

مقایسه تجویز مزمن میکرو و نانوذره اکسید منگنز بر شاخص‌های عملکرد کبدی در موش نر بزرگ آزمایشگاهی

نویسندگان: شیوا رضاقلیان^۱، مجید حسن پور عزتی^{۲*}، سید زهرا موسوی^۳، محمد صفی رحمانی فر^۲، ناهید نصرتی^۱

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه سم‌شناسی، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۳. استادیار گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

E-mail: hassanpour@shahed.ac.ir

* نویسنده مسئول: مجید حسن پور عزتی

چکیده

مقدمه و هدف: تولید و مصرف صنعتی نانو و میکروذرات اکسید منگنز سبب افزایش تماس انسان با آنها شده است. در این پژوهش، توزیع زیستی منگنز در بافت کبدی موش بزرگ به دنبال تجویز مزمن هر دو ذره اندازه‌گیری شد؛ همچنین، اثر آنها بر سرعت افزایش وزن بدن و آزمون عملکرد کبدی موش‌ها بررسی شد.

مواد و روش‌ها: موش‌های بزرگ نر از نژاد ویستار هر دو هفته یکبار به مدت چهارده هفته توزین و نانو یا میکروذره اکسید منگنز (100 µg/kg) را به صورت زیرجلدی در گروه‌های مختلف دریافت کردند. نمونه خون به طور مستقیم از قلب موش‌ها (n=5) در زمان‌های مشابه گرفته شد. میزان منگنز نمونه بافت کبدی به روش ICP-MS تعیین شد. سطح سرمی پروتئین تام، آلبومین، بیلی‌روبین و آنزیم‌های ترانس آمیناز، لاکتات دهیدروژناز و آلکالین فسفاتاز به کمک دستگاه آنالایزر اتوماتیک تعیین شدند

نتایج: سرعت افزایش وزن بدن در موش‌های گروه نانو سریع‌تر و در گروه میکرو کندتر از کنترل ($p < 0.05$) بود. توزیع، تجمع و پاکسازی زیستی منگنز از بافت کبد در گروه نانوذرات با گروه میکروذرات تفاوت داشت. میزان پروتئین تام، آلبومین، بیلی‌روبین و فعالیت آلکالین فسفاتاز سرم در هر دو گروه افزایش و فعالیت آنزیم‌های ترانس آمیناز و لاکتات دهیدروژناز در هر دو گروه کاهش یافت ($p < 0.05$).

نتیجه‌گیری: تجویز مزمن نانو و میکروذرات اکسید منگنز به تجمع منگنز در بافت کبدی منجر می‌شود. خاصیت اکسیدکنندگی قوی هر دو ذره و امکان اتصال این ذرات با برخی آنزیم‌های کبدی می‌توانند عوامل اصلی آسیب‌های کبدی ناشی از این ذرات باشند.

واژگان کلیدی: اکسید منگنز، نانوذرات، میکروذرات، شاخص‌های عملکرد کبدی

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیستم- شماره ۱۰۶
شهریور ۱۳۹۲

دریافت: ۱۳۹۲/۴/۱۲

آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۲/۷/۱۰

پذیرش: ۱۳۹۲/۷/۲۰

مقدمه

امروزه تولید محصول‌های حاوی نانوذرات مختلف، گسترش زیادی در سطح جهان یافته‌است؛ این ذرات از درمان سوختگی گرفته تا تولید لوازم آرایشی، صنایع باتری‌سازی، تولید لاستیک، سیستم‌های نوری، پوشاک و الکترونیک به‌طور گسترده، استفاده می‌شوند (۱). اکسید منگنز از میان انواع مختلفی از اکسیدها و سوپر اکسیدها، به‌عنوان اکسیدکننده قوی در تولید محصول‌های متنوع صنعتی، بیشترین مورد استفاده را دارند؛ این اکسید فلزی به‌عنوان افزایش‌دهنده سختی آلیاژهای فولاد و افزایش‌دهنده مقاومت آلیاژهای مختلف در مقابل خوردگی به آنها افزوده می‌شود. نانو و میکروذرات اکسید منگنز در صنعت تولید باتری، ساخت رنگ‌های صنعتی و رنگ‌های تاتو استفاده می‌شوند (۲)؛ علاوه بر این، اکسید منگنز به‌عنوان کاتالیست مکمل سوخت خودروها، در ترکیب ماده حاجب MRI، صنایع داروسازی و فراماکولوژی برای ساخت بیوسنسورها استفاده می‌شود (۳)؛ کاربرد گسترده این ذرات سبب شده تا مدت زمان تماس با آنها هم برای کارگران شاغل در صنایع و هم برای عموم افراد جامعه افزایش یابد (۴). ترکیب‌های نانو به دلیل تغییر خواص فیزیکوشیمیایی قادرند تأثیرهایی نامطلوب را در سطوح مختلف اندام‌ها، بافت‌ها، سلول‌ها یا حتی سطوح زیرسلولی و پروتئین‌ها ایجاد کنند (۵). دانشمندی به نام راجاک^۱ به کمبود اطلاعات موجود درباره آثار سمی ترکیب‌های حاوی منگنز و به‌خصوص اکسید منگنز به فرم MnO₂ در شرایط *In vivo* اشاره کرده‌است (۶)؛ ضمن اینکه تعداد آزمایش‌هایی که در شرایط *In vivo* به بررسی آثار بیولوژیکی نانوذرات پرداخته‌اند، نیز بسیار اندک‌اند (۷).

سنجش توزیع بافتی (Biodistribution)، تجمع بافتی (Bioaccumulation) و پاک‌سازی بافتی (Bioclearance) این ذرات در بدن، اهمیت کاربردی فراوانی دارند. اندازه‌گیری شاخص‌های سرمی از متداول‌ترین روش‌های ارزیابی آثار سمی ترکیب‌های مختلف و نانوذرات بر

بدن است. این آزمون‌ها مشخص‌کننده اختلال در عملکرد اندام‌ها و آسیب‌های سلولی وارد بر آنها به‌دنبال تماس با ترکیب‌های سمی و نانوذرات هستند (۸). کبد، مهم‌ترین اندامی است که پاک‌سازی این ترکیب‌ها را از بدن پس از ورود آنها به بدن برعهده دارد و لذا بررسی شاخص‌های عملکرد این اندام دارای اهمیتی خاص است (۹). امروزه مقایسه آثار پاتولوژیکی دو اندازه مختلف نانو و میکروذرات یک ترکیب بر بدن از زمینه‌های نوین پژوهشی در علم نانوتکنولوژی است (۱۰)؛ این پژوهش‌ها براساس این مشاهدات شکل گرفته‌اند که برخی از ترکیب‌ها در ابعاد نانو دارای آثاری نامطلوب بر اندام‌های بدن هستند، ولی در ابعاد بزرگ‌تر هیچ‌گونه اثر سمی یا نامطلوبی از خود نشان نمی‌دهند (۱۱). بر این اساس در این پژوهش به مقایسه تجمع و آثار دو اندازه میکرو و نانو اکسید منگنز (MnO₂) بر بافت کبدی پرداخته شده‌است، چون دو عامل غلظت و اندازه نانوذرات بر پیامدهای ناشی از آنها بر بدن مؤثرند، تصمیم گرفته شد تا با انتخاب یک غلظت ثابت، فقط به مقایسه آثار دو اندازه نانو و میکرو از اکسید منگنز بر بدن پرداخته شود.

ویژگی خاص دیگری که درخصوص آثار *in vivo* نانوذرات بر بدن به آن باید اشاره کرد، این است که این ذرات می‌توانند در دو موجود مختلف باعث بروز آثاری متفاوت شوند؛ برای نمونه نانو اکسید آهن، فاقد آثار سمی در موش‌های کوچک بود (۱۲). ولی در موش بزرگ، باعث بروز آثار سمی شد (۱۳)؛ لذا بررسی‌های آثار نانوذرات در شرایط *in vivo* مشکلات و پیچیدگی‌های خاص خود را دارد؛ در این پژوهش با استناد به گزارش Lasagna-Reeves و همکارانش در سال ۲۰۱۰ که نشان دادند عمده نانوذرات به‌دنبال تجویز و ورود به گردش خون توسط کبد و طحال برداشته می‌شوند و بافت‌های دیگری مانند ریه، کلیه، قلب و مغز در مراحل بعدی از نظر تجمع بافتی نانوذرات قرار دارند (۱۴)، تصمیم گرفته شد تا به‌دنبال تجویز غلظتی ثابت و مزمن به مدت چهارده هفته از نانو و میکروذره اکسید

¹ - Rajak

صورت زیرجلدی به موش‌ها تزریق شدند.

انتخاب دوز

محدوده اندازه ذرات نانو و میکروذرات اکسید منگنز به‌کارگرفته‌شده در این پژوهش با پژوهش یو^۱ و همکارانش در سال ۲۰۱۱ مشابه است (۱۷)؛ آنها به‌دنبال تجویز دوزهای ۰/۰۵، ۰/۵ و ۵۰ میکروگرم از نوع فوق ظریف (Ultrafine-Particle) با قطری حدود ۲/۵ میکرومتر از اکسید منگنز به‌مدت ۱ ساعت به محیط کشت سلول‌های کبدی و کلیوی، فقط در دوز ۵۰ میکروگرم از این نانوذره، تغییراتی نامطلوب را در میزان ترکیب‌های حاوی اکسیژن فعال (Reactive oxygen species)، گلوتاتیون (Glutathione) و میزان پیوندهای عرضی میان DNA با پروتئین (DNA-protein crosslinks) در این سلول‌ها مشاهده کردند (۱۷) لذا در این پژوهش، دوز ۱۰۰ میکروگرم/کیلوگرم وزن بدن موش‌ها به‌عنوان دوز تجویزی از نانو و میکروذرات اکسید منگنز انتخاب شد.

حیوانات

موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نر نژاد ویستار با وزن 15 ± 12 گرم خریداری شده از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه تهران در این پژوهش استفاده شدند. درجه حرارت محیط در زمان آزمایش ۲۵ درجه سانتی‌گراد بود. شرایط نوری آزمایشگاه ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی تنظیم شده بود. آب لوله‌کشی شهری به‌عنوان آب آشامیدنی موش‌ها استفاده می‌شد و موش‌ها توسط خوراک مخصوص موش (غذای فشرده) تهیه‌شده از شرکت سهامی دام پارس تغذیه می‌شدند.

نحوه تیمار حیوانات، تهیه سرم و نمونه بافتی

موش‌ها به سه گروه کنترل و دو گروه تجربی شامل دریافت‌کننده میکروذره و دریافت‌کننده نانوذره تقسیم شدند؛ هر یک از دو گروه تجربی، شامل هفت زیرگروه و هر زیرگروه شامل ۵ سرموش بودند که به‌ترتیب به آنها هر دو هفته یک‌بار به‌مدت چهارده هفته ۱۰۰ میکروگرم/

منگنز به مقایسه آثار آنها بر کبد توسط اندازه‌گیری شاخص‌های سرمی عملکرد کبد در موش بزرگ در طول این مدت پرداخته‌شود.

مواد و روش‌ها

ذرات اکسید منگنز

میکروذره با خلوص بالای اکسید منگنز از شرکت مرک (MERCK) آلمان خریداری شد. ابعاد میکروذره اکسید منگنز مورد استفاده در این پژوهش ۳ میکرومتر بود (۱۵). نانوذره اکسید منگنز به روش Hydrothermal procedure با کمی تغییر و با استفاده از همین میکروذرات اکسید منگنز در گروه زیست‌شناسی دانشگاه شاهد سنتز شدند؛ این ذرات دارای ابعادی در حدود ۲۵ تا ۸۵ نانومتر بودند (۱۶).

روش ساخت نانوذره اکسید منگنز

برای تهیه نانوذره اکسید منگنز، ابتدا ۲۰ میلی‌لیتر $KMnO_4$ (۲/۰ میلی‌مولار) با ۱۶ میلی‌لیتر MnO_4 (۱۲۵/۰ میلی‌مولار) به‌مدت ۵ دقیقه با هم مخلوط شدند؛ مخلوط نهایی به‌طور مستقیم به داخل یک اتوکلاو استیل با پوشش تفلون منتقل و به‌مدت ۱۶ ساعت در دمای ۱۶۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و سپس محصول حاصل در دمای اتاق سرد شد. محصول قهوه‌ای‌رنگ حاصل، جمع‌آوری و با آب مقطر و اتانول سه مرتبه شسته و توسط جریان هوای با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت خشک شد. اندازه نانوذرات حاصل به کمک میکروسکوپ الکترونی میان ۲۵ تا ۸۵ میکرومتر تعیین شد.

روش تهیه محلول سوسپانسیون تزریقی از نانوذره

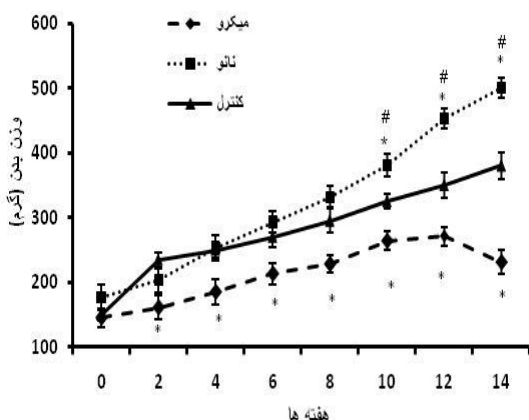
و میکروذره اکسید منگنز

با توجه به اینکه میزان حلالیت نانو و میکروذره اکسید منگنز در آب کم است، برای تهیه محلول سوسپانسیون نانو یا میکروذرات، ابتدا هر یک از ذرات با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میکرولیتر در سالی‌نرمال حل شدند. سوسپانسیون‌های حاصل پیش از تزریق توسط سونیکاتور به‌مدت ۳۰ دقیقه سونیکه و سپس به-

نتایج

۱- مقایسه میزان تغییر وزن موش‌ها

مقایسه میزان تغییر وزن موش‌ها طی چهارده هفته تجویز مزمن نانوذره و میکروذره اکسید منگنز نشان داد که سرعت افزایش وزن موش‌ها در دو گروه دریافت-کننده میکرو و نانوذره، تفاوتی معنی‌دار ($p < 0/05$) در مقایسه با موش‌های کنترل در زمان‌های مختلف دارد. تزریق میکروذرات اکسید منگنز، کاهش معنی‌دار ($p < 0/05$) در سرعت افزایش وزن موش‌ها را در هفته‌های دوم، هشتم، دهم، دوازدهم و چهاردهم در مقایسه با گروه کنترل در پی داشت (شکل ۱). تزریق نانوذرات اکسید منگنز، سبب افزایش معنی‌دار ($p < 0/05$) در سرعت افزایش وزن موش‌ها در مقایسه با گروه کنترل، طی هفته دهم تا چهاردهم شد (شکل ۱): بر این اساس، میان وزن موش‌های دریافت‌کننده نانو و میکروذره اکسید منگنز نیز، طی هفته‌های چهارم تا چهاردهم، تفاوتی معنی‌دار ($p < 0/05$) مشاهده شد. بررسی روند کلی افزایش وزن موش‌ها نشان می‌دهد که به دنبال تجویز نانوذرات، روند افزایش وزن به هم-نمی‌خورد، درحالی‌که تجویز میکروذرات در هفته



چهاردهم، روند طبیعی افزایش وزن موش را تغییر می‌دهد (شکل ۱).

شکل ۱. مقایسه تغییر وزن موش‌ها پس از تجویز میکرو یا نانوذرات اکسید منگنز (۱۰۰ میکروگرم/کیلوگرم وزن بدن) به مدت چهارده هفته ($n=5$). $p < 0/05$ * در مقایسه با کنترل، معنی‌دار است.

کیلوگرم میکروذره نانوذره اکسید منگنز به صورت زیرجلدی تزریق شد. موش‌های تمامی گروه‌ها هر دو هفته یکبار توزین و وزن آنها یادداشت شد؛ سپس ۵ سر موش از هر گروه به‌طور تصادفی، انتخاب و توسط اتر (Merck) بیهوش شدند. نمونه خون موش‌ها به‌طور مستقیم از قلب آنها گرفته شد و سپس موش‌ها تشریح و بافت کبدی آنها به‌طور کامل (In toto) برداشته شده و بلافاصله توسط سرم نرمال سرد (-۴ درجه سانتی‌گراد) شست‌شوداده شد. سرم نمونه‌های خونی موش‌ها پس از لخته شدن خون توسط سانتریفوژ جداسازی و همراه با نمونه بافت کبدی تا زمان انجام سنجش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

روش اندازه‌گیری میزان منگنز نمونه‌های بافتی

در این آزمایش از دستگاه (ICP-MS Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry system مدل Agilent Yokogawa Analytical Systems Inc., Tokyo, Japan) HP 4500، برای اندازه‌گیری منگنز موجود در عصاره بافت کبد استفاده شد (۱۸). از محلول 1000 PPM منگنز (Merck) به‌عنوان محلول استاندارد استفاده شد (۱۹).

اندازه‌گیری شاخص‌های سرم خونی

اندازه‌گیری شاخص‌های مختلف سرمی توسط دستگاه (Vitalab Selectra E, UK) Blood Chemical Analyzer صورت گرفت. پروتئین تام، آلومین، بیلی‌روبین، آنزیم‌های الکالین فسفاتاز (ALP)، آلانین آمینو ترانسفراز (ALT)، آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) و لاکتات دهیدروژناز (LDH) در نمونه سرم خون موش‌ها با کمک کیت‌های مرتبط اندازه‌گیری شدند.

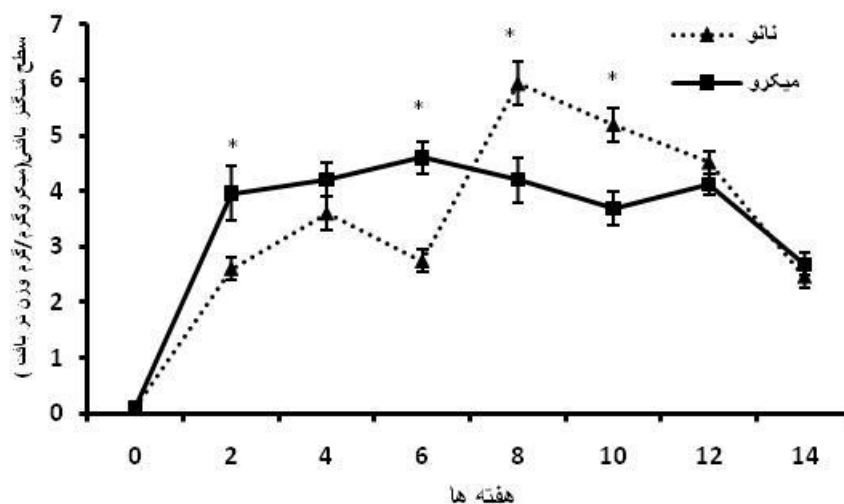
تجزیه و تحلیل آماری

میانگین وزن موش‌ها، میزان منگنز موجود در بافت کبدی و مقادیر هریک از شاخص‌های خونی اندازه‌گیری شده طی مدت چهارده هفته، توسط ANOVA و آزمون Tukey میان گروه‌های مختلف طی هفته‌های مختلف در مقایسه با گروه کنترل با سطح معنی‌داری ($p < 0/05$) تجزیه و تحلیل و نتایج به‌صورت میانگین \pm SEM ارائه شده‌اند.

$p < 0/05$ در مقایسه با میکرو ذرات اکسید منگنز، معنی دار است.

۲- اندازه گیری میزان تجمع منگنز در بافت‌ها

تجویز نانوذره و میکروذره اکسید منگنز، سبب تجمع قابل توجه و معنی داری منگنز در بافت کبدی موش‌ها شد. میزان طبیعی منگنز در بافت کبد در موش‌های کنترل طی هفته‌های مختلف، ثابت و در حدود $0/1 \pm 0/01$ میکروگرم/گرم بافت کبدی است. میزان تجمع منگنز در بافت کبد در هر دو گروه پس از تجویز نانو و میکروذره اکسید منگنز از هفته دوم به طور معنی داری ($p < 0/01$) نسبت به حالت پایه افزایش یافت و این افزایش تا آخر هفته چهاردهم حفظ شد (شکل ۲).



شکل ۲. میزان تغییرهای منگنز بافت کبدی موش‌ها ($n=5$) بدنال تجویز میکرو و نانوذرات اکسید منگنز در مقایسه با میزان آن پیش از تزریق. میزان منگنز بافت کبدی در روزهای مختلف در گروه میکروذرات با گروه نانوذرات اکسید منگنز دارای تفاوت معنی دار ($p < 0/05$) است.

۳- مقایسه تغییرهای سطح سرمی شاخص‌های مختلف به‌دنبال تجویز نانو و میکروذره اکسید منگنز

الف- اندازه گیری میزان پروتئین‌های سرمی

مقایسه تغییرهای پروتئین تام و آلبومین در سرم خون موش‌ها طی چهارده هفته پس از تجویز مزمن میکرو و نانوذره اکسید منگنز در جدول ۱ ارائه شده است. میزان

پروتئین تام سرمی به‌دنبال تجویز هر دو ذره به‌طور معنی دار ($p < 0/05$) افزایش یافت. میزان تأثیر نانوذرات در مقایسه با فرم میکروذرات بر افزایش سطح پروتئین تام، طی شش هفته اول، بیشتر است، درحالی‌که طی شش هفته آخر، اثر میکروذره اکسید منگنز بر افزایش سطح پروتئین تام خون، بیشتر از فرم نانو آن است. میزان آلبومین سرم خون نیز به‌دنبال تجویز هر دو ذره، افزایش

معنی‌دار ($p < 0/05$) را نشان‌داد. روند آثار میکرو و پروتئین تام خون است. نانوذرات بر این متغیر نیز شبیه به آثار آنها بر سطح

جدول ۱. مقایسه تغییرهای پروتئین تام و آلبومین سرم خون موش‌های دریافت‌کننده نانو و میکروذره اکسید منگنز (۱۰۰ میکروگرم/وزن بدن، هر دو هفته یک‌بار) به‌مدت چهارده هفته در مقایسه با گروه کنترل ($n=5$)

هفته	سطح پروتئین تام سرم (g/dL)			سطح آلبومین سرم (g/dL)		
	گروه کنترل	گروه میکروذره	گروه نانوذره	گروه کنترل	گروه میکروذره	گروه نانوذره
۰	۶/۴±۰۴/۰	۶/۴±۰۵/۰	۶/۳±۰۵/۰	۲/۵±۰۴/۰	۲/۵±۰۶/۰*	۲/۶±۰۵/۰*
۲	۶/۳±۰۴/۰	۶/۸±۰۶/۰*	۶/۷±۰۵/۰*	۲/۴±۰۲/۰	۳/۷±۰۴/۰*	۳/۸±۰۳/۰*
۴	۶/۵±۰۵/۰	۶/۵±۰۶/۰#	۹/۱±۰۸/۰*	۲/۶±۰۶/۰	۳/۷±۰۵/۰*#	۴/۷±۰۵/۰*
۶	۶/۴±۰۷/۰	۶/۹±۰۸/۰*#	۷/۹±۰۷/۰*	۲/۴±۰۸/۰	۳/۸±۰۶/۰*	۴±۰۴/۰*
۸	۶/۳±۰۵/۰	۷/۱±۰۸/۰*#	۶/۳±۰۴/۰	۲/۶±۰۷/۰	۳/۷±۰۴/۰*#	۳/۱±۰۶/۰*
۱۰	۶/۴±۰۴/۰	۶/۶±۰۶/۰*#	۶±۰۴/۰*	۲/۵±۰۴/۰	۳/۷±۰۷/۰*	۳/۶±۰۳/۰*
۱۲	۶/۴±۰۳/۰	۶/۳±۰۵/۰*#	۶/۶±۰۵/۰*	۲/۴±۰۲/۰	۳/۸±۰۶/۰*	۳/۶±۰۸/۰*
۱۴	۶/۳±۰۳/۰	۶/۵±۰۵/۰*#	۷/۲±۰۶/۰*	۲/۶±۰۵/۰	۳/۴±۰۸/۰*	۳/۷±۰۷/۰*

* تفاوت میان گروه‌های دریافت‌کننده اکسید منگنز با کنترل ($p < 0/05$) و # تفاوت میان گروه دریافت‌کننده نانوذره ($p < 0/05$)

میکروذره اکسید منگنز، باعث کاهش فعالیت آنزیم ALT، طی هفته چهارم آخر و افزایش آن در هفته ششم شد. تجویز نانوذرات فقط در هفته آخر، افزایش فعالیت این آنزیم سرمی را به‌طور معنی‌دار ($p < 0/05$) در پی-داشت (جدول ۲).

ب- تغییرهای فعالیت ترانس آمینازهای سرمی تجویز میکروذره اکسید منگنز، باعث کاهش فعالیت آنزیم AST سرم فقط در هفته دوازدهم در مقایسه با گروه کنترل شد ($p < 0/05$). نانوذره اکسید منگنز، طی هفته‌های دوم و دوازدهم، سبب کاهش معنی‌دار ($p < 0/05$) فعالیت این آنزیم در سرم شد. تجویز

جدول ۲. مقایسه تغییرهای فعالیت آنزیم‌های ALT و AST سرم خون موش‌های دریافت‌کننده نانوذره اکسید منگنز و میکروذره اکسید منگنز (۱۰۰ میکروگرم/وزن بدن هر دو هفته یک‌بار) به‌مدت چهارده هفته در مقایسه با گروه کنترل ($n=5$)

هفته	فعالیت آنزیم AST (U/L)			فعالیت آنزیم ALT (U/L)		
	کنترل	گروه میکروذره	گروه نانوذره	کنترل	گروه میکروذره	گروه نانوذره
۰	۱۵۶±۱۶	۱۹۸±۲۳	۱۷۶±۲	۵۱±۴	۵۲±۶	۵۴±۶
۲	۱۶۱±۱۱	۱۸۱±۱۶#	۳۸۲±۱۴*	۵۲±۵	۶۰±۷	۷۵±۹
۴	۱۶۸±۱۵	۱۵۶±۱۹	۱۸۲±۱۸	۴۸±۴	۲۳±۳*#	۵۲±۵
۶	۱۵۸±۱۸	۱۱۷±۱۱	۱۵۸±۱۳	۴۶±۴	۷۳±۷*#	۴۹±۴
۸	۱۴۹±۲۲	۱۱۱±۱۱	۱۶۰±۱۸	۵۰±۵	۳۶±۴	۴۴±۳
۱۰	۱۵۵±۲۵	۱۲۴±۱۸	۱۰۵±۱۹	۵۳±۶	۴۱±۴	۵۳±۵
۱۲	۱۶۴±۲۱	۹۶±۹*	۱۰۱±۱۵*	۵۵±۵	۵۳±۵	۶۶±۶
۱۴	۱۷۳±۱۸	۱۸۰±۱۶	۱۹۲±۱۵	۵۱±۶	۳۹±۳#	۷۷±۷*

* تفاوت میان گروه‌های دریافت‌کننده اکسید منگنز با کنترل ($p < 0/05$) و # تفاوت میان گروه نانو با میکروذره ($p < 0/05$)

معنی‌دار غلظت بیلی‌روبین تام سرم، طی دوازده هفته در مقایسه با گروه کنترل شد ($p < 0/05$). به دلیل نوسان

ج- بررسی تغییرهای میزان بیلی‌روبین سرمی تجویز نانو و میکروذره اکسید منگنز، باعث افزایش

میزان بیلی‌روبین، طی هفته‌های مختلف میان دو گروه بیلی‌روبین سرمی میان دو گروه مشاهده شد (جدول ۳). میکرو و نانوذره در تمامی هفته‌های مورد بررسی به جز هفته چهاردهم، تفاوت معنی‌داری ($p < 0/05$) در میزان

جدول ۳. تغییرهای بیلی‌روبین تام سرم خون موش‌ها طی چهارده هفته پس از تجویز نانوذره یا میکروذره اکسید منگنز (۱۰۰ میکروگرم/وزن بدن، هر دو هفته یک‌بار) به مدت چهارده هفته ($n=5$)

غلظت بیلی‌روبین تام (mg/dL)			
هفته	گروه کنترل	گروه میکروذره	گروه نانوذره
۰	۰۲/۰±۰۱/۰	۰۳/۰±۰۱/۰	۰۴/۰±۰۲/۰
۲	۰۳/۰±۰۱/۰	۶۲/۰±۰۲/۰#*	۲/۰±۰۱/۰*
۴	۰۴/۰±۰۱/۰	۱۲/۰±۰۲/۰#*	۲/۰±۰۲/۰*
۶	۰۴/۰±۰۱/۰	۳/۰±۰۲/۰#*	۱۴/۰±۰۲/۰*
۸	۰۳/۰±۰۱/۰	۰/۲±۰۲/۰#*	۱۳/۰±۰۲/۰*
۱۰	۰۲/۰±۰۱/۰	۱۴/۰±۰۱/۰*	۱۴/۰±۰۲/۰*
۱۲	۰۳/۰±۰۱/۰	۰۴/۰±۰۱/۰#	۸/۰±۰۲/۰*
۱۴	۰۲/۰±۰۱/۰	۰۵/۰±۰۲/۰	۰۵/۰±۰۲/۰

* تفاوت میان گروه‌های دریافت‌کننده اکسید منگنز با کنترل ($p < 0/05$) و # تفاوت میان گروه نانو با میکروذره ($p < 0/05$)

د- فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) سرمی تجویز نانو و میکروذره اکسید منگنز، باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم ALP سرم، طی چهارده هفته در مقایسه با گروه کنترل شد ($p < 0/05$) (جدول ۴).

جدول ۴. تغییرهای فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) و لاکتات دهیدروژناز (LDH) سرم خون موش‌ها، طی چهارده هفته پس از دریافت زیرجلدی مزمن ۱۰۰ میکروگرم/کیلوگرم نانوذره و میکروذره اکسید منگنز ($n=5$)

هفته	فعالیت آنزیم ALP (U/L)			فعالیت آنزیم LDH (U/L)		
	گروه کنترل	گروه میکروذره	گروه نانوذره	گروه کنترل	گروه میکروذره	گروه نانوذره
۰	۲/۱۸±۲۳/۰۵	۶۴/۲۴±۱۷/۲۸۶	۶۶/۲۶۶±۲/۲۲	۲۷۴۶±۲۷۸	۲۹۵۰±۳۲۸	۲۸۵۵±۳۰۷
۲	۸/۱۵±۲۱۲	۲/۸۵±۹۹۷	۷۸۲±۳/۶۰*	۳۰۰۱±۲۲۲	۲۴۵۲±۲۳۳	۳۴۳۱±۴۳۳
۴	۳/۲۱±۲۲۵	#۴/۲۳±۳۰۴	۶۷۵±۲/۵۱*	۲۹۵۴±۳۱۷	۵۳۰±۴۱#	۲۳۵۴±۲۴۴
۶	۴۲/۲۲±۲۳۸	۴/۱۴۰±۱۹۵۸	۳۸۶±۸/۲۲	۳۱۲۲±۳۱۷	۳۹۹±۳۲*	۱۲۳۳±۱۳۴*
۸	۷۱/۱۷±۲۱۹	۳/۳۱±۴۲۶#	۲۷۱±۹۸/۱۶	۲۸۷۴±۳۵۴	۶۷۳±۶۵*	۱۱۹۸±۱۲۷*
۱۰	۲۳±۲۶۶	۶۲۳±۶/۴۰#*	۴۷۵±۵/۳۷*	۲۹۹۳±۳۳۱	۲۶۹±۱۷*	۹۳۷±۹۸*
۱۲	۵/۲۴±۲۴۰	۴۸۶±۸/۴۰*	۳۷۰±۲۸*	۲۰۳۱±۲۲۸	۲۲۴±۱۳*	۷۷۱±۸۴*
۱۴	۲/۲۶±۲۶۶	۶۰۰±۴۰*	۴۷۴±۶/۳۹*	۲۸۲۷±۳۱۴	۲۹۶۲±۳۶۷#	۵۴۷±۴۹*

* تفاوت میان گروه‌های دریافت‌کننده اکسید منگنز با کنترل ($p < 0/05$) و # تفاوت میان گروه نانو با میکروذره ($p < 0/05$)

هفته ششم تا چهاردهم در مقایسه با گروه کنترل در پی-داشت؛ شدت آثار کاهش‌دهنده میکروذرات بر فعالیت این آنزیم، طی هفته‌های چهارم تا دوازدهم در مقایسه با نانوذرات، شدیدتر بود (جدول ۴).

د- میزان فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز سرمی تجویز نانو و میکروذره اکسید منگنز، افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم LDH سرم خون موش‌ها را از

بحث

محققان، تغییرهای وزن بدن موش‌ها را شاخص کلی (General indicator) از وضعیت سلامت عمومی (Health state) موش‌ها به دنبال تجویز نانوذرات می‌دانند. یافته‌های پژوهشی، نتایجی متضاد را در خصوص آثار نانوذرات اکسید فلزی مختلف بر وزن بدن موش‌ها یا به عبارتی اثر نانوذرات بر سلامت عمومی این حیوانات نشان داده‌اند؛ برای نمونه، وزن موش‌های بزرگ (۲۰) یا کوچک آزمایشگاهی (۲۱) پس از سه ماه دریافت نانوذره TiO_2 به صورت داخل صفاقی یا موش‌های بزرگ آزمایشگاهی پس از یک ماه دریافت خوراکی نانوذره نقره به تغییری معنی‌دار در مقایسه با موش‌های کنترل دچار نشد (۲۲)؛ در حالی که، تجویز نانوذره اکسید آهن به صورت استنشاقی، سبب تغییر معنی‌دار در وزن موش‌های بزرگ آزمایشگاهی شد (۲۳). محققان، افزایش استرس اکسیداتیو (Oxidative stress) و اختلال‌های متابولیک (Metabolic disturbance) به واسطه حضور رادیکال‌های آزاد (Free radicals) را به عنوان دلیل عمده کاهش وزن بدن و اختلال در سلامت عمومی این حیوانات در پی تجویز این نانوذرات مطرح کرده‌اند (۲۴)؛ بدین ترتیب به نظر می‌رسد که هرچه نانوذره‌ای، سبب بروز استرس اکسیداتیو بالاتری در کل بدن شود، آثار آن بر تغییرهای وزن بدن، بیشتر خواهد بود؛ بر اساس این فرضیه می‌توان مطرح کرد که هر دو ذره اکسید منگنز، حتی پس از دو هفته تجویز، سبب بروز استرس اکسیداتیو و اختلال‌های متابولیکی شدید در بافت‌های بدن شده‌اند؛ البته در ادامه، مدارکی بیشتر از یافته‌های این پژوهش دال بر این ادعا ارائه خواهند شد؛ به عنوان یک نکته در تأیید این فرضیه، مقایسه میزان تولید ROS در بافت‌های مختلف بدن به دنبال تجویز MnO_2 با فرم دیگر اکسید منگنز، مانند Mn_3O_4 نشان داد که MnO_2 سبب القای استرس اکسیداتیو بیشتری در سلول‌های بدن می‌شود (۲۵)؛ دانشمندان در توجیه ساختار مولکولی بروز این آثار اکسیداتیو نشان داده‌اند که نانوذره اکسید

منگنز می‌تواند سبب بروز اختلالی متوسط در فعالیت‌های اکسیداسیون و احیای میتوکندری شود (۲۶). نتایج سنجش سطح منگنز در بافت کبد نشان دادند که منگنز به دنبال تجویز هر دو ذره اکسید منگنز در بافت کبدی مجتمع می‌شود. سطح منگنز بافتی در گروه میکروذره اکسید منگنز، به رغم ادامه تجویز آن، از هفته‌های دوم تا دوازدهم در حدی ثابت باقی‌ماند، اما میزان آن در گروه نانوذره روند افزایشی دو مرحله‌ای را نشان داد. غلظت منگنز بافت کبد در این گروه، طی دو مرحله و طی هفته‌های دوم و ششم به تدریج افزایش یافت؛ نتایج پژوهشی دیگر که روی دو اندازه مختلف نانوذرات طلا با ابعاد ۱۰ و ۵۰ تا ۲۵۰ نانومتر صورت گرفته است، نشان داد که نانوذرات کوچک‌تر طلا به طور گسترده در خون، کبد، طحال، کلیه، بیضه، تیموس، قلب، ریه و مغز توزیع می‌شوند، اما نانوذرات بزرگ‌تر طلا فقط در خون، کبد و طحال قابل تشخیص هستند (۲۷)؛ این پژوهش، گویای این نکته است که گرچه تغییر در اندازه نانوذرات سبب می‌شود تا تجمع آنها در بافت‌های مختلف تغییر کند، در هر حال، کبد، بافت اصلی تجمع نانوذرات محسوب می‌شود و این مشاهده با یافته ما در این پژوهش همخوانی دارد؛ اما در توجیه افزایش دو مرحله‌ای در میزان منگنز بافت کبدی در دو گروه نانو و میکروذرات به نظر می‌رسد که این تغییرها ناشی از تفاوت در میزان پاک‌سازی این دو ذره از بافت کبدی باشد؛ بر این اساس، طی هفته‌های اول تجویز این ذره، میزان پاک‌سازی کبدی از منگنز بیشتر است، اما با ادامه تجویز نانوذرات از توان پاک‌سازی کبد کاسته شده است؛ در حالی که در گروه میکروذره، روند پاک‌سازی منگنز از بافت کبدی، متفاوت بوده، سرعت پاک‌سازی منگنز در طول هفته‌ها ثابت بود.

در ادامه و برای مقایسه آثار ناخواسته منگنز جمع شده در کبد به اندازه‌گیری شاخص‌های سرمی عملکرد کبد پرداخته شد؛ ابتدا تغییرهای فعالیت سرمی دو آنزیم ALT و AST به عنوان شاخصی از تخریب سلول‌های

(Cytolysis) کبدی در تماس با این دو ذره اندازه‌گیری- شد (۲۸)؛ افزایش سرمی این شاخص‌ها نشانه‌ای از افزایش فعالیت سنتزی کبد آنها و کاهش آنها نمادی از تغییر در میزان نفوذپذیری غشای سلول‌های کبدی است (۲۹). یافته‌های ما نشان‌دادند که تجویز میکروذرات، سبب کاهش فعالیت AST طی هفته دوم و دوازدهم در مقایسه با گروه کنترل شد؛ درحالی‌که تجویز نانوذره، سبب افزایش فعالیت این آنزیم در هفته دوم و کاهش آن در هفته دوازدهم شد. آنزیم ALT تحت تأثیر میکروذره در هفته‌های چهارم و چهاردهم در مقایسه با گروه کنترل، کاهش و در هفته ششم افزایش یافت و تحت تأثیر تجویز نانوذره در هفته آخر در مقایسه با گروه کنترل، افزایش نشان‌داد. درخصوص ساختار آثار نانوذرات بر سطح سرمی این دو آنزیم، شواهدی در دست است که نشان‌می‌دهند، برخی از نانوذرات فلزی می‌توانند سبب مهار آنزیم‌های ترانس آمیناز شوند (۳۰)؛ بر این اساس، می‌توان این نظریه را ارائه کرد که نانوذرات در کوتاه‌مدت به‌واسطه مهار این آنزیم‌ها سبب تحریک سنتز آنها شده‌اند، اما این ذرات در طولانی-مدت، سبب تحریک شدید سلول‌های کبدی شده، در نتیجه، باعث تخریب سلول‌های کبدی و افزایش سطح این آنزیم‌ها در سرم می‌شوند درحالی‌که به‌نظر می‌رسد میکروذرات چه در کوتاه‌مدت و چه در بلندمدت، گرچه آسیب‌رسانی به سلول‌های کبدی شده‌اند، سلول‌های کبدی توانسته‌اند این آسیب‌ها را جبران کرده، سطح سرمی طبیعی این آنزیم‌ها را دوباره برقرار کنند. نتایج ما گویای افزایش در پروتئین تام، آلبومین و بیلی‌روبین در سرم خون به‌دنبال تجویز هر دو ذره در برخی از هفته‌ها است؛ مقایسه این شاخص‌ها در سرم خون گروه نانوذره با میکروذره نشان‌داد که در برخی هفته‌ها این شاخص‌ها در گروه نانوذره و در هفته‌های دیگر در گروه میکروذره، افزایش سطح نشان‌می‌دادند. آلبومین و بیلی‌روبین پروتئین‌هایی هستند که اغلب از آنها به‌عنوان شاخص‌های عملکرد گلوومولی-توبولی کلیه‌ها استفاده- می‌شود و به‌عنوان شاخص‌های تنظیم‌کننده میزان فشار

اسمزی خون در نظر گرفته می‌شوند (۳۱)، ولی برخی از پژوهشگران، آنها را به‌عنوان شاخص‌های عملکرد کبدی نیز در نظر گرفته‌اند (۳۱)؛ بدین ترتیب، کاهش میزان آلبومین را می‌توان ناشی از نقص عملکردی سنتز پروتئین‌ها در سلول‌های کبدی دانست؛ ضمن اینکه می‌توان آن را ناشی از دفع و ازدست‌دادن کلیوی آلبومین نیز تفسیر کرد (۳۱). بیلی‌روبین، هم یک محصول مهم متابولیسم (Heme) در خون است (۳۱). افزایش آن در سرم خون می‌تواند ناشی از اختلال در عملکرد کبدی-کلیوی باشد (۳۲)؛ به این ترتیب می‌توان گفت که فشار اسمزی خون و به احتمال زیاد، عملکرد کبدی و همراه با آن، کلیوی به‌دنبال تجویز هر دو ذره به اختلال، دچار شده‌است؛ در این خصوص، دانشمندی بنام نسرین^۱ و همکارانش در پژوهش خود به بررسی آثار داروهای سنتی حاوی ترکیب فلزی مس و جیوه با ابعاد بزرگ‌تر از نانو در شرایط In Vivo بر عملکرد کبدی پرداخته‌اند و به کمک اندازه‌گیری شاخص‌های عملکرد کبدی در مصرف‌کنندگان این داروها نشان‌دادند که مصرف این فلزات می‌تواند به‌طور مشابه، افزایش آلبومین و کاهش بیلی‌روبین سرمی را در پی داشته‌باشد، ولی این فلزات بر سطح پروتئین تام سرمی و فعالیت آنزیم‌های ALT، AST و ALP سرمی تأثیری نداشته‌اند (۳۳)؛ اما در توجیه یافته‌های این پژوهش و ارائه ساختار افزایش پروتئین تام خون به‌دنبال تجویز هر دو ذره اکسید منگنز، می‌توان به گزارشی اشاره کرد که در آن نشان‌داده شده‌است که در پی تجویز برخی نانوذرات و به‌واسطه تحریک تولید NF-κB و تولید پروتئین‌های پیش‌التهابی در خون، سطح پروتئین تام خون افزایش یافته‌است (۳۴) لذا ممکن است افزایش مشاهده‌شده در سطح پروتئین‌های تام سرمی در این پژوهش نیز ناشی از افزایش تولید پروتئین‌های پیش‌التهابی در خون تحت اثر تحریکی ذرات اکسید منگنز باشد. دانشمندان افزایش در میزان بیلی‌روبین خون را نمادی از بروز بیماری‌های همولیتیک می‌دانند (۳۵)؛ لذا اولین پیش‌فرض درخصوص افزایش بیلی‌روبین خون

¹ - Nasrin

(۴۲). دانشمندی به نام لی^۲ و همکارانش گزارش کرده‌اند که کاهش در فعالیت لاکتات دهیدروژناز می‌تواند به بروز استرس اکسیداتیو در سلول‌های بدن منجر شود (۴۳)؛ این ادعا فرضیه ما را درخصوص آثار نامطلوب کبدی این ذرات به دلیل خاصیت اکسیدکنندگی آنها که در ابتدای بحث به آن اشاره شد، تأیید می‌کند. در تأیید این فرضیه که نانوذرات با اتصال به این ترکیب و کاهش آن می‌توانند سبب بروز آثار اکسیدکنندگی خودشان بر بافت‌ها و بروز اختلال در عملکرد اندام‌های شوند؛ یافته تأییدکننده دیگری به این شرح در دست است که برخی از رنگ‌هایی که ترکیب‌های اکسید فلزی دارند و در تصویربرداری استفاده می‌شوند، می‌توانند با اتصال به این آنزیم، سبب کاهش غلظت آن در سرم شوند (۴۴)؛ بدین ترتیب، اتصال ذرات اکسید منگنز با این آنزیم را می‌توان به‌عنوان یک ساختار پیشنهادی برای ایجاد آثار اکسیداتیو آنها مطرح کرد.

نتیجه‌گیری

در جمع‌بندی کلی می‌توان گفت که هر دو اندازه مختلف اکسید منگنز به‌دنبال تجویز مزمن به بدن به - سرعت در بافت کبدی مجتمع شده، سبب بروز اختلال در عملکرد این اندام می‌شوند؛ همچنین پاک‌سازی بافتی این ذرات از کبد نیز بسیار کند و بر بروز آثار ناخواسته آنها بر عملکرد کبدی، تأثیرگذار است؛ بررسی سرعت افزایش وزن بدن موش‌های مورد بررسی نیز دال بر این است که هر دو ذره مختلف نه‌تنها سبب اختلال در عملکرد کبدی شده‌اند، بلکه سبب بروز اختلال‌هایی شدیدتر بر متابولیسم کلی بدن می‌شوند. براساس نتایج اندازه‌گیری شاخص‌های سرم خون می‌توان به برخی از ساختارهای احتمالی این ذرات بر عملکرد کبدی پی‌برد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از زحمات جناب آقای دکتر حسینی،

به‌دنبال تجویز هر دو ذره اکسید منگنز می‌تواند بروز حالت همولیز در گلبول‌های قرمز خون باشد؛ البته پژوهشگران، اختلال در عملکرد طبیعی کبد را نیز به - عنوان دلیلی دیگر برای افزایش میزان بیلی‌روبین سرمی مطرح کرده‌اند (۳۶).

شاخص دیگر کبدی مورد بررسی در این پژوهش، «آنزیم آلکالین فسفاتاز» است که کاهش فعالیت آن در پلاسما دلیلی بر بهبود کیفیت فعالیت سنتزی کبد است (۳۷) و افزایش فعالیت این آنزیم در انواع مختلفی از بیماری‌های کبدی گزارش شده است؛ البته برخی از دانشمندی مدعی شده‌اند فقط در صورتی که میزان فعالیت این آنزیم در خون تا سه برابر میزان طبیعی‌اش افزایش - یابد، می‌توان آن را به‌عنوان شاخصی از بروز مشکل کبدی در نظر گرفت (۳۸)؛ یافته‌های این پژوهش، افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز سرمی به‌دنبال تجویز هر دو نانوذره را نشان داد؛ این مشاهده با یافته‌های دانشمندی بنام راجاک و همکارانش در سال ۲۰۱۲ درخصوص بررسی این شاخص به‌دنبال نانوذره اکسید منگنز همخوانی و مطابقت دارد (۶)؛ همچنین وانگ^۱ و همکارانش در سال ۲۰۰۶ رابطه‌ای را میان افزایش این شاخص خونی و دیگر شاخص‌های خونی عملکرد کبدی و تغییرهای بافت‌شناسی در کبد به‌دنبال تجویز میکروذره و نانوذره اکسید روی گزارش کرده‌اند (۳۹)؛ به این ترتیب، این شاخص نیز تأییدی دیگر درخصوص آسیب کبدی این دو ذره فراهم می‌آورد.

یافته‌های ما کاهش فعالیت سرمی آنزیم لاکتات دهیدروژناز در گروه نانوذره اکسید منگنز از هفته چهارم به بعد و در گروه میکروذره اکسید منگنز از هفته ششم به بعد را نشان داد؛ گزارش شده است که کاهش غلظت سرمی این آنزیم به‌دنبال تجویز نانوذرات اکسید فلزی به دلیل اتصال این نوع نانوذرات به این آنزیم است (۴۰) و (۴۱). کاهش فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز سرمی، شاخصی از افزایش نفوذپذیری عروق خونی موئینه تحت اثر نانوذرات اکسید فلزی نیز قلمداد شده است

² - Le

¹ - Wang

آزمایشگاه فارماکولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی که در طول اجرای این طرح با ما همکاری صمیمانه داشتند، تشکر و قدردانی می‌کنیم.

مسئول آزمایشگاه ICP-MS دانشگاه تربیت مدرس که صمیمانه ما را در اجرای این طرح یاری فرمودند، تشکر و سپاسگزاری می‌شود؛ همچنین از زحمات مسئول

منابع

- Huang YW, Wu CH, Aronstam RS. Toxicity of transition metal oxide nanoparticles: recent insights from in vitro studies. *Materials* 2010; 3: 4842-4859.
- Nguyen LQ, Allen HB. Reactions to manganese and cadmium in tattoos. *Cutis* 1979;23:71-72.
- Cui X, Liu G, Lin Y. Amperometric biosensors based on carbon paste electrodes modified with nanostructured mixed-valence manganese oxides and glucose oxidase. *Nanomedicine* 2005;1:130-135.
- Na HB, Lee JH, An K, Park YI, Park M, Lee IS, Nam DH, Kim ST, Kim SH, Kim SW, Lim KH, Kim KS, Kim SO, Hyeon T. Development of a T1 contrast agent for magnetic resonance imaging using MnO nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007; 46:1-6.
- Schrand AM, Rahman MF, Hussain SM, Schlager JJ, Smith DA, Syed AF. Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. *Wiley interdisciplinary reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology.* 2010; 2: 544-568.
- Rajak S, Jamil K. Acute and subacute toxicity studies of manganese oxide nanomaterials as compared to bulk in rats with emphasis on changes in biochemical and hematological parameters. *Int J Adv Scient Tec Res* 2012; 2:81-94.
- Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3 A rat liver cells. *Toxicol in Vitro* 2005; 19:975-983.
- Li Y, Liu J, Zhong Y, Zhang J, Wang Z, Wang L, et al. Biocompatibility of Fe₃O₄@Au composite magnetic nanoparticles in vitro and in vivo. *Int J Nanomedicine.* 2011;6:2805-19.
- Jani, P., Halbert, GW., Langridge, J., Florence, AT. Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency. *J Pharm Pharmacol* 1990;42:821-826.
- Gatti AM. Risk assessment of micro and nanoaprticles and the human health, Chapter 12, *Handbook of Nanostructured biomaterials and their applications* Ed American Scientific Publisher USA. 2005:347-369.
- Goodman CM, McCusker CD, Yilmaz T, Rotello VM. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjug Chem.* 2004;15:897-900.
- Jain TK, Reddy MK, Morales MA, Leslie-Pelecky DL, Labhasetwar V. Biodistribution, clearance, and biocompatibility of iron oxide magnetic nanoparticles in rats. *Mol. Pharmaceutics* 2008; 5:316-327.
- Gu L, Fang RH, Sailor MJ, Park JH. In vivo clearance and toxicity of monodisperse iron oxide nanocrystals. *ACS NANO* 2012; 6:4947-4954.
- Lasagna-Reeves C, Gonzalez-Romero D, Barria MA, Olmedo I, Clos A, Sadagopa Ramanujam VM, Urayama A, Vergara L, Kogan MJ, Soto C. Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice. *Biochem Biophysical Res Com* 2010;393:649-655.
- Geiser M, Kreyling WG. Deposition and biokinetics of inhaled Nanoparticles. *Part Fibre Toxicol.* 2010;7:2.
- Zhang Y, Yang Y, Zhang Y, Zhang T, Ye M, Heterogeneous oxidation of naproxen in the presence of α -MnO₂ nanostructures with different morphologies. *Applied Catalysis B Environmental* 2012;127:182-189.
- You H, Zhao J, Li L, Yuan J. Effects of MnO₂ Nanoparticles on Liver and Kidney Cells of Rats, Published in 5th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering. 2011:1-4.
- Watanabe M, Asatsuma M, Ikui A, Ikeda M, Yamada Y, Nomura S, Igarashi A. Measurements of several metallic elements and matrix metalloproteinases (MMPs) in saliva from patients with taste disorder. *Chem. Senses* 2005;30:121-125.
- Severo MIG, Barbier F, de Oliveira AH, Loustalot MFG, Carneiro CG, Silva MRS, INAA and ICP-MS Methods for Biological Tissues Studies. *Revista de Física Aplicada e Instrumentacao* 2004;17:110-115.
- Warheit DB, Hoke RA, Finlay C, Donner EM, Reed KL, Sayes CM. Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO₂ particles as a component of nanoparticle risk management. *Toxicol Lett.* 2007;171:99-110.
- Kim WY, Kim J, Park JD, Ryu HY, Yu IJ. Histological study of gender differences in accumulation of silver nanoparticles in kidneys of Fischer 344 rats. *J. Toxicol. Environ. Health A,* 2009;72:1279-84.
- Ranjbar Sardari RR, Zarchi SR, Talebi A, Nasri S, Imani S, Khoradmehr A, Razavi Sheshde SA. Toxicological effects of silver nanoparticles in rats. *African Journal of Microbiology Research* 2012;6:5587-5593.
- Szalay B, Erzsébet Tátrai, Gábor Nyíró, Tünde Vezér, Gyula Dura, Potential toxic effects of iron oxide nanoparticles in in vivo and in vitro experiments. *J Appl Toxicol.* 2012;32: 446-53.
- Merry BJ. Molecular mechanisms linking calorie restriction and longevity. *Intern J Biochem Cell Biol.* 2002;34:1340-1354.
- Stefanescu DM, Khoshnan A, Patterson PH, Hering JG, Neurotoxicity of manganese oxide

- nanomaterials. *J Nanopart Res.* 2009;11:1957–1969.
26. Yang Z., Z. W. Liu, R. P. Allaker, P. Reip, J. Oxford, Z. Ahmad and G. Ren. A review of nanoparticle functionality and toxicity on the central nervous system. *J. R. Soc. Interface.* 2010; Suppl 4:S411-22.
 27. Jong WHD, Hagens WI, Krystek P, Burger MC, Sips AJAM, Geertsma, RE. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials* 2008;29:1912–1919.
 28. Yakubu MT, Akanji MA, Oladiji AT. Aphrodisiac potentials of aqueous extract of *Fadogia agrestis* (Schweinf. Ex Hern) stem in male albino rats. *Asian. J. Androl.* 2005;7:399-404.
 29. Jimoh FO, Odotuga AA. Changes in the activities of some diagnostic enzymes in some rats tissue following consumption of thermally oxidized groundnut oil. *Nig. J. Biochem. Mol. Biol* 2001;16:173-176.
 30. Abbas SAR, Abdullah AH, Sada SHA, Ali AK. The effects of gold and silver nanoparticles on transaminase enzymes activities. *Int. J Chem Res* 2011;1:1-11.
 31. Yakubu MT, Bilbis LS, Lawal M, Akanji MA. Effect of repeated administration of sildenafil citrate on selected enzyme activities of liver and kidney of male albino rate. *Nig, J. Pure and Appl Sci.* 2003;18:1395-4000.
 32. Afolayan AJ, Yakubu MT. Effect of *Bulbine natalensis* Baker stem extract on the functional indices and histology of the liver and kidney of male Wistar rats. *J Med Food.* 2009;12:814-20.
 33. Nasrin S, Bachar SC, Choudhuri MSK. Toxicological studies of “chondrokola rosh”, an ayurvedic preparation on liver function tests of rats. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2011;8:170-174.
 34. Brown DM, Donaldson K, Borm PJ, Schins RP, Dehnhardt M, Gilmour P, et al. Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF-alpha cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004;286:L344–L353.
 35. Chien CH, Hwu CM, Liou TL, Huang ZL, Shen AR, Yang VH, Lee CW and Chien EJ. Inducible nitric oxide synthase expression and plasma bilirubin changes in rats under intermittent hypoxia treatment. *Chinese J Physiol* 2006;49: 275-280.
 36. Naganna B. Plasma proteins. In: *Textbook of Biochemistry and Human Biology*, Talwar G. P., Srivastava L. M. and Moudgil, K. D., Prentice- Hall of India Private Ltd., New- Delhi, 2nd edn. 1989; 59 – 61.
 37. Shahjahan M, Sabitha KE, Jainu M, Shyamala-Devi CS. Effect of *Solanum trilobatum* against carbon tetrachloride induced hepatic damage in albino rats. *Indian J. Med. Res.* 2004; 120:194-198.
 38. Wiwanitkit V. High serum alkaline phosphatase levels, a study in 181 Thai adult hospitalized patients. *BMC Family Practice* 2001;2:2.
 39. Wang B, Feng WY, Wang TC, Jia G, Wang M, Shi JW, Zhang F, Zhao Y-L, Chai ZF. Acute toxicity of nano- and micro-scale zinc powder in healthy adult mice. *Toxicol Lett.* 2006;161:115-123.
 40. Zaqout MS, Sumizawa T, Igisu H, Wilson D, Myojo T, Ueno S. Binding of titanium dioxide nanoparticles to lactate dehydrogenase. *Environ Health Prev Med.* 2012;17:341-5.
 41. Vijayakumar S, Ganesan S. In Vitro cytotoxicity assay on gold nanoparticles with different stabilizing agents. *J Nanomaterials* 2012;2012:1-9.
 42. Hetland, R.B., Cassee, F.R., Refsnes, M., Schwarze, P.E., Lag, M., Boere, A.J.F., Dybing, E. Release of inflammatory cytokines, cell toxicity and apoptosis in epithelial lung cells after exposure to ambient air particles of different size fractions. *In Vitro Toxicol.* 2004;18:203–212.
 43. Le A, Cooper CR, Gouw AM, Dinavahi R, Maitra A, Deck LM, Royer RE, Vander Jagt DL, Semenza GL, Dang CV. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107: 2037-42.
 44. Franke RP, Fuhrmann R, Mrowietz C, Rickert D, Hiebl B, Jung F. Reduced diagnostic value of lactate dehydrogenase (LDH) in the presence of radiographic contrast media. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2010;45:123-30.

Comparison of chronic administration of manganese oxide micro and nanoparticles on liver function parameters in male rats

Shiva Rezagolian^{1,2}, Majid Hassanpourezatti^{1*}, Seyede Zahra Mousavi²,
Mohammadsafi Rhamanifar¹, Nahid Nosrati²

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran.

2. Department of Toxicology & Pharmacology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

E-mail:hassanpour@shahed.ac.ir

Abstract

Background and Objective: Increased production and industrial application of manganese oxide (MnO₂) nano and microparticles have led to increased human contact with these particles. In this study, the biodistribution of manganese in rat liver was studied after chronic administration of two MnO₂ particles. Also, the effect of these particles was studied on body weight gain and liver function tests of rats.

Materials and Methods: Male wistar rats were weighted and subcutaneously treated with 100 (µg/kg) nano- or micro-particles of MnO₂ every two weeks for 14 weeks. Blood samples are taken directly from the heart of the rats (n=5) at the same times. The Mn level in samples of rat hepatic tissue was determined by ICP-MS. Serum levels of total protein, albumin, bilirubin, activities of transaminases, lactate dehydrogenase and alkaline phosphatase were measured by autoanalyzer.

Results: Rate of body weight gain in rats of nano group was significantly faster and in micro group rats was slower than control (p<0.05). The hepatic Mn biodistribution, accumulation and bioclearance in nanoparticles group were different from microparticles group. The levels of total protein, albumin, bilirubin and alkaline phosphatase activity increased, while transaminase enzymes and lactate dehydrogenase activities decreased in serum of both groups (p<0.05).

Conclusion: The chronic administration of MnO₂ nano- and microparticles caused manganese accumulation in hepatic tissue. The strong oxidizing property of both MnO₂ particles and their binding with some hepatic enzymes can be main causes of liver dysfunction.

Key words: MnO₂, Nanoparticles, Microparticles, Liver Biomarkers