

مطالعه هیستوپاتولوژی و بیوشیمیایی تاثیر نانوذرات اکسید روی بر بافت کلیه موش صحرایی



سیدمحمد حسینی^{۱*}، رضا امانی^۲، سیدوحید رضوی مهر^۲، امیرحسین مشرفی^۲، محمدحسن آقاجانی خواه^۲

(۱) گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دام پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل، بابل، ایران

(۲) گروه دام پزشکی، دانشکده دام پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل، بابل، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۳/۷

چکیده

مقدمه: نانوذرات اکسید روی برای اهداف صنعتی و خانگی استفاده می شود که می تواند موجب آلودگی گسترده محیط زیست شود. در این مطالعه تاثیر نانوذرات اکسید روی بر هیستوپاتولوژی، تجمع زیستی نانوذرات، شاخص بیوشیمیایی سرم و آسیب اکسیداتیو بافت کلیه مورد بررسی قرار گرفت. **مواد و روش ها:** در این مطالعه تجربی ۸۰ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار در هشت گروه شامل کنترل، شش دریافت کننده سالیسین و پنج گروه دریافت کننده نانوذرات اکسید روی (۴، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم/کیلوگرم) به مدت ۲۸ روز دوبار در هفته تقسیم بندی شدند. نیتروژن اوره خون، اسید اوریک و کراتینین توسط دستگاه اتوآنالایزر اندازه گیری شد. بررسی های هیستوپاتولوژی بعد از مراحل آماده سازی بافت صورت گرفت. هضم بافت کلیه با اسیدنیتریک-اسید پرکلریک، محلول مناسبی برای تعیین میزان نانوذرات اکسید روی با روش جذب اتمی اسپکتروفوتومتر فراهم می کند. **یافته های پژوهش:** نتایج نشان داد که ضایعات هیستوپاتولوژیک در دوز ۲۰۰ mg/kg شامل پرولیفريشن گلوومرولی به همراه فیبروز در بافت کلیه می باشد. سطوح سرمی BUN و کراتینین در گروه های تحت درمان نسبت به گروه کنترل افزایش بیشتری را نشان دادند که نشان دهنده سمیت کلیوی است. مقادیر نانوذرات اکسید روی در بافت های کلیه در گروه های دریافت کننده دوزهای بالاتر به طور معنی داری بیشتر از سایر گروه ها بود ($P < 0.05$).

بحث و نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات اکسید اثرات مخربی بر کلیه دارد؛ به طوری که این نانوذرات در غلظت های بالا

واژه های کلیدی: موش صحرایی، کلیه، اکسید روی، نانو ذره

* نویسنده مسئول: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دام پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل، بابل، ایران

Email: dr_hosseini2323@yahoo.com

Copyright © 2018 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه

در چند دهه اخیر توسعه شهرنشینی و استفاده زیاد از سوخت های فسیلی در سراسر جهان بسیار مطرح شده است که به دنبال آن افزایش چشمگیر غلظت فلزات سنگین در محیط زیست رخ داده است (۱). فلزات سنگین به دلیل ماهیت آسیب رسانی که دارند به خصوص در زمان هایی که از حد استاندارد خود تجاوز کنند، حائز اهمیت هستند (۲). آلودگی آب های سطحی و سیستم رودخانه ای به خاطر در تماس بودن با محیط، یکی از مخاطره انگیزترین مواردی است که می تواند تهدیدکننده سلامت انسان باشد؛ از طرفی نگرانی دیگر تجمع اشکال کمتر محلول فلزات در خاک های کشاورزی می باشد که به محلول های خاکی منتقل می شوند و باعث معیوب شدن آب های زیرزمینی و محصولات می شوند (۳). با توجه به اثرات مستقیم، توانایی تجمع زیستی و انباشته شدن فلزات سنگین از جمله روی در بدن، بررسی اثرات سوء احتمالی این فلز بر بدن و ارگان های حیاتی مثل کلیه امری حیاتی تلقی می شود (۳،۲). امروزه روی (Zn) و خصوصاً نانوذرات روی در کشاورزی، پزشکی، صنعت و بهداشتی و آرایشی و هم چنین تولیدات غذایی کاربردهای وسیعی دارد که خود می تواند به نوعی تهدیدکننده سلامت انسان باشد (۴) هم چنین کاربرد آن در برخی موارد از تحقیقات زیست پزشکی مثل تشخیص و درمان سرطان، انسان می تواند به طور مستقیم در معرض قرار گیرد (۵). نانوذرات موادی هستند که دارای ابعادی در اندازه حدوداً ۱ تا ۱۰۰ نانومتر هستند (۶). اندازه کوچک نانوذرات با توجه به افزایش واکنش سطحی از طریق ایجاد یک سطح بزرگ در واحد جرم و هم چنین فعال تر کردن آن ها، سبب افزایش جذب این مواد از غشاهای بیولوژیکی می شود (۷). از آن جا که بافت کلیه مکان اولیه برای تجمع تعدادی از فلزات سنگین می باشد لذا این بافت هدف عمده و اصلی در معرض قرارگیری این فلزات می باشد (۸). سمیت نانوذرات اکسید روی (ZnO nanoparticles) در موارد مختلفی از جمله استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی کاملاً تایید شده است. گزارشاتی در این رابطه وجود

دارند که بیان می کنند نانوذرات اکسید روی سبب پاسخ اکسیداتیو و آپاپتوز شده است (۹)؛ هم چنین خوراندن سوسپانسیون های حاوی این نانوذرات در موش عوارض شدیدی را در ارگان هایی مثل کبد و کلیه باعث شده است (۱۰). در مطالعه حاضر تاثیر دوزهای مختلف نانوذرات اکسید روی (ZnO Nps) بر بافت کلیه، میزان تجمع زیستی نانوذرات اکسید روی در کلیه، سطح مالون دی آلدید (MDA) و سطح شاخص های بیوشیمیایی سرم مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی و آزمایشگاهی از ۸۰ سر موش صحرایی ماده بالغ نژاد ویستار با وزن تقریبی 20 ± 200 گرم و سن ۱۲-۱۰ هفته استفاده شد که از مرکز پرورش و تکثیر انستیتو پاستور شمال کشور تهیه و در زمان انجام آزمایش در آن جا نگهداری شدند. حیوانات مورد آزمایش در شرایط کنترل شده (درجه حرارت 23 ± 2 ، رطوبت حدود 55 ± 5 درصد، نور ۱۲ ساعت روز و ۱۲ ساعت شب) نگهداری شدند. حیوانات در تمام طول مدت آزمایش بدون هیچ محدودیتی آب و غذا را به طور یکسان دریافت می کردند. در کلیه مراحل تحقیق اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی که توسط کمیته اخلاق حیوانی دانشگاه آزاد اسلامی بابل تصویب شده است، رعایت گردید.

تهیه محلول نانوذره: نانوذرات اکسید روی (ZnO) به شکل کریستال سفید شیری تقریباً کروی با ذراتی به ابعاد ۱۰ تا ۳۰ نانومتر، با سطح ویژه $60-20 \text{ m}^2/\text{g}$ ، چگالی واقعی $5/606 \text{ g/cm}^3$ و درصد خلوص ۹۹ درصد از شرکت نانوسونی (Nanosany Company Mashhad, Iran) تهیه شدند. برای تهیه محلول های ۴، ۸، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم، نانوذره در محلول نرمال سالین ۰/۹ درصد حل شد. این محلول ها قبل از تزریق به کمک دستگاه سونیکاتور همگن شدند (Misonix Sonicator, 55 W).

گروه های مورد آزمایش: در این تحقیق حیوانات به طور تصادفی به ۸ گروه ۱۰ تایی شامل گروه کنترل، گروه شم و ۶ گروه تجربی تقسیم شدند. گروه کنترل

هیچ گونه موادی دریافت نکردند. حیوانات گروه حلال دو بار در هفته مقدار ۰/۵ میلی لیتر محلول ۰/۹ درصد نرمال سالین به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کردند. گروه های تجربی اول، دوم، سوم، چهارم و پنجم دو بار در هفته مقدار ۰/۵ میلی لیتر از محلول های ۴، ۸، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرمی اکسید روی را به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کردند. جهت الگوی ضایعات مزمن دوزها به صورت لگاریتمی و برای مدت ۲۸ روز انتخاب شدند (۱۱).

خون گیری و اندازه گیری شاخص های بیوشیمیایی: حیوانات در پایان روز ۲۸ وزن گیری شده و با ترکیبی از داروی کتامین (۶۰ میلی گرم به ازای وزن بدن) و زایلازین (۲۰ میلی گرم به ازای وزن بدن) به صورت تزریق داخل صفاقی بی هوش گردیدند؛ سپس به کمک خون گیری مستقیم از قلب، نمونه های خون جمع آوری شد. جهت ارزیابی پارامترهای بیوشیمیایی، سرم گرفته شده به مدت ۱۵ دقیقه و با ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس، نمونه ها تا زمان انجام سنجش های آنزیمی در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد منجمد و نگهداری شدند. در نهایت توسط دستگاه اتوآنالایزر (Hitachi 902) و با استفاده از کیت های اختصاصی شرکت پارس آزمون و به روش توصیه شده International Federation of clinical chemistry (IFCC) سنجش های آنزیمی انجام شد و میزان نیتروژن اوره خون (BUN)، اوره و کراتینین (CR) اندازه گیری شدند.

نمونه برداری بافت: پس از کالبدگشایی، بافت کلیه موش ها خارج گردیده و درون ظروف نمونه برداری پاتولوژی محتوی محلول فرمالین بافر ۱۰ درصد تثبیت شدند. مراحل پاساژ بافتی، تهیه بلوک های پارافینی و تهیه برش های ۵ میکرونی انجام شد. لام های آماده شده به روش هماتوکسیلین-ئوزین رنگ آمیزی و با میکروسکوپ نوری (Olympus, cx31) ارزیابی شدند. شدت ضایعات به شکل عدم ایجاد ضایعات (-)، ضایعات خفیف (+)، ضایعات متوسط (++) و ضایعات شدید (+++) نشان داده شد (۱۲).

جذب /تمی: به منظور تعیین میزان تجمع زیستی، بافت کبد به طور کامل خشک شده و در فور در دمای ۱۵۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا به وزن ثابت برسند. سپس یک گرم از نمونه های بافتی جدا شده و به یک لوله آزمایش تمیز اضافه شدند. برای هضم شیمیایی ۵ میلی لیتر از اسید نیتریک-اسید پرکلریک با نسبت ۱۰ به ۴ به لوله آزمایش اضافه شد. سر لوله های آزمایش با پنبه بسته شده و به مدت یک شب در دمای اتاق قرار گرفت. سپس نمونه هضم شده در حمام آب ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت قرار داده شد تا به صورت محلول کاملاً شفاف درآید. محتویات لوله سرد شده و با استفاده از کاغذ صافی صاف و محلول صاف شده به یک بالن مدرج انتقال داده شد و حجم محلول به ۲۵ میلی لیتر رسانده شد. جهت اندازه گیری میزان تجمع زیستی فلز روی، از دستگاه جذب اتمی مدل Buck-210VGP مورد استفاده قرار گرفت (۱۳).

اندازه گیری سطح مالون دی آلدید (MDA): مخلوط همگن با ترکیب کردن ۱ گرم از بافت کلیه با ۵ میلی لیتر بافر فسفات نمکی مهیا شده و به کمک دستگاه هموژنایزر تهیه گردید. این ترکیب با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول حاصل شده جمع آوری و برای اندازه گیری MDA نگهداری شد. سپس نمونه ها به کمک کیت Zell Bio با واحد nmol/mg و بر اساس دستورالعمل آنالیز گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: برای مقایسه داده ها بین گروه های تیمار و شاهد از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ استفاده شد. آنالیز داده ها با استفاده از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و به کمک تست تعقیبی دانکن تفاوت معنی دار بین گروه ها با حروف نشان داده شده و هر حرف نشان دهنده یک گروه است. داده ها به صورت (انحراف معیار $\pm$ میانگین) ثبت شدند.

یافته های پژوهش

در بررسی هیستوپاتولوژیک متعاقب استفاده از دوزهای مختلف نانوپارتنیکل روی ضایعاتی هم چون نکروز، پرخونی، کست هیالین، اینفیلتریشن سلول های

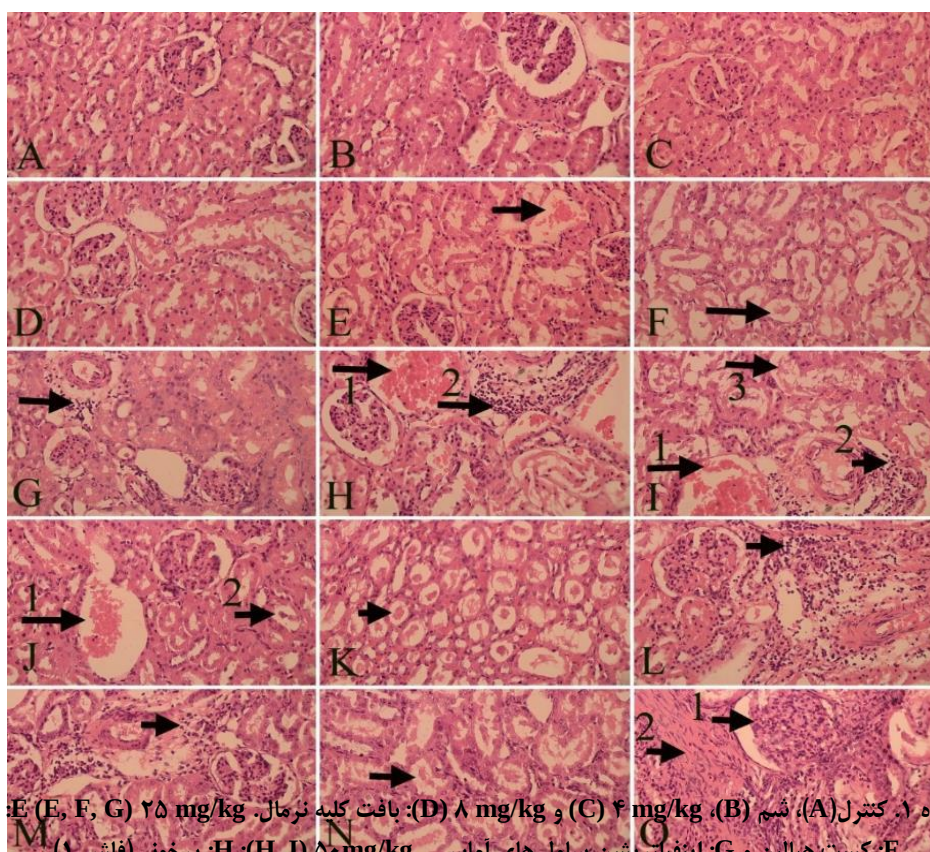
چنین اندازه گیری مقادیر بیوشیمیایی اوره، گروه ۲۰۰ mg/kg تفاوت معنی داری را با سایر گروه ها نشان داد ($P<0.05$) (جدول شماره ۳).

اندازه گیری سطوح مالون دی آلدیید بافتی، بین گروه کنترل و شم تفاوت معنی داری وجود نداشت اما با سایر گروه ها تفاوت معنی داری مشاهده شد ($P<0.05$) (نمودار شماره ۱).

مقادیر تجمع زیستی نانوذره اکسید روی در بافت کلیه نشان داد که در گروه ۲۰۰ mg/kg نسبت به سایر گروه ها افزایش رخ است، هم چنین بین گروه کنترل و شم تفاوت معنی داری وجود نداشت اما بین سایر گروه ها تفاوت معنی داری وجود داشت ($P<0.05$) (نمودار شماره ۲).

آماسی، پرولیفریشن گلومرولی و فیبروز مشاهده شد که بیشترین ضایعات در گروه ۲۰۰ mg/kg رخ داده است (شکل شماره ۱) (جدول شماره ۱). به دلیل تاثیرات منفی نانوذرات اکسید روی متناسب با افزایش دوز به واسطه التهاب، پرخونی و فیبروزی که در دوزهای بالا رخ می دهد افزایش وزن در کلیه های راست و چپ را شاهد هستیم (جدول شماره ۲).

اندازه گیری مقادیر بیوشیمیایی نیتروژن اوره خون گروه ۲۰۰ mg/kg تفاوت معنی داری را با سایر گروه ها به جز گروه ۱۰۰ mg/kg نشان داد ($P<0.05$) (جدول شماره ۳). هم چنین در اندازه گیری مقادیر بیوشیمیایی کراتینین، گروه ۲۰۰ mg/kg تفاوت معنی داری را با گروه ۱۰۰ mg/kg نشان داد ($P<0.05$) این در حالی است که تفاوت معنی داری در بین سایر گروه ها دیده نشد (جدول شماره ۳). هم



شکل شماره ۱. کنترل (A)، شم (B)، ۴ mg/kg (C) و ۸ mg/kg (D): بافت کلیه نرمال. ۲۵ mg/kg (E, F, G): پرخونی، کست هیالین و G: اینفیلتریشن سلول های آماسی. ۵۰ mg/kg (H, I): پرخونی (فلش ۱) و اینفیلتریشن سلول های آماسی (فلش ۲) و I: پرخونی (فلش ۱)، اینفیلتریشن سلول های آماسی (فلش ۲) و کست هیالین (فلش ۳). ۱۰۰ mg/kg (J, K, L): پرخونی (فلش ۱) و کست هیالین (فلش ۲)، K: کست هیالین و L: اینفیلتریشن سلول های آماسی. ۲۰۰ mg/kg (M, N, O): اینفیلتریشن سلول های آماسی، N: کست هیالین و O: پرولیفریشن گلومرولی (فلش ۱) و فیبروز (فلش ۲).

رنگ آمیزی H&E، بزرگ نمایی

جدول شماره ۱. بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیک بین گروه های مورد آزمایش متاثر از دوزهای مختلف نانوذرات اکسید روی

گروه	نکروز	پرخونی	کست هیالین	اینفیلتریشن سلول های آماسی	پرولیفريشن گلو مریولی	فیبروز
کنترل	-	-	-	-	-	-
شم	-	-	-	-	-	-
۴ mg/kg	-	-	-	-	-	-
۸ mg/kg	-	-	-	-	-	-
۲۵ mg/kg	+	+	+	+	-	-
۵۰ mg/kg	++	++	+	++	-	-
۱۰۰ mg/kg	++	++	++	+++	-	-
۲۰۰ mg/kg	+++	+	++	+++	+	++

شدت تغییرات هیستوپاتولوژیک به صورت عدم مشاهده تغییر بافتی (-)، ضایعات خفیف (+)، ضایعات متوسط (++) و ضایعات شدید (+++) نشان داده شده است.

جدول شماره ۲. بررسی تغییرات وزن کلیه های راست و چپ بین گروه های مورد آزمایش متاثر از دوزهای مختلف نانوذرات اکسید روی

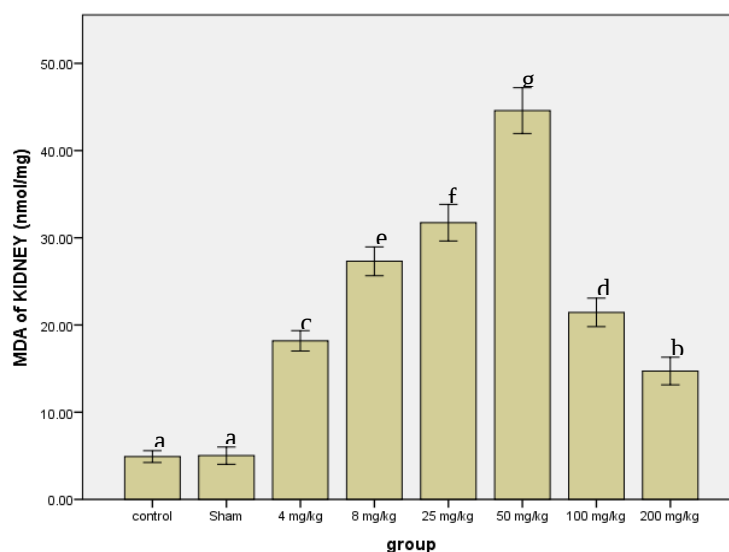
گروه	کلیه راست	کلیه چپ
کنترل	a ۰/۰۱±۰/۷۰	ab ۰/۰۱±۰/۷۱
شم	a ۰/۰۲±۰/۶۷	a ۰/۰۱±۰/۶۳
۴ mg/kg	a ۰/۰۱±۰/۶۵	a ۰/۰۱±۰/۶۴
۸ mg/kg	a ۰/۰۳±۰/۶۵	a ۰/۰۳±۰/۶۳
۲۵ mg/kg	ab ۰/۰۴±۰/۷۲	ab ۰/۰۴±۰/۶۸
۵۰ mg/kg	bc ۰/۰۳±۰/۷۸	b ۰/۰۳±۰/۷۴
۱۰۰ mg/kg	cd ۰/۰۳±۰/۸۳	c ۰/۰۲±۰/۸۲
۲۰۰ mg/kg	d ۰/۰۲±۰/۸۷	c ۰/۰۳±۰/۸۴

اطلاعات به صورت (انحراف معیار ± میانگین) ثبت شده اند. سطح معنی داری ۹۵ درصد می باشد (P<0.05). تفاوت معنی داری بین گروه ها بعد از آزمون تعقیبی Duncan با حروف نشان داده شده و هر حرف نشان دهنده یک گروه است (n=10).

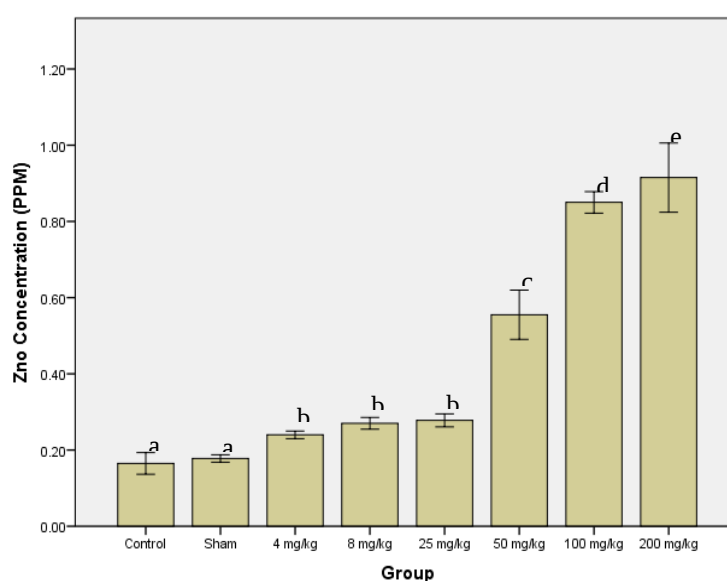
جدول شماره ۳. بررسی تغییرات بیوشیمیایی خون بین گروه های مورد آزمایش متاثر از دوزهای مختلف نانوذرات اکسید روی

گروه	نیترژن اوره خون (mg/dl) (BUN)	اسید اوریک (mg/dl) (UA)	کراتینین (mg/dl) (CRE)
کنترل	a ۰/۳۴±۱۵/۵	c ۰/۱۵±۱۱/۵۵	a ۰/۰۶±۰/۶۲
شم	a,b ۰/۳۳±۱۶/۵	c ۰/۱۲±۱۱/۵۲	a ۰/۰۱±۰/۶۳
۴ mg/kg	b ۰/۳۳±۱۸/۰	b, c ۰/۰۷±۱۱/۲۶	a ۰/۰۱±۰/۶۴
۸ mg/kg	b ۰/۳۷±۱۸/۰	b, c ۰/۰۹±۱۱/۲۴	a ۰/۰۲±۰/۶۹
۲۵ mg/kg	c ۰/۶۸±۲۰/۳	b, c ۰/۰۹±۱۱/۲۵	a ۰/۰۳±۰/۷۱
۵۰ mg/kg	c ۰/۸۹±۲۱/۹	a, b ۰/۱۵±۱۰/۹۵	a ۰/۰۵±۰/۸۱
۱۰۰ mg/kg	d ۱/۱۴±۲۴/۳	a, b ۰/۰۸±۱۰/۹۶	b ۰/۱۴±۱/۲۵
۲۰۰ mg/kg	d ۱/۲۵±۲۵/۳	a ۰/۲۵±۱۰/۸۶	c ۰/۱۱±۱/۴۷

اطلاعات به صورت (انحراف معیار ± میانگین) ثبت شده اند. سطح معنی داری ۹۵ درصد می باشد (P<0.05). تفاوت معنی داری بین گروه ها بعد از آزمون تعقیبی Duncan با حروف نشان داده شده و هر حرف نشان دهنده یک گروه است (n=10).



نمودار شماره ۱. بررسی تغییرات MDA در بین گروه های مورد آزمایش متاثر از دوزهای مختلف نانوذرات اکسید روی تفاوت معنی داری بین گروه ها بعد از آزمون تعقیبی Duncan با حروف نشان داده شده و هر حرف نشان دهنده یک گروه است (n=10).



نمودار شماره ۲. بررسی تغییرات تجمع زیستی فلز روی بین گروه های مورد آزمایش متاثر از دوزهای مختلف نانوذرات اکسید روی. تفاوت معنی داری بین گروه ها بعد از آزمون تعقیبی Duncan با حروف نشان داده شده و هر حرف نشان دهنده یک گروه است (n=10).

بحث و نتیجه گیری

با رشد جوامع، نگرانی های علمی از ویژگی های مطلوب فناوری نانوذرات متعاقب تولید و استفاده در مقیاس گسترده ممکن است سلامت انسان ها و محیط

زیست را در معرض خطر قرار دهد (۱۴، ۱۵). از ویژگی های نانوذرات برای تعیین انتشار آن ها در شرایط زنده اندازه کوچک این ذرات، سطح بزرگ و واکنش پذیری بالا می باشد (۱۵). با

کاهش قطر ذرات، نفوذ آن ها به داخل سلول ها و جذب در غشاهای بیولوژیکی افزایش می یابد. با افزایش استفاده از نانوذرات اکسید روی، قرار گرفتن در معرض این نانوذرات به طور پیوسته افزایش یافته است (۱۴،۱۶).

نیترژن اوره خون (BUN) و کراتینین (CR) خون شاخص خوبی برای عملکرد کلیه می باشند. در صورت آسیب دیدن کلیه، BUN و CR افزایش یافته و وارد جریان خون می شوند. در مطالعه Bing Wang به منظور ارزیابی سمیت حاد پودر روی در مقیاس نانو در موش های بالغ از طریق دهان، به طور قابل توجهی افزایش BUN و CR سرم را نشان داد، که به دلیل اختلال در عملکرد کلیه ایجاد می شود (۱۰). مطالعه Amara و همکاران نشان داد تزریق داخل صفاقی نانوذرات اکسید روی (۳۰-۲۰ نانومتر) و کلرید روی در موش منجر به مدولاسیون پارامترهای بیوشیمیایی پلاسما در نتیجه آسیب سلولی کلیه می شود (۱۴). طبق نتایج به دست آمده از مطالعه Yan و همکاران در بررسی ترکیب بیوشیمیایی ادرار و کلیه در موش های دریافت کننده نانوذرات اکسید روی به روش داخل معدی، افزایش BUN و CR سرم مشاهده شد که دلالت بر آسیب احتمالی سلول های کلیوی دارد (۱۷). در مطالعه ای سطح اسیداوریک خون به عنوان شاخص عملکردی کلیه در موش های دریافت کننده نانوذره طلا مورد ارزیابی قرار گرفت که در نتیجه آن سطح سرمی اسید اوریک کاهش یافت که با مطالعه حاضر هم خوانی دارد (۱۸). در مطالعه حاضر افزایش قابل توجه سطح سرمی BUN و CR نسبت به گروه کنترل مشاهده شد که بیانگر سمیت کلیوی می باشد؛ نتایج حاصل با یافته های مطالعات فوق مطابقت دارد. تغییرات در متابولیت های ادرار متعاقب تخریب سوخت و ساز انرژی و اختلال میتوکندری و غشای سلولی در بافت کلیه موش های در معرض نانوذرات اکسید روی به وقوع می پیوندد و سمیت کلیوی را ایجاد می نمایند (۱۷).

بافت کلیه به دلیل توانایی در جذب و تجمع فلزات اولین ارگان هدف فلزات سنگین است. مطالعه Sandy Thijssen و همکاران نشان می دهد که آلودگی آب

آشامیدنی به کادمیوم در دوز های بالا سبب ایجاد تورم در سلول های اپیتلیال توبول های کلیه موش می شود (۱۹). در مطالعه ای نکروز توبولی متعاقب دریافت کادمیم در کلیه موش صحرایی ایجاد شد (۲۰). Zalups RK و همکاران در بررسی خود بر جیوه به این نتیجه رسیدند که میتوکندری کلیه از اهداف اولیه داخل سلولی جیوه برای ایجاد تخریب کلیوی می باشد (۲۱). در مواجهه با فلزات سنگین این مواد می توانند در بافت کلیه انباشته شده و هم چنین مقداری از آن از طریق ادرار دفع شوند (۲۰). در مطالعه Bhattacherjee T. و همکاران در موش های صحرایی که به صورت دهانی فلزات سنگینی مثل آرسنیک، کادمیم و سرب را به مدت ۹۰ روز دریافت کرده بودند افزایش قابل توجهی در وزن کلیه آن ها مشاهده شده است (۲۲). در مطالعه حسینی و همکاران طی تزریق دوزهای متفاوت نانوذره اکسید روی به روش تزریق داخل صفاقی در بافت کبد در دوز mg/kg ۲۵ ضایعاتی هم چون نکروز، پرخونی و دژنراسیون واکوئولی و در دوزهای mg/kg ۵۰ و ۱۰۰ اینفیلتریشن سلول های آماسی نیز مشاهده شد (۲۳). مطالعه Robert و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان داد که نانو ذرات اکسید روی می تواند سبب برهم زدن سوخت و ساز انرژی و اختلال میتوکندری و غشای سلول در کلیه موش شود (۲۴). Bing Wang گزارش داد که مصرف خوراکی نانوذرات ZnO می تواند موجب ضایعات شدید کلیوی و کم خونی شود (۱۰). در مطالعه حاضر در بررسی هیستوپاتولوژیک بافت کلیه در دوزهای mg/kg ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ پرخونی، نکروز، کست هیالین و اینفیلتریشن سلول های آماسی و در دوز mg/kg ۲۰۰ علاوه بر ضایعات فوق پرولیفریشن گلومرولی و فیبروز نیز مشاهده شد.

به منظور تعیین میزان تجمع زیستی در بافت کلیه، از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد. مقدار نانوذره اکسید روی در بافت کلیه در موش های دریافت کننده دوزهای بالاتر به طور معنی داری بیشتر از سایر گروه ها بود که بیانگر تجمع بیشتر فلز سنگین در این دوزها می باشد. در مطالعه ای افزایش قابل توجه در مقادیر طلا پس از تزریق مکرر در کلیه، کبد، طحال و

افزایش سطح MDA در گروه های آزمایشی ناشی از ZnO در مقایسه با گروه شاهد نشان دهنده افزایش پراکسیداسیون لیپید است. در بررسی انجام شده توسط R.C. Patra و همکاران سرب سبب افزایش پراکسیداسیون لیپید در کلیه موش صحرایی می شود (۲۷). کاهش سطوح MDA در دوزهای بالاتر به واسطه کاهش جمعیت سلولی و وقوع فیروز بافتی قابل توجه است (۲۸).

نتایج این مطالعه نشان می دهد که نانوذرات اکسید روی در غلظت های بالا دارای اثرات نفروتوکسیک می باشند؛ بنا بر این انجام آزمایشات تکمیلی با عصاره های گیاهی به منظور بررسی چگونگی پیشگیری و درمان ضایعات حاصل از این نانوذرات پیشنهاد می گردد.

ریه به اثبات رسید (۱۸). در مطالعه ای دیگر قرار گرفتن در معرض کادمیم تا حد زیادی تجمع داخل کلیوی این فلز سمی را موجب می شود (۲۵). غفاری و همکاران با اندازه گیری غلظت ایندیم توسط دستگاه جذب اتمی در بافت های کبد، کلیه و مغز موش های صحرایی دریافت کننده این عنصر، مشخص نمودند که میزان توزیع این فلز در بافت های کبد و کلیه بیشتر از مغز است (۲۶). هم چنین تجمع مقدار قابل توجهی از جیوه نیز در کلیه موش های دریافت کننده این فلز پس از مواجهه با اشکال آلی جیوه یافت شده است (۲۱). طبق مطالعه حاضر تخریب بافتی نانوذرات اکسید روی در بافت کلیه در دوزهای دریافتی بالاتر به طور معنی داری بیشتر از سایر گروه ها بود.

References

1. Yi Y, Yang Z, Zhang S. Ecological risk assessment of heavy metals in sediment and human health risk assessment of heavy metals in fishes in the middle and lower reaches of the Yangtze River basin. *Environ Pollut* 2011; 159:2575-85. Doi:10.1016/j.envpol.2011.06.011.
2. Adamu CI, Njanje TN, Edet A. Heavy metal contamination and health risk assessment associated with abandoned barite mines in Cross River State Southeastern Nigeria. *Environ Nano Monit Manag* 2015; 3:10-21. Doi:10.1016/j.enmm.2014.11.001.
3. Herojeet R, Rishi MS, Kishore N. Integrated approach of heavy metal pollution indices and complexity quantification using chemometric models in the Sirsa Basin Nalagarh valley Himachal Pradesh India. *Chin J Geochem* 2015; 34:620-33. Doi:10.1007/s11631-015-0075-1.
4. Espitia PJ, Soares ND, Reis Coimbra JS, Andrade NJ, Cruz RS, Medeiros EA. Zinc oxide nanoparticles synthesis antimicrobial activity and food packaging applications. *Food Bioproc Tech* 2012; 5:1447-64. Doi:10.1007/s11947-012-0797-6.
5. Esmaeillou M, Moharamnejad M, Hsankhani R, Tehrani AA, Maadi H. Toxicity of ZnO nanoparticles in healthy adult mice. *Environ Toxicol Pharmacol* 2013; 35:67-71. Doi:10.1016/j.etap.2012.11.003.
6. Handy RD, Vonderkammer F, Lead JR, Hasselov M, Owen R, Crane M. The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. *Ecotoxicol* 2008; 17:287-314. Doi:10.1007/s10646-008-0199-8.
7. Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WC. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano lett* 2006; 6:662-8. Doi:10.1021/nl052396o.
8. Thomas LD, Hodgson S, Nieuwenhuijsen M, Jarup L. Early kidney damage in a population exposed to cadmium and other heavy metals. *Environ Health Perspect* 2009; 117:181. Doi:10.1289/ehp.11641.
9. Huang CC, Aronstam RS, Chen DR, Huang YW. Oxidative stress calcium homeostasis and altered gene expression in human lung epithelial cells exposed to ZnO nanoparticles. *Toxicol In vitro* 2010; 24:45-55. Doi: 10.1016/j.tiv.2009.09.007.
10. Wang B, Feng W, Wang M, Wang T, Gu Y, Zhu M, et al. Acute toxicological impact of nano-and submicro scaled Zinc oxide powder on healthy adult Mice. *J*

- Nanopart Res 2008; 10:263-76. Doi:10.1007/s11051-007-9245-3.
11. Vandebriel RJ, Jong WH. A review of mammalian toxicity of ZnO nanoparticles. *Nanotechnol Scie Appl* 2012; 5:61. Doi:10.2147/NSA.S23932.
 12. Aydin G, Gokçimen A, Oncu M, Çicek E, Karahan N, Gokalp O. Histopathologic changes in liver and renal tissues induced by different doses of diclofenac sodium in Rats. *Turk J Vet Anim Sci* 2003; 27:1131-40.
 13. Ajayi OA, Idowu AB, Eromosele CO, Dedeke GA, Ademolu KO. Distribution and effect of some heavy metals in selected organs and tissues of albino Rats exposed to Vehicular exhaust fumes. *Colerm Proce* 2012; 2:518-25.
 14. Amara S, Slama IB, Mrad I, Rihane N, Khemissi W, El Mir L, et al. Effects of Zinc oxide nanoparticles and/or zinc chloride on biochemical parameters and mineral levels in rat liver and kidney. *Hum Exp Toxicol* 2014; 33:1150-7. Doi:10.1177/0960327113510327.
 15. Pujalte I, Passagne I, Brouillaud B, Treguer M, Durand E, Ohayon C, et al. Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells. *Part Fibre Toxicol* 2011; 8:10. Doi:10.1186/1743-8977-8-10.
 16. Fukuoka A, Sakamoto Y, Guan S, Inagaki S, Sugimoto N, Fukushima Y, et al. Novel templating synthesis of necklace shaped monoand bimetallic nanowires in hybrid organicoorganic mesoporous material. *J Am Chem Soc* 2001; 123: 3373-4. Doi:10.1021/ja004067y.
 17. Yan G, Huang Y, Bu Q, Lv L, Deng P, Zhou J, et al. Zinc oxide nanoparticles cause nephrotoxicity and kidney metabolism alterations in rats. *J Environ Sci Health Part A* 2012; 47:577-88. Doi:10.1080/10934529.2012.650576.
 18. Lasagna C, Gonzalez D, Barria MA, Olmedo I, Clos A, Ramanujam VS, et al. Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in Mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 393:649-55. Doi:10.1016/j.bbrc.2010.02.046.
 19. Thijssen S, Maringwa J, Faes C, Lambrichts I, Kerkhove E. Chronic exposure of Mice to environmentally relevant low doses of cadmium leads to early renal damage not predicted by blood or urine cadmium levels. *Toxicology* 2007; 229:145-56. Doi:10.1016/j.tox.2006.10.011.
 20. Barbier O, Jacquillet G, Tauc M, Poujeol P, Cougnon M. Acute study of interaction among cadmium, calcium, and Zinc transport along the rat nephron in vivo. *Am J Phys Renal Physiol* 2004; 287:1067-75. Doi: 10.1152/ajprenal.00120.2004.
 21. Zalups RK. Molecular interactions with mercury in the kidney. *Pharmacol Rev* 2000; 52:113-44.
 22. Bhattacharjee T, Bhattacharjee S, Choudhuri D. Hepatotoxic and nephrotoxic effect of chronic low dose exposure to a mixture of heavy metals lead cadmium and Arsenic. *Int J Pharm Chem Biol Sci* 2016; 6:39-47.
 23. Hossieni SM, Moshrefi AH, Amani R, Razavimehr SV, Aghajanihah MH. [Biochemical and histopathological study of the toxicity of Zinc oxide nanoparticles on liver in Rat]. *J Anim Biol* 2016; 8:37-47. (Persian)
 24. Reed RB, Ladner DA, Higgins CP, Westerhoff P, Ranville JF. Solubility of nano Zinc oxide in environmentally and biologically important matrices. *Environ Toxicol Chem* 2012; 31:93-9. Doi: 10.1002/etc.708.
 25. Felleybosco E, Diezi J. Fate of cadmium in rat renal tubules: a microinjection study. *Toxicol Appl Pharmacol* 1987; 91:204-11. Doi:10.1016/0041-008X(87)90101-3.
 26. Ghaffari MA, Moshtaghi AA. [The study of indium distributions in rat liver kidney and brain tissues]. *Koomesh* 2004; 5:151-6. (Persian)
 27. Patra RC, Swarup D, Dwivedi SK. Antioxidant effects of α tocopherol, ascorbic acid and L-methionine on lead induced oxidative stress to the liver, kidney and brain in Rats. *Toxicology* 2001; 162:81-8. Doi:10.1016/S0300-483X(01)00345-6.
 28. Nerlich AG, Bachmeier BE. Density dependent lineage instability of MDA-MB-435 breast cancer cells. *Oncology letters*. 2013; 5:1370-4. Doi:10.3892/ol.2013.1157.



Histopathologic and biochemical study of zinc oxide nanoparticles effect on renal tissue in rats

Hosseini SM^{1*}, Amani R², Razavimehr SV², Moshrefi AH², Aghajanikhah MH²

(Received: January 6, 2018

Accepted: May 28, 2018)

Abstract

Introduction: Zinc oxide nanoparticles that are used for industrial and domestic purposes can cause a widespread environmental contamination. Regarding this, the present study was conducted to investigate the effect of zinc oxide nanoparticles on renal tissue in terms of bioaccumulation of nanoparticles, histopathology, serum biochemical index, and oxidative damage.

Materials & Methods: This experimental study was conducted on 80 male Wistar rats that were divided into eight groups, including one control group, one sham group (receiving saline), and six groups administered zinc oxide nanoparticles at doses of 4, 8, 25, 50, 100, and 200 mg/kg for 28 days twice a week. The measurement of blood urine nitrogen (BUN), uric acid, and creatinine was accomplished using an autoanalyzer. Furthermore, histopathological examinations were performed after tissue processing. The digestion of the renal tissue by nitric-perchloric acid provided suitable solutions for the determination of zinc oxide

nanoparticles by atomic absorption spectrometry.

Findings: According to the results, the histopathological lesions in the renal tissue at the dose of 200 mg/kg included glomerular proliferation and fibrosis. The groups treated with zinc oxide nanoparticles showed a higher increase in the serum levels of BUN and creatinine, compared with the control group, which indicated renal toxicity. Furthermore, a significantly higher level of zinc oxide nanoparticles was observed in the renal tissue of the groups receiving higher doses than those of the other groups ($P < 0.05$).

Discussion & Conclusions: The findings of the current study revealed that zinc oxide nanoparticles exerted a destructive effect on the kidney. Moreover, it was found that these nanoparticles had a toxic effect on the renal tissue at a high concentration.

Keywords: Rat, Kidney, Zinc oxide, Nanoparticle

1. Department of Pathobiology, Islamic Azad University, Babol Branch, Babol, Iran

2. Young Researchers and Elite Club, Islamic Azad University, Babol Branch, Babol, Iran

*Corresponding author: Email: dr_hosseini2323@yahoo.com