

Effects of Silver Nanoparticle on Phosphocreatine kinase and Histological Changes of Skeletal Muscle Tissue in Male Wistar Rat

Samaneh Khodadadi,
Nooshin Naghsh,
Amirmasoud Mashayekh

Department of Biology, Islamic Azad University, Flavarjan Branch, Isfahan, Iran

(Received September 19, 2012 ; Accepted December 2, 2012)

Abstract

Background and purpose: Nanotechnology researchers have identified a wide range of nanoparticle uses that may have an important role in medicine, prevention and treatment of diseases. Paucity of information on toxicity of silver nanoparticles made the authors to evaluate the effect of silver nanoparticles on the enzyme creatine phosphate kinase.

Materials and methods: In this study, 40 adult male Wistar rats with average weight of 220 ± 20 gr were injected with 50, 100, 200, and 400 PPM of nanosilver particle in five consecutive days. Then three, eight and twelve days after the last injection, blood sampling was performed and skeletal tissue samples from the muscle were stained using hematoxylin-eosin. To investigate the effect of nanosilver on Phospho creatin kinase ANOVA was used in different days.

Results: Different concentrations of silver nanoparticles has no significant effect on the phospho creatin kinase activity ($P=0.841$), but the effect of time was apparent on this activity ($P=0.005$). In fact the mean of the phospho creatin kinase activity increased in all concentrations of nanosilver after eight days. Histological changes were also occurred in 400 PPM doses of silver nanoparticles.

Conclusion: Development of nanotechnology has increased its use in cosmetic and medical supplies. So precautions are needed when using appliances containing silvre nanoparticle.

Keywords: Silver nanoparticle, phospho creatin kinase, muscle tissue

J Mazand Univ Med Sci 2013; 23(97): 34-39 (Persian).

تأثیر نانوذرات نقره بر فعالیت آنزیم فسفوکراتین کیناز و تغییرات بافت عضله موش‌های بزرگ آزمایشگاهی

سمانه خدادادی

نوشین نقش

امیر مسعود مشایخ

چکیده

سابقه و هدف: محققان نانوتکنولوژی ابعاد وسیعی از کاربرد نانوذرات را شناسایی کرده‌اند که ممکن است نقش مهمی در درمان بیماری‌ها داشته باشد. با توجه به عدم وجود مستندات دقیق درباره سمیت نانو ذرات نقره این تحقیق با هدف بررسی تأثیر نانوذرات نقره بر آنزیم فسفوکراتین کیناز صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه کلونید نانو نقره با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ PPM به رت‌های نر ویستار در پنج روز متوالی تزریق و سپس خونگیری انجام شد و نمونه بافتی تهیه شده از عضله اسکلتی با هماتوکسیلین-ائوزین رنگ آمیزی شد. برای بررسی تأثیر نانو نقره بر فعالیت آنزیم فسفوکراتین کیناز در روزهای مختلف از آزمون آماری استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره بر روی فعالیت آنزیم فسفوکراتین کیناز تأثیر معنی‌دار ندارد ($p=0/841$) اما اثر زمان بر فعالیت آنزیم فسفوکراتین کیناز مؤثر است ($p=0/005$) به طوری که در روز هشتم بعد از تیمار در همه غلظت‌های نانو ذرات نقره میانگین فعالیت آنزیم فسفوکراتین کیناز افزایش یافته است. تغییرات بافتی در دوز ۴۰۰ PPM از نانو ذرات نقره نیز رخ داد.

استنتاج: گسترش نانوتکنولوژی در دنیای امروز و استفاده از آن در ساخت لوازم پزشکی و لوازم خانگی بر کسی پوشیده نیست. بنابراین تعمیم نتایج این مطالعه می‌تواند در مورد آسیب‌های عضلانی انسان در زمینه پزشکی مورد استفاده قرار گیرد لذا باید در استفاده از لوازم حاوی نانو نقره احتیاط فراوانی به عمل آید.

واژه‌های کلیدی: نانو ذرات نقره، فسفوکراتین کیناز، بافت عضله اسکلتی

مقدمه

فعالیت زیاد است. به دلیل این ویژگی‌های خاص مواد به شکل نانو ممکن است نسبت به مواد شیمیایی حجیم فواید بیشتری داشته باشند (۱). نانو تکنولوژی به سرعت در حال توسعه است و در حوزه‌هایی از قبیل سلامتی، لوازم آرایشی بهداشتی، مواد غذایی و حتی اسباب بازی‌ها

نانو تکنولوژی با تفاوت‌های ساختاری بین یک تا صد نانومتر سر و کار دارد. اندازه نانو به ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاصی منجر می‌شود که ممکن است با ذرات با اندازه بزرگ‌تر متفاوت باشد و این اثرات اساساً باعث افزایش نسبت سطح به حجم شده که نتیجه آن

E-mail: sama_khodadadi@yahoo.com

مؤلف مسئول: سمانه خدادادی - اصفهان: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان

گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۶/۲۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۱/۷/۲۲ تاریخ تصویب: ۱۳۹۱/۹/۱۲

استفاده می‌شود (۲۰۱). هنگامی که یک جسم ماکروسکوپی به نانو ذرات تبدیل می‌شود خواص فیزیکی و شیمیایی آن تا حد زیادی با مواد طبیعی فرق می‌کند (۳). نانو ذرات نقره اغلب کوچک‌تر از صد نانومتر و شامل ۱۵ تا ۲۰ هزار اتم نقره می‌باشند. نانوذراتی مثل نقره ممکن است شکل‌های متفاوتی از قبیل کروی، میله‌ای و مکعبی داشته باشند. در مقایسه با انواع نانو ذرات، ذرات نقره خواص فیزیکوشیمیایی متفاوتی نشان می‌دهد و فعالیت بیولوژیک آن‌ها با فلزات مقایسه و نسبت سطح به حجم بالا به آن‌ها اجازه می‌دهد به مقادیر بزرگ‌تری با محیط در تقابل باشند (۱). نانو نقره به عنوان ماده‌ای با سمیت زیاد در مقایسه با دیگر مواد گزارش شده است سمیت سلولی نانونقره با تولید گونه‌های آزاد اکسیژن همراه است. بسیاری از مطالعات آزمایشگاهی (In vitro) وابسته به دوز بودن آن را نشان داده‌اند، جایی که دوز نقره بالا باشد سمیت سلولی کاهش پیدا می‌کند. در مقابل تحقیقات صورت گرفته محیطی، غلظت آزمایشگاهی نانوذرات اغلب بیشتر و ذرات از طریق محیط کشت به سلول تحویل داده می‌شوند. در حال حاضر هیچ همبستگی مستقیمی بین مارکرهای بیولوژیک در داخل بدن (In vivo) و مطالعات آزمایشگاهی به دلیل پیچیدگی محیط داخلی بدن و تک بودن سلول در محیط کشت وجود ندارد (۴). با توجه به سمیت نقره مطالعات بیشتری روی استرس اکسیداتیو آن انجام شد. بیشتر مطالعات کاهش فعالیت سلولی در طول احیاء گلو تاتیون، آسیب میتو کندری و غشاء سلولی از قبیل افزایش سطوح آنزیم‌های کبدی به دنبال استفاده از باند پوشیده شده با نانو نقره را نشان دادند (۳،۲). از طرفی کراتین کیناز آنزیمی با وزن مولکولی ۸۲ کیلو دالتون که به طور اساسی در بازسازی آدنوزین تری فسفات (ATP) در سیستم‌های انقباضی و انتقالی فعالیت می‌نماید، واکنش برگشت پذیر انتقال فسفات را از آدنوزین تری فسفات به کراتین و در نتیجه تولید فسفو کراتین را کاتالیز می‌نماید. فسفو کراتین اولین بار در بافت عضلانی شناسایی شد و به عنوان منبع شیمیایی تأمین کننده انرژی

برای انقباض عضله مطرح شد. کراتین کیناز دارای یک شکل دایمر بوده که در سه نوع عضلانی، مغزی و قلبی - عضلانی در بافت‌های پستانداران یافت می‌شود (۵). از طرفی کراتین کیناز نقش محوری در متابولیسم انرژی بافت‌های مختلف از جمله مغز، عضلات اسکلتی و قلب را ایفاء می‌نماید و عملکرد آن به عنوان یک سیستم بافری برای سطوح ATP است. این آنزیم انتقال برگشت پذیر گروه فسفریل از فسفو کراتین به آدنوزین دی فسفات و تولید آدنوزین تری فسفات را کاتالیز می‌کند. دانشمندان معتقدند که در یک سلول طی تحریک میزان تولید تا ده برابر افزایش می‌یابد و در حین این تکرارها (تغییرات کراتین به فسفو کراتین) وجود سیستم کراتین کیناز به عنوان یک سیستم بافری انرژی برای جلوگیری از نوسانات بزرگ سطوح ATP/ADP سلولی در بافت تحریک شده ضروری است (۶). مهار فعالیت کراتین کیناز در عضله اسکلتی منجر به ناهنجاری‌های انقباضی مهم، همچنین تغییرات در اندازه سلول‌های عضلانی می‌شود (۶). مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که ناهنجاری در متابولیسم انرژی منجر به تخریب سلول می‌شود (۷). با توجه به کاربرد وسیع نانوذرات نقره و جدید بودن تحقیقات در زمینه نانوبیوتکنولوژی و تأثیرات قطر و اندازه نانوذرات در خواص آن‌ها، هدف این مطالعه بررسی اثرات نانوذرات نسل اول نقره به صورت کلوئیدی، کروی و با قطر ۴ Nm (۸) بر میزان تغییرات آنزیم فسفو کراتین کیناز به عنوان شاخص آسیب عضلانی (۹) بر رت‌های بزرگ آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی از ۴۰ سر رت نر بالغ از نژاد ویستار استفاده شد که میانگین وزن آن‌ها در روز شروع ۲۰ ± ۲۲۵ گرم بود (۸). علت انتخاب رت‌های نر به دلیل ساده‌تر بودن سیستم هورمونی و نیز تداخل کمتر هورمون‌های جنسی با نانوذرات نقره بود (۱۰). محلول کلوئیدی نانو ذرات نقره با میانگین قطر ۴ Nm به

یافته‌ها

داده‌های به دست آمده برای هر گروه در جداول از پیش تعیین شده و با استفاده از نرم افزار SPSS 17 و آزمون آنالیز واریانس دوطرفه (Two Way ANOVA) تجزیه و تحلیل شد ($p < 0.05$). پس از مشاهده نتایج هیچ یک از دوزها و زمان‌ها تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های تیمار با گروه کنترل نشان نداد اما در مجموع میانگین فعالیت این آنزیم در روز هشتم بعد از تیمار در تمام گروه‌های آزمایشی افزایش معنی‌داری داشته که مستقل از تأثیرات نانو ذرات نقره می‌باشد (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: میانگین فعالیت فسفوکراتین کیناز و p-value به تفکیک گروه‌ها و روزهای مختلف

| گروه | انحراف معیار \pm میانگین | سطح معنی داری |
|---------|----------------------------|---------------|
| کنترل | | |
| ۳ | $50.8/250 \pm 395/624$ | |
| ۸ | $30.5/654 \pm 913/085$ | ۰/۸۴۱ |
| ۱۲ | $540/827 \pm 443/002$ | |
| PPm ۵۰ | | |
| ۳ | $625 \pm 116/496$ | |
| ۸ | $842/708 \pm 504/878$ | ۰/۵۹۲ |
| ۱۲ | $686/042 \pm 106/967$ | |
| PPm ۱۰۰ | | |
| ۳ | $625 \pm 243/486$ | |
| ۸ | $968/465 \pm 133/450$ | ۰/۳۳۷ |
| ۱۲ | $335/705 \pm 301/645$ | |
| PPm ۲۰۰ | | |
| ۳ | $575 \pm 231/455$ | |
| ۸ | $505/1045 \pm 167/074$ | ۰/۱۱۲ |
| ۱۲ | $650/618 \pm 237/840$ | |
| PPm ۴۰۰ | | |
| ۳ | $275/600 \pm 338/205$ | |
| ۸ | $542/960 \pm 151/691$ | ۰/۰۹۸ |
| ۱۲ | $950/627 \pm 353/647$ | |

در بررسی هیستولوژیک بافت عضله اسکلتی شاهد به هم ریختن نظم هسته‌ها و فیبرها بودیم به طوری که فیبرها کاملاً از هم باز شده اما در نقاط زیادی ساختمان میوفیبریل‌ها که مختط شدن عرضی باشد، خیلی آسیب ندید (تصویر شماره ۱).

شکل گروهی از شرکت نانو نسب پارس با نام تجاری نانوسید تهیه شد. در ابتدا غلظت‌های مورد نظر از کلوتید نانونقره به وسیله آب مقطر دیونیزه و با روش سری رقت (Serial Dilution) تهیه شد (۱۱). سپس در شرایط استریل ۱ cc از نانونقره در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ PPm به صورت داخل صفاقی به هر رت تزریق شد (۸). درجه حرارت محیط در زمان انجام آزمایش $25 \pm 2^\circ C$ در تمام طول شبانه روز بود. در این تحقیق حیوانات مورد استفاده به پنج گروه هشت‌تایی (۸) به شرح زیر تقسیم شدند:

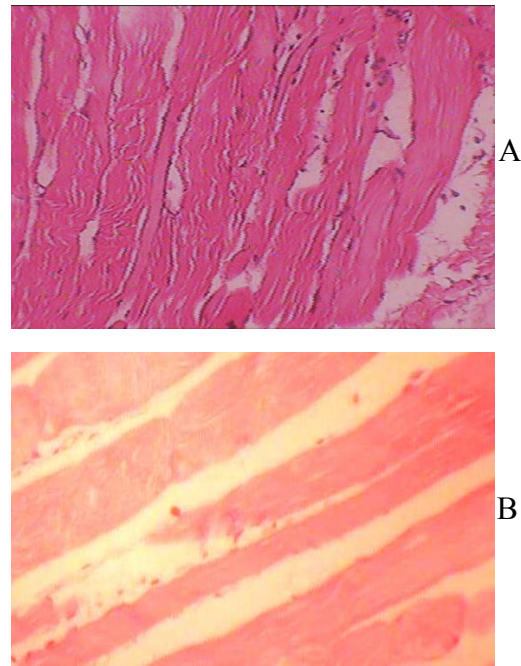
گروه کنترل:

حیوانات این گروه بدون هیچ گونه محدودیتی و به اندازه کافی از آب و غذای فشرده استفاده کردند. علاوه بر این مانند گروه‌های تجربی دیگر برای یکسان بودن شرایط یعنی القاء اثر شوک ناشی از تزریق ۱ cc آب مقطر به هر یک از آن‌ها تزریق شد (۸).

گروه‌های تجربی:

۴ گروه تجربی تیمار با نانوذرات نقره به ترتیب دریافت کننده مقدار ۱ cc نانونقره با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ PPm بودند به طوری که به هر رت ۱ cc نانونقره روزی یک بار در پنج روز متوالی به صورت درون صفاقی تزریق شد. سپس سه، هشت و دوازده روز پس از آخرین تزریق خونگیری از گوشه داخلی چشم انجام شد (۸). نمونه‌های خونی به وسیله دستگاه سانتریفیوژ (Sahand TA) با دور ۳/۰۰۰ به مدت بیست دقیقه سانتریفیوژ شد و سرم آن‌ها جدا گردید و اندازه گیری آنزیم فسفوکراتین کیناز توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Ral ساخت اسپانیا) در جذب نوری ۳۴۰ Nm انجام شد. در پایان دوره خونگیری از بافت عضله اسکلتی رت‌ها نمونه بافتی جدا گردید و در فرمالین ۱۰ درصد فیکس شد سپس نمونه‌ها پس از طی مراحل پاساژ بافت و برش با میکروتوم روی لام قرار گرفته، جهت بررسی با هماتوکسیلین-ائوزین رنگ آمیزی شدند (۱۲).

که تأثیر نانو ذرات نقره با افزایش غلظت کاهش می‌یابد. Da Silva Paula در مشاهدات خود پیشنهاد می‌کند که ممکن است نانو ذرات نقره با مکانیسم‌های متنوعی باعث آسیب به سلول‌های مختلف شوند (۶). از طرفی Andre و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند بسیاری پارامترها شامل یونیزاسیون، شکل، اندازه و ساختار کریستالی در توزیع سمیت نانو ذرات مؤثر می‌باشند. در نتیجه نانو ذرات نقره کروی با قطر ۴ Nm موجب تغییر در میزان آنزیم فسفو کراتین کیناز نمی‌شود اما از طرفی مطالعات بافتی بیشترین تغییرات را در دوز ۴۰۰ PPM نشان دادند، بدین مفهوم که بیشترین تغییر بافتی در بالاترین دوز از نانو ذرات نقره بوده است (۱۳). Almofiti و همکاران (۲۰۰۳) پیشنهاد دادند که به نظر می‌رسد نانو ذرات نقره باعث تغییرات غشاء میتوکندری از طریق واکنش با گروه تیول در غشاء داخلی آن می‌شوند. همچنین تحقیقات اخیر نشان داده‌اند که نانو ذرات نقره تأثیرات ضد میکروبی خود را نیز از طریق واکنش با گروه‌های تیول پروتئین‌ها اعمال می‌کنند (۱۴). همچنین کاهش فعالیت کراتین کیناز ممکن است به آسیب هومئوستازی انرژی و مرگ سلولی منجر شود. مطابق جدول شماره ۲ در روزهای مختلف میانگین فعالیت کراتین کیناز افزایش دارد که این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نیست؛ احتمالاً دلیل این عدم تأثیر، از دست دادن خاصیت نانو در غلظت‌های بالا به علت چسبیدن این ذرات به یکدیگر پس از هشت روز و از دست دادن خواص نانویی آن‌ها در بدن موش در روز دوازدهم می‌باشد. گسترش نانو تکنولوژی در دنیای امروز بر کسی پوشیده نیست بنابراین تعمیم نتایج این مطالعه می‌تواند در مورد انسان در زمینه پزشکی مورد استفاده قرار گیرد. در این تحقیق تغییرات بافتی در دوز ۴۰۰ PPM از نانو ذرات نقره در رت‌های نر رخ داد. با توجه به شباهت مکانیسم‌های داخلی و سلولی موش و انسان به یکدیگر احتمال تغییرات مشابهی در این زمینه برای انسان نیز وجود دارد. با توجه به کاربرد وسیع نانو ذرات نقره در



تصویر شماره ۱: مقایسه برش طولی بافت عضله اسکلتی در گروه کنترل (A) با گروه تیمار شده با دوز ۴۰۰ PPM (B)

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که در هیچ یک از دوزها و زمان‌ها تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های تیمار و گروه کنترل وجود ندارد اما در دوز ۴۰۰ PPM از نانو ذرات نقره بیشترین تأثیر بافتی بر عضلات رت‌های نر دیده شد (تصویر شماره ۱). با توجه به تغییر خواص فیزیولوژیک نانو ذرات با تغییر شکل و دوز می‌توان نتیجه گرفت در این تحقیق احتمال به هم چسبیدن نانو ذرات نقره در داخل بدن و تشکیل بالک وجود داشته، از اثرات آن کاسته است. Da Silva Paula و همکاران (۲۰۰۹) با انجام آزمایشاتی مبنی بر تأثیر نانو ذرات نقره بر آنزیم کراتین کیناز نشان دادند که نانو ذرات نقره با غلظت ۱۰، ۲۵، و ۵۰ mg/l باعث مهار فعالیت کراتین کیناز مغز به اندازه ۳۵ تا ۴۰ درصد و مهار فعالیت کراتین کیناز عضله اسکلتی به اندازه ۳۵ تا ۵۵ درصد می‌شود اما کراتین کیناز قلب تحت تأثیر قرار نگرفت (۶). اما در این مطالعه غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ PPM تأثیری بر میزان فعالیت این آنزیم نداشت لذا می‌توان نتیجه گرفت

سپاسگزاری

این مطالعه حاصل طرح تحقیقاتی و پایان نامه کارشناسی ارشد دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری می‌باشد. بدین وسیله از زحمات خانم دکتر منجمی و رئیس آزمایشگاه هشت بهشت اصفهان آقای دکتر آقای قزوینی تشکر و قدردانی می‌شود.

صنایع و محصولات مختلف در دنیا و در کشور ما لزوم انجام مطالعات فیزیولوژیک در غلظت‌ها و دوزهای متفاوت از نانو ذرات و بررسی ایزوآنزیم‌های مغزی، قلبی و عضله‌ای به همراه بررسی تغییرات بافتی در مدت زمان طولانی تر پیشنهاد می‌شود.

References

1. Wijnhoven SW, Peijneburg WJ, Herberts CA, Hagens WI, Oomen AG, Heugens EH, et al. Nano-silver-a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology* 2009; 3(2): 109-138.
2. Hussain SM, Schlager JJ. Safty evaluation of silver nanoparticles: inhalation model for chronic exposure. *Toxicol Sci* 2009; 108(2): 223-224.
3. Akradi L, Sohrabi Haghdooost I, Djeddi AN, Mortazavi P. Histopathologic and apoptotic effect of nanosilver in liver of broiler chickens. *African J Biotechnology* 2012; 11(22): 6207-6211.
4. Stebounova LV, Adamcakova-Dodd A, Kim JS, Park H, O'Shaughnessy PT, Grassian VH, et al. Nanosilver induces minimal lung toxicity or inflammation in a subacute murine inhalation model. *Part fibre toxicol* 2011; 8(1): 5.
5. Dawson DM, Eppenberger HM, Kaplan NO. The comparative enzymology of creatine kinases. II. Physical and chemical properties. *J Biol Chem* 1967; 242(2): 210-217.
6. Da silva paula MM, Da costa CS, Baldin MC, Scaini G, Rezin GT, Segala K, et al. In vitro effect of silver nanoparticles on creatin kinase activity. *J Braz Chem Soc* 2009; 20(8): 1556-1560.
7. Costa CS, Ronconi JV, Daufenbach JF, Gonçalves CL, Rezin GT, Streck EL, et al. In vitro effects of silver nanoparticles on the mitochondrial respiratory chain. *Mol Cell Biochem*. 2010; 342(1-2): 51-56.
8. Naghsh N, Nuri A, Aghababa H, Amirkhani-Dehkordi S. The effect of nanosilver particles on alanine aminotransferase (ALT) activity and white blood cells level in male wistar rats, in vivo condition. *Zahedan J Res Med Sci (ZJRMS)* 2012; 13(9): 1-7 (Persian).
9. Ahmadi A, Agha alinezhad H, Gharakhanlou R, Zarifi A. Study of relationship between serum interleukin 6 (IL-6) and creatine kinase (CK) changes response in active women after sub maximal eccentric and concentric exercise. *SID* 2009; 17(2): 63-72 (Persian).
10. Beirami E, Oryan Sh, Valizadegan F, Zarrindast M. Performance evaluation of interference morphine and β -adrenergic system of dorasal hippocampus on anxiety-related behavior in male wistar rat. *J Mazand Univ Med Sci* 2012; 22(91): 50-59 (Persian).
11. Naghsh N, Safari M, Hajmehrabi P. Investing the effect of silver nanoparticles on E.coli growth. *Qom Univ Med Sci* 2012; 6(2): 65-68 (Persian).
12. Akradi L, Andi MA, Naghani ES, Ahmadi F. Nephrotoxic effect of nanosilver in broiler

- chickens. J Vet Med 2011; 5(2): 25-31.
13. Nel A, Xia T, Madler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. Science 2006; 311(5761): 622-627.
14. Almofti MR, Ichikawa T, Yamashita K, Terada H, Shinorhara Y. Silver ion induces a cyclosporine a-insensitive permeability transition in rat liver mitochondria and release of apoptogenic cytochrome c. J biochem 2003; 134(1): 43-49.