Original Article

تاثیر نانوذرات نقره بر فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز و تغییرات بافت قلب در موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار

نوشین نقش*، امیر مسعود مشایخ، سمانه خدادادی

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان،گروه زیست شناسی، اصفهان، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۶ ۲۷ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۰۹/۰۹

چکیده

زمینه و هدف: نانوذرات نقره در بسیاری از جنبه‌های کاربردی در سلامتی انسان اهمیت دارند. با توجه به نبود مستندات دقیق درباره سمیت نانوذرات نقره، این تحقیق با هدف بررسی تاثیر نانوذرات نقره بر تغییرات آنزیم لاکتات دهیدروژناز و تغییرات بافتی قلب انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، کلوئید نانو ذرات نقره با غلظت‌های50، 100، 200و ppm400 به رت‌های نر ویستار که در پنج گروه هشت تایی تقسیم شدند، در پنج روز متوالی به صورت داخل صفاقی تزریق شد. سپس سه، هشت و دوازده روز پس از آخرین تزریق، خون‌گیری انجام شد و در پایان، نمونه بافتی از قلب تهیه شد و جهت بررسی با روش هماتوکسیلین- ائوزین رنگ آمیزی شد. سپس به منظور بررسی تاثیر نانوذرات نقره بر آنزیم لاکتات دهیدروژناز در روزهای مختلف، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شد و P<05/0 به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

نتایج: یافته ها نشان داد که غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر روی مقدار آنزیم لاکتات دهیدروژناز تاثیر معناداری ندارد (P value=0.192). تغییرات بافتی در دوز ppm400 از نانو ذرات نقره در مقایسه با گروه کنترل احتمالاً نشان دهنده شروع روند آپوپتوز می‌باشد.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه، تغییر معنی داری در میزان فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در این غلظت‌ها ایجاد نشد که حاکی از ایمن بودن این نانوذره برای فعالیت آنزیم مزبور می‌باشد. با توجه به شباهت فیزیولوژیک موش و انسان، از نتایج حاصل می‌توان برای جلوگیری از آسیب‌های قلبی انسان در حین استفاده از نانوذرات نقره استفاده نمود.

کلمات کلیدی: **نانوذرات نقره، لاکتات دهیدروژناز، سمیت، بافت قلب**

مقدمه

نقره یکی از مواد کاربردی در نانوتکنولوژی است. در زمان‌های قدیم، نقره کاربرد وسیعی داشت و در تمدن‌های باستان از خاصیت ضد باکتریایی نقره استفاده می‌شد (۱، ۲). همچنین از نقره به عنوان جواهر، پول‌های سکه¬ای، عکاسی و تجهیزات پزشکی استفاده می‌شد و مقدمه آنتی بیوتیک‌هایی بود که در فعالیت ضدعفونی و به‌خصوص در کنترل زخم‌های باز و سوختگی‌ها مورد استفاده قرار می‌گرفت (۳، ۴). براساس مستندات تاریخی، نقره توسط پادشاهان ایرانی در حدود دو هزار سال پیش به صورت پودر نقره در آب جوش استفاده می‌شد که این ترکیبات، تاثیرگذارترین ترکیبات ضد میکروبی برای انسان هستند و با سیستم‌های بیولوژیک سازگارند. مشخص شده که نانوذرات نقره بر طیف وسیعی از باکتری‌ها از قبیل سالمونلا، سودوموناس و E-coli موثر هستند (۵). نانو تکنولوژی در حال توسعه یافتن است و در حوزه های متنوعی از قبیل سلامت، بهداشت (نظیر محصولات پرفروش آرایشی بهداشتی)، غذا و تغذیه، سلامت محیطی و کشاورزی استفاده می‌شود؛ لذا جای تعجب نیست که بسیاری محصولات مهندسی شده نانو ذرات در حال حاضر در دسترس مصرف کنندگان قرار دارند (۴). نانونقره ماده‌ای با سمیت زیاداست که با تولید گونه‌های آزاد اکسیژن همراه است. بسیاری از مطالعات آزمایشگاهی (vitro In) وابسته به دوز بودن آن را تایید کرده‌اند. در حال حاضر، هیچ همبستگی مستقیمی بین مارکرهای بیولوژیک در داخل بدن (In vivo) و مطالعات آزمایشگاهی به دلیل پیچیدگی محیط داخلی بدن و تک بودن سلول در محیط کشت وجود ندارد (۶). اثر مهاری یون نقره طی چندین رویداد بیولوژیک مثل اتصالات غشای سلولی با جذب به دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی، نفوذ پذیری غشای آن‌ها را تغییر داده و با تولید گونه‌های اکسیژن آزاد، آنزیم‌های سلولی را غیر فعال می‌کند. این ویژگی‌ها ممکن است تاثیرات منفی بر سلامتی و محیط داشته باشد و منجر به سمیت بالای نانونقره شوند. نانونقره محلولی است که از سوسپانسیون کلوییدی یون نقره تشکیل شده و مقاوم‌تر از دیگر محلول‌ها است (۷). از طرفی لاکتات دهیدروژناز آنزیمی داخل سلولی است که در بسیاری از بافت‌های بدن از جمله قلب، کبد، کلیه، خون (گلبول قرمز) و عضلات اسکلتی وجود دارد و منجر به اکسیداسیون برگشت‌پذیر لاکتات به پیروات می‌شود. این آنزیم دارای پنج ایزوآنزیم بوده که غلظت هریک، در بافت‌های مختلف متفاوت است (۸). به طور مثال، LDH 5 یکی از ایزوآنزیم‌های لاکتات دهیدروژناز است که بالاترین قابلیت را برای کاتالیز پیروات به لاکتات دارد و در سلول‌های سرطانی باعث القای متابولیسم گلیکولیتیک می‌شود. احیای این آنزیم بستگی به حضور

* **نویسنده مسئول:** نوشین نقش،گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، اصفهان، ایران. شماره تلفن: ۰۹۱۳۲۰۰۹۲۷۶
Email: n_naghsh@yahoo.com

اکسیژن دارد (۹). در موارد انفارکتوس قلب و کلیه، سطح سرمی LDH افزایش می‌یابد. این آنزیم همچنین در پیش آگهی لوسمی و سرطان کولون نقش مهمی دارد (۸). با توجه به کاربرد وسیع نانوذرات نقره در کشور ما و عدم مطالعه دقیق فیزیولوژیک این نانوذرات بر تغییر فعالیت آنزیم‌های بدن، در این مطالعه اثر نانوذرات نقره کروی با قطر ۴ نانومتر بر میزان تغییرات آنزیم لاکتات دهیدروژناز بر روی رت‌های نر نژاد ویستارمورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، از ۴۰ سر رت نر بالغ از نژاد ویستار استفاده شد که میانگین وزن آن‌ها در روز شروع ۲۰±۲۲۰گرم و سن آن ها دو تا سه ماه بود. محلول کلوئیدی نانوذرات نقره با میانگین قطر ۴ نانومتر به شکل کروی از شرکت نانونصب پارس تهیه شد. در ابتدا غلظت‌های مورد نظر از کلوئید نانوذرات نقره به وسیله آب مقطر دیونیزه تهیه شد. سپس در شرایط استریل، یک سی‌سی از نانونقره در غلظت‌های 50،100،200 و ppm400 به صورت داخل صفاقی به هر رت تزریق شد. درجه حرارت محیط در زمان انجام آزمایش، ۲±۲۵درجه سانتیگراد در تمام طول شبانه روز بود و غذای فشرده بدون محدودیت در اختیار آن‌ها قرار می‌گرفت. در این تحقیق، حیوانات مورد استفاده به پنج گروه هشت تایی به شرح زیر تقسیم شدند:

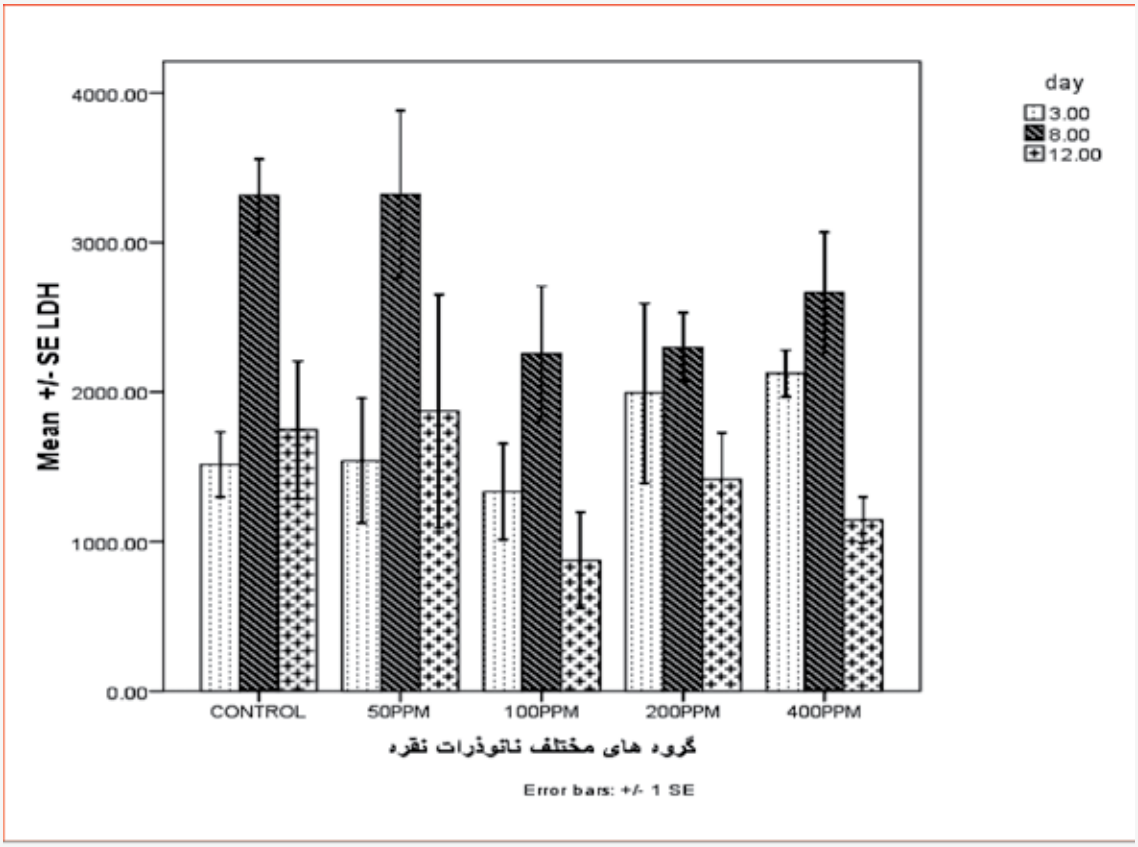
گروه کنترل: حیوانات این گروه بدون هیچ‌گونه محدودیتی و به اندازه کافی از آب و غذای فشرده استفاده می‌کردند. علاوه بر این، مانند سایر گروه‌های تجربی برای یکسان بودن شرایط یعنی القای اثر شوک ناشی از تزریق، یک سی‌سی آب مقطر به هریک از آن‌ها تزریق شد.

گروه‌های تجربی: ۴ گروه تجربی تیمار شونده با نانوذرات نقره به ترتیب دریافت کننده مقدار یک سی‌سی نانو نقره با غلظت‌های 50،100،200 و ppm400 بودند. به طوری که به هر رت، یک سی‌سی نانونقره روزی یک بار در پنج روز متوالی به صورت داخل صفاقی تزریق شد. سپس سه، هشت و دوازده روز پس از آخرین تزریق، خون‌گیری از گوشه داخلی چشم انجام شد. نمونه‌های خون به وسیله دستگاه سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ به مدت بیست دقیقه سانتریفیوژ شد و سرم آن ها جدا گردید.

سنجش فعالیت آنزیم: سرم جدا شده، با رعایت اصول رنگ سنجی جهت سنجش فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز مورد بررسی قرار گرفت. دستگاه اسپکتروفتومتر جهت این سنجش استفاده شد و طول موج مورد استفاده ۳۴۰ نانومتر بود. جذب نوری به دست آمده نشان دهنده فعالیت آنزیمی است.

سنجش‌های بافت شناسی: در پایان دوره خون‌گیری، از بافت عضله قلب رت‌ها نمونه بافتی جدا گردید و در فرمالین ۱۰٪فیکس شد. سپس نمونه‌ها در غلظت‌های کاهش یابنده از الکل قرار گرفت تا آب‌گیری از بافت‌ها انجام شود. پس از طی مراحل پاساژ بافت و برش با میکروتوم، نمونه‌های حاصل بر روی لام قرار گرفته و جهت بررسی با هماتوکسیلین-ائوزین رنگ آمیزی شدند. در این روش مواد اسیدی مثل هسته با ائوزین و مواد بازی مثل سیتوپلاسم با هماتوکسیلین رنگ می‌گیرند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: داده‌های به‌دست آمده برای هرگروه در



نمودار ۱ـ میانگین لاکتات دهیدروژناز به تفکیک گروه‌ها و دوزهای‌مختلف

جداول از پیش تعیین شده و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۷ و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA OneWay) تجزیه و تحلیل شد. P<05/0 به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

نتایج

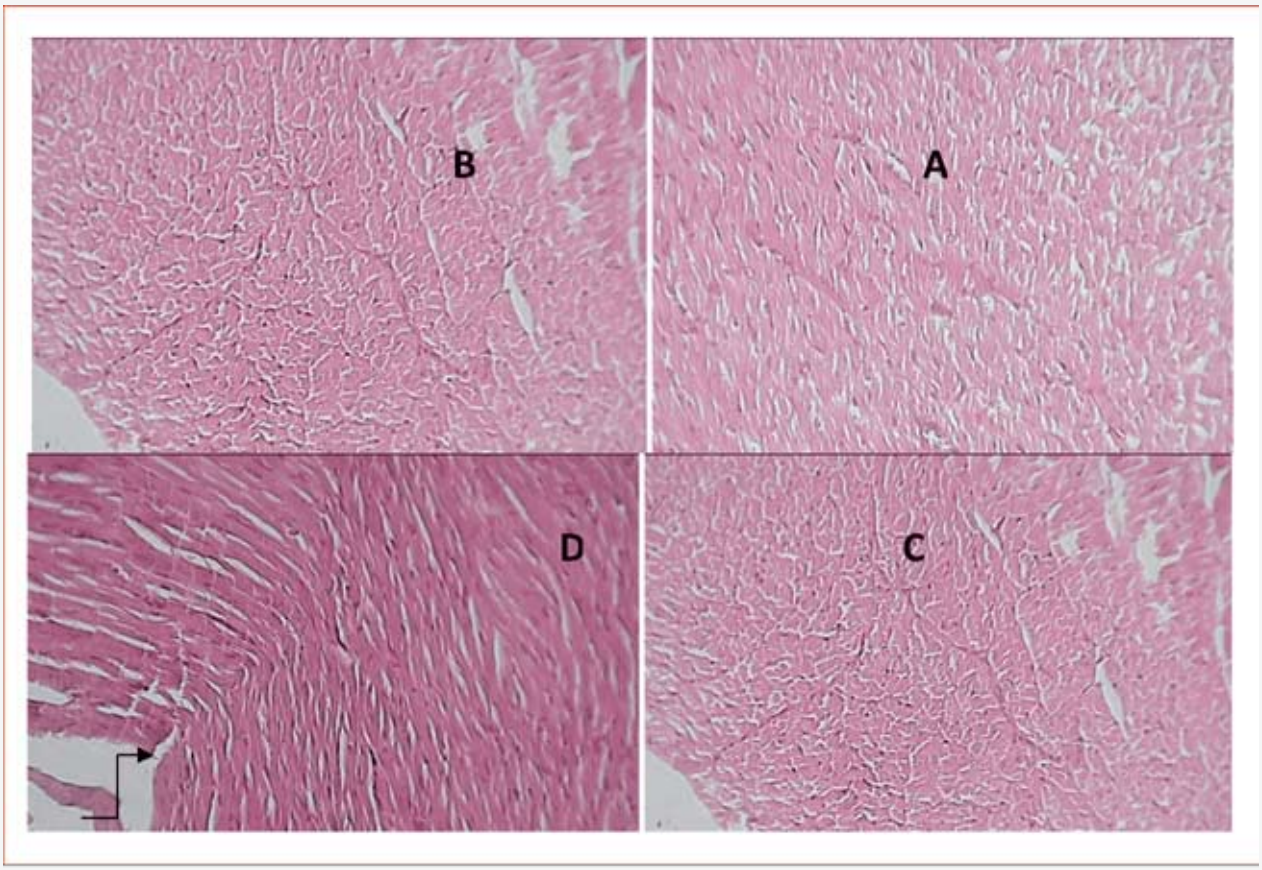
نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد که در غلظت‌ها و زمان‌های مورد اشاره، تفاوت معناداری از نظر فعالیت آنزیمی بین گروه‌های تیمار با گروه کنترل وجود نداشته اما در مجموع میانگین فعالیت این آنزیم در روز هشتم بعد از تیمار در تمام گروه‌های آزمایشی افزایش معنی داری (P value=005/0) داشته که مستقل از تاثیرات نانوذرات نقره می‌باشد (نمودار ۱). در بررسی هیستولوژیک بافت قلب، بیشترین تغییر در هسته‌ها مشاهده می‌شود. همچنین فیبرهای عضله قلب بسیار متراکم شده و انشعابات این فیبرها تا حدود زیادی محو شدند که احتمالا نشان دهنده شروع آسیب بافتی از نوع آپوپتوز می‌باشد (شکل ۱).

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که در هیچ‌یک از دوزها و زمان‌ها تفاوت معناداری بین گروه‌های تیمار و گروه کنترل وجود ندارد اما در دوز ppm400 از نانوذرات نقره، بیشترین تاثیر بافتی بر قلب رت‌های نر دیده شد (شکل ۱). با توجه به تغییر خواص فیزیولوژیک نانوذرات با تغییر شکل و دوز می‌توان نتیجه گرفت، در این مطالعه، احتمال به هم چسبیدن نانوذرات نقره در داخل بدن و تشکیل توده‌های بزرگ‌تر از ابعاد نانو (بالک) وجود داشته و از اثرات آن کاسته شده است.

لینگ سانگ و همکاران در سال۲۰۱۲، ارزیابی نانوذرات نقره بر زیست پذیری سلولی (Viability cell)، نشت لاکتات دهیدروژناز، استرس اکسیداتیو و چرخه سلولی را نشان دادند که نتایج نشان دهنده کاهش زیست پذیری سلولی (Viability) یعنی قابلیت زنده ماندن سلول‌ها و حفظ متابولیسم آن‌ها در محیط کشت به صورت روش‌های وابسته به دوز و زمان در سطوح بین ۲۵/۶ و ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر به شدت کاهش یافت. یعنی نانوذرات نقره منجر به آسیب غشایی (نشت لاکتات دهیدروژناز) و کاهش فعالیت سوپراکسید دسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز شدند (۱۰).

حسین و همکاران در سال ۲۰۰۵ سمیت نانوذرات مختلف از جمله نانوذرات نقره را بر کبد موش صحرایی مورد ارزیابی قرار دادند و پس از ۲۴ ساعت قرار گرفتن در معرض میتوکندری نشت قابل ملاحظه و وابسته به دوز لاکتات دهیدروژناز را مشاهده کردند (۱۱). از طرفی Moudgi BM ،Robert SM و همکاران در سال۲۰۰۶، نشان دادند که تاثیر نانوذرات بر روی سلول‌های موجودات زنده به قطر، شکل و اندازه نانوذرات بستگی دارد (۱۲). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که نانوذرات نقره کروی با قطر ۴ نانومتر موجب تغییر در میزان فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز نمی‌شوند، اما از طرفی مطالعات بافتی بیشترین تغییرات را در دوز ppm400 نشان دادند، بدین مفهوم که تغییر بافتی در دوز بالا از نانوذرات نقره ایجاد می‌شود (۱۳). در مطالعه احمدی و همکاران در



شکل ۱ـ مقایسه بافت قلب در گروه کنترل (A) و تیمار شده با دوز 100 ppm (B)، 100 ppm (C) و 100 ppm (D). پیکان موجود در شکل (D) نشان دهنده خروج محتویات سلولی و شروع احتمالی آپوپتوز می‌باشد که موجب ایجاد فضاهای خالی در بین عضلات طولی شده است.

سال ۲۰۱۱، تجمع نانونقره در کبد و پوست پستانداران و نکروز قلبی و کاهش گلوتاتیون پراکسیداز در خون خوک‌های تحت بررسی با نقره گزارش شده است (۱۱). آشارانی و همکاران در سال ۲۰۰۹ با بررسی سلول‌های آسیب دیده توسط نانوذرات نقره نشان دادند که آسیب وارده به سلول‌ها به توانایی خروج نانوذرات توسط خود سلول بستگی دارد. از اینرو، میزان اگزوسیتوز نانوذرات نقره برای فهم بهتر حفظ و خروج نانوذرات بررسی شد (۱۳). اخیرا گزارش شده است که ذرات نانو، رادیکال آزاد و استرس اکسیداتیو ایجاد می‌کنند و با مکانیسم استرس اکسایشی یعنی حمله رادیکال‌های آزاد به بافت‌ها، می‌توانند به اندام‌ها و بافت‌های مختلف آسیب برسانند (۷). با توجه به شباهت مکانیسم‌های داخل سلولی موش و انسان، احتمال تغییرات مشابهی در این زمینه برای انسان نیز وجود دارد. با توجه به کاربرد وسیع نانوذرات نقره در صنایع و محصولات مختلف در کل دنیا و در کشور ما، لزوم مطالعه دقیق فیزیولوژیک در غلظت‌ها و دوزهای متفاوت از نانوذره بر بافت‌های مختلف بدن پیشنهاد می‌شود.

نتیجه گیری

در تحقیق حاضر، در میزان فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در غلظت‌های مزبور، تغییر معنی داری حاصل نشد. فقط تغییرات بافتی در قلب موش‌ها در دوز بالا مشاهده شد. با توجه به شباهت فیزیولوژیک موش و انسان از تعمیم نتایج این مطالعه می‌توان در زمینه جلوگیری از آسیب‌های قلبی انسان در حین استفاده از نانوذرات نقره استفاده نمود.

References

1. Hassan SF, Abdel-Fattah SA, Elsalmoney AE. Relationship between some serum enzyme activities, liver functions andbody weight in growing local chickens. International Journal of Poultry Science.2009;8(7):700-705.
2. Moaddab S, AhariH,Shahabzade D. Toxicity study of nanosilver on osteoblast cancer cell line. IntNanoLett. 2011;1(1):11-16.
3. Yeo MK, Kang M. Effects of nanometer sized silver materials on biological toxicity duringzebra fish emeberiogenesis.BullKoreanChemSoc.2008;29(6):1179-1184.
4. Wijnhoven S, Peijneburg W, Herberts C. Nano-silver-a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. 2009;3(2):109-138.
5. Ahmadi J, Irani M, Choobchian M. Pathological study of intestine and liver in broiler chickens after treatment with different levels of silver nanoparticles.World Applied Sciences Journal. 2009;7(S1):28-32.
6. Stebounova L، Adamcakova-Dodd A، Sung Kim J. Nanosilver induces minimal lung toxicity or inflammation in a subacute murine inhalation model. Particle and Fibre Toxicology. 2011;8(5):1-12.
7. Akradi L،SohrabiHaghdoost I، Djeddi AN. Histopathologic and apoptotic effect of nanosilver in liver of broiler chickens. African Journal of Biotechnology. 2012;11(22):6207-6211.
8. Naghsh N, Mashayekh A, Khodadadi S. Effects of Silver Nanoparticle on Phosphocreatine kinase and Histological Changes of Skeletal Muscle Tissue in Male Wistar Rat. J MazandaranUniv Med Sci. 2013;22(97) :36-41.
9. Kayser G, Kassem A, Sienel W. Lactate-Dehydrogenas is overexpressed in non-small cell lung cancer and correlates with the expression of the transketolase-like protein 1. Diagnostic Pathology. 2010;5(22):1-10.
10. ling song X, Li B, Xu K. Citotoxicity of water-soluble Mpeg-SH-coated silver nanoparticles in HL-7702 cells. Cell boiltoxico. l2012;28:225-237.
11. SaberMH, John JS.Toxicological highlight safety evaluation of silver nanoparticles: inhalation model for chronic exposure.Toxicological Sciences. 2009;108(2):223-224 .
12. Moudgi¬ BM, Robert SM. Designing a sterategies for safety evaluation of nanomaterials. Partnano-interface in a microfluidic chip to probe living VI. Characterization of nanoscale particles for cells: challenges and perspectives. Toxicological Science USA.2006;103:6419-6424.
13. AshaRaniPV, KahMunGL, PrakashHande M. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. ACSnano.2009;3(2):279-290.

Original Article

Effects of silver nanoparticle on lactate dehydrogenase activity and histological changes of heart tissue in male wistar rats

Naghsh N*, Mashayekh A, Khodadadi S

Department of Biology, Falavarjan branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

Recieved:17 Sep 2012 Accepted: 29 Nov 2012

Abstract

Background & Objective: The silver nanoparticles are important in many applications of nanoparticles on human health. The toxicity of silver nanoparticles are not well documented yet. The aim of this study was to investigate the effect of silver nanoparticles on lactate dehydrogenase activity and histological changes in heart tissue.

Materials & Methods: In this study, 40 adult male wistar rats of 220±20gr were divided in to five groups including control and four experimental groups. The latter groups were injected intraperitoneally spherical nano silver particles of 50, 100, 200 and 400 ppm respectively for five consecutive days. Then three, eight and twelve days after the last injection, blood samples were collected and lactate dehydrogenase (LDH) activity was assayed. Also, tissue samples from the heart muscle were prepared and studied after staining with Hematoxiline-Eosine. Data of LDH activity was analyzed by One way- ANOVA- test and P-value of ≤ 0.05 were considered as significant.

Results: The result showed that different concentrations of silver nanoparticles have no significant effect on the lactate dehydrogenase ($p=0.192$). The histological study of the tissue after exposure to 400 ppm concentration of silver nanoparticles showed the start of primary apoptosis in heart tissue.

Conclusion: The LDH activity was not changed significantly after exposure to different concentration of silver nanoparticles, which shows the safety of these particles on LDH activity.

Keywords: silver nanoparticles, lactateDehydroganase, toxicity, heart tissue

*** Corresponding author: Naghsh Nooshin,** Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
Tel: +98 9132009276
Email: n_naghsh@yahoo.com