

## تأثیر نانوذرات اکسید آهن بر بافتهای کبد، کلیه و طحال در موش صحرایی نر

کامبیز روشنایی<sup>۱</sup>، سعید شیرمردی<sup>۲</sup>، سعید رضایی زارچی<sup>۳</sup>، علیرضا عبداللهی نیا<sup>۴</sup>

Email: kambiz.Roshanaei@gmail.com

۱) گروه فیزیولوژی جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران

۲) دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران

۳) استادیار دانشگاه پیام نور تفت

۴) کارشناسی ارشد فیزیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران

### چکیده

نانو ذرات اکسید آهن به عنوان عنصر ایجادکننده تضاد در MRI و همچنین گرما درمانی سلولهای سرطانی استفاده‌های گسترده‌ای دارند. با این وجود اثرات این نانو ذرات روی سلامتی انسان به طور کامل بررسی نشده است. در این تحقیق اثرات نانو ذرات اکسید آهن روی تغییرات مورفولوژیکی و پاتولوژیکی بافتهای کبد، کلیه و طحال در موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار مورد بررسی قرار گرفت. موشها در سه گروه تجربی، روزانه و به مدت ۱۵ روز، نانو ذرات اکسید آهن را با غلظتهای ۲۰، ۵۰ و ۱۵۰  $\mu\text{g}/\text{kg}$  که در یک میلی لیتر آب مقطر حل شده بود، توسط لوله گاواژ دریافت کردند. گروه کنترل نیز روزانه یک میلی لیتر آب مقطر دریافت کرد. نتایج به دست آمده، تغییرات مورفولوژیکی و پاتولوژیکی را در بافتهای مورد نظر نشان داده که با افزایش دوز، افزایش می‌یابد. در بافت کبد تورم و نکروز بافتی، التهاب و افزایش لنفوسیتها مشاهده شد. همچنین دیواره فضای پورت تخریب شده و گستردگی فضای پورت مشهود بود. بافت کلیه‌ها دچار نکروز شده و همچنین تخریب کپسول بومن، وجود سلولهای دو هسته‌ای و تورم سلولها و همچنین تحلیل افزایش پالپ‌های سفید و در نتیجه افزایش التهاب و لنفوسیتها قابل مشاهده بود. با توجه به نتایج به دست آمده چنین به نظر می‌رسد که نانو ذرات اکسید آهن دارای اثرات سمی بر بافتهای کبد، کلیه و طحال هستند. که این اثرات سمی با افزایش دوز افزایش می‌یابد.

### کلمات کلیدی

نانو ذرات اکسید آهن، کبد کلیه، طحال، رت

### مقدمه

طور گسترده در تحقیقات *In vivo* و *In vitro* استفاده می‌شوند. همچنین این نانو ذرات دارای کاربردهای زیست پزشکی زیادی از قبیل بازسازی بافتی، ایمنی سنجی، دفع مسمومیت مایعات زیستی، گرما درمانی

برخی نانو ذرات نظیر آهن، کبالت و نیکل به دلیل خصوصیات مغناطیسی و پایداری که دارند به نانو ذرات مغناطیسی معروفند. از این میان نانو ذرات اکسید آهن به دلیل خصوصیات فیزیکوشیمیایی، به



سلولهای سرطانی و... هستند (Mirkovic et al. 2010). کاربرد مهم دیگر این نانو ذره در MRI می باشد. MRI امروزه یک روش استاندارد و جاری در تشخیصهای پزشکی است (Ka-Wing Au et al. 2009). استفاده از نانو ذرات اکسید آهن به عنوان انتقال دهنده دارو برای درمان سرطان به سال ۱۹۷۰ باز می گردد و تا به حال نیز ادامه داشته است. با وجود کاربرد فراوان این نانو ذره اثرات آن روی سلامتی انسان هنوز به طور کامل شناخته نشده است. نانو ذرات اکسید آهن پاسخهای التهابی شامل افزایش غلظت سایتوکاین ها و همچنین افزایش بیان ژنهای وابسته به این پاسخها را تشدید می کنند. تحقیقات زیادی اثرات سمی خفیف این نانو ذرات را ثابت کرده اند (Park E.J et al. 2010). Apopa و همکارانش در سال ۲۰۰۹ اعلام کردند که نانو ذرات اکسید آهن باعث افزایش نفوذپذیری سلولهای اندوتلیالی می شوند. نانو ذرات به دلیل شکل و اندازه ای که دارند قادرند از سد های فیزیولوژیکی عبور کرده و اثرات مضر به جای گذارند (Apopa P.L et al. 2009). به هر حال اطلاعات ما در مورد سمی بودن آنها بسیار کم و محدود است. در این تحقیق فرض بر این است که تماس طولانی با نانو ذرات اکسید آهن موجب تغییرات مورفولوژیکی و پاتولوژیکی در بافتهای کبد، کلیه و طحال شده و همچنین باعث بروز اختلال در عملکرد عمومی این بافتهای می گردد.

همان طور که می دانیم بافت کبد اعمال بسیار مهمی را از قبیل دفع سموم و ترشح صفرا در بدن انجام می دهد. همچنین بافت کلیه یکی از اندامهای حیاتی بوده که کار تصفیه خون را انجام می دهد. بافت

طحال نیز با داشتن پالپهای قرمز و سفید در اعمال ایمنی بدن شرکت دارد. خسارت به این بافتهای می تواند برای بدن بسیار خطرناک و جبران ناپذیر باشد. در این تحقیق اثرات مقادیر مختلف نانو ذرات اکسید آهن بر بافتهای کبد، کلیه و طحال مورد بررسی قرار گرفته است تا بتواند اطلاعات مهمی در ارتباط با اثرات این نانو ذرات بر فعالیتهای این بافتهای حیاتی بدن ارائه دهد و زمینه های افزایش حفاظت در برابر این نانو ذرات فراهم گردد.

### مواد و روشها

حیوانات مورد استفاده در این تحقیق تجربی موشهای صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار با وزن تقریبی ۳۰۰ - ۲۵۰ گرم و محدوده سنی ۳ - ۲/۵ ماه T از حیوان خانه دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد تهیه شد. درجه حرارت محیط در زمان آزمایش ۲۵ - ۲۰ درجه سانتیگراد و شرایط نوری به مدت ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی تنظیم شد. آب آشامیدنی از آب لوله کشی شهری و تغذیه با خوراک مخصوص موش (غذای فشرده) که از شرکت سهامی خوراک دام و طیور پارس تهیه شده بود انجام شد. در این تحقیق تجربی حیوانات به طور تصادفی به دو گروه به شرح زیر تقسیم شدند:

**گروه اول:** گروه کنترل شامل ۱۰ حیوان که در زمان آزمایش به آنها روزانه یک میلی لیتر آب مقطر به مدت ۱۵ روز خورانده شد.

**گروه دوم:** گروه تجربی شامل سه زیر گروه و هر کدام شامل ۱۰ حیوان که به آنها مقادیر مختلف نانو ذرات اکسید آهن که از پژوهشکده نانوتکنولوژی یزد



### نتایج

تغییرات شکلی یا مورفولوژیکی موشهایی در معرض نانو ذرات اکسید آهن در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند که ظاهر موشهایی که در معرض نانو ذرات با دوز  $150 \mu\text{g/kg}$  قرار گرفته بودند تغییرات چشمگیری را در رنگ مو (رنگ برنزه) نشان دادند.

نتایج به دست آمده از بافتهای کبد، کلیه و طحال به شرح زیر می باشد:

**کبد:** در اسلایدهای تهیه شده از بافت کبد که به صورت برشهای متوالی انجام گرفت در گروههای دریافت کننده دوزهای مختلف نانو ذرات اکسید آهن تغییرات پاتولوژیکی زیادی قابل مشاهده بود.

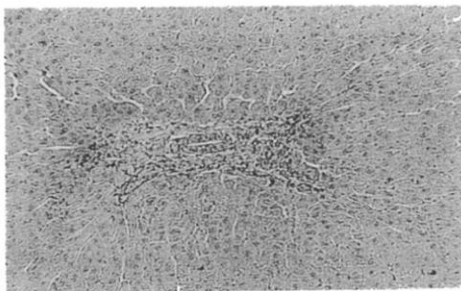
در گروههای دریافت کننده دوزهای متوسط و حداکثر، نکروز بافتی (شکل ۱)، آپوپتوز، التهاب و حضور لنفوستها، و همچنین گستردگی فضای پورت قابل مشاهده بود (شکل ۲).

تهیه و در یک میلی لیتر آب مقطر حل شده بود با غلظت حداکثر  $150 \mu\text{g/kg}$  و غلظت متوسط  $50 \mu\text{g/kg}$  و غلظت حداقل  $20 \mu\text{g/kg}$ ، به مدت ۱۵ روز به صورت دهانی و از طریق لوله گاوژ خوراندند.

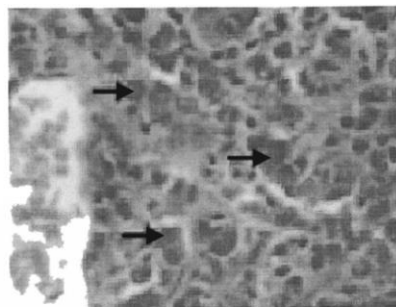
در پایان روز پانزدهم حیوانات تشریح شده و بافتهای مورد نظر جداسازی شده ابتدا مورد مطالعه مورفولوژیکی قرار گرفته سپس جهت تهیه برشهای بافتی درون فرمالین قرار داده شد.

پس از انجام مراحل پاساژ بافتی و تهیه برش توسط میکروتوم بافتها به وسیله H&E رنگ آمیزی شده و توسط میکروسکوپ نوری مورد مطالعه هیستوپاتولوژیکی قرار گرفتند. همچنین با توجه به نتایج بدست آمده میزان درصد تخریب بافتها در هر یک از گروههای آزمایشی تعیین شد.

نتایج بدست آمده از درصد تخریب بافتها براساس برنامه آماری SPSS و آزمون ANOVA و تست Tukey مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و اختلاف در سطح احتمال  $P < 0.05$  معنی دار در نظر گرفته شد.



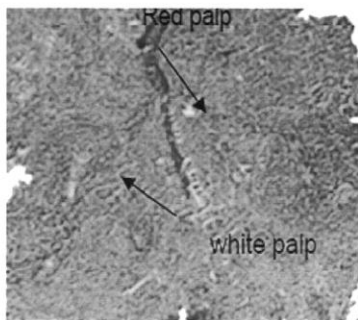
شکل ۲- برش بافتی از کبد موش گروه دریافت کننده دوز حداکثر، که التهاب سلولها اطراف فضای پورت را نشان می دهند.



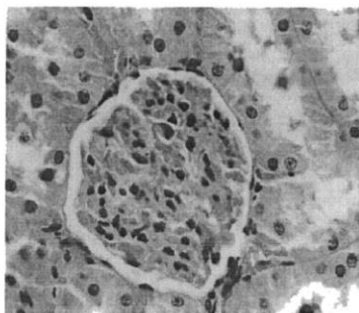
شکل ۱- فلشها نکروز بافتی را نشان می دهند.



**طحال:** بررسی‌های پاتولوژیک در اسلایدهای تهیه شده از بافت طحال در گروه‌های مختلف آزمایشی و کنترل صورت پذیرفت. نتایج به دست آمده همان گونه که پیش‌بینی می‌شد مانند بافتهای کلیه و کبد قابل ملاحظه بود. و همچنین این تغییرات با افزایش دوز مشهودتر و معنی‌دارتر نیز بود. در برشهای تهیه شده از بافت طحال در گروه‌های دریافت کننده دوزهای مختلف نانو ذرات اکسید آهن افزایش تعداد پالپهای سفید مشهود بود که این افزایش در گروه‌های دریافت کننده دوز متوسط و حداکثر معنی‌دار بود (شکل ۵).

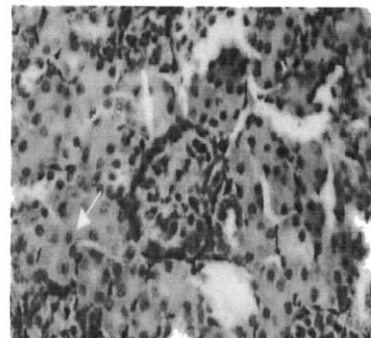


شکل ۵- تغییرات مورفولوژیکی در بافت طحال



شکل ۴- پرخونی کلاف مویرگی را در دوز متوسط و حداکثر نشان می‌دهد.

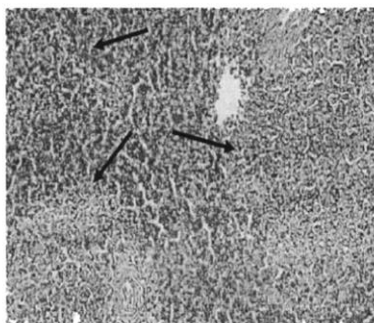
**کلیه:** اسلایدهای تهیه شده از بافت کلیه موشهای دریافت‌کننده دوزهای مختلف نانو ذرات اکسید آهن نسبت به گروه کنترل مورد بررسی‌های هیستوپاتولوژیکی قرار گرفت و تغییرات پاتولوژیکی زیادی شامل نکروز انعقادی، تورم سلولی توبولهای کلیوی و همچنین تزاید سلولهای پوششی در لایه احشایی کپسول بومن مشاهده شد (شکل ۳). همچنین اسلایدها نشان دادند که بافت کلیه در موشهای دریافت‌کننده دوزهای متوسط و حداکثر، دچار پرخونی کلافه مویرگی شده و گلومرولواسکلروزیس به صورت افزایش بستر مزانشیال و قطور شدن سرتاسری غشای پایه در گلومرولها مشهود است (شکل ۴). در بررسی لام‌های تهیه شده به صورت سریال سکشن یا برشهای متوالی با میکروسکوپ نوری، همچنین وجود سلولهای التهابی و لنفوسیتها در گلومرول کلیه موشهای دریافت کننده دوزهای متوسط و حداکثر ثابت شد.



شکل ۳- تزاید سلولهای پوششی در لایه احشایی کپسول بومن را نشان می‌دهد.



ع. و همکاران (۱۳۹۰). با توجه به مطالعات انجام گرفته توسط دانشمندان مختلف میزان سمیت این نانو ذرات مورد مطالعه قرار گرفت. اخیراً krejci و همکارانش ثابت کردند که اگرچه فرایند نشانه گذاری با نانو ذرات اکسید آهن روی قابلیت زیست و تکثیر سلولها اثری ندارد اما این فرایند قادر است عمل حفره سازی بدن جنین و همچنین تمایز سلولهای جنینی به سلولهای عصبی (نوروزن) را به طور خفیفی مهار کند (Krejci J et al. 2010). همچنین نانو ذرات اکسید آهن باعث تشدید پاسخهای التهابی در موشهای تیمار



شکل ۷- اسلاید تهیه شده از بافت طحال در گروه دریافت کننده دوز حداکثر، فلشها پالپهای سفید را نشان می دهد که افزایش یافته اند.

شده با این نانو ذرات می شوند و مطالعات نشان داده اند که این نانو ذرات قادرند فرایند چرخه سلولی را در مرحله G<sub>1</sub> متوقف کنند (Park E.J et al. 2010). Apopa و همکارانش در سال ۲۰۰۹ اعلام کردند که نانو ذرات اکسید آهن باعث افزایش نفوذپذیری سلولهای آندوتلیالی می شوند. اثرات سمی نانو ذرات اکسید آهن به دلیل اندازه و شکل آنها و توانایی عبور آنها از سد های فیزیولوژیکی می باشد (Apopa P.L et al. 2009). و ذرات نانو اندازه

همچنین نکته دیگری که در بررسیهای بافت طحال مورد توجه قرار گرفت کاهش وزن طحال بود که در اثر تحلیل رفتن پالپهای قرمز بوده و نشانگر وجود یک عامل توکسیک در جریان خون می باشد. همچنین، آتروفی طحال در موشهای گروه های دریافت کننده دوزهای متوسط و حداکثر در مقیاس بالا مشاهده شد. تحلیل رفتن واحدهای طحال (پالپهای قرمز) توسط نانو ذرات، افزایش لنفوسیتها (پالپهای سفید)، خونریزی، دژنراسیون شدید سلولها در مقایسه با گروه کنترل در طحال مشاهده گردید (شکل ۶ و ۷).



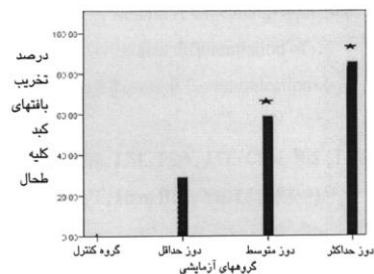
شکل ۶- تغییرات مورفولوژیکی در بافت طحال در دوز حداکثر، تحلیل رفتن واحدهای طحال (پالپهای قرمز) توسط نانو ذرات، افزایش لنفوسیتها (پالپهای سفید).

### بحث و نتیجه گیری

نانو ذرات براساس شکل و اندازه و نسبت سطح به حجمی که دارند قادرند از غشاهای زیستی عبور کنند و باعث بروز اختلالاتی در عملکرد سلولهای مختلف گردند. نانو ذرات اکسید آهن با تأثیر بر غشای سلولهای هپاتوسیت قادرند با تخریب این سلولها بر میزان آنزیمهای کبدی تأثیر بگذارند. این نانو ذرات باعث بروز تغییرات قابل توجهی در میزان آنزیمهای کبدی ALT, AST و ALP شدند (شیربند،



فلورسانت و کیت مخصوص آپوپتوز و همچنین مشاهدات مورفولوژیکی بافتها از قبیل اندازه، شکل، حجم، رنگ و میزان تورم بافتهای کبد، کلیه و طحال، میزان تخریب بافتها در هر یک از گروههای آزمایشی و گروه کنترل به طور جداگانه و با سه بار تکرار در هر گروه آزمایشی تعیین شد و سپس نتایج بدست آمده براساس برنامه آماری SPSS تجزیه و تحلیل شد و در قالب نمودار ۱ آورده شده است.



نمودار ۱- میزان درصد تخریب بافتهای کبد، کلیه و طحال با استفاده از نرم افزار آماری spss علامت \* نشان دهنده اختلاف در سطح معنی دار می باشد.

مطالعات آماری و بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیکی و مورفولوژیکی در این تحقیق نشان دادند که این نانو ذرات به علت نفوذ به سلولهای هیپاتوسیت و عبور از سد های فیزیولوژیکی از جمله غشای سلولهای مختلف قادرند در عملکرد سلولها اختلال ایجاد کرده و با ایجاد نکروز و تخریب سلولها باعث بروز اختلال در عملکرد کلی کبد گردند. همچنین با توجه به مطالعات انجام شده در این تحقیق می توان چنین نتیجه گرفت که هر چه میزان غلظت این نانو ذرات یعنی میزان دوز استفاده شده برای گروههای آزمایشی بیشتر باشد میزان بروز این اختلالات نیز بیشتر خواهد بود. همچنین مطالعه تغییرات

می توانند در مسیرهای دیگر مثل مسیر روده کوچک جذب شده و در خون، مغز، ریه، کلیه، طحال، روده کوچک و شکم منتشر شوند (Kim et al. 2008).

اندازه کوچک نانو ذرات آهن همراه با فعالیت زیاد احتمالاً در بافتهای هدف نفوذ می کنند و سبب عملکرد نامطلوب اندامها می شوند. نانو ذرات می توانند به اعماق بافتها نفوذ کنند و به سیستم لنفاوی راه یابند. ذراتی که پوشش ضخیم دارند از جذب فاگوسیت های موجود در گره های لنفاوی می گریزند و به جریان لنف وارد می شوند اما اگر میزان پوشش دهی کامل نباشد چنین ذراتی در گره های لنفاوی انباشته می شوند (Hawley 1995). از طریق توده های بافت لنفاوی روده ای از داخل مجرای روده، تغییر مکان می دهند. علاوه بر این، آنها می توانند فاگوسیتوز را در موکوس روده معدی بالا ببرند و سبب پاسخهای ایمنی با واسطه آنتی ژنی شوند (Lomer et al. 2002). بررسی ورود نانو ذرات پلی استیرن لاتکس از طریق دهانی نشان می دهد که نانو ذرات می توانند در طول مجرای گاسترواینتستینال (روده ای معده ای) جذب شوند و از منبع لنف روده بند (mesentery) و گره لنفاوی بگذرند و به کبد و طحال برسند (Jani et al. 1990). موادی با مقیاس نانو به سادگی توسط سیستم رتیولو اندوتلیال (RES) جذب می شوند (Yoshifumi 2002). با توجه به مطالب ارائه شده و مشاهده و بررسی اسلایدهای تهیه شده به صورت سریال سکشن یا برشهای متوالی از بافتها و از طریق تعیین میزان نکروز بافتی به وسیله میکروسکوپ نوری و رنگ آمیزی H&E و تعیین میزان آپوپتوز سلولها به وسیله میکروسکوپ



مورفولوژیکی و هیستوپاتولوژیکی بافتهای کلیه و طحال نیز بر این امر شاهدند که نانو ذرات اکسید آهن به علت شکل و اندازه خود قادرند به داخل سلولهای مختلف این بافتها نفوذ کرده و سبب بروز اختلال در عملکرد کلی این بافتها گردند.

به طور کلی می توان چنین نتیجه گرفت که نانو ذرات اکسید آهن با توجه به شکل و اندازه ای که دارند از غشاهای زیستی عبور می کنند و سبب بروز اختلال می گردند همچنین این نانو ذرات قادرند که با افزایش رادیکالهای آزاد و تحریک استرس اکسیداتیو، تعادل اکسیدانت/ آنتی اکسیدانت غشاهای زیستی را بر هم

زده و موجب تخریب غشاء و لیز شدن سلولها گردند که مجموع این اعمال می تواند سبب بروز اختلال در عملکرد بافتهای مختلف از جمله بافتهای کبد، کلیه و طحال که مورد مطالعه این تحقیق تجربی می باشند گردد. همچنین با توجه به نتایج بدست آمده می توان چنین نتیجه گرفت که هر چه میزان غلظت این نانو مواد بیشتر باشد میزان تخریب بافتی و بروز اختلال عملکردی نیز بیشتر خواهد بود. در جمع بندی کلی می توان بیان کرد که اثر نانو ذرات اکسید آهن برای بافتهای کبد، کلیه و طحال سمی بوده که میزان سمیت با افزایش دوز افزایش می یابد.



۱. شیربند، علی. افخمی، محمد. گلزاده، جلال. تأثیر نانو ذرات اکسید آهن روی هورمونهای تیروئیدی در موش صحرایی نر. مجله همایش نانو فناوری یزد، بهمن ۱۳۸۹.
2. Apopa, P.L.; Qian, Y.; Shao, R.; Guo, N.L.; Schwegler-Berry, D.; Pacurari, M.; Porter, D.; Shi, X.; Vallyathan, V.; Castranova, V.; Flynn, D.C.; Iron oxide nanoparticles induce human microvascular endothelial cell permeability through reactive oxygen species production and microtubule remodeling. *Part Fibre Toxicol.* (2009) 6, 1.
3. Hawley AE, D.S., Illum L, (1995). Targeting of colloids to lymph nodes: influence of lymphatic physiology and colloidal characteristics. *Adv Drug Del Rev* 17, 129-148
4. Jani P, Halbert CW, Langridge J, Florence AT. Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency. *J Pharm Pharmacol.* 1990 Dec; 42 (12): 821-6.
5. Ka-Wing Au; Song-Yan Liao; Yee-Ki Lee; Wing-Hon Lai; Kwong-Man Ng; Yau-Chi Chan; Mei-Chu Yip; Chung-Yee Ho; Ed X Wu; Ronald A Li; Chung-Wah Siua; Hung-fat Tse; Effects of iron oxide nanoparticles on cardiac differentiation of embryonic stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* (2009) 898-903.
6. Kim, Y.S., Kim, J.S., Cho, H.S., Rha, D.S., Kim, J.M., Park, J.D., Choi, B.S., Lim, R., Chang, H.K., Chung, Y.H., Kwon, I.H., Jeong, J., Han, B.S., Yu, I.J., (2008). Twenty-eightday
7. Krejci J.; Pachernik J.; Hampl A.; Dvorak P.; In vitro labeling of mouse embryonic stem cells with SPIO nanoparticles, *Gen, Physiol, Biophys.* 27 (3) (2010) 164-173.
8. Lomer, M.C., Thompson, R.P., Powell, J.J., (2002). Fine and ultrafine particles of the diet: influence on the mucosal immune response and association with Crohn's disease. *Proc Nutr Soc* 61, 123-130
9. Mirkovic B.; LahTurnsek T.; Kos J.; Nanotechnology in the treatment of cancer. *Zdrav Vestn* (2010) 79:146-15
10. Park E.J.; Kim H.; Kim Y.; Yij Choi K.; Inflammatory responses may be induced Toxicology 275. by a single intratracheal instillation of iron nanoparticles in mice (2010) 65-71.





## Abstracts

### The effect of iron oxide nanoparticles on liver, kidney and spleen in male rats

Kambiz roshanaei<sup>1</sup>, Said Shirmardi<sup>2</sup>, Said Rezaei Zarchi<sup>3</sup>, Ali Reza Abdollahi nia<sup>4</sup>

1. Islamec Azad University, Qom, iran, Email: kambize roshanaei@gmail.com
2. Student Physiology, Islamic Azad University, Qom, iran,
3. Payam Noor University Taft,
4. Master of Physiology Islamic Azad University, Qom, iran

#### Abstract:

Iron oxide nanoparticles have been used as contrast agents in the MRI and in thermal therapy for cancer cells. However, their, their adverse effects on human health have not been fully investigated. In this experience the effect of iron oxide nanoparticles on morphological and pathological changes of liver tissue, kidney and spleen tissue in rats was investigated. Mice in Three experimental groups were received iron oxide nanoparticle (20, 50 and 150  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) which was dissolved in 1 ml of distilled water by gavage tube daily and for fifteen days. The control group was received 1 ml of distilled water daily. Results showed morphological and pathological changes in the tissues. Meanwhile results showed that this change was depended to the dose. In liver, tissue necrosis, inflammation and increased number of lymphocytes was observed. Meanwhile port area was extensive. Necrosis of kidneys and destruction of bowmen's capsule and glomerular atrophy was observed. Meanwhile atrophy of spleen tissue was severe and loss of red pulps and white pulps increased. According to the results it seems that Iron oxide nanoparticles have toxic effects on the liver, kidney and spleen tissues that this effects increases with increasing dose.

#### Key words:

Iron oxide nanoparticles, liver, kidney, spleen, rat

