

بررسی هیستوپاتولوژی اپیدیدیم در موش‌های نر بالغ نژاد NMRI تیمار شده با نانوذرات اکسید روی

زیبا مظفری^۱، کاظم پریور^۲، نسیم حیاتی رودباری^۳، شیوا ایرانی^۳

^۱ دانشجوی دکتری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران

^۲ استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران

^۳ استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: توسعه سریع نانوفناوری منجر به افزایش کاربردهای گسترده نانوذرات در تحقیقات زیست‌پزشکی شده است. این مواد پس از تزریق، از طریق سیستم گردش خون به سرعت در تمام بدن توزیع و به اندام‌ها و بافت‌ها می‌رسند. از این رو بررسی اثرات سمی آنها قبل از کاربردشان به عنوان دارو برای انسان و حیوان باید ارزیابی شود. در این مطالعه، تاثیر نانوذرات اکسید روی بر تغییرات هیستوپاتولوژیک بافت اپیدیدیم در موش بالغ مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، از ۳۰ سر موش نر بالغ نژاد NMRI استفاده شد. حیوانات در ۵ گروه کنترل، شم و سه گروه تجربی (n=۶) قرار گرفتند. گروه شم ۱ میلی لیتر آب مقطر و گروه‌های تجربی دوزهای مختلف نانو اکسید روی (۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم، به روش درون صفاقی) دریافت کردند. تیمار برای یک روز انجام شد. یک هفته پس از تزریق، تاثیر نانوذرات اکسید روی بر بافت اپیدیدیم مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج توسط ANOVA و آزمون توکی تحلیل شد.

یافته‌ها: نانوذرات اکسید روی در دوز ۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم باعث کاهش قابل توجهی در تعداد سلول‌های اسپرم در مقایسه با گروه کنترل شد. همچنین سبب ایجاد سلول‌های دژنره شده در لوله‌ها نیز شد. تغییرات معنی‌داری در قطر لوله‌ها و تعداد لوله‌های اپیدیدیمی مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: طبق نتایج این مطالعه و احتمال ایجاد اثرات نامطلوب نانو اکسید روی بر سیستم تولیدمثلی، پیشنهاد می‌شود افراد از استفاده از فرآورده‌های محتوی نانو اکسید روی و برخورد زیاد با آن، تا حد امکان پرهیز کنند.

واژگان کلیدی: نانو ذرات اکسید روی، بافت اپیدیدیم، سلول‌های اسپرم، موش.

مقدمه

از داروهای زیستی تا بخش‌های مختلف صنعتی به کار برده شوند (۲، ۳). دامنه وسیعی از کاربرد نانوذرات در علوم پزشکی، تولید داروها بر پایه نانو است (۴). نانوذرات به راحتی از پوشش سلول‌ها، حتی سد خونی - مغزی و سد خونی - بیضه‌ای می‌گذرند (۵) و به همین دلیل می‌توانند بر اندام‌ها و بدن تاثیر بگذارند. نانو ذرات می‌توانند با سرعت به جریان خون وارد شده و توسط سیستم گردش خون به اندام‌ها (شامل مغز، قلب و کلیه‌ها) برسند (۶). همراه با توسعه نانو تکنولوژی در چند سال اخیر، نانو اکسید روی

اصطلاح "nano-technology" که برای اولین بار توسط Norio Taniguchi به کار برده شد، تکنیکی برای تولید مواد در ابعاد نانومتری است (۱). نانو ذرات (NPs) دارای خواص گرمایی ویژه، و خواص مکانیکی و مغناطیسی خاصی هستند که به آنها این امکان را می‌دهد که در دامنه وسیعی

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم پایه،

گروه زیست‌شناسی، کاظم پریور (email: kazem_parivar@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۹۴/۱۰/۲۷

تاریخ پذیرش مقاله: ۹۵/۱/۱۶

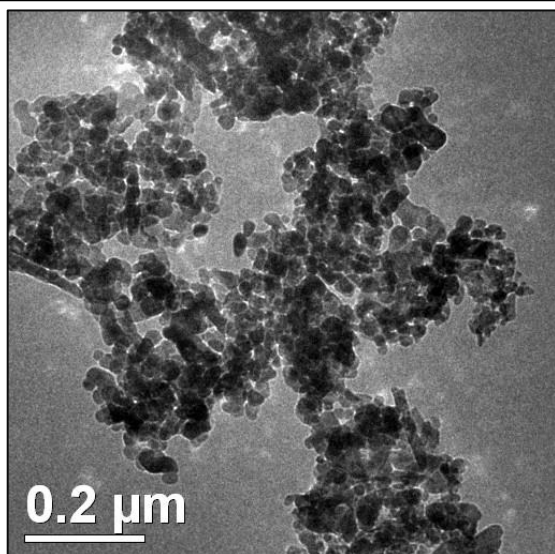
Bentley و همکارانش در سال ۲۰۰۸ نشان دادند یکی از مکانیسم‌های تأثیر نانو ذرات در سلول‌های مختلف، کاهش فعالیت میتوکندری‌ها است (۱۸). اگرچه چندین مطالعه از تأثیر نانو ذرات اکسید آهن بر روی تولید مثل انجام شده است، ولی تحقیقات بیشتری برای بررسی تأثیر نانو ذرات اکسید روی بر روی سلول‌های جنسی، به ویژه سلول‌های بافت اپیدیدیم لازم است. موقعیت اپیدیدیم در بین لوله بیرون برنده و وازودفران قرار گرفته است که یکی از عضوهای فرعی مردانه است که از یک لوله پیچ خورده با طول تقریبی ۷-۵ میلی‌متر تشکیل شده است (۱۹). این مجرا هم اکنون به عنوان یک کانال برای انتقال، غلیظ سازی و ذخیره اسپرماتوزوآ شناخته شده است (۲۰). مجاری اپیدیدیم از طریق فرآیندهایی به نام بلوغ اپیدیدیمال سبب بروز تغییرات مورفولوژیکی، بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و تغییرات عملکردی در ساختمان اسپرماتوزوآ می‌شود، که سبب تولید سلولی کارآمد برای بارور کردن می‌شود (۲۱).

در این مطالعه، ما تغییرات آسیب بافتی ناشی از تزریق درون صفاقی نانو ذرات اکسید روی را بر روی بافت اپیدیدیم در موش‌های بالغ نژاد NMRI بررسی کردیم.

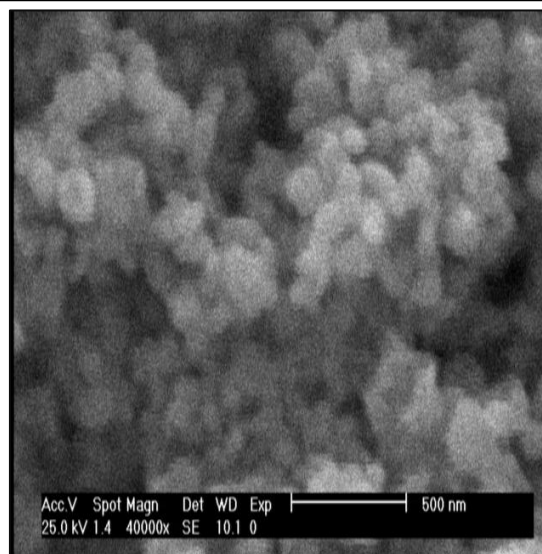
مواد و روشها

در این مطالعه تجربی، از نانو ذرات اکسید روی با قطر ۲۰ نانومتر، تهیه شده از شرکت نانو پارس لیما (شکل ۱) و آب مقطر به عنوان حلال استفاده شد. ۳۰ سر موش‌های کوچک آزمایشگاهی نر بالغ نژاد NMRI در محدوده وزنی ۲۸-۳۲ گرم که از انستیتو پاستور ایران خریداری شده بود، استفاده شدند. حیوانات در قفس پلکسی گلاس با دسترسی آزاد به آب و غذا در دمای 2 ± 32 درجه سانتی‌گراد تحت سیکل نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. حیوانات به ۵ گروه (۶ موش در هر گروه) به صورت زیر گروه بندی و تقسیم شدند: گروه ۱ (کنترل): موش‌هایی که تا پایان آزمایش دست نخورده باقی ماندند و هیچ تیماری روی آنها انجام نگرفت. گروه ۲ (شم): موش‌هایی که آب مقطر دریافت کردند. گروه ۳، ۴ و ۵ (تجربی): سه گروه حیوانات تجربی به ترتیب دوزهای ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانو اکسید روی به روش درون صفاقی به صورت محلول در ۱ میلی

بسیار در دسترس قرار گرفته است که دارای یون‌های روی با ویژگی‌های متفاوت است و توجه دانشمندان زیادی را در رشته‌های مختلف به ویژه نانوتکنولوژیست‌ها را به خود جلب کرده است (۷). نانو ذرات اکسید روی (ZnO NPs) در محصولات تجاری زیادی، از جمله لوازم آرایشی، بهداشتی، مواد رنگی، و نساجی مورد استفاده قرار می‌گیرند. همچنین با توجه به خاصیت آنتی‌بیوتیکی این ماده (ZnO NPs)، از آن در نگهدارنده‌های غذایی و به دلیل خاصیت ضد قارچی در بخش کشاورزی استفاده می‌شود و نیز به عنوان جایگزینی برای مواد ضد سرطان در داروسازی به کار می‌رود (۸). اکسید روی به عنوان ماده‌ای با سمیت کم شناخته شده است، اگرچه استنشاق گاز آن می‌تواند سمی باشد (۹). بعضی از مطالعات در زمینه تولید مثل پیشنهاد می‌کنند که در قرار گرفتن در معرض نانوذرات اختلال در عملکرد هورمونی از جمله اختلال در مراحل مختلف تنظیم هورمون‌های جنسی می‌شود، در مقابل شاید نانوذرات دیگری بتوانند از نقص عملکرد هورمونی از طریق مکانیسم‌های مختلفی همچون خاصیت آنتی‌اکسیدانی جلوگیری کنند (۱۰). مطالعات نشان داده‌اند که نانو ذرات می‌توانند با عبور از سد‌های بیولوژیکی به داخل بافت‌های تولیدمثلی نفوذ کنند، به همین دلیل توانایی آسیب رساندن به سلول‌های مختلفی دارند، به عنوان، مثال ماندگاری اسپرم‌ها را کاهش می‌دهند (۱۱). گزارش شده است که برخی از نانوذرات با تولید گونه‌های اکسیژن واکنشی (ROS) در محیط آزمایشگاه به مواد سمی تبدیل می‌شوند (۱۲). تماس افراد با نانوذرات به دلیل اندازه بسیار کوچک، سطح نسبتاً بزرگ و واکنش پذیر بودن آنها ممکن است مضر و خطرناک باشد. نانو ذرات می‌توانند به راحتی از سطح غشای سلول (۱۳) و سد خونی - بیضه‌ای عبور کنند (۱۴). برای مثال، سمیت نانوذرات اکسید آهن به وسیله تغییر در pH و تغییر غلظت سرم گزارش شده است (۱۵). مطالعاتی که بر روی موش‌ها با استفاد از نانو ذرات TiO₂ انجام شدند، تجمع این ماده در سلول‌های لایدیگ، سرتولی و اسپرماتید را نشان دادند (۱۶). در مطالعه دیگری که تأثیر نانو ذرات کربن سیاه بر روی سیستم تناسلی جنس نر مطالعه شد، نتایج به دست آمده حاکی از کاهش تولید روزانه اسپرم همراه با تغییر در شکل و ریخت سلول‌های بیضه، به خصوص سلول‌های لایدیگ، و کاهش سطح تستوسترون در سرم بود (۱۷).



عکس SEM نانوذرات ZnO



عکس TEM نانوذرات ZnO

شکل ۱. تصویر میکروسکوپ الکترونی نانوذرات اکسید روی مورد استفاده در این مطالعه

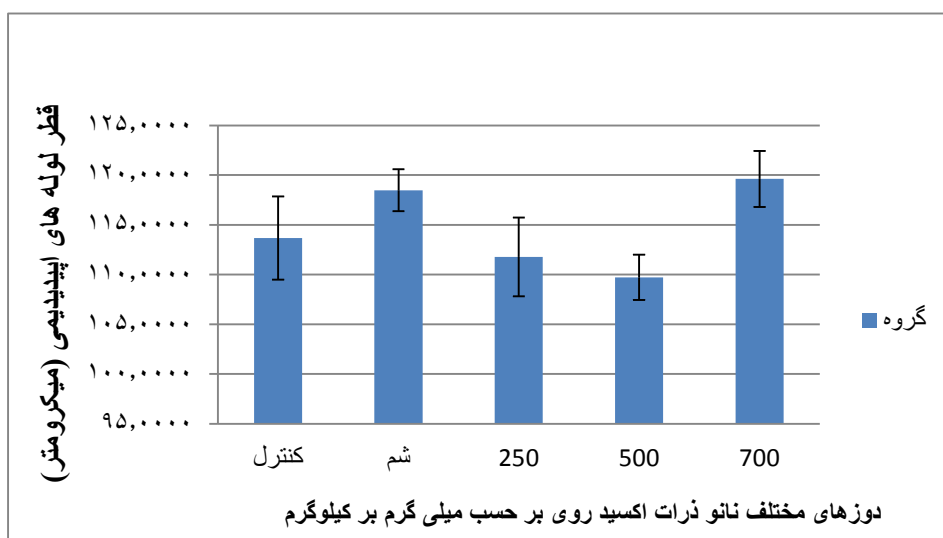
سبب ایجاد تغییرات معنی‌داری در قطر لوله‌های اپیدیمی (EPD) در مقایسه با گروه کنترل شد (نمودار ۱). همان‌طور که در نمودار ۲ نشان داده شده است، تزریق درون صفاقی نانو ذرات اکسید روی در دوزهای مختلف ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم به موش‌های گروه تجربی هیچ تفاوت معنی‌داری را در تعداد لوله‌های اپیدیمی در مقایسه با گروه کنترل و شم ایجاد نکردند. موش‌هایی که تحت تیمار با دوز ۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم نانو ذرات اکسید روی قرار گرفته بودند، کاهش معنی‌داری را در تعداد سلول‌های اسپرم داخل لوله‌های اپیدیمی در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند. اما دوزهای بالاتر (۵۰۰ و ۷۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) هیچ گونه تغییرات قابل توجهی را در تعداد سلول‌های اسپرم در مقایسه با گروه‌های کنترل و شم نشان ندادند (نمودار ۳).

تغییرات بافتی در بافت اپیدیم گروه کنترل (A)، شم (B) و سه گروه تجربی ۱، ۲ و ۳ در شکل ۲ قابل مشاهده است (A, B, C, D, E). با توجه به شکل ۲ (C)، بیشترین تأثیر نانو ذره اکسید روی در دوز ۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم مشاهده شد، زیرا همان‌طور که در شکل ۲ (C) نشان داده شده است، سلول‌های دژنره شده در لوله‌های اپیدیم موش‌های تیمار شده با نانو ذرات اکسید روی در این دوز قابل مشاهده است.

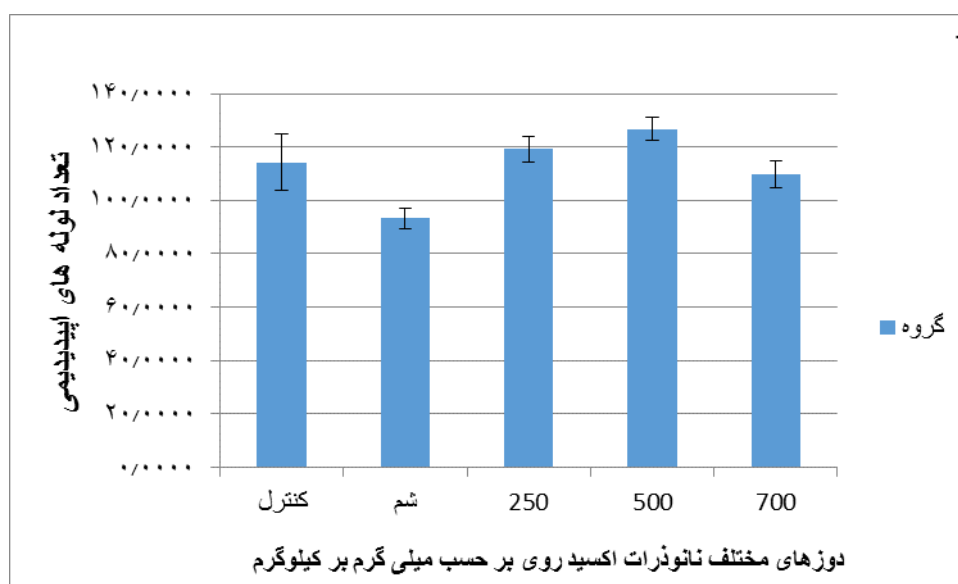
لیتر آب مقطر دریافت کردند. تمامی تیمارها به صورت تزریق درون صفاقی انجام شد. حجم تیمارها ۱ میلی لیتر بود. یک هفته بعد از تزریق، موش‌ها توسط دی اتیل اتر بی هوش شدند و بعد از کالبدشکافی، اپیدیم آنها برداشته شد. پس از شتشو در سرم فیزیولوژیک، در محلول بوئن جهت تثبیت قرار داده شدند. پس از انجام مراحل مختلف تثبیت، آگیری و قالبگیری جهت تهیه برش‌های بافتی، بلوک‌ها توسط میکروتوم برش گیری و به روش هماتوکسیلین - ائوزین رنگ آمیزی شدند و در نهایت تحت بررسی‌های هیستوپاتولوژی قرار گرفتند. تغییرات هیستوپاتولوژیک برای پارامترهای مختلفی در بافت اپیدیم نظیر تعداد سلول‌های اسپرم و سلول‌های دژنره شده در لوله‌های اسپرم اپیدیمی، قطر لوله‌های اسپرم اپیدیمی و تعداد لوله‌های اسپرم اپیدیمی مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS (نسخه ۲۱) و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی تحلیل آماری شدند. $P < 0.05$ ملاک استنتاج آماری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

یافته‌های حاصل از بررسی اثر دوزهای مختلف نانو ذرات اکسید روی (۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) در موش‌های گروه تجربی نشان داد که دریافت این نانوذره



نمودار ۱. اثر دوزهای مختلف (۲۵۰، ۵۰۰، ۷۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) نانو ذرات اکسید روی بر روی قطر لوله‌های اپیدیمی (EPD) در بافت اپیدیم موش بالغ. در مقایسه گروه‌های تجربی تیمار شده با دوزهای مختلف نانو ذرات اکسید روی با گروه کنترل هیچ اختلاف معنی داری در قطر لوله‌های اپیدیمی مشاهده نشد.



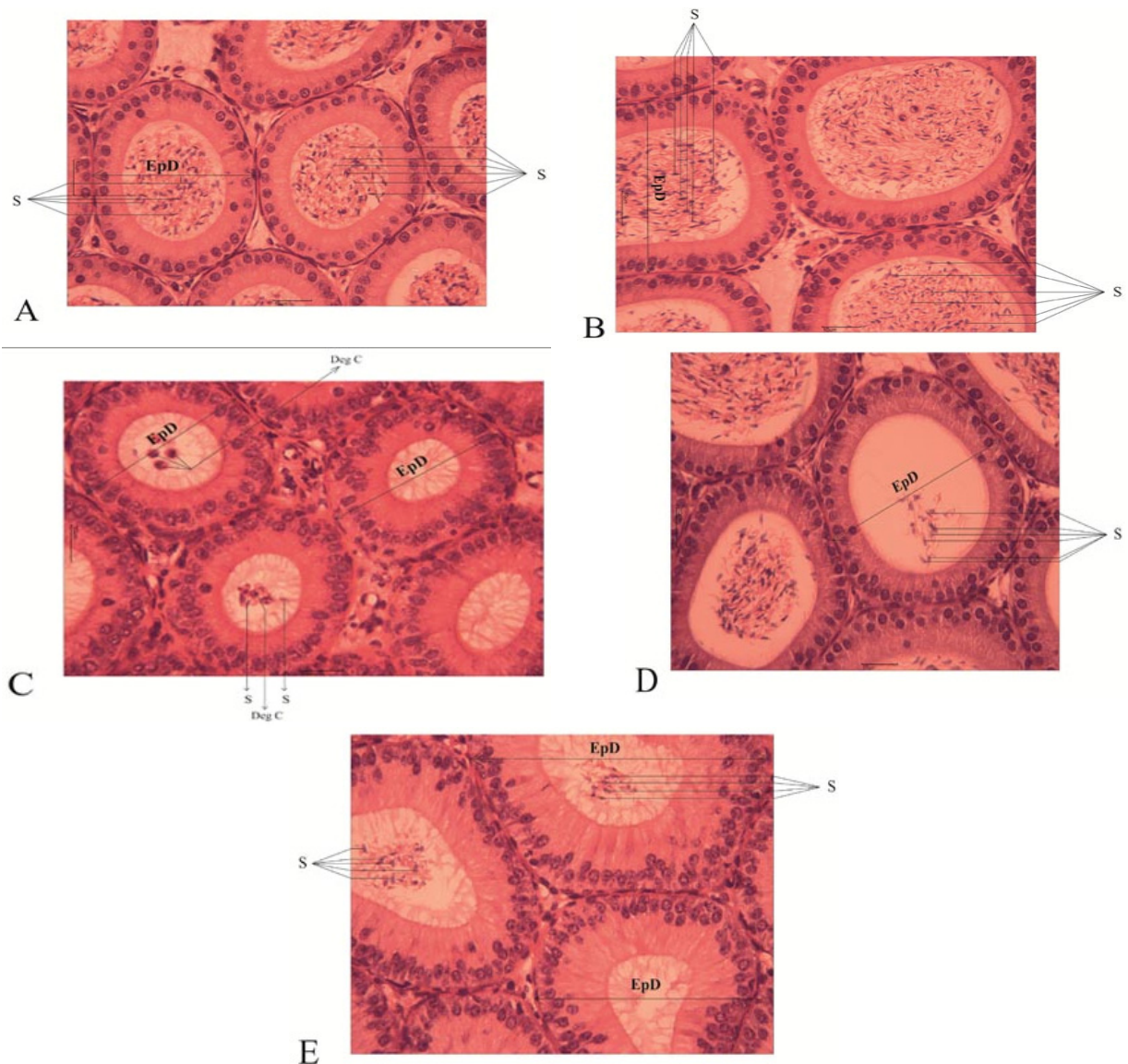
نمودار ۲. اثر سه دوز مختلف (۲۵۰، ۵۰۰، ۷۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) نانو ذرات اکسید روی بر تعداد لوله‌های اپیدیمی. تزریق درون صفاقی دوزهای مختلف نانو ذرات اکسید روی هیچ اختلاف معنی‌داری در تعداد لوله‌های اپیدیمی در مقایسه با گروه کنترل و شم ایجاد نکرد.

بحث

نانو ذرات اکسید روی را بر سیستم تولیدمثلی و باروری رت‌های نر بالغ مورد بررسی قرار دادند. نتایج تحقیق آنها نشان داد که نانو ذرات اکسید روی اثرات جانبی داروی داکسوروبیسین که شامل کاهش اسپرم اپیدیمی، دژنره شدن سلول‌های لایدیگ و دفرمه شدن سلول‌های سرتولی است، را محدود می‌کند (۲۲).

مطالعات نشان داده‌اند که روی (Zn) در مراحل مختلف تولیدمثل از جمله لقاح، لانه‌گزینی و بارداری موفق ضروری است (۲۳). همچنین روی، در جنبه‌های متعددی در دستگاه

نتایج تحقیق حاضر و مشاهدات بافت‌شناسی آن تأیید می‌کنند که دوز ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانو ذرات اکسید روی تأثیر نامطلوبی بر بافت اپیدیم دارد. البته شواهدی نیز وجود دارد که نشان می‌دهد نانو ذرات اکسید روی می‌توانند در دوزهای دیگری اثرات مثبت و غیر سمی بر روی اندام‌های تولیدمثلی داشته باشند. به عنوان مثال، در مطالعه‌ای که بادکوبه و همکارانش در سال ۲۰۱۳ انجام دادند، اثر محافظتی



شکل ۲. تصویر میکروسکوپ نوری از مقطع عرضی بافت اپیدیم موش بالغ در گروه‌های کنترل (A)، شم (B) و سه گروه تجربی (C, D, E) که به ترتیب دوزهای ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۰۰ میلی گرم / کیلوگرم نانو ذرات اکسید روی دریافت کرده بودند (رنگ آمیزی به روش H&E، بزرگنمایی میکروسکوپی ۴۰۰×). هیچ تفاوت معنی‌داری در قطر لوله‌های اسپرم اپیدیم (EPD) در گروه‌های تجربی C, D, E در مقایسه با گروه شم (B) و گروه کنترل مشاهده نشد. تعداد سلول‌های اسپرم داخل لوله‌های اپیدیمی (S) در گروه تیمار شده با دوز ۲۵۰ میلی گرم / کیلوگرم نانو اکسید روی (گروه تجربی C) در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافته بود ($p < 0.05$). درون صفاقی نانو اکسید روی در دوز ۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم سبب ایجاد سلول‌های دژنره شده (Deg C) در لوله‌های اپیدیمی در موش‌ها شد.

با مکانیسم مهار آنزیم‌های تخریب کننده جلوگیری می‌کند (۲۶). آنزیم‌های حیاتی که در بافت‌هایی که به سرعت در حال رشد هستند، همچون گنادها و بافت‌های درگیر در روند بازسازی که در سنتز پروتئین و اسید نوکلئیک‌ها دخیلند، متالوآنزیم‌های روی هستند (۲۷). طبق نتایج به دست آمده از مطالعه فعلی، نانوذرات اکسید روی در دوز ۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم سبب دژنره شدن سلول‌ها در لوله‌های اپیدیمی و کاهش معنی‌داری در تعداد اسپرم‌ها شد که همخوان با نتایج

تولید مثل جنسی نیز نقش دارد (۲۴). فیوز و همکارانش در سال ۱۹۹۹ نشان دادند که بین میزان غلظت روی و تستوسترون پلازما ارتباط معنی‌داری وجود دارد و روی برای عملکرد طبیعی اسپرم ضروری است (۲۵). سایر مطالعات نشان می‌دهند کمبود روی سبب آتروفی و تحلیل رفتن لوله‌های اسپرم ساز شده و باعث اختلال اسپرماتوژنز در رت‌ها می‌شود (۲۳). به علاوه، روی قادر به تثبیت ساختار پروتئین‌ها، حفظ یکپارچگی اندامک‌های داخل سلولی است و از تخریب DNA

استفاده از فرآورده‌های محتوی نانوذرات اکسید روی یا حتی کارگرانی که به سبب حرفه خود در معرض این نانوذره قرار دارند، از برخورد زیاد با این نانوذره، حتی‌المقدور پرهیز کنند.

تشکر و قدردانی

از همکاری دلسوزانه اساتید محترم گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، جهت همکاری در اجرای این تحقیق بسیار قدردانی می‌شود. همچنین از کارکنان محترم مجتمع آزمایشگاهی تحقیقاتی زکریای رازی واقع در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران و کارشناسان محترم این مجتمع، به دلیل همکاری‌ها و حمایت‌های فراوانشان در ارائه دستگاه‌ها، وسایل و امکانات آزمایشگاهی جهت به انجام رساندن این پروژه تحقیقاتی صمیمانه تشکر و قدردانی می‌کنیم.

مطالعات دیگران در بررسی سایر نانوذرات بر روی سلول‌های جنسی بود، به طوری که Collodel و همکارانش نیز در سال ۲۰۱۳ نشان دادند برخی نانوذرات مثل نانوذرات طلا و نقره دارای اثرات منفی بر روی سلول‌های جنسی به ویژه اسپرماتوسیت‌ها در رت‌ها هستند (۲۸). اما در دوزهای بالا در این مطالعه تأثیر نانو ذرات اکسید روی بر بافت اپیدیدیم به عنوان یکی از اندام‌های تولیدمثلی نری معنی‌دار نبود. با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعه فعلی، می‌توان نتیجه گرفت که مشابه با نانوذرات طلا و نقره که سبب بروز تأثیر منفی و نامطلوبی روی سلول‌های زاینده نری به ویژه سلول‌های اسپرماتوسیت در رت می‌شوند، نانوذرات اکسید روی نیز در دوز ۲۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم باعث کاهش معنی‌داری در تعداد سلول‌های اسپرم و بروز سلول‌های دژنره شده در لوله‌های اپیدیدیمی می‌شود. اثرات مضر این نانوذره در دوز ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بر بافت اپیدیدیم، لزوم احتیاط در مصرف این ماده مشخص می‌کند. بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه و احتمال ایجاد اثرات نامطلوب این نانوذره بر سیستم تولیدمثلی، پیشنهاد می‌شود افراد از

REFERENCES

1. Aaseth J, Olsen A, Halse J, Hovig T. Argyria-tissue deposition of silver as selenide. *Scand J Clin Lab Invest* 1981; 41: 247-51.
2. Zhang L, Gu F, Chan J, Wang A, Langer R, Farokhzad O. Nanoparticles in medicine: Therapeutic applications and developments. *J Clin Pharmacol Ther* 2007; 83: 761-69.
3. Das SK, Das AR, Guha AK. Gold nanoparticles: Microbial synthesis and application in water hygiene management. *J Langmuir* 2009; 25: 8192-99.
4. Jani P, Halberd GW, Langridge J, Florence AT. Nanoparticle uptake by the gastrointestinal mucosa: quantitation and particle dependency *J Pharm Pharmacol* 1990; 42: 821-26.
5. McAuliffe ME, Perry MG, Are nanoparticles potential male reproductive toxicant? A literature review. *J Nanotoxicol* 2007; 1: 204-10.
6. Yousefi Babadi V, Najafi L, Najafi A, Gholami H, BeigiZarji ME, Golzadeh J, et al. Evaluation of iron oxide nanoparticles effects on tissue and enzymes of liver in rats. *J Pharma Biomed Sci* 2012; 23: 1-5.
7. Dawei A, Zhisheng W, Anguo Z, Protective effects of Nano-ZnO on the primary culture mice intestinal epithelial cells in in vitro against oxidative injury. *W J Agri Sci* 2010; 6:149-53.
8. Nazem H, Arefian Z. Effect of ZnO NPs on tumor marker hormones in male rats. *Biomedical Research* 2015; 26: 82-88.
9. Delavari M, Dalimi A, Ghaffarifar F, Sadraei J. In Vitro Study on Cytotoxic Effects of ZnO Nanoparticles on Promastigote and Amastigote Forms of *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) Iran *J Parasitol* 2014; 9(1): 6-13.
10. Yamashita K, Yoshioka Y. Safety assessment of nanomaterials in reproductive developmental filed. *J Yakugaku Zasshi (Japan)* 2012; 132:331-35.
11. Taylor U, Barchanski A, Garrels W. Toxicity of Gold Nanoparticles on Somatic and Reproductive Cells *Adv Exp Med Biol* 2012; 733:125-33.
12. Mahmudi M, Simchi A, Imani M. A new approach for the in vitro identification of the cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *J Colloids Surf B* 2010; 75: 300-309.
13. Gopinath P, Gogoi SK, Chattopadhyay A, Gosh SS. Implications of silver nanoparticle induced cell apoptosis for invitro gene therapy. *J Nano* 2008; 19: 075-104.

14. Lan Z, Yang WX. Nanoparticles and spermatogenesis: How do nanoparticles affect spermatogenesis and penetrate the blood-testis barrier. *J Nanomedicine* 2012; 7: 579-96.
15. Nel A, Xia T, Madler L, Li N. Toxic potential of materials at the nano level. *J Science* 2006; 311: 622-27.
16. Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager JJ, Hofman MC. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germ line stem cells. *J Toxicol Sci* 2005; 88: 412-19.
17. Yoshida S, Hiyoshi K, Ichinose T. Effect of nanoparticles on the male reproductive system of mice. *Int J Androl* 2009; 32: 337-42.
18. Bentley GE, Ubuka T, McGuire NL. Gonadotropin-inhibitory hormone and its receptor in the avian reproductive system. *J Gen Comp Endocrinol* 2008; 156: 34-43.
19. O'Hara L, Welsh M, Saunders PTK, Smith LB. Androgen receptor expression in the caput epididymal epithelium is essential for development of the initial segment and epididymal spermatozoa transit. *J Endocrinology* 2001; 152: 718-29.
20. Flesch FM, Gadella BM. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *J Biochimica Et Biophysica Acta* 2000; 3:197-35.
21. Gatti JL, Castella S, Dacheux F, Ecroyd H, Métayer S, Thimon V, et al. Post-testicular sperm environment and fertility. *Anim Reprod Sci* 2004; 83:321-39.
22. Badkoobeh P, Parivar K, Kalantar SM, Salabat A, Hosseini SD. Protective effect of nano-zinc oxide on reproductive system and fertility of adult male Wistar rats following doxorubicin treatment. *Arak Medical University Journal (AMUJ)* 2013; 6: 1-9.
23. Hammadeh ME, Alixides Filippou A, Hamad MF. Reactive oxygen species and antioxidant in seminal plasma and their impact on male fertility. *Int J Fertil Steril* 2009; 3: 87-92.
24. Ebisch I, Thomas C, Peters W, Braat D, Steegers-Theunissen R, The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. *Human Reprod Update* 2007; 13:163-74.
25. Fuse H, Kazama T, Ohta S, Fujiuchi Y. Relationship between zinc concentrations in seminal plasma and various sperm parameters. *Int Urol Nephrol* 1999; 31:401-408.
26. Bedwal RS, Bahuguna A, Copper and selenium in reproduction., *J Experientia* 1994; 50: 620-640.
27. Prasad AS, Oberleas D. Ribonuclease and deoxyribonuclease activities in zinc deficient tissues *J Lab Clin Med* 1973; 82: 461-66.
28. Collodel G, Terzuoli G, Mazzi L, Pascarelli NA, Renieri T, Moretti E. In Vitro Effect of Gold or Silver Nanoparticles on Meiotic and Postmeiotic Fractions of Rat Germinal Cells. *The Open Andrology J* 2013; 5: 10-15.