

## مطالعه استریولوژیک اثر حفاظتی ژل رویال بر بافت کلیه موش NMRI به دنبال سمیت القا شده با نانو ذرات نقره

سیدمحمدعلی شریعت زاده\* و مهناز گودرزی

ایران، اراک، دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۰۱ تاریخ پذیرش: ۹۹/۹/۲۵

### چکیده

افزایش کاربرد نانو ذرات نقره در محصولات مصرفی ممکن است اثرات مفید یا مضر بر ساختار بدن انسان و موجودات زنده داشته باشد و از آنجایی که یکی از اندام های هدف نانو ذرات نقره در بدن جانداران، کلیه است و کلیه نقش کلیدی در پاکسازی بدن از مواد زائد و تنظیم هوموستازی را دارد. هدف از این پژوهش بررسی اثر ژل رویال بر بافت کلیه موش در پی سمیت نانو ذرات نقره بود. ۲۴ سر موش نر بالغ NMRI به ۴ گروه: کنترل، نانوذرات نقره (۵۰۰ mg / Kg/ day)، ژل رویال (Kg/ day ۳۰۰ mg/ day) و نانوذرات نقره به همراه ژل رویال تقسیم و به مدت ۳۵ روز تیمار شد. ارزیابی بافت کلیه با روش های استریولوژیک انجام شد. آنالیز پارامترهای بیوشیمیایی مالون دی آلدئید، اوره، کراتینین و ظرفیت آنتی اکسیدانی تام به روش FRAP انجام شد. داده ها با آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون Tukey تجزیه و تحلیل آماری شد و تفاوت میانگین ها در حد ( $P < 0.05$ ) معنی دار در نظر گرفته شد. در تیمار با نانوذرات نقره افزایش معنی داری در میانگین حجم کل جسمک کلیوی و کاهش معنی داری در میانگین حجم کل فضای کپسول بومن نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ( $P < 0.05$ ) در بررسی پارامترهای بیوشیمیایی MDA (مالون دی آلدئید) و BUN (نیتروژن اوره خون) افزایش معنی داری در گروه نانو نقره در مقایسه با کنترل نشان داد. اما در سطوح آنتی اکسیدانی (FRAP) کاهش معنی داری نشان داد. اکثر آسیب های القاء شده در کلیه توسط نانو ذرات نقره در گروه (نانو + ژل رویال) در حد گروه کنترل بهبود یافت. براساس این پژوهش به نظر می رسد ژل رویال می تواند کلیه را از آسیب نانوذرات نقره محافظت کند.

واژه های کلیدی: نانوذرات نقره، ژل رویال، کلیه، استریولوژی، موش NMRI.

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۸۶۱۲۷۶۷۳۰۴، پست الکترونیکی: s-shariatzadeh@araku.ac.ir

### مقدمه

دارو و ژن رسانی، پوشش های خود تمیز شونده و ضد باکتری، برچسب های بیولوژیک، مطالعه و شناسایی پروتئین ها، مهندسی بافت، هایپرترمیا (Hyperthermia) روش درمانی که در آن برای آسیب رساندن به سلول های سرطانی، بافت بدن را در معرض دمای زیاد (تا حدود ۴۴ درجه سلسیوس) قرار می دهند، حسگرها، زیست حسگرها و پوشش ها می باشد (۳۴). در برخی مواقع نانوذرات علاوه بر اثرات مثبت می توانند با ورود به بدن از طریق مختلف به اندام ها راه یافته و اثر سوء بر عملکرد آن ها داشته باشند. در

انسان فناوری های گوناگونی را جهت نیل به اهداف مختلف زندگی اش به کار گرفته است. پیشرفت سریع نانو تکنولوژی و تنوع کاربردهای آن موجب شده است که مواد با ابعاد نانو بطور وسیعی مورد استفاده قرار گیرند (۲۸). نانو مواد ساختارهایی هستند که حداقل یک بعد کمتر از ۱۰۰ نانومتر دارند. نانو مواد با اشکال و اندازه های بسیار متنوعی ساخته شده و در تولید محصولات و ابزارهای مختلف صنعتی و پزشکی به کار می روند. کاربردهای نانو مواد شامل درمان سرطان، طراحی دارو،

نانوذرات نقره می‌تواند تولید ROS بیش از حدی را القاء کند که در نهایت می‌تواند از طریق انواع مکانیسم منجر به مرگ سلول شود:

- پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش نفوذپذیری غشاء
  - فعال‌سازی آبخاری سیگنالینگ درگیر در مسیر میتوکندریایی
  - اختلالات در تغییرات اتوفاژی
  - آسیب DNA و جلوگیری از رشد سلول
- به نظر می‌رسد این فرایندها به اندازه و پوشش نانوذرات بستگی دارد (۳۹).

رادیکال‌های آزاد، اتم‌ها یا مولکول‌هایی با الکترون جفت نشده هستند که قادرند به طور برگشت‌ناپذیر به مولکول‌های سیستم‌های بیولوژیک نظیر اسیدهای آمینه آزاد، لیپیدها، لیپوپروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و ماکرومولکول‌های بافت همبند آسیب وارد نمایند (۴۲).

شواهد بیوشیمیایی، زیستی و بالینی فراوان وجود دارد که نشان می‌دهد واکنش اکسایشی ناشی از رادیکال‌های آزاد در ایجاد بیماری‌های مختلف، تسریع پیری و فساد مواد غذایی دخالت دارد (۲۰). سلول‌های انسانی دارای سیستم دفاعی محافظ در برابر رادیکال‌های آزاد هستند (مانند آنزیم سوپراکساید دیسموتاز، کاتالاز و گلوکوتایون پراکسیداز، ویتامین‌های E و A و ترکیباتی چون سلنیم و روی). آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که می‌توانند از تولید پرواکسیدان‌ها و رادیکال‌ها جلوگیری کرده و رادیکال‌های آزاد را خنثی و در نتیجه از ایجاد بیماری‌ها جلوگیری کنند. در حضور این ترکیبات اکسید شدن یک ماده به تأخیر افتاده یا از آن جلوگیری می‌شود. آنتی‌اکسیدان‌ها تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن را از روش‌های مختلف مانند اتصال به فلزات یا روش آنزیمی مهار یا جلوگیری می‌کنند (۳۰).

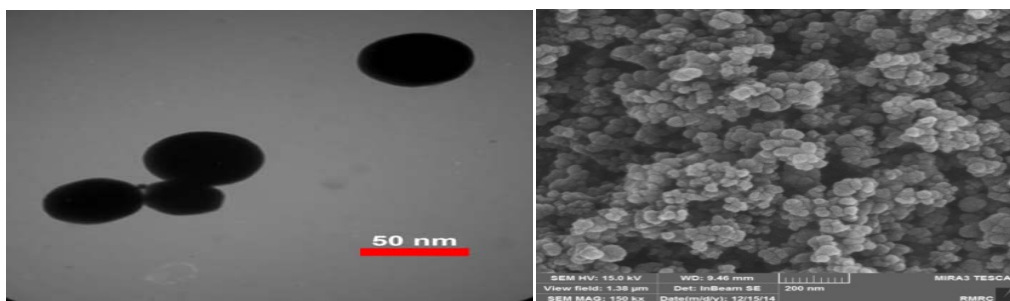
ژل رویال یک محصول طبیعی زنبور عسل با یک پتانسیل بزرگ و ارزشمند است (۳۳). این ماده نقش مهمی در

این رابطه شاخص‌هایی مانند اندازه، شکل، ماهیت، واکنش‌پذیری، توانایی تحرک، پایداری بار، شیمی سطح، تجمع محیط و زمان ذخیره بر سمیت آن‌ها تأثیر دارد (۳۷). نانونقره، یکی از پرکاربردترین محصولات فناوری نانو، با ویژگی‌های خاصی که مهمترین آن‌ها رسانایی گرمایی، پایداری شیمیایی، فعالیت کاتالیزوری و طیف گسترده‌ای از فعالیت ضد میکروبی می‌باشد، به طور گسترده در وسایل جراحی، پماد زخم، پروتز باند مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴۱). انسان‌ها از طریق منابع مختلف در معرض نانونقره قرار گرفته و این نانو ذرات می‌توانند از طریق خوردن، تماس پوستی، استنشاق، وارد بدن شده و ممکن است تأثیر منفی بر روی سلامتی داشته باشند. بسیاری از مطالعات نشان می‌دهند که نقره آزاد شده از نانونقره در اکثر بافت‌ها از جمله کبد، کلیه‌ها، شش‌ها، طحال، مغز و خون توزیع می‌گردد (۱۶). نانو ذرات بعد از ورود به بافت در مایع میان بافتی تجمع می‌کند و برحسب برهم کنش با سطح سلول و یا ورودشان به سلول و دسترسی به محل هسته و یا ماده ژنتیکی سلول در سازوکار عملکرد سلول تأثیر می‌گذارد. براساس بار سطحی نانوذرات، جذب آن‌ها توسط سلول‌های ایمنی هم چون مونوسیت‌ها، پلاکت‌ها، لوکوسیت‌ها، سلول‌های دندریتیک و ماکروفاژها رخ می‌دهد و در نتیجه آن واکنش‌های التهابی و واکنش‌های استرس اکسیداتیو ایجاد می‌شود. انواع سازوکارهای ورود نانوذرات به درون سلول‌ها شامل: اندوسیتوز، جریان‌ات غشایی، کانال‌ها و یا ورود از طریق واکنش‌های چسبندگی است (۲۴). براساس مطالعات صورت گرفته، نانونقره می‌تواند سبب آسیب غشاء سلولی، نکروز سلولی، کاهش عملکرد میتوکندری و کاهش بقاء سلول گردد. چرا که نانوذرات معمولاً وارد میتوکندری شده و با تولید گونه‌های اکسیژنی فعال ROS Reactive Oxygen Species ( ) و نیز تولید رادیکال‌های آزاد می‌توانند سبب آسیب درون سلولی شوند (۴۱).

## مواد و روشها

برای انجام این تحقیق ۲۴ سر موش نر بالغ از نژاد (NMRI) از انستیتو پاستور ایران خریداری و در خانه حیوانات دانشگاه اراک در شرایط استاندارد (دمای  $21 \pm 2$  درجه سانتیگراد و نور محیطی با شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی) نگهداری شدند. جهت سازگاری با محیط، موشها به مدت ۲ هفته با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند تا استرس احتمالی به وجود آمده در اثر تغییر مکان زندگی از بین رفته و به شرایط جدید عادت کنند. موشها به صورت تصادفی به ۴ گروه ۶ تایی شامل: گروه اول کنترل که فقط آب و غذای معمولی دریافت کردند. گروه دوم با نانوذرات نقره با قطر ۲۰ نانومتر (۳) و دوز (۵۰۰ mg/kg.bw) (۲۹)، گروه سوم ژل رویال با دوز (۳۰۰ mg/kg.bw) (۲۶) و گروه چهارم با نانوذرات نقره + ژل رویال تقسیم بندی و به مدت ۳۵ روز و به صورت گاوژ تیمار شدند. برای تیمار نانوذرات نقره با خلوص ۹۹/۹۹٪ با قطر ۲۰ نانومتر از شرکت پیشگامان نانومواد ایرانیان با مشخصات زیر خریداری گردید.

تغذیه ملکه دارد. این ماده از غده حلقی (hypopharynx) و تحت فکی (mandibular) زنبورهای کارگر جوان ترشح می شود. ژل رویال ماده ای ژلاتینی به رنگ سفید شیری است و دارای بوی تند و مزه ای میوه ای و ارزش غذایی فراوان است (۱۷). ژل رویال بطور عمده از پروتئینها، قندها، چربیها (شامل استرولها و اسیدهای چرب) و مقادیر ناچیزی از نمکهای معدنی و ویتامینها تشکیل شده است (۱۸). مشخص شده است که این مواد فعالیت های فارماکولوژیکی متفاوتی از قبیل خواص ضدتوموری، ضد میکروبی، اتساع دهنده عروق، کاهش دهنده فشار خون و همچنین تحریک کننده رشد، مقاومت در مقابل عفونتها، ضد هایپرکلسترولمی و فعالیت های ضدالتهابی، نشان می دهد (۲۵). ژل رویال اثرات تحریکی بر اندام های بدن دارد و به دلیل دارا بودن خاصیت آنتی اکسیدانی می تواند عملکرد آنها را بهبود بخشد (۶). یکی از اندام های هدف نانوذرات نقره، کلیه است و کلیه در تنظیم هوموستازی و پاک سازی مواد اضافی در بدن نقش دارد. براین اساس هدف مطالعه حاضر ارزیابی بافت شناسی اثرات محافظتی احتمالی ژل رویال در برابر سمیت کلیوی ناشی از نانوذرات نقره در موش می باشد.

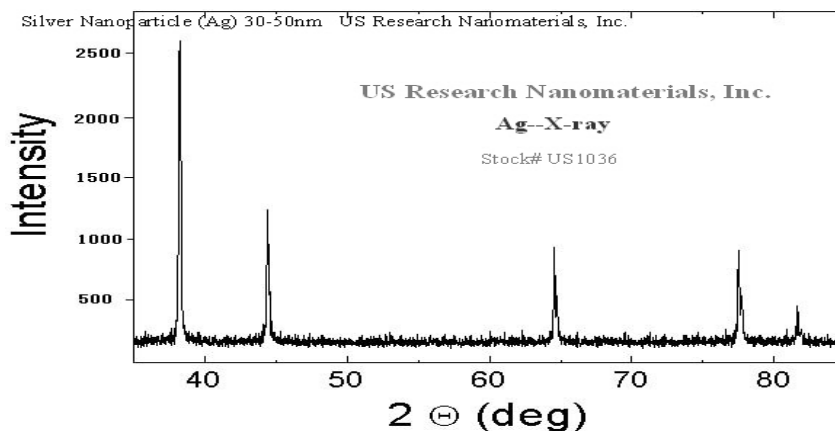


شکل ۱ - تصاویر نانوذرات نقره با استفاده از میکروسکوپ های الکترونی SEM, TEM

شدت اشعه پراشیده شده مقدار قابل ملاحظه ای ندارد. منظور از پراش، همین رفتار اشعه ایکس (شدت قله مربوط به آرایش اتمها در صفحات) می باشد. (نمودار عمودی: شدت پرتو X بازتابیده، نمودار افقی: زاویه بین پرتو تابش و بازتابش). ترکیب شیمیایی نانوذرات نقره با این الگوی

در (The X-ray diffraction pattern) XRD انجام شده توسط کریستال های نانوذرات نقره مشاهده می شود که شدت اشعه ایکس بازتابیده از کریستال، که در هر اتم بصورت الاستیک پراکنده شده اند (بدون تغییر طول موج)، در زوایای خاصی ماکسیمم خواهد بود و در بقیه زوایا،

پراش تایید شده است. اندیس‌های میلر در سطوح ۱۱۱، ۲۲۰، ۲۰۰ و ۳۱۱ که به ترتیب مربوط به زاویه های ۳۸/۲۸، ۴۴/۳۸، ۶۴/۵۴ و ۷۷/۶۴ درجه بوده که وجود کریستال‌های نانوذرات نقره را با درجه خلوص بالا اثبات می‌کند (شکل ۲).



شکل ۲- XRD مربوط به نانوذرات نقره

استفاده از فرمول زیر میزان چروکیدگی مربوط به کلیه هرموش محاسبه شد (۲۱).

$$\text{Shrinkage} = 1 - \left( \frac{r_{\text{after}}^2}{r_{\text{before}}^2} \right)^{\frac{3}{2}}$$

با استفاده از فرمول Shrinkage 1-، حجم نهائی نسبت به حجم اولیه محاسبه گردید و سپس با ضرب آن در حجمی که به روش Immersion به دست آمده بود حجم واقعی کلیه به دست آمد.

محاسبه حجم کورتکس و مدولا: ابتدا اسلایدهای ۵ میکرونی بافت کلیه با بزرگنمایی ۱۰۰ و با استفاده از روش تصادفی منظم به صورت کاملاً تصادفی به طور میانگین تعداد ۱۱ میدان دید انتخاب و با پروب نقطه‌ای روی هر فیلد مورد بررسی قرار گرفت. کل نقاط برخورد کرده پروب با کل میدان دید انتخاب شده با  $\sum_{i=1}^n P_{\text{total}}$ ، نقاط برخورد کرده با کورتکس با  $\sum_{i=1}^n P_{\text{cortex}}$ ، نقاط برخورد کرده با مدولا با  $\sum_{i=1}^n P_{\text{medulla}}$  نشان داده می‌شود. با استفاده از فرمول‌های زیر دانسیته حجمی محاسبه گردید.

$$Vv \text{ cortex} = \frac{\sum_{i=1}^n P_{\text{cortex}}}{\sum_{i=1}^n P_{\text{total}}}$$

همچنین ژل رویال از کندوهای طبیعی زنبور عسل منطقه ازنا لرستان در ظروف کاملاً استریل و منجمد شده خریداری و مورد استفاده قرار گرفت. پس از پایان دوره تیمار ابتدا موش‌ها توسط دی اتیل اتر بیهوش و پس از تشریح، کلیه چپ خارج گردید. بعد از جداسازی کپسول و وزن کردن، تعیین حجم به روش Immersion (۱۱) انجام شد. به منظور ثبوت بافتی به مدت ۲۴ ساعت در فیکساتیو بوئن قرار گرفت (۳۲). با استفاده از روش orientator برش‌های IUR (۲۲) گرفته شد. مراحل پاساژ بافتی انجام و بلوک پارافینی تهیه شد و با استفاده از دستگاه میکروتوم برش‌های ۵ میکرونی به صورت سریال گرفته شد و به روش هایدن هاین-آزان رنگ آمیزی شد.

محاسبه چروکیدگی بافت کلیه: برای محاسبه چروکیدگی با ابزاری به نام تروکار بطور میانگین دو یا سه قطعه گرد از برش‌های IUR تهیه و دو قطر عمود بر هم از هر کدام اندازه‌گیری و میانگین شعاع آنها محاسبه شد و بصورت rbefore نشان داده شد. بعد از مراحل پاساژ بافتی، برش‌گیری و رنگ‌آمیزی، مجدداً دو قطر عمود بر هم هر کدام از اسلایدهای مربوط به چروکیدگی اندازه‌گیری و میانگین شعاع آنها بصورت rafter بدست آمد سپس با

اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید: از روش باگ و آست استفاده شد (۱۰). در این روش MDA با تیوباربیوتوریک اسید واکنش داده و ترکیبی با رنگ نارنجی تولید می‌کند که پرتوهای با طول موج ۵۳۵-۵۳۲ را جذب می‌کند (۱۳).

روش اندازه‌گیری میزان کراتینین و اوره: نمونه های سرم در دمای ۸۰-درجه سانتی‌گراد نگهداری و به روش فتومتریک توسط دستگاه اتوآنالیز میزان اوره و کراتینین اندازه گیری شد.

روش سنجش میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی تام: این روش براساس توانایی پلازما یا عصاره بافتی در احیاء یون های  $Fe^{3+}$  (فریک) به  $Fe^{2+}$  (فرو) در حضور ماده‌ای به نام TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) استوار است. میزان قدرت احیاء کنندگی پلازما با غلظت این کمپلکس متناسب می باشد. در PH پایین، احیاء کمپلکس TPTZ،  $Fe^{3+}$  به شکل فرس ( $Fe^{2+}$ ) یک کمپلکس آبی رنگ با ماکزیمم جذب در ۵۹۳ نانومتر ایجاد می کند (۹).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: داده های حاصل توسط نرم افزار Spss مدل 16 و روش آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) و تست آماری Tukey مورد تجزیه و تحلیل آماری قرارگرفت و تفاوت میانگین ها در سطح  $P < 0.05$  معنی دار در نظر گرفته شد.

## نتایج

در بررسی و تحلیل هیستوپاتولوژیک کلیه ساختمان طبیعی بافت کلیه با تیوبول‌های منظم، فضای لومن و گلوبول‌های طبیعی در گروه کنترل و ژل رویال مشاهده شد. (شکل ۳، A و D) در گروه تیمار شده با نانو ذرات نقره گلوبول‌ها نسبتاً دچار التهاب شدند، حجم گلوبول‌ها افزایش معنی‌داری یافته بود. در گروه ژل رویال + نانو ذرات نقره این تغییرات تا حدودی بهبود یافته بود. (شکل ۳، C و B)

$$Vv \text{ medulla} = \frac{\sum_{i=1}^n P_{\text{medulla}}}{\sum_{i=1}^n P_{\text{total}}}$$

سپس حجم کل کورتکس و حجم کل مدولا از فرمول‌های زیر محاسبه شد.

$$V_{\text{cortex}} = Vv_{\text{cortex}} \times V_{\text{total}}$$

$$V_{\text{medulla}} = Vv_{\text{medulla}} \times V_{\text{total}}$$

محاسبه حجم اجزای کورتکس (لوله‌های نزدیک و دور به همراه لومن و اپیتلیوم آن‌ها، گلوبولوس و بافت بینابینی)، با استفاده از روش نمونه گیری تصادفی منظم بطور میانگین ۱۱ میدان دید از هر اسلاید ۵ میکرونی بافت کلیه با بزرگنمایی ۴۰۰ با قرار دادن پروب نقطه‌ای روی هر فیلد مورد بررسی قرارگرفت. کل نقاط برخورد کرده از پروب با کل میدان دید انتخاب شد با  $\sum_{i=1}^n P_{\text{total}}$  و نقاط برخورد کرده با هر کدام از اجزاء با  $\sum_{i=1}^n P_x$  نشان داده شد و دانسیته حجمی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد که X میتواند نشان دهنده لوله‌ها، لومن و اپیتلیوم آنها، بافت بینابینی و گلوبولوس باشد.

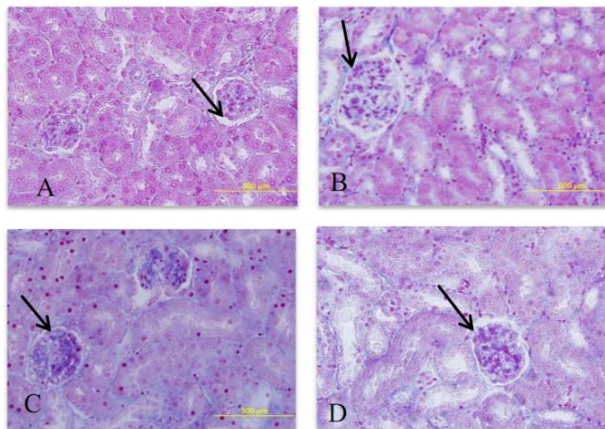
$$Vv_x = \frac{\sum_{i=1}^n P_x}{\sum_{i=1}^n P_{\text{total}}}$$

سپس با استفاده از فرمول زیر حجم لوله‌ها، لومن و اپیتلیوم آنها، بافت بینابینی و یا گلوبولوس به طور جداگانه از طریق ضرب کردن دانسیته حجمی هر کدام در حجم کورتکس محاسبه شد:

$$V_x = V_{\text{cortex}} \times Vv_x$$

که در آن X می تواند نشان دهنده هرکدام از اجزا گلوبولوس یعنی تافت (شبکه مویرگی بین سلول‌های گلوبول)، کاپیلاری (مویرگ‌های سوراخ دار)، کپسول بومن و فضای بومن باشد.

مطالعات پارامترهای بیوشیمیایی به منظور بررسی پارامترهای بیوشیمیایی در هنگام تشریح از قلب موش خونگیری شد و میزان مالون‌دی‌آلدئید، کراتینین، اوره و ظرفیت آنتی اکسیدانی تام سرم خون اندازه‌گیری شد.



شکل ۳ - تصاویر میکروسکوپی از بافت کلیه موش های نر بالغ تیمار شده با نانوذرات نقره (۵۰۰ mg/kg/b.w) و ژل رویال (۳۰۰ mg/kg/b.w).

(برش ۵ میکرونی، رنگ آمیزی هایدن هان آزان، بزرگنمایی ۴۰۰X) نشان دهنده:

- A. گروه کنترل: گلومرولوس با اجزا و ساختار و اندازه‌ی طبیعی (نوک پیکان نشان دهنده فضای بومن) در گروه کنترل.  
 B. گروه نانوذرات نقره: گلومرولوس دچار هایپرتروفی و کاهش فضای بومن در گروه تیمار شده با نانوذرات نقره.  
 C. گروه نانوذرات نقره + ژل رویال: بهبود آسیب گلومرولی و افزایش فضای بومن در گروه تیمار با نانوذرات نقره + ژل رویال.  
 D. گروه ژل رویال: گلومرولوس با ظاهر و اجزا شبیه به گروه کنترل در گروه ژل رویال.

**حجم کل کلیه، کورتکس و مدولا:** از مقایسه حجم کلیه پس از اتمام دوره تیمار تفاوت معنی‌داری بین گروه نانوذرات نقره نسبت به گروه کنترل و نانوذرات نقره + ژل رویال مشاهده نشد در حالی که نسبت به گروه ژل رویال

جدول ۱- مقایسه واریانس حجم کل کلیه، حجم مدولا و حجم کورتکس بر حسب ( $\text{mm}^3$ ) در گروه های مختلف، ۳۵ روز بعد از تیمار نانوذرات نقره (۵۰۰ mg/kg/b.w) و ژل رویال (۳۰۰ mg/kg/b.w). مقادیر به صورت  $\text{mean} \pm \text{SD}$  می باشند. میانگین های با کد حروف مختلف، دارای تفاوت معنی دار نسبت به یکدیگر می باشند ( $P < 0.05$ ) (*one way ANOVA, Tukey, stes*).

گروه ها	حجم کلیه $\text{mm}^3$	حجم کورتکس $\text{mm}^3$	حجم مدولا $\text{mm}^3$
کنترل	$161/75 \pm 3/23^a$	$131/32 \pm 6/09^a$	$30/43 \pm 4/8^a$
نانوذرات نقره	$152/18 \pm 2/93^b$	$126/82 \pm 3/53^a$	$25/33 \pm 2/51^a$
نانوذرات نقره + ژل رویال	$161/13 \pm 5/62^a$	$130/13 \pm 8/14^a$	$31 \pm 4/13^a$
ژل رویال	$168/03 \pm 9/73^a$	$135/8 \pm 14/41^a$	$32/17 \pm 5/71^a$

بین سلول های گلومرول در گروه های مختلف، افزایش معنی‌داری در گروه نانوذرات نقره نسبت به سایر گروه‌ها مشاهده شد (جدول ۲). حجم مویرگ‌های سوراخدار در گروه نانوذرات نقره نسبت به سایر گروه‌ها کاهش معنی‌داری یافت (جدول ۲). میانگین حجم فضای کپسول بومن در گروه نانوذرات نقره نسبت به سایر گروه‌ها کاهش معنی‌داری را نشان داد (جدول ۲).

**حجم جسمک کلیوی، گلومرول و اجزای آن:** حجم جسمک کلیوی در گروه نانوذرات نقره نسبت به سایر گروه‌ها افزایش معنی‌داری را نشان داد (جدول ۲). میانگین حجم کل گلومرولوس در گروه نانوذرات نقره نسبت به گروه کنترل ژل رویال افزایش معنی‌داری نشان داد. اما نسبت به گروه نانوذرات نقره + ژل رویال تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (جدول ۲). از مقایسه حجم شبکه مویرگی

جدول ۲- مقایسه واریانس حجم گلوپولوس (mm<sup>3</sup>)، حجم شبکه مویرگی بین سلول‌های گلوپولوس (mm<sup>3</sup>)، حجم مویرگ‌های سورآخدار (mm<sup>3</sup>)، حجم فضای کپسول بومن (mm<sup>3</sup>) و حجم جسمک کلیوی (mm<sup>3</sup>) در گروه های مختلف موش نر بالغ، ۳۵ روز پس از تیمار نانوذرات نقره (۵۰۰mg/kg/b.w) و ژل رویال (۳۰۰mg/kg/b.w). مقادیر به صورت mean±SD می باشد. میانگین ها با کد حروف مختلف، دارای تفاوت معنی دار نسبت به یکدیگر می باشند (P<۰/۰۵) (testone way ANOVA, Tukey, s).

گروه	حجم گلوپولوس mm <sup>3</sup>	حجم شبکه مویرگی بین سلول‌های گلوپولوس mm <sup>3</sup>	حجم مویرگ‌های سورآخدار mm <sup>3</sup>	حجم فضای کپسول بومن mm <sup>3</sup>	حجم جسمک کلیوی mm <sup>3</sup>
کنترل	۳/۶۱±۰/۹۰ <sup>a</sup>	۲/۰۱±۰/۴۷ <sup>a</sup>	۱/۶۰±۰/۴۹ <sup>a</sup>	۱/۲۹±۰/۳۵ <sup>a</sup>	۵/۶۸±۱/۰۳ <sup>a</sup>
نانوذرات نقره	۴/۷۴±۰/۵۴ <sup>b</sup>	۳/۶۸±۰/۵۲ <sup>b</sup>	۱/۰۳±۰/۰۹ <sup>b</sup>	۰/۶۶±۰/۱۴ <sup>b</sup>	۷/۰۶±۰/۵۱ <sup>b</sup>
نانوذرات نقره + ژل رویال	۳/۷۶±۰/۵۰ <sup>a</sup>	۲/۰۳±۰/۲۵ <sup>a</sup>	۱/۸۰±۰/۳۲ <sup>a</sup>	۱/۱۹±۰/۲۸ <sup>a</sup>	۵/۷۴±۰/۶۵ <sup>a</sup>
ژل رویال	۳/۶۳±۰/۲۶ <sup>a</sup>	۱/۷۸±۰/۲۶ <sup>a</sup>	۱/۷۱±۰/۳۱ <sup>a</sup>	۱/۳۳±۰/۲۸ <sup>a</sup>	۵/۵۶±۰/۸۲ <sup>a</sup>

نسبت به گروه ژل رویال کاهش معنی دار داشت (P<۰/۰۵) (جدول ۳) حجم کل لوله دیستال و همچنین حجم اپیتلیوم و لومن لوله دیستال در بین گروه‌های مختلف اختلاف معنی داری را نشان نداد (جدول ۳). حجم بافت بینابینی در گروه نانو ذرات نقره نسبت به سایر گروه‌ها افزایش معنی داری را نشان داد (جدول ۳).

**حجم لوله پروکسیمال و دیستال و اپیتلیوم و لومن آن‌ها و بافت بینابینی:** از مقایسه حجم کل لوله پروکسیمال و اپیتلیوم آن در گروه‌های مختلف اختلاف معنی داری را مشاهده نشد (جدول ۳). حجم لومن لوله پروکسیمال در گروه نانوذرات نقره نسبت به گروه کنترل و نانو ذرات نقره + ژل رویال اختلاف معنی دار مشاهده نشد، در حالی که

جدول ۳- مقایسه واریانس حجم لوله پروکسیمال به همراه حجم لومن و اپیتلیوم (۳mm) و حجم لوله دیستال به همراه حجم لومن و اپیتلیوم (۳mm) و حجم بافت بینابینی (۳mm) در گروه های مختلف موش نر بالغ ۳۵ روز پس از تیمار نانوذرات نقره (۵۰۰mg/kg/b.w) و ژل رویال (۳۰۰mg/kg/b.w). مقادیر به صورت mean±SD می باشد. میانگین ها با کد حروف مختلف، دارای تفاوت معنی دار نسبت به یکدیگر می باشند.

One way ANOVA, Tukey, s. test, (P<۰/۰۵)

گروه	حجم لوله پروکسیمال (mm <sup>3</sup> )			حجم لوله دیستال (mm <sup>3</sup> )			حجم بافت بینابینی (mm <sup>3</sup> )
	حجم کل (mm <sup>3</sup> )	حجم اپیتلیوم (mm <sup>3</sup> )	حجم لومن (mm <sup>3</sup> )	حجم کل (mm <sup>3</sup> )	حجم اپیتلیوم (mm <sup>3</sup> )	حجم لومن (mm <sup>3</sup> )	
کنترل	۹۴/۷۵±۴/۷۴ <sup>a</sup>	۶۷/۵۹±۴/۱۱ <sup>a</sup>	۲۷/۱۷±۳/۵۰ <sup>a</sup>	۲۳/۸۸±۳/۳۱ <sup>a</sup>	۱۴/۹۹±۱/۸۴ <sup>a</sup>	۸/۰۵±۰/۶۳ <sup>a</sup>	۷/۷۹±۱/۴۹ <sup>a</sup>
نانو ذرات نقره	۸۴/۹۶±۳/۵۱ <sup>a</sup>	۶۲/۷۸±۲/۷۰ <sup>a</sup>	۲۲/۱۸±۱/۱۵ <sup>b</sup>	۲۲/۶۲±۱/۷۱ <sup>a</sup>	۱۴/۱۷±۲/۳۳ <sup>a</sup>	۸/۴۵±۱/۲۷ <sup>a</sup>	۱۰/۷۷±۱/۴۹ <sup>b</sup>
نانوذرات نقره + ژل رویال	۹۲/۷۸±۵/۳۶ <sup>a</sup>	۶۴/۸۳±۵/۹۲ <sup>a</sup>	۲۸/۳۲±۴/۲۴ <sup>a</sup>	۲۰/۵۹±۱/۷۰ <sup>a</sup>	۱۲/۳۲±۱/۰۷ <sup>a</sup>	۸/۲۸±۱/۶۸ <sup>a</sup>	۷/۴۰±۲ <sup>a</sup>
ژل رویال	۹۴/۹۰±۱۰/۴۶ <sup>a</sup>	۶۵/۴۵±۶/۹۶ <sup>a</sup>	۲۹/۰۴±۵/۲۱ <sup>a</sup>	۲۲/۶۱±۲/۶۱ <sup>a</sup>	۱۴/۴۱±۱/۶۱ <sup>a</sup>	۸/۵۴±۱/۴۸ <sup>a</sup>	۷/۱۴±۱/۳۶ <sup>a</sup>

با ژل رویال شاهد بودیم (جدول ۴) مقایسه میزان اوره در گروه‌های مختلف نیز نشان دهنده‌ی افزایش معنی داری در گروه نانوذرات نقره نسبت به سایر گروه‌ها بود و همچنین میزان اوره در گروه نانوذرات نقره + ژل رویال کاهش معنی داری را نسبت به گروه نانوذرات نقره نشان داد

میزان مالون دی آلدئید (MDA)، کراتینین و اوره و ظرفیت آنتی اکسیدانی تام سرم خون: بررسی میزان مالون دی آلدئید سرم در بین گروه‌های مختلف موش افزایش معنی داری را در گروه نانوذرات نقره نسبت به سایر گروه‌ها نشان داد (جدول ۴). همچنین در گروه نانوذرات نقره + ژل رویال افزایش معنی داری را نسبت به گروه تیمار

(جدول ۴). اما از مقایسه میزان کراتینین در گروه های مختلف موش اختلاف معنی داری مشاهده نشد (جدول ۴).

جدول ۴- مقایسه میزان مالون دی آلدئید بر حسب (nmol/ml)، کراتینین و اوره سرم خون بر حسب (mg/dl) در گروه های مختلف موش نر بالغ ۳۵ روز پس از تیمار نانوذرات نقره (۵۰۰ mg/kg/b.w) و ژل رویال (۳۰۰ mg/kg/b.w). مقادیر به صورت mean±SD می باشد. میانگین ها با کد حروف مختلف، دارای تفاوت معنی دار نسبت به یکدیگر می باشند (P < ۰/۰۵) (One way ANOVA, Tukey, s test).

گروه ها	میزان مالون دی آلدئید (nmol/ml)	میزان اوره (mg/dl)	میزان کراتینین (mg/dl)
کنترل	۲/۱۴ ± ۰/۲۱ <sup>a</sup>	۲۵/۶۱ ± ۰/۹۷ <sup>a</sup>	۰/۵۸ ± ۰/۱۱۵ <sup>a</sup>
نانوذرات نقره	۳/۶۶ ± ۰/۴۴ <sup>c</sup>	۲۸/۳۰ ± ۰/۹۰ <sup>b</sup>	۰/۵۴ ± ۰/۰۶ <sup>a</sup>
نانوذرات نقره + ژل رویال	۲/۶۷ ± ۰/۲۹ <sup>b</sup>	۲۴/۱۶ ± ۰/۹۸ <sup>a</sup>	۰/۵۰ ± ۰/۰۵۴ <sup>a</sup>
ژل رویال	۱/۹۹ ± ۰/۵۵ <sup>a</sup>	۲۴/۱۰ ± ۱/۳۸ <sup>a</sup>	۰/۴۷ ± ۰/۰۴۸ <sup>a</sup>

بررسی میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی تام در بین گروه های مختلف موش بدین گونه بود که کاهش معنی داری در گروه تیمار با نانوذرات نقره نسبت به گروه کنترل مشاهده شد و در گروه تیمار نانوذرات نقره + ژل رویال ظرفیت آنتی اکسیدانی تام افزایش معنی داری نسبت به گروه تیمار شده با نانوذرات نقره داشت و ژل رویال توانسته بود این پارامترها را جبران و به حد گروه کنترل برساند (جدول ۵).

جدول ۵- مقایسه میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی تام بر حسب (nmol/ml)، در گروه های مختلف موش نر بالغ ۳۵ روز پس از تیمار نانوذرات نقره (۵۰۰ mg/kg/b.w) و ژل رویال (۳۰۰ mg/kg/b.w). مقادیر به صورت mean±SD می باشد. میانگین ها با کد حروف مختلف، دارای تفاوت معنی دار نسبت به یکدیگر می باشند (P < ۰/۰۵) (one way ANOVA, Tukey, s test).

گروه ها	میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی تام (nmol/ml)
کنترل	۰/۵۶ ± ۰/۰۴۵ <sup>a</sup>
نانوذرات نقره	۰/۳۵ ± ۰/۰۱ <sup>b</sup>
نانوذرات نقره + ژل رویال	۰/۴۲ ± ۰/۰۳۲ <sup>c</sup>
ژل رویال	۰/۵۴ ± ۰/۰۳۱ <sup>a</sup>

وزن موش و کلیه: میانگین وزن موش قبل از شروع تیمار در بین گروه ها اختلاف معنی داری نداشت. از مقایسه وزن موش پس از اتمام دوره تیمار در بین گروه های مختلف اختلاف معنی داری مشاهده نشد. از مقایسه میانگین وزن کلیه پس از اتمام دوره تیمار در بین گروه های مختلف اختلاف معنی داری مشاهده نشد (جدول ۶).

جدول ۶- مقایسه واریانس وزن موش (گرم) و وزن کلیه (میلی گرم) در گروه های مختلف موش نر بالغ ۳۵ روز پس از تیمار نانوذرات نقره (۵۰۰ mg/kg/b.w) و ژل رویال (۳۰۰ mg/kg/b.w). مقادیر به صورت mean±SD می باشد. میانگین ها با کد حروف مختلف، دارای تفاوت معنی دار نسبت به یکدیگر می باشند (P < ۰/۰۵) (one way ANOVA, Tukey, s test).

گروه ها	میانگین وزن موش در		میانگین وزن کلیه موش
	دوره تیمار (gr)	پایان دوره تیمار (gr)	(mgr)
کنترل	۳۶/۵۲ ± ۱/۷۲ <sup>a</sup>	۳۶/۴۲ ± ۱/۷۷ <sup>a</sup>	۰/۲۷ ± ۰/۰۲۴ <sup>a</sup>
نانوذرات نقره	۳۷/۳۸ ± ۲/۰۷ <sup>a</sup>	۳۵/۳۳ ± ۲/۰۷ <sup>a</sup>	۰/۲۶ ± ۰/۰۳۹ <sup>a</sup>
نانوذرات نقره + ژل رویال	۳۵/۵۳ ± ۲/۱۸ <sup>a</sup>	۳۶/۳۵ ± ۲/۹۹ <sup>a</sup>	۰/۲۶ ± ۰/۰۴۷ <sup>a</sup>
ژل رویال	۳۶/۳۲ ± ۲/۳۶ <sup>a</sup>	۳۷/۲۵ ± ۲/۰۷ <sup>a</sup>	۰/۲۶ ± ۰/۰۱۹ <sup>a</sup>



## بحث

می باشد در ضمن اختلالات بافتی در کلیه می تواند بیانگر اثر سمی نانوذرات نقره در مدت زمان آزمایش با غلظت های فوق باشد (۳۶).

مطالعات متعدد نشان داده است که نانوذرات نقره از طریق مکانیسم های مختلف باعث سمیت در سلول می شوند از جمله: تولید ROS، تعامل با آنزیم های درون سلولی، تقلید از یون های اندروژن، انتشار یون های نقره (۳۸).

به نظر می رسد سمیت نانوذرات نقره در درجه اول با افزایش داخل سلولی سطح گونه های اکسیژن فعال (ROS) است. ROS شامل رادیکال های حاوی اکسیژن مانند سوپراکسید ( $O_2^-$ )، پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ )، هیدروکسیل (OH) یا رادیکال های نیتروکسیل (NO) و محصولات جانبی، به عنوان مثال، آلكوكسیل (RO) می باشد. افزایش سطح ROS ناشی از نانوذرات نقره ممکن است دلیلی برای موارد مشاهده شده آسیب سلولی و آپوپتوز باشد. تولید ROS و استرس اکسیداتیو ممکن است ناشی از ویژگی کاتالیزوری نانوذرات نقره باشد، در اثر اختلال در عملکرد میتوکندری به وسیله نانوذرات نقره ایجاد شود یا ترکیبی از هر دو مکانیسم آن را تشکیل دهد (۳۸).

ROS قادر است با پروتئین، چربی و اسید نوکلئیک واکنش دهد، منجر به پراکسیداسیون لیپیدی در غشاهای زیستی شود که منجر به اثرات فرایندهای آنزیمی از جمله فعالیت های پمپ یونی و خسارت DNA و در نتیجه مهار رونویسی و تعمیر شود. در نتیجه پراکسیداسیون لیپیدی اسیدهای چرب غیراشباع در غشای زیستی از بین رفته و منجر به تخریب غشا سلول می شود. که می تواند از دلایل کاهش حجم سلول ها و در نهایت کاهش حجم کلیه باشد (۱۲).

از آنجایی که دفع مواد زائد حاصل از سوخت و ساز (متابولیسم) به طور عمده توسط پالایش و ترشح از موئنه های گلوبمرولی صورت می گیرد، محاسبه ی حجم گلوبمرول ها که به طور غیر مستقیم نشان دهنده ی سطح

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد نانو ذرات نقره باعث کاهش حجم کلیه، افزایش حجم گلوبمرول، جسمک کلیوی، شبکه مویرگی بین سلول های گلوبمرول، حجم فضای بینابینی و کاهش حجم فضای بومن و مویرگ های سوراخدار و کاهش حجم لومن در لوله پروکسیمال و افزایش مالون دی آلدئید سرم و اوره سرم و کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی تام سرم خون شد. نانوذرات به علت اندازه فوق العاده کوچک خود به نظر می رسد با مشکل چندانی برای عبور از سدهای فیزیولوژیکی درون بدن مواجه نیستند و بنابراین به طور موثر از طریق جریان سیستم عروقی در بافت های بدن توزیع می گردند (۷). بسیاری از مطالعات نشان می دهند که نقره آزاد شده از نانو نقره در اکثر بافت ها از جمله کبد، کلیه، شش ها، طحال، مغز و خون توزیع می گردد. در سطح سلولی، نانوذرات نقره می تواند در غلظت های بالا باعث سمیت سلولی آشکار، از جمله اختلالات در مورفولوژی سلولی، افزایش نفوذپذیری غشاء، کاهش قابل توجه رشد سلول و حتی مرگ سلول شود (۱۶). نتایج نشان داد که در بین تمام مواد بررسی شده، نانو ذرات نقره با تظاهراتی مانند کاهش شدید عملکرد میتوکندری، افزایش نشت غشاء، نکروز و القاء آپوپتوز از سمی ترین نانو ذرات بودند (۲۸).

در مطالعه سیدعلیپور و همکاران اثر نانوذرات در غلظت های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم به طور یک روز در میان به مدت ۱۷ روز به صورت درون صفاقی بر روی کلیه موش باردار نژاد *NMRI*، طیف وسیعی از آسیب های پاتولوژی شامل: پرخونی، نکروز، اینفیلتریشن سلول های آماسی، دژنراسانس واکوئولی و کست هیالین (وجود ترکیبات پروتئینی در لومن یا وسط لوله های ادراری، عدم فیلتراسیون صحیح و دفع پروتئین) را نشان داد. این یافته ها نشان دهنده عبور نانوذرات از غشای سلولی مختلف، ورود آن به جریان خون و در نهایت ورود به کلیه

حجم شبکه مویرگی بین سول‌های گلومرول (تافت) و در نتیجه تورم و افزایش حجم گلومرول، همچنین ضخیم شدن غشای گلومرول توسط نانوذرات نقره باشد (۱۴ و ۴۰). مطالعات *in vitro* نشان داده است که نانوذرات احتمالاً توسط فاگوسیتوز یا انتشار غیرفعال از طریق غشای سلول قادر به ورود به سلول هستند. هنگامی که وارد سیتوپلاسم سلول می‌شود، نانوذرات نقره در وزیکول‌های داخل سلولی ظاهر می‌شوند و توانایی ورود به اندامک‌هایی مانند میتوکندری و هسته را دارند (۳۵). در این تحقیق حجم کاپیلاری (مویرگ های سوراخدار) کاهش یافت که می‌تواند به علت رسوب نانوذرات نقره و نکروز و آپوپتوز سلول‌های آندوتلیالی بر اثر استرس اکسیداتیو باشد. همچنین کاهش در حجم فضای بومن می‌تواند ناشی از تورم در سلول‌های موجود در سلول‌های موجود در کپسول بومن و افزایش حجم حجم شبکه مویرگی بین سول‌های گلومرول (تافت) باشد.

مطالعات رده‌های سلولی مختلف پستانداران، نشان داده است که نانو نقره فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و پراکسیداسیون لیپیدها را تغییر می‌دهد. تشریح سیتوکین‌های التهابی و بیان ژن‌های پاسخ دهنده به استرس را افزایش می‌دهد (۳۸). در این مطالعه کاهش فضای لومن لوله پروکسیمال می‌تواند به دلیل تورم سلول‌های پوششی دیواره لوله پروکسیمال باشد که در نتیجه اثرات تخریبی نانوذرات نقره بر لوله‌ها و نکروز و آپوپتوز حاشیه مسواکی سلول‌های اپیتلیومی لوله پروکسیمال به وجود آمده است. با افزایش غلظت نانوذرات نقره در بافت‌های در معرض نانوذرات نقره تجمع سلول‌های آماسی، پرخونی و نکروز دیده می‌شود. لذا می‌توان افزایش حجم بافت بینابینی در گروه تیمار با نانوذرات نقره را نتیجه‌ی وجود سلول‌های آماسی و التهاب ایجاد شده توسط ROS در اثر وجود نانوذرات نقره دانست. در این تحقیق مالون‌دی‌آلدئید سرم در گروه نانوذرات نقره افزایش یافت. پراکسیداسیون

پالایش کننده است از اهمیت زیادی برخوردار است، بدین جهت تعیین تفاوت حجم کل گلومرول‌ها به عنوان شاخصی از سطح کل پالایش گلومرولی در نظر گرفته می‌شود (۲). افزایش حجم در گلومرول‌ها به عنوان نماینده‌ی واحدهای ساختمانی و عملکردی کلیه، می‌تواند به منظور جبران عملکرد گلومرول‌های از دست رفته، و از سوی دیگر به منظور تطابق با شرایط جدید و دفع مواد سمی از بدن صورت گرفته باشد (۱۹). نانوذرات نقره ممکن است با آنزیم‌های درون سلولی تعامل کنند. از آنجایی که یون‌های نقره شباهت زیادی به گروه‌های تیول آزاد نشان می‌دهد، اتصال به گروه تیول می‌تواند منجر به آسیب و غیرفعال کردن پروتئین‌ها و آنزیم‌ها شود و بنابراین به آسیب سلولی منجر شود، علاوه بر این، یون‌های نقره به مولکول‌های DNA به ویژه به بازهای پورین و پیریمیدین متصل می‌شود و باعث اختلال در چرخه‌ی تکثیر سلول و تخریب می‌شود (۳۸).

استرس اکسیداتیو از طریق چند سازوکار در ایجاد آسیب کلیوی نقش دارد. استرس اکسیداتیو اولاً از طریق افزایش بیان ژن فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) پودوسیت‌ها، سلول‌های اندوتلیال و سلول‌های مزانژیال کلیه سبب افزایش نفوذپذیری گلومرولی و دفع پروتئین از طریق ادرار می‌شود ثانیاً، باعث افزایش بیان ژن فاکتورهای رشد مختلف از جمله فاکتور رشد تبدیل کننده (TGF- $\beta$ )، فاکتور رشد بافت همبند (CTGF) و فاکتور رشد مشتق از پلاکت‌ها (PDGF) در سلول‌های اندوتلیال گلومرولی، سلول‌های مزانژیال، سلول‌های توبولار، پروکسیمال، فیبروبلاست‌ها و ماکروفاژها می‌شود (۱۴). این فاکتورهای رشد سبب افزایش بیان ژن پروتئین‌های کلاژن ماکروفاژها می‌شود. این فاکتورهای رشد سبب افزایش بیان ژن پروتئین‌های کلاژن نوع I، III، IV، V، VI، لامینین و فیبرونکتین می‌شوند و به این ترتیب باعث افزایش ماتریکس خارج سلولی و ضخیم شدن غشای پایه‌ی گلومرولی می‌شوند. این اختلال می‌تواند دلیل افزایش

درمان با ژل رویال در کلیه‌ی موش‌های دیابتی افزایش یافت (۱۵).

در این مطالعه تیمار هم‌زمان ژل رویال + نانو ذرات نقره در گروه تیمار ژل رویال + نانوذرات نقره توانست تأثیر منفی نانوذرات نقره در کلیه را کاهش و به حد طبیعی و به گروه کنترل نزدیک نماید. ژل رویال واجد گستره عظیمی از کارکردهای دارویی مانند ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانت، ضدآماسی، ضد میکروبی، ضد آلرژی و ضد توموری و اثرات حفاظتی بر روی دستگاه‌های ایمنی، تولید مثلی و عصبی می‌باشد (۵). ژل رویال متشکل از آب، شکر، چربی، پروتئین می‌باشد و غنی از مواد معدنی، هورمون‌های طبیعی، ویتامین B، اسید چرب، اسید مولیک همراه با اسید آسپارتیک است که برای ترمیم بافت و رشد، حائز اهمیت می‌باشد. ژل رویال سبب کاهش فشار خون و افزایش نرخ رشد شده و با دارا بودن مواد ضد عفونی کننده و فعالیت‌های ضد توموری، خاصیت ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی دارد. از جمله اسیدهای چرب غیر اشباع موجود در ژل رویال می‌توان به ۱۰ هیدروکسی ۲ دکونئیک اسید (HDA-۱۰) اشاره نمود که تنها در طبیعت ژل رویال دیده شده و خواص اعجاب انگیزی را در بردارد. نشان داده شده است که عملکرد پروتئین‌های ژل رویال فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی داشته و این پروتئین‌ها توانایی مهار رادیکال‌های آزاد را دارند (۴). اسیدهای ترانس ۱۰ هیدروکسی-۲ دکونئیک اسید (HDA-۱۰) و سباسیک اسید (SEA) سه اسید چرب در ژل رویال می‌باشد که (HDA-۱۰) بیشترین مقدار (حدود ۵۰ درصد) را تشکیل می‌دهد. این سه فاکتور پروتئین‌های متعددی درگیر در مسیرهای سیگنالینگ MAPK و NF-κB تنظیم می‌کنند و (HDA-۱۰) قویترین اثر ضد التهابی در شرایط *invitro* را دارد (۱۲). ژل رویال دارای ترکیبات فلاونوئیدی، فنلی و اسیدهای آمینه آزاد می‌باشد. ژل رویال نه تنها می‌تواند موجب مهار رادیکال‌های آزاد شود، بلکه با اثر غیرمستقیم دیگری سبب

لیپیدها منجر به کاهش سیالیت غشاء و از بین رفتن ساختمان و عملکرد آن می‌شوند که در پاتوژنز بسیاری از بیماری‌ها دخالت دارد. محصول نهایی ناشی از پر اکسیداسیون لیپیدها، مالون دی آلدئید (MDA=Malondialdehyde) می‌باشد. حضور MDA به عنوان شاخصی از آسیب‌های رادیکال‌های آزاد می‌باشد (۲۳ و ۲۷). در این مطالعه میزان اوره سرم خون در گروه تیمار با نانو ذرات نقره افزایش نشان داد اما در میزان کراتینین تغییری مشاهده نشد. طبق تحقیقاتی که احمد و همکارانش در سال ۲۰۰۲ انجام دادند، با توجه به اینکه نیتروژن به طور طبیعی از خون به نفرون‌ها وارد می‌شوند و نزدیک به ۹۰ درصد اوره توسط کلیه دفع می‌شود (مسیر دفع عمده اوره بدن، کلیه است)، نشان دادند هنگامی که سلول‌های نفرون و کاپیلاری (مویرگ‌های سوراخدار) آسیب ببینند ورود نیتروژن به سرم اتفاق می‌افتد و اوره خون افزایش می‌یابد، لذا هرگونه اختلالی در عملکرد کلیه‌ها منجر به افزایش غلظت اوره در خون می‌شود. در شرایط عادی، مکانیسم‌های سم‌زدایی آنزیمی و غیر آنزیمی (به عنوان مثال، گلوکاتینون (GSH)، سوپر اکسید دسموتاز (SOD) و پراکسیدهای مانند کاتالاز) ممکن است به آسیب اکسیداتیو لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA منجر شود، ROS همچنین نقش خود را در عملکرد سلول حفظ کند، و می‌تواند به عنوان پیام بر شیمیایی در مسیرهای سلولی عمل کند (۱). در این بررسی میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام سرم در گروه تیمار هم‌زمان نانو ذرات نقره + ژل رویال و گروه تیمار با ژل رویال افزایش معنی‌دار نسبت به گروه تیمار نانوذرات نقره را نشان داد. در مطالعه قنبری و همکاران اثر محافظتی ژل رویال در برابر آسیب کلیه در موش‌های دیابتی ناشی از استرپتوزوتوسین، موش‌های نر صحرایی نژاد ویستار (با وزن  $200 \pm 10$ ) در گروه دیابتی تحت درمان با ژل رویال به میزان  $100 \text{ mg/kg}$  به صورت خوراکی روزانه و دیابت ناشی از تزریق داخل صفاقی استرپتوزوتوسین به مدت ۴۲ روز انجام شد. مشاهده شد ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام تحت

### نتیجه گیری

نتایج این مطالعه به روشنی نشان داد نانوذرات نقره موجب آسیب اکسیداتیو در کلیه می شود و ژل رویال به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی آسیب های وارده ناشی از نانوذرات نقره در بافت کلیه را کاهش می دهد. این حفاظت می تواند به دلیل وجود ترکیبات سرکوب کننده پراکسیداسیون لیپیدی و تولید رادیکال آزاد و همچنین اثر ضد التهابی آن باشد.

### تشکر و قدردانی

بدینوسیله مراتب سپاس خود را از معاونت محترم پژوهش و مرکز تحقیقات آزمایشگاه زیست شناسی دانشگاه اراک و کلیه عزیزانی که مرا در این مطالعه یاری نمودند ابراز می دارم.

مهار آنزیم های کاتالیز کننده پراکسیداسیون لیپیدی اندروژن ها و همچنین بیان ژن سیتوکروم *p450* می شود (۳۱). فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات فنلی عمدتاً به دلیل خواص بازسازی آن هاست که نقش مهمی در جذب و خنثی سازی رادیکال های آزاد دارند. ترکیبات فنلی از مهم ترین گروه های ترکیبات گیاهی هستند. همچنین از محصولات متابولیسم ثانویه گیاهان نیز می باشند که دارای فعالیت ضد التهابی اند (۸).

ژل رویال دارای خواص بازسازی و جذب و خنثی سازی رادیکال های آزاد می باشد در نتیجه موجب کاهش التهاب، تورم سلولی و استرس اکسیداتیو می شود. بنابراین در گروه ژل رویال + نانوذرات نقره حجم گلو مریولوس کاهش یافته و حجم مویرگ های سوراخدار نزدیک به گروه کنترل می شود.

### منابع

- Ahamed, M., and Siddiqui, M. K., 2007. Low level lead exposure and oxidative stress: current opinions, *Clinica chimica acta*, 383, (1-2), PP: 57-64.
- Akilesh, S., 2014. Normal Kidney Function and Structure. University of Washington, Seattle, WA, USA, PP: 2716-2733.
- Almansour, M., Jarrar, Q., Battah, A., and Jarrar, B., 2015. Morphometric alterations induced by the toxicity of variable sizes of silver nanoparticles. *International Journal of Morphology*, 33(2), PP: 544-552.
- Amirshahi, T., Nejati, V., and Najafi, G. H. R., 2013. Biochemical and Histological Evaluation of Protective Effect of Royal Jelly on Pancreas-Induced Oxidative Stress in Male Rat Pancreas, *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, 23 (107), PP: 107-115.
- Anbara, H., Shalizar Jalali, A., SHarouz, R., and Razi, M., 2016. Protective effect of royal jelly against phenylhydrazine-induced histological injuries of small intestine of mice :Morphometric analyses, *Qom University of Medical Sciences Journal*, 9(11), PP: 12-21.
- Anbara, H., Shahrooz, R., Razi, M., and Malekinejad, H., 2015. Study of the protective effect of co-administrating of vitamin C and royal jelly on sperm quality and serum parameters in mice (NMRI) following Phenylhydrazine induced hemolytic anemia. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*, 17(5), PP: 110-120.
- Asare, N., Instanes, C., Sandberg, W. J., Refsnes, M., Schwarze, P., Kruszewski, M., and Brunborg, G., 2012. Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells. *Toxicology*, 291(1-3), PP: 65-72.
- Balkanska, R., Marghitas, L. A., and Pavel, C. I., 2017. Antioxidant Activity and Total Polyphenol Content of Royal Jelly from Bulgaria, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(10), PP: 578-585.
- Benzie, I. F., and Strain, J. J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay, *Analytical biochemistry*, 239(1), PP: 70-76.
- Buege, J. A., and Aust, S. D., 1978. Microsomal lipid peroxidation, *Methods in enzymology*, 52, PP: 302-310.
- Carlos, A., and Mandarim-de, L., 2003. Stereological tools in biomedical research, *Anais da Academia brasileira de Ciências*, 75(4), PP: 469-486.

- 12- Chen, Y. F., Wang, K., Zhang, Y. Z., Zheng, Y. F., and Hu FL. 2016. In vitro anti-inflammatory effects of three fatty acids from royal jelly, *Mediators of Inflammation*, 2016, PP: 1-11.
- 13- Esterbauer, H., and Cheeseman, K. H., 1990. (42) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. In *Methods in enzymology*, Academic Press, 186, PP: 407-421.
- 14- Forbes, J. M., Cooper, M. E., Oldfield, M. D., and Thomas, M. C., 2003. Role of advanced glycation end products in diabetic nephropathy, *Journal of the American Society of Nephrology*, 14(suppl 3), PP: S254-S258.
- 15- Ghanbari, E., Nejati, V., and Azadbakht, M., 2015. Protective Effect of Royal Jelly against Renal Damage in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Iranian Journal of Toxicology*, 9(28), PP: 1258-1263.
- 16- Habibian, S., Shadnoush, S. H., Arabi, M., and Saffar, B., 2013. Evaluation of cell toxicity and protein expression induced by silver nanoparticles in sperm and testicles of rats. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences*, 15(4), PP: 26-34.
- 17- Hashimoto, M., Kanda, M., Ikeno, K., Hayashi, Y., Nakamura, T., and Ogawa, Y., et al., 2005. Oral administration of royal jelly facilitates mRNA expression of glial cell line-derived neurotrophic factor and neurofilament H in the hippocampus of the adult mouse brain. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 69(4), PP: 800-805.
- 18- Hattori, N., Nomoto, H., Fukumitsu, H., Mishima, S., and Furukawa, S. H., 2007. Royal Jelly-induced neurite outgrowth from rat pheochromocytoma PC12 cell requires integrin signal independent of activation of extracellular signal-regulated kinases, *Biomed Res*, 28 (3), PP: 139-46.
- 19- Heidari, Z., Mahmoudzadeh Sagheb, H. R., Dezfoulian, A. R., Barbarestani, M., and Noori, S. M. H., 2002. A Stereological Analysis of Renal Glomeruli following Chronic Lead Intoxication in rat During A Continuous Period Of 8 Weeks, *Acta medica Iranica*, 40(2), PP: 73-78.
- 20- Hosseini, S., Ghrachorlo, M., Ghayy tari, B., and Qavami, M., 2014. A review of oxidative determination methods, *Food Technology and Nutrition*, 11(4), PP: 89-111.
- 21- Hoseini, L., Roozbeh, J., Sagheb, M., Karbalay-Doust, S., and Noorafshan, A., 2009. Nandrolone decanoate increases the volume but not the length of the proximal and distal convoluted tubules of the mouse kidney. *Micron*, 40(2), PP: 226-230.
- 22- Howard, V., and Reed, M., 2004. Unbiased stereology, three-dimensional measurement in microscopy, *Medical Science*, 22(95), PP: 10.
- 23- Jafarzadeh Samani, R., Heydarnejad, M. S., and Kabiri Samani, M., 2015. A survey of acute histopathological effects of silver nanoparticles on liver, kidney with blood cells during oral administration in male mice (*Mus musculus*), *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences*, 17(4), PP: 97-107.
- 24- Kamali, M., Rostami, A. A., and Mohseni Kouheshfahani, H., 2015. Cytotoxicity of nanoparticles in the environment *Invitro*, *New Cellular Biotechnology*, 3(12), PP: 65-72.
- 25- Kanbur, M., Eraslan, G., Silici, S., and Karabacak, M., 2009. Effects of sodium fluoride exposure on some biochemical parameters in mice, Evaluation of the ameliorative effect of royal jelly applications on these parameters, *Food and Chemical Toxicology*, 47(6), PP: 1184-1189.
- 26- Karadeniz, A., Simsek, N., Karakus, E., Yildirim, S., Kara, A., and Can, I., et al., 2011. Royal jelly modulates oxidative stress and apoptosis in liver and kidneys of rats treated with cisplatin, *Oxidative medicine and cellular longevity*, Vol 2011, PP: 1-10.
- 27- Karam Sichani, S., Naghsh, N., and Razm, N., 2012. Effects of Alcoholic Extract of *Peganumharmala*, L., on Malondialdehyde Concentration and Catalase and Glutathione Peroxidase Activity in Mice Treated with Nanosilver Particles, *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, 22(95), PP: 10-7.
- 28- Karimi, E., Sadeghi, A., and Makhdoumi, M. A., 2012. Nanotechnology: Features, uses and bio-safety, *Jornal of bio safety*, 5(2), PP: 57 -74.
- 29- Kim, Y. S., Song, M.Y., Park, J. D., Song, K.S., Ryu, H. R., Chung, Y. H., and Chang, H. K., et al., 2010. Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. *Particle and Fibre Toxicology*, 7(20), PP: 1-11.
- 30- Khalili, M., and Ebrahimzadeh, M. A., 2015. A Review on Antioxidants and Some of their Common Evaluation Methods, *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, 24(120), PP: 188-208.

- 31- Kocot, J., Kielczykowska, M., Luchowska-Kocot, D., Kurzepa, J., and Musik, I., 2018. Antioxidant Potential of Propolis, Bee Pollen, and Royal Jelly: Possible Medical Application. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018, PP: 1-29.
- 32- Murmu, S., and Shrivastava, V. K., 2011. Protective Action of an Anti-oxidant (Vitamin-C) against Bisphenol-toxicity in *Cirrhinus mrigala* (Ham), *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 11(1), PP: 25-29.
- 33- Pavel, C. I., Mărghitaș, L. A., Bobiș, O., Dezmirean, D. S., Șapcaliu, A., Radoi, I., and Mădaș, M. N., 2011. Biological activities of royal jelly-review. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, 44(2), PP: 108-118.
- 34- Rahi, A., Sattarahmady, N., and Heli, H., 2015. Toxicity of nanomaterials-physicochemical effects, *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*, 22(6), PP: 1737-1754.
- 35- Sardari, R. R. R., Zarchi, S. R., Talebi, A., Nasri, S., Imani, S., Khoradmehr, A., and Sheshde, S. A. R., 2012. Toxicological effects of silver nanoparticles in rats, *African Journal of Microbiology Research*, 6(27), PP: 5587-5593.
- 36- Seyedalipour, B., Arefifar, A., Khanbabaee, R., and Hosseini, S. M., 2015. Cytotoxic assessment of silver nanoparticles in embryonic development and kidney tissue in pregnant mice, *Journal of Birjand University of Medical Sciences*, 22 (3), PP: 218-228.
- 37- Soleimani, F., Nabipour, I., Faraji Ghasemi, F., and Doberadaran, S., 2015. Effects of Nanoparticles on Human and Environment, A Review on Toxicity, Exposure, ways to control risks and future prospects, *South Medical Journal (ISMJ)*, 18(3), PP: 630-663.
- 38- Völker, C., Oetken, M., and Oehlmann, J., 2013. The biological effects and possible modes of action of nanosilver. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 223*, Springer New York, PP: 81-106.
- 39- Wang, Z., Xia, T., and Liu, S., 2015. Mechanisms of nanosilver-induced toxicological effects: more attention should be paid to its sublethal effects, *Nanoscale*, Author manuscript, 7 (17), PP: 7470-7481.
- 40- Yamagishi, S. I., and Imaizumi, T., 2005. Diabetic vascular complications, pathophysiology, biochemical basis and potential therapeutic strategy, *Current pharmaceutical design*, 11(18), PP: 2279-2299.
- 41- Yarmohammadi Samani, P., Arabi, M., and Yarmohammadi Samani, P., 2015. Investigation of the absorption of nanosilver particles on functional parameters Kidney in mice, *South Medical Journal (ISMJ)*, 18(2), PP: 260-269.
- 42- Zarban, A., Malekaneh, M., Hassanpour, M., Najari, M., Mohsen Abad, T., 2004. Evaluation of antioxidant properties of 28 Iranian herbs. *Journal of Birjand University of Medical Sciences*, 11(1), PP: 5-13.

## **Stereological study on the protective effect of royal jelly on kidney tissue following silver nanoparticles – induced toxicity in the NMRI mouse**

**Shariatzadeh S.M.A. and Goudarzi M.**

**Dept. of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, I.R. of Iran**

### **Abstract**

**Introduction:** Increasing the use of silver particles in consumer products may have beneficial or detrimental effects on the structure of the human body and living organisms. It has homeostasis. The aim of this study was to investigate the effect of royal jelly on the tissue of all mice following the toxicity of silver nanoparticles. **Materials and Methods:** 24 adult NMRI mice were divided into 4 groups: control, silver nanoparticles (500 mg /Kg/day, gavage), royal jelly (300 mg /Kg/day, gavage) and silver nanoparticles with royal gel and treated for 35 days. Kidney tissue was evaluated by stereologic methods. Biochemical parameters of malondialdehyde, urea, creatinine and total antioxidant activity were analyzed by FRAP method. Data were analyzed by one-way ANOVA and Tukey tests and the difference was considered significant ( $P < 0.05$ ). **Results:** In the treatment with silver nanoparticles, there was a significant increase in the mean total renal body volume and a significant decrease in total volume of Bowman capsule space compared to the control group ( $P < 0.05$ ). Comparison with control showed. However, antioxidant levels (FRAP) decreased significantly. Most of the kidney damage induced by silver nanoparticles in the group (nano + royal jelly) was improved in the control group. **Conclusion:** According to this study, Royal jelly can protect the kidneys from the damage of silver nanoparticles.

**Key words:** Stereology, Royal Jelly, Kidney, NMRI Mouse, Silver nanoparticles