

## بررسی مقایسه‌ای سمیت نانوذره نیکل و کلرید نیکل بر بافت و آنزیم‌های کبدی در موش صحرایی

فرنوش انوشا<sup>۱</sup>، باقر سیدعلیپور<sup>۲\*</sup>، علی طراوتی<sup>۲</sup>، منیره موحدی<sup>۳</sup>

۱. کارشناس ارشد بیوشیمی، گروه زیست‌سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران.

۲. استادیار، گروه زیست سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران.

۳. استادیار، گروه زیست سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران.

## چکیده

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۵/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۲۴

**اهداف** سمیت فلزات و ترکیبات آن با خواص فیزیوشیمیایی تعیین می‌شود. بنابراین، فلزات ممکن است برای اتصال به سایت‌های بیولوژیکی به رقابت بپردازند و در نتیجه باعث عملکرد نادرست ماکرومولکول‌های بیوشیمیایی شوند. این مطالعه با هدف بررسی سمیت نانوذره نیکل در مقایسه با کلرید نیکل بر فعالیت آنزیم‌های کبدی و بررسی تغییرات هیستوپاتولوژی بافت کبد در موش صحرایی نر انجام شد.

**مواد و روش‌ها** در این مطالعه تجربی، ۴۸ سر موش صحرایی نر بالغ به ۶ گروه تجربی، یک گروه کنترل و یک گروه شم تقسیم شدند. گروه‌های تجربی، نانو ذرات نیکل و کلرید نیکل با غلظت ۵، ۱۵ و ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت درون صفاقی دریافت کردند. پس از یک هفته تزریق، خون و نمونه بافتی برای آنالیز جمع‌آوری شد. سنجش فعالیت آنزیم‌های کبدی و مطالعات هیستوپاتولوژی انجام شد. نتایج با استفاده از آنوا و تست تعقیبی توکی آنالیز شد.

**یافته‌ها** فعالیت آنزیم‌های AST و ALP در دوزهای مختلف نانوذره نیکل و کلرید نیکل و فعالیت LDH در دوزهای مختلف کلرید نیکل تغییرات معناداری در گروه‌های مورد مطالعه نشان داد ( $p < 0.05$ ). مطالعات هیستوپاتولوژی کبد حاکی از تغییرات وابسته به دوز در موش‌های تیمار شده با کلرید نیکل و نانوذره نیکل نسبت به گروه کنترل بود. تغییراتی شامل نکروز، پرخونی، آپاپتوز و استئاتوهپاتیت پس از قرار گرفتن در معرض دوزهای مختلف مشاهده شد.

**نتیجه‌گیری** افزایش غلظت آنزیم‌های کبدی و تغییرات هیستوپاتولوژی کبد سمیت نانوذره نیکل و کلرید نیکل را تأیید می‌کند.

## کلیدواژه‌ها:

آنزیم‌های کبدی، کلرید نیکل، موش صحرایی، نانو ذرات نیکل، هیستوپاتولوژی.

## مقدمه

نیکل به‌طور گسترده‌ای در محیط‌زیست پراکنده است و غلظت آن تابعی از سوخت‌های فسیلی است. انسان از طریق هوا، آب،

غذا و تنباکو در معرض نیکل قرار دارد. در این میان، غذا مهم‌ترین مسیر ورود نیکل در بدن انسان است که جذب متوسط روزانه آن ۰/۲ تا ۰/۳ میلی‌گرم است و دود سیگار در

\* نویسنده مسئول: باقر سیدعلیپور

نشانی: دانشگاه مازندران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌سلولی و مولکولی

دورنگار:

تلفن: ۰۱۱-۳۵۳۰۲۴۰۵

رایانه: b.alipour81@gmail.com

شناسه ORCID: 000-0002-3854-9328

شناسه ORCID نویسنده اول: 0000-0002-9812-6706

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دوره ۲۵، شماره ۵، آذر و دی ۱۳۹۷، ص  
آدرس سایت: <http://jsums.medsab.ac.ir> رایانامه: [journal@medsab.ac.ir](mailto:journal@medsab.ac.ir)

شاپای چاپی: ۱۶۰۶-۷۴۸۷

باشد تأثیر آن بر کبد و متابولیسم آن است. بنابراین هدف از این پژوهش بررسی اثر سیتوتوکسیک نانو ذرات نیکل و کلرید نیکل بر پارامترهای بیوشیمیایی خون و تغییرات هیستوپاتولوژی کبد در مدل موش صحرایی است که می‌تواند افق جدیدی را در رابطه با چالش‌های موجود باز نماید.

### مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، ۴۸ سر موش صحرایی نر ویستار بالغ با محدوده سنی ۱۲-۱۴ هفته و محدوده وزن ۱۷۰-۲۲۰ گرم از انستیتو پاستور آمل خریداری شدند. موش‌ها در اتاق حیوانات دانشگاه مازندران تحت شرایط استاندارد، دمای  $23 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و رطوبت حدود  $60 \pm 10$  درصد دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند و آب و غذای مخصوص به شکل پیلت همواره در دسترس آن‌ها قرار داشت. آزمایش‌ها روی تمامی موش‌های مورد آزمایش در شرایط کاملاً یکسان و رعایت شرایط استاندارد مطابق اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی در دانشگاه مازندران صورت گرفت. معیارهای ورود به مطالعه شامل نر بودن موش‌ها، استفاده از موش صحرایی نژاد ویستار، محدوده سنی ۱۲-۱۴ هفته و محدوده وزن ۱۷۰-۲۲۰ گرم، استفاده از روش تزریق درون صفاقی، سلامت کامل موش‌ها و عدم استفاده پیشین از هرگونه ترکیبات شیمیایی بود. معیارهای خروج از مطالعه شامل مشاهده هرگونه بیماری، عفونت یا التهاب در هنگام آزمایش، مؤنث بودن و عدم تناسب وزنی و سنی موش با مطالعه حاضر بود.

در این پژوهش تجربی ۴۸ موش صحرایی نر بالغ به ۸ گروه ۶ تایی شامل یک گروه کنترل، یک گروه شم و ۶ گروه تجربی به‌طور تصادفی تقسیم‌بندی شدند. برای انجام این مطالعه نانوذره نیکل با شکل ظاهری کروی، رنگ سیاه و درجه خلوص ۹۹ درصد از شرکت سیگما آلدريج و کلرید نیکل به‌صورت هگزا هیدرات با شکل ظاهری بلوری، رنگ سبز و درصد خلوص ۹۹ درصد از شرکت مرگ آلمان خریداری شد. با توجه به مطالعات انجام شده در ارتباط به دوز LD50 کلرید نیکل، دوز تزریقی گروه‌های آزمایشی را کمتر از دوز LD50 کلرید نیکل تعیین کردیم [۱۳]. ماده تزریقی روزانه تهیه شده و در هر مرحله قبل از تزریق به مدت ۱۵ دقیقه در سرم فیزیولوژی حل شد و با استفاده از سرنگ انسولین ۱ میلی‌لیتر از ماده تزریقی به‌صورت درون صفاقی به مدت یک هفته به‌صورت روزانه انجام شد. به موش‌های گروه شم روزانه یک میلی‌لیتر

درجه دوم اهمیت قرار دارد که جذب متوسط روزانه آن ۰/۰۲ میلی‌گرم است [۱، ۲]. در پلاسما، نیکل از طریق باند شدن با آلومین، ماکروگلوبولین-آلفا ۲ و پلی‌پپتیدهای کوچک و آمینواسیدها انتقال می‌یابد. وزن مولکولی پایین کمپلکس نیکل و ال-هیستیدین باعث می‌شود که بتواند به راحتی از غشای بیولوژیکی عبور کند [۳]. نیمه عمر بیولوژیکی نیکل در پلاسما ۲۰-۳۴ ساعت و در ادرار ۱۷-۳۹ ساعت گزارش شد [۴]. مطالعات نشان داد توانایی نیکل برای ورود به سلول هدف و آزادسازی یون نیکل عامل اصلی آثار سمی و کارسینوزن، برای مشخص کردن زیست سازگاری ترکیبات نیکل است. غلظت نیکل داخل سلولی احتمالاً می‌تواند علت فعالیت کارسینوزن بیشتر ترکیبات نیکل در مقایسه با نمک نیکل محلول را توجیه کند [۵، ۶]. مکانیسم اثر این عنصر از طریق ایجاد اتصالات غیر برگشت با ماکرومولکول‌ها است و به همین علت موجب اختلال در فعالیت بیولوژیکی سلول‌ها می‌شود. نیکل بعد از ورود به بدن می‌تواند باعث آسیب به بافت‌های مختلفی از جمله کبد، کلیه، شش و بیضه شود [۷].

فناوری نانو با بهره‌گیری از ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی مواد در اندازه‌های کمتر از ۱۰۰ نانومتر در علوم و صنایع مختلف کاربرد دارد. نانو ذرات به علت اندازه فوق‌العاده کوچک خود به نظر می‌رسد با مشکل چندانی برای عبور از سد‌های فیزیولوژیکی درون بدن مواجه نیستند و بنابراین به‌طور مؤثر از طریق جریان سیستم عروقی در بافت‌های بدن به‌ویژه کبد توزیع می‌شوند [۸، ۹]. اندازه کوچک نانو ذرات نقش مهمی در سمیت این مواد دارد. نانو ذرات توانایی دارند که از غشای سلول عبور کرده و وارد سلول شوند و به‌طور مستقیم باعث آسیب سلولی شوند. نانو ذرات به لحاظ کاربردهای فراوانی که در یک دهه گذشته پیدا کرده‌اند بسیار مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته‌اند [۱۰]. می‌دانیم که در نانو ذرات کاهش اندازه ذرات، باعث افزایش نسبت سطح به حجم ذرات می‌شود که مهم‌ترین اثر این پدیده، افزایش شدید خواص کاتالیستی نانو ذرات فلزی است [۱۱]. مطالعات مختلف نشان می‌دهد که نانو ذرات قادرند گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را تولید کنند و سطح ROS درون سلول را تغییر دهند و با آسیب رساندن به DNA می‌توانند به سلول‌ها آسیب وارد کنند [۱۲]. آثار سمی نانو ذرات از جمله نگرانی‌های بزرگی است که مصرف این نانو ذرات را با چالش‌های زیادی مواجه کرده است. عوارض جانبی و احتمالی نانو ذرات باعث تردید در مصرف آن شده است. از جمله تأثیرات عمده‌ای که نانو ذرات در بدن می‌تواند داشته

برحسب U/I گزارش شد. برای سنجش لاکتات دهیدروژناز در سرم با کیت پارس آزمون (lot no 94005) از روش فتومتریک و بر اساس فدراسیون بین‌المللی شیمی بالینی و طب آزمایشگاهی (IFCC) در طول موج ۳۴۰ نانومتر انجام شد. پس از مخلوط کردن ۱۰۰ میکرولیتر سرم با ۱۰۰۰ میکرولیتر معرف، پس از ۱، ۲ و ۳ دقیقه جذب‌های نوری قرائت و تغییرات جذب در فاکتور ۳۶۲۵ ضرب شد و فعالیت آنزیم برحسب U/I گزارش شد.

برای انجام مطالعات هیستوپاتولوژی، جانور را فیکس و پوست و عضله را به ترتیب جدا کرده و سپس کبد خارج شد و پس از شستشو با محلول سرم فیزیولوژی سرد و اندازه‌گیری دقیق وزن، در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شدند. مراحل آماده‌سازی بافتی شامل آب‌گیری، الکل‌گیری و شفاف‌کردن، نفوذ پارافین و قالب‌گیری انجام شد. نمونه‌ها همراه با قالب پارافین توسط دستگاه میکروتوم برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرون گرفته شد و به روش هماتوکسیلین-ئوزین (H&E) رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری ارزیابی صورت گرفت. شاخص‌های هیستوپاتولوژیکی کبد مانند اتساع سینوزوئیدها، اینفیلتریشن سلول‌های آماسی، نکروز و پرخونی و غیره مطالعه و ارزیابی شد. ۱۰ مقطع بافتی از کبد، به صورت سریال سکشن ارزیابی شد و بیست فیلد میکروسکوپی در آن مقاطع، در ارزیابی نهایی لحاظ شد. نتایج به صورت تعداد علامت مثبت که نمایانگر حالت‌های عدم مشاهده تغییرات بافتی ساختار طبیعی (-)، آسیب خفیف +۱ (Mild)، آسیب ملایم +۲ (Moderate) و آسیب شدید +۳ (Severe) بود نشان داده و بررسی شد.

### آنالیز آماری و تحلیل داده‌ها

پس از جمع‌آوری داده‌ها، تجزیه و تحلیل با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۱ انجام شد. برای بررسی وجود اختلاف بین گروه‌ها، از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و به دنبال آن از آزمون تعقیبی توکی و برای مطالعه تغییرات وزن کبد از تست تعقیبی LSD استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش و اختلاف بین گروه‌ها با  $p < 0.05$  معنادار تلقی شده است.

### یافته‌ها

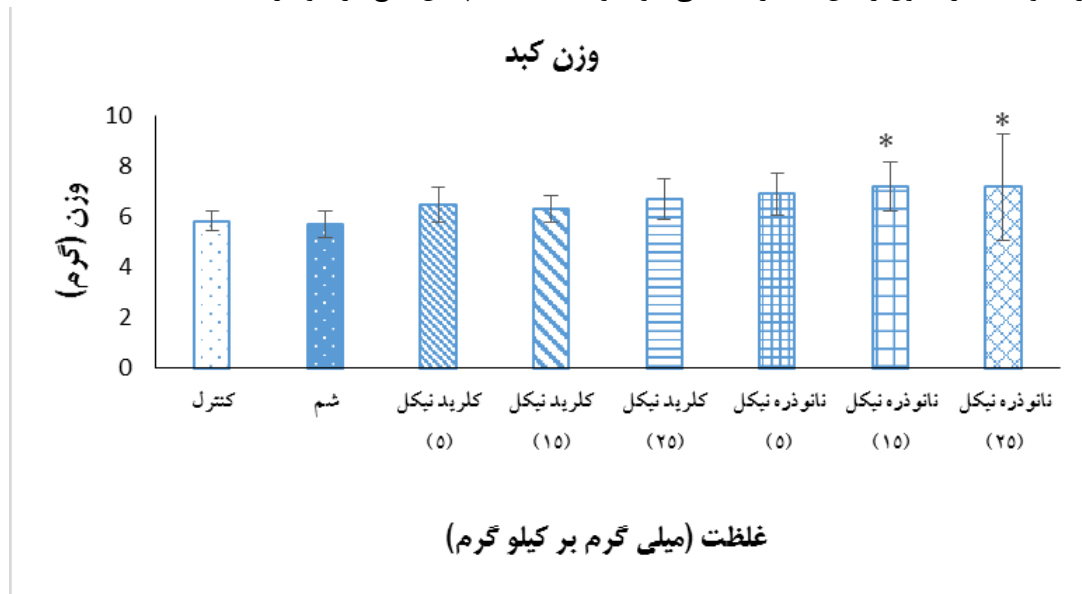
در مطالعه حاضر سمیت نانوذره نیکل و کلرید نیکل بر وزن بدن موش ارزیابی شد. تغییرات وزن بدن موش نر قبل و بعد از دوره تیمار تفاوت معناداری را نشان نداد ( $p > 0.05$ ). در تمام دوره آزمایش هیچ تغییر رفتاری یا پاسخ غیرمعمول در حیوانات تیمار شده با کلرید نیکل و نانوذره نیکل مشاهده

سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد تزریق شد. نانو ذره نیکل و کلرید نیکل با غلظت‌های ۵، ۱۵ و ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به ازای وزن بدن به صورت درون صفاقی به مدت یک هفته به صورت روزانه به گروه‌های مورد آزمایش تزریق شد. پس از آخرین تزریق با رعایت شرایط ناشتا، خون‌گیری از قلب تحت بی‌هوشی عمیق صورت گرفت. نخست موش را با کلروفورم بی‌هوش کرده، جانور را فیکس و عمل جمع‌آوری خون از قلب به وسیله سرنگ ۵ سی‌سی انجام گرفت. سپس نمونه خون به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ شده تا سرم از لخته جدا شود. بعد از جداسازی سرم خون از لخته به وسیله سمپلر، نمونه‌ها تا زمان انجام سنجش‌های آنزیمی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های کبدی آلکال فسفاتاز، آلانین آمینو ترانسفراز، آسپارات آمینو ترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز از دستگاه تمام‌اتوماتیک اتونالایزر آلفا کلاسیک با بهره‌گیری از کیت‌های پارس آزمون بر نمونه سرم انجام شد. برای کالیبراسیون دستگاه از Trucal u و برای کنترل پارامترها از Control N استفاده شد.

سنجش آلکال فسفاتاز در نمونه سرم با کیت پارس آزمون (lot no 94009) با روش فتومتریک طبق استاندارد انجمن بیوشیمی آلمان (DGKC) و طول موج ۴۰۵ نانومتر انجام شد. پس از اینکه ۲۰ میکرولیتر نمونه با معرف مخلوط شد مقدار جذب نوری اولیه را قرائت کرده و کرنومتر را به کار انداخته و دقیقاً بعد از ۱ و ۲ و ۳ دقیقه جذب‌های نوری را مجدد قرائت کرده و مقدار اختلافات جذب نوری پس از دقایق ۱ و ۲ و ۳ را با هم جمع کرده و بر عدد ۳ تقسیم کرده و میانگین به دست آمده را در فاکتور ۳۴۳۳ ضرب می‌نماییم. فعالیت آنزیم برحسب U/I گزارش شد. برای سنجش آلانین آمینو ترانسفراز در سرم با کیت پارس آزمون (lot no 94003) با روش فتومتریک و بر اساس فدراسیون بین‌المللی شیمی بالینی و طب آزمایشگاهی (IFCC) در طول موج ۳۴۰ نانومتر انجام شد. پس از مخلوط کردن ۱۰۰ میکرولیتر نمونه با معرف مقدار جذب نوری را در زمان‌های ۱ و ۲ و ۳ دقیقه قرائت کرده و تغییرات جذب در فاکتور ۱۷۳۶ ضرب کرده و فعالیت آنزیم برحسب U/I گزارش شد. برای سنجش آسپارات آمینو ترانسفراز در سرم با کیت پارس آزمون (lot no 94006) روش فتومتریک و بر اساس فدراسیون بین‌المللی شیمی بالینی و طب آزمایشگاهی (IFCC) در طول موج ۳۴۰ نانومتر انجام شد. پس از مخلوط کردن ۱۰۰ میکرولیتر نمونه با معرف مقدار جذب نوری را در زمان‌های ۱ و ۲ و ۳ دقیقه قرائت کرده تغییرات جذب در فاکتور ۱۷۴۶ ضرب کرده و فعالیت آنزیم

نشده. ظاهر حیوانات در طول زمان تیمار طبیعی بوده و

همچنین هیچ مرگومیری مشاهده نشد.



شکل ۱. تغییرات وزن کبد در غلظت‌های مختلف نانو ذره نیکل و کلرید نیکل در موش صحرائی

یافته‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار نشان داده شده‌اند. \* دارای اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل به ازاء  $p < 0.05$  و \*\* دارای اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل به ازاء  $p < 0.01$ . اختلاف در سطح احتمال  $p < 0.05$  معنادار در نظر گرفته شده است (n=6)

آمینوترانسفراز در تمام گروه‌های مورد مطالعه نسبت به گروه کنترل افزایش داشته اما این اختلاف معناداری نبود. آنالیز آماری با آزمون آنوا نشان داد که میزان فعالیت آلانین آمینوترانسفراز در گروه‌های مورد مطالعه کلرید نیکل و نانو ذره نیکل افزایش معناداری را نشان داد ( $p = 0.004$ ). بر اساس تست تعقیبی توکی مشخص شد میزان فعالیت ALT بین گروه نانو ذره نیکل با غلظت ۱۵ میلی گرم بر کیلوگرم با گروه کلرید نیکل با غلظت ۱۵ میلی گرم بر کیلوگرم ( $p = 0.038$ ) و ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم ( $p = 0.002$ ) اختلاف معناداری را نشان داد در حالی که بین بقیه گروه‌ها اختلاف معناداری مشاهده نشد. همان طوری که در جدول ۱ مشاهده می‌شود آنالیز آماری با آزمون آنوا نشان داد فعالیت آنزیم LDH در گروه‌های مورد مطالعه افزایش معناداری را نشان داد ( $p < 0.003$ ). فعالیت آنزیم LDH در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف کلرید نیکل در مقایسه با شم و کنترل افزایش معناداری را نشان داد. در حالی که گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانو ذره نیکل در مقایسه با کنترل و شم اختلاف معناداری مشاهده نشد.

همان طوری که در شکل ۱ نشان داده شده است، تغییرات وزن کبد در گروه‌های تجربی تیمار شده با کلرید نیکل در تمامی غلظت‌ها اختلاف معناداری را در مقایسه با گروه کنترل و شم نشان ندادند. در حالی که گروه تجربی تیمار شده با نانو ذره نیکل در غلظت ۱۵ و ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن اختلاف معناداری با گروه کنترل به ترتیب  $p = 0.018$  و  $p = 0.02$  نشان دادند.

در بررسی آنزیم‌های کبدی، نتایج این مطالعه تغییرات چشمگیری را در میزان آنزیم‌های AST، ALT، LDH و ALP نشان داد. آنالیز آماری با آزمون آنوا نشان داد که فعالیت آلکالین فسفاتاز در گروه‌های مورد مطالعه افزایش معناداری دارد ( $p < 0.001$ ). بر اساس تست تعقیبی توکی مشخص شد که فعالیت آنزیم در گروه کلرید نیکل با غلظت ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم با تمام گروه‌ها تفاوت معناداری ( $p < 0.001$ ) دارد. همچنین بین گروه کلرید نیکل با غلظت ۱۵ میلی گرم بر کیلوگرم و گروه نانو ذره نیکل با غلظت ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم اختلاف معناداری ( $p = 0.035$ ) مشاهده شد. همان طوری که در جدول ۱ مشاهده می‌شود آنالیز آماری با آزمون آنوا نشان داد که میزان فعالیت آسپاراتات

جدول ۱. بررسی تغییرات آنزیم‌های کبدی پس از تیمارسازی با غلظت‌های مختلف نانوذره نیکل و کلرید نیکل در موش صحرایی

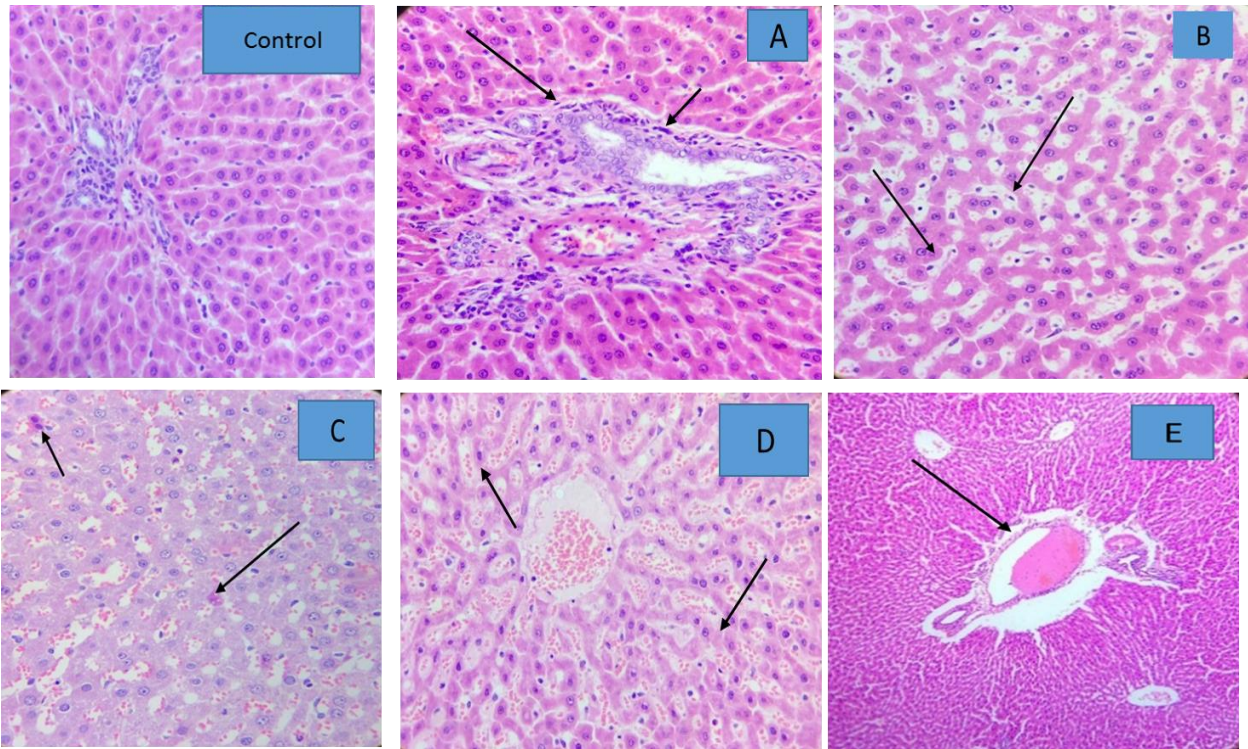
لاکتات دهیدروژناز (u/l)	آسپاراتات ترانس آمیناز (u/l)	آلکالن فسفاتاز (u/l)	آلانین ترانس آمیناز (u/l)	غلظت‌ها (mg/kg)
۱۴۵۶/۳۳ ± ۲۱۹/۸۷	۱۴۸/۳۳۵۰ ± ۱۰/۳۲	۳۴۳/۸۳ ± ۴۸/۵۱	۴۷/۱۶ ± ۵/۵۰	گروه کنترل
۱۴۲۶/۴۰ ± ۱۵۰/۰۴	۱۷۲/۶۰ ± ۱۳/۶۳	۳۵۶/۰۰ ± ۵۷/۶۹	۵۱/۲۰ ± ۲/۱۷	گروه ششم
۲۷۳۹/۰۰ ± ۶۶/۴۰	۲۰۹/۸۳ ± ۱۷/۵۴	۴۲۶/۸۳ ± ۲۹/۶۷	۴۹/۵۰ ± ۵/۲۰	کلرید نیکل (۵)
۲۶۷۳/۳۳ ± ۳۰۶/۴۹	۱۹۸/۵۰ ± ۱۵/۴۷	۴۷۸/۱۶ ± ۴۷/۳۱	۵۰/۵۰ ± ۴/۴۶	کلرید نیکل (۱۵)
۲۵۸۰/۰۰ ± ۳۴۶/۱۶	۲۱۱/۲۰ ± ۱۸/۷۵	۷۱۹/۶۰ ± ۴۸/۱۶	۵۷/۸۰ ± ۵/۹۱	کلرید نیکل (۲۵)
۲۲۹۶/۱۶ ± ۲۶۳/۰۱	۲۰۱/۳۳ ± ۱۳/۱۸	۳۴۱/۶۶ ± ۱۵/۳۶	۳۹/۸۳ ± ۲/۰۸	نانوذره نیکل (۵)
۱۹۹۶/۰۰ ± ۳۰۴/۰۰	۱۹۹/۲۰ ± ۲۲/۹۲	۳۲۸/۵۰ ± ۱۰/۰۴	۳۰/۶۶ ± ۱/۵۶	نانوذره نیکل (۱۵)
۲۱۸۳/۰۰ ± ۳۲۵/۶۹	۲۰۶/۳۳ ± ۹/۳۶	۳۱۲/۶۶ ± ۱۷/۸۲	۴۳/۸۸ ± ۴/۹۸	نانوذره نیکل (۲۵)

داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد نشان داده شده‌اند (n=6). غلظت‌های کلرید نیکل ۵، ۱۵ و ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم و غلظت نانوذره نیکل ۵، ۱۵ و ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم است. اختلاف در سطح کمتر از  $p < 0.05$  معنادار تلقی شده است.

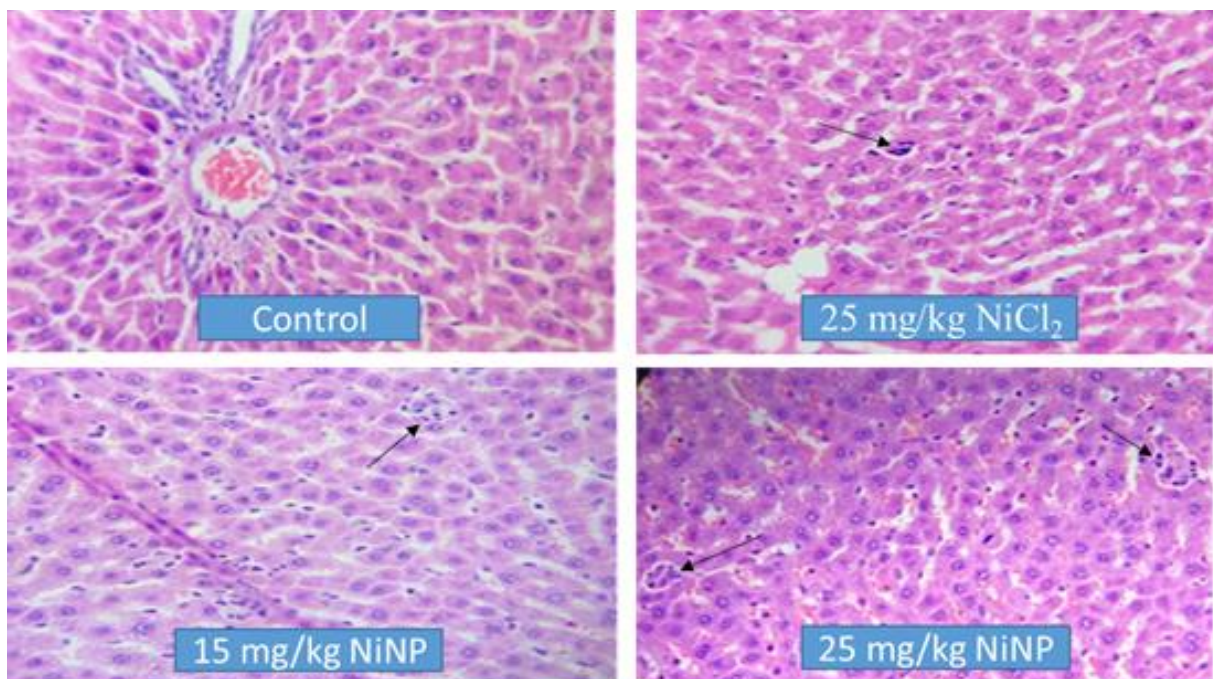
نشان داده شده است در گروه تیمار شده با دوز ۲۵ mg/kg کلرید نیکل اتساع و پرخونی ورید مرکز لوبولی، فضای پورت و اتساع سینوزوئیدها، آپاتوتیک هیپاتوسیت و تعدادی هیپاتوسیت‌های دو هسته‌ای مشاهده شد. نتایج تیمار با نانوذره نیکل با غلظت ۵ mg/kg اتساع و پرخونی ورید مرکز لوبولی و فضای پورت، اشکال آپاتوتیک، هیپاتوسیت‌های دو هسته‌ای و اتساع سینوزوئیدها مشاهده شد. همان‌طوری که در شکل ۲ مشاهده می‌شود اتساع و پرخونی ورید مرکز لوبولی و عروق فضای پورت، استئاتو هیپاتیت به میزان خفیف، اتساع سینوزوئیدها و آپاتوز در گروه تیمار شده با نانوذره نیکل ۱۵ mg/kg مشاهده شد. در دوز ۲۵ mg/kg نانوذره نیکل آسیب شدیدتری مشاهده شد به طوری که اتساع و احتقان عروق، آپاتوز بارزتر و هیپاتوسیت‌های دو هسته‌ای مشاهده شد. استئاتو هیپاتیت، دژنراسانس بالونینگ و متورم شدن سیتوپلاسم هیپاتوسیت، پرخونی عروق و نکروز بیشتری مشاهده شد (شکل ۳).

نتایج مطالعه هیستوپاتولوژی روی موش صحرایی نشان داد که نانوذره نیکل و کلرید نیکل با غلظت‌های مختلف، بر کبد اثر گذاشته و باعث پرخونی، نکروز، هیپاتیت (Interface) پری سپتال، اتساع سینوزوئیدها، اتساع ناحیه پورتال، آپاتوتیک سل و استئاتو هیپاتیت شد. آسیب‌شناسی بافتی کبد در موش‌های گروه کنترل و گروه ششم، هیچ‌گونه تغییر پاتولوژیک چشمگیری را نشان نداد. ساختمان کبد فرمی طبیعی، فضای پورت نرمال و هیپاتویست‌ها نرمال به نظر می‌رسد. سلول‌های التهابی در فضای سینوزوئیدها به ندرت مشاهده می‌شود و احتقان و نکروز هیپاتوسیت مشاهده نشد. نتایج گروه تیمار شده با دوز ۵ mg/kg کلرید نیکل احتقان ورید مرکز لوبولی و عروق فضای پورت و به میزان کم افزایش سلول‌های التهابی لنفوسیت در فضای سینوزوئیدها مشاهده شد. نتایج گروه تیمار شده با دوز ۱۵ mg/kg کلرید نیکل حاکی از احتقان ورید مرکز لوبولی و عروق فضای پورت و همچنین اتساع سینوزوئیدها بود. همان‌طوری که در شکل ۲





شکل ۲. مقاطع بافتی کبد موش صحرائی با بزرگنمایی  $\times 400$  (رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین). با فلش آسیب‌های بافتی نشان داده شده است. A. التهاب فضای پورت (فلش بزرگ)، لنفوسیت‌ها در محل التهاب (فلش کوچک)، کلرید نیکل ۱۵ mg/kg. B. دیلاتاسیون سینوزوئیدها، نانوذره نیکل ۵ mg/kg. C. آپابتوز (فلش بزرگ) و هپاتوسیت دو هسته‌ای (فلش کوچک)، نانوذره نیکل ۲۵ mg/kg. D. اتساع سینوزوئیدها، نانوذره نیکل ۱۵ mg/kg. E. التهاب فضای پورت، نانوذره نیکل ۲۵ mg/kg



شکل ۳. مقاطع بافتی کبد موش صحرائی با بزرگنمایی  $\times 400$  (رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین). مقایسه بافت کبد در گروه کنترل،

شم و گروه‌های مواجهه شده با غلظت‌های مختلف نانوذرات نیکل و کلرید نیکل، که نشان‌دهنده شروع نکروز در گروه‌های بیمار است.

## بحث

نتایج مطالعه هیستوپاتولوژی روی موش صحرائی نشان داد که نانوذره نیکل و کلرید نیکل با غلظت‌های مختلف، بر کبد اثر گذاشته و باعث پرخونی، نکروز، هپاتیت (Interface) پری سیتال، اتساع سینوزوئیدها، اتساع ناحیه پورتال، آپاتوتیک سل و استئاتوهپاتیت شد. بر طبق نتایج آسیب‌شناسی بافت کبد، بیشترین تغییرات پاتولوژیک در گروه نانوذره نیکل با غلظت ۲۵mg/kg مشاهده شد. از نظر کیفی نکروز ناشی از تزریق نانوذره نیکل در غلظت ۲۵mg/kg در مقایسه با دیگر گروه‌ها از شدت بیشتری (Severe) برخوردار بود. استئاتوهپاتیت و آپاتوتیک سل در غلظت‌های مختلف نانوذره نیکل به صورت خفیف (Mild) مشاهده شد. مطالعات هیستوپاتولوژی Liu و همکارانش نشان داد که نانوذره اکسید نیکل می‌تواند تغییرات و آسیب‌های مختلفی شامل (آدم سلولی، اینفیلترشن لنفوسیت و نوتروفیل، ناپدید شدن سینوس کبدی و نکروز فوکال و کانونی) را در کبد موش القاء کند [۱۴] که با نتایج هیستوپاتولوژی ما مطابقت دارد. Pari و همکارانش نشان دادند نیکل با ایجاد پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی باعث آسیب اکسیداتیو بافت کبد می‌شود [۱۵]. مطالعات هیستوپاتولوژی نشان داد کلرید نیکل باعث تغییر پاتولوژی در کبد می‌شود به طوری که در غلظت‌های مختلف کلرید نیکل در جاتی متفاوتی از آسیب‌ها را نشان می‌دهد. مطالعات Android نشان داد تزریق زیر جلدی کلرید نیکل به موش در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث پرخونی سینوزئیدها، اتساع ورید مرکزی و نکروز در کبد و در غلظت‌های بالاتر (۵۰ و ۱۰۰) میلی‌گرم بر کیلوگرم علاوه بر علائم فوق، قطعه‌قطعه شدن هسته و اینفیلترشن سلول‌های آماسی هم مشاهده شد [۱۶].

در این پژوهش میانگین تغییرات وزن کبد در گروه‌های تیمار شده با نانوذره نیکل در غلظت ۱۵ و ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به کنترل افزایش معناداری را نشان داد. مطالعات Magaye و همکارانش نشان داد بعد از تزریق درون عضلانی نانوذره نیکل ۵۰ نانومتری با دوز ۱، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم افزایش معناداری در وزن کبد در مسیر وابسته به دوز مشاهده شد در حالی که وزن مغز، بیضه و شش تفاوت معناداری با کنترل نشان نداد که با پژوهش‌های انجام شده ما همخوانی دارد [۱۷]. شواهد بررسی هیستوپاتولوژی کبد نشان داد پرخونی و تغییرات سینوزوئیدها و همچنین اینفیلتراسیون سلول‌های آماسی سبب بی‌نظمی و تغییرات مورفولوژی کبد نسبت به کنترل شد بنابراین، تغییرات وزن

کبد مشاهده شده در غلظت ۱۵ و ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم این مشاهدات را حمایت می‌کند.

شاخص‌های عملکرد کبد در سرم (ALT,AST,ALP) عموماً برای ارزیابی شدت آسیب‌های سلولی استفاده می‌شود. مطالعات آنزیمولوژی نشان داد فعالیت آنزیم ALP در غلظت‌های مختلف کلرید نیکل (۲۵ و ۱۵) نسبت به غلظت‌های مختلف نانوذره نیکل، گروه کنترل و شم افزایش یافت. انسداد مجاری صفراوی باعث افزایش غلظت سرمی آنزیم ALP می‌شود. از این رو احتمالاً با توجه به تخریب سلول‌های کبدی و اتساع و پرخونی ورید مرکز لوبولی، فضای پورت و اتساع سینوزوئیدها، آپاتوتیک هپاتوسیت و تعدادی هپاتوسیت‌های دو هسته‌ای و انسداد مجاری صفراوی باعث افزایش غلظت ALP می‌شود. آنزیم‌های کبدی ALT، AST و ALP به طور ویژه منعکس‌کننده نکروز هپاتوسیت‌های کبدی و کلسناز هستند و به عنوان شاخص بیوشیمیایی در تشخیص اختلالات کبدی صفراوی و بیماری کبد چرب با ارزش هستند [۱۸]. فعالیت آنزیماتیک سرمی با آسیب‌های پارانشیمی کبد در ارتباط است به نحوی که این آسیب‌ها موجب آزادسازی آنزیم‌های کبدی از مواضعشان در میتوکندری و سیتوزول هپاتوسیت‌ها و راه یافتن این آنزیم‌ها به خون شده و فعالیت سرمی آن‌ها را افزایش می‌دهند [۱۹]. فعالیت آنزیم‌های کبدی در غلظت‌های مختلف کلرید نیکل در مقایسه با غلظت‌های مختلف نانوذره نیکل افزایش بیشتری را نشان داده است. Magaye و همکارانش نشان دادند بعد از تزریق زیر جلدی نانوذره نیکل ۵۰ نانومتری در طی ۱۴ روز اینفیلترشن سلول‌های آماسی، تغییر ساختار پارانشیم کبدی و افزایش آنزیم ALT، AST و ALP در سرم در مسیر وابسته به دوز مشاهده شد که با نتایج پژوهش ما همخوانی داشت [۱۷]. Katsnelson و همکارانش نشان دادند تزریق درون صفاقی نانوذره اکسید نیکل به موش باعث افزایش آنزیم‌های کبدی سرم (ALT، AST و ALP)، افزایش تعداد سلول کوپفر و هپاتوسیت‌های دوهسته‌ای و بدون هسته در کبد موش شد که با نتایج ما در یک راستا بود [۲۰]. افزایش فعالیت آنزیم‌های کبدی در این مطالعه نشان‌دهنده آسیب کبدی است که با تغییرات هیستوپاتولوژیک بافت کبد مطابقت دارد. فعالیت آنزیم LDH در غلظت‌های مختلف کلرید نیکل، نانوذره نیکل نسبت به کنترل افزایش معناداری را نشان داد ( $p < 0.05$ ). LDH یک آنزیم سیتوپلاسمی است که برای بررسی آسیب سلولی و به عنوان شاخص به منظور بررسی سمیت یک ماده شیمیایی و لیز سلولی استفاده می‌شود [۲۱]. مقادیر کم نیکل



نانوذرات به دلیل اندازه کوچک، افزایش نسبت سطح به حجم، ترکیب شیمیایی و توانایی عبور از سد های فیزیولوژیکی مورد توجه است، به طوری که طبق نتایج بافت‌شناسی کبد در مطالعه حاضر، نانوذره نیکل در مقایسه با کلرید نیکل، تغییرات عمده‌ای را از نظر هیستولوژی نشان داد و همچنین دوزهای بالای نانوذرات آثار تخریبی بیشتری را نشان داد.

### نتیجه گیری

نتایج مطالعات هیستوپاتولوژی حاضر تغییراتی وابسته به دوز در کبد موش‌های تیمار شده با کلرید نیکل و نانوذره نیکل نسبت به گروه کنترل نشان داد. برخی از تغییرات شامل شروع احتمالی نکروز سلول‌های کبدی، پرخونی، افزایش فضای سینوزوئیدی، آپاتوز و استئاتوهپاتیت پس از قرار گرفتن در معرض دوزهای مختلف مشاهده شد. تأثیر سیتوتوکسیک نانوذرات بر کبد نشان داد که دوزهای بالای نانوذرات، باعث نکروزه شدن بافت کبد و تخریب بیشتر نسبت به دوزهای پایین شده است. افزایش غلظت آنزیم‌های کبدی و تغییرات هیستوپاتولوژی کبد سمیت نانوذره نیکل و کلرید نیکل را تأیید می‌کند و علت تفاوت مشاهده شده در نتایج احتمالاً می‌تواند به دلیل محلول بودن نمک کلرید نیکل نسبت به نانوذره نیکل و سمیت کمتر آن باشد. به‌طور کلی نتایج این پژوهش سمیت نانوذرات نیکل و کلرید نیکل را تأیید کرد و مطالعات بیشتر برای پیش‌بینی آثار این مواد پیشنهاد می‌شود.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل کار پایان‌نامه خانم فرونش انوشا است. بدین‌وسیله از سرکار خانم دکتر قدسیه کامرانی که در بررسی هیستوپاتولوژی کبد و کارشناس آزمایشگاه آقای علی‌رضا یوسف‌پور که در تهیه نمونه‌ها و بافت‌ها ما را یاری کردند، بسیار سپاسگزاریم.

برای تولید سلول‌های قرمز خون در بدن انسان نیاز است، هرچند در مقادیر بالا تا حدودی می‌تواند سمی باشد. به نظر می‌رسد نیکل در کوتاه مدت مشکلاتی ایجاد نمی‌کند اما در طولانی‌مدت می‌تواند باعث کاهش وزن بدن، صدماتی به قلب، کبد، تحریک و حساسیت بالا شود.

عملکرد متابولیکی و موقعیت استراتژیک کبد سبب شده این عضو هدف توکسین‌های گوناگون و مستعد بیماری‌های بسیاری باشد. مکانیسم‌های مختلفی برای جذب سلولی نیکل مطرح شده که شامل آندوسیتوز ترکیبات نیکل، انتقال یون نیکل از طریق کانال کلسیم و همچنین انتشار ترکیبات لیپوفیلیک نیکل (مثل کربونیل نیکل) از غشای سلول است. مطالعات مختلف نشان داد که یون کلسیم از طریق کانال کلسیم از غشای سلول عبور می‌کند، یون‌های فلزی از جمله یون نیکل از طریق رقابت با یون کلسیم می‌تواند کانال کلسیمی را مهار کند و همچنین به علت کوچک‌تر بودن شعاع یونی نیکل از کلسیم، نیکل ممکن است از طریق کانال کلسیم وارد سلول شود [۲۲، ۲۳]. بنابراین با توجه به مطالعات انجام شده توسط Funakoshi و کوچک‌تر بودن شعاع یونی نیکل از کلسیم، این احتمال وجود دارد کلرید نیکل و نانوذره نیکل از طریق کانال کلسیم وارد سلول هپاتوسیت و باعث آسیب شوند [۲۴]. غلظت نیکل داخل سلولی که از طریق مسیر انتقال کلسیم دریافت می‌شود کمتر از مسیر آندوسیتوز است و این احتمال می‌تواند علت فعالیت کارسینوژن بیشتر ترکیبات ذرات نیکل در مقایسه با نمک نیکل محلول را توجیه کند. نیکل بعد از ورود به بدن می‌تواند باعث آسیب به بافت‌های مختلفی از جمله کبد، کلیه، شش و بیضه شود. ذرات نامحلول نیکل اکسید و سولفید از طریق فاگوسیتوز وارد سلول شده و در درون سلول‌ها با غلظت بالا تجمع می‌یابند و بعد از حل شدن تدریجی در لیزوزوم یون نیکل را آزاد می‌کنند. بنابراین سمیت فلزات و ترکیبات آن‌ها به‌طور زیادی وابسته به زیست‌سازگاری آن‌هاست. یعنی جذب از طریق غشای سلول، توزیع درون سلولی و اتصال به ماکرومولکول‌هاست [۲۵]. آثار سمی

### References

- [1]. Duda-Chodak A. Baszczyk U. The impact of nickel on human health. *J Elementol*. 2008; 13(4): 685-696.
- [2]. Nie J. Pan Y. Shi J. Guo Y. Yan Z. Duan X. et al. A Comparative study on the uptake and toxicity of nickel added in the form of different salts to maize seedlings. *Int J Environ Res Public Health*. 2015 Nov 30; 12(12):15075-87.
- [3]. Melo DR; Leggett, RW. A biokinetic model for systemic nickel. *Health Physics*. 2017; 112 (1): 18-27.
- [4]. Saito M, Arakaki R, Yamada Y, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N. Molecular mechanisms of nickel allergy. *Int J Mol Sci*. 2016; 17(2): 202.
- [5]. Hongrui G. Lian C. Henemin C. Xi P. Jine F. Zhicai Z. et al. Research advances on pathways of nickel-induced apoptosis. *Int J Mol Sci*. 2016; 17(1): 10.
- [6]. Antonietta Zoroddu M. Schinocca L. Molecular mechanisms in nickel carcinogenesis: modeling Ni (II) binding site in histone H4. *Environ Health Perspect*. 2002 Oct; 110 (Suppl 5): 719-723.
- [7]. Munoz A, Costa M. Elucidating the mechanisms of nickel compound uptake: A review of particulate and nano-nickel endocytosis and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012; 260:1-16.
- [8]. Li Y. Li X. Li Z. Gao H. Surface-structure-regulated penetration of nanoparticles across a cell membrane. *Nanoscale*. 2012; 4:3768-3775.
- [9]. Yang K. Ma YO. Computer simulation of the translocation of nanoparticles with different shapes across a lipid bilayer. *Nature Nanotechnology*. 2010; 5: 579-583.



- [10]. Jiang W, Wang Q, Qu X, Wang L, Wei X, Zhu D, et al. Effects of charge and surface defects of multi-walled carbon nanotubes on the disruption of model cell membranes. *Sci Total Environ*. 2017; 574: 771-780.
- [11]. Duan Y, Li J. Structure study of nickel nanoparticles. *Mater Chem Phys*. 2004; 87(2-3): 452-457.
- [12]. Mendes R, Fernandes AR, Baptista PV. Gold nanoparticle approach to the selective delivery of gene silencing in cancer- The case for combined delivery? *Genes*. 2017; 8(3): 94.
- [13]. Deknudt G, Leonard A. Mutagenicity tests with nickel salts in the male mouse. *Toxicology*. 1982; 25: 289-292.
- [14]. Liu F, Chang X, Tian M, Zhu A, Zou L, Han A, et al. Nano NiO induce liver toxicity via activating NF- $\kappa$ B signaling pathway in rats. *Toxicol Res*. 2017; 6: 242-250.
- [15]. Pari L, Prasath A. Efficacy of caffeic acid in preventing nickel induced oxidative damage in liver of rats. *Chem Biol Interact*. 2008; 173(2):77-83.
- [16]. Adjrour O. The toxic effects of nickel chloride on liver, erythropoiesis, and development in Wistar albino preimplanted rats can be reversed with selenium pretreatment. *Environ Toxicol*. 2013; 28(5):290-8.
- [17]. Magave R, Yue X, Zou B, Shi H, Yu H, Liu K, et al. Acute toxicity of nickel nanoparticles in rats after intravenous injection. *Int J Nanomedicine*. 2014; 9: 1393-1402.
- [18]. Ali AT, Pennv CB, Paiker JE, Van Niekerk C, Smit A, Ferris WF. Alkaline phosphatase is involved in the control of adipogenesis in the murine preadipocyte cell line, 3T3-L1. *Clin Chim Acta*. 2005; 354(1-2): 101-9.
- [19]. Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. Biomarkers of liver fibrosis: Clinical translation of molecular pathogenesis or based on liver-dependent malfunction tests. *Clin Chim Acta*. 2007; 381 (2): 107-113.
- [20]. Katsnelson BA, Minigaliyeva IA, Panov VG, Privalova LI, Varaksin AN, Gurchich VB, et al. Some patterns of metallic nanoparticles' combined subchronic toxicity as exemplified by a combination of nickel and manganese oxide nanoparticles. *Food Chem Toxicol*. 2015 Dec; 86:351-64.
- [21]. El-Demerdash FM. Lipid peroxidation, oxidative stress and acetyl cholinesterase in rat brain exposed to organophosphate and pyrethroid insecticides. *Food Chem Toxicol*. 2011 Jun; 49(6):1346-52.
- [22]. Hughes BP, Barritt GJ. Inhibition of the liver cell receptor-activated  $Ca^{+2}$  inflow system by metal ion inhibitors of voltage-operated  $Ca^{+2}$  channels but not other inhibitors of  $Ca^{+2}$  inflow. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1989 Oct; 1013(3):197-205.
- [23]. Patel PK, Hindala M, Kohli B, Haiela K. Divalent metal ions binding properties of goat serum mannose binding lectin. *Int J Biol Macromol*. 2015 Sep; 80:324-7.
- [24]. Funakoshi T, Inoue T, Shimada H, Kojima SH. The mechanisms of nickel uptake by rat primary hepatocyte cultures: role of calcium channels. *Toxicology* 1997 Dec 19; 124(1):21-6.
- [25]. Beversmann D, Hartwig A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch Toxicol*. 2008 Aug; 82(8):493-512.

## Comparative Study on Toxicity of Ni Nanoparticle and Nickel Chloride on Liver Enzymes and Tissue in Rats

Farnosh Anoosha<sup>1</sup>, Bagher Seyedalipour<sup>2\*</sup>, Ali Taravati<sup>2</sup>, Monireh Movahedi<sup>3</sup>

1. M.Sc. in Biochemistry, Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Life Sciences, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Assistant Professor, Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran
3. Assistant Professor, Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Life Sciences, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

### Abstract

**Background and Objectives** The toxicity of metals and their compounds is determined by their physicochemical properties. Thus, they may compete for the biological binding sites resulting in aberrant function of biochemical macromolecules. The aim of this study to investigate Ni NPs toxicity in compared to Nickel chloride on liver enzyme activity and the histopathological changes of liver tissue in male Wistar rats.

**Materials & Methods** In this experimental study, 48 male rates were divided into six experimental groups and one control group and one sham group (n=6). Experimental groups received Ni NPs and nickel chloride with concentration of 5, 15 and 25 mg/ kg by intraperitoneal injection. At the end of 7th day, blood and liver specimen were collected for analysis. Assay of the activity of liver enzyme and histopathological study was performed. Data were analyzed using ANOVA and Tukey.

**Results** Enzyme activity of AST and ALP in different doses of Ni NPs and nickel chloride and LDH activity in different doses of nickel chloride showed significant changes in the studied groups ( $p < 0.05$ ). Histopathological study of liver were revealed dose dependent changes in the liver of rate with nickel chloride and nanoparticles compared to the control group. Some of the changes including necrosis, congestion, apoptosis and steatohepatitis were observed after exposure to different doses of treatment.

**Conclusion** Increasing of enzyme activity and histopathological changes in the liver confirmed due to Ni NPs and nickel chloride toxicity.

**Received:** 2017/10/17

**Accepted:** 2018/02/07

**Keywords:** histopathological, liver enzymes, nickel chloride, nickel nanoparticles, rat.