



بررسی اثرات احتمالی نانو ذرات بیولوژیک طلای تولید شده به وسیله باکتری *Bacillus cereus* بر ساختار و عملکرد کبد موش صحرائی

بهروز یحیایی*^۱، پرستو پورعلی^۱، سحر باخرد^۲

۱- گروه علوم پایه، دانشکده علوم پزشکی، واحد شاهرود، دانشگاه آزاد اسلامی شاهرود، شاهرود، ایران.

۲- مرکز تحقیقات نانوذرات بیولوژیک در پزشکی، واحد شاهرود، دانشگاه آزاد اسلامی شاهرود، شاهرود، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۷/۳۰، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۸/۳۰

چکیده

مقدمه: باتوجه به اهمیت استفاده از نانو ذرات طلا در زمینه تشخیص و درمان بیماری‌ها، به دست آوردن نانوذراتی که دارای سازگاری بیشتری با بدن باشند، از اهمیت بالایی برخوردار است. باتوجه به نوین بودن سنتز بیولوژیک نانوذرات طلا برخلاف سایر روش‌ها، هنوز اطلاعات چندانی از فارماکوکینتیک و فارماکودینامیک این ذرات در اختیار نیست؛ بنابراین، مطالعه اخیر بر روی ارزیابی اثرات احتمالی نانوذرات طلای تولید شده به روش زیستی بر روی کبد موش صحرائی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: نانوذرات به دست آمده بر روی ۱۵ سر موش صحرائی نر نژاد ویستار مورد مطالعه قرار گرفتند. بدین منظور ابتدا موش‌های صحرائی به ۳ گروه تقسیم شدند و پس از دو مرحله تزریق نانوذرات به روش داخل صفاقی، تشریح شده و کبد آن‌ها بعد از طی مراحل آماده‌سازی، به وسیله میکروسکوپ نوری مطالعه گردید. نمونه خون موش‌های صحرائی نیز جهت بررسی‌های بیوشیمیایی به آزمایشگاه ارسال و مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج: بر اساس نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر دیده شد در هر دو گروه دریافت‌کننده نانوذرات با دوز سمی و غیر سمی، سلول‌های هیپاتوسیتی دارای تغییرات واکوتولار بودند. علاوه بر این در گروه دریافت‌کننده دوز سمی فضاهای سینوزویدی دارای اتساع و پرخونی اندکی نیز بود. نتیجه‌گیری: به طور کل نانوذرات طلای بیولوژیک دارای خواص سمیت سلولی اندکی بر بافت کبد بوده، که این سمیت وابسته به دوز نانوذرات می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: نانو ذرات بیولوژیک، موش صحرائی، کبد، باکتری، *Bacillus cereus*.

*نویسنده مسئول: شاهرود، دانشگاه آزاد اسلامی شاهرود، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم پایه، تلفن: ۰۲۳۳۲۳۹۰۰۷۷، نمابر: ۰۲۳۳۲۳۹۰۰۷۷
Email: behroozyahyaei@yahoo.com

ارجاع: یحیایی بهروز، پورعلی پرستو، باخرد سحر. بررسی اثرات احتمالی نانو ذرات بیولوژیک طلای تولید شده به وسیله باکتری *Bacillus cereus* بر ساختار و عملکرد کبد موش صحرائی. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۳:۱۳۹۷ (۴): ۱-۱۰.

مقدمه

به درون سلول نفوذ نمایند. این نفوذ وابسته به اندازه نانوذرات است؛ برای مثال هنگامیکه اندازه نانوذرات طلا به حدود ۵۱nm می‌رسد، به راحتی توسط اندوسیتوز با واسطه گیرنده وارد سلول می‌شود که این عمل در طول ۳۱ دقیقه ابتدایی با سرعتی ثابت رخ می‌دهد (۶).

دیده شده است که نانوذرات شیمیایی طلا توانایی تحریک تولید آنتی بادی در موش را دارا هستند، بنابراین خاصیت سمی به حضور عواملی علاوه بر سمیت سلولی نانوذرات طلا نیز نسبت داده شده است. به‌طور کلی نانوذرات طلا دارای سمیت کمی در کشت سلولی می‌باشند ولی استفاده از میزان‌های بالا از نانوذرات شیمیایی طلا در موش، سبب مرگ حیوان آزمایشگاهی شده است. سمیت ایجاد شده بیشتر در ریه، کبد و طحال دیده شده که احتمالاً ابعاد نانومتری طلا و تحریک تولید آنتی‌بادی در بدن توسط نانوذرات، دلیل این کشندگی است (۷).

نوری و همکاران نشان دادند که نانوذرات طلا در غلظت‌های پایین (۱۰۰ppm) در موارد بیولوژیک، اثر سمی پایدار و طولانی مدت بر بدن جانوران ایجاد نکرده و سیستم رتیکولاندوتلیال می‌تواند آنها را دفع یا تجزیه نماید (۸).

مطالعات قبل نیز اثر مثبت نانوذرات را بر التیام زخم نشان دادند به طوری که بر اساس آن مطالعات نانوذرات نقره سنتز شده توسط باکتری *Paenibacillus* با ابعاد ۴۰nm سبب تسریع التیام زخم گردیده است (۹).

Connor و همکاران در مطالعات خود در سال ۲۰۰۵ نشان داده‌اند که نانوذرات طلا علی‌رغم جذب توسط سلول‌های انسانی، سمیت سلولی حادی نداشته و در عملکرد سلول دخالتی ندارند (۱۰).

مطالعات انجام شده بر روی نانوذرات طلا بیانگر این امر است که جذب نانوذرات طلا در سلول‌های کبدی بیشتر از سایر سلول‌ها است که از این امر می‌توان به این نتیجه رسید که سلول‌های کبدی خاصیت بازجذب بالایی در جذب سایر مواد از جمله نانوذرات دارند (۱۱).

یکی از عوامل بیوشیمیایی مهم جهت بازجذب نانوذرات طلا میزان اثر نانوذرات بر گلوکاتیون می‌باشد. غلظت این ماده در شرایط مختلف در بدن متفاوت می‌باشد ولی به جهت جذب نانوذرات غلظت این ماده تحت شرایط خاصی متفاوت می‌شود. سیتوکروم P۴۵۰ نیز یکی دیگر از موادی است که در شرایط بسیار خاصی دارای تغییرات مهمی می‌باشد. این سیتوکروم در بدن نقش ویژه‌ای را بر عهده دارد. یکی از نقش‌های مهم این سیتوکروم باز جذب سموم و داروها می‌باشد؛ از این جهت سیتوکروم P۴۵۰ یکی از فیلترهای مهم کبدی در باز جذب

امروزه گرایش به استفاده از نانوذرات فلزات مختلف در زمینه‌های پزشکی و مهندسی بسیار افزایش یافته است. برخی از نانوذرات سازگار با بدن انسان شامل نانوذرات طلا، نقره، تیتانیوم و پلاتین می‌باشند. جهت سنتز نانو ذرات فلزات مختلف سه روش وجود دارد: شیمیایی، فیزیکی و بیولوژی. تعیین مشخصات نانوذرات برای کنترل سنتز و کاربرد آنها ضروری است. به‌طور کلی، روش‌های فیزیکی و شیمیایی موجود جهت تولید نانوذرات فلزی، نیاز به دما و فشار و زمان بالا دارند و هزینه بر می‌باشند. از طرفی در این روش‌ها، به‌خصوص در نوع فیزیکی، زمان زیادی مورد نیاز است (۱).

سنتز بیولوژیکی اشاره به روندی دارد که توسط روش‌های بیولوژیکی و روندهای آنزیمی و غیر آنزیمی رخ می‌دهد. این روش‌ها به‌دلیل اینکه مواد سمی در محیط تولید نمی‌نمایند، به نام تکنولوژی سبز نیز خوانده می‌شوند که در طی آن می‌توان نانوذرات فلزی بهتری نسبت به انواع دیگر تولید نمود (۲).

منابع میکروبی به‌دلیل تولید نانوذرات فلزات، امروزه بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. نانوذرات فلزی هم به‌صورت خارج سلولی (به‌دلیل ترشح مواد سلولی و آنزیم‌ها به خارج از سلول) و هم به‌صورت داخل سلولی قابل تولید هستند. تولید خارج سلولی در مقایسه با تولید داخل سلولی مناسب‌تر است زیرا نانوذرات در فرم داخل سلولی در درون سلول تولید شده که بنابراین مرحله‌ای دیگر جهت استخراج نانوذرات از درون سلول‌های میکروبی مورد نیاز است.

مطالعات نشان می‌دهد که سایر نانوذرات از قبیل نانوذرات نقره به صورت خوراکی سبب آسیب کبدی و کلیوی شده (۳)، همچنین نانوذرات اکسید روی و دی اکسید تیتانیوم در دوزهای مختلف احتمالاً به دلیل تخریب کبد و افزایش نشت آنزیم‌های کبدی باعث افزایش سطح سرمی آنزیم‌ها می‌شود (۴).

نانو ذره‌های طلا در نقش نشانگر، حساسیت، سرعت و انعطاف‌پذیری آزمون‌های زیستی را جهت اندازه‌گیری حضور یا فعالیت مواد افزایش می‌دهد. از طرفی در استفاده از این ذرات حجم کوچکی از نمونه مورد نیاز است، پس نیاز اولیه نمونه به تکثیر ماده مورد اندازه‌گیری و استفاده از روش‌هایی مانند CR را برطرف می‌کنند (۵).

با وجود خواص مفید نانوذرات، این مواد می‌توانند دارای واکنش‌های نامطلوبی برای سیستم‌های بیولوژیک و محیط باشند که سبب سمیت شود. طلا عنصری سازگار با بدن است. سمیت نانوذرات شیمیایی طلا بررسی شده و دیده شده این ذرات می‌توانند به‌دلیل کوچک بودن ابعاد،

روش مناسب برای انجام این مطالعه روش آزمایشگاهی و تجربی بوده که با این روش امکان کنترل عوامل تأثیرگذار بر نتایج میسر باشد، و در کل دوره آزمایش تمام شرایط اخلاقی در مورد کار با حیوانات، رعایت گردید.

به منظور بررسی اثر نانوذرات بیولوژیک طلا بر بافت‌شناسی کبد موش‌های صحرایی تحت آزمایش، ۳۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با سن ۸-۱۲ هفته و میانگین وزن مشابه، از دانشگاه علمی کاربردی دامغان خریداری و به مدت یک هفته شرایط تطابق اعمال گردید تا موش‌های صحرایی به شرایط محیط جدید عادت کنند. حیوانات مورد بررسی در قفس‌های استاندارد مخصوص از جنس PVC (Polyvinyl chloride)، با درپوش توری فلزی که کف آن‌ها با تراشه های تمیز چوب پوشانده شده بود، نگهداری شدند. در طی دوره آزمایش جهت موش‌های صحرایی، از خوراک مخصوص و فشرده جوندگان از شرکت مینو صباح به میزان ۲۵ گرم به ازای ۱۰۰ گرم وزن بدن و آب سالم شهری روزانه ۵۰ میلی‌لیتر، در داخل ظرف آب‌خوری از جنس PVC استفاده شد و چرخه ۱۲ ساعت خواب و بیداری، رطوبت محیط ۴۰٪ تا ۶۰٪ و دما ۲۰°C تا ۲۵°C برقرار گردید. موش‌های صحرایی به صورت هفتگی و قبل از تزریق وزن‌کشی شده و غلظت نانوذرات باتوجه به وزن جدید تنظیم گردید. این مطالعه بر طبق راهنمای استفاده و مراقبت از حیوانات آزمایشگاهی اجرا گردید (۱۴).

هت تقسیم‌بندی، ابتدا از بین ۳۰ سر موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار خریداری شده ۱۵ عدد به صورت تصادفی انتخاب شد سپس موش‌های صحرایی انتخابی وزن‌گیری شدند و میانگین وزنی آن‌ها حدود ۱۹۰ گرم بود.

گروه‌بندی حیوانات بدین صورت بود:

۱- گروه موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار بدون دریافت نانوذرات (۵ سر)

۲- گروه موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار دریافت‌کننده دوز غیر سمی نانوذرات (۵ سر)

۳- گروه موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار دریافت‌کننده دوز سمی نانوذرات (۵ سر)

بعد از گروه‌بندی بر اساس مداخله‌ها، تزریق نانوذرات به روش درون صفاقی که سمی‌ترین راه تجویز در موش‌های صحرایی می‌باشد، انجام شد (۱۵).

در طی دوره آزمون، گروه شاهد هیچ دارویی دریافت نکرد. به موش‌های صحرایی در گروه غیرسمی، نانوذرات با دوز ۱/۱۲۸ و به گروه سمی، نانوذرات با دوز ۱/۳۲ محلول اولیه و به میزان دو دوز به فاصله ۴۸ ساعت تزریق شد (۶). در انتهای دوره آزمایش به منظور نمونه‌گیری بافتی، موش‌های صحرایی بیهوش و نمونه‌گیری بافتی انجام شد.

سموم بوده و می‌توان این تصور را داشت که در باز جذب نانوذرات نیز نقش مهمی را بر عهده داشته باشد (۱۲).

حال باتوجه به این که از میان روش‌های سنتز نانوذرات، اطلاعات چندانی از فارماکوکینتیک و فارماکودینامیک نانوذرات طلای سنتز شده به روش بیولوژیک در اختیار نیست؛ لذا در این پروژه به بررسی تأثیرات احتمالی نانوذرات بیولوژیک سنتز شده به وسیله باکتری *Bacillus cereus* بر بافت کبد موش صحرایی نژاد ویستار پرداخته شد.

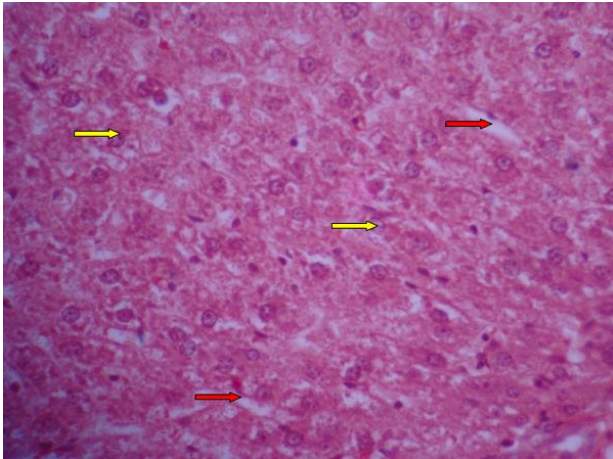
مواد و روش‌ها

جهت سنتز نانوذرات طلا، پس از کشت *Bacillus cereus* در محیط کشت نوترینت برات، ابتدا باکتری‌ها توسط سانتریفیوژ از محیط رشد میکروبی جداسازی شدند و سوپرناتانت به دست آمده در معرض کلرواوریک اسید با غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار قرار گرفت. محلول در دور 200 rpm در دمای 37°C به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد و تولید نانوذرات طلا با بررسی تغییر رنگ محلول از زرد به قرمز و نیز روش‌های اسپکتروفوتومتری نور مرئی، میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) و تکنیک پراش اشعه اکس (XRD) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از تولید نانوذرات طلا در ابعاد ۱۰-۷۰ نانومتر و به صورت گرد و چند وجهی توسط باکتری مذکور بوده است. باتوجه به اینکه نانوذرات طلا به صورت وابسته به دوز دارای سمیت سلولی بر روی سلول‌های هیپاتوسیت بوده‌اند، ابتدا غلظت‌های سمی و غیر سمی آن‌ها بر اساس ۵۰٪ IC (Inhibitory concentration 50%) به دست آمده از همان نانوذرات تهیه شدند. برای این منظور به دلیل اینکه IC_{۵۰} در چاهک شماره ۵ در پلیت کشت سلولی بود محاسبات نشان داد که نانوذرات در این چاهک رقتی معادل ۱/۳۲ محلول اولیه داشتند. در نتیجه از رقت ۱/۶۴ به بعد به عنوان دوز غیرسمی نانوذرات طلا در نظر گرفته شد (۱۳).

براین اساس در مطالعه حاضر از رقت ۱/۱۲۸ به عنوان دوز غیرسمی و از رقت ۱/۳۲ به عنوان دوز سمی استفاده گردید. بدین منظور جهت ایجاد دوز غیرسمی باید ۱ سی سی از نانوذرات، با ۱۲۷ سی سی از خون موش مخلوط شود. از آنجا که حجم خون موجود در بدن هر موش ۱۰٪ وزن کل بدن را شامل می‌شود جهت تزریق با دوز غیرسمی در موش صحرایی به وزن ۲۰۰ گرم که حجم خونی حدود ۲۰ سی سی خواهد داشت ۰/۱۵ سی سی از نانوذرات تزریق شد.

جامعه آماری موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار بودند که از میان آن‌ها تعداد ۱۵ سر موش صحرایی با میانگین وزن مشابه با سن ۸-۱۲ هفته، به عنوان نمونه آماری انتخاب شدند. نمونه آماری این تحقیق، به روش نمونه‌گیری انتخابی هدفدار باتوجه به شرایط وزنی، سنی و جنسیت انجام شد. سپس به صورت تصادفی در ۳ گروه تقسیم شدند.

نمونه‌ها در این ناحیه قابل رویت می‌باشد. درون سلول‌های هیپاتوسیت (فلش زرد) مقداری تغییرات واکوئولار مشاهده می‌شود اما اندازه و شکل هسته مناسب است. فضای سینوزوئیدی (فلش قرمز) و فضای پورت کاملاً مشخص و بدون تغییر دیده می‌شوند (شکل ۲).



شکل ۲- مقطع بافت‌شناسی کبد موش صحرایی گروه دوز غیر سمی نانوذرات طلا (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و انوزین $\times 400$).

در نمونه‌های بافت‌شناسی گروه دریافت‌کننده دوز سمی نانوذرات طلا سلول‌های هیپاتوسیت (فلش زرد) دارای نظم ستونی مناسبی به طرف ورید مرکز لوبولی می‌باشند و تنها برخی از این سلول‌ها به میزان اندک تغییرات واکوئولار را از خود نشان می‌دهند. وریدهای مرکز لوبولی دارای انتشار مناسب و اندازه یکنواختی بوده و اتساع غیر طبیعی در آنها رویت نمی‌شود. فضای سینوزوئیدی (فلش قرمز) در مقاطع بافتی دارای اتساع و پرخونی اندکی بوده که در نواحی دور از ورید مرکز لوبولی مشهود است. فضای پورت بدون تغییر و دارای ویژگی طبیعی است (شکل ۳).

از آنجایی که شرط ورود به آزمون‌های پارامتریک، طبیعی بودن جامعه می‌باشد تست آماری K-S استفاده شد که نرمال بودن جامعه اثبات گردید.

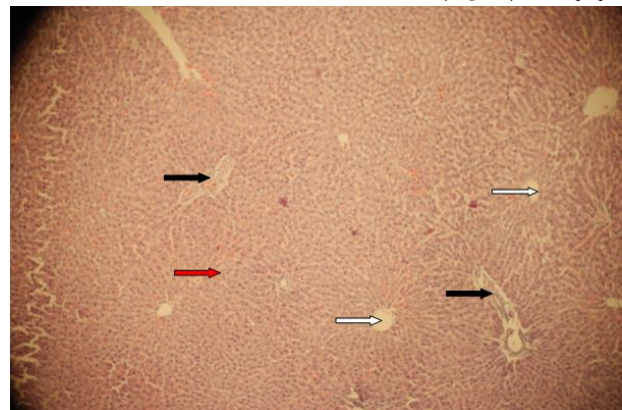
باتوجه به نتایج Anova یک طرفه در رابطه با میزان AST اختلاف بین گروه‌ها معنی‌دار نبود ($P=0/786$)، همچنین در رابطه با میزان ALT نیز اختلاف معنی‌دار نگردید ($P=0/366$). در رابطه با میزان ALP نیز اختلاف بین گروه‌ها معنی‌دار نشد ($P=0/234$) که این نیز نتیجه فرضیه محقق را رد و فرضیه تحقیق را اثبات می‌کند.

در این مرحله موش‌های صحرایی جهت نمونه‌برداری روی تخته جراحی فیکس شدند و از بطن راست آن‌ها نمونه خون جهت مطالعات بیوشیمیایی گرفته شد. سپس کبد موش‌های صحرایی نمونه‌گیری شده و توسط ترازوی دیجیتالی توزین گردید و بلافاصله درون ظروف حاوی محلول فرمالین ۱۰٪ جهت ثبوت بافت قرار داده شده و پس از ۲۴ ساعت محلول فرمالین تعویض گردید. در نهایت نمونه‌های اخذ شده جهت تهیه مقاطع هیستولوژیک به آزمایشگاه بافت‌شناسی تهران ارسال شدند و پس از آماده سازی، مقاطع تهیه شده به لحاظ متغیرهایی که به‌طور معمول و قرار دادی جهت بررسی روند تغییرات هیستوپاتولوژیکی بافت کبد مطالعه می‌شوند، به کمک میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی بافت‌شناسی قرار گرفتند.

باتوجه به کیفیت و کمیت داده‌ها، نوع آمار مورد استفاده متغیر خواهد بود. ابتدا از آمار توصیفی جهت نشان دادن توزیع داده‌ها استفاده می‌شود. در داده‌های پارامتریک ابتدا بعد از تعیین همگن بودن جامعه و واریانس‌ها توسط آزمون کولموگروف-اسمیرنوف (K-S) برای تعیین اختلاف بین گروه‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (Anova) و آزمون تعقیبی Tukey استفاده گردید. در کلیه مراحل ضریب معنی‌داری ۰/۰۵ لحاظ شد.

نتایج

نمونه‌های به‌دست آمده از گروه کنترل نشان‌دهنده ویژگی‌های نرمال سلول‌های هیپاتوسیتی می‌باشد. سلول‌های مذکور منظم و هسته‌های یکسان و مشخص دارند. فضای سینوزوئیدی (فلش قرمز)، ناحیه پورتال (فلش سیاه) و ورید مرکز لوبولی (فلش سفید) کاملاً طبیعی و مشخص می‌باشد. ستون‌های هیپاتوسیتی به سمت ورید مرکز لوبولی با آرایشی مرتب قرار گرفته و لوبول‌های کبدی کاملاً مشخص هستند. از هم گسیختگی و بی‌منظمی در بافت وجود ندارد (شکل ۱) شده است.



شکل ۱- مقطع بافت‌شناسی کبد موش صحرایی گروه کنترل (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و انوزین $\times 100$).

در گروه دوز غیر سمی نانوذرات طلا ستون‌های هیپاتوسیتی دارای نظم مناسب همراه با آرایش لوبولی مطلوبی می‌باشند. وریدهای مرکز لوبولی در اغلب نواحی دارای اتساع بوده و اندکی پرخونی در برخی

طبق مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۲ توسط عبدالحلیم و همکاران بر روی تغییرات هیستوپاتولوژیک کبد موش‌های صحرایی تلقیح شده با نانو ذرات شیمیایی طلا با توجه به متغیرهای سایز و مدت مواجهه با ذرات انجام دادند، دریافتند که در مقایسه با گروه کنترل، گروه‌های مواجهه یافته با این نانو ذرات شیمیایی تغییراتی را در هیپاتوسیت‌ها، فضای پورت و سینوزویدها دارند. این تغییرات به‌طور خلاصه شامل: تغییرات هیدروپیک، تغییرات چربی، انفیلتراسیون به‌وسیله سلول‌های التهابی و اتساع و احتقان ورید مرکزی بود. این آسیب‌های ساختاری و متابولیکی وارد شده به هیپاتوسیت‌ها وابسته به سایز و مدت مواجهه با نانوذرات بودند به‌طوری‌که در ذرات کوچکتر و استفاده‌های طولانی‌تر بیشتر دیده شدند. تغییرات سیتوپلاسم هیپاتوسیت‌ها و تخریب هسته‌هایشان مطرح‌کننده وجود تداخل بین نانو ذرات شیمیایی طلا با پروتئین‌ها و آنزیم‌های بافت کبد بود که منجر به ایجاد اختلال در فرآیندهای آنتی‌اکسیدانی، تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن و در نتیجه آتروفی و نکروز هیپاتوسیت‌ها شد (۱۰). مطالعه ما که بر روی تأثیر نانوذرات بیولوژیک طلا بر بافت کبد بود نیز نشان‌دهنده ایجاد تغییرات واکنش‌گر در داخل هیپاتوسیت‌ها در هر دو گروه سمی و غیرسمی و ایجاد اتساع در وریدهای مرکز لوپولی در گروه غیرسمی بود که از نظر وجود این تغییرات با مطالعه آقای عبدالحلیم و همکاران هم‌خوانی نسبی داشت. ولی در مطالعه ما هیچ تغییری در هسته هیپاتوسیت‌ها و ارتشاحات التهابی رؤیت نشد که این می‌تواند مطرح‌کننده مزیت نانوذرات تولید شده به روش بیولوژیک نسبت به نانوذرات تولیدی به روش شیمیایی باشد.

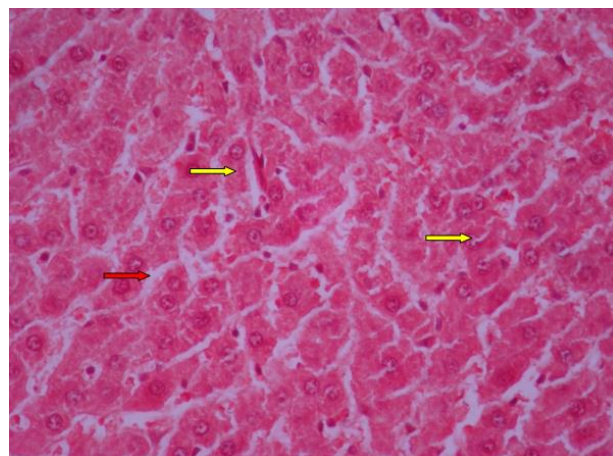
در سال ۲۰۱۳ آقای عبدالحلیم و همکاران با تحقیق بر روی تأثیر نانو ذرات شیمیایی طلا بر روی کبد و کلیه به نتایج ذیل دست یافتند:

۱- سطح (Aspartate aminotransferase) AST در موش‌های صحرایی که نانو ذرات ۱۰ و ۵۰ نانومتر را دریافت کرده بودند در مقایسه با گروه کنترل افزایش داشت و این افزایش در گروه دریافت‌کننده نانو ذرات ۱۰nm در مقایسه با نانو ذرات ۵۰nm بیشتر بود.

۲- میزان (Alanine aminotransferase) ALT و GGT (Gamma-glutamyl transferase) در گروه‌های دریافت‌کننده نانو ذرات، نسبت به گروه کنترل کاهش نشان داد که این کاهش در گروه دریافت‌کننده نانو ذرات ۵۰nm در مقایسه با ۱۰nm بیشتر بود (گروه دریافت‌کننده ذرات ۱۰nm کاهش بیشتری را نشان دادند).

۳- میزان (Alkaline phosphatase) ALP نیز در گروه‌های دریافت‌کننده نانو ذرات، کاهش داشت که این کاهش در گروه دریافت‌کننده ذرات ۱۰nm بیشتر از ۵۰nm بود (۱۷). نتایج حاصل از پژوهش ما نیز مطرح نمود که:

۱- سطح AST در هر دو گروه در مقایسه با گروه کنترل بدون تغییر بوده که از این نظر با مطالعه مذکور هم‌خوانی ندارد.



شکل ۳- مقطع بافت‌شناسی کبد موش صحرایی گروه دوز سمی نانوذرات طلا (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین $\times 400$).

بحث

باتوجه به اینکه تا کنون مطالعه‌ای مبنی بر اثرات سمیت سلولی نانوذرات بیولوژیک طلا تولید شده به‌وسیله میکروارگانسیم‌ها در بدن موجود زنده وجود نداشته و اکثر مطالعات موجود بر روی نانوذرات طلا تولید شده به روش شیمیایی بوده و کمتر به نانوذرات تولیدی به روش زیستی پرداخته شده است، در مطالعه حاضر به بررسی تأثیرات احتمالی نانوذرات بیولوژیک سنتز شده به‌وسیله باکتری *Bacillus cereus* بر بافت کبد موش صحرایی نژاد ویستار پرداخته شد.

جهت انجام این تحقیق ابتدا نانوذرات طلای بیوسنتز شده به‌وسیله باکتری *Bacillus cereus* از مرکز تحقیقات پژوهش‌گده زکریای مشهد تهیه شد.

همان‌طور که در فصل سوم بیان شد دوز مناسب نانوذرات جهت تزریق در هر گروه با بهره‌گیری از پایان‌نامه خانم رضایی تعیین گردید؛ بر این اساس از رقت ۱/۱۲۸ به‌عنوان دوز غیرسمی و از رقت ۱/۳۲ به‌عنوان دوز سمی نانوذرات بیولوژیک استفاده شد.

هیپاتوسیت سلول پارانسیم کبد بوده که اکثراً دارای یک و یا دو هسته می‌باشند. هسته سلول یوکروماتین و روشن و سیتوپلاسم تیره بوده که نشان‌دهنده فعالیت پروتئین‌سازی و سنتز مواد می‌باشد. هیپاتوسیت‌ها سلول‌هایی هستند که در ساخت پروتئین‌های اصلی خون مانند آلبومین، فیبرینوژن و همچنین متابولیسم کربوهیدرات‌ها، لیپوپروتئین‌ها، چربی‌ها و همچنین در سمیت‌زدایی مواد نقش اصلی را دارند. بنابراین این سلول‌ها در تماس با مواد مختلف از قبیل مواد سمی و غیر سمی جلوه‌های مختلفی از خود نشان می‌دهند (۱۶).

باتوجه به اینکه نانوذرات طلا پس از ورود به بدن در داخل کبد که یکی از بافت‌های اصلی بدن در سمیت‌زدایی و خنثی‌سازی می‌باشد، تجمع خواهند یافت، در مطالعه حاضر به بررسی تأثیر نانوذرات بیوسنتز شده بر روی بافت کبد پرداخته شد.

سمیت نانوذرات بر روی موش‌های سوری بررسی گردید. در این پژوهش از نانوذرات طلای کروی با سایز ۱۰ nm و غلظت ۲۰۰ ppm، استفاده شد و خواص آنتی‌باکتریایی این نانوذرات طی زمان‌های یک تا سه روز، تحت دمای ۳۷ درجه مورد ارزیابی قرار گرفت و قطر هاله عدم رشد هر روز بررسی گردید که طی نتایج حاصل شده بیشترین میانگین قطر هاله عدم رشد در *Escherichia coli* مقاوم به آنتی‌بیوتیک وجود داشت. بخش دیگر این تحقیق بر روی بافت و آنزیم‌های کبدی موش‌های سوری آزمایشگاهی بود که به این منظور موش‌های سوری به دو گروه شاهد و تیمار تقسیم شدند و نانوذرات کروی شکل به اندازه ۱۰ nm و غلظتی برابر ۱۰۰ ppm به صورت یک روز در میان، به مدت ۶ روز، به صورت درون صفاقی به موش‌های سوری تزریق شد. نتایج حاصل از بررسی موش‌های سوری بیانگر عدم ایجاد تغییرات و اختلالات محسوس بر روی وزن، میزان آنزیم‌های کبدی و بافت کبد در رقت‌های مذکور از نانوذرات با مشخصات ذکر شده، پس از سپری شدن یک ماه بود (۲۰) که نتایج حاصل از بخش هیستوپاتولوژیک و آنزیم‌های کبدی این پژوهش با مطالعه ما هم‌خوانی داشت.

بر اساس نتایج حاصل از مطالعه کنونی نانوذرات طلا در کل دارای خواص سمیت سلولی اندکی بر بافت کبد می‌باشند که این سمیت وابسته به دوز نانوذرات بوده است. در نتیجه می‌توان از نانوذرات مذکور با دوزهای غیر سمی در بدن استفاده نمود. با این حال باید به این نکته نیز توجه داشت که چنانچه هدف از استفاده از نانوذرات تولیدی به‌روش بیولوژیک جهت مصارف دارورسانی و درمان باشد، باید نانوذرات در حجم خاص حداقلی جهت تأثیر استفاده شوند. لذا مطالعات بیشتری در بدن لازم است تا دوز مورد استفاده در پزشکی را تعیین نمود و همچنین باید به بررسی تأثیر این نانوذرات روی سایر ارگان‌های بدن نیز پرداخت تا بتوان این نانوذرات را با اطمینان و با حداقل دوز مؤثر مناسب استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر حاصل پایان‌نامه خانم سحر باخرد با عنوان "بررسی اثرات احتمالی نانو ذرات بیولوژیک طلای تولید شده به‌وسیله باکتری *Bacillus cereus* بر ساختار و عملکرد کبد موش صحرائی"، در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شاهرود می‌باشد.

References

1. Kumar SA, Abyaneh MK, Gosavi SW, Kulkarni SK, Ahmad A, Khan MI. Sulfite reductase-mediated synthesis of gold nanoparticles capped with phytochelatin. *Biotechnol Appl Biochem* 2007;47:191-5. doi:10.1042/BA20060205
2. Harrison RM, Ping Shi J, Xi S, Khan A, Mark D, Kinnersley R, Yin J. Measurement of number mass and size distribution of particles in the atmosphere. *Land* 2002;358:2567-80. doi:10.1098/rsta.2000.0669
3. Heydarnejad MS, Jafarzadeh R, kabiri M. A survey of acute histopathological effects of silver nanoparticles on liver, kidney with blood cells during oral administration in male mice (*Mus musculus*). *J Shahrekord Univ Med Sci* 2015;17:97-107.

۲- سطح ALT در هر دو گروه در مقایسه با گروه کنترل بدون تغییر بوده که از این نظر نیز با مطالعه مذکور هم‌خوانی ندارد.

۳- سطح ALP در هر دو گروه در مقایسه با گروه کنترل بدون تغییر بود که از این نظر با مطالعه مذکور نیز هم‌خوانی نداشته و می‌تواند مطرح کننده تفاوت تأثیر نانوذرات سنتز شده به روش شیمیایی بر روی ارگان‌های تولیدکننده ALP از قبیل مجاری صفراوی، غدد بزاقی، روده کوچک و غیره نسبت به نانوذرات تولیدی به روش بیولوژیک باشد.

در سال ۲۰۰۹ آقای چن و همکاران طی پژوهشی بر آثار توکسیک نانوذرات شیمیایی طلا با سایزهای متفاوت در بدن موش صحرائی پرداختند. بدین منظور از تزریق داخل صفاقی نانوذرات به سایزهای ۳۷nm، ۵۰ nm، ۷۰ nm، ۱۰۰ nm و ۱۲۰ nm دوز ۸ mg/kg در هفته استفاده کردند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد موش‌های صحرائی که نانوذرات با سایز ۸ تا ۳۷nm را دریافت کرده‌اند علائمی مبنی بر مسمومیت را بروز دادند که این علائم شامل خستگی، کاهش اشتها، تغییر رنگ قهوه‌ای موها، راش و کبودی در پوست، کاهش وزن و خمیده شدن ستون فقرات بود. علاوه بر این تعداد زیادی از موش‌های صحرائی این گروه طی ۴ هفته از زمان شروع آزمایش دچار مرگ شدند. در حالیکه گروه دریافت کننده نانوذرات ۳،۵۵۰ و ۱۰۰ nm فاقد هرگونه علائمی مبنی بر مسمومیت بودند و در طول پژوهش قابلیت حیات خود را حفظ کردند. مطالعات هیستوپاتولوژیک بر روی ارگان‌های اصلی گروه مسموم شده نشان دهنده افزایش در تعداد سلول‌های کوپفر کبدی، کاهش انسجام بافتی در ریه و پخش شدگی پالپ سفید طحال بود. در پژوهش ما از نانوذرات طلا با اندازه‌ای در محدوده ۵۰ تا ۷۰ نانومتر استفاده شد که نتایج حاصل مبنی بر عدم بروز علائمی دال بر مسمومیت و همچنین کاهش عمر موش‌های صحرائی بود که با نتایج حاصل از نانوذرات شیمیایی با اندازه ۵۰ نانومتر در مطالعه آقای Chen و همکاران هم‌خوانی دارد (۱۸).

در سال ۲۰۱۲ خانم Dragon و همکاران بر روی اثر توکسیسیته نانوذرات طلا بر کبد موش صحرائی پرداختند و دریافتند نانوذرات در عرض ۳۰ دقیقه در داخل وزیکول‌های اندوسیتیک هیاتوسیت‌ها ظاهر شده و بعد از دو ساعت، در داخل سلول‌های اندوتلیال و کوپفر نیز ظاهر می‌شوند (۱۹) که باتوجه به عدم‌دخیل بودن زمان در مطالعه ما، نتایج مطالعه حاضر با پژوهش ایشان قابل قیاس نمی‌باشد.

در سال ۲۰۱۶ خانم ترابی و همکاران به بررسی اثرات آنتی‌میکروبیال نانوذرات طلا بر روی باکتری‌های *Escherichia coli* و *Klebsiella pneumoniae* مقاوم به چندین آنتی‌بیوتیک و تأثیر آن بر روی کبد موش‌های سوری پرداختند. در این پژوهش از باکتری‌های *Escherichia coli* و *Klebsiella pneumoniae* مقاوم به دارو، که از نمونه‌های بالینی از چندین بیمارستان در اصفهان جداسازی شده بود استفاده و سپس اثر

4. Arbabi S, Bayrami A, Sheidaii P. An Investigation of the Toxicity of Zinc Oxide and Titanium Oxide Nanoparticles on Some Liver Enzymes in Male Mice. *JRUMS* 2017;16:633-644.
5. Pal A. Photochemical synthesis of gold nanoparticles via controlled nucleation using a bioactive molecule. *Materials Letters* 2004;58:529-34
6. Huang X, Qian W, El-Sayed IH, El-Sayed MA. The potential use of the enhanced nonlinear properties of gold nanospheres in photothermal cancer therapy. *Lasers Surg Med* 2007;39:747-53. doi:10.1002/lsm.20577
7. Jia HY, Liu Y, Zhang XJ, Han L, Du LB, Tian Q, et al. Potential oxidativestress of gold nanoparticles by induced,NO releasing in serum. *J Am Chem Soc* 2009;131:40-1. doi:10.1021/ja808033w
8. Noori A, Ghasami Z. Effect of Gold nanoparticles on Balb/c mice kidneys. *Feyz* 2013;16:639-40.
9. Pourali P, Yahyaei B. Effect of Silver Nanoparticles Produced by *Paenibacillus* on Rat Cutaneous Wound Healing . *J Mazandaran Univ Med Sci* 2018;28:107-112.
10. Abdelhalim MA, Jarrar BM. Histological alteration's in the liver of rats indused by different gold nanoparticle sizes,doses and explor duration. *J Nanobiotechnology* 2012;10:5. doi:10.1186/1477-3155-10-5
11. Johnson EF, Stout CD. Structural diversity of eukaryotic membrane cytochrome P450s. *J Biol Chem* 2013;288:17082-90. doi:10.1074/jbc.R113.452805
12. Gebhardt, R (1996) Special issue on international congress on hepatocytes applications in cell biology, toxicology and medicine. *Cell Biol Toxicol.* p.1-65.
13. Rezaei A, Pourali P, Yahyaei B. Assessment of the cytotoxicity of gold nanoparticles produced by *Bacillus cereus* on hepatocyte and fibroblast cell lines. *Journal of Cellular and Molecular Researches* 2016;29:291-301.[Persian].
14. Aravinthan A, Kamala-Kannan S, Govarthanam M, Kim JH. Accumulation of biosynthesized gold nanoparticles and its impact on various organs of Sprague Dawley rats: a systematic study.*Toxicology Research* 2016.
15. Zhang XD, Wu HY, Wu D, Wang YY, Chang JH, Zhai ZB. Toxicologic effects of gold nanoparticles in vivo by different administration routes. *Int J Nanomedicine* 2010;5:771-81. doi:10.2147/IJN.S8428
16. Abdelhalim MA. Uptake of gold nanoparticles in several rat organs after intraperitoneal administration in vivo: a fluorescence study. *Biomed Res Int* 2013;013:353695. doi:10.1155/2013/353695
17. Abdehhalim MA, Abdelmottaleb Moussa SA. The gold nanoparticle size and exposure duration effect on the liver and kidney function of rats: In vivo. *Saudi J Biol Sci* 2013;20, 177-81
18. Chen YS, Hung YC, Liao L, Huang GS. Assessment of the in vivo toxicity of gold nanoparticles. *Nanoscale Res Lett* 2009;4:858-64. doi:10.1007/s11671-009-9334-6
19. Dragoni S, Franco G, Regoli M, Bracciali M, Morandi V, Sgaragli G, et al. Gold nanoparticles uptake and cytotoxicity assessed on rat liver precision-cut slices. *Toxicol Sci* 2012;128L:186-97. doi:10.1093/toxsci/kfs150
20. Rahimzade Torabi L, Doudi M, Noori A. Antibacterial effects of gold nanoparticles on multi-sdrug resistant *klebsiella pneumoniae* and *escherichia coli* and its effect on the liver of balb/c mice. *J Shahid Sadoughi Univ Med Sci* 2016;23:1001-17.



Study of the Possible Effects of the Biologically Produced Gold Nanoparticles by *Bacillus Cereus* on the Function and Structure of the Rat's Liver

Behrooz Yahyaei (Ph.D)^{1,2}, Parastoo Pourali (Ph.D)^{1,2}, Sahar Bakherad (MD)^{1,2}

1- Dept. of Basic Sciences, Faculty of Medical Sciences, Shahrood Branch, Islamic Azad University, Shahrood, Iran.

2- Biological Nanoparticles in Medicine Research center, Shahrood Branch, Islamic Azad University, Shahrood, Iran.

Received: 13 October 2018, Accepted: 31 November 2018

Abstract:

Introduction: Due to the importance of using nanoparticles in the diseases treatment and diagnosing, it is important to obtain nanoparticles that are more compatible with the body. Because, the biological synthesis of gold nanoparticles is new and novel filed, there is little information on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of these particles. Therefore, the present study was conducted to evaluate the possible effects of biological nanoparticles on rat liver.

Methods: The nanoparticles were examined on 15 male Wistar rats. For this purpose, the rats were first divided into 3 groups and after two stages of injection of the nanoparticles by intraperitoneal method, their liver was studied by optical microscope. Blood samples from rats collected for biochemical studies.

Results: According to the results of the study, in both groups receiving toxic and non-toxic nanoparticles, hepatocyte cells had varicose veins. Additionally, in the recipient group, the doses of sinusoid have a slight distension and hyperemia.

Conclusion: Nanoparticles of biological gold have a low toxicity effect on liver tissue in dose dependent manner.

Keyword: Biological Gold nanoaprticles, rat, liver, Bacillus cereus.

Conflict of Interest: No

*Corresponding author: B.Yahyaei, Email: behroozyahyaei@yahoo.com

Citation: Yahyaei B, Pourali P, Bakherad S. Study of the possible effects of the biologically produced gold nanoparticles by Bacillus cereus on the function and structure of the rat's liver. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2019;13 (4):3-10.