مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۶، مهر ۱۳۹۶، ۶۴۴-۶۳۳

بررسی اثرات سمیتی نانوذرات اکسید روی و دی‌اکسید تیتانیوم بر روی برخی از آنزیم‌های کبدی موش سفید آزمایشگاهی نر

سمیرا اربابی[۱]، ابوالفضل بایرامی[۲]، پروین شیدایی[۱]

دریافت مقاله: ۹۵/۱۲/۱۰ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۶/۲/۱۶ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۶/۶/۲۹ پذیرش مقاله: ۹۶/۷/۱

چکیده

زمینه و هدف: پیشرفت فناوری نانو باعث شده است که بررسی اثرات مخرب نانومواد بر روی موجودات اهمیت زیادی پیدا کند. نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و اکسید روی از راه‌های مختلف وارد بدن شده و باعث تخریب کبد و سایر ارگان‌های بدن موجودات می‌شوند. هدف از این مطالعه بررسی اثر سمیتی نانوذرات اکسید روی و دی‌اکسید تیتانیوم بر روی برخی از آنزیم‌های کبد و بافت کبد موش نر می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۷۰ موش نر بالغ مورد استفاده قرار گرفت. موش‌ها در ۱۰ دسته ۷تایی شامل یک گروه کنترل و نه گروه آزمایش تقسیم شدند. موش‌های گروه تجربی نانوذرات اکسید روی را به مدت ۱۴ روز با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت گاواژ دریافت کردند و گروه شاهد فقط آب مقطر دریافت کرد. در روز پانزدهم، خون‌گیری از موش‌ها به عمل آمد و آنزیم‌های کبدی شامل آلانین آمینوترانسفراز، آلکالین فسفاتاز و آسپارتات آمینوترانسفراز و بافت کبد مورد بررسی قرار گرفت. داده‌ها، با توجه به برخورداری از توزیع نرمال، توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Duncan مورد آنالیز قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که نانوذرات اکسید روی و دی‌اکسید تیتانیوم در غلظت‌های ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ترکیب این دو نانوذره در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم باعث ایجاد تغییر معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم‌های کبدی آلانین آمینوترانسفراز، آلکالین فسفاتاز و آسپارتات آمینوترانسفراز نسبت به گروه کنترل شده‌اند ($P< ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که نانوذرات اکسید روی و دی‌اکسید تیتانیوم در دوزهای مختلف احتمالاً به دلیل تخریب کبد و افزایش نشت آنزیم‌های کبدی باعث افزایش سطح سرمی آنزیم‌ها می‌شود. بااین‌حال، مطالعات بیشتری جهت پیش‌بینی اثرات این ماده و استفاده ایمن از این نانوذرات پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های کبدی، نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم، نانوذرات اکسید روی، موش سوری

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
۲- (نویسنده مسئول) استادیار گروه آموزشی زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
تلفن: ۳۳۵۱۳۹۱۵-۰۴۵، دورنگار: ۳۳۵۱۴۷۰۱- ۰۴۵، پست الکترونیکی: a_bayrami@uma.ac.ir

مقدمه

با گذر از میکروذرات به نانوذرات، با تغییر برخی از خواص فیزیکی روبرو می‌شویم، افزایش نسبت مساحت سطحی به حجم که به‌تدریج با کاهش اندازه ذره رخ می‌دهد، باعث غلبه یافتن رفتار اتم‌های واقع در سطح ذره به رفتار اتم‌های درونی می‌شود. این پدیده بر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی ذره اثر می‌گذارد [۱]. نانوذرات در بسیاری از موارد پزشکی و بیولوژیک، صنعت، کشاورزی، تصفیه آب، بسته‌بندی، لوازم آرایشی بهداشتی و غیره کاربرد دارند [۲]. نانوذرات به علت اندازه منحصربه‌فردشان با خصوصیات فیزیکوشیمیایی ویژه بسیاری تولید می‌شوند و می‌توانند خطرات پیش‌بینی‌نشده‌ای را برای سلامتی انسان داشته باشند [۳].

نانوذرات اکسید روی به‌طور گسترده‌ای در وسایل الکترونیکی نوری، لوازم آرایشی، کاتالیزورها، سرامیک‌ها، رنگدانه‌ها و غیره به کار می‌روند [۴]. نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم به دلیل ویژگی‌های منحصربه‌فرد آن می‌تواند در تولید انواع رنگ، لوازم آرایشی و بهداشتی، ساخت سرامیک، ساخت فتوکاتالیست‌ها، تصفیه آب و فاضلاب، فیلتراسیون گازها و بسیاری از صنایع دیگر کاربرد داشته باشد [۵].

عوامل کلیدی در ارزیابی خطر بعد از مواجهه با نانوذرات شامل اندازه ذره، ویژگی سطح، انحلال‌پذیری و روش‌های مواجهه می‌گردد [۶]. طبق گفته متخصصان، نانوذرات از طریق دهان و بینی وارد بدن انسان و سایر موجودات و سیستم گوارشی آنها می‌شود و به بافت‌های بدن نفوذ می‌کند. پیش‌بینی می‌شود نانومواد می‌تواند با اجزای زیستی برهم‌کنش داشته باشد و اثرات زیادی بر رفتار و خصوصیات سلول و بدن موجود زنده بگذارد [۷]. در مطالعه‌ای که توسط Fazilati صورت گرفت، رت‌های نر با نانوذرات اکسید روی تحت تیمار قرار گرفتند. نتایج نشان داد فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز کبدی افزایش یافته است [۸]. در مطالعه دیگر اثر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر فعالیت آنزیم‌های کبدی رت مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج نشان داد که نانوذرات اکسید تیتانیوم باعث افزایش در غلظت آنزیم‌های کبدی می‌گردد. این نتایج حاکی از اثر سمیت نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر بدن است [۹].

اهمیت مطالعه آنزیم‌های کبدی در این است که هنگامی‌که یک اندام به خاطر اثر یک سم بیمار می‌شود، در ظاهر فعالیت آنزیمی اندام آسیب‌دیده افزایش می‌یابد. افزایش یا کاهش سطح این آنزیم‌ها می‌تواند اطلاعات مربوط به ارزش تشخیصی را فراهم نماید. تغییر فعالیت‌های آنزیمی پلاسما به‌عنوان شاخص‌های آسیب بافتی، استرس محیطی یا وضعیت بیماری مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱۰].

به‌طورکلی، با توجه به کاربردهای زیاد نانومواد در صنایع مختلف و وجود فرضیه‌های زیادی بر تأثیرات مخرب نانوذرات بر روی موجودات زنده، بررسی و پژوهش در این زمینه از اهمیت زیادی برخوردار است و با توجه به اینکه انواع نانوذرات ممکن است به‌صورت هم‌زمان یا ترکیبی وارد بدن موجودات زنده شوند و اینکه در بررسی‌ها و مطالعات انجام‌یافته هر نانوذره به‌صورت

انفرادی مورد مطالعه قرار گرفته است [۹/۱۱]، لذا در مطالعه حاضر علاوه بر بررسی جداگانه تأثیرات دو نانوذره اکسید روی و دی‌اکسید تیتانیوم بر آنزیم‌های کبدی و بافت‌های موش، اثرات ترکیبی این دو نانوذره در غلظت‌های مختلف نیز مورد آنالیز قرار گرفته است. بنابراین هدف از این پژوهش بررسی اثرات مخرب نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و اکسید روی با سایز ۲۰ نانومتر بر روی بافت کبد و آنزیم‌های کبدی موجود در خون موش سفید آزمایشگاهی نر است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۴-۱۳۹۳ در دانشگاه محقق اردبیلی انجام شد. از موش‌های بالغ نر نژاد بالب سوری استفاده شد. ۷۰ موش نر (۸هفته‌ای با میانگین وزنی ۱±۳۳/۵ گرم) جهت آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفت. موش‌ها در ۱۰ دسته ۷تایی شامل یک گروه کنترل و نه گروه آزمایشی تقسیم‌بندی شدند. حیوانات موردآزمایش از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران خریداری شدند و در قفس‌های پروپلینی نگهداری شدند. کف قفس‌ها از خاک‌اره پوشیده می‌شد. حیوانات در شرایط کنترل‌شده (درجه حرارت ۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۶۰ درصد، نور ۱۲ ساعت روز و ۱۲ ساعت شب) با دسترسی آسان به آب و غذای کامل (کنسانتره) نگهداری شدند. تمامی آزمایش‌های حیوانی بر اساس مجوز کمیته اخلاقی دانشگاه انجام شد.

در این مطالعه، نانوذرات اکسید روی و دی‌اکسید تیتانیوم به‌صورت پودر از شرکت پیشگامان نانومواد ایرانیان واقع در مشهد خریداری شدند. نانوذرات پودری بعد از مخلوط شدن با آب دیونیزه به مدت ۲۰ دقیقه توسط سونیکاتور (مدل PARSONIC، شرکت مهندسی پارس نهند، تهران، ایران) تحت امواج فراصوت قرار گرفت. حیوانات به‌طور تصادفی به ده گروه تقسیم شدند. گروه شاهد روزانه ۰/۳ میلی‌لیتر آب مقطر و گروه‌های آزمایشی، سه گروه به ترتیب ۵۰، ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن نانوذرات اکسید روی و سه گروه به ترتیب ۵۰، ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و سه گروه به ترتیب ۵۰، ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و اکسید روی را به‌صورت ترکیبی (با نسبت مساوی از هر نانوذره) از طریق گاواژ دهانی دریافت کردند [۱۲].

دوزها بر اساس میانگین وزن موش‌ها تهیه شدند به‌طوری‌که ۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن موش تجویز شد. این نسبت در میانگین وزن موش‌ها محاسبه شد و به ازای ۳۳/۵ گرم، ۰/۰۰۱۶ گرم نانوذره وزن شد و این نانوذرات به ۰/۳ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شد. ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن موش تجویز شد. این نسبت در میانگین وزن موش‌ها محاسبه شد و به ازای ۳۳/۵ گرم، ۰/۰۰۳ گرم نانوذره وزن شد و این نانوذرات به ۰/۳ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شد. ۳۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن موش تجویز شد. این نسبت در میانگین وزن موش‌ها محاسبه شد و به ازای ۳۳/۵ گرم، ۰/۰۱ گرم نانوذره وزن شد و این نانوذرات به ۰/۳ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد.

در گروه‌های ترکیبی ۰/۱۵ میلی‌لیتر از هریک از انواع سوسپانسیون نانوذرات به نسبت مساوی باهم ترکیب شدند [۱۲].

تیمار به مدت ۱۴ روز متوالی تکرار شد (تیمار قبل از ظهر و در ساعات مشخص انجام می‌شد). روز پانزدهم بیهوشی با کتامین و زایلازین (کتامین ۸۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن موش + زایلازین ۱۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن موش) صورت گرفت و سپس خون‌گیری انجام شد [۱۲].

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های ALT (آلانین آمینوترانسفراز)، ALP (آلکالین فسفاتاز) و AST (آسپارتات آمینوترانسفراز) بعد از خون‌گیری، نمونه به مدت ۱ ساعت در محیط آزمایشگاه قرار داده شد. برای تهیه سرم، نمونه‌های خونی به مدت ۱۵ دقیقه در rpm ۳۰۰۰ سانتریفیوژ (PRISM R، Labnet، آمریکا) شد.

بعد از جداسازی سرم از لخته به‌وسیله سمپلر (سمپلر متغیر و قابل اتوکلاو، Brand، آلمان) با استفاده از کیت‌های آنزیمی (پارس آزمون، کرج، ایران) و به روش توصیه‌شده IFCC (The International Federation of Clinical Chemistry) سنجش‌های آنزیمی انجام شد [۱۲]. در این مطالعه، کبد موش‌ها بلافاصله بعد از مرگ حیوان از بدن خارج شد و برش‌های بافتی تهیه شد و مورد بررسی قرار گرفت [۱۲].

داده‌های حاصل از گروه‌های آزمایشی با گروه کنترل مقایسه گردید تا تأثیر غلظت نانوذرات نسبت به گروه کنترل و نرمال سنجیده شود. اطلاعات با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ و آنالیز واریانس یک‌طرفه و سپس آزمون Duncan مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف انجام گرفت و سطح معنی‌داری در مقایسه میانگین دادها ($P<۰/۰۵$) در نظر گرفته شد.

نتایج

مقایسه آماری بین گروه‌های دریافت‌کننده نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و گروه کنترل دریافت‌کننده آب مقطر بر آنزیم‌های کبدی در جدول ۱ نشان داده شده است. در غلظت ۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم، آنزیم‌ها افزایش معنی‌داری نداشتند ($P>۰/۰۵$). در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز و آسپارتات آمینوترانسفراز افزایش معنی‌داری را نشان دادند ($P<۰/۰۵$). در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، هر سه آنزیم افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان دادند ($P<۰/۰۵$) و گروه‌ها نسبت به هم اختلاف معنی‌دار نداشتند ($P>۰/۰۵$).

جدول ۱- غلظت سرمی آنزیم‌ها در گروه کنترل و گروه آزمایشی موش‌های نر دریافت‌کننده نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم به مدت چهارده روز

پارامترها	گروه کنترل n=۷	۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم TiO_2 n=۷	۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم TiO_2 n=۷	۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم TiO_2 n=۷
آلکالین فسفاتاز (واحد در لیتر)	۴۳۵/۱۲ ± ۵/۰۷	۴۱۰/۰۷ ± ۳/۱۲	*۴۸۸/۰۰ ± ۶/۱۲	*۵۰۱/۶۰ ± ۳/۲۱
آلانین آمینوترانسفراز (واحد در لیتر)	۸۷/۰۰ ± ۶/۲۱	۷۴/۲۱ ± ۴/۱۲	۷۰/۱۶ ± ۵/۱۱	*۱۵۰/۰۱ ± ۷/۰۱
آسپارتات آمینوترانسفراز (واحد در لیتر)	۱۲۹/۴۶ ± ۴/۲۸	۱۴۳/۱۲ ± ۲/۱۶	*۱۵۹/۲۱ ± ۳/۱۲	*۲۰۱/۲۲ ± ۶/۰۱

*آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Duncan. * P<۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل*

جدول ۲ نشان‌دهنده مقایسه آماری بین گروه‌های دریافت‌کننده نانوذرات اکسید روی با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و گروه کنترل دریافت‌کننده آب مقطر بر آنزیم‌های کبدی است. در غلظت ۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم آنزیم‌ها افزایش معنی‌داری نداشتند (P>۰/۰۵). در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز و آسپارتات آمینوترانسفراز افزایشی معنی‌دار نشان دادند. در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، هر سه آنزیم افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان دادند (P<۰/۰۵) و گروه‌ها نسبت به هم اختلاف معنی‌دار نداشتند (P>۰/۰۵).

جدول ۲- غلظت سرمی آنزیم‌ها در گروه کنترل و گروه آزمایشی موش‌های نر دریافت‌کننده نانوذرات اکسید روی به مدت چهارده روز

پارامترها	گروه کنترل n=۷	۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ZnO n=۷	۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ZnO n=۷	۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ZnO n=۷
آلکالین فسفاتاز (واحد در لیتر)	۴۳۵/۱۲ ± ۵/۰۷	۴۰۵/۰۶ ± ۴/۲۱	*۴۹۶/۰۰ ± ۷/۱۱	*۵۱۲/۷۰ ± ۴/۸۷
آلانین آمینوترانسفراز (واحد در لیتر)	۸۷/۰۰ ± ۶/۲۱	۷۹/۳۱ ± ۳/۹۱	۶۷/۱۹ ± ۴/۲۲	*۱۷۶/۰۰ ± ۵/۴۵
آسپارتات آمینوترانسفراز (واحد در لیتر)	۱۲۹/۴۶ ± ۴/۲۸	۱۴۰/۲۱ ± ۳/۲۱	*۱۶۸/۹۱ ± ۶/۱۱	*۲۴۵/۲۲ ± ۵/۰۱

*آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Duncan. * P<۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل*

جدول ۳ نشان‌دهنده مقایسه آماری بین گروه‌های دریافت‌کننده نانوذرات اکسید روی و دی‌اکسید تیتانیوم به‌صورت ترکیبی با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و گروه کنترل دریافت‌کننده آب مقطر بر آنزیم‌های کبدی است. در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم هر سه آنزیم کبدی افزایش معنی‌دار نسبت به گروه کنترل نشان دادند (P<۰/۰۵) و گروه‌ها نسبت به هم اختلاف معنی‌دار نداشتند (P>۰/۰۵).

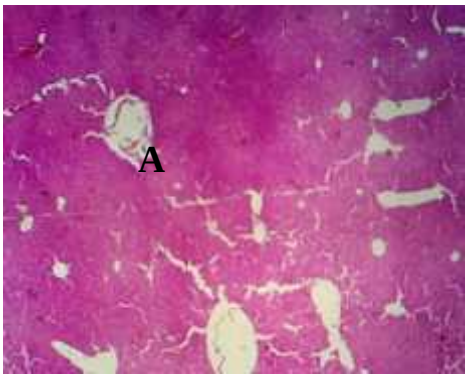
در بررسی بافتی، کبد موش‌های گروه‌های آزمایشی با

برش کبد موش گروه کنترل (شکل ۱) مقایسه شدند. در تمامی گروه‌ها تخریب بافت کبد دیده شد و با افزایش دوز نانوذرات تجویزی، تخریب بالاتر بود. در گروه‌هایی که نانوذرات را به‌صورت ترکیبی با دوز ۳۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم دریافت کرده بودند، بیشترین تخریب دیده شد (شکل ۴). شکل ۳ برش بافتی کبد گروه تیمار شده با نانوذرات اکسید روی و دی‌اکسید تیتانیوم را با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم را نشان می‌دهد.

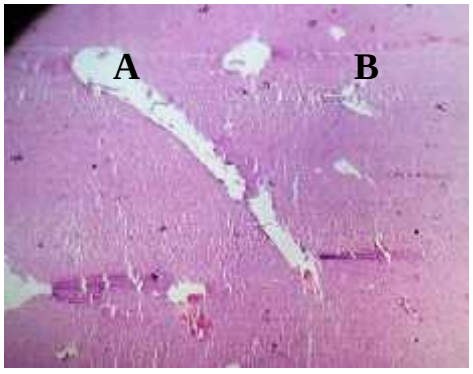
جدول شماره ۳- غلظت سرمی آنزیم‌ها در گروه کنترل و گروه آزمایشی موش‌های نر دریافت‌کننده نانوذرات اکسید روی و دی‌اکسید تیتانیوم به مدت چهارده روز

پارامترها	گروه کنترل n=۷	۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم TiO_2 +ZnO n=۷	۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم TiO_2 +ZnO n=۷	۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم TiO_2 +ZnO n=۷
آلکالین فسفاتاز (واحد در لیتر)	۴۳۵/۱۲ ±۵/۰۷	*۴۶۷/۰۸ ±۲/۳۱	*۵۰۲/۲۰ ±۵/۴۱	*۵۴۱/۳۱ ±۳/۷۱
آلانین آمینوترانسفراز (واحد در لیتر)	۸۷/۰۰ ±۶/۲۱	*۹۱/۱۲ ±۲/۹۱	*۹۹/۰۱ ±۳/۴۳	*۱۹۷/۰۲ ±۶/۵۷
آسپارتات آمینوترانسفراز (واحد در لیتر)	۱۲۹/۴۶ ±۴/۲۸	*۱۵۱/۱۲ ±۴/۷۱	*۱۷۸/۸۲ ±۴/۲۱	*۲۷۱/۳۱ ±۶/۰۲

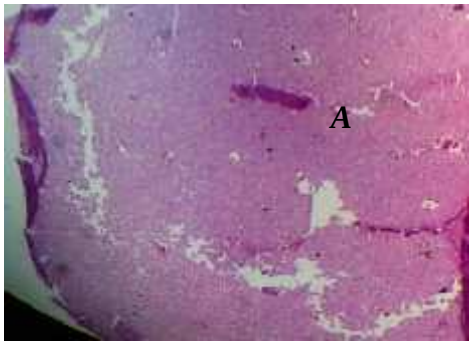
آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Duncan. * P<۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل



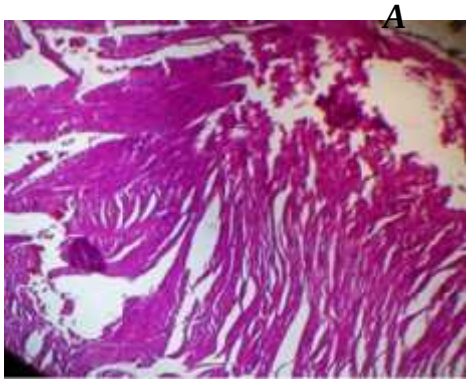
شکل ۱- برش بافتی کبد موش گروه کنترل با بزرگنمایی ×۱۰۰ با رنگ‌آمیزی H&E (A: ورید مرکزی)



شکل ۲- برش بافتی کبد موش با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذرات TiO_2 و ZnO با بزرگنمایی ×۱۰۰ با رنگ‌آمیزی H&E (A: ورید مرکزی/ B: تخریب کمتر در کبد)



شکل ۳- برش بافتی کبد موش با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذرات TiO_2 و ZnO با بزرگنمایی×۱۰۰ با رنگ‌آمیزی H&E (A: تخریب کمتر در کبد)



شکل ۴- برش بافتی کبد موش با دوز ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذرات TiO_2 و ZnO با بزرگنمایی ×۱۰۰ با رنگ‌آمیزی H&E (A: تخریب شدید در کبد)

بحث

در پژوهش حاضر اثر سمیت نانوذرات اکسید روی و دی‌اکسید تیتانیوم به علت کاربرد زیاد آنها در صنایع و همچنین برای مقایسه نسبت به کارهای قبلی مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه سایزهای متفاوت نانوذرات و همچنین دوزهای مختلفی از نانوذرات استفاده شد. در این پژوهش اثرات ترکیبی دو نانوذره اکسید روی و دی‌اکسید تیتانیوم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به‌دست‌آمده در بررسی تأثیر مقادیر مختلف نانوذرات اکسید روی و دی‌اکسید تیتانیوم بر میزان آنزیم‌های کبدی نشان داد که این نانوذرات باعث افزایش معنی‌داری در غلظت‌های این آنزیم‌ها می‌شوند. آنزیم آلانین آمینوترانسفراز برای کبد اختصاصی بوده و آسیب سلول‌های کبدی باعث افزایش آزاد شدن این آنزیم می‌گردد [۱۳]. بنابراین دلیل افزایش آنزیم آلانین آمینوترانسفراز در این مطالعه، به علت اثر تخریبی نانوذرات اکسید روی و دی‌اکسید تیتانیوم بر سلول‌های کبدی بوده است. همچنین انسداد مجاری صفراوی باعث افزایش غلظت سرمی آنزیم آلکالین فسفاتاز می‌گردد [۱۴]. ازاین‌رو، احتمالاً با توجه به تخریب سلول‌های کبدی و انسداد مجاری صفراوی، غلظت آلکالین فسفاتاز افزایش یافته است. در این مطالعه همچنین افزایش غلظت آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز مشاهده شد که ممکن است به دلیل افزایش آنابولیسم یا کاهش کاتابولیسم آنها باشد [۱۵].

در این مطالعه، احتمال می‌رود نانوذرات اکسید روی و دی‌اکسید تیتانیوم با توجه به خصوصیات فیزیکوشیمیایی که دارند، این ثبات را بر هم زده و موجب بروز اختلال در عملکرد کبد می‌گردند. نتایج بررسی ما حاکی از آن بود که در اثر تجویز نانوذرات، بافت کبد دچار تخریب شده بود. این نانوذرات با ورود به سلول و پس از مستقر شدن در سیتوپلاسم موجب مرگ سلولی می‌گردند [۱۶]. مطالعات زیادی روی خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوذرات صورت گرفته است. در مطالعه اخیر، اثرات دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۳۰۰ نانوذرات اکسید روی بر روی کبد و آنزیم‌های کبدی بررسی شد و اثرات سمی آن به تأیید رسید که موجب افزایش سطح آنزیم‌های کبدی و تخریب بافت کبد شدند و با افزایش دوز نانوذرات تجویزی، اثرات سمی بیشتر شد. همچنین در مطالعات ما که دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۳۰۰ نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بررسی شدند با افزایش دوز، اثرات سمی نیز بیشتر شد. نانوذرات اکسید روی نیز اثر مشابهی بر روی موش‌ها داشتند. در بررسی ما، در گروه‌های آزمایشی که نانوذرات اکسید روی و دی‌اکسید تیتانیوم را به‌صورت ترکیبی با دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن دریافت کرده بودند، بیشترین اثرات سمی دیده شد. سطح آنزیم‌های کبدی و تخریب کبد در بالاترین حد بود و با افزایش دوز اثرات سمی نیز بیشتر شد. نانوذرات اکسید روی باعث آسیب شدید کبد، نشت از غشای سلول، آزاد شدن آنزیم، پرخونی بافت کبد، تغییر چربی کبد، هپاتیک نکرونی و هپاتیت پورتال در کبد می‌شود [۱۱].

نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم نیز باعث مرگ سلولی و نکروز کبدی می‌شود [۱۷]. ازاین‌رو احتمال می‌رود اثر توأم این نانوذرات موجب القای شدید تخریب بافتی در این اندام شده است. در مطالعه صورت‌گرفته با هدف ارزیابی اثر سمیت حاد نانوذرات اکسید روی بر برخی فاکتورهای بیوشیمیایی کبد در سرم خون موش، غلظت سرمی آنزیم‌های لاکتات دهیدروژناز، آلکالین فسفاتاز،

آلانین آمینوترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز تعیین شد. افزایش قابل‌توجهی در آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز، آلکالین فسفاتاز و آسپارتات آمینوترانسفراز مشاهده شد [۱۱]. نانوذرات اکسید روی به روش تزریق وارد بدن رت‌های نر شدند و بعد از خون‌گیری، آنالیز سرم موش‌ها افزایش آنزیم‌های کبدی (آلانین آمینوترانسفراز، آلکالین فسفاتاز و آسپارتات آمینوترانسفراز) را نشان داد. همچنین درجاتی از تخریب بافتی در کبد حیوانات مشاهده شد [۱۸].

تجویز خوراکی نانوذرات اکسید روی بر روی کبد و کلیه موش صحرایی باعث افزایش فعالیت آنزیم پلاسمایی ترانس‌آمیناز گردید که نشان‌دهنده آسیب کبدی است. همچنین تجمع نانوذرات اکسید روی در کبد و کلیه دیده شد [۱۹]. اثر نانوذرات اکسید روی بعد از تجویز خوراکی به موش‌ها مورد بررسی قرار گرفت. افزایش سطح آنزیم‌های کبدی (آلانین آمینوترانسفراز، آلکالین فسفاتاز و آسپارتات آمینوترانسفراز) بعد از تیمار حیوانات با نانوذرات دیده شد. همچنین آسیب DNA، آسیب کبد و کلیه در حیوانات مورد آزمایش دیده شد و این نتایج نشان‌دهنده اثرات سمی نانوذرات اکسید روی است [۱۶].

در مطالعه دیگر اثر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر فعالیت آنزیم‌های کبدی رت مورد بررسی قرار گرفته است. نانوذرات به‌صورت دهانی به موش خورانده شد و بعد از این مدت فعالیت آنزیم‌های کبدی اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم باعث افزایش در غلظت آنزیم‌های کبدی می‌گردد. نتایج حاکی از اثر سمیت نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر بدن است [۱۷]. تجویز خوراکی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم سبب افزایش آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز می‌شود. افزایش این آنزیم‌ها در سرم در اثر تخریب کبد صورت می‌گیرد. بعد از تخریب غشای کبد، آنزیم‌های کبدی در خون رها می‌شوند [۲۰]. در بررسی اثرات سمی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم، نتایج نشان داد که مسمومیت‌های ناشی از نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم فعالیت غده تیموس را کاهش می‌دهد، این غده در تکامل ایمونولوژیکی سلول‌های T دارای نقش بسیار مهمی است [۲۱]. محققان آزمایش‌هایی در شرایط invitro با استفاده از نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم انجام دادند و نتیجه گرفتند که نانو دی‌اکسید تیتانیوم سیستم تولیدمثلی نر را تحت تأثیر قرار می‌دهد. این نانوذرات جذب سلول‌های لیدیگ می‌شود و تکثیر آن‌ها را مختل می‌کند [۲۲].

در مطالعه‌ای که توسط Fabian و همکاران صورت گرفت، تأثیر تجویز داخل وریدی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم در رت‌های نژاد ویستار مورد بررسی قرار گرفت. تجمع مقداری از این ذرات در کبد، کلیه، طحال و ریه یافت شد ولی هیچ‌گونه پاسخ التهابی در بافت‌های فوق دیده نشد. بر این اساس، آنها پیشنهاد کردند که نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم اگر در مقادیر کم استفاده شوند، خطری ندارند [۲۳]. نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر روی لنفوسیت‌های خون انسان اثر سمی دارند که به دلیل تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن است [۲۴]. تجویز نانوذره اکسید روی به‌صورت خوراکی نشان داد که بعد از ۷۲ ساعت سطح معنی‌داری از روی در اندام‌ها به‌ویژه کبد و کلیه توزیع و پخش شد [۲۵]. شواهد به‌دست‌آمده نشان داد که نانوذرات ممکن است به‌صورت بالقوه از روده به بافت‌های داخل راه یابند [۲۶]. نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم از طریق دهانی وارد بدن موجودات می‌شود که درنتیجه، عملکرد اپی‌تلیوم معده و روده را تحت تأثیر خود

قرار می‌دهد. در یک تحقیق، جذب نانوذرات از طریق روده کوچک گزارش شده است [۲۷]. به‌طورکلی، نتایج این پژوهش سمیت نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و اکسید روی را تأیید نمود. بررسی بیان ژن آنزیم‌های موردمطالعه به دلیل محدودیت منابع مالی انجام نشد، پیشنهاد می‌شود مطالعات دیگری در این زمینه انجام شود و همچنین پیشنهاد می‌گردد تأثیر این نانوذرات به‌صورت پوستی، تزریقی و استنشاق نیز بررسی گردد. بررسی دوزها و سایزهای دیگر این نانوذرات و همچنین بررسی سایر اندام‌ها مخصوصاً ماهیچه، بافت عصبی و فاکتورهای خونی پیشنهاد می‌شود.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه سمیت نانوذرات اکسید روی و دی‌اکسید تیتانیوم را تأیید نمود و احتمال می‌رود که تجویز نانوذرات اکسید روی و دی‌اکسید تیتانیوم در سه غلظت مختلف به روش خوراکی می‌تواند به‌واسطه افزایش نشت آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز، آلکالین فسفاتاز و آسپارتات آمینوترانسفراز از سلول‌های کبدی و افزایش سطح سرمی آنها، باعث مسمومیت موش‌ها از طریق ایجاد اختلال در عملکرد کبد و آسیب سلول‌های کبدی و تخریب کبد شود. بااین‌حال، مطالعه اثرات سایر دوزهای نانوذرات اکسید روی و دی‌اکسید تیتانیوم بر روی بدن انسان و موجودات و همچنین بررسی اثرات دیگر نانوذرات بر روی سایر ارگان‌های موجودات توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد تحت عنوان «مطالعه اثرات نانوذرات برخی اکسیدهای فلزی بر روی برخی از آنزیم‌های کبدی موش سفید آزمایشگاهی» است، بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی جهت تصویب و حمایت مالی از این طرح تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

[1] Goddard Iii WA, Brenner D, Lyshevski SE, Iafrate GJ, editors. Handbook of nanoscience, engineering, and technology. *CRC press*; 2007 May 3.

[2] Berry CC, Curtis AS. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J, Phys, D: Appl, Phys* 2003; 36(13): R198.

[3] Hoet PH, Brüske-Hohlfeld I, Salata OV. Nanoparticles–known and unknown health risks. *J nanobiotechnology* 2004; 2(1): 12.

[4] Li LZ, Zhou DM, Peijnenburg WJ, van Gestel CA, Jin SY, Wang YJ, et al. Toxicity of zinc oxide nanoparticles in the earthworm, Eisenia fetida and subcellular fractionation of Zn. *Environ, Int* 2011; 37(6): 1098-104.

[5] Gupta SM, Tripathi M. A review of TiO2 nanoparticles. *Chin, Sci, Bull* 2011; 56(16): 1639-57.

[6] Chang YN, Zhang M, Xia L, Zhang J, Xing G. The Toxic Effects and Mechanisms of CuO and ZnO Nanoparticles. *Materials* 2012; 2850-71.

[7] Saptarshi SR, Duschl A, Lopata AL. Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *J nanobiotechnology* 2013; 11(1): 1.

[8] Fazilati M. Investigation toxicity properties of zinc oxide nanoparticles on liver enzymes in male rat. *Eur J Exp Biol* 2013; 3(1): 97-103.

[9] Rezaei Zarchi S. Effect of Titanium Dioxide Nanoparticles on the Amount of Blood Cells and Liver Enzymes in Wistar Rats. *SSU Journals* 2011; 19(5): 618-26. [Farsi]

[10] Kim EE, Wyckoff HW. Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures: two-metal ion catalysis. *J, Mol, Biol* 1991; 218(2): 449-64.

[11] Heydarnejad M, Najafi M, Mobini-Dehkordi M, Rahnama S. An assessment of acute oral toxicity of ZnO nanoparticles on serum biochemical function of liver in mice. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2014; 16(1): 65-71. [Farsi]

[12] Sheydaei P, Bayrami A, Azizian Y, Parvinroo Sh. Study on the Toxicity Effects of Zinc Oxide Nanoparticles on Hematological and Serum Parameters in Mice. *J Arak Univ Med Sci* 2016; 19(115): 39-47. [Farsi]

[13] Tiegs G, Hentschel J, Wendel A. AT cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *J, Clin, Invest* 1992; 90(1): 196.

[14] Kaplan MM, Righetti A. Induction of rat liver alkaline phosphatase: the mechanism of the serum elevation in bile duct obstruction. *J, Clin, Invest* 1970; 49(3): 508.

[15] Christ-Crain M, Huber PR, Keller U, Meier C, Müller B, Puder J, et al. Changes in liver function correlate with the improvement of lipid profile after restoration of euthyroidism in patients with subclinical hypothyroidism *EXCLI J* 2004; 3: 1-9.

[16] Sharma V, Singh P, Pandey AK, Dhawan A. Induction of oxidative stress, DNA damage and apoptosis in mouse liver after sub-acute oral exposure to zinc oxide nanoparticles. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 2012; 745(1): 84-91.

[17] Rezaei-Zarchi S, Taghavi-Foumani MH, Razavi Sheshdeh SA, Negahdary M. The effect of silver nanoparticles on blood cells in male rats. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2013; 10(2): 147-153. [Farsi]

[18] Saman S, Moradhaseli S, Shokouhian A, Ghorbani M. Histopathological effects of ZnO nanoparticles on liver and heart tissues in wistar rats. *Adv Biores* 2013; 4(2): 83-8.

[19] Guo D, Bi H, Liu B, Wu Q, Wang D, Cui Y. Reactive oxygen species-induced cytotoxic effects of zinc oxide nanoparticles in rat retinal ganglion cells. *Toxicol, In Vitro* 2013; 27(2): 731-8.

[20] Duan Y, Liu J, Ma L, Li N, Liu H, Wang J, et al. Toxicological characteristics of nanoparticulate anatase titanium dioxide in mice. *Biomaterials* 2010; 31(5): 894-9.

[21] Silva AM, Novelli EL, Fascineli ML, Almeida JA. Impact of an environmentally realistic intake of water

contaminants and superoxide formation on tissues of rats. *Environ, Pollut* 1999; 105(2): 243-9.

[22] Komatsu T, Tabata M, Kubo-Irie M, Shimizu T, Suzuki KI, Nihei Y, et al. The effects of nanoparticles on mouse testis Leydig cells in vitro. *Toxicol, In Vitro* 2008; 22(8): 1825-31.

[23] Fabian E, Landsiedel R, Ma-Hock L, Wiench K, Wohlleben W, Van Ravenzwaay B. Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. *Arch, Toxicol* 2008; 82(3): 151-7.

[24] Kang SJ, Kim BM, Lee YJ, Chung HW. Titanium dioxide nanoparticles trigger p53- mediated damage response in peripheral blood lymphocytes. Environ, Mol, Mutagen 2008; 49(5): 399-405.

[25] Cho WS, Kang BC, Lee JK, Jeong J, Che JH, Seok SH. Comparative absorption, distribution, and excretion of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles after repeated oral administration. *Part Fibre Toxicol* 2013; 10(1): 1.

[26] Brun E, Barreau F, Veronesi G, Fayard B, Sorieul S, Chanéac C, et al. Titanium dioxide nanoparticle impact and translocation through ex vivo, in vivo and in vitro gut epithelia. *Part Fibre Toxicol* 2014; 11(1): 1.

[27] Al-Jubory AR, Handy RD. Uptake of titanium from TiO2 nanoparticle exposure in the isolated perfused intestine of rainbow trout: nystatin, vanadate and novel CO2-sensitive components. *Nanotoxicology* 2013; 7(8): 1282-301.

An **Investigation of the Toxicity of Zinc Oxide and Titanium Oxide Nanoparticles on Some Liver Enzymes in Male Mice**

S. Arbabi[1], A. Bayrami[2], P. Sheidaii[1]

Received: 28/02/2017 Sent for Revision: 06/05/2017 Received Revised Manuscript: 20/09/2017 Accepted: 23/09/2017

Background and Objectives: The advancement of nanotechnology has made it more important to study the destructive effects of nano-materials on organisms. Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles can enter the body in different ways and cause damage to the liver and other organs of the body. The purpose of this study was to evaluate the effects of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles on some liver enzymes and tissue in male rats.

Materials and Methods: In this experimental study, 70 adult male mice were divided into ten groups including one control and nine experimental groups. The mice in the experimental groups orally received zinc oxide and titanium oxide nanoparticles with doses of 50, 100, and 300 mg/kg. The experiment lasted for 14 days, then on the fifteenth day, blood samples were collected. Liver tissues and some liver enzymes (Alanine aminotransferase, Alkaline phosphatase, and Aspartate aminotransferase) were analayzed. The data were analyzed using one way ANOVA and Duncan post hoc test with respect to normal distribution.

Results: The results showed that zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles at concentrations of 100 and 300 mg / kg, and the combination of these two nanoparticles at concentrations of 50, 100, and 300 mg caused a significant change in the activity of liver enzymes (alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, and aspartate aminotransferase) that was more than the control group ($p<0.05$).

Conclusion: The results showed that zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles at different doses may increase serum levels of enzymes due to liver degeneration and increased leakage of liver enzymes. However, further studies are proposed to predict the effects of this substance and to safely use these nanoparticles.

Key words: Liver enzyme, Titanium oxide nanoparticles, Zinc oxide nanoparticles, Mice

Funding: This research was funded by University of Mohaghegh Ardabili.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of University of Mohaghegh Ardabili approved the study.

How to cite this article: Arbabi S, Bayrami A, Sheidaii P. An Investigation of the Toxicity of Zinc Oxide and Titanium Oxide Nanoparticles on Some Liver Enzymes in Male Mice. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2017; 16(7): 633-44. [Farsi]

1- MSc Student in Animal Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mohagegh Ardabili, Ardabili, Iran

2- Assistant Prof., Dept. of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mohagegh Ardabili, Ardabili, Iran (Corresponding Author) Tell: (045) 33513915, Fax: (045) 33514701, Email: a_bayrami@uma.ac.ir