

Comparison of Tissue Damages Resulting from Chronic Administration of Manganese Dioxide Nano- and Microparticles on the Liver, Kidneys and Testes of Rats

Sedigh Ghaedi¹, Majid Hassanpour-Ezatti^{2*}, Tahereh Naji³, Mohammad Safi Rahmanifar²

1- M.Sc. Department of Toxicology & Pharmacology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran

3- Assistant Professor, Department of Toxicology & Pharmacology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

**Corresponding Address: P.O.Code: 3319118651, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Opposite of Holy Shrine of Imam Khomeini, Khalij Fars Expressway, Tehran, Iran
Email: Hassanpour@shahed.ac.ir*

Received: 02/Dec/2013, Accepted: 11/Jan/2014

Abstract

Objective: This study investigated tissue damages induced by chronic subcutaneous administration of nano- and microparticles of manganese dioxide (MnO₂) on the liver, kidneys and testes of rats.

Methods: Rats (n=210) were divided into three groups: control, MnO₂ nanoparticle injected and MnO₂ microparticle injected. The experimental groups received subcutaneous injections with either nano- or microparticles of a solution that contained MnO₂ (100 µg/kg) once per two weeks for 14 weeks. Once every two weeks, we randomly selected five rats from each group for histological evaluations of the liver, kidneys, and testes. Tissue lesions were initially evaluated by hematoxylin and eosin staining, then kidney and liver tissue sections were stained by the Jones and Masson's trichrome methods, respectively. The changes in diameter of basement membrane and cell numbers of the various parts of the nephrons in different groups were measured by Image Tools version 2 software.

Results: The liver tissues of the nano- and microparticle groups exhibited severe damage histopathologically. Cloudy swelling was observed in the cytoplasm of hepatocytes. The liver tissue and its canaliculi structures were severely damaged. Inflammation and ductular reaction signs were seen in liver tissue. Deposition of particles in the basement membrane of the nephrons were observed in the nanoparticle-treated group. There was a significant reduction in glomerular and tubular cells in the nanoparticle-treated group compared to the control and microparticle-treated groups. Some of the structural and functional parameters of the testes in the nanoparticle-treated group had significant pathobiological variations.

Conclusion: Administration of MnO₂ nanoparticles when compared with the same dose of MnO₂ microparticles caused more tissue damage in all examined tissues. Reduction in particle size from micrometer to nanometer appeared to exacerbate the damaging mechanisms of these particles in the examined tissues.

Keywords: Nanoparticles, Microparticles, Manganese dioxide, Tissue injuries

مقایسه آسیب‌های بافتی حاصل از تجویز مزمن نانو و میکرو ذره دی اکسید منگنز بر بافت‌های کبد، کلیه و بیضه موش‌های بزرگ

صدیقه قانیدی^۱، مجید حسن پور عزتی^{۲*}، طاهره ناجی^۳، محمدصفی رحمانی فر^۲

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه سم‌شناسی، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۳- استادیار، دانشکده علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۳۳۱۹۱۱۸۶۵۱، دانشگاه شاهد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

Email: Hassanpour@shahed.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۲/۱۰/۲۱

دریافت مقاله: ۹۲/۰۹/۱۱

چکیده

هدف: این پژوهش به بررسی آسیب‌های بافتی ناشی از تجویز زیرجلدی مزمن میکرو و نانو ذره اکسید منگنز بر بافت‌های کبد، کلیه و بیضه موش‌های بزرگ پرداخته است.

مواد و روش‌ها: موش‌ها (۲۱۰ سر) به سه گروه کنترل، دریافت کننده نانو و میکرو ذره اکسید منگنز تقسیم شدند. موش‌ها در گروه‌های تجربی، هر دو هفته یک‌بار به مدت ۱۴ هفته به صورت زیرجلدی محلول حاوی نانو یا میکروذرات دی اکسید منگنز (۱۰۰ میکروگرم/کیلوگرم) را دریافت کردند. تعداد ۵ سر موش از هر گروه به طور تصادفی هر دو هفته انتخاب و بافت‌های کبد، کلیه و بیضه آن‌ها برای بررسی بافت‌شناسی جمع‌آوری شد. ابتدا آسیب‌های بافتی توسط رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوژین ارزیابی شد، سپس برش‌های بافت کلیه و کبد به ترتیب توسط رنگ‌آمیزی جونز و تری کروم ماسون رنگ‌آمیزی شدند. تغییر در ضخامت غشای پایه و تعداد سلول‌های بخش‌های مختلف نفرون‌های کلیه در گروه‌های مختلف توسط نرم‌افزار Image Tools 2 اندازه‌گیری شد.

نتایج: بافت کبدی در گروه‌های نانو و میکرو ذره از نظر بافت‌شناسی آسیب‌های شدیدی را نشان داد. توده‌های ابری شکلی در درون سیتوپلاسم سلول‌های کبدی مشاهده شدند. ساختار بافتی و مجاری صفراوی کبد دچار به هم ریختگی شدید شدند و علائم التهاب و واکنش مجاری در بافت کبدی مشاهده شد. رسوب ذرات در غشای پایه نفرون‌ها و کاهش معنی‌دار در سلول‌های گلومرول‌ها و لوله خمیده نزدیک نفرون‌ها در گروه نانو ذرات در مقایسه با کنترل و میکرو ذرات مشاهده شد. برخی معیارهای ساختاری و عملکردی بافت بیضه در گروه دریافت کننده نانو ذرات تغییرات پاتوبیولوژیکی معنی‌داری را نشان دادند.

نتیجه‌گیری: تجویز نانو ذرات دی اکسید منگنز در مقایسه با میکرو ذرات با یک دوز ثابت سبب بروز آسیب‌های بافتی شدیدتری در بافت‌های مورد بررسی شدند. کاهش اندازه ذرات اکسید منگنز از حد میکرومتر به نانومتر به نظر می‌رسد که سبب تشدید مکانیسم‌های آسیب‌رسان این ذرات بر بافت‌های مورد بررسی شده است.

کلیدواژگان: نانو ذره، میکرو ذره، دی اکسید منگنز، آسیب‌های بافتی

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۶، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۲، صفحات: ۶۷-۸۱

اکسید منگنز (MnO_2) ترکیبی با مصارف روزافزون در صنعت است و در تولید غربال مولکولی، به عنوان کاتالیزور قوی در واکنش‌های شیمیایی و به عنوان ماده اولیه تولید الکتروود باتری‌ها استفاده می‌شود. این ترکیب همچنین در حال حاضر در ساخت انواع فناوری‌های نانو مانند نانو بلورهای نیمه هادی و نانو ساختارهای سه بعدی مصنوعی کاربرد دارد [۱]. این اکسید فلزی در قارچ‌کش‌های کشاورزی و در ترکیب ماده حاجب مورد مصرف بیماران در تصویربرداری رزونانس مغناطیسی (Magnetic Resonance Imaging) نیز استفاده می‌شود. با توجه به این‌که ترکیبات دارای عناصر فلزی نقش مهمی در ایجاد مسمومیت‌ها ایفا می‌کند، ارزیابی آسیب ناشی از تماس مزمن با اکسید منگنز بر بافت‌های مختلف می‌تواند اهمیت فراوانی در تشخیص عوارض و شناسایی آسیب‌های بافتی ناشی از تماس با این ترکیب داشته باشد [۲]. ویژگی‌های خاص نانو ذرات فلزی ناشی از ابعاد کوچک آن‌ها، افزایش سطح به حجم آن‌ها و تقویت توان آن‌ها در واکنش‌های شیمیایی سبب شده تا استفاده از آن‌ها به عنوان کاتالیزور، کاربرد صنعتی روزافزونی یابد [۳]. برخی از نانو ذرات در هر دو شرایط برون‌تنی [۴] و درون‌تنی [۵] از خود آثار سمی نشان می‌دهند، این در حالی است که برخی دیگر فقط در ابعاد نانو دارای آثار سمی بوده و در ابعاد میکرو فاقد اثر سمی هستند. نانوذرات به هر روشی که تجویز شوند به دنبال ورود به گردش خون در نهایت به بافت کبدی می‌رسند و در آن تجمع می‌یابند [۶]. بافت کلیوی به دلیل دارا بودن جریان خون بالا یکی دیگر از بافت‌های تجمع نانو ذرات در بدن محسوب شده و نشان داده شده که بین اندازه نانوذرات و میزان توزیع و تجمع این ذرات در این بافت رابطه مستقیم وجود دارد [۷]. بدین ترتیب بافت کلیوی و کبدی به عنوان بافت‌های اصلی تجمع و در معرض خطر آسیب‌های نانو ذرات به دنبال ورود این ذرات به بدن محسوب می‌شوند [۸]. گرچه یافته‌های مبنی بر آثار آسیب‌رسان نانو ذرات فلزی بر عملکرد کلیوی محدود

است، ولی در این ارتباط می‌توان به بررسی آسیب‌های ناشی از مصرف خوراکی نانو ذرات مس بر لوله خمیده نزدیک نفرون‌ها [۹] یا گلو مرونفریت و تخریب لوله خمیده نزدیک به دنبال مصرف خوراکی نانوذرات تیتانیوم دی اکسید (Titanium Dioxide) اشاره کرد [۱۰]. همچنین مشخص شده که آسیب کبدی ناشی از نانو ذرات طلا وابسته به عوامل مختلفی چون غلظت، مدت تماس و به خصوص اندازه این ذرات است [۱۱]. مستنداتی در ارتباط با آسیب‌های وارده به بافت بیضه ناشی از تماس با نانو ذرات فلزی و از این طریق بر فعالیت تولید مثلی موجودات زنده در دست است. برای مثال، آثار دو اندازه مختلف نانو و میکرو ذره اکسید سربوم (Cerium Oxide) بر فرآیند تولید اسپرم در موش بزرگ مطالعه شده است [۱۲]. اما در ارتباط با آثار آسیب بافتی به دنبال تماس با اکسید منگنز و به عنوان پیش‌زمینه‌ای از تحقیق حاضر می‌توان به گزارش هابس‌لند (Hobbesland) و همکاران اشاره کرد. این پژوهشگر بر اساس آزمایش‌هایی که روی کارگران معادن منگنز انجام داد، مدعی شده است که به دلیل بالا بودن سطح اکسید منگنز در این معادن و تماس طولانی مدت کارگران با آن، عوارض ناخواسته‌ای چون سرطان کبد و مشکلات ادراری و تناسلی در این کارگران بروز کرده است [۱۳]. این نتایج منجر به این امر شد تا دانشمندان به کارفرمایان این معادن توصیه کنند تا زمان کاری این کارگران را کاهش دهند [۱۴]. گرچه اطلاعات آزمایشگاهی قبلی از بررسی آثار اکسید منگنز بر عملکرد دستگاه تناسلی نر در حیوانات در دست نیست، ولی تاکنون یافته‌های محدودی بر بروز آسیب بر ساختارهای تناسلی نرینه به دنبال تماس با دیگر نانو ساختارها منتشر شده‌است [۱۵-۱۷]. به عنوان ضرورت انجام مطالعات بافت‌شناسی علاوه بر دیگر مطالعات بالینی در ارتباط با آثار نانو ذرات بر بافت‌های در تماس با این ذرات باید به این یافته اشاره شود که برخی از نانو ذرات مانند اکسید تیتانیوم با وجود اثر بر هورمون گنادوتروپینی و ایجاد اختلال در فرآیندهای تولید هورمون‌های جنسی فاقد آثار مستقیم بر بافت بیضوی و سلول‌های تولید مثلی

ارزیابی شده است [۱۸]. بنابراین بررسی آسیب‌های بافتی ناشی از تماس با نانو ذرات می‌تواند تصویر کامل‌تری از تمامی اختلالات ناشی از تماس با یک نانو ذره را فراهم آورد. امروزه رنگ‌آمیزی‌های مختلفی برای ارزیابی آثار نانو ذرات بر بافت کبدی [۱۹]، کلیوی و بیضه [۲۰] به کار گرفته می‌شوند که از این میان رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین (Hematoxylin-Eosin: H & E) با موفقیت توانسته است موارد تأیید کننده خوبی از آثار آسیب‌رسان این نانو ذرات بر بافت‌های بدن را مشخص کند. رنگ‌آمیزی جونز (Jones' Staining) نیز یک رنگ‌آمیزی تخصصی در ارزیابی دقیق آثار نانو ذرات فلزی بر کلیه‌ها است [۳]. این رنگ‌آمیزی امکان بررسی آسیب‌های وارده به غشای پایه در ناحیه مویرگ‌های گلو مری را فراهم می‌آورد. رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون (Masson's Trichrome Stain) روش تخصصی ارزیابی آسیب‌های ناشی از فیروز در کبد است [۲۱]؛ برای مثال دانشمندی بنام کونگ (Kong) و همکارانش از این رنگ‌آمیزی برای ارزیابی آثار نانو ذرات LDL (Low-Density Lipoproteins) فاقد آپوپروتئین (Apoprotein) بر کبد استفاده کرده‌اند [۲۲]. این پژوهشگر با استفاده از این رنگ‌آمیزی توانست موفقیت استفاده از این ذرات را در درمان بروز فیروز کبدی به اثبات برساند. اما مطالعات اولیه در مورد آثار نانو ذرات بر بافت بیضه بیشتر به مطالعه توزیع این نانو ذرات در این بافت اختصاص دارند و نشان داده شده که با وجود سد خون-بیضه نانو ذرات به دنبال تجویز در این بافت تجمع می‌یابند [۲۳]. در این پژوهش برای بررسی و مقایسه آسیب‌های بافتی ناشی از تجویز مزمن دو اندازه مختلف میکرو و نانو ذرات اکسید منگنز بر بافت‌های کبد، کلیه و بیضه موش سفید بزرگ، نانو ذرات (اندازه ۲۵ تا ۸۵ نانومتر) و میکرو ذرات (۳ میکرومتر) اکسید منگنز با غلظت ۱۰۰ میکروگرم/کیلوگرم وزن بدن به مدت ۱۴ هفته هر دو هفته یکبار به صورت زیر جلدی به این موش‌ها تجویز شدند. این غلظت براساس مطالعات قبلی محققان پژوهش حاضر درباره آثار

آسیب‌رسان مختلف این ذرات انتخاب شده است و اثر بیوشیمیایی و سمیت عصبی تجویز این دوز قبلاً به اثبات رسیده است [۲۴، ۲۵]. نمونه‌های بافت‌های کبدی، کلیوی و بیضه موش‌ها هر دو هفته یکبار تهیه و پس از رنگ‌آمیزی H & E ارزیابی شدند. در ادامه نمونه‌های بافت کلیوی توسط روش جونز و بافت کبدی توسط روش تری کروم ماسون رنگ‌آمیزی و بررسی شدند.

مواد و روش‌ها

حیوانات

موش‌های بزرگ نر (۲۰۰-۲۵۰ گرم) تهیه شده از مرکز پرورش حیوانات دانشگاه علوم پزشکی تهران به ۳ گروه ۵ تایی (کنترل، دریافت کننده میکرو ذره و دریافت کننده نانو ذره اکسید منگنز) تقسیم شدند. این موش‌ها در شرایط کنترل شده درجه حرارت، رطوبت، نور ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با دسترسی آزاد به آب و غذای کامل نگهداری شدند. تمامی موش‌ها به مدت ۲ هفته قبل از شروع آزمایش‌ها در قفس‌های نگهداری حیوانات در شرایط یکسان محیطی نگهداری شدند تا از نظر تطابق، آشنایی و رژیم غذایی به محیط عادت نمایند. تمامی آزمایش‌های حیوانی مطابق قوانین کمیته اخلاقی دانشگاه انجام شدند.

ذرات اکسید منگنز

میکرو ذره اکسید منگنز با خلوص بالا از شرکت Merck آلمان خریداری شد. ابعاد میکرو ذره اکسید منگنز مورد استفاده در این پژوهش ۳ میکرومتر بود [۲۶]. نانو ذرات اکسید منگنز به روش هیدرودرمال (Hydrothermal Procedure) با کمی تغییرات و با استفاده از همین ذرات میکرو اکسید منگنز در گروه زیست‌شناسی دانشگاه شاهد سنتز شد. این ذرات دارای

برای آزمایش‌های هیستوپاتولوژی (Histopathologic Tests) نگهداری شدند.

ابعادی در حدود ۲۵ تا ۸۵ نانومتر بودند.

روش ساخت نانو ذره اکسید منگنز

برای تهیه نانو ذره اکسید منگنز، ابتدا ۲۰ میلی‌لیتر $KMnO_4$ (۰/۲ میلی‌مولار) با ۱۶ میلی‌لیتر MnO_4 (۰/۱۲۵ میلی‌مولار) به مدت ۵ دقیقه با هم مخلوط شدند. مخلوط نهایی مستقیماً به داخل یک اتوکلاو استیل با پوشش تفلون منتقل و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۱۶۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و سپس محصول حاصل در دمای اتاق سرد شد. محصول قهوه‌ای رنگ حاصل جمع‌آوری و با آب مقطر و اتانول سه مرتبه شسته شد و توسط جریان هوا با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت خشک شد [۲۷]. اندازه نانو ذرات حاصل به کمک میکروسکوپ الکترونی بین ۲۵ تا ۸۵ میکرومتر تعیین شد.

مراحل آماده‌سازی لام بافتی

ابتدا نمونه‌های بافتی به ترتیب در الکل‌هایی ۷۰ درصد، ۸۰ درصد، دو مرتبه الکل ۹۰ درصد و دو مرتبه الکل ۱۰۰ درصد هر کدام به مدت ۶۰ دقیقه قرار گرفتند. سپس بافت‌ها با قرار گرفتن در گزین شفاف شده و توسط پارافین قالب‌گیری شدند. برش‌هایی به ضخامت ۷ میکرومتر توسط دستگاه میکروتوم از بافت‌ها تهیه شد. سپس به منظور آب‌دهی برش‌ها به ترتیب به مدت ۱ دقیقه در محلول‌های الکل ۱۰۰ درصد تا ۵۰ درصد قرار گرفتند.

رنگ‌آمیزی H & E

برش‌های تهیه شده از این سه بافت توسط روش رنگ‌آمیزی H & E استاندارد به شرح زیر رنگ‌آمیزی واقع شد [۲۸]. برش‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در هماتوکسیلین قرار داده شدند و پس از شستشو با آب به مدت ۱ ثانیه در اسید الکل قرار گرفتند. سپس مجدداً با آب شستشو داده شدند و به مدت ۲ دقیقه در اتوزین قرار گرفتند. پس از آن به منظور حذف مجدد آب، بافت‌ها به مدت ۱ دقیقه به ترتیب در الکل‌های ۵۰ درصد تا ۱۰۰ درصد قرار گرفتند و به منظور شفاف شدن، بافت‌ها به مدت ۵ دقیقه در گزینل قرار داده شدند.

روش تهیه محلول سوسپانسیون تزریقی از نانو

ذره و میکرو ذره اکسید منگنز

با توجه به میزان اندک حلالیت نانو و میکرو ذره اکسید منگنز در آب، برای تهیه محلول سوسپانسیون نانو یا میکرو ذرات ابتدا هر کدام از ذرات با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میکرولیتر در سالیین نرمال حل شدند. سوسپانسیون‌ها قبل از تزریق توسط سونیکاتور (Sonicator) به مدت ۳۰ دقیقه سونیکه و سپس به صورت زیر جلدی به موش‌ها تزریق شدند.

بررسی بافتی

از هر نمونه ۳ لام به طور تصادفی انتخاب شد و در هر لام به طور تصادفی ۵ منطقه توسط میکروسکوپ نوری انتخاب و با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر از آن‌ها تصویر میکروسکوپی تهیه شد. برای تحلیل کمی بافت کلیه از رنگ‌آمیزی H&E استفاده شد و به این منظور هسته سلول‌های گلومرولی (Glomerular Cell Nucleus)، هسته سلول‌های لوله پیچیده نزدیک، متوسط قطر

تشریح و نمونه‌برداری بافتی

هر دو هفته یکبار ۵ سر موش به صورت تصادفی از هر گروه انتخاب و توسط اتر بیهوش شدند. اندام‌های کبد، کلیه و بیضه موش‌ها پس از تشریح با دقت و ظرافت به کمک پنس و قیچی جراحی جدا و در سرم فیزیولوژی شسته شدند. این اندام‌ها از نظر وزن و از نظر ریخت‌شناسی (Morphology) بررسی شده و نمونه همگی این اندام‌ها در داخل فرمالین ۱۰ درصد تثبیت و

بزرگ و قطر کوچک گلوله‌ها با استفاده از نرم‌افزار Image Tools 2 محاسبه شدند.

معنی‌داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

موارد مورد بررسی رنگ‌آمیزی شده توسط H & E در نمونه‌های بافت کبدی موش‌ها در گروه‌های دریافت‌کننده ذرات و کنترل عبارت بودند از: آرایش سلول‌های بافت، وضعیت تریادهای (Triads) کبد، وضعیت سلول‌های کبدی، سینوزوئیدها (Sinusoids) و بررسی علایم تخریب بافتی، نکروز، تغییر در میزان تجمع چربی و فیروز پروتال. بافت تهیه شده از کبد موش‌های کنترل دارای لوبول‌های کبدی کاملاً مشخص در اطراف یک ورید مرکزی بودند (شکل ۱). بافت کبدی در گروه‌های دریافت‌کننده هر دو ذره تغییرات چندانی را تا قبل از هفته ششم بعد از تزریق در مقایسه با گروه کنترل نشان نداد. ارزیابی بافت‌های تهیه شده از کبد از هفته ششم در هر دو گروه دریافت‌کننده ذرات اکسید منگنز التهاب و پرخونی در ورید پروتال مرکزی را نشان داد که تعدادی از سلول‌ها به دلیل التهاب مزمن به درون این ورید نیز رانده شده بودند. تعدادی از سلول‌ها نیز شرایط نکروتیک از خود نشان دادند. در هفته دهم سلول‌های کبدی شروع به متفرق شدن کرده و نظم آن‌ها به هم ریخت و سلول‌های کبدی دچار تورم شدند و درون آن‌ها از ماده کدر و ابرمانندی پر شد. این شرایط در هفته دوازدهم و چهاردهم در هر دو گروه ادامه پیدا کرد و افزایشی در تعداد سلول‌های کوپفر (Kupffer Cells) کبدی نیز مشاهده شد. در سلول‌های کبدی دریافت‌کننده ذرات از هفته هشتم به بعد ضمن کاهش در اندازه و قطرشان مواردی چون استازیس (Stasis)، از دست رفتن هسته (Anisonucleosis)، چند هسته‌ای شدن (Multinucleation)، التهاب و آسیب به مجرای صفراوی و شرایطی تحت عنوان واکنش مجرای (Ductular Reaction) به طور مشهود مشاهده شد (شکل ۱). رنگ‌آمیزی تری کروم در کبد وجود ذرات ظریف و شاخص کلاژن در اطراف عروق وریدی به دنبال تجویز هر

روش رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون

این رنگ‌آمیزی برای تشخیص افزایش کلاژن و تعیین شدت فیروز در بافت کبدی استفاده می‌شود [۲۹]، در این روش از سه رنگ به ترتیب برای رنگ‌آمیزی کلاژن، سیتوپلاسم و هسته سلول استفاده شد. این روش شامل رنگ‌آمیزی پشت سرهم رنگ‌های زیر است: رنگ آهن هماتوکسیلین (Iron Hematoxylin) که هسته‌ها را مشکی می‌کند، رنگ Biebrich Scarlet که سیتوپلاسم را قرمز رنگ می‌کند و رنگ Aniline Blue یا Aniline Light Green که به ترتیب سبب آبی یا سبز رنگ شدن کلاژن می‌شود.

روش رنگ‌آمیزی جونز

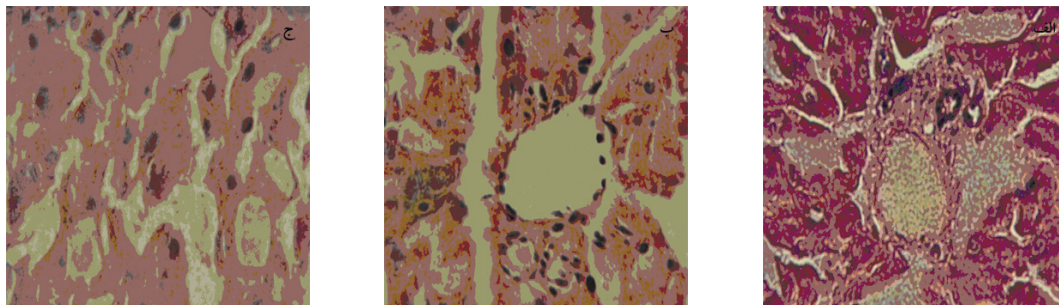
ابتدا برش‌های بافتی از بلوک‌های پارافینی کلیه تهیه شد. این برش‌ها پارافین‌زدایی و سپس توسط قرار گرفتن در غلظت‌های کاهشی از الکل آب‌دهی شدند. برش‌ها به مدت ده دقیقه به محلول اسید پریودیک (Periodic Acid) ۰/۵ درصد منتقل و سپس شستشو داده شدند. برش‌ها سپس به محلول Methenamine Silver Solution منتقل و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار گرفتند. پس از شستشو به مدت یک دقیقه به محلول Gold Chloride منتقل شدند و در نهایت پس از شستشو، مجدداً توسط غلظت‌های افزایش‌یابنده الکل آب‌گیری شدند.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

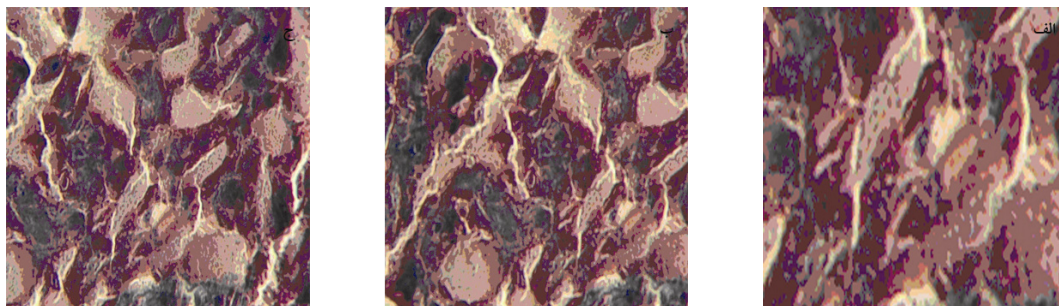
داده‌های بافت‌شناسی به صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد بیان شده‌اند. داده‌ها به وسیله نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ و آزمون آماری واریانس یک طرفه (One-Way Analysis of Variance: ANOVA) بررسی شدند. مقایسه بین گروه‌ها با استفاده از آزمون توکی انجام شد و سطح

آسیب‌های بافتی و نانوذرات اکسید منگنز

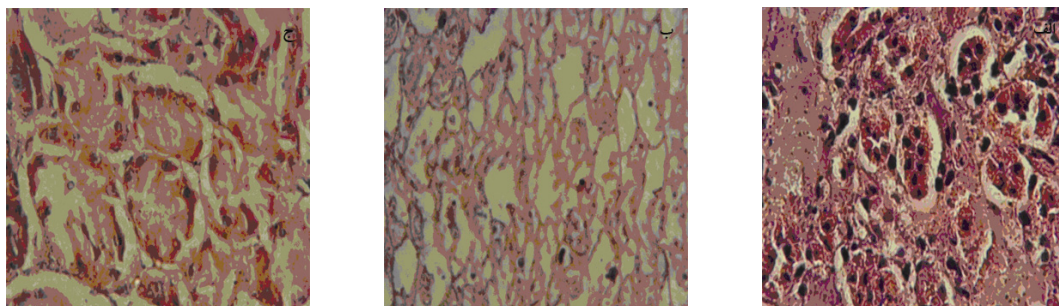
دو ذره اکسید منگنز را مشخص کرد (شکل ۲) و آثار تخریب در سلول‌های هپاتوسیت و کوپفر به وضوح مشاهده شد.



شکل ۱ تصویر میکروسکوپ نوری ($\times 400$) رنگ‌آمیزی شده توسط H & E از برش‌های بافت کبدی در موش کنترل (الف)، دریافت کننده (100 میکروگرم/کیلوگرم) نانوذرات (ب) و میکروذرات (ج) اکسید منگنز در روزهای که آسیب‌های بافتی مشاهده شدند (جزئیات بیشتر در متن مقاله). تجمع توده‌های ابری شکل در سلول‌های بافت پارانشیم کبد در گروه دریافت کننده نانوذرات (ج) به خوبی مشاهده می‌شود.



شکل ۲ تصویر میکروسکوپ نوری ($\times 400$) رنگ‌آمیزی شده به روش تری کروم ماسون از برش‌های بافت کبدی موش کنترل (الف) و موش‌های گروه دریافت کننده نانوذرات (ب) و میکروذرات (ج) اکسید منگنز (100 میکروگرم/کیلوگرم)؛ توده‌های ابری شکل در سیتوپلاسم هر دو گروه دریافت کننده اکسید منگنز مشاهده می‌شود.



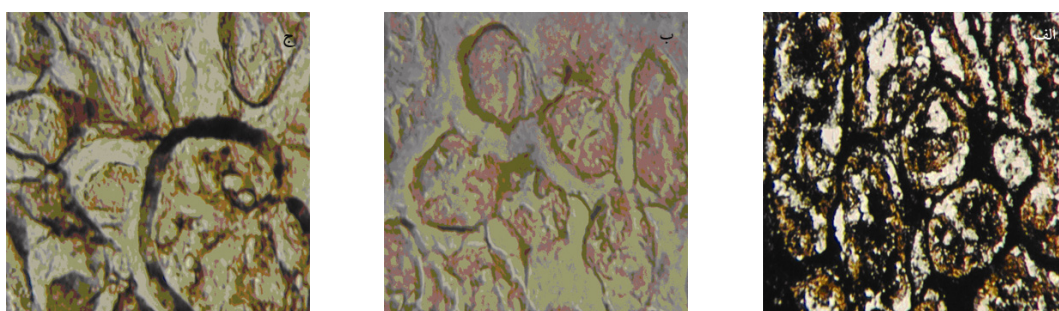
شکل ۳ تصویر میکروسکوپ نوری ($\times 400$) تهیه شده از برش‌های بافت کلیوی رنگ‌آمیزی شده توسط H & E در موش کنترل (الف) و موش‌هایی که نانوذرات (ب) و میکروذرات (ج) اکسید منگنز (100 میکروگرم/کیلوگرم) را دریافت کرده‌اند. جزئیات بیشتر در ارتباط با هفته‌هایی که آسیب‌های کلیوی در آن مشاهده می‌شوند در متن مقاله

مشخص شد. کاهش در متوسط قطر گلومرول‌های کلیوی در گروه دریافت کننده نانو ذرات نسبت به گروه کنترل و

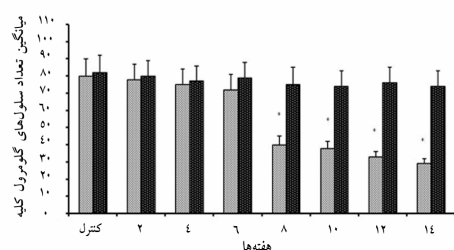
همچنین تغییرات ساختاری گسترده‌ای در بافت کلیه‌ها توسط رنگ‌آمیزی H & E (شکل ۳) و جونز (شکل ۴)

میکروذرات در هفته‌های ۸ تا ۱۴ و افزایش قطر گلومرول در هفته ۸ در گروه دریافت کننده میکرو ذرات اکسید منگنز نسبت به گروه‌های کنترل و نانو ذرات معنی‌دار ($P<0/05$) بود (شکل ۵). میانگین تعداد سلول‌های گلومرولی در گروه دریافت کننده نانو ذرات در مقایسه با کنترل در هفته‌های ۸ تا ۱۴ کاهش معنی‌دار ($P<0/05$) داشت (شکل ۶). همچنین مقایسه میانگین تعداد سلول‌های لوله پیچیده نزدیک بین گروه‌های دریافت کننده ذرات اکسید منگنز و کنترل تفاوت معنی‌دار ($P<0/05$) را از هفته ۸ تا ۱۴ پس از تزریق در گروه دریافت کننده نانو ذرات در مقایسه با کنترل و دریافت کننده میکرو ذرات نشان داد (شکل ۷). مشاهده برش‌های تهیه شده از بافت بیضه گویای این نکته است که ضخامت لایه اپی‌تلیوم لایه زاینده دیواره لوله‌های اسپرم‌ساز (Seminiferous Tubules) فقط در

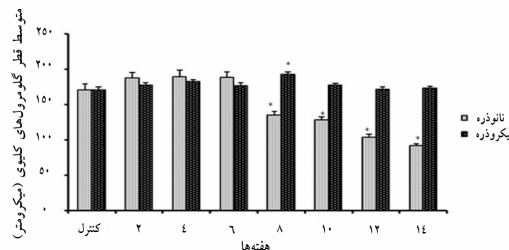
گروه دریافت کننده نانو ذرات از هفته هشتم به بعد به طور معنی‌دار ($P<0/05$) کاهش یافته و به ۶۰ میکرومتر رسیده است، در حالی که در گروه کنترل این لایه دارای ضخامتی حدود ۱۰۰ میکرومتر است. ضمن این که تعداد لوله‌های اسپرم‌ساز در واحد میلی‌متر مربع به طور معنی‌داری ($P<0/05$) کاهش نشان می‌دهد. تغییر شکل غیر طبیعی لوله‌های اسپرم‌ساز همراه با تخریب و پراکنده شدن سلول‌های اسپرم‌ساز در حیوانات تحت درمان با نانو ذره اکسید منگنز طی هفته‌های هشتم به بعد مشاهده شد. همچنین تعداد اسپرم‌های دارای ساختار غیر طبیعی در گروه نانو ذرات افزایش یافته و تعداد کل اسپرم‌ها در گروه‌های مورد تجویز کاهش نشان داد (شکل ۸). شکل ۹ تصویر نحوه اندازه‌گیری قطر گلومرول کلیه را نشان می‌دهد.



شکل ۴ نمونه‌ای از تصویر میکروسکوپ نوری ($\times 400$) تهیه شده از برش‌های بافت کلیوی موش‌ها رنگ‌آمیزی شده به روش جونز در گروه کنترل (الف) در مقایسه با موش‌های دریافت کننده نانو ذرات (ب) و میکرو ذرات (ج) اکسید منگنز (۱۰۰ میکروگرم/ کیلوگرم)

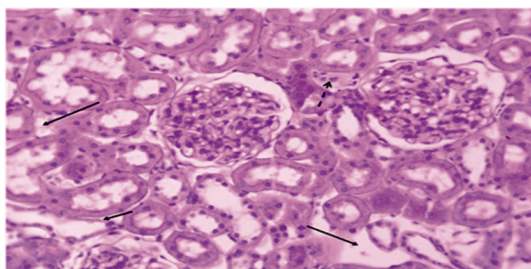


شکل ۶ مقایسه تعداد سلول‌های گلومرول کلیه‌ها بین گروه‌های کنترل و دریافت کننده نانو و میکرو ذرات اکسید منگنز (۱۰۰ میکروگرم/ کیلوگرم) هر دو هفته یکبار به مدت چهارده هفته ($P<0/05$).



شکل ۵ مقایسه میانگین قطر گلومرول کلیه‌ها بین گروه‌های کنترل و دریافت کننده نانو و میکرو ذرات اکسید منگنز (۱۰۰ میکروگرم/ کیلوگرم) هر دو هفته یکبار به مدت چهارده هفته ($P<0/05$).

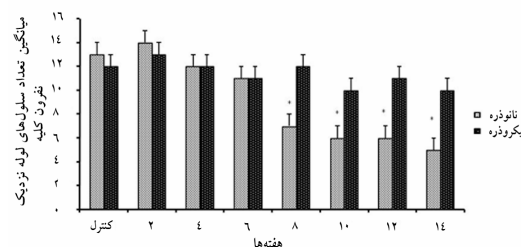
آسیب‌های بافتی و نانوذرات اکسید منگنز



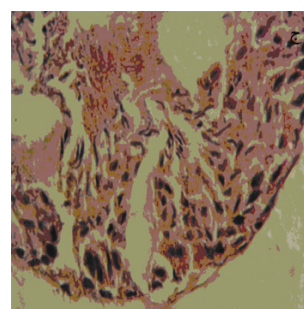
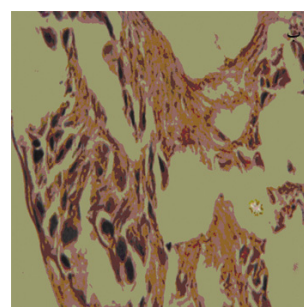
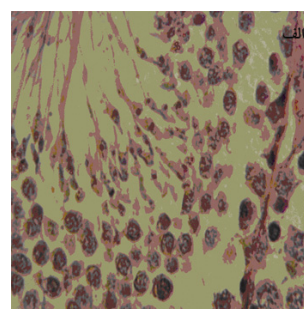
شکل ۹ تصویر میکروسکوپی ($\times 400$) بافت کلیه و فضای بینابینی توبول‌های کلیوی؛ نوک پیکان بلند محلی که در آن فضای بین توبول‌های کلیوی گروه‌های نانو ذره در مقایسه با کنترل افزایش یافته را به عنوان نشانه بروز ادم مشخص می‌کند. پیکان مقطع نشان دهنده ارتشاح سلول‌های آماسی در بافت بینابینی است. پیکان کوتاه نشان دهنده تحلیل ارتفاع سلول‌های توبولی است.

بحث

یافته‌های بررسی حاضر بروز مشهود آسیب‌های کبدی را از هفته ششم پس از تزریق هر دو ذره اکسید منگنز را نشان می‌دهد. در تصاویر میکروسکوپی رنگ‌آمیزی شده با H & E توده‌های ابری شکلی در درون سلول‌های کبدی به دنبال تجویز مزمن نانو و میکرو ذرات مشاهده شد، قبلاً نیز پژوهشگران دیگری توده‌های ابری شکل در درون سلول‌های کبدی به دنبال تجویز نانو ذرات فلزی مانند نانو ذره طلا را گزارش کرده‌اند [۱۱]. این پژوهشگران با استناد به یافته‌های دانشمندی به نام دل‌مونت (Del Monte) و همکارانش در سال ۲۰۰۵ دلیل بروز چنین شرایطی را در سلول‌های کبدی اختلال در عملکرد غشا و ورود حجم آب و یون سدیم به درون سلول ناشی از اثر ذرات نانو عنوان کرده‌اند [۳۰]. این تورم سلولی می‌تواند همراه با نشت آنزیم‌های هیدرولیز کننده لیزوزومی بوده و منجر به تخریب سیتوپلاسم و تولید ماکرومولکول‌های ابری شکل شود. گزارش شده است که اتم‌های فلزی چون آهن (Fe) و منگنز (Mn) که دارای بیش از یک حالت اکسیداسیون هستند مایل به شرکت در واکنش‌های اکسیداسیون و احیا هستند و تحت شرایط پروتوپلاسمی ممکن است باعث تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن شوند. در تأیید این مسئله نشان داده شده است که نانو اکسید آهن (Fe_3O_4) می‌تواند سبب بروز آسیب کبدی و



شکل ۷ مقایسه تعداد سلول‌های لوله پیچیده نزدیک کلیه‌ها بین گروه‌های کنترل و دریافت کننده نانو و میکرو ذرات اکسید منگنز ($100 \mu\text{g}/\text{kg}$) کیلوگرم) هر دو هفته یکبار به مدت چهارده هفته ($P < 0.05$).



شکل ۸ تصویر میکروسکوپ نوری ($\times 400$) تهیه شده از بافت بیضه موش‌ها در گروه کنترل (الف) در مقایسه با همین بافت در موش‌های دریافت کننده نانوذرات (ب) و میکروذرات (ج) اکسید منگنز ($100 \mu\text{g}/\text{kg}$) کیلوگرم وزن بدن، رنگ‌آمیزی شده به روش H & E

کلیوی شود [۳۱]. البته آثار تخریبی ناشی از تجویز غلظت مشابهی از نانو ذرات بر بافت کبدی و کلیوی در مقایسه با گروه دریافت کننده میکروذرات در این پژوهش شدیدتر به نظر می‌رسد و شدت این آسیب‌ها بر دو بافت با مرور زمان افزایش نیز می‌یابد. به عنوان یک مکانیسم پیشنهادی برای توجیه این مشاهدات می‌توان این نظریه را مطرح کرد که تخریب سیتوپلاسمی و هسته سلول‌های کبدی به دنبال تجویز این ذرات گویای این نکته است که این ذرات با پروتئین‌ها و آنزیم‌های بافت کبدی واکنش نشان داده و سبب اختلال در عملکردهای دفاعی علیه آنتی اکسیدان‌ها در این بافت‌ها شده و با تولید ترکیبات دارای اکسیژن فعال باعث آتروفی (Atrophy) و نکروز در این بافت‌ها شده‌است. البته یافته‌های این پژوهش در امتداد و تأیید کننده یافته‌های قبلی همین گروه تحقیقی در ارتباط با آثار سمی این ذرات بر عوامل عملکرد سرمی در بدن موش‌هایی است که در تماس با همین غلظت از این ذرات بوده‌اند [۲۴، ۲۵]. برخی دانشمندان دلایل دیگری را برای تغییرات مشاهده شده در سلول‌های کبدی مطرح می‌کنند؛ این دانشمندان معتقدند که به دنبال تماس ترکیبات آسیب‌رسان به این بافت فعالیت بیش از حد طبیعی سلول‌های کبدی برای متابولیزه کردن و بیرون ریختن این ترکیبات سمی از بدن طی مراحل سم‌زدایی سبب بروز این تغییرات در سلول‌های کبدی می‌شود [۳۲]. کلیه‌ها ۲۵ درصد از برون‌ده قلبی را دریافت می‌کنند و بنابراین بالاترین میزان خطر آسیب‌دیدگی را در مقابل نانو ذرات تجویز شده در بدن از خود نشان می‌دهند [۳۳، ۳۴]. آثار کشنده برخی از ترکیبات نانو نیز بر سلول‌های کلیوی و آثار التهاب‌زای آن‌ها بر این بافت قبلاً گزارش شده است [۳۵]. پژوهش‌ها نشان داده‌است که نانو ذراتی با ابعاد ۵۰ تا ۱۰۰ نانومتر می‌تواند سلول‌های مزانژیوم (Mesangium) کلیه‌ها را هدف قرار دهند. همچنین نشان داده شده است که تماس طولانی مدت نانو ذرات با کلیه‌ها نیز سبب چروکیدگی شدن سلول‌های این بافت به دلیل برداشت بیش از حد این نانو ذرات به درون این سلول‌ها می‌باشد [۳۶]. یافته‌های تحقیق

حاضر تغییر در نواحی مختلف نفرون‌های کلیوی شامل گلومرول، لوله خمیده نزدیک به دنبال تماس مزمن با نانو ذرات اکسید منگنز را تأیید می‌کند. در تأیید این یافته‌ها می‌توان گفت که کبد و کلیه‌ها به عنوان دو اندام تجمع نانو ذرات شناخته شده‌اند [۳۷] و آسیب‌های التهابی در اندام‌های مختلف موش کوچک توسط روش بافت‌شناسی به دنبال تجویز نانو ذرات فلزی به صورت زیرجلدی، داخل صفاقی و داخل وریدی نشان داده شده است [۳۸]. دانشمندان دیگری نشان داده‌اند که تجویز نانو ذرات پلیمری به میزان ۲۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به مدت ۲ هفته سبب می‌شود تا این نانو ذرات توسط سلول‌های کوپفر کبدی فاگوسیتوز شوند و به تدریج در کبد تجمع یابند و به واسطه افزایش تولید و رهایش میانجی‌های سایتوکاینی سبب بروز علائم التهابی در این اندام شوند [۳۹]. لازم به ذکر است که دانشمندان مدعی شده‌اند که پیچیده‌ترین روش توزیع نانو ذرات در بدن به دنبال تجویز این ذرات به صورت زیرجلدی، یعنی به همان روشی که در این پژوهش به‌کار گرفته شده است [۴۰]. نتایج بررسی حاضر گویای کاهش تعداد و اندازه گلومرول‌های کلیوی در موش تحت تجویز با نانو ذرات اکسید منگنز بود. دانشمندان کاهش در تعداد و اندازه گلومرول‌های کلیوی را مهم‌ترین عامل خطر در بیماری‌های مزمن کلیوی می‌دانند که منجر به بروز بیماری‌های قلبی عروقی چون پرفشاری خون می‌شود [۴۱]. این ویژگی نانوذرات فلزی سبب شده است تا در عمل نیز پژوهشگران از این تمایل زیاد نانو ذرات فلزی مانند نانو ذرات مغناطیسی اکسید آهن باردار برای اتصال به غشای پایه گلومرول‌های کلیوی برای تعیین تعداد و تغییر شکل و تخریب غشای پایه گلومرول‌های کلیه‌ها در پژوهش‌های علوم پایه استفاده کنند [۴۲].

یافته‌های این پژوهش دلالت بر تغییر در ساختار لوله‌های اسپرم ساز و کاهش لایه سلول‌های زاینده آن در هر دو گروه دریافت کننده میکرو و نانو ذرات اکسید منگنز دارد. مطالعات دیگری به دنبال تجویز حاد نانو ذرات نقره در موش‌های بزرگ نشان داده‌اند که تماس با این ذرات، وابسته به اندازه، دوز تجویز

آن در ریه نیز گزارش شده است [۴۶]. مولکول ICAM-1 (Inter cellular Adhesion Molecule 1) در جذب و اتصال سلول‌های التهابی به سلول‌های اندوتلیال و اپی‌تلیال دخالت داشته و نقش فرم محلول این مولکول که sICAM-1 (Soluble ICAM-1) نامیده می‌شود در ارتباط با بروز شرایط پاتوفیزیولوژیک در بافت‌ها نشان داده شده است [۴۷]. افزایش این ترکیب به دنبال تجویز زیر جلدی نانو ذره تیتانیوم دی اکسید به موش‌های کوچک [۴۸] و به دنبال تماس استنشاقی با نانو ذرات سلیکا به صورت برون‌تنی نشان داده شده است [۴۹]. این مکانیسم هم می‌تواند سومین گزینه پیشنهادی برای آثار مشاهده شده از این ذرات در بافت‌های مورد مطالعه در این پژوهش باشد. با توجه به ثابت بودن دوز تجویز میکرو و نانو ذرات اکسید منگنز در این پژوهش به عنوان یک مقایسه می‌توان گفت که کاهش اندازه این ذرات سبب تشدید آسیب‌های ناشی از تماس مزمن آن‌ها بر بافت کبدی و کلیوی شده و به دلیل توان بیشتر عبور نانو ذرات از سد خون-بیضه این ذرات سبب وارد آمدن جراحت شدیدتری بر این بافت شده‌اند.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از زحمات اساتید معظم جناب آقای دکتر محمد جلالی ندوشن، جناب آقای دکتر دلشاد و سرکار خانم دکتر زهره مظاهری که در طول اجرای این پایان‌نامه صمیمانه ما را یاری فرمودند تقدیر و تشکر می‌شود.

شده و مدت زمان تماس با این ذرات می‌تواند باعث تغییر در ابعاد و شکل لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه‌ها در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی شود [۴۳]. به تازگی بررسی نانو ذرات فلزی کروم-کبالت (Cobalt-Chromium) نشان داد که این نانو ذرات دارای آثار نامطلوبی بر عملکرد سیستم تولید مثلی در موش‌های نر به دلیل خاصیت شدید آنتی اکسیدانی هستند [۲۰]. البته در ارتباط با نانو ذرات اکسید منگنز مطالعات برون‌تنی روی سلول‌های PC12 نیز نشان داده است که تولید انواع گونه‌های اکسیژن فعال در این سلول‌ها به دنبال تماس با این نانو ذرات با ابعاد ۴۰ نانومتر افزایش یافته و سبب تخریب دوپامین (Dopamine)، دی هیدروکسی فنیلاکتیک اسید (Dihydroxyphenylacetic Acid) و همو وانیلیک اسید (Homovanillic Acid) در این سلول‌ها می‌شود [۴۴]. اغلب مطالعاتی که به بررسی آثار آسیب‌رسان اکسیدهای فلزی به خصوص در ابعاد نانو پرداخته‌اند این آثار را ناشی از افزایش تولید ترکیبات فعال اکسیژن‌دار می‌دانند. این پدیده می‌تواند به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های پیشنهادی برای آثار آسیب‌رسان این ذرات بر بافت بیضه و دو بافت دیگر مطرح شود. در ارتباط با نانو ذرات فلزی دیگری مثل نانو ذره نقره نشان داده شده است که این نانو ذرات می‌تواند سبب تنظیم افزایشی گیرنده اینترلوکین یک در سلول‌ها و در نتیجه سبب برانگیخته شدن فرآیندهای التهابی و آسیب به سدهای خونی شوند. این امر می‌تواند توجه‌کننده یافته‌های پژوهش حاضر در ارتباط با بروز آسیب در بافت بیضه با وجود سد خون-بیضه به دنبال تجویز هر دو ذره اکسید منگنز باشد [۴۵]. ضمن این که به دنبال تجویز استنشاقی این نانو ذره آثار التهابی

منابع

- [1] Kipen HM, Laskin DL. Smaller is not always better: nanotechnology yields nanotoxicology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 289(5): L696-7.
- [2] Appenroth KJ. Definition of "heavy metals" and their role in biological systems. In: Sherameti I, Varma A (Editors). *Soil heavy metals*. New York: Springer, USA, 2010; p: 19-29.
- [3] Pujalté I, Passagne I, Brouillaud B, Tréguer M, Durand E, Ohayon-Courtès C, L'Azou B. Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human

- kidney cells. *Part Fibre Toxicol* 2011; 8: 10.
- [4] Oberdörster G, Ferin J, Lehnert BE. Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ Health Perspect* 1994; 102(Suppl 5):173-9.
- [5] Johnston HJ, Hutchison G, Christensen FM, Peters S, Hankin S, Stone V. A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Crit Rev Toxicol* 2010; 40(4): 328-46.
- [6] Hirn S, Semmler-Behnke M, Schleh C, Wenk A, Lipka J, Schäffler M, Takenaka S, Möller W, Schmid G, Simon U, Kreyling WG. Particle size-dependent and surface charge-dependent biodistribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Eur J Pharm Biopharm* 2011; 77(3): 407-16.
- [7] Choi HS, Liu W, Misra P, Tanaka E, Zimmer JP, Itty Ipe B, Bawendi MG, Frangioni JV. Renal clearance of quantum dots. *Nat Biotechnol* 2007; 25(10): 1165-70.
- [8] Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small* 2008; 4(1): 26-49.
- [9] Chen Z, Meng H, Xing G, Chen C, Zhao Y, Jia G, Wang T, Yuan H, Ye C, Zhao F, Chai Z, Zhu C, Fang X, Ma B, Wan L. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. *Toxicol Lett* 2006; 163(2): 109-20.
- [10] Wang J, Zhou G, Chen C, Yu H, Wang T, Ma Y, Jia G, Gao Y, Li B, Sun J, Li Y, Jiao F, Zhao Y, Chai Z. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicol Lett* 2007; 168(2): 176-85.
- [11] Abdelhalim MA, Jarrar BM. Histological alterations in the liver of rats induced by different gold nanoparticle sizes, doses and exposure duration. *J Nanobiotechnology* 2012; 10: 5.
- [12] Geraets L, Oomen AG, Schroeter JD, Coleman VA, Cassee FR. Tissue distribution of inhaled micro- and nano-sized cerium oxide particles in rats: results from a 28-day exposure study. *Toxicol Sci* 2012; 127(2): 463-73.
- [13] De Jong WH, Borm PJ. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *Int J Nanomedicine* 2008; 3(2): 133-49.
- [14] Li C, Taneda S, Taya K, Watanabe G, Li X, Fujitani Y, Nakajima T, Suzuki AK. Effects of in utero exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust on testicular function in immature male rats. *Toxicol Lett* 2009; 185(1): 1-8.
- [15] Yauk C, Polyzos A, Rowan-Carroll A, Somers CM, Godschalk RW, Van Schooten FJ, Berndt ML, Pogribny IP, Koturbash I, Williams A, Douglas GR, Kovalchuk O. Germ-line mutations, DNA damage, and global hypermethylation in mice exposed to particulate air pollution in an urban/industrial location. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(2): 605-10.
- [16] Roels HA, Ghyselen P, Buchet JP, Ceulemans E, Lauwerys RR. Assessment of the permissible exposure level to manganese in workers exposed to manganese dioxide dust. *Br J Ind Med* 1992; 49(1): 25-34.
- [17] Hobbesland A, Kjuus H, Thelle DS. Study of cancer incidence among 6363 male workers in four Norwegian ferromanganese and silicomanganese producing plants. *Occup*

- Environ Med 1999; 56(9): 618-24.
- [18] Mohammadi Fartkhoni F, Noori A, Momayez M, Sadeghi L, Shirani K, Yousefi Babadi V. The effects of nano titanium dioxide (TiO₂) in spermatogenesis in wistar rat. Euro J Exp Bio 2013; 3(4): 145-9.
- [19] Al Faraj A, Fauvelle F, Luciani N, Lacroix G, Levy M, Crémillieux Y, Canet-Soulas E. In vivo biodistribution and biological impact of injected carbon nanotubes using magnetic resonance techniques. Int J Nanomedicine 2011; 6: 351-61.
- [20] Wang Z, Chen Z, Zuo Q, Song F, Wu D, Cheng W, Fan W. Reproductive toxicity in adult male rats following intra-articular injection of cobalt-chromium nanoparticles. J Orthop Sci 2013; 18(6): 1020-6.
- [21] Ha Y, Shin JS, Lee DY, Rhim T. Fluorescently Labeled Nanoparticles Enable the Detection of Stem Cell-Derived Hepatocytes. Bull Korean Chem Soc 2012; 33(6): 1983-8.
- [22] Kong WH, Park K, Lee MY, Lee H, Sung DK, Hahn SK. Cationic solid lipid nanoparticles derived from apolipoprotein-free LDLs for target specific systemic treatment of liver fibrosis. Biomaterials 2013; 34(2): 542-51.
- [23] Kim JS, Yoon TJ, Yu KN, Kim BG, Park SJ, Kim HW, Lee KH, Park SB, Lee JK, Cho MH. Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice. Toxicol Sci 2006; 89(1): 338-47.
- [24] Nosrati N, Hassanpour-Ezzati M, Mousavi SZ, Rahmanifar MS, Rezagholiyan S. Comparison of MnO₂ nanoparticles and microparticles distribution in CNS and muscle and effect on acute pain threshold in rats. Nanomed J 2013; 1(3):180-90.
- [25] Rezagolian S, Hassanpour-Ezatti M, Mousavi SZ, Rahmanifar MS, Nosrati N. Comparison of chronic administration of manganese oxide micro and nanoparticles on liver function parameters in male rats. Daneshvar Med 2013; 20(106): 1-13.
- [26] Geiser M, Kreyling WG. Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. Part Fibre Toxicol 2010; 7: 2.
- [27] Zhang Y, Yang Y, Zhang Y, Zhang T, Ye M. Heterogeneous oxidation of naproxen in the presence of α -MnO₂ nanostructures with different morphologies. Appl Catal B Environ 2012; 127: 182-9.
- [28] Pearse AE. Histochemistry. Theoretical and applied. Analytical technology. 4th ed, Edinburgh: Churchill-Livingstone, 1985; p: 441-1055.
- [29] Escobedo G, Arjona-Román JL, Meléndez-Pérez R, Suárez-Álvarez K, Guzmán C, Aguirre-García J, Gutiérrez-Reyes G, Vivas O, Varela-Fascinetto G, Rodríguez-Romero A, Robles-Díaz G, Kershenobich D. Liver exhibits thermal variations according to the stage of fibrosis progression: A novel use of modulated-differential scanning calorimetry for research in hepatology. Hepatol Res 2013; 43(7): 785-94.
- [30] Del Monte U. Swelling of hepatocytes injured by oxidative stress suggests pathological changes related to macromolecular crowding. Med Hypotheses 2005; 64(4): 818-25.
- [31] Ma P, Luo Q, Chen J, Gan Y, Du J, Ding S, Xi Z, Yang X. Intraperitoneal injection of magnetic Fe₃O₄-nanoparticle induces hepatic and renal tissue injury via oxidative stress in

- mice. *Int J Nanomedicine* 2012; 7: 4809-18.
- [32] Patel JM, Bahadur A. Histopathological Manifestations of Sub Lethal Toxicity of Copper Ions in *Catla catla*. *Am Euras J Toxicol Sci* 2011; 3(1): 1-5.
- [33] Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 2006; 311(5761): 622-7.
- [34] Deelman LE, Declèves AE, Rychak JJ, Sharma K. Targeted renal therapies through microbubbles and ultrasound. *Adv Drug Deliv Rev* 2010; 62(14): 1369-77.
- [35] Wu J, Nyborg WL. Ultrasound, cavitation bubbles and their interaction with cells. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60(10): 1103-16.
- [36] L'azou B, Jorly J, On D, Sellier E, Moisan F, Fleury-Feith J, Cambar J, Brochard P, Ohayon-Courtès C. In vitro effects of nanoparticles on renal cells. *Part Fibre Toxicol* 2008; 5: 22.
- [37] Choi CH, Zuckerman JE, Webster P, Davis ME. Targeting kidney mesangium by nanoparticles of defined size. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(16): 6656-61.
- [38] Flesken-Nikitin A, Toshkov I, Naskar J, Tyner KM, Williams RM, Zipfel WR, Giannelis EP, Nikitin AY. Toxicity and biomedical imaging of layered nanohybrids in the mouse. *Toxicol Pathol* 2007; 35(6): 806-12.
- [39] Fernández-Urrusuno R, Fattal E, Féger J, Couvreur P, Théron P. Evaluation of hepatic antioxidant systems after intravenous administration of polymeric nanoparticles. *Biomaterials* 1997; 18(6): 511-7.
- [40] Thanos C, Sandor M, Jong Y, Jacob J, Yip KP, Harper J, Morrell C, Scherer J and Mathiowitz E. Inter-species uptake of polymeric particles. *Mater Res Proc* 1998; 550: 65-70.
- [41] Brenner BM, Garcia DL, Anderson S. Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? *Am J Hypertens* 1988; 1(4 Pt 1): 335-47.
- [42] Bennett KM, Zhou H, Sumner JP, Dodd SJ, Bouraoud N, Doi K, Star RA, Koretsky AP. MRI of the basement membrane using charged nanoparticles as contrast agents. *Magn Reson Med* 2008; 60(3): 564-74.
- [43] Gromadzka-Ostrowska J, Dziendzikowska K, Lankoff A, Dobrzyńska M, Instanes C, Brunborg G, Gajowik A, Radzikowska J, Wojewódzka M, Kruszewski M. Silver nanoparticles effects on epididymal sperm in rats. *Toxicol Lett* 2012; 214(3): 251-8.
- [44] Pisanic TR 2nd, Blackwell JD, Shubayev VI, Fiñones RR, Jin S. Nanotoxicity of iron oxide nanoparticle internalization in growing neurons. *Biomaterials* 2007; 28(16): 2572-81.
- [45] Trickler WJ, Lantz SM, Murdock RC, Schrand AM, Robinson BL, Newport GD, Schlager JJ, Oldenburg SJ, Paule MG, Slikker W Jr, Hussain SM, Ali SF. Silver nanoparticle induced blood-brain barrier inflammation and increased permeability in primary rat brain microvessel endothelial cells. *Toxicol Sci* 2010; 118(1): 160-70.
- [46] Yazdi AS, Guarda G, Riteau N, Drexler SK, Tardivel A, Couillin I, Tschopp J. Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1 α and IL-1 β . *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(45): 19449-54.

- [47] Gearing AJ, Hemingway I, Pigott R, Hughes J, Rees AJ, Cashman SJ. Soluble forms of vascular adhesion molecules, E-selectin, ICAM-1, and VCAM-1: pathological significance. *Ann N Y Acad Sci* 1992; 667: 324-31.
- [48] Gonçalves DM, Girard D. Titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles induce neutrophil influx and local production of several pro-inflammatory mediators in vivo. *Int Immunopharmacol* 2011; 11(8): 1109-15.
- [49] Kasper J, Hermanns MI, Bantz C, Maskos M, Stauber R, Pohl C, Unger RE, Kirkpatrick JC. Inflammatory and cytotoxic responses of an alveolar-capillary coculture model to silica nanoparticles: comparison with conventional monocultures. *Part Fibre Toxicol* 2011; 8(1): 6.