

## Protective effect of *Nigella sativa* on sperm parameters in mice exposed to titanium dioxide during embryonic development

Abouzaripour M<sup>1</sup>, Hosaini Bae M<sup>2</sup>, Rezaie MJ<sup>3</sup>, Nikkho B<sup>4</sup>, Allahveisi A<sup>5</sup>, Roshani D<sup>6</sup>, Khalesro SH<sup>7</sup>, Daneshi E<sup>8</sup>

1. Assistant Professor, Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran.

2. Msc Student of Anatomical Sciences, Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran.

3. Associate Professor, Infertility Treatment Center, Besat Hospital, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran.

4. Associate professor, Department of Pathology, School of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran.

5. Assistant Professor, Infertility Treatment Center, Besat Hospital, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran.

6. Associate Professor, Social Determinants of Health Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran.

7. Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.

8. Assistant Professor, Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran (Corresponding Author), Tel: +98-8733664658, Email: erfandaneshi@yahoo.com

### ABSTRACT

**Background and Aim:** Nanotechnology is the precise and controlled manipulation of the atomic or molecular structure of nanoscale materials for the preparation of particulate matter with new properties and specific applications. Many in vivo and in vitro studies have shown the negative and destructive effects of nanoparticles on male germ cells. Nanoparticles include primary particles with at least one of their dimensions less than 100 nm.

**Material and Method:** This study included 20 male and female adult mice (NMRI), between 6 and 8 weeks of age and weight of 25-30 g. We placed every two adult female mice with a male adult mouse in a cage for mating. Pregnant mice were randomly divided into 4 groups (control, titanium, *nigella sativa*, titanium + *nigella sativa*). Animals were sacrificed by cervical spine dislocation under anesthesia. Then, using a neobar lamel and under the optical microscope, number of sperms and their morphology were assessed.

**Result :** In this study, semen parameters including sperm morphology and number and also weights of organs were assessed. We found decreased number of sperms, increased number of abnormal sperms and decreased weight in the titanium group. But protective effect of *Nigella sativa* in the treatment group led to a significant difference in the sperm parameters compared to that in the titanium group ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** TNP reduced sperm count and increased the number of abnormal sperms. Previous studies by Hajshafiha showed the ability of nanoparticles to cross the blood-testicular barrier. Protective and antioxidant effects of *Nigella sativa* can greatly reduce the toxicity of TNP. NS had a potent protective effect against the toxic effect of TNP on testese.

**Keyword:** Titanium nanoparticle, *Nigella sativa*, Parameter

**Received:** Oct 16, 2018

**Accepted:** Feb 17, 2019

**How to cite the article:** Abouzaripour M, Hosaini Bae M, Rezaie MJ, Nikkho B, Allahveisi A, Roshani D, Khalesro SH, Daneshi E. Protective effect of *Nigella sativa* on sperm parameters in mice exposed to titanium dioxide during embryonic development. SJKU 2019;24(2):66-73.

## بررسی اثر محافظتی سیاه دانه بر پارامترهای اسپرم در موش‌های دریافت کننده نانوذره اکسید تیتانیوم در زمان تکامل جنینی

مرتضی ابوذری پور<sup>۱</sup>، مهدی حسینی بای<sup>۲</sup>، محمد جعفر رضایی<sup>۳</sup>، بهرام نیکخواه<sup>۴</sup>، عدرا اله ویسی<sup>۵</sup>، دائم روشنی<sup>۶</sup>، شیوا خالص رو<sup>۷</sup>، عرفان دانشی<sup>۸</sup>

۱. استادیار، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی استان کردستان، دانشکده پزشکی، سنندج، ایران.
۲. دانشجوی کارشناسی ارشد علوم تشریح، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی استان کردستان، دانشکده پزشکی، سنندج، ایران.
۳. دانشیار، مرکز درمان ناباروری، مرکز پزشکی آموزشی و درمانی بعثت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.
۴. دانشیار، گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی استان کردستان، دانشکده پزشکی، سنندج، ایران.
۵. استادیار، مرکز درمان ناباروری، مرکز پزشکی آموزشی و درمانی بعثت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.
۶. دانشیار، مرکز تحقیقات عوامل اجتماعی مؤثر بر سلامت، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.
۷. استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.
۸. استادیار، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی استان کردستان، دانشکده پزشکی، سنندج، ایران (مؤلف مسئول)، تلفن ثابت: ۰۸۷-۳۳۶۶۴۶۵۸، پست الکترونیک: erfandaneshi@yahoo.com

### چکیده

**زمینه و هدف:** نانوتکنولوژی عبارت است از دست کاری دقیق و کنترل شده ساختار اتمی یا مولکولی مواد در مقیاس نانو به منظور تهیه ریز ذراتی با خصوصیات نوظهور و کاربردهای خاص. بسیاری از مطالعات *in vivo* و *in vitro* نشان دهنده اثرات منفی و مخرب نانو پارٹیکلها بر سلول‌های زایای جنس نر است. ذرات نانو عبارت‌اند از ذرات اولیه‌ای که حداقل یکی از ابعاد آن‌ها کمتر از ۱۰۰ نانومتر باشد.

**روش بررسی:** در این مطالعه ۲۰ سر موش بالغ نژاد (NMRI) سن ۸-۶ هفته با وزن ۲۵-۳۰ گرم استفاده شد. موش‌های بالغ جهت انجام جفت‌گیری به صورت ۲ موش ماده بالغ همراه با یک موش نر بالغ در یک قفس قرار داده شدند. موش‌های حامله به صورت تصادفی به ۴ گروه (کنترل، تیتانیوم، سیاه‌دانه، تیتانیوم سیاه‌دانه) تقسیم شدند. موش‌ها با تکنیک جابجایی مهره‌های گردنی قربانی شدند. با استفاده از لام نتوبار و در زیر میکروسکوپ نوری شمارش اسپرم‌ها و مورفولوژی اسپرم مورد بررسی قرار می‌گیرد.

**یافته‌ها:** در این بررسی پارامترهای سیمین از نظر تعداد اسپرم و مورفولوژی اسپرم و وزن ارگان‌ها مورد مطالعه قرار گرفتند. کاهش تعداد اسپرم‌ها، افزایش اسپرم‌های غیرطبیعی و کاهش وزن در گروه تیتانیوم دیده شد که در گروه درمان به خاطر سیاه دانه این تغییرات جبران شدند ( $P < 0/05$ ).

**یافته‌ها:** نانوذره اکسید تیتانیوم می‌تواند باعث کاهش شمارش اسپرم و افزایش اسپرم‌های غیر طبیعی شود در مطالعات قبلی (حاج شفیها و همکاران) نشان دادند که نانو ذرات توانایی عبور از سد خونی-بیضه‌ای را دارند. سیاه دانه با توجه به اثر محافظتی و آنتی اکسیدانی می‌تواند باعث بهبود اثرات سمی اکسید تیتانیوم شود.

**نتیجه‌گیری:** سیاه دانه به عنوان عامل محافظتی می‌تواند در اثرات سمی ناشی از نانوذره تیتانیوم در بیضه نقش داشته باشد.

**کلید واژه‌ها:** نانوذره تیتانیوم، سیاه دانه، پارامتر

وصول مقاله: ۹۷/۷/۲۴ اصلاحیه نهایی: ۹۷/۱۱/۱۷ پذیرش: ۹۷/۱۱/۲۸

**مقدمه**

با گسترش نانو تکنولوژی و مهندسی مواد، نانو ذرات مختلفی با خصوصیات جدید ساخته شده و علی‌رغم اینکه پتانسیل اثرات سمی آن‌ها در بسیاری از موارد ناشناخته است ولی این مواد کاربردهای روزافزونی یافته‌اند (۱). نانو تکنولوژی عبارت است از دست‌کاری دقیق و کنترل‌شده ساختار اتمی یا مولکولی مواد در مقیاس نانو به منظور تهیه ریز ذراتی با خصوصیات نوظهور و کاربردهای خاص. بسیاری از مطالعات *in vitro* و *in vivo* نشان‌دهنده اثرات منفی و مخرب نانو پارسیکله‌ها بر سلول‌های زایای جنس نر است (۲). ذرات نانو عبارت‌اند از ذرات اولیه‌ای که حداقل یکی از ابعاد آن‌ها کمتر از ۱۰۰ nm باشد (۳). اکسیدهای فلزی نانو ذرات در مقیاس وسیعی هم در صنعت و هم در موارد خانگی کاربرد دارند (۴). در بین نانو ذرات اکسید روی و تیتانیوم جزو نانو ذرات مهم هستند که در بسیاری از کشورها در مقیاس صنعتی در حال استفاده می‌باشند (۵). مطالعات زیادی نشان‌دهنده تجمع نانو ذرات در بافت‌های مختلف و همچنین تخریب سد خونی - بیضوی و سد خونی - مغزی است (۶). در زمان‌های قدیم از اکسید تیتانیوم به علت داشتن ثبات ساختاری و قیمت پایین آن در افزودنی‌های غذایی مورد استفاده بود. امروزه از Titanium (TNP) nanoparticle در تولید انواع رنگ، لوازم آرایشی و بهداشتی، مکمل‌های غذایی و آب‌نبات، ساخت سرامیک، تصفیه آب و فاضلاب و بسیاری موارد دیگر مانند شیشه پنجره، آسفالت و دیوارها استفاده می‌شود (۷). در سال‌های اخیر پیشرفت‌های سریع فناوری نانو، سبب تحولات بزرگی در زمینه‌های محیط‌زیست، پزشکی، کشاورزی، صنعت و علوم دیگر شده است (۸). و همچنین نانو ذرات نقره و تیتانیوم دی‌اکسید دارای اثر ضد میکروبی بر باکتری‌های *Staphylococcus aureus* PTCC 1431 و *Listeria monocytogenes* می‌باشند (۹). علاوه بر

اثرات مفید نانو ذرات با توجه به تحقیقات انجام‌شده نانوذره تیتانیوم می‌تواند اثرات مضر در بافت‌های مختلف در انسان و موش ایجاد کند (۱۰). سیاه‌دانه گیاهی است از خانواده آللاه که اثرات متعدد درمانی برای آن شناخته‌شده است (۱۱). این گیاه در طب سنتی بسیاری از کشورها استفاده می‌گردد (۱۲). سیاه‌دانه حاوی ۳۲ الی ۴۰ درصد روغن جامد و ۰/۴ الی ۰/۴۵ درصد روغن فرار است این گیاه باعث کاهش میزان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود. سیاه‌دانه حاوی ترکیبات پروتئین، چربی، فیبر، فسفر، کلسیم، نیاسین، تیامین، پیرویدوکسین و فولیک اسید است (۱۳). تایموکینین یکی از ترکیب اصلی سیاه دانه است که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است (۱۴).

**روش بررسی****حیوانات**

در این مطالعه ۲۰ سر موش بالغ نژاد (NMRI) سن ۸-۶ هفته با وزن ۲۵-۳۰ گرم استفاده شد. حیوانات در شرایط استاندارد آزمایشگاهی نگهداری شدند (۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی ۵۰ درصد رطوبت و دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد). قفس موش‌ها تمیز نگه‌داشته شدند، غذا و آب برای موش‌ها فراهم شد.

**تیمار حیوانات**

موش‌های بالغ جهت انجام جفت‌گیری، ۲ موش ماده بالغ همراه با یک موش نر بالغ در یک قفس قرار داده شدند. روز بعد پس از مشاهده پلاک واژینال به عنوان روز اول حاملگی در نظر گرفته شد. موش‌های حامله به صورت تصادفی به ۴ گروه تقسیم شدند. گروه اول که کنترل بود نرمال سالین با همان حجم تیتانیوم و سیاه دانه و از طریق گاوژ داده شد. گروه دوم به موش‌ها ۵ mg/kg نانوذره اکسید تیتانیوم به‌صورت گاوژو به مدت ۷ روز داده شد. گروه سوم: به

استفاده از لام نئوبار و در زیر میکروسکوپ نوری شمارش اسپرم‌ها و مورفولوژی اسپرم مورد بررسی قرار گرفت.

#### تحلیل آماری

پس از کسب اطمینان از طبیعی بودن توزیع داده‌ها با استفاده از روش تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و در صورت معنی‌دار بودن از آزمون خی دو استفاده شد. عملیات آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ اجرا شد و سطح معنی‌داری ( $p < 0/05$ ) در نظر گرفته شد.

#### یافته‌ها

##### وزن ارگان‌ها

بررسی وزن بدن و بیضه‌ها در چهار گروه انجام شد. وزن بدن و بیضه موش‌ها در موش‌های گروه کنترل و سیاه‌دانه یکسان بودند و اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها نبود. در گروه تیتانیوم وزن بدن و بیضه موش‌ها کاهش داشته که این کاهش در گروه درمان توسط سیاه‌دانه جبران شد ( $p < 0/05$ ) (جدول ۱).

جدول ۱: تغییرات وزنی بدن و بیضه در گروه‌های مختلف، میانگین  $\pm$  انحراف معیار  $p < 0/05$

گروه	وزن بدن (گرم)	وزن بیضه (میلی‌گرم)
کنترل	۳۲/۵ $\pm$ ۴/۲۲	۱۱۰/۱ $\pm$ ۱۰/۲
سیاه‌دانه	۳۳/۴ $\pm$ ۳/۳	۱۱۱/۶ $\pm$ ۹/۵
اکسید تیتانیوم	۲۸/۱۲ $\pm$ ۴/۳	۹۶/۵ $\pm$ ۹/۳۰
سیاه‌دانه + اکسید تیتانیوم	۳۰ $\pm$ ۲/۵	۱۰۶/۳ $\pm$ ۹/۶

دیده نشد ولی کاهش تعداد اسپرم‌ها در گروه تیتانیوم به نسبت گروه کنترل دیده شد که این کاهش تعداد در گروه درمان توسط سیاه‌دانه جبران شد (نمودار ۱).

از نظر مورفولوژی اسپرم، اسپرم‌های گروه کنترل و سیاه‌دانه اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند ولی در گروه تیتانیوم اسپرم‌های غیرطبیعی افزایش معنی‌داری به نسبت گروه

موش‌ها ۳۰۰ mg/kg تیتانیوم و ۵ mg/kg سیاه‌دانه به‌صورت گاوآژ به مدت ۷ روز داده شد. در گروه چهارم که گروه سیاه‌دانه بود ۵ mg/kg سیاه‌دانه به مدت ۷ روز داده شد. (از روز ۱۳ حاملگی تا زمان زایمان، به موش‌ها، طبق گروه‌بندی‌های مختلف نانوذره اکسید تیتانیوم و سیاه‌دانه داده شد). بعد از زایمان موش‌های نوزاد نر جدا شده و تحت شرایط استاندارد تا سن بلوغ (هفته ۸-۶) نگهداری شدند. سپس موش‌ها جهت انجام آزمایش با تکنیک جابجایی مهره‌های گردنی قربانی شدند.

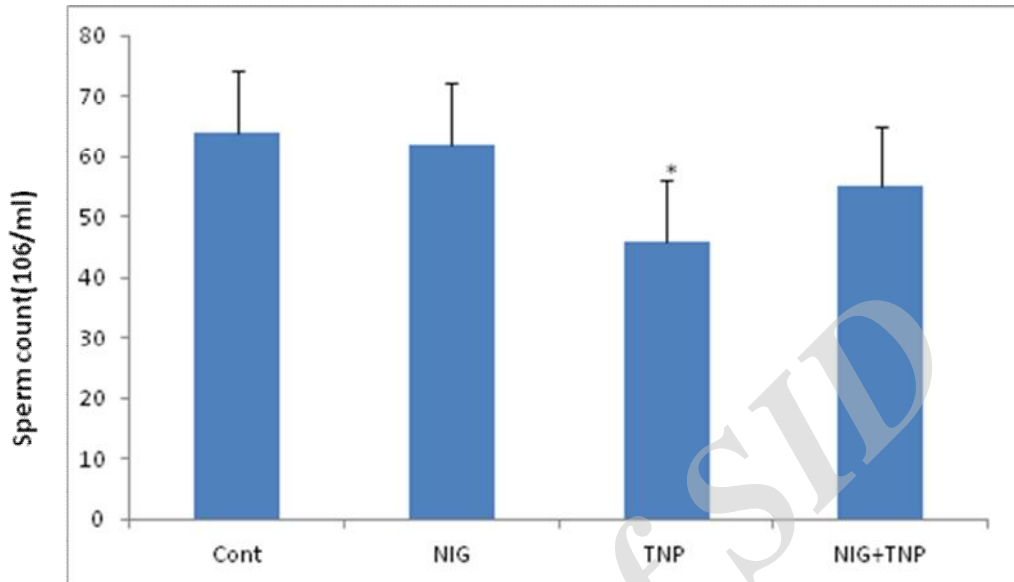
##### پارامترهای اسپرم

بعد از قربانی کردن موش‌ها به طریق جابه‌جایی مهره‌های گردنی، شکم آن‌ها را باز شده و با مشخص کردن بیضه‌ها و مشخص نمودن اپی دیدیم، دم اپی دیدیم را جهت خروج اسپرم‌ها ۳ برش مایل زده شد. اسپرم‌های خارج شده در محیط Human Tubal Fluid (HTF) به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  قرار گرفتند تا متفرق گردند و با

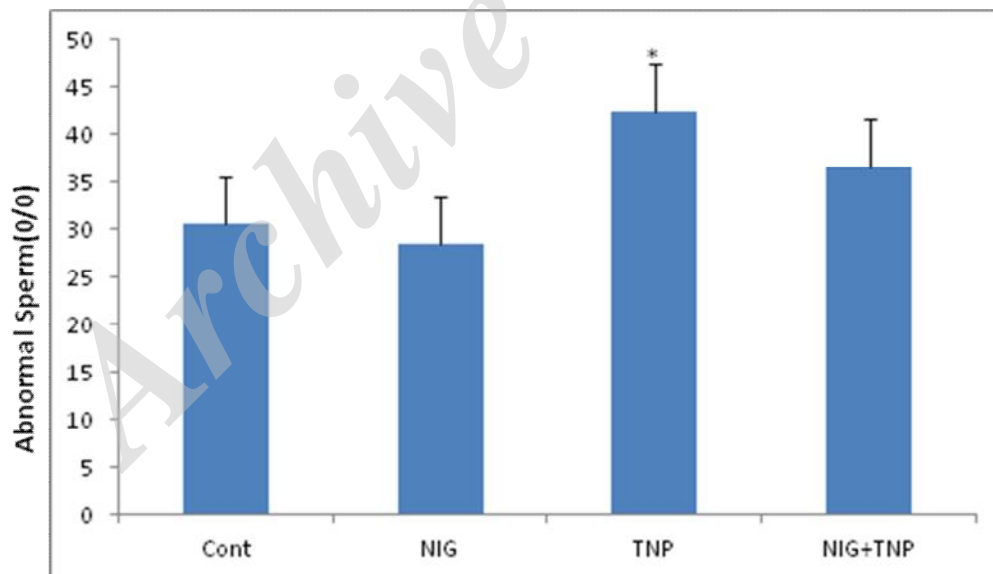
##### پارامترهای سیمین

در این بررسی پارامترهای سیمین از نظر تعداد اسپرم و مورفولوژی اسپرم مورد مطالعه قرار گرفتند. جهت تعیین تعداد و مورفولوژی اسپرم‌ها با استفاده از لام نئوبار و در ۵ میدان مختلف مورد بررسی قرار گرفت. در گروه سیاه‌دانه تعداد اسپرم‌ها اختلاف معنی‌داری به نسبت گروه کنترل

کنترل داشتند که در گروه درمان این افزایش توسط سیاه دانه کمتر شده بود ( $p < 0.05$ ) (نمودار ۲).



نمودار ۱: ارزیابی شمارش اسپرم در گروه‌های آزمایش. علامت \* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار گروه تیتانیوم با گروه کنترل است، میانگین  $\pm$  انحراف معیار.  $P^* < 0.01$



نمودار ۲: ارزیابی مورفولوژی اسپرم در گروه کنترل و گروه‌های دیگر. علامت \* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار گروه تیتانیوم با گروه کنترل است، میانگین  $\pm$  انحراف معیار.  $P < 0.05$ \*

## بحث

سیلیکا، کربن سیاه، آلومینیوم و مولیبیدیم تری اکسید دارای اثرات سوء بر فرآیند اسپرمتوزن هستند و باعث تغییرات هیستوپاتولوژی در بافت بیضه می‌شوند و همچنین سلول‌های لیدینگ و سلول‌های بنیادی اسپرمتوگونی را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۲۱). در این تحقیق همچنین مشخص شد که سیاه‌دانه به‌طور مؤثری باعث افزایش شمارش اسپرم و کاهش اسپرم‌های غیرطبیعی می‌شود که بیانگر اثرات مفید سیاه‌دانه است. مطالعات قبلی نیز اثرات مفید و مؤثر سیاه‌دانه را بر سیستم تولید مثل موش نشان داده اند (۲۲). هالی و همکاران در سال ۲۰۱۱ مشخص کردند که دریافت روغن سیاه‌دانه با دوز ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۴ هفته دارای اثر حفاظتی در برابر آسیب بیضه‌ای ناشی از سدیم والپروات است که سبب بهبود کیفیت و کمیت مایع منی و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی در بیضه رت شده است (۲۳). می‌توان گفت اثر حفاظتی سیاه‌دانه می‌تواند به دلیل اثرات آنتی‌اکسیدانی آن باشد. پارامترهای اسپرم اپیدیدیم توسط سیاه‌دانه تغییرات مثبتی داشته است. در تحقیقات قبلی ثابت شده است که سیاه‌دانه باعث بهبود حرکت اسپرم و افزایش حیات اسپرم می‌شود (۲۴). احمد الساعدی و همکاران نشان دادند که استفاده از سیاه‌دانه منجر به بهبود اسپرمتوزن و همچنین باعث افزایش اندازه و ضخامت دیواره لوله‌های اسپرم‌ساز و تعداد سلول‌های اسپرمتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، ثانویه، اسپرماتید و اسپرم‌ها در لومن لوله‌های اسپرم‌ساز شده است (۲۵).

## نتیجه‌گیری

نانو ذره تیتانیوم در دوران جنینی می‌تواند اثر مخرب بر سیستم تناسلی داشته باشد که سیاه‌دانه به عنوان عامل محافظتی می‌تواند در کاهش اثرات منفی این نانو ذره نقش داشته باشد.

در سال‌های اخیر در بسیاری از مطالعات اثرات سمی نانو ذرات مورد بررسی قرار گرفته است اما تا به حال در جهت کاهش اثرات سمی آن پژوهش‌های کمتری صورت گرفته است. در این تحقیق اثر محافظتی سیاه‌دانه بر اثرات مخرب نانو ذره اکسید تیتانیوم بر پارامترهای اسپرم (شمارش اسپرم و مورفولوژی اسپرم) مورد مطالعه قرار گرفته است. نتایج این تحقیق نشان داد که نانو ذره اکسید تیتانیوم می‌تواند باعث کاهش شمارش اسپرم و افزایش اسپرم‌های غیرطبیعی شود که این نتایج شبیه مطالعه‌ای است که در آن حاج شفیع و همکاران نشان دادند که نانو ذرات توانایی عبور از سد خونی-بیضه‌ای را دارند و تعدادی از آن‌ها اثرات مخرب و سمی بر سلول‌های زایا بر جا می‌گذارند (۱۵) همچنین این یافته‌ها با نتایج آقای Guo و همکاران مطابقت داشت که نشان دادند TNF در رت باعث کاهش شمارش اسپرم و حرکات اسپرم می‌شود (۱۶). حرکات اسپرم می‌تواند مارکری باشد برای تأثیر مواد سمی بر اسپرم‌ها باشد (۱۷). بنابراین احتمال دارد نانو ذره اکسید تیتانیوم با تخریب سد خونی-بیضه‌ای وارد لوله منی ساز شده و مستقیماً سلول‌های زایا یا سرتولی را تحت تأثیر قرار داده باشد. kim همکارانش در سال ۲۰۰۶ با مطالعه بر روی نانو ذرات مغناطیسی به روش تزریق داخل صفاقی نشان دادند که این نانو ذرات از سد خونی-بیضه‌ای عبور می‌کنند (۱۸). مطالعات قبلی نشان دادند نانو ذرات تأثیرات مخرب بر سلول‌های زایای جنس نر دارند. Gromadzka-Ostrowsk و همکاران نشان دادند که نانو ذره نقره اثر مخرب بر سلول‌های زایا دارد و باعث کاهش کیفیت اسپرم می‌گردد (۱۹). Yoshida و همکاران نشان دادند که نانو ذرات دیزلی باعث تخریب سلول‌های لایدینگ و کاهش تولید اسپرم می‌گردد (۲۰). مطالعات *in vivo* و *in vitro* مشخص کرده‌اند که نانو ذراتی مانند اکسید تیتانیوم، طلا،

**تشکر و قدردانی**

بودجه این تحقیق که حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشجوی مهدی حسینی بای، مصوب با کد ۹۶/۸۸ در تاریخ ۹۶/۱۰/۱۲ است و محل انجام طرح آزمایشگاه سلولی و مولکولی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی استان کردستان بوده است. این طرح از محل اعتبارات معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کردستان در سال ۱۳۹۶

تأمین‌شده است و که بدین‌وسیله از این معاونت تشکر می‌گردد.

**Reference**

1. Seaton A. Nanotechnology and the occupational physician. *Occup Med* 2006;56:312-6.
2. Braydich LK, Lucas B, Schrand A, Murdock RC, Lee T, Schlager JJ, et al. Silver nanoparticles disrupt GDNF/Fyn kinase signaling in spermatogonial stem cells. *Toxicol Sci* 2010;116:577-89.
3. Donaldson K, Tran L, Jimenez LA, Duffin R, Newby DE, Mills N, et al. Combustion-derived nanoparticles: A review of their toxicology following inhalation exposure. *Part Fibre Toxicol* 2005;2:10.
4. Chow JC. Nanoparticles and environment. *J Air Waste Manag Assoc* 2005;55:706-7.
5. Heinlaan M, Ivask A, Blinova I, Dubourguier HC, Kahru A. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO<sub>2</sub> to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere* 2008;71:1308-16.
6. Borm PJ, Kreyling W. Toxicological hazards of inhaled nanoparticles potential implications for drug delivery. *J Nanosci Nanotechnol* 2004;4:521-31.
7. Lee J, Mahendra S, Alvarez PJ. Nanomaterials in the construction industry: a review of their applications and environmental health and safety considerations. *ACS Nano* 2010;4:3580-90.
8. Gogos A, Knauer K, Bucheli TD. Nanomaterials in plant protection and fertilization: current state, foreseen applications, and research priorities. *J Agric Food Chem* 2012;60:9781-92.
9. Mohammad N, Iman P, Rasoul K, Elham E. Antimicrobial effect of zinc oxide and silver nitrate nanoparticles against *S. aureus*, *A. baumannii* and *P. aeruginosa*. *JBCP* 2019;7:17-30.
10. Liu H, Ma L, Zhao J, Liu J, Yan J, J Ruan, et al. Biochemical toxicity of nano-anatase TiO<sub>2</sub> particles in mice. *Biol Trace Elem Res* 2009;129:170-80.
11. Amin B, Hosseinzadeh H. Black Cumin (*Nigella sativa*) and its active constituent, thymoquinone: an overview on the analgesic and anti-inflammatory effects. *Planta Med* 2016;82:8-16.
12. Weinstein RA. Controlling antimicrobial resistance in hospitals: infection control and use of antibiotics. *Emerg Infect Dis* 2001;7:188-92.
13. Kanter M, Coskun O, Korkmaz A, Oter S. Effects of *Nigella sativa* on oxidative stress and beta-cell damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Anat Rec ADiscov Mol Cell Evol Biol* 2004;279:685-91.
14. Mosaddegh M, Naghibi F, editors. Iranian traditional medicine, past and present. International Seminar on "Integration of Traditional Medicine (Complementary/Alternative) and Modern Medicine" 2002 Oct. 12-15, Cairo, Egypt, 2002. 2-20

15. Hajshafiha M, Ghareaghaji R, Salemi S, Sadegh-Asadi N, SadeghiBazargani H. Association of body mass index with some fertility markers among male partners of infertile couples. *Int J Gen Med* 2013;6:447-5.
16. Guo LL, Liu XH, Qin DX, Gao L, Zhang HM, Liu JY, et al. Effects of nanosized titanium dioxide on the reproductive system of male mice. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2009;15:517-22.
17. El-Demerdash FM, Yousef MI, Kedwany FS, Baghdadi HB. Role of  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene in ameliorating the fenvalerate-induced changes in oxidative stress, hemato-biochemical parameters, and semen quality of male rats. *J Environ Sci Health B* 2004;39:443-59.
18. Kim JS, Yoon TJ, Yu KN, Kim BG, Park SJ, Kim HW, et al. Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice. *Toxicol Sci* 2006;89:338-47.
19. Gromadzka-Ostrowskaa J, Dziendzikowskaa K, Lankoffb A, Dobrzyńska M, Instanes C, Brunborg G, et al. Silver nanoparticles effects on epididymal spermin rats. *Toxicol Lett* 2012;214:251-8.
20. Yoshida S, Sagai M, Oshio S, Umeda T, Ihara T, Sugamata M, et al. Exposure to diesel exhaust affects the male reproductive system of mice. *Int J Androl* 1999;22:307-15.
21. Talebi AR, Khorsandi L, Moridian M. The effect of zinc oxide nanoparticles on mouse spermatogenesis. *J Assist Reprod Genet* 2013;30:1203-9.
22. Ali BH and Blundeh G. Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Pytother Res* 2003;17:299-305.
23. Hooley RP, Paterson M, Brown P, Kerr K, Saunders PTK. Intratesticular injection of adenoviral constructs results in Sertolicellspecific gene expression and disruption of the seminiferous epithelium. *Reproduction* 2009;137:361-70.
24. Ghilissi Z, Hamden K, Saoudi M, Sahnoun Z, Zeghal KM, El Feki A, et al. Effect of *Nigella sativa* seeds on reproductive system of male diabetic rats. *Afr J Pharm Pharmacol* 2012;6:1444-50.
25. Ahmad A, Husain A, Mujeeb M, Khan SA, Najmi AK, Siddique NA, et al. A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb. *Asian Pac J Trop Biomed* 2013;3:337-52.