

## بررسی اثرات تزریق داخل صفاقی نانو ذرات مولیبدن بر میزان تغییرات سطح آنزیم های کبدی در موش صحرایی نر بالغ

اعظم حیدری<sup>1</sup>، مهران محسنی<sup>2</sup>، کریم داداشی<sup>3</sup>

1-دپارتمان بیوتکنولوژی و ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران. Heidariazam@yahoo.com

2-دپارتمان کنترل غذا و دارو، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران.

3-کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران.

تاریخ دریافت: 93/7/5 تاریخ پذیرش: 93/9/17

### چکیده

مقدمه و هدف: با گسترش صنعتی شدن فناوری نانو استفاده از نانوذرات نیز در تکنولوژی های مدرن افزایش خواهد یافت و افراد زیادی در معرض مواجهه با این ذرات خواهند بود. لذا بررسی اثرات غلظت های مختلف این نانوذرات بر سلامتی حائز اهمیت می باشد. این مطالعه با هدف ارزیابی اثر سمیت حاد نانوذرات مولیبدن بر برخی فاکتورهای بیوشیمیایی کبد در سرم خون موش انجام شده است.

روش کار: در این مطالعه تجربی، 24 سر موش صحرایی نر بالغ به صورت تصادفی در چهار گروه شش تایی، یک گروه شاهد و سه گروه تیمار قرار گرفتند. به گروه شاهد یک میلی لیتر آب مقطر و به گروه های تیمار روزانه نانوذرات مولیبدن به ترتیب مقادیر mg/Kg 5، 10 و 15 به مدت 28 روز متوالی به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. بعد از آخرین دوز دریافتی از موش ها خونگیری به عمل آمد و سطح برخی فاکتورهای بیوشیمیایی سرم مانند لاکتات دهیدروژناز (LDH)، آلانین آمینو ترانسفراز (ALT)، آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP) سنجیده شد و نتایج گروه ها با یک دیگر مقایسه گردید.

یافته ها: کاهش معنی داری در آنزیم AST در مقادیر 5 mg/Kg/BW و 10 نسبت به گروه شاهد مشاهده گردید ( $P < 0/05$ ) و آنزیم LDH در مقدار 5 mg/Kg/BW نسبت به گروه شاهد کاهش معنی داری نشان داد ( $P < 0/05$ ). آنزیم ALP و ALT نیز دارای اختلاف غیر معنی دار بود.

نتیجه گیری: مطالعه حاضر نشان داد که نانوذرات مولیبدن در غلظت های پایین با توجه به اثر آنتاگونیستی آن با مس سمیت حادی ایجاد نمی کند.

واژه های کلیدی: نانو ذرات مولیبدن، آنزیم های کبدی، سمیت.

### مقدمه

کار می رود. به علاوه این عنصر از عناصر کمیاب و ضروری برای گیاهان، حیوانات و انسان است و نقش مهمی در بدن ایفا می کند (8، 12). مولیبدن به عنوان کوفاکتور در ساختمان آنزیم های سولفیت اکسیداز، آلدهید دهیدروژناز و گزانتین اکسیداز شرکت نموده و نقش مهمی در متابولیسم بدن دارد و هم چنین اثر آنتاگونیستی آن بر متابولیسم مس قابل توجه می باشد. مولیبدن در گیاهان برگ دار و بسیاری از دانه ها و گوشت یافت می شود (13). مولیبدن به عنوان یک ماده ضد سرطانی شناخته شده است و رابطه بین کمبود آن و

مولیبدن (Molybdenum) عنصر فلزی با عدد اتمی 42 در گروه VI B و دوره پنجم جدول تناوبی جای دارد. فلز خاکستری با گرد سیاه رنگ بوده و به صورت آزاد در طبیعت یافت نمی شود. مولیبدن در صنعت به عنوان آلیاژ کننده در فولاد و چدن، آلیاژ با تنگستن، به عنوان آنتی کاتد در لوله روتنگتن، ماده رنگی برای جوهر چاپ، رنگ ها و سرامیک، کاتالیزور، روان کننده در موشک ها و هواپیما، راکتورها، پره های توربین، باتری ها، آلیاژها و فولادهای ویژه در صنایع شیمیایی به

بررسی تاثیر نانو ذرات مولیبدن بر میزان تغییرات آنزیم های کبدی که قبلاً مطالعه ای بر روی آن انجام نشده است پرداخته می شود.

### مواد و روش ها

حیوانات مورد استفاده در این مطالعه تجربی موش های صحرائی نر بالغ از نژاد اسپراگ داوولی با وزن تقریبی 300-250 گرم بود که از خانه حیوانات دانشکده داروسازی زنجان تهیه شد. هم چنین شرایط نوری به مدت 12 ساعت تاریکی و 12 ساعت روشنایی تنظیم گردید. آب آشامیدنی از آب لوله کشی شهری و تغذیه ی حیوانات به وسیله ی خوراک مخصوص موش انجام شد. برای انجام مطالعه از 24 سر موش نر بالغ استفاده و موش ها به صورت تصادفی در چهار گروه شش تایی، یک گروه شاهد و سه گروه تیمار قرار گرفتند. گروه شاهد شامل 6 سر موش نر بود که در زمان آزمایش به آن ها روزانه یک میلی لیتر آب مقطر به مدت 28 روز به صورت داخل صفاقی تزریق شد. گروه تیمار شامل سه زیر گروه و هر کدام شامل 6 سر موش نر که به آن ها مقادیر مختلف نانوذرات مولیبدن روزانه به ترتیب مقادیر 5, 10 و 15 mg/Kg/BW، که از شرکت زیست شیمی آزما رشد تهیه شده بود به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. از تمام موش ها در پایان روز بیست و هشتم پس از بیهوشی خون گیری از طریق سیاهرگ چشمی صورت گرفت. سپس هر نمونه به مدت 15 دقیقه با دور 3000 سانتریفیوژ شد. بعد از جداسازی سرم از لخته، نمونه ها تا زمان انجام سنجش های آنزیمی در دمای 20- درجه سانتی گراد منجمد و نگهداری شد. سطح برخی فاکتورهای بیوشیمیایی سرم مانند لاکتات دهیدروژناز (LDH)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP) با استفاده از کیت های آنزیمی شرکت بیونیک به روش اسپکتروفوتومتری (Hitachi 912)

بروز سرطان مری در انسان نخستین بار در سال 1966 گزارش شده و در تعدادی از مطالعات حیوانی نیز به اثر بازدارندگی مولیبدن بر سرطان های معدی و روده ای اشاره شده است (11، 3). بر اساس گزارش لئو و همکاران مولیبدن از سرطان دهانه معده القاء شده با N - نیتروزوسارکوزین اتیل استر (NSEE) در موش ممانعت می کند لذا مکمل آن می تواند موجب کاهش القاء NSEE بر سرطان زایی مری و معده گردد (10). به علاوه وئی و همکاران نشان دادند که دوره فحلی موش صحرائی ماده به طور معنی داری با خوراندن مکمل های مولیبدن رابطه دارد. از آن جایی که مولیبدن به عنوان باز دارنده تبدیل گیرنده های استروژن شناخته شده احتمال دارد که غیر فعال ماندن گیرنده های استروژن در رحم توسط مولیبدات موجب تغییر دوره فحلی موش ماده باشد (9). مولیبدن از طریق غبار و بیشتر به صورت استنشاقی جذب می شود. میزان مولیبدن در هوا در مناطق شهری در حدود 0/03 - 0/01 میکروگرم بر متر مکعب و در مناطق غیر شهری بین 0/001 و 0/0032 میکروگرم بر متر مکعب متغیر است (8). با گسترش صنعتی شدن فناوری نانو استفاده از نانو ذرات نیز در تکنولوژی های مدرن افزایش یافته است لذا افراد زیادی در معرض مواجهه با این ذرات خواهند بود. قابلیت های ذرات فلز در ابعاد نانو به خاطر افزایش مساحت سطح آن بسیار بیشتر از ابعاد عادی آن می باشد، اما علی رغم این توسعه روز افزون تاکنون تحقیقات بسیار اندکی در زمینه شناسایی پتانسیل اثرات سوء این نانو مواد بر سلامتی انسان و محیط صورت گرفته است (5). در سال های اخیر در بررسی اثرات نانو ذراتی از قبیل  $Fe_2O_3$ , Cr,  $TiO_2$ , ZnO, Zn, Fe, Cu و غیره مطالعات گسترده ای انجام شده است (17، 16، 7، 6، 2، 1). با توجه به این که مولیبدن علاوه بر ارزش حیاتی دارای سمیت ناشی از تولیدات و پسماند صنایع نیز می باشد لذا در این مطالعه به

آنزیم AST در دو گروه 5 و 10 mg/Kg BW نسبت به گروه شاهد کاهش معنی داری داشت ( $P < 0/05$ ). آنزیم LDH نیز گروه یک نسبت به گروه شاهد کاهش معنی دار نشان داد ( $P < 0/05$ ) ولی در مورد آنزیم های ALP و ALT اختلاف معنی داری مشاهده نگردید (جدول 1).

سنجیده شد. نتایج حاصله توسط برنامه آماری SPSS 22 و ANOVA و تست توکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و اختلاف در سطح احتمال  $p < 0/05$  معنی دار در نظر گرفته شد.

## نتایج

جدول 1- اثر تزریق نانوذرات مولیبدن بر میانگین و انحراف معیار غلظت فاکتورهای بیوشیمیایی AST، ALT، LDH و ALP در سطح سرم در گروه های مختلف مورد مطالعه

پارامتر	گروه شاهد	گروه 1 (تیمار با غلظت 5 mg/Kg)	گروه 2 (تیمار با غلظت 10 mg/Kg)	گروه 3 (تیمار با غلظت 15 mg/Kg)
AST	236/8 ± 56/28	158/6 ± 31/56 <sup>a</sup>	177/6 ± 51/593 <sup>a</sup>	175 ± 55/7
ALT	58/5 ± 9/11	57/17 ± 11/23	61 ± 12/1	45/5 ± 9/327
LDH	1149 ± 395/76	606/2 ± 187/77 <sup>a</sup>	724/4 ± 139/27	1005/5 ± 188/3
ALP	200 ± 67/65	343/3 ± 85/899	255/3 ± 90/972	379/67 ± 202/09

یافته ها به صورت میانگین ± انحراف معیار می باشند. a نشان دهنده تفاوت معنی دار بین هر یک از گروه های تیمار با گروه شاهد در سطح  $P < 0/05$  می باشد. AST: آسپارات آمینو ترانسفراز، ALT: آلانین آمینو ترانسفراز، LDH: لاکتات دهیدروژناز، ALP: آلکالین فسفاتاز

## بحث و نتیجه گیری

نشان داده است که سمیت نانو ذرات به طور معنی داری با خصوصیات نوظهور فیزیکوشیمیایی این مواد ارتباط دارد. این خصوصیات که در مقیاس نانو مطرح می شود با تغییر شیمی و فیزیک این ذرات موجب بروز رفتارهای جدید شده و منجر به عملکرد متفاوت این ذرات در سیستم های بیولوژیکی می گردد. می توان انتظار داشت که سایز کوچک نانو ذرات نقش مهمی در سمیت این مواد داشته باشد. خصوصاً اگر اندازه این ذرات ( $< 100\text{nm}$ ) با سایر اجزاء بیولوژیکی بدن انسان مانند گلبول های قرمز ( $700\text{ nm}$ ) مورد مقایسه قرار گیرد. نانو ذرات این توانایی را دارند که با عبور از غشای سلولی و ورود به سلول مستقیماً باعث آسیب سلولی شود (15). نتایج به دست آمده از بررسی تأثیر تزریق داخل صفاقی نانو ذرات مولیبدن نشان می دهد که هیچ گونه علائم بیماری ظاهری و مرگ و میر در دوزهای مصرف شده مشاهده نگردید و هم چنین آنزیم AST در دو گروه 5 و 10 mg/Kg/BW نسبت به گروه شاهد کاهش معنی داری را نشان داد ( $P < 0/05$ ). آنزیم LDH

اطلاعات محدودی وجود دارد که بیان می کند حدود 25-20 درصد از دوز خوراکی مولیبدن از طریق ادرار دفع می شود. ترکیبات محلول در آب مولیبدن به آسانی از طریق ریه، معده و روده جذب می شود اما ترکیبات نامحلول بدین صورت نمی باشد. مولیبدن بعد از جذب شدن در سراسر بدن در مقادیر بالا و عمدتاً در کبد، کلیه ها، طحال و استخوان توزیع می شود. قسمت اعظم مولیبدن یافت شده در کبد در غشای خارجی میتوکندری تجمع می یابد که در آن به عنوان کوفاکتور در دسترس واکنش های آنزیمی قرار می گیرد. اشکال شیمیایی و فیزیکی مولیبدن، چگونگی مواجهه با آن و ترکیبات موجود در رژیم غذایی نظیر مس و گوگرد می تواند سمیت مولیبدن را تحت تأثیر قرار دهد. مکانیسم سمیت آن هنوز ناشناخته است اما فرض شده است که فاکتور اولیه تشکیل کمپلکس تتراتیومولیدات در محیط احیاگر مجرای معده ای-روده ای، موجب کاهش خواص بیولوژیکی مس می گردد (8). تحقیقات اولیه سم شناسی

عملکرد کبد نیز نشان داد که مقادیر ALT, AST, ALP و LDH در موش هایی که در معرض میکرو ذرات روی بودند و هم چنین مقادیر ALT, ALP و LDH در موش هایی که در معرض نانوذرات روی بودند نسبت به گروه شاهد افزایش معنی دار نشان داده است ( $P < 0/05$ ) که بیان گر آسیب کبدی توسط نانوذرات مورد مطالعه می باشد (2). جیانگسو و همکاران (2007) با بررسی سمیت حاد نانو ذرات تیتانیم دی اکسید ( $\text{TiO}_2$ ) و توزیع زیستی این نانو ذرات با ابعاد مختلف (25 و 80 نانومتر) در موش بالغ دریافتند که با وارد ساختن این مواد به مقدار  $5 \text{ g/Kg/BW}$  به صورت سوسپانسیون از طریق لوله گوارشی طی دو هفته، ذرات تیتانیم دی اکسید سمیت حادی نشان نداد. تغییرات پارامترهای بیوشیمیایی سرم (LDH, ALT/AST) و آسیب شناسی کبد بیان گر این بود که این ذرات موجب ایجاد جراحات کبدی بعد از در معرض قرار گرفتن موش ها گردید. تغییر معنی داری در LDH و  $\alpha\text{-HBDH}$  سرم در گروه ذرات 25 و 80 نانومتر در مقایسه با گروه شاهد بوده که نشان گر آسیب های میوکاردیال است (7). ز لانگ ینگ و همکاران (2007) در بررسی اثرات مقادیر مختلف نانوذرات کروم در رشد، ترکیب بدن، بافت و هورمون های سرمی در رت های اسپراگ داوولی طی یک دوره مطالعه شش هفته ای مشاهده کردند که توده بدون چربی بدن (LBM) زمانی که دوز 300 و 450 ppb از نانوذرات کروم استفاده شد به طور معناداری افزایش یافت ( $P < 0/05$ ). دوزهای مصرفی 150, 300, 450, 600 نانوذرات کروم به طور معنی دار با کاهش میزان چربی بدن ( $P < 0/05$ ) همراه بود. به علاوه دوزهای 300, 450 نانوذرات کروم به طور معنی دار سطح انسولین سرمی را کاهش داد ( $P < 0/05$ ) (17). هم چنین یافته های حمزه ای و همکاران (2013) در بررسی تزریق نانوذرات نقره بر سطوح پلاسمایی آنزیم های کبدی ALT, AST,

نیز گروه یک نسبت به گروه شاهد کاهش معنی دار نشان داد ( $P < 0/05$ ) ولی در مورد آنزیم های ALP و ALT اختلاف معنی داری مشاهده نگردید. آنزیم ALT برای کبد اختصاصی بوده و آسیب سلول های کبدی باعث افزایش سطح سرمی این آنزیم می گردد. به علاوه انسداد مجاری صفراوی باعث افزایش غلظت سرمی آنزیم ALP می گردد. هم چنین افزایش غلظت سرمی ALT و AST ممکن است به دلیل افزایش آنابولیسم و یا کاهش کاتابولیسم آن ها باشد (4). به علاوه اثر آنتاگونیستی مولیبدن و مس می تواند نتایج را تحت تأثیر قرار دهد لذا احتمال دارد که این اثر بازدارندگی مولیبدن از طریق حذف یون های فلزی ترک کننده اپو آنزیم ها و هم چنین جایگزینی برخی از گروه های پروتئینی که مخلوطی از کمپلکس آنزیم بازدارنده - فلز تشکیل می دهند ایجاد گردد (14). یافته های آنزیم شناسی کولین استراز، آلکالین فسفاتاز، گلوکز 6 فسفاتاز، اسید فسفاتاز و لیپاز به دست آمده از کلیه موش که در مطالعه رانا و همکاران (1981) در تیمار با مولیبدن، مس و هم چنین گاوژ هم زمان آن ها (سولفات مس و آمونیوم مولیبدات) گزارش شده است نشان می دهد که مصرف مولیبدن موجب بازدارندگی این آنزیم ها غیر از لیپاز و اسید فسفاتاز می شود. بازدارندگی کامل آلکالین فسفاتاز نیز بعد از مصرف مس بوده است، اما مصرف هم زمان مولیبدن و مس فقط بر کولین استراز اثر بازدارندگی داشته است (14). در سال های اخیر مطالعات فراوانی پیرامون سمیت شناسی نانوذرات مختلف انجام گرفته است. بینگ وانگ و همکاران (2007) در بررسی تاثیر سمیت حاد نانو ذرات و میکرو ذرات روی در موش بالغ با وارد کردن مقدار  $5 \text{ g/Kg/BW}$  از طریق لوله گوارشی (روده - معده) و مطالعات بافت شناسی و خون شناسی بعد از طی دو هفته، دریافتند که در روزهای آغازین علائمی نظیر اسهال، استفراغ و خواب آلودگی ایجاد شد. تست سرمی

داخل صفاقی در غلظت های 25، 50، 100 و 200 نانوذرات اکسید روی به مدت یک هفته را افزایش معنی دار گزارش نمود(6). نتایج حاصل از این مطالعه به-طور کلی نشان می دهد که نانوذرات مولیبدن در دوزهای پایین با توجه به اثر آنتاگونیستی آن با مس سمیت حادی ایجاد نمی کند.

### تشکر و قدردانی

مقاله حاضر حاصل طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات متابولیک دانشگاه علوم پزشکی زنجان می باشد. نویسندگان مقاله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه جهت در اختیار قرار دادن هزینه طرح تحقیقاتی تشکر و قدردانی می نماید.

7. Jiangxue, W., Guoqiang, Z., Chunying, C., Hongwei, Y., Tiancheng, W., Yongmei. (2007). Acute toxicity and misdistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicology Letters*, 168; 176-185.
8. Kapp, R. (1998). *Encyclopedia of Toxicology*. Elsevier Inc, 3; 145.
9. Liu Y.L. (1987). The effect of molybdenum and tungsten supplementations on reproductive hormones of female rats. Thesis of M.Sc. Texas Tech University.
10. Luo, X. M., Wei, H. J., Hu, G. G., Shano, A. L., Liu, Y. Y., Lu, S. M. (1981). Molybdenum and esophageal cancer in china. *Federation Proceedings*, 40; 928.
11. Luo, X.M., Wei, H.J., Yang, S.P. (1983). Inhibitory effects of molybdenum on oesophageal and forestomach carcinogenesis in rats. *Journal of the National Cancer Institute*, 71; 75-80.
12. Mills, C.F., Davis, G.K. (1987). Trace elements in human and animal nutrition. In: Mertz W, ed. Fifth edition. San Diego: Academic Press; 492-430.
13. Pandey, R., Singh, S.P. (2002). Effects of molybdenum on fertility of male rats. *BioMetals*, 15; 65-72.
14. Rana, S.V.S., Kumar, A. (1981). Effect of molybdenum and copper on key enzymes of rat kidney with special reference to physiological antagonism. *Toxicology Letter*, 7; 393-397.

ALP موش صحرایی ماده در غلظت های 5، 10، 20، 40 و 80 نانوذرات نقره به مدت 10 روز نشان داد که اختلاف معنی داری بین گروه های کنترل و گروه های شام وجود نداشته و تنها نانوذرات نقره در غلظت های بالا موجب کاهش معنی دار میزان آنزیم های مورد نظر گردید(1). نتایج گزارش شده توسط نجفی و همکاران(2012) در بررسی تاثیر نانوذرات اکسید آهن بر سطح آنزیم های کبدی ALT, AST, ALP در غلظت های 20، 50 و 150  $\mu\text{g}/\text{kg}$  به مدت 15 روز اختلاف معنی داری را نشان داد ( $P < 0/05$ ) (16). فضیلتی (2013) نتایج به دست آمده مطالعه تاثیر نانوذرات اکسید روی بر آنزیم های کبدی ALT, AST, ALP از طریق تزریق

### منابع

#### منابع

- 1- حمزه ای، ح.، علیزاده، ح.، اجلی، م.، دولتشاهی، ف. 1392. بررسی اثر نانوذرات نقره بر سطوح پلاسمایی آنزیم های کبدی موش صحرایی ماده. فصلنامه فیزیولوژی و تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان. جلد 6، شماره 2. ص 41-48.
2. Bing, W., Wei-Yue, F., Tian-Cheng, W., Guang, J., Meng, W., Jun-Wen, S. (2006). Acute toxicity of nano- and micro-scale zinc powder in healthy adult mice. *Toxicology Letters*, 161; 115-123.
3. Burrell, R. J. W., Roach, W. A., Shadwell, A. (1966). Esophageal cancer in the bantu of the trankei associated with mineral deficiency in garden plants. *Journal of the National Cancer Institute*, 36; 201-209.
4. Christ-Crain, M., Meier, C., Puder, J., Staub, J., Huber P., Keller, U. (2004). Changes in liver function correlate with the improvement of lipid profile after restoration of euthyroidism in patients with subclinical hypothyroidism. *Excil J*, 3; 9.
5. Colvin, V.L. (2003). The potential environmental impacts of engineered nonmaterial. *Nature Biotechnology*, 21; 1166-1170.
6. Fazilati, M. (2013). Investigation toxicity properties of zinc oxide nanoparticles on liver enzymes in male rat. *European Journal of Experimental Biology*, 3(1); 97-103.

**15.** Tolstoshev, A. (2006). Nanotechnology, assessing the environmental risks for australia. Earth Policy Centre. University of Melbourne. Australia.

**16.** Yousefi Babadi, V., Najafi, L., Najafi, A., Gholami, H., Beigi Zarji, M.B., Golzadeh, J. (2012). Evaluation of iron oxide nanoparticles effects on tissue and enzymes of liver in rats.

Journal of pharmaceutical and Biomedical Sciences, 23 (04); 1-5.

**17.** Zha, L. y., Xu, Z.R., Wang, M. Q., Gu, L.Y. (2007). Effects of chromium nanoparticle dosage on growth, body composition, serum hormones and tissue chromium in Sprague-Dawley rats. Journal of Zhejiang University Science B, 8(5); 323-330.

Archive of SID