Journal of
Babol University of Medical Sciences
مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل
e-ISSN: 2251-7170 p-ISSN: 1561-4107

Stereological Study of Mouse Testicular Tissue Treated with Zinc Oxide Nanoparticles and N-Acetyl Cysteine

M. Mahmoodi (PhD)[1], N. Darbandi (PhD)[*1], Z. Khosravi (MSc)[1]

1.Department of Biology, Faculty of Sciences, Arak University, Arak, I.R.Iran.

Article Type

Research Paper

ABSTRACT

Background and Objective: With the increase in the production of nanoparticles, human beings are exposed to its potential dangers. Research has shown the antioxidant effects of zinc oxide at low doses, but long-term exposure to high doses has pro-oxidant effects and influences the function of the male reproductive system, spermatogenesis and fertility. The present study was conducted to investigate the effect of N-acetyl cysteine on testicular tissue changes and spermatogenesis process in male mice treated with zinc oxide nanoparticles.

Methods: In this experimental study, 24 adult male mice were assigned to groups of control (1 ml/kg saline), zinc oxide nanoparticles (50 mg/kg), N-acetyl cysteine (150 mg/kg) and N-acetyl cysteine + zinc oxide nanoparticles. In all groups, intraperitoneal injections were performed daily for 28 days. At the end of the treatment, mean weight and volume of testicles, length and diameter of seminiferous tubules, height of germinal epithelium and number of germ cells were evaluated.

Findings: In the group of zinc oxide nanoparticles, a significant decrease was observed in volume (38.86±1.48), length (0.89±0.09), diameter (162.69±1.03), and height of germinal epithelium (41.06±1.73) of the seminiferous tubules, number of spermatogonia (4.15±0.11) $\times 10^6$, spermatocytes (21.45±0.83) $\times 10^6$, round spermatid (22.31±0.47) $\times 10^6$, elongated spermatid (21.74±0.76) $\times 10^6$ and Sertoli cell (3.08±0.10) $\times 10^6$ and a significant increase was observed in interstitial tissue volume (18.04±1.84) compared to the control group ($p<0.001$). In the concurrent treatment group, N-acetyl cysteine improved the above parameters compared to the group of zinc oxide nanoparticles ($p<0.01$). These parameters were not significantly different in the N-acetyl cysteine group compared to the control group.

Conclusion: Based on the results of this study, N-acetyl cysteine was able to prevent the damage caused by zinc oxide nanoparticles on testicular tissue and spermatogenesis.

Keywords: *N-Acetyl Cysteine, Stereology, Testis, Zinc Oxide Nanoparticles*.

Received: Sep 4th 2021
Revised: Nov 2nd 2021
Accepted: Dec 4th 2021

Cite this article: Mahmoodi M, Darbandi N, Khosravi Z. Stereological Study of Mouse Testicular Tissue Treated with Zinc Oxide Nanoparticles and N-Acetyl Cysteine. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2022; 24(1): 109-18.

© The Author(S).
Publisher: Babol University of Medical Sciences

[*]Corresponding Author: N. Darbandi (PhD)
Address: Department of Biology, Faculty of Sciences, Arak University, Arak, I.R.Iran.
Tel: +98 (86) 32627224. **E-mail:** N-Darbandi@araku.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.16.2]
[DOI: 10.22088/jbums.24.1.109]

Journal of
Babol University of Medical Sciences
مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل
e-ISSN: 2251-7170 p-ISSN: 1561-4107

مطالعه استریولوژیکی بافت بیضه موش تحت تاثیر نانوذرات اکسید روی و ان استیل سیستئین

منیره محمودی (PhD)[1]، نیلوفر دربندی (PhD)[1*]، زهرا خسروی (MSc)[1]

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک، اراک، ایران

نوع مقاله
مقاله پژوهشی

دریافت:
۱۴۰۰/۶/۱۳
اصلاح:
۱۴۰۰/۸/۱۱
پذیرش:
۱۴۰۰/۹/۱۳

چکیده

سابقه و هدف: با تولید روزافزون نانوذرات انسان در معرض خطرات احتمالی آن قرار دارد. تحقیقات نشان دهنده اثرات آنتی اکسیدانی اکسید روی در دوزهای پایین است اما مواجهه طولانی مدت با دوزهای بالا اثرات اکسیدانی ایجاد کرده و بر عملکرد سیستم تولید مثلی نر، اسپرماتوژنز و باروری تاثیرگذار است. در این تحقیق اثر ان استیل سیستئین بر تغییرات بافتی بیضه و فرآیند اسپرماتوژنز در موش های نر تیمار شده با نانوذرات اکسید روی بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۲۴ سر موش نر بالغ در گروه های کنترل (سالین، ۱ ml/kg)، نانوذرات اکسید روی (۵۰ mg/kg)، ان استیل سیستئین (۱۵۰ mg/kg) و ان استیل سیستئین + نانوذرات اکسید روی تقسیم شدند. در کلیه گروه ها تزریقات داخل صفاقی روزانه به مدت ۲۸ روز انجام شد. در پایان تیمار میانگین وزن و حجم بیضه، طول و قطر لوله‌های منی ساز، ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی و تعداد سلول های جنسی ارزیابی شد.

یافته‌ها: در گروه نانوذرات اکسید روی کاهش معنی‌داری در حجم (۱/۴۸±۳۸/۸۶)، طول (۰/۰۹±۰/۸۹)، قطر (۱/۰۳±۱۶۲/۶۹)، ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی (۱/۷۳±۴۱/۰۶) لوله های منی ساز، تعداد سلول های اسپرماتوگونی $۱۰^{۶}\times$ (۰/۱۱±۴/۱۵)، اسپرماتوسیت $۱۰^{۶}\times$ (۰/۸۳±۲۱/۴۵)، اسپرماتید گرد $۱۰^{۶}\times$ (۰/۴۷±۲۲/۳۱)، اسپرماتید دراز $۱۰^{۶}\times$ (۰/۷۶±۲۱/۷۴) و سرتولی $۱۰^{۶}\times$ (۰/۱۰±۳/۰۸) و افزایش معنی داری در حجم بافت بینابینی (۱/۸۴±۱۸/۰۴) نسبت به گروه کنترل دیده شد ($p<۰/۰۰۱$). در گروه تیمار همزمان، ان استیل سیستئین پارامترهای فوق را نسبت به گروه نانوذرات اکسید روی بهبود داد ($p<۰/۰۱$). این پارامترها در گروه ان استیل سیستئین نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی داری نداشت.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج این مطالعه، ان استیل سیستئین توانست از آسیب های ناشی از نانوذرات اکسید روی بر بافت بیضه و اسپرماتوژنز جلوگیری نماید.

واژه‌های کلیدی: ان استیل سیستئین، استریولوژی، بیضه، نانوذرات اکسید روی.

استناد: منیره محمودی، نیلوفر دربندی، زهرا خسروی. مطالعه استریولوژیکی بافت بیضه موش تحت تاثیر نانوذرات اکسید روی و ان استیل سیستئین. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل، ۱۴۰۱؛ ۲۴(۱): ۱۸-۱۰۹.

© The Author(S).
Publisher: Babol University of Medical Sciences

[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.16.2]
[DOI: 10.22088/jbums.24.1.109]

▣ این مقاله مستخرج از پایان نامه زهرا خسروی دانشجوی کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی جانوری دانشگاه اراک می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر نیلوفر دربندی
آدرس: اراک، دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی. تلفن: ۳۲۶۲۷۲۲۴-۰۸۶
رایانامه: N-Darbandi@araku.ac.ir

مقدمه

نانو تکنولوژی امروزه با سرعت بالایی در حال رشد است و با تولید روزافزون نانوذرات به عنوان اجزای اصلی این علم انسان نیز نسبت به گذشته بیشتر در معرض این ذرات قرار می گیرد. زمانی که مواد از حالت توده‌ای به مقیاس نانو تبدیل می‌شوند در خواص شیمیایی، زیستی و فعالیت‌های کاتالیستی آن‌ها تغییراتی ایجاد می‌شود و از آنجایی که اندازه آن‌ها، کوچکتر از سلول ها و اندام های سلولی بدن است به راحتی از طریق پوست، تنفس و سلول های مخاطی غشا جذب و باعث اختلال در عملکرد قسمت های مختلف بدن می‌شوند (۱). نانوذرات اکسید روی دارای قطری کمتر از ۱۰۰ نانومتر بوده و نسبت به اندازه خود، مساحت سطحی بزرگ و فعالیت کاتالیزوری بالایی دارند (۲). نانوذرات اکسید روی در تعداد زیادی از محصولات صنعتی مانند لاستیک، رنگ و مواد آرایشی از جمله کرم های ضد آفتاب مورد استفاده قرار می‌گیرند و در زمینه های مختلف علمی، پزشکی و فناوری به عنوان عامل ضد سرطان، ضد باکتری، آنتی اکسیدان، ضد دیابت و ضد التهاب کاربرد دارند (۴و۳). به این ترتیب انسان به طور مداوم در معرض این نانوذرات قرار دارد. گرچه برخی مطالعات نشان دهنده اثرات آنتی اکسیدانی اکسید روی در دوزهای پایین است با این حال قرار گرفتن در معرض این نانو ذرات با غظت بالا و به مدت طولانی برای موجود زنده مضر گزارش شده است (۵).

پژوهش های مختلف نشان داده است که نانوذرات اکسید روی به راحتی از پوشش سلول ها، سد خونی– مغزی و سد خونی– بیضه ای می گذرند و توسط سیستم گردش خون به اندام های مختلف بدن از جمله مغز، قلب، کلیه و کبد رسیده و باعث ایجاد استرس اکسیداتیو و آپوپتوز می‌گردند (۸–۶). نانوذرات اکسید روی دارای اثرات سایتوتوکسیک بر سلول های بیضه موش هستند، بطوریکه توسط سلول های سرتولی و لیدیگ جذب و با افزایش رادیکال های آزاد اکسیژن و آسیب به غشای میتوکندری منجر به آپوپتوز در سلول ها می شوند (۱۰و۹). نانوذرات اکسید روی از طریق تاثیر بر سلول های لیدیگ باعث کاهش مقدار تستوسترون سرم و در نتیجه اختلال در روند اسپرماتوژنز می گردد (۹). مشخص شده اکسید روی با کاهش بیان پروتئین ها و تخریب غشاء سلول و غشاء خارجی میتوکندری در سلول‌های سرتولی منجر به تخریب یکپارچگی سد خونی– بیضه ای می‌گردد (۱۱). علاوه بر آن تیمار موش های نر به وسیله نانوذرات اکسید روی باعث ایجاد تغییرات ساختاری و دژنره شدن سلول ها در لوله های منی ساز می شود (۱۲و۱۰).

ان استیل سیستئین یک ترکیب تیولی و مشتقی از اسید آمینه L–سیستئین است (۱۳) که به عنوان آنتی‌اکسیدان قادر است به طور مستقیم و غیر مستقیم از آسیب های داخل سلولی رادیکال های آزاد جلوگیری کند (۱۵و۱۴). در مطالعات بالینی مکمل خوراکی ان استیل سیستئین قادر به بهبود پارامترهای اسپرمی (تعداد، تحرک و مورفولوژی طبیعی) نسبت به قبل از درمان شده است (۱۶). ان‌استیل سیستئین همچنین دارای اثرات ضد التهابی است (۱۷). ان استیل سیستئین از طریق کاهش استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی در بافت بیضه و بهبود وضعیت آنتی اکسیدانتی منجر به اثر محافظتی بر صدمات بیضوی و کاهش آسیب هیستوپاتولوژیک بیضه ها شده (۱۸) و از مرگ سلول های زایای بیضه جلوگیری می‌کند (۱۹).

چنانچه مطالعات نشان می دهد استفاده از نانوذرات اکسید روی از طریق تغییرات هورمونی و بافت شناسی، افزایش رادیکال های آزاد و القای آپوپتوز سبب ناهنجاری های اسپرمی و کاهش قدرت باروری می‌گردد. از طرفی استفاده از نانوذرات اکسید روی در زندگی روزمره انکار ناپذیر است. لذا در تحقیق حاضر اثر محافظتی ان استیل سیستئین بر سمیت ناشی از نانوذرات اکسید روی بر بافت بیضه و شاخص های اسپرماتوژنز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه اراک با کد IR.ARAKMU.REC.1399.049، ۲۴ سر موش نر بالغ نژاد (NMRI) با میانگین وزنی ۲/۱۱±۳۵/۴۵ گرم از مرکز انسیتو پاستور ایران خریداری و در خانه حیوانات دانشگاه اراک تحت شرایط طبیعی نور (۱۲ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی) و دما (۲±۲۱ درجه سانتی گراد) نگهداری شدند. تمام حیوانات دارای شرایط تغذیه ای یکسان و با امکان دسترسی آزاد به آب نگهداری شدند. پس از وزن‌کشی، موش ها به طور تصادفی به ۴ گروه ۶ تایی کنترل (سالین، ml/kg ۱)، نانوذرات اکسید روی (Tecnan Spain، mg/kg ۵۰) (۲۱و۲۰)، ان استیل سیستئین (Sigma Germany، mg/kg ۱۵۰) (۲۳و۲۲) و ان استیل سیستئین + نانوذرات اکسید روی تقسیم شدند. اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید.

در کلیه گروه ها تیمار به صورت روزانه و داخل صفاقی و به مدت ۲۸ روز انجام گرفت (۲۴). پس از پایان دوره تیمار، موش ها ابتدا وزن و سپس توسط دی اتیل اتر بیهوش شدند. بیضه چپ آن ها از بدن خارج، وزن تر و وزن غوطه ور آن اندازه گیری و جهت مطالعات استریولوژیک به فیکساتیو (Modified MDF (Davidson's Fluid منتقل گردید. در کلیه گروه ها حجم کل بیضه، حجم لوله های منی ساز و بافت بینابینی، طول و قطر لوله های منی‌ساز، ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی و شمارش انواع سلول های جنسی و سرتولی انجام گرفت. از روش شناور سازی برای محاسبه حجم اولیه بیضه استفاده شد (۲۵). سپس

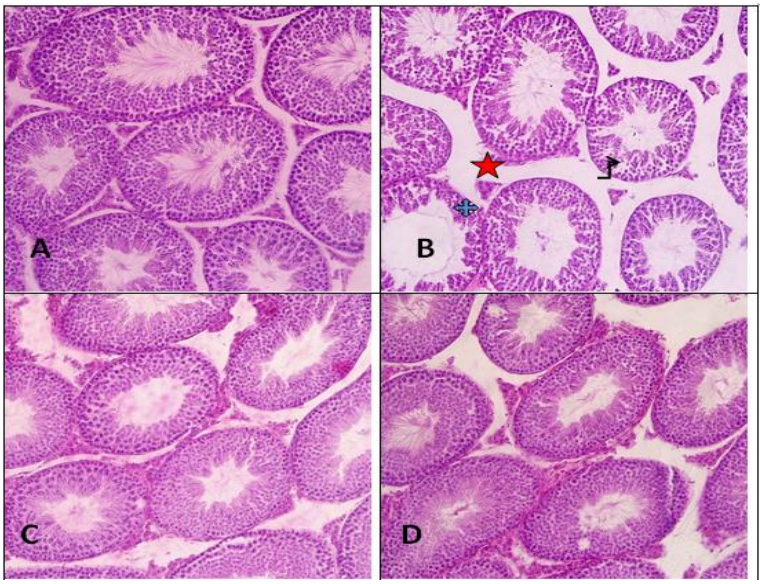
[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.16.2]
[DOI: 10.22088/jbums.24.1.109]

به روش اورینتیتور برش هایی از بافت بیضه تهیه و بعد از محاسبه میزان چروکیدگی حجم کل بیضه تخمین زده شد (۲۶). نمونه ها به وسیله دستگاه پاساژ بافتی (مدل Leica) پردازش و بعد از قالب گیری، با میکروتوم (مدل Leitz 1512) برش هایی به ضخامت ۵ و ۲۰ میکرومتر تهیه و با روش هماتوکسیلین- ائوزین رنگ آمیزی شدند. برای تخمین حجم لوله‌های منی ساز و بافت بینابینی، ابتدا دانسیته حجمی مربوط به هر یک از اجزاء با پروب نقطه‌ای محاسبه و سپس حجم کل با ضرب کردن دانسیته حجمی آن در حجم کل بیضه تخمین زده شد (۲۷). دانسیته طول لوله های منی ساز با فریم شمارش محاسبه و با ضرب کردن در حجم کل بیضه، طول مطلق لوله های منی ساز به دست آمد (۲۸). قطر لوله های منی ساز با فریم صلیب مانند و با کمک نرم افزار موتیک (Motic image 2000) اندازه‌گیری شد (۲۸). برای تخمین ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی ابتدا مجموع کل نقاط برخورد کرده با اپی‌تلیوم زایشی بر مجموع نقاط برخورد کرده با تصاویر بافت بیضه تقسیم و دانسیته حجمی اپی‌تلیوم زایشی به دست آمد. سپس تعداد برخوردهای پروب سطح با تصاویر بافت بیضه و سطح لومن اپی‌تلیوم زایشی شمارش و دانسیته سطحی اپی‌تلیوم زایشی محاسبه شد (۲۹). برای محاسبه تعداد سلول ها از اسلایدهای ۲۰ میکرونی با میکروسکوپ نوری و بزرگنمایی ۱۰۰، با روش اپتیکال دایسکتور، انواع سلول‌ها با فریم مخصوص انتخاب و شمارش شد. بعد از محاسبه دانسیته عددی و ضرب آن در حجم کل بیضه، تعداد کل سلول ها به دست آمد (۲۹).

جهت تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و روش آنالیز واریانس یک طرفه (One Way ANOVA) و تست آماری Tukey استفاده شد و $p<0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

تغییرات هیستوپاتولوژیکی بافت بیضه: در گروه کنترل آرایش منظم اپی‌تلیوم زایشی لوله های منی ساز و به هم پیوستگی طبیعی سلول های جنسی قابل مشاهده بود (شکل ۱A). در گروه نانوذرات اکسید روی بی نظمی و به هم ریختگی اپی‌تلیوم زایشی، افزایش وسعت لومن لوله های منی ساز، ادم بافت بینابینی و کاهش ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی دیده شد. همچنین تراکم اسپرم در لوله های منی ساز کمتر از سایر گروه ها بود (شکل ۱B). در گروه ان استیل سیستئین + نانو ذرات اکسیدروی نمای بافتی لوله های منی ساز شبیه گروه کنترل بود و تا اندازه زیادی از تخریب های بافتی جلوگیری شده بود (شکل ۱C). در گروه ان استیل سیستئین ساختار طبیعی لوله های منی ساز و آرایش منظم سلول های جنسی مشاهده شد (شکل ۱D).



شکل ۱. تصاویر میکروسکوپی از بافت بیضه موش ها در گروه های مختلف تیمار شده با نانوذرات اکسید روی، ان استیل سیستئین و ان استیل سیستئین + نانوذرات اکسید روی (برش های ۵ میکرونی، رنگ آمیزی هماتوکسلین- ائوزین، بزرگنمایی ۲۰۰×).
A. آرایش طبیعی و منظم اپی‌تلیوم زایشی در گروه کنترل، B. به هم ریختگی، آرایش نامنظم و کاهش ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی ( ) و افزایش وسعت بافت بینابینی ( ) و واکوئله شدن ( ) در گروه تیمار با نانوذرات اکسید روی، C. ساختار طبیعی اپی‌تلیوم زایشی در گروه ان استیل سیستئین + نانوذرات اکسید روی، D. آرایش طبیعی و منظم اپی‌تلیوم زایشی در گروه تیمار شده با ان استیل سیستئین.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.16.2]
[DOI: 10.22088/jbums.24.1.109]

محاسبات استریولوژیک: میانگین وزن موش (g) پس از اتمام دوره تیمار در بین گروه های کنترل (۲/۷۵±۳۵/۷۳)، نانوذرات اکسید روی (۱/۹۶±۳۴/۴۸)، تیمار همزمان (۱/۵۱±۳۶/۱۹) و ان استیل سیستئین به تنهایی (۱/۰۵±۳۷/۳۸) اختلاف معنی داری را نشان نداد. از مقایسه میانگین وزن بیضه در گروه های مختلف نیز اختلاف معنی داری مشاهده نشد (جدول ۱).

جدول ۱. مقایسه میانگین وزن موش و وزن بیضه (گرم) در گروه های مختلف موش پس از تیمار با نانوذرات اکسید روی (۵۰ mg/kg/day) و ان استیل سیستئین (۱۵۰ mg/kg/day) به مدت ۲۸ روز.

گروه‌ها	میانگین وزن اولیه موش (گرم) Mean±SD	میانگین وزن موش در پایان تیمار (گرم) Mean±SD	میانگین وزن بیضه موش (گرم) Mean±SD
کنترل	۳۴/۷۵±۲/۳۹[a]	۳۵/۷۳±۲/۷۵[a]	۰/۱۱۷±۰/۰۰۸[a]
نانوذرات اکسید روی	۳۵/۸۵±۲/۴۸[a]	۳۴/۴۸±۱/۹۶[a]	۰/۱۲۵±۰/۰۱۱[a]
ان استیل سیستئین + نانوذرات اکسید روی	۳۴/۹۸±۱/۶۶[a]	۳۶/۱۹±۱/۵۱[a]	۰/۱۱۰±۰/۰۲۳[a]
ان استیل سیستئین	۳۶/۲۲±۱/۹۹[a]	۳۷/۳۸±۱/۰۵[a]	۰/۱۳۵±۰/۰۲[a]

میانگین ها با کد حرف های مختلف در یک ستون دارای تفاوت معنی داری نسبت به یکدیگر می باشند (p<۰/۰۵ و one way ANOVA، Tukey's test).

از مقایسه میانگین حجم کل بیضه موش ها (mm ۳) در بین گروه های گروه های کنترل (۱/۳۸±۵۹/۵۵)، نانوذرات اکسید روی (۳/۰۸±۵۶/۹۰)، تیمار همزمان (۱/۲۵±۵۸/۰۶) و ان استیل سیستئین به تنهایی (۰/۹۳±۵۹/۶۴) اختلاف معنی داری مشاهده نشد (جدول ۲). در حالیکه میانگین حجم لوله های منی ساز در گروه نانوذرات اکسید روی در مقایسه با سایر گروه ها کاهش معنی دار (p<۰/۰۰۱) و حجم بافت بینابینی افزایش معنی داری نشان داد (p<۰/۰۰۱). تیمار همزمان ان استیل سیستئین با نانوذرات اکسید روی توانست این مقادیر را به طور معنی داری جبران و به حد گروه کنترل برساند (p<۰/۰۰۱). حجم کل بیضه و حجم لوله های منی ساز و بافت بینابینی در گروه ان استیل سیستئین نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی داری نداشت (جدول ۲).

جدول ۲. مقایسه میانگین حجم کل بیضه، حجم لوله های منی‌ساز و حجم بافت بینابینی در گروه های مختلف موش پس از تیمار با نانوذرات اکسید روی (۵۰ mg/kg/day) و ان استیل سیستئین (۱۵۰ mg/kg/day) به مدت ۲۸ روز.

گروه‌ها	حجم کل بیضه (mm ۳) Mean±SD	حجم لوله های منی ساز (mm ۳) Mean±SD	حجم بافت بینابینی (mm ۳) Mean±SD
کنترل	۵۹/۵۵±۱/۳۸[a]	۴۶/۱۷±۰/۸۶[a]	۱۳/۳۸±۱/۱۴[a]
نانوذرات اکسید روی	۵۶/۹۰±۳/۰۸[a]	۳۸/۸۶±۱/۴۸[b]	۱۸/۰۴±۱/۸۴[b]
ان استیل سیستئین + نانوذرات اکسید روی	۵۸/۰۶±۱/۲۵[a]	۴۳/۸۶±۱/۷۶[a]	۱۴/۲۲±۱/۰۶[a]
ان استیل سیستئین	۵۹/۶۴±۰/۹۳[a]	۴۶/۲۳±۱/۷۰[a]	۱۳/۱۴±۱/۴۶[a]

میانگین ها با کد حرف های مختلف در یک ستون دارای تفاوت معنی داری نسبت به یکدیگر می باشند (p<۰/۰۵ و one way ANOVA، Tukey's test).

اختلاف معنی داری در میانگین طول لوله های منی ساز (m) در بین گروه های کنترل (۱/۳۳±۰/۰۵)، نانوذرات اکسید روی (۰/۸۹±۰/۰۹)، تیمار همزمان (۱/۰۷±۰/۰۸) و ان استیل سیستئین به تنهایی (۱/۳۶±۰/۱۳) دیده شد (جدول ۳). همچنین اختلاف معنی داری در قطر لوله های منی ساز و ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی در گروه های مختلف مشاهده شد (p<۰/۰۰۱). میانگین طول و قطر لوله های منی ساز و ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی در گروه تیمار همزمان ان استیل سیستئین + نانوذرات اکسید روی، افزایش معنی داری را نسبت به گروه نانوذرات اکسید روی نشان داد (p<۰/۰۱) اما به حد گروه کنترل نرسید. طول و قطر لوله های منی ساز همچنین ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی در گروه ان استیل سیستئین اختلاف معنی داری با گروه کنترل نشان نداد (جدول ۳).

[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.16.2]
[DOI: 10.22088/jbums.24.1.109]

جدول ۳. مقایسه میانگین طول (m)، قطر و ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی (µm) لوله های منی ساز در گروه های مختلف موش پس از تیمار با نانوذرات اکسید روی (۵۰ mg/kg/day) و ان استیل سیستئین (۱۵۰ mg/kg/day) به مدت ۲۸ روز.

گروه‌ها	طول لوله های منی ساز (m) Mean±SD	قطر لوله های منی ساز (µm) Mean±SD	ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی (µm) Mean±SD
کنترل	۱/۳۳±۰/۰۵^{a}	۱۷۷/۷۴±۴/۷۹^{a}	۵۶/۳۰±۰/۶۹^{a}
نانوذرات اکسید روی	۰/۸۹±۰/۰۹^{c}	۱۶۲/۶۹±۱/۰۳^{c}	۴۱/۰۶±۱/۷۳^{c}
ان استیل سیستئین + نانوذرات اکسید روی	۱/۰۷±۰/۰۸^{b}	۱۷۱/۶۲±۱/۷۰^{b}	۴۶/۶۴±۱/۰۳^{b}
ان استیل سیستئین	۱/۳۶±۰/۱۳^{a}	۱۷۹/۵۵±۵/۰۲^{a}	۵۵/۷۷±۲/۷۳^{a}

میانگین ها با کد حرف های مختلف در یک ستون دارای تفاوت معنی داری نسبت به یکدیگر می باشند (p<۰/۰۵ و one way ANOVA، Tukey's test).

میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی ۱۰^{۶}× (۰/۱۱±۴/۱۵)، اسپرماتوسیت ۱۰^{۶}× (۰/۸۳±۲۱/۴۵)، اسپرماتید گرد ۱۰^{۶}× (۰/۴۷±۲۲/۳۱)، اسپرماتید دراز ۱۰^{۶}× (۰/۷۶±۲۱/۷۴) و سرتولی ۱۰^{۶}× (۰/۱۰±۳/۰۸) در گروه تیمار با نانوذرات اکسید روی نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری را نشان داد (p<۰/۰۰۱) (جدول ۴). میانگین تعداد این سلول ها در گروه تیمار همزمان ان استیل سیستئین + نانوذرات اکسید در مقایسه با گروه نانوذرات اکسید روی افزایش معنی داری نشان داد (p<۰/۰۰۱) اما به حد گروه کنترل نرسید. در گروه تیمار با ان استیل سیتئین تعداد سلول های فوق اختلاف معنی داری با گروه کنترل نشان نداد (جدول ۴).

جدول ٤. مقایسه میانگین تعداد انواع سلول های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید و سرتولی (۱۰^{٦}×) در گروه های مختلف موش پس از تیمار با نانوذرات اکسید روی (۵۰ mg/kg/day) و ان استیل سیستئین (۱۵۰ mg/kg/day) به مدت ۲۸ روز.

میانگین تعداد سلول‌ها / گروه‌ها	اسپرماتوگونی (×۱۰^{٦}) Mean±SD	اسپرماتوسیت (×۱۰^{٦}) Mean±SD	اسپرماتید گرد (×۱۰^{٦}) Mean±SD	اسپرماتید دراز (×۱۰^{٦}) Mean±SD	سرتولی (×۱۰^{٦}) Mean±SD
کنترل	۶/۳۷±۰/۲۳^{a}	۲۵/۹۲±۰/۹۳^{a}	۲۸/۳۳±۲/۱۹^{a}	۲۹/۸۷±۳/۱۹^{a}	۴/۲۴±۰/۱۲^{a}
نانوذرات اکسید روی	۴/۱۵±۰/۱۱^{c}	۲۱/۴۵±۰/۸۳^{c}	۲۲/۳۱±۰/۴۷^{c}	۲۱/۷۴±۰/۷۶^{c}	۳/۰۸±۰/۱۰^{c}
ان استیل سیستئین + نانوذرات اکسید روی	۴/۸۳±۰/۳۴^{b}	۲۳/۲۶±۱/۲۱^{b}	۲۵/۹۳±۰/۵۷^{b}	۲۵/۰۱±۰/۷۱^{b}	۳/۴۹±۰/۱۴^{b}
ان استیل سیستئین	۶/۱۹±۰/۱۳^{a}	۲۵/۲۶±۱/۱۷^{a}	۲۸/۲۰±۱/۱۰^{a}	۲۸/۲۵±۱/۵۸^{a}	۴/۰۵±۰/۲۱^{a}

میانگین ها با کد حرف های مختلف در یک ستون دارای تفاوت معنی داری نسبت به یکدیگر می باشند (p<۰/۰۵ و one way ANOVA، Tukey's test).

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر میانگین وزن بیضه و وزن بدن موش ها در پایان دوره تیمار در بین گروه های مختلف تفاوت معنی داری نداشت. بر اساس نتایج حاصل از مطالعه حاضر، ان استیل سیستئین قادر است از آسیب های بافتی و کاهش اسپرماتوژنز ناشی از نانوذرات اکسید روی جلوگیری نماید. سایر مطالعات نیز نتایج مشابهی گزارش کرده‌اند (۳۱و۳۰و۲۰). بنابراین می توان استدلال کرد که کاهش وزن بدن و وزن بیضه در موش ها بستگی به زمان تیمار موش در قبل و بعد از بلوغ، نژاد و سن موش و همچنین دوز مصرفی دارد. در مطالعه حاضر دوز به کار رفته از نانوذرات اکسید روی با توجه به بالغ بودن موش ها نتوانست در اشتها، جذب مواد غذایی و فعالیت متابولیکی موش ها تاثیر معنی داری داشته باشد. یافته های این مطالعه همچنین کاهش معنی داری در حجم لوله های منی ساز و افزایش معنی داری در حجم بافت بینابینی در گروه نانوذرات اکسید روی در مقایسه با سایر گروه ها نشان داد. نتیجه برخی مطالعات پیشین ضمن تایید نتیجه حاصل نشان می دهد آتروفی لوله های منی ساز به علت افزایش آپوپتوز و کاهش تعداد سلول های جنسی است (۳۲). همچنین گزارش شده است یکی از عوامل افزایش میزان آپوپتوز، تجمع گونه های اکسیژن فعال در بافت بیضه به دنبال کاهش سطح آنزیم های آنتی اکسیدانی است (۳۳). تحقیقات نشان داده نانوذرات اکسید روی بعد از ورود به لیزوزوم سلول با تولید Zn^{2+} باعث افزایش تولید گونه های اکسیژن فعال، آسیب میتوکندریایی و فعال شدن مسیرهای

[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.16.2]
[DOI: 10.22088/jbums.24.1.109]

سیگنالینگ آپوپتوزی از جمله مسیر p53 و مرگ سلول های هدف می شود (۳۴و۹). بنابراین با توجه به مطالعات گذشته ممکن است نانوذرات اکسید روی با القای استرس اکسیداتیو و اتوفاژی سلول ها در بافت بیضه (۹) از طریق تخریب سلول های سرتولی و لیدیگ و دژنره کردن سلول‌های زایای لوله های منی ساز باعث اختلال در روند اسپرماتوژنز و از بین رفتن سلول های بافت بیضه شود که این خود می تواند باعث کاهش حجم لوله های منی ساز و افزایش حجم بافت بینابینی گردد (۳۶و۳۵و۱۲). در مطالعه حاضر ان استیل سیستئین توانست از آتروفی و دژنره شدن سلول های جنسی و کاهش حجم لوله های منی ساز و افزایش حجم بافت بینابینی ناشی از نانوذرات اکسید روی جلوگیری کرده و آن را در حد گروه کنترل بهبود بخشد. احتمالاً ان استیل سیستئین با خاصیت آنتی اکسیدانی خود توانسته است سلول های بیضه را از تخریب محافظت کند و از مرگ سلولی که از طریق آسیب اکسیداتیو در شبکه آندوپلاسمی سلول های بیضه ایجاد شده، جلوگیری نماید (۳۷و۲۹و۱۹).

همچنین در این مطالعه کاهش معنی داری در میانگین طول، قطر و ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی لوله های منی ساز در گروه نانوذرات اکسید روی نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. مطالعات قبلی انجام شده نیز این یافته ها را تایید می کند (۳۵و۲۰و۱۰و۹). نانوذرات اکسید روی از طریق آندوسیتوز یا چندین مکانیسم دیگر مانند ماکروپینوسیتوز وارد سلول شده و با القاء اتوفاژی باعث آسیب به DNA می‌شود، همچنین می تواند از طریق تخریب پروتئین های ضد آپوپتوزی و ترمیم کننده DNA باعث افزایش سمیت و در نهایت مرگ سلولی شود (۳۴). بدین ترتیب با افزایش میزان آپوپتوز و کاهش سلول های جنسی (۳۲) منجر به کاهش طول، قطر و ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی لوله های منی ساز می‌گردد. از طرفی نانوذرات اکسید روی می تواند با ایجاد اختلال در روند اسپرماتوژنز (۳۵) و القاء تغییرات هیستوپاتولوژیک مانند تخریب سلول های سرتولی و سلول های زایای لوله های منی ساز (۳۶) منجر به کاهش قطر و ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی گردد. در مطالعه حاضر تیمار همزمان ان استیل سیستئین با نانوذرات اکسید روی توانست موجب افزایش میانگین قطر، طول و ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی لوله های منی ساز شود، سایر مطالعات نیز نتیجه حاصل را تایید می‌کند (۳۷و۲۹و۱۸). به نظر می رسد ان استیل سیستئین به دلیل خاصیت آنتی اکسیدانی خود، با افزایش غلظت آنزیم های آنتی اکسیدانی، کاهش پر اکسیداسیون لیپیدی، افزایش غلظت تستوسترون و کاهش رادیکال های آزاد تولید شده، از آسیب بافتی و آپوپتوز سلول های اسپرماتوژنیک و سرتولی جلوگیری می‌کند (۳۷و۱۹). با توجه به اینکه جمعیت سلول های اسپرماتوژنیک و سرتولی ارتباط تنگاتنگی با ارتفاع و قطر لوله های منی ساز دارند، بنابراین می توان اینگونه توجیه کرد که ان استیل سیستئین با ممانعت از دژنره شدن و افزایش جمعیت سلول های اسپرماتوژنیک و سرتولی موجب افزایش قطر و ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی لوله های منی ساز می شود (۳۷).

در این تحقیق همچنین، میانگین تعداد سلول های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید گرد و دراز و سلول های سرتولی در گروه تیمار با نانوذرات اکسید روی نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری یافت. مطالعات قبلی انجام شده نیز این یافته ها را تایید می کند (۳۴و۱۰و۹). نانو ساختارها پس از نفوذ به سلول های لیدیگ و سلول های سرتولی با القا آپوپتوز (۱۰) موجب اختلال در مورفولوژی سلول های اپی‌تلیوم لوله های اسپرم ساز بیضه می شوند (۹). تحقیقات نشان داده است نانوذرات اکسید روی از طریق کاهش بیان پروتئین ها همچنین تخریب غشاء سلولی و غشاء خارجی میتوکندری و افزایش معنی دار استرس اکسیداتیو و پاسخ های التهابی در سلول های سرتولی منجر به تضعیف سد خونی بیضه ای شده و با کاهش بیان ژن های مربوط به اتصالات محکم در این سلول ها منجر به وسیع تر شدن منافذ این سد و تسهیل ورود نانو ساختارها در بافت های تولید کننده اسپرم می شود (۳۸). در این تحقیق تیمار با ان استیل سیستئین توانست به طور معنی داری تعداد سلول های جنسی و سرتولی را افزایش دهد. با توجه به سایر تحقیقات احتمال می رود که ان استیل سیستئین سلول های زایای بیضه را به وسیله تنظیم مسیرهای آپوپتوز از مرگ سلولی نجات داده (۲۳) و یا از طریق پیشگیری از آسیب اکسیداتیو در شبکه آندوپلاسمی بیضه از تخریب و مرگ سلول های بیضه جلوگیری کند (۱۹). مطالعات نشان داده است ان استیل سیستئین نقش بسیار مهمی در مسیر خنثی سازی مواد سمی از جمله زنوبیوتیک ها (مواد بیگانه برای دستگاه زیستی)، ترکیبات پر اکسید و دیگر مولکول های تولید کننده رادیکال آزاد داشته (۴۱-۳۹) همچنین قادر است بسیاری از ترکیبات پیش التهابی و ژن های آنتی آپوپتوتیک را تنظیم کند (۴۳و۴۲).

باتوجه به نتایج این پژوهش ان استیل سیستئین قادر است از آسیب بافتی بیضه و کاهش اسپرماتوژنز ناشی از نانوذرات اکسید روی در بافت بیضه موش جلوگیری نماید. به نظر می رسد اصلی ترین عامل ایجاد کننده آسیب های ناشی از نانوذرات اکسید روی استرس اکسیداتیو باشد چرا که ان استیل سیستئین به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی توانست از سمیت القا شده توسط نانوذرات روی جلوگیری نماید. با این حال برای ارائه مکانیسم دقیق مطالعات بیشتری لازم و ضروری است.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از دانشگاه اراک به جهت حمایت مالی و همچنین از زحمات کارشناسان آزمایشگاه تحقیقاتی فیزیولوژی جانوری دانشکده زیست شناسی دانشگاه اراک قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.16.2]
[DOI: 10.22088/jbums.24.1.109]

References

1.Yildirimer L, Thanh NT, Loizidou M, Seifalian AM. Toxicological considerations of clinically applicable nanoparticles. Nano Today. 2011;6(6):585-607.

2.Kumar SS, Venkateswarlu P, Rao VR, Rao GN. Synthesis, characterization and optical properties of zinc oxide nanoparticles. Int Nano Lett. 2013;3(1):30.

3.Jiang J, Pi J, Cai J. The advancing of zinc oxide nanoparticles for biomedical applications. Bioinorg Chem Appl. 2018;2018:1062562.

4.Kessler R. Engineered nanoparticles in consumer products: understanding a new ingredient. Environ Health Perspect. 2011;119(3):A120-A5.

5.Mohammadi T, Hoveizi E, Khajehpour L, Jelodar Z. Protective Effects of Zinc Oxide Nanoparticles on Testis Histological Structure in Cyclophosphamide Treated Adult Mice. J Mazandaran Univ Med Sci. 2017;26(144):19-27. [In Persian]

6.Sharma V, Singh P, Pandey AK, Dhawan A. Induction of oxidative stress, DNA damage and apoptosis in mouse liver after sub-acute oral exposure to zinc oxide nanoparticles. Mutat Res. 2012;745(1-2):84-91.

7.Pati R, Das I, Mehta RK, Sahu R, Sonawane A. Zinc-Oxide Nanoparticles Exhibit Genotoxic, Clastogenic, Cytotoxic and Actin Depolymerization Effects by Inducing Oxidative Stress Responses in Macrophages and Adult Mice. Toxicol Sci. 2016;150(2):454-72.

8.Ghosh M, Sinha S, Jothiramajayam M, Jana A, Nag A, Mukherjee A. Cyto-genotoxicity and oxidative stress induced by zinc oxide nanoparticle in human lymphocyte cells in vitro and Swiss albino male mice in vivo. Food Chem Toxicol. 2016;97:286-96.

9.Shen J, Yang D, Zhou X, Wang Y, Tang S, Yin H, et al. Role of Autophagy in Zinc Oxide Nanoparticles-Induced Apoptosis of Mouse LEYDIG Cells. Int J Mol Sci. 2019;20(16):4042.

10.Han Z, Yan Q, Ge W, Liu Z-G, Gurunathan S, De Felici M, et al. Cytotoxic effects of ZnO nanoparticles on mouse testicular cells. Int J Nanomedicine. 2016;11:5187-203.

11.Liu Q, Xu C, Ji G, Liu H, Mo Y, Tollerud DJ, et al. Sublethal effects of zinc oxide nanoparticles on male reproductive cells. Toxicol In Vitro. 2016;35:131-8.

12.Mozaffari Z, Parivar K, Hayati Roodbari N, Irani S. Histopathological Evaluation of the Toxic Effects of Zinc Oxide (ZnO) Nanoparticles on Testicular Tissue of NMRI Adult Mice. Adv Stud Biol. 2015;7(6):275-91.

13.Mokhtari V, Afsharian P, Shahhoseini M, Kalantar SM, Moini A. A review on various uses of N-acetyl cysteine. Cell J. 2017;19(1):11-7.

14.Gholamloo M, Jafari M. Study of Effect of N-Acetyl Cysteine on Reduction of Paraoxon-Induced Oxidative Stress in Brain and Heart Tissues. Health Res J. 2017;2(2):77-85. [In Persian]

15.Zargari O, Kianifar K. Clinical applications of N-acetylcysteine in dermatology. J Dermatol Cosmet. 2010;1(4):201-6. [In Persian]

16.Jannatifar R, Parivar K, Hayati Roodbari N, Nasr-Esfahani MH. Effects of N-acetyl-cysteine supplementation on sperm quality, chromatin integrity and level of oxidative stress in infertile men. Reprod Biol Endocrinol. 2019;17(1):24.

17.Pei Y, Liu H, Yang Y, Yang Y, Jiao Y, Tay FR, et al. Biological activities and potential oral applications of N-acetylcysteine: progress and prospects. Oxid Med Cell Longev. 2018;2018:2835787.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.16.2]
[DOI: 10.22088/jbums.24.1.109]

18.Hassanzadeh Moghadam M, Shariati M, Naeimi S, Edalatmanesh MA. Study of the Protective Effect of N-acetylcysteine on Testicular Tissue and Spermatogenesis Cells in Streptozotocin-diabetic Adult Rats. Alborz Univ Med J. 2019;8(4):343-54. [In Persian]
19.Ji Y-L, Wang H, Zhang C, Zhang Y, Zhao M, Chen Y-H, et al. N-acetylcysteine protects against cadmium-induced germ cell apoptosis by inhibiting endoplasmic reticulum stress in testes. Asian J Androl. 2013;15(2):290-6.
20.Talebi AR, Khorsandi L, Moridian M. The effect of zinc oxide nanoparticles on mouse spermatogenesis. J Assist Reprod Genet. 2013;30(9):1203-9.
21.Abbasalipourkabir R, Moradi H, Zarei S, Asadi S, Salehzadeh A, Ghafourikhosroshahi A, et al. Toxicity of zinc oxide nanoparticles on adult male Wistar rats. Food Chem Toxicol. 2015;84:154-60.
22.Feng D, Huang H, Yang Y, Yan T, Jin Y, Cheng X, et al. Ameliorative effects of N-acetylcysteine on fluoride-induced oxidative stress and DNA damage in male rats' testis. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen. 2015;792:35-45.
23.Maheshwari A, Misro MM, Aggarwal A, Sharma RK. N-acetyl-L-cysteine modulates multiple signaling pathways to rescue male germ cells from apoptosis induced by chronic hCG administration to rats. Apoptosis. 2012;17(6):551-65.
24.Kumari M, Singh P. Study on the reproductive organs and fertility of the male mice following administration of metronidazole. Int J Fertil Steril. 2013;7(3):225-38.
25.Soleimani Mehranjani M, Mahmoodi M. Stereology principles, Techniques and Its Application in Histology. Iran, Arak: Arak University Press; 2014. p.108-9. [In Persian]
26.Noorafshan A, Karbalay-Doust S, Mesbah Ardekani F. High doses of nandrolone decanoate reduce volume of testis and length of seminiferous tubules in rats. APMIS. 2005;113(2):122-5.
27.Noorafshan A. Stereology as a valuable tool in the toolbox of testicular research. Ann Anat. 2014;196(1):57-66.
28.Soleimani Mehranjani M, Hatamikia N, Naderi Noreini S. Curcumin Protects Mice Testicular Tissue against the Adverse Effects of Sodium Arsenite: A Stereological Study. J Kerman Univ Med Sci. 2016;23(6):714-26. [In Persian]
29.Malmir M, Faraji T, Naderi Noreini S, Soleimani Mehranjani M. Protective Antioxidant Effects of N-acetylcysteine on Testicular Tissue and Serum Testosterone in Paranonylphenol-Treated Mice (A Stereological Analysis). Reprod Syst Sex Disord. 2018;7(2):1000225.
30.Radhi MJ, Al-Bairuty GA. Effect of Zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) on weights of some reproductive organs and sperm abnormalities in the tail of epididymis of albino mice. J Pharm Sci Res. 2019;11(1):243-6.
31.Moatamed ER, Hussein AA, El-desoky MM, Khayat ZE. Comparative study of zinc oxide nanoparticles and its bulk form on liver function of Wistar rat. Toxicol Ind Health. 2019;35(10):627-37.
32.Caneguim BH, Cerri PS, Spolidório LC, Miraglia SM, Sasso-Cerri E. Structural alterations in the seminiferous tubules of rats treated with immunosuppressor tacrolimus. Reprod Biol Endocrinol. 2009;7:19.
33.Tang Y, Chen B, Hong W, Chen L, Yao L, Zhao Y, et al. ZnO Nanoparticles Induced Male Reproductive Toxicity Based on the Effects on the Endoplasmic Reticulum Stress Signaling Pathway. Int J Nanomedicine. 2019;14:9563-76.
34.Ng KW, Khoo SP, Heng BC, Setyawati MI, Tan EC, Zhao X, et al. The role of the tumor suppressor p53 pathway in the cellular DNA damage response to zinc oxide nanoparticles. Biomaterials. 2011;32(32):8218-25.
35.Salman RA. The Influence of ZnO NPs on Reproductive System Tissues of Albino Male Mice. Histopathological Study. Int J Sci Res. 2017;6(7):2021-5.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.16.2]
[DOI: 10.22088/jbums.24.1.109]

36.Ahmed AF, Ibrahim IA, Amira FA, Mokhtar HE, Morsy MM. Effect of Zinc Oxide Nanoparticles on the Structure of Testis of Adult Albino Rats and the Possible Protective Role of Naringenin. Med J Cairo Univ. 2019:87(5):3469-83.

37.Uyeturk U, Cetinkaya A, Ozyalvacli G, Kin Tekce B, Ozyalvacli ME, Kemahli E, et al. Protective effects of N-acetylcysteine on experimentally undescended testis. J Urol. 2014;191(4):1168-73.

38.Javadi A, Farzaneh M, Mokhtar S, Azimirad R, Esfandiari F, Gourabi H. Mechanisms of the Effects of Zinc Oxide Nanostructures on Living Cells. J Fasa Univ Med Sci. 2020;10(1):1998-2011. [In Persian]

39.Santus P, Corsico A, Solidoro P, Braido F, Di Marco F, Scichilone N. Oxidative stress and respiratory system: pharmacological and clinical reappraisal of N-acetylcysteine. COPD. 2014;11(6):705-17.

40.Aldini G, Altomare A, Baron G, Vistoli G, Carini M, Borsani L, et al. N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why. Free Radic Res. 2018;52(7):751-62.

41.Barekat F, Tavalaee M, Deemeh MR, Bahreinian M, Azadi L, Abbasi H, et al. A Preliminary Study: N-acetyl-L-cysteine Improves Semen Quality following Varicocelectomy. Int J Fertil Steril. 2016;10(1):120-6.

42.Marmolino D, Manto M. Past, present and future therapeutics for cerebellar ataxias. Curr Neuropharmacol. 2010;8(1):41-61.

43.Ciftci H, Verit A, Savas M, Yeni E, Erel O. Effects of N-acetylcysteine on semen parameters and oxidative/antioxidant status. Urology. 2009;74(1):73-6.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.16.2]

[DOI: 10.22088/jbums.24.1.109]