

مطالعه بافت‌شناسی شش در جنین موش نژاد NMRI بعد از مواجهه با نانو اکسید آهن در

شرایط *in vitro*

مرجان صادقیان^۱، پروین خدارحمی^{۲*}، نسیم حیاتی رودباری^۳، کاظم پریور^۴

خلاصه

مقدمه: نانوذرات اکسید آهن در زمینه‌های مرتبط با فناوری نانو از جمله زیست محیطی، ذخیره‌سازی مغناطیسی، تصویربرداری و اهداف دارویی مورد استفاده هستند. نانوذرات آهن می‌توانند گونه‌های اکسیژن فعال را تولید کنند که این مواد قادر به عبور از جفت هستند. هدف ما در این مطالعه بررسی اثر سمیت نانوذرات اکسید آهن بر روی ریه جنین موش است.

روش: در شرایط *in vitro* در روز ۱۴ بارداری ریه جنین‌ها خارج و در محیط کشت در ۵ گروه کنترل، گروه شم و گروه‌های تجربی ۱، ۲ و ۳ (دوزهای ۱۰، ۳۰ و ۵۰ میکروگرم/کیلوگرم نانو اکسید آهن) تیمار شدند و سپس به مدت ۲۴ ساعت به درون انکوباتور نگهداری شدند. برای بررسی هیستوپاتولوژی، بافت ریه با روش هماتوکسیلین و اتوزین رنگ آمیزی شد و نتایج مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: میانگین تعداد برونشیول‌ها و قطر رگ‌های خونی ریه جنین در نمونه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل و شم تغییر معنی‌داری نداشت. میانگین تعداد رگ‌های خونی در گروه تجربی ۱ و ۲ نسبت به گروه کنترل و شم تغییر معنی‌داری را نشان نداد، در حالی که در گروه تجربی ۳ کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل و شم نشان داد ($P < 0/05$). هیستوپاتولوژی ریه جنین سمیت سلولی شامل دژنراسانس واکوئولی و نکروز را در مقایسه با گروه کنترل و شم نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که در شرایط *in vitro* نانو اکسید آهن باعث کاهش تعداد رگ‌های خونی، افزایش سمیت سلولی شامل دژنره شدن واکوئولی و نکروز در بافت ریه جنین به صورت وابسته به دوز می‌شود. این نتایج می‌تواند زمینه‌ای برای بررسی به روش *In vivo* باشد.

واژه‌های کلیدی: نانو اکسید آهن، جنین، شش، سمیت سلولی

۱- کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران ۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران ۳- استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران ۴- استاد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران

* نویسنده مسؤل، آدرس پست الکترونیک: khodarahmiparvin@yahoo.com

دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۱۰/۲۱ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۱۱/۶ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۴/۲۰

مقدمه

امروزه نانوذرات اکسید آهن به طور قابل ملاحظه‌ای در فناوری نانو مورد استفاده قرار می‌گیرند. پیشرفت‌های اخیر نشان داده است که نانوذرات اکسید آهن به دلیل ویژگی فوق العاده مغناطیسی و توانایی بالای کاتالیزوری برای برنامه‌های کاربردی در زمینه‌های مرتبط با فناوری نانو از جمله زیست محیطی، ذخیره‌سازی مغناطیسی، تصویربرداری، پزشکی، اهداف دارویی مورد توجه هستند (۱). بسیاری از خصوصیات ذاتی نانو مواد که موجب به کار بردن آنها در نانو تکنولوژی می‌شود مربوط به سطح آنها است (۲،۳). سمیت مواد نانو اغلب مربوط به اندازه کوچک آنها می‌باشد زیرا موجب می‌شود که آنها خیلی سریع‌تر به وسیله بدن انسان جذب شوند و به راحتی از غشای زیستی عبور کرده و به سلول‌ها، بافت‌ها و اندام‌ها برسند (۴).

نانوذرات فلزی مانند آهن می‌توانند گونه‌های اکسیژن فعال (Ros) را به عنوان کاتالیزور در واکنش تولید کنند. ذرات با اندازه کوچکتر تعداد بیشتری گونه‌های اکسیژن فعال تولید می‌کنند که می‌تواند باعث تولید رادیکال‌های آزاد شده و در نهایت منجر به مکانیسم‌های سمیت نانو ذرات که ممکن است موجب استرس اکسیداتیو، التهاب و در نتیجه آسیب به پروتئین‌ها، غشا و DNA شود (۵). به علاوه، نانوذرات کوچک قادر به ورود به میتو کندری، ایجاد آسیب فیزیکی و شرکت در استرس اکسیداتیو هستند (۶). در طی تحقیقات دیگر مشخص شده که گونه‌های اکسیژن فعال القا شده توسط ذرات فلزی گذرا مثل آهن می‌توانند پراکسیداسیون لیپید را تحریک کرده و سپس منجر به التهاب و پلاک‌های آتروماتوز (atheromatous) شوند که ممکن است منجر به شکل‌گیری فیبرینوژن و افزایش ویسکوزیته رگ‌ها شود (۷). مطالعات تجربی و

اپیدمیولوژیکی نشان می‌دهد که بسیاری از بیماری‌های قلبی و عروقی و تنفسی مانند سرطان ریه، تصلب شرائین و انفارکتوس و التهاب ریه با نانو ذرات در ارتباط هستند (۸). نانوذرات اکسید آهن به دو طریق مستقیم و غیرمستقیم بر روی جنین اثر می‌گذارند. اثر مستقیم از طریق انتقال ذرات از شش به جریان خون و رسیدن به جفت و اثر غیرمستقیم از طریق ایجاد التهاب تنفسی در مادر و نهایتاً اثر روی جنین می‌باشد (۹).

ریه و دستگاه گوارش مناطق مهمی برای ورود نانوذرات طبیعی یا دست‌ساز انسان می‌باشند. به واسطه‌ی اندازه‌ی کوچک، مواد نانو می‌توانند از محل ورودشان به سیستم لنفاوی و گردش خون وارد شوند و سرانجام به بافت‌ها و اعضای بدن بروند. بعضی از مواد نانو، بر حسب اندازه و ترکیب خود، می‌توانند آسیب غیر قابل برگشتی به سلول‌ها از طریق استرس اکسیداتیو یا صدمه به اعضا وارد کنند (۸). نانوذرات بعد از استنشاق به مسیر تنفسی وارد می‌شوند و از بینی به حلق و سپس به ریه‌ها می‌روند (۱۰). مژک‌های سلول‌های اپیتلیال برونشیول، پوشش لایه‌ی مخاطی را که شامل ذرات هم می‌شود، حرکت می‌دهد. نانوذراتی که از ریه توسط مژک‌ها پاک شده‌اند وارد مسیر معده‌ای می‌شوند (۱۱)، اما ذرات کوچکتر از ۱۰ میکرون می‌توانند به مسیرهای هوایی پایین‌تر برسند (۱۲). پاکسازی ذرات از آلونول‌های ریوی در ابتدا از طریق فاگوسیتوز ماکروفاژ رخ می‌دهد. ذرات در اندازه نانو منطقه سطحی بزرگ و فعالیت بیولوژیکی بالایی دارند که ممکن است ناحیه سطح اپیتلیال در ریه را تحت تأثیر قرار می‌دهند و در نتیجه در راه‌های هوایی پایین‌تر و مناطق آلوئولار بیشتر رسوب کنند (۱۳). شواهد نشان می‌دهد که نانوذرات به راحتی می‌توانند از غشای سلولی منتقل شوند، از فاگوسیت

می‌شد. قفس موش‌های نر از ماده‌ها جدا بوده و پس از جفت‌گیری، موش نر جفت‌گیری کرده از سایر موش‌های نر جدا نگهداری می‌شد. آمیزش منجر به ایجاد درپوش واژنی (VP: Vaginal Plug) می‌شد. زمان مشاهده VP یا اسپرم روز صفر حاملگی در نظر گرفته می‌شد.

در این تحقیق، موش‌ها به ۵ گروه تقسیم شدند. گروه کنترل (بدون تأثیر نانو اکسید آهن)، گروه شم (با تزریق حلال نانو اکسید آهن، آب مقطر)، گروه تجربی ۱: نانو اکسید آهن با غلظت ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم، گروه تجربی ۲: نانو اکسید آهن با غلظت ۳۰ میکروگرم بر کیلوگرم، گروه تجربی ۳: نانو اکسید آهن با غلظت ۵۰ میکروگرم بر کیلوگرم. تعداد جنین بررسی شده در هر دوز ۱۰ جنین بود. در این مطالعه تمامی نکات پروتکل بین‌المللی کار بر روی حیوانات رعایت گردید. تیمار دارو در ساعت معینی از روز (۱۲-۱۰ قبل از ظهر) شروع شد.

آماده کردن محلول نانو اکسید آهن

نانو اکسید آهن $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ به شکل پودری قهوه‌ای قرمز رنگ با ابعاد حدود ۲۰ نانومتر از شرکت نانو رهپویان ماهان خریداری شد. برای تهیه محلول، پودر در آب مقطر دوبار تقطیر حل و سپس به مدت پانزده دقیقه در دستگاه سونیکاتور قرار داده شد تا نانو اکسید آهن در آب مقطر حل شود. بعد توسط دستگاه روتاری (ورتکس) این مایع هم زده شد تا به خوبی مخلوط شود. برای جلوگیری از رسوب ماده در ته ظرف، پس از اینکه با و ورتکس هم زده شد، مورد استفاده قرار گرفت.

شدن ماکروفاژ فرار کنند و وارد ریه شوند (۱۴). Zho و همکاران در سال ۲۰۰۸ گزارش کردند که استنشاق ذرات آهن در رت منجر به استرس اکسیداتیو مرتبط با پاسخ پیش التهابی در ریه می‌شود (۱۵). همچنین مشخص شده که نانوذرات اکسید آهن با افزایش نفوذ پذیری مویرگ‌ها و لیز سلولی موجب صدمه به اپیتلیوم ریه می‌شود (۱۴).

مطالعات حیوانی نشان می‌دهد که تغذیه موش با رژیم غذایی کم آهن در اوایل زندگی منجر به ایجاد تغییرات برگشت‌ناپذیر در عملکرد مغز می‌گردد که مرتبط با نقص در میلین است (۱۶) به علاوه، بسیاری از انواع نانوذرات غیرسمی هستند (۱۷) و برخی از انواع نانوذرات می‌توانند سلول‌ها را از استرس اکسیداتیو در سیستم‌های بیولوژیکی محافظت نمایند (۱۸). از آنجایی که اکثر کارهایی که تا کنون در این زمینه صورت گرفته، به منظور بررسی اثر نانو اکسید آهن در موجود بالغ بوده و پژوهشی در زمینه‌ی بررسی اثر این ماده بر روی رویان صورت نگرفته است، لذا هدف این مطالعه اثر نانو ذرات اکسید آهن بر روی رشد و نمو شش جنین به روش *In vitro* می‌باشد.

روش بررسی

حیوانات مورد آزمایش

در این مطالعه تجربی از موش سفید نژاد NMRI استفاده شد. موش‌های نر و ماده از انیستیتو پاستور تهران خریداری و در اتاق نگهداری حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تکثیر و پرورش داده شدند. جانوران در قفس‌های پلاستیکی با ابعاد استاندارد، با دسترسی آسان به آب و غذا نگهداری می‌شدند. درجه‌ی حرارت اتاق پرورش حیوانات 23 ± 2 درجه‌ی سانتی‌گراد بود. میزان نور اتاق در حد ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی تنظیم

مراحل کشت In Vitro

در روز ۱۴ حاملگی موش‌های باردار توسط اتر یا کلروفرم بیهوش شدند. موش به طشتک تشریح انتقال داده شده و به پشت خوابانده شد. لوله‌های رحمی به دقت از شکم مادر جدا و درون پتری‌های حاوی سرم فیزیولوژیکی که از قبل آماده شده بود انتقال داده شد. لوله‌های رحمی پس از اینکه اندکی درون سرم فیزیولوژیکی شستشو داده شدند به پتری حاوی HBSS انتقال داده شد. در مرحله بعد جنین‌ها در زیر میکروسکوپ استریو از رحم و پرده‌ی آمنیون خارج شده و ریه‌ها به سرعت جدا شده درون ظرف پتری حاوی HBSS انتقال داده شدند. سپس ریه‌ها به سرعت به ظروف کشت منتقل گردیدند. ظروف کشت حاوی گرید مخصوص کشت اندام بودند. ریه‌ها به دقت و بدون آسیب دیدن، بر روی این گریدها منتقل شده و در فاز بین محیط کشت مایع حاوی ۹۰ درصد DMEM، ۱۰ درصد FBS و نانو اکسید آهن رقیق شده در آب مقطر دوبار تقطیر درون انکوباتور CO₂ دار ۵٪ و ۹۵٪ هوا در دمای ۳۷ ± ۰/۱ °C به مدت یک روز انکوبه شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت درون فیکساتور بوئن فیکس شدند. پس از آن توسط آب مقطر دوبار تقطیر چندین بار شستشو داده شدند تا رنگ زرد بوئن تا حدی زدوده شود.

سپس فرآیند آبگیری، شفاف‌سازی، پارافین‌دهی و قالب‌گیری با پارافین انجام شد. از قالب‌های تهیه شده مقاطع سریال با ضخامت ۰/۶ میکرومتر ایجاد شده و پس از

قرارگیری بر روی لام رنگ آمیزی شدند. رنگ آمیزی توسط هماتوکسیلین-ائوزین انجام شد و لام‌های تهیه شده با این روش زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند. شمارش سلولی و سایر بررسی‌ها بر روی نمونه‌های کنترل، شم و گروه‌های تجربی صورت گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS 22، آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و تست توکی (Tukey) تحلیل گردید. نتایج با در نظر گرفتن انحراف معیار (SE) و با اختلاف معنی دار $P < 0/05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج نشان داد میانگین تعداد برونشبول‌ها در نمونه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل و شم تغییر معنی‌داری نداشته است.

میانگین تعداد رگ‌های خونی در گروه تجربی ۱ و ۲ نسبت به گروه کنترل و شم تغییر معنی‌داری را نشان نداد در حالی که در گروه تجربی ۳ کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل و شم نشان داد ($p < 0/05$).

قطر رگ‌های خونی در گروه تجربی ۱، ۲ و ۳ نسبت به گروه کنترل و شم تغییر معنی‌داری را نشان نداد (جدول ۱، شکل ۱، ۲، ۳، ۴).

جدول ۱. نتایج تحلیل آماری میانگین تعداد برونشیول‌ها، تعداد رگ خونی، قطر رگ خونی در شرایط *In Vitro* در گروه‌های کنترل، شم، ۱۰ میکروگرم/کیلوگرم، ۳۰ میکروگرم/کیلوگرم و ۵۰ میکروگرم/کیلوگرم

گروه‌ها/ غلظت‌ها	میانگین تعداد برونشیول	میانگین تعداد رگ خونی	میانگین قطر رگ خونی (میکرومتر)
کنترل	۱۱/۸۳±۹۳۶	۱/۵۰±۳۹۹	۱/۲۹±۴۳۲
شم	۱۱/۸۳±۶۹۴	۱/۵۸±۲۸۸	۳۳±۳۲۷
۱۰ میکروگرم/کیلوگرم	۱۱/۶۷±۸۰۱	۶۷±۱۸۸	۶۲۵±۲۴۷
۳۰ میکروگرم/کیلوگرم	۹/۶۷±۸۹۹	۴۲±۳۳۶	۳۷۵±۳۳۲
۵۰ میکروگرم/کیلوگرم	۸/۹۲±۷۳۳	۱۷/۱۱۲*	۱۶۷±۱۱۲

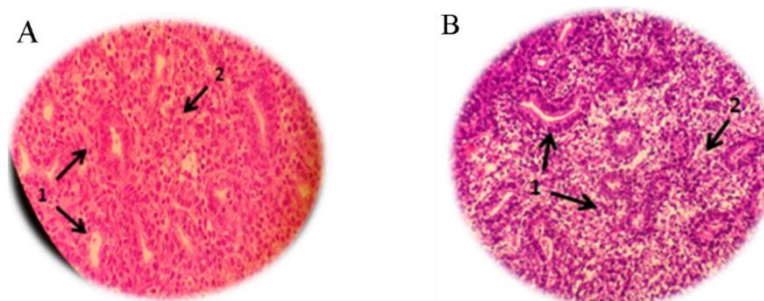
لام‌های مورد بررسی در نمونه‌های تجربی برونشیول‌ها در جداره‌های ریه اجتماع یافته بودند و در قسمت مرکزی ریه‌ها فاصله بین سلول‌ها زیاد شده بود و فضای خالی (دژنرسانس واکوئولی) دیده می‌شد که این فضای خالی با افزایش دوز بیشتر شده بود و سلول‌های نکروتیک مشاهده گردید که تعداد سلول‌های نکروز شده با افزایش دوز افزایش یافته بود. (جدول ۲ و شکل ۱، ۲، ۳، ۴)

لام‌های مورد بررسی در نمونه‌های تجربی برونشیول‌ها در جداره‌های ریه اجتماع یافته بودند و در قسمت مرکزی ریه‌ها فاصله بین سلول‌ها زیاد شده بود و فضای خالی (دژنرسانس واکوئولی) دیده می‌شد که این فضای

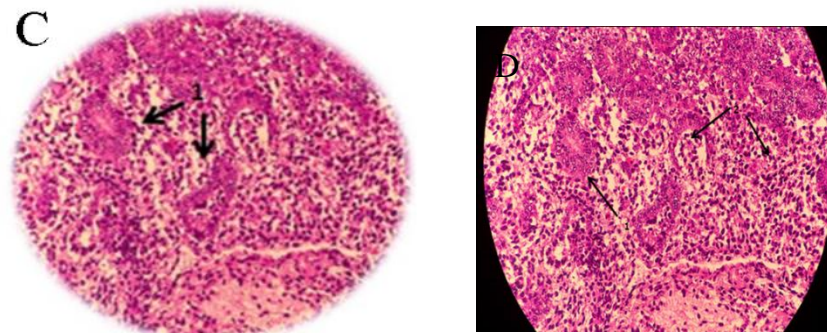
جدول ۲. مقایسه شدت تغییرات هیستوپاتولوژیک ریه بعد از مواجهه با دوزهای مختلف نانوذره اکسید آهن

گروه‌ها/ غلظت‌ها	سلول نکروتیک	دژنرسانس واکوئولی
کنترل	-	-
شم	-	-
۱۰ میکروگرم/کیلوگرم	+	+
۳۰ میکروگرم/کیلوگرم	++	++
۵۰ میکروگرم/کیلوگرم	++	+++

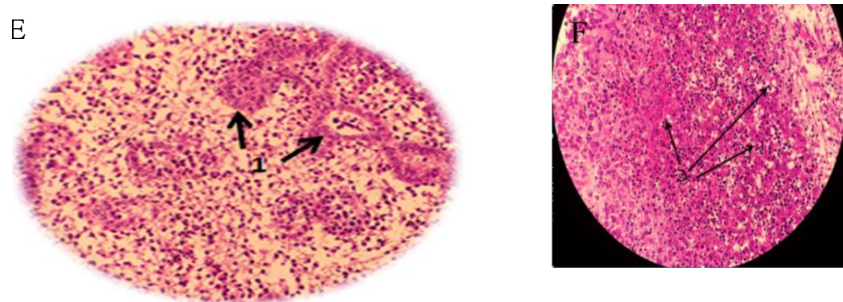
- عدم مشاهده تغییرات بافتی، + آسیب خفیف (mild)، ++ آسیب ملایم (moderate)، +++ آسیب شدید (severe)



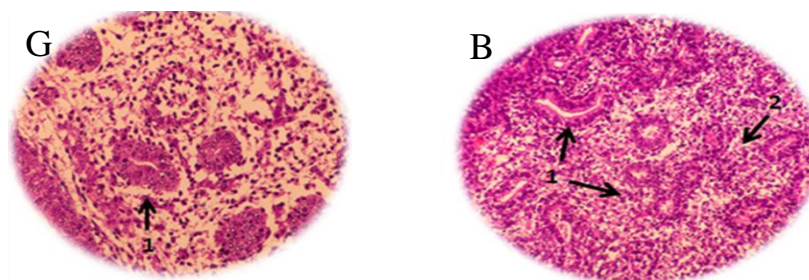
شکل ۱. فتومیکروگراف جوانه‌ی ششی نمونه (A) کنترل، (B) شم، در روز ۱۵ جنینی ۱: برونشیول، ۲: پارانشیم ریوی (بزرگنمایی ۴۰۰ برابر، رنگ آمیزی به روش هماتوکسیلین-انوزین).



شکل ۲. فتو میکروگراف جوانه‌ی ششی نمونه‌ی گروه تجربی ۱ در روز ۱۵ جنینی، ۱: برونشیول (بزرگنمایی ۴۰۰ برابر، رنگ آمیزی به روش هماتوکسیلین-ئوزین).



شکل ۳. فتو میکروگراف جوانه‌ی ششی نمونه‌ی گروه تجربی ۲ در روز ۱۵ جنینی، ۱: برونشیول ۲: سلول‌های نکروزه (بزرگنمایی ۴۰۰ برابر، رنگ آمیزی به روش هماتوکسیلین-ئوزین).



شکل ۴. فتو میکروگراف جوانه ششی نمونه گروه تجربی ۳ در روز ۱۵ جنینی، ۱: برونشیول ۲: سلول نکروزه (بزرگنمایی ۴۰۰ برابر، رنگ آمیزی به روش هماتوکسیلین-ئوزین).

بحث

در این مطالعه *In vitro*، ریه جنین موش در معرض نانو اکسید آهن با قطر ۲۰ نانومتر در دوزهای ۱۰، ۳۰ و ۵۰ میکروگرم بر کیلوگرم قرار داده شد. نتایج مطالعه هیستولوژی نشان داد قرار گرفتن در معرض نانو اکسید آهن در غلظت‌های مختلف منجر به تغییرات پاتولوژیکی ریه جنین موش شامل کاهش تعداد رگ‌های خونی، ایجاد نکروز و ایجاد ساختارهای واکوئل مانند بین سلول‌ها می‌شود. اندازه نانوذرات ارتباط مستقیم با بسیاری از ویژگی‌ها از جمله ویژگی سطح، انحلال‌پذیری و واکنش‌پذیری دارد که می‌تواند رفتارهای سمیت نانو ذره در موجود زنده را تحت تأثیر قرار دهد (۱۹). بنابراین کاهش اندازه منجر به افزایش مساحت سطح ویژه نانوذرات می‌شود که نه تنها تجمع نانوذرات را باعث می‌شود بلکه باعث واکنش‌پذیری ذرات با زیست مولکول‌ها می‌شود.

در بررسی حاضر ریه جنین‌هایی که در معرض نانو ذرات اکسید آهن در دوز بالا قرار گرفته بودند، دچار نکروز سلولی، ایجاد ساختارهای واکوئل مانند به صورت حفره حفره و کاهش تعداد رگ خونی شدند. در راستای این نتایج، Zhu و همکاران در سال ۲۰۰۸ اثرات سمی وابسته به اندازه از نانو ذرات اکسید آهن را بعد از القاب به درون نای در موش را مطالعه کرده و نشان دادند که ذرات در اندازه نانو و زیر میکرون صدمات ریوی را القا می‌کنند (۲۰). Warheit در سال ۲۰۰۸ نشان داد که در مدل موش، ریه‌ای که در معرض نانو ذرات قرار گیرد به‌طور معمول عوارض جانبی التهابی و پاسخ فیروتیک بیشتری در مقایسه با ذرات مشابه با اندازه بزرگتر تولید می‌کند (۲۰).

در بررسی آسیب و ضایعات هیستوپاتولوژیک ریه، ساختارهای واکوئل مانند که به صورت حفره حفره درآمده‌اند دیده شد که نشان دهنده دژنراسانس واکوئلی می‌باشد. در غلظت ۱۰ و ۳۰ میکروگرم بر کیلوگرم در مقایسه با کنترل

این آسیب کمتر بود و با افزایش غلظت این آسیب بیشتر شده به طوری که در غلظت ۵۰ میکروگرم بر کیلوگرم تغییرات پاتوبیولوژیکی بیشتری مشاهده شد که نشان می‌دهد سمیت نانو اکسید آهن و ضایعات ایجاد شده وابسته به دوز می‌باشد. مطالعات Naqvi و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان داده است که زمانی که سلول‌های ماکروفاژ موش به مدت طولانی در معرض غلظت بالای اکسید آهن قرار گیرند زنده ماندن سلولی کاهش می‌یابد. در مطالعه یاد شده، درصد زنده ماندن سلول‌ها در دوز ۵۰۰ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر از نانو ذرات اکسید آهن، در عرض ۶ ساعت از ۷۵ درصد به ۶۰ درصد کاهش یافت و ROS ایجاد شده باعث مرگ سلولی شد (۲۱) که با یافته‌های ما همخوانی دارد. همچنین مطالعات Maracovic و همکاران در سال ۲۰۱۳ مشابه با مطالعه حاضر، نشان داد که نانوذرات باعث ایجاد اثرات مخرب بر سلول‌های کشت شده می‌شوند؛ به این ترتیب که سلول‌های کشت شده پس از چهار هفته قرار گرفتن در معرض نانوذرات ۲۰ نانومتری با دوزهای متفاوت، حدود ۶۰ درصد کاهش یافتند که این کاهش سلولی به صورت نکروز و مرگ سلولی بود (۲۲). در همین راستا در مطالعه دیگری نشان داده شده که نانوذرات نقره باعث آپوپتوز سلول‌های هیپوکامپ می‌شوند و این اثر با افزایش دوزهای تریقی نانو ذرات نقره افزایش می‌یابد (۲۳).

همچنین بررسی ما نشان داد در غلظت ۵۰ میکروگرم بر کیلوگرم می‌یابد که این نشان‌دهنده سمیت این ماده در این دوز می‌باشد. مکانیسم سمیت نانو ذرات از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو و گونه‌های اکسیژن فعال می‌باشد و گونه‌های اکسیژن فعال توسط پراکسیداسیون لیپیدها به سلول آسیب می‌رسانند، پروتئین‌ها را تغییر می‌دهند، DNA را جدا می‌کنند و رونویسی ژن‌ها را تغییر می‌دهند (۱۰). در همین راستا Wei Qei و همکاران در سال ۲۰۱۳، اعلام کردند که نانو لوله‌های کربن باعث کاهش تعداد رگ‌های

نتایج این بررسی نشان می‌دهد نانو اکسید آهن بر میانگین تعداد برونشپول‌ها و قطر رگ‌های خونی ریه جنین اثری نداشته است، اما باعث کاهش رگ‌های خونی، دژنره شدن واکوئولی و نکروز در بافت ریه جنین در شرایط *in vitro* می‌شود و این اثر وابسته به دوز می‌باشد.

سپاسگزاری

مقاله حاضر برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد دانشجو مرجان صادقیان می‌باشد، بدین وسیله از مسئولین آزمایشگاه دانشگاه علوم و تحقیقات تشکر و قدردانی می‌شود.

خونی در جفت موش‌های سوری و به دنبال آن سقط جنین می‌شود (۲۴). این نتایج یافته‌های ما را که نشان داد نانو ذره اکسید آهن در دوز بالا باعث تعداد کاهش رگ‌های خونی و نکروزه شدن بافت شش نسبت به دوز پایین می‌شود حمایت می‌کند. مطالعات هیستوپاتولوژی بررسی حاضر، آسیب‌های قابل توجهی را در بافت ریه موش‌های تیمار شده با نانوذره اکسید آهن ۲۰ نانومتری نشان داد، لذا مطالعات جامع‌تر با غلظت‌ها و زمان‌های متفاوت به‌روش *In vivo* و مطالعات مولکولی و بافتی در گروه‌های مورد بررسی پیشنهاد می‌شود.

References

- Ernie Hood. Nanotechnology: Looking As We Leap. *Environ Health Perspect* 2004; 112(13): A740-A749.
- Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 2006; 311(5761):622-7.
- Halappanavar S, Jackson P, Williams A, Jensen KA, Hougaard KS, Vogel U, et al. Pulmonary response to surface-coated nanotitanium dioxide particles includes induction of acute phase response genes, inflammatory cascades, and changes in microRNAs: a toxicogenomic study. *Environ Mol Mutagen* 2011; 52(6):425-39.
- Holsapple MP, Farland WH, Landry TD, Monteiro-Riviere NA, Carter JM, Walker NJ, et al. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part II: toxicological and safety evaluation of nanomaterials, current challenges and data needs. *Toxicol Sci* 2005; 88(1):12-7.
- Risom L, Moller P, Loft S. Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat Res* 2005; 592(1-2): 119-37.
- Xia T, Kovochich M, Brant J, Hotze M, Sempf J, Oberley T, et al. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Lett* 2006; 6(8):1794-807.
- Sorensen M, Autrup H, Moller P, Hertel O, Jensen SS, Vinzents P, et al. Linking exposure to environmental pollutants with biological effects. *Mutat Res* 2003; 544(2-3): 255-71.
- Buzea C, Pacheco II, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases* 2007; 2(4): 17-71.
- Hougaard KS, Jackson P, Jensen KA, Sloth JJ, Löschner K, Larsen EH, et al. Effects of prenatal exposure to surface-coated nanosized titanium dioxide (UV-

- Titan). A study in mice. *Part Fibre Toxicol* 2010; 7:16. doi: 10.1186/1743-8977-7-16.
10. Oberdorster G. Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int Arch Occup Environ Health* 2001; 74(1): 1-8.
 11. Semmler M, Seitz J, Mayer P, Heyder J, Oberdörster G, Kreyling W G. Long-term clearance kinetics of inhaled ultrafine insoluble iridium particles from the rat lung, including transient translocation into secondary organs. *Inhal Toxicol* 2004; 16(6-7): 453-9.
 12. Ng AW, Bidani A, Heming TA. Innate host defense of the lung: effects of lung-lining fluid pH. *Lung* 2004; 182(5):297-317.
 13. Donaldson K, Li X.Y, MacNee W. Ultrafine (nanometer) particle mediated lung injury. *J Aerosol Sci* 1998; 29 (5/6): 553-60.
 14. Hoet PHM, Brüske-Hohlfeld I, Salata OV. Nanoparticles – known and unknown health risks. *J Nanobiotechnology* 2004; 2: 12-27.
 15. Zhu MT, Feng WY, Wang B, Wang TC, Gu YQ, Wang M, et al. Comparative study of pulmonary responses to nano- and submicron-sized ferric oxide in rats. *Toxicology* 2008; 247(2-3): 102-11.
 16. Ortiz E, Pasquini JM, Thompson K, Felt B, Butkus G, Beard J, et al. Effect of manipulation of iron storage, transport, or availability on myelin composition and brain iron content in three different animal models. *J Neurosci Res* 2004; 77(5): 681-9.
 17. Goodman CM, McCusker CD, Yilmaz T, Rotello VM. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjug Chem* 2004; 15(4):897-900.
 18. Schubert D, Dargusch R, Raitano J, Chan SW. Cerium and yttrium oxide nanoparticles are neuroprotective. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 342(1): 86-91.
 19. Zhao Y, Meng H, Chen Z, Feng Z, Chai Z. Dependence of nanotoxicity on nanoscale characteristics and strategies for reducing and eliminating nanotoxicity. In: Zhao YL, Nalwa HS (eds), *Nanotoxicology*, CA, American Scientific, 2007; PP 265-80.
 20. Zhu MT, Feng WY, Wang B, Wang TC, Gu YQ, Wang M, et al. Comparative study of pulmonary responses to nano- and submicron-sized ferric oxide in rats. *Toxicology* 2008; 247(2-3):102-11.
 21. Warheit DB, Sayes CM, Reed KL, Swain KA. Health effects related to nanoparticle exposures: environmental, health and safety considerations for assessing hazards and risks. *Pharmacol Ther* 2008; 120(1): 35-42.
 22. Naqvi S, Samim M, Abdin MZ, Ahmed FJ, Maitra A, Prashant, C, et al. Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. *Int J Nanomed* 2010; 5: 983-9.
 23. Mrakovcic M, Absenger M, Riedl R, Smole C, Roblegg E, Fröhlich LF, et al. Assessment of long-term effects of

- nanoparticles in a microcarrier cell culture system. *PLoS One* 2013; 8(2): e56791.
24. Khodarahmi P, Phili HN, Nasrabadi MH. Evaluation of apoptotic effects of intraperitoneal administration of nano-silver on rat hippocampal cells. *Journals pnu ac ir* 2015; 3(4):79-87.
25. Wei Qi, Juanjuan Bi, Xiaoyong Zhang, Jing Wang, Jianjun Wang, Peng Liu, et al. Damaging effects of multi-walled carbon nanotubes on pregnant mice with different pregnancy times. *Scientific reports* 4. 2014; 4352.

Histological Evaluation of the Fetus Lung in NMRI Mice after Exposure to Iron Oxide Nanoparticles: an *in vitro* Study

Marjan Sadeghian, M.Sc.¹, Parvin khodarahmi, Ph.D.^{2*}, Nasim Hayati Roodbari, Ph.D.³, Kazem Parivar, Ph.D.⁴

1. Student of Biology, Dept. of Biology, Science and Research, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Assistant Professor, Dept. of Biology, Branch of Parand, Islamic Azad University, Parand, Iran

3. Assistant Professor, Dept. of Biology, Islamic Azad University, Science and Research, Tehran, Iran

4. Professor, Dept. of Biology, Science and Research, Islamic Azad University, Tehran, Iran

* Corresponding author; e-mail: khodarahmiparvin@yahoo.com

(Received: 10 July 2015 Accepted: 25 Jan. 2016)

Abstract

Background and Aim: Iron oxide nanoparticles are used in fields related to nanotechnology including ecology, magnetic storage, imaging and medicinal purposes. Iron nanoparticles produce reactive oxygen species (Ros). These materials are able to cross the placenta. The aim of this study was to investigate toxic effect of iron oxide nanoparticles on fetal lung in mice.

Methods: In this study, at day 14 of pregnancy, fetal lungs were removed and transferred to the Cell culture medium. The lungs were divided into 5 groups, including control, sham and experimental groups of 1, 2 and 3 (received respectively 10, 30 and 50 mg/kg nano iron oxide) and then they were incubated for 24 hours. For histopathological evaluation, lung tissues were stained with Hematoxylin-Eosin and the results were evaluated.

Results: Mean number of bronchioles and the diameter of blood vessels in experimental groups showed no significant difference compared with control and sham groups. Mean number of blood vessels in experimental groups 1 and 2 showed no significant difference compared to control and sham groups, while in the experimental group 3, mean number of blood vessels showed significant decrease compared to sham and control groups ($p < 0.05$). Histopathological examination of lung after exposure to iron oxide nanoparticles showed signs of cytotoxicity including vacuole degeneration and necrosis.

Conclusion: The finding of this study showed that in *in vitro*, conditions, iron oxide nanoparticles reduce number of blood vessels and have cytotoxic effects such as vacuole degeneration and necrosis in the lung tissue of the fetus, in a dose- dependent way. These results can be grounds for *in vivo* studies.

Keywords: Nanoparticles, Ferric oxide, Fetus, Lung, Cytotoxicity

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2016; 23(5): 596-606