

## ارزیابی توان باروری داخل آزمایشگاهی و پارامترهای اسپرم در موش‌های کوچک آزمایشگاهی تیمار شده با آکرلامید

فهیمة خان محمدی قانع<sup>۱</sup>، عباس احمدی<sup>۲\*</sup>، مهدی ایمانی<sup>۳</sup>، علی شالیزار جلالی<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت ۱۴۰۰/۰۹/۰۶ تاریخ پذیرش ۱۴۰۰/۱۲/۲۲

### چکیده

**پیش‌زمینه و هدف:** امروزه با تغییر سبک زندگی، استفاده از غذاهای بسته‌بندی، خیابانی و فست‌فودها افزایش پیدا کرده است که بسیاری از آن‌ها حاوی آکرلامید می‌باشند. از مهم‌ترین عوارض آکرلامید سمیت در سیستم تولیدمثلی است. هدف از این مطالعه، بررسی اثرات طولانی‌مدت آکرلامید بر توان باروری آزمایشگاهی و پارامترهای اسپرم است.

**مواد و روش کار:** ۱۶ قطعه موش سوری نر ۸-۶ هفته ایی به ۲ گروه تقسیم و به مدت ۴۵ روز تیمار شدند. گروه کنترل روزانه ۰.۲ml سرم فیزیولوژی و گروه تیمار روزانه ۰.۲ml آکرلامید (۵۰ mg/kg) به صورت خوراکی دریافت کردند. پس از پایان دوره تیمار، استحصال اسپرم از دم اپیدیدیم و فرآیند لقاح در محیط کشت HTF+4mgBSA انجام و مراحل رشد جنینی در طی ۱۲۰ ساعت انکوباسیون مورد بررسی قرار گرفت. همچنین تعداد، قابلیت تحرک، قدرت زیست‌پذیری، کیفیت بلوغ هسته و میزان آسیب DNA اسپرم ارزیابی شد. آنالیز آماری پارامترهای اسپرم با نرم‌افزار SPSS روش T-TEST و آنالیز داده‌های لقاح داخل آزمایشگاهی با نرم‌افزار Minitab روش proportion2 انجام گرفت ( $p < 0/05$ ).

**یافته‌ها:** کاهش معنی‌داری در درصد لقاح، روپان‌های دوسلولی و بلاستوسیست‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی و افزایش معنی‌داری در تعداد جنین‌های متوقف‌شده در گروه دریافت‌کننده آکرلامید در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد ( $p < 0/05$ ). همچنین در گروه تیمار شده با آکرلامید، تعداد، قدرت تحرک و زیست‌پذیری اسپرم‌ها، تعداد اسپرم‌های با DNA آسیب‌دیده، مورفولوژی غیرطبیعی و هسته نابالغ افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان داد ( $p < 0/05$ ).

**بحث و نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد که تجویز دهانی آکرلامید به صورت طولانی‌مدت دارای اثرات منفی بر توان باروری و پارامترهای اسپرم است.

**کلیدواژه‌ها:** آکرلامید، لقاح داخل آزمایشگاهی، کیفیت اسپرم، آسیب DNA، بلوغ هسته، موش کوچک آزمایشگاهی

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و دوم، شماره دهم، ص ۷۵۶-۷۴۵، دی ۱۴۰۰

آدرس مکاتبه: گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، صندوق پستی ۱۱۷۷-۵۷۱۵۵ تلفن: ۰۹۱۴۱۴۹۸۵۲۴

Email: a.ahmady@urmia.ac.ir

### مقدمه

است که نه تنها قرار گرفتن مادران در معرض آلاینده‌های محیطی و غذایی می‌تواند رشد و تکامل جنین را تحت تأثیر قرار دهد بلکه در معرض قرار گرفتن پدران نیز چنین نتایجی را می‌تواند ایجاد کند (۲) به طوری که تأثیر یک دارو یا ماده شیمیایی بر نسل بعدی که می‌تواند به واسطه حضور آن ماده در مایع منی صورت بگیرد، یا در طول لقاح و بارورسازی تخمک بروز می‌کند و یا به احتمال بسیار زیاد در طول رشد و تکامل جنین پدیدار می‌گردد (۱). آکرلامید به صورت تجاری از هیدرولیز آکرلونیتریل تولید می‌شود که در

یکی از نگرانی‌های دنیای امروز افزایش قابل ملاحظه ناباروری و تأثیرات شگرف عوامل تغذیه‌ای مؤثر بر آن است. عوامل متعدد آگزوژنی و آندروژنی می‌تواند سلامت اسپرم و توان باروری را تحت تأثیر قرار دهد. عوامل آگزوژنی نظیر ترکیبات شیمیایی، آلاینده‌های محیطی، سن، سبک زندگی، مواجهات شغلی و... با تأثیر بر پارامترهای اسپرم (تعداد، تحرک، زیست‌پذیری، مورفولوژی) عملکرد دستگاه تناسلی نر را می‌توانند تحت تأثیر قرار دهند (۱). ثابت شده

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری تخصصی آناتومی و جنین‌شناسی مقایسه‌ای، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

<sup>۲</sup> دانشیار علوم تشریح، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (نویسنده مسئول)

<sup>۳</sup> دانشیار بیوشیمی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

<sup>۴</sup> دانشیار بافت‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

قرار گرفتن در معرض آکرلامید باعث آسیب DNA سلول‌های جنسی می‌شود (۲۲). ایجاد آسیب در DNA اسپرم پیچیده و به عوامل داخلی بیضه و فاکتورهای خارجی وابسته است. گاهی اسپرم با DNA آسیب دیده با وجود موفقیت در لقاح، توانایی ادامه رشد جنین را تا مرحله بعد از ۴ الی ۸ سلولی که همزمان با بیان زن است را ندارد، بنابراین بررسی آسیب DNA اسپرم از اهمیت بسیاری برخوردار است (۲۳). پس آکرلامید به‌عنوان یکی از مهم‌ترین آلاینده‌های غذایی یک خطر عمده برای سلامت عمومی و دستگاه تناسلی به حساب می‌آید. اگر چه مطالعات متعدد بیانگر اثرات سمی آکرلامید بر روی سیستم تولید مثلی نر می‌باشد اما بر اساس اطلاعات ما تاکنون گزارشی دال بر مطالعه اثر طولانی‌مدت آکرلامید بر توان باروری آزمایشگاهی موش سوری وجود ندارد. بنابراین، هدف از این تحقیق بررسی آثار مخرب آکرلامید در دراز مدت بر پتانسیل باروری آزمایشگاهی و ارزیابی تعداد، کیفیت، وضعیت DNA، بلوغ هسته، قدرت تحرک و زیست پذیری اسپرم موش‌های بالغ تیمار شده با آکرلامید می‌باشد.

## مواد و روش کار

### گروه بندی و نحوه تیمار:

جهت ارزیابی توان باروری آزمایشگاهی و پارامترهای اسپرم موش‌های سوری تحت تیمار طولانی مدت با آکرلامید، از ۱۶ قطعه موش سوری نر بالغ ۸-۶ هفته ایی نژاد NMRI با وزن ۲۵-۲۰ گرم استفاده شد که در خرداد ماه ۱۴۰۰ در مرکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه در شرایط استاندارد با دمای  $22 \pm 2$ ، رطوبت ۶۰-۳۰ درصد و سیکل نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی نگه داری شدند. آب و غذا به‌صورت آزاد در دسترس بود. حیوانات به دو گروه کنترل که روزانه ۰.۲ ml سرم فیزیولوژی به‌صورت خوراکی دریافت می‌کردند و گروه تیمار که روزانه ۰.۲ ml آکرلامید (ساخت شرکت MERCK, آلمان) ۵۰ mg/kg حل شده در سرم فیزیولوژی به‌صورت خوراکی دریافت می‌کردند (۲۴) تقسیم و به مدت ۴۵ روز تیمار شدند (۲۵). به ازای هر قطعه موش نر، سه قطعه موش سوری ماده بالغ ۲۵-۲۰ گرمی نژاد NMRI جهت تخمک‌گیری برای لقاح داخل آزمایشگاهی استفاده شد.

### نحوه تهیه آکرلامید:

ویال آکرلامید مورد استفاده حاوی ۱۰۰۰ گرم آکرلامید به‌صورت پودر سفید رنگ (ساخت شرکت MERCK, آلمان) بود و داروی مؤثر در موش‌های سفید آزمایشگاهی ۵۰ mg/kg به‌صورت خوراکی است. با توجه به میانگین وزن موش‌ها که ۲۵-۲۰ گرم بود میزان ۳۹۳/۷۵ میلی‌گرم از پودر آکرلامید در ۶۳ میلی‌لیتر سرم

صنعت برای تولید پلی‌آکرلامید مصرف گسترده ایی دارد (۳). فرم مونومر آکرلامید یک ترکیب سمی با پیوند غیراشباع و بسیار فعال است که در حین پختن، برشته کردن و سرخ کردن مواد غذایی در حرارت بالای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد و خصوصاً در مواد غذایی غنی از کربوهیدرات و پروتئین در حین واکنش میلارد به وجود می‌آید (۴). قرار گرفتن در معرض آکرلامید با سیگار کشیدن نیز رخ می‌دهد و سطح آکرلامید-هموگلوبین (AA-Hb) سیگاری‌ها به طور متوسط چهار برابر بیشتر از غیر سیگاری‌ها است (۵). سمیت آکرلامید از طریق القای استرس اکسیداتیو و ایجاد التهاب، آپوپتوز و اتوفازی در بافت‌های مختلفی نظیر مغز، ریه، کبد، روده، کلیه، تخمدان و بیضه‌ها به اثبات رسیده است و این سمیت به‌صورت وابسته به دوز گزارش شده است (۸-۶). از مهم‌ترین عوارض آکرلامید ژنوتوکسیسیته، نوروٹوکسیسیته و توکسیسیته در سیستم تولید مثل می‌باشد که مسئله‌ی کم‌اهمیتی نیست (۱۲-۹). سمیت تولید مثلی آکرلامید در دستگاه تناسلی ماده باعث دژنراسیون اووسیت می‌شود که از طریق متابولیت آن یعنی گلاسیدامید صورت می‌گیرد (۱۳). مطالعات اپیدمیولوژیک بیانگر ارتباط مستقیم بین قرار گرفتن در معرض آکرلامید موجود در رژیم غذایی و خطر ابتلا به سرطان‌های تخمدان، آندومتر و سرطان پستان می‌باشد (۱۴). یکی از مکانیسم‌های سرطان‌زایی آکرلامید، سرطان‌زایی ناشی از اختلال در سیستم هورمون‌های جنسی است (۱۵). اگر آکرلامید این سیستم را تحت تأثیر قرار دهد در درجه اول ممکن است یک عامل خطر برای استروژن و ایجاد سرطانی نظیر سرطان پستان باشد (۱۵). به علت پیچیدگی فرآیند اسپرماتوزیس یک ماده سمی می‌تواند کیفیت اسپرم، کمیت اسپرم و یا هر دو را تحت تأثیر قرار دهد. اثرات سوء آلاینده‌های محیطی و غذایی نظیر نانیل فنل و اتفون با کاهش کیفیت و کمیت اسپرم و توان باروری برون تنی، کاهش کیفیت پارامترهای اسپرمی، اختلال در عملکرد غدد تناسلی درون ریز و اختلال در روند اسپرماتوزیس به اثبات رسیده است (۱۶، ۱۷). مشخص شده است که آکرلامید از طریق تأثیر بر سلول‌های لیدیگ و لوله‌های منی ساز، ایجاد اختلال در بیان زن و تغییرات هیستوپاتولوژیک در بافت بیضه، کاهش سطح تستوسترون سرم و کاهش تولید اسپرم، سمیت تولید مثلی در جنس نر نیز ایجاد می‌کند (۱۸) به‌طوری‌که تجویز آکرلامید سبب کاهش قابل توجه تعداد اسپرم، نرخ باروری و تعداد فرزندان متولد شده و افزایش تعداد اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی می‌گردد (۱۹). آکرلامید و متابولیت حاصل از آن گلاسیدامید، هر دو از طریق تخلیه گلوکاتینون داخل سلولی موجب سمیت تولیدمثلی می‌شوند (۲۰). وجود فعالیت کلاستوزنیک آکرلامید در بافت‌های جوان‌هایی نشان‌دهنده وراثت‌پذیری احتمالی تغییرات DNA ناشی از آکرلامید است (۲۱).

رشد جنینی در این مدت مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی میزان شکافتگی، ۲۴ ساعت بعد از کشت صورت گرفت و در هر گروه، جنین‌ها از نظر میزان فراگمانتاسیون، طی کردن مراحل رشد جنینی و تعداد جنین‌های متوقف‌شده با هم مقایسه شدند. تیپ بندی جنین‌های متوقف‌شده با توجه به فاکتورهای مختلفی نظیر لیز شدن جنین‌ها، نکروتیک بودن آن‌ها، فراگمانتاسیون و وجود وزیکول‌های سیتوپلاسمیک صورت گرفت و به این ترتیب، تیپ I جنین‌های با لیز، فراگمانته شدن و نکروتیک بودن کامل، تیپ II جنین‌های با لیز و فراگمانته شدن در تعدادی از بلاستومرها و تیپ III جنین‌های با تعداد کمی بلاستومرهای لیز و فراگمانته و وزیکول سیتوپلاسمیک بود (۲۷). کیفیت جنین‌ها، تعداد جنین‌های رشد کرده، درصد شکافتگی با بررسی درصد جنین‌های دو سلولی، میزان جنین‌های متوقف‌شده و درصد بلاستوسیت‌های ایجادشده و هچ شده در طی ۱۲۰ ساعت انکوباسیون در هر گروه مورد ارزیابی قرار گرفت.

#### بررسی پارامترهای اسپرم:

##### تعداد کل اسپرم به ازای دم اپیدیدم:

برای شمارش اسپرم‌ها رقت ۱ به ۵۰ از اسپرم مذکور تهیه شد. به این صورت که در داخل یک میکروتیوب ۱ میلی‌لیتری، ۹۸۰ میکرولیتر آب مقطر ریخته شده و سپس، ۲۰ میکرولیتر از اسپرم موردنظر به آن افزوده شد. سپس، ۱۰ میکرولیتر از این محلول بر روی لام نئوبار که لامل سنگی از قبل بر روی آن گذاشته شده بود ریخته شد. به این ترتیب شمارش تعداد اسپرم‌ها انجام گرفت (۲۸).

##### سنجش وضعیت تحرک اسپرم:

مقدار ۱۰ میکرولیتر از محیط کشت حاوی اسپرم موردنظر را بر روی لام نئوبار که لامل سنگی بر روی آن قرار داده شده است گذاشته و درصد تحرک اسپرم‌ها در زیر میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی  $\times 400$  بررسی گردید (۲۸).

##### بررسی قدرت زیست‌پذیری اسپرم:

به منظور ارزیابی قدرت زیست‌پذیری اسپرم، از تست ائوزین-نگروزین استفاده شد. مقدار ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم موردنظر، در روی یک لام تمیز با ۲۰ میکرولیتر از محلول ائوزین حل شده و پس از ۲۰ الی ۳۰ ثانیه، ۲۰ میکرولیتر از محلول رنگی نگروزین به آن اضافه شد. بعد از تهیه اسمیر از محلول موردنظر و خشک شدن لام‌ها، با استفاده از میکروسکوپ نوری و با بزرگ‌نمایی  $\times 1000$  درصد اسپرم‌های زنده (با سر بی‌رنگ) و اسپرم‌های مرده (با سر رنگ گرفته) مورد بررسی قرار گرفت (۲۸).

##### بررسی مورفولوژی اسپرم:

فیزیولوژی حل شد و به ازای هر حیوان  $0.2$  میلی‌لیتر از محلول آکریلامید از راه دهان به وسیله سوند مری-معدی گاواج شد (۲۴). محلول به صورت هفتگی تهیه شد.

#### تهیه اسپرم:

ابتدا تمامی موش‌های نر بعد از بیهوشی با تزریق کتامین-زایلازین ( $25\text{mg/kg/bw, IP}$ ) آسان کشی شدند. سپس پوست ناحیه شکمی با اتانول ۷۰ درصد استریل و برشی در ناحیه شکم ایجاد شد. بعد از جدا کردن بافت‌های همبندی اطراف، دم اپیدیدیم از بیضه جدا و در داخل پتری دیش ۳ سانتی‌متری حاوی ۱ میلی‌لیتر محیط کشت HTF حاوی BSA ( $4\text{mg/ml}$  Albumen, Sigma, USA) که قبلاً جهت تعادل در داخل انکوباتور  $\text{CO}_2$  قرار داده شده بود گذاشته شد و بعد از ایجاد چند برش در دم اپیدیدیم برای خروج اسپرم‌ها، در داخل انکوباتور  $\text{CO}_2$  به مدت نیم ساعت قرار داده شد. بعد از گذشت این زمان و شستشو جهت خارج نمودن بقایای بافتی دم اپیدیدیم، نمونه‌های اسپرم جهت لقاح داخل آزمایشگاهی و ارزیابی پارامترهای اسپرم استفاده شد (۲۶). برای انجام این مطالعه به تحریک تخمک‌گذاری نیاز بود که بدین منظور پس از پایان دوره تیمار و ۷۲ ساعت قبل از IVF تزریق  $7.5$  واحد (IU) هورمون PMSG (ساخت شرکت Folligon، هلند) به حجم  $0.1$  میلی‌لیتر و ۴۸ ساعت بعد، تزریق  $7.5$  واحد (IU) هورمون HCG (ساخت شرکت Folligon، هلند) به حجم  $0.1$  میلی‌لیتر به روش داخل صفاقی به موش‌های سوری ماده بالغ تزریق شد. عمل تخمک‌گذاری ۱۳ ساعت بعد از تزریق HCG انجام شد. مرحله دوم از کار، تخمک‌گیری از موش‌های ماده بود که بدین منظور، ۱۳ ساعت پس از تزریق HCG (صبح روز بعد)، آسان کشی حیوانات بعد از تزریق کتامین-زایلازین ( $25\text{mg/kg/bw, IP}$ ) انجام و لوله‌های رحمی جدا شد و در داخل محیط کشت  $\text{HTF}+4\text{mg/ml}$  BSA با دمای  $37$  درجه که از قبل آماده شده بود قرار داده شد و با استفاده از روش Dissecting تخمک‌ها خارج و پس از شستشو، به محیط لقاح در زیر روغن معدنی حاوی محیط کشت HTF (حاوی  $4\text{mg/ml}$  BSA) منتقل شدند و سپس اسپرم‌ها به تعداد یک میلیون به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت، به محیط کشت منتقل شد. عمل لقاح حدود ۵-۳ ساعت بعد از اضافه کردن اسپرم صورت گرفت و بدین ترتیب زیگوت‌ها به دست آمدند (۲۷).

##### بررسی نتایج حاصل از لقاح داخل آزمایشگاهی:

زیگوت‌های حاصل از هر دو گروه در محیط کشت HTF به مدت ۱۲۰ ساعت کشت داده شدند و برای بررسی تأثیر تجویز طولانی مدت آکریلامید در زیر میکروسکوپ فاز کنتراست، مراحل

<sup>۱</sup> Viability

<sup>۱</sup> Motility

درصد اسپرم‌های بالغ (بی‌رنگ) و نابالغ (آبی‌رنگ) تعیین گردید (۲۹).

#### آنالیز آماری:

آنالیز آماری داده‌های مربوط به توان باروری آزمایشگاهی توسط نرم افزار Minitab و روش 2proportion در سطح معنی‌دار ۰/۰۵ <math>p</math> انجام گرفت و نتایج به صورت تعداد (درصد) در جدول ۱ آورده شد. آنالیز آماری داده‌های مربوط به ارزیابی پارامترهای اسپرم با نرم افزار SPSS رونوشت ۱۶ و روش آماری T-Test در سطح معنی‌دار ۰/۰۵ <math>p</math> انجام و نتایج در جدول ۲ آورده شد.

#### یافته‌ها

##### بررسی میزان لقاح و رشد جنین‌ها تا مرحله هیچ شده‌گی

##### در بلاستوسیست:

قدرت لقاح داخل آزمایشگاهی اسپرم‌های به دست آمده با بررسی درصد تخمک‌های لقاح یافته با مشاهده دو پیش هسته بعد از ۸ ساعت از فرآیند لقاح نشان داد درصد لقاح اسپرم‌های گروه تیمار شده با آکرلامید در مقایسه با گروه کنترل کاهش کاملاً معنی داری از نظر آماری داشت (۰/۰۵ <math>p</math>). همچنین بررسی میزان شکافتگی جنین‌های حاصله در هر گروه که با مطالعه درصد جنین‌های دوسلولی بعد از ۲۴ ساعت از لقاح صورت گرفت کاهش کاملاً معنی داری را از نظر آماری با ۰/۰۵ <math>p</math> در گروه تیمار شده با آکرلامید در مقایسه با گروه کنترل نشان داد (جدول ۱، شکل ۱). مطالعه روند رشد جنینی با بررسی درصد جنین‌های مرحله بلاستوسیست بعد از ۱۲۰ ساعت از لقاح نشان داد جنین‌های حاصل از لقاح داخل آزمایشگاهی گروه تیمار شده با آکرلامید به صورت کاملاً معنی داری از نظر آماری در مقایسه با گروه کنترل کاهش نشان داد (جدول ۱)، (۰/۰۵ <math>p</math>). همچنین بررسی درصد بلاستوسیست‌های حاصل از لقاح داخل آزمایشگاهی گروه تیمار شده با آکرلامید در مقایسه با گروه کنترل کاهش نشان داد (جدول ۱)، (۰/۰۵ <math>p</math>). همچنین بررسی درصد بلاستوسیست‌های حاصل از لقاح داخل آزمایشگاهی گروه تیمار شده با آکرلامید در مقایسه با گروه کنترل وجود داشت (جدول ۱، شکل ۱)، (۰/۰۵ <math>p</math>).

##### بررسی کیفیت جنین‌های متوقف شده در مراحل مختلف

##### رشد:

بررسی درصد جنین‌های متوقف شده در مراحل مختلف رشد نشان داد درصد جنین‌هایی که به مرحله بلاستوسیست نرسیدند در گروه تیمار شده با آکرلامید در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی داری داشت (۰/۰۵ <math>p</math>). همچنین بررسی میزان لیز، فراگمانتاسیون

به منظور ارزیابی مورفولوژی اسپرم، از رنگ‌آمیزی آنیلین استفاده شد. در این روش اسپرم‌هایی که دارای ظاهر غیرطبیعی بودند، شمارش و نتایج بر اساس درصد بیان شد. برای ارزیابی دقیق‌تر و همچنین تشخیص بقایای سیتوپلاسمیک که نشان از عدم بلوغ مورفولوژیک اسپرم‌ها دارد، رنگ‌آمیزی ائوزین - نگرزین نیز مورد استفاده قرار گرفت. آن دسته از اسپرم‌هایی که حاوی بقایای سیتوپلاسمی بودند به عنوان اسپرم‌های غیرطبیعی (از لحاظ مورفولوژیک) در نظر گرفته شدند (۲۹).

#### بررسی میزان آسیب DNA اسپرم:

برای بررسی میزان آسیب DNA اسپرم از رنگ‌آمیزی آکریدین-اورنج استفاده شد. این رنگ فلورسنت، جهت تمایز DNA دو-رشته-ای سالم از DNA تک-رشته‌ای ناسالم و دنا توره به کار می‌رود. DNA دو-رشته‌ای سالم زیر میکروسکوپ فلورسنت، سبز رنگ و DNA تک-رشته‌ای دنا توره بسته به میزان آسیب زرد تا قرمز فلورسنت نمایان می‌شود. در این روش پس از سه بار شستشوی نمونه سمینال با بافر PBS و حذف مایع رویی، رسوب حاصل به کمک بافر PBS به غلظت نهایی رسانده شد. پس از تهیه اسمیر از هر نمونه و خشک شدن آن در محیط آزمایشگاه، لام‌ها جهت ثبوت به مدت ۳۰ دقیقه در داخل ظرف حاوی اتانول - استون به نسبت 1:1 قرار گرفتند. سپس لام‌ها به مدت ۷ دقیقه توسط رنگ آکریدین‌اورنج رنگ‌آمیزی شدند. پس از شستشو توسط آب جاری و خشک شدن نهایی، لام‌ها توسط میکروسکوپ ایمونوفلوئورسنت با فیلتر ۴۶۰ nm و بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ بررسی شد و نتایج حاصل به صورت درصد بیان شد (۲۹).

#### ارزیابی بلوغ هسته اسپرم:

برای این منظور از رنگ‌آمیزی آنیلین بلو استفاده شد. پروتئین هیستون دارای مقدار زیادی اسید آمینه لیزین می‌باشد که با رنگ‌های اسیدی همانند آنیلین بلو واکنش نشان می‌دهد و آبی رنگ می‌شود. در طی مرحله اسپرمیونژنز<sup>۳</sup> پروتئین به جای هیستون در کروماتین هسته قرار می‌گیرد که این جایگزینی در تراکم و پایداری اسپرم بسیار با اهمیت است. در این رنگ‌آمیزی، اسپرم‌های نابالغ به دلیل هیستون زیاد به رنگ آبی تیره مایل به خاکستری درآمده و اسپرم‌های بالغ از رنگ پذیری کم‌تری برخوردار هستند. همانند روش ذکر شده در فوق، شستشوی اسپرم‌ها در بافر PBS انجام شد و پس از تثبیت لام‌ها در محلول اتانول - استون و خشک شدن در مجاورت هوا، لام‌ها به مدت هفت دقیقه در محلول حاوی رنگ آنیلین بلو قرار گرفت و بعد از شستشو و خشک شدن در مجاورت هوا با میکروسکوپ نوری و درشت‌نمایی (۱۰×۱۰۰) بررسی شدند و

<sup>۱</sup> Spermiogenesis

و واکوئل در بلاستومرهای جنین‌های متوقف شده در گروه تحت تیمار با آکریلامید بر اساس تیپ‌بندی آن‌ها (تیپ I که اکثر بلاستومرها دچار لیز و فرگمانتاسیون بودند، تیپ II که حدود ۵۰ درصد از بلاستومرها لیز و فراگمانتاسیون داشته‌اند و جنین‌های تیپ III که بلاستومرها لیز و فرگمانتاسیون جزئی را داشتند) نشان داد میزان لیز و فراگمانتاسیون و واکوئل در جنین‌های متوقف شده تا حد زیادی افزایش یافت و اکثر جنین‌های متوقف شده از نوع تیپ I و II بودند (شکل ۱-B)، در حالی که در گروه کنترل این جنین‌های متوقف شده از نوع تیپ III با میزان لیز، فراگمانتاسیون و واکوئل کمی بودند (جدول ۱، شکل ۱-A)، ( $p < 0.05$ ).

### بررسی پارامترهای اسپرم:

#### تعداد اسپرم دم اپیدیدیم:

به‌منظور ارزیابی تعداد اسپرم‌های دم اپیدیدیم، شمارش اسپرم‌ها در هر دو گروه در زیر لام نئوبار به وسیله میکروسکوپ نوری انجام شد. کاهش معنی‌داری بین میانگین اسپرم‌های شمارش شده در گروه تیمار ( $15/1 \pm 6/65$  میلیون) و گروه کنترل ( $53/87 \pm 2/59$  میلیون) مشاهده شد (جدول ۲)، ( $p < 0.05$ ).

#### وضعیت تحرک اسپرم:

درصد اسپرم‌های متحرک در دو گروه تیمار و کنترل توسط میکروسکوپ نوری بررسی شد که در گروه تیمار میانگین درصد اسپرم‌های متحرک ( $22/2 \pm 8/45$ ) کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل ( $69/1 \pm 25/49$ ) نشان داد (جدول ۲)، ( $p < 0.05$ ).

#### قدرت زیست‌پذیری اسپرم:

تعداد اسپرم‌های مرده و زنده در روش رنگ‌آمیزی ائوزین - نگرزین در هر دو گروه شمارش و درصد آن‌ها به دست آمد. کاهش معنی‌داری در میانگین درصد اسپرم‌های زنده گروه تیمار

#### مورفولوژی اسپرم:

هرگونه اختلال در شکل ظاهری اسپرم و دم آن و همچنین وجود باقیمانده‌های سیتوپلاسمی به‌عنوان مورفولوژی غیرطبیعی در نظر گرفته شد. اسپرم‌هایی با مورفولوژی غیرطبیعی در دو گروه کنترل و تیمار شمارش و به‌صورت درصد بیان شد. اختلاف معنی‌داری بین میانگین درصد اسپرم‌های غیرطبیعی در گروه تیمار ( $52/3 \pm 4/35$ ) و کنترل ( $11/2 \pm 5/1$ ) مشاهده شد (جدول ۲)، ( $p < 0.05$ ).

#### بلوغ هسته اسپرم:

در روش رنگ‌آمیزی آنیلین بلو برای ارزیابی بلوغ هسته، اسپرم‌هایی با هسته حاوی هیستون بسته به میزان هیستون به رنگ آبی تا خاکستری رنگ گرفتند. تعداد اسپرم‌های نابالغ در دو گروه محاسبه و درصد آن به دست آمد که افزایش معنی‌داری در میانگین درصد اسپرم‌های نابالغ گروه تیمار ( $31/2 \pm 4/06$ ) در مقایسه با گروه کنترل ( $2/0 \pm 5/64$ ) مشاهده شد (جدول ۲)، (شکل ۳)، ( $p < 0.05$ ).

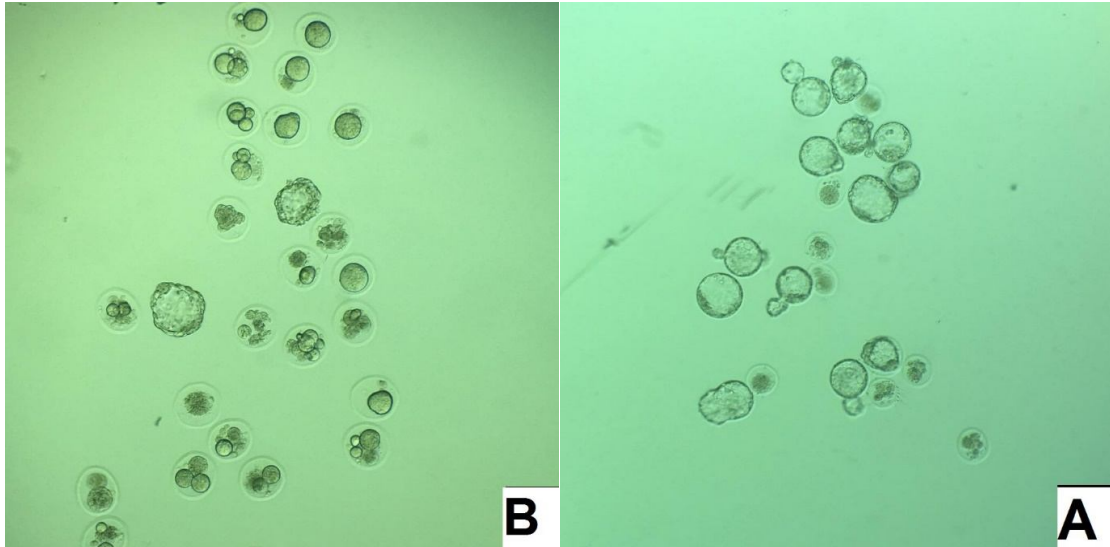
#### میزان آسیب DNA اسپرم:

در روش ارزیابی با آکریدین اورنج تعداد اسپرم‌های با کروماتین آسیب دیده در هر دو گروه با استفاده از میکروسکوپ فلوروسنت محاسبه و درصد آن‌ها به دست آمد که اسپرم‌هایی با هسته سبز رنگ طبیعی و با هسته زرد تا قرمز بسته به میزان آسیب کروماتین، اسپرم‌هایی با DNA آسیب دیده در نظر گرفته شدند. اختلاف بین میانگین درصد اسپرم‌هایی با DNA آسیب دیده در گروه تیمار ( $33/1 \pm 6/86$ ) نسبت به گروه کنترل ( $2/0 \pm 7/62$ ) معنی‌دار بود (جدول ۲)، (شکل ۴)، ( $p < 0.05$ ).

جدول (۱): نتایج حاصل از بررسی روند رشد جنینی و نوع توقف جنینی

گروه	تعداد کل اووسیت	لقاح	دوسلولی	بلاستوسیست	هچ شده	متوقف شده	تیپ ۱	تیپ ۲	تیپ ۳
	تعداد	تعداد	تعداد	تعداد	تعداد	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
کنترل	۱۸۹	۱۷۸	۱۶۳	۱۱۵	۷۸	۶۳ (۳۵/۳۹)	۳ (۱/۶۸)	۶ (۳/۳۷)	۵۴ (۳۰/۳۴)
تیمار	۲۱۶	۱۳۳	۷۸	۲۱	۴	۱۱۲ (۵۱/۴۱)	۴۱ (۱۸/۸۳)	۵۴ (۲۵/۱۱۳)	۱۷ (۷/۳۸)

وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه تیمار با گروه کنترل با علامت × مشخص شده است ( $p < 0.05$ ).



**شکل (۱):** A- گروه کنترل، تمایز درصدی از جنین‌ها به بلاستوسیست با کیفیت مناسب بعد از ۱۲۰ ساعت انکوباسیون و درصدی از جنین‌ها که در مراحل مختلف رشد متوقف شده‌اند (بزرگ‌نمایی  $\times 100$ )، B- گروه تیمار شده با آکریلامید، درصد کمی از جنین‌ها به مرحله بلاستوسیست رسیده و بلاستوسیست‌های حاصله کیفیت مناسبی از نظر مورفولوژی ندارند، درصد بالایی از جنین‌ها متوقف شده‌اند و جنین‌های متوقف شده دارای لیز و فراگمانتاسیون زیاد و اکثراً از تیپ ۱ و ۲ می‌باشند (بزرگ‌نمایی  $\times 100$ ).

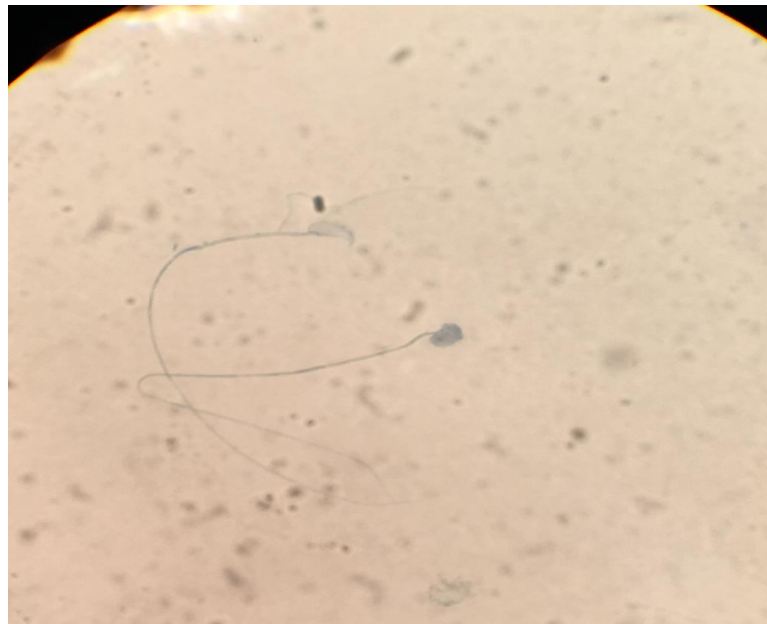
**جدول (۲):** نتایج حاصل از ارزیابی پارامترهای اسپرم

گروه	میانگین تعداد اسپرم در دم اپیدیدیم $\times 10^6$	میانگین اسپرم متحرک	میانگین اسپرم زنده	میانگین اسپرم با مورفولوژی غیرطبیعی	میانگین اسپرم نابالغ	میانگین اسپرم با DNA آسیب دیده
کنترل	$53/2 \pm 87/59$	$69/1 \pm 25/49$	$1 \pm 76/87$	$11/2 \pm 5/1$	$2/0 \pm 5/64$	$2/0 \pm 7/62$
تیمار	$15/1 \pm 6/65$	$22/2 \pm 8/45$	$30/1 \pm 8/93$	$52/3 \pm 4/35$	$31/2 \pm 4/06$	$33/1 \pm 6/86$

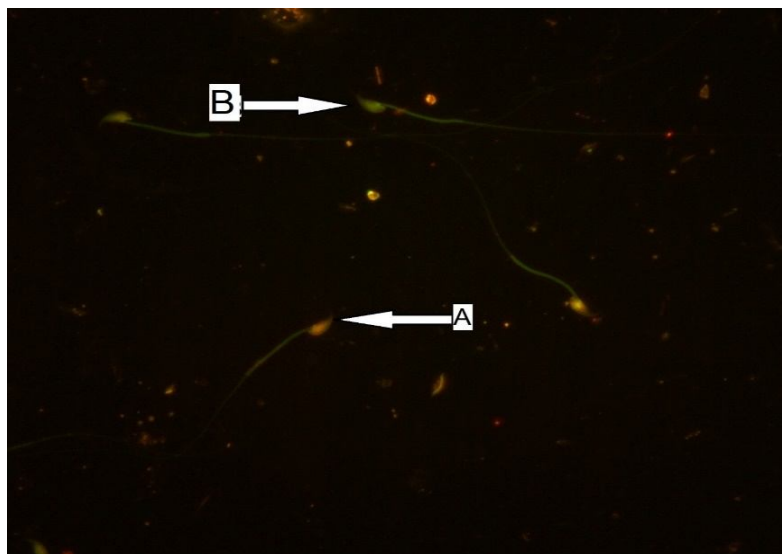
وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه تیمار با گروه کنترل با علامت  $\times$  مشخص شده است ( $p < 0/05$ ).



**شکل (۲):** رنگ‌آمیزی اتوزین نگرزین، سر اسپرم زنده بی‌رنگ و اسپرم مرده به دلیل آسیب دیده‌گی غشای پلاسمایی و نفوذپذیری آن به رنگ اتوزین صورتی دیده می‌شود (بزرگ‌نمایی  $\times 1000$ )



شکل (۳): رنگ آمیزی آنیلین بلو، اسپرم بالغ با هسته آبی کمرنگ و اسپرم نابالغ با هسته آبی تیره مشخص است (بزرگنمایی  $\times 1000$ )



شکل (۴): رنگ آمیزی آکریدین اورنج، سر اسپرم با DNA آسیب دیده به رنگ زرد (A) و سر اسپرم نرمال به رنگ سبز (B) دیده می شود (بزرگنمایی  $\times 400$ )

### بحث و نتیجه گیری

تجویز طولانی مدت آکریلامید سبب کاهش کیفیت اسپرم و توان باروری داخل آزمایشگاهی و روند رشد جنینی شد. آکریلامید به عنوان یکی از عوامل سمی غذایی، روزانه مقادیری از آن همراه با غذاهای حرارت دیده حاوی مقادیر بالای کربوهیدرات و پروتئین وارد بدن ما می شود و می تواند به عنوان یک عامل تولید کننده سمیت تولیدمثلی عمل کند. میزان آسیب ناشی از سموم غذایی

نظیر آکریلامید به ماهیت متابولیت آن، مقدار ماده شیمیایی مصرف شده و مدت زمان قرارگرفتن در معرض آن بستگی دارد (۳۰). در مردانی که در معرض ترکیبات شیمیایی، آلاینده های محیطی و شغلی، امواج الکترومغناطیسی و فلزاتی چون سرب، جیوه و منگنز قرار می گیرند، عملکرد سیستم تولیدمثلی آن ها از طریق نقص در فعالیت غدد درون ریز و سطح هورمون های جنسی و کاهش قابل توجه پارامترهای اسپرم تحت تأثیر قرار می گیرد (۳۱، ۳۲، ۳۳).

کاهش قدرت زیست پذیری اسپرم‌ها بودیم و نتایج حاکی از افزایش معنی دار اسپرم‌هایی با مورفولوژی غیرطبیعی بود و این تغییرات ایجاد شده در پارامترهای مهم و تأثیر گذار بر فرآیند لقاح یعنی کاهش تعداد و قدرت تحرک اسپرم‌ها و افزایش ناهنجاریهای مورفولوژیکی اسپرم در نتیجه تغییر در سیالیت غشا، تأثیر مستقیمی بر کاهش توان باروری آزمایشگاهی از طریق کاهش درصد لقاح و رویان‌های دو سلولی در گروه تیمار شده با آکرلامید در مقایسه با گروه کنترل داشت (جدول ۱، شکل ۱ و ۲)، ( $p < 0.05$ ).

ارتباط تنگاتنگی بین کیفیت اسپرم، میزان باروری و رشد جنینی وجود دارد (۳۹). کسب قابلیت‌های لازم برای تحرک، ظرفیت یابی و نفوذ به درون پرده شفاف اووسیت‌ها از جمله مواردی است که اسپرم‌ها در طی عبور از اپیدیدیم، آن‌ها را کسب می‌کنند (۳۹). در مواردی که اسپرماتوزن دچار اختلال می‌شود، مکانیسم‌های بیرون راندن سیتوپلاسم دچار نقص شده و اسپرم به همراه بقایای سیتوپلاسمی از اپی تلوم زایا جدا می‌شود. اسپرمی که تحت این شرایط آزاد می‌شود، نابالغ بوده و دارای نقص عملکردی می‌باشد هرگونه اختلال در فرآیند بلوغ داخل اپی دیدیمی اسپرم‌ها، در توان بارورسازی این سلول‌ها ایجاد مشکل می‌کند (۴۰). پس می‌توان چنین نتیجه گرفت که آکرلامید با ایجاد اختلال در بلوغ داخل اپی دیدیمی اسپرم موجب افزایش اسپرم‌های نابالغ و غیرطبیعی و در نهایت کاهش توان باروری می‌شود و در مطالعه حاضر نیز آکرلامید توانست با کاهش کیفیت مورفولوژی اسپرم، تعداد اسپرم-های نابالغ و غیرطبیعی را به طور معنی داری افزایش دهد (جدول ۱، شکل ۳)، ( $p < 0.05$ ).

آکرلامید و گلاسدیامید قابلیت اتصال به DNA و هموگلوبین را دارند که اتصال آن‌ها به DNA یک امر مهم در جهش‌زایی ناشی از آکرلامید در سلول‌های زایا و سوماتیک است به طوری که قرار گرفتن در معرض آکرلامید منجر به آسیب DNA سلول‌های جنسی می‌گردد که دارای اثرات منفی بر نتایج تولید مثل است (۲۲). علاوه بر این، اسپرم مردان نابارور در مقایسه با اسپرم مردان بارور، آسیب DNA بیشتری را به همراه دارد. علاوه بر اختلال در باروری، چنین آسیبی احتمالاً باعث افزایش انتقال بیماری‌های ژنتیکی در طی روش‌های کمک باروری می‌شود (۴۱). روشی جدیدی که برای بررسی باروری مردان انجام می‌شود ارزیابی کروماتین هسته اسپرم است (۴۱). از آن جا که گامت نر ۵۰ درصد از ژنوم جنین را تأمین می‌کند، هر گونه ناهنجاری در کروماتین اسپرم می‌تواند بر رشد جنین تأثیر گذارد و در واقع یک رابطه مستقیمی بین آسیب کروماتین DNA اسپرم و نتایج تولید مثل وجود دارد (۴۲). تراکم کروماتین اسپرم نقش اساسی در باروری مردان، رشد اولیه جنین و نتایج بارداری دارد (۴۲). همچنین استرس اکسیداتیو و نقص در بسته

عوامل چندی در کاهش نسبی و یا از دست رفتن کامل اسپرماتوزنیز دخیل هستند که یکی از این عوامل استرس اکسیداتیو ناشی از سموم غذایی است (۳۳). سمیت تولیدمثلی ناشی از آلاینده‌های غذایی و محیطی با پراکسیداسیون لیپیدی اسیدهای چرب غیر اشباع موجود در ساختار غشای اسپرم می‌تواند منجر به کاهش تعداد اسپرم، افزایش مرگ سلولی و تغییرات سیتوپاتولوژیک متعدد از جمله تغییر سیالیت غشای اسپرم و در نتیجه کاهش تحرک اسپرم، کاهش قدرت زیست پذیری و ظرفیت‌پذیری اسپرم گردد که به طور مستقیم با کاهش قدرت باروری در ارتباط است (۳۴). آکرلامید و متابولیت حاصل از آن یعنی گلاسدیامید قابلیت اتصال به پروتئین‌های اسپرماتید و پروتئین‌های حرکتی موجود در تاژک اسپرم از جمله کینزین و دینئین و تداخل در عملکرد این پروتئین‌ها را دارند و سبب کاهش تراکم کروماتین اسپرم، ایجاد اختلالات مورفولوژیکی اسپرم و همچنین تداخل در عملکرد تاژک‌ها و در نتیجه کاهش تحرک اسپرم می‌شوند (۲۲).

نتایج این مطالعه نیز نشان داد که تجویز دهانی آکرلامید به صورت طولانی سبب تغییر در سیالیت غشای اسپرم و در نتیجه کاهش تحرک و ظرفیت پذیری اسپرم شد به طوری که اثر این تغییرات به وضوح در نتایج لقاح داخل آزمایشگاهی با کاهش معنی دار درصد لقاح، رویان‌های دوسلولی و میزان شکافتگی رویان‌ها در مقایسه با گروه کنترل در محیط کشت مشخص شد (جدول ۱، شکل ۱) ( $p < 0.05$ ).

تعداد و مورفولوژی اسپرم‌ها از دیگر فاکتورهایی هستند که تحت تأثیر غلظت‌های بالای پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از عوامل محیطی قرار می‌گیرد (۳۵). آکرلامید می‌تواند باعث اختلال در عملکرد بیضه، هورمون‌های جنسی و ژن‌های پاسخ ایمنی، کاهش ذخیره اسپرم در دم اپیدیدیم، تخریب بافت بیضه و اتروفی بیضه، افزایش ناهنجاریهای مورفولوژیکی اسپرم و کاهش کیفیت اسپرم می‌گردد (۳۶). افزایش تغییر شکل اسپرم به فرم غیرطبیعی توسط آکرلامید به صورت وابسته به دوز است (۳۵). مطالعات نشان داده است که آکرلامید مستقیماً به سلول‌های لیدیک آسیب می‌رساند و بر عملکرد بیضه و فرآیند اسپرم‌زایی تأثیر می‌گذارد (۳۷) تجویز دوزهای بالای آکرلامید باعث ضخیم شدن اندوتلیوم عروق خونی لوله‌های منی ساز و در نتیجه کاهش تولید اسپرم می‌شود (۲۲). آکرلامید باعث اختلال در جفت‌گیری، کاهش نرخ باروری، ایجاد ناهنجاری در سر اسپرم و همچنین کوچک شدن هسته اسپرم، افزایش تعداد اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی و کاهش قدرت زیست پذیری اسپرم می‌شود (۳۸). ما نیز در این مطالعه تجربی با تجویز طولانی مدت آکرلامید شاهد اثر سوء آن بر فرآیند اسپرماتوزن کاهش معنی دار تعداد اسپرم‌ها به ازای دم اپیدیدیم و



درمجموع نتایج این مطالعه نشان می‌دهد قرار گرفتن طولانی‌مدت در معرض آکریلامید از طریق مداوم غذاهای تهیه شده در حرارت‌های بالا نظیر فست‌فودها و برخی غذاهای فرآوری و بسته بندی شده به دلیل تأثیرات سوء آن بر پارامترهای اسپرم می‌تواند باعث کاهش پتانسیل تولیدمثلی شود. لذا تغییر سبک زندگی و عادات غذایی و محدود کردن استفاده از این قبیل غذاها به‌منظور کاهش اثرات نامطلوب آن بر سلامتی بایستی بیشتر مورد توجه قرار گیرد.

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه دانشجوی مقطع دکتری تخصصی (Ph.D) می‌باشد که با حمایت دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه اجرا شده است.

بندی کروماتین اسپرم که به دلیل نقص در جایگزینی هیستون توسط پروتامین طی مرحله اسپرمیوژنز است از عوامل اصلی آسیب DNA و ناهنجاری کروماتین هسته اسپرم می‌باشد (۴۱، ۴۲). بررسی‌های انجام گرفته در این تحقیق نیز حاکی از این بود که آکریلامید با ایجاد شکست DNA در هسته اسپرم و اختلال در فرآیند بلوغ اسپرم باعث کاهش میزان شکافتگی جنین‌ها در محیط کشت، کاهش درصد بلاستوسپیست‌ها و بلاستوسپیست‌های هچ شده گردید و از این طریق اثرات سوء خود را در کاهش قدرت لانه‌گزینی و توان باروری اعمال نمود و سبب کاهش رشد جنین‌ها و افزایش معنی دار تعداد جنین‌های متوقف شده در مراحل مختلف رشد در محیط کشت گردید (جدول ۱، شکل ۴)،  $(p < 0/05)$ .

## References

- Mantovani A, Maranghi F. Risk assessment of chemicals potentially affecting male fertility. *J Contracept* 2005; 72(4): 308-1.
- Al-Gubory KH. Environmental pollutants and lifestyle factors induce oxidative stress and poor prenatal development. *Reprod Biomed Online* 2014; 29(1): 17-31.
- Krishnakumar T, Visvanathan R. Acrylamide in food products: A review. *J Food Process Technol* 2014; 5(7) : 1.
- Friedman M. Acrylamide: inhibition of formation in processed food and mitigation of toxicity in cells, animals, and humans. *Food Funct* 2015; 6(6): 1752-72.
- Schettgen T, Rossbach B, Kütting B, Letzel S, Drexler H, Angerer J. Determination of haemoglobin adducts of acrylamide and glycidamide in smoking and non-smoking persons of the general population. *Int J Hyg Environ Health* 2004; 207(6): 531-9.
- Ahrari Roodi P, Moosavi Z, Afkhami Goli A, Azizzadeh M, Hosseinzadeh H. Histopathological Study of Protective Effects of Honey on Subacute Toxicity of Acrylamide-Induced Tissue Lesions in Rats' Brain and Liver. *Iran J Toxicol* 2018; 12(3): 1-8.
- Bin-Jumah M, Abdel-Fattah A-FM, Saied EM, El-Seedi HR, Abdel-Daim MM. Acrylamide-induced peripheral neuropathy: manifestations, mechanisms, and potential treatment modalities. *Environ Sci Pollut Res* 2021: 1-16.
- Gur C, Kandemir FM, Darendelioglu E, Caglayan C, Kucukler S, Kandemir O, et al. Morin protects against acrylamide-induced neurotoxicity in rats: an investigation into different signal pathways. *Environ Sci Pollut Res* 2021: 1-12.
- Tian S-m, Ma Y-x, Shi J, Lou T-y, Liu S-s, Li G-y. Acrylamide neurotoxicity on the cerebrum of weaning rats. *Neural Regener Res* 2015; 10(6): 938.
- Seale SM, Feng Q, Agarwal AK, El-Alfy AT. Neurobehavioral and transcriptional effects of acrylamide in juvenile rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2012; 101(1): 77-84.
- Wei Q, Li J, Li X, Zhang L, Shi F. Reproductive toxicity in acrylamide-treated female mice. *Reprod. Toxicol* 2014; 46: 121-8.
- Marchetti F, Lowe X, Bishop J, Wyrobek AJ. Induction of chromosomal aberrations in mouse zygotes by acrylamide treatment of male germ cells and their correlation with dominant lethality and heritable translocations. *Environ Mol Mutagen* 1997; 30(4): 410-7.
- Aras D, Cakar Z, Ozkavukcu S, Can A, Cinar O. In Vivo acrylamide exposure may cause severe toxicity to mouse oocytes through its metabolite glycidamide. *PLoS One* 2017; 12(2): e0172026.

14. Thonning Olesen P, Olsen A, Frandsen H, Frederiksen K, Overvad K, Tjønneland A. Acrylamide exposure and incidence of breast cancer among postmenopausal women in the Danish Diet, Cancer and Health Study. *Int J Cancer* 2008; 122(9): 2094-100.
15. Althuis MD, Fergenbaum JH, Garcia-Closas M, Brinton LA, Madigan MP, Sherman ME. Etiology of hormone receptor-defined breast cancer: a systematic review of the literature. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13(10): 1558-68.
16. Ahmadi A, Jamshidi F. Evaluation of the Protective Effect of Satureja khuzestanica Essential Oil on the Potential Fertilization in Vitro and the Process of Embryonic Growth in Syrian Mice Under the Oxidative Stress Induced by Nonophenol. *Armaghane danesh* 2020; 25(2): 201-12.
17. Jahangirfard R, Najafi G, Shalizar-jalali A, Ahmadi A, Zadeh-hashem E. Evaluation of CatSper 2 gene expression and embryonic morphological parameters in mice exposed to ethephon. *J Sabzevar Univ Med Sci* 2021; 28(3): 379-86.
18. Pouretezari M, Talebi A, Abbasi A, Khalili MA, Mangoli E, Anvari M. Effects of acrylamide on sperm parameters, chromatin quality, and the level of blood testosterone in mice. *Iran J Reprod Med* 2014; 12(5): 335.
19. Sakamoto J, Hashimoto K. Reproductive toxicity of acrylamide and related compounds in mice\_ effects on fertility and sperm morphology. *Arch Toxicol* 1986; 59(4):201-5.
20. Luo Y-S, Long T-Y, Shen L-C, Huang S-L, Chiang S-Y, Wu K-Y. Synthesis, characterization and analysis of the acrylamide-and glycidamide-glutathione conjugates. *Chem Biol Interact* 2015; 237: 38-46.
21. Dearfield KL, Douglas GR, Ehling UH, Moore MM, Segal GA, Brusick DJ. Acrylamide: a review of its genotoxicity and an assessment of heritable genetic risk. *Fundam. Mol Mech Mutagen* 1995; 330(1-2): 71-99.
22. Nixon BJ, Stanger SJ, Nixon B, Roman SD. Chronic exposure to acrylamide induces DNA damage in male germ cells of mice. *Toxicol Sci* 2012; 129(1): 135-45.
23. Babakhah L, Azad I, Arbabian M, Tavalaei M, Bahadorani M, Nasr-Esfahani M. Influence of Occupational Exposures on Sperm Parameters and Chromatin Structure. *Cell Tissue Res* 2017; 8(1): 52-68.
24. Duan X, Wang Q-C, Chen K-L, Zhu C-C, Liu J, Sun S-C. Acrylamide toxic effects on mouse oocyte quality and fertility in vivo. *Sci Rep* 2015; 5(1):1-11.
25. Zobeiri F, Sadrkhanlou R-A, Salami S, Mardani K, Ahmadi A. The effect of ciprofloxacin on sperm DNA damage, fertility potential and early embryonic development in NMRI mice. *Vet Res Forum* 2012; 3(2): 131-5.
26. Mozaffari AA, Shahrooz R, Ahmadi A, Malekinejad H, Mardani K. Assessment of protective effect of ethyl pyruvate on sperm parameters, and trend of embryological development after in vitro fertilization (IVF) in phenylhydrazine treated mice. *Sci J Kurd* 2017; 22(1):11-24.
27. Khan Mohammadi Ghane F, Ahmadi A, Razi M. Evaluation of protective effects of Ethyl Pyruvate on embryo developing process in in vitro fertilization (IVF) in Cyclophosphamide treated mice. *Res J Med Sci* 2014; 25(8): 760-8.
28. Fajri M, Ahmadi A, Sadrkhanlou R. Protective effects of Equisetum arvense methanolic extract on sperm characteristics and in vitro fertilization potential in experimental diabetic mice: An experimental study. *Int J Reprod Biomed* 2020; 18(2): 93.
29. Ahmadi A, Salami S, Ahmadi A. Evaluation of sperm quality, maturation and DNA integrity in adult mice treated with sulpiride. *Tehran Univ Med J* 2012; 70(4).
30. Capuano E, Fogliano V. Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *J Agric Food Chem* 2011; 44(4): 793-810.

31. Jeng HA, Pan CH, Chao MR, Chiu CC, et al. Sperm quality and DNA integrity of coke oven workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int J Occup Med Environ Health*. 2016; 29(6): 915-26.
32. Jurewicz J, Radwan M, Sobala W, Radwan P, Bochenek M, Hanke W. Effects of occupational exposure - is there a link between exposure based on an occupational questionnaire and semen quality? *Syst Biol Reprod Med* 2014; 60(4): 227-33.
33. Nirupama M, Devaki M, Nirupama R, Yajurvedi H. Chronic intermittent stress-induced alterations in the spermatogenesis and antioxidant status of the testis are irreversible in albino rat. *J Physiol Biochem* 2013; 69(1): 59-68.
34. Collodel G, Federico M, Geminiani M, Martini S, Bonechi C, Rossi C, et al. Effect of trans-resveratrol on induced oxidative stress in human sperm and in rat germinal cells. *Reprod Toxicol* 2011; 31(2): 239-46.
35. Agarwal A, Mulgund A, Alshahrani S, Assidi M, Abuzenadah AM, Sharma R, et al. Reactive oxygen species and sperm DNA damage in infertile men presenting with low level leukocytospermia. *Reprod Biol Endocrinol* 2014; 12(1): 1-8.
36. Babaei H, Kheirandish R, Ebrahimi L. The effects of copper toxicity on histopathological and morphometrical changes of the rat testes. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012; 2(3): S1615-S9.
37. Yang HJ, Lee SH, Jin Y, Choi JH, Han CH, Lee MH. Genotoxicity and toxicological effects of acrylamide on reproductive system in male rats. *J Vet Sci* 2005; 6(2): 103-9.
38. Wang H, Huang P, Lie T, Li J, Hutz RJ, Li K, et al. Reproductive toxicity of acrylamide-treated male rats. *Reprod Toxicol* 2010; 29(2): 225-30.
39. Suzuki N, Sofikitis N. Protective effects of antioxidants on testicular functions of varicocelectomized rats. *Yonago Acta Med* 1999; 42(7): 87-94.
40. Cocuzza M, Sikka SC, Athayde KS, Agarwal A. Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. *Int Braz J Urol* 2007; 33(5): 603-21.
41. Talebi A, Vahidi S, Aflatoonian A, Ghasemi N, Ghasemzadeh J, Firoozabadi R, et al. Cytochemical evaluation of sperm chromatin and DNA integrity in couples with unexplained recurrent spontaneous abortions. *Andrologia* 2012; 44: 462-70.
42. Talebi AR, Khalili MA, Nahangi H, Abbasi A, Anvari M. Evaluation of epididymal necrospermia following experimental chronic spinal cord injury in rat. *Iran J Reprod Med* 2007; 4: 171-7.

## EVALUATION OF IN VITRO FERTILIZATION POTENTIAL AND SPERM PARAMETERS IN ACRYLAMIDE TREATED MICE

Fahime Khan Mohamadi<sup>1</sup>, Abbas Ahmadi<sup>2\*</sup>, Mehdi Imani<sup>3</sup>, Ali Shalizar Jalali<sup>4</sup>

Received: 27 November, 2021; Accepted: 13 March, 2022

### Abstract

**Background & Aims:** Today, with lifestyle changes, the tendency to use packaged food, street food, and fast food has increased, and most of them contain Acrylamide. One of the most important side effects of Acrylamide is toxicity in the reproductive system. In this study, the long-term effects of Acrylamide on in Vitro Fertilization (IVF) and sperm parameters were investigated.

**Materials & Methods:** Sixteen male mice (age: 6-8 weeks) were divided into two groups. The control group received normal saline (0.2ml/day) and the treatment group received Acrylamide (50mg/kg, 0.2ml/day) orally for 45 days. At the end of the term, sperms were extracted from the tail of the epididymis and fertilization process was performed in HTF + 4mgBSA medium and embryonic growth stages were studied during 120 hours of incubation. Also, sperm count, motility, viability, sperm chromatin quality, and DNA integrity were evaluated. Two proportion methods by Minitab software and T-Test by SPSS software were used for statistical analysis ( $p < 0.05$ ).

**Results:** There was a significant decrease in the percentage of fertilization, 2 cell-embryos and blastocysts resulting from IVF and a significant increase was observed in the number of arrested embryos in treatment group by Acrylamide compared to the control group ( $p < 0.05$ ). Also in treatment group by Acrylamide, sperm count, motility, and viability of sperms, the number of sperms with DNA damage, abnormal morphology, and with immature nucleus showed a significant increase compared to the control group ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** The study showed long-term oral administration of Acrylamide has negative effects on fertility potential and sperm parameters.

**Keywords:** Acrylamide, In Vitro Fertilization, sperm quality, DNA damage, Nucleus maturation, Mice

**Address:** Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

**Tel:** +98 9141498524

**Email:** a.ahmady@urmia.ac.ir

SOURCE: STUD MED SCI 2022; 32(10): 756 ISSN: 2717-008X

Copyright © 2022 Studies in Medical Sciences

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

<sup>1</sup> PhD Student in Comparative Anatomy and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

<sup>2</sup> Associate Professor of Anatomical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran (Corresponding Author)

<sup>3</sup> Associate Professor of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

<sup>4</sup> Associate Professor of Histology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran