

Toxic Effect of Cerium Oxide Nanoparticles on Mice Testis

Maedeh Hamzeh¹,
Fereshteh Talebpour Amiri²,
Seyed Jalal Hosseinimehr³

¹ MSc Student in Anatomical Sciences, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Assistant Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Professor, Department of Radiopharmacy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received September 19, 2017 Accepted December 18, 2017)

Abstract

Background and purpose: Cerium oxide nanoparticles (CNPs) are widely used as a catalyst in industry and as an antioxidant in applied nanomedicine. The biological effect of CNPs exposure on testis tissue is not known. The objective of this study was to evaluate the effect of CNPs on testis in mice model.

Materials and methods: In this experimental study, CNPs were administered intraperitoneally at 5 mg/kg dose for 7 consecutive days. Testicular toxicity was evaluated by histopathological, biochemical, and immunohistochemical assays.

Results: According to the findings CNPs significantly induced oxidative stress in testis ($P < 0.05$). Compared to the control group, the MDA, ROS, and PC levels increased in treated groups while the GSH levels decreased. Histopathological examination showed severe damage in testis in treated group. Moreover, Johnsen's Testicular Score decreased in CNPs group. CNPs treatment caused a significant decrease in sperm count, motility, sperm viability, testosterone level and increase in number of abnormal sperms ($P < 0.05$).

Conclusion: Such observations suggest that CNPs at 5 mg/kg dose with pro-oxidative stress effect can lead to testicular toxicity. Also, this study confirmed that CNPs could pass through the blood-testis barrier.

Keywords: cerium oxide nanoparticles, testicular toxicity, oxidative stress

بررسی اثر سمی نانوذره سریع اکساید بر بیضه موش

ماتده حمزه^۱

فرشته طالب پور امیری^۲

سید جلال حسینی مهر^۳

چکیده

سابقه و هدف: نانو ذره سربوم اکسید (نانوسریا، CNP) به طور گسترده‌ای در صنعت، به عنوان یک کاتالیزور و در برنامه‌های کاربردی نانو پزشکی به عنوان یک آنتی اکسیدان استفاده می‌شود. اثرات بیولوژیکی مواجهه با نانوسریا بر بافت بیضه شناخته شده نیست. هدف از این مطالعه بررسی اثر نانوسریا بر روی بیضه موش می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، نانوسریا به صورت داخل صفاقی با دوز ۵ mg/kg به مدت ۷ روز متوالی تجویز شد. سمیت بیضه با استفاده از آزمایشات هیستوپاتولوژی، بیوشیمیایی و ایمنوهیستوشیمی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج به دست آمده نشان داد که نانوسریا به طور معنی داری استرس اکسیداتیو را القاء کرده است ($P < 0/05$). میزان ROS، MDA، PC در گروه تحت درمان با نانوسریا نسبت به گروه کنترل افزایش، و میزان GSH کاهش یافت. با بررسی هیستوپاتولوژی آسیب شدید در بافت بیضه مشاهده شد و Johnsens's Testicular Score در گروه نانوسریا کاهش یافت. دریافت CNP باعث کاهش معنی داری ($P < 0/05$) در تعداد اسپرم، درصد تحرک اسپرم، درصد زنده مانی اسپرم، سطح تستوسترون و افزایش معنی داری در تعداد اسپرم‌های غیر طبیعی شد.

استنتاج: با توجه به نتایج این مطالعه پیشنهاد می‌شود که نانوسریا در دوز ۵ mg/kg با اثر استرس پرو-اکسیداتیو می‌تواند به مسمومیت در بیضه منجر شود. همچنین تایید می‌شود که نانوسریا توانست از سد خونی-بیضه‌ای عبور کند.

واژه های کلیدی: نانو ذره سربوم اکسید، سمیت بیضه‌ای، استرس اکسیداتیو

مقدمه

گاز، پمپ‌های اکسیژن و در مصارف شیشه و سرامیک دارد، به عنوان مهم‌ترین نانو مواد معرفی می‌گردد (۲). امروزه در برنامه‌های کاربردی نانو پزشکی نیز این نانو ذره مطرح می‌باشد (۳). همان‌گونه که کاربرد نانوسریا رو به افزایش است، شناخت کمی از این نانوذرات مهندسی شده وجود دارد و نگرانی‌ها در خصوص اثرات سمی نانو ذره و اثرات زیست محیطی آن نیز رو به افزایش است. با این حال، اطلاعات در مورد سمیت

با توجه به پیشرفت‌های سریع در نانو تکنولوژی، اخیرا اثرات سوء نانوذرات از قبیل سمیت نانوذرات در سلامت انسان به سرعت در حال افزایش است (۱). نانوذرات فلزی به طور گسترده برای مقاصد صنعتی استفاده می‌شوند. در این میان، نانوذرات سربوم اکسید (نانوسریا، cerium oxide nanoparticles, CNP) با کاربرد گسترده‌ای که به عنوان یک کاتالیزور در پیل‌های سوختی و باتری، سلول‌های خورشیدی، سنسور

Email: ftaleb2001@yahoo.co.uk

مؤلف مسئول: فرشته طالبپور - ساری، کیلومتر ۱۸ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر(ص)، دانشگاه پزشکی

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد علوم تشریح، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. استادیار، گروه علوم تشریح، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. استاد، گروه رادیوفارمسی، دانشگاه داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۶/۲۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۶/۸/۳۰ تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۹/۲۷

تولید مثلی از قبیل تخمدان و بیضه گردد. بیضه بافتی است با تقسیم میتوزی و میوزی بالا و با وجود داشتن سد خونی بیضه‌ای، خیلی سریع تحت تاثیر مواد سمی قرار می‌گیرد (۱۳). در مطالعات بر روی بافت مغزی، دیده شده نانوذرات مهندسی شده با سایزهای زیر ۵۰ نانومتر قادرند از سد خونی مغزی عبور کنند اما اطلاعات کمی در مورد پتانسیل سمیت نانوسریا بر روی بافت بیضه وجود دارد (۴).

اثرات سمی نانوسریا در دوزهای ۲۵۰-۸۵ mg/kg، در چندین مطالعه ارزیابی شد (۱۴). از طرفی در یک مطالعه از دوز ۶۰ mg/kg نانو سریا برای ۶۰ روز به عنوان آنتی اکسیدان و عامل محافظتی در برابر آسیب میتوکندریایی ناشی از دیابت استفاده گردید (۱۵). Park و همکاران از دو دوز ۵ g/kg و ۱۰۰ mg/kg به صورت خوراکی بر روی بافت های کبد، ریه، طحال، مغز، بیضه استفاده کردند و بیان داشتند این دوزها فراهم زیستی کمی داشته‌اند (۴).

به دلیل این که، برای استفاده از نانوسریا به عنوان آنتی اکسیدان در نانو پزشکی، اطلاعات کافی در مورد سمیت و اثرات بیولوژیکی آن وجود ندارد ارزیابی سمیت نانوسریا برای استفاده از آن در تحقیقات زیست پزشکی، ضروری می‌باشد. بر این اساس در این مطالعه، بر روی اثرات بیولوژیکی نانوسریا بر روی بافت بیضه متمرکز شده و به بررسی سمیت نانوسریا بر روی این بافت در محیط داخل بدن *in vivo* پرداختیم. بعد از تزریق ۵ mg/kg نانوسریا به مدت ۷ روز، اثرات بیولوژیکی این نانو ذره مهندسی شده بر بافت بیضه، با ارزیابی بیوشیمی، هیستوشیمی، هیستولوژیکی و ایمنوهیستوشیمیایی تعیین شد.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی، نانو ذره سریم اکسید از شرکت نوترینو (ایران) تهیه شد. اندازه و شارژ زتا آن با دستگاه زتا سائزر بررسی گردید (Zetasizer 3600)

نانوسریا بر سلامت انسان تنها محدود به نتایج چند مطالعه منتشر شده می‌باشد. علاوه بر این، سمیت نانوسریا، به ویژه در زمینه اثرات اکسیدانی / آنتی اکسیدانی نیز هنوز بحث بر انگیز است (۱،۴،۵). گزارش‌های متناقضی در مورد سمیت نانوسریا در سال‌های اخیر منتشر شده است، که بعضی از یافته‌های این مطالعات به اثرات سمی نانوسریا پرداخته‌اند، در حالی که یافته‌های دیگر به اثرات محافظتی آن در برابر استرس اکسیداتیو اشاره کردند (۶،۷). لین و همکاران مطرح کردند که Ce^{3+} حاصل از احیای Ce^{4+} ، با مولکول اکسیژن (O_2) واکنش نشان داده و آنیون‌های سوپراکسید تولید می‌کند. دو آنیون سوپر اکسید نیز با هم واکنش نشان داده و به هیدروژن پراکسید تبدیل می‌شوند، و سپس پراکسید هیدروژن به رادیکال‌های هیدروکسیل تبدیل می‌گردد (۸). در حالی که محقق دیگری با نظر کاملاً مخالف بیان کرد که حضور حالت‌های ظرفیتی متفاوت Ce^{3+} و Ce^{4+} بر روی سطح نانوسریا به عنوان یک آنتی اکسیدان عمل کرده و اجازه می‌دهد تا نانوذرات در محیط کشت رادیکال‌های آزاد را برابند (۹). علاوه بر این، سمیت حاصل از نانوسریا که در محیط درون تنی و برون تنی اعمال می‌شود نیز ممکن است متفاوت باشد (۴). اثرات توکسیک نانوسریا همراه با افزایش استرس اکسیداتیو می‌باشد (۱۰). استرس اکسیداتیو به خاطر عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و میزان آنتی اکسیدان ایجاد می‌شود (۱۱). از طرفی اثر آنتی اکسیدانی نانوسریا با زدودن رادیکال‌های آزاد اکسیژن، نقش محافظتی در بدن دارد (۱۲). موارد فوق نشان می‌دهد که برخی از اختلاف نظرها بر روی سمیت نانوسریا هنوز وجود دارد. نانو سریا با نیمه عمر بیولوژیکی طولانی، حدود ۱۰۳ روز در ارگان‌های بدن تجمع می‌یابد و در طی یک دوره قابل توجه‌ای از زمان، تغییراتی از قبیل التهاب، فیبروز و سرطان در ارگان‌ها ایجاد می‌کند (۴). از این رو ممکن است نانوسریا سبب آسیب شدید بر ارگان‌های

(ROS)، Malondialdehyde (MDA) و Glutathione (GSH) اندازه گیری شد.

در اندازه گیری میزان (GSH)، میزان گلو تاتیون (GSH) کاهش یافته در نمونه های بیضه، با استفاده از روش Gaffari در طول موج ۴۱۲ نانومتر انجام شد. ۰/۵ ml از مایع رویی، ۲ ml از بافر تریس EDTA (۰/۲ mol/L با pH ۸/۹) و ۰/۱ ml از ۰/۱ mol/L از 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) با هم مخلوط شدند. محلول در دمای اتاق برای مدت ۵ دقیقه نگهداری شد و سپس در طول موج ۴۱۲ نانومتر بر روی اسپکتروفتومتر خوانده شد. سطح GSH در nmol / mL بیان شد.

در اندازه گیری میزان ROS با فلوریمتری، میزان ROS با استفاده از معرف DCFH-DA اندازه گیری شد. بعد از تعیین پروتئین بافت، 20 μl DCFH-DA به ۱ μl از ۲۰۰۰ از نمونه اضافه شد و در دمای 4 °C به مدت ۱۵ دقیقه نگهداری گردید. سپس جذب در طول موج تحریکی 312 nm و نشری 420 nm اندازه گیری شد.

برای تعیین میزان PC

میزان پروتئین کربونیل با استفاده از معرف 2,4-dinitrophenyl-hydrazine (DNPH) اندازه گیری شد. بعد از تعیین پروتئین بافت، ۵۰۰ میکرولیتر از تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد (w/v) به ۲۵۰ میکروگرم از نمونه اضافه و در دمای ۴ °C به مدت ۱۵ دقیقه نگهداری شد. سپس پروتئین های رسوب داده شده با دور ۶۵۰۰ × g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و محلول رویی دور ریخته شد. رسوب زیرین کاملاً در ۵۰۰ میکرولیتر از NaOH ۰/۱ مول پراکنده شد و ۵۰۰ میکرولیتر از DNPH ۱۰ میلی مول حل شده در HCl ۲ مول به نمونه ها اضافه شد. هم چنین یک بلانک که با اضافه کردن ۵۰۰ میکرولیتر از HCl ۲ مول بدون DNPH به نمونه پروتئین تهیه شد. سپس نمونه ها به مدت نیم ساعت در دمای اتاق و دور از نور انکوبه گردیدند، و سپس از آن، ۵۰۰ میکرولیتر از تری

Nano ZS; Malvern Instrument Ltd, Malvern, (UK) اندازه آن 378 nm و PDI برابر ۰/۳۷۲ و زتای آن ۷/۱۱- می باشد.

در این مطالعه ۱۴ موش از نژاد balb/c از مرکز تحقیقات حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی مازندران تهیه شد. اجازه داده شد تا حیوانات یک هفته قبل از آغاز مطالعه با شرایط اتاق خو بگیرند. شرایط محیطی شامل، دمای ۲۳±۱ درجه سانتی گراد، رطوبت نسبی ۵±۵ درصد و نور ۱۲ ساعت / تاریکی، بوده است. نانوسربا در آب مقطر سوسپانسیون شد و قبل از تزریق ورتکس گردید. موش ها به صورت تصادفی به دو گروه مساوی کنترل و تجربی تقسیم شدند. گروه کنترل نرمال سالیین دریافت کردند و گروه تجربی، ۵ mg/kg نانوسربا به صورت داخل صفاقی برای ۷ روز متوالی دریافت کردند (۱۵).

جمع آوری نمونه

یک روز بعد از دریافت آخرین دارو، حیوانات با یکتامین (۵۰ mg/kg و زایلازین) ۵ mg/kg بیهوش شدند. نمونه های خون از قلب حیوان جمع آوری شده و به داخل لوله لخته خون ریخته شد. بعد از ۱۵ دقیقه لخته خارج شد و نمونه با دور ۳۰۰۰ × سانتریفیوژ گردید. نمونه های سرم جدا سازی شده در دمای ۲۰- درجه برای سنجش تستوسترون فریز شد. سپس حیوان با جابجایی مهره های گردن کشته شد و هر دو بیضه بلافاصله خارج گردید. اپیدیدیم از یکی از بیضه ها برای ارزیابی پارامترهای اسپرم جدا شد و یکی از بیضه ها برای ارزیابی هیستولوژیکی و ایمنوهیستوشیمی در بافر فرمالین ۱۰ درصد فیکس شد. بیضه دیگر بعد از پاکسازی بافت ها و شستشو در بافر فسفات سالیین (PBS)، برای ارزیابی بیوشیمیایی به صورت تازه استفاده شد.

برای ارزیابی استرس اکسیداتیو، سطح protein Radical oxidative species, carbonyl (PC)

قرار داده شد، و سپس یک لامل بر روی قطره قرار گرفت. حداقل در ۱۰ میدان دید میکروسکوپی با بزرگنمایی $\times 40$ حرکت اسپرم‌ها مورد بررسی قرار گرفت و درصد اسپرم‌های متحرک ثبت شد.

برای ارزیابی مورفولوژیکی اسپرم، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی اسپرم با ۱۰ میکرولیتر از رنگ اتوزین میکس شدند. سپس با ۱۰ میکرولیتر از آن، اسپرم بر روی لام تهیه شد. بعد از خشک شدن نمونه‌ها، نمونه‌ها با لنز $\times 40$ برای ارزیابی مورفولوژیکی مورد بررسی قرار گرفتند و حداقل ۲۰۰ اسپرم در میدان‌های دید مختلف آزمایش شدند.

برای شمارش اسپرم ۲۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون سلولی بر روی لام نوبار هموسیتر قرار گرفت. سپس سلول‌ها با بزرگنمایی $\times 40$ شمارش شدند.

برای ارزیابی میزان زنده مانی سلول، ۲۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون سلولی با ۲۰ میکرو لیتر از رنگ تریان بلو ترکیب شد. بعد از ۱ دقیقه ۲۰ میکرو لیتر از آن بر روی لام نوبار هموسیتر قرار گرفت. سپس کل سلول‌ها و سلول‌های رنگ شده شمارش شد و درصد میزان زنده مانی سلول مشخص گردید.

برای ارزیابی هیستوپاتولوژی، بیضه‌های فیکس شده در بافر فرمالین ۱۰ درصد، بعد از پردازش بافتی با استفاده از دستگاه اتوتکنیکون و پارافینه کردن، برش‌های ۵ میکرونی با هماتوکسیلین و اتوزین (H & E) رنگ آمیزی شد و برای ارزیابی کمی و کیفی هیستوپاتولوژی آزمایش گردید. به صورت تصادفی ۱۰ لوله سمینفر از هر سکشن و ۱۰ سکشن از هر بیضه با بزرگنمایی $\times 40$ مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌های هیستوپاتولوژیکی با استفاده از تست جانسون Johnson's score بررسی شد. با در نظر گرفتن وضعیت سلول‌های رده اسپرماتوزن در اپیتلیوم لوله سمینفر از ۰ تا ۱۰ نمره دهی شد (جدول شماره ۱). ارزیابی بافتی توسط یک هیستولوژیست به صورت blind به گروه‌های درمانی انجام شد.

کلرواستیک اسید) ۲۰ درصد (w/v) اضافه شد. رسوب پروتئینی با سانتریفوژ در دور $\times g 6500$ به مدت ۱۰ دقیقه جمع‌آوری و سوپرناتانت دور ریخته شد. رسوب زیرین با ۱ میلی لیتر از مخلوط 1 : 1 (v/v) اتانول و اتیل استات ترکیب شده و مجدداً در $\times g 6500$ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و محلول رویی برداشته شد. رسوب پروتئین نهایی در ۲۰۰ میکرولیتر از محلول گوانین هیدروکلراید ۶ مول پراکنده شد. میزان پروتئین کربونیل با خواندن جذب در ۳۶۵ نانومتر با ضریب جذب $1 \text{ cm}^{-1} = 1 \text{ M} \times 22000$ ارزیابی شد و به صورت نانومولاز DNPH به ازای هر میلی گرم پروتئین بیان شد.

در اندازه‌گیری میزان MDA، برای تعیین سطح لیپید پراکسیداسیون در بافت بیضه، بیضه با بافر کلرید پتاسیم ۱/۵ درصد هموژنیزه شد. مالون دی آلدئید (MDA) به عنوان محصول نهایی لیپید پراکسیداسیون و به عنوان شاخص شدت استرس اکسیداتیو سنجش شد.

میزان تستوسترون در سرم خون با کیت Mouse Testosterone ELISA Kit, Bioassay, Cat. No. E0260MO طبق دستورالعمل شرکت سازنده و با روش اسپکتروفتومتری سنجش شد. میزان تستوسترون با واحد nmol/L بیان شد. تمام نمونه‌ها به صورت دو بار تکرار سنجش شدند.

جهت ارزیابی پارامترهای اسپرم اپیدیدیمال، اپیدیدیم در داخل پلیت کوچک حاوی ۱ ml محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم گاوی و ۱ درصد آنتی بیوتیک که از قبل در داخل انکوباتور گرم شده بود به تکه‌های کوچک تقسیم گردید. یک ربع زمان داده شد تا اسپرماتوزوئیدها به داخل محیط کشت حرکت کنند. سپس تکه بافتی اپیدیدیم از محیط کشت خارج شده و سوسپانسیون سلولی برای ارزیابی پارامترهای اسپرم استفاده گردید.

جهت ارزیابی درصد تحرک اسپرم، سوسپانسیون سلولی پیتاژ شد، یک قطره از سوسپانسیون سلولی بر روی یک اسلاید میکروسکوپی که از قبل گرم شده بود

انحراف معیار نشان داده شد. اختلاف آماری بین دو گروه با آنالیز واریانس یک طرفه و تست Tukey در سطح ۵ درصد محاسبه شد. $P > 0/05$ به عنوان میزان اختلاف معنی دار پذیرفته شد.

یافته ها

برای بررسی مرگ و میر موش ها، پس از یک دوره درمان CNP به صورت داخل صفاقی، موش ها یک بار در روز تحت نظر قرار گرفتند. هیچ مرگ و میری در هر دو گروه کنترل و تحت درمان با دوز ۵ یافت نشد. تفاوت قابل توجه ای در علائم بالینی مانند ظاهر کلی و تغییرات رفتاری مشاهده نشد.

میزان بیومارکرهای استرس اکسیداتیو، MDA، ROS، PC و GSH در هر دو گروه در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. نانوسرب با دوز ۵ mg/kg سبب افزایش معنی دار پراکسیداسیون لیپیدی، پروتئینی و رادیکال های آزاد در بافت بیضه، در مقایسه با گروه کنترل شد ($P > 0/05$). هم چنین میزان گلوتاتیون کاهش معنی داری در گروه نانوسرب در مقایسه با گروه کنترل داشته است ($P > 0/05$).

جدول شماره ۲: میزان ROS، PC و GSH در بافت بیضه.

متغیرها	کنترل	نانوسرب
MDA(μg/mg)	4/8 ± 0/32	2/69 ± 0/79 ^a
PC	0/17 ± 0/035	0/64 ± 0/17 ^b
GSH (nm/ml)	1775 ± 1/5	10/5 ± 1/27 ^b
ROS (Fluorescence intensity)	112/5 ± 18/23	338/4 ± 74/36 ^b

a در مقایسه با گروه کنترل می باشد. $P < 0/01$; $P < 0/05$.

0,0001

در موش هایی که با نانوسرب تیمار شدند افزایش معنی داری در میزان ROS، MDA، PC و کاهش معنی داری در میزان GSH نشان داده شد ($P < 0/05$). داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شدند.

جدول شماره ۱: سیستم نمره دهی جانسون

Score	Description
1	No cells
2	Sertoli cells without germ cells
3	Only spermatogonia
4	Only a few spermatocytes
5	Many spermatocytes
6	Only a few early spermatids
7	Many early spermatids without differentiation
8	Many early spermatids without differentiation
9	Few late spermatids
10	Many late spermatids
	Full spermatogenesis

برای ارزیابی هیستومورفومتریک، ارزیابی کمی، میانگین قطر و ضخامت اپی تلیوم لوله های سمینفر در ۱۰ لوله از هر سکشن و ۱۰ سکشن از هر گروه، در بزرگ نمایی ۱۰× با استفاده از میکروسکوپ نوری با نرم افزار OLYSIA(GmbH, version 3.2 - Japan) انجام شد. لوله های سمینفری که گرد یا تقریباً گرد بودند برای اندازه گیری انتخاب شدند. تمام اندازه گیری ها توسط یک نفر هیستولوژیست که به گروه ها بی اطلاع بود انجام شد.

در ارزیابی ایمنو هیستوشیمی، تکنیک ایمنو هیستوشیمی مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده کیت (Abcam Company, USA) انجام شد. بعد از پارافین زدایی و آب دهی، برای مهار فعالیت پراکسیداز اندوژن نمونه ها با ۰/۳ درصد H_2O_2 در متانول برای مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس نمونه ها در دمای ۴ °C در یک شب با آنتی بادی اولیه 3 anti-caspase rabbit polyclonal antibody, in PBS, v/v, Abcam, lat: GR224831-2) به ۱۰۰ به ۱ انکوبه شدند. بعد از

انکوبه شدن با آنتی بادی ثانویه کونژوگه با horseradish peroxidase(Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB, Abcam, Lat: GR2623314-4) برای دو ساعت، برش ها با DAB

(diaminobenzidinetetrahydrochloride) برای ۵ دقیقه انکوبه گردید. سپس نمونه ها آبیگری و مونته شدند. شدت رنگ پذیری بیانگر میزان آپوپتوز سلول ها در نمونه ها بوده است.

تجزیه و تحلیل داده ها با نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام شد. نتایج همه گروه ها به صورت میانگین ±

نانوسریا باعث تغییرات غیر طبیعی در پارامترهای اسپرم گردید. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شدند و میانگین اختلاف مقادیر در هر ردیف از لحاظ آماری معنی دار هستند بر اساس میزان تستوسترون سرم در جدول شماره ۳ غلظت تستوسترون به طور معنی داری در گروه دریافت کننده نانوسریا در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت ($P < 0/001$).

یافته‌های هیستومورفومتریک در شکل شماره ۱ نشان داده شده است. در گروه نانوسریا اختلاف معنی داری در ضخامت اپیتلیوم و قطر لوله‌های سمینفر (بترتیب $28/6 \pm 11/92$ و $169/5 \pm 25/11$) در مقایسه با گروه کنترل (بترتیب $61,53 \pm 8,303$ و $198,1 \pm 14,82$) دیده شد. این تغییرات در ضخامت و قطر لوله‌ها از لحاظ آماری کاملاً معنی دار بود ($P < 0/001$).

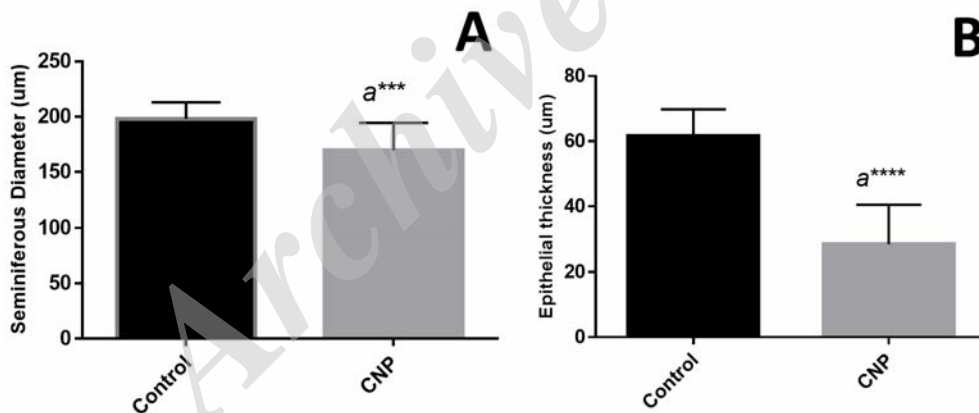
جدول شماره ۳ پارامترهای اسپرم را نشان می‌دهد. تعداد اسپرم و درصد تحرک اسپرم در گروه دریافت کننده نانوسریا به طور معنی داری در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت ($P < 0/001$)، این در حالی است که درصد اسپرم‌های غیر نرمال در گروه دریافت کننده نانوسریا از لحاظ شکل ظاهری به طور معنی داری در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته است ($P < 0/001$).

جدول شماره ۳: اثر نانوسریا بر روی پارامترهای اسپرم و

متغیرها	کنترل	نانوسریا
پارامترهای اسپرم		
Total Epididymal Sperm Number ($\times 10^6$)	$8/86 \pm 2/9$	$1/047 \pm 0/064^a$
Cell Viability (%)	$71/3 \pm 4/33$	$40/67 \pm 8/26^a$
Sperm Motility (%)	$89/6 \pm 7/021$	$49/4 \pm 9/86^a$
Total Sperm Abnormality (%)	$3/6 \pm 1/14$	$14 \pm 4/85^b$
تستوسترون		
Testosterone	$14/02 \pm 2/61$	$4/61 \pm 2/09^a$

در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد. $P < 0,001$; a ; $P < 0,001$; b .

0,001

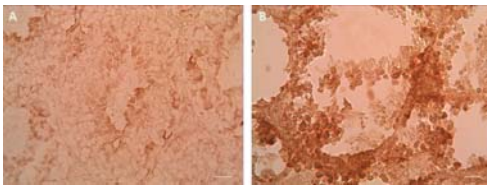


شکل شماره ۱: A: هیستوگرامی از آنالیز کمی قطر لوله‌های سمینفر، B: ضخامت لایه اپیتلیال لوله‌های سمینفر در دو گروه نانوسریا و کنترل، کاهش شدید در ضخامت لایه اپیتلیال لوله‌های سمینفر در گروه نانوسریا در مقایسه با گروه کنترل نشان داده شد. *** بیانگر $P < 0/001$ و **** بیانگر $P < 0/0001$ می‌باشد. CNP: نانوسریا.

ساختار بافتی نرمال را در گروه کنترل نشان داده شده است. هم‌چنین در شکل شماره ۲-A، تغییرات ساختاری در بافت بیضه گروه کنترل دیده نشد. شکل شماره ۲-B و ۲-C نشان می‌دهد که بیضه در موش‌هایی که

یافته‌های هیستوپاتولوژیک، پس از ۷ روز تزریق داخل صفاقی نانوسریا با دوز ۵ میلی‌گرم / کیلوگرم، بررسی پاتولوژیکی در بافت بیضه انجام شد. در شکل شماره ۲ فتومیکروگراف رنگ‌آمیزی شده با H & E

مثبت با رنگ قهوه‌ای رنگ شدند. رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی در گروه کنترل، ساختار نرمال لوله‌های سمینفر و بافت بینابینی را نشان داده است که در شکل شماره ۳- B آمده است. همان‌طور که در شکل شماره ۳- A مشخص است immunoreactivity کاسپاز-۳ در گروه نانوسرب در سلول‌های اسپرماتوگونی بسیار شدید بود.



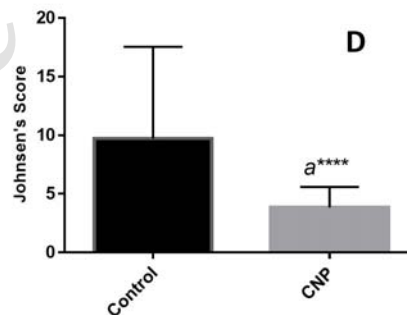
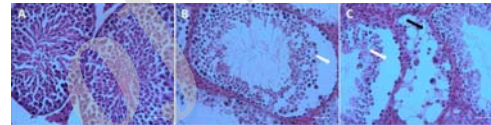
شکل شماره ۳: رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی بیان کاسپاز-۳ در گروه‌ها را نشان می‌دهد. A: اکثر سلول‌های رده اسپرماتوژنز در گروه نانوسرب از بین رفتند و ایمونورآکتیویته کاسپاز ۳ در سلول‌های اسپرماتوگونی‌ها و اسپرماتوسیت‌های اولیه قابل توجه بود. B: در گروه کنترل سلول‌های مثبت شناسایی نشد = 100 μm Scale bar, (IHC × 400).

بحث

ایجاد استرس اکسیداتیو و تولید ROS در مواجهه با نانوسرب در مطالعات قبلی تایید گردید (۱۰). در این مطالعه، سمیت نانوسرب با دوز ۵ mg/kg با تزریق داخل صفاقی مورد بررسی قرار گرفت. نانوسرب با سایز ۳۷۸ نانومتر کاملاً برای بافت بیضه سمی بوده است. این تغییرات در ساختار بافتی به دلیل استرس اکسیداتیو ناشی از تجویز نانوسرب ایجاد گردید.

اگر چه فعالیت آنتی اکسیدانی قوی نانوسرب در طیف گسترده‌ای از انواع سلول‌ها از قبیل انواع سلول‌های مانند قلب، اندوتلیال، اپی تلیال، عصبی و سلول‌های سرطانی گزارش شده است (۲۰، ۱۶). اثرات پرو-اکسیداتیو نانوسرب نیز در کبد، ریه، سلول‌های عصبی و سلول‌های گرانولوزا مشاهده شد (۲۴، ۲۱). در این مطالعه تیمار با نانوسرب، میزان ROS، PC و محصول

نانوسرب دریافت کردند، دارای لوله‌های سمینفر نامنظم و با کاهش شدید اسپرماتوگونی، سرتولی و اسپرماتید اولیه، نکروز، جدا شدن سلول‌های رده اسپرماتوگونی از غشاء پایه desquamation، دژنره شدن سلول‌ها، واکوتلیزه شدن، ادم و احتقان عروق و سلول‌هایی با سیتوپلاسم ائوزینوفیلیک و هسته پیکنوتیک می‌باشند. همچنین کاهش ضخامت اپی تلیوم و قطر لوله‌های سمینفر در اکثر لوله‌های سمینفر نیز مشاهده شد. همان‌طور که در شکل شماره ۲- D مشخص است ایست بلوغ اسپرماتوژنز (maturation arrest) با کاهش نمره جانسون در گروه دریافت کننده نانوسرب همراه بود. اختلاف معنی‌داری در بین دو گروه وجود داشت ($P > 0.0001$).



شکل شماره ۴: فوتومیکروگرافی از اثر نانوسرب بر ساختار هیستولوژیکی بیضه، A: ساختار نرمال لوله‌های سمینفر را در گروه کنترل نشان می‌دهد. B و C: تخریب شدید لوله‌های سمینفر در گروه نانوسرب با نکروز اسپرماتوسیت‌ها، ادم شدید، واکوتلیزه شدن (فلش سیاه)، جدا شدن سلول‌های رده اسپرماتوگونی از غشاء پایه (فلش سفید) را نشان می‌دهد. Scale bar = 100 μm × 400 (D, E & H): هیستوگرامی از آنالیز نیمه کمی آسیب بیضه با تست جانسون. **** بیانگر $P < 0.0001$ می‌باشد در مقایسه با گروه کنترل، نانوسرب.

ارزیابی ایمونوهیستوشیمی، در رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی برای کاسپاز-۳، سلول‌های آپوپتوز

پراکسیداسیون لیپیدی MDA - ، را افزایش و میزان GSH را کاهش داده است.

نانوذرات CeO₂ توانایی‌های منحصر به فردی در ذخیره و آزاد سازی اکسیژن دارند. در حالی که اثرات کاتالیزوری آن به طور کامل در صنعت مورد استفاده قرار می‌گیرد، فعالیت ربودن رادیکال‌های آزاد در سیستم‌های بیولوژیکی هنوز یک چالش می‌باشد (۲۵). نانوذره سر یوم اکسید (CNPs) در اندازه‌های مختلف به میتو کندری، اندامک فعال ردوکس سلول‌ها حمله کرده و با تغییر در تولید ROS در سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی بدن تداخل ایجاد می‌کند (۵). دوز بالای نانوسریا با تولید استرس اکسیداتیو باعث القا آسیب در بافت‌ها می‌شود. نانوسریا در این مطالعه بالانس اکسیداتیو را در بافت بیضه تغییر داد. میزان ROS در گروه دریافت کننده نانوسریا بیشتر از گروه کنترل بوده است و این نشان می‌دهد که نانوسریا با این غلظت برای بافت بیضه فعالیت پرو-اکسیداتیو قوی داشته است. این یافته‌ها با سنجش فعالیت میتو کندریایی و پروتئین کربونیل نیز تجزیه و تحلیل شد. در این مطالعه افزایش MDA در گروه دریافت کننده نانوسریا نشان داد، که نانوسریا لیپید پراکسیداسیون و استرس اکسیداتیو را افزایش می‌دهد. بر خلاف نتایج این مطالعه، Park نشان داد که نانوسریا با دوز ۵ g/kg بر روی پارامترهای بیوشیمیایی تغییری ایجاد نمی‌کند (۴). افزایش مارکرهای استرس اکسیداتیو در موش‌های گروه نانوسریا ایجاد پراکسیداسیون لیپیدها و پروتئین‌ها را در بافت بیضه نشان می‌دهد. نانوسریا در این دوز با داشتن خاصیت پرو-اکسیداتیو، وضعیت اکسیدانی/آنتی اکسیدانی بیضه را مختل کرد.

اثرات نانوسریا به شدت وابسته به طبیعت آن از قبیل اندازه، بار الکتریکی و پوشش coating آن می‌باشد (۴). از میان مطالعات مختلف تنها یک گزارش از اثر نانوسریا بر روی بافت بیضه وجود دارد که به بررسی نانوسریا را بر ساختار بافتی بیضه پرداخته است (۴).

Park در مطالعه خود نشان داد تیمار تک دوز نانوسریا با دوز ۵ g/kg به صورت خوراکی بر روی بافت بیضه تأثیری ندارد (۴). در مطالعه حاضر، از دوز ۵ mg/kg برای بررسی اثر بیولوژیکی آن بر روی بافت بیضه استفاده گردید و ارزیابی ساختار بافتی و بیوشیمیایی بیضه، سمیت بسیار شدید را تایید کردند. این تفاوت می‌تواند مربوط به تعداد دفعات تجویز دارو و روش تجویز باشد. در این مطالعه، نانوسریا برای ۷ روز متوالی و به صورت داخل صفاقی تجویز گردید. نوع تجویز نانوسریا بر روی اثرات بیولوژی آن بسیار موثر می‌باشد. تجویز خوراکی نانوسریا کم‌ترین اثر بخشی را دارد. علت جذب پایین CNP از راه خوراکی، دفع حدود ۹۵ درصد آن در عرض ۲۴ ساعت از بدن می‌باشد (۴). این در حالی است که تجویز داخل وریدی و داخل صفاقی تماماً جذب شده و بیش‌ترین تأثیر را بر بدن می‌گذارد (۲۶). هم‌چنین مدت زمان مواجهه با نانوسریا در مقایسه با دوز نانوسریا اثر بخشی بیش‌تری بر روی سمیت ژنی و رشد سلول می‌گذارد (۲۷). Park در یک مطالعه برون تنی نشان داد CNP قادر است استرس اکسیداتیو و آپوپتوز در محیط کشت ایجاد کند، در حالی که همین محقق بر خلاف انتظار، در محیط درون تنی، نشان داد نانوسریا با همان دوز بر روی بافت‌های بیضه، طحال، کلیه و کبد هیچ گونه اثر توکسیک ندارد (۴). از طرفی مدت تهیه نانوسریا نیز ممکن است در این مطالعات متفاوت باشد. نانوسریا با اندازه‌های مختلف و شکل‌های متفاوت برای مدت ۹۰ روز در بدن می‌ماند (۲۷). اگر چه میزان غلظت CNP در بدن با گذشت زمان کاهش پیدا می‌کند، ولی قادر است حتی بعد از دریافت تک دوز این نانوذره در بدن، تا پایان وجود آن در بدن استرس اکسیداتیو ایجاد کند (۲۸).

هنگامی که نانوسریا با تزریق داخل صفاقی با دوز ۵ میلی گرم / کیلو گرم به موش تزریق گردید، هیچ حیوانی تلف نشد، ولی استرس اکسیداتیو شدید ساختار بافتی را تخریب کرد. اسپرما توژنز یک روند پیچیده‌ای است که

عوامل سیتوتوکسیک با تولید استرس اکسیداتیو به شدت بر روی سلول‌های اسپرماتوژنیک تاثیر می‌گذارند و حفظ سیستم آنتی‌اکسیدانی اندوژنوس برای حفظ روند اسپرماتوژن و استروئیدوژن ضروری می‌باشد (۳۰). یافته‌های مورفومتریک در گروه نانسریا کاهش در ضخامت اپیتلیوم و قطر لوله‌های سمینفر را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد. کم شدن تعداد لایه‌های سلول‌های اپیتلیال لوله‌های سمینفر در ارتباط با مهار تقسیم میتوزی و میوزی سلول‌های اسپرماتوژنیک می‌باشد که منجر به نقص در تولید اسپرم و متعاقب آن ناباروری می‌شود (۳۱، ۳۲). از طرفی، ارگان‌های تولید مثلی از قبیل بیضه، اپیدیدیم و پروستات جزء ارگان‌های وابسته به اندروژن میباشند (۳۳). در این مطالعه، کاهش میزان تستوسترون آسیب سلول‌های لایدیگ را تایید می‌کند. و ممکن است علت آسیب روند اسپرماتوژن در ارتباط با کاهش تستوسترون هم باشد.

نانوذرات در تکنیک sperm-mediated gene transfer (SMGT)، جهت انتقال DNA اسپرم به داخل اووسیت نقش موثری دارند (۳۴). Falchi و همکاران در مطالعه خود نشان دادند در محیط *In vitro* اسپرم‌هایی که در معرض نانسریا بودند، بعد از ۲۴ ساعت، هیچ نانوذره‌ای در داخل سلول مشاهده نشد و بر روی پارامتر تحرک (motility) اسپرم هیچ تاثیری نداشته است. هم‌چنین هیچ سمیت سلولی و سمیت ژنی نیز مشاهده نگردید (۳۵). نتایج آن در مقابل نتایج این مطالعه می‌باشد که در محیط *in vivo* انجام شد. در مطالعات قبلی نشان داده شد دوز ۵ g/kg نانسریا به صورت خوراکی هیچ اثر سویی بر روی ارگان‌هایی از قبیل کبد، ریه، طحال، مغز، کلیه و بیضه ندارد (۴). اما Hungl نیز در مطالعه خود بیان داشت مواجهه با نانوذره تیتانیوم (دی اکسید TiO_2) در سه دوز ۲/۵، ۵ و ۱۰ mg/kg در ۶۰ روز متوالی در آب خوراکی باعث سمیت بیضه و کاهش پارامترهای اسپرم می‌شود (۳۶). در این مطالعه نیز تجویز

۵ mg/kg باعث تغییرات شدید در ساختار بافتی بیضه شد. روند اسپرماتوژن کاملاً مختل شد و نمره تست جانسون به شدت در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت. در این مطالعه اثر بیولوژی تولید مثلی نانسریا علاوه بر تاثیر بر ساختار بافتی بیضه، بر پارامترهای اسپرم نیز ارزیابی شد. پارامتر تحرک اسپرم عاملی است که به طور غیر مستقیم در باروری مردان نقش دارد. زیرا اسپرم‌ها با داشتن توانایی حرکت رو به جلو در دستگاه تناسلی زنان در بارور نمودن تخمک نقش دارند (۳۷). اختلال در تحرک گامت نر منجر به کاهش توانایی باروری می‌شود. در بررسی متون، مطالعات مختلف گزارش‌های متناقضی از اثر نانوذرات مهندسی شده مختلف بر تحرک اسپرم بیان کردند. در بعضی از مطالعات کاهش در تحرک اسپرم گاوی و انسانی در مواجهه با نانوذرات مختلف نشان داده شده است (۴۱). در این مطالعه ارزیابی پارامترهای اسپرم نشان داد در مواجهه با نانسریا علاوه بر آسیب بیضه، کاهش در تعداد اسپرم، اختلال در تحرک اسپرم و افزایش اسپرم‌های غیر نرمال نیز دیده شد. این تغییرات می‌تواند قابلیت اسپرم را در باروری به خطر بیناندازد. علاوه بر این، در مواجهه با نانسریا میزان ROS، MDA و PC در بیضه افزایش یافت. این موارد نشان می‌دهد که اسپرماتوژن در مواجهه با نانسریا سرکوب شده و با تغییرات در ساختار بافتی و استرس اکسیداتیو در بیضه همراه بوده است.

در مطالعات *in vitro* دیده شد که CNP با تولید ROS و کاهش میزان گلوکوتاتیون درون سلولی (GSH) منجر به آپوپتوز و فعال شدن کاسپاز-۳ می‌شود (۵) در مطالعه حاضر یافته ایمنو هیستوشیمی بافت بیضه در موش های تیمار شده با نانسریا نشان داد در محیط *in vivo*، نانسریا باعث القاء آپوپتوز در سلول‌های اسپرماتوگونی شده است. در این مطالعه سلول‌های اسپرماتوگونی

نانوسریا برای استفاده از خاصیت آنتی اکسیدانی در محیط داخل بدن روشن گردد.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر نتیجه طرح تحقیقاتی شماره IR.MAZUMS.REC.1396.3039 میباشد که بخشی از پایان نامه خانم ماده حمزه است. بدینوسیله از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی در این پژوهش قدردانی می گردد.

References

1. Kagan VE, Bayir H, Shvedova AA. Nanomedicine and nanotoxicology: two sides of the same coin. *Nanomedicine*. 2005;1(4):313-316.
2. Gao F, Lu Q, Komameni S. Fast synthesis of cerium oxide nanoparticles and nanorods. *J Nanosci Nanotechnol*. 2006;6(12):3812-2819.
3. Amin KA, Hassan MS, Awad E-ST, Hashem KS. The protective effects of cerium oxide nanoparticles against hepatic oxidative damage induced by monocrotaline. *Int J nanomedicine*. 2011;6:143-149.
4. Park E-J, Park YK, Park KS. Acute toxicity and tissue distribution of cerium oxide nanoparticles by a single oral administration in rats. *Toxicol Res*. 2009;25(2):79-84.
5. Park EJ, Choi J, Park YK, Park K. Oxidative stress induced by cerium oxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology*. 2008;245(1):90-100.
6. Ghaznavi H, Najafi R, Mehrzadi S, Hosseini A, Tekyemaroo N, Shakeri-zadeh A, et al. Neuro-protective effects of cerium and yttrium oxide nanoparticles on high glucose-induced oxidative stress and apoptosis in undifferentiated PC12 cells. *Neurol Res*. 2015;37(7):624-632.
7. Leung YH, Yung MM, Ng AM, Ma AP, Wong SW, Chan CM, et al. Toxicity of CeO₂ nanoparticles—the effect of nanoparticle properties. *J Photochem Photobiol B*. 2015;145:48-59.
8. Lin W, Huang Yw, Zhou XD, Ma Y. Toxicity of cerium oxide nanoparticles in human lung cancer cells. *Int J Toxicol*. 2006;25(6):451-457.
9. Das M, Patil S, Bhargava N, Kang JF, Riedel LM, Seal S, et al. Auto-catalytic ceria nanoparticles offer neuroprotection to adult rat spinal cord neurons. *Biomaterials*. 2007;28(10):1918-1925.
10. Nemmar A, Yuvaraju P, Beegam S, Fahim MA, Ali BH. Cerium Oxide Nanoparticles in Lung Acutely Induce Oxidative Stress, Inflammation, and

سلولهای حساس تری به نانوسریا بودند و کمترین حساسیت مربوط به سلولهای سرتولی بوده است.

در این مطالعه آزمایشی، که اثر پرواکسیدانی/آنتی اکسیدانی نانوسریا را در دوز ۵ میلی گرم/کیلو گرم در محیط *in vivo* برای مطالعات آینده مشخص شد و از نانوسریا با سایز ۳۷۸ نانومتر برای ارزیابی اثرات بیولوژیکی و پتانسیل توکسیک آن استفاده گردید. براساس نتایج این مطالعه، نانوسریا با این سایز با وجود سد خونی بیضه توانست سمیت بسیار شدیدی در بافت بیضه ایجاد کند. این نتایج پیشنهاد می کند مطالعات پیش تری در محیط *in vivo* انجام شود تا دوز مناسب

- DNA Damage in Various Organs of Mice. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2017;2017.
11. Inupakutika MA, Sengupta S, Devireddy AR, Azad RK, Mittler R. The evolution of reactive oxygen species metabolism. *J Exp Bot.* 2016;67(21): 5933-5943.
 12. Saikia H, Hazarika KK, Chutia B, Choudhury B, Bharali P. A Simple Chemical Route toward High Surface Area CeO₂ Nanoparticles Displaying Remarkable Radical Scavenging Activity. *Chem Select.* 2017;2(11):3369-3375.
 13. Colpi GM, Contalbi GF, Nerva F, Sagone P, Piediferro G. Testicular function following chemo-radiotherapy. *Eur J Obst Gynecol Reprod Biol.* 2004;113(1):S2-S6.
 14. Hardas SS, Butterfield DA, Sultana R, Tseng MT, Dan M, Florence RL, et al. Brain distribution and toxicological evaluation of a systemically delivered engineered nanoscale ceria. *Toxicol Sci.* 2010;116(2):562-576.
 15. Shokrzadeh M, Jahani M, Vafaeipour Z, Shaki F. Protective Effect of Nanoceria against Renal Mitochondrial Damage in Streptozocine-induced Diabetic Mice. *J Mazandaran Univ Med Sci.* 2016;25(132):258-269. (persian)
 16. Pagliari F, Mandoli C, Forte G, Magnani E, Pagliari S, Nardone G, et al. Cerium oxide nanoparticles protect cardiac progenitor cells from oxidative stress. *ACS Nano.* 2012;6(5):3767-3775.
 17. Chen S, Hou Y, Cheng G, Zhang C, Wang S, Zhang J. Cerium oxide nanoparticles protect endothelial cells from apoptosis induced by oxidative stress. *Biol Trace Elem Res.* 2013;154(1):156-166.
 18. Pierscionek BK, Li Y, Yasseen AA, Colhoun LM, Schachar RA, Chen W. Nanoceria have no genotoxic effect on human lens epithelial cells. *Nanotechnology.* 2010;21(3):035102.
 19. Dowding JM, Song W, Bossy K, Karakoti A, Kumar A, Kim A, et al. Cerium oxide nanoparticles protect against A β -induced mitochondrial fragmentation and neuronal cell death. *Cell Death & Differ.* 2014;21(10):1622-1632.
 20. González-Flores D, De Nicola M, Bruni E, Caputo F, Rodríguez AB, Pariente JA, et al. Nanoceria protects from alterations in oxidative metabolism and calcium overloads induced by TNF α and cycloheximide in U937 cells: pharmacological potential of nanoparticles. *Mol Cell Biochem.* 2014;397(1-2):245-253.
 21. Tseng MT, Lu X, Duan X, Hardas SS, Sultana R, Wu P, et al. Alteration of hepatic structure and oxidative stress induced by intravenous nanoceria. *Toxicol Appl pharmacol.* 2012;260(2):173-182.
 22. Ma JY, Mercer RR, Barger M, Schwegler-Berry D, Scabilloni J, Ma JK, et al. Induction of pulmonary fibrosis by cerium oxide nanoparticles. *Toxicol Appl pharmacol.* 2012;262(3):255-264.

23. Kumari M, Singh SP, Chinde S, Rahman MF, Mahboob M, Grover P. Toxicity study of cerium oxide nanoparticles in human neuroblastoma cells. *Int J Toxicol*. 2014;33(2):86-97.
24. Courbiere B, Auffan M, Rollais R, Tassistro V, Bonnefoy A, Botta A, et al. Ultrastructural interactions and genotoxicity assay of cerium dioxide nanoparticles on mouse oocytes. *Int J Mol Sci*. 2013;14(11):21613-2128.
25. Grulke E, Reed K, Beck M, Huang X, Cormack A, Seal S. Nanoceria: factors affecting its pro-and anti-oxidant properties. *Environ Sci: Nano*. 2014;1(5):429-444.
26. Hirst SM, Karakoti A, Singh S, Self W, Tyler R, Seal S, et al. Bio-distribution and in vivo antioxidant effects of cerium oxide nanoparticles in mice. *Environ Toxicol*. 2013;28(2):107-118.
27. Pierscionek BK, Li Y, Schachar RA, Chen W. The effect of high concentration and exposure duration of nanoceria on human lens epithelial cells. *Nanomedicine*. 2012;8(3):383-390.
28. Hardas SS, Sultana R, Warriar G, Dan M, Wu P, Grulke EA, et al. Rat hippocampal responses up to 90 days after a single nanoceria dose extends a hierarchical oxidative stress model for nanoparticle toxicity. *Nanotoxicology*. 2014;8(sup1):155-166.
29. Habas K, Brinkworth MH, Anderson D. Diethylstilbestrol induces oxidative DNA damage, resulting in apoptosis of spermatogonial stem cells in vitro. *Toxicology*. 2017;382:117-121.
30. Chen H, Liu J, Luo L, Baig MU, Kim JM, Zirkin BR. Vitamin E, aging and Leydig cell steroidogenesis. *Exp Gerontol*. 2005;40(8-9):728-736.
31. JEDLINSKA-KRAKOWSKA M, BOMBA G, JAKUBOWSKI K, ROTKIEWICZ T, JANA B, PENKOWSKI A. Impact of oxidative stress and supplementation with vitamins E and C on testes morphology in rats. *J Reprod Dev*. 2006;52(2):203-209.
32. Haubitz M. Acute and Long-term Toxicity of Cyclophosphamide. *Transplantationsmedizin*. 2007;19(2):26-31.
33. Green SM, Mostaghel EA, Nelson PS. Androgen action and metabolism in prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;360(1-2):3-13.
34. Campos VF, Komninou ER, Urriaga G, de Leon PM, Seixas FK, Dellagostin OA, et al. NanoSMGT: transfection of exogenous DNA on sex-sorted bovine sperm using nanopolymer. *Theriogenology*. 2011;75(8):1476-1481.
35. Falchi L, Bogliolo L, Galleri G, Ariu F, Zedda MT, Pinna A, et al. Cerium dioxide nanoparticles did not alter the functional and morphologic characteristics of ram sperm during short-term exposure. *Theriogenology*. 2016;85(7):1274-1281. e3.
36. Hong F, Si W, Zhao X, Wang L, Zhou Y, Chen M, et al. TiO₂ nanoparticle exposure decreases spermatogenesis via biochemical dysfunctions in the testis of male mice. *J Agric Food Chem*. 2015;63(31):7084-7092.

37. Robayo I, Montenegro V, Valdes C, Cox J. CASA assessment of kinematic parameters of ram spermatozoa and their relationship to migration efficiency in ruminant cervical mucus. *Reprod Domest Anim.* 2008;43(4):393-399.
38. Makhluf SBD, Arnon R, Patra C, Mukhopadhyay D, Gedanken A, Mukherjee P, et al. Labeling of sperm cells via the spontaneous penetration of Eu³⁺ ions as nanoparticles complexed with PVA or PVP. *J Phys Chem C.* 2008;112(33):12801-12807.
39. Taylor U, Barchanski A, Garrels W, Klein S, Kues W, Barcikowski S, et al. Toxicity of gold nanoparticles on somatic and reproductive cells. *Nanobiotechnology for biomedical and diagnostic Research: Springer;* 2012;733:125-133.
40. Wiwanitkit V, Sereemasapun A, Rojanathanes R. Effect of gold nanoparticles on spermatozoa: the first world report. *Fertil Steril.* 2009;91(1):e7-e8.
41. Terzuoli G, Iacoponi F, Moretti E, Renieri T, Baldi G, Collodel G. In vitro effect of silver engineered nanoparticles on human spermatozoa. *J Siena Acad Sci.* 2012;3(1):27-29.