

ارزیابی اثر حفاظتی روغن سیاه‌دانه بر بافت کبد موش‌های نر NMRI متعاقب سمیت نانو ذرات نقره

سید محمدعلی شریعت زاده*، فاطمه مقدمی و پریسا مالکی

ایران، اراک، دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۸/۵/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۸/۹/۲۶

چکیده

با وجود استفاده گسترده از نانو ذرات نقره نگرانی‌هایی در مورد اثرات بیولوژیک آن‌ها بر روی سلامت انسان وجود دارد. هدف از این مطالعه بررسی اثر روغن سیاه‌دانه بر بافت کبد موش در پی سمیت نانو ذرات نقره بود. ۲۴ سر موش نر بالغ نژاد NMRI به چهار گروه کنترل، نانو ذرات نقره (۵۰۰ mg/kg/day، گاواژ)، روغن سیاه‌دانه (۵ ml/kg/day، گاواژ) و در نهایت نانو ذرات نقره به علاوه روغن سیاه‌دانه تقسیم و به مدت ۳۵ روز تیمار شد. ارزیابی بافتی کبد با استفاده از روش‌های استریولوژیک انجام شد. سطوح سرمی آلانین آمینو ترانسفراز (ALT)، آسپارات آمینو ترانسفراز (AST) و مالون دی‌آلدئید (MDA) نیز اندازه‌گیری شد. داده‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه تجزیه و تحلیل آماری شد و تفاوت میانگین‌ها در حد $(P < 0/05)$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. کاهش معنی‌داری در میانگین وزن نسبی کبد، حجم کل ورید مرکزی، حجم کل شریان، بافت همبند و ورید دستگاه پورتال و افزایش معنی‌داری در حجم کل سینوزوئیدها، مجرای صفراوی، حجم سلول هپاتوسیت و سطوح MDA و آنزیم‌های ALT و AST در گروه نانو ذرات نقره نسبت به گروه کنترل مشاهده شد $(P < 0/05)$. اکثر آسیب‌های کبدی القاشده توسط نانو ذرات نقره، در گروه نانو ذرات نقره + سیاه‌دانه در حد گروه کنترل بهبود یافت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که روغن سیاه‌دانه می‌تواند کبد را از آسیب نانو ذرات نقره محافظت کند.

واژه‌های کلیدی: نانو ذرات نقره، روغن سیاه‌دانه، موش، کبد، استریولوژی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۸۶۳)۴۱۷۲۴۰۱، پست الکترونیکی: S-Shariatzadeh@araku.ac.ir

مقدمه

مخصوصاً پرکردن دندان و پروتزهای دندانی، کاربرد در وسایل جراحی و پروتزهای استخوانی، مواد و ابزار جلوگیری کننده از آبستنی، مواد ضد عفونی کننده و شوینده و درمان بیماری‌های عفونی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها از موارد دیگر استفاده از این ذرات در پزشکی می‌باشند (۴ و ۱۷). در صنایع غذایی نیز برای بسته بندی مواد غذایی، جهت حفاظت از مواد غذایی و برای افزایش ماندگاری و ذخیره مواد غذایی کاربرد دارند (۴، ۱۳ و ۲۹). نقره در ابعاد نانو دسترسی بیشتری به بافت‌ها، سلول‌ها و مولکول‌های بیولوژیک در بدن موجودات زنده دارد (۵) و استفاده وسیع

پیشرفت سریع نانو تکنولوژی و تنوع کاربردهای آن موجب شده است که مواد با ابعاد نانو بطور وسیعی مورد استفاده قرار گیرند. نانو ذرات نقره در بین نانو ذرات مختلف بیشترین مصرف را دارند، بطوریکه ۳۰ درصد محصولات حاوی نانو مواد دارای نانو ذرات نقره هستند (۲۹). امروزه نانو ذرات نقره به دلیل خصوصیات بیولوژیکی خاص در جنبه‌های مختلف زندگی کاربردهای متفاوتی دارند (۴). به‌عنوان مثال در پزشکی برای ترمیم سوختگی و زخم‌ها، بانداژهای آغشته به نانو ذرات نقره بسیار خوب عمل می‌کنند. استفاده در ابزار و ادوات دندانپزشکی و مواد

۲۱ درجه سانتی‌گراد و نور محیطی با شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی) و دسترسی آزاد به آب و غذا جهت سازگاری با محیط به مدت ۲ هفته نگهداری شد. موش‌های نر به ۴ گروه (n=۶) ترتیب زیر تقسیم شدند: کنترل، نانو ذرات نقره (۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، عصاره سیاه‌دانه (۵ میلی‌لیتر بر کیلوگرم) و نانو ذرات نقره + عصاره سیاه‌دانه.

روش تهیه روغن سیاه‌دانه: دانه‌های سیاه‌دانه، که نمونه‌ای از آن در هر باریوم گروه فارماکوکونوزی مرکز تحقیقات گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی نگهداری می‌شود، تهیه گردید و سپس در هاون چینی آسیاب شد و دانه‌های آسیاب شده با مقدار مناسبی از اتانول در دستگاه عصاره‌گیری (سوکسیله) قرارگرفت و حرارت‌دهی و استخراج ادامه یافت تا حلال کاملاً تبخیر شود. در مرحله بعد رطوبت عصاره با استفاده از سدیم سولفات بدون آب (Na₂SO₄) حذف شد و روغن حاصل وزن و در یک ظرف تاریک نگهداری و درصد روغن استخراج‌شده توسط معادله زیر محاسبه شد.

$$\times 100 (\text{وزن روغن / وزن نمونه}) = \text{درصد روغن}$$

استخراج‌شده

روغن گیاه (به صورت متیل‌استر اسیدهای چرب) با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی و ردیاب FID و نوع ستون SGE-BX70 (به طول ۳۰ متر و قطر ۰/۲۵ میلی‌متر) و ازت به‌عنوان گاز حامل، آنالیز گردید. اجزای روغن توسط مقایسه زمان بازداری‌شان با نمونه شاهد شناسایی شدند. (محلول‌های شاهد شامل متیل‌استر اسیدهای لوریک، پالمیتیک، استئاریک، اولئیک، لینولئیک و ایکوزادینوئیک با غلظت یک درصد بودند.)

روش تیمار: تیمار موش‌ها با فاصله زمانی ۲۴ ساعت به مدت ۳۵ روز انجام گرفت که دوز مورد استفاده برای تیمار با نانو ذرات نقره ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در هر روز (۱۲) و

آن احتمالاً می‌تواند سلامت انسان و حتی سایر جانورانی را که در معرض قرار می‌گیرند، مورد مخاطره قرار داده و آسیب‌هایی از قبیل تحلیل بافت و بروز اختلال در عملکرد بافت‌های مختلف را موجب شود. از جمله بافت‌های هدف نانو ذرات نقره می‌توان کبد را نام برد. کبد بزرگترین غده در بدن است که عمده سلول‌های تشکیل‌دهنده آن هپاتوسیت‌ها هستند که عملکردهای متنوعی از قبیل متابولیسم، سم‌زدایی، ذخیره گلیکوژن و... برعهده دارد. در واقع در معرض آسیب بسیاری از داروها و سموم قرار دارد. آسیب کبدی به دنبال مصرف چنین عواملی می‌تواند برگشت‌پذیر و درمان‌پذیر باشد، اما ممکن است منتج به نارسایی کبدی حاد (FHF) و مرگ گردد (۱۴ و ۲۳). از جمله اثرات نامطلوب آن بر روی کبد به‌عنوان مهمترین اندام هدف نانو ذرات گزارش شده است به‌ویژه زمانی که از طریق گوارش وارد بدن شود و می‌تواند با ایجاد استرس اکسیداتیو در عملکرد کبد اختلال ایجاد کند (۹). پژوهش‌ها نشان داده است که آنتی‌اکسیدان‌ها (آنزیمی و غیرآنزیمی) از طریق مکانیسم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی مختلف می‌توانند رادیکال‌های آزاد را خنثی کرده و توانایی حفظ هموستاز اکسیداتیو و مقابله با استرس اکسیداتیو را دارند (۱۶). گیاه سیاه‌دانه با نام علمی *Nigella sativa* از خانواده آلاله گیاهی است که اثرات ضد اکسایشی، ضدالتهابی و... آن باعث شده است اثرات فارماکولوژیک متعددی مانند کاهش قند، دفع صفرا و اسید اوریک، محافظ بافت‌های کبد، کلیه و قلب و عروق از آن گزارش شود (۳). لذا در این مطالعه به بررسی اثرات حفاظتی و آنتی‌اکسیدانی گیاه سیاه‌دانه بر روی موش‌های نر تیمار شده با نانو ذرات نقره می‌پردازیم.

مواد و روشها

روش بررسی: به‌منظور انجام این تحقیق ۲۴ سر موش نر بالغ از نژاد ویستار از انیستیتوپاستور ایران خریداری و در خانه حیوانات دانشگاه اراک در شرایط استاندارد (دمای ± 2)

در سبدهای مخصوص رنگ‌آمیزی قرارداد شده و به روش هایدن‌هان‌آزان رنگ‌آمیزی شدند.

محاسبه چروکیدگی: برای محاسبه میزان چروکیدگی با استفاده از تروکار به صورت تصادفی دو یا سه قطعه گرد از برشهای IUR کبد هر موش با استفاده از کولیس ورنیه دو قطر عمود بر هم اندازه‌گیری و میانگین شعاع آنها محاسبه شد. پس از پاساژ بافتی و رنگ‌آمیزی مجدداً قطر عمود بر هم قطعات اندازه‌گیری و میانگین شعاع آنها به عنوان شعاع پس از تثبیت بافتی در نظر گرفته شد و طبق فرمول زیر میزان چروکیدگی مربوط به کبد هر موش محاسبه شد (۱۱).

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

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

محاسبه دانسیته حجمی اجزای کبد: برای محاسبه دانسیته حجمی اجزای کبد از میکروسکوپ مدل (Olympus B×) 4ITE ساخت ژاپن و نرم‌افزار Olysia استفاده شد. با استفاده از روش نمونه‌گیری تصادفی منظم (Systematic Random sampling) به‌طور میانگین ۱۴-۱۰ میدان دید از اسلایدهای ۵ میکرونی مورد بررسی قرار گرفت. روش محاسبه کسر حجمی اجزاء کبد به این ترتیب بود که پروب ۲۵ نقطه‌ای به‌طور کاملاً تصادفی و بدون هیچ‌گونه سوگیری روی هر میدان دید انداخته شد و کسر حجمی هپاتوسیت‌ها، سینوزوئیدها، بافت بینابینی، ورید مرکزی، ساختارهای تریاد پورتال شامل: وریدها، سرخرگ‌ها و مجاری صفراوی محاسبه شد. شمارش نقاط برای اندازه‌گیری حجم اجزاء نام برده شده به روش زیر انجام گرفت.

برای عصاره‌ی سیاه‌دانه دوز ۵ میلی‌لیتر بر کیلوگرم انتخاب شد.

پس از پایان دوره تیمار ابتدا موش‌ها وزن شدند سپس با دی اتیل اتر بیهوش شدند و پس از تشریح، کبد برداشته و وزن شد و سپس حجم کبد با روش شناورسازی (Immersion) اندازه‌گیری شد (۲۱).

بعد از شستشو در نرمال سالین به منظور ثبوت بافت کبد در فیکساتیو NBF به مدت ۷ روز قرار داده شد.

بعد از آنکه کبدها در فیکساتیو NBF فیکس شدند از آنها برش IUR گرفته شد. برای تهیه برشهای IUR از بافت کبد از دو ساعت فی (Φ) و تتا (θ) استفاده گردید. روش کار به این صورت بود که ابتدا هر لوب کبد به صورت تصادفی بر روی ساعت فی (Φ) قرار گرفت سپس عدد تصادفی از جدول اعداد بین صفر تا ۹ انتخاب و سپس کبد در امتداد عدد انتخاب شده برش زده شد. نتیجه این برش ایجاد دو قطعه از هر لوب کبد بود. قطعه اول از هر لوب بر روی ساعت تتا (θ) طوری قرار گرفت که سطح برش خورده در طول محور ۰-۰ ساعت تتا قرار گرفت. سپس یک عدد تصادفی انتخاب و این قطعه مجدداً در امتداد آن عدد برش داده شد. ادامه برشها به صورت موازی و مساوی با برش اول زده شد و قطعه دوم هر لوب به اندازه ۹۰ درجه چرخانده شد تا سطح برش خورده مماس بر محور ۰-۰ ساعت تتا (θ) قرار گیرد. سپس یک عدد تصادفی انتخاب و برش‌ها به موازات عدد انتخاب شده تهیه شد. این برش‌های IUR طوری در داخل بسکت‌ها قرارداده شد که در نهایت از سطح دوم برش خورده بافت در میکروتوم برش گرفته شود. سپس برش‌ها آماده شده در دستگاه پاساژ قرارداد شده و فرآیند پاساژ بافتی صورت گرفت. بعد از پاساژ بافتی، قالب‌گیری و تهیه بلوک پارافینی که حاوی نمونه هستند توسط میکروتوم برش‌گیری صورت گرفت، از بلوکها برش‌های ۵ و ۱۵ میکرونی با تنظیم میکروتوم گرفته شد و روی لام قرار می‌دهیم، سپس لامها

سلول‌های مورد نظر محاسبه شد (۲۱ و ۲۲). از فرمول زیر برای محاسبه تعداد سلول‌ها استفاده شد.

$$Nv = \frac{\sum_{i=1}^n \rho_i}{h \sum_{i=1}^n p_i \cdot a/f}$$

$$(total) = Nv \times V(\text{totalliver}) N$$

تخمین حجم سلول هیپاتوسیت و هسته آن: برای محاسبه حجم هیپاتوسیت و هسته آن از روش نوکلئاتور (Nucleator) استفاده شد. در این روش از برش‌های ۱۵ میکرونی استفاده شد و به‌طور تصادفی و با استفاده از فریم مخصوص شمارش بدون جهت‌گیری، از میدان دید انتخاب شده توسط میکروسکوپ Olympus (BX14TE) که به دوربین عکاسی (Olympus) DP12 ساخت ژاپن مجهز بود و نرم‌افزار Olysa با ۱۰۰ ob عکس گرفته شد (شکل ۱). برای محاسبه کردن حجم هیپاتوسیت، از نرم‌افزار موتیک استفاده شد، به این صورت که از مرکز هسته تا غشای هیپاتوسیت اندازه‌گیری شد و برای حساب کردن حجم هسته، از مرکز هسته تا غشای هسته اندازه‌گیری شد (۲۱ و ۲۲). اندازه‌گیری‌ها در دو جهت مختلف انجام شد و حجم بوسیله رابطه زیر محاسبه شد.

$$V_n = 4/3\pi \times \bar{L}_n^3$$

L_n = اندازه مرکز هسته تا غشای هیپاتوسیت یا مرکز هسته تا غشای هسته

محاسبه سنجش مالون دی‌آلدئید سرم (MDA): ابتدا محلول تیوباریبوتیک اسید (TBA) ۳۷۵ درصد (وزن/حجم)، تری کلرواستیک اسید (TCA) ۱۵ درصد (وزن/حجم)، اسید کلریدریک (HCL) ۲۵ درصد نرمال تهیه شد. سپس به نسبت ۲ به ۱ (۲ میلی‌لیتر از محلول و یک میلی‌لیتر از نمونه) در یک اپندرف مخلوط شد و نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری قرار داده شد. بعد از خارج کردن نمونه‌ها از بن ماری، به سرعت در زیر آب سرد خنک شده و

۱- کل نقاط برخورد کرده از پروب با کل میدان دید انتخاب شده شمارش شد. به همین ترتیب نقاط برخورد کرده با هیپاتوسیت‌ها و دیگر اجزای کبد شمارش گردید. در همه میدان‌های دید انتخابی این عمل انجام گرفت.

۲- سپس اعداد به دست آمده از شمارش نقاط برخورد کرده با هریک از اجزاء در همه میدان‌های دید مربوط به هر کبد جمع شده و به صورت ΣP بیان شد.

۳- با تقسیم مجموع نقاط به دست آمده از هر جزء به‌طور جداگانه بر مجموع کل نقاط برخورد کرده با تصویر کبد دانسیته حجمی (Volume density) مربوط به هریک از اجزای نام برده شده حاصل شد. سپس حجم کل مربوط به هریک از اجزاء به‌طور غیرمستقیم و به‌وسیله ضرب کردن دانسیته حجمی در حجم کل کبد در هر موش تخمین زده شد (۲۱ و ۲۲).

$$V_v = \frac{\sum_{i=1}^n P_{structure}}{\sum_{i=1}^n P_{reference}}$$

$$V_{structure} = V_{liver} \times V_{v structure}$$

تخمین تعداد سلول‌های هیپاتوسیت در بافت کبد: برای محاسبه تعداد سلول‌های هیپاتوسیت، از روش اپتیکال دایسکتور (optical dissector) و از فریم مخصوص شمارش (unbiased counting frame) استفاده شد، به این صورت که توسط میکروسکوپ با بزرگنمایی ۱۰۰ از تمامی اسلایدهای ۱۵ میکرونی به‌طور میانگین تعدادی میدان دید انتخاب و از دستگاه میکروکتور برای شمارش استفاده شد. ابتدا از دو ناحیه به نام Guard zoon به ضخامت ۵ میکرون از بالا و پایین برشهای ۱۵ میکرونی برای شمارش صرف نظر شد، سلول ذکر شده راکه با فریم مورد نظر انتخاب شده و با خط ممنوعه برخورد نکرده بود را شمارش کردیم، برای فیله‌های بعدی نیز این مراحل تکرار شد.

سپس دانسیته عددی سلول‌ها به دست آمد عدد حاصل در حجم کل کبد مربوطه ضرب شد و تعداد کل انواع

وزن موش و کبد (gr): از مقایسه میانگین وزن موش و وزن کبد پس از اتمام دوره تیمار در بین گروه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$). میانگین وزن نسبی کبد در پایان دوره تیمار در گروه نانو ذرات نقره در مقایسه با گروه کنترل ($P < 0.03$) و گروه روغن سیاه‌دانه ($P < 0.04$) کاهش معنی‌داری را نشان داد (جدول ۱).

حجم کل کبد، حجم ورید مرکزی، حجم سلول هپاتوسیت، حجم هسته هپاتوسیت

میانگین حجم کبد در پایان دوره تیمار در بین گروه‌ها اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($P > 0.05$). حجم ورید مرکزی در گروه نانو ذرات نقره نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت ($P < 0.01$) اما درگرو تیمار همزمان نانو ذرات نقره و روغن سیاه‌دانه حجم ورید مرکزی نسبت به گروه نانو ذرات نقره افزایش داشت اما این افزایش معنی‌دار نبود. میانگین حجم سلول هپاتوسیت درگروه نانوذرات نقره نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت ($P < 0.03$) و در گروه نانو ذرات نقره + روغن سیاه‌دانه حجم سلول هپاتوسیت در حد گروه کنترل بود. بررسی حجم هسته هپاتوسیت در بین گروه‌های مختلف موش تفاوت معنی‌داری نشان نداد (جدول ۲).

به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. بعد مایع رویی جدا شد و جذب آن در ۵۳۲ نانومتر در برابر بلانک که حاوی تمام ترکیبات به‌جز نمونه بود، خوانده شد. غلظت مالون دی‌آلدئید با استفاده از ضریب خاموشی (Extinction coefficient) که عبارت است از $10^5 \text{ M}^{-1}\text{CM}^{-1}$ \times ۱/۵۶ می‌باشد، محاسبه شد و برحسب میکرومولار بیان شد (۸).

سنجش فعالیت آنزیم‌های کبدی: سنجش فعالیت آنزیم کبدی آسپاراتات آمینو ترانسفراز (AST) با استفاده از کیت آنزیمی CO بیوشیمی (شرکت پارس آزمون lot no.92003) ، آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) با استفاده از کیت آنزیمی CO بیوشیمی (شرکت پارس آزمون lot no.92005) با کمک دستگاه اتوآنالایزر (COBAS MIRA) انجام شد (۲۷).

آنالیز آماری: در نهایت داده‌های حاصل توسط نرم‌افزار Spss مدل ۱۶ و روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (Oneway ANOVA) و تست Tukey مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و تفاوت میانگین‌ها در سطح ($P < 0.05$) معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

جدول ۱- مقایسه میانگین وزن موش و وزن کبد در گروه‌های مختلف موش نر بالغ پس از ۳۵ روز تیمار با نانو ذرات نقره (500 mg/kg/day) و روغن سیاه‌دانه (5 ml/kg/day). مقادیر به صورت $\text{means} \pm \text{sd}$ می‌باشند. میانگین‌های باکد حرف‌های متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$)

(one way ANOVA, Tukeys test و)

گروه‌ها	میانگین وزن موش قبل	میانگین وزن موش در	میانگین وزن	میانگین وزن
	از شروع تیمار (gr)	پایان تیمار (gr)	نعام کبد	نسبی کبد
کنترل	$27/83 \pm 1/72^a$	$30/81 \pm 2/53^a$	$2/52 \pm 0/23^a$	$8/22 \pm 0/48^a$
نانو نقره	$28/11 \pm 2/47^a$	$32/28 \pm 2/30^a$	$2/33 \pm 0/23^a$	$7/21 \pm 0/47^b$
نانو نقره + روغن سیاه‌دانه	$28/95 \pm 2/78^a$	$31/70 \pm 3/76^a$	$2/44 \pm 0/18^a$	$7/87 \pm 0/91^{ab}$
روغن سیاه‌دانه	$28/46 \pm 3/06^a$	$30/70 \pm 1/55^a$	$2/50 \pm 0/18^a$	$8/18 \pm 0/25^a$

جدول ۲- مقایسه میانگین حجم کبد، حجم ورید مرکزی برحسب (mm^3)، حجم سلول هپاتوسیت و هسته آن برحسب (μm^3) در گروه‌های مختلف موش نر بالغ پس از ۳۵ روز تیمار با نانو ذرات نقره (50.0mg/kg/day) و روغن سیاه‌دانه (5ml/kg/day). مقادیر به صورت $\text{means} \pm \text{sd}$ می‌باشند. میانگین‌های با کد حرفهای متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$) و (one way ANOVA, Tukeys test)

گروه‌ها	میانگین حجم کبد (mm^3)	میانگین حجم ورید مرکزی (mm^3)	میانگین حجم سلول هپاتوسیت	میانگین حجم هسته هپاتوسیت
کنترل	$1612/613 \pm 146/16^a$	$200/93 \pm 16/52^a$	$5842/11 \pm 931/87^a$	$337/21 \pm 49/32^a$
نانونقره	$1474/35 \pm 140/08^a$	$136/03 \pm 20/15^b$	$7945/05 \pm 971/78^b$	$369/85 \pm 67/43^a$
نانونقره+روغن سیاه‌دانه	$1587/35 \pm 108/48^a$	$153/72 \pm 26/48^b$	$7179/37 \pm 963/96^{ab}$	$296/23 \pm 30/89^a$
روغن سیاه‌دانه	$1624/45 \pm 100/96^a$	$197/98 \pm 23/75^a$	$6223/53 \pm 610/37^a$	$318/83 \pm 59/52^a$

غلظت مالون دی آلدئید و آنزیم‌های کبدی: غلظت مالون دی آلدئید در گروه نانو ذرات نقره نسبت به گروه کنترل ($P < 0.001$)، گروه سیاه‌دانه ($P < 0.004$) و گروه نانو ذرات نقره + روغن سیاه‌دانه ($P < 0.001$) افزایش معنی‌داری نشان داد. غلظت مالون دی آلدئید در گروه نانو ذرات نقره + روغن سیاه‌دانه تا حدودی کاهش یافت و به گروه کنترل نزدیک شد.

مقدار آنزیم آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) در گروه نانو ذرات نقره نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت ($P < 0.006$). همچنین نسبت به گروه نانو ذرات نقره + سیاه‌دانه ($P < 0.02$) و گروه سیاه‌دانه ($P < 0.001$) تفاوت معنی‌دار را نشان داد (جدول ۵).

میانگین حجم هپاتوسیت‌ها، حجم سینوزوئیدها و حجم بافت بینابینی: میانگین کل حجم هپاتوسیت‌ها در بین گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. میانگین حجم سینوزوئیدها در گروه نانو ذرات نقره نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار ($P < 0.03$) و میانگین حجم بافت بینابینی کاهش معنی‌داری داشت ($P < 0.02$) (جدول ۳).

تعداد هپاتوسیت‌ها ($\times 10^4$)، تعداد سلول‌های هپاتوسیت ($\times 10^4$) در بافت کبد موش‌های تیمار شده با نانو ذرات نقره نسبت به گروه کنترل و گروه عصاره کاهش معنی‌داری نشان داد ($P < 0.001$). تعداد این سلول‌ها در گروه نانو ذرات نقره + روغن سیاه‌دانه تا حدی افزایش یافت ولی به حد گروه کنترل نرسید (جدول ۴).

جدول ۳- مقایسه میانگین حجم هپاتوسیت‌ها، حجم سینوزوئیدها و حجم بافت بینابینی برحسب (mm^3) در گروه‌های مختلف موش نر بالغ پس از ۳۵ روز تیمار با نانو ذرات نقره (50.0mg/kg/day) و روغن سیاه‌دانه (5ml/kg/day). مقادیر به صورت $\text{means} \pm \text{sd}$ می‌باشند. میانگین‌های با کد حرفهای متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$) و (one way ANOVA, Tukeys test).

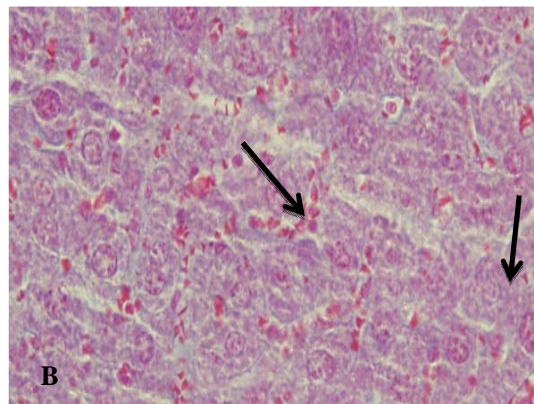
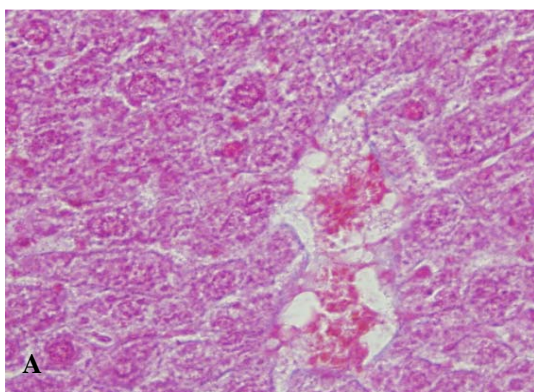
گروه‌ها	میانگین حجم هپاتوسیت‌ها (mm^3)	میانگین حجم سینوزوئیدها (mm^3)	میانگین حجم بافت بینابینی (mm^3)
کنترل	$1156/07 \pm 108/94^a$	$100/32 \pm 7/19^a$	$25/47 \pm 7/01^a$
نانونقره	$1079/45 \pm 86/62^a$	$128/27 \pm 18/03^b$	$15/46 \pm 2/36^b$
نانونقره+روغن سیاه‌دانه	$1174/42 \pm 66/43^a$	$111/33 \pm 22/26^{ab}$	$19/42 \pm 4/25^a$
روغن سیاه‌دانه	$1167/86 \pm 67/19^a$	$104/90 \pm 14/89^a$	$24/76 \pm 6/88^a$

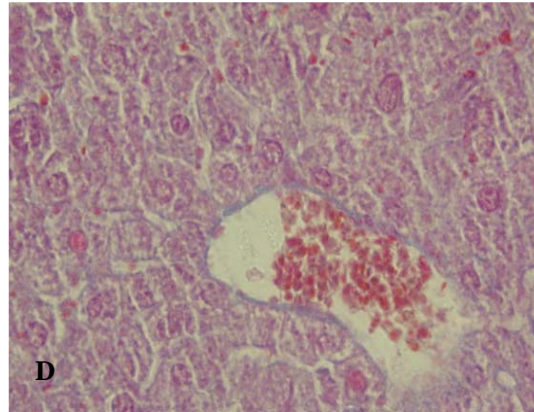
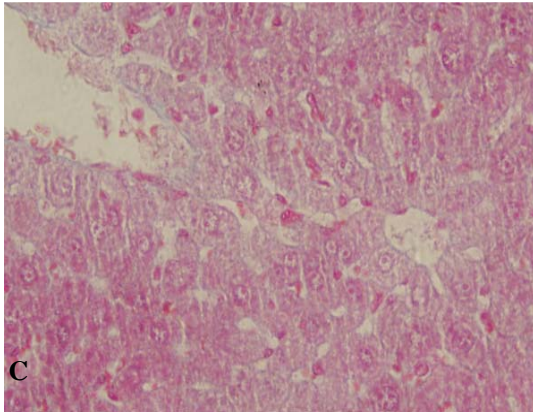
جدول ۴- مقایسه میانگین تعداد هپاتوسیت‌ها ($\times 10^6$)، در گروه‌های مختلف موش نر بالغ پس از ۳۵ روز تیمار با نانو ذرات نقره (500 mg/kg/day) و روغن سیاه‌دانه (5 ml/kg/day)، مقادیر به صورت $\text{means} \pm \text{sd}$ می‌باشند. میانگین‌های با کد حرف‌های متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند (one way ANOVA, Tukeys test و $P < 0.05$).

تعداد هپاتوسیت‌ها ($\times 10^6$)	گروه‌ها
$5/69 \pm 0/23^a$	کنترل
$3/89 \pm 0/27^b$	نانونقره
$4/46 \pm 0/97^b$	نانونقره+روغن سیاه‌دانه
$5/37 \pm 0/90^a$	روغن سیاه‌دانه

جدول ۵- مقایسه میانگین غلظت مالون دی‌آلدئید (n mol/ml) و مقدار آنزیم‌های کبدی در گروه‌های مختلف موش نر بالغ پس از ۳۵ روز تیمار با نانو ذرات نقره (500 mg/kg/day) و روغن سیاه‌دانه (5 ml/kg/day)، مقادیر به صورت $\text{means} \pm \text{sd}$ می‌باشند. میانگین‌های با کد حرف‌های متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$) و (one way ANOVA, Tukeys test).

AST	ALT	غلظت مالون دی‌آلدئید	گروه‌ها
$166/16 \pm 13/33^{ab}$	$79/83 \pm 10/96^{ab}$	$4/36 \pm 0/13^{ab}$	کنترل
$184/83 \pm 21/86^b$	$127/33 \pm 36/08^c$	$7/36 \pm 0/52^c$	نانونقره
$161/66 \pm 7/34^a$	$88/83 \pm 21/25^b$	$5/50 \pm 1/45^b$	نانونقره+روغن سیاه‌دانه
$159/50 \pm 7/36^a$	$52 \pm 5/76^a$	$3/34 \pm 0/52^a$	روغن سیاه‌دانه





شکل ۱- تصاویر میکروسکوپی از بافت کبد موش‌ها در گروه‌های مختلف، تیمار شده با نانو ذرات نقره (500 mg/kg/day) و روغن سیاه‌دانه (5 ml/kg/day)، برش‌های ۵ میکرونی، (رنگ‌آمیزی هایدن هاین آزان، بزرگنمایی 400X). (A) بافت طبیعی کبد در گروه کنترل. (B) بافت کبد در گروه تیمار نانو ذرات نقره (التهاب سینوزوئیدها و دژنراسیون هپاتوسیتها توسط پیکان نشان داده شده است). (C) بافت کبد در گروه تیمار روغن سیاه‌دانه (به گروه کنترل شباهت زیادی دارد). (D) بافت کبد در گروه نانو ذرات نقره + عصاره سیاه‌دانه (وضعیت هپاتوسیت‌ها و سینوزوئیدها نسبت به گروه نانو ذرات نقره بهبود یافته است).

بحث

نانومتر) و دوز ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۱۴ روز، تغییر معنی‌داری در وزن موش و وزن نسبی کبد مشاهده نشد (۷). در مطالعه Rashno و همکارانش در سال ۲۰۱۴، که بر روی موش‌های ماده باردار صورت گرفت پس از ۲۸ روز تیمار با نانو ذرات نقره (۱۰ نانومتر) در غلظت‌های ۵، ۵۰، ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از طریق تزریق زیر جلدی هیچ‌گونه تغییر معنی‌داری در وزن بدن مادران و نوزادان در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نشد (۲۵). با توجه به مطالعات دیگران، کاهش وزن نسبی کبد در مطالعه حاضر می‌تواند ناشی از استفاده از دوز بالای نانو نقره در این مطالعه یا بیشتر بودن طول مدت تیمار نسبت به مطالعات گذشته باشد. در این مطالعه حجم سلول هپاتوسیت در گروه نانو ذرات نقره نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد. در مطالعه Najjaran و همکارانش روی موش‌های صحرایی، مصرف خوراکی نانو ذرات نقره با سایز ۷۰ نانومتر و دوز ۲۵، ۲۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۲۸ روز، در دوز (۵۰ میلی‌گرم) و دوزهای بالاتر تورم و هایپرتروفی سلول‌های هپاتوسیت اطراف ورید مرکزی مشاهده شد (۱۹). در مطالعه Zamani و همکارانش در سال ۲۰۱۳، گروهی از موش‌های نر توسط نانو ذرات نقره با دوز

نانوتکنولوژی با تولید نانو ذرات و کاربرد وسیع آنها در سراسر جهان رشد سریعی داشته است. مطالعات زیاد در شرایط آزمایشگاهی حاکی از این است که این مواد اثر سمی بر سلول‌های جدا شده از کبد، پوست، ریه، مغز، سیستم عروقی و اندام‌های تناسلی دارند (۲). مکانیسم‌های القای اثر سمیت نقره شامل تأثیر این ذرات بر غشای سلولی، میتوکندری، و ماده ژنتیکی می‌باشد. در این بررسی تیمار موش‌های بالغ نژاد NMRI با نانو ذرات نقره در دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه به مدت ۳۵ روز، عدم تغییر وزن موش، کاهش وزن نسبی کبد و کاهش حجم ورید مرکزی مشاهده شد. در بررسی که توسط فاطمی و نوری در خصوص تأثیر نانو ذرات نقره در دوره شیردهی بر کبد نوزادان موش صحرایی صورت گرفت در گروه تیمار نانو ذرات نقره (۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به صورت گاوآژ و به مدت ۱۲ روز، هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری در وزن بدن نسبت به گروه کنترل دیده نشد (۹). در مطالعه اون جونگ پارک و همکارانش در سال ۲۰۱۰، در موش‌های تیمار شده با نانو ذرات نقره (۲۲، ۴۲ و ۷۱

بررسی که در سال ۲۰۱۵ توسط Heydarnejad و همکارانش بر روی موش‌های نر و ماده نژاد (بالسی) Balb c صورت گرفت در گروه تیمارنانوذرات نقره با دوز ۵۰ ppm (خوراکی)، به مدت ۱۴ روز، واکنش شدن سیتوپلاسم هپاتوسیت‌ها همراه با دژنراسیون و نکروز مشاهده شد (۱۰). نانو ذرات نقره می‌توانند گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و رادیکال‌های آزاد را تولید نموده، تجمع بیش‌ازحد ROS می‌تواند پاسخ التهابی را آغاز کند و منجر به تخریب میتوکندری شود در نتیجه سطح GSH (گلوکوتاتیون سولفات هیدروژناز) به دلیل التهاب کاهش می‌یابد، بنابراین فاکتورهای آپاپتوز از جمله سیتوکروم C آزاد شده و منجر به مرگ سلولی می‌شود (۱۹).

به‌عنوان یک مکانیسم پیشنهادی برای توجیه این مشاهدات می‌توان این نظریه را مطرح کرد که تخریب سیتوپلاسمی و هسته سلول‌های کبدی به دنبال تجویز این نانو ذرات گویای این نکته است که این ذرات با پروتئین‌ها و آنزیم‌های بافت کبدی واکنش نشان داده و سبب اختلال در عملکردهای دفاعی علیه آنتی‌اکسیدان‌ها در این بافت‌ها شده و با تولید ترکیبات دارای اکسیژن فعال باعث آتروفی (Atrophy) و نکروز در این بافت‌ها شده است (۶). 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 بیش‌ازحد طبیعی سلول‌های کبدی برای متابولیسم کردن و بیرون ریختن این ترکیبات سمی از بدن طی مراحل سم‌زدایی سبب بروز این تغییرات در سلول‌های کبدی می‌شود (۲۴).

حجم سینوزوئیدها در گروه نانو ذرات نقره نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت. در مطالعه Fatemi و همکارش روی موش‌های صحرائی، مصرف خوراکی نانو ذرات نقره با دوز (۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به مدت ۱۲ روز، موجب اتساع و پرخونی سینوزوئیدها شد (۹).

۳۰۰۰ppm به مدت ۲۰ روز به روش داخل صفاقی تیمار شدند، در نهایت تجمع سلول‌های التهابی و تورم هپاتوسیت‌ها در فضای پورتال و اطراف ورید مرکزی دیده شد (۳۰). در مطالعه‌ای که توسط Ziaee Ghahnavieh و همکارانش در سال ۲۰۱۳ بر روی ۳۲ سر موش سوری نر نژاد آلبینو با میانگین وزنی ۲۵ گرم صورت گرفت، پس از تماس پوستی نانو ذرات طلا با غلظت ۲۵،۵۰،۱۰۰ppm به میزان ۰/۲ میلی‌گرم به مدت ۱۴ روز متوالی، تورم و هایپرتروفی سلول‌های هپاتوسیت مشهود بود (۳۱). نانو نقره در طولانی‌مدت سرطان‌زا می‌باشد و توسط آنزیم‌ها در میکروزوم‌های کبدی متابولیزه می‌شود و این خود منجر به آسیب هپاتوسیت‌ها، آپاپتوز و در نهایت نکروز می‌شود. آلودگی طولانی‌مدت با نانو نقره مخصوصاً در دوزهای بالا منجر به فیبروز کبدی (رسوب کلاژن و التهاب و تورم هپاتوسیت‌ها) می‌شود (۱۹). پژوهشگران با استناد به یافته‌های دانشمندی به نام Del Monte و همکارانش در سال ۲۰۰۵ دلیل بروز چنین شرایطی را در سلول‌های کبدی اختلال در عملکرد غشا و ورود حجیم آب و یون سدیم به درون سلول ناشی از اثر ذرات نانو عنوان کرده‌اند (۶). این تورم سلولی می‌تواند همراه با نشت آنزیم‌های هیدرولیز کننده لیزوزومی بوده و منجر به تخریب سیتوپلاسم و تولید ماکرو مولکول‌های ابری شکل شود.

همچنین طی بررسی دادخواه و همکاران اسانس برخی مواد، کبد را در برابر آسیب اکسیداتیو القاء شده توسط

نانو ذرات محافظت می‌نماید و این تأثیر محافظتی با خواص آنتی‌اکسیدانی اسانس ارتباط دارد (۱). در مطالعه حاضر تعداد هپاتوسیت‌ها در گروه نانو ذرات نقره نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد. در مطالعه Zamani و همکارانش در سال ۲۰۱۳، گروهی از موش‌های نر توسط نانو ذرات نقره با دوز ۳۰۰۰ ppm به مدت ۲۰ روز به روش داخل صفاقی تیمار شدند که در نهایت دژنراسیون هپاتوسیت‌ها و بافت کبد مشاهده شد (۳۰) در

ALT و AST جزء آنزیم‌های غیرعملکردی پلازما هستند که به‌طور طبیعی در سلول‌های برخی از اندام‌ها از جمله کبد قرار گرفته‌اند. یکی از دلایل افزایش سطح سرمی این آنزیم‌ها ممکن است تغییر در نفوذپذیری غشای پلاسمایی سلول‌های کبدی و یا صدمات سلولی حاصل از قرار گرفتن در معرض نانوذره نقره باشد (۲۷). زمانی که نانو مواد از طریق گوارش وارد بدن می‌شوند پس از ورود، در کبد، طحال و بیضه‌ها تجمع می‌یابند که منجر به جذب سلولی می‌شود. حذف نانو مواد توسط ماکروفاژهای کبدی منجر به تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود (۳۱). احتمالاً رادیکال‌های آزاد حاصل از نانو ذرات نقره با آسیب به کبد باعث پراکسیداسیون لیپیدهای غشای آن و در نتیجه کاهش سیالیت غشاء و از بین رفتن ساختمان و عملکرد آن شده و متعاقباً منجر به افزایش غلظت آنزیم‌های کبدی در خون شده است. بنابراین بالا رفتن این آنزیم‌ها نشانه‌ای از تخریب سلول‌های کبدی است (۲۷) از آنجاکه کبد یک ارگان مهم در متابولیسم و سم‌زدایی مواد خارجی و سمی است و با آسیب‌پذیری خود طی متابولیسم کردن مواد بیگانه در واکنش‌های پیچیده که خود باعث اثرات مخرب بر بافت کبد می‌شود، موجب کاهش صدمه به بدن می‌گردد (۲۰). ایزو آنزیم‌های AST هم در میتوکندری و هم در سیتوپلاسم و آنزیم ALT فقط در سیتوپلاسم سلول‌ها وجود دارد (۲۶)، بنابراین افزایش سطح ALT دلیلی بر آسیب غشای میتوکندری و غشای هیپاتوسیت‌های کبد به علت حمله اکسیدانی رادیکال‌های آزاد حاصل از نانو ذرات می‌باشد.

بازگشت مقادیر افزایش‌یافته آنزیم‌های سرمی شاخص آسیب کبد به حالت طبیعی خود به‌وسیله عصاره سیاه‌دانه می‌تواند در اثر جلوگیری از نشت آنزیم‌های داخل سلولی به دلیل حفظ یکپارچگی غشای سلول و یا نوزایش و ترمیم سلول‌های آسیب‌دیده کبد باشد (۲۸).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این پژوهش نانو ذرات نقره قادر به القاء

در بررسی که در سال ۲۰۱۵ توسط Heydrnejad و همکارانش بر روی موش‌های نر و ماده نژاد بالبی صورت گرفت در گروه تیمار نانو ذرات نقره با دوز ۵۰ ppm (خوراکی)، به مدت ۱۴ روز، التهاب و پرخونی و در نتیجه افزایش حجم سینوزویدها دیده شد (۱۰).

در مطالعه‌ای که توسط Ziaee Ghahnavieh و همکارانش در سال ۲۰۱۳ بر روی ۳۲ سر موش سوری نر نژاد آلبینو با میانگین وزنی ۲۵ گرم صورت گرفت، پس از تماس پوستی نانو ذرات طلا با غلظت ۲۵،۵۰،۱۰۰ ppm به میزان ۰/۲ میلی‌گرم به مدت ۱۴ روز متوالی، در غلظت ۵۰ ppm، افزایش حجم سینوزویدها مشاهده شد (۳۱).

در این مطالعه غلظت مالون دی‌آلدئید و فعالیت ALT در گروه نانو ذرات نقره نسبت به گروه کنترل و سایر گروه‌ها افزایش معنی‌داری نشان داد. در واقع لیپیدها از مهمترین مولکول‌هایی هستند که مورد تهاجم رادیکال‌های آزاد قرار می‌گیرند. در این میان غشای سلول‌ها که غنی از اسیدهای چرب غیراشباع است بیشتر از سایر قسمت‌های سلول به پراکسیداسیون حساس است. پراکسیداسیون لیپیدها منجر به کاهش سیالیت غشاء و از بین رفتن ساختمان و عملکرد آن می‌شود که در پاتوژنز بسیاری از بیماری‌ها دخالت دارد. محصول نهایی ناشی از پراکسیداسیون لیپیدها مالون دی‌آلدئید می‌باشد (۱۲).

سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوکاتایون پراکسیداز؛ آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی هستند که یک سیستم تدافعی را علیه گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species; ROS) تشکیل داده‌اند (۱۵).

افزایش میزان مالون دی‌آلدئید در موش‌های دریافت‌کننده نانو ذرات نقره، نشان‌دهنده افزایش واکنش‌های پراکسیداسیونی است که به ضعف مکانیسم‌های تدافعی آنتی‌اکسیدانی منجر می‌شود و بدین ترتیب ممانعت از تشکیل مفرط رادیکال‌های آزاد مقدور نخواهد بود (۱۸).

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه خانم فاطمه مقدمی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست سلولی تکوینی از دانشکده علوم پایه دانشگاه اراک بود و با حمایت مالی حوزه معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه اراک به انجام رسیده است. در ضمن از کمک‌های ارزشمند خانم نادری در این مطالعه صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

سمیت در بافت کبد موش می‌باشد. نتایج ما کاهش معنی‌داری در میانگین وزن نسبی کبد، حجم کل ورید مرکزی، حجم کل شریان، بافت همبند و ورید دستگاه پورتال و افزایش معنی‌داری در حجم کل سینوزوئیدها، مجرای صفراوی، حجم سلول هپاتوسیت و سطوح MDA و آنزیم‌های ALT و AST در گروه نانو ذرات نقره نسبت به گروه کنترل نشان داد. عصاره سیاه‌دانه نیز با خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی خود توانست اثرات سوء نانو نقره را بر بافت کبد در این مطالعه کاهش دهد.

منابع

- اولین کنفرانس ملی علوم و فناوری نانو، یزد، دانشگاه پیام نور یزد، سازمان علمی دانشجویی مهندسی برق، https://www.civilica.com/Paper-NNTC01-NNTC01_403.html
- ۱- دادخواه، ا.، فاطمی، ف.، محمدی ملایری، م.، ر.، ترابی، ف.، سربازی، م.، و دینی، س.، ۱۳۹۶. دوره ۳۲، شماره ۳، صفحات ۲۰۶-۲۱۷.
 - ۲- لطیفی، ا.، محمد افخمی اردکانی، گلزاده، ج.، و علی نیا اهندانی، ا.، ۱۳۸۹. بررسی اثر سمیت نانو ذرات نقره بر اندامهای جانوری، lactation on the liver of newborn rats". J Shahid Sadoughi Univ Med Sci, 23(5), PP: 440-51.
 - 3- Ali, B. H., and Blunden, G., 2003. Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytother.* 17, PP: 299 – 305.
 - 4- Chen, W., Liu, Y., Courtney, H. S., Bettenga, M., Agrawal, C. M., and Bumgardner, J. D., et al. 2006. In vitro antibacterial and biological properties of magnetron co-sputtered silver-containing hydroxyapatite coating. *Biomaterials*, 27(32), PP: 5512-7.
 - 5- Chen, X., and Schluesener, H. J., 2008. Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicol Lett.* 176(1), PP: 1-12.
 - 6- Del Monte, U., 2005. Swelling of hepatocytes injured by oxidative stress suggests pathological changes related to macromolecular crowding. *Med Hypotheses*, 64(4), PP: 818-25.
 - 7- Eun-Jung, P., Eunjoo, B., and Jongheop, Y., et al. 2010. Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 30, PP: 162–168.
 - 8- Esterbauer, H., and Cheeseman, K. H., 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal". *Methods in enzymology* 186, PP: 407-421.
 - 9- Fatemi, M., and Nouri, A., 2015. "The effect of maternal exposure to silver nanoparticles during lactation on the liver of newborn rats". *J Shahid Sadoughi Univ Med Sci*, 23(5), PP: 440-51.
 - 10- Heydrnejad, M. S., Jafarzadeh Samani, R., and Aghaeivanda, S., 2015. Toxic Effects of Silver Nanoparticles on Liver and Some Hematological Parameters in Male and Female Mice (*Mus musculus*). *Biol Trace Elem*, 165, PP: 153–158.
 - 11- Hoseini, L., Roozbeh, J., Sagheb, M., Karbalay-Doust, S., and Noorafshan, A., 2009. "Nondrolone 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.
 - 12- Karamsichani, S., Noori, A., and Naghsh, N., et al. 2015. "Antioxidant effect of *Peganum harmala* L on toxicity caused by silver nanoparticles in mice liver". *International Journal of Biosciences [IJB]*, PP: 274-282.
 - 13- Lee, K. J., Nallathamby, P. D., Browning, L. M., Osgood, C. J., and XGN, X. U., 2007. In vitro imaging of transport and biocompatibility of single Silver nanoparticles in early development of Zebra fish embryos. *ACS Nano*, 1, PP: 133-43.
 - 14- Lee, W. L., 2003. "Drug-induced hepatotoxicity". *N. Engl. J.*, 349, PP: 474–85.

- 15- Lil, J. L., Stantman, F. W., and Lardy, H. A., 1988. Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys*. 263(1), PP: 150-6.
- 16- Mates, J., Perez-Gomez, C., and Decastro, I., 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem*, 32, PP: 595-603.
- 17- McAuliffe, M. E., and Perry, M. J., 2007. Are nanoparticles potential male reproductive toxicants? A literature review. *Nanotoxicol*, 1(3), PP: 204-10.
- 18- Naik, S. R., 2003. Antioxidants and their role in biological functions: An overview. *Indian Drugs*, 40(9), PP: 501-16.
- 19- Najjara, N., Asghari Moghaddam, N., and Rezai Zarchi, S., et al. 2014. "Toxicity effects of nanosilver on liver enzymes, liver and lung tissues". *International journal of Biomedical Engineering and Science (IJBES)*, Vol, 1, No, 1.
- 20- Nalpas, B., Vassault, A., Le Guillou, A., Lesgourgues, B., Ferry, N., and Lacour, B., et al. 1984. Serum activity of mitochondrial aspartate aminotransferase: a sensitive marker of alcoholism with or without alcoholic hepatitis. *Hepatology*, 4(5), PP: 893-896.
- 21- Noorafshan, A., Esmail-Zadeh, B., Bahmanpour, S., and Poost-Pasand, A., 2005. "Early stereological changes in liver of Sprague-Dawley rats after streptozotocin injection". *Indian Journal of Gastroenterology*, Vol 24, PP: 104-107.
- 22- Nyengaard, J. R., 1999. "Stereologic Methods and Their Application in Kidney Research". *Stereological Research Laboratory. Diabetologia*, 10, PP: 1100-1123.
- 23- O'Grady, J., Schalman, S. W., and Williams, R., 1993. "Acute liver failure: Redefining the syndrome". *Lancet*, 324, PP: 273-5.
- 24- Patel, J. M., and Bahadur, A., 2011. Histopathological Manifestations of Sub Lethal Toxicity of Copper Ions in *Catla catla*. *Am Euras J Toxicol Sci*, 3(1), PP: 1-5.
- 25- Rashno, M., Fatemi Tabatabaei, S. R., Khaksary Mahabady, M., and Ghaderi, S. H., 2014. Maternal Exposure to Silver Nanoparticles in Mice: Effects on dams' Reproductive Performance and Pups' Neurobehavioral Ontogeny. February. Volume 11, Number 1.
- 26- Rousselot, P., Larghero, J., Labaume, S., Poupon, J., Chopin, M., and Dosquet, C., et al. 2004. Arsenic trioxide is effective in the treatment of multiple myeloma in SCID mice. *Eur J Haematol*, 72(3), PP: 166-171.
- 27- Seyedalipour, B., Arefifar, A., Khanbabaee, R., and Hoseini, S. M., 2015. Toxicity of Silver Nanoparticles on ALT, AST, ALP and Histopathological Changes in NMRI Mice. *J Mazandaran Univ Med Sci*. 25(124), PP: 183-193.
- 28- Thabrew, M. I., Joice, P. D., and Rajatissa, W., 1987. A comparative study of the efficacy of *Pavetta indica* and *Osbeckia octanda* in the treatment of liver dysfunction. *Planta Med*, 53(3), PP: 239-41.
- 29- Wijnhoven, S., Peijnenburg, W., Herberts, C., Hagens, W., Oomen, A., and Heugens, E., 2009. Nano-silver: A review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicol*, 3(2), PP: 109-38.
- 30- Zamani, N., Naghsh, N., and Fathpour, H., 2013. Comparing poisonous effects of thioacetamide and silver nanoparticles on enzymic changes and liver tissue in Syrian mice. *Zahedan J Res Med Sci*, 16(2), PP: 54-7.
- 31- Ziaee Ghahnavieh, M., Ziaee Ghahnavieh, M., Naghsh, N., and Dorostkar, E., 2014. Skin Touch Effects of Gold Nanoparticles in Male Mice. *J Mazand Univ Med Sci*. 24(Supple 1), PP: 225-232.

Evaluation of the protective effect of *Nigella sativa* oil on liver in NMRI male mice following silver nanoparticles toxicity.

Shariatzadeh S.M.A., Moghadami F. and Maleki P.

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

Abstract

Despite the widespread use of silver nanoparticles (SNP), there are concerns about their biological effects on the human health. The aim of this study was to investigate the effect of *Nigella sativa* oil (NSO) on mice liver following silver nanoparticles toxicity. 24 adult male NMRI mice were divided into 4 groups: control, SNP (500mg/kg/day, gavage), NSO (5ml/kg/day, gavage) and finally SNP plus NSO and treated for 35 days. Histological assessment of liver were performed using stereological methods. The serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and malondialdehyde (MDA) were also measured. A significant decrease in the mean relative weight of liver, the total volume of the central veins, the total volume of the connective tissue, arteries and veins in the portal tracts and a significant increase in the total volume of sinusoids, bile ductules, the hepatocytes cell volume and serum levels of MDA and ALT and AST enzymes were observed in the silver nanoparticles group compared with the control group. The major of silver nanoparticles-induced Liver damages improved in the silver nanoparticles + *Nigella sativa* oil group to the control ones. The results of this study suggest that *Nigella sativa* oil can protect the liver from silver nanoparticles damage.

Key words: Silver nanoparticles, *Nigella sativa* oil, Mice, Liver, Stereology