DOI: 10.22092/vj.2020.342325.1703
شماره ۱۳۱ تابستان ۱۴۰۰
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی تغییرات پلاسمایی هورمون‌های LH،FSH ، تستوسترون و کورتیکوسترون به‌دنبال تزریق داخل بیضه‌ای نانوذرات اکسید روی در رت

• **اقبال جهانگیری اصل**
گروه مامایی و طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران
• **علی سلیمان زاده(نویسنده مسئول)**
گروه مامایی و طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران
• **شهرام جوادی**
گروه بیماریهای درونی و کلینیکال پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران
• **سیامک عصری رضایی**
گروه بیماریهای درونی و کلینیکال پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸-۱۲-۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹-۰۱-۲۰
Email: a.soleimanzadeh@urmia.ac.ir

چکیده

این مطالعه به منظور بررسی تغییرات هورمونی (LH، FSH و تستوسترون) پس از تزریق داخل بیضه ای نانواکسیدروی در رت‌ها مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه ۶۰ سر رت نر بالغ نژاد ویستار به طور تصادفی به ۶ گروه تقسیم شدند: گروه کنترل (گلوکونات روی /mg ml ۲۵)، گروه شم (آب مقطر به عنوان حلال) و گروه‌های نانواکسیدروی (mg/ml ۵،۱۰،۲۵). رت‌ها در روز ۳۰ (۵ سر رت از هر گروه) و روز ۶۰ (بقیه رت‌ها) جهت اندازه‌گیری هورمون‌ها، خون‌گیری انجام شد. نمونه‌های سرم تا زمان اندازه‌گیری هورمون‌ها در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. غلظت سرمی LH در گروه نانوذرات روی به طور معنی‌داری بالاتر از گروه‌های اکسید روی و آب مقطر بود (P<۰/۰۵). از طرف دیگر، غلظت سرم تستوسترون در گروه نانوذرات روی به طور قابل توجهی پایین‌تر از گروه‌های اکسیدروی و آب مقطر بود (P<۰/۰۵). تغییرات هورمون‌های FSH و کورتیزول در بین گروه‌های مختلف رت‌ها معنی‌دار نبود. افزایش قابل توجه در غلظت LH سرم را می‌توان با افزایش میزان ترشح LHRH به دلیل بازخورد منفی هیپوتالاموس در پاسخ به کاهش غلظت تستوسترون دانست. بر اساس نتایج این مطالعه نشان داده شد که تزریق داخل بیضه‌ای نانوذرات اکسید روی در رت، ممکن است با القای تغییرات هورمونی ، عملکرد سیستم تولید مثل و میزان باروری را تحت تأثیر قرار دهد، که می‌تواند برای عقیم سازی شیمیایی پیشنهاد شود.

کلمات کلیدی: نانوذرات اکسید روی، تزریق LH، FSH، تستوسترون، کورتیزول

Veterinary Researches & Biological Products No 131 pp: 94-103

The effect of intratesticular injection of Zinc Oxide Nanoparticles on plasma concentrations of LH, FSH, Testosterone and Corticosterone in Rat

By: Jahangiri Asl, E., Department of Theirogenology, *Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Iran. Soleimanzadeh, A., (Corresponding Author) Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Iran. Javadi, Sh., Department of Internal Medicine and Clinical Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Iran and Asri Rezaei, S., Department of Internal Medicine and Clinical Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Iran.*

Received: 2020-03-15 **Accepted: 2020-04-08**

Email: a.soleimanzadeh@urmia.ac.ir

This study was designed to evaluate the hormonal (LH, FSH, and Testosterone) changes after the intratesticular injection of Zinc Oxide Nanoparticles in rats. In this study 60 adult male Wistar rats were randomly divided into 6 groups: control group (25 mg/ml zinc gluconate), sham group (distilled water as solvent) and Zinc Oxide Nanoparticles groups (5,10, 25 mg/ml). Rats were sampled on day 30 (5 rats from each group) and day 60 (other rats) to measure hormones. Serum samples were stored at -20 ° C until hormone measurement. Plasma serum concentrations of LH in the Zinc Oxide Nanoparticle group were significantly higher than zinc oxide and distilled water groups ($p<0.05$). On the other hand, serum plasma concentrations of testosterone in the zinc nanoparticle group were significantly lower than zinc oxide and distilled water groups ($p<0.05$). There were no significant differences in serum plasma concentrations of FSH and corticosterone between different groups of rats. A significant increase in serum LH concentration could be explained by the increase of LHRH release due to negative feedback of the hypothalamus in response to the reduction of testosterone concentration. In conclusion, our results showed that the intratesticular injection of zinc oxide nanoparticles in rats may be affected the reproductive system performance and fertility rate by inducing hormonal changes, which can be suggested for chemical sterilization.

Key words: Zinc Oxide nanoparticles, LH, FSH, Testosterone, Corticosterone.

مقدمه

امروزه استفاده از نانوذرات در علوم بیولوژیک توجه فراوانی را به خود جلب کرده و کاربردهای فراوانی از جمله: اکتشاف عوامل پاتوژن و پروتئین، مهندسی بافت، نابودسازی تومورها و موارد بسیار دیگر برای این مواد ذکر شده است (۲۲). تکنولوژی‌های بر پایه‌ی نانوذرات، بر مصرف کمتر مواد با خواص بیشتر پایه‌ریزی شده‌اند. ظهور نانوتکنولوژی، منجر به توسعه و گسترش مواد ضدمیکروبی با ویژگی‌های جدید شده است (۸). مصرف نانوذرات در بسته‌بندی مواد غذایی برای کنترل محیط اطراف غذا، برای تازه نگه داشتن و کنترل رطوبت و اثرات ضدمیکروبی در سال‌های اخیر افزایش داشته است (۲۲). از سوی دیگر، توسعه‌ی روزافزون نانوتکنولوژی در بسیاری از زمینه‌های صنعتی و پزشکی (نظیر بیوتکنولوژی، الکترونیک، تولید برخی از داروهای پزشکی توسط تکنولوژی نانو و استفاده از نانوحامل‌ها برای عرضه‌ی داروهای خاص به سلول‌های سرطانی، بیوسنسورها و...) سبب گردیده است که نگاه خاصی بر عوارض مورد استفاده از ترکیبات نانو صورت گیرد (۲۲).

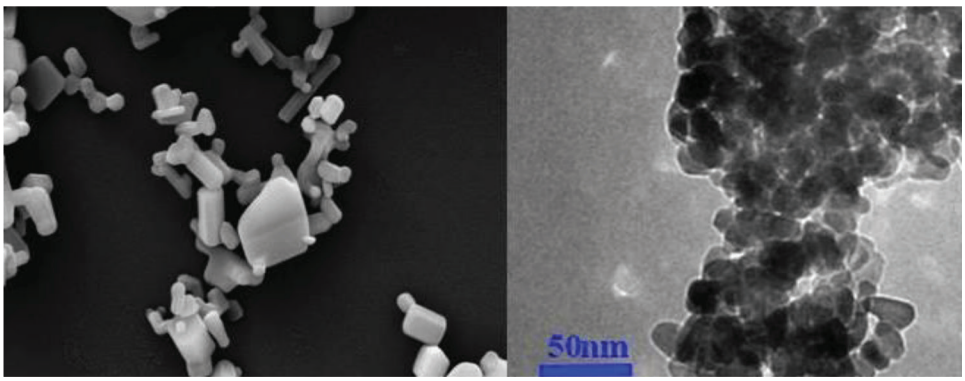
روی بعد از آهن، کمیاب‌ترین عنصر بدن است و بعد از آهن، آلومینیوم و مس، چهارمین فلز پرکاربرد در جهان است. نانوذرات روی به علت خواص ویژه‌ای نظیر شفافیت، خاصیت ایزوالکتریک بالا و سازگاری با بافت‌های زنده، کاربرد وسیعی را در صنعت و پزشکی به خود اختصاص داده است. همچنین نشان داده شده است که نانو فیبرهای اکسیدروی می‌تواند در بهبود زخم‌ها مورد استفاده قرار بگیرد (۳). اکسید روی در ابعاد نانوذره، خاصیت ضدمیکروبی نشان داده و پتانسیل کاربردی در نگهداری غذایی دارد (۸). هم‌اکنون اکسید روی در لیست مواد عمومی سالم شناخته شده و توسط سازمان‌های غذا و دارو ثبت شده و از آن به عنوان یکی از ابزارهای نگهداری غذایی یاد می‌شود. نانوذرات اکسید روی در ساختار مواد پلیمری جهت فعالیت ضدمیکروبی در مواد بسته‌بندی شرکت داده شده‌اند (۸). از آن‌جایی که جذب عنصر روی در روده می‌تواند تحت تأثیر عوامل مختلف از جمله وجود عناصر آنتاگونیست و سایر ترکیبات شیمیایی دیگر باشد، ضرورت استفاده از ترکیبات حاوی و عرضه‌کننده‌ی روی، نظیر نانوذرات اکسید روی، مورد توجه بسیاری از

محققین قرار گرفته است (۶). همچنین مشخص شده است که استفاده از ppm ۸۰ از نانواکسیدروی بصورت خوراکی در قوچ‌های نژاد عربی سبب افزایش کیفیت پارامترهای اسپرم در خارج از فصل تولیدمثلی گردید (۱). روش تزریق داخل بیضه‌ای مواد شیمیایی عقیم‌ساز توسط وانگ در آژانس اختراعات ایالات متحده ثبت شده است (۱۳). در تحقیقات جدیدی، ضمن بررسی اثرات نانوذرات بر فاکتورهای جنسی، به نقش احتمالی آن‌ها در زمینه‌ی عقیم‌سازی شیمیایی هم تاحدودی توجه شده است (۱۳). از گذشته تاکنون تلاش‌های زیادی برای ایجاد عقیمی در جنس نر به روش شیمیایی صورت گرفته است و ترکیبات فارماکولوژیک شیمیایی گوناگونی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. تمامی استروئیدهای فعالی که خاصیت آنتی گنادوتروپینی دارند، می‌توانند با ممانعت از ترشح گنادوتروپین بویژه LH، اسپرماتوژنز را متوقف نمایند. با این وجود تأثیر آنتی‌آندروژن‌های خالصی نظیر فلوتامید (Flutamide) و سیپروترون (Cyproterone) در داخل بیضه زیاد نبوده و اکثر آن‌ها سبب توقف موقتی در اسپرماتوژنز می‌گردند. علاوه بر این، نیاز به غلظت بالای این مواد در داخل بیضه، جهت متوقف‌سازی اسپرماتوژنز، استفاده‌ی بالینی از آنتی‌گنادوتروپین‌ها را محدود می‌نماید. برخی از ترکیبات سایکوتروپ و ضدفشارخون نیز اثراتی ممانعتی روی اسپرماتوژنز از طریق کاهش ترشح گنادوتروپین‌ها دارند. کلشی‌سین و ترکیبات آلکیله‌کننده با ممانعت از تقسیم میتوزی سبب آسیب سلول‌های لیدیگ می‌گردند (۱۷). در بررسی اثرات تیمار داخل بیضه‌ای گلوکونات روی که بر ابعاد بیضه، بافت‌شناسی، چگالی صوتی، تولید اسپرم و ترشح تستوسترون در خرس‌های سیاه امریکایی صورت گرفت، نتیجه گرفتند که تیمار داخل بیضه‌ای گلوکونات روی باعث تغییرات ابعادی، کاهش ترشح تستوسترون وابسته به GnRH، کاهش بقایای تستوسترون و توقف تولید اسپرم می‌شود. آن‌ها همچنین شاهد تغییرات دژنراتیو بودند که شواهد آن توسط آزمایشات سونوگرافی و بافت‌شناسی مورد تأیید قرار گرفت (۶). در مطالعه‌ای دیگر اثر تزریق تک دوز داخل بیضه‌ای محلول با پایه‌ی گلوکونات روی را بر روی سگ‌ها نر انجام شده است. آن‌ها نشان دادند که در تمام سگ‌ها مقادیر فاکتورهای هماتولوژی و بیوشیمی بالینی در مقادیر طبیعی ثابت ماند؛ اگرچه غلظت پلاسمایی تستوسترون در سرتاسر دوره کاهش یافت، اما میل جنسی به صورت مشخص متأثر نشد (۲۱). با این وجود که مواد بسیاری در این زمینه استفاده شده است و اکثر ترکیبات غیر استروئیدی متوقف کننده‌ی اسپرماتوژنز می‌باشند، بدلیل سمی بودن این مواد، برای ایجاد عقیمی دائمی مناسب تشخیص داده نشده‌اند. در رابطه با عقیم‌سازی شیمیایی و تزریق داخل بیضه‌ای، گلوکونات روی سبب مرگ سلول‌های اسپرم، فیبروز دایمی و برگشت ناپذیر توبول‌های سمینی‌فر، شبکه‌ی بیضه‌ای، و اپیدیدیم و در نهایت عقیم‌سازی دائمی گردیده است؛ ولی نگرانی‌های زیادی در خصوص سمیت مقادیر بالای روی در بدن وجود دارد (۲۱). از آنجا که استفاده از نانو ذرات در دوزهای کمتری می‌تواند مورد استفاده قرار بگیرد تا بتواند اثرات سمیت کمتری بر روی پارامترهای مختلف بدن از جمله هورمون‌ها داشته باشد، در این مطالعه، تأثیر تزریق داخل بیضه‌ای نانوذرات روی بر هورمون‌های LH، FSH، تستوسترون و کورتیکوسترون در رت‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

گروه‌بندی و تغذیه حیوانات

کلیه‌ی مراحل آزمایش و تیمار حیوانات در محل پرورش و نگهداری از حیوانات آزمایشگاهی بخش مامایی و بیماری‌های تولید مثل دام، بیمارستان دامپزشکی دانشگاه ارومیه انجام گرفت. در این مطالعه، رت‌ها در شرایط دمای حرارت ۲۳-۲۰ درجه سانتی‌گراد، چرخه روشنایی - تاریکی ۱۲ ساعت و دسترسی آزاد به آب و غذای استاندارد تغذیه شده و در قفس پرورشی (پلی‌استری) با تعداد ۵ سر رت در هر قفس نگهداری شدند. در این بررسی تعداد ۶۰ سر رت نر بالغ نژاد ویستار با سن تقریبی ۳-۲ ماه تهیه شده و به‌طور تصادفی به ۶ گروه



شکل۱- تصویر میکروسکوپ الکترونی (SEM) نانو ذرات اکسید روی

شامل: گروه ۱- گروه کنترل (بدون دریافت هیچ دارو)؛ گروه ۲- گروه شم (تزریق آب مقطر استریل)؛ گروه ۳- دریافت کننده نانواکسیدروی (۵ mg/ml)؛ گروه ۴- دریافت کننده نانواکسیدروی (۱۰ mg/ml)؛ گروه ۵- دریافت کننده نانواکسیدروی (۲۵ mg/ml)، تقسیم شدند. نانوذرات اکسید روی از شرکت سیگما (Zincoxide Nanoparticles (ZnO, ۱۰۰+٪۹۹ us (۳۵۵۵ nm, CAS #(stock# ۱۳۱۴-۱۳-۲) با اندازه‌ی ۱۰۰ nm و خلوص ٪۹۹ تهیه شده (جدول ۱) و به غلظت‌های ۵،۱۰،۲۵ mg/ml توسط آب مقطر استریل رسانده شد و پس از استریلیزاسیون با اتوکلاو، روزانه ابتدا به مدت ۳ دقیقه با دستگاه شیکر (ورتکس) LABINCO©L۴۶ ویره شده و بعد به‌وسیله‌ی امواج اولتراسوند دستگاه اولتراسونیک هموژنایزر مدل ۴۰۰R FAPAN (شکل ۱) با طول موج ۷۰ db به مدت ۲۰ دقیقه اولتراسونیکیت گشته و سوسپانسیون تازه جهت تزریق تهیه شد.

تزریق داخل‌بیضه‌ای

پس از طی زمان ۱۰ روزه تطابق محیطی، رت‌ها در ابتدا توسط کوکتل کتامین-زایلازین با مقدار ۱۵۰ mg/kgBW کتامین و ۱۵ mg/kgBW زایلازین، به‌صورت داخل صفاقی آرام‌بخشی شدند. سپس بیضه‌ها با اسپری اسکراب ضدعفونی شده، بسته به اندازه‌ی بیضه‌ها (با کولیس (Calipers) عرض بیضه‌ها بطور کامل اندازه‌گیری شد و بر اساس سایز عرض بیضه‌ها تزریق داخل بیضه‌ای در آن‌ها صورت گرفت) (جدول ۲) نانوذرات روی (۱۹)، گلوکونات روی و آب مقطر استریل به روش تزریق داخل بیضه‌ای (۲۳) با استفاده از سرنگ انسولینی به روش بسته به گروه‌های مذکور تجویز شد.

نمونه‌برداری

در روز ۳۰ و ۶۰ پس از تزریق، از هر گروه درمانی از ۵ سر رت، نمونه‌های خون اخذ گردید. نمونه‌های خون در همان روز توسط دستگاه سانتریفیوژ شرکت ©FAR TEST، سانتریفیوژ گشته (۲۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه) و سرم آن‌ها پس از جداسازی به داخل میکروتیوب انتقال و در فریزر در دمای ۲۴- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

آزمایشات بیوشیمیایی سرم

اندازه‌گیری میزان FSH و LH سرم

میزان هورمون FSH توسط کیت ۵۴۹/۷۸-WHO/Sigma Asso-RFGC و میزان هورمون LH سرم توسط کیت WHO/Sigma Asso-RLGC ۵۵۲/۸۰- با روش رادیوایمنواسی اندازه‌گیری شدند.

اندازه‌گیری میزان تستوسترون سرم

مقادیر هورمون تستوسترون با روش رادیوایمنومتری با استفاده از کیت اختصاصی (۹۸/۷۶۸-WHO/Sigma Asso-RTGC) مورد ارزیابی قرار گرفت و با گروه کنترل شم و کنترل مقایسه شد.

اندازه‌گیری میزان کورتیکوسترون سرم

برای سنجش مقادیر سرمی کورتیکوسترون، از کیت الایزای کورتیزول (Zellbio Co., Germany) استفاده گردید. مقدار کورتیکوسترون با اندازه‌گیری جذب نوری محلول به دست آمده در طول موج ۴۱۲ نانومتر تعیین می‌گردد.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌هاي حاصل از سنجش شاخص‌های تحت بررسی، توسط نرم افزار IBM SPSS Statistics ورژن ۲۳ و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA) و آزمون توکی تجزیه و تحلیل شدند. سطح معني‌داری، P<۰/۰۵ در نظر گرفته

جدول ۱- مشخصات فیزیکی نانوذرات اکسید روی (ارائه شده توسط کارخانه تولید کننده).

Chemical formula	Color	Morphology	(APSa (nm	(g/SSAb (m۲	(TD c (g/cm۳	(٪) LId	(٪) MCe	(٪) Purityf
ZnO	White	Powder	۱۰۰-۸۰	۴۱	۵,۶	<۳	<۲	۹۹,۹۸۳

.a Average particle size measured by high resolution SEM with charge compensation system

.b Specific surface area measured by Brunauer, Emmett and Teler (BET) technique

.c True density

.d Loss on ignition

.e Moisture content

.f Purity level measured by inductive coupled plasma-mass spectroscopy (ICP-MS) technique

جدول ۲- نسبت عرض بیضه ها و میزان تزریق دارو بصورت داخل بیضه ای.

عرض بیضه (mm)	حجم دوز تزریق شده (ml)
۱۲-۱۰	۰/۲
۱۵-۱۳	۰/۳
۱۸-۱۶	۰/۵
۲۱-۱۹	۰/۷
۲۴-۲۲	۰/۸
۲۷-۲۵	۱/۰

جدول ۳- مقایسه اثر نانواکسیدروی و گلوکونات روی در زمان و دوزهای متفاوت بر مقدار هورمون LH در رت (Mean±SD)

گروه	زمان	
	روز ۳۰	روز ۶۰
کنترل	۱/۲۱ ± ۰/۴۸ a	۱/۵۳ ± ۰/۳۵ a
شم (نرمال سالین)	۱/۱۵ ± ۰/۲۳ a	۱/۲۷ ± ۰/۲۳ a
نانواکسیدروی ۵ mg/ml	۱/۶۰ ± ۰/۲۰ a	۱/۷۴ ± ۰/۱۹ a
نانواکسیدروی ۱۰ mg/ml	۲/۶۴ ± ۰/۲۷ b	۲/۷۷ ± ۰/۲۵ b
نانواکسیدروی ۲۵ mg/ml	۲/۵۰ ± ۰/۳۶ b	۲/۵۷ ± ۰/۳۰ b
گلوکونات روی ۲۵ mg/ml	۲/۴۸ ± ۰/۳۲ b	۲/۴۱ ± ۰/۲۷ b

-حروف انگلیسی متفاوت در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار در حد (P<۰/۰۵) می‌باشد.

جدول ۴- مقایسه اثر نانواکسیدروی و گلوکونات روی در زمان و دوزهای متفاوت بر مقدار هورمون FSH در رت (Mean±SD).

گروه	زمان	
	روز ۳۰	روز ۶۰
کنترل	۲/۱۵ ± ۰/۴۳ a	۲/۳۶ ± ۰/۳۹ a
شم (نرمال سالین)	۲/۳۲ ± ۰/۳۵ a	۲/۲۷ ± ۰/۴۲ a
نانواکسیدروی ۵ mg/ml	۲/۱۹ ± ۰/۴۸ a	۲/۲۴ ± ۰/۵۱ a
نانواکسیدروی ۱۰ mg/ml	۲/۴۰ ± ۰/۱۹ a	۲/۴۹ ± ۰/۳۶ a
نانواکسیدروی ۲۵ mg/ml	۲/۵۶ ± ۰/۳۰ a	۲/۵۳ ± ۰/۲۹ a
گلوکونات روی ۲۵ mg/ml	۳/۷۴ ± ۰/۵۶ b	۳/۵۱ ± ۰/۴۹ b

-حروف انگلیسی متفاوت در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار در حد (P<۰/۰۵) می‌باشد.

شد. کلیه‌ی داده های ارائه شده در جداول و نمودارها، به صورت میانگین± انحراف معیار (Mean±SD) بیان شده است.

نتایج

هورمون LH

نتایج به دست آمده از مقدار هورمون LH موجود در سرم خون، در جدول ۳ نشان داده شده است. بررسی آماری این داده‌ها، نشان داد که سطح LH سرم در گروه تیمار شده با دوز ۱۰ mg/ml نانواکسید روی در روزهای ۳۰ و ۶۰ پس از تیمار، در مقایسه با گروه کنترل و شم، به‌صورت معنی‌دار افزایش پیدا کرده است. افزایش سطح LH، در گروه تیمار شده با دوز ۲۵ mg/ml نانواکسید روی در روز ۳۰ (۰/۳۶ ± ۲/۵۰) و ۶۰ (۰/۳۰ ± ۲/۵۷) پس از تیمار نیز معنی‌دار بود. با وجود افزایش غلظت سرمی LH در گروه ۵ mg/ml نانو اکسید روی در روزهای ۳۰ و ۶۰ پس از تیمار نسبت به گروه‌های کنترل و کنترل شم، این افزایش معنی‌دار نبود. رت‌های گروه گلوکونات روی ۲۵ mg/ml نیز در روزهای ۳۰ (۰/۳۲ ± ۲/۴۸) و ۶۰ (۰/۲۷ ± ۲/۴۱) پس از تیمار، افزایش معنی‌داری($P<0/05$) را در میزان غلظت LH نسبت به دو گروه کنترل و کنترل شم نشان دادند (جدول ۳).

هورمون FSH

نتایج به دست آمده از مقدار هورمون FSH موجود در سرم خون، نشان

جدول ۵-مقایسه اثر نانواکسیدروی و گلوکونات روی در زمان و دوزهای متفاوت بر مقدار هورمون تستوسترون در رت (Mean±SD).

گروه	زمان	
	روز ۳۰	روز ۶۰
کنترل	۳/۱۹ ± ۰/۲۵ a	۳/۱۲ ± ۰/۴۱ a
شم (نرمال سالین)	۳/۰۱ ± ۰/۴۸ a	۳/۰۸ ± ۰/۲۴ a
نانواکسیدروی ۵ mg/ml	۲/۸۹ ± ۰/۵۷ a	۲/۸۵ ± ۰/۲۴ a
نانواکسیدروی ۱۰ mg/ml	۲/۷۱ ± ۰/۴۰ a	۲/۶۴ ± ۰/۶۹ a
نانواکسیدروی ۲۵ mg/ml	۱/۷۷ ± ۰/۲۹ b	۱/۶۳ ± ۰/۳۵ b
گلوکونات روی ۲۵ mg/ml	۲/۱۶ ± ۰/۲۷ b	۲/۳۰ ± ۰/۵۶ ab

-حروف انگلیسی متفاوت در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار در حد ($P<0/05$) می‌باشد.

جدول ۶- مقایسه‌ی اثر نانواکسیدروی و گلوکونات روی در زمان و دوزهای متفاوت بر مقدار هورمون کورتیکوسترون در موش‌های صحرایی (Mean±SD).

گروه	زمان	
	روز ۳۰	روز ۶۰
کنترل	۲۳/۱۱ ± ۰/۶۸ a	۲۳/۲۶ ± ۰/۶۳ a
شم (نرمال سالین)	۲۲/۱۹ ± ۰/۲۸ a	۲۲/۲۷ ± ۰/۷۵ a
نانواکسیدروی ۵ mg/ml	۲۲/۱۶ ± ۰/۵۱ a	۲۲/۲۸ ± ۰/۴۷ a
نانواکسیدروی ۱۰ mg/ml	۲۳/۱۹ ± ۰/۳۷ a	۲۳/۲۵ ± ۰/۵۴ a
نانواکسیدروی ۲۵ mg/ml	۲۴/۳۷ ± ۰/۵۹ a	۲۴/۴۵ ± ۰/۶۵ a
گلوکونات روی ۲۵ mg/ml	۲۴/۱۸ ± ۰/۳۰ a	۲۴/۳۱ ± ۰/۵۳ a

-حروف انگلیسی متفاوت در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار در حد ($P<0/05$) می‌باشد.

داد که افزایش در سطح FSH سرم در گروه‌های تیمار شده با دوزهای ۵، ۱۰ و ۲۵ mg/ml نانواکسید روی، در مقایسه با گروه‌های کنترل و شم (نرمال سالین)، معنی‌دار نبوده است. درحالی‌که رت‌های گروه گلوکونات روی ۲۵ mg/ml، روزهای ۳۰ (۰/۵۶ ± ۳/۷۴) و ۶۰ (۰/۴۹ ± ۳/۵۱) پس از تیمار، افزایش معنی‌داری (P<۰/۰۵)، را در میزان غلظت FSH نسبت به دو گروه کنترل و کنترل شم نشان دادند (جدول ۴).

هورمون تستوسترون (T)

نتایج به دست آمده از مقدار هورمون تستوسترون موجود در سرم خون، در جدول ۵ نشان داده شده است. بررسی آماری این داده‌ها، مشخص کرد که غلظت سرمی تستوسترون، در گروه تیمار شده با دوز ۲۵ mg/ml نانواکسید روی، در روزهای ۳۰ و ۶۰ پس از تیمار، نسبت به گروه‌های کنترل (روز ۳۰: ۰/۲۵ ± ۳/۱۹ | روز ۶۰: ۰/۴۱ ± ۳/۱۲) و شم (روز ۳۰: ۰/۴۸ ± ۳/۰۱ | روز ۶۰: ۰/۲۴ ± ۳/۰۸)، کاهش معنی‌داری نشان داده است. با وجود کاهش غلظت سرمی تستوسترون در گروه‌های ۵ و ۱۰ mg/ml نانواکسید روی در روزهای ۳۰ و ۶۰ پس از تیمار نسبت به گروه‌های کنترل و کنترل شم، این کاهش معنی‌دار نبود. رت‌های گروه گلوکونات روی ۲۵ mg/ml نیز در روزهای ۳۰ و ۶۰ پس از تیمار، کاهش معنی‌داری (P<۰/۰۵) را در میزان غلظت تستوسترون سرم نسبت به دو گروه کنترل و کنترل شم نشان دادند (جدول ۵).

هورمون کورتیکوسترون

نتایج به دست آمده از مقدار هورمون کورتیکوسترون نشان داد که هیچ‌یک از دوزهای ۵ و ۱۰ و ۲۵ mg/ml نانواکسید روی در روزهای ۳۰ و ۶۰ پس از تیمار، قادر نبودند تغییر معنی‌داری در غلظت سرمی کورتیکوسترون نسبت به گروه‌های کنترل و کنترل شم ایجاد کنند. جالب آنکه میزان این هورمون در گروه گلوکونات روی ۲۵ mg/ml نیز اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۵) با گروه-های کنترل و کنترل شم نشان ندادند؛ گرچه در مقایسه با این دو گروه، مقداری افزایش یافته بود (جدول ۶).

بحث

مطالعه‌ی حاضر، اثر تزریق داخل بیضه‌ای نانوذرات اکسید روی را بر روی سطوح پلاسمایی هورمون‌های FSH، LH، تستوسترون و کورتیکوسترون در رت، مورد بررسی قرار داد. نانواکسید روی، اخیراً در مطالعات جانوری توجه بسیاری را به خود جلب کرده است. نانوذرات شکل‌های مختلفی از مواد جدید با خواص بیولوژیکی برجسته و سمیت کم دارند که به نظر می‌رسد در عبور از سدهای فیزیولوژیکی و دسترسی به بافت هدف خاص، دارای پتانسیل بسیار بالایی می‌باشند (۷). این مواد پس از تزریق، به‌سرعت در سراسر بدن منتشر می‌شوند و تا حد امکان، به تمام ارگان‌ها و بافت‌ها سرایت می‌کنند. این ذرات، همچنین به‌دلیل اندازه‌ی کوچک‌شان، نسبت سطح به حجم زیادی دارند و به‌شدت واکنش نشان می‌دهند. این امر، یکی از دلایل مهم سمیت نانوذرات است (۷). در مطالعه‌ی حاضر، بررسی آنالیز آماری در خصوص اثر نانوذرات اکسید روی بر روی غلظت سرمی هورمون LH، نشان داد که نانوذرات اکسید روی با دوزهای ۱۰ mg/ml و ۲۵، سبب افزایش معنی‌داری در غلظت هورمون LH در ۳۰ و ۶۰ روز پس از تیمار نسبت به گروه کنترل شده است. تحقیقات نشان داده‌اند که درمان با استفاده از نانوذرات اکسید روی به صورت داخل وریدی، مقدار LH اندازه‌گیری شده در روز ۷ و ۱۴ پس از تزریق را افزایش داده است برخی از مطالعات نشان می‌دهند که نانوذرات می‌توانند باعث افزایش رونویسی mRNA پروتئین تنظیم‌کننده‌ی حاد استروئیدساز بیضه شوند که این افزایش، توانایی زنده ماندن سلول‌های لیدیگ و تولید هورمون‌های استروئیدی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۰). از طرف دیگر، نانوذرات اکسید روی می‌توانند باعث افزایش محصولات نیتریک اکسید شوند. نیتریک اکسید باعث افزایش cGMP می شود. افزایش cGMP می‌تواند سبب افزایش پروتئین کیناز G (PKG) شود که سبب افزایش ترشح LHRH از هیپوتالاموس و در نهایت افزایش LH می-شود. افزایش معنی‌دار غلظت سرمی هورمون LH در دو گروه تزریق ۲۵ mg/kg و ۱۰، می‌تواند ناشی از کاهش هورمون تستوسترون باشد، به طوری که کاهش تستوسترون به صورت خودتنظیمی منفی بر هیپوتالاموس تأثیر گذاشته و میزان ترشح هورمون آزادکننده‌ی هورمون لوتئینی (LHRH) را افزایش داده و سبب افزایش تولید LH شده است (۲۰). نتایج مطالعه‌ی حیدرنژاد و همکاران (۲۰۱۷) در خصوص اثر نانوذرات اکسید روی بر روی غلظت سرمی هورمون LH، نشان داد که تجویز نانوذرات اکسید روی با دوزهای ppm ۱ و ۲/۵ به‌صورت گاواژ و تزریق داخل صفاقی، سبب افزایش معنی‌داری در غلظت هورمون‌ها در ۱۴ روز پس از تیمار نسبت به گروه کنترل شده است. نتایج این مطالعه نشان دهنده‌ی افزایش معنی‌دار غلظت این هورمون در دوز ppm ۲/۵ در روز ۷ نسبت به گروه کنترل می‌باشد (۱۲). داده‌های حاصل از این مطالعه، در خصوص اثر نانوذرات اکسید روی بر روی غلظت سرمی تستوسترون، نشان داد که نانوذرات اکسید روی با دوز mg/ml ۲۵، سبب کاهش معنی‌داری در غلظت این هورمون در روزهای ۳۰ و ۶۰ پس از تیمار نسبت به گروه کنترل شده است. سنتز تستوسترون برای تولید اسپرم و تکمیل و افزایش خصوصیات ثانویه‌ی جنسی و رفتار طبیعی جنسی الزامی است. هیپوفیز قدامی این اعمال را با ترشح LH و FSH و بطور ثانویه با آزادسازی هورمون آزادکننده‌ی گنادوتروپین (GnRH) از هیپوتالاموس تنظیم می‌کند. تستوسترون به عنوان مهم‌ترین هورمون آندروژن، در تکامل و تکثیر سلول‌های زایا و تمایز اسپرماتیدهای گرد به اسپرماتیدهای کشیده نقش اساسی ایفا می‌کند. در واقع سلامت سلول‌های زایا و توانایی آنها برای انجام تقسیمات میتوزی در لوله‌های منی‌ساز، به ترشح هورمون تستوسترون توسط سلول‌های لیدیگ وابسته می‌باشد. بنابراین اختلال در بیوسنتز تستوسترون در سلول‌های لیدیگ می‌تواند اثرات مضر روی باروری جنس نر داشته باشد (۲۴). پروتئین تنظیم‌کننده‌ی حاد استروئیدساز، در تنظیم انتقال کلسترول به غشاي داخل میتوکندري و افزایش تولید هورمون‌هاي استروئیدي نقش دارد (۲). بنابراین یکی از فرضیه‌های ممکن، این است که نانوذرات اکسید روي می‌توانند در بیان ژن StAR تاثیر داشته باشند و این امکان وجود دارد که نانوذرات اکسید روي با افزایش بیان ژن پروتئین StAR، مانع انتقال کلسترول به غشاي داخل میتوکندري شده و در نهایت از تبدیل کلسترول به پرگنولون جلوگیري کند و باعث کاهش میزان هورمون‌ها شود (۲). جدا از اثرات مرکزی پرولاکتین بر روی

غده‌ی هیپوفیز یا اثرات محیطی آن بر روی سلول‌های لیدیگ، تاثیرات منفی آن بر روی اسپرماتوژنز با القاء کاهش میزان تستوسترون اعمال می‌گردد (۱). کاهش تستوسترون، ممکن است به‌طور ثانویه در نتیجه‌ی کاتابولیسم کندتر تستوسترون و اختلال در تبدیل محیطی آن به ۵ آلفادی هیدرو تستوسترون با ایجاد مشکل در بیوسنتز ۱۷ بتااسترادیول از سلول‌های لیدیگ رخ دهد که باعث کاهش میزان تستوسترون می‌گردد (۲۵). کاهش غلظت تستوسترون، ممکن است با نارسایی‌های ایجاد شده در عملکرد سلول‌های لیدیگ به واسطه‌ی افزایش تولید رادیکال‌های آزاد نیز در ارتباط باشد. همچنین بروز استرس اکسیداتیو در بافت بیضه از آندروژنز توسط سلول‌های لیدیگ ممانعت می‌کند (۲۵). بررسی آماری داده‌های به‌دست آمده در این مطالعه، نشان داد که افزایش جزئی در سطح FSH سرم در گروه‌های تیمار شده با دوزهای ۵، ۱۰ و ۲۵ نانواکسید روی، در مقایسه با گروه‌های کنترل و شم (نرمال سالین)، معنی‌دار نبوده است. افزایش غلظت هورمون FSH، نمی‌تواند در ارتباط با GnRH باشد. زیرا LH به‌صورت معنی‌دار افزایش یافته است. این افزایش می‌تواند در ارتباط با آزادسازی هورمون اینهیبین از سلول‌های رده‌ی سرتولی باشد (۴). یوسفی بابادی و همکاران (۲۰۱۳) در مطالعه‌ای، ۳۲ رت نر بالغ نژاد ویستار را به‌طور مساوی در ۴ گروه تقسیم کردند. آنها به دو گروه از رت‌ها، به‌صورت یک روز در میان تا ۲۱ روز، ml ۱ نانوذره‌ی اکسید تیتانیوم (TiO۲) با دوزهای mg/kg ۳۰ و ۵۰ به روش داخل صفاقی تزریق کردند. نتایج آنالیز هورمونی آنان، مطابق با نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر، به‌ترتیب افزایش و کاهش معنی‌داری را در میزان هورمون‌های LH و تستوسترون نشان داد و تغییرات هورمون FSH، معنی‌دار نبود (۱۸). دهقانی و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه‌ای مشابه با مطالعه‌ی بالا، تعداد ۳۲ رت نر ۳۵ روزه‌ی نژاد ویستار را به‌طور مساوی در ۴ گروه تقسیم کردند. آنها سه گروه از رت‌ها را، با روش تزریق داخل صفاقی، ۵ مرتبه به‌صورت یک روز در میان، با دوزهای mg/kg ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ نانوذره‌ی TiO۲، تیمار کردند. نتایج آنالیز هورمونی آنان، مطابق با نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر، به‌ترتیب افزایش و کاهش معنی‌داری را در میزان هورمون‌های LH و تستوسترون نشان داد و تغییرات هورمون FSH، معنی‌دار نبود. در مطالعه‌ی آنان، تغییرات غلظت تستوسترون، وابسته به دوز بود و تنها در بالاترین میزان تزریق نانوذره(mg/kg ۱۵۰)، به‌صورت معنی‌دار کاهش یافت. این یافته، با نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر نیز، از این حیث که تنها در گروه تیمار شده با دوز mg/ml ۲۵ نانوذره‌ی اکسید روی، کاهش تستوسترون معنی‌دار بود، مطابقت دارد (۹). در مطالعه‌ای دیگر، بهنام‌مرشدی و همکاران (۲۰۱۵)، تعداد ۴۰ رت نر نژاد ویستار با سن حدود ۸ هفته را به‌طور مساوی به ۵ گروه (۲ گروه کنترل و ۳ گروه درمان) تقسیم کردند. آنها ۱۰ روز به رت های تحت درمان، مقادیر ppm ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ نانوذره‌ی طلا خوراندند (گاواژ). نتایج آنالیز هورمونی آنان، مطابق با نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر، به‌ترتیب افزایش و کاهش معنی‌داری را در میزان هورمون‌های LH و تستوسترون نشان داد و تغییرات هورمون FSH، معنی‌دار نبود (۵). آنالیز آماری داده‌های حاصل از مطالعه‌ی حاضر، نشان داد که هیچ‌یک از دوزهای mg/ml ۵ و ۱۰ و ۲۵ نانواکسید روی در روزهای ۳۰ و ۶۰ پس از تیمار، قادر نبودند تغییر معنی‌داری در غلظت سرمی کورتیکوسترون نسبت به گروه‌های کنترل و شم ایجاد کنند. جالب آنکه میزان این هورمون در گروه گلوکونات روی mg/ml ۲۵ نیز اختلاف معنی‌داری با گروه‌های کنترل و شم نشان نداد؛ گرچه در مقایسه با این دو گروه، مقداری افزایش یافته بود. تقریباً هرنوع استرسی، باعث افزایش ترشح کورتیکوسترون در رت می‌شود (۱۱). در مطالعاتی که جانا و همکارانش طی آن، پاسخ به تزریق داخل بیضه‌ای کلسیم کلرید را در رت‌های صحرایی آلبینو بررسی کرده‌اند، میزان کورتیکوسترون سرمی در رت‌های تحت درمان نسبت به گروه کنترل، معنی‌دار نبوده است. آنان علاوه بر سنجش غلظت کورتیکوسترون، میزان پرولاکتین، پروتئین تام سرم و سطح قند خون ناشتا را نیز سنجیدند و در هیچکدام تغییرات معنی‌داری را مشاهده نکردند. آنان در نهایت ادعا کرده‌اند که این روش عقیم‌سازی (عقیم‌سازی شیمیایی به‌روش تزریق داخل بیضه‌ای کلسیم کلرید) با هیچ پاسخ کلی استرس همراه نیست (۱۴، ۱۶). آنان طی مطالعات دیگری، همین ترکیب را به‌صورت داخل بیضه‌ای به حیواناتی غیر از رت، نظیر بزهای سیاه بنگالی، سگ‌های ولگرد و گربه‌ها نیز تزریق کرده و پاسخ‌های مربوطه را سنجیده‌اند. در این دسته از حیوانات نیز، غلظت سرمی کورتیزول(کورتیکوسترونید غالب و تقریباً معادل کورتیکوسترون در پستانداران) به‌همراه سایر فاکتورهای استرس، در گروه حیوانات تحت درمان، در مقایسه با گروه کنترل، تغییرات معنی‌داری مشاهده نشده است (۱۵، ۱۶).

نتیجه‌گیری کلی

افزایش معنی‌دار غلظت سرمی هورمون LH، می‌تواند ناشی از کاهش هورمون تستوسترون باشد، به‌طوری‌که کاهش تستوسترون، به‌صورت خودتنظیمی منفی، بر هیپوتالاموس تأثیر گذاشته و میزان ترشح هورمون آزادکننده‌ی هورمون لوتئینی (LHRH) را افزایش داده و سبب افزایش تولید LH شده است. عدم افزایش کورتیکوسترون در گروه‌های مورد مطالعه را می‌توان بیانگر ایجاد حداقل استرس در رت‌های مورد مطالعه دانست. در مطالعه‌ی حاضر، مشخص شد که استفاده از محلول نانوذرات اکسید روی، در صورت تزریق داخل بیضه‌ای، می‌تواند با ایجاد تغییرات هورمونی، بر عملکرد سیستم تولیدمثلی نر و میزان باروری اثرگذار باشد. نکته‌ی مهم و غیرقابل انکاری که از این مطالعه و سایر مطالعات مشابه می‌توان دریافت، این است که سه فاکتور اساسی در میزان اثرگذاری این مواد بر پارامترهای تولیدمثلی، ایفای نقش می‌کنند: دوز و مقدار نانومواد، مدت‌زمان مواجهه با نانومواد و در نهایت، شیوه‌ی تجویز نانومواد. نتایج هورمونی گاهاً متناقضی که در مطالعات مختلف مشاهده می‌شود، می‌تواند نتیجه‌ی اختلاف در یک، دو یا هرسه فاکتور بالا باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ارومیه که با تصویب و حمایت مالی امکان انجام مطالعه را فراهم آوردند تشکر به عمل می‌آید.

منابع مورد استفاده

1- Abaspour Aporvari, M. H., M. Mamoei, S. Tabatabaei Vakili,

M. Zareei, and N. Dadashpour Davachi. 2018. The Effect of Oral Administration of Zinc Oxide Nanoparticles on Quantitative and Qualitative Properties of Arabic Ram Sperm and Some Antioxidant Parameters of Seminal Plasma in the Non-Breeding Season. *Archives of Razi Institute* 73(2): 121–129.

2- Arakane, F., S.R. King, Y. Du, C.B. Kallen, L.P. Walsh, H. Watari, D.M. Stocco and J.F. Strauss. 1997. Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity. *Journal of Biological Chemistry* 272(51): 32656–32662.

3- Ashjazadeh, M. A., A. Jahandideh, G. Abedi, A. Akbarzadeh, and S. Hesaraki. 2019. Histopathology and Histomorphological Study of Wound Healing Using Clove Extract Nanofibers (Eugenol) Compared to Zinc Oxide Nanofibers on the Skin of Rats. *Archives of Razi Institute* 74(3): 267-277.

4- Baki, M.E., S.M. Miresmaili, M. Pourentezari, E. Amraii, V. Yousefi, H.R. Spenani, A.R. Talebi, M. Anvari, M. Fazilati and A.A. Fallah. 2014. Effects of silver nano-particles on sperm parameters, number of Leydig cells and sex hormones in rats. *Iranian Journal of Reproductive Medicine* 12(2): 139.

5- Behnammorshedi, M. and H. Nazem. 2015. The Effect of Gold Nanoparticle on Luteinizing Hormone, Follicle Stimulating Hormone, Testosterone and Testis In Male Rat. *Biomedical Research* 26(2): 348-352

6- Brito, L.F.C., P.L. Sertich, W. Rives, M. Knobbe, F. Del Piero and G.B. Stull. 2011. Effects of intratesticular zinc gluconate treatment on testicular dimensions, echodensity, histology, sperm production, and testosterone secretion in American black bears (Ursus americanus). *Theriogenology* 75(8): 1444–1452.

7- Carlson, C., S.M. Hussain, A.M. Schrand, L. K. Braydich-Stolle, K.L. Hess, R.L. Jones and J.J. Schlager. 2008. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *The Journal of Physical Chemistry B* 112(43): 13608–13619.

8- De, M., P.S. Ghosh and V.M. Rotello. 2008. Applications of nanoparticles in biology. Advanced Materials 20(22): 4225–4241.

9- Dehghani, N., A. Noori and M. Modaresi. 2014. Investigating the effect of titanium dioxide nanoparticles on the growth and sexual maturation of male rats. *International Journal of Basic Sciences and Applied Research* 3(11): 772–776.

10- Gromadzka-Ostrowska, J., K. Dziendzikowska, A. Lankoff, M. Dobrzyńska, C. Instanes, G. Brunborg, A. Gajowik, J. Radzikowska, M. Wojewódzka and M. Kruszewski. 2012. Silver nanoparticles effects on epididymal sperm in rats. *Toxicology Letters* 214(3): 251–258.

11- Guyton, A.C. and J.E. Hall. 1986. Textbook of medical physiology. Saunders Philadelphia. pp: 25-100.

12- Heydarnejad, M.S., A. Mosharafi, M.M. Dehkordi and R. Fattahian. 2017. Histo-immunological Aspects of ZnO Nanoparticles in Mice (Mus musculus). *Bulletin of Pure and Applied Sciences-Zoology* 36(2): 76–84.

13- Huang, W.-F., J.-H. Jiang, Y.-W. Chen and C.-H. Wang. 2007. A Nosema ceranae isolate from the honeybee Apis mellifera. *Apidologie* 38(1): 30–37.

14- Jana, K. and P.K. Samanta. 2006. Evaluation of single intratesticular injection of calcium chloride for nonsurgical sterilization in adult albino rats. Contraception 73(3): 289–300.

15- Jana, K. and P.K. Samanta. 2007. Sterilization of male stray dogs with a single intratesticular injection of calcium chloride: a dose-dependent study. Contraception 75(5): 390–400.

16- Jana, K. and P.K. Samanta. 2011. Clinical evaluation of nonsurgical sterilization of male cats with single intra-testicular injection of calcium chloride. *BMC Veterinary Research* 7(1): 39.

17- Klinefelter, G.R., N.L. Roberts and J.D. Suarez. 1992. Direct effects of ethane dimethanesulphonate on epididymal function in adult rats: an in vitro demonstration. *Journal of Andrology* 13(5): 409–421.

18- Mohammadi Fartkhooni, F., A. Noori, M. Momayez, L. Sadeghi, K. Shirani and V. Yousefi Babadi. 2013. The effects of nano titanium dioxide (TiO2) in spermatogenesis in wistar rat. *European Journal of Experimental Biology* 3(4): 145–149.

19- Oliveira, E.C.S., M.R. Moura, V.A. Silva Jr, C.A. Peixoto, K.L.A. Saraiva, M.J.C. de Sá, R.H. Douglas and A. de Pinho Marques Jr. 2007. Intratesticular injection of a zinc-based solution as a contraceptive for dogs. *Theriogenology* 68(2): 137–145.

20- Prestifilippo, J.P., J. Fernández-Solari, C. Mohn, A. De Laurentiis, S.M. McCann, W.L. Dees and V. Rettori. 2007. Effect of manganese on luteinizing hormone–releasing hormone secretion in adult male rats. *Toxicological Sciences* 97(1): 75–80.

21- De Rensis, F., R. Saleri, P. Tummaruk, M. Techakumphu and R.N. Kirkwood. 2012. Prostaglandin F2α and control of reproduction in female swine: a review. *Theriogenology* 77(1): 1–11.

22- Salata, O. V. 2004. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of Nanobiotechnology* 2(1): 3.

23- Wang, M. 2007. Intratesticular injection of chemical sterilant. U.S. Patent 7,276,535.

24- Yang, J., Y. Zhang, Y. Wang and S. Cui. 2007. Toxic effects of zearalenone and α-zearalenol on the regulation of ste-

roidogenesis and testosterone production in mouse Leydig cells. *Toxicology in Vitro* 21(4): 558–565.

25- Yoshida, Y., N. Itoh, Y. Saito, M. Hayakawa and E. Niki. 2004. Application of water-soluble radical initiator, 2, 2′-azo-bis-[2-(2-imidazolin-2-yl) propane] dihydrochloride, to a study of oxidative stress. *Free Radical Research* 38(4): 375–384.