

بررسی اثر نانو اکسید آهن بر رشد و نمو شش جنین موش نژاد NMRI در شرایط *In Vivo*

دکتر پروین خدارحمی^۱، دکتر نسیم حیاتی رودباری^۲، دکتر کاظم پریور^۳، مرجان صادقیان^۴

نویسنده‌ی مسوول: گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، پرند khodarahmiparvin@yahoo.com

دریافت: ۹۴/۷/۲۳ پذیرش: ۹۴/۱۱/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: نانو ذرات اکسید آهن کاربردهای زیادی در پزشکی دارد. نانو ذراتی با ابعاد حدود ۱۰۰ نانومتر هستند. اگرچه مزایای استفاده از نانو ذرات اکسید آهن قابل توجه است، اما شناسایی هرگونه آسیب احتمالی این نانوذرات نیازمند تحقیق بیشتر است. هدف از این مطالعه نیز بررسی اثر سمیت نانوذرات اکسید آهن بر روی ریه‌ی جنین موش‌ها می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه‌ی تجربی، اثرات نانو ذرات اکسید آهن بر رشد و نمو شش جنین موش در شرایط *in vivo* مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه گروه کنترل بدون تزریق، گروه شم با تزریق آب مقطر (حلال نانو اکسید آهن) و گروه‌های تجربی نانو ذرات اکسید آهن با قطر ۲۰ نانومتر در دوزهای کم (۱۰ و ۳۰ و ۵۰ میکروگرم بر کیلوگرم) و دوزهای بالا (۱۰ و ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به موش بارداری در روز ۹ بارداری به صورت درون صفاقی تزریق شد و در روز ۱۶ بارداری جنین‌ها از بدن مادر خارج و شش جنین مورد بررسی قرار گرفت. **یافته‌ها:** نتایج کاهش معنی‌داری در دوزهای ۳۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در طول بدن جنین و در دوزهای ۱۰، ۳۰، ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در وزن جنین و تعداد برنشپول ابتدایی نشان داد. همچنین افزایش معنی‌داری در دوزهای ۳۰ و ۵۰ میکروگرم بر کیلوگرم در وزن و طول شش، در ۱۰، ۳۰، ۵۰ میکروگرم بر کیلوگرم و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در تعداد آلونول جوانه و در دوزهای ۳۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در تعداد سلول نکروتیک مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: نانوذرات اکسید آهن پتانسیل دوگانه‌ای دارد. این ماده در دوزهای کم باعث تکوین شش جنین و در دوز بالا باعث نکروزه شدن بافت شش می‌شود.

واژگان کلیدی: نانو اکسید آهن، سمیت سلولی، تکوین شش

مقدمه

آهن جزء مواد مغذی ضروری برای بدن است که کاهش یا افزایش آن موجب بروز اختلال در عملکرد سلول می‌شود.	رشد، ایجاد تغییراتی در مواد معدنی استخوان و کاهش پاسخ ایمنی بدن می‌گردد (۱). آهن برای بسیاری از پروتئین‌ها مانند پروتئین‌های محتوی هم، پروتئین‌های زنجیره‌ی انتقال
---	--

۱- دکترای تخصصی فیزیولوژی جانوری، استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، پرند

۲- دکترای تکوینی جانوری، استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران

۳- دکترای تکوینی جانوری، استاد گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران

۴- کارشناسی ارشد تکوینی جانوری، گروه زیست شناسی دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران

الکترون، آنزیم‌های متعددی که در تقسیم سلولی، تکثیر DNA، متابولیسم سلولی درگیر هستند، ضروری است. میزان حداقل آهن برای بقا، حیاتی است. مشاهدات متعددی ارتباط محتوای آهن سلول‌ها را با پیشرفت سرطان نشان می‌دهد (۲). در مطالعات انجام شده از حیوانات تجویز مقادیر بیش از حد آهن به صورت خوراکی و تزریقی، افزایش خطر ابتلا به سرطان، (تومورهای کولورکتال، تومورهای پستان، مزوتلیوما، سرطان سلول‌های توبولی کلیوی و سارکوما) را نشان داده است. بیماران مبتلا به هموکروماتوز (افزایش جذب آهن) استعداد بیشتری برای سرطان کبد دارند. تجمع آهن در ناحیه مغز با کاهش عملکرد و از دست دادن سلول همراه است که در بسیاری از بیماری‌های نورولوژیکی مانند پارکینسون و آلزایمر مشاهده شده است (۳). استنشاق غبار آهن موجب بیماری تنفسی پنوموکونیوز (Phenamoconiosis) می‌شود (۴). نانو مواد، ذراتی با قطر کمتر از صد نانومتر در یک بعد ساختمانی هستند که در مقایسه با مواد مشابه با مقیاس میکرومتر خواص ویژه‌ای مانند اندازه‌ی کوچک، منطقه‌ی سطحی بزرگ، شکل و ساختار ویژه دارند (۵). بدین علت می‌توان از آنها در پروسه‌های پزشکی و صنعتی استفاده کرد (۶ و ۷). یکی از مکانیسم‌های اولیه‌ی سمیت نانو ذرات، تولید تعداد بیشتری گونه‌های اکسیژن فعال و رادیکال‌های آزاد است که ممکن است موجب استرس اکسیداتیو، التهاب و در نتیجه آسیب به پروتئین‌ها، غشاء، DNA و تغییر در رونویسی ژن‌ها شود (۸-۱۰ و ۵). بعلاوه، این ذرات نانو ممکن است ناحیه‌ی سطح اپیتلیال در ریه را تحت تاثیر قرار دهند و در راه‌های هوایی پایین‌تر و مناطق آلئولار رسوب کنند (۱۱) و بیماری‌های وابسته به استنشاق نانو ذرات مانند آسم، برونشیت، آمفیزم، سرطان ریه را ایجاد کنند (۸). نانو ذرات اکسید آهن امروزه به طور قابل توجهی در فناوری نانو مورد استفاده قرار می‌گیرد. کاربردهای بیولوژیکی نانو ذرات مغناطیسی بر پایه آهن شامل کاربردهای درمان شناسی،

به‌عنوان سنجش ایمنی، به‌عنوان تصویر برداری برای نقشه‌ی مغناطیسی ارگان‌ها، به‌عنوان حامل مغناطیسی برای شناسایی و جداسازی سلول‌های خونی و آنتی‌بادی و برای انتقال داروها مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۴-۱۲). شواهد نشان می‌دهد که نانو ذرات به راحتی می‌توانند از غشای سلولی منتقل شوند، از فاگوسیتیه شدن ماکروفاژ فرار کنند و وارد ریه شوند (۱۶ و ۱۵). بعد از استنشاق، نانو ذرات به مسیر تنفسی وارد می‌شوند و از بینی به حلق و سپس به ریه‌ها می‌روند (۱۸ و ۱۷). در مسیرهای هوایی فوقانی فرآیند پاکسازی عمدتاً توسط مژک سلول‌های اپیتلیال مجاری هوایی انجام می‌شود (۱۹). نانو ذراتی که از ریه توسط مژک‌ها پاک شده‌اند وارد مسیر معده - روده‌ای می‌شوند (۲۱ و ۲۰). اما ذرات کوچکتر از ۱۰ میکرون می‌توانند به مسیرهای هوایی پایین‌تر برسند (۲۲). فعال شدن سلول‌های التهابی، مانند ماکروفاژهای آلئولار و نوتروفیل که می‌تواند توسط فاگوسیتوز نانو ذرات القا شود، می‌توان منجر به تولید گونه‌های اکسیژن فعال و گونه‌های نیترژن فعال شود. ماکروفاژهای آلئولار در شروع التهاب ریه شرکت دارند (۲۴ و ۲۳). در طی تحقیقات دیگری که انجام شد مشخص شد که گونه‌های اکسیژن فعال القا شده توسط ذرات فلزی گذرا مثل آهن می‌توانند پراکسیداسیون لیپید را تحریک کنند و سپس منجر به التهاب و یا حتی منجر به شکل‌گیری فیبرینوز و افزایش ویسکوزیته‌ی رگ‌ها شوند (۲۷-۲۵). همچنین مشخص شده است که نانو ذرات اکسید آهن با افزایش نفوذ پذیری مویرگ‌ها و لیز سلولی موجب صدمه به اپیتلیوم ریه می‌شوند (۲۸). ژو و همکارانش در سال ۲۰۰۳ گزارش کردند که استنشاق ذرات آهن در موش رت منجر به استرس اکسیداتیو مرتبط با پاسخ پیش التهابی در ریه می‌شود (۲۹). نانو ذرات اکسید آهن به دو طریق مستقیم و غیرمستقیم بر روی جنین اثر می‌گذارند. به‌طور مستقیم از طریق انتقال ذرات به شش، جریان خون و رسیدن به جفت و از طریق غیر مستقیم، موجب التهاب تنفسی مادر می‌شود که

روی جنین و مادر اثر می‌گذارند (۳۰)، لذا در این تحقیق، اثر سمی نانو اکسید آهن را بر بافت ریه در جنین موش سوری مورد مطالعه قرار گرفت.

روش بررسی

حیوانات مورد آزمایش: در این تحقیق از ۱۰۰ سر موش سفید نژاد NMRI استفاده شد. موش‌های نر و ماده را از انیستیتو پاستور تهران خریداری نموده و در اتاق نگهداری حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، نسبت به پرورش آنها اقدام نموده و کلیه شرایط و ضوابط کار با حیوان در طی انجام کار رعایت شد. جانوران در قفس‌های پلاستیکی با ابعاد استاندارد، با دسترسی آسان به آب و غذا نگهداری می‌شدند. درجهی حرارت اتاق پرورش حیوانات 23 ± 2 درجهی سانتی‌گراد بود. میزان نور اتاق در حد ۱۲ ساعت روشنائی و ۱۲ ساعت تاریکی تنظیم می‌شد. قفس موش‌های نر از ماده‌ها جدا بوده، سپس جهت جفت‌گیری هر ۴ سر موش ماده با یک عدد نر در یک قفس قرار داده شد و هنگام صبح موش‌ها از نظر درپوش واژنی (Vaginal Plug) بررسی شده و با مشاهده VP، موش‌های مشکوک به حاملگی در قفس‌های مجزایی قرار گرفته و زمان مشاهدهی VP روز صفر حاملگی در نظر گرفته شد.

نانو اکسید آهن و روش تزریق: نانو اکسید آهن (Fe_2O_3) به شکل پودری قهوه‌ای قرمز رنگ با ابعاد حدود ۲۰ نانومتر و درصد خلوص ۹۹/۵، از شرکت نانو رهپویان ماهان خریداری شد. برای تهیه محلول، پودر در آب مقطر دو بار تقطیر حل و سپس به مدت پانزده دقیقه در دستگاه سونیکاتور قرار داده شد تا نانو اکسید آهن در آب مقطر حل شود، سپس توسط دستگاه ورتکس مایع را هم زده تا به خوبی مخلوط شود. برای جلوگیری از رسوب ماده، در همه زمان از داروی تازه استفاده شد. روش تزریق به صورت داخل صفاقی بوده و همه‌ی تزریقات در شرایط استریل انجام شد.

در این مطالعه از ۸۰ سر موش ماده باردار استفاده شد. موش‌های ماده‌ی باردار به ۸ گروه ده تایی به صورت تصادفی تقسیم شدند. گروه‌ها شامل گروه کنترل (بدون تزریق)، گروه شم (با تزریق حلال نانو اکسید آهن، آب مقطر) و ۶ گروه تجربی (تزریق نانو اکسید آهن) بود. ۶ گروه تجربی شامل:

تجربی ۱: ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن در روز

تجربی ۲: ۳۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن در روز

تجربی ۳: ۵۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن در روز

تجربی ۴: ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در روز

تجربی ۵: ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در روز

تجربی ۶: ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در روز

در روز ۹ حاملگی که مصادف با زمان ارگانوژنز موش می‌باشد، آب مقطر و یا دوزهای مختلف نانو اکسید آهن به صورت درون صفاقی تزریق شد. در روز ۱۶ حاملگی که همزمان با پایان اندام‌زایی می‌باشد، جنین‌ها بررسی شدند.

مراحل کار به روش *In vivo*

در روز ۱۶ حاملگی موش‌های باردار توسط اتر یا کلروفرم بیهوش شدند. موش به تشنگ تشریح انتقال داده شد و موش به پشت خوابانده شد، پس از الک زدن به پوست ناحیه‌ی شکمی، بر روی شکم برش طولی داده شد و پوست ناحیه‌ی شکم جدا شد. لوله‌های رحمی به دقت از شکم مادر جدا پس از اینکه با سرم فیزیولوژیکی شستشو داده شد به پتری حاوی HBSS (Hanks Balanced Salt Solution)، (این محلول از تخریب بافت‌ها جلوگیری می‌نماید) انتقال داده شد. در مرحله‌ی بعد جنین‌ها در زیر استریومیکروسکوپ از رحم و پرده‌ی آمنیون خارج شده و مورد بررسی ماکروسکوپی قرار گرفتند. اندازه‌گیری وزن جنین‌ها توسط ترازوی حساس دیجیتال انجام شد. طول جنین (بر اساس طول سری دمی Crow Rump) و شش با استفاده از کولیس اندازه‌گیری و ثبت شد. سپس شش‌ها به ظروف حاوی HBSS تازه انتقال داده شدند. پس از جدا نمودن شش مراحل رنگ آمیزی با

هماتوکسیلین - ائوزین انجام شد. روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین برای رنگ آمیزی هسته و سیتوپلاسم به کار می رود. رنگ هماتوکسیلین هسته را به رنگ بنفش در آورده و ائوزین سیتوپلاسم را صورتی متمایل به نارنجی می نماید.

تحلیل آماری: نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲، آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) و تست توکی (Tukey) آنالیز گردید. نتایج با در نظر گرفتن انحراف معیار (SD) و با اختلاف معنی دار در $P < 0.05$ در نظر گرفته شد. سپس با استفاده از نرم افزار Excel نمودارها رسم شد.

یافته‌ها

به طور کلی نتایج در بخش *in vivo* در هشت گروه تحت عنوان گروه‌های کنترل، شم و ۶ گروه تجربی مورد بررسی

قرار گرفت. گروه‌های تجربی شامل، تجربی ۱ (دوز ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم)، تجربی ۲ (دوز ۳۰ میکروگرم بر کیلوگرم)، تجربی ۳ (دوز ۵۰ میکروگرم بر کیلوگرم)، تجربی ۴ (دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم)، تجربی ۵ (دوز ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و تجربی ۶ (دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) بودند.

نتایج حاصل از بررسی ماکروسکوپی اثر نانو اکسید آهن بر جنین‌ها در روز ۱۶ حاملگی در شرایط *in vivo* تجربه ۱: نتایج حاصل از اثر نانو اکسید آهن بر وزن جنین‌ها در شرایط *in vivo*: میانگین وزن جنین‌های ۱۶ روزه در گروه تجربی ۱ و ۲ افزایش معنی دار ($P < 0.001$) و گروه‌های تجربی ۴، ۵ و ۶ کاهش معنی داری ($P < 0.001$) نسبت به گروه کنترل و شم نشان داد (جدول ۱).

جدول ۱: نتایج تحلیل مقایسه‌ی میانگین وزن جنین‌ها در گروه‌های مختلف. مقادیر به صورت $Mean \pm SD$ بیان شده است.

تیمار	کنترل	شم	تجربی ۱	تجربی ۲	تجربی ۳	تجربی ۴	تجربی ۵	تجربی ۶
میانگین وزن جنین (گرم)	0.77 ± 0.06	0.77 ± 0.07	0.83 ± 0.14	0.95 ± 0.16	0.98 ± 0.15	0.57 ± 0.12	0.56 ± 0.16	0.54 ± 0.18
طول جنین (میلی متر)	15.67 ± 0.34	16.22 ± 0.28	18.17 ± 0.27	20.33 ± 0.32	20.66 ± 0.19	15.33 ± 0.13	14.20 ± 0.12	13.13 ± 0.16

$n=10$, $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$

تجربه ۲: نتایج حاصل از اثر نانو اکسید آهن بر طول کل بدن جنین‌ها در شرایط *in vivo*. اندازه‌ی طول کل بدن جنین‌های ۱۶ روزه در گروه تجربی ۱ ($P < 0.001$)، ۲ ($P < 0.001$) و ۳ ($P < 0.001$) افزایش معنی نسبت به گروه‌های کنترل و شم داشت، در مقابل در گروه تجربی ۵ ($P < 0.001$) و گروه ۶ ($P < 0.001$) کاهش معنی داری نسبت به گروه کنترل و شم نشان داد (جدول ۱).

نتایج حاصل از تاثیر نانو اکسید آهن بر رشد و نمو شش در شرایط *in vivo*: جوانه‌های اندام ششی در روز ۱۶ رشد و نمو جنینی از بدن جنین در پنج گروه کنترل، شم و

گروه‌های تجربی تحت بررسی‌های میکروسکوپی، ماکروسکوپی و هیستولوژیکی قرار گرفتند. بررسی ماکروسکوپی اندام شش در هر هشت گروه کنترل، شم و تجربی‌ها نشان داد که این اندام هیچ گونه تغییر شکل مورفولوژیکی ندارد.

تجربه ۳: نتایج حاصل از بررسی وزن شش در شرایط *in vivo*: نتایج نشان داد وزن شش در نمونه‌های تجربی ۲ و ۳ در مقایسه با نمونه‌های کنترل و شم افزایش معنی داری ($P < 0.001$) دارد و در گروه تجربی ۶ ($P < 0.05$) کاهش معنی داری را نشان می دهد (جدول ۲).

تجربه‌ی ۴: نتایج حاصل از بررسی طول شش در شرایط *in vivo*: طول کل جوانه‌ی اندام ششی در نمونه‌های تجربی ۲ و تجربی ۳ افزایش معنی‌دار ($P < 0.001$) و در گروه

تجربی ۶ کاهش معنی‌داری را در مقایسه با نمونه‌های کنترل و شم از خود نشان داد ($P < 0.01$). (جدول ۲).

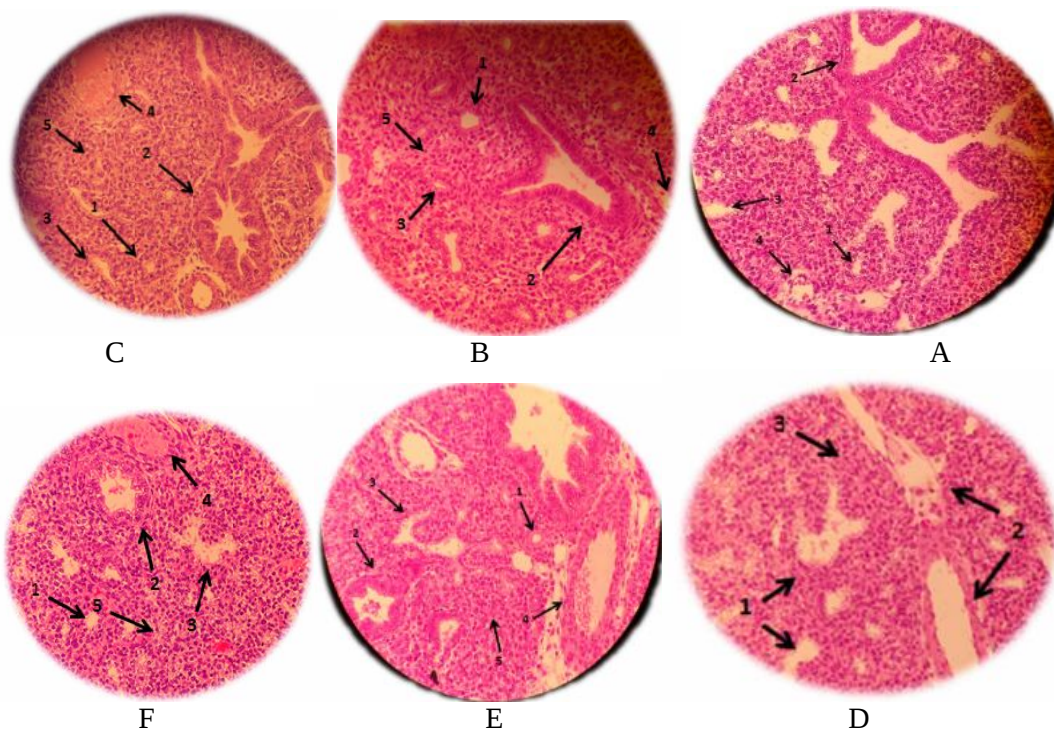
جدول ۲: نتایج تحلیل مقایسه میانگین وزن و طول ریه در گروه‌های مختلف مقادیر به صورت $Mean \pm SD$ بیان شده است.

مشاهده/تیمار	کنترل	شم	تجربی ۱	تجربی ۲	تجربی ۳	تجربی ۴	تجربی ۵	تجربی ۶
وزن شش (گرم)	0.029 ± 0.005	0.029 ± 0.005	0.034 ± 0.004	0.047 ± 0.003	0.050 ± 0.004	0.028 ± 0.004	0.026 ± 0.003	0.022 ± 0.007
طول شش (میلی‌متر)	4.83 ± 0.13	4.9 ± 0.26	5.39 ± 0.18	6.25 ± 0.23	6.54 ± 0.08	4.75 ± 0.11	4.12 ± 0.12	3.79 ± 0.1

$n=10$ و $P < 0.05$ *، $P < 0.01$ **، $P < 0.001$ ***

نتایج حاصل از بررسی میکروسکوپی جوانه ششی؛ به‌منظور انجام مطالعات بافتی در جوانه‌ی اندام ششی در گروه‌های کنترل، شم و تجربی، مقاطع سریال به‌ضخامت

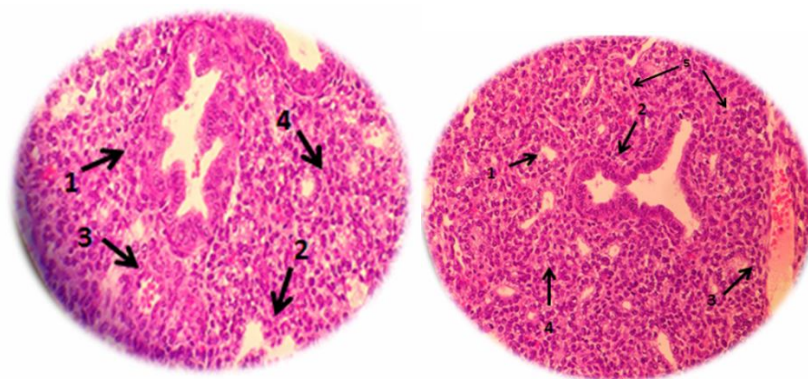
۶ میکرومتر به‌صورت طولی (فرونال) تهیه گردید و نمونه‌ها مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت.



شکل ۱: فتو میکروگراف جوانه‌ی ششی نمونه‌ی A: کنترل، B: شم، C: تجربی ۱، D: تجربی ۲، E: تجربی ۳، F: تجربی ۴ در روز

۱۶ جنینی، بزرگنمایی ۴۰۰ برابر، رنگ آمیزی به روش هماتوکسیلین-اوتوزین

۱: برونشیول ابتدایی، ۲: برونشیول، ۳: آلئولول تنفسی، ۴: رگ خونی، ۵: پارانشیم ریوی



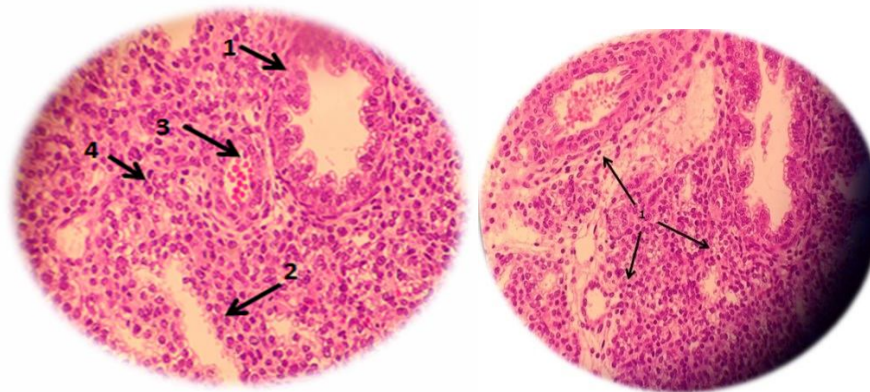
H

G

شکل ۲: فتو میکروگراف جوانه‌ی ششی نمونه تجربی ۵ در روز ۱۶ جنینی، بزرگنمایی ۴۰۰ برابر، رنگ آمیزی به روش هماتوکسیلین-ائوزین.

G - ۱: برونشیول، ۲: آلئول تنفسی، ۳: رگ خونی، ۴: پارانشیم ریوی

H - ۱: برونشیول ابتدایی، ۲: برونشیول، ۳: مقطع رگ خونی، ۴: پارانشیم ریوی، ۵: سلول نکروتیک



J

I

شکل ۳: فتو میکروگراف جوانه ششی نمونه تجربی ۶ در روز ۱۶ جنینی، بزرگنمایی ۴۰۰ برابر، رنگ آمیزی به روش هماتوکسیلین-ائوزین

شکل I - ۱: برونشیول، ۲: آلئول تنفسی، ۳: رگ خونی، ۴: پارانشیم ریوی

شکل J - ۱: سلول نکروتیک

جدول ۳: نتایج تحلیل مقایسه میانگین تعداد سلول نکروز یافته در گروه‌های مختلف، مقادیر به صورت $Mean \pm SD$ بیان شده است.

مشاهده/تیمار	کنترل	شم	تجربی ۱	تجربی ۲	تجربی ۳	تجربی ۴	تجربی ۵	تجربی ۶
میانگین تعداد سلول نکروتیک	$6/33 \pm 1/03$	$7/83 \pm 2/13$	$10/5 \pm 2/16$	$9/5 \pm 1/64$	$9/66 \pm 1/96$	$10/83 \pm 2/48$	$***18 \pm 5/36$	$***22/83 \pm 1/32$

$P < 0.01$ و $n=10$ ***

کنترل و شم از خود نشان داده است (جدول ۳) (شکل ۲ و ۳ سلول‌های نکروتیک را نشان می‌دهد).

تجربه‌ی ۶: نتایج حاصل از بررسی تعداد برونشیول ابتدایی

تجربه‌ی ۵: نتایج حاصل از بررسی تعداد سلول نکروتیک در شرایط *in vivo*: تعداد سلول نکروز یافته در گروه‌های تجربی ۵ و ۶ افزایش معنی‌داری ($P < 0.01$) نسبت به گروه

(نایژک) های جوانه‌ی اندام ششی در شرایط *in vivo*:

تعداد برونشیول ابتدایی گروه تجربی ۱، ۲ و ۳ هیچ تغییر معنی‌داری نسبت به گروه کنترل و شم از خود نشان نداد در حالی که در گروه‌های تجربی ۴ ($P < 0.05$)، گروه تجربی ۵ ($P < 0.01$) و گروه تجربی ۶ ($P < 0.001$) کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل و شم از خود نشان داده است (جدول ۴)

(شکل ۱ و ۲ و ۳).

تجربه‌ی ۷: نتایج حاصل از بررسی تعداد برونشیول (نایژک‌های) جوانه‌ی اندام ششی در شرایط *in vivo*: تعداد نایژک‌ها در هیچ یک از گروه‌های تجربی تغییر معنی‌داری نسبت به گروه کنترل و شم از خود نشان نداد (جدول ۴) (شکل ۱ و ۲ و ۳).

جدول ۴: نتایج تحلیل مقایسه میانگین تعداد نایژک ابتدایی، تعداد برونشیول، تعداد آلوئول‌ها و قطر برونشیول انتهایی در گروه‌های مختلف، مقادیر به صورت $Mean \pm SD$ بیان شده است

مشاهده/ تیمار	کنترل	شم	تجربی ۱	تجربی ۲	تجربی ۳	تجربی ۴	تجربی ۵	تجربی ۶
میانگین تعداد نایژک ابتدایی در جوانه‌ی اندام ششی	۹/۹۵ ± ۰/۸۱۲	۹/۹۰ ± ۰/۸۶۷	۹/۱۴ ± ۰/۷۸۲	۸/۲۴ ± ۱/۵۲	۶/۴۸ ± ۰/۷۴۵	۵/۴۸ ± ۱/۰۸	**۵/۱۴ ± ۰/۶۵۲	***۳/۶۷ ± ۰/۷۶۰
تعداد برونشیول در جوانه‌ی اندام ششی	۱/۳۸ ± ۰/۱۸	۱/۳۸ ± ۰/۲۶	۱/۱۹ ± ۰/۱۹	۱/۰۹ ± ۰/۱۹	۰/۷۶ ± ۰/۱۱	۰/۹۰ ± ۰/۲۲	۱/۰۹ ± ۰/۲۳	۱/۱۴ ± ۰/۱۸
میانگین تعداد آلوئول‌های جوانه اندام ششی	۰/۹۰ ± ۰/۲	۱/۰۴ ± ۰/۲۸	*** ۴/۶۱ ± ۰/۳	***۵/۱۴ ± ۰/۴۶	***۵/۴۲ ± ۰/۶۶	***۳/۸۵ ± ۰/۴۱	۰/۹۵ ± ۰/۲۳	۰/۰۹ ± ۰/۰۶
قطر برونشیول انتهایی در جوانه‌ی اندام ششی	۶/۲۶ ± ۱/۰۲	۶/۲۱ ± ۱/۴۳	۶/۱۴ ± ۱/۰۴	۶/۰۷ ± ۱/۱۲	۵/۹۰ ± ۱/۱۳	۴/۶۱ ± ۱/۱۴	۵/۷۱ ± ۱/۲	۶/۰۴ ± ۱/۰۶

$P < 0.05$ ، * $P < 0.01$ ، ** $P < 0.001$ و $n=10$.

تجربه‌ی ۸: نتایج حاصل از بررسی تعداد آلوئول‌های هوایی جوانه‌ی اندام ششی در شرایط *In vivo*: تعداد آلوئول‌ها در گروه‌های تجربی ۱، ۲، ۳ و ۴ افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل و شم از خود نشان داد ($P < 0.001$) (جدول ۴) (شکل ۱ و ۲ و ۳).

تجربه‌ی ۹: نتایج حاصل از بررسی قطر برونشیول‌ها در جوانه‌ی اندام ششی در شرایط *in vivo*: قطر برونشیول انتهایی در گروه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل و شم هیچگونه تغییر معنی‌داری نشان نداد (جدول ۴) (شکل ۱ و ۲ و ۳).

تجربه‌ی ۱۰: نتایج حاصل از بررسی تعداد رگ‌های خونی جوانه‌ی اندام ششی در شرایط *in vivo*: نتایج نشان داد میانگین تعداد رگ‌های خونی در هیچ یک از گروه‌های تجربی تغییر معنی‌داری نسبت به گروه کنترل و شم نشان نداد (جدول ۵) (شکل ۱ و ۲ و ۳).

تجربه‌ی ۱۱: نتایج حاصل از بررسی قطر رگ خونی در جوانه‌ی اندام ششی در شرایط *in vivo*: نتایج نشان داد هیچگونه تغییر معنی‌داری در قطر رگ‌های خونی در گروه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل و شم رخ نداد (جدول ۵) (شکل ۱ و ۲ و ۳).

جدول ۵: نتایج تحلیل مقایسه میانگین رگ خونی و قطر رگ خونی در گروه‌های مختلف، مقادیر به صورت $Mean \pm SD$ بیان شده است، $n=10$.

مشاهده/تیمار	کنترل	شم	تجربی ۱	تجربی ۲	تجربی ۳	تجربی ۴	تجربی ۵	تجربی ۶
میانگین تعداد رگ خونی در جوانه‌ای اندام ششی	۰/۹۵±۰/۲۴۴	۰/۹۵±۰/۱۵۳	۰/۹۵±۰/۱۶۱	۱/۱۹±۰/۲۱۴	۱/۳۳±۰/۲۴۲	۰/۹۵±۰/۲۲۳	۰/۷۶±۰/۱۶۸	۰/۶۷±۰/۱۶۴
قطر رگ خونی (میکرومتر) در جوانه‌ای اندام ششی	۴/۲۶۲±۱/۲۶	۴±۱/۱۲	۴/۵۷±۱/۱	۵±۱/۱۵	۶/۲۸±۲/۰۱	۳/۴±۱/۰۹	۲/۱۶±۰/۹۲۶	۱/۸۱±۰/۸۱۰

بحث

در این تحقیق، موش سوری نژاد NMRI به عنوان مدل حیوانی به کار گرفته شد. در روش *in vivo*، ۶ دوز مختلف از نانو اکسید آهن را از طریق تزریق درون صفاقی به منظور بررسی اثر سمیت نانو اکسید آهن استفاده شد. دوزهای مورد استفاده (۱۰، ۳۰ و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و (۱۰، ۳۰ و ۵۰ میکروگرم بر کیلوگرم) بود. برای این منظور براساس وزن موش، در روز ۹ بارداری نانو اکسید آهن به موش مادر تزریق شد و در روز ۱۶ بارداری جنین‌ها از بدن مادر خارج و مورد بررسی ماکروسکوپی قرار گرفتند، سپس ریه‌ی جنین‌ها خارج شده و پس از تهیه‌ی لام، مورد بررسی هیستولوژیکی قرار گرفت. نانو ذرات به راحتی می‌توانند از غشای سلولی منتقل شوند و وارد ریه شوند (۱۵). این ذرات می‌توانند از طریق عبور جفت روی جنین اثر گذارند (۳۰). مطالعات بسیاری نشان داد تغییر در شکل و اندازه نانو ذرات (Fe_2O_3) درجه سمیت این ذرات را تحت کنترل دارد و این ذرات در اندازه نانو و زیر میکرون صدمات ریوی را القا می‌کنند (۳۰ و ۲۹). از طرفی، نانو ذرات منطقه سطحی بزرگ و فعالیت بیولوژیکی بالایی دارند که ممکن است ناحیه‌ی سطح اپیتلیال در ریه را تحت تاثیر قرار دهند و در راه‌های هوایی پایین‌تر و مناطق آلوئولار بیشتر رسوب کنند (۳۱). در سال ۲۰۱۱ هانینی و همکارانش SPION ها (Super Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticle) را در شرایط *in vivo* آزمایش کردند و تایید

کردند که SPION ها سمیت را در کبد، کلیه و ریه‌ها القا می‌کنند در حالی که در اندام‌های مغز و قلب بی‌تاثیر است (۳۲). بر طبق نتایج ابردورستر استرس اکسیداتیو که به علت استفاده از نانو ذرات ایجاد می‌شود یکی از مکانیسم‌های مهم سمی بودن نانو ذرات به ویژه نانو ذرات بر پایه فلزهای گذرا است. نانو ذرات با ترکیبات مختلف گونه‌های اکسیژن فعال را ایجاد می‌کنند. گونه‌های اکسیژن فعال توسط پراکسیداسیون لیپیدها به سلول آسیب می‌رسانند، پروتئین‌ها را تغییر می‌دهند، DNA را جدا می‌کنند، در سیگنال‌های عملکردی مداخله می‌کنند و رونویسی ژن‌ها را تغییر می‌دهند (۳۳). بعلاوه با درجه‌ی بالایی از نانو ذرات اکسید آهن، به دلیل افزایش آسیب به غشای سلول و تولید ROS میزان نکروز افزایش می‌یابد (۳۴). در مطالعه‌ی دیگری با استفاده از سنجش MTT نشان داده شده که زمانی که سلول‌های ماکروفاژ موش به مدت طولانی در معرض غلظت بالای (Fe_2O_3) قرار گیرند زنده ماندن سلولی کاهش می‌یابد و درصد زنده ماندن سلول‌های ماکروفاژ در اثر نانو ذرات اکسید آهن، از ۷۵ درصد به ۶۰ درصد کاهش می‌یابد و ROS ایجاد شده باعث مرگ سلولی می‌شود (۳۵). ما نیز در این مطالعه در شرایط *in vivo* در دوزهای بالا نکروز سلولی را مشاهده کردیم. در مطالعه‌ی حاضر، در بررسی ما در دوزهای ۱۰، ۳۰ و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن جنین، در دوزهای ۱۰ و ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم اندازه جنین و در دوزهای ۳۰، ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن

ریه و همچنین طول ریه نسبت به گروه کنترل و شش کاهش یافته بود. تعداد برونشلول‌های ابتدایی در دوزهای ۱۰، ۳۰ و ۵۰ میکروگرم بر کیلوگرم کاهش یافته بود. همچنین در دوزهای بالا (دوزهای ۳۰ و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) نکروز سلولی مشاهده گردید که بیانگر آسیب سلولی است یعنی نانو اکسید آهن با قطر ۲۰ نانومتر به علت کوچک بودن اندازه قادر به عبور از جفت بوده است و اثراتی را بر جنین‌ها گذاشته و موجب صدمه ریوی گردیده است. آزمایشات ما نیز تایید کننده خاصیت سمی نانو اکسید آهن در دوزهای بالا در شرایط *in vivo* می باشد. از آنجایی که میزان جذب نانو اکسید آهن به مراتب بیشتر از اکسید آهن است لذا اثراتی که این ماده بر روی جنین و جوانه اندام ریه می گذارد به مراتب بیشتر خواهد بود. بررسی‌های میکروسکوپی ما در شرایط *in vivo* نشان می دهد که در دوزهای پایین وزن جنین و طول جنین افزایش معنی داری در مقایسه با گروه کنترل و شش داشته اند. در حالی که در دوزهای بالا وزن جنین و طول جنین کاهش معنی داری در مقایسه با گروه کنترل و شش داشته اند. همچنین وزن ریه و طول ریه در دوزهای ۳۰ و ۵۰ میکروگرم بر کیلوگرم افزایش معنی داری و در دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم کاهش معنی داری نسبت به گروه کنترل و شش داشته اند، این کاهش وزن جنین‌ها، طول جنین‌ها، وزن ریه‌ها، طول ریه‌ها در دوزهای بالا می تواند به علت اثرات سمی نانو اکسید آهن باشد که مانع رشد جنین در حد مطلوب می شود. در حالی که در شرایط مشابه، در دوز پایین این نانو ذرات موجب افزایش وزن جنین، طول جنین، وزن ریه و طول ریه شده اند. در بررسی‌های میکروسکوپی نیز تعداد برونشلول‌ها در دوزهای ۱۰ و ۳۰ و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم کاهش معنی داری نسبت به گروه کنترل و شش داشته اند. این کاهش تعداد برونشلول‌ها می تواند به علت اثرات سمی نانو اکسید آهن در دوزهای بالا باشد. بر خلاف یافته‌های ورنس و همکارانش، در این مطالعه طول جنین‌ها و اندازه‌ی جنین‌ها در

دوزهای بالا نسبت به گروه کنترل و شش کاهش معنی داری نشان داد که به علت سمیت نانو ذرات اکسید آهن در جنین بود. این اختلاف در داده‌ها می تواند به این دلیل باشد که مطالعاتی که ما انجام دادیم بر روی جنین ۱۶ روزه بوده است و مطالعات ورنس بر روی بالغین صورت گرفته است (۳۵). بعلاوه، نتایج تحقیق دیگری بر روی کبد نشان داد که بدن قادر است نانوذرات آهن را پس از تزریق، به تدریج از بدن دفع کند و یا به دلیل از بین رفتن خواص نانوذرات و ایجاد تحمل در سلول‌های کبدی، اثرات سمی آنها را از بین ببرد (۳۶). محمودی و همکارانش در سال ۲۰۱۰ پتانسیل سمیت انواع مختلفی از SPIONها را بررسی کردند و نشان دادند که تا زمانی که در معرض سطح بالایی از این نانوذرات قرار نگیرند یا سمیتی ندارند یا سمیت آنها کم است (۳۷). اختلال در هموستاز سلولی فلزاتی مانند مس، منگنز و به خصوص افزایش غلظت آهن در هسته‌ی سیاه مغز با بیماری پارکینسون در ارتباط است (۳۸). سمیت همچنین به فاکتورهای گوناگونی مانند انواع سطوح پوشیده شده یا بر هم کنش پروتئین‌ها یا حالت اکسیداسیون آهن در SPIONها بستگی دارد (۳۷). مطالعات موره و همکارانش در سال ۲۰۰۰ نشان داد که نانو ذرات اکسید آهن دارای پوشش و بدون پوشش خواص سطحی متفاوت دارند (۳۹). نانو اکسید آهن مورد استفاده در این تحقیق نیز بدون پوشش بود که در شرایط *in vivo* بر روی سلول‌های ریه جنین موش خواص سمی از خود نشان داد.

نتیجه گیری

به طور کلی نتایج این تحقیق، وجود پتانسیل دوگانه‌ی نانو اکسید آهن با قطر ۲۰ نانومتر و با درصد خلوص ۹۹ درصد را در سمیت‌زایی و تحریک فرایندهای رشد و نموی بیان می‌دارد. این ماده در دوزهای بالا خاصیت سمیت‌زایی داشته و احتمالاً با ایجاد رادیکال‌های آزاد

خانم مرجان صادقیان می‌باشد، بدین وسیله از مسوولین آزمایشگاه دانشگاه علوم و تحقیقات تشکر و قدردانی می‌شود.

باعث مرگ سلولی و نکروزه شدن بافت‌ها شده است.

تشکر و قدردانی

مقاله‌ی حاضر برگرفته از پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد

References

- 1- Zarjou A, Jeney V, Arosio P, et al. Ferritin ferroxidase activity: a potent inhibitor of osteogenesis. *J Bone Miner Res.* 2010; 25: 164-72.
- 2- Simonart T. Iron: a target for the management of Kaposi's sarcoma? *BMC Cancer.* 2004; 4: 1-6.
- 3- Noonan CW, Pfau JC, Larson TC, Spence MR. Nested case-control study of autoimmune disease in an asbestos-exposed population *Envir. Health Persp.* 2006; 114: 1243-47.
- 4- Nemery B. Metal toxicity and the respiratory tract. *Eur Respir J.* 1990; 3: 202-19.
- 5- Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect.* 2005; 113: 823-39.
- 6- Hsieh LL, Kang HJ, Shyu HL, Chang CY. Optimal degradation of dye wastewater by ultrasound/Fenton method in the presence of nanoscale iron. *Water Sci Technol.* 2009; 60: 1295-301.
- 7- Kleps I, Ignat T, Miu M, et al. *J Nanosci Nanotechnol.* 2010; 10: 2694-700.
- 8- Buzea C, Blandino I, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases.* 2007; 2: 17-71.
- 9- Li N, Nel AE. Feasibility of biomarker studies for engineered nanoparticles: what can be learned from air pollution research. *J Occup Environ Med.* 2011; 53: 74-9.
- 10- Holsapple MP1, Farland WH, Landry TD, et al. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part II: toxicological and safety evaluation of nanomaterials, current challenges and data needs. *Toxicol Sci.* 2005; 88: 12-7.
- 11- Donaldson K, Li X Y, MacNee W. Ultrafine (nanometer) particle mediated lung injury. *J Aerosol Sci.* 1998; 29: 553-60.
- 12- Reimer P, Weissleder R. Development and experimental use of receptor specific MR contrast media. *Radiology.* 1996; 36: 153-63.
- 13- Lee JH, Schneider B, Jordan EK, Liu W, Frank JA. Synthesis of complexable fluorescent superparamagnetic iron oxide nanoparticles (FL SPIONs) and cell labeling for clinical application. *Adv Mater.* 2008; 2: 2512-16.
- 14- Pankhurst QA, Connolly J, Jones SK, Dobson J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J Phys.* 2003; 36: 167-81.
- 15- Hoet PH, Brüske-Hohlfeld I, Salata OV. Nanoparticles - known and unknown health risks. *J Nanobiotechnology.* 2004; 8: 2: 12-18.

- 16- Renwick LC, Donaldson K, Clouter A. Impairment of alveolar macrophage phagocytosis by ultrafine particles. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2001; 172: 119-27.
- 17- Oberdorster G. Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int Arch Occup Environ Health*. 2001; 74: 1-8.
- 18- Elder A, Gelein R, Silva V, et al. Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. *Environ Health Perspect*. 2006; 114: 1172-8.
- 19- Ferin J. Pulmonary retention and clearance of particles. *Toxicol Lett*. 2004; 72: 121-5.
- 20- Semmler M, Seitz J, Erbe F, et al. Long-term clearance kinetics of inhaled ultrafine insoluble iridium particles from the rat lung, including transient translocation into secondary organs. *Inhal Toxicol*. 2004; 16: 453-9.
- 21- Takenaka S, Karg E, Roth C, et al. Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. *Environ Health Perspect*. 2001; 109: 547-51.
- 22- Ng AW, Bidani A, Heming TA. Innate host defense of the lung: effects of lung-lining fluid pH. *Lung*. 2004; 182: 297-317.
- 23- Risom L, Moller P, Loft S. Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat Res*. 2005; 592: 119-37.
- 24- Long H, Shi T, Borm PJ, et al. ROS-mediated TNF-alpha and MIP-2 gene expression in alveolar macrophages exposed to pine dust. *Part Fibre Toxicol*. 2004; 1: 3-9.
- 25- Sorensen M, Autrup H, Moller P, et al. Linking exposure to environmental pollutants with biological effects. *Mutat Res*. 2003; 544: 255-71.
- 26- Berry JP, Arnoux B, Stanislas G, Galle P, Chretien J. A microanalytic study of particles transport across the alveoli: role of blood platelets. *Biomedicine*. 1977; 27: 354-7.
- 27- Seaton A, MacNee W, Donaldson K, Godden D. Particulate air pollution and acute health effects. *Lancet*. 1995; 345: 176-78.
- 28- Hetland RB, Cassee FR, Refsnes M, et al. Release of inflammatory cytokines, cell toxicity and apoptosis in epithelial lung cells after exposure to ambient air particles of different size fractions. *Toxicol in Vitro*. 2004; 18: 203-12.
- 29- Zhu MT, Feng WY, Wang B, et al. Comparative study of pulmonary responses to nano- and submicron-sized ferric oxide in rats. *Toxicology*. 2008; 247: 102-11.
- 30- Hougaard KS, Jackson P, Jensen KA, et al. Effects of prenatal exposure to surface-coated nanosized titanium dioxide (UV-Titan). A study in mice. *Part Fibre Toxicol*. 2010; 14; 7: 16-20.
- 31- Donaldson K, Li XY, Mac Nee W. Ultrafine (nanometer) particle mediated lung injury. *J Aerosol Sci*. 1998; 29: 553-60.
- 32- Hanini A, Schmitt A, Kacem K, et al. Evaluation of iron oxide nanoparticle biocompatibility. *Int J Nanomedicine*. 2011; 6: 787-94.

- 33- Oberdörster G, Ferin J, Lehnert BE. Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ Health Perspect.* 1994; 102: Suppl 5: 173-9.
- 34- Lee JH, Ju JE, Kim BI, et al. Rod-shaped iron oxide nanoparticles are more toxic than sphere-shaped nanoparticles to murine macrophage cells. *Environ Toxicol Chem.* 2014; 33: 2759-66.
- 35- Veranth JM, Kaser EG, Veranth MM, Koch M, Yost GS. Cytokine responses of human lung cells (BEAS-2B) treated with micron-sized and nanoparticles of metal oxides compared to soil dusts. *Part Fibre Toxicol.* 2007 27; 4: 2-8.
- 36- Golmohammadi R, Hooshmandi Z, Setorki M. The Effect of Fe₄NiO₄Zn nanoparticles on some liver factors in wistar rats. *J Zanzan Univ Med Sci.* 2015; 23: 108-19.
- 37- Mahmoudi M, Simchi A, Imani M, et al. A new approach for the in vitro identification of the cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2010 1; 75: 300-9.
- 38- Dusek P, Roos PM, Litwin T, Schneider SA, Flaten TP, Aaseth J. The neurotoxicity of iron, copper and manganese in Parkinson's and Wilson's diseases. *J Trace Elem Med Biol.* 2015; 31: 193-203.
- 39- Moore A, Marecos E, Bogdanov A Jr, Weissleder R. Tumoral distribution of long-circulating dextran-coated iron oxide nanoparticles in a rodent model. *Radiology.* 2000; 214: 568-74.

Effect of Iron Oxide Nanoparticles on the Lung of NMRI Mouse Embryos in vivo

Khodarahmi P¹, Hayati Roodbari N², Parivar K², Sadeghian M²

¹Dept. of Biology, Islamic Azad University, Parand Branch, Parand, Iran

²Dept. of Biology, Islamic Azad University, Sciences and Research Branch, Tehran, Iran

Corresponding Author: Khodarahmi P, Dept. of Biology, Islamic Azad University, Parand Branch, Parand, Iran

E-mail: khodarahmiparvin@yahoo.com

Received: 15 Oct 2015 **Accepted:** 10 Feb 2016

Background and Objective: Iron oxides nanoparticles have numerous applications in medical industry. Nanoparticles are particles with 100 nm in diameter. Despite their various applications, toxic effects of Iron oxide nanoparticles call for supplementary investigations. In this study, the toxic effect of iron oxide nanoparticles on lung development in fetal mice was examined.

Materials and Methods: Using in vivo technique, the mice were allocated to one of the following groups: the control group without the effect of nano iron oxide, sham group with injection of distilled water and experimental groups with low doses (10, 30 and 50 µg /kg) and high doses (10, 30 and 30 mg/kg) of nano iron oxide with 20 nm in diameters injected intraperitoneally on day 9 of pregnancy. On day 16 of pregnancy, embryos were removed and the lung tissue sections were assessed.

Results: The findings showed a significant decrease in the length of the fetus with 30 and 50 mg/kg doses and a significant decrease in the fetal weight and number of primitive bronchioles with 10, 30 and 50 mg/kg. Results also showed a significant increase in lung weight and lung length with doses of 30 and 50 µg/kg, a significant increase in the number of alveolus with doses of 10, 30, 50 µg/kg and 10 mg/kg and a significant increase in the number of necrotic cells with doses of 30 and 50 mg/kg.

Conclusion: Iron oxide nanoparticles showed dual effects. It is asserted throughout this study that fetal lung development increases at low doses and necrotic effect increases with high doses.

Keywords: Iron oxide nanoparticles, Lung development, Toxic effect