Original Article

The effect of multi-wall carbon nanotubes on sex hormone levels and ovarian tissue in female Wistar rats

Vaziri-Katehshori N, Noori A*

Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, I. R. Iran

Received March 31, 2017; Accepted October 29, 2017

Abstract:

Background: Due to the application of carbon nanotubes in biological fields and the possibility of their toxic effects, this study was conducted to examine the toxic effect of multi-wall carbon nanotubes on ovaries in rats.

Materials and Methods: In this experimental study, 50 rats were studied as follows: control group received normal saline, and experimental groups received the concentrations of 2.5, 5, 10, 20 mg/kg of multi-wall carbon nanotubes functionalized with the carboxylic group in 8 steps intraperitoneally. Blood samples were collected in two phases (one day and 20 days after the last injection) and the serum hormone levels of FSH, LH, estrogen, and progesterone and also the amount of malondialdehyde were measured. In addition, the tissue sections of ovary were stained by hematoxylin-eosin and studied.

Results: The results of the first stage showed a significant reduction in all hormones in all concentrations in the experimental group compared to the control group. In the second stage, the level of FSH increased significantly in exposure to 10 and 20mg/kg concentrations of nanotubes and the estrogen level increased by 20mg/kg concentration of nanotubes, but the LH and progesterone hormones showed no significant change compared to the control group. There was no significant difference in the mean weight of the rats and the amount of malondialdehyde during the experiment. The histological results showed degradation of the granular layer, absence of corpus luteum and non-oocyte follicles in exposure to 10 and 20mg/kg concentrations of carbon nanotubes.

Conclusion: It seems that carbon nanotubes, along with probable accumulation in the ovary, with the effect of oxidative stress, affect the level of sex hormones and cause disorders in the ovarian tissue.

Keywords: Multi-wall carbon nanotubes, Ovary, Toxicity, Hormone

* **Corresponding Author.**
Email: ali.noori55@gmail.com
Tel: 0098 913 169 9182
Fax: 0098 313 743 0135

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, February, 2018; Vol. 21, No 6, Pages 525-533

Please cite this article as: Vaziri-Katehshori N, Noori A. The effect of multi-wall carbon nanotubes on sex hormone levels and ovarian tissue in female Wistar rats. ***Feyz*** 2018; 21(6): 525-33.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-15]

بررسی تاثیر نانولوله‌های کربن چنددیواره بر میزان هورمون‌های جنسی و بافت تخمدان در موش‌های صحرایی ماده نژاد ویستار

نرگس وزیری کته شوری [۱]، علی نوری [۲*]

خلاصه:

سابقه و هدف: با توجه به کاربرد نانولوله‌های کربن در زمینه‌های بیولوژیک و احتمال ایجاد اثرات سمی توسط آنها، در این تحقیق اثر سمیت نانولوله‌های کربنی چنددیواره بر تخمدان موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی ۵۰ سر موش صحرایی به شرح ذیل وارد مطالعه شدند: گروه شاهد سرم فیزیولوژی و گروه‌های تیمار با غلظت‌های mg/kg ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ از نانولوله‌های کربن چنددیواره عامل‌دار شده با گروه کربوکسیل را طی ۸ مرحله به‌صورت درون صفاقی دریافت کردند. خون‌گیری در دو مرحله (یک روز و ۲۰ روز پس از آخرین تزریق) انجام شد و سطح سرمی هورمون‌های FSH، LH، استروژن و پروژسترون و همچنین میزان مالون‌دی‌آلدئید اندازه‌گیری شد. به‌علاوه، مقاطع بافتی با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین از تخمدان تهیه و مطالعه گردید.

نتایج: نتایج مرحله اول کاهش معنی‌دار میزان تمام هورمون‌ها را در همه غلظت‌ها نسبت به گروه شاهد نشان داد. در مرحله دوم میزان هورمون FSH در مواجهه با غلظت‌های mg/kg ۱۰ و ۲۰ نانولوله و میزان هورمون استروژن در مواجهه با غلظت ۲۰mg/kg به‌طور معنی‌دار افزایش یافت، ولی هورمون‌های LH و پروژسترون تغییر معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان ندادند. میانگین وزن حیوانات و مقدار مالون‌دی‌آلدئید در طول آزمایش اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. نتایج بافت شناسی تحلیل رفتن لایه دانه‌دار، فقدان جسم زرد، و فولیکول‌های فاقد اووسیت را در مواجهه با غلظت‌های ۱۰mg/kg و ۲۰ نانولوله کربن نشان داد.

نتیجه‌گیری: به‌نظر می‌رسد نانولوله‌های کربن ضمن تجمع احتمالی در تخمدان و با ایجاد فشارهای اکسیداتیو سبب تغییر میزان هورمون-های جنسی و ایجاد اختلالاتی در بافت تخمدان می‌شوند.

واژگان کلیدی: نانولوله‌های کربن چنددیواره، تخمدان، سمیت، هورمون

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره بیست و یکم، شماره ۶، بهمن و اسفند ۱۳۹۶، صفحات ۵۳۳-۵۲۵

مقدمه

یکی از پرکاربردترین ساختارهای مورد بحث در فن‌آوری نانو که به عرصه علوم زیستی وارد شده است، نانولوله‌های کربنی (CNTs=carbon nanotubes) هستند. نانولوله‌های کربنی تک-دیواره صفحات گرافن پیچ‌خورده با نسبت طول به قطر ۱۰۰۰ هستند و ساختارشان نزدیک به حالت تک‌بعدی است، ولی نانو-لوله‌های کربنی چنددیواره بزرگ‌تر بوده و دارای چندین لوله تک-دیواره تودرتو هستند [۱]. نانولوله‌های کربن دارای خواص فیزیکی و شیمیایی ویژه از قبیل هدایت حرارتی، الکتریکی، مغناطیسی و نوری می‌باشند [۲]. در سایر علوم نیز از جمله در دارورسانی، نانو-پزشکی و زیست مولکولی دارای اهمیت می‌باشند [۴،۳].

نانولوله‌های کربنی به‌طور وسیع از سال ۲۰۰۴ به‌عنوان حمل‌کننده-های دارویی برای نقل و انتقال درون سلولی داروهایی نظیر دارو-های شیمی‌درمانی، ژن‌ها و پروتئین‌ها مورد توجه قرار گرفته‌اند [۴]. باتوجه به استفاده روبه‌رشد این مواد و افزایش به‌کارگیری آن-ها توسط انسان در حیطه پزشکی و دارورسانی، دانشمندان معتقدند که واکنش‌های سمیتی درخصوص نانولوله‌های کربنی همانند سایر نانوذرات دیگر وجود دارد و بررسی سمیت آن‌ها ضروری است [۶،۵]. میزان سمیت نانولوله‌های کربنی به ویژگی‌های فیزیکی متعدد آن‌ها مانند طول، قطر، سطح، تمایل به متراکم شدن و همچنین گروه‌های عاملی شیمیایی بستگی دارد و معمولا شبیه نانو-ذرات دیگر، مهم‌ترین مکانیسم ایجاد سمیت توسط نانولوله‌های کربن، تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و ایجاد فشارهای اکسیداتیو است که به روش‌های مختلف سبب تخریب سلول‌ها و بافت‌ها می‌گردد. همچنین، احتمال مرگ سلولی در نتیجه برهم‌کنش نانو-لوله‌های کربنی با پروتئین‌ها وجود دارد. از دیگر مکانیسم‌های ایجاد سمیت توسط نانولوله‌های کربن، نفوذ به داخل سلول‌ها و ایجاد اختلال در عملکرد اسکلت سلولی و همچنین تاثیر بر عملکرد فاکتورهای نسخه برداری و ژن‌ها است [۷-۹]. بررسی‌های

[۱] کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

[۲] استادیار، گروه زیست شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

* **نشانی نویسنده مسئول:** اصفهان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان

تلفن: ۰۹۱۳۱۶۹۹۱۸۲ **دورنویس:** ۰۳۱۳۷۴۳۰۱۳۵

پست الکترونیک: alinoori55@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱/۱۱ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۱۳۹۶/۸/۷

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-15]

علمی حاکی از آن است که نانولوله‌های کربن باعث ایجاد کاهش در تکثیر سلول‌ها، آپوپتوز و نکروز می‌شوند. برخی تحقیقات نشان می‌دهد که یکی از راه‌های میزان کم شدن سمیت نانولوله‌های کربن استفاده از پوشش سطحی یا گروه‌های عاملی روی نانولوله‌ها است [۱۲-۱۰]. نانولوله‌های کربن در محیط‌های آبی حل نمی‌شوند و به‌همین دلیل کاربرد آن‌ها در زمینه‌های شیمیایی و بیولوژیکی با مشکل روبه‌رو می‌شود [۱۳]. بنابراین با افزودن گروه‌های عاملی نظیر کربوکسیل به ساختار نانولوله‌های کربن علاوه بر کاهش سمیت، حلالیت آن‌ها افزایش پیدا کرده و می‌توان از آن‌ها در انتقال دارو استفاده کرد [۱۴]. در یک مطالعه سمی بودن نانو-لوله‌های کربنی برای بافت ریه تایید شده است [۱۵]. درواقع این نانولوله‌ها سبب تشکیل گرانولوماس در ریه و مرگ و میر در موش‌های صحرائی به‌علت ایجاد انسداد مسیرهای هوایی می‌شوند [۱۶]. Rajagopalan و همکاران نشان داده‌اند که نانولوله‌های کربن چنددیواره با نسبت ابعاد بالا سبب افزایش نوتروفیل‌ها یا ترشح پروتئین‌ها (مایعات غنی از پروتئین و عناصر سلولی که به-علت التهاب وارد جریان خون می‌گردند) شده و سبب التهاب و واکنش‌های فیبروزی می‌گردند [۱۷]. نشان داده شده است تزریق درون‌صفاقی نانولوله‌های کربن تک‌دیواره عامل‌دارشده با گروه کربوکسیل در دوزهای بالا روی بافت کبد، سبب تخریب هپاتوسیت‌ها و واکوئله شدن و آتروفی شدن بافت کبد می‌شود [۱۸]. Qi و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان داده‌اند که تزریق نانو-لوله‌های کربنی چنددیواره از راه وریدی به موش‌های باردار در دوره‌های مختلف بارداری سبب ایجاد اثرات مخرب بر جفت و تاخیر در رشد مغز و قلب جنین‌ها می‌شود؛ به‌طوری‌که این اثرات در اولین دوره بارداری شدید بوده، اما در دوره‌های دوم و سوم کاهش می‌یابد. همچنین، میزان سقط جنین در بار اول، دوم و چهارم در موش باردار به‌ترتیب ۷۰، ۴۰ و ۵۰ درصد بوده است. به‌علاوه، کاهش میزان پروژسترون و افزایش استرادیول در مادران مشاهده شده است [۱۹]. در تحقیقات دیگر مشخص گردیده است که خاصیت سمی نانولوله‌های کربن تاثیرات منفی بر قابلیت تولید مثل در جنس ماده و همچنین بر تکامل جنین می‌گذارد [۲۱،۲۰]. باتوجه به این اثرات منفی، Wang و همکاران در سال ۲۰۱۴ به بررسی سمیت نانولوله‌های کربنی چندلایه پوشش‌دهی‌شده با Bisphenol A در ارتباط با غدد درون‌ریز پرداخته و به این نتیجه رسیدند که پوشش‌دهی نانولوله‌ها به‌وسیله مواد مختلف ممکن است باعث تغییر در روند ایجاد سمیت آن‌ها گردد و همچنین پوشش-دهی نانولوله‌های کربنی باعث کاهش سمیت آن‌ها در طول دوران بارداری و رشد جنین می‌شود [۲۲]. در تحقیق حاضر اثر سمیت غلظت‌های مختلف نانولوله‌های کربن چنددیواره عامل‌دار شده با گروه کربوکسیل بر تغییرات میزان هورمون‌های جنسی در موش-های صحرائی ماده و بافت تخمدان مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

تعداد ۵۰ سر موش صحرایی ماده بالغ نژاد ویستار با میانگین وزن ۱۸۰ گرم از دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان خریداری شده و در شرایط آزمایشگاهی با دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۲ ساعت روشنایی- ۱۲ ساعت تاریکی به‌منظور سازگاری با محیط نگه‌داری شدند. تحقیق حاضر در لانه حیوانات دانشگاه آزاد فلاورجان در سال ۱۳۹۵ انجام شد. آزمایشات مورد تایید شورای پژوهشی دانشگاه قرار گرفت و بر-طبق دستورالعمل‌های اخلاقی انجمن بین‌المللی مطالعه درد در مورد حیوانات آزمایشگاهی انجام شد [۲۳]. حیوانات در طول مطالعه دسترسی کافی به آب و غذا داشتند. در این تحقیق نانو-لوله‌های کربن چنددیواره عامل‌دار شده با گروه کربوکسیل با قطر کمتر از ۸ نانومتر، طول ۳۰ میکرومتر و درجه خلوص ۹۵ درصد از شرکت نوترینو تهران خریداری شد. برای به‌دست آوردن محلولی نسبتاً یکنواخت از نانولوله‌های کربن، از توین ۸۰ درصد و سرم فیزیولوژی (نسبت یک به صد) به‌عنوان حلال استفاده گردید و غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از آن [۵،۱۰،۱۲] تهیه شد. در این آزمایش از توئین ۸۰ درصد برای تهیه کردن سوسپانسیون یکنواخت استفاده گردید؛ چراکه عدم وجود توئین و صرفاً استفاده از سرم فیزیولوژیک سبب رسوب فوری نانولوله‌ها شده و امکان تزریق و تهیه محلول یکنواخت و هموژن وجود ندارد. حیوانات به‌صورت تصادفی به پنج گروه ۱۰تایی تقسیم شدند [۱۲،۱۰]: چهار گروه به‌ترتیب غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر گیلوگرم وزن بدن نانولوله کربن و گروه پنجم به‌عنوان گروه شاهد سرم فیزیولوژی به‌همراه توئین دریافت کردند. باتوجه به این‌که نتایج گروه‌های تجربی (گروه‌هایی که نانولوله‌های کربن دریافت کردند) با گروه شاهد مقایسه گردید، گروه کنترل در نظر گرفته نشد [۲۴]. سپس، نانولوله‌های کربن طی ۸ مرحله به-صورت یک‌روز درمیان و به شیوه درون‌صفاقی به موش‌ها تزریق شد. یک روز پس از آخرین تزریق، مرحله اول خون‌گیری از گوشه چشم انجام شد. پس از آن حیوانات در شرایط استاندارد با دسترسی به آب‌وغذای کافی به‌مدت ۲۰ روز در لانه حیوانات نگهداری شدند و پس از آن خون‌گیری مستقیم از قلب انجام شد. سپس، مقدار هورمون‌های FSH، LH، استروژن و پروژسترون توسط دستگاه Cobas E411 و کیت هورمونی Monobind

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-15]

ساخت کشور آمریکا اندازه‌گیری شدند. همچنین میزان مالون دی-آلدئید در نمونه‌های خونی ۲۰ روزه (مرحله دوم) با استفاده از کیت MDA ساخت کشور آلمان و به روش اسپکتروفتومتری تیو-باربیتوریک اسید اندازه‌گیری گردید. پس از خون‌گیری مرحله دوم، از هر گروه سه سر موش تشریح شده و از هر تخمدان سه عدد لام مقاطع بافتی به‌روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین تهیه گردید. ساختار بافتی تخمدان توسط میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین روی تمام لام‌ها مورد بررسی قرارگرفت و به‌عنوان نمونه تعدای از عکس‌های تهیه شده با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ در بخش نتایج آورده شد. تمام حیوانات قبل از اولین تزریق و قبل از خونگیری توزین شده و میانگین وزن آن‌ها بین گروه‌های مختلف مورد مقایسه قرار گرفت. میانگین هورمون‌ها و مالون دی‌آلدئید و تغییرات وزن موش‌ها در گروه‌های تیمار و شاهد توسط آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آنالیز واریانس چندمتغیره (One-Way ANOVA, MANOVA) و تست دانکن با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۷ مورد مقایسه قرار گرفت [۲۴،۲۰] و سطح $P<۰/۰۵$ تفاوت معنی‌دار در نظر گرفته شد. مقایسه میانگین وزن در دو زمان (قبل از تزریق و قبل از خونگیری) با استفاده از آزمون t زوجی صورت گرفت.

نتایج

آزمون t زوجی نشان داد که میانگین وزن بدن موش‌ها قبل از تزریق نانولوله‌های کربن و قبل از خونگیری بین گروه‌های مختلف تیمار و شاهد اختلاف معنی‌داری ندارد؛ به‌عبارت دیگر تزریق نانولوله کربن اثری بر تغییرات وزن حیوانات نداشته است (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱- میانگین وزن بدن قبل از تزریق و قبل از خونگیری در گروه‌های مختلف مطالعه

غلظت نانولوله‌های کربن (mg/kg)	وزن قبل از تزریق (g)	وزن قبل از خونگیری (g)
شاهد	۱۶۸٫۷±۲۳/۳	۱۷۵٫۷±۲۰/۴
۲/۵	۱۷۳±۹/۴	۱۷۸±۱۳/۱
۵	۱۸۷±۱۴/۱	۱۹۳±۱۱/۵
۱۰	۱۸۸±۷/۸	۱۸۵±۱۵/۳
۲۰	۱۹۶±۱۵	۱۹۵±۹/۷
P	$P>۰/۰۵$ ،F=۵/۴۸۹	$P>۰/۰۵$ ،F=۲/۴۵۶

همچنین، اختلاف معنی‌داری در میزان مالون دی‌آلدئید بین گروه-های مختلف تیمار نسبت به گروه شاهد وجود نداشت؛ به‌عبارت دیگر تزریق نانولوله‌های کربن چنددیواره عامل‌دار شده به گروه کربوکسیل درصورتی‌که فشارهای اکسیداتیو هم ایجاد کرده باشد، بر میزان مالون دی‌آلدئید بی‌تاثیر بوده است (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲- مقایسه میزان مالون دی‌آلدئید در گروه‌های مطالعه

غلظت نانولوله‌های کربن (mg/kg)	مقدارمالون دی‌آلدئید (nmol/ml)
شاهد	۱۳/۴۵±۲/۲۲
۲/۵	۸/۲۵±۳/۳۵
۵	۱۱/۹۱±۶/۲۲
۱۰	۱۰/۶۰±۶/۸۲
۲۰	۱۰/۷۳±۶/۹۶
P	$F=۵۶۷/۹$ ،$P>۰/۰۵$

تغییرات هورمونی در مرحله اول (۲۴ ساعت پس از آخرین تزریق) به‌صورت کاهش معنی‌دار در میزان هورمون‌های FSH ($P<۰/۰۱$)، LH ($P<۰/۰۵$)، استروژن ($P<۰/۰۰۱$) و پروژسترون ($P<۰/۰۱$) در گروه‌های تیمار نسبت به گروه شاهد مشاهده شد که البته وابسته به دوز نبود (جدول شماره ۳، MANOVA). در مرحله دوم (۲۰ روز پس از آخرین تزریق) میانگین مقادیر LH و پروژسترون با گذشت ۲۰ روز از تیمار به حالت طبیعی باز گشت؛ به‌طوری‌که مقادیر این دو هورمون در گروه‌های تیمار با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت، درحالی‌که میزان هورمون FSH در دو غلظت بالا (۱۰ mg/kg و ۲۰) افزایش معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها نشان داد ($P<۰/۰۱$)، ولی در غلظت‌های پایین (۵ mg/kg و ۲/۵) به حالت طبیعی بازگشت. میزان هورمون استروژن نیز افزایش معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) در غلظت حداکثر (۲۰ mg/kg) نسبت به سایر گروه‌ها نشان داد، ولی در سایر غلظت‌ها به‌حالت طبیعی بازگشته بود (جدول شماره ۴، MANOVA). باتوجه به بررسی‌هایی که روی تعداد زیادی از لام‌های رنگ‌آمیزی شده با روش هماتوکسیلین – ائوزین صورت گرفت، مشاهده شد که تغییر معنی‌داری در بافت تخمدان در دو غلظت ۲/۵ mg/kg و ۵ نسبت به شاهد به‌وجود نیامده است (شکل‌های شماره ۱، ۲ و ۳)، اما در گروه دریافت‌کننده نانولوله کربن با غلظت ۱۰ mg/kg در فولیکول گراف نشانه‌هایی از تحلیل رفتن لایه‌ی دانه‌دار دیده می‌شد که سبب کاهش ضخامت آن شده بود (شکل شماره ۴). چنین اختلالی در غلظت ۲۰ mg/kg نیز همراه با دژنره شدن و تخریب ضعیف در لایه دانه‌دار دیده شد (شکل شماره ۵). در هر دو غلظت ۱۰ mg/kg و ۲۰ باتوجه به مطالعه تعداد زیادی از مقاطع، بسیاری از فولیکول‌ها فاقد اووسیت بودند که چنین حالتی در گروه شاهد و غلظت‌های ۲/۵ mg/kg و ۵ دیده نشد. همچنین، در این دو غلظت تخمدان‌ها فاقد جسم زرد

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-15]

بودند که احتمالا دلیلی بر وقفه و اختلال در تخمک گذاری می-باشد. در برخی نمونه‌ها در هر دو دوز ۱۰ و mg/kg ۲۰ هیچ نشانه‌ای از فولیکولوژنز و رشد فولیکول‌ها مشاهده نشد و تخمدان-ها ظاهرا غیرفعال بوده و آتروفی شدید نشان دادند (شکل‌های شماره ۴ و ۵).

جدول شماره ۳- میانگین میزان هورمون‌ها در گروه‌های مطالعه یک روز بعداز آخرین تزریق (MANOVA)

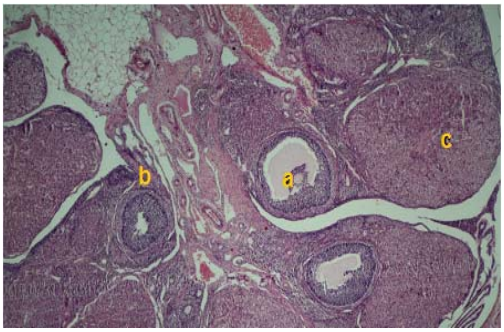
غلظت نانولوله های کربن (mg/kg)	FSH (mIU/ml)	LH (mIU/ml)	Strogen (pg/ml)	Progestron (ng/ml)
شاهد	۰/۹۱±۰/۳۹	۰/۹۲±۰/۲۸	۱/۰۶±۰/۵۲	۰/۹۵±۰/۴۱
۲/۵	**۰/۵۳±۰/۲۲	*۰/۶۵±۰/۲۵	***۰/۵۰±۰/۱۶	**۰/۷۱±۰/۲۷
۵	**۰/۴۳±۰/۲۶	*۰/۶۳±۰/۲۹	***۰/۴۶±۰/۱۶	**۰/۵۳±۰/۱۴
۱۰	**۰/۵۵±۰/۲۵	*۰/۵۵±۰/۱۹	***۰/۶۱±۰/۱۱	**۰/۶۲±۰/۱۷
۲۰	**۰/۴۴±۰/۲۲	*۰/۶۰±۰/۲۸	***۰/۵۹±۰/۱۸	**۰/۵۳±۰/۲۳
P value	P<۰/۰۱ F=۴/۸۵۹	P<۰/۰۵ F=۲/۹۰۶	P<۰/۰۰۱ F=۷/۵۱۲	P<۰/۰۱ F=۴/۳۵۵

*** نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در حد P<۰/۰۰۱، ** نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در حد P<۰/۰۱ و * نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در حد P<۰/۰۵ در گروه‌های تیمار - نسبت به گروه شاهد

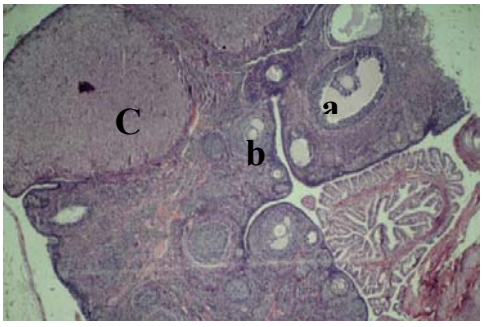
جدول شماره ۴- میانگین میزان هورمون‌ها در گروه‌های مطالعه ۲۰ روز بعداز آخرین تزریق (MANOVA)

غلظتmg/kg	FSH(miu/ml)	LH(miu/ml)	Stogen(pg/ml)	Progestron(ng/ml)
شاهد	۰/۸۹±۰/۴۴	۱/۰۳±۰/۴۲	۱/۱۸±۰/۵۵	۰/۹۵±۰/۲۷
۲/۵	۱/۳۱±۰/۳۳	۱/۴۲±۰/۴۸	۱/۰۹±۰/۱۶	۱/۱۹±۰/۴۱
۵	۱/۲۲±۰/۴۴	۱/۲۷±۰/۴۱	۱/۲۹±۰/۲۱	۱/۲۳±۰/۴۳
۱۰	**۱/۷۳±۰/۵۶	۱/۴۸±۰/۶۴	۱/۰۳±۰/۲۸	۰/۹۷±۰/۳۵
۲۰	**۱/۶۱±۰/۵۱	۱/۲۰±۰/۳۸	*۱/۵۵±۰/۴۱	۱/۱۵±۰/۳۱
P value	P<۰/۰۱ F=۵/۰۱۴	P>۰/۰۵ F=۱/۳۸۵	P>۰/۰۵ F=۳/۲۴۶	P>۰/۰۵ F=۱/۲۹۳

** نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در حد P<۰/۰۱ و * نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در حد P<۰/۰۵ در گروه‌های تیمار نسبت به گروه شاهد

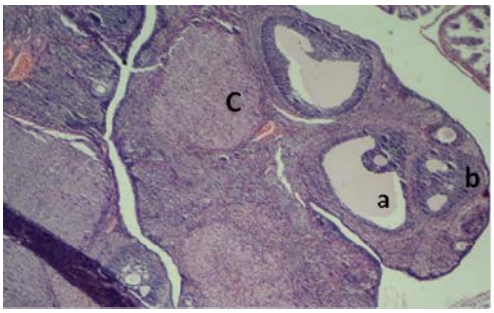


شکل شماره ۱- مقطع بافت تخمدان با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین در گروه شاهد: a: فولیکول گراف دارای اووسیت، b: فولیکول در حال رشد، c: جسم زرد. بزرگ‌نمایی ×۱۰۰

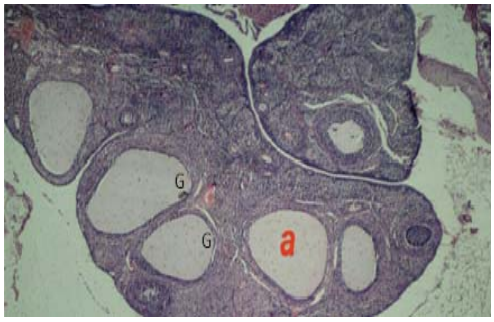


شکل شماره ۲- مقطع بافت تخمدان با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین در گروه تیمار غلظت mg/kg۲/۵: در این تصویر وضعیت بافت تخمدان طبیعی است. a: فولیکول گرآاف دارای اووسیت، b: فولیکول در حال رشد، C: جسم زرد. بزرگ‌نمایی ×۱۰۰

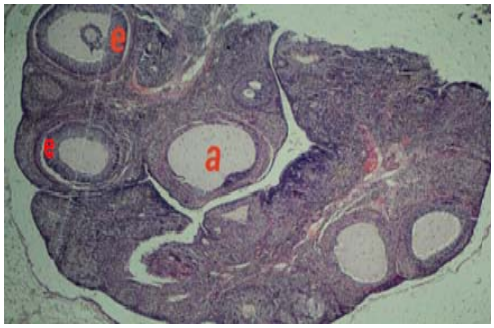
[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-15]



شکل شماره ۳- مقطع بافت تخمدان با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین در گروه تیمار غلظت ۵mg/kg: a: فولیکول گراآف دارای اووسیت، b: فولیکول در حال رشد، C: جسم زرد. وضعیت بافت طبیعی است. بزرگ‌نمایی×۱۰۰



شکل شماره ۴- مقطع بافت تخمدان با رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین در گروه تیمار غلظت ۱۰ mg/kg: فولیکول گراآف فاقد اووسیت (a) و لایه دانه دار تحلیل رفته (G) همراه با فقدان جسم زرد. بزرگ‌نمایی×۱۰۰



شکل شماره ۵- مقطع بافت تخمدان با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین در گروه تیمار غلظت ۲۰ mg/kg: فولیکول‌های فاقد اووسیت (a) لایه دانه‌دار در برخی نقاط تخریب و دژنره شدن ضعیف را نشان می‌دهد که سبب ایجاد شکاف در آن شده است (e). جسم زرد دیده نمی‌شود. بزرگ‌نمایی×۱۰۰

بحث

مطالعه در زمینه سمیت نانولوله‌های کربن باتوجه به ویژگی‌های منحصر به‌فرد این ذرات به‌ویژه قطر، طول و گروه‌های عاملی و کاربرد وسیع آن‌ها در زمینه‌های مختلف پزشکی، بیو- لوژیک و صنعتی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است [۳] و از- آنجایی‌که یکی از مهم‌ترین و حساس‌ترین اندام‌های بدن سیستم هورمونی و تولید مثلی می‌باشد [۲۰]. در مطالعه حاضر سمیت نانو- لوله‌های کربن چنددیواره با قطر کمتر از ۸ نانومتر، طول ۳۰ میکرومتر و عامل‌دار شده با گروه‌های کربوکسیل بر تغییرات هورمون‌های جنسی و ساختار بافتی تخمدان مورد مطالعه قرار گرفت. در تحقیق حاضر میانگین وزن موش‌های صحرائی بین گروه‌های تیمار و گروه کنترل اختلاف معنی‌داری نداشت که نشان- دهنده عدم تأثیر نانولوله‌های کربن چنددیواره بر رشد و افزایش وزن حیوانات است و با نتایج تحقیقی که توسط Sakamoto و همکاران در سال ۲۰۰۹ انجام گرفت، هم‌خوانی دارد [۲۵]. میزان مالون دی‌آلدئید در گروه‌های تیمار نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت؛ به‌عبارت دیگر تزریق نانولوله‌های کربن در- صورتی‌که فشارهای اکسیداتیو هم ایجاد کرده باشد، بر میزان مالون دی‌آلدئید بی‌تاثیر بوده است. نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعه Smart و همکاران که در مورد مالون دی‌آلدئید هیچ اختلاف معنی‌داری در گروه شاهد نسبت به گروه کنترل پیدا نکردند، مطابقت دارد [۲۶]. همچنین، مطالعه Yang و همکاران در ارتباط با سمیت نانولوله‌های کربنی چنددیواره (MWCNTs) بر بافت ریه و باروری موش‌های ماده آزمایشگاهی نشان داد که میزان مالون دی‌آلدئید در موش‌های مورد مطالعه تغییری نکرده است [۲۷]؛ هرچند در برخی مطالعات با کاربرد دوزهای متفاوتی از نانو- لوله‌های کربن با ابعاد و گروه‌های عاملی مختلف، افزایش معنی‌دار مقدار مالون دی‌آلدئید گزارش شده است که نشان‌دهنده پراکسید- اسیون لیپیدها تحت تأثیر این ذرات است [۳۰-۲۸]. در مرحله اول (یک روز پس از تزریق) میزان هورمون FSH کاهش معنی‌داری داشت ($P<۰/۰۱$)، اما در مرحله دوم (۲۰ روز پس از تزریق) در دو دوز بالا (۱۰ mg/kg و ۲۰) افزایش معنی‌داری داشت ($P<۰/۰۱$) و در دوزهای پایین (۵ mg/kg و ۲/۵) به حالت طبیعی برگشت. در مطالعه Yang و همکاران پس از تزریق نانو- لوله‌های کربنی چنددیواره سطح FSH به‌شدت کاهش یافت که دلیل آن را اثر احتمالی نانولوله‌های کربنی بر بیان ژن *Star* می- دانند و این امکان وجود دارد که با افزایش بیان این ژن، پروتئین Star مانع انتقال کلسترول به غشاء داخل میتوکندری شده و در- نهایت از تبدیل کلسترول به پروگنولون جلوگیری کرده و باعث کاهش میزان این هورمون شده باشد [۳۱]. اما افزایش معنی‌دار FSH در مرحله دوم (۲۰ روز پس از تزریق) در دو دوز بالا (۱۰ و ۲۰ mg/kg) را می‌توان به تاثیر این نانوذرات بر افـــزایش رونویســـی mRNA پـــروتئین تنظیم‌کننده حاد استروئیدساز

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-15]

تخمدان دانست که این افزایش توانایی زنـده مانـدن سلول‌های تخمدان و تولید هورمون‌های اسـتروئیدی را تحـت تأثیر قرار می‌دهد [۳۲]؛ این نتیجه در مورد غلظت‌های ۲/۵ و ۵ ممکن است رخ نداده باشد که به‌هرحال نشان‌دهنده نوعی اثر وابسته به دوز است. میزان هورمون LH ($P<۰/۰۵$)، استروژن ($P<۰/۰۰۱$) و پروژسترون ($P<۰/۰۱$) در مرحله اول کاهش معنی‌دار داشت که وابسته به دوز نبود، ولی در مرحله دوم میانگین مقادیر LH و پروژسترون با گذشت ۲۰ روز از تیمار به حالت طبیعی بازگشت؛ به‌عبارت دیگر با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت. هورمون استروژن در دوز حداکثر (۲۰ mg/kg) افزایش معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) داشت، ولی در سایر دوزها به حالت طبیعی بازگشت. نتیجه مطالعه حاضر در مرحله اول با نتایج مطالعه Bai و همکاران مطابقت دارد که به بررسی اثر نانولوله‌های کربن با غلظت ۱۰ تا ۱۰۰ ppm روی ۴۰ موش ماده پرداختند و بعد از ۱۴ روز با کاهش میزان استروژن، پروژسترون، FSH و LH روبه‌رو شدند [۳۳]. چنین تغییراتی را می‌توان به جذب درون سلولی نانولوله‌های کربن و تأثیر احتمالی آن‌ها بر ژن‌های متعدد نسبت داد [۳۴]. بر-خلاف هورمون استروژن که بعد از ۲۰ روز از تزریق آخر اختلاف معنی‌داری در غلظت بالا نشان داد، هورمون پروژسترون تغییر معنی‌داری را در گروه‌های دریافت کننده نانولوله‌های کربن در غلظت‌های مختلف نشان نداد، که ممکن است به‌دلیل اثرات طبیعی آنتاگونیستی پروژسترون بر استروژن باشد؛ بدین‌معنی که به تعادل و خنثی کردن تاثیرات قدرتمند استروژن اضافی در مردان و زنان کمک می‌کند و به‌عنوان یک هورمون تنظیم کننده شناخته می‌شود؛ ازآنجاکه نانولوله‌های تزریق شده روی میزان هورمون استروژن در دوز ۲۰ mg/kg تاثیرگذار بوده، هورمون پروژسترون با عدم تغییر-پذیری در این سطح از میزان اثر سمی و خطرناک استروژن کاسته است. زیاد شدن سطح استروژن در بدن موجودات زنده منجر به برخی اختلالات همچون ناباروری، پستان فیبروکیستیک، سقط جنین‌های مکرر، فیبروئیدهای رحمی و اندومتریوز و هم‌چنین ابتلا به سرطان‌های مختلف می‌شود [۳۳،۳۲]. براسـاس نتایج بافت-شناسی این مطالعه مشخص گردید که نانولوله‌های کربن چند-دیواره کربوکسیلیک در دو غلظت ۱۰ و ۲۰ mg/kg سبب ایجاد اختلالاتی نظیر تحلیل و دژنره شدن لایه دانه‌دار، کاهش جسم زرد و فقدان احتمالی اووسیت در فولیکول‌های گرافآف شده که این تغییرات را می‌توان به تجمع احتمالی نانولوله‌ها در تخمدان، ایجاد رادیکال‌های آزاد اکسـیژن و اختلال در مسـیرهای اکسـیداتیو سلولی نسبت داد که نتیجه آن کاهش تعداد فولیکول‌ها و اجسام زرد بوده است. از طرف دیگر با تخریـب میکروفیلامنت‌ها به-دنبال تجمع کربن، تعداد فولیکول‌های آترتیک افزایش می‌یابد که این حالت می‌تواند تأثیر منفی بر باروری و تخمک گذاری موش-های ماده ایجاد کند [۲۳]. باتوجه به این‌که در دوز ۲۰ تقریبا در هیچ‌یک از مقاطع جسم زرد این اتفاقات مشاهده نشد، به احتمال زیاد نشانه‌ای بر عدم تخمک گذاری است و می‌توان نتیجه گرفت که اثرات سمی نانولوله‌های کربن بر بافت تخمدان نوعی اثر وابسته به دوز بوده است. استرس اکسیداتیو تولید شده ناشی از تزریق نانولوله‌های کربنی از طریق تولید رادیکال‌های آزاد سبب تخریب بافت تخمدان گردیده و با ایجاد رادیکال آزاد موجب القای مرگ سلولی می‌شوند. لذا ممکن است نانولوله‌های کربنی به-طور مستقیم روی بافت‌ها و سلول‌های جنسی اثر گذاشته و سبب آسیب در ساختار بافتی تخمدان و رده‌های مختلف سلولی و اختلالات هورمونی شود و یا اینکه با فسفریلاسیون جایگاه فعال آنزیم کولین‌استراز، اثر آن را غیرفعال ساخته و با پراکسیداسیون لیپیدها، به دستگاه تولید مثلی آسیب برساند [۲۲]. در مطالعات مختلف مشخص گردیده است که چندین نانوذره تاثیرات منفی بر قابلیت تولید مثل جنس ماده داشته و همچنین تاثیرات منفی بر تکامل جنین می‌گذارند و این تاثیرات منفی با ساختار ترکیبی نانو-ذره، شکل و اندازه نانوذره، تغییر دوز، مسیر در معرض قرارگیری و گونه‌های جانوری مرتبط هستند [۳۵]. باتوجه به بازگشت میزان هورمون‌های LH و پروژسترون به‌حالت طبیعی پس از گذشت ۲۰ روز از تیمار در تمام غلظت‌ها و همچنین بازگشت مقادیر FSH در غلظت‌های ۲/۵ و ۵ و مقدار استروژن در غلظت‌های ۲/۵، ۵ و ۱۰ mg/kg به‌حالت طبیعی پس از گذشت ۲۰ روز از آخرین تزریق، احتمالا اثرات سمی نانولوله‌های کربن چنددیواره کربو-کسیلیک با گذشت زمان به‌تدریج کاهش می‌یابد، اما از طرف دیگر اختلالات تخمدان در غلظت‌های بالا پس از گذشت ۲۰ روز از تیمار همچنان باقی است. بنابراین نمی‌توان با اطمینان از کاهش سمیت نانولوله‌های کربن در مدت ۲۰ روز صحبت کرد و تحقیقات بیشتری در این زمینه لازم است.

نتیجه‌گیری

به‌نظر می‌رسد نانولوله‌های کربنی چنددیواره ضمن تجمع احتمالی در تخمدان با ایجاد فشارهای اکسیداتیو بر محور هیپوفیز-گناد اثر گذاشته و سبب تغییر میزان هورمون‌ها و همچنین باعث ایجاد اختلالاتی در بافت تخمدان می‌شود که احتمالا این اثرات با گذشت زمان کمتر می‌شوند. به‌هرحال، باتوجه به این‌که تزریق نانو-لوله‌های کربن چنددیواره در شرایط درون‌تنی بافت هدف مشخصی را دنبال نمی‌کند و امکان جذب این نانوذرات به‌هریک از اندام‌های

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-15]

بدن وجود دارد و از طرفی سیستم‌های تنظیم هورمونی و تولید مثل بسیار پیچیده‌اند، نمی‌توان با اطمینان مسیر دقیق سمیت نانولوله‌های کربن بر تغییرات رخ داده در تحقیق حاضر را دنبال کرد و برای این منظور لازم است تحقیقات بیشتری با استفاده از نانولوله‌های کربنی نشان‌دار و هدف‌گذاری شده انجام شود، تا بتوان مسیرهای عبور و نفوذ آن‌ها را در اندام‌های مختلف و حتی سلول‌ها بررسی کرد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان اصفهان انجام گرفته و بدین‌وسیله از مسئولین محترم این مراکز قدردانی می‌گردد. این مقاله حاصل از پایان‌نامه دانشجویی است.

References:

[1] Hamers B, ST PJ, Veld M. The Wondrous World of Carbon Nanotubes. Eindhoven University of Technology: Eindhoven, The Netherlands. 2003.

[2] Pastorin G. Crucial functionalizations of carbon nanotubes for improved drug delivery: a valuable option? ***Pharmaceutical Res*** 2009; 26(4): 746-69.

[3] Foldvari M. Formulating nanomedicines: focus on carbon nanotubes as novel nanoexcipients. ***Key Engineering Materials*** 2010; 441: 53-74.

[4] Foldvari M, Bagonluri M. Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines: I. Pharmaceutical properties. ***Nanomedicine*** 2008; 4(3): 173-82

[5] Kolosnjaj-Tabi J, Hartman KB, Boudjemaa S, Ananta JS, Morgant G, Szwarc H, et al. In vivo behavior of large doses of ultrashort and full-length single-walled carbon nanotubes after oral and intraperitoneal administration to Swiss mice. ***Acs Nano*** 2010; 4(3): 1481-92.

[6] Zhang Y, Wang B, Meng X, Sun G, Gao C. Influences of acid-treated multiwalled carbon nanotubes on fibroblasts: proliferation, adhesion, migration, and wound healing. ***Ann Biomed Eng*** 2011; 39(1): 414-26

[7] Donaldson K, Poland CA. Nanotoxicology: new insights into nanotubes. ***Nat Nanotechnol*** 2009; 4(11): 708-10

[8] Herzog E, Casey A, Lyng FM, Chambers G, Byrne HJ, Davoren M. A new approach to the toxicity testing of carbon-based nanomaterials-the clonogenic assay. ***Toxicol Lett*** 2007; 174(1-3): 49-60.

[9] Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. ***Science*** 2006; 311(5761): 622-7.

[10] Zhao X, Liu R. Recent progress and perspectives on the toxicity of carbon nanotubes at organism, organ, cell, and biomacromolecule levels. ***Environ Int*** 2012; 40: 244-55.

[11] Foldvari M, Bagonluri M. Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines: II. Drug delivery and biocompatibility issues. ***Nanomedicine*** 2008; 4(3): 183-200

[12] Tang S, Tang Y, Zhong L, Murat K, Asan G, Yu J, et al. Short-and long-term toxicities of multi-walled carbon nanotubes in vivo and in vitro. ***J Appl Toxicol*** 2012; 32(11): 900-12.

[13] Bianco A, Kostarelos K, Prato M. Applications of carbon nanotubes in drug delivery. ***Curr Opin Chem Biol*** 2005; 9(6): 674-9

[14] Yang W, Thordarson P ,Gooding JJ, Ringer SP, Braet F. Carbon nanotubes for biological and biomedical applications. ***Nanotechnology*** 2007; 18(41)

[15] Lim JH, Kim SH, Lee IC, Moon C, Kim SH, Shin DH, et al. Evaluation of maternal toxicity in rats exposed to multi-wall carbon nanotubes during pregnancy. ***Environ Health Toxicol*** 2011; 26.

[16] Warheit DB, Laurence BR, Reed KL, Roach DH, Reynolds GA, Webb TR. Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. ***Toxicol Sci*** 2004; 77(1): 117-25

[17] Rajagopalan P, Wudl F, Schinazi RF, Boudinot FD. Pharmacokinetics of a water-soluble fullerene in rats. ***Antimicrob Agents Chemother*** 1996; 40(10): 2262-5

[18] Shvedova A, Kisin E, Murray A, Kommineni C, Castranova V, Fadeel B, et al. Increased accumulation of neutrophils and decreased fibrosis in the lung of NADPH oxidase-deficient C۵۷BL/ ۶ mice exposed to carbon nanotubes. ***Toxicol Appl Pharmacol*** 2008; 231(2): 235-40

[19] Qi W, Bi J, Zhang X, Wang J, Wang J, Liu P, et al. Damaging Effects of Multi-walled Carbon Nanotubes on Pregnant Mice with Different Pregnancy Times. ***Sci Rep*** 2014; 4: 4352

[20] Bonner JC, Silva RM, Taylor AJ, Brown JM, Hilderbrand SC, Castranova V, et al .Interlaboratory evaluation of rodent pulmonary responses to engineered nanomaterials: the NIEHS Nano GO Consortium. ***Environ Health Perspect*** 2013; 121(6): 676-82.

[21] Hadidi N, Kobarfard F, Nafissi-Varcheh N, Aboofazeli R. PEGylated single-walled carbon nanotubes as nanocarriers for cyclosporin a delivery. ***AAPS PharmSciTech*** 2013; 14(2): 593-600.

[22] Wang W, Jiang C, Zhu L, Liang N, Liu X, Jia J, et al. Adsorption of bisphenol A to a carbon nanotube reduced its endocrine disrupting effect in mice male offspring. ***Int J Mol Sci*** 2014; 15(9): 15981-93.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-15]

[23] Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. ***Pain*** 1983; 16(2): 109-10.
[24] Heidari-Rarani M, Noori A, Ghodousi A. Effects of methamphetamine on pituitary gonadal axis and spermatogenesis in mature male rats. ***Zahedan J Res Med Sci*** 2014; 16(12): 37-42.
[25] Sakamoto Y, Nakae D, Fukumori N, Tayama K, Maekawa A, Imai K, et al. Induction of mesothelioma by a single intrascrotal administration of multi-wall carbon nanotube in intact male Fischer 344rats. ***J Toxicol Sci*** 2009; 34(1): 65-76
[26] Smart SK, Cassady AL, Lu GQ, Martin DJ. The biocompatibility of carbon nanotubes. ***Carbon*** 2006; 44(6): 1034-47.
[27] Yang ST, Wang X, Jia G, Gu Y, Wang T, Nie H, et al. Long-term accumulation and low toxicity of single-walled carbon nanotubes in intravenously exposedmice. ***Toxicol Lett*** 2008; 181(3): 182-9.
[28] Firme CP, Bandaru PR. Toxicity issues in the application of carbon nanotubes to biological systems. ***Nanomedicine*** 2010; 6(2): 245-56.
[29] Shvedova AA, Kisin E, Murray AR, Johnson VJ, Gorelik O, Arepalli S, et al. Inhalation vs. aspiration of single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagenesis. ***Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*** 2008; 295(4): L552-65
[30] Hougaard KS, Jackson P, Kyjovska ZO, Birkedal RK, De Temmerman PJ, Brunelli A, et al. Effects of lung exposure to carbon nanotubes on female fertility and pregnancy. A study in mice. ***Reprod Toxicol*** 2013; 41: 86-97.
[31] Yang ST, Luo J, Zhou Q, Wang H. Pharmacokinetics, metabolism and toxicity of carbon nanotubes for biomedical purposes. ***Theranostics*** 2012; 2(3): 271-82.
[32] Liu X, Qin D, Cui Y, Chen L, Li H, Chen Z, et al. The effect of calcium phosphate nanoparticles on hormone production and apoptosis in human granulosa cells. ***Reprod Biol Endocrinol*** 2010 2; 8: 32.
[33] Bai Y, Zhang Y, Zhang J, Mu Q, Zhang W, Butch ER, et al. Repeated administrations of carbon nanotubes in male mice cause reversible testis damage without affecting fertility. ***Nat Nanotechnol*** 2010; 5(9): 683-9
[34] St-Laurent V, Sanchez M, Charbonneau C, Tremblay A. Selective hormone-dependent repression of estrogen receptor beta by a p38-activatedErbB2/ErbB3pathway. ***J Steroid Biochem Mol Biol*** 2005; 94(1-3): 23-37
[35] Ema M, Kobayashi N, Naya M, Hanai S, Nakanishi J, et al. Reproductive and developmental toxicity studies of manufactured nanomaterials. ***Reprod Toxicol*** 2010; 30(3): 343-52.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-15]