

Original Paper

Effect of copper oxide nanoparticles on toxicity, enzymatic changes and tissue structure of rat liver

Razieh Karshenas (M.Sc), M.Sc in in Animal Physiology, Payame Noor University of Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0002-0008-7447

*Ali Noori (Ph.D), Corresponding Author, Assistant Professor, Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran. E-mail: ali.noori55@gmail.com ORCID ID: 0000-0003-3083-6602

Fatemeh Shahbazi (Ph.D), Assistant Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Iran. ORCID ID: 0000-0002-4091-0135

Abstract

Background and Objective: Copper oxide nanoparticles, in addition to useful applications, may have adverse effects on the organisms. This study was done to determine the effect of copper oxide nanoparticles on liver toxicity, enzymes changes and liver histological structure of rats.

Methods: In this experimental study, 40 Wistar male rats were randomly allocated into 4 groups. During 10 days, five times (one day interval), 3 groups of rats were received 10, 20 and 30 mg/kg of copper oxide nanoparticles with a diameter of less than 50 nm and purity of 99% and a surface of 80 m²/g intraperitoneally, respectively. One group was considered as the control group. Activity of Lactate dehydrogenase (LDH), Alkaline phosphatase (ALP), Aspartate transaminase (AST) and Alanine aminotransferase (ALT) enzymes were tested in two stages (one day and 15 days after treatment). Also, liver tissue sections were prepared and stained with hematoxylin-eosin.

Results: No significant alterations of AST enzyme activity were not seen between different groups in two stages. The activity of ALT, ALP, and LDH enzymes in the first stage showed a significant increase in all treatment groups compared to control and returned to normal after 15 days. Rat's weight changes were not statistically significant between different groups. Histological studies revealed multiple tissue injuries in dose-dependent in treatment groups which included mild and severe hyperemia, hepatocytes degeneration, hyperplasia and inflammation.

Conclusion: Injection of low doses of copper oxide nanoparticles, after 15 days, although changes in enzyme activity return to normal, but significant disturbances observes in the structure of the liver tissue.

Keywords: Liver, Copper oxide nanoparticles, Toxicity

Received 10 Jul 2019

Revised 11 Aug 2019

Accepted 18 Aug 2019

Cite this article as: Karshenas R, Noori A, Shahbazi F. [Effect of copper oxide nanoparticles on toxicity, enzymatic changes and tissue structure of rat liver]. J Gorgan Univ Med Sci. 2020 Summer; 22(2): 18-25. [Article in Persian]

اثر نانوذرات اکسید مس بر میزان سمیت، تغییرات آنزیمی و ساختار بافتی کبد موش صحرائی

ORCID ID: 0000-0002-0008-7447

راضیه کارشناس، کارشناس ارشد رشته فیزیولوژی جانوری، دانشگاه پیام نور تهران شرق، تهران، ایران.

ORCID ID: 0000-0003-3083-6602

* دکتر علی نوری، استادیار، گروه زیست شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

ORCID ID: 0000-0002-4091-0135

دکتر فاطمه شهبازی، استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: از آنجایی که نانوذرات اکسید مس علاوه بر کاربردهای مفید، ممکن است دارای اثرات سوء بر جانداران باشند؛ این مطالعه به منظور تعیین اثر نانوذرات اکسید مس بر میزان سمیت، تغییرات آنزیمی و ساختار بافتی کبد موش صحرائی انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی ۴۰ سر موش صحرائی نر نژاد ویستار به طور تصادفی در ۴ دسته ۱۰ تایی تقسیم شدند. سپس طی مدت ۱۰ روز، ۵ مرتبه (به صورت یک روز در میان) به ۳ گروه از موش ها ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی گرم بر کیلو گرم نانوذرات اکسید مس با قطر کمتر از ۵۰ نانومتر و خلوص ۹۹ درصد و سطح ۸۰ مترمربع بر گرم به روش درون صفاقی تزریق گردید و یک گروه به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. سپس فعالیت آنزیم‌های لاکتات دهیدروژناز (Lactate dehydrogenase: LDH)، آلکالین فسفاتاز (Alkaline Phosphatase: ALP)، آسپارات ترانس آمیناز (Aspartate transaminase: AST) و آلانین آمینو ترانسفراز (Alanine aminotransferase: ALT) در دو مرحله خونگیری (یک روز و ۱۵ روز پس از تیمار) مورد بررسی قرار گرفت. همچنین مقاطع بافت کبد با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین تهیه و مطالعه گردید.

یافته ها: فعالیت آنزیم AST بین گروه های مختلف در دو مرحله خونگیری تغییر معنی داری نشان نداد. فعالیت آنزیم های ALT، ALP و LDH در اولین خونگیری افزایش معنی داری را در هر سه گروه تیمار نسبت به گروه کنترل نشان داد و پس از ۱۵ روز (دومین خونگیری) به حالت طبیعی بازگشت. تغییرات وزن موش ها بین گروه های مختلف اختلاف آماری معنی داری نداشت. بررسی های بافت شناسی آسیب های بافتی متعدد را به صورت وابسته به دوز در گروه های تیمار نشان داد که شامل پرخونی خفیف و شدید، دژنراسیون هیپاتوسیت ها، هایپرپلازی و التهاب بودند.

نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد که با تزریق دوزهای پایین نانوذرات اکسید مس، پس از گذشت ۱۵ روز، با وجود آن که تغییرات فعالیت آنزیمی به حالت طبیعی بازمی گردد؛ اما همچنان اختلالات قابل توجهی در ساختار بافت کبد مشاهده می شود.

کلید واژه ها: کبد، نانوذرات اکسید مس، سمیت

* نویسنده مسؤول: دکتر علی نوری، پست الکترونیکی ali.noori55@gmail.com

نشانی: اصفهان، فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، گروه زیست شناسی، تلفن ۰۳۱-۲۷۴۲۰۱۳۵-۳۷۴۳۰۱۴۵، نمابر ۳۷۴۳۰۱۴۵

مقاله: ۱۳۹۸/۴/۱۹، اصلاح نهایی: ۱۳۹۸/۵/۲۰، پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۵/۲۷

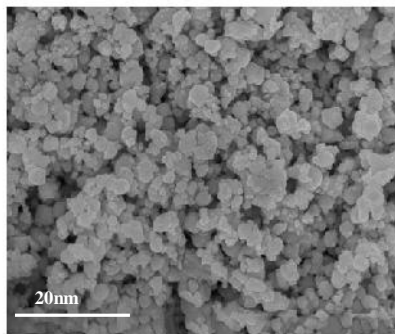
مقدمه

کاربردهای متعدد در زمینه های بیولوژیک نظیر انتقال ژن و دارو هستند (۳). به همین دلیل، بسته به گسترش این نانوذرات در محیط، اثرات مضر و مخرب آن بر روی انسان و سایر جانداران ممکن است افزایش یابد. اثرات سمی نانوذرات تا حد زیادی به آرایش خاص اتم های آن بستگی دارد. به علت سایز کوچک آنها، نانوذرات توانایی عبور از سیستم گردش خون و لنفاوی را دارند و در نتیجه می توانند به بافت ها و اندام های مختلف بدن برسند و موجب تغییرات ساختاری و عملکردی زیادی گردند. به طوری که برخی مطالعات دیستروپی یا تخریب بافت ها را در اثر افزایش نانوذرات مس در موجودات زنده نشان داده اند (۴). در بدن انسان، میزان عنصر مس در حد ۱۰۰ تا ۱۵۰ میلی گرم است که در متابولیسم گلوکز، جذب آهن، فعالیت غده تیروئید، عملکرد مغز و اعصاب و

نانومواد با اندازه های در مقیاس ۱ تا ۱۰۰ نانومتر به دلیل افزایش نسبت سطح به حجم، خواص شیمیایی، مکانیکی، فیزیکی، الکتریکی و مغناطیسی ویژه ای دارا هستند و لذا در زمینه های مختلف کاربرد جدیدی پیدا کرده و کارآیی بسیار بالایی دارند (۱). از جمله این نانومواد، نانوذرات اکسید مس بوده که به عنوان فلز کاتالیست و منتقل کننده حرارت در ابزارهای مختلف و نیمه رساناها مورد استفاده قرار می گیرد (۲). علاوه بر این، نانوذرات مس باعث مهار رشد میکروارگانیسم ها شده و به دلیل خصوصیات آفت کشی در ماسک های صورت، پانسمان زخم و جوراب های طبی از آنها استفاده می شود. همچنین در تهیه انواع روغن ها، پلیمرها، پلاستیک ها و پوشش های فلزی استفاده می شوند و دارای

۲۰±۱۸۰ گرم بودند. حیوانات در شرایط آزمایشگاهی با دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتی گراد و چرخه روشنایی - تاریکی ۱۲ ساعت به منظور سازگاری با محیط نگهداری شدند. خوراک حیوانات کنترل شده بود و از استرس‌های احتمالی مصون بودند. موش‌ها یک هفته قبل از شروع آزمایش به منظور تطابق و سازگاری با محیط آزمایشگاه و رسیدن به وزن موردنظر در لانه حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان نگهداری شدند.

این مطالعه مورد تایید شورای پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان اصفهان قرار گرفت و بر طبق دستورالعمل‌های اخلاقی انجمن بین‌المللی مطالعه درد (International association for study of pain) در مورد حیوانات آزمایشگاهی انجام شد (۱۱). نانوذرات اکسید مس با قطر کمتر از ۵۰ نانومتر، خلوص ۹۹ درصد و سطح ۸۰ مترمربع بر گرم از شرکت نوترینو در تهران (ساخت کشور اسپانیا) تهیه گردید و براساس تصاویر TEM و طیف پراش پرتو X نانوذرات از نظر اندازه و خلوص همگن بودند (شکل یک و جدول یک). غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم در سرم فیزیولوژیک آماده شد (۱۲ و ۱۳). از محدودیت‌های تحقیق حاضر تهیه محلول نسبتاً یکنواخت از نانوذرات اکسید مس بود که برای جلوگیری از ایجاد رسوب نانوذرات و تهیه سوسپانسیون نسبتاً همگن، نمونه‌های آماده شده قبل از تزریق در دستگاه اولتراسونیک FALC-LB5210 ساخت ایتالیا با دمای ۴ درجه سانتی گراد و دامنه ۴۰ درصد برای مدت سی دقیقه قرار گرفتند (۱۳).



شکل ۱: تصویر TEM نانوذرات اکسید مس

جدول ۱: مشخصات نانوذرات اکسید مس

CuO	فرمول مولکولی
جامد	شکل ظاهری
سیاه	رنگ
۱۳۳۶ درجه سانتی گراد	نقطه ذوب
۰/۶۹ گرم بر سانتی متر مکعب	چگالی حجمی
کمتر از ۵۰ نانومتر	اندازه
۹۹ درصد	درجه خلوص
۸۰ مترمربع بر گرم	سطح

آنزیم‌های گوارشی نقش مهمی دارد. به دلیل توزیع گسترده این عنصر در مواد غذایی، معمولاً فقر یا کمبود آن کمتر رخ می‌دهد و میزان آن از طریق متابولیسم شدن در کبد و تخلیه در کلیه تنظیم می‌گردد. اگر میزان مس از حد تحمل انسان بیشتر شود؛ باعث اثرات سمی مانند یرقان، همولیز و در بعضی موارد مرگ خواهد شد (۵). از این رو ممکن است به دلیل کاربرد رو به افزایش نانوذرات مس در زمینه‌های مختلف صنعتی و بیولوژیک، به تدریج تجمع آنها در زنجیره‌های غذایی، بدن جانداران مختلف و انسان افزایش یابد. بنابراین مطالعه در زمینه سمیت نانوذرات اکسید مس و چگونگی اثرات زیستی آنها، امری ضروری است. با توجه به این که کبد (به دلیل داشتن سیستم ریتیکولاندوتلیال گسترده) مهم‌ترین اندامی است که در معرض سموم وارد شده به بدن قرار می‌گیرد؛ لازم است فعالیت آنزیم‌های کبدی و تغییرات بافتی آن در پی تزریق نانوذرات اکسید مس مورد بررسی قرار گیرد (۶). در مطالعات پیشین با کاربرد نانوذرات اکسید مس با ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی مختلف، سمیت کبدی و کلیوی به صورت تغییرات آنزیمی و تخریب بافتی گزارش شده است (۷ و ۸). از آنجایی که خصوصیات نانوذرات و همچنین اثرات سمی آنها به شدت تحت تاثیر قطر، درجه خلوص، ترکیب شیمیایی، دوز تزریقی و طول دوره تیمار قرار دارد؛ لازم است که سمیت کبدی نانوذرات اکسید مس با ویژگی‌های گوناگون از نظر اندازه و نوع ترکیب شیمیایی و به روش‌های مختلف تیمار به صورت خوراکی، تزریق درون رگی یا درون صفاقی مورد توجه قرار گیرد که به احتمال زیاد در برخی از نتایج تغییراتی ایجاد خواهد کرد (۹). در تحقیق حاضر اثرات ۵ بار تزریق درون صفاقی این نانوذرات با فرمول شیمیایی CuO و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی متفاوت نسبت به مطالعات پیشین، در دو دوره یک روزه و ۱۵ روزه پس از تیمار ضمن بررسی اختلالات بافتی کبد مطالعه گردید و با توجه به اهمیت آنزیم‌های لاکتات دهیدروژناز (Lactate dehydrogenase: LDH)، آلکالین فسفاتاز (Alkaline Phosphatase: ALP)، آسپاراتات ترانس آمیناز (Aspartate transaminase: AST) و آلانین آمینو ترانسفراز (Alanine aminotransferase: ALT) به عنوان مهم‌ترین آنزیم‌های موجود در سلول‌های کبدی (۱۰) فعالیت آنها مورد سنجش قرار گرفت.

روش بررسی

این مطالعه تجربی روی ۴۰ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار خریداری شده از دانشگاه علوم پزشکی اصفهان در گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان طی سال ۱۳۹۷ انجام شد.

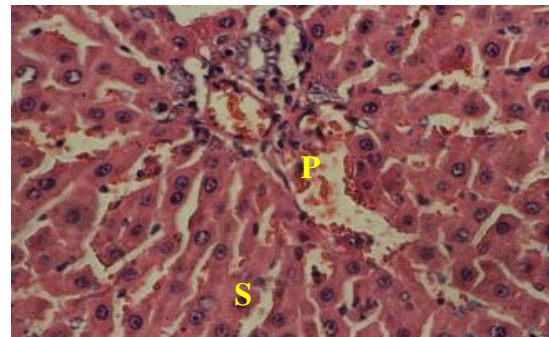
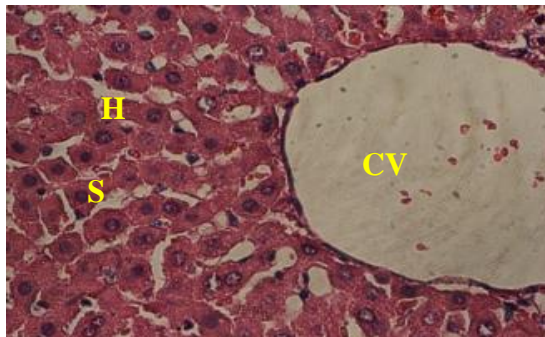
موش‌های صحرایی دارای سن ۱۲۰-۱۱۰ روز با وزن تقریبی

انجام شد. مقاطع بافتی با ضخامت ۴ میکرون توسط میکروتوم دستی (cut 4062 manual، ساخت آلمان) تهیه گردید. به طوری که از هر نمونه سه عدد لام و در مجموع ۳۶ عدد لام تهیه شد. سپس مقاطع به روش هماتوکسیلین-ائوزین رنگ آمیزی شدند و لام‌ها توسط میکروسکوپ نوری Olympus CX22LED مجهز به دوربین Canon Eos 760D 18 ساخت کشور ژاپن توسط نویسنده مسؤول مقاله مورد بررسی دقیق قرار گرفت. مطالعه تغییرات بافتی از هر لام در ۱۰ میدان میکروسکوپی در مقایسه با گروه کنترل انجام گردید. نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف تعیین شد. با توجه به برابری حجم نمونه‌ها و همگنی واریانس‌ها، میانگین فعالیت آنزیم‌های کبدی بین گروه‌های تیمار و کنترل در هر مرحله خونگیری توسط آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) مورد مقایسه قرار گرفت و با استفاده از تست دانکن اختلاف معنی‌دار بین این گروه‌ها توسط نرم‌افزار آماری SPSS-22 بررسی گردید. همچنین میانگین فعالیت آنزیم‌ها در هر گروه بین مرحله اول و دوم خونگیری توسط آزمون t زوج شده بررسی گردید. سطح معنی‌داری آزمون‌ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

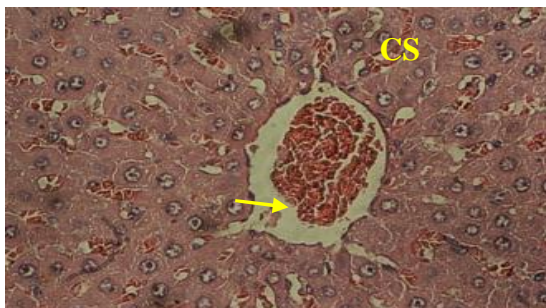
یافته‌ها

تغییرات آنزیمی: فعالیت آنزیم AST بین گروه‌های مختلف در

موش‌ها به صورت تصادفی در ۴ گروه ۱۰ تایی به شرح زیر قرار گرفتند.
به گروه اول به عنوان گروه کنترل طی ۱۰ روز هیچ ماده‌ای تزریق نشد. به گروه‌های ۲، ۳ و ۴ به عنوان گروه مورد تیمار، پنج مرتبه به صورت یک روز در میان (۸) نانوذرات اکسید مس با غلظت ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت درون صفاقی تزریق گردید. با توجه به این که در مطالعات متعدد و مشابه تفاوتی بین نتایج دو گروه کنترل و دارونما دیده نشد؛ در مطالعه حاضر گروه دارونما در نظر گرفته نشد و نتایج گروه‌های تیمار فقط با گروه کنترل مورد مقایسه قرار گرفت (۱۴). ۲۴ ساعت بعد از آخرین تزریق، خونگیری از گوشه چشم و ۱۵ روز بعد از آخرین تزریق خونگیری از قلب انجام گردید (۱۵ و ۱۶). برای انجام مطالعات بیوشیمیایی نمونه‌های خون به مدت ۲۰ دقیقه و با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (مدل Continuos Flow ساخت چین) و سرم آن جداسازی شد. سنجش میزان آنزیم‌های LDH، ALP، AST و ALT با استفاده از کیت‌های شرکت پارس آزمون و با دستگاه اتوآنالایزر (آلفا کلاسیک II اتوآنالایزر، ساخت ایران) انجام شد. پس از دومین خونگیری، ۳ سر موش صحرایی در هر گروه پس از بیهوشی با کتامین تشریح شدند و نمونه‌هایی از کبد آنان در فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفت و ۴۸ ساعت بعد مراحل تهیه بافت بر روی آن



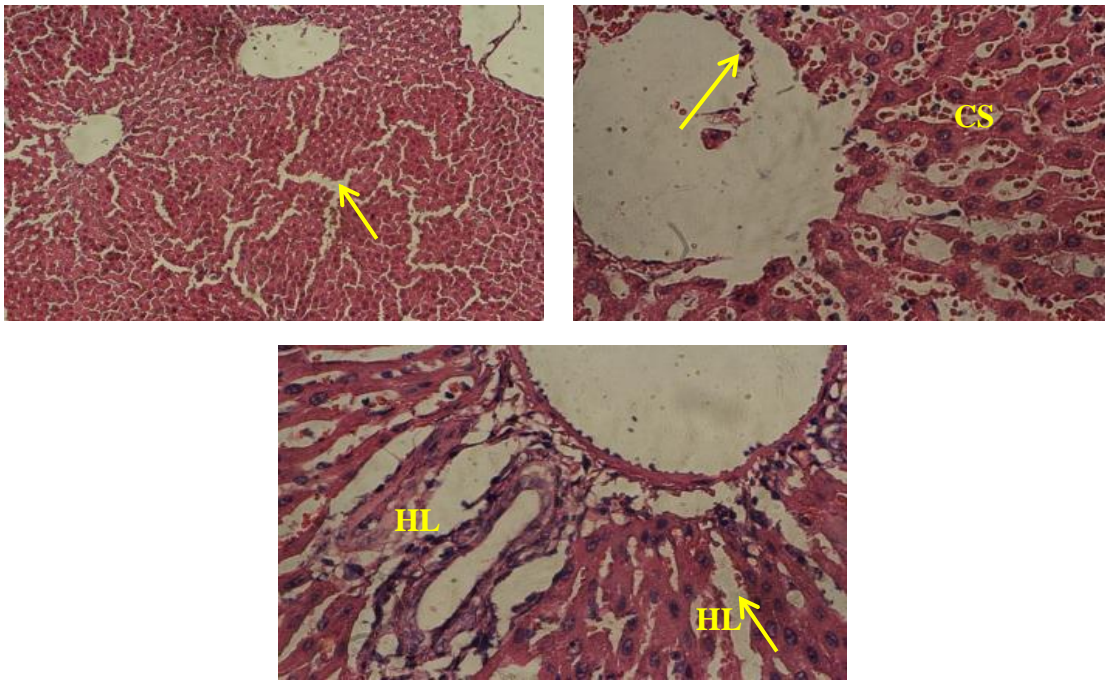
شکل ۲: مقاطع بافت کبد در گروه کنترل، رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، بزرگ‌نمایی ۴۰۰x
CV: سیاهرگ مرکز لوبولی، H: هپاتوسیت‌ها، S: سینوزوئیدها، P: فضای پورت



شکل ۳: مقاطع بافت کبد در گروه تیمار با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذرات اکسید مس
هیپرپلازی طناب‌های هپاتوسیتی و تنگی سینوزوئیدها

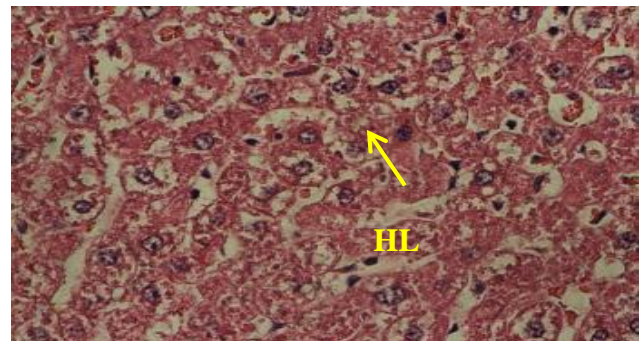
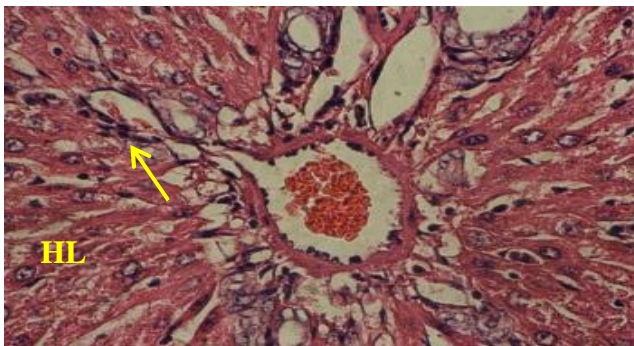
فلش: پرخونی در سیاهرگ مرکز لوبولی، CS: پرخونی در سینوزوئیدها

رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین؛ بزرگ‌نمایی تصویر سمت چپ ۴۰۰x؛ بزرگ‌نمایی تصویر سمت راست ۱۰۰x



شکل ۴: مقاطع بافت کبد در گروه تیمار با غلظت ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم نانوذرات اکسید مس، رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین فلش در تصویر سمت چپ (بزرگ‌نمایی ۱۰۰x): بی‌نظمی و عدم بکنواختی در سینوزوئیدها که طناب‌های هیاتوسیتی را از حالت طبیعی خارج کرده است.

تصویر سمت راست (بزرگ‌نمایی ۴۰۰x): (فلش) لیز شدن و تخریب دیواره سیاهرگ مرکز لوپولی، (CS) پرخونی در سینوزوئیدها
 تصویر پایین (بزرگ‌نمایی ۴۰۰x): (HL) لیز شدن هیاتوسیت‌ها، (فلش) اتساع سینوزوئیدها
 تجمع سلول‌های التهابی نظیر لوکوسیت‌ها، ماکروفاژها و بازوفیل‌ها



شکل ۵: مقاطع بافت کبد در گروه تیمار با غلظت ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم نانوذرات اکسید مس، رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین در تصویر سمت چپ (بزرگ‌نمایی ۴۰۰x): لیز شدن هیاتوسیت‌ها و تجمع شدید سلول‌های التهابی در فضای پورتال
 تصویر سمت راست (بزرگ‌نمایی ۴۰۰x): (HL) لیز شدن شدید هیاتوسیت‌ها و رها شدن هسته آنها، (فلش) عدم وضوح سینوزوئیدها و طناب‌های هیاتوسیتی، واکنش شدن سیتوپلاسم هیاتوسیت‌ها

با کنترل مشاهده نگردید (جدول ۳). نتایج آزمون t زوج شده نیز تفاوت معنی داری ($P < 0.05$) را بین مرحله اول و دوم خونگیری در هر گروه (گروه‌های تیمار) فقط در مورد آنزیم‌های ALT، ALP و LDH نشان داد که دلیلی بر کاهش معنی دار این عوامل در مرحله دوم خونگیری و رسیدن به حالت طبیعی است. تغییرات وزن موش‌ها نیز بین گروه‌های مختلف اختلاف معنی داری نداشت.

تغییرات بافتی: با مطالعه بر روی لام‌های متعدد از بافت کبد در گروه‌های مختلف تیمار و مقایسه با گروه کنترل، اختلالات و

دو زمان خونگیری تغییر معنی داری نشان نداد. در حالی که فعالیت آنزیم‌های ALT ($P < 0.01$)، ALP ($P < 0.01$) و LDH ($P < 0.01$) در اولین مرحله خونگیری افزایش معنی دار را در هر سه گروه تیمار نسبت به کنترل نشان داد (جدول ۲) که وابسته به دوز نبود. همچنین براساس آزمون تعقیبی دانکن میانگین فعالیت هر سه آنزیم بین غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید مس تفاوت معنی دار نداشت. پس از ۱۵ روز (دومین خونگیری) به حالت طبیعی بازگشت. به طوری که در این مرحله اختلاف معنی داری بین گروه‌های تیمار

جدول ۲: مقایسه فعالیت آنزیم‌های کبدی بین گروه‌های تیمار و کنترل در مرحله اول خونگیری (یک روز پس از تزریق نانوذرات اکسید مس)

LDH (U/L)	ALP (U/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)	گروه‌ها
میانگین و انحراف معیار	میانگین و انحراف معیار	میانگین و انحراف معیار	میانگین و انحراف معیار	کنترل
۷۱۹/۲۰±۸۳/۲۱	۴۰۶/۲۰±۵۱/۶۹	۱۲۰/۶۰±۱۰/۳۳	۲۲۹/۸۰±۳۰/۹۸	کنترل
۱۰۲۴/۳۰±۱۶۳/۲۲*	۷۱۵/۸۰±۱۳۰/۰۴**	۱۶۲/۱۰±۳۰/۶۹*	۲۳۳/۴۰±۶۰/۶۵	۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم
۸۸۳/۲۲±۱۳۲/۲۸*	۷۶۰/۸۸±۱۵۴/۰۸**	۱۸۱/۴۴±۲۱/۴۸*	۱۹۶/۱۱±۲۲/۹۳	۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم
۹۵۳/۶۲±۱۸۱/۵۳*	۷۳۵/۲۵±۱۲۳/۳۴**	۱۷۶/۰۰±۳۲/۸۲*	۲۵۷/۲۵±۴۱/۳۶	۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم
<۰/۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۱	>۰/۰۵	p-value
۴/۸۴۹	۹/۵۵۳	۶/۱۸۰	۲/۸۶۳	F

* P<۰/۰۱, ** P<۰/۰۰۱

جدول ۳: مقایسه فعالیت آنزیم‌های کبدی بین گروه‌های تیمار و کنترل در مرحله دوم خونگیری (۱۵ روز پس از تزریق نانوذرات اکسید مس)

LDH (U/L)	ALP (U/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)	گروه‌ها
میانگین و انحراف معیار	میانگین و انحراف معیار	میانگین و انحراف معیار	میانگین و انحراف معیار	کنترل
۶۴۸/۰۰±۹۶/۰۲	۴۱۲/۲۰±۷۲/۰۲	۱۰۸/۲۰±۹/۸۵	۲۰۲/۶۰±۶/۵۸	کنترل
۷۵۲/۶۰±۸۴/۰۵	۳۷۷/۱۰±۷۵/۴۸	۱۰۴/۵۰±۱۶/۲۷	۱۹۴/۲۰±۲۸/۰۷	۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم
۷۷۲/۱۴±۹۹/۲۳	۳۵۹/۰۰±۹۸/۴۹	۱۰۷/۱۴±۲۴/۷۴	۲۱۳/۷۱±۳۸/۲۸	۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم
۶۹۵/۸۷±۱۳۱/۳۰	۳۰۴/۱۲±۵۶/۰۰	۱۰۶/۶۲±۱۶/۲۰	۲۱۱/۳۷±۶۷/۸۵	۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم
>۰/۰۵	>۰/۰۵	>۰/۰۵	>۰/۰۵	p-value
۱/۸۴۳	۲/۳۶۴	۰/۰۵۹	۰/۳۶۸	F

نانوذرات مس به روش درون عضلانی به مدت سه روز سبب تجمع آنها در سیتوپلاسم سلول‌های کوبفر و هپاتوسیت‌های کبد گردید که پس از گذشت ۷ روز از تیمار، تجمع نانوذرات ناپدید شد؛ اما علایم دژنراسیون هیدروپیک در هپاتوسیت‌ها مشاهده گردید (۱۷). در مطالعه ما به احتمال بسیار زیاد، ۵ بار تزریق درون صفاقی نانوذرات اکسید مس با دوزهای بالاتر، تجمع آنها را در بخش‌های مختلف کبد به همراه داشته است و ضمن برقراری تماس در سطح وسیعی با غشاهای سلولی و اندامک‌های مختلف، سبب تخریب آنها شده است (۱۸) که نشأت آنزیم‌های کبدی را از هپاتوسیت‌ها به جریان خون به همراه دارد. از طرفی مشابه نتایج Sizova و همکاران (۱۷) ممکن است به دلیل دفع تدریجی نانوذرات اکسید مس از کبد پس از ۱۵ روز، میزان فعالیت آنزیم‌های کبدی در سرم خون کاهش یافته و به حد طبیعی بازگشته است. در گزارش مشابهی، پرخونی و انسداد در سیاهرگ مرکز لوبولی و رگ‌های پورتال کبدی و ناپدید شدن ساختار لوبولی هگزگونال در بافت کبد همراه با افزایش سطح فعالیت آنزیم‌های کبدی در اثر تزریق نانوذرات اکسید مس (با قطر ۱۰ تا ۱۵ نانومتر) تا ۱۴ روز پس از تیمار به صورت وابسته به دوز (دوزهای ۵، ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) مشاهده گردید (۱۲) که با نتایج مطالعه حاضر (عدم وضوح سینوزوئیدها و طناب‌های هپاتوسیتی به ویژه در بالاترین دوز یعنی ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) مطابقت دارد؛ اما تفاوت با آن، سطح فعالیت آنزیم‌های کبدی در مطالعه حاضر ۱۵ روز پس از تیمار به حالت طبیعی رسید. از دلایل دیگر ایجاد اختلال در ساختار بافت کبد و لیز شدن هپاتوسیت‌ها در تحقیق حاضر، ممکن است پدیده آپوپتوز سلولی در کبد بوده که

تغییرات معنی‌دار و قابل توجهی مشاهده گردید. این تغییرات شامل پرخونی سینوزوئیدها و سیاهرگ‌های مرکز لوبولی، اتساع سینوزوئیدها، تورم و بدشکلی هپاتوسیت‌ها، لیز شدن هپاتوسیت‌ها و تجمع سلول‌های التهابی بود که در شکل‌های ۲ تا ۵ مشاهده می‌گردد. لازم به ذکر است شدت و نوع اختلالات در اکثر لام‌های یک گروه بسیار مشابه بود.

به طور کلی اختلالات بافت کبد در اثر ۵ بار تزریق درون صفاقی نانوذرات اکسید مس و با گذشت زمان ۱۵ روز از آخرین تزریق به طور معنی‌دار و قابل توجهی در تمام دوزها دیده شد. این تغییرات و ناهنجاری‌ها از نظر کمی و کیفی به صورت وابسته به دوز افزایش نشان داد و بیشترین تغییرات بافتی در دوز ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده گردید.

بحث

در این مطالعه، ۵ بار تزریق درون صفاقی نانوذرات اکسید مس گرچه تغییر معنی‌داری در فعالیت آنزیم AST ایجاد نکرد؛ اما فعالیت سایر آنزیم‌های کبدی نظیر ALT، ALP و LDH در گروه‌های تیمار را نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش داد و با گذشت ۱۵ روز از آخرین تزریق، فعالیت این آنزیم‌ها نیز به حالت طبیعی بازگشت. مطالعات هیستوپاتولوژیک کبد در روز ۱۵ام پس از تیمار اختلالاتی نظیر پرخونی و اتساع سینوزوئیدها، پرخونی و تخریب سیاهرگ مرکز لوبولی، دژنره شدن طناب‌های هپاتوسیتی و واکنش شدن و لیز شدن هپاتوسیت‌ها را به صورت وابسته به دوز نشان داد. به طوری که بیشترین اختلالات مربوط به دوز ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود. در مطالعه‌ای تزریق ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم

مختلف، استفاده از نانوذرات اکسید مس با ویژگی‌های گوناگون (از نظر قطر، ترکیب شیمیایی و میزان سطح) باشد که با غلظت‌ها و دفعات متفاوتی توسط محققین مختلف تزریق شده است. هرچند که روش کاربرد نانوذرات (درون صفاقی، درون رگی، درون نایی و خوراکی) نیز بر نتایج پژوهش موثر است (۲۷).

پیشنهاد می‌گردد مطالعات متعدد دیگری در دوره‌های زمانی طولانی‌تر با نانوذراتی با انحلال‌پذیری پایدارتر انجام گردد و از آنجایی که برخی از افراد نظیر کارکنان صنایع مربوط به نانو تکنولوژی ممکن است در معرض مقادیر بیشتر نانوذرات اکسید مس قرار گیرند؛ توصیه می‌شود سمیت دوزهای بالاتر این نانوذرات با ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی مشخص نیز بررسی گردد. همچنین برای حصول اطمینان بیشتر از نتایج، انجام تحقیقات تکمیلی با بررسی دقیق فشارهای اکسیداتیو و مطالعات بافتی دقیق‌تر با استفاده از روش‌های رنگ آمیزی اختصاصی و میکروسکوپ الکترونی پیشنهاد می‌گردد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این مطالعه، به نظر می‌رسد برخلاف اثرات نسبتاً شدید نانوذرات اکسید مس بر سطح فعالیت آنزیمی کبد پس از یک روز از تیمار و ایجاد اختلالات شدید بافتی پس از ۱۵ روز، باتوجه به عدم تغییر وزن و مرگ و میر حیوانات در طول آزمایش و احتمالاً فعالیت طبیعی کبد در روز ۱۵ام، ممکن است با گذشت زمان بیشتر، اختلالات بافتی نیز برطرف گردند. لذا احتمالاً نتایج این تحقیق نشان‌دهنده برطرف شدن تدریجی سمیت کبدی حاصل از تزریق نانوذرات مس بوده که می‌تواند در کاربردهای بیولوژیک و پزشکی این نانوذرات مفید باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل پایان‌نامه (شماره ۲۴۶۱۴۱۵) خانم راضیه کارشناس برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته فیزیولوژی جانوری از دانشگاه پیام نور تهران شرق بود. بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان که در انجام این مطالعه ما را یاری نمودند؛ نهایت سپاس خود را اعلام می‌داریم.

References

1. Chang YN, Zhang M, Xia L, Zhang J, Xing G. The Toxic Effects and Mechanisms of CuO and ZnO Nanoparticles. *Materials* (Basel). 2012 Dec; 5(12): 2850-71. DOI: 10.3390/ma5122850
2. De Jong WH, Hagens WI, Krystek P, Burger MC, Sips AJ, Geertsma RE. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials*. 2008 Apr; 29(12): 1912-19. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.12.037
3. Borkow G, Gabbay J, Dardik R, Eidelman AI, Lavie Y, Grunfeld Y, et al. Molecular mechanisms of enhanced wound healing by copper oxide-impregnated dressings. *Wound Repair Regen*. 2010 Mar-Apr; 18(2): 266-75. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2010.00573.x
4. Donaldson K, Tran L, Jimenez LA, Duffin R, Newby DE, Mills

در اثر تجمع نانوذرات اکسید مس رخ داده است (۱۷). همچنین برخی محققین اثرات ژنوتوکسیک و آلرژیک نانوذرات اکسید مس (۱۸ و ۱۹) و تخریب DNA ناشی از ایجاد فشارهای اکسیداتیو را اثبات کرده‌اند (۲۰). در تحقیقات دیگری نیز سمیت کبدی، کلیوی و ریوی نانوذرات اکسید مس با اندازه‌های مختلف مشاهده شده است (۱۸ و ۲۱). یکی از مکانیسم‌های مشترک که نانوذرات از طریق آن سبب سمیت می‌شوند؛ تولید رادیکال‌های آزاد و ایجاد فشارهای اکسیداتیو است (۲۲). در رابطه با اثر نانوذرات اکسید مس هم ثابت گردید که تیمار سلول‌ها با این نانوذرات فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را کاهش داده و فعالیت آنزیم‌هایی نظیر گلوکاتایون پراکسیداز را افزایش می‌دهد. افزایش این آنزیم نشان‌دهنده افزایش استرس اکسیداتیو است. ضمن آن که سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی در سلول ضعیف‌تر می‌گردد (۲۳). تولید رادیکال‌های آزاد به‌ویژه اکسیژن نیز می‌تواند سبب پراکسیداسیون لیپیدهای غشا شده و منجر به تخریب آن گردد (۲۴ و ۲۵) که ممکن است از علل دیگر تخریب بافت کبد در مطالعه حاضر باشد. همچنین برخی پژوهش‌ها نشان داده‌اند که یکی از دلایل لیز شدن هپاتوسیت‌ها و اتساع سینوزوئیدی، پدیده آمیلوئیدی شدن است که به علت رسوب موقت مواد فیبری در دوره التهاب در دیواره سینوزوئیدها، سبب تخریب هپاتوسیت‌ها می‌گردد. این پدیده همراه با تراکم مواد بی‌شکل اتوزینوفیلی در اطراف هپاتوسیت‌ها است که باعث جدایی هپاتوسیت‌ها از فضای سینوزوئیدی می‌شود؛ اما معمولاً عملکرد کبد در چنین شرایطی طبیعی است (۲۶) که علاوه بر دفع تدریجی نانوذرات از کبد، ممکن است یکی دیگر از دلایل عدم تغییر فعالیت آنزیم‌های کبدی در روز ۱۵ام پس از تیمار، در مطالعه حاضر باشد. در مطالعه ما، حتی دوزهای پایین نانوذرات اکسید مس (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های کبدی گردید و اختلالات بافتی را تا ۱۵ روز پس از تیمار به همراه داشت؛ اما برخلاف مطالعات پیشین (۲۶-۲۴)، فعالیت آنزیم AST تغییر نکرد و سطح فعالیت سایر آنزیم‌ها نیز پس از ۱۵ روز به حالت عادی بازگشت. ممکن است علت تفاوت برخی نتایج در تحقیقات

- N, MacNee W, Stone V. Combustion-derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure. *Part Fibre Toxicol*. 2005 Oct; 2: 10. DOI: 10.1186/1743-8977-2-10
5. Galhardi CM, Diniz YS, Rodrigues HG, Faine LA, Burneiko RC, Ribas BO, Novelli EL. Beneficial effects of dietary copper supplementation on serum lipids and antioxidant defenses in rats. *Ann Nutr Metab*. 2005 Sep-Oct; 49(5): 283-88. DOI: 10.1159/000087294
6. Ramos AS, Correia AT, Antunes SC, Gonçalves F, Nunes B. Effect of acetaminophen exposure in *Oncorhynchus mykiss* gills and liver: detoxification mechanisms, oxidative defence system and peroxidative damage. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2014 May; 37(3): 1221-28. DOI: 10.1016/j.etap.2014.04.005

7. 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 May; 163(2): 109-20. DOI: 10.1016/j.toxlet.2005.10.003
8. Lei R, Wu C, Yang B, Ma H, Shi C, Wang Q, et al. Integrated metabolomic analysis of the nano-sized copper particle-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats: a rapid in vivo screening method for nanotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008 Oct; 232(2): 292-301. DOI: 10.1016/j.taap.2008.06.026
9. Manke A, Wang L, Rojanasakul Y. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *Biomed Res Int.* 2013; 2013: 942916. DOI: 10.1155/2013/942916
10. Fernando S, Wijewickrama A, Gomes L, Punchihewa CT, Madusanka SD, Dissanayake H, et al. Patterns and causes of liver involvement in acute dengue infection. *BMC Infect Dis.* 2016 Jul; 16: 319. DOI: 10.1186/s12879-016-1656-2
11. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain.* 1983 Jun; 16(2): 109-10. DOI: 10.1016/0304-3959(83)90201-4
12. Doudi M, Setorki M. Acute effect of nano-copper on liver tissue and function in rat. *Nanomed J.* 2014; 1(5): 331-38. DOI: 10.7508/NMJ.2015.05.007
13. Genan A Al Bairuty, Mohammad N Taha. Effects of copper nanoparticles on reproductive organs of male albino rats. *International Journal for Sciences and Technology.* 2016; 11(3): 17-24.
14. Kalirawana TC, Sharma P, Joshi SC. Reproductive Toxicity of Copper Nanoparticles in Male Albino Rats. *Int J Pharma Res Health Sci.* 2018; 6(1): 2258-63. DOI:10.21276/ijprhs.2018.01.29
15. Zolghadri Jahromi S, Rezaeizadeh M. [The Effect of iron nanoparticles on ovarian histopathological changes in rats treated with isoniazid]. *Empirical Animal Biology Journal.* 2018; 6(3): 39-48. [Article in Persian]
16. Liu G, Li X, Qin B, Xing D, Guo Y, Fan R. Investigation of the mending effect and mechanism of copper nanoparticles on a tribologically stressed surface. *Tribology Letters.* 2004; 17(4): 961-66.
17. Sizova EA, Miroshnikov S, Polyakova V, Gluschenko N, Skalny A. Copper nanoparticles as modulators of apoptosis and structural changes in tissues. *J Biomater Nanobiotechnol.* 2012; 3: 97-104. DOI: 10.4236/jbnb.2012.31013
18. Magaye R, Zhao J, Bowman L, Ding M. Genotoxicity and carcinogenicity of cobalt-, nickel- and copper-based nanoparticles. *Exp Ther Med.* 2012 Oct; 4(4): 551-61. DOI: 10.3892/etm.2012.656
19. Singh N, Manshian B, Jenkins GJ, Griffiths SM, Williams PM, Maffei TG, et al. NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials.* 2009 Aug; 30(23-24): 3891-914. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.04.009
20. Murray AR, Kisin E, Leonard SS, Young SH, Kommineni C, Kagan VE, Castranova V, et al. Oxidative stress and inflammatory response in dermal toxicity of single-walled carbon nanotubes. *Toxicology.* 2009 Mar; 257(3): 161-71. DOI: 10.1016/j.tox.2008.12.023
21. Yokohira M, Hashimoto N, Yamakawa K, Suzuki S, Saoo K, Kuno T. Lung Carcinogenic Bioassay of CuO and TiO2 Nanoparticles with Intratracheal Instillation Using F344 Male Rats. *J Toxicol Pathol.* 2009 Mar; 22(1): 71-78. DOI: 10.1293/tox.22.71
22. Seyedalipour B, Arefifar A, Khanbabaee R, Hoseini S M. [Toxicity investigating of silver nanoparticles on ALT, AST, ALP and histopathological changes in NMRI mice]. *J Mazandaran Univ Med Sci.* 2015; 25(124): 183-93. [Article in Persian]
23. Fahmy B, Cormier SA. Copper oxide nanoparticles induce oxidative stress and cytotoxicity in airway epithelial cells. *Toxicol In Vitro.* 2009 Oct; 23(7):1365-71. DOI: 10.1016/j.tiv.2009.08.005
24. 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 Mar; 27(2): 731-38. DOI: 10.1016/j.tiv.2012.12.001
25. Gaiser BK, Hirn S, Kermanizadeh A, Kanase N, Fytianos K, Wenk A, et al. Effects of silver nanoparticles on the liver and hepatocytes in vitro. *Toxicol Sci.* 2013 Feb; 131(2): 537-47. DOI: 10.1093/toxsci/kfs306
26. García-Niño WR, Pedraza-Chaverrí J. Protective effect of curcumin against heavy metals-induced liver damage. *Food Chem Toxicol.* 2014 Jul; 69: 182-201. DOI: 10.1016/j.fct.2014.04.016
27. Shin SW, Song IH, Um SH. Role of Physicochemical Properties in Nanoparticle Toxicity. *Nanomaterials (Basel).* 2015 Sep; 5(3): 1351-65. DOI: 10.3390/nano5031351