مقاله پژوهشی

بررسی هیستوپاتولوژیک جنین و ارزیابی وزن بدن، کلیه و کبد در موش باردار نژاد NMRI تحت مواجهه با نانوذره اکسید روی

باقر سید علیپور[1*]، معصومه عشریه[2]، رمضان خان بابایی[2]

۱- گروه زیست سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران.
۲- گروه زیست سلولی و مولکولی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم شهر، قائم شهر، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۰۷/۲۸ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۱۱/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: روی یک عنصر کمیاب ضروری است که نقش کلیدی در رشد و تکوین جنین در دوران بارداری دارد. این مطالعه برای بررسی اثر سمیت نانوذره اکسید روی بر رشد و نمو جنین و ارزیابی وزن بدن، کلیه و کبد موش باردار NMRI انجام شد.

مواد و روش‌ها: ۲۵ موش سوری ماده بالغ با وزن ۳ ± ۳۰ (گرم) به طور تصادفی به پنج گروه تقسیم شدند(یک گروه کنترل و چهار گروه تجربی). موش‌ها در گروه‌های تجربی ۱، ۲، ۳ و۴ در طی ۱۵ روز به صورت یک روز در میان نانو اکسید روی به ترتیب با غلظت‌های ۵۰،۱۰۰،۱۵۰،۲۰۰ mg/kg (تزریق درون صفاقی) دریافت کردند. در پایان این دوره وزن بدن، کلیه و کبد موش‌های باردار و جنین‌ها اندازه‌گیری شد. همچنین، بررسی هیستوپاتولوژی بر روی جنین‌ها انجام گردید. داده‌ها توسط برنامه آماری SAS در سطح $P\leq0.05$ آنالیز شدند.

نتایج: بر اساس مشاهدات ماکروسکوپی وزن جنین و کلیه با افزایش غلظت‌های مختلف نانوذره در مقایسه با کنترل به ترتیب کاهش و افزایش یافت ($P\leq0.05$). داده‌های ما نشان داد در غلظت‌های مختلف نانوذره فاصله و اندازه و تعداد اجسام مهره‌ای نسبت به گروه کنترل افزایش یافت. در غلظت ۱۵۰ mg/kg تجمعی از سلول‌های مزانشیمی جهت غضروفی شدن مشاهده گردید و به نظر می‌رسد دوز بالای نانو ذره از رشد جنین ممانعت می‌کند.

نتیجه‌گیری: نتایج ما نشان داد اکسید روی سبب تاخیر در رشد و نمو، بهم ریختگی و عدم تمایز کامل جنین در موش NMRI شده است.

کلمات کلیدی: نانو ذره اکسید روی، موش نژاد NMRI، رشد و نمو جنین

مقدمه

در حال حاضر فناوری نانو پیشرفته‌ترین و جدیدترین فن آوری بشری است که از همگرایی علوم فیزیک، شیمی و زیست شناسی به وجود آمده است. توسعه قابل توجه نانو تکنولوژی و استفاده گسترده نانومواد در زمینه‌های مختلف صنعتی باعث ضرورت بررسی اثرات تخریبی آن‌ها بر سیستم بیولوژیک می‌باشد (۱). از این رو در استفاده از نانو ذرات باید به سمیت آن‌ها توجه نمود زیرا می‌تواند با پاسخ‌هایی چون التهاب مزمن و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن همراه باشد (۲). نانوذرات طبقه‌ای از مواد با ابعاد ۱ تا ۱۰۰ نانومتراند که دارای ویژگی‌های بسیار خاص شیمیایی و فیزیکی از نظر اندازه، شکل و نسبت بالای سطح به حجم می‌باشند گاهی اندازه آن‌ها کوچکتر و یا در حد ساختارهای سلولی، ویروس، پروتئین و یا یک ژن می‌باشند (۳). همچنین ویژگی‌های جدید مانند انحلال پذیری، تحرک بسیار زیاد در بدن انسان و توانایی نفوذ به غشا سلولی را می‌توان نام برد که این امر سبب شده مقیاس نانو بیش از مقیاس‌های دیگر مورد توجه قرار گیرد (۴). با توجه به خصوصیات منحصر به فرد فیزیکوشیمیایی نانوذرات ممکن است نوع سمیت آن‌ها با موادی که از نظر

*نویسنده مسئول: **باقر سید علیپور**، گروه زیست سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران. تلفن: ۰۹۱۱۲۱۲۹۶۵۸ Email: b.seyedalipour@umz.ac.ir

ساختمان شیمیایی با آن‌ها یکسان اما اندازه متفاوت دارند، فرق داشته باشد، حتی امکان دارد که نانو ذره‌ها سمیت بیشتری در مقایسه با ذرات بزرگ‌تر ایجاد کنند (۵). نانوذرات اکسید فلزی می‌توانند وارد رگ‌ها و بافت‌های مغز شوند و از این طریق می‌توانند قابلیت دسترسی زیستی را افزایش دهند. این مسئله ممکن است منجر به تأثیرات سمی و پاسخ‌های التهابی در مغز و تخریب سیستم عصبی مرکزی شود (۳).

اخیراً در مورد نانوذرات اکسید مس (CuO) و اکسید روی (ZnO) به عنوان نماینده کاربرد صنعتی و خانگی نشان داده شده است که تأثیرات منفی بر بقاء و رشد موجودات زنده دارند (۳). تولید نانوذرات مهندسی شده در مقیاس وسیع ممکن است منجر به مواجهه ناخواسته این ترکیبات با انسان‌ها و محیط زیست شود. علاوه بر افزایش درک ما نسبت به سمیت نانوذرات، مطالعه مناسب ویژگی‌های نانوذرات اکسید فلزی ضروری است، نیاز مبرمی به درک سمیت آن‌ها بر موجودات زنده و محیط زیست از نظر فرآیندهای جذب، توزیع زیستی، متابولیسم و دفع نانو مواد در موجود زنده وجود دارد (۳). برخی از مطالعات نشان دادند که نانوذرات اکسید روی توابعی از بافت‌های سازگاری نسجی را تحت تاثیر قرار می‌دهند (۶) که به طور مثال می‌توان به کبد، طحال، قلب، پانکراس و استخوان اندام‌های هدف برای قرار گرفتن در معرض اکسید روی 120-20 نانومتر اشاره نمود (۷). شواهد نشان داد که نانوذرات اکسید روی نانوذراتی سمی با کمترین سمیت از نظر LD_{50} در میان نانوذرات فلزی اکسید شناخته شده است (۷). مشاهده شد استفاده از نانو ذرات اکسید روی در محصولات آرایشی و بهداشتی سبب ایجاد رادیکال‌های آزاد در پوست شده و بنابراین می‌توانند به DNA و پروتئین‌های این سلول‌ها آسیب زده و ممکن است در نهایت منجر به سرطان شوند (۸)، همچنین این نانو ذرات می‌توانند از لایه‌های حفاظتی بدن عبور کرده و وارد جریان خون شده و سبب اثرات سمیت شدید شوند (۹). برخی از نانو ذرات، بسته به ترکیب و اندازه آن‌ها، می‌توانند رادیکال آزاد و استرس اکسیداتیو ایجاد کنند و با مکانیسم استرس اکسایشی یعنی حمله رادیکال‌های آزاد به بافت‌ها، می‌توانند به اندام‌ها، بافت‌ها و اندامک‌های مختلف آسیب رسانند (۱۰ و ۱۱).

نانو ذرات قادر به عبور از غشاهای زیستی بوده و به سلول‌ها، بافت‌ها و اعضایی که اجازه عبور مواد در اندازه‌های معمول را نمی‌دهند، وارد می‌شوند و نانوذرات ممکن است به مدت طولانی در بدن باقی بمانند و از این رو بررسی سمیت آن‌ها از موارد مهم و قابل مطالعه به شمار می‌رود (۱۲). عنصر روی جزء فلزات ضروری و البته کمیاب محسوب می‌شود که وجود آن در مقادیر کم برای بدن ضروری می‌باشد. اما کاهش آن به خصوص در دوران بارداری می‌تواند باعث بروز سقط جنین، ناهنجاری مادرزادی و زایمان زودرس گردد (۱۳ و ۱۴).

مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که برخی از نانوذرات ساخته شده از اکسیدهای فلزی، مانند نانوذره اکسید روی سمیت انتخابی به باکتری و تنها اثر کمی بر روی سلول‌های انسان نشان می‌دهد، که استفاده بالقوه آن‌ها در صنایع کشاورزی و مواد غذایی توصیه می‌شود (۹). استفاده رو به رشد نانوذرات مصنوعی در جوامع انسانی بی شک منجر به آزادسازی چنین موادی به انواع محیط‌ها و اکوسیستم‌ها خواهد شد. با این وجود تحقیقات کمی در مورد رفتار محیطی، میزان آزادسازی در محیط‌های آبی و خطرناک ناشی از نانوذرات صورت گرفته است و امنیت این ترکیب برای بشر هنوز هم نامشخص است. از این رو و با توجه به این که پژوهش‌ها در مورد اثرات روی بر بافت‌های بدن اندک و در مواردی نیز متناقض است، بررسی سمیت آن‌ها از موارد مهم و قابل مطالعه به شمار می‌رود.

با بررسی مطالعات گذشته به نظر می‌رسد که تاکنون مطالعه‌ی اثر نانوذره اکسید روی با قطر ۲۰ نانومتر بر روی رشد و نمو اجسام مهره‌ای جنینی صورت نگرفته است؛ لذا انجام مطالعات در ارتباط با تاثیر نانوذرات اکسید روی بر روی رشد و نمو جنینی یک موضوع جدید محسوب می‌شود. با توجه به اهمیت موضوع، در این تحقیق به بررسی و مطالعه اثر سمیت نانوذرات اکسید روی بر وزن بدن، کلیه و کبد موش‌های باردار و جنین‌ها پرداختیم. همچنین، بررسی هیستوپاتولوژی بر روی اجسام مهره‌ای جنین‌های موش نژاد NMRI انجام گردید.

مواد و روش‌ها

نانو اکسید روی مورد استفاده در این آزمایش از شرکت نانوسونی (Nanosany Company, Mashhad, Iran) تهیه شد که به شکل پودر سفید رنگی با ذراتی به ابعاد ۲۰ نانومتر و درصد خلوص ۹۹٪ بود. در این آزمایش از موش‌های بالغ نر و ماده با

دامنه وزنی ۳±۳۰ گرم استفاده شد. ۲۵ سر موش سوری ماده با میانگین سنی ۸-۷ هفته جهت شروع مراحل اصلی آزمایش انتخاب شدند در ۵ گروه ۵ تایی به صورت تصادفی قرار گرفتند. مقدار مورد نیاز از پودر نانو اکسید روی با توجه به دوزی که به موش تزریق خواهد شد، بر حسب میلی گرم وزن شده و در درون ویال با مقدار معینی از آب مقطر استریل دوبار تقطیر مخلوط شد و سپس ویال به مدت چند دقیقه ورتکس شد تا محتویات آن به خوبی حل شود. محلول سفید رنگ را با سرنگ انسولینی به حیوان تزریق شد. حیوانات در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و حرارت ۲±۲۳ درجه سانتی گراد نگهداری و دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند.

برای مشخص کردن این که چه مقدار از نانو اکسید روی باید مورد استفاده قرار گیرد LD50 تعیین شد که در ابتدای آزمایش ضروری می‌باشد. زیرا باید از کمترین حد کشندگی برای تزریق به جانور استفاده شود. در این آزمایش از زیر حد دوز خطرناک برای تاثیرگذاری بر روی جنین‌ها استفاده گردید. گروه‌ها شامل یک گروه کنترل و چهار گروه تجربی بودند که نانو اکسید روی با قطر ۲۰ نانومتر با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰،۲۰۰ میلی گرم بر گیلوگرم به صورت یک روز در میان با حجم نیم میلی لیتر به مدت ۱۵ روز و با سرنگ انسولینی به گروه‌های تجربی تزریق گردید و در همین مدت به گروه کنترل فقط نیم میلی لیتر آب مقطر تزریق شد. دو روز بعد از اولین تزریق، ۵ موش ماده بالغ و ۳ موش نر بالغ در قفس قرار داده شدند. آمیزش معمولا در نیمه‌های شب انجام می‌گرفت و منجر به ایجاد پلاک واژنی می‌شد. مشاهده Vp نشانه خوبی برای تایید جفت‌گیری است. با مشاهده پلاک واژینال در صبح روز بعد، موش‌های ماده از سایر موش‌های نر و ماده جدا گشته و در قفس جداگانه نگه داری شدند و آن روز به عنوان روز صفر حاملگی در نظر گرفته شد و سپس تزریق یک روز بعد از مشاهده پلاک واژینال هفت بار به صورت یک روز در میان ادامه یافت .

اندازه‌گیری وزن اندام‌ها و بررسی هیستوپاتولوژی جنین:

برای اندازه‌گیری وزن جنین، کلیه و کبد در روز ۱۷ بارداری موش‌ها کالبد شکافی شدند و جنین‌ها در زیر میکروسکوپ استریو از بافت رحمی و سپس پرده آمنیونی خارج شدند و همچنین بعد از کالبد شکافی کبد و کلیه تمام موش‌های بالغ جدا و قبل از فیکس کردن وزن کبد و کلیه تمام موش‌ها اندازه‌گیری شد. در ضمن قبل از هر تزریق موش‌ها وزن شدند و وزن آن‌ها با هم و با گروه کنترل مقایسه گردید. جهت بررسی هیستوپاتولوژی جنین‌ها درون شیشه‌های محتوی محلول بوئن تثبیت شدند و پس از آب گیری با الکل به وسیله گزیلن باقی‌مانده الکل خارج شده و توسط دستگاه آماده ساز بافت بلوکه پارافینی تهیه گردید و با میکروتوم از بلوک‌ها برش با ضخامت ۵ میکرون تهیه و با روش هماتوکسیلین - ائوزین رنگ آمیزی شدند.

آنالیز آماری:

پس از جمع آوری داده‌ها تجزیه و تحلیل با استفاده از برنامه آماری SAS انجام شد. تجزیه و تحلیل برای صفات وزن W1 تا W8 به روش GLM (مدل‌های خطی کلی) انجام گردید. مقادیر به صورت مقایسه میانگین ± انحراف معیار بیان شده است و اختلاف در سطح احتمال $P\leq0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد. سپس با استفاده از نرم افزار Excel هیستوگرام‌ها رسم شد.

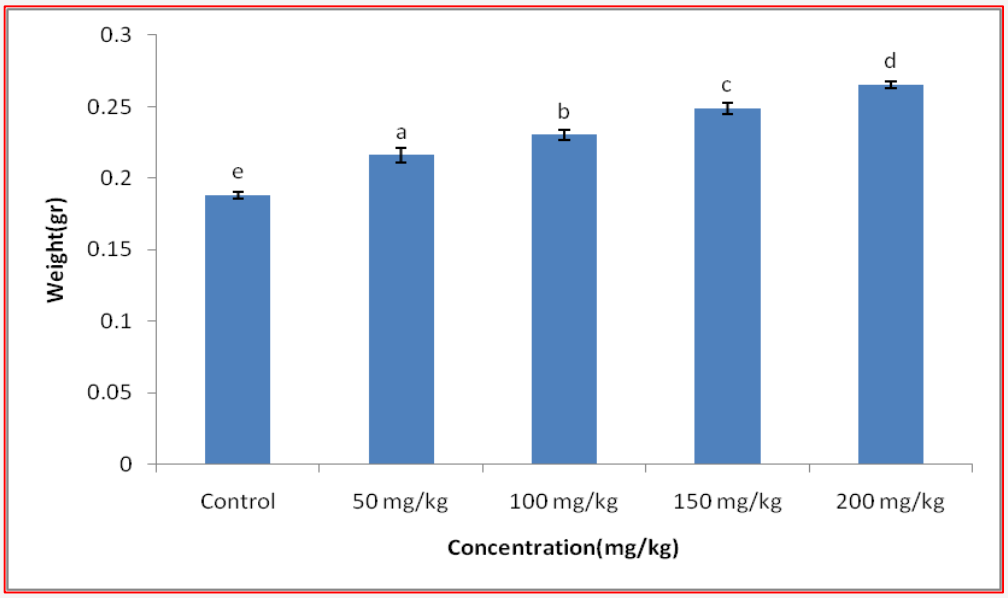
نتایج

نتایج بررسی اثر نانوذره اکسید روی با قطر۲۰ نانومتر به صورت تزریق درون صفاقی به موش نژاد NMRI نشان داد که میانگین تغییرات وزن گروه کنترل و گروه تیمار معنی دار بوده به طوری که تغییرات وزن موش‌های تیمار شده در طول زمان در دومین روز تزریق اختلاف معنی داری را در ($P\leq0.05$) با کنترل نشان داد. میانگین وزن موش‌ها قبل از شروع آزمایش روز دوم (W2) در گروه کنترل 1.47 ± 25.4 گرم بوده ولی در غلظت ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم به ترتیب 1.58 ± 32.85، 33.8 ± 1.47 و 1.58 ± 33.31 گرم بوده که نسبت به کنترل افزایش معنی داری را $P\leq0.05$ نشان دادند (جدول ۱). همچنین وزن موش‌ها در روز چهارم (W4) در گروه کنترل 1.47 ± 26 گرم بوده ولی در غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم به ترتیب 32.29 ± 1.63 و 1.47 ± 34.6 بوده که نسبت به کنترل اختلاف معنی داری در $P\leq0.05$ مشاهده شد (جدول ۱). همان طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود در روزهای دیگر تغییرات کمی در میانگین وزن مشاهده شد که نسبت به کنترل تغییرات آن در سطح $P\leq0.05$ معنی دار نبود.

جدول ۱: مقایسه میانگین وزن موش‌های (گرم) نژاد NMRI پس از هشت بار تیمار با غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید روی

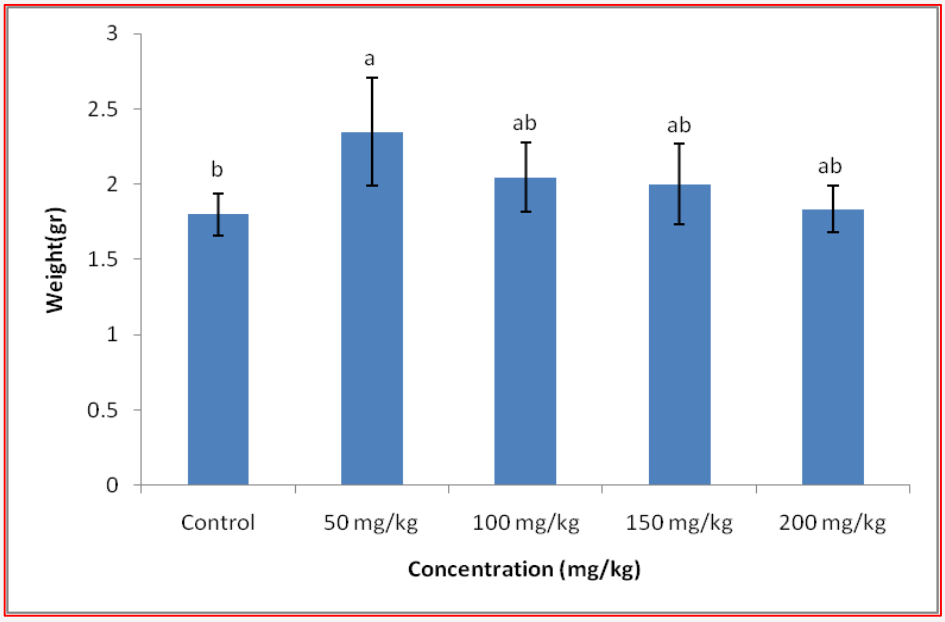
Concentration / Time (Day)	control	50 mg/kg	100 mg/kg	150 mg/kg	200 mg/kg
W1	21.9 ± 1.47	30.3 ± 1.47	29 ± 1.47	29.06 ± 1.47	31.24 ± 1.47
W2	25.4 ± 1.47	32.85 ± 1.58*	33.8 ± 1.47*	28.2 ± 1.47ns	33.31 ± 1.58*
W3	27.58 ± 1.47	32.26 ± 1.61	34.4 ± 1.47	26.2 ± 1.47	31.96 ± 1.79
W4	26 ± 1.47	32.29 ± 1.63*	34.6 ± 1.47*	27.45 ± 1.58 ns	31.37 ± 1.84 ns
W5	25.4 ± 1.47	32.03 ± 1.63	33 ± 1.47	30.65 ± 1.79	31.88 ± 1.87
W6	27.8 ± 1.47	32.77 ± 1.64	34.8 ± 1.47	31.51 ± 1.84	30.89 ± 1.88
W7	27.2 ± 1.47	36.35 ± 1.81	34.8 ± 1.47	32.87 ± 1.87	33.80 ± 1.89
W8	30.21 ± 1.58	38.60 ± 1.85	36.58 ± 1.47	36.48 ± 1.88	35.33 ± 1.89

Day: تزریق یک روز درمیان به مدت ۱۵ روز. (W1) روز تزریق قبل از شروع بارداری، (W2) الی (W7) روزهای تزریق در دوران بارداری، (W8) روز ۱۷ بارداری و تشریح موش. مقادیر به صورت مقایسه میانگین ± انحراف معیار بیان شده است. * اختلاف در سطح احتمال ۵ درصد در مقایسه با کنترل، ns عدم وجود اختلاف معنی دار

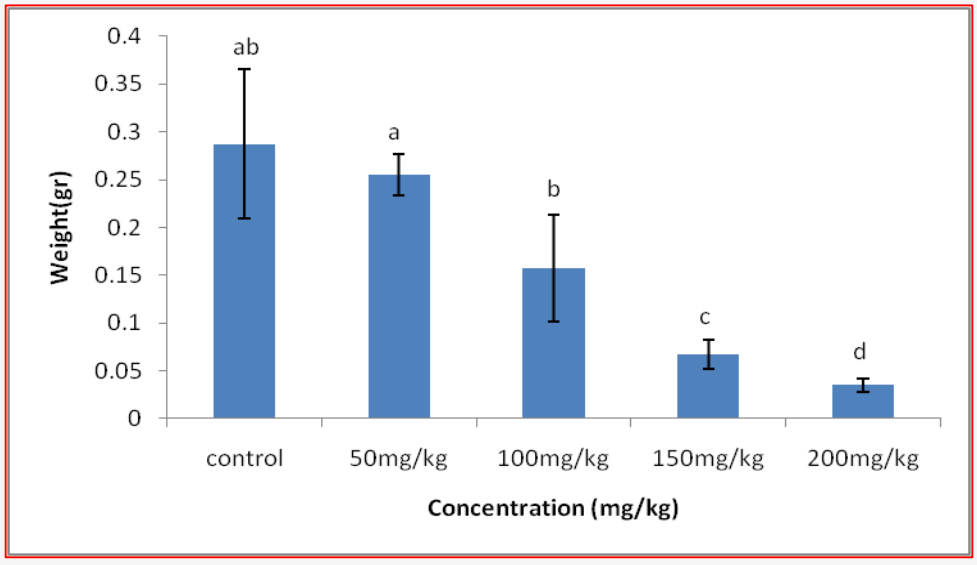


نمودار ۱: مقایسه میانگین وزن کلیه موش‌های نژاد NMRI پس از ۸ مرتبه تیمار با غلظت‌های مختلف نانوذره اکسیدروی. مقادیر به صورت مقایسه میانگین ± انحراف معیار بیان شده است. میانگین‌ها با کد حرف‌های متفاوت (a, b, c, d, e) دارای تفاوت معنی دار می‌باشد و اختلاف در سطح احتمال P≤0.05 معنی دار در نظر گرفته شدند.

همان طور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود در اثر تزریق نانو ذره اکسید روی با غلظت‌های مختلف سبب افزایش در وزن کلیه شد که این افزایش در سطح P≤0.05 نسبت به کنترل معنی دار می‌باشد. بررسی انجام شده بر وزن کبد در غلظت‌های مختلف نانو



نمودار ۲: مقایسه میانگین وزن کبد موش‌های نژاد NMRI پس از ۸ مرتبه تیمار با غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید روی. مقادیر به صورت مقایسه میانگین ± انحراف معیار بیان شده است. میانگین‌ها با کد حرف‌های متفاوت (a, b, c) دارای تفاوت معنی دار می‌باشد و اختلاف در سطح احتمال $P\leq0.05$ معنی دار در نظر گرفته شدند.

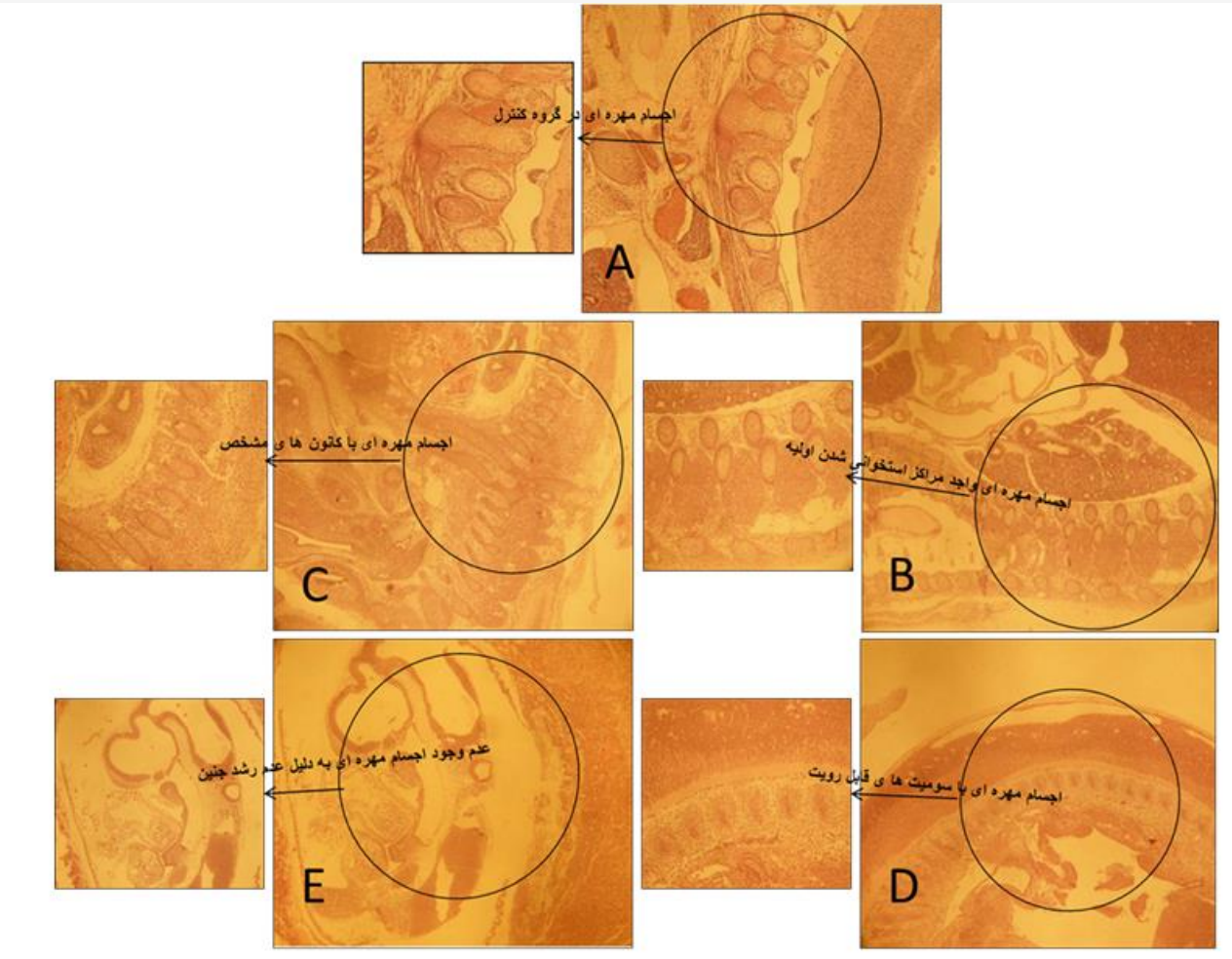


نمودار ۳: مقایسه میانگین وزن جنین موش‌های نژاد NMRI پس از ۸ مرتبه تیمار با غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید روی. مقادیر به صورت مقایسه میانگین ± انحراف معیار بیان شده است. میانگین‌ها با کد حرف‌های متفاوت (a, b, c, d) دارای تفاوت معنی دار می‌باشد و اختلاف در سطح احتمال $P\leq0.05$ معنی دار در نظر گرفته شدند.

ذره اکسید روی نشان داد که وزن کبد در همه غلظت‌ها افزایش داشت اما این افزایش وزن معنی دار نبود فقط در غلظت ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم تغییرات معنی داری در سطح ($P\leq0.05$) با کنترل مشاهده شد (نمودار ۲).

مشاهدات ماکروسکوپی نشان داد که وزن جنین‌ها و تعداد جنین‌ها با افزایش غلظت‌های مختلف نانو ذره در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت و همچنین با افزایش غلظت نانوذره اثر سمی آن نیز افزایش داشت به طوری که کمترین تعداد بارداری را در بالاترین غلظت یعنی ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم مشاهده شد (نمودار ۳).

نتایج مطالعه هیستولوژی بر روی موش نژاد NMRI نشان داد که نانو ذره اکسید روی در غلظت‌های مختلف بر رشد و تکوین جنین موش تاثیر گذاشته و باعث کاهش رشد و تاخیر در تشکیل اجسام مهره‌ای می‌شود (شکل ۱).



شکل ۱: مقاطع بافتی اجسام مهره‌ای جنین ۱۷ روزه موش نژاد NMRI با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین. بزرگنمایی میکروسکوپی 40x . (A) مقاطع بافتی اجسام مهره‌ای جنین ۱۷ روزه در گروه کنترل (B) مقاطع بافتی اجسام مهره‌ای جنین ۱۷ روزه در غلظت ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم، اجسام مهره‌ای واجد مراکز استخوانی شدن اولیه می‌باشند. (C) مقاطع بافتی اجسام مهره‌ای جنین ۱۷ روزه در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم، اجسام مهره‌ای باکانون‌ها مشخص شده (D) مقاطع بافتی اجسام مهره‌ای جنین ۱۷روزه در غلظت ۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم، اجسام مهره‌ای با سومیت‌های قابل رویت (E) مقاطع بافتی اجسام مهره‌ای جنین ۱۷ روزه در غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم، جنین در مقایسه با جنین‌های شاهد رشد خیلی کمی داشت.

بحث و نتیجه‌گیری

عنصر روی یکی از مهمترین عنصرهای ضروری بدن می‌باشد. کمبود روی به خصوص در دوران بارداری باعث کاهش عملکرد هورمون‌های میتوژن در طی رشد و نمو جنینی می‌شود و در نتیجه تغییرات زیادی در تکوین اندام‌های جنینی ایجاد می‌کند (۱۵). با توجه به اهمیت روی در دوران بارداری، در مطالعه حاضر اثر غلظت‌های مختلف نانو ذره اکسید روی ۲۰ نانومتری بر وزن کبد و کلیه موش باردار و جنین بررسی شد. مطالعه انجام شده بر وزن کبد در غلظت‌های مختلف نانو ذره اکسید روی نشان داد در اثر هشت بار تزریق نانوذره اکسید روی در تمام غلظت‌ها، وزن کبد افزایش پیداه کرده که این افزایش در سطح $P\leq0.05$ معنی دار نمی‌باشد و فقط در غلظت ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم تغییرات معنی داری در سطح ($P\leq0.05$) با کنترل مشاهده شد که نشان دهنده اثر نانوذره اکسید روی بر کبد می‌باشد. وانگ و همکاران سمیت نانوذرات اکسید روی از طریق مجرای گوارشی مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها مشاهده کردند اندام‌های اصلی از جمله قلب، ریه، کبد و کلیه در مقایسه با گروه کنترل صدمه دیدند و از بین رفتند در حالی که در سلول‌های طحال و مغز آسیبی مشاهده نشد (۱۶). یوسفی و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند نانوذرات اکسید آهن در غلظت‌های بالا می‌تواند اثرات نامطلوبی بر روی کبد داشته باشد و باعث صدمه به بافت کبدی شود (۱۷).

مطالعه Cho و همکاران با نانو ذره اکسید روی به صورت خوراکی نشان داد که بعد از ۷۲ ساعت سطح معنی داری از روی در اندام‌ها به ویژه کبد و کلیه توزیع و پخش شد (۱۸). بررسی ما نشان داد که وزن کلیه در همه غلظت‌های نانو ذره اکسید روی نسبت به گروه کنترل در سطح ($P\leq0.05$) افزایش معنی داری داشت (نمودار ۱) که نشان دهنده اثر نانوذره اکسید روی بر کلیه می‌باشد. مطالعات نشان داد مسیر اصلی حذف نانو ذرات در ادرار به وسیله کلیه می‌باشد. تجویز خوراکی نانوذرات اکسید روی یا $ZnCl_2$ بر روی کبد و کلیه موش صحرایی باعث افزایش فعالیت آنزیم پلاسمایی ترانس آمیناز و افزایش قابل توجهی از محتوای روی در کبد و کلیه شد (۱۹). نتایج ما هم نشان داد تزریق نانوذره اکسید روی به صورت درون صفاقی باعث تغییر در وزن کلیه شده به طوری که با گروه کنترل اختلاف معنی داری را نشان داد.

بنابراین در این مطالعه مشخص گردید بعد از هشت بار تزریق با غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید روی، تغییرات عمده‌ای در کبد و کلیه مشاهده شد. این یافته‌ها نشان دهنده عبور نانوذرات از غشاء سلولی مختلف، ورود آن به جریان خون و در نهایت ورود به کبد و کلیه می‌باشد. در ضمن تغییرات معنی دار وزن کبد و کلیه می‌تواند بیانگر اثر سمی نانوذرات اکسید روی در مدت زمان آزمایش با غلظت‌های فوق باشد. بنابراین نتایج ما در راستای یافته‌های به دست آمده توسط وانگ و همکاران می باشد که نشان می‌داد تغییرات آسیب شناختی القا شده توسط نانوذرات اکسید روی وابسته به اندازه و مقدار می‌باشند (۱۶).

در این تحقیق همچنین تغییرات وزن موش در طی تزریق نانو ذره اکسید روی اندازه‌گیری شد. بررسی ما نشان داد در دومین و چهارمین روز تزریق اختلاف معنی داری در سطح $P\leq0.05$ با کنترل مشاهده شد در حالی که تغییرات مشاهده شده نسبت به کنترل در بقیه روزها معنی دار نبود. نتایج مطالعه ما نشان داد تغییرات وزنی در موش نژاد NMRI نشان دهنده اثر نانوذره بر رشد موش در غلظت‌های مختلف می‌باشد بنابراین نتایج ما موافق با اثر نانوذرات اکسید آهن می‌باشد که به موش‌های سوری باردار به صورت درون صفاقی تزریق شد (۲۰) . این نتایج می‌تواند زمینه‌ای برای بررسی‌ها و مطالعات جامع تر با غلظت‌ها و زمان‌های متفاوت باشد.

همان طوری که در نمودار ۳ مشاهده می‌شود وزن جنین‌ها با افزایش غلظت‌های مختلف نانو ذره در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت و با افزایش غلظت نانوذره اثر سمی آن نیز افزایش یافت. در بررسی رسوب ذرات در مقیاس نانو اکسید روی در محیط کشت زبرافیش و ارزیابی سمیت نانو ذرات ZnO بر روی رشد و نمو جنین و لارو زبرافیش، ترکیبی از هر دو ZnO و Zn^{2+} منجر به سمیت جنینی، احتمالا با افزایش گونه واکنشی اکسیداتیو (ROS) باشد (۲۱).

همچنین نتایج مطالعه میکروسکوپی برروی موش نژاد NMRI نشان داد که نانو ذره اکسید روی در غلظت‌های مختلف بر رشد و تکوین جنین موش تاثیر گذاشته و باعث کاهش رشد و تاخیر در تشکیل اجسام مهره‌ای می‌شود. بررسی اثرات نانوذرات با اجزای شیمیایی مختلف بر پیامد بارداری مشخص شد. نانوذرات اکسید روی می‌تواند اثر سمی بر تولید مثل موش اعمال

کند (۲۲). Gao و همکاران نشان دادند تزریق نانو ذره TiO_2 با غلظت‌های ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت داخل شکمی به موش باعث تجمع نانوذرات در تخمدان و آسیب به آن، موجب عدم تعادل در ترشح هورمون‌های جنسی، کاهش باروری و تغییر وزن موش می‌شود (۲۳).

همان طور که در شکل ۱ تصویر A (کنترل) نشان داده شده است انتظار داریم، در جنین ۱۷ روزه استخوانی شدن جسم مهره‌ای در ناحیه‌ی تحتانی سینه شروع شود (۲۴). مطالعات ما نشان داد در غلظت ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم اجسام مهره‌ای که واجد مراکز استخوانی شدن اولیه می‌باشند از نظر اندازه کوچک تر شده است، همچنین فاصله بین اجسام مهره‌ای و تعداد آن‌ها نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است (شکل ۱ تصویر B). در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم اجسام مهره‌ای هنوز به طور کامل تمایز نیافتند و نسبت به غلظت ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم نظم و انسجام کمتری دیده می‌شود. پریور و همکاران در سال ۲۰۱۳ با مطالعه اثر نانو اکسید روی بر روی جوانه اندام حرکتی جلویی جنین موش، تغییرات زیادی را در تعداد سلول‌های استخوانی، کندروسیتی، مزانشیمی و غضروفی مشاهده کردند که نشان دهنده اثر نانو ذره اکسید روی در تشکیل و عدم تشکیل قسمت‌های مختلف جنین می‌باشد (۲۵).

نتایج مطالعه ما در غلظت ۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم نانو ذره اکسید روی، اجسام مهره‌ای با کانون‌های مشخص شده را نشان می‌دهد به طوری که تجمعی از سلول‌های مزانشیمی دیده می‌شود که به سمت غضروفی شدن پیش رفتند ولی هنوز غضروفی نشده‌اند.

در این غلظت سومیت‌ها هنوز به طور واضح قابل رویت می‌باشند و مزانشیم دیسک‌های بین مهره‌ای ابتدایی قدامی در حال متراکم شدن هستند (شکل ۱ تصویر C).

همان طور که در شکل ۱ و تصویر D مشاهده می‌شود در غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم، جنین در مقایسه با جنین‌های ۱۷ روزه (کنترل) رشد خیلی کمی داشته و اجسام مهره‌ای تشکیل نشد و احتمالا در این غلظت تزریق دوز بالای نانوذره سبب شده تا اجازه رشد به جنین داده نشود. تمایز سلول‌های مزانشیمی به غضروف و استخوان تا حد زیادی به یون روی وابسته است (۲۶). یون روی به عنوان عنصر کمیاب و ضروری زمانی مهم هست که بیش از حد مصرف نشود و افزایش بیش از حد روی موجب تجمع در اندام‌های موجودات زنده می‌شود و این مسئله می‌تواند منجر به سقط‌های جنینی در دوران بارداری شود (۲۷). مطالعات قبلی انجام گرفته با استفاده از رنگ آمیزی آبی پروس بر روی مقاطع بافتی جنین قبل از تولد، حضور نانوذرات را در بافت کبد و عبور آن‌ها از سدخونی - جفت و نفوذ به جنین درحال تکوین را اثبات کرد که احتمالا باعث ایجاد اختلال در بیان ژن‌ها، تمایز و مهاجرت سلولی می‌شود (۲۰). این نتایج مطالعات ما را حمایت می‌کند، که نانو ذره اکسید روی در غلظت‌های مختلف بر جنین در حال رشد موش نژاد NMRI تاثیر گذاشته و باعث کاهش رشد و تاخیر در تشکیل اجسام مهره‌ای شده است و نقش مهم این عنصر در کنترل تقسیم، تکثیر و تمایز را مطرح می‌کند.

روی یک عنصر ضروری برای رشد، تکوین، سنتز DNA و سایر فرآیندهای سلولی می‌باشد و ازسوی دیگر با وجود بهره‌برداری فراگیر از نانوذرات ZnO و تولید روز افزون نانو اکسید روی و کاربردهای مفید آن در سیستم‌های بیولوژیک، تاکنون مطالعات اندکی در زمینه اثر سمیت نانو ذرات ZnO بر سلامت نسل و تکوین انجام شده است. نتایج مطالعه ما نشان داد که نانو ذره ۲۰ نانومتری اکسید روی باعث کاهش وزن جنین و تعداد جنین در دوزهای بالا شده و با افزایش غلظت نانوذره اثر سمی آن نیز افزایش داشت به طوری که کمترین تعداد بارداری در غلظت بالا مشاهده شد. بررسی هیستولوژی نشان داد که نانو ذره اکسید روی باعث تاخیر در رشد و نمو جنین شده و اجسام مهره‌ای هنوز به طور کامل تمایز نیافته‌اند و نظم و انسجام کمتری در آن‌ها نسبت به گروه کنترل دیده می‌شود. بنابراین می‌توان از این نتایج برای افزایش ایمنی و سلامت انسان در برابر اثر سمیت نانوذرات استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از سرکار خانم دکتر میرمحمدرضایی در بخش هیستولوژی و جناب آقای دکتر عبدالله پور در آنالیز آماری و کارشناس آزمایشگاه مرکزی آقای مجید قاسمی در آمادگی نمونه‌ها و بافت‌ها ما را یاری نمودند نهایت تشکر به عمل می‌آید.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Ostadhadi S , Bakhtiarian A, Azizi Y, Nikoui V. Respiratory and blood responses following intratracheal instillation of titanium dioxide nanoparticles in rabbits. Tehran Univ Med J (TUMJ). 2013;71(1):24-30. [Persian].
2. Chen Z, Meng H, Xing G, Chen C, Zhao Y, Jia G, et al. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. Toxicol Lett. 2006; 163(2): 109–120.
3. Chang Ya, Xia L, Zhang M, Zhang J, Xing G. The Toxic Effects and Mechanisms of CuO and ZnO Nanoparticles. Materials. 2012; 5(12): 2850-2871.
4. Warheit DB, Hoke RA, Finday C, Donner EM, Reed KL, Sayes CM. Development of a base set of toxicity tests using ultrafine Tio_2 as a component of nanoparticle risk management. Toxicol Lett , 2007; 171(3): 99 -110.
5.Donaldson K, Stone V, Clouter A, Renwick L, MacNee W. Ultrafine particles. Occup Environ Med 2001; 58(3):211-6.
6.Xie Y, Wang Y, Zhang T, Ren G, Yang Z. Effects of nanoparticle zinc oxide on spatial cognition and synaptic plasticity in mice with depressive-like behaviors. Journal of Biomedical Science. 2012; 19(1):14.
7.Pradhan AK, Bahoura M, Zhang K, Pradhan J, Ravichandran P, Gopikrishnan R, et al. Synthesis, Characterization, Toxicity of Nanomaterials for Biomedical Applications. Biomedical Engineering, Trends in Materials Science. Norfolk State University, United State of America. 2011; 349-370.
8. Bystrzejewska-Piotrowska G, Golimowski J, Urban PL. Nanoparticles: their potential toxicity, waste and environmental management. Waste Manag. 2009; 29(9): 2587-95.
9. Barbu E, Molnar E, Tsibouklis J, Gorecki DC. The potential for nanoparticle-based drug delivery to the brain: overcoming the blood-brain barrier. Expert Opin Drug Deliv. 2009; 6(6): 553-65.
10. Zhang DX, Gutterman DD. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. Am. J. P. Hear. 2007; 292(5): H2023–H2031.
11. De Berardis B, Civitelli G, Condello M, Lista P, Pozzi R, Arancia G, et al. Exposure to ZnO nanoparticles induces oxidative stress and cytotoxicity in human colon carcinoma cells. Toxicol. Appl. Pharmacol. 2010; 246(3): 116–127.
12. Brunner TJ, Wick P, Manser P, Spohn P, Grass RN, Limbach LK, et al. In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: Comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. Environ. Sci. Technol. 2006; 40(14):4374–4381.
13. Caulfield LE, Zavaleta N, Shankar AH, Merialdi M. Potential contribution of maternal zinc supplementation during pregnancy to maternal and child survival. Am J Clin Nutr. 1998; 68(suppl):S499–508.
14. Seshadri S. Prevalence of micronutrient deficiency particularly of iron, zinc and folic acid in pregnant women in South East Asia. Br J Nutr. 2001;85 (Suppl 2):S87–92.
15. Park JK, Kim YJ, Yeom J, Jeon JH, Yi GC, Je JH, et al. The topographic effect of zinc oxide nanoflowers on osteoblast growth and osseointegration. Adv Mater. 2010; 22(43):4857-61.
16.Wang B, Feng W, Wang M, Wang T, Gu Y, Zhu M, et al. Acute toxicological impact of nano- and submicro-scaled zinc oxide powder on healthy adult mice. J. Nanopart. Res, 2008; 10(2):263–276.
17. Yousefi Babadi V, Najafi L, Najafi A, Gholami H, Beigi Zarji ME, Golzadeh J, et al. Evaluation of iron oxide nanoparticles effects on tissue and enzymes of liver in rats. Elixir Appl. Chem. 2013; 55A:13226-13229.
18. Cho WS, Kang BC, Lee JK, Jeong J, Seok SH..Comparative absorption, distribution, and excretion of itanium dioxide and zinc oxide nanoparticles after repeated oral administration. Particle and Fibre Toxicology.2013;10:9.
19.Guo D, Bi H, Liu B, Wu Q, Wang D, Cui Y. Reactive oxygen species-induced cytotoxic effects of zinc oxide nanoparticles in rat retinal ganglion cells. Toxicol in Vitro. 2013;27(2):731-738.
20.Nori A, Parivar K, Modaresi M, Yousefi M.H. Effects of iron oxide nanoparticles on the growth and development of mice embryo, the National Conference of nano-materials and nano-technology, Najaf Abad, Islamic Azad University. 2010. [Persian].
21.Wang J, Zhu X, Chen Y, Chang Y. Application of embryonic and adult zebrafish for nanotoxicity assessment. Environ Int.2011; 37(6):1083-97.
22. Chiang HM, Xia Q, Zou X, Wang C, Wang S, Miller BJ, et al. Nanoscale ZnO induces cytotoxicity and DNA damage in human cell lines and rat primary neuronal cells. J Nanosci Nanotechnol. 2012; 12(3):2126-35.
23. Gao G, Ze Y, Li B, Zhao X, Zhang T, Sheng L, et al. Ovarian dysfunction and gene- expressed charad cteristics of female mice caused by long – term exposure to titanium dioxide nanoparticles .J Hazard Mater. 2012;243:19-27.
24. Parivar K, Mohseni Kochesfahani H. Atlas of Embryology and Experimental Embryology. 2ed ed ,Tehran,Tarbiat Moallem University; 1372.p.434-502.[Persian].
25. Parivar K, Hayati Roodbari N, Badiyee A, Nejadfazel M. Effect of nano zinc oxide on the fore limb bud of NMRI mouse embryos in vivo. 2013; 23 (3):161-167.
26. Wang T, Zhang JC, Chen Y, Xiao PG, Yang MS. Effect of zinc ion on the osteogenic and adipogenic differentiation of mouse primary bone marrow stromal cells and the adipocytic trans-differentiation of mouse primary osteoblasts. J Trace Elem Med Biol. 2007; 21(2):84-91.

27. Gunson DE, Kowalczyk DF, Shoop CR, Ramberg CF Jr. Environmental zinc and cadmium pollution associated with generalized osteochondrosis, osteoporosis, and nephrocalcinosis in horses. J Am Vet Med Assoc. 1982; 180(3):295-9.

Original Article

Histopathological Evaluation of the Embryo and Weight Assessment of Body, Kidney, and Liver in Pregnant NMRI Mice Exposed to Zinc Oxide (ZnO) Nanoparticles

Seyed Alipour B[1*], Oshrieh M[2], Khanbabaee R[2]

1- Department of Cellular and Molecular Biology, faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran.
2- Department of Cellular and Molecular Biology, Qaemshahr Branch, Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran.

Received: 20 Oct 2014 Accepted: 30 Jan 2015

Abstract

Background & Objective: Zinc is an essential trace element which plays a key role in the growth and the development of the embryo during pregnancy. This study was designed to investigate the cytotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on embryonic development and to assess the weight of body, kidney, and liver in Naval Medical Research Institute (NMRI) mice.

Materials & Methods: 25 female of NMRI mice weighting 30±3.0 gram were randomly divided into five groups (five in each group, four experimental groups and one control group). Mice in experimental groups one, two, three, and four received intraperitoneal ZnO nanoparticle with the concentrations of 50,100,150, and 200 mg / kg, respectively during 15 days (every other day). At the end, the weight of the body, the kidney, and the liver of the pregnant mice and the embryos were measured. In addition, histopathological evaluations were performed on embryos. The data were analyzed by SAS software in $P \leq 0.05$.

Results: Based on the macroscopic observations, the embryo and the kidney weights decreased and increased, respectively with increasing different concentrations of nanoparticle compared with controls ($P \leq 0.05$). Our data showed that at different concentrations of nanoparticles, the distance, the size, and the number of vertebral bodies increased compared to the control group. At the concentration of 150 mg/kg, an accumulation of mesenchymal cells for cartilage were observed and it seems that high dose of nanoparticles prevents embryo growth.

Conclusion: The results of this study indicate that ZnO nanoparticles cause embryonic developmental delay, undifferentiated and disorganized vertebral bodies in NMRI mice.

Keywords: **zinc oxide nanoparticles, NMRI mice, embryonic development**

***Corresponding author: Bagher Seyedalipour,** Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran. Babolsar.
Email: b.seyedalipour@umz.ac.ir
Tel: +98 911 2129658