

بررسی اثر کوتاه مدت نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن بر کبد و کلیه در موش‌های ماده

نژاد Balb/C

علی نوری*^۱، غلامرضا امیری^۱، بهناز تاج^۲، مهسا نصر اصفهانی^۲، سمیرا تاج^۳، علی والیانی^۴

خلاصه

مقدمه: با توجه به تولید روزافزون نانوذرات مغناطیسی و کاربردهای مفید آن در سیستم‌های بیولوژیک، تاکنون مطالعات کمتری در زمینه اثرات جانبی این مواد بر بدن جانداران صورت گرفته است. روش: در تحقیق حاضر، اثر یک بار تزریق درون صفاقی دوزهای مختلف (۳۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ mg/kg) نانوذرات اکسید آهن (Fe_3O_4) پوشش دار شده با DMSA (دی‌مرکتو سوکسینیک اسید) بر عملکرد کبد و کلیه در پاسخ به جذب نانوپارتيكل‌ها به این اندام‌ها، پس از گذشت چهار روز از تیمار، مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌ها: نفوذ و تجمع نانوذرات در بافت کبد و کلیه به صورت دانه‌های آبی تیره با رنگ آمیزی آبی پروس در مقاطع بافتی نمونه‌های تیمار شده، بدون هیچ اختلال بافتی نسبت به گروه شاهد، مشاهده گردید. میانگین مقادیر آنزیم‌های LDH، SGPT، SGOT، پروتئین آلبومین، اسید اوریک، اوره و کراتینین اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نشان نداد؛ اما میانگین تعداد سلول‌های خونی در گروه‌های تیمار بالاتر از ۵۰ mg/kg نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. در طول مدت آزمایش هیچ مرگ و میری در حیوانات مشاهده نشد. نتیجه‌گیری: با توجه به این نتایج، کاربرد کوتاه‌مدت نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن با پوشش DMSA در موارد پزشکی و بیولوژیک سمیت خاصی در بدن ایجاد نمی‌نماید. واژه‌های کلیدی: نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن، دی‌مرکتو سوکسینیک اسید، کبد، کلیه، سمیت

۱- استادیار زیست‌شناسی تکوینی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، اصفهان ۲- استادیار فیزیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، اصفهان ۳- کارشناس

بیوشیمی ۴- مربی، گروه علوم تشریحی و بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

* نویسنده مسؤول، آدرس: اصفهان، اتوبان ذوب آهن، فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان • آدرس پست الکترونیک: alinoori55@gmail.com

دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۵/۲۷ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۰/۴/۱۰ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۴/۲۲

مقدمه

نانوذرات دارای ویژگی‌های بسیار خاص شیمیایی و فیزیکی از نظر اندازه، شکل و نسبت بالای سطح به حجم می‌باشند که این صفات، کاربرد آن‌ها را در بسیاری از موارد پزشکی و بیولوژیک مناسب ساخته است. اندازه این مواد گاهی کوچک‌تر و یا در حد ساختارهای سلولی، ویروس، پروتئین و یا یک ژن می‌باشد. این مواد پس از تزریق به جانوران به سرعت در اکثر اندام‌ها و بافت‌ها توزیع می‌شود و پدیده جذب سلولی آن‌ها بسیار شدید می‌باشد (۱).

امروزه به منظور کاربرد مفید و مؤثر نانوذرات در سیستم‌های بیولوژیک، پوشش‌های مختلفی نظیر آلبومین، دکستران، پلی اتیلن گلاکول، پلی اتیلن اکسید و آسپارتیک اسید بر سطح آن‌ها ایجاد می‌گردد. حضور چنین پوشش‌هایی به پایداری نانوذرات در محلول‌های بیولوژیک و گردش خون، توزیع بافتی و همچنین به ورود این مواد به سلول‌ها و کاهش اثر سمی آن‌ها کمک می‌کند (۲). در این میان، نانوپارتیکل‌های مغناطیسی با پوششی از مولکول‌های آلی می‌تواند کلوئیدهای پایداری را در شرایط فیزیولوژیک (Biocompatible magnetic fluids) ایجاد کند (۳).

با توجه به تحقیقات گسترده در زمینه کاربردهای وسیع نانو ساختارهای مغناطیسی اکسید آهن، نظیر درمان تومورها، MRI، انتقال دارو و ژن به بافت‌ها و سلول‌ها و نشان‌دار کردن سلول‌ها و ماکرومولکول‌ها، گزارش‌های کمی در زمینه سمیت یا اثرات جانبی آن‌ها بر سلول و جانداران، به خصوص در شرایط *In vivo* ارایه شده است (۴، ۵).

از طرفی، تحقیقات محدود انجام شده در این زمینه، نتایج به نسبت متضادی را به همراه داشته است؛ به عنوان مثال، در شرایط *In vivo*، برخی محققان غیر سمی بودن نانوذرات اکسید آهن، برخی دیگر سمیت ناچیز و برخی نیز ایجاد پاسخ‌های التهابی و حتی مرگ سلولی را گزارش کرده‌اند

(۹-۵). از دیگر سو، با توجه به تنوع پوشش‌های به کار رفته بر سطح نانوذرات، لازم است که توزیع بافتی و اثرات جانبی نانوذرات اکسید آهن با هر پوشش خاص، به‌طور جداگانه بررسی شود تا در موارد مختلف بیولوژیک و درمانی، از پوشش مناسب در همان زمینه استفاده گردد (۱۰).

در تحقیق حاضر، توزیع بافتی و اثرات جانبی نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن (Fe_3O_4) با پوشش DMSA (دی‌مرکتو سوکسینیک اسید)، با تزریق درون صفاقی، بر روی کبد، کلیه و میزان سلول‌های خونی در موش‌های سوری ماده، نژاد Balb/C مورد مطالعه قرار گرفت.

DMSA ($C_4S_2O_4H_6$, Aldrich Chemical, Milwaukee, WI) از مواد غیر سمی است که امروزه به عنوان عامل شلات کننده (Chelating agent) برای جذب عناصر اضافی بدن به بیماران تزریق می‌شود. استفاده از این ماده، پوشش آنیونیک بر سطح نانوذرات ایجاد کرده، از پدیده Opsonisation (تجمع پروتئین‌های خونی در اطراف نانوذرات) و حذف آن‌ها توسط سیستم رتیکولاندوتلیال موجود در کبد، طحال و گره‌های لنفاوی تا حدی جلوگیری می‌کند. حضور این ماده بر سطح نانوذرات بر میزان جذب سلولی و توزیع بافتی نانوپارتیکل‌ها افزوده، از تماس مستقیم با سلول و ترکیبات سلولی و در نتیجه، اثرات سمی آن‌ها می‌کاهد (۱۰). نانوذرات Fe_3O_4 به دلیل دارا بودن خاصیت مغناطیسی بالاتر نسبت به دیگر ترکیبات (نظیر Fe_2O_3)، از نظر کاربرد در زمینه‌های بیولوژیک و پزشکی بسیار مفیدتر می‌باشد؛ چرا که در ساختار آن یک اتم آهن ۲ (فرو) وجود دارد که هنوز می‌تواند اکسید شود و همین ویژگی واکنش‌پذیری و خاصیت مغناطیسی آن را افزایش می‌دهد. از طرفی، در برخی مطالعات ثابت شده است که همین ویژگی، اثرات سمی و تخریبی این ترکیب را نسبت به Fe_2O_3 افزایش می‌دهد (۱۱). این در حالی است که در مطالعات قبلی، اثرات جانبی نانوذرات اکسید آهن با ترکیبات دیگر نظیر

چند روز و حتی چند ماه جهت بررسی نحوه نفوذ نانوذرات در بدن و اثرات سمی آنها مورد مطالعه قرار گرفته است (۳، ۶، ۸، ۹، ۱۲).

تهیه مقاطع بافتی جهت رنگ آمیزی آبی پروس

تعدادی از نمونه‌ها در همه گروه‌ها بلافاصله پس از خون‌گیری، تشریح و تکه‌هایی از اندام کبد و کلیه جدا شد. پس از تثبیت در فرمالین و قالب‌گیری در پارافین، مقاطع بافتی تهیه و با رنگ آمیزی اختصاصی آهن (آبی پروس (Perl's Method) (۶۸) رنگ آمیزی گردید. نانوذرات تجمع یافته در نقاط مختلف بافت‌ها به صورت دانه‌های آبی تیره با میکروسکوپ نوری مشاهده شد.

اندازه‌گیری فاکتورهای خونی، کبدی و کلیوی

پس از گذشت ۴ روز از تیمار، با بیهوشی مختصر با اتر، عمل خون‌گیری به طور مستقیم از قلب موش‌ها صورت گرفت. نمونه‌های خون در لوله‌های CBC محتوی EDTA (ماده ضدانعقاد) ریخته شد و پس از اندازه‌گیری تعداد و درصد سلول‌های خونی (گلبول‌های قرمز، گلبول‌های سفید، پلاکت‌ها، لنفوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها) توسط دستگاه Sysmex K-100، با عمل سانتریفوژ پلاسماي نمونه‌ها جدا گردید. مقدار سایر فاکتورها، نظیر آنزیم‌های SGOT (سرم گلوتامات اگزوالاستات ترانس آمیناز)، SGPT (سرم گلوتامات پیرووات ترانس آمیناز)، لاکتات دهیدروژناز (LDH)، پروتئین آلبومین تام، اسید اوریک، اوره و کراتینین توسط دستگاه 902, Hitachi Automatic Analyzer, Roche در پلاسماي حاصل اندازه‌گیری شد.

آنالیز آماری

میانگین مقادیر فاکتورهای مختلف خونی، کبدی و کلیوی به تفکیک دوز به کار رفته (در هر گروه تیمار، ۱۰

CoFe₂O₄ (۳) و Fe₂O₃ (۹، ۸، ۶) مورد بررسی قرار گرفته که در برخی از آنها نوع پوشش هم متفاوت بوده است (۱۲). همچنین میزان نانوذره تزریق شده به حیوانات در گزارش‌های قبلی با دوزهای به کار رفته در پژوهش حاضر متفاوت است.

روش بررسی

ویژگی‌های نانوذرات سنتز شده

نانوذرات به کار گرفته شده در این تحقیق، در دانشگاه صنعتی مالک اشتر اصفهان سنتز شد و با استفاده از تکنیک‌های پراش اشعه X (X-ray Diffraction یا XRD)، اندازه‌گیری مغناطیسی شیب میدان متناوب (AGFM Alternating gradient-force magnetometry) و طیف‌سنجی مادون قرمز بر اساس جذب تابش (Fourier transform infrared spectroscopy یا FTIR) به ترتیب، اندازه نانوذرات حدود ۳ تا ۹ نانومتر و شدت مغناطیسی برابر ۹۲ emu/g محاسبه شد و پیوند گروه کربوکسیل DMSA با اتم‌های آهن اثبات گردید (۱۳).

پرورش و نگهداری حیوانات و انجام تیمارها

موش‌های ماده سوری نژاد Balb/C از مرکز تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی خریداری و در شرایط دمایی ۲۲-۲۴ درجه سانتی‌گراد، رطوبت آزمایشگاه و نور طبیعی در ۵ گروه ده‌تایی نگهداری شدند. ۴ گروه تیمار به ترتیب دوزهای (mg/kg) ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ از نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن (Fe₃O₄) پوشش‌دار شده با DMSA تهیه شده در سرم فیزیولوژیک و گروه شاهد فقط سرم فیزیولوژیک به صورت یک بار تزریق درون صفاقی دریافت کردند. حیوانات چهار روز پس از تیمار جهت خون‌گیری، تشریح و تهیه مقاطع بافتی آماده شدند. لازم به ذکر است که در بررسی‌های مختلف، زمان‌های مختلف پس از تزریق از چند دقیقه تا چند ساعت و از یک روز تا

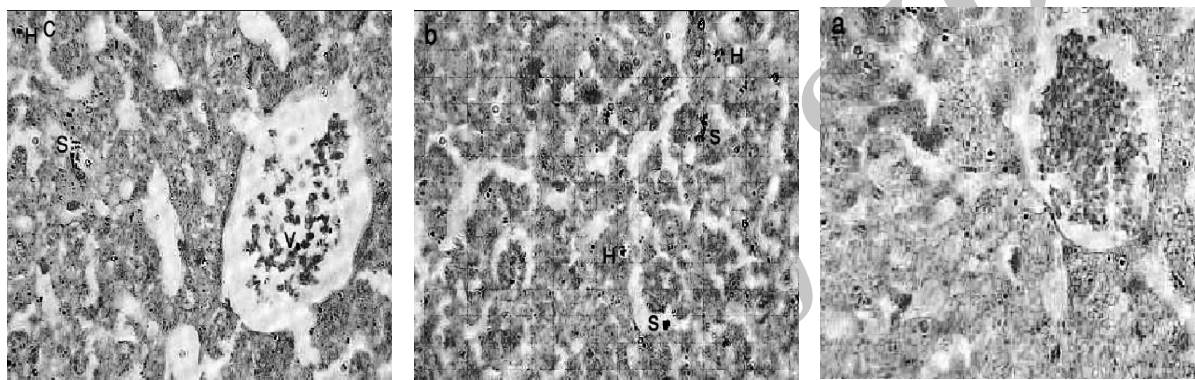
با توجه به شکل ۱، نانوذرات پس از تزریق، با ورود به جریان خون به بافت کبد نفوذ کرد و در نقاط مختلف آن، مثل هپاتوسیت‌ها، سینوزوئیدها و رگ‌های خونی کبدی، تجمع یافت.

شکل ۲، حضور و تجمع نانوپارتنیکل‌های اکسید آهن را در بخش‌های مختلف بافت کلیه، نظیر شبکه مویرگی کپسول بومن (گلومرول)، سلول‌های دیواره نفرون در لوله‌های پیچیده نزدیک و دور، مجرای داخلی نفرون و رگ‌های خونی کلیوی، نشان می‌دهد.

نمونه خون)، توسط نرم‌افزار SPSS^{۱۵} با آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه بین گروه‌های تیمار و شاهد مقایسه شد.

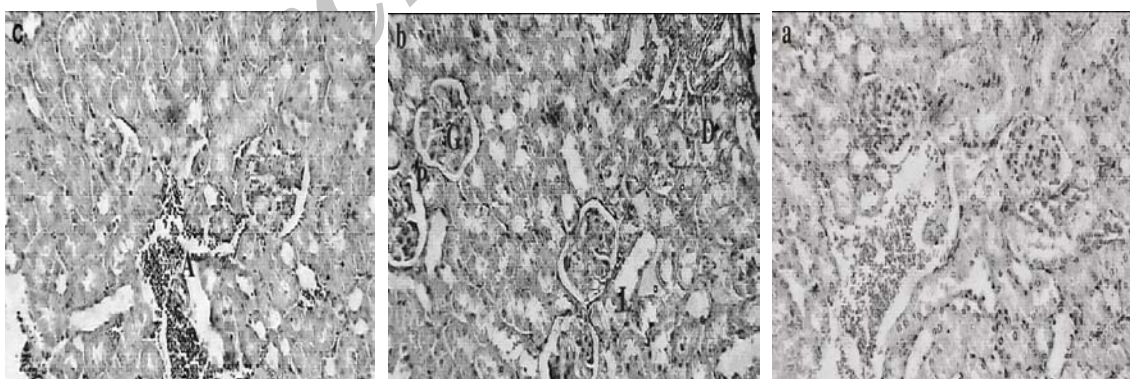
نتایج

مشاهده نانوذرات اکسید آهن تجمع یافته در بافت کبد و کلیه پس از تهیه مقاطع بافتی از نمونه‌های شاهد و تیمار، رنگ‌آمیزی آبی پروس جهت مشخص شدن ورود و تجمع نانوپارتنیکل‌های اکسید آهن در نقاط مختلف بافت‌ها صورت گرفت.



شکل ۱. تجمع نانوذرات اکسید آهن در بافت کبد با رنگ‌آمیزی آبی پروس (بزرگ‌نمایی $\times 400$)

شاهد، برخی نقاط تیره نشان‌گر آهن ذخیره شده اندوزن می‌باشد. b و c نمونه تیمار شده با دوز 50 mg/kg و تجمع نانوذرات در سینوزوئیدهای کبدی؛ H: تجمع نانوذرات در هپاتوسیت‌ها؛ و c در رگ‌های خونی کبدی. همان‌طور که دیده می‌شود، میزان دانه‌های آبی تیره در نمونه تیمار بیشتر بوده است که نشان‌دهنده تجمع آهن آگروژن (نانوذرات) می‌باشد.



شکل ۲. تجمع نانوذرات اکسید آهن در بافت کلیه با رنگ‌آمیزی آبی پروس (بزرگ‌نمایی $\times 400$)

شاهد؛ b و c نمونه تیمار شده با دوز 50 mg/kg ؛ G: تجمع نانوذرات در گلومرول (شبکه مویرگی کپسول بومن)؛ P: تجمع نانوذرات در سلول‌های دیواره لوله‌های پیچیده نزدیک؛ D: تجمع نانوذرات در لوله‌های پیچیده دور؛ L: تجمع نانوذرات در داخل نفرون؛ A: تجمع نانوذرات در رگ‌های خونی کلیوی

و نوتروفیل‌ها فقط در گروه ۳۰۰ mg/kg به طور معنی‌دار کاهش یافت.

با توجه به جدول ۲، هیچ اختلاف معنی‌داری در میانگین میزان فاکتورهای کلیوی و کبدی بین گروه شاهد و تیمار مشاهده نشد. این یافته بیان‌کننده این احتمال است که تزریق مقادیر فوق از نانوذرات اکسید آهن، با توجه به نفوذ پذیری بالا در کبد و کلیه، اختلال خاصی در عملکرد این اندام‌ها ایجاد نمی‌کند؛ به طوری که در میزان آنزیم‌های کبدی، نظیر آلانین آمینو ترانسفراز، گلوتامیک پیروویک ترانس آمیناز و لاکتات دهیدروژناز، همچنین آلبومین و فاکتورهای کلیوی، نظیر اوره، اسید اوریک و کراتینین، بین گروه شاهد و تیمار تغییر معنی‌داری ایجاد نشد.

احتمال می‌رود این نتایج نشان‌گر عدم سمیت دوزهای مختلف نانوذرات اکسید آهن پوشش‌دار شده با DMSA بر فعالیت کبد و کلیه باشد.

در مقایسه انجام گرفته، هیچ‌گونه اختلال بافتی در اثر تجمع نانوذرات در بافت کبد و کلیه نمونه‌های تیمار شده در مقایسه با نمونه شاهد مشاهده نشد.

این نتایج نشان می‌دهد که نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن پوشش‌دار شده با DMSA (پوشش آنیونیک) ضمن عبور از غشاهای مختلف سلولی، به همراه جریان خون وارد کبد و کلیه شده، نفوذ به نسبت خوبی در سلول‌ها و بخش‌های گوناگون این دو اندام داشته است.

آنالیز فاکتورهای خونی، کبدی و کلیوی به تفکیک دوز

با توجه به جدول ۱، میانگین تعداد گلبول‌های سفید در غلظت‌های بیشتر از ۵۰ mg/kg به طور معنی‌داری کاهش یافت. در مورد گلبول‌های قرمز، در غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰ و در مورد پلاکت‌ها، فقط در غلظت ۳۰۰ mg/kg کاهش معنی‌دار مشاهده شد. میانگین تعداد لنفوسیت‌ها در گروه‌های بالاتر از ۵۰ mg/kg و میانگین درصد لنفوسیت‌ها

جدول ۱. میانگین سلول‌های خونی چهار روز پس از تزریق دوزهای مختلف نانوذرات اکسید آهن پوشش‌دار شده با DMSA

دوز (mg/kg)	تعداد گلبول‌های سفید ($\times 10^3$) در میکرولیتر	تعداد گلبول‌های قرمز ($\times 10^6$) در میکرولیتر	تعداد پلاکت‌ها ($\times 10^3$) در میکرولیتر	تعداد لنفوسیت‌ها ($\times 10^3$) در میکرولیتر	درصد لنفوسیت‌ها	درصد نوتروفیل‌ها
گروه شاهد	۴/۶۴ ± ۱/۶۸	۱۰/۰۵ ± ۰/۸۱	۵۳۱/۵۰ ± ۱۰۴/۰۵	۲/۹۶ ± ۱/۰۶	۵۹/۷۶ ± ۱۰/۵۷	۴۰/۲۳ ± ۱۰/۵۷
۵۰	۴/۵۶ ± ۱/۷۳	۱۰/۰۷ ± ۰/۷۶	۵۶۳/۸۵ ± ۱۴۵/۵۷	۲/۸۵ ± ۱/۰۵	۵۶/۶۵ ± ۹/۴۷	۴۲/۴۵ ± ۸/۶۷
۱۰۰	*۱/۷۳ ± ۰/۷۲	۱۰/۰۹ ± ۰/۹۹	۵۸۵/۹۰ ± ۱۷۲/۵۷	*۰/۶۸ ± ۰/۴۳	۵۵/۲۴ ± ۴/۳۵	۴۴/۷۶ ± ۴/۳۵
۲۰۰	*۲/۳۷ ± ۰/۹۳	*۷/۳۵ ± ۱/۶۳	۵۸۹/۸۰ ± ۱۳۹/۱۹	*۱/۰۹ ± ۰/۵۳	۵۴/۵۰ ± ۳/۲۸	۴۵/۵۰ ± ۳/۲۸
۳۰۰	*۱/۴۳ ± ۰/۹۰	*۷/۱۱ ± ۲/۱۹	*۱۷۹/۲۰ ± ۱۲۵/۴۳	*۰/۹۰ ± ۰/۵۹	*۴۷/۷۴ ± ۱/۰۵	*۵۲/۲۶ ± ۱/۰۵
	F=۱۶/۷۴۳, P<۰/۰۱	F=۱۱/۷۶۵, P<۰/۰۱	F=۲۰/۴۴۹, P<۰/۰۱	F=۲۴/۷۰۷, P<۰/۰۱	F=۶/۸۹۱, P<۰/۰۵	F=۶/۸۹۱, P<۰/۰۵

*: کاهش معنی‌دار سلول‌های خونی

هر عدد حاصل میانگین ۱۰ نمونه خون در هر گروه تیمار می‌باشد.

جدول ۲. میانگین فاکتورهای کلیوی و کبدی چهار روز پس از تزریق دوزهای مختلف نانوذرات اکسید آهن پوشش دار شده با DMSA

دوز (mg/kg)	اوره (mg/dl)	کراتینین (mg/dl)	اوریک اسید (mg/dl)	آگزوالاستات ترانس آمیناز (UL)(OT)	پروات ترانس آمیناز (UL)(PT)	لاکتات دهیدروژناز (UL)(LDH)	آلبومین (g/dl)
گروه شاهد	۶۰/۸۰ ± ۷/۱۶	۰/۳۵ ± ۰/۰۸	۰/۷۶ ± ۰/۰۳۶	۱۶۰/۳۰ ± ۵۴/۶۸	۶۱/۳۰ ± ۲۴/۱۲	۱۱۳۸/۲۰ ± ۲۰۷/۶۳	۳/۰۸ ± ۱/۱۵
۵۰	۶۱/۷۰ ± ۷/۵۵	۰/۴۱ ± ۰/۰۶	۰/۷۹ ± ۰/۰۳۴	۱۲۹/۵۰ ± ۶۶/۹۵	۶۰/۸۰ ± ۱۶/۴۱	۹۸۸/۹۰ ± ۳۱۲/۸۱	۲/۳۸ ± ۰/۷۸
۱۰۰	۵۶/۶۰ ± ۱۸/۱۰	۰/۴۰ ± ۰/۰۵	۰/۷۵ ± ۰/۰۵۸	۱۳۰/۴۰ ± ۶۰/۲۴	۶۹/۱۰ ± ۲۵/۵۷	۱۰۹۶/۱۰ ± ۲۹۲/۵۹	۳/۱۳ ± ۱/۰۴
۲۰۰	۶۶/۱۰ ± ۱۵/۰۷	۰/۴۲ ± ۰/۰۸	۰/۸۴ ± ۰/۰۳۵	۱۳۸/۶۰ ± ۶۹/۶۹	۷۷/۱۰ ± ۳۰/۸۵	۹۹۴/۳۰ ± ۳۵۴/۲۲	۲/۸۳ ± ۱/۲۵
۳۰۰	۶۰/۴۰ ± ۲۷/۰۶	۰/۴۵ ± ۰/۱۰	۰/۶۷ ± ۰/۰۴۰	۱۵۵/۷۰ ± ۶۹/۴۹	۶۸/۴۰ ± ۴۰/۴۰	۹۹۲/۵۰ ± ۵۰۱/۵۰	۲/۸۰ ± ۰/۸۸
	P > ۰/۰۵	P > ۰/۰۵	P > ۰/۰۵	P > ۰/۰۵	P > ۰/۰۵	P > ۰/۰۵	P > ۰/۰۵
	F = ۰/۴۱۴	F = ۱/۷۵۹	F = ۰/۲۲۰	F = ۰/۴۹۴	F = ۰/۵۴۶	F = ۰/۴۰۹	F = ۰/۸۰۸

هر عدد حاصل میانگین ۱۰ نمونه خون در هر گروه تیمار می باشد.

بحث

نمی آید (۸، ۶). همچنین یک هفته پس از تزریق نانوذرات $CoFe_2O_4$ پوشش دار شده با سیلیکا (SiO_2) به موش ها، حضور و توزیع آن در اندام های مختلف بدون هیچ گونه اختلال بافتی مشاهده شده است (۳).

در مطالعه ای دیگر با یک بار تزریق درون رگی ۱۰۰ میکرولیتر از نانوپارتیکل های مغناطیسی با پوشش DMSA به موش ها، تجمع نانوذرات ۵ دقیقه پس از تزریق در کبد و ریه ها مشاهده گردید که نشان دهنده جذب فوری آنها توسط این دو اندام می باشد. این در حالی است که در اندام های نظیر طحال، کلیه، قلب، پانکراس و مغز نفوذ نانوذرات اثبات نشد (۹). در بررسی دیگری نیز تزریق نانوذرات اکسید آهن پوشش دار شده با دکستران در کبد و طحال تجمع یافت؛ در پی گیری سه ماه پس از تیمار، به تدریج از تجمع این ذرات کاسته شد و در این مدت هیچ اختلال بافتی مشاهده نگردید (۱۲). احتمال می رود، اختلاف در توزیع زیستی نانوذرات در مطالعات مختلف به نوع پوشش به کار رفته، اندازه و ویژگی های سطحی آنها ارتباط داشته باشد (۱۳، ۱۴).

در پژوهش حاضر، اثر توزیع بافتی و سمیت دوزهای مختلف نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن (Fe_3O_4) پایدار شده با پوشش بیولوژیک دی مرکپتو سوکسینیک اسید، بر روی کبد، کلیه و فاکتورهای خونی موش های سوری مورد مطالعه قرار گرفت.

در این مطالعه مشخص گردید که پس از چهار روز، نانوپارتیکل های تزریق شده با دوز ۵۰ mg/kg نفوذ و تجمع به نسبت بالایی را، به خصوص در کبد، ایجاد می کند؛ این یافته نشان دهنده عبور نانوذرات از غشاهای سلولی مختلف، ورود آن به جریان خون و در نهایت ورود به کبد و کلیه می باشد. علاوه بر این، اختلال و تغییر خاصی در ساختار بافتی کبد و کلیه ایجاد نشد.

مطالعات پیشین نشان داده است که تزریق ۱۰۰ میکرولیتر از نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن (Fe_2O_3) با پوشش DMSA به موش های سوری، ضمن تجمع در ریه ها منجر به ایجاد پاسخ التهابی در این اندام ها می گردد؛ البته پس از گذشت سه ماه، از شدت این تغییرات کاسته می شود و در این مدت تغییر و اختلال بافتی در ریه ها به وجود

اکسی‌هموگلوبین در اثر افزودن نانوذرات مغناطیسی با پوشش اسید سیتریک گزارش گردید که به علت باند شدن احتمالی گروه OH سیترات با یون‌های آهن گروه هم (Heme) در ساختار هموگلوبین بود. در بررسی آنان، میزان همولیز گلبول‌های قرمز در برخی نمونه‌های خونی افزایش معنی‌دار داشت (۱۷). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که نوع پوشش به کار رفته بر سطح نانوذرات از اهمیت ویژه‌ای بر اثرات سمی آن‌ها بر سلول‌ها برخوردار است.

احتمال می‌رود در تحقیق حاضر، کاهش میزان سلول‌های خونی به علت همولیز و یا تغییر در ساختار و تخریب سلول‌ها به علت اتصال و پیوند با نانوذرات بوده باشد؛ اما با توجه به نتایج تحقیقات مختلف انجام شده پیشین (۱۷-۱۵، ۱۸، ۱۹) می‌توان گفت که تغییرات ایجاد شده در میزان سلول‌های خونی در تحقیق حاضر موقتی بوده، به احتمال زیاد، به تدریج و حداکثر پس از گذشت یک‌ماه از بین می‌رود.

در مطالعه دیگری توسط این گروه تحقیقاتی مشخص گردید که تزریق دوزهای مشابه، تا سه ماه پس از تیمار هیچ‌گونه اختلالی در وزن موش‌های بالغ ایجاد نمی‌کند (۱۸)؛ عدم تغییر معنی‌دار در فاکتورهای کبدی و کلیوی و همچنین اختلالات بافتی در این اندام‌ها می‌تواند بیان‌گر اثر غیر سمی نانوذرات مورد استفاده در مدت انجام این مطالعه باشد. با تکرار تحقیق در مدت طولانی‌تر می‌توان اظهار نظر قطعی در مورد قابل اطمینان بودن اثرات طولانی مدت‌تر این ترکیبات ارایه نمود.

به‌طور کلی، محققین مختلف (۹، ۱۰، ۱۱) علت عدم ایجاد اثرات سمی نانوذرات اکسید آهن در اکثر پژوهش‌ها، به خصوص در شرایط *in vivo* را به حذف سریع مقداری از آن‌ها توسط سیستم رتی‌کولاندوتلیال موجود در کبد، طحال و گره‌های لنفاوی و در نتیجه دفع نانوذرات از بدن و همچنین، از بین رفتن ویژگی‌های اختصاصی نانوذرات از قبیل اندازه و خصوصیات سطحی پس از تزریق، به علت

در بررسی حاضر مشخص گردید که حتی بالاترین دوز به کار رفته از نانوذرات اکسید آهن (۳۰۰ mg/kg) با وجود جذب نانوپارتیکل‌ها در این اندام‌ها، تغییر معنی‌داری در میزان آنزیم‌ها و دیگر فاکتورهای کبدی و کلیوی ایجاد نمی‌کند؛ در حالی که تعداد و درصد سلول‌های مختلف خونی در دوزهای مختلف تزریق شده از نانوذرات اکسید آهن، کاهش معنی‌دار داشت؛ البته در مورد انواع سلول‌ها تغییرات مشابه نبود. به طوری که کاهش میانگین تعداد گلبول‌های سفید و لنفوسیت‌ها در گروه‌های تیمار بالاتر از ۵۰ mg/kg، تعداد پلاکت‌ها و درصد نوتروفیل‌ها فقط در گروه ۳۰۰ mg/kg و گلبول‌های قرمز در گروه‌های بالاتر از ۱۰۰ mg/kg مشاهده شد. در یک گزارش دیگر تزریق دوزهای مختلف نانوذرات مغناطیسی CoFe_2O_4 پوشش‌دار شده با سیلیکا (SiO_2) به موش‌ها، در طول یک‌ماه پس از تیمار، هیچ‌گونه تغییری در فاکتورهای کبدی، کلیوی و درصد سلول‌های خونی ایجاد نکرد (۳). در این زمینه، تحقیقات Sadeghiani و همکاران نشان داد که تزریق نانوذرات مغناطیسی پوشش‌دار شده با پلی‌آسپارتیک اسید به موش‌ها، در طی گذشت سی روز از تیمار منجر به کاهش تعداد لنفوسیت‌ها و افزایش هم‌زمان مونوسیت‌ها می‌گردد که احتمال دارد نشان‌گر پاسخ التهابی بدن به عوامل خارجی باشد؛ چرا که در مورد انواع سلول‌های خونی و در روزهای مختلف پس از تزریق تغییرات متفاوت گزارش شده و پس از گذشت سی روز از تیمار، تمام تغییرات ایجاد شده از بین رفته است و در ظاهر، التهاب ایجاد شده موقتی و بدون زیان بوده است (۱۵).

در پژوهشی دیگر، با افزودن نانوذرات سوپرپارامغناطیس با پوشش کریوکی متیل دکستران به نمونه‌های خون از جانوران مختلف، روند اکسید شدن هموگلوبین طبیعی گزارش شده و تغییر ساختمانی در هموگلوبین مشاهده نشده است (۱۶). در حالی که در پژوهش Creanga و همکاران، کاهش میزان

سیاسگزاری

بدین وسیله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان به علت استفاده از امکانات آزمایشگاهی و انجام پژوهش حاضر در آن دانشگاه قدردانی می‌شود.

تجمع و اتصال ترکیبات آلی به آن‌ها و در نتیجه عدم جذب و ورود آن‌ها به گردش خون و اندام‌ها نسبت می‌دهند. به نظر می‌رسد که استفاده از نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن در زمینه‌های بیولوژیک و پزشکی، سمیت و خطر جدی بر سلامتی افراد به همراه ندارد؛ البته انجام تحقیقات بیشتر با استفاده از پوشش‌های بیولوژیک مختلف در این زمینه کاملاً ضروری است.

References

- Berry CC, Adam SG. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics* 2003; 36(13): R198.
- Salata O. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *J Nanobiotechnology* 2004; 2(1): 3.
- Kim JS, Yoon TJ, Yu KN, Kim BG, Park SJ, Kim HW, et al. Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice. *Toxicol Sci* 2006; 89(1): 338-47.
- Pisanic TR, Blackwell JD, Shubayev VI, Finones RR, Jin S. Nanotoxicity of iron oxide nanoparticle internalization in growing neurons. *Biomaterials* 2007; 28(16): 2572-81.
- Jain TK, Reddy MK, Morales MA, Leslie-Pelecky DL, Labhassetwar V. Biodistribution, clearance, and biocompatibility of iron oxide magnetic nanoparticles in rats. *Mol Pharm* 2008; 5(2): 316-27.
- Garcia MP, Parca RM, Chaves SB, Silva LP, Santos AD, Marques Lacava ZJ, et al. Morphological analysis of mouse lungs after treatment with magnetite-based magnetic fluid stabilized with DMSA. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 2003; 293(1): 277-82.
- Bourrinet P, Bengele HH, Bonnemain B, Dencausse A, Idee JM, Jacobs PM, et al. Preclinical safety and pharmacokinetic profile of ferumoxtran-10, an ultrasmall superparamagnetic iron oxide magnetic resonance contrast agent. *Invest Radiol* 2006; 41(3): 313-24.
- Chaves SB, Silva LP, Lacava ZGM, Morais PC, Azevedo RB. Interleukin-1 and interleukin-6 production in mice's lungs induced by 2, 3 meso-dimercaptosuccinic-coated magnetic nanoparticles. *J Applied Physics* 2005; 97(10).
- Chaves SB, Lacava LM, Lacava ZGM, Silva O, Pelegri F, Buske N, et al. Light microscopy and magnetic resonance characterization of a DMSA-coated magnetic fluid in mice. *IEEE Transactions on Magnetics* 2002; 38(5): 3231-3.
- Shubayev VI, Pisanic TR, Jin S. Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; 61(6): 467-77.
- Auffan M, Rose J, Wiesner MR, Bottero JY. Chemical stability of metallic nanoparticles: a parameter controlling their potential cellular toxicity in vitro. *Environ Pollut* 2009; 157(4): 1127-33.

12. Lacava LM, Garcia VAa, Kückelhaus S, Azevedo RB, Sadeghiani N, Buske N, et al. Long-term retention of dextran-coated magnetite nanoparticles in the liver and spleen. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 2004; 272-276(3): 2435-4.
13. Chen ZP, Zhang Y, Zhang S, Xia JG, Liu JW, Xu K, et al. Preparation and characterization of water-soluble monodisperse magnetic iron oxide nanoparticles via surface double-exchange with DMSA. *Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects* 2008; 316(1): 210-16.
14. Auffan M, Decome L, Rose J, Orsiere T, De MM, Briois V, et al. In vitro interactions between DMSA-coated maghemite nanoparticles and human fibroblasts: A physicochemical and cytogenotoxic study. *Environ Sci Technol* 2006; 40(14): 4367-73.
15. Sadeghiani N, Barbosa LS, Silva LP, Azevedo RB, Morais PC, Lacava ZG. Genotoxicity and inflammatory investigation in mice treated with magnetite nanoparticles surface coated with polyaspartic acid. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 2005; 289: 466-68.
16. Santana JF, Soler MA, Da Silva SW, Lacava ZG, Azevedo RB, Morais PC. Investigation of the interaction between magnetic nanoparticles surface-coated with carboxymethyldextran and blood cells using Raman spectroscopy. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 2005; 289: 452-4.
17. Creanga DE, Culea M, Nadejde C, Oancea S, Curecheriu L, Racuciu M. Magnetic nanoparticle effects on the red blood cells. *Journal of Physics: Conference Series* 2009; 170(1).
18. Noori A, Parivar K, Modaresi M, Messripour M, Yousefi MH, Amiri GR. Effect of magnetic iron oxide nanoparticles on pregnancy and testicular development of mice. *African Journal of Biotechnolog* 2011; 10(7): 1221-7.

The Effect of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles on Mice Liver and Kidney

Noori A., Ph.D.^{*1}, Amiri Gh.R, Ph.D.², Taj B., B.Sc.³, Nasr Isfahani M., B.Sc.³, Taj S., B.Sc.,³ Valiani A., M.Sc.⁴

1. Assistant Professor of Developmental Biology, Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

2. Assistant Professor of Physics, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

3. Bachelor of Science in Biochemistry

4. Instructor, Dep. Anatomical Sciences and Molecular Biology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

* Corresponding author; e-mail: alinoori55@gmail.com

(Received: 18 August 2010

Accepted: 13 July 2011)

Abstract

Background & Aims: In spite of frequent produce and use of magnetic nanoparticles in biological fields, there are few studies on their side effects, especially under *in-vivo* conditions.

Method: In this research, the effect of the single-dose intraperitoneal injection of DMSA (dimercaptosuccinic acid) coated magnetic iron oxide nanoparticles (Fe_3O_4) in different doses (50, 100, 200 and 300 mg/kg) on liver and kidney function was studied.

Results: Clusters of iron oxide nanoparticles were observed in treatment mice liver and kidney tissues as dark blue accumulations with Prussian blue staining up to 4 days after administration; so, the nanoparticles were absorbed into and were accumulated in these organs. No histological disorders were observed in the tissue sections in comparison with controls. Considering biochemical analysis, the mean amounts of SGOT, SGPT, and LDH enzymes, also albumin, uric acid, urea and creatinine were not different significantly than control group; but in contrast to the control group, the mean numbers of the blood cells were decreased significantly in treatment groups with doses higher than 50 mg/kg. During the study, no death was found in animals.

Conclusion: The data suggest that the future applications of DMSA- coated magnetic iron oxide in medicine and biology has not probably toxic effects on health human.

Keywords: Magnetic iron oxide nanoparticles, Dimercaptosuccinic acid, Absorption, kidney, Liver, Toxicity

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2012; 19(3): 243-252