

## Assessment of histopathological changes on brain, spleen and embryo NMRI pregnant mice exposed to copper oxide nanoparticles

Seyedalipour B<sup>1\*</sup>, Barimani N<sup>2</sup>, Dehpour Jooybari AA<sup>3</sup>, Hoseini SM<sup>4</sup>

1- Department of Cellular and Molecular Biology, faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

2- Department of Cellular and Molecular Biology, Islamic Azad University, Qaemshahr Branch, Qaemshahr, Iran.

3- Department of veterinary pathobiology, faculty of veterinary medicine, Islamic Azad University, Babol branch, Babol, Iran.

Received: 8 Sep 2014, Accepted: 12 Nov 2014

### Abstract

**Background:** Nanomaterials have gained increasing attention because of their novel properties, including a large specific surface area and high reaction activity. This study was designed to investigate the cytotoxic effects of CuO nanoparticles on brain, spleen, and embryo NMRI pregnant mice.

**Materials and Methods:** In this experimental study, Forty two female NMRI mice of (weighting  $30 \pm 3.0$  g) were randomly divided into six groups (four experimental groups, one sham group and one control group). The experimental mice on days 3 and 12 of pregnancy received CuO nanoparticle with concentrations 50, 100, 150, 200 mg/kg intraperitoneal injection. On day 17 pregnancy, brain, spleen and fetus weights were measured. Tissues for histopathological evaluation were stained with hematoxylin and eosin.

**Results:** Based on the macroscopic observations of embryos weight with increasing concentration of nanoparticle compared to control reduces its toxicity increased ( $P \leq 0.05$ ). Spleen only at concentration of 600 mg/kg showed significant changes compared to control ( $P \leq 0.05$ ). Histopathologic examination on brain and spleen following IP administration of CuO nanoparticle showed signs of cytotoxicity (congestion, necrosis, inflammatory cell infiltration, vacuolar degeneration) and (congestion, necrosis, increased hemosiderin) compared to control group, respectively.

**Conclusion:** The present study clearly showed that CuO-NPs can produce the histopathological abnormalities on brain and spleen tissues of NMRI mice in a dose-dependent manner.

**Keywords:** CuO nanoparticles, Cytotoxicity, Histopathology, Inflammatory cell infiltration, Necrosis, NMRI mice

\*Corresponding Author:

Address: Department of Cellular and Molecular Biology, faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

Email: b.alipour81@gmail.com

## ارزیابی تغییرات هیستوپاتولوژیکی مغز، طحال و جنین موش باردار نژاد NMRI تحت مواجهه با نانو ذره اکسید مس

باقر سید علیپور<sup>۱\*</sup>، نجمه بریمانی<sup>۲</sup>، عباسعلی دهبور جویباری<sup>۳</sup>، سید محمد حسینی<sup>۴</sup>

۱- استادیار، گروه زیست سلولی و مولکولی، دانشگاه مازندران، بابل، ایران

۲- کارشناس ارشد، گروه زیست سلولی و مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم شهر، قائم شهر، ایران

۳- استادیار، گروه زیست سلولی و مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم شهر، قائم شهر، ایران

۴- استادیار، گروه پاتوبیولوژی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل، بابل، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۶/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۳/۸/۲۱

### چکیده

**زمینه و هدف:** نانو مواد به دلیل ویژگی‌های جدیدشان از جمله مساحت سطحی ویژه و واکنش پذیری بالا توجه فزاینده‌ای را به خود جلب کرده‌اند. هدف از این مطالعه بررسی اثر سمیت نانو ذره اکسید مس بر مغز، طحال و جنین موش نژاد NMRI می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، ۴۲ موش سوری ماده بالغ ( $30 \pm 3$  گرم) به طور تصادفی به شش گروه (چهار گروه تجربی، یک گروه شم و یک گروه کنترل) تقسیم شدند. موش‌های گروه تجربی در روز ۳ و ۱۲ بارداری نانوذرات اکسید روی با غلظت‌های ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. در روز ۱۷ بارداری وزن مغز، طحال و جنین اندازه‌گیری شد. بافت‌ها جهت بررسی هیستولوژی با روش هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شدند.

**یافته‌ها:** بر اساس مشاهدات میکروسکوپی وزن جنین با افزایش غلظت‌های مختلف نانوذره در مقایسه با کنترل کاهش و اثر سمی آن افزایش یافت ( $p \leq 0.05$ ). طحال فقط در غلظت ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تغییرات معنی‌داری را در مقایسه با کنترل نشان داد. بررسی هیستوپاتولوژیک مغز و طحال پس از تزریق درون صفاقی نانوذره اکسید مس علائم سمیت سلولی (پرخونی، نکروز، ارتشاح سلول‌های التهابی، دژنراسانس واکوئولی) و پرخونی، نکروز و افزایش هموسیدرین را نسبت به گروه کنترل به ترتیب نشان داد.

**نتیجه‌گیری:** مطالعه حاضر به وضوح نشان داد نانوذره اکسید مس می‌تواند ناهنجاری‌های هیستوپاتولوژیک را در بافت مغز و طحال موش NMRI به طور وابسته به دوز ایجاد کند.

**واژگان کلیدی:** نانو ذره اکسید مس، سمیت سلولی، هیستوپاتولوژی، ارتشاح سلول‌های التهابی، نکروز، موش NMRI

**نویسنده مسئول:** مازندران، دانشگاه مازندران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست سلولی و مولکولی

Email: b.alipour81@gmail.com

## مقدمه

نانوذرات طبقه‌ای از مواد با ابعاد ۱ تا ۱۰۰ نانومتر هستند که خواص آنها با حالت توده تفاوت زیادی داشته که از آن جمله می‌توان به فضای سطحی بزرگ، انحلال‌پذیری و فعالیت بیشتر، تحرک بسیار زیاد در بدن انسان و توانایی نفوذ به غشا سلولی اشاره کرد، این امر سبب شده مقیاس نانو بیش از مقیاس‌های دیگر مورد توجه قرار بگیرد (۱). فناوری نانو شامل مطالعه کنترل ماده در مقیاس اتمی و مولکولی است به طوری که فعالیت سیستم‌های زنده اصولاً از رفتار مولکول‌ها در مقیاس‌های نانو ناشی می‌شود (۲). پیشرفت‌های اخیر در زمینه نانو تکنولوژی بیان کننده آن است که نانوذرات اکسید فلز می‌توانند در زمینه‌های مختلف از کاتالیز و مواد نوری- الکترونیکی گرفته تا حسگرها، پاکسازی محیط و زیست پزشکی مورد استفاده قرار گیرند. مطالعات نشان داد نانوذرات اثر ضد سرطانی بر روی میزان بقاء رده سلول‌های سرطانی در غلظت‌های میکرومولار دارند (۳). اخیراً، نشان داده شده است که نانوذرات اکسید مس و اکسید روی تأثیرات منفی بر بقاء و رشد موجودات زنده دارند (۴). با توجه به کاربردهای صنعتی نانوذره اکسید مس در کاهش اصطکاک، ترمیم سطوح فرسایش یافته، حسگرهای گاز، کاتالیزور، فوق رسانائی در دمای بالا و پوشش‌های فلزی توجه زیادی را به خود جلب کرده است (۵، ۶). انحلال‌پذیری و ویژگی مهمی است که دلایل تأثیرات سمی نانو ذرات در بسیاری از موجودات را شرح می‌دهد. نانوذرات اکسید مس ۴۵ یا ۵۰ بار سمی تر از اکسید مس توده‌ای می‌باشند. در محیط آبی طبیعی، نانوذرات اکسید فلز می‌توانند به صورت تجمع‌ی حضور داشته باشند که احتمالاً از یون‌های دو ظرفیتی ناشی می‌شود. بررسی‌ها نشان داد سمیت نانوذرات CuO مرتبط با انحلال‌پذیری می‌باشد (۷). این مطالعات بیان کننده آن است که استفاده روزافزون از نانوذرات منجر به آزادسازی آنها در محیط شده است و سمیت نانوذرات اکسید فلز بر موجودات عموم مردم و دانشمندان را نگران کرده است. مس سومین عنصر کمیاب فراوان بعد از روی و آهن در بدن انسان

می‌باشد. یک کاتیون بسیار موثر در واکنش‌های انتقال الکترون و اتصال به مولکول‌های آلی می‌باشد. مس برای تحنفس سلولی، تنظیم نوروترانسمیتر، سنتز کلاژن، متابولیسم مواد تغذیه‌ای به ویژه آهن ضروری است و هم‌چنین به عنوان آنتی اکسیدان علیه رادیکال‌های آزاد عمل می‌نماید. مس در تمام سلول‌های زنده وجود دارد و اکثراً به عنوان یک جزو آنزیم‌های مس دار و پروتئین‌های مس دار عمل می‌نماید. در سنتز کلاژن والاستین در بافت پیوندی به آنزیم‌های حاوی مس از جمله لیزیل اکسیداز نیاز است (۸). فاکتورهای کلیدی در ارزیابی خطر بعد از مواجهه با نانوذره، اندازه نانو، سطح نانو، انحلال پذیری، خودتجمعی، نوساختارها، غلظت و تجمع، مقدار و روش مواجهه می‌باشند (۹). درک این مسئله که چطور این فاکتورها سمیت نانومواد را تحت تأثیر قرار می‌دهند، اهمیت فراوانی دارد. در مورد نانوذرات اکسید مس، فاکتورهای اصلی که مدنظر قرار گرفته‌اند شامل اندازه، ویژگی‌های سطح، انحلال‌پذیری و روش‌های مواجهه می‌باشند. روش‌های مواجهه مختلف می‌تواند منجر به تأثیرات متفاوت شود. نانوذرات اکسید فلز می‌توانند از طریق دهانی، بینی، پوست و نائی و دیگر روش‌ها تجویز شوند (۹). مکانیزم ورود نانوذره اکسید مس به داخل سلول از طریق کانال‌های یونی و پروتئین‌های انتقال دهنده انجام می‌شود و این امکان برای نانوذرات فراهم می‌آورد تا از عرض غشا پلاسمائی عبور کنند. برخی نانوذرات از طریق اندوستیوز وارد سلول‌ها می‌شوند به این صورت که غشا اطراف آنها را احاطه نموده و وزیکول‌ها نانوذرات را به درون سلول‌ها انتقال می‌دهند. هم‌چنین اکسید مس حل شده از نانوذرات می‌تواند از طریق انتقال و کانال‌های دریچه دار ولتاژ- یون وارد سلول‌ها شوند (۱۰-۱۲). پزشکی نانو در واقع کاربرد فناوری نانو در جهت پیش‌گیری و درمان بیماری‌ها است. آزمایش‌های تشخیصی، شیمی درمانی، تزریق‌های بدون سوزن، سنسورهای مختلف پزشکی و سیستم‌های تحویل دارو در بافت‌های بدن از کاربردهای ثبت شده نانو در پزشکی هستند. یکی از رویکردهای استفاده از این ذرات در علم پزشکی، کاربرد

بافت‌های بدن اندک است، بررسی سمیت آنها از موارد مهم و قابل مطالعه به شمار می‌رود. با توجه به اهمیت موضوع، در این تحقیق به بررسی و مطالعه اثر سمیت نانوذرات اکسید مس بر تغییرات هیستوپاتولوژی طحال و مغز موش باردار نژاد NMRI پرداختیم.

### مواد و روش‌ها

جهت انجام این مطالعه از نانو اکسید مس ۲۰ نانومتر و موش نژاد NMRI استفاده شد. نانو اکسید مس مورد استفاده در این آزمایش از شرکت نانسونی (ایران- مشهد) تهیه شد که به شکل پودر سیاه رنگی با ذراتی به ابعاد ۲۰ نانومتر و دارای خلوص ۹۹ درصد بود. مشخصات کامل نانو اکسید مس در جدول ۱ آورده شده است.

وریدی و ورود مستقیم آنها به جریان خون است (۱۳). برای دارورسانی به مغز باید بر سد خونی-مغزی (Blood Brain Barrier) غلبه نمود. نانوذرات به علت ویژگی‌های از قبیل قابلیت عبور از رگ‌ها (قطر ذرات در حد نانومتر)، عمر طولانی در خون و عدم اثر ماکروفاژ بر آنها، غیر تهاجمی بودن برای مغز و قابلیت انتقال دارو به داخل سلول گزینه مناسبی برای انتقال می‌باشند (۱۴). بنابراین نانوذرات برای انتقال داروهایی که نفوذ کمی به سلول‌های مغزی دارند استفاده می‌شوند. با توجه به اندازه‌ی کوچک این ذرات، آنها آزادانه در عروق خونی حرکت می‌کنند و به بافت مغزی وارد می‌شوند. در نتیجه دارورسانی به مغز از راه نانوذرات می‌تواند یکی از شاخه‌های قابل پیشرفت برای درمان بیماری‌ها با کمک فناوری نانو باشد. از این رو و با توجه به این که پژوهش‌ها در مورد اثرات نانوذرات بر

جدول ۱. مشخصات نانو ذره اکسید مس

نوع نانوذره	اندازه نانوذره	سطح ویژه	درصد خلوص	شکل ظاهری	چگالی واقعی
CuO	۲۰ نانومتر	۲۵ m <sup>2</sup> /g	۹۹	سیاه	۶/۴ g/m <sup>3</sup>

شود که در ابتدای آزمایش ضروری می‌باشد زیرا باید از کمترین حد کشندگی برای تزریق به جانور استفاده شود (۱۵).

در این آزمایش ۵ موش ماده بالغ و ۳ موش نر بالغ در قفس قرار داده شدند. آمیزش معمولاً در نیمه‌های شب انجام می‌گرفت و منجر به ایجاد پلاک واژنی می‌شد. پلاک واژنی مخلوطی از ترشحات منعقد کننده و ترشحات کیسه‌های منی جنس نر است که سفت شده و دهانه واژن را می‌پوشاند. مشاهده پلاک واژنی نشانه خوبی برای تایید جفت‌گیری است، البته نشانه دقیق لقاح نیست. معمولاً ۷۰ درصد موارد پلاک واژنی مشاهده شده همراه با حاملگی می‌باشد. با مشاهده پلاک واژنی در صبح روز بعد، روز صفر حاملگی در نظر گرفته شد و موش‌های ماده در قفس جداگانه نگهداری شدند و سپس تزریق بعد از مشاهده پلاک واژنی انجام شد. به گروه‌های تیمار، نانو اکسید مس با قطر ۲۰ نانومتر و با غلظت ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰، ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز ۳ و ۱۲ بارداری با حجم ۰/۴ میلی‌لیتر با

این مطالعه روی موش‌های بالغ نر و ماده نژاد NMRI با دامنه وزنی  $30 \pm 3$  گرم و میانگین سنی ۸-۷ هفته انجام شد. پس از انتقال موش‌ها از انستیتو پاستور آمل به حیوان خانه دانشکده علوم پزشکی بابل، ۴۲ سرموش سوری ماده به ۶ گروه ۷ تایی به صورت تصادفی تقسیم شدند. حیوانات در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، حرارت  $23 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و دسترسی کافی به آب و غذا نگهداری شده و به طور تصادفی به چهار گروه تجربی، یک گروه شم و یک گروه کنترل تقسیم شدند. مقدار مورد نیاز از پودر نانو اکسید مس با توجه به دوزی که به موش تزریق خواهد شد، بر حسب میلی‌گرم وزن شده و در درون ویال با مقدار معینی از آب مقطر استریل دوبار تقطیر مخلوط شد و سپس ویال به مدت چند دقیقه ورتکس شد تا محتویات آن به خوبی حل شود. سپس محلول سیاه رنگ با سرنگ انسولینی کشیده و به حیوان تزریق گردید. برای مشخص کردن این که چه مقدار از نانو اکسید مس باید مورد استفاده قرار گیرد LD<sub>50</sub> باید تعیین

اختلاف در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

سرنگ انسونینی و به گروه شم ۰/۴ میلی لیتر آب مقطر تزریق شد. از شروع تیمار تا پایان آزمایش، هر سه روز وزن موش‌ها اندازه‌گیری شد.

بررسی هیستوپاتولوژی:

#### یافته‌ها

نتایج بررسی اثر نانوذره اکسید مس با اندازه ۲۰ نانومتر به صورت تزریق درون صفاقی به موش بارداری نژاد NMRI نشان داد که میانگین تغییرات وزن گروه کنترل، شم و گروه تیمار در W1 در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار نبود. میانگین وزن موش‌ها در W4 در گروه کنترل و شم به ترتیب  $33/47 \pm 1/77$  و  $33/57 \pm 0/98$  گرم بوده که نسبت به دوز بالا ( $600$  میلی گرم بر کیلو گرم)  $25/33 \pm 1/33$  گرم بوده که در سطح احتمال ۵ درصد نسبت به هم اختلاف معنی‌دار را نشان دادند (جدول ۲). هم‌چنین وزن موش‌ها در W5 در غلظت  $600$  میلی گرم بر کیلوگرم  $32/08 \pm 1/57$  گرم بوده که نسبت به گروه کنترل و شم اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد (جدول ۲). در W6 هم اختلاف معنی‌داری در غلظت بالا با کنترل مشاهده شد. همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود در بقیه غلظت‌ها تغییرات میانگین وزن نسبت به کنترل در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار نبود.

جهت بررسی هیستوپاتولوژی در روز ۱۷ بارداری بعد از کالبد شکافی جنین‌ها، طحال و مغز جداسازی و وزن آنها اندازه‌گیری گردید. مغز و طحال در درون شیشه‌های محتوی محلول بوئن تثبیت شدند و پس از آب‌گیری با الکل به وسیله گزلیل باقیمانده الکل خارج شده و توسط دستگاه آماده ساز بافت بلوک پارافینی تهیه گردید و با میکروتوم از بلوک‌ها برش با ضخامت ۵ میکرون تهیه و با روش هماتوکسیلین-اؤزین رنگ آمیزی شدند.

در پایان تجزیه و تحلیل با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ انجام شد. محاسبه میانگین مشاهدات مربوط به وزن طحال، مغز و جنین از طریق آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ انجام گردید و تجزیه و تحلیل برای صفات وزن w1 تا w6 به روش GLM (مدل‌های خطی کلی) و داده‌های تکرار شده در زمان انجام گردید. سپس با استفاده از نرم افزار Excel هیستوگرام‌ها رسم شد. مقادیر به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار محاسبه گردید و

جدول ۲. مقایسه میانگین وزن موش‌های (گرم) نژاد NMRI پس از تیمار با غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید مس

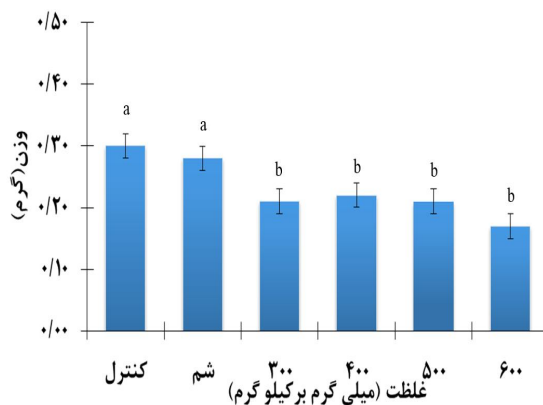
غلظت وزن گروه‌ها	کنترل	شم	۳۰۰ mg/kg	۴۰۰ mg/kg	۵۰۰ mg/kg	۶۰۰ mg/kg
W1	$28/33 \pm 0/84^{ab}$	$30/83 \pm 0/83^a$	$28/88 \pm 0/36^{ab}$	$30/03 \pm 0/47^{ab}$	$30/70 \pm 0/79^a$	$29/43 \pm 0/69^{ab}$
W2	$29/97 \pm 0/68^b$	$32/20 \pm 0/72^b$	$28/14 \pm 0/23^b$	$29/80 \pm 0/27^b$	$29/85 \pm 0/63^b$	$28/25 \pm 1/13^b$
W3	$31/67 \pm 1/20^{ab}$	$32/00 \pm 1/15^a$	$28/20 \pm 0/37^c$	$30/57 \pm 0/20^{ab}$	$30/25 \pm 0/48^{ab}$	$29/75 \pm 0/75^{bc}$
W4	$33/47 \pm 1/77^a$	$33/57 \pm 0/98^a$	$25/80 \pm 0/66^{cd}$	$30/97 \pm 0/32^{ab}$	$28/50 \pm 0/50^{abc}$	$25/33 \pm 1/33^d$
W5	$41/33 \pm 4/18^a$	$39/50 \pm 1/50^{ab}$	$30/82 \pm 1/87^c$	$33/21 \pm 1/27^{bc}$	$34/03 \pm 0/79^{bc}$	$32/08 \pm 1/57^c$
W6	$44/83 \pm 7/12^{ab}$	$46/45 \pm 0/84^a$	$32/42 \pm 2/88^a$	$34/84 \pm 2/29^{abc}$	$36/50 \pm 2/87^{abc}$	$33/75 \pm 3/82^{bc}$

(W1) وزن موش‌ها قبل از شروع بارداری؛ (W2) الی (W6) وزن موش‌ها در دوران بارداری هر سه روز وزن موش‌ها اندازه‌گیری شد، تزریق با غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید مس به حجم ۰/۴ میلی لیتر در روزهای سوم و دوازدهم بارداری انجام شد و به گروه شم هم ۰/۴ میلی لیتر آب مقطر تزریق شد و در روز هفدهم موش‌ها تشریح شدند. یافته‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار نشان داده شده‌اند. میانگین‌ها با کد حرف‌های متفاوت در هر ردیف دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند و اختلاف در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

درصد نسبت به کنترل و شم معنی‌دار نمی‌باشد. بررسی انجام شده بر وزن طحال در غلظت‌های مختلف نانو ذره اکسید مس نشان داد که وزن طحال در همه غلظت‌ها افزایش جزئی

همان‌طور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود در اثر تزریق نانو ذره اکسید مس با غلظت‌های مختلف سبب کاهش در وزن مغز شد که این کاهش در سطح احتمال ۵

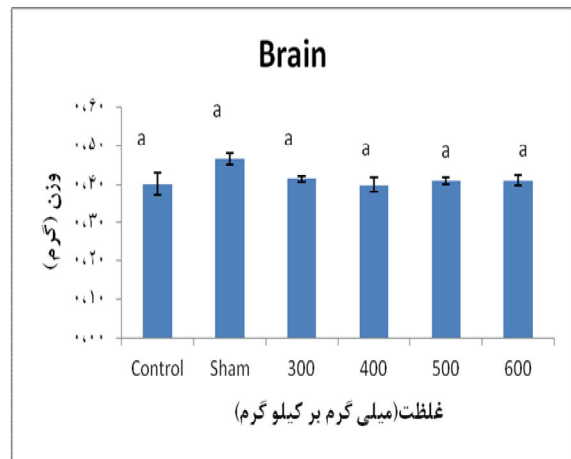
مشاهدات ماکروسکوپی نشان داد که وزن جنین‌ها و تعداد جنین‌ها با افزایش غلظت‌های مختلف نانو ذره در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت و هم‌چنین با افزایش غلظت نانوذره اثر سمی آن نیز افزایش داشت به طوری که کمترین تعداد بارداری را در بالاترین غلظت یعنی ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده کردیم (نمودار ۳).



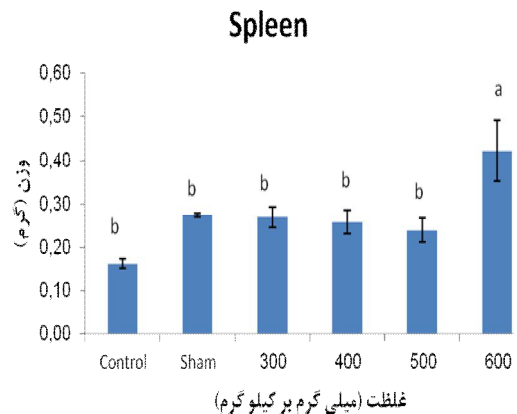
نمودار ۳. مقایسه میانگین وزن جنین موش‌های نژاد NMRI پس از ۱۷ روز تیمار با غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید مس و در روز هفدهم موش‌ها تشریح شدند. یافته‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار نشان داده شده‌اند. میانگین‌ها با کد حرف‌های متفاوت، دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشد و اختلاف در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

نتایج مطالعه هیستوپاتولوژی بر روی موش باردار نژاد NMRI نشان داد که نانو ذره اکسید مس بر روی طحال اثر گذاشت و باعث پر خونی، نکروز و افزایش هموسیدرین در غلظت‌های مختلف با شدت متفاوت شد (شکل ۱). همان طوری که در شکل ۲ مشاهده می‌شود تزریق اکسید مس باعث دژنراسیون سلول‌های آماسی، افزایش ضخامت منتر و نورو ن‌های مرده در بافت مغز می‌شود.

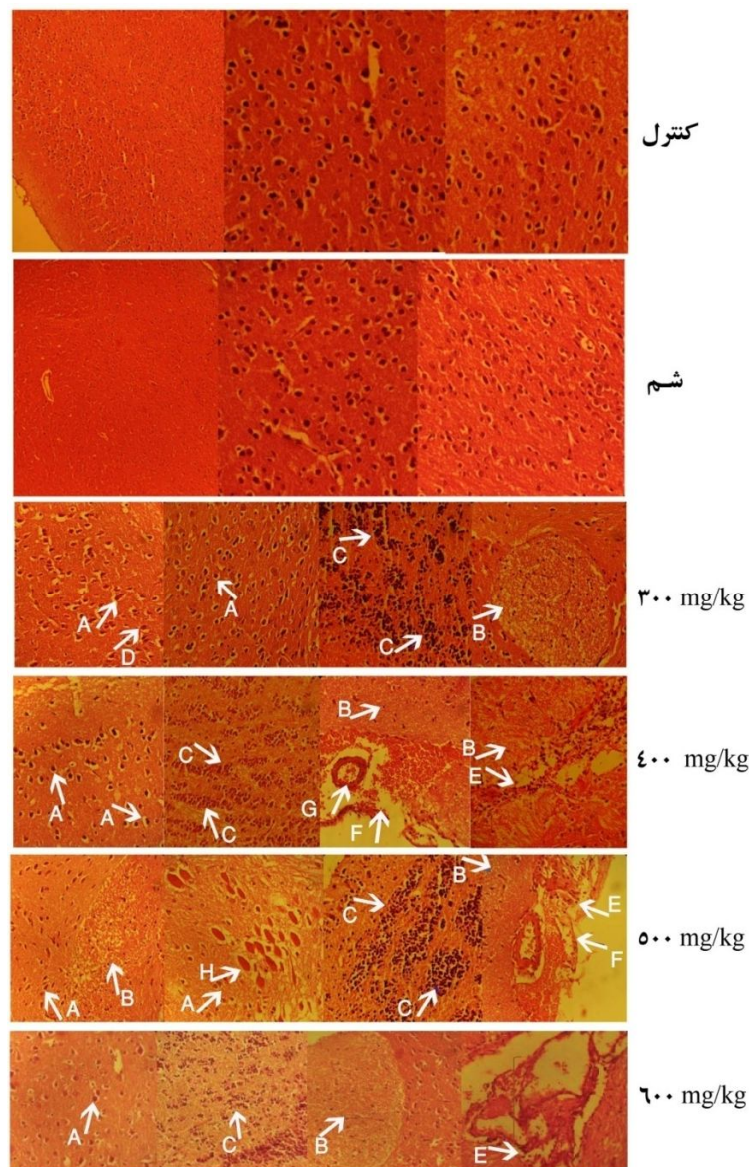
داشت اما این افزایش وزن معنی‌دار نبود فقط در غلظت ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تغییرات معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد با کنترل و شم مشاهده شد (نمودار ۲).



نمودار ۲. مقایسه میانگین وزن مغز موش‌های نژاد NMRI پس از تیمار با غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید مس و در روز هفدهم موش‌ها تشریح شدند. یافته‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار نشان داده شده‌اند. میانگین‌ها با کد حرف‌های متفاوت، دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشد و اختلاف در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

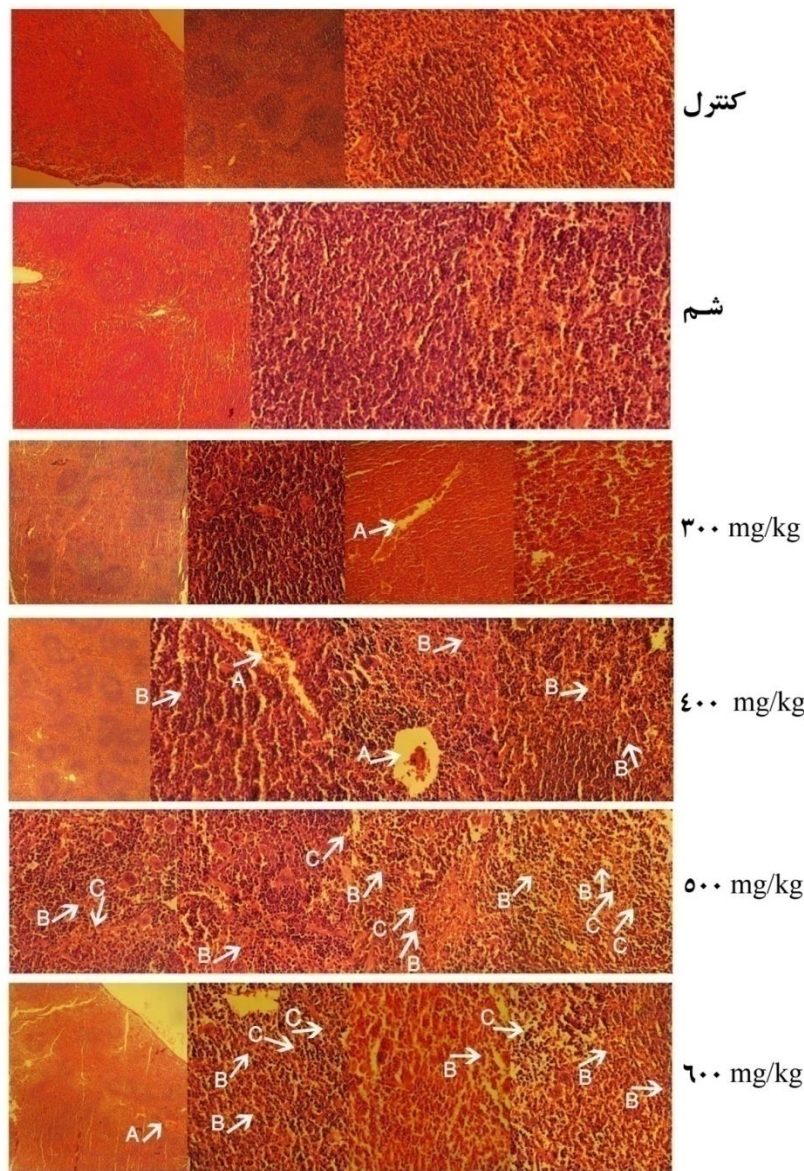


نمودار ۱. مقایسه میانگین وزن طحال موش‌های نژاد NMRI پس از تیمار با غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید مس و در روز هفدهم موش‌ها تشریح شدند. یافته‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار نشان داده شده‌اند. میانگین‌ها با کد حرف‌های متفاوت، دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشد و اختلاف در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار در نظر گرفته شدند.



شکل ۱. بررسی تغییرات هیستوپاتولوژی مغز بعد از مواجهه با غلظت های مختلف نانوذره اکسید مس (الف) گروه کنترل. بافت نرمال مغز. رنگ آمیزی H&E. بزرگنمایی  $40\times$ ،  $4\times$  (ب) گروه شم. بافت نرمال مغز. رنگ آمیزی H&E. بزرگنمایی  $40\times$ ،  $4\times$  (ج) گروه تیمار  $300\text{ mg/kg}$ ،  $4\times$ ،  $40\times$ ؛ A: دژنراسانس واکونولی، B: نکروز، C: گلیوز، D: هیپرتروفی نورونی بزرگنمایی  $40\times$  (د) گروه تیمار  $400\text{ mg/kg}$ ،  $4\times$ ،  $40\times$ ؛ A: دژنراسانس واکونولی، B: نکروز، C: گلیوز، E: اینفیلتریشن سلول های آماسی، F: افزایش ضخامت مننژ بزرگنمایی  $40\times$  (و) گروه تیمار  $500\text{ mg/kg}$ ،  $4\times$ ،  $40\times$ ؛ A: دژنراسانس واکونولی، B: نکروز، C: گلیوز، E: اینفیلتریشن سلول های آماسی، F: افزایش ضخامت مننژ H: نوروهای مرده، بزرگنمایی  $40\times$  (ه) گروه تیمار  $600\text{ mg/kg}$ ،  $4\times$ ،  $40\times$ ؛ A: دژنراسانس واکونولی، B: نکروز، C: گلیوز، E: اینفیلتریشن سلول های آماسی بزرگنمایی  $40\times$





شکل ۲. بررسی تغییرات هیستوپاتولوژی طحال بعد از مواجهه با غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید مس

الف) گروه کنترل. بافت نرمال طحال. رنگ آمیزی H&E. بزرگنمایی  $40 \times 10 \times$ ،  $4 \times$  بزرگنمایی (ب) گروه شم. بافت نرمال طحال. رنگ آمیزی H&E. بزرگنمایی  $40 \times 10 \times$ : A: پرخونی B: نکروز بزرگنمایی  $40 \times 10 \times$  (ج) گروه تیمار  $300 \text{ mg/kg}$ : A: پرخونی B: نکروز بزرگنمایی  $40 \times 10 \times$  (د) گروه تیمار  $400 \text{ mg/kg}$ : A: پرخونی B: نکروز بزرگنمایی  $40 \times 10 \times$  (ه) گروه تیمار  $500 \text{ mg/kg}$ : A: پرخونی B: نکروز C: افزایش هموسیدرین، بزرگنمایی  $40 \times$  (و) گروه تیمار  $600 \text{ mg/kg}$ : A: پرخونی B: نکروز C: افزایش هموسیدرین بزرگنمایی  $40 \times$

## بحث

در پژوهش حاضر اثر سمیت نانوذره اکسید مس با قطر ۲۰ نانومتری برای ارزیابی ضایعات هیستوپاتولوژی مغز و طحال و بررسی تغییرات وزن جنین، مغز و طحال به صورت تزریق درون صفاقی مورد بررسی قرار گرفته است. با توجه به این که در موجودات زنده، Cu یکی از عناصر ضروری برای حفظ هموستاز می‌باشد (۱۶) و یون‌های Cu

زمانی که از آستانه تحمل فیزیولوژیکی موجود زنده تجاوز کنند، ممکن است باعث سمیت شوند، بنابراین تأثیر در سلامتی و سمیت احتمالی نانوذرات CuO باعث نگرانی شدید عموم مردم و محققان شده است (۱۷، ۱۸). در این مطالعه تزریق درون صفاقی نانو اکسید مس باعث تغییر در وزن موش در مدت آزمایش شد. مطالعه ما نشان داد تغییرات میانگین وزن موش‌های تیمار شده در w1 و w2



داد که نانو ذره اکسید مس در غلظت‌های مختلف باعث آسیب با شدت متفاوت به بافت مغز شد. همان طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلو گرم پرخونی خفیف (mild) مشاهده شد و با افزایش غلظت پر خونی به صورت متوسط (moderate) در مغز موش ظاهر شد. گلیوز به صورت شدید (severe) در تمام غلظت‌ها مشاهده شد و دژنراسانس واکوئولی و نکروز در غلظت بالا به صورت شدید مشاهده شد در صورتی که در بقیه غلظت‌ها به صورت متوسط می‌باشد. ارتشاح سلول‌های آماسی در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده نشد ولی با افزایش غلظت به صورت متوسط دیده شد. بنابراین آسیب‌های بافت مغز شامل پرخونی، نکروز، دژنراسانس واکوئولی، گلیوز می‌باشد در حالی که در بقیه غلظت‌ها علاوه بر آسیب‌های ذکر شده ورود سلول‌های التهابی و منژیته مشاهده می‌شود که همه اینها نشانه‌های مرگ سلول‌های نورونی می‌باشد. در ضمن با افزایش غلظت‌های نانو ذره اکسید مس آسیب‌های بافتی مغز شدیدتر شده است که نشان دهنده اثر این نانو ذره بر بافت مغز می‌باشد.

اندازه نانوذرات ارتباط مستقیم با بسیاری از ویژگی‌ها از جمله ویژگی سطح، انحلال‌پذیری و واکنش‌پذیری دارند که می‌توانند رفتارهای سمیت نانو ذره را در موجود زنده تحت تأثیر قرار دهند (۲۱). برای مثال، کاهش اندازه منجر به افزایش مساحت سطح ویژه نانوذرات می‌شود که نه تنها تجمع نانوذرات را افزایش می‌دهد، بلکه باعث افزایش واکنش‌پذیری و میان‌کنش‌های بین نانوذرات و زیست مولکول‌ها می‌شود. مطالعات نشان داد که نانو ذرات با توجه به اندازه شان قادر به عبور از سلول‌های بیولوژیکی مانند غشاء و سدهای خونی مغزی و جفت می‌باشند (۲۲). هم‌چنین گزارش شده نانوذرات به دلیل ابعاد کوچکشان می‌توانند از عرض روده کوچک عبور کرده و در خون، مغز، کلیه و کبد منتشر شوند (۲۳، ۲۴). در ضمن، برخی مطالعات نشان داده است که نانوذرات می‌توانند از طریق تزریق درون بینی به مغز برسند که مانع از تأثیر حفاظتی سد خونی - مغزی می‌شود. از طریق این روش،

اختلاف معنی‌داری را در سطح احتمال ( $p \leq 0/05$ ) با کنترل و شم نشان نداد در حالی که در  $w_3$ ،  $w_4$ ،  $w_5$  و  $w_6$  غلظت بالا (۶۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل و شم مشاهده شد ( $p \leq 0/05$ ). همان طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود در بقیه غلظت‌ها تغییرات معنی‌داری نسبت به گروه کنترل و شم مشاهده نشد. بنابراین نتایج مطالعه ما نشان دهنده اثر نانو ذره اکسید مس بر رشد موش در غلظت بالا می‌باشد که این نتایج موافق با اثر نانوذرات اکسید آهن می‌باشد که به موش‌های سوری باردار به صورت درون صفاقی تزریق شد (۱۹). به منظور بررسی اثر نانو ذره بر تغییرات میانگین وزن مغز و طحال موش‌های باردار نژاد NMRI، در مطالعه حاضر اثر آن را در غلظت‌های مختلف نانو ذره اکسید مس ۲۰ نانومتری مطالعه کردیم. بررسی میانگین وزن مغز در غلظت‌های مختلف نانو ذره اکسید مس نشان داد که هیچ تغییر قابل ملاحظه‌ای در سطح ۰/۰۵ نسبت به کنترل و شم مشاهده نشد. هم‌چنین بررسی انجام شده بر تغییرات میانگین وزن طحال در موش نژاد NMRI نشان داد که وزن طحال در همه غلظت‌های نانو ذره اکسید مس نسبت به گروه کنترل افزایش پیدا کرده به طوری که فقط در غلظت ۶۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در سطح  $p \leq 0/05$  افزایش معنی‌داری را نشان داد (نمودار ۲). مشاهدات ماکروسکوپی نشان داد که وزن جنین‌ها و تعداد جنین‌ها با افزایش غلظت‌های مختلف نانو ذره در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت و هم‌چنین با افزایش غلظت نانوذره اثر سمی آن نیز افزایش داشت به طوری که کمترین تعداد بارداری را در بالاترین غلظت یعنی ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده کردیم (نمودار ۳). مطالعات ارزیابی سمیت در ابتدا بر بررسی تأثیرات روش‌های مختلف مواجهه از جمله مجاری تنفسی یا گوارشی (معدی - روده‌ای) متمرکز شده بود. بررسی هیستولوژی نشان داد که تزریق درون نائی نانوذرات CuO در دوزهای بالا تغییرات التهابی بسیار حاد و در دوزهای پایین به دنبال تزریق مکرر تغییرات مزمن را در ریه موش صحرائی القاء می‌کند (۲۰). نتایج مطالعه هیستولوژی بر روی موش باردار نژاد NMRI نشان

دیگر اندام‌هایی که در آنها تجمع می‌یابند، حمل شوند. بررسی القاء التهاب در سلول‌های اندوتلیال عروق نشان داد که نانو ذرات وارد شده به عروق منجر به سمیت قابل توجه سلولی به همراه پاسخ التهابی مشخص می‌شود.

### نتیجه گیری

جهت اطمینان از این که نانو ذرات برای موجودات و محیط بی خطر است، سمیت باید تا مقادیر اندک کاهش یابد. دست‌یابی به این هدف نیازمند مطالعه بیشتر است که بر فاکتورهای سمیت نانو ذرات اکسید فلز متمرکز شوند. نتایج ما نشان داد نانو اکسید مس با تجمع و اثرات سمی خود به ویژه در دوزهای بالا منجر به دژنره شدن و نکروزه شدن سلول‌ها و بافت‌های مغز و طحال می‌شود. بنابراین می‌توان از این نتایج برای افزایش ایمنی و سلامت انسان در برابر اثر سمیت نانو ذرات استفاده کرد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه دوره کارشناسی ارشد خانم نجمه بریمانی با عنوان تاثیر نانو ذرات اکسید مس بر موش باردار نژاد NMRI می‌باشد. بدین وسیله از جناب آقای مهندس افخمی که در آنالیز آماری و کارشناس آزمایشگاه مرکزی آقای مجید قاسمی در تهیه نمونه‌ها و بافت‌ها ما را یاری نمودند نهایت تشکر به عمل می‌آید.

### منابع

1. Warheit DB, Hoke RA, Finlay C, Donner EM, Reed KL, Sayes CM. Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO<sub>2</sub> particles as a component of nanoparticle risk management. *Toxicology letters*. 2007; 171(3): 99-110.
2. Drexler KE. *Nanosystems: molecular machinery, manufacturing, and computation*. John Wiley & Sons, Inc.; 1992.
3. Mahdavidrad M, Najafzadeh N, Ali Niapour A, Jafari A. Cytotoxicity of ZnO and Ag/ZnO nano-composites on malignant melanoma cell line (A375). *Arak Medical University Journal*. 2014; 17(6):74-83.[Persian]

ذرات یا یون‌های فلزی کوچک به طور مستقیم از طریق موکوس بینی وارد چرخه خون شده و از طریق انتقال آکسونی بین نورون وارد پیاز بویائی و به دنبال آن به طور مستقیم از طریق اپی تلیوم پیاز بویائی وارد مغز می‌شود (۲۵)، (۲۶). مطالعات چانک و همکاران نتایج ما را حمایت می‌کند که نانو ذرات اکسید فلزی می‌توانند وارد رگ‌ها و بافت‌های مغز شوند و از این طریق می‌توانند قابلیت دسترسی زیستی را افزایش دهند. این مسئله ممکن است منجر به تأثیرات سمی و پاسخ‌های التهابی در مغز و تخریب سیستم عصبی مرکزی شود (۲۷). بررسی ما نشان داد نانو اکسید مس در دوزهای بالا با تجمع خود باعث ممانعت از رشد و تکثیر سلول‌ها و با اثرات سمی منجر به پرخونی، انفیلتراسیون، دژنره شدن و نکروزه شدن سلول‌ها و بافت می‌شود. هم‌چنین گزارش شده دوزهای بالا نانو ذره اکسید مس باعث نکروزه شدن بافت کبد و کلیه نسبت به دوز پایین می‌شود (۲۸) که این نتایج در راستای یافته‌های ما می‌باشد.

ارزیابی آسیب و ضایعات هیستوپاتولوژیک بر روی موش باردار نژاد NMRI نشان داد که نانو ذره اکسید مس در غلظت‌های مختلف باعث آسیب‌های متفاوتی به بافت طحال شده به طوری که در تمام غلظت‌های اکسید مس پرخونی به صورت متوسط در بافت طحال مشاهده شد در صورتی که در غلظت‌های ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نکروزه شدن و افزایش هموسیدرین به صورت خفیف مشاهده شد. با افزایش غلظت به ویژه در غلظت ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ضایعات بیشتری مشاهده شده که نشان دهنده اثر نانو ذره در دوزهای بالاتر می‌باشد. چن و همکاران گزارش دادند که نانو ذره اکسید مس در دوزهای مختلف بر روی کلیه و طحال اثر گذاشته و باعث تغییرات ساختاری و پاتوبیولوژیک در آنها می‌شود و هم‌چنین سمیت نانو ذرات Cu برای بافت‌های معده و کلیه از طریق افزایش H<sup>+</sup> و تولید زیاد HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> به وجود می‌آید (۲۹). بنابراین در مورد نانو ذرات اکسید فلز، مویرگ‌های خونی و بافت لنفی نقش‌های مهمی را در قابلیت جذب ایفا می‌کنند و نانو ذرات وارد شده به مویرگ‌های خونی یا بافت لنفی ممکن است به

4. Nations S, Wages M, Cañas JE, Maul J, Theodorakis C, Cobb GP. Acute effects of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub>, ZnO and CuO nanomaterials on *Xenopus laevis*. *Chemosphere*. 2011; 83(8): 1053-61.
5. Chowdhuri A, Gupta V, Sreenivas K, Kumar R, Mozumdar S, Patanjali P. Response speed of SnO<sub>2</sub>-based H<sub>2</sub>S gas sensors with CuO nanoparticles. *Applied Physics Letters*. 2004; 84(7): 1180-2.
6. Jammi S, Sakthivel S, Rout L, Mukherjee T, Mandal S, Mitra R, et al. CuO nanoparticles catalyzed C–N, C–O, and C–S cross-coupling reactions: Scope and mechanism. *The Journal of organic chemistry*. 2009;74(5):1971-6.
7. Mortimer M, Kasemets K, Kahru A. Toxicity of ZnO and CuO nanoparticles to ciliated protozoa *Tetrahymena thermophila*. *Toxicology*. 2010;269(2):182-9.
8. Tapiero H, Tew KD. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2003;57(9):399-411.
9. Yan L, Zhao F, Li S, Hu Z, Zhao Y. Low-toxic and safe nanomaterials by surface-chemical design, carbon nanotubes, fullerenes, metallofullerenes, and graphenes. *Nanoscale*. 2011; 3(2):362-82.
10. Nel AE, Mädler L, Velegol D, Xia T, Hoek EM, Somasundaran P, et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nature materials*. 2009;8(7):543-57.
11. Ho C-L, Teo S-S, Rahim RA, Phang S-M. Transcripts of *Gracilaria changii* that improve copper tolerance of *Escherichia coli*. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*. 2010; 18(3): 315-9.
12. Colvin RA, Fontaine CP, Laskowski M, Thomas D. Zn<sup>2+</sup> transporters and Zn<sup>2+</sup> homeostasis in neurons. *European journal of pharmacology*. 2003; 479(1):171-85.
13. Borm PJ, Kreyling W. Toxicological hazards of inhaled nanoparticles-potential implications for drug delivery. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2004; 4(5): 521-31.
14. Thassu D, Deleers M, Pathak YV. Nanoparticulate drug delivery systems: CRC Press; 2007.
15. Parivar K, Hayati Roodbari N, Badiyee A, Nejadfazel M. Effect of nano zinc oxide on the fore limb bud of NMRI mouse embryos in vivo. *Medical Sciences Journal of Islamic Azad University/Tehran Medical Branch*. 2013; 23 (3):161-7.[Persian]
16. Galhardi C, Diniz Y, Rodrigues H, Faine L, Burneiko R, Ribas B, et al. Beneficial effects of dietary copper supplementation on serum lipids and antioxidant defenses in rats. *Annals of nutrition and metabolism*. 2005; 49(5):283-8.
17. Zietz BP, Dieter HH, Lakomek M, Schneider H, Keßler-Gaedtke B, Dunkelberg H. Epidemiological investigation on chronic copper toxicity to children exposed via the public drinking water supply. *Science of the Total Environment*. 2003;302(1):127-44.
18. Galhardi CM, Diniz YS, Faine LA, Rodrigues HG, Burneiko R, Ribas BO, et al. Toxicity of copper intake: lipid profile, oxidative stress and susceptibility to renal dysfunction. *Food and chemical toxicology*. 2004; 42(12):2053-60.
19. Noori A, Parivar K, Modaresi M, Messripour M, Yousefi MH, Amiri GR. Effect of magnetic iron oxide nanoparticles on pregnancy and testicular development of mice. *African journal of biotechnology*. 2013; 10(7): 1221-7.
20. Yokohira M, Hashimoto N, Yamakawa K, Suzuki S, Saoo K, Kuno T, et al. Lung carcinogenic bioassay of CuO and TiO<sub>2</sub> nanoparticles with intratracheal instillation using F344 male rats. *Journal of toxicologic pathology*. 2009;22(1):71-2.
21. Risha GA, Boyer E, Evans B, Kuo KK, Malek R, editors. Characterization of Nano-Sized Particles for Propulsion Applications. MRS fall meeting. 2003 ; 800 : 243-54.
22. Zhao, Y, Meng, H, Chen, Z, Feng, Z, Chai Z. Dependence of nanotoxicity on nanoscale characteristics and strategies for reducing and eliminating nanotoxicity. In: *Nanotoxicology*. Zhao Y, Singh NH, Eds. American Scientific Publisher: Valencia, CA, USA, 2007. p. 265-80.
23. Kwon J-T, Hwang S-K, Jin H, Kim D-S, Minai-Tehrani A, Yoon H-J, et al. Body distribution of inhaled fluorescent magnetic nanoparticles in the mice. *Journal of occupational health*. 2008;50(1):1-6.

24. 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; 29(12): 1912-9.
25. Cheng Q, Feng J, Chen J, Zhu X, Li F. Brain transport of neurotoxin-I with PLA nanoparticles through intranasal administration in rats: a microdialysis study. *Biopharmaceutics & drug disposition*. 2008; 29(8):431-9.
26. Wang J, Liu Y, Jiao F, Lao F, Li W, Gu Y, et al. Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Toxicology*. 2008; 254(1):82-90.
27. Chang Y-N, Zhang M, Xia L, Zhang J, Xing G. The toxic effects and mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles. *Materials*. 2012; 5(12): 2850-71.
28. Cavanagh N, Judson G. Copper oxide powder as a copper supplement for sheep. *Journal of trace elements and electrolytes in health and disease*. 1994;8(3-4):183-8.
29. Chen Z, Meng H, Xing G, Chen C, Zhao Y, Jia G, et al. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. *Toxicology letters*. 2006; 163(2):109-20.