

بررسی اثرات مواجهه‌ی پیش از تولد با نانوذرات نقره بر تکامل برخی اندام‌های داخلی موش: هیستومورفومتری کبد زاده‌ها

دکتر سیدرضا فاطمی طباطبایی^۱، دکتر نعیم عرفانی مجد^۲، شهاب قادری^۳، معصومه رشنو^۴، خدابخش رشیدی^۵،
محمد مهدی شمسی^۵، محمد بهرامی تپه‌بور^۵

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: با توجه به کاربرد گسترده‌ی نانوذرات نقره در حوزه‌های مختلف زیستی و افزایش مواجهه با آن‌ها، هدف از این مطالعه، بررسی اثرات تزریق زیر جلدی این نانوذرات در طی دوران بارداری بر تکامل برخی اندام‌های داخلی و هیستومورفومتری کبد زاده‌های موش بود.

روش‌ها: ۱۵ سر موش ماده‌ی باردار نژاد NMRI در ۳ گروه، هر ۳ روز یک بار تا زمان زایمان، به صورت زیر جلدی نانوذرات نقره را به ترتیب در مقادیر صفر (شاهد)، ۰/۲ و ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت نمودند. پس از آسان‌کنشی، احشای داخلی پنج زاده‌ی نر و پنج زاده‌ی ماده‌ی ۲۸ روزه از هر گروه، استخراج و توزین شد. همچنین، از کبد مقاطع بافتی به منظور بررسی هیستومورفومتری تهیه و با توجه به تیمار و جنسیت واکاوی گردید.

یافته‌ها: در مطالعه‌ی حاضر، وزن بدن زاده‌ها اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($P > 0.05$). وزن نسبی طحال در گروه ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذره نسبت به گروه شاهد کمتر بود ($P < 0.01$). هر چند وزن نسبی کبد در بین تیمارها اختلاف معنی‌داری نداشت ($P > 0.05$)، اما تأثیر نانوذرات نقره بر وزن کبد، تحت تأثیر جنسیت قرار گرفت ($P < 0.05$)؛ به گونه‌ای که فقط در زاده‌های نر باعث افزایش وزن کبد ($P < 0.05$) شد. در گروه‌های تیمار شده با نانوذرات نقره بدون وابستگی به جنسیت، تعداد هپاتوسیت‌ها کمتر و اندازه‌ی آن‌ها بزرگ‌تر از گروه شاهد بود ($P < 0.01$).

نتیجه‌گیری: هر چند مواجهه‌ی موش‌های باردار با نانوذرات نقره بر رشد زاده‌های آن‌ها اثری نداشت، اما باعث افزایش وزن نسبی کبد و تغییرات ساختاری کبد شد.

واژگان کلیدی: نانوذرات نقره، هیستومورفومتری کبد، زاده‌ها

ارجاع: فاطمی طباطبایی سیدرضا، عرفانی مجد نعیم، قادری شهاب، رشنو معصومه، رشیدی خدابخش، شمسی محمد مهدی، بهرامی تپه‌بور محمد. **بررسی اثرات مواجهه‌ی پیش از تولد با نانوذرات نقره بر تکامل برخی اندام‌های داخلی موش: هیستومورفومتری کبد زاده‌ها.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان

۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۶۴): ۲۲۴۷-۲۲۵۵

توجه به کاربرد گسترده‌ی زیست‌پزشکی نانوذرات نقره و با وجود مطالعات انجام شده، بررسی اثر این نانوذرات در اندام‌های مختلف حیاتی به نظر می‌رسد.

علاوه بر بسیاری از مطالعات برون‌تنی (In vitro) که بر سمیت نانوذرات نقره تأکید کرده‌اند (۹-۶)، مطالعات درون‌تنی (In vivo) نیز بیانگر برخی اثرات سمی می‌باشند (۱۲-۱۰). نانوذرات نقره، قادر به

مقدمه

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی منحصر به فرد و خواص ضد میکروبی وسیع‌الطیف نانوذرات نقره و همچنین کاربرد این نانوذرات در حوزه‌های زیست‌پزشکی مانند تصویربرداری پزشکی (۱)، سنجش زیستی (۲)، انتقال دارو (۳)، عوامل ضد رگ‌زایی (۴) و درمان سرطان (۵)، چشم‌انداز امیدوارکننده‌ای از نانوذرات نقره را نمایان می‌سازد. با

۱- دانشیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- استاد، گروه بافت‌شناسی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳- کارشناس ارشد، گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۴- دانشجوی دکتری، گروه بافت‌شناسی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۵- دانشجوی دکتری، گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

نویسنده‌ی مسؤؤل: معصومه رشنو

بررسی هیستومورفومتریک کبد زاده‌ها طراحی و انجام شد.

روش‌ها

نانوذرات نقره: سوسپانسیون معلق نانوذرات نقره با غلظت ۱۰۰۰ ppm و خلوص ۹۹/۹ درصد و محلول حامل آن (سیترات سدیم ۰/۱ مولار- بدون نانوذرات) (شرکت نوترینو، ایران) خریداری شد. غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره با اضافه کردن حامل به سوسپانسیون موجود آماده شد. ریخت‌شناسی نانوذرات نقره توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری (Transmission electron microscope) یا TEM مدل LEO-906E و وضوح ۰/۳۴ مورد مطالعه قرار گرفت و اندازه‌ی آن‌ها با شمارش ۱۰۰ عدد از نانوذرات نقره اندازه‌گیری شد.

حیوانات: این مطالعه بر روی ۱۵ سر موش سوری ماده‌ی نژاد NMRI با سن ۷-۶ هفته انجام شد. موش‌های خریداری شده از مرکز پرورش حیوانات دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز در قفس‌های پلکسی‌گلاس تحت شرایط کنترل شده با دمای 22 ± 2 درجه‌ی سانتی‌گراد، ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، همراه با تهویه‌ی مناسب نگهداری شدند. در طول مدت نگهداری و آزمایش، حیوانات بدون محدودیت به آب و غذای فشرده (شرکت خوراک دام پارس، ایران) دسترسی داشتند.

پس از یک هفته تطابق با شرایط محیطی، ۱۵ سر موش ماده‌ی بارداری در سه گروه ($n = 5$) شاهد، NP0.2 و NP2 به صورت زیر جلدی نانوذرات نقره را به ترتیب در مقادیر صفر، ۰/۲ و ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت نمودند. تشخیص پلاک واژینال به عنوان روز صفر بارداری در نظر گرفته شد و تجویز نانوذرات نقره از روز ۳ بارداری تا روز زایمان هر ۳ روز یک بار تکرار شد.

نمونه‌گیری: در سن ۲۸ روزگی ۱۰ زاده شامل ۵ نر و ۵ ماده از کلنی‌های مختلف هر گروه پس از آسان‌کشی و پس از توزین، کالبدگشایی شدند و احشای آن‌ها شامل مغز، تیموس، ریه‌ها، قلب، کبد، طحال، کلیه‌ها و بیضه‌ها به دقت جدا و در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت و در نهایت، با استفاده از ترازو با دقت ۰/۰۰۱ گرم توزین شدند. وزن اندام‌ها به صورت وزن نسبی (نسبت وزن اندام به وزن موش ضرب در ۱۰۰) محاسبه شد.

هیستومورفومتري: از لوب‌های مختلف کبد نمونه‌هایی به ضخامت حداکثر ۰/۵ سانتی‌متر برداشت و پس از ثبوت و طی مراحل مختلف پاساژ بافتی، مقاطع پارافینی به ضخامت ۵-۶ میکرومتر تهیه و پس از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین (Hematoxylin and eosin) یا H&E مورد بررسی هیستومورفومتري قرار گرفتند. بدین منظور، تغییرات ساختاری بافت کبد شامل هپاتوسیت‌ها، طناب‌های کبدی و سینوزویدها مورد توجه قرار گرفتند و در مطالعات میکرومتری اندازه و تعداد

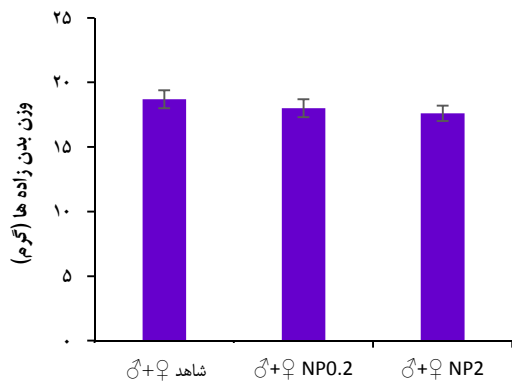
تجمع در برخی اندام‌ها مانند کبد، کلیه‌ها، ریه‌ها و طحال هستند که این امر، می‌تواند منجر به سمیت با واسطه‌ی پاسخ‌های التهابی و استرس اکسیداتیو شود (۱۳، ۱۰، ۶). آسیب‌های هیستوپاتولوژیک کبد در مواجهه‌ی با نانوذرات نقره در گونه‌های مختلف حیوانات آزمایشگاهی نظیر موش صحرایی (۱۰)، موش سوری (۱۵-۱۴، ۱۲)، خوکچه‌ی هندی (۱۶)، خرگوش (۱۷)، ماهی گورخری (۱۸)، ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (۱۹) و جوجه‌های گوشتی (۲۰) گزارش شده است. نانو ذرات نقره، توانایی عبور از سد‌های خونی- مغزی و خونی- جفتی را دارند (۲۱-۲۲). تجمع این نانوذرات در جفت، جنین و کبد جنین‌های ۱۴ روزه‌ی موش سوری گزارش شده است (۲۲). همچنین، نشان شده است که تیمار با نانوذرات نقره، در طی دوران بارداری باعث بروز استرس اکسیداتیو در بافت کبد مادران باردار می‌شود (۲۳). در پی تجویز خوراکی نانوذرات نقره به مادران باردار، این نانوذرات در اندام‌های مختلف از جمله کلیه‌ها، ریه‌ها، مغز و کبد نوزادان ۴ روزه شناسایی شده است (۲۱).

تجویز داخل وریدی نانوذرات نقره با اندازه‌ی ۲۰ نانومتر در موش‌های صحرایی نر، بیشترین توزیع و غلظت را در کبد به همراه داشت (۲۴-۲۵). گزارش شده است که تجویز داخل صفاقی نانوذرات نقره در موش‌های صحرایی باردار، باعث کاهش وزن و طول جنین‌ها و همچنین باعث کاهش وزن، حجم و قطر جفت می‌شود (۲۶). با توجه به بررسی‌های انجام شده، موارد پیش‌گفته اندک مطالعاتی هستند که تاکنون به بررسی اثرات سمیت نانوذرات نقره در طی دوران بارداری و بررسی هیستوپاتولوژیک اندام‌ها اشاره کرده‌اند.

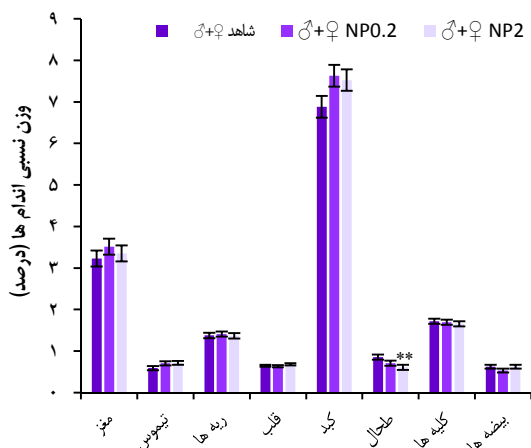
با وجود مطالعات فراوانی که در خصوص اثرات نانوذرات نقره در شرایط درون و برون‌تنی صورت گرفته است و همچنین شواهد کافی مبنی بر اثر سوء این ذرات بر کبد، مطالعه‌ای مبنی بر اثر این نانوذرات بر کبد زاده‌هایی که در دوران جنینی با این مواد مواجه شده باشند، یافت نشد. کبد جنین به طور مستقیم خون مادر را از جفت دریافت می‌کند. از این جهت، یک مکان بالقوه برای پاسخ اولیه به دنبال مواجهه‌ی مادری در برابر عوامل محیطی است.

کبد، یک اندام ضروری و جایگاه خاص برای فرایندهای مختلف زیستی و سم‌شناسی نظیر سم‌زدایی، تنظیم متابولیک هموستاز و عملکرد آندوکراین است که در طول آسیب‌های کبدی، بسیاری از این فرایندها دچار اختلال می‌شوند. با توجه به نقش مهم فیزیولوژیک کبد، بررسی تغییرات هیستومورفومتریک کبد زاده‌هایی که در دوران جنینی با نانوذرات نقره مواجه شده بودند، به فهم و بینش جدیدی درباره‌ی سمیت احتمالی این نانوذرات کمک می‌کند. از این رو، مطالعه‌ی حاضر به منظور بررسی اثرات تجویز زیر جلدی نانوذرات نقره در موش‌های سوری باردار بر تکامل برخی از اندام‌های داخلی و

هپاتوسیت‌ها با استفاده از لنز دیجیتال Dino-Lite و نرم‌افزار Dino-capture II شمارش و اندازه‌گیری شدند. تجزیه و تحلیل آماری: برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) استفاده شد. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار (Mean \pm SEM)، بیان و بسا به کارگیری مدل GLM (General linear model) تک متغیره (Univariate) واکاوی شد. تیمارها (شاهد، NP0.2 و NP2) و جنسیت (نر و ماده) در این مدل آماری به عنوان عوامل ثابت در نظر گرفته شدند. همچنین، از آزمون One-way ANOVA و پس‌آزمون Least significant difference (LSD) برای مقایسه‌ی تیمارهای نر و ماده به تفکیک استفاده شد. در تمامی موارد، $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.



شکل ۲. میانگین \pm خطای معیار وزن بدن زاده‌ها در سن ۲۸ روزگی. مادران گروه‌های شاهد، NP0.2 و NP2 به ترتیب صفر، ۰/۲ و ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذرات نقره را از روز ۳ بارداری و در ادامه هر ۳ روز یک بار تا زمان زایمان دریافت کردند. ($n = 10$ در هر گروه، شامل ۵ زاده‌ی نر و ۵ زاده‌ی ماده).

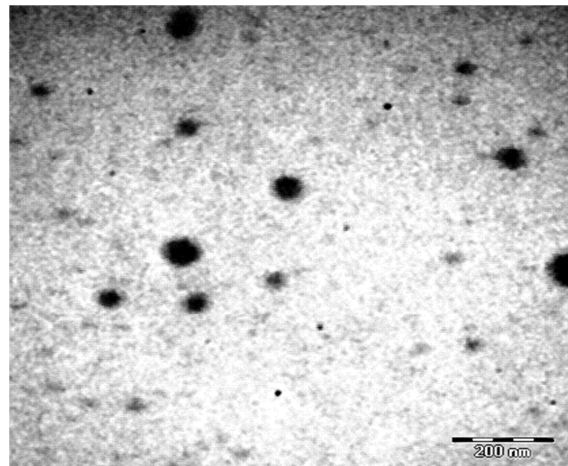


شکل ۳. میانگین \pm خطای معیار وزن نسبی اندام‌های داخلی (درصد). مادران گروه‌های شاهد، NP0.2 و NP2 به ترتیب صفر، ۰/۲ و ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذرات نقره را از روز ۳ بارداری و در ادامه هر ۳ روز یک بار تا زمان زایمان دریافت کردند. **: نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد است. ***: $P < 0.01$ در هر گروه، شامل ۵ زاده‌ی نر و ۵ زاده‌ی ماده

هپاتوسیت‌ها با استفاده از لنز دیجیتال Dino-Lite و نرم‌افزار Dino-capture II شمارش و اندازه‌گیری شدند. تجزیه و تحلیل آماری: برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) استفاده شد. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار (Mean \pm SEM)، بیان و بسا به کارگیری مدل GLM (General linear model) تک متغیره (Univariate) واکاوی شد. تیمارها (شاهد، NP0.2 و NP2) و جنسیت (نر و ماده) در این مدل آماری به عنوان عوامل ثابت در نظر گرفته شدند. همچنین، از آزمون One-way ANOVA و پس‌آزمون Least significant difference (LSD) برای مقایسه‌ی تیمارهای نر و ماده به تفکیک استفاده شد. در تمامی موارد، $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بر اساس تصاویر تهیه شده، نانوذرات نقره‌ی مورد استفاده، کروی شکل بودند و قطرشان 32.0 ± 6.6 نانومتر بود (شکل ۱). توزیع اندازه‌ی نانوذرات نقره ۷۰-۵ نانومتر بود.



شکل ۱. تصویر گرفته شده از نانوذرات نقره با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM یا Transmission electron microscope)

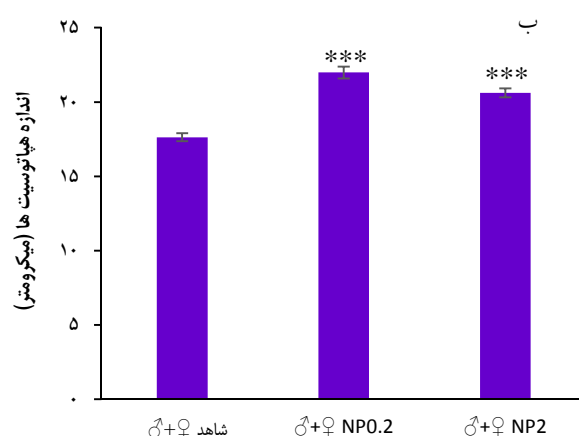
همان‌گونه که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، وزن بدن زاده‌ها در گروه‌های تحت بررسی در سن ۲۸ روزگی اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($F_{2,22} = 0.655, P = 0.528$). وزن اندام‌های داخلی: وزن نسبی کبد از نظر آماری در بین گروه‌ها اختلاف معنی‌داری نداشت ($F_{2,22} = 2/418, P = 0/111$). اما جنسیت با وزن نسبی کبد تداخل اثر نشان داد ($F_{2,22} = 4/175, P = 0/028$)؛ به طوری که در میان حیوانات نر ($F_{2,11} = 7/197, P = 0/009$) وزن کبد در گروه‌های نر NP0.2

بحث

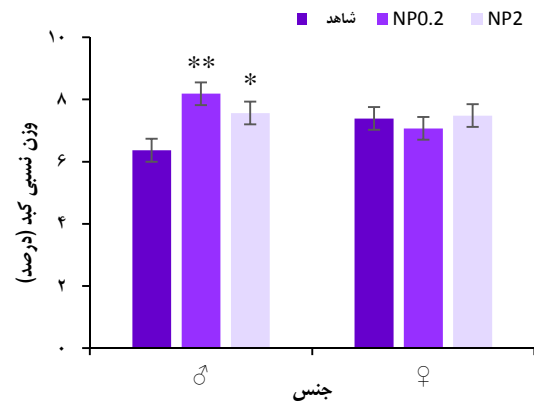
با توجه به کاربردهای فراوان نانوذرات نقره، مواجهه‌ی با آن‌ها به طور فزاینده‌ای رو به گسترش است. بنا بر این، بررسی اثرات سمی این مواد ضروری به نظر می‌رسد.

نانوذرات نقره، توانایی عبور از سد خونی-جفتی و تجمع در کبد جنین را دارند و می‌توانند بیش از ۴ ماه در بدن موش ماندگاری داشته باشند (۲۲). استفاده از روش‌های تزریقی به منظور تحویل مستقیم نانوذرات نقره به گردش عمومی خون برای ارزیابی سمیت آن‌ها توصیه شده است (۲۷). نشان داده شده است که تجویز زیر جلدی نانوذرات نقره، باعث ورود این نانوذرات به گردش خون و در نهایت توزیع آن در سراسر اندام‌های اصلی از جمله کبد، کلیه‌ها، ریه‌ها، طحال و مغز می‌شود (۲۸).

در مطالعه‌ی حاضر، از دوزهای پایین نانوذرات نقره استفاده شد که به اغلب اندام‌های مادری، بافت‌های خارج جنینی و جنین انتقال می‌یابد (۲۹). توزیع دوزهای پایین نانوذرات نقره در کبد جنین موش‌های سوری در مطالعه‌ی Wang و همکاران نشان داد که غلظت‌های پایین، با سهولت بیشتری در خون توزیع می‌شوند و توانایی بیشتری در عبور از سد خونی-جفتی و رسیدن به اندام‌های داخلی جنین را دارند (۲۲). نانومواد در غلظت‌های بالاتر، تمایل به متراکم شدن و جمع شدن دارند که در نتیجه، فراهمی زیستی و جذب سلولی آن‌ها کاهش می‌یابد (۳۲-۳۰). از سوی دیگر، تزریق زیر جلدی، موجب تأخیر در گسترش و پاک‌سازی نانوذرات و همچنین باعث به حداقل رساندن میزان دستکاری حیوانات در طول دوران بارداری می‌شود (۳۳).



شکل ۵. میانگین \pm خطای معیار تعداد هیاتوسیت‌ها (الف) و اندازه‌ی هیاتوسیت‌ها (ب) بر حسب میکرومتر. مادران گروه‌های شاهد، NPO.2 و NP2 به ترتیب صفر، ۰/۲ و ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذرات نقره را از روز ۳ بارداری و در ادامه هر ۳ روز یک بار تا زمان زایمان دریافت کردند. * نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد است (***: $P < 0.001$) (n = 10) در هر گروه، شامل ۵ زاده‌ی نر و ۵ زاده‌ی ماده.

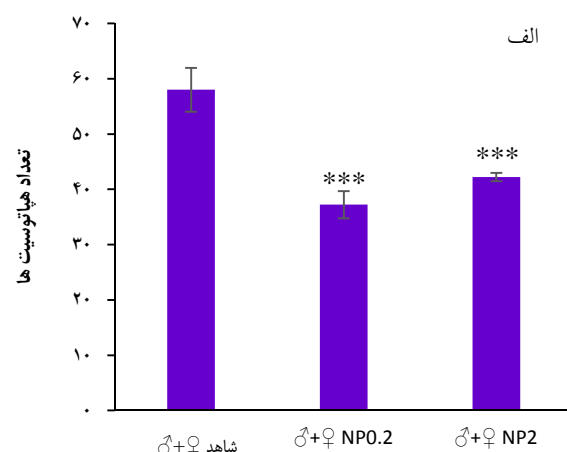


شکل ۴. میانگین \pm خطای معیار تداخل اثر بین دو جنس نر و ماده در وزن نسبی کبد (درصد). مادران گروه‌های شاهد، NPO.2 و NP2 به ترتیب صفر، ۰/۲ و ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذرات نقره را از روز ۳ بارداری و در ادامه هر ۳ روز یک بار تا زمان زایمان دریافت کردند. * نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد می‌باشد.

***: $P < 0.001$; **: $P < 0.05$

n = 10 در هر گروه، شامل ۵ زاده‌ی نر و ۵ زاده‌ی ماده

مورفومتری کبد: تعداد و اندازه‌ی هیاتوسیت‌ها در تیمارهای انجام شده با اختلاف آماری همراه بود؛ به طوری که در گروه‌های تیمار شده با نانوذرات نقره، تعداد هیاتوسیت‌ها کمتر ($P < 0.001$) ($F_{2,24} = 23/984$) و اندازه‌ی آن‌ها بزرگ‌تر ($P = 0.001$) ($F_{2,24} = 48/51$) از گروه شاهد بود ($P < 0.010$)، شکل ۵-الف و ۵-ب). این تغییرات در شکل‌های ۶، ۷ و ۸ قابل مشاهده است. در هیچ یک از موارد، جنسیت تأثیری بر نتایج مورفومتری کبد نداشت.



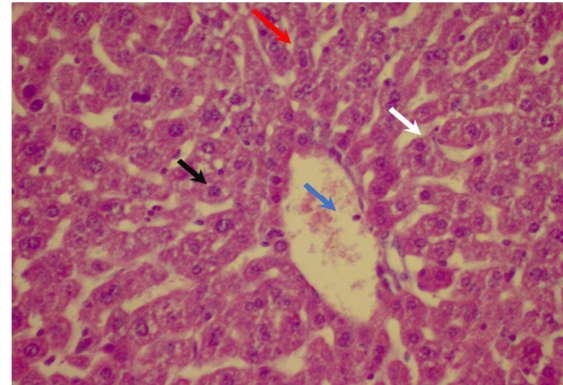
به نظر می‌رسد مطالعه‌ای مبنی بر بررسی هیستومورفومتریک کبد، اندام‌های احشایی و تغییرات وزنی زاده‌ها در دسترس نیست و مطالعه‌ی حاضر برای اولین بار به این مهم پرداخته است.

به طور کلی، مواجهه‌ی مادری با نانوذرات از طریق استرس اکسیداتیو و سایتوکاین‌های التهابی که به دنبال عبور نانوذرات از گردش خون به جفت، آندومتر، کیسه‌ی زرده و یا جنین رخ می‌دهد، می‌تواند منجر به سمیت در زاده‌ها شود (۳۴). در این راستا، گزارش شده است که مواجهه‌ی مادری با نانوذرات نقره، باعث القای استرس اکسیداتیو در زاده‌های موش صحرایی می‌شود (۳۵). گزارش شده است که نانوذرات نقره با افزایش بیان ژن‌های مربوط به سایتوکاین‌های التهابی و استرس اکسیداتیو در کبد موش‌های صحرایی و هپاتوسیت‌های C3A انسان (نوعی رده‌ی سلول‌های هپاتومای انسانی که برای مطالعه بر روی هپاتوسیت‌ها مورد تأیید قرار گرفته است)، باعث سمیت می‌شوند (۳۶).

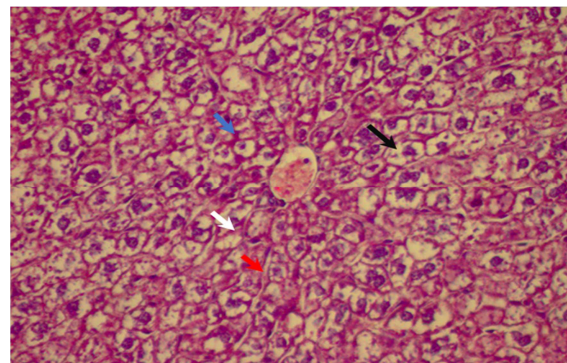
همچنین، نشان داده شده است نانوذرات نقره باعث افزایش استرس اکسیداتیو در هپاتوسیت‌های ماهی قزل‌آلا می‌شود (۱۹). این در حالی است که Arofa و همکاران، سمیت سلول‌های کبدی در مواجهه با نانوذرات نقره را ناشی از افزایش سطح گلوکوتایون و فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و القای فعالیت کاسپاز ۳ (نشانگر رایج آنزیمی آپوپتوز) گزارش کردند (۷).

حجم زیاد و جریان ثابت خون در کبد (۳۷) و همچنین، حضور تعداد زیادی از سلول‌های تک هسته‌ای (فاگوسیتوز) در آن (۳۸)، که شامل بخشی از سیستم رتیکلواندوتلیال می‌باشند، می‌توانند باعث رسوب و تجمع نانوذرات نقره در کبد (۲۲) و به دنبال آن، آسیب هیستوپاتولوژیک شوند (۱۷، ۱۰). در راستای این فرضیه، Gaiser و همکاران نیز پیشنهاد کرده‌اند که نانوذرات نقره از طریق انتشار غشایی و یا توسط مکانیسم‌های انتقال غشایی مثل اندوسیتوز برداشت می‌شوند و از این طریق، باعث رسوب نانوذرات نقره و بروز سمیت سلولی می‌شوند (۳۶). علاوه بر این، عملکرد سم‌زدایی فلزات سنگین و غریبه‌زیستی که توسط هپاتوسیت‌ها انجام می‌شود (۳۹-۴۰)، مکانیسم دیگری است که ممکن است مسؤول تغییرات رخ داده در مطالعه‌ی حاضر باشد.

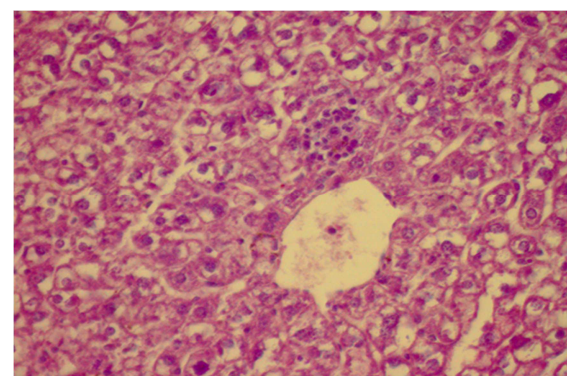
مطالعات درون‌تنی در مواجهه با نانوذرات نقره، انواع آسیب‌های کبدی شامل اتساع ورید مرکزی، افزایش بروز هیپرپلازی مجرای صفرا، افزایش کانون (۱۰)، چند کانونی، نکروز لوبولار (۱۱)، ارتشاح



شکل ۶. هپاتوسیت‌ها با هسته‌ی بزرگ یوکروماتین و سیتوپلاسم اسیدوفیلی مشخص (پیکان سیاه)، طناب‌های کبدی (پیکان سفید)، سینوزوئیدها (پیکان قرمز) و همچنین ورید مرکزی کبد (پیکان آبی) در گروه شاهد مشخص شده است. بزرگ‌نمایی ۴۰×، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-انوزین.



شکل ۷. هپاتوسیت‌ها بزرگ و هیپرتروفی شده و سیتوپلاسم واکونله (پیکان سیاه)، نامنظم شدن طناب‌های کبدی (پیکان سفید)، محدود شدن سینوزوئیدها (پیکان قرمز) و افزایش ضخامت دیواره‌ی بین سلول‌ها (پیکان آبی) در گروه NP0.2 (نر و ماده) نشان داده شده است. بزرگ‌نمایی ۴۰×، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-انوزین.



شکل ۸. ساختار بافتی کبد در گروه NP2 تغییرات ساختاری مشابه گروه NP0.2 را نشان می‌دهد. بزرگ‌نمایی ۴۰×، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-انوزین.

زاده‌ها در گروه‌های تیمار با نانوذرات نقره بود. عواملی از قبیل کاهش تولید شیر مادران، تفاوت در رفتار مادرانه و همچنین تفاوت‌های رفتاری یا متابولیک زاده‌ها، ممکن است وزن زاده‌ها را در این دوران تحت تأثیر قرار دهد. در این راستا، گزارش شده است که تجویز ۲۸ روزه‌ی نانوذرات نقره به روش خوراکی در دوز ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در موش‌های صحرایی، تأثیری بر وزن بدن نداشت (۱۰).
مواجهه‌ی ۵۲ روزه با نانوذرات نقره با دوزهای ۶۲/۵، ۱۲۵ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در جنس ماده، موجب افزایش وزن مطلق کلیه‌ها شد و مواجهه‌ی ۴۲ روزه با این دوزها در جنس نر، موجب افزایش وزن مطلق و نسبی کبد شد، اما بر وزن مغز، تیموس، طحال، ریه‌ها و قلب در دو جنس اثری نداشت (۲۷).

در مجموع، نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که تزریق زیر جلدی نانوذرات نقره در دوران بارداری، می‌تواند باعث افزایش وزن نسبی کبد و تغییرات ساختاری کبد در زاده‌های موش سوری شود. این یافته‌ها می‌تواند هشدار به مادران باردار و مادرانی باشد که قصد بارداری دارند تا از مواجهه با نانوذرات نقره بپرهیزند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز که از این پژوهش حمایت مالی نمود، اعلام می‌دارند.

کانونی لنفوسیت‌ها در مجاری باب (۱۴)، به هم خوردن طناب‌های هپاتوسیستی، تغییرات آپوپتوتیک از قبیل متراکم شدن کروماتین و پیکنوزیس (۱۸)، تولید بیش از حد سلول‌های کوپفر، دژنره شدن (۱۶) و واکنش شدن سیتوپلاسم سلول‌های کبدی (۱۲)، ادم و پرخونی، تورم سلولی و افزایش سلول‌های التهابی (۱۵) را گزارش کرده‌اند.

تغییرات وزن طحال، شاخصی از فعالیت سیستم ایمنی می‌باشد؛ به گونه‌ای که واکسیناسیون (۴۱) و عفونت سیستمیک باعث افزایش وزن آن می‌شود (۴۲). از آن جایی که نانوذرات نقره اثرات ضد میکروبی دارند (۴۳)، کاهش وزن نسبی طحال در مطالعه‌ی حاضر، ممکن است ناشی از کاهش جمعیت میکروارگانیسم‌ها باشد که با کم کردن تحریک سیستم ایمنی، وزن طحال را به عنوان یک اندام لنفاوی کاهش داده‌اند. ضمن این که، به نظر می‌رسد با بررسی اثر این نانوذرات بر سیستم ایمنی، بتوان این موضوع را با دقت بیشتری مورد ارزیابی قرار داد.

برخی مطالعات پیشنهاد داده‌اند که مواجهه با ذراتی در مقیاس نانو، نمی‌تواند اثرات مضر قابل توجهی بر وزن و تکامل فیزیکی ایجاد کند (۴۴-۴۵). شاخص عمومی سلامت نوزادان با اندازه‌گیری وزن بدن و ثبت مشاهدات در مورد ویژگی‌های غیر طبیعی جسمانی به دست می‌آید (۴۶).

در مطالعه‌ی حاضر، تغییرات وزن زاده‌ها به عنوان یک شاخص از تکامل فیزیکی یکسان بود که در مجموع، نشان دهنده‌ی سلامت

References

- Sladkova M, Vlckova B, Pavel I, Siskova K, Slouf M. Surface-enhanced Raman scattering from a single molecularly bridged silver nanoparticle aggregate. *J Mol Struct* 2009; 924-926: 567-70.
- Ananth AN, Daniel SCG, Sironmani TA, Umapathi S. PVA and BSA stabilized silver nanoparticles based surface-enhanced plasmon resonance probes for protein detection. *Colloids Surf B: Biointerfaces* 2011; 85(2): 138-44.
- kiruba Daniel SCG, Sironmani A, Tharmaraj V, Pitchumani K. Synthesis and characterization of fluorophore attached silver nanoparticles. *Bull Mater Sci* 2011; 34(4): 639-43.
- Gurunathan S, Lee KJ, Kalishwaralal K, Sheikpranbabu S, Vaidyanathan R, Eom SH. Antiangiogenic properties of silver nanoparticles. *Biomaterials* 2009; 30(31): 6341-50.
- Asharani PV, Hande MP, Valiyaveettil S. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Cell Biol* 2009; 10: 65.
- Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol In Vitro* 2005; 19(7): 975-83.
- Arora S, Jain J, Rajwade JM, Paknikar KM. Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 236(3): 310-8.
- Piao MJ, Kang KA, Lee IK, Kim HS, Kim S, Choi JY, et al. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicol Lett* 2011; 201(1): 92-100.
- Sahu SC, Zheng J, Graham L, Chen L, Ihrie J, Yourick JJ, et al. Comparative cytotoxicity of nanosilver in human liver HepG2 and colon Caco2 cells in culture. *J Appl Toxicol* 2014; 34(11): 1155-66.
- Kim YS, Kim JS, Cho HS, Rha DS, Kim JM, Park JD, et al. Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of

- silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhal Toxicol* 2008; 20(6): 575-83.
11. Kim YS, Song MY, Park JD, Song KS, Ryu HR, Chung YH, et al. Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. *Part Fibre Toxicol* 2010; 7: 20.
 12. Xue Y, Zhang S, Huang Y, Zhang T, Liu X, Hu Y, et al. Acute toxic effects and gender-related biokinetics of silver nanoparticles following an intravenous injection in mice. *J Appl Toxicol* 2012; 32(11): 890-9.
 13. Hsin YH, Chen CF, Huang S, Shih TS, Lai PS, Chueh PJ. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicol Lett* 2008; 179(3): 130-9.
 14. Cha K, Hong HW, Choi YG, Lee MJ, Park JH, Chae HK, et al. Comparison of acute responses of mice livers to short-term exposure to nano-sized or micro-sized silver particles. *Biotechnol Lett* 2008; 30(11): 1893-9.
 15. Heydarnejad MS, Yarmohammadi-Samani P, Mobini-Dehkordi M, Shadkhast M, Rahnama S. Histopathological effects of nanosilver (Ag-NPs) in liver after dermal exposure during wound healing. *Nano Medical* 2014; 1(3): 191-7.
 16. Korani M, Rezayat SM, Gilani K, Arbabi BS, Adeli S. Acute and subchronic dermal toxicity of nanosilver in guinea pig. *Int J Nanomedicine* 2011; 6: 855-62.
 17. Lee Y, Kim P, Yoon J, Lee B, Choi K, Kil KH, et al. Serum kinetics, distribution and excretion of silver in rabbits following 28 days after a single intravenous injection of silver nanoparticles. *Nanotoxicology* 2013; 7(6): 1120-30.
 18. Choi JE, Kim S, Ahn JH, Youn P, Kang JS, Park K, et al. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. *Aquat Toxicol* 2010; 100(2): 151-9.
 19. Massarsky A, Abraham R, Nguyen KC, Rippstein P, Tayabali AF, Trudeau VL, et al. Nanosilver cytotoxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocytes and hepatocytes. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2014; 159: 10-21.
 20. Akradi L, Sohrabi Haghdoost I, Djeddi AN, Mortazavi P. Histopathologic and apoptotic effect of nanosilver in liver of broiler chickens. *Afr J Biotechnol* 2012; 11(22): 6207-11.
 21. Lee Y, Choi J, Kim P, Choi K, Kim S, Shon W, et al. A transfer of silver nanoparticles from pregnant rat to offspring. *Toxicol Res* 2012; 28(3): 139-41.
 22. Wang Z, Qu G, Su L, Wang L, Yang Z, Jiang J, et al. Evaluation of the biological fate and the transport through biological barriers of nanosilver in mice. *Curr Pharm Des* 2013; 19(37): 6691-7.
 23. Yu WJ, Son JM, Lee J, Kim SH, Lee IC, Baek HS, et al. Effects of silver nanoparticles on pregnant dams and embryo-fetal development in rats. *Nanotoxicology* 2014; 8(Suppl 1): 85-91.
 24. Lankveld DP, Oomen AG, Krystek P, Neigh A, Troost-de JA, Noorlander CW, et al. The kinetics of the tissue distribution of silver nanoparticles of different sizes. *Biomaterials* 2010; 31(32): 8350-61.
 25. Dziendzikowska K, Gromadzka-Ostrowska J, Lankoff A, Oczkowski M, Krawczynska A, Chwastowska J, et al. Time-dependent biodistribution and excretion of silver nanoparticles in male Wistar rats. *J Appl Toxicol* 2012; 32(11): 920-8.
 26. Khaksary Mahabady M. The evaluation of teratogenicity of nanosilver on skeletal system and placenta of rat fetuses in prenatal period. *Afr J Pharm Pharmacol* 2012; 6(6): 419-24.
 27. Hong JS, Kim S, Lee SH, Jo E, Lee B, Yoon J, et al. Combined repeated-dose toxicity study of silver nanoparticles with the reproduction/developmental toxicity screening test. *Nanotoxicology* 2014; 8(4): 349-62.
 28. Tang J, Xiong L, Wang S, Wang J, Liu L, Li J, et al. Distribution, translocation and accumulation of silver nanoparticles in rats. *J Nanosci Nanotechnol* 2009; 9(8): 4924-32.
 29. Austin CA, Umbreit TH, Brown KM, Barber DS, Dair BJ, Francke-Carroll S, et al. Distribution of silver nanoparticles in pregnant mice and developing embryos. *Nanotoxicology* 2012; 6: 912-22.
 30. Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager JJ, Hofmann MC. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicol Sci* 2005; 88(2): 412-9.
 31. Oberdorster G. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *J Intern Med* 2010; 267(1): 89-105.
 32. Puvanakrishnan P, Park J, Chatterjee D, Krishnan S, Tunnell JW. In vivo tumor targeting of gold nanoparticles: effect of particle type and dosing strategy. *Int J Nanomedicine* 2012; 7: 1251-8.
 33. Ghaderi S, Tabatabaei SR, Varzi HN, Rashno M. Induced adverse effects of prenatal exposure to silver nanoparticles on neurobehavioral development of offspring of mice. *J Toxicol Sci* 2015; 40(2): 263-75.
 34. Li Y, Zhang Y, Yan B. Nanotoxicity overview: nano-threat to susceptible populations. *Int J Mol Sci* 2014; 15(3): 3671-97.
 35. Fatemi M, Roodbari NH, Ghaedi K, Naderi G. The effects of prenatal exposure to silver nanoparticles on the developing brain in neonatal rats. *J Biol Res-Thessalon* 2013; 20(1): 233-42.
 36. 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; 131(2): 537-47.
 37. Rappaport AM. Hepatic blood flow: morphologic aspects and physiologic regulation. *Int Rev Physiol* 1980; 21: 1-63.
 38. Hume DA. The mononuclear phagocyte system. *Curr Opin Immunol* 2006; 18(1): 49-53.
 39. Guillouzo A. Liver cell models in in vitro toxicology. *Environ Health Perspect* 1998; 106(Suppl 2): 511-32.
 40. Wijnhoven SWP, Peijnenburg WJGM, Herberts CA, Hagens WI, Oomen AG, Heugens EHW, et al. Nano-

- silver _ a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology* 2009; 3(2): 109-38.
41. Kabir SML, Rahman MM, Rahman MB, Ahmed SU. The dynamics of probiotics on growth performance and immune response in broilers. *Int J Poult Sci* 2004; 3(5): 361-4.
42. Siegmund B, Rieder F, Albrich S, Wolf K, Bidlingmaier C, Firestein GS, et al. Adenosine kinase inhibitor GP515 improves experimental colitis in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 296(1): 99-105.
43. Chernousova S, Epple M. Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal. *Angew Chem Int Ed Engl* 2013; 52(6): 1636-53.
44. Lim JH, Kim SH, Lee IC, Moon C, Kim SH, Shin DH, et al. Evaluation of maternal toxicity in rats exposed to multi-wall carbon nanotubes during pregnancy. *Environ Health Toxicol* 2011; 26: e2011006.
45. Jackson P, Hougaard KS, Boisen AM, Jacobsen NR, Jensen KA, Moller P, et al. Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring. *Nanotoxicology* 2012; 6(5): 486-500.
46. Crawley JN, Paylor R. A proposed test battery and constellations of specific behavioral paradigms to investigate the behavioral phenotypes of transgenic and knockout mice. *Horm Behav* 1997; 31(3): 197-211.

Evaluating the Effects of Prenatal Exposure to Silver Nanoparticles on Development of Some Internal Organs in Mice: Liver Histomorphometry of Offspring

Seyed Reza Fatemi-Tabatabaei DVM, PhD¹, Naim Erfani-Majd DVM, PhD², Shahab Ghaderi MSc³, Masome Rashno MSc³, Khodabakhsh Rashidi MSc⁴, Mohammad Mehdi Shamsi MSc⁵, Mohammad Bahrami-Tapehebur MSc⁵

Original Article

Abstract

Background: Silver nanoparticles (AgNPs) are widely consumed in different fields of biology and exposure to them have increased. This study was designed to evaluate the effects of subcutaneous administration of silver nanoparticles during pregnancy on development of some internal organs and liver histomorphometry of mouse offspring.

Methods: Fifteen pregnant NMRI female mice in three groups were subcutaneously administered every three days until delivery with 0 (control), 0.2, and 2 mg/kg of body weight (BW) of silver nanoparticles. Internal organs of five male and five female offspring from each groups were weighed following anesthesia on 28th day offspring. Histological liver sections were also prepared to assess histomorphometry of liver. Finally, results were analyzed according to the treatment and sex.

Findings: There were no significant differences in offspring body weights ($P > 0.05$). Partial weight of spleen were lower in the group received 2 mg/kg nanoparticles compared to the control group ($P < 0.01$). Although liver partial weight were not significantly different between the groups ($P > 0.05$), the effect of silver nanoparticles on liver weight was influenced by the sex ($P < 0.05$), in a way that only the liver weight of male mice were increased ($P < 0.05$). Number of hepatocytes decreased and their size increased sex-independently in silver-nanoparticles-treated groups compared to control group ($P < 0.01$).

Conclusion: Although exposure of pregnant mice to silver nanoparticles has no effect on the growth of their offspring, it leads to increased liver weight and liver structural changes.

Keywords: Silver nanoparticles, Liver histomorphometry, Offspring

Citation: Fatemi-Tabatabaei SR, Erfani-Majd N, Ghaderi Sh, Rashno M, Rashidi Kh, Shamsi MM, et al. **Evaluating the Effects of Prenatal Exposure to Silver Nanoparticles on Development of Some Internal Organs in Mice: Liver Histomorphometry of Offspring.** J Isfahan Med Sch 2016; 33(364): 2247-55

1- Associate Professor, Department of Physiology, School of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2- Professor, Department of Histology, School of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

3- Department of Physiology, School of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

4- PhD Student, Department of Histology, School of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

5- PhD Student, Department of Anatomical Sciences, School of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Corresponding Author: Masome Rashno MSc, Email: masome.rashno@yahoo.com