

بررسی تغییرات هیستوپاتولوژی کبد و فعالیت آنزیم‌های آمینوترانسفراز و آلکالن فسفاتاز در موش باردار نژاد NMRI پس از مواجهه با نانوذرات اکسید منیزیم (MgO)

دکتر باقر سید علیپور^۱، رویا فتاحی^۲، دکتر رمضان خان بابایی^۳، دکتر روح اله عبدالله پور^۴

نویسنده‌ی مسؤل: گروه زیست سلولی و مولکولی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر

b.alipour81@gmail.com

دریافت: ۹۳/۲/۲۰ پذیرش: ۹۴/۶/۸

چکیده

زمینه و هدف: نانوذرات اکسید منیزیم به طور گسترده در زمینه‌های زیادی از جمله جذب، کاتالیز، الکترونیک، سرامیک و ضد باکتری مورد استفاده قرار می‌گیرند. هدف از این مطالعه بررسی اثر نانوذره اکسید منیزیم بر تغییرات هیستوپاتولوژی و بیومارکرهای آسیب به کبد آمینوترانسفراز و آلکالن فسفاتاز (ALT, AST, ALP) در موش باردار نژاد NMRI می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه‌ی تجربی، ۳۵ سر موش ماده نژاد NMRI به‌طور تصادفی به یک گروه کنترل و چهار گروه تیمار تقسیم شدند ($n=7$). به موش‌های گروه‌های تیمار، نانو ذره اکسید منیزیم با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد. پس از خونگیری از گوشه‌ی داخلی چشم و جدا کردن سرم، فعالیت آنزیم‌های کبد آنالیز شد. سپس، همه‌ی موش‌ها به وسیله‌ی جابجایی مهره گردن کشته شدند و نمونه‌های بافتی برای ارزیابی هیستولوژی با هماتوکسیلین و اتوزین رنگ آمیزی شدند. آنالیز آماری با استفاده از SAS انجام گردید.

یافته‌ها: غلظت‌های مختلف نانو ذرات اکسید منیزیم اثر معنی‌داری بر وزن کبد و وزن بدن نداشت. فعالیت آنزیم‌های سرم مرتبط با کبد در تمام غلظت‌های نانوذره اکسید منیزیم در سطح کمتر از پنج صدم نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری یافت ($P < 0.05$). در مطالعه‌ی هیستوپاتولوژی، تجمع و تقسیم سلولی در اطراف مجاری سینوسی، تخریب سلول‌های کبدی، ارتشاح سلول‌های التهابی و دژنراسانس در اطراف ورید مرکزی مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: پارامترهای بیوشیمیایی و یافته‌های هیستوپاتولوژی کبد نشان داد که قرار گرفتن در معرض نانوذره اکسید منیزیم می‌تواند درجات مختلفی از آسیب کبدی در مسیر وابسته به دوز القا کند.

واژگان کلیدی: نانوذرات اکسید منیزیم، موش NMRI، ارتشاح سلول‌های التهابی، آمینوترانسفراز، آلکالن فسفاتاز

۱- دکترای تخصصی بیوشیمی، استادیار گروه زیست سلولی و مولکولی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر

۲- کارشناس ارشد تکوین جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم شهر، قائم شهر

۳- دکترای تخصصی تکوین جانوری، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم شهر، قائم شهر

۴- دکترای تخصصی علوم دامی، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم شهر، قائم شهر

مقدمه

فناوری نانو شامل دستکاری مواد و ایجاد ساختارها و سیستم‌هایی است که در مقیاس اتم‌ها و مولکول‌ها می‌باشند. با گذر از میکرو ذرات به نانوذرات با قطر کوچکتر از ۱۰۰ نانومتر (۱) با تغییر برخی از خواص فیزیکی روبه‌رو می‌شویم. افزایش نسبت مساحت سطح به حجم که به تدریج با کاهش اندازه ذره رخ می‌دهد، واکنش‌پذیری نانوذرات را به شدت افزایش می‌دهد. در میان نانوذرات، اکسید منیزیم به‌عنوان یک اکسید فلزی خاکی بسیار مهم، برای استفاده در واکنش‌های کاتالیستی و تصفیه‌ی پساب‌ها کاربرد دارد. نتایج برخی از محققین نشان می‌دهد نانو ذرات اکسید منیزیم ظرفیت بالایی در جذب و تجزیه‌ی آلاینده‌ها، ساخت مواد عایق و مقاوم در برابر دمای بالا نشان می‌دهد (۲).

تاکنون مطالعات گوناگونی در ارتباط با سایتوتوکسیسیته نانوذرات انجام شده است که در این بین اندازه، ساختار، شکل نانوذره و مشخصات سطحی نانوذره تاثیر مهمی بر میزان سمیت نانوذره دارند (۳و۴). نانو ذرات می‌توانند از موانع فیزیولوژیک نفوذ کنند و وارد سیستم گردش خون میزبان شوند و با رسیدن به بافت‌های بدن و اندام‌ها، در فرایندهای سلولی اختلال ایجاد نموده و سبب بیماری شوند (۵). توزیع نانوذرات در بافت‌ها و اندام‌ها به علت اندازه‌ی کوچک آن‌ها و ایجاد تغییرات ساختاری و هیستوپاتولوژیکی و همچنین دیستروپی و نکروز بافتی باعث نگرانی شده است (۶). آن‌ها همچنین می‌توانند بر سیستم ایمنی بدن با القای پاسخ‌ها یا حساسیت‌های آلرژیک، یا با فعال کردن سلول‌های سیستم رتیکولو اندوتلیال تاثیر بگذارند (۷). مطالعات گوناگونی در رابطه با تاثیر سمیت نانوذرات انجام شده است و سمیت سلولی نانوذرات اکسید تیتانیوم، اکسید روی، نقره و طلا بر روی سلول‌های پوست، ماکروفاژ، قلب، کبد، کلیه مورد بررسی قرار گرفته است (۸). در مطالعه‌ی حیدر نژاد و همکاران پس از تیمار موش سوری با نانوذره نقره، تغییری در

عملکرد کبد موش سفید آزمایشگاهی و سطح سرمی آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) مشاهده نشد (۹). پایداری بالا، زیست سازگاری و سمیت کم از خصوصیات مهم نانوذرات اکسید منیزیم می‌باشد (۱۰). تحقیقات نشان داد نانو ذرات اکسید منیزیم ضد دردی و ضد التهابی و خاصیت آنتی باکتریایی دارد (۱۲ و ۱۱). مطالعات دیگری نشان داد استنشاق نانوذره اکسید منیزیم در رت‌ها باعث کاهش استرس اکسیداتیو از طریق کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی می‌شود (۱۳). تاثیر نانوذرات اکسید منیزیم بر سلول‌های عصبی، فیبروبلاست و سلول‌های تک هسته‌ای خون سبب پیامدهای پاتوفیزیولوژی، تغییرات مورفولوژی و مرگ سلولی شده است (۱۵ و ۱۴). اخیرا اثر سمیت سلولی نانوذره اکسید منیزیم بر سلول‌های اندوتلیال رگ‌های بندناف انسانی و سلول‌های اندوتلیال میکروواسکولار قلبی عروقی انسان گزارش شد که وابسته به زمان مواجهه، اندازه نانوذره و غلظت می‌باشد (۱۶ و ۱۷). در میان نانومواد اکسید فلزی، نانوذره اکسید منیزیم به خاطر کم هزینه بودن و زیست سازگاری از اهمیت خاص برخوردار می‌باشد. همچنین مطالعات نشان داد توکسیسیته نانوذرات اکسید منیزیم در مقایسه با نانوذرات دیگر همانند ZnO و TiO₂ با اندازه یکسان کمتر می‌باشد (۱۸). مکانیسم‌های مختلفی برای توجیه اعمال آسیب رسان نانوذرات مطرح می‌شود. سمیت نانوذرات اساسا وابسته به میان کنش نانوذرات و زیست مولکول‌ها می‌باشد. تولید ROS و القای استرس اکسیداتیو مکانیسم‌های سمیت‌زایی اصلی نانوذرات می‌باشند. استرس اکسیداتیو که در اثر نانوذرات ایجاد می‌شود به خصوص نانوذرات فلزی می‌تواند باعث تولید ROS شوند. بنابراین با افزایش تولید ROS، نانوذرات می‌تواند باعث تخریب DNA، آزاد سازی Ca²⁺ درون سلولی، اختلال عملکرد میتوکندری و مرگ سلول شوند (۲۰ و ۱۹). نانوذرات قادر به عبور از غشاهای زیستی هستند و به سلول‌ها، بافت‌ها و اعضای که اجازه عبور

مواد در اندازه‌های معمول را نمی‌دهند، وارد می‌شوند و ممکن است به مدت طولانی در بدن باقی بمانند، از این رو، بررسی سمیت آن‌ها از موارد مهم و قابل مطالعه به‌شمار می‌رود. با توجه به این که بیشتر سموم وارد شده به بدن وارد کبد می‌شوند، بررسی تغییرات بافتی کبد و تغییرات آنزیم‌های کبدی شامل آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) و آلکالین فسفاتاز (ALP) در ارزیابی نحوه‌ی عملکرد سلول‌های کبدی به‌عنوان تست‌های استاندارد حایز اهمیت می‌باشد. با بررسی مطالعات گذشته به نظر می‌رسد تاکنون مطالعه‌ی اثر نانوذره اکسید منیزیم با اندازه ۲۰ نانومتر بر کبد موش باردار نژاد NMRI صورت نگرفته است. لذا این مطالعه با هدف بررسی تاثیر نانوذرات اکسید منیزیم بر کبد موش باردار به علت حساسیت بیشتر در طول بارداری و همچنین تاثیر مضاعف استرس بارداری و حجم ضایعات ناشی از نانوذره اکسید منیزیم بر بافت کبد و ارزیابی آنزیم‌های کبدی انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه ی تجربی از ۳۵ سر موش ماده نژاد NMRI با میانگین وزنی ۲۵ تا ۳۵ گرم استفاده شد. این حیوانات از انستیتو پاستور آمل خریداری شدند و به‌منظور آماده سازی برای آزمایش به مدت دو هفته در حیوان خانه در قفس‌های پلی وینیل کربنات در شرایط دمایی 23 ± 2 درجه‌ی سانتی گراد و رطوبت 60 ± 10 درصد و با چرخه روشنایی- تاریکی ثابت (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و همچنین دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. کلیه‌ی قوانین و اصول اخلاقی در رابطه با استفاده از حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد. نانوذره اکسید منیزیم مورد استفاده در این آزمایش از شرکت نانوسونی (Nanosany Company, Mashhad, Iran) تهیه شد که به شکل پودر سفید با ذراتی به ابعاد ۲۰ نانومتر و درصد خلوص

۹۸ درصد می‌باشد. برای مشخص کردن اینکه چه مقدار از نانو اکسید منیزیم باید مورد استفاده قرار گیرد در این تحقیق بر اساس پایلوت‌های انجام گرفته قبل از شروع کار و مشابهت با دوزهای مورد استفاده محققین در بررسی سمیت نانوذره اکسید منیزیم انجام شد (۲۱). بنابراین در این آزمایش دوزهای ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم استفاده شد. در ابتدا غلظت‌های مورد نظر از نانو ذره اکسید منیزیم به‌وسیله آب مقطر دیونیزه تهیه شد. سپس در شرایط استریل، نیم سی‌سی از نانو ذره اکسید منیزیم به صورت داخل صفاقی (IP) به هر موش تزریق شد و وزن موش‌ها قبل از شروع بارداری اندازه‌گیری شد (وزن موش‌ها قبل از شروع بارداری با W_0 (Weight ۰) معرفی شد). جهت انجام جفت گیری ۲ الی ۳ سر موش ماده انتخاب و به همراه ۱ سر موش نر درون قفس قرار داده شد و با مشاهده پلاک واژنی، روز صفر حاملگی در نظر گرفته شد. موش‌های باردار در قفس جداگانه نگهداری شدند و برای گروه‌بندی انتخاب گردیدند. موش‌های سوری به‌صورت تصادفی به پنج گروه هفت‌تایی (یک کنترل و ۴ تیمار) تقسیم شدند. به گروه‌های تیمار، نانو ذره اکسید منیزیم با قطر ۲۰ نانومتر و با غلظت ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت یک روز درمیان با حجم نیم سی‌سی و با سرنگ انسولینی تزریق شد. به گروه کنترل فقط نیم سی‌سی آب مقطر دیونیزه تزریق شد. بعد از هفت بار تزریق که به صورت یک روز درمیان انجام شد وزن موش اندازه‌گیری شد که با W_1 الی W_7 (Weight ۱) الی W_7 (Weight ۷) نشان داده شد. در روز ۱۷ بارداری، ابتدا خونگیری از گوشه داخلی چشم حیوانات با کمک لوله موینه انجام شد. خون گرفته شده به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ شده تا سرم از لخته جدا شود. سنجش فعالیت آنزیم کبدی آسپاراتات آمینو ترانسفراز (AST) با استفاده از کیت آنزیمی CO بیوشیمی (شرکت پارس آزمون lot NO. ۹۲۰۰۳)، آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) با استفاده

یافته ها

نتایج بررسی اثر نانوذره اکسید منیزیم با قطر ۲۰ نانومتر به صورت تزریق درون صفاقی به موش نژاد NMRI نشان داد که وزن اولیه‌ی موش‌ها در وزن موش‌ها در تمام روزها موثر بود ($P < 0/05$). وزن موش‌ها در هفتمین تزریق دوران بارداری (W_7) بر وزن کبد آن‌ها اثرگذار بود ($P < 0/05$). W_7 و وزن کبد موش‌ها بر میزان غلظت آنزیم‌های کبدی اثری نداشت ($P > 0/05$). سطوح مورد آزمایش از غلظت نانوذره اکسید منیزیم بر وزن‌های مختلف موش‌ها و وزن کبد آن‌ها اثر معنی‌داری نداشت ($P > 0/05$), هرچند در مورد وزن کبد اثر آن نزدیک به معنی‌داری بود (جدول ۱).

در نمودارهای ۱، ۲ و ۳، خط رگرسیونی به همراه دو خط دامنه اطمینان ۹۵ درصد بالا و پایین، چگونگی تبعیت غلظت آنزیم‌های کبدی از سطوح آزمایشی غلظت نانوذره اکسید منیزیم را نشان می‌دهد. همچنین در این نمودارها معادله رگرسیونی، سطح معنی‌داری ضریب رگرسیونی (P), ضریب تبیین مدل (R^2) و تعداد مشاهدات (n) آورده شده است. همان طور که در این نمودارها مشاهده می‌شود ضریب رگرسیونی برای هر سه آنزیم مثبت و معنی‌دار ($P < 0/05$) بوده است، که نشان‌دهنده‌ی افزایشی بودن تغییرات غلظت آنزیم‌های ALT, AST و ALP در برابر سطوح آزمایشی نانوذره اکسید منیزیم است. نتایج نشان داد غلظت‌های آزمایشی نانوذره اکسید منیزیم روند مشخص و معنی‌داری را در غلظت ALT و AST و ALP ایجاد کرد ($P < 0/05$) به طوری که با افزایش غلظت نانوذره اکسید منیزیم میزان غلظت هر سه آنزیم به طور خطی افزایش یافت. به عبارت دیگر با تزریق نانوذره اکسید منیزیم، غلظت هر سه آنزیم کبدی مورد مطالعه در مقایسه با سطح کنترل افزایش معنی‌داری داشته است ($P < 0/05$).

از کیت آنزیمی CO بیوشیمی (شرکت پارس آزمون lot NO. ۹۲۰۰۵), الکالین فسفاتاز (ALP) با استفاده از کیت آنزیمی CO بیوشیمی (شرکت پارس آزمون lot NO. ۹۲۰۰۵) و توسط روش پیشنهادی فدراسیون بین المللی شیمی بالینی (IFCC) با کمک دستگاه اتوآنالایزر (Roche, Cobas Mira, Swiss) انجام شد. جهت بررسی هیستوپاتولوژی در روز ۱۷ بارداری موش‌ها به روش جابجایی مهره‌های گردنی کشته و کالبد شکافی شدند. سپس کبد از موش‌های مادر خارج گردید و قبل از فیکس کردن وزن کبد توسط ترازوی دیجیتالی اندازه‌گیری شد. برای ارزیابی تغییرات هیستوپاتولوژی، کبد‌ها در درون شیشه‌های محتوی محلول بوئن تثبیت شدند. سپس مراحل پاساژ بافتی، تهیه قالب‌های پارافینی و تهیه برش‌های ۵ میکرونی توسط میکروتوم (Leitz 1512, Germany) انجام شد و با روش هماتوکسیلین اتوزین رنگ‌آمیزی شدند. سپس نمونه‌های بافتی تحت مطالعات میکروسکوپی و هیستوپاتولوژیکی قرار گرفتند.

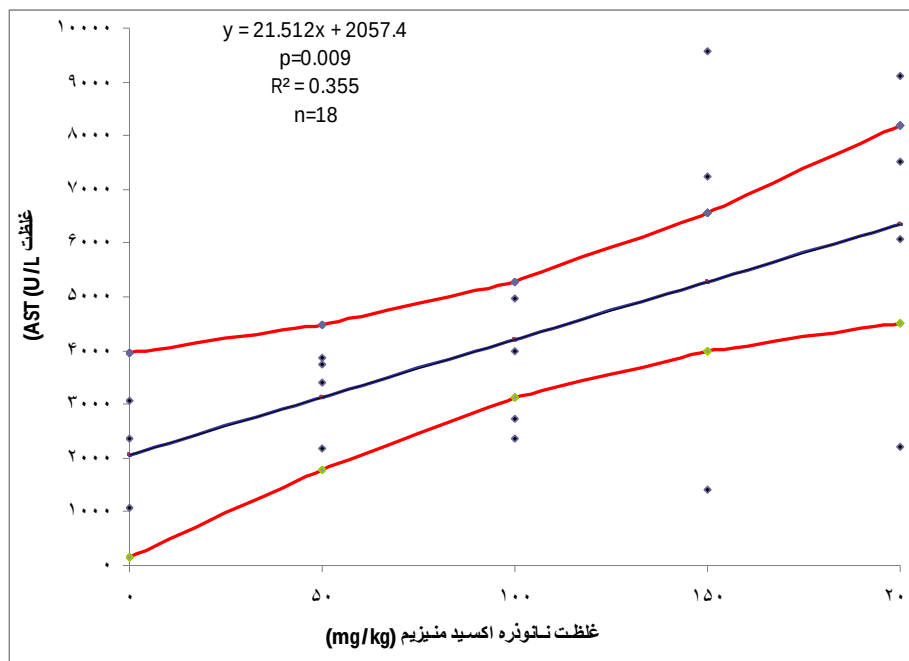
متغیرها و تحلیل داده‌ها: این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد که تیمارها در آن شامل پنج سطح (صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) از نانو ذره اکسید منیزیم بود. متغیرهای وزن روزانه موش‌ها (W_0) و وزن موش‌ها قبل از شروع بارداری، W_1 الی W_7 وزن موش‌ها در دوران بارداری), وزن کبد و غلظت آنزیم‌های کبدی ALT, AST و ALP پس از هفده روز از انجام آزمایش اندازه‌گیری شدند. در مدل‌های رگرسیونی مورد استفاده برای وزن‌های روزانه اثر وزن اولیه در کنار اثر تیمار در نظر گرفته شد. همچنین در مدل رگرسیونی مورد استفاده برای وزن کبد اثر متغیر وزن W_7 آزمایش و در مدل رگرسیونی برازش‌شده برای غلظت آنزیم‌های کبدی، متغیر وزن کبد موش‌ها نیز در کنار اثر تیمار در مدل لحاظ شد. تحلیل‌های آماری با استفاده از رویه GLM (General Linear Model) نرم‌افزار آماری SAS (Statistical Analysis System) نسخه ۹/۱ انجام شد.

جدول ۱: میانگین، انحراف معیار، ضریب رگرسیون از سطح آزمایشی نانوذره اکسید منیزیم به همراه خطای معیار و سطح معنی‌داری آن و ضریب تبیین مدل رگرسیون مورد استفاده برای متغیرهای وزن مورد مطالعه

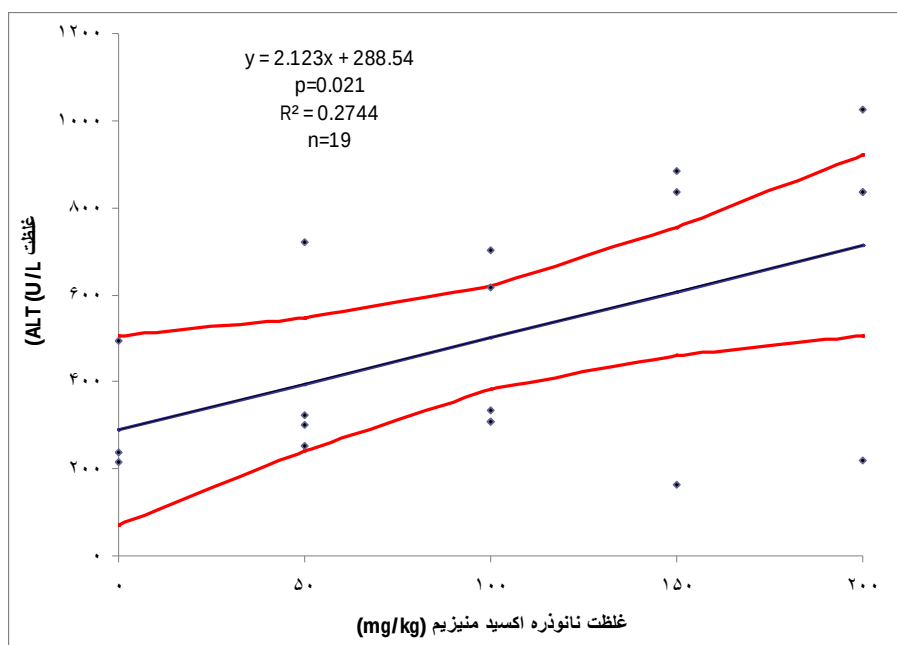
متغیر (گرم)	میانگین	انحراف معیار	عرض از مبدا	ضریب رگرسیون	خطای معیار	سطح معنی‌داری	ضریب تبیین مدل (R^2)
W1	۳۲/۳۸	۵/۸	۸/۶۹۳	۰/۰۰۴	۰/۰۱۳	۰/۷۶	۰/۶۱۴
W2	۳۱/۰۴	۵/۳۷	۱۴/۴۸۹	۰/۰۰۹	۰/۰۱۶	۰/۵۶۲	۰/۳۹۰
W3	۳۱/۳۸	۴/۶۶	۱۵/۲۵۸	۰/۰۰۱	۰/۰۱۳	۰/۹۳۴	۰/۴۲
W4	۳۰/۸۳	۴/۵۶	۱۵/۲۵۵	۰/۰۰۷	۰/۰۱۲	۰/۵۷۵	۰/۴۶۷
W5	۳۲/۸۸	۴/۱۴	۱۷/۷۸۲	۰/۰۰۳	۰/۰۱۱	۰/۷۹۶	۰/۴۹۲
W6	۳۳/۰۹	۴/۳۳	۱۴/۴۵۰	-۰/۰۰۴	۰/۰۱۱	۰/۷۱۵	۰/۵۹۷
W7	۳۶/۰۹	۴/۸۹	۱۶/۴۰۰	-۰/۰۰۷	۰/۰۱۴	۰/۶۳۸	۰/۴۷۲
وزن کبد	۲/۰۵	۰/۲۴	۱/۰۷۷	۰/۰۰۱۴	۰/۰۰۰۷	۰/۰۵۶۸	۰/۴۰۷

ضریب تبیین مدل رگرسیونی برای متغیرهای وزن بدن و وزن کبد (جدول ۱) در مقایسه با ضریب تبیین مدل رگرسیونی برای آنزیم‌های کبدی (نمودارهای ۱، ۲ و ۳)

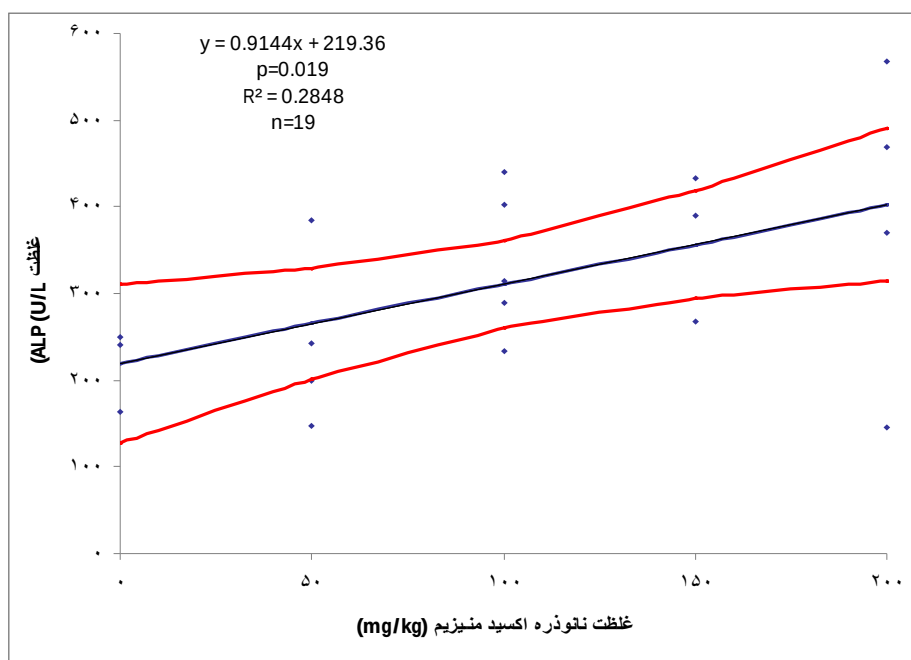
بالا تر بود که می‌تواند بخاطر اثر معنی‌دار متغیر وزن اولیه در مدل وزن‌ها و همچنین معنی‌دار بودن اثر متغیر W7 در مدل وزن کبد باشد.



نمودار ۱: روند تغییرات به همراه دامنه اطمینان ۹۵ درصد غلظت AST در برابر سطوح آزمایشی نانوذره اکسید منیزیم (معادله رگرسیونی غلظت آنزیم کبدی AST (Y) از غلظت‌های آزمایشی نانوذره اکسید منیزیم (X), سطح معنی‌داری ضریب رگرسیون (P), ضریب تبیین مدل (R^2) و تعداد مشاهدات (n) نیز مشخص شده‌اند)



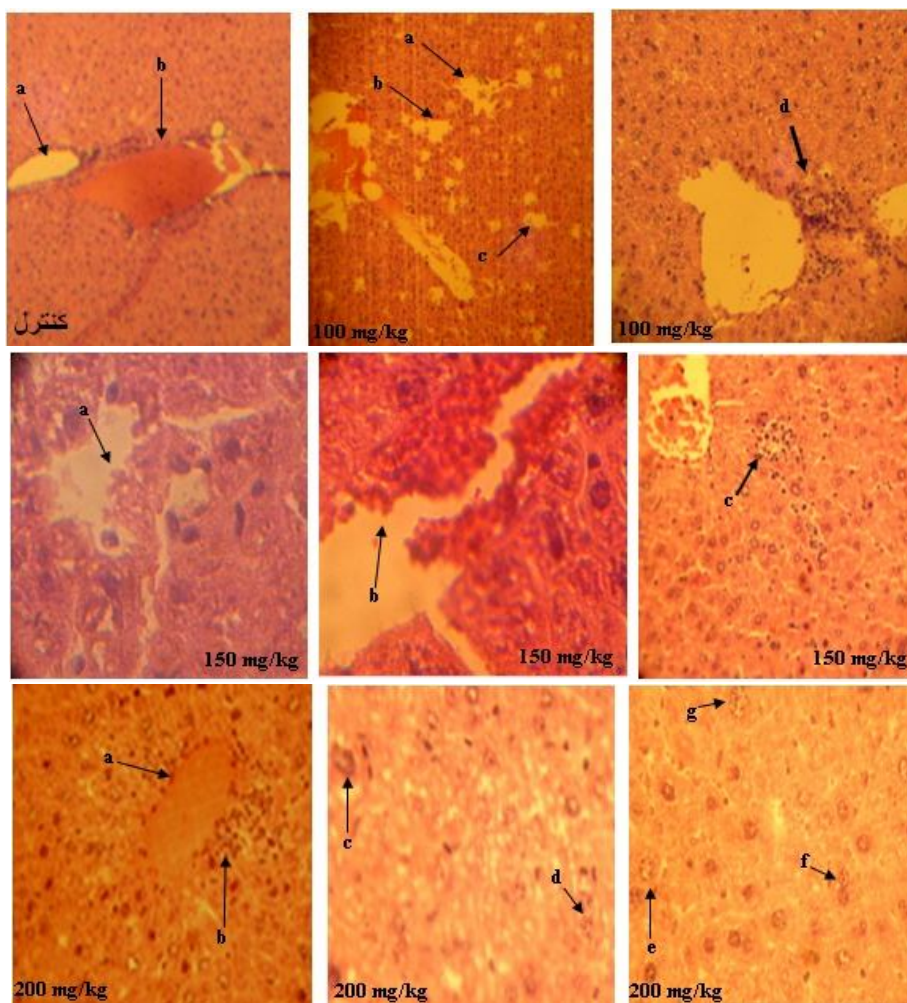
نمودار ۲؛ روند تغییرات به همراه دامنه اطمینان ۹۵ درصد غلظت ALT در برابر سطوح آزمایشی نانوذره اکسید منیزیم (معادله رگرسیونی غلظت آنزیم کبدی ALT (Y) از غلظت‌های آزمایشی نانوذره اکسید منیزیم (X)، سطح معنی‌داری ضریب رگرسیون (P)، ضریب تبیین مدل (R²) و تعداد مشاهدات (n) نیز مشخص شده‌اند)



نمودار ۳؛ روند تغییرات به همراه دامنه اطمینان ۹۵ درصد غلظت ALP در برابر سطوح آزمایشی نانوذره اکسید منیزیم (معادله رگرسیونی غلظت آنزیم کبدی ALP (Y) از غلظت‌های آزمایشی نانوذره اکسید منیزیم (X)، سطح معنی‌داری ضریب رگرسیون (P)، ضریب تبیین مدل (R²) و تعداد مشاهدات (n) نیز مشخص شده‌اند)

غلظت نانوذره اکسید منیزیم تغییرات پاتولوژیک بافت کبد بیشتر شده به طوری که در دوز ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم پرخونی در وریدهای مرکزی لوبولی و سینوزوئیدها، تجمعات سلولی و یا ارتشاح شدید سلولهای دفاعی در پارانشیم کبدی، تخریب و پارگی سلولها و تراوش کردن مواد سلولی به بیرون و همچنین در دوز ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم مرگ سلولی مشاهده گردید (شکل ۱).

نتایج مطالعه هیستوپاتولوژی نشان داد که نانوذره اکسید منیزیم با غلظت‌های مختلف بر روی کبد اثر گذاشت. در گروه کنترل فضای سینوزوئیدی، وریدهای مرکزی و فضاهای پورت به صورت کاملاً واضح و نرمال نمایان بودند. در گروه تیمار با دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم هیچ گونه تغییر پاتولوژیک قابل ملاحظه‌ای دیده نشد. در دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم پدیده حذف و رگ‌زایی مشاهده گردید. با افزایش



شکل ۱: بررسی تغییرات هیستوپاتولوژی کبد بعد از مواجهه با غلظت های مختلف نانوذره اکسید منیزیم

● گروه تیمار با دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم، a، b و c پدیده حذف و d رگ زایی را نشان می‌دهند. رنگ آمیزی H&E. بزرگنمایی ۱۰۰X

● گروه کنترل. بافت نرمال کبد به همراه فضای سینوزوئیدی، (a) مجاری صفراوی (b) ورید پورت، رنگ آمیزی H&E. بزرگنمایی ۱۰۰X

مشهود بود و در دوز ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم سلول‌های بزرگ چند قسمتی و آپوپتوتیک مشاهده شد. برخی نانوذرات با تولید رادیکال‌های آزاد و گونه‌های اکسیژن فعال سمیت ایجاد می‌کنند و احتمالاً رادیکال‌های آزاد با ایجاد پراکسیداسیون لیپیدهای غشای و تخریب ساختمان و عملکرد آن باعث آسیب به کبد و موجب پیر شدن سلول یا آپوپتوز می‌شود (۲۲). با توجه به نتایج مطالعه‌ی حاضر، نانوذره اکسید منیزیم منجر به طیف وسیعی از تغییرات پاتولوژیک در غلظت‌های ۱۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم در موش نژاد NMRI گردید که با نتایج مطالعه‌ی مظاهری و همکاران در رابطه با سمیت نانوذره MgO با اندازه ۱۰ تا ۱۵ نانومتری بر روی موش‌های نر نژاد ویستار مطابقت ندارد (۲۳) که این تفاوت ممکن است به علت غلظت‌های نانوذره مورد استفاده و اندازه نانو ذره باشد. در حالی که نتایج این مطالعه با نتایج مطالعه‌ی ضیایی و همکاران در خصوص ایجاد تغییرات هیستوپاتولوژی موش سوری در مواجهه با نانو ذرات طلا (۲۴) و همچنین با نتایج مطالعه‌ی عرب نژاد و همکاران که حاکی از ایجاد تغییرات بافتی کبد و کلیه در مواجهه با نانوذرات اکسید منیزیم می‌باشد، همخوانی دارد (۲۱). سلول‌های اندوتلیال جدار عروق خونی در کبد دارای منافذ بیش از ۱۰۰ نانومتر می‌باشد، بنابراین با توجه به مطالعات قبلی در ارتباط با نانوذرات، نانوذره اکسید منیزیم استفاده شده در این مطالعه با قطر ۲۰ نانومتر به آسانی از دیواره عروق خونی بافت کبد عبور کرده و وارد این اندام شده است. لاسگنا و همکارانش در سال ۲۰۱۰ گزارش کردند عمده نانوذرات بعد از تجویز و ورود به گردش خون در کبد و طحال تجمع پیدا می‌کنند (۲۵). نانوذرات از جمله اکسید منیزیم می‌توانند از طریق پوست، بافت‌های آسیب دیده، تزریق، سیستم بویایی، تنفسی و گوارشی وارد سیستم میزبان شوند پس از عبور از غشای سلولی در بافت هدف مستقر شوند (۲۶). یافته‌های پژوهشی در ارتباط با تاثیر نانوذرات

● گروه تیمار با دوز ۱۵۰ میلی گرم در کیلوگرم، (a) تخریب و پارگی سلول‌ها و تراوش کردن مواد سلولی به بیرون، (b) خونریزی شدید در بافت کبدی و (c) نشان دهنده‌ی تجمع‌ات و تقسیمات سلولی فراوان. رنگ آمیزی H&E. بزرگنمایی ۴۰۰X

● گروه تیمار با دوز ۲۰۰ میلی گرم در کیلوگرم، (a) نشان دهنده‌ی خونریزی شدید و مجاری پر از خون، (b) تجمع‌ات سلولی زیادی را در اطراف سینوزوئیدهای کبدی نشان می‌دهد. c, d, e, f و g نشان دهنده‌ی سلول‌های بزرگ چند قسمتی و مشاهده مرگ سلولی می‌باشد. رنگ آمیزی H&E. بزرگنمایی ۴۰۰X

بحث

در این مطالعه نشان داده شد تزریق درون صفاقی نانوذرات اکسید منیزیم سبب طیفی از تغییرات هیستوپاتولوژی شامل تخریب سلول‌های کبدی، ارتشاح سلول‌های التهابی و دژنراسانس اطراف ورید مرکزی در موش نژاد NMRI شد. به طوری که مطالعه‌ی تغییرات هیستوپاتولوژی انجام شده حاکی از تاثیر پذیری خفیف تا شدید بافت کبد در گروه‌های تیمار بود. در پژوهش حاضر پدیده‌ی حذف و رگ‌زایی در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم مشاهده شد. در کبد سلول‌ها معمولاً دو هسته‌ای هستند، و تقسیم میتوزی نادر می‌باشد ولی با افزایش غلظت نانوذره اکسید منیزیم تجمع‌ات و تقسیمات میتوزی در بافت کبد به خصوص در اطراف مجاری سینوزوئیدی افزایش یافته است. پارگی در هپاتوسیت موجب شد تا مواد سلولی از آن خارج شود، همچنین خون در مجاری صفراوی، پرخونی در وریدهای مرکزی لوبولی و سینوزوئیدها، تجمع‌ات سلولی و یا ارتشاح شدید سلول‌های دفاعی در پارانشیم کبدی مشاهده شد. وبا افزایش دوز نانوذره پرخونی بسیار واضح در بسیاری از وریدهای مرکزی و وریدهای پورت و شریان‌های هپاتیک

اکسید فلزی بر وزن بدن موش نتایج متفاوتی را نشان داد. تجویز خوراکی نانوذره اکسید روی در رت برای ۵ روز متوالی تغییر معنی‌داری در وزن بدن و وزن کبد ایجاد نکرد (۲۷) در حالی که تجویز زیر جلدی نانوذره اکسید منگنز در موش نر نژاد ویستار باعث افزایش وزن موش گردید (۲۸). در راستای نتایج حاصل از مطالعه ما، موش‌هایی که در معرض یک دوز نانوذره اکسید منیزیم قرار گرفتند در مقایسه با کنترل افزایشی در وزن بدن مشاهده نشد (۲۹). این امر می‌تواند به دلیل دفع نانوذره و نرسیدن به حد آستانه و مدت زمان کم باشد، به عبارت دیگر نانوذرات به اندازه‌ی کافی جذب بافت‌ها نمی‌شوند. مطالعات نشان داد وقتی موش به مدت ۳۰ روز در معرض نانوذره اکسید منیزیم قرار گرفت باعث افزایش وزن بدن شد که با نتایج ما مطابقت ندارد. افزایش وزن بدن موش می‌تواند به علت عدم تعادل هورمونی ایجاد شده به وسیله نانوذره اکسید منیزیم باشد و همچنین هر نوع استرس به بدن باعث ترشح بیش از حد هورمون استرس مانند کورتیزول می‌شود که سبب افزایش چربی بدن می‌شود همچنین محققان افزایش استرس اکسیداتیو و اختلال متابولیک را دلایل عمده این تغییرات مطرح می‌کنند (۳۰).

در ارزیابی نحوه عملکرد و آسیب‌های سلول کبدی اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های ALT, AST و ALP از حساسیت نسبتاً خوبی برخوردارند. بر اساس نتایج بیوشیمیایی این مطالعه، مواجهه شدن موش‌های سوری با غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید منیزیم در مقایسه با گروه کنترل موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های سرمی ALT, AST شد. ALT و AST جزء آنزیم‌های غیرعملکردی پلاسما و آنزیم داخل سلولی هستند که به طور طبیعی در سلول‌های برخی از اندام‌ها از جمله کبد قرار گرفته‌اند و همچنین تغییرات ALT سرم عموماً به موازات AST صورت می‌گیرد. بنابراین یکی از دلایل افزایش سطح سرمی این آنزیم‌ها ممکن است تغییر در نفوذپذیری غشای پلاسمایی سلول‌های کبدی و یا صدمات

سلولی حاصل از قرار گرفتن در معرض نانوذرات باشد. نتایج این مطالعه نشان داد با افزایش دوز نانوذره اکسید منیزیم غلظت آنزیم ALT و AST افزایش یافت. بنابراین دلیل افزایش این آنزیم اثر تخریبی نانوذره اکسید منیزیم بر سلول‌های کبدی می‌باشد که با نتایج مطالعه‌ی مظاهری و همکاران در رابطه با سمیت نانوذره اکسید منیزیم با اندازه ۱۰ تا ۱۵ نانومتری با دوز کمتر از ۲۰۰ بخش در میلیون بر روی موش‌های نر نژاد ویستار مطابقت ندارد اما در دوز ۲۵۰ و ۵۰۰ بخش در میلیون با مطالعات ما همخوانی دارد این تفاوت می‌تواند به علت غلظت‌های نانوذره مورد استفاده و اندازه نانو ذره باشد. نتایج آزمایش ما نشان داد با افزایش غلظت نانوذره اکسید منیزیم فعالیت آنزیم الکالین فسفاتاز به طور معنی‌داری در سطح احتمال کمتر از پنج صدم زیاد شد. بررسی سمیت نانوذره اکسید آهن بر بافت کبد موش صحرایی نژاد ویستار، افزایش سطح آنزیم‌های کبدی و همچنین اثرات نامطلوبی بر روی کبد را نشان داد (۳۱) که با مطالعات ما همخوانی دارد. یکی از مارکرهای بیوشیمیایی برای ارزیابی اختلالات کبدی آنزیم آلکالین فسفاتاز می‌باشد که عمدتاً به غشای سلولی متصل است. شایع‌ترین علل افزایش سطح سرمی الکالین فسفاتاز آسیب مجاری صفراوی و تخریب سلول‌های کبدی می‌باشد. همچنین افزایش آنزیم آلکالین فسفاتاز تا سه برابر میزان طبیعی‌اش در خون، به عنوان شاخصی از بروز مشکل کبدی می‌باشد (۳۲) بنابراین افزایش این آنزیم گواه دیگری برای تایید آسیب‌های کبدی می‌باشد.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از آنالیز آماری آنزیم‌ها با یافته‌های هیستوپاتولوژی کبد، خروج آنزیم‌ها را به داخل گردش خون تایید می‌کند. با توجه به تغییرات آنزیمی به صورت افزایش غلظت پلاسمایی آنزیم‌های داخل سلولی و مشاهده آسیب‌های بافتی در کبد می‌توان انتظار داشت که نانو

هیستوپاتولوژی کبد و کارشناسان آزمایشگاه آقای مهندس قاسمی و سرکار خانم پورقلی که در تهیه نمونه‌ها و بافت‌ها ما را یاری نمودند نهایت تشکر به عمل می‌آید.

ذره اکسید منیزیم منجر به آسیب برگشت ناپذیر در کبد شود.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از جناب آقای دکتر حسینی که در بررسی

References

- 1- Lewinski N, Colvin V, Drezek R: Cytotoxicity of nanoparticles. *Small*. 2008; 4: 26-49.
- 2- Park JY, Lee YJ, Jun KW, Baeg JO, Yim DJ. Chemical synthesis and characterization of highly oil dispersed MgO nanoparticles. *J Ind Eng Chem*. 2006; 12: 882-7.
- 3- Gill S, Lobenberg R, Ku T, Azarmi S, Roa W, Prenner EJ. Nanoparticles: characteristics, mechanisms of action, and toxicity in pulmonary drug delivery review. *J Biomed Nanotechnol*. 2007; 3: 107-19.
- 4- Valeriy V, Baliyepalli S. Modeling the thermodynamics of the interaction of nanoparticles with cell membranes. *Nano letters*. 2007; 7: 3716-22.
- 5- Borm PJA, Robbins D, Haubold S, et al. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Part Fibre Toxicol*. 2006; 3: 11.
- 6- Singh N, Manshian B, Jenkins GJ, et al. Nano genotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*. 2009; 30: 3891-914.
- 7- Zahr AS, Davis CA, Pishko MV. Macrophage uptake of core-shell nanoparticles surface modified with poly (ethylene glycol). *Langmuir*. 2006; 22: 8178-85.

- 8- Hussain SM, Braydich-Stolle LK, Schrand AM, et al. Toxicity evaluation for safe use of anomaterials: recent achievements and technical challenges. *Adv Mater*. 2009; 21: 1549-59.
- 9- Heydarnejad M, Yarmohammadi- Samani P, Mobini-Dehkordi M, Rahnama S. The influence of topical treatment of dermal wounds with silver nanoparticles on alt and ast enzymes and hemoglobin in mice (*Mus Musculus*). *J Zanjan Unive Med Sci*. 2013; 21: 35-44.
- 10- Kumaran RS, Choi YK, Singh V, et al. In vitro cytotoxic evaluation of mgo nanoparticles and their effect on the expression of ROS genes. *Int J Mol Sci*. 2015; 16: 7551-64.
- 11- Jahangiri L1, Kesmati M, Najafzadeh H. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory effect of nanoparticles of magnesium oxide in mice with and without ketamine. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2013; 17: 2706-10.
- 12- Ravikumar S, Gokulakrishnan R, Boomi P. In vitro antibacterial activity of the metal oxide nanoparticles against urinary tract infectious bacterial pathogens. *Asian Pacific J Trop Dis*. 2012: 85-89.
- 13- Kiranmai G1, Reddy AR. Antioxidant status in MgO nanoparticle-exposed rats. *Toxicol Ind Health*. 2013; 29: 897-903.

- 14- Lai JCK, Lai MB, Jandhyam S, et al. Exposure to titanium dioxide and other metallic oxide nanoparticles induces cytotoxicity on human neural cells and fibroblasts. *Int J Nanomedicine*. 2008; 3: 533-39.
- 15- Barkhordari A, Barzegar S, Hekmati Moghaddam H, Jebali A, Fallahzadeh H. The cytotoxic effects of MgO nanoparticles on human blood mononuclear cells. *Occup Med Quat J*. 2012; 3: 9-14 [Persian].
- 16- Ge S, Wang G, Shen Y, et al. Cytotoxic effects of MgO nanoparticles on human umbilical vein endothelial cells in vitro. *IET Nanobiotechnol*. 2011; 5: 36-40.
- 17- Krishnamoorthy K, Moon JY, Hyun HB, Cho SK, Kim SJ. Mechanistic investigation on the toxicity of MgO NPs toward cancer cells. *J Mater Chem*. 2012; 22: 24610-17.
- 18- Vidic J, Stankic S, Haque F, et al. Selective antibacterial effects of mixed ZnMgO nanoparticles. *J Nanopart Res*. 2013; 15: 1595-1604.
- 19- Manke A, Wang L, Rojanasakul Y. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *Biomed Res Int*. 2013; 2013: 15-30.
- 20- Yang H, Liu C, Yang DF, Zhang HS, Xi Z. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: The role of particle size, shape and composition. *J Appl Toxicol*. 2009; 29: 69-78.
- 21- Arabnezhad Khanooki T, Fazilati M. The toxicity effect of magnesium oxide nanoparticles. *Adv Environ Biol*. 2014; 8: 969-973.
- 22- Rastogi ID. Nanotechnology: safety paradigms. *J Toxicol Environ Health*. 2012; 4: 1-12.
- 23- Mazaheri N, Karimi A, Salavati H, Rezaei Zarchi S, Khalilian S, Rezaei Ranjbar Sardari R. Investigating the effect of intraperitoneal injection of magnesium oxide nanoparticles on the liver and kidney function of rat in vivo. *J Shahid Sadoughi Univ Med Sci*. 2014; 22: 1430-38.
- 24- Ziaee Ghahnavieh M, Naghsh N, Dorostkar E. Skin touch effects of gold nanoparticles in male mice. *J Mazandaran Univ Med Sci*. 2014; 23: 225-32.
- 25- Lasagna-Reeves C, Gonzalez-Romero D, Barria MA, et al. Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice. *Biochem Biophysical Res Com*. 2010; 393: 649-55.
- 26- Ge S, Wang G, Shen Y, et al. Cytotoxic effects of MgO nanoparticles on human umbilical vein endothelial cells in vitro. *IET Nanobiotechnol*. 2011; 5(2): 36.
- 27- Ben Slama S, Amara N, Rihane Ben Younes I, et al. Effects of ZnO nanoparticles and ZnCl₂ solution on rat liver and kidney. *Nanotech*. 2013; 3: 3365-68.
- 28- Rezagolian S, Hassanpourezatti M, Mousavi S, Rhamanifar M, Nosrati N. Comparison of chronic administration of manganese oxide micro

- and nanoparticles on liver function parameters in male rats . *Daneshvar*. 2013; 20: 35-46.
- 29- Shamshad MS, Soorambail KS, Prakash VD. Absorption, LD50 and effects of CoO, MgO and PbO nanoparticles on mice (*Mus musculus*). *J Environ Sci Toxicol Food Tech*. 2015; 9: 32-38.
- 30- Buzea C, Blandino IIP, Robbie K. Nanomaterials and NPs: sources and toxicity. *Bio Interphases*. 2007; 2: MR17-MR172.
- 31- Afkhami-Ardakani M, Shirband A, Golzade J, et al. The effect of iron oxide nanoparticles on liver enzymes (ALT, AST and ALP), thyroid hormones (T3 and T4) and TSH in rats. *J Shahrekord Univ Med Sci*. 2013; 14; 82-88.
- 32- Wiwanitkit V. High serum alkaline phosphatase levels, a study in 181 Thai adult hospitalized patients. *BMC Family Practice*. 2001; 2; 2-10.

The Effect of MgO Nanoparticles on Histopathological and Biomarker Changes of liver Injuries (ALT, ALP, and AST) in Pregnant NMRI Mice

Seyedalipour B¹, Fattahi R², Khanbabaee R², Abdollahpour R²

¹Dept. of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

²Dept. of Cellular and Molecular Biology, Qaemshahr Branch, Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran.

Corresponding Author: Dept. of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

E-mail: b.alipour81@gmail.com

Received: 10 May 2014 **Accepted:** 30 Aug 2015

Background and Objectives: The MgO nanoparticles (MgO-NPs) are widely used in many fields such as catalysis, adsorption, electronics, ceramics and antibacterial. The aim of this study was to investigate the effect of MgO-NPs on histopathological and biomarker changes of liver injuries (ALT, ALP, and AST) in pregnant NMRI mice.

Materials and Methods: In this experimental study, thirty five female NMRI mice were randomly allocated to one control group and four experimental groups (n=7). The experimental mice received MgO-NPs at concentrations of 50, 100, 150 and 200 mg/kg intraperitoneally. Blood samples were taken from the inner corners of their eyes, serums were separated and then liver enzyme activities were analyzed. Subsequently, all animals were euthanized via cervical dislocation and tissue samples were stained with Hematoxylin and Eosin for histopathological evaluation. Statistical analysis was performed using SAS software.

Results: Findings assert that different concentrations of MgO-NPs did not bring about any significant effect on liver and body weight. Activity of liver-associated serum enzymes at all concentrations of MgO NPs exhibited a significant increase ($P<0.05$) compared to the control group. In histopathological study, cell accumulation and cell division around sinusoidal ducts, destruction of hepatocytes, inflammatory cell infiltration and cell degeneration around the central vein were observed.

Conclusion: The biochemical parameters and histopathological findings from liver indicated that exposure to MgO-NPs could induce different degrees of damage in a dose dependent manner.

Keywords: MgO nanoparticles, NMRI mice, Inflammatory cell infiltration, Aminotransferase, Alkaline phosphatase