



Original Paper

## Effects of Silver Nanoparticles on the Ovarian Tissue of NMRI Rats Treated with Alpha Lipoic Acid: A Stereological Study

Seyed Mohammad Ali Shariatzadeh (Ph.D)<sup>\*1</sup>  , Sara Aghabarati (M.Sc)<sup>2</sup> , Parisa Maleki (M.Sc)<sup>3</sup>  

<sup>1</sup> Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran. <sup>2</sup> M.Sc in Biology, Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran. <sup>3</sup> M.Sc in Biology, Academic Instructor, Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran.

### Abstract

**Background and Objective:** Silver nanoparticles are produced in large quantities in the industry and have estrogenic activities and toxic effects on different organs. This study was conducted to determine the effect of silver nanoparticles on the ovarian tissue of NMRI rats treated with alpha lipoic acid.

**Methods:** In this experimental study, 24 female NMRI rats were randomly divided into 4 groups of 6. The groups included the control group, oral silver nanoparticles (500 mg/kg of body weight), injected alpha lipoic acid (100 mg/kg of body weight), and silver nanoparticles (500 mg/kg of body weight) plus alpha lipoic acid (100 mg/kg body weight). The treatment was performed for 28 days. After the treatment period, blood sampling was performed from the rats' hearts to analyze biochemical parameters (malondialdehyde, estrogen, progesterone, and total antioxidant capacity using the ferric reducing ability of plasma (FRAP) method). By dissecting the rats, the left ovaries were removed, fixed, molded, and cut, tissue passaging was performed, and the ovaries were stained using the hematoxylin-eosin method. Then, the ovarian tissue was evaluated by different stereological methods.

**Results:** The total mean ovarian volume, the cortex volume, the medulla volume, and the corpus luteum volume, and the total number of primordial, primary, secondary, and Graafian follicles were significantly reduced in the silver nanoparticles group compared to the control group ( $P < 0.05$ ). The simultaneous administration of alpha lipoic acid and silver nanoparticles compensated for the adverse effects of silver nanoparticles on the above parameters. On the other hand, the mean number of different types of follicles in the rats treated with alpha lipoic acid significantly increased compared to the control group ( $P < 0.05$ ). A statistically significant reduction was observed in the measurement of estrogen and progesterone hormones in the serum of the silver nanoparticles group compared to the control group ( $P < 0.05$ ). Moreover, in assessing the antioxidant capacity of the serum of the group treated simultaneously with silver nanoparticles + alpha lipoic acid, a statistically significant increase was observed compared to the group treated with silver nanoparticles ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** Silver nanoparticles can have adverse effects on the structure of the ovary and its components, and alpha lipoic acid can largely compensate for these detrimental effects.

**Keywords:** Nanoparticles, Silver, Ovary, Alpha Lipoic Acid, Mice

\*Corresponding Author: Seyed Mohammad Ali Shariatzadeh (Ph.D), E-mail: s-shariatzadeh@araku.ac.ir



Received 19 Jul 2022

Final Revised 22 Jul 2023

Accepted 22 Jul 2023

Published Online 30 Dec 2023

Cite this article as: Shariatzadeh SMA, Aghabarati S, Maleki P. [Effects of Silver Nanoparticles on the Ovarian Tissue of NMRI Rats Treated with Alpha Lipoic Acid: A Stereological Study]. J Gorgan Univ Med Sci. 2023; 25(4): 11-18. [Article in Persian]





## Extended Abstract

### Introduction

The main characteristic of silver nanoparticles is their antibacterial property, a property that is used in wound dressings, bedsores ointments, disinfectants, and medical tool coatings. Many medical devices containing silver release silver ions, which can lead to toxicity in blood circulation and also in some organs, such as the liver and kidney. The main mechanism of nanoparticle performance is not known yet; however, various *in vivo* and *in vitro* studies propose that the silver nanoparticle is a highly toxic substance that enters the target cell through two ways, including diffusion and endocytosis, and leads to creating toxicity via disruption of the membrane structure, mitochondrial dysfunction in energy production, chromosomal disorders, oxidative stress, protein or DNA binding, reactive oxygen production, and cell death or apoptosis. A large number of studies have confirmed the silver nanoparticle dose-dependent toxicity. Evidence indicates a relationship between the production of reactive oxygen species (ROS), oxidative stress, and cytotoxicity stemming from silver nanoparticles.

Alpha lipoic acid is considered a strong antioxidant that exerts its antioxidant property through the direct cleaning of free radicals, the impact on other antioxidants, and the increase of intracellular glutathione. Alpha lipoic acid leads to preventing oxidative stress and producing free radicals.

Nanosilver adversely influences many organs of the body, including the liver, kidney, lung, and reproductive organs. Silver nanoparticles in high concentrations have been shown to induce apoptosis in sperm and changes in the expression of cellular proteins in the testes of rats. The present research was conducted to determine the effect of silver nanoparticles on the ovarian tissue of NMRI rats treated with alpha lipoic acid.

### Methods

In this experimental study, 24 four-week-old female NMRI rats were randomly divided into 4 groups of 6. The groups included the control group, the first experimental group of oral silver nanoparticles (500 mg/kg of body weight), the second experimental group of injected alpha lipoic acid (100 mg/kg of body weight), and the third experimental group of silver nanoparticles (500 mg/kg of body weight) plus alpha lipoic acid (100 mg/kg body weight). The treatment was performed for 28 days. After the treatment period, the rats were anesthetized, and the amounts of malondialdehyde, estrogen, progesterone, and total antioxidant capacity of blood serum were measured. After dissection, the left ovaries of the animals were removed, weighed, and then placed in Bouin's fixative. After 21 hours of fixation, tissue passaging and preparation of paraffin blocks were carried out in cylindrical molds using the isotropic uniform random (IUR) sampling by the orientor cutting method.

Total ovarian volume, cortex volume, medulla volume, and corpus luteum volume were calculated using the Cavalieri method, oocyte volume and its nucleus in various types of ovarian follicles were calculated using the nucleation method, and the number of various types of ovarian follicles was calculated using the dissector method.

The Buege and Aust method was used to measure malondialdehyde.

Serum estrogen and progesterone levels were measured photometrically using an autoanalyzer device.

### Results

The total mean ovarian volume, the cortex and medulla volumes, the corpus luteum volume, and the mean number of primordial, primary, secondary, and Graafian follicles were reduced in the rats of the first experimental group compared to the control group ( $P < 0.001$ ). Also, comparing the total mean ovarian volume, the cortex and medulla volumes, and the corpus luteum volume in the third experimental group showed an increase compared to the first experimental group ( $P < 0.001$ ). In the silver nanoparticles plus alpha lipoic acid group (the third experimental group), the reduction in the ovarian volume, the cortex and medulla volumes, the corpus luteum volume, and the mean number of various types of follicle were

compensated significantly ( $P < 0.05$ ) and were equal to the control group. Furthermore, the mean number of primordial, primary, secondary, and Graafian follicles in the second experimental group increased compared to the control group ( $P < 0.001$ ).

The mean oocyte volume in primordial, primary, secondary, and Graafian follicles in the first experimental group was reduced compared to all other groups ( $P < 0.001$ ), and this reduction was compensated in the third experimental group significantly and was equal to the control group ( $P < 0.001$ ).

The mean oocyte nucleus volume in primordial, primary, secondary, and Graafian follicles was statistically significantly reduced in the first experimental group compared to the control group ( $P < 0.001$ ). The mean oocyte volume in the second experimental group showed an increase compared to the control group ( $P < 0.001$ ). The reduced oocyte nucleus volume observed in primordial, primary, and secondary follicles of the third experimental group was compensated compared to the first experimental group significantly and was equal to the control group ( $P < 0.001$ ).

The mean thickness of the clear zone in preantral and antral follicles had a statistically significant reduction in the first experimental group compared to the control group ( $P < 0.001$ ). The use of alpha lipoic acid simultaneously with silver nanoparticles significantly compensated for the reduced thickness of the clear zone in preantral and antral follicles compared to the group receiving only silver nanoparticles ( $P < 0.001$ ). Additionally, the mean thickness of the clear zone in preantral and antral follicles significantly increased in the second experimental group compared to the control group ( $P < 0.001$ ).

A statistically significant decrease was observed in the estrogen and progesterone levels of the first experimental group compared to other groups ( $P < 0.001$ ). Estrogen and progesterone levels of the third experimental group were statistically significantly decreased compared to the second experimental group ( $P < 0.001$ ).

### Conclusion

By producing free radicals, silver nanoparticles at the amount of 500 mg/kg of body weight daily for 4 weeks are able to induce oxidative stress in rats' ovarian tissues and lead to reduced total ovarian volume, cortex and medulla volumes, and corpus luteum volume.

Alpha lipoic acid considerably improved the adverse effects stemming from silver nanoparticles on the ovarian tissue, including reduced total ovarian volume, cortex, and medulla volumes, and corpus luteum volume. Moreover, in the group receiving silver nanoparticles plus alpha lipoic acid, the reduced number of follicles was significantly compensated compared to the toxin group and was equal to the control group. The volume of the oocyte and its nucleus also significantly increased in all types of follicles in rats treated with alpha lipoic acid compared to the control group.

### Ethical Statement

The present article was approved by the Research Ethics Committee of Arak University of Medical Sciences (IR.ARAKMU.REC.1397.220), and the ethical protocol for experimental animals was observed.

### Funding

This article was extracted from Sara Aghabari's master's thesis in the field of Cellular Biology of Animal Sciences, Cellular-Developmental major, from the Faculty of Basic Sciences, Arak University, and was conducted with the financial support of the Vice-Chancellor for Research and Technology of Arak University.

### Conflicts of Interest

No conflict of interest.

### Acknowledgment

We would like to thank Mr. Mehdi Nodeh Farahani.

**Alpha lipoic acid can greatly compensate for the adverse effects stemming from silver nanoparticles on the structure of the ovary and its components.**



تحقیقی

## اثر نانوذرات نقره بر بافت تخمدان موش های نژاد NMRI تیمار شده با اسیدلیپوئیک آلفا: یک مطالعه استریولوژیکی

دکتر سیده محمدعلی شریعت زاده\*<sup>۱</sup>، سارا آقابرانی<sup>۲</sup> ID، پرینسا مالکی<sup>۳</sup> ID

۱ استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک، اراک، ایران. ۲ دانش آموخته کارشناسی ارشد زیست سلولی علوم جانوری سلولی - تکوینی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک، اراک، ایران. ۳ کارشناس ارشد علوم جانوری سلولی - تکوینی، مربی گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک، اراک، ایران.

### چکیده

**زمینه و هدف:** نانوذرات نقره به میزان زیادی در صنعت تولید می شود و دارای فعالیت های استروژنیک و اثرات سمی بر اندام های مختلف است. این مطالعه به منظور تعیین اثر نانوذرات نقره بر بافت تخمدان موش های نژاد NMRI تیمار شده با اسیدلیپوئیک آلفا انجام شد.

**روش بررسی:** در این مطالعه تجربی ۲۴ سر موش ماده بالغ نژاد NMRI به صورت تصادفی در ۴ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. گروه ها شامل کنترل، نانوذرات نقره دهانی (۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، آلفا لیپوئیک اسید تزریقی (۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و نانوذرات نقره (۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) توام با آلفا لیپوئیک اسید (۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) بودند. تیمار به مدت ۲۸ روز انجام شد. در پایان دوره تیمار خون گیری از قلب موش ها برای آنالیز پارامترهای بیوشیمیایی (مالون دی آلدنید، استروژن، پروژسترون و ظرفیت آنتی اکسیدانی تام به روش FRAP) انجام شد. با تشریح موش ها، تخمدان چپ خارج، فیکس، قالب گیری، برش گیری و پاساژ یافتی انجام شد و با روش هماتوکسیلین-ئروزین رنگ آمیزی گردید. سپس بافت تخمدان برای مطالعه با روش های مختلف استریولوژیکی مورد ارزیابی قرار گرفت. **یافته ها:** حجم کل تخمدان، کورتکس، مدولا و جسم زرد و نیز میانگین تعداد کل فولیکول های بدوی، اولیه، ثانویه و گراف در گروه نانوذرات نقره در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری کاهش یافت ( $P < 0/05$ ). تجویز همزمان اسید لیپوئیک آلفا و نانوذرات نقره اثرات نامطلوب نانوذرات نقره را بر پارامترهای فوق جبران کرد. از طرفی، میانگین تعداد انواع مختلف فولیکول ها در موش های تیمار شده با اسیدلیپوئیک آلفا نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری افزایش یافت ( $P < 0/05$ ). کاهش آماری معنی داری در سنجش هورمون های استروژن و پروژسترون در سرم گروه نانوذرات نقره نسبت به گروه کنترل یافت شد ( $P < 0/05$ ). همچنین در بررسی ظرفیت آنتی اکسیدانی سرم گروه تیمار همزمان با نانوذرات نقره + آلفا لیپوئیک اسید افزایش آماری معنی داری نسبت به گروه تیمار با نانوذرات نقره مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). **نتیجه گیری:** نانوذرات نقره می تواند اثرات نامطلوب بر ساختار تخمدان و اجزای آن داشته باشد و آلفا لیپوئیک اسید می تواند این اثرات مخرب را تا حدود زیادی جبران نماید.

**واژه های کلیدی:** نانوذرات، نقره، تخمدان، اسید لیپوئیک آلفا، موش

\* نویسنده مسؤول: دکتر سیده محمدعلی شریعت زاده، پست الکترونیکی: s-shariatzadeh@araku.ac.ir

نشانی: اراک، دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، ۰۸۶-۳۴۱۷۳۴۰۹

وصول ۱۴۰۱/۴/۲۸ اصلاح نهایی ۱۴۰۲/۴/۳۱ پذیرش ۱۴۰۲/۴/۳۱ انتشار ۱۴۰۲/۱۰/۰۹

### مقدمه

اصلی ترین ویژگی نانوذرات نقره (Nano Silver: NPs) خاصیت ضدباکتریایی است که از این ویژگی در پانسمان زخم، پمادهای زخم بستری، ضد عفونی کننده ها و پوشش های ابزار پزشکی استفاده می شود.<sup>۱</sup> اگرچه نانوذره نقره در بسیاری از روش های پزشکی، دستگاه ها و زمینه های مختلف بیولوژیکی استفاده می شود؛ دارای اشکالاتی مرتبط با سمیت سلولی است.<sup>۲</sup> برخی گزارش ها نشان داده اند که بسیاری از دستگاه های پزشکی دارای نقره، یون های نقره را آزاد می کنند که در گردش خون و در بعضی از اعضای بدن مثل

کبد و کلیه می تواند سبب مسمومیت شود.<sup>۳</sup> مکانیسم اصلی عملکرد نانوذرات هنوز شناخته نشده است؛ اما مطالعات مختلف در محیط های *in vivo* و *in vitro* پیشنهاد می کنند که نانو ذره نقره ماده ای با سمیت زیاد است که از دو راه انتشار و آندوسیتوز وارد سلول هدف می شوند و از طریق اختلال در ساختار غشا، اختلال عملکرد میتوکندری در تولید انرژی، اختلالات کروموزومی، استرس اکسیداتیو، اتصال به پروتئین یا DNA، تولید اکسیژن فعال و مرگ سلولی یا آپوپتوز، باعث ایجاد سمیت می شود. بسیاری از

گروه تجربی اول: دریافت کننده نانوذرات نقره ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت دهانی روزانه به مدت ۲۸ روز. گروه تجربی دوم: دریافت کننده آلفا لیپوئیک اسید ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت دهانی در روزانه به مدت ۲۸ روز. گروه تجربی سوم: دریافت کننده نانوذرات نقره ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت دهانی روزانه توام با آلفا لیپوئیک اسید ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت تزریقی در روز به مدت ۲۸ روز.

نانوذرات نقره با قطر ۲۰ نانومتر با خلوص ۹۹/۹۹ درصد از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان و اسید لیپوئیک آلفا از شرکت SIGMA با درصد خلوص ۹۸ درصد تهیه شدند. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت Merck آلمان تهیه شد.

در پایان دوره تیمار موش‌ها بیهوش شده و برای بررسی پارامترهای بیوشیمیایی در هنگام تشریح از قلب آنان خونگیری و میزان مالوندی آلدئید، استروژن، پروژسترون و ظرفیت آنتی اکسیدانی تام سرم خون اندازه گیری شدند. بعد از تشریح، تخمدان چپ حیوانات خارج و پس از وزن کردن در فیکساتیو بوئن قرار داده شدند.<sup>۷</sup>

بعد از گذشت ۲۱ ساعت از فیکس شدن، مراحل پاساژ بافتی و تهیه بلوک پارافینی در قالب‌های استوانه‌ای شکل به روش orientor برش (Isotropic Uniform Random sampling) انجام شد.<sup>۱۳</sup> برای این منظور ابتدا قالب استوانه‌ای شکل به صورت تصادفی روی ساعت فی (Φ) که به ۹ قسمت مساوی تقسیم شده بود؛ قرار گرفت. سپس با انتخاب یک عدد تصادفی بین صفر تا ۹ در امتداد عدد انتخاب شده برش داده شد. سپس بر روی ساعت تا (0) طوری قرار گرفت که سطح برش خورده در طول محور ۰-۰ ساعت تا قرار گرفت. پس از آن یک عدد تصادفی دیگر انتخاب و در امتداد آن برش داده شد.<sup>۱۴</sup> سپس از جهت برش دوم با استفاده از میکروتوم برش‌های ۵ میکرونی و ۲۰ میکرونی گرفته شد و به روش هماتوکسلین - اتوزین (E&H) رنگ آمیزی گردید. برای بررسی نمونه‌های تهیه شده از روش‌های استریولوژی استفاده شد.

حجم کل تخمدان، حجم کورتکس، حجم مدولا و حجم جسم زرد با استفاده از روش کاوالیری، حجم اووسیت و هسته آن در انواع فولیکول‌های تخمدان با استفاده از روش نوکلئاتور و تعداد انواع فولیکول‌های تخمدان با استفاده از روش داسیکتور محاسبه شد.

برای محاسبه حجم کل تخمدان از میکروسکوپ Olympus (B×4ITE, Japan) و نرم‌افزار Olysia استفاده شد. تصویر اسلایدهای ۵ میکرونی با بزرگ‌نمایی 4X بر روی مانیتور انداخته شد. سپس پروب نقطه‌ای به‌طور تصادفی و بدون هیچگونه سوگیری روی تصویر انداخته شد و نقاط برخورد کرده با کل تصویر تخمدان شمارش گردید. برای محاسبه حجم کورتکس، حجم مدولا و حجم

مطالعات سمیت وابسته به دوز نانو نقره را تایید کرده‌اند.<sup>۴</sup> شواهدی دال بر ارتباط بین تولید رادیکال آزاد اکسیژن دار (ROS)، استرس اکسیداتیو و سمیت سلولی ناشی از نانوذرات نقره وجود دارد. نانوذرات نقره باعث پراکسیداسیون لیپیدی، آپوپتوزیس و تغییر در بیان ژن‌ها می‌شوند. همچنین نانوذرات نقره ابتدا سایتوکین‌های پیش‌التهابی IL-1، IL-6، TNF-α را فعال می‌کنند و باعث افزایش بیان و فعالیت NOX/NADPH اکسیداز می‌شوند. این آنزیم اکسیژن را به رادیکال‌های اکسیژن واکنشی تبدیل کرده و در نتیجه باعث تولید انبوه رادیکال‌های آزاد می‌شوند.<sup>۵</sup> واسطه‌های التهابی از طریق فعال کردن فاکتورهای رونویسی مانند فاکتور القای هاپوکسی NF-κB منجر به تقویت حلقه ارتباطی میان استرس اکسیداتیو و التهاب می‌شود که در نهایت باعث آسیب به DNA و مرگ سلولی (آپوپتوز) می‌شود.<sup>۶</sup>

اسیدلیپوئیک آلفا یا تیوکتیک اسید ترکیب هشت کربنه با دو عامل تیول است. این ماده کوفاکتور کمپلکس‌های چند آنزیمی است که دکربوکسیلاسیون اکسیداتیو آلفاکتواسیدها را کاتالیز می‌کند. اسید لیپوئیک آلفا جزء آنتی اکسیدان‌های قوی محسوب می‌شود. این ماده خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود را از طریق پاکسازی مستقیم رادیکال‌های آزاد، اثر بر روی بقیه آنتی‌اکسیدان‌ها و افزایش گلوتاتیون داخل سلولی اعمال می‌کند.<sup>۷</sup> اسید لیپوئیک آلفا سبب جلوگیری از استرس اکسیداتیو و تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود.<sup>۸</sup> نانونقره بر روی بسیاری از اندام‌های بدن از جمله کبد، کلیه، ریه و اندام‌های تولید مثلی اثر نامطلوب داشته و سیستم‌های مختلف در بدن انسان و حیوان را تحت تاثیر قرار می‌دهد.<sup>۹</sup> نانوذرات نقره در غلظت‌های بالا موجب القای آپوپتوز در اسپرم و تغییر بیان پروتئین‌های سلولی در بیضه موش‌های صحرایی شده است.<sup>۱۰</sup> این مطالعه به منظور تعیین اثر نانوذرات نقره بر بافت تخمدان موش‌های نژاد NMRI تیمار شده با اسیدلیپوئیک آلفا انجام شد.

### روش بررسی

این مطالعه تجربی روی ۲۴ سر موش ماده ۴ هفته‌ای نژاد NMRI خریداری شده از مؤسسه پاستور ایران در دانشگاه اراک طی سال ۱۳۹۷ انجام شد.

مقاله مورد تایید کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی اراک (IR.ARAKMU.REC.1397.220) قرار گرفت و پروتکل کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید.

موش‌ها در خانه حیوانات در شرایط متعادل با دمای ۲۱±۲ درجه سانتی‌گراد، نور محیطی با شرایط ۱۲ ساعت تاریکی - روشنایی و آب و غذای کافی به مدت ۲۸ روز نگهداری شدند. سپس به‌طور تصادفی به ۴ گروه ۶ تایی به شرح زیر تقسیم شدند.<sup>۱۱،۱۲</sup> گروه کنترل: مداخله‌ای صورت نگرفت.

می کند که پرتوهای با طول موج ۵۳۵-۵۳۲ را جذب می کند. روش سنجش میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی تام براساس توانایی پلاسما یا عصاره بافتی در احیا یون های  $Fe^{3+}$  (فریک) به  $Fe^{2+}$  (فرو) در حضور ماده ای به نام TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) استوار است. میزان قدرت احیا کنندگی پلاسما با غلظت این کمپلکس متناسب است. در PH پایین، احیا کمپلکس  $Fe^{3+}$ ، TPTZ،  $Fe^{3+}$  به شکل فروس ( $Fe^{2+}$ ) یک کمپلکس آبی رنگ با ماکزیم جذب در ۵۹۳ نانومتر ایجاد می کند.

برای اندازه گیری میزان استروژن و پروژسترون، نمونه های سرم در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری و به روش فتومتریک توسط دستگاه اتوآنالیز (شرکت Technicon، انگلستان) اندازه گیری شدند. داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS-16 و آزمون های آنالیز واریانس یک طرفه و Tukey در سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شدند.

#### یافته ها

حجم تخمدان، کورتکس، مدولا، جسم زرد و میانگین تعداد انواع فولیکول ها در گروه نانوذرات نقره (تجربی اول) در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری کاهش یافت ( $P < 0/05$ ) (شکل یک - B). در گروه آلفا لیپوئیک اسید (تجربی دوم) تعداد زیادی از انواع فولیکول ها مشاهده شد (شکل یک - A). در گروه نانوذرات نقره توام با آلفا لیپوئیک اسید (تجربی سوم) کاهش در حجم تخمدان، کورتکس، مدولا، جسم زرد و میانگین تعداد انواع فولیکول ها به طور معنی دار ( $P < 0/05$ ) (شکل یک - C) و به میزان گروه کنترل جبران شد (شکل یک - D).

میانگین حجم کل تخمدان، حجم کورتکس و مدولا و حجم جسم زرد در موش های گروه تجربی اول در مقایسه با گروه کنترل کاهش آماری معنی داری یافت ( $P < 0/001$ ). همچنین از مقایسه میانگین حجم کل تخمدان، حجم کورتکس و حجم جسم زرد در گروه تجربی سوم نسبت به گروه تجربی اول افزایش آماری معنی داری مشاهده شد ( $P < 0/001$ ) (جدول یک).

میانگین تعداد انواع فولیکول های بدوی، اولیه، ثانویه و گراف در گروه تجربی اول نسبت به گروه کنترل کاهش آماری معنی داری یافت ( $P < 0/001$ ). تعداد فولیکول های گروه تجربی سوم نسبت به گروه تجربی اول کاهش آماری معنی داری مشاهده شد ( $P < 0/001$ ). علاوه بر این میانگین تعداد انواع فولیکول های بدوی، اولیه، ثانویه و گراف در گروه تجربی دوم نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری یافت ( $P < 0/001$ ) (جدول یک).

میانگین حجم اووسیت در انواع فولیکول های بدوی، اولیه، ثانویه و گراف در گروه تجربی اول نسبت به تمامی گروه ها کاهش آماری معنی داری یافت ( $P < 0/001$ ) و این کاهش در گروه تجربی سوم

جسم زرد، ابتدا پروب نقطه ای به طور تصادفی بر روی تصویر انداخته شد. سپس نقاطی که با نواحی مورد نظر برخورد کردند؛ شمارش گردید و کسر حجمی هر یک از آنها محاسبه شد. سپس کسر حجمی را در حجم فضای رفرنس ضرب نمودیم و حجم کورتکس و مدولا به طور غیرمستقیم به دست آمد. برای به دست آوردن حجم جسم زرد کسر حجمی جسم زرد در حجم کورتکس ضرب شد.<sup>۸</sup>

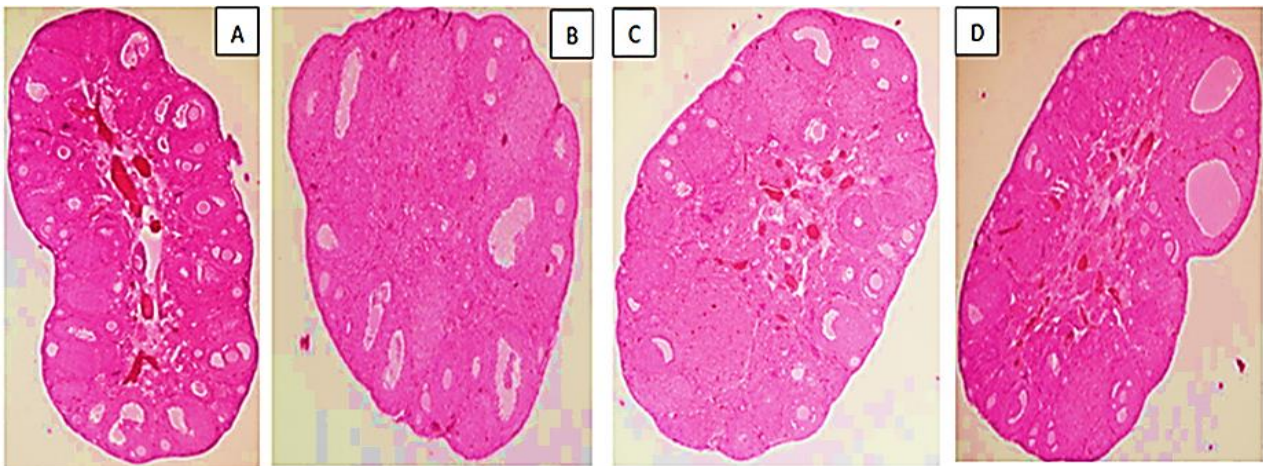
برای محاسبه تعداد فولیکول ها از روش Optical dissector و از فریم مخصوص شمارش (Unbiased counting frame) با دستگاه میکروکیتور ساخت آلمان (HEIDEN Main ND221B) استفاده شد. برای محاسبه تعداد انواع فولیکول ها به دلیل اندازه های متفاوت آنها، از برش های ۲۰ میکرونی استفاده شد. به این ترتیب که به طور تصادفی ۱۲ برش انتخاب شد و سپس تمام میدان دید هر برش با استفاده از میکروسکوپ (Olympus, BX41TE, Japan) و بزرگ نمایی 100X بررسی شد.<sup>۹</sup>

برای محاسبه حجم اووسیت از روش Nucleator استفاده شد. در این روش از برش های ۲۰ میکرونی استفاده گردید. سپس به طور تصادفی ۱۲ برش انتخاب و با فولیکول های هر برش با استفاده از فریم مخصوص شمارش بدون جهت گیری، از میدان دید انتخاب شده توسط میکروسکوپ (Olympus, BX41TE, Japan) که به دوربین عکاسی DP12 مجهز بود با نرم افزار Olysia با بزرگ نمایی 100X عکس گرفته شد. برای محاسبه حجم اووسیت از نرم افزار Motic images 2000 استفاده شد. به این صورت که از مرکز هستک تا غشای اووسیت اندازه گیری شد و برای حساب کردن حجم هسته اووسیت از مرکز هستک تا غشای هسته اندازه گیری صورت گرفت.

برای محاسبه ضخامت منطقه شفاف، از برش های ۵ میکرونی استفاده شد. به این صورت که به طور میانگین ۱۲ برش به طور تصادفی انتخاب و از انواع فولیکول های انتخاب شده در میدان های مختلف توسط میکروسکوپ (Olympus, BX41TE, Japan) که به دوربین عکاسی DP12 مجهز بود با نرم افزار Olysia با بزرگ نمایی 100X عکس برداری انجام گردید.<sup>۱۱</sup>

برای اندازه گیری ضخامت، پروب مخصوص اندازه گیری ضخامت بدون جهت گیری بر روی تصویر انداخته شد و از محل تقاطع خطوط گرید با غشاء داخلی منطقه شفاف خطی عمود بر خط مماس با غشای خارجی منطقه شفاف در نظر گرفته شد و طول آن توسط نرم افزار Motic images 2000 اندازه گیری گردید.

برای اندازه گیری مالون دی آلدئید (MDA: Malondialdehyde) از روش Buege و Aust استفاده شد. در این روش MDA با تیوباریوتوریک اسید واکنش داده و ترکیبی با رنگ نارنجی تولید



شکل ۱: تصاویر میکروسکوپی از برش ۵ میکرونی بافت تخمدان موش‌های ماده بالغ (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین، بزرگ‌نمایی ۴۰۰X) A: آلفا لیپوئیک اسید (۱۰۰mg/kg/bw): افزایش حجم تخمدان، مدولا، کورتکس، جسم زرد و تعداد زیاد انواع فولیکول‌ها؛ B: نانوذرات نقره (۵۰۰mg/kg/bw) کاهش حجم تخمدان، کورتکس، مدولا، جسم زرد و تعداد انواع فولیکول‌ها؛ C: نانوذرات نقره (۵۰۰mg/kg/bw) توام با آلفا لیپوئیک اسید (۱۰۰mg/kg/bw): بهبود کاهش حجم تخمدان، کورتکس، مدولا، جسم زرد و تعداد انواع فولیکول‌ها؛ D: گروه کنترل: حالت طبیعی حجم تخمدان، کورتکس، مدولا، جسم زرد و تعداد انواع فولیکول‌ها.

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار حجم کل تخمدان، حجم کورتکس، مدولا و جسم زرد؛ تعداد، حجم اووسیت و حجم هسته اووسیت انواع فولیکول‌های بدوی، اولیه، پره آنترال و آنترال موش‌های نژاد NMRI در گروه‌های مورد مطالعه

P-value	میانگین و انحراف معیار				متغیرها
	گروه تجربی سوم	گروه تجربی دوم	گروه تجربی اول	گروه کنترل	
<۰/۰۰۱	۲/۶۴±۰/۰۹ a	۳/۴۱±۰/۰۴ c	۱/۳۷±۰/۱۱ b	۲/۶۶±۰/۲۲ a	جسم زرد
<۰/۰۰۱	۰/۳۹±۰/۱۱ d	۰/۳۹±۰/۰۷ c	۰/۱۳±۰/۱۰ b	۰/۳۲±۰/۰۵ a	مدولا
<۰/۰۰۱	۴/۶۵±۰/۱۰ d	۶/۲۱±۰/۰۶ c	۲/۳۶±۰/۱۰ b	۴/۸۰±۰/۰۳ a	کورتکس
<۰/۰۰۱	۵/۰۷±۰/۲۳ a	۶/۴۶±۰/۰۶ c	۲/۴۹±۰/۱۵ b	۵/۰۹±۰/۲۲ a	کل تخمدان
<۰/۰۰۱	۱۶۱۰/۱±۶۸/۸۱ ab	۴۸۳/۱±۶۰/۳۲ c	۸۷/۹۱±۳۰/۹۵ b	۱۸۷/۶۵±۸۶/۵۲ a	آنترال
<۰/۰۰۱	۳۱۲/۳۴±۵۵/۴۶ a	۴۸۳/۱±۶۰/۳۲ c	۱۳۴/۰۲±۳۱/۶۷ b	۳۳۰/۱۶±۵۳/۲۵ a	پره آنترال
<۰/۰۰۱	۵۵۶/۶۸±۲۷/۲۴ a	۸۱۱/۸۴±۶۰/۸۵ c	۲۹۵/۲۵±۳۶/۹۱ b	۶۲۱/۸۰±۵۳/۴۲ a	اولیه
<۰/۰۰۱	۱۷۶۱/۳±۹۴/۴۶ a	۲۲۵۶±۶۶/۵۴ c	۹۸۸/۲±۷۴/۱۷ b	۱۷۹۵/۴±۵۴/۸۱ a	بدوی
<۰/۰۰۱	۱۶۹۵۶۰±۱۴۹۳/۷ a	۱۷۵۳۱۱±۲۳۱۹/۵ c	۱۳۲۲۹۲±۱۲۵۴/۱ b	۱۵۱۸۵۱±۰/۱۵۳ a	آنترال
<۰/۰۰۱	۸۴۰۴۸±۹۲۰/۴۱ a	۱۱۱۱۶۴/۹۴±۴۲۶۱/۶ c	۷۵۳۳۲±۴۱۵/۴۷ b	۸۳۸۱۵±۱۸۶۳/۶۶ a	پره آنترال
<۰/۰۰۱	۳۹۷۱±۴۲/۸۷ d	۸۷۸۲±۱۴۶/۸۰ c	۳۲۱۱/۶±۵۸/۳۹ b	۴۰۵۸/۷±۱۵۱/۵۴ a	اولیه
<۰/۰۰۱	۱۵۵۷/۳±۴۰/۰۸ a	۲۳۰۴/۱±۵۶/۳ c	۱۴۵۰/۷±۲۸/۸۹ b	۱۶۳۴±۱۳۲/۴۴ a	بدوی
<۰/۰۰۱	۶۴۵۹/۴±۲۱/۷۰ d	۷۳۳۳/۹±۵۴/۸۳ c	۴۱۱۸/۶±۱۱/۲۲ b	۶۳۳۶/۳±۴۲/۳۰ a	آنترال
<۰/۰۰۱	۲۵۱۲/۷±۵۲/۶۰ d	۴۲۹۹/۲±۱۱۶/۶۲ c	۲۲۴۶/۹±۹۷/۸۳ b	۲۶۹۶/۶±۱۲۵/۲۲ a	پره آنترال
<۰/۰۰۱	۱۲۹۴/۴±۳۹/۰۵ a	۱۶۳۱/۵±۵۹/۲۶ c	۱۰۶۲/۸۵±۱۸/۲۰ b	۱۳۲۵/۷±۱۰۲/۷۴ a	اولیه
<۰/۰۰۱	۵۴۸/۸۶±۱۱/۲۳ a	۹۱۷/۲۶±۲/۷۳ c	۳۸۳/۹۳±۲/۴۲ b	۵۵۳/۹۶±۱۵/۰۷ a	بدوی

گروه کنترل (بدون مداخله)؛ گروه تجربی اول دریافت کننده نانوذرات نقره (۵۰۰ mg/kg/bw)؛ گروه تجربی دوم دریافت کننده آلفا لیپوئیک اسید (۱۰۰ mg/kg/bw)؛ گروه تجربی سوم دریافت کننده نانوذرات نقره (۵۰۰ mg/kg/bw) توام با آلفا لیپوئیک اسید (۱۰۰ mg/kg/bw). میانگین‌ها با کد حروف مختلف، دارای تفاوت آماری معنی‌دار نسبت به یکدیگر هستند (P<۰/۰۰۵).

مشاهده شد؛ نسبت به گروه تجربی اول به‌طور معنی‌دار و در حد گروه کنترل جبران شد (P<۰/۰۰۱) (جدول یک).

میانگین ضخامت منطقه شفاف در فولیکول‌های پره آنترال و آنترال در گروه تجربی اول نسبت به گروه کنترل کاهش آماری معنی‌داری یافت (P<۰/۰۰۱). مصرف هم‌زمان آلفا لیپوئیک اسید با نانوذرات نقره، کاهش ضخامت منطقه شفاف را در فولیکول‌های پره آنترال و آنترال نسبت به گروهی که فقط نانوذرات نقره دریافت کرده بودند؛ به‌طور معنی‌داری جبران کرد (P<۰/۰۰۱). علاوه بر این میانگین ضخامت منطقه شفاف در فولیکول‌های پره آنترال و آنترال در گروه تجربی دوم نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری یافت

به‌طور معنی‌دار و در حد گروه کنترل جبران شد (P<۰/۰۰۱). همچنین میانگین حجم اووسیت انواع فولیکول‌های بدوی، اولیه، ثانویه و گراف در گروه تجربی دوم نسبت به گروه کنترل افزایش آماری معنی‌داری داشت (P<۰/۰۰۱) (جدول یک).

میانگین حجم هسته اووسیت در انواع فولیکول‌های بدوی، اولیه، ثانویه و گراف در گروه تجربی اول نسبت به گروه کنترل کاهش آماری معنی‌داری یافت (P<۰/۰۰۱). همچنین در میانگین حجم اووسیت در گروه تجربی دوم نسبت به گروه کنترل افزایش آماری معنی‌داری مشاهده شد (P<۰/۰۰۱). کاهش حجمی که در هسته اووسیت در فولیکول‌های بدوی، اولیه و ثانویه گروه تجربی سوم

جدول ۲: میانگین ضخامت ناحیه شفاف فولیکول‌های پره‌آنترال و آنترال؛ ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام و پراکسیداسیون لیپیدی و مقادیر هورمون‌های پروژسترون و استروژن موش‌های نژاد NMRI در گروه‌های مورد مطالعه

P-value	میانگین و انحراف معیار				متغیرها
	گروه تجربی سوم	گروه تجربی دوم	گروه تجربی اول	گروه کنترل	
<۰/۰۰۱	۱۶/۴۳±۰/۰۲d	۱۹/۴±۰/۰۲c	۱۴/۳۵±۰/۰۲b	۱۶/۸۹±۰/۰۲a	ضخامت ناحیه شفاف فولیکول آنترال
<۰/۰۰۱	۱۳/۳۳±۰/۰۱d	۱۶/۰۶±۰/۰۲c	۱۱/۰۵±۰/۰۲b	۱۳/۵۶±۰/۰۸a	ضخامت ناحیه شفاف فولیکول پره‌آنترال
<۰/۰۰۱	۰/۴۳۶±۰/۰۱ c	۰/۵۷۹±۰/۰۲ *	۰/۳۲۸±۰/۰۵ b	۰/۵۸۰±۰/۰۱ *	ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (nmol/ml)
<۰/۰۰۱	۴/۲۶±۰/۰۱ d	۲/۲۵±۰/۰۲ c	۴/۷۲±۰/۰۵ b	۳/۳۰±۰/۰۱ a	پراکسیداسیون لیپیدی (nmol/ml)
<۰/۰۰۱	۲/۰۱±۰/۰۶ c	۲/۱۷±۰/۰۴ *	۱/۰۹۵±۰/۰۲ b	۲/۱۲±۰/۰۳ *	هورمون پروژسترون (ng/ml)
<۰/۰۰۱	۲/۱۲±۰/۰۶ c	۲/۳۲±۰/۰۴۷ *	۱/۳±۰/۰۷ b	۲/۳۴±۰/۰۸۵ *	هورمون استروژن (ng/ml)

گروه کنترل (بدون مداخله)؛ گروه تجربی اول دریافت‌کننده نانوذرات نقره (۵۰۰ mg/kg/bw)؛ گروه تجربی دوم دریافت‌کننده آلفا لیپوتیک اسید (۱۰۰ mg/kg/bw)؛ گروه تجربی سوم دریافت‌کننده نانوذرات نقره (۵۰۰ mg/kg/bw) توام با آلفا لیپوتیک اسید (۱۰۰ mg/kg/bw). میانگین‌ها با کد حروف مختلف، دارای تفاوت آماری معنی‌دار نسبت به یکدیگر هستند (P<۰/۰۵).

نانوذرات نقره تیمار شدند و کاهش معنی‌داری در تعداد فولیکول‌ها (جدول ۲) (P<۰/۰۰۱).

مشاهده شد.<sup>۱۶</sup>

در مطالعه Syrvatka و همکاران که روی خرگوش انجام شد؛ نانوذرات نقره سبب مهار تکثیر سلول‌های گرانولوزا گردید. از آنجایی که سلول‌های گرانولوزا تولید استروژن در تخمدان را بر عهده دارند؛ با کاهش سلول‌های گرانولوزا تولید استروژن که در رشد فولیکول‌ها موثر است؛ کاهش می‌یابد. در نتیجه با مهار تکثیر سلول‌های گرانولوزا تعداد فولیکول‌ها نیز کاهش پیدا می‌کند.<sup>۱۷</sup> نتایج مطالعه حاضر کاهش معنی‌داری در حجم اووسیت و هسته آن در انواع فولیکول‌های بدوی، اولیه، ثانویه و گراف در گروه نانوذرات نقره نسبت به گروه کنترل نشان داد. تحقیقات بسیاری نشان داده‌اند که با ورود نانوذرات نقره به داخل تخمدان، به علت تولید گونه‌های فعال اکسیژن و فعال شدن عوامل استرس اکسیداتیو آشکار کاسپاز ۳ فعال می‌شود.<sup>۱۸</sup> سلول طی فرایند مرگ برنامه‌ریزی شده دچار تغییرات ساختمانی می‌شود که به ترتیب شامل خروج آب از داخل سلول، متراکم شدن کروماتین، متراکم گشتن و چروکیده شدن هسته، تکه تکه شدن هسته و متالشی شدن سلول و تبدیل آن به اجسام آپوپتوتیک است.<sup>۱۹</sup> لذا این عوامل می‌توانند رشد هسته و تکامل اووسیت‌ها را تحت تاثیر قرار دهند.

در مطالعه ما اسید لیپوتیک آلفا به صورت قابل توجهی اثرات سوء ناشی از نانوذرات نقره بر روی بافت تخمدان از جمله کاهش در حجم کل تخمدان، مدولا، کورتکس و جسم زرد را بهبود بخشید. همچنین در گروه دریافت‌کننده نانوذرات نقره توام با اسیدلیپوتیک آلفا، کاهش تعداد فولیکول‌ها نسبت به گروه سم به‌طور معنی‌دار و در حد گروه کنترل جبران شد. حجم اووسیت و هسته آن نیز در انواع فولیکول‌ها در موش‌های تیمار شده با اسید لیپوتیک آلفا در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت.

در مطالعه طالبی و همکاران اسید لیپوتیک آلفا (۱۰۰ میکروگرم) باعث بهبود رشد فولیکول‌ها گردید. این اثر ممکن است با کاهش غلظت ROS و افزایش سطح تکای داخلی فولیکول طی دوره کشت

میزان MDA در گروه تجربی اول افزایش آماری معنی‌داری در بین گروه‌های مختلف نشان داد (P<۰/۰۰۱). همچنین در گروه تجربی سوم افزایش آماری معنی‌داری نسبت به گروه تجربی دوم مشاهده شد (P<۰/۰۰۱) (جدول ۲).

میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام گروه تجربی اول کاهش آماری معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل یافت (P<۰/۰۰۱). همچنین در گروه تجربی سوم افزایش آماری معنی‌داری نسبت به گروه تجربی اول مشاهده شد (P<۰/۰۰۱) (جدول ۲).

در مقادیر استروژن و پروژسترون گروه تجربی اول نسبت به سایر گروه‌ها کاهش آماری معنی‌داری مشاهده شد (P<۰/۰۰۱). مقادیر استروژن و پروژسترون گروه تجربی سوم نسبت به گروه تجربی دوم کاهش آماری معنی‌داری یافت (P<۰/۰۰۱) (جدول ۲).

### بحث

با توجه به نتایج مطالعه حاضر، تیمار موش‌های بالغ با نانوذرات نقره به مدت ۲۸ روز سبب کاهش حجم کل تخمدان، حجم کورتکس، مدولا و حجم جسم زرد گردید. این نتایج مطابق یافته‌های مطالعه Sriram و همکاران به علت فعال شدن کاسپاز ۳ در اثر رادیکال آزاد حاصل از نانوذرات نقره بود. این رادیکال قادر است مسیر داخلی آپوپتوز را فعال کرده و در نتیجه فرآیند آپاپتوز موجب چروکیده و کوچک شدن سلول می‌شود. همچنین غشاء سیتوپلاسمی به صورت اجسام آپوپتوتیک در می‌آیند.<sup>۱۲</sup>

در مطالعه El-Nouri و همکاران تیمار نانوذرات نقره با دوز ۳۰۰ mg/kg/day به مدت ۳۰ روز در موش‌ها از طریق تولید رادیکال‌های آزاد باعث کاهش وزن بدن، تراکم استروما همراه با خونریزی، التهاب، نکروز، افزایش فولیکول‌های آترتیک و افزایش پاسخ به کاسپاز ۳ و در نهایت آپاپتوز گردید.<sup>۱۵</sup>

نتایج مطالعه حاضر کاهش معنی‌داری در تعداد انواع فولیکول‌های بدوی، اولیه، ثانویه و گراف در گروه نانوذرات نقره نشان داد. در مطالعه قربانزاده و همکاران موش‌های صحرائی به مدت ۳۰ روز با

بر کیلوگرم وزن بدن در روز به مدت ۴ هفته، با تولید رادیکال‌های آزاد، قادر است؛ استرس اکسیداتیو در بافت تخمدان موش را القاء نماید. اسید لیپوئیک آلفا به عنوان آنتی‌اکسیدان به کار رفته تا حدود زیادی این اثرات سوء نانوذرات نقره را جبران نمود و حتی باعث بهبود این پارامترها نسبت به گروه کنترل شد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه خانم سارا آقابراتی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست سلولی علوم جانوری گرایش سلولی - تکوینی از دانشکده علوم پایه دانشگاه اراک بود و با حمایت مالی حوزه معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه اراک به انجام رسید. بدین‌وسیله از آقای مهدی نوده فراهانی تشکر می‌نماییم. بین نویسندگان تضاد منافی وجود ندارد.

### References

- Franklin NM, Rogers NJ, Apte SC, Batley GE, Gadd GE, Casey PS. Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl<sub>2</sub> to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): the importance of particle solubility. *Environ Sci Technol*. 2007 Dec; 41(24): 8484-90. doi: 10.1021/es071445r.
- Prabhu S, Poulouse EK. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters*. 2012; 2: 32.
- Tang J, Xi T. [Status of biological evaluation on silver nanoparticles]. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. 2008 Aug; 25(4): 958-61. [Article in Chinese]
- Sivolella S, Brunello G, Ferrarese N, Della Puppa A, D'Avella D, Bressan E, et al. Nanostructured guidance for peripheral nerve injuries: a review with a perspective in the oral and maxillofacial area. *Int J Mol Sci*. 2014 Feb; 15(2): 3088-117. doi: 10.3390/ijms15023088.
- Acker H. The oxygen sensing signal cascade under the influence of reactive oxygen species. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2005 Dec; 360(1464): 2201-10. doi: 10.1098/rstb.2005.1760.
- Foldbjerg R, Olesen P, Hougaard M, Dang DA, Hoffmann HJ, Autrup H. PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. *Toxicol Lett*. 2009 Oct; 190(2): 156-62. doi: 10.1016/j.toxlet.2009.07.009.
- Murmu S, Shrivastava VK. Protective Action of an Anti-oxidant (Vitamin-C) Against Bisphenol-toxicity in *Cirrhinus mrigala* (Ham.). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 2011; 2(1): 25-29. doi: 10.4194/trjfas.2011.0104.
- Howard CV, Reed MG. *Unbiased Stereology, Three-Dimensional Measurement in Microscopy*. Illustrated. Oxford: BIOS Scientific Publishers. 1998.
- Hadek R. Preliminary report on the cellular effect of intravitral silver in the mouse ovary. *J Ultrastruct Res*. 1966 Apr; 15(1): 66-73. doi: 10.1016/s0022-5320(66)80094-1.
- Habibian S, Shadnough F, Arabi M, Safar B. [Evaluation of the cytotoxicity and protein expression alteration induced by nanoparticles of silver in the rat sperm and testis]. *J Shahrekord Univ Med Sci*. 2013; 15(4): 26-34. [Article in Persian]
- Ferrando RE, Nyengaard JR, Hays SR, Fahy JV, Woodruff PG. Applying stereology to measure thickness of the basement

همراه باشد که این خود باعث افزایش حجم کل تخمدان می‌گردد.<sup>۲۰</sup>

در مطالعه Soylu Karapinar و همکاران تیمار موش‌ها با اسید لیپوئیک آلفا (۱۰۰ mg/kg) به مدت ۱۰ روز سبب سرکوب رادیکال‌های آزاد گردید. در نتیجه به سلول‌های گرانولوزا آسیبی وارد نشده و فولیکول‌ها از بین نمی‌روند که این عوامل می‌تواند باعث تکامل اووسیت و هسته آن را در تخمدان شود.<sup>۲۱</sup> لذا در مورد اثرات حفاظتی اسید لیپوئیک آلفا بر بافت تخمدان، دور از انتظار نیست که این ماده موجب بهبود پارامترهای فوق در مطالعه حاضر شده باشد.

### نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات نقره به میزان ۵۰۰ میلی‌گرم

membrane zone in bronchial biopsy specimens. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Dec; 112(6): 1243-45. doi: 10.1016/j.jaci.2003.09.038.

- Sriram MI, Kanth SB, Kalishwaralal K, Gurnathan S. Antitumor activity of silver nanoparticles in Dalton's lymphoma ascites tumor model. *Int J Nanomedicine*. 2010 Oct; 5: 753-62. doi: 10.2147/IJN.S11727.
- Cruz-Orive LM. Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy. *J Anat*. 1999 Jan; 194(Pt 1): 153-57. doi: 10.1046/j.1469-7580.1999.194101536.x.
- Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc*. 2003 Dec; 75(4): 469-86. doi: 10.1590/s0001-37652003000400006.
- El-Nouri MA, Azmy OM, Ibraheem Elshal AO, Ragab AMH, Elsherbini EAM. Study of the Effects of Silver Nanoparticles Exposure on the Ovary of Rats. *Life Science Journal*. 2013; 10(2): 1887-94.
- Ghorbanzadeh V, Moshtaghian SJ, Habibian S, Ebadi AG. Influence of nanosilver on secondary follicles of ovary via intraperitoneal injection in rats. *Middle-East Journal of Scientific Research*. 2011; 8(1): 228-30.
- Syrvatka V, Slyvchuk YI, Rozgoni II, Gevkan II, Shtapenko OV. Effect of silver nanoparticles on maturation of rabbit's oocytes co-cultured with granulosa cells in vitro. *Studia Biologica*. 2015; 9(1):57-66. doi: 10.30970/sbi.0901.419.
- Johnson AL. Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. *Anim Reprod Sci*. 2003 Oct; 78(3-4): 185-201. doi: 10.1016/s0378-4320(03)00090-3.
- Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther*. 2001 Oct; 92(1): 57-70. doi: 10.1016/s0163-7258(01)00159-0.
- Talebi A, Zavareh S, Kashani MH, Lashgarbluki T, Karimi I. The effect of alpha lipoic acid on the developmental competence of mouse isolated preantral follicles. *J Assist Reprod Genet*. 2012 Feb; 29(2): 175-83. doi: 10.1007/s10815-011-9706-6.
- Soylu Karapinar O, Pinar N, Özcan O, Özgür T, Dolapçioğlu K. Protective effect of alpha-lipoic acid in methotrexate-induced ovarian oxidative injury and decreased ovarian reserve in rats. *Gynecol Endocrinol*. 2017 Aug; 33(8): 653-59. doi: 10.1080/09513590.2017.1306847.