

ORIGINAL ARTICLE

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

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 27 (157): 35- 48 (Persian).

بررسی اثر سمی نانوذره سریم اکساید بر بیضه موش

مائده حمزه^۱

فرشته طالب پور امیری^۲

سید جلال حسینی مهر^۳

چکیده

سابقه و هدف: نانو ذره سریوم اکساید (نانوسریا، CNP) به طور گستردۀ ای 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 صفائی با دوز ۵ mg/kg به مدت ۷ روز متوالی تجویز شد. سمیت بیضه با استفاده از آزمایشات هیستوپاتولوژی، بیوشیمیابی 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 MDA، ROS و 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 Johnsen'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 برو-اکسیداتیو می‌تواند به مسمومیت در بیضه منجر شود. همچنین تایید می‌شود که نانوسریا توانست از سد خونی بیضه‌ای عبور کند.

واژه‌های کلیدی: نانو ذره سریوم اکساید، سمیت بیضه‌ای، استرس اکسیداتیو

مقدمه

گاز، پمپ‌های اکسیژن و در مصارف شیشه و سرامیک دارد، به عنوان مهم‌ترین نانو مواد معرفی می‌گردد(۱). امروزه در برنامه‌های کاربردی نانو پزشکی نیز این نانو ذره مطرح می‌باشد(۲). همان‌گونه که کاربرد نانوسریا رو به افزایش است، شناخت کمی از این نانوذرات مهندسی شده وجود دارد و نگرانی‌ها در خصوص اثرات سرمی نانو ذره و اثرات زیست محیطی آن نیز رو به افزایش است. با این حال، اطلاعات در مورد سمیت پیل‌های سوختی و باتری، سلول‌های خورشیدی، سنسور

با توجه به پیشرفت‌های سریع در نانو تکنولوژی، اخیراً اثرات سوء نانوذرات از قبیل سمیت نانوذرات در سلامت انسان به سرعت در حال افزایش است(۳). نانوذرات فلزی به طور گستردۀ برای مقاصد صنعتی استفاده می‌شوند. در این میان، نانوذرات سریم اکساید (نانو سریا CNP cerium oxide nanoparticles) با کاربرد گستردۀ ای 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 پامبر(ص)، دانشکده پزشکی

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

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

۳. استاد، گروه رادیوفارماسی، دانشکده 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 تخدمدان و بیضه گردد. بیضه بافتی است با تقسیم میتوzی و میوزی بالا و با وجود داشتن سد خونی بیضه‌ای، خیلی سریع تحت تاثیر مواد سی در قرار می‌گیرد^(۱۳). در مطالعات بر روی بافت مغزی، دیده شده نانوذرات مهندسی شده با سایزهای زیر ۵۰ نانو متر قادرند از سد خونی مغزی عبور کنند اما اطلاعات کمی در مورد پتانسیل سمیت نانوسربا بر روی بافت بیضه وجود دارد^(۴).

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

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

مواد و روش‌ها

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

نانوسربا بر سلامت انسان تنها محدود به نتایج چند مطالعه منتشر شده می‌باشد. علاوه بر این، سمیت نانوسربا، به ویژه در زمینه اثرات اکسیدانی / آنتی اکسیدانی نیز هنوز بحث بر انگیز است^(۵). گزارش‌های متناقضی در مورد سمیت نانوسربا در سال‌های اخیر منتشر شده است، که بعضی از یافته‌های این مطالعات به اثرات سمی نانوسربا پرداخته‌اند، در حالی که یافته‌های دیگر به اثرات محافظتی آن در برابر استرس اکسیداتیو اشاره کردند^(۶، ۷). لین و همکاران مطرح کردند که Ce3+ حاصل از احیای Ce4+ ، با مولکول اکسیژن (O2) واکنش نشان داده و آنیون‌های سوپراکسید تولید می‌کند. دو آنیون سوپراکسید 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 Ce3+ و Ce4+ بر روی سطح نانوسربا به عنوان یک آنتی اکسیدان عمل کرده و اجازه می‌دهد تا نانوذرات در محیط کشت رادیکال‌های آزاد را بربایند^(۹). علاوه بر این، سمیت حاصل از نانوسربا که در محیط درون تنی و برون تنی اعمال می‌شود نیز ممکن است متفاوت باشد^(۴). اثرات توکسیک نانوسربا 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 نانوسربا با زدودن رادیکال‌های آزاد اکسیژن، نقش محافظتی در بدن دارد^(۱۲). موارد فوق نشان می‌دهد که برخی از اختلاف نظرها بر روی سمیت نانوسربا هنوز وجود دارد. نانو سربا 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، فیبرоз و سرطان در ارگان‌ها ایجاد می‌کند^(۴). از این رو ممکن است نانوسربا سبب آسیب شدید بر ارگان‌های

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

در اندازه گیری میزان (GSH)، میزان گلوتاتیون کاهش یافته در نمونه های بیضه، با استفاده از روش Gaffari در طول موج ۴۱۲ نانو متر انجام شد. ۰/۵ ml مایع رویی، ۲ ml از بافر تریس EDTA (۰/۲) mol/L، با pH ۸/۹ و ۰/۱ ml از ۵,۵'- mol/L Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) محلول در دمای اتاق برای مدت ۵ دقیقه نگهداری شد و سپس در طول موج ۴۱۲ نانومتر بر روی اسپکترو فوتومتر خوانده شد. سطح GSH در mL / nmol 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، ۲۰ µl DCFH-DA (۰/۱ mg/kg) در دمای ۴°C به مدت ۱۵ دقیقه نگهداری گردید. سپس جذب در طول موج تحریکی ۳۱۲ nm و نشری ۴۲۰ 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 (۰/۱ w/v) به ۲۵۰ میکرو گرم از نمونه اضافه و در دمای ۴°C به مدت ۱۵ دقیقه نگهداری شد. سپس پروتئین های رسوب داده شده با دور ۳۰۰۰ g سانتی فیوژن گردید و محلول رویی دور ریخته شد. رسوب زیرین کاملا در ۵۰۰ میکرولیتر از ۰/۱ NaOH مول پراکنده شد و ۵۰۰ میکرولیتر از ۱۰ DNPH میلی مول حل شده در ۲ HCl ۲ مول به نمونه ها اضافه شد. همچنین یک بلانک که با اضافه کردن ۵۰۰ میکرولیتر از ۲ 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 گردید، و پس از آن، ۵۰۰ میکرولیتر از تری

Nano ZS; Malvern Instrument Ltd, Malvern, UK). اندازه آن ۳۷۸ nm و PDI برابر ۰/۳۷۲ و زتای آن ۱۱/۷ 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 خود بگیرند. شرایط محیطی شامل، دمای 23 ± 1 درجه سانتی گراد، رطوبت نسبی 55 ± 5 درصد و نور ۱۲ ساعت / تاریکی، بوده است. نانوسریا در آب مقطر سوسپانسیون شد و قبل از تزریق ورتكس گردید. موش ها به صورت تصادفی به دو گروه مساوی کنترل و تجربی تقسیم شدند. گروه کنترل نرمال سالین دریافت کردند و گروه تجربی، ۵ mg/kg نانوسریا به صورت داخل صفاقی برای ۷ روز متوالی دریافت کردند (۱۵).

جمع آوری نمونه

یک روز بعد از دریافت آخرین دارو، حیوانات با کتابخانه (۵ mg/kg و زایلazin) ۵ mg/kg بیهوده 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 g سانتی فیوژن 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 بلafasle خارج گردید. اپیدیدیم از یکی از بیضه ها برای ارزیابی پارامترهای اسپرم جدا شد و یکی از بیضه ها برای ارزیابی هیستولوژیکی و اینتوهیستوشیمی در بافر فرمالین ۱۰ درصد فیکس شد. بیضه دیگر بعد از پاکسازی بافت ها و شستشو در بافر فسفات سالین (PBS)، برای ارزیابی بیوشیمیابی به صورت تازه استفاده شد.

برای ارزیابی استرس اکسیداتیو، سطح Radical oxidative species (ROS)، 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 اسپرم ها مورد بررسی قرار گرفت و درصد اسپرم های متحرک ثبت شد. برای ارزیابی مورفولوژیکی اسپرم، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسون سلولی اسپرم با ۱۰ میکرولیتر از رنگ ائوزین میکس شدند. سپس با ۱۰ میکرولیتر از آن، اسمیر بر روی لام تهیه شد. بعد از خشک شدن نمونه ها، نمونه ها با لنز $\times 40$ برای ارزیابی مورفولوژیکی مورد بررسی قرار گرفتند و حداقل ۲۰۰ اسپرم در میدان های دید مختلف آزمایش شدند.

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

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

برای ارزیابی هیستوپاتولوژی، بیضه های فیکس شده در بافر فرمالین ۱۰ درصد، بعد از پردازش بافتی با استفاده از دستگاه اتو تکنیکون و پارافینه کردن، H & E بر شاهی ۵ میکرونی با هماتوکسیلین و ائوزین (H & E) رنگ آمیزی شد و برای ارزیابی کمی و کیفی هیستوپاتولوژی آزمایش گردید. به صورت تصادفی ۱۰ لوله سمینیفر از هر سکشن و ۱۰ سکشن از هر بیضه با بزرگنمایی $\times 40$ مورد بررسی قرار گرفت. یافته های Johnsen's هیستوپاتولوژیکی با استفاده از تست جانسون score بررسی شد. با در نظر گرفتن وضعیت سلول های رده اسپرماتوژن در اپیتلیوم لوله سمینیفر از ۰ تا ۱۰ نمره دهی شد (جدول شماره ۱). ارزیابی بافتی توسط یک هیستولوژیست به صورت blind به گروه های درمانی انجام شد.

کلرواستیک اسید) ۲۰ درصد (w/v) اضافه شد. رسوب پروتئینی با سانتریفوژ در دور $g \times 6500$ به مدت ۱۰ دقیقه جمع آوری و سوپرناتنت دور ریخته شد. رسوب زیرین با ۱ میلی لیتر از مخلوط ۱ : ۱ (v/v) اتانول و اتیل استات ترکیب شده و مجددا در $g \times 6500$ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و محلول رویی برداشته شد. رسوب پروتئین نهایی در ۲۰۰ میکرولیتر از محلول گوانین هیدرو کلراید ۶ مول پراکنده شد. میزان پروتئین کربونیل با خواندن جذب در ۳۶۵ نانومتر با ضریب جذب $1\text{ cm}^{-1} \text{ cm}^{-1} 22000\text{ M}$ ارزیابی شد و به صورت نانومولاز DNP به ازای هر میلی گرم پروتئینیان شد. در اندازه گیری 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 اکسیداتیون سنجش شد. میزان تستوسترون در سرم خون با کیت Mouse Testosterone ELISA Kit، Bioassay, Cat. No. E0260MO طبق دستورالعمل شرکت سازنده و با روش اسپکترو فوتومتری سنجش شد. میزان تستوسترون با واحد nmol/L شد. تمام نمونه ها به صورت دو بار تکرار سنجش شدند.

جهت ارزیابی پارامترهای اسپرم اپیدیدیمال، اپیدیدم 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 تکه های کوچک تقسیم گردید. یک ربع زمان داده شد تا اسپرماتوزوئیدها به داخل محیط کشت حرکت کنند. سپس تکه بافتی اپیدیدم از محیط کشت خارج شده و سوسپانسیون سلولی برای ارزیابی پارامترهای اسپرم استفاده گردید.

جهت ارزیابی درصد تحرک اسپرم، سوسپانسیون سلولی پیش از 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. نانوسریا با دوز ۵ 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 نانوسریا در مقایسه با گروه کنترل داشته است ($P < 0.05$).

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

متغیرها (پارامتر های استرس اکسیداتیو)	کنترل	نانوسریا
MDA(µg/mg)	۴/۸۳ ± ۰/۳۲	۲/۶۹ ± ۰/۷۹ ^a
PC	۰/۱۷ ± ۰/۰۳۵	۰/۶۴ ± ۰/۱۷ ^b
GSH (nm/ml)	۱۷/۷۵ ± ۱/۵	۱۰/۵ ± ۱/۲۷ ^b
ROS (Fluorescence intensity)	۱۱۲/۵ ± ۱۸/۲۳	۳۳۸/۴ ± ۷۴/۳۶ ^b

در مقایسه با گروه کنترل می باشد. $a, b; P < 0.05$; $a, b; P < 0.001$.

در موش هایی که با نانوسریا 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	Few late spermatids
9	Many late spermatids
10	Full spermatogenesis

برای ارزیابی هیستومورفومتریک، ارزیابی کمی، میانگین قطر و ضخامت اپی تلیوم لوله های سمینیفر در ۱۰ لوله از هر سکشن و ۱۰ سکشن از هر گروه، در بزرگ نمایی $10 \times$ با استفاده از میکروسکوپ نوری با OLYSIA(GmbH, version 3.2 - Japan) نرم افزار انجام شد. لوله های سمینیفری 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 ایمنوهیستوشیمی، تکنیک ایمنوهیستوشیمی مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده کیت (Abcam Company, USA) انجام شد. بعد از پارافین زدایی و آب دهی، برای مهار فعالیت پراکسیداز اندوژنز نمونه ها با $0.03\% H_2O_2$ در متانول برای مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس نمونه ها در دمای $4^{\circ}C$ در یک شب با آنتی بادی اولیه 3 (anti-caspase 3 rabbit polyclonal antibody, in PBS, v/v, Abcam, 1:100 lat: GR224831-2).

انکوبه شدن با آنتی بادی ثانویه کونژو گه با horseradish peroxidase(Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB, Abcam, Lat: GR2623314-

4) برای دو ساعت، برش ها با DAB (diaminobenzidinetetrahydrochloride) دقیقه انکوبه گردید. سپس نمونه ها آبگیری و موئنه شدند. شدت رنگ پذیری یانگر 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 اسperm 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 غلطت تستوسترون به طور معنی داری در گروه دریافت کننده نانوسریا در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت ($P < 0.001$). این در حالی است که درصد اسperm‌های غیر نرمال در گروه دریافت کننده نانوسریا از لحاظ شکل ظاهری به طور معنی داری در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته است ($P < 0.001$).

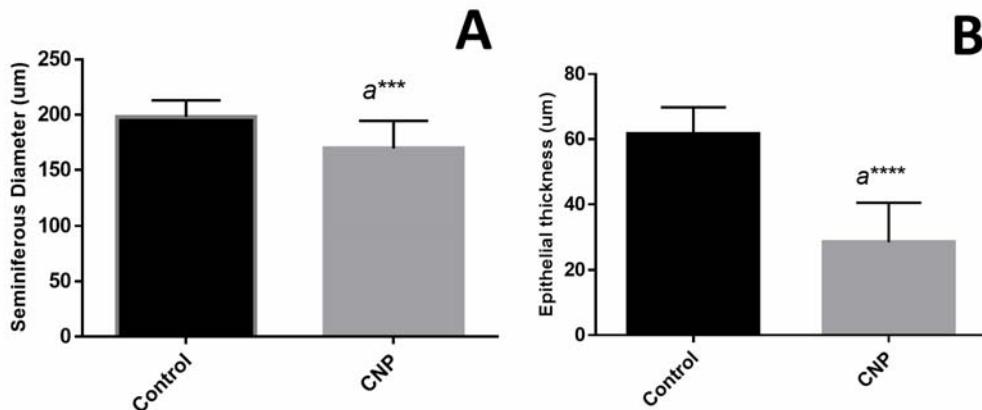
یافته‌های هیستومورفومتریک در شکل شماره ۱ نشان داده شده است. در گروه نانوسریا اختلاف معنی داری در ضخامت اپیتیلیوم و قطر لوله‌های سمینیفر (بترتیب 11.92 ± 11.6 و 28.6 ± 25.1) در مقایسه با گروه کنترل (بترتیب 8.30 ± 8.53 و 14.82 ± 14.1) دیده شد. این تغییرات در ضخامت و قطر لوله‌ها از لحاظ آماری کاملاً معنی دار بود ($P < 0.0001$).

جدول شماره ۳ پارامترهای اسperm را نشان می‌دهد. تعداد اسperm و درصد تحرک اسperm 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 اسperm‌های 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 اسperm و غلظت تستوسترون در موش

متغیرها	کنترل	نانوسریا
پارامترهای اسperm		
Total Epididymal Sperm Number ($\times 10^6$)	8.86 ± 0.9	1.47 ± 0.44^a
Cell Viability (%)	71.7 ± 7.33	41.97 ± 8.45^a
Sperm Motility (%)	89.9 ± 7.21	49.4 ± 9.16^a
Total Sperm Abnormality (%)	3.9 ± 1.14	17.4 ± 4.05^b
تستوسترون		
Testosterone	12.02 ± 2.61	4.61 ± 2.92^a

در مقایسه با گروه کنترل می باشد. $a, b; P < 0.001$; $a, b; P < 0.0001$.

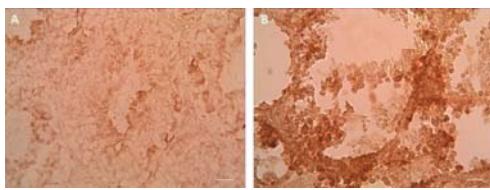


شکل شماره ۱: A: هیستوگرامی از آنالیز کمی قطر لوله‌های سمینیفر، B: ضخامت لایه اپیتیلیال لوله‌های سمینیفر در دو گروه نانوسریا و کنترل، کاهش شدید در ضخامت لایه اپیتیلیال لوله‌های سمینیفر در گروه نانوسریا در مقایسه با گروه کنترل نشان داده شد. ***، ****: بیانگر $P < 0.001$ و $P < 0.0001$ می باشد. CNP: نانوسریا.

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

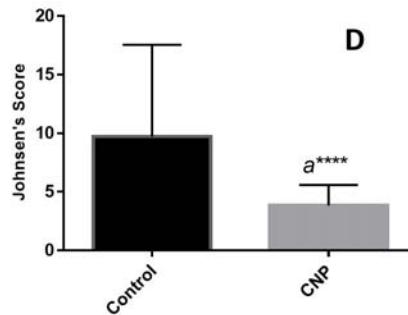
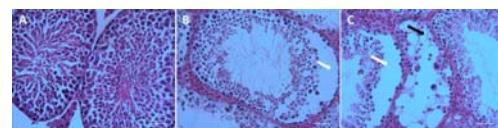
یافته‌های هیستوپاتولوژیکی، پس از ۷ روز تزریق داخل صفاقی نانوسریا با دوز ۵ میلی گرم / کیلو گرم، بررسی پاتولوژیکی در بافت بیضه انجام شد. در شکل شماره ۲ فتومیکروگراف رتگ‌آمیزی شده با H & E

ثبت با رنگ قهقهه‌ای رنگ شدند. رنگ آمیزی ایمونوہیستوشیمی در گروه کنترل، ساختار نرمال لوله‌های سینیفر و بافت بینایی را نشان داده است که در شکل شماره ۳- TB آمده است. همان طور که در شکل شماره ۳-A مشخص است immunoreactivity کاسپاز-۳ در گروه نانوسریا در سلول‌های اسپرماتوگونی بسیار شدید بود.



شکل شماره ۳: رنگ آمیزی ایمونوہیستوشیمی بیان کاسپاز-۳ در گروه‌ها را نشان می‌دهد. A: اکثر سلول‌های رده اسپرماتوژن در گروه نانوسریا از بین رفند و ایمتوکتیویتی کاسپاز ۳ در سلول‌های اسپرماتوگونی‌ها و اسپرماتوسیت‌های اولیه قابل توجه بود، در گروه کنترل سلول‌های مثبت شناسایی نشد = $100 \mu\text{m}$ (400 \times IHC) Scale bar

نانوسریا دریافت کردند، دارای لوله‌های سینیفر نامنظم و با کاهش شدید اسپرماتوگونی، سرتولی و اسپرماتید اولیه، نکروز، جدا شدن سلول‌های رده اسپرماتوگنی از غشاء پایه desquamation، دژنره شدن سلول‌ها، واکوئولیزه شدن، ادم و اختناق عروق و سلول‌های با سیتوپلاسم اثوزینوفیلیک و هسته پیکتویک می‌باشند. هم‌چنین کاهش ضخامت اپی تیلوم و قطر لوله‌های سینیفر در اکثر لوله‌های سینیفر نیز مشاهده شد. همان‌طور که در شکل شماره ۲-D مشخص است ایست بلوغ اسپرماتوژن (maturation arrest) با کاهش نمره جانسون در گروه دریافت کننده نانوسریا همراه بود. اختلاف معنی‌داری در بین دو گروه وجود داشت ($P < 0.0001$).



شکل شماره ۴: A: فتومیکروگرافی از اثر نانوسریا بر ساختار هیستولوژیکی بیضه، (A) ساختار نرمال لوله‌های سینیفر را در گروه کنترل نشان می‌دهد. B و C: تخرب شدید لوله‌های سینیفر در گروه نانوسریا با نکروز اسپرماتوسیت‌ها، ادم شدید، واکوئولیزه شدن (فلش سیاه)، جدا شدن سلول‌های رده اسپرماتوگنی از غشاء پایه (فلش سفید) را نشان می‌دهد. (400 \times $100 \mu\text{m}$ = Scale bar) (E & H) D: هیستوگرامی از آنالیز نیمه کمی آسیب بیضه با تست جانسون. *** بیانگر $P < 0.0001$ می‌باشد در مقایسه با گروه کنترل، CNP: نانوسریا.

بحث

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

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

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

Park در مطالعه خود نشان داد تیمار تک دوز نانوسریا با دوز 5 mg/kg به صورت خوراکی بر روی بافت بیضه تاثیری ندارد^(۴). در مطالعه حاضر، از دوز 5 mg/kg برای بررسی اثر بیولوژیکی آن بر روی بافت بیضه استفاده گردید و ارزیابی ساختار بافتی و بیوشیمیابی 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 تاثیر 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 بروون 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 متد تهیه نانوسریا نیز ممکن است در این مطالعات متفاوت باشد. نانو سریا 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 $5 \text{ میلی گرم} / \text{کیلو گرم}$ به موش تزریق گردید، هیچ حیوانی تلف نشد، ولی استرس اکسیداتیو شدید ساختار بافتی را تخریب کرد. اسپرماتوژن زیک روند پیچیده‌ای است که

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 ریودن رادیکال‌های آزاد در سیستم‌های بیولوژیکی هنوز یک چالش می‌باشد^(۲۵). نانوذره سریوم اکسید (CNPs) در اندازه‌های مختلف به میتوکندری، 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 بالанс 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-اکسیدانتی قوی داشته است. این یافه‌ها با سنجش فعالیت میتوکندریابی 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 5 mg/kg بر روی پارامترهای بیوشیمیابی 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-اکسیدانتی، وضعیت اکسیدانی/آنتی اکسیدانی بیضه را مختلط 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).

mg/kg باعث تغییرات شدید در ساختار بافتی بیضه شد. روند اسپرماتوژنر کاملاً مختلف شد و نمره تست جانسون به شدت در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت. در این مطالعه اثر بیولوژی تولید مثلی نانوسریا 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 تضمین ک 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 نانوسریا 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 بیندازد. علاوه بر این، در مواجهه با نانوسریا میزان ROS، MDA و PC در بیضه افزایش یافت. این موارد نشان می‌دهد که اسپرماتوژنر در مواجهه با نانوسریا سرکوب شده و با تغییرات در ساختار بافتی و استرس اکسیداتیو در بیضه همراه بوده است.

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

عوامل سیتوکسیک با تولید استرس اکسیداتیو به شدت بر روی سلول‌های اسپرماتوژنیک تاثیر می‌گذارند و حفظ سیستم آنتی اکسیدانی اندوزنس برای حفظ روند اسپرماتوژنر و استروئیدوژنر ضروری می‌باشد.^(۲۰) یافته‌های مورفومتریک در گروه نانوسریا کاهش در ضخامت اپیتلیوم و قطر لوله‌های سمینیفر را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد. کم شدن تعداد لایه‌های سلول‌های اپیتلیال لوله‌های سمینیفر 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 اندرورژن می‌باشند.^(۳۳) در این مطالعه، کاهش میزان تستوسترون آسیب سلول‌های لایدیگ را تایید می‌کند. و ممکن است علت آسیب روند اسپرماتوژنر در ارتباط با کاهش تستوسترون هم باشد.

نانوذرات در تکنیک sperm-mediated gene transfer (SMGT) اسپرم به داخل اووسیت نقش موثری دارند.^(۳۴) Falchi و همکاران در مطالعه خود نشان دادند در محیط In vitro اسپرم‌هایی که در معرض نانوسریا 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 mg/kg نانوسریا به صورت خوراکی هیچ اثر سویی بر روی ارگان‌هایی از قبیل کبد، ریه، طحال، مغز، کلیه و بیضه ندارد.^(۴) اما Hung نیز در مطالعه خود بیان داشت مواجهه با نانوذره تیتانیوم (TiO2) در سه دوز ۲/۵ و ۵ mg/kg در روز متوالی در آب خوراکی باعث سمیت بیضه و کاهش پارامترهای اسپرم می‌شود.^(۳۶) در این مطالعه نیز تجویز

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

سیاستگزاری

پژوهش حاضر نتیجه طرح
تحقیقی ماره شماره اتی بـ IR.MAZUMS.REC.1396.3039 میباشد که بخشی از
پایان نامه خانم مائده حمزه است. بدینوسیله از
معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم
پزشکی مازندران و مرکز تحقیقات سلوی 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, Komarneni 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, Tekyemaroof 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، به ده است.

در این مطالعه آزمایشی، که اثر پروواکسیدانی/آنتی اکسیدانی نانوسریا را در دوز ۵ میلی گرم/کیلو گرم در محیط *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-سیپهه توانست سمیت بسیار شدیدی در بافت پیشنهاد می کند مطالعات پیشتری در محیط *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, Warrier 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, Komminou ER, Urtiaga 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, Sereemaspun 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.