

## ***A Comparative Histopathological Investigation of the Effects of ZnO/Chitosan Nanocomposites and ZnO Nanoparticles on Thioacetamide-induced Nephropathy in Rats***

Mohammad Reza Hajinezhad<sup>1</sup>,  
Abbas Jamshidian<sup>2</sup>,  
Alireza Samzadeh kermani<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Associate Professor, Department of Basic Science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran

<sup>2</sup> Assistant Professor, Department of Pthobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran

<sup>3</sup> Associate Professor, Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, University of Zabol, Zabol, Iran

(Received November 10, 2018 Accepted July 17, 2019)

### ***Abstract***

**Background and purpose:** This study compared the effects of intraperitoneal injections of ZnO/chitosan nanocomposite and ZnO nanoparticles on histopathology of kidney in thioacetamide-intoxicated rats.

**Materials and methods:** Twenty-eight male rats were randomly allocated into a healthy control group (negative control), positive control group (thioacetamide-intoxicated rats), thioacetamide-intoxicated + ZnO nanoparticles, and thioacetamide-intoxicated + ZnO/chitosan nanocomposite. Nephropathy was induced by intraperitoneal injection of thioacetamide (50 mg/kg IP) three times (24h interval). The treatment groups were treated with ZnO nanocomposites (5mg/kg) and ZnO nanoparticles (5mg/kg) intraperitoneally for four weeks. Then, serum BUN and creatinine levels were measured. Afterwards, the rats were euthanized and kidney samples were separated for histological examinations.

**Results:** There were significant increases in serum BUN and creatinine levels in thioacetamide-intoxicated rats compared to those in the control group ( $P < 0.05$ ). Compared to the control group, ZnO nanoparticles-treated group was found with significantly higher serum BUN and creatinine levels ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference between the rats treated with ZnO/chitosan nanocomposites and the positive control group in BUN and creatinine levels ( $P > 0.05$ ). In histological analysis, tubular necrosis and glomerular fibrosis were observed in treatment groups.

**Conclusion:** This study showed that ZnO nanoparticles can increase nephrotoxicity induced by thioacetamide, but, ZnO/chitosan nanocomposite had no effect on thioacetamide induced nephrotoxicity.

**Keywords:** liver, ZnO/chitosan nanoparticles, ZnO nanocomposites, kidney, rat

**J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 29(176): 189-194 (Persian).**

\* **Corresponding Author: Mohammad Reza Hajinezhad**- Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran  
(E-mail: hajinezhad@uoz.ac.ir)

# بررسی مقایسه ای هیستوپاتولوژیک اثر نانو کامپوزیت ZnO/chitosan و نانو ذرات ZnO بر نوروباتی ناشی از تیواستامید در موش صحرایی

محمد رضا حاجی نژاد<sup>۱</sup>عباس جمشیدیان<sup>۲</sup>علیرضا سام زاده کرمانی<sup>۳</sup>

## چکیده

**سابقه و هدف:** در این مطالعه اثر تجویز داخل صفاقی نانو ذرات روی اکسید (ZnO) و نانو کامپوزیت ZnO/chitosan بر هیستوپاتولوژی بافت کلیه موش‌های صحرایی مسموم شده با تیواستامید مقایسه شد.

**مواد و روش‌ها:** تعداد ۲۸ سر موش صحرایی نر به گروه‌های کنترل منفی (موش‌های سالم)، کنترل مثبت (مسموم شده با تیواستامید)، مسموم شده با تیواستامید و تیمار با نانو ذرات ZnO 5mg/kg و مسموم شده با تیواستامید و تیمار با نانو کامپوزیت ZnO/chitosan 5mg/kg تقسیم شدند. تجویز نانوذرات به مدت چهار هفته انجام شد. نوروباتی با سه تزریق تیواستامید (50 mg/kg ip) در فواصل ۲۴ ساعت القا شد. در پایان میزان BUN و کراتینین سرم سنجش شد. سپس رت‌ها آسان کشتی شده و نمونه‌های کلیه برای بررسی هیستوپاتولوژیک تهیه شد.

**یافته‌ها:** در موش‌های مسموم شده با تیواستامید افزایش معنی داری در BUN و کراتینین سرم نسبت به گروه شاهد مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). BUN و کراتینین در گروه دریافت کننده تیواستامید و تحت تیمار با نانو ذرات ZnO نسبت به گروه کنترل افزایش معنی دار نشان داد ( $P < 0/05$ ). در موش‌های گروه دریافت کننده تیواستامید و تحت تیمار با نانو کامپوزیت ZnO/chitosan سطح سرمی BUN و کراتینین تفاوت معنی داری با گروه کنترل مثبت نداشت. در بررسی‌های بافت‌شناسی در گروه کنترل مثبت و گروه‌های تحت تیمار، نکروز و فیروز گلمرولی مشاهده شد.

**استنتاج:** نتایج این بررسی نشان داد که نانوذرات ZnO سمیت کلیوی ناشی از تیواستامید را تشدید می‌کنند اما نانو کامپوزیت ZnO/chitosan اثری بر سمیت کلیوی ناشی از تیواستامید نداشت.

**واژه‌های کلیدی:** موش صحرایی، نانو کامپوزیت ZnO/Chitosan، کلیه، نانو ذرات ZnO

## مقدمه

آنها قرار گرفته و تغییر می‌کند. تغییر خواص فیزیکی و شیمیایی ماده سبب تغییر اثرات بیولوژیک یک ماده می‌شود (۲). نانو ذره روی اکسید (ZnO)، در صنایع

فناوری نانو تمام جنبه‌های صنعت و کشاورزی تا پزشکی و بهداشت را تحت تاثیر قرار داده است (۱). در علم نانو فعالیت شیمیایی مواد تحت تاثیر کاهش اندازه

E-mail: hajinezhad@uoz.ac.ir

**مؤلف مسئول:** محمد رضا حاجی نژاد - زابل: دانشگاه زابل، دانشکده دامپزشکی

۱. دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۲. استادیار، گروه علوم پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۳. دانشیار، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل، زابل، ایران

تاریخ تصویب: ۱۳۹۸/۳/۲۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۸/۱۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۷/۹/۶

ساعت دریافت کردند (۷). به موش‌های شاهد سالم نیم میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی تزریق شد. یک گروه از موش‌های مسموم شده با تیو استامید سرم فیزیولوژی دریافت کردند و دو گروه دیگر از موش‌های مسموم شده با تیو استامید به ترتیب با نانو ذرات  $5\text{mg/kg ZnO}$  و نانو کامپوزیت  $\text{ZnO/chitosan}$  تیمار شدند. دوز محلول‌ها براساس مطالعات قبلی و بررسی مقدماتی انتخاب شد (۸). در پایان از موش‌ها نمونه‌گیری شد و سرم خون جداسازی شد. BUN و کراتینین نمونه‌های سرم با دستگاه اتوآنالایزر (Selectra pro M) سنجش شد. نمونه‌های کلیه در فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفت و پس از رنگ آمیزی با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اوتوزین استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شدند (۹). برای مقایسه گروه‌های آزمایشی با همدیگر از آزمون آنوای یکطرفه و آزمون تکمیلی posthoc توکی (Tukey) استفاده شد. سطح معنی‌داری گروه‌های آزمایشی ( $P < 0/05$ ) در نظر گرفته شد.

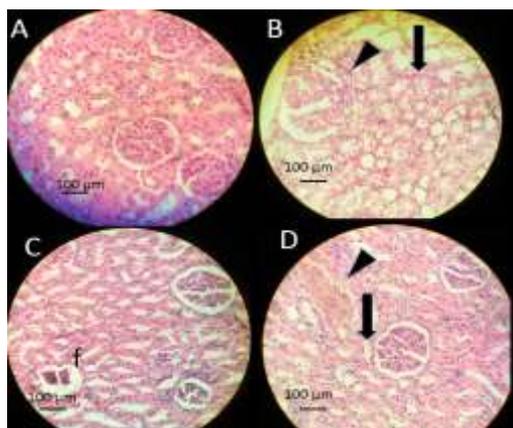
## یافته‌ها و بحث

موش‌های صحرایی مسموم شده با تیو استامید، BUN بالاتری نسبت به گروه کنترل داشتند ( $P < 0/05$ ). هم‌چنین سطح کراتینین در این گروه از گروه شاهد سالم بیش‌تر بود ( $P < 0/05$ ). BUN و کراتینین سرم موش‌های مسموم شده با تیو استامید و تحت تیمار با نانو ذرات  $\text{ZnO}$  نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار داشت ( $P < 0/05$ ). در موش‌های گروه دریافت‌کننده تیو استامید و تحت تیمار با نانو کامپوزیت  $\text{ZnO/chitosan}$ ، سطح سرمی BUN و کراتینین تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل مثبت (مسموم شده با تیو استامید بدون درمان) نداشت. سطح سرمی BUN در گروه تیمار شده با نانو ذره  $\text{ZnO}$  از گروه تیمار شده با نانو کامپوزیت  $\text{ZnO/chitosan}$  کم‌تر بود اما در بررسی آماری مشخص شد که این تفاوت معنی‌دار نمی‌باشد ( $p > 0/05$ ) میزان کراتینین سرم در گروه تیمار شده با نانو ذره  $\text{ZnO}$  تفاوت معنی‌داری با گروه تیمار شده با نانو کامپوزیت  $\text{ZnO/chitosan}$  نداشت ( $P > 0/05$ ).

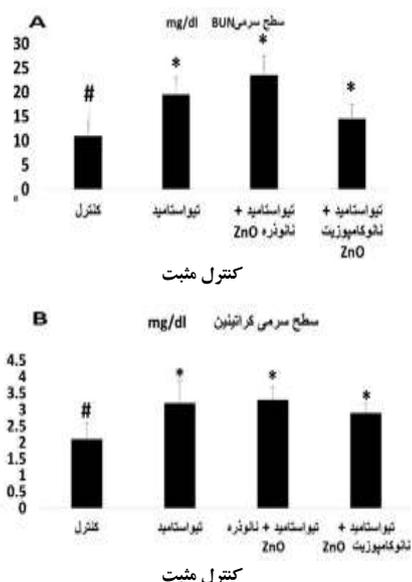
الکترونیک ساخت نمایشگرهای پلاسما و تجهیزات پزشکی کاربرد دارد (۳). نانو ذرات اکسید روی به دلیل اندازه کوچک می‌توانند در مقادیر بسیار کم از اندوتلیوم مویرگ‌های خونی جذب‌گردش خون شوند. نانو کامپوزیت روی اکسید نسبت به نانو ذرات بزرگ‌تر هستند و جذب آن‌ها از اندوتلیوم مویرگ‌ها دشوارتر است اما از سوی دیگر به دلیل حلالیت بالاتر توزیع آن‌ها در مایعات بدن بیش‌تر است (۴). کاربرد نانو کامپوزیت روی در صنعت در حال افزایش است، هم‌چنین در ساخت وسایل ارتوپدی و تجهیزات مهندسی پزشکی استفاده می‌شوند (۵). با این حال مطالعات کمی در مورد اثر سمیت کلوی نانو کامپوزیت‌های روی انجام شده و دوز سمی این ترکیبات به خوبی شناخته نشده است اما در برخی از مطالعات اثر آنتی‌اکسیدانی این نانو ذرات به اثبات رسیده است. نتایج سایر بررسی‌ها نشان دهنده اثر سمیت کبدی و کلوی این ترکیبات است (۶). از سوی دیگر تاکنون مطالعه جامعی در مورد اثر تجویز طولانی مدت نانو ذرات روی و نانو کامپوزیت روی بر آسیب بافت کلیه انجام نشده است. در مطالعه حاضر اثر تجویز طولانی مدت این ترکیبات بر بافت کلیه موش بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

نانو ذرات در گروه شیمی دانشکده علوم پایه دانشگاه زابل به روش رسوب‌گیری شیمیایی سنتز شدند. برای سنتز نانو ترکیب  $\text{ZnO/Chitosan}$  ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول ۰/۵ درصد وزنی کیتوزان با انحلال کیتوزان جامد در محلول ۱/۰ درصد وزنی استیک اسید با pH حدود ۳/۵۳ تحت هم‌زدن مداوم به مدت ۴۵ دقیقه تهیه شد. سپس مقدار یک گرم نانو ذره  $\text{ZnO}$  به محلول اضافه شد تا سوسپانسیون یکنواختی به دست آید. متوسط اندازه نانو ذرات تهیه شده در این فرایند در حدود ۲۵۰ نانومتر بود. موش‌های صحرایی نر به ۴ گروه هفت‌تایی تقسیم شدند، سه گروه از موش‌ها سه تزریق داخل صفاقی تیو استامید با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به فاصله ۲۴



تصویر شماره ۱: A: مقطع بافت کلیه گروه کنترل. رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین (بزرگنمایی ۴۰) (مقیاس=100 μm). B: مقطع بافت کلیه موش صحرایی مسموم شده با تیواستامید نفوذ سلول های آماسی (نوک فلش) و پرخونی (فلش). رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین. (بزرگنمایی ۴۰) (مقیاس=100 μm). C: مسموم شده با تیواستامید و تحت تیمار با نانوکامپوزیت ZnO/Chitosan. فیروز گلوبولی (f). رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین (بزرگنمایی ۴۰). D: (مقیاس=100 μm)، مسموم شده با تیواستامید و تحت تیمار با ZnO. اتساع توبول های کلیوی (فلش) و پرخونی (نوک فلش) (رنگ آمیزی H&E، بزرگنمایی ۴۰) (مقیاس=100 μm).



نمودار شماره ۲: سطح سرمی BUN و کراتینین در گروه های تحت تیمار و گروه شاهد سالم.

\*: اختلاف معنی دار با گروه شاهد سالم ( $P < 0.05$ ). #: اختلاف معنی دار با گروه کنترل مثبت (مسموم شده با تیواستامید) ( $P < 0.05$ ).

در بررسی هیستوپاتولوژیک در گروه کنترل، توبول های کلیوی، گلوبول ها و بافت بینابینی طبیعی بود و هیچگونه آثاری از ضایعه دیده نشد (تصویر شماره A ۱). در گروه مسموم شده با تیواستامید، علایم آسیب کلیوی مانند پرخونی، اتساع توبول های کلیوی و تهاجم سلول های آماسی مشاهده شد و مشخص بود که نشان دهنده تخریب بافت کلیوی از جمله لوله های کلیوی و بافت بینابینی می باشد (تصویر شماره B ۱). در گروه مسموم شده با تیواستامید و تحت تیمار با نانو کامپوزیت ZnO/فیروز گلوبولی (گلوبولواسکلروز)، اتساع فضای داخلی توبول های کلیوی و اتساع فضای کپسول بومن مشاهده شد (تصویر شماره C ۱). در گروه مسموم شده با تیواستامید و تحت تیمار با نانو ذرات ZnO/فیروز گلوبولی، اتساع فضای داخلی توبول های کلیوی، اتساع فضای کپسول بومن و پرخونی مشاهده شد که این یافته ها نشان دهنده آسیب شدید کلیوی است و با نتایج مارکرهای بیوشیمیایی کارکرد کلیه مطابقت داشت (تصویر شماره D ۱).

در مطالعه حاضر تجویز همزمان نانو ذرات ZnO و تیواستامید، سطح BUN و کراتینین را کاهش نداد و سطح سرمی BUN و کراتینین در گروه های تیمار شده با نانو کامپوزیت ZnO/chitosan تفاوت معنی داری با گروه مسموم شده با تیواستامید نداشت. نتایج بررسی هیستوپاتولوژی نشان داد که آسیب بافت کلیه در گروه هایی که نانوذرات ZnO و نانو کامپوزیت ZnO/chitosan را همزمان با تیواستامید دریافت کرده بودند از گروه کنترل مثبت بیشتر بود. تیواستامید توسط سیتوکروم (CYP) P450 به تیواستامید سولفوکسید (TASO) و سپس به تیواستامید سولفودی اکسید (TASO2) تبدیل می شود که یک ماده به شدت اکسید کننده است و با اکسیداسیون پروتئین ها و چربی های غشا سبب نکرز سلول های کلیه می شود (۱۰). نانوذرات ZnO با کاهش سطح مالون دی آلدئید از آسیب اکسیداتیو در سلول جلوگیری می کنند. هم چنین این

تسریع می‌کنند (۱۴). در بررسی‌های پیشین استفاده از نانوکامپوزیت روی سبب بهبود عملکرد حرکتی در موش‌های صحرایی دچار آسیب عصب سیاتیک شد (۱۵). در مورد اثر تجویز داخل صفاقی نانوکامپوزیت‌ها اطلاعات کمی وجود دارد. در یک مطالعه سطح پراکسیداسیون لیپیدی در موش‌هایی که نانوکامپوزیت روی را دریافت کرده بودند نسبت به موش‌های تحت تیمار با نانوذره روی کم‌تر بود (۱۶). روش مناسب تجویز دسترسی زیستی را افزایش می‌دهد. در مطالعات قبلی نانوذراتی که به صورت داخل صفاقی تجویز می‌شوند اثرات بیولوژیک قوی‌تر داشتند (۱۷، ۱۸).

### سپاسگزاری

این مطالعه تجربی براساس قوانین بین‌المللی در زمینه کار با حیوانات آزمایشگاهی (NIH publication No 85-23) و قوانین مربوط با پژوهش‌های علوم پزشکی شماره سند BP-QP-106-01 انجام شد. هزینه این مطالعه از محل اعتبار پژوهانه (شماره ۹۶/۲۲۸/پ ۱۰) دانشگاه زابل تامین شد.

### References

- Mohanraj VJ, Chen Y. Nanoparticles-a review. Trop J Pharm Res 2006; 5(1): 561-573.
- Rahdar A, Taboada P, Aliahmad M, Hajinezhad MR, Sadeghfard F. Iron oxide nanoparticles: Synthesis, physical characterization, and intraperitoneal biochemical studies in Rattus norvegicus. J Mol Struct 2018; 1173: 240-245.
- Kittelsohn DB. Engines and nanoparticles: a review. J Aerosol Sci 1998; 29(5-6): 575-588.
- Zhang L, Gu FX, Chan JM, Wang AZ, Langer RS, Farokhzad OC. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. Clin. Pharmacol Ther 2008; 83(5): 761-769.
- Nogi M, Yano H. Transparent nanocomposites based on cellulose produced by bacteria offer potential innovation in the electronics device industry. Adv Mater 2008; 20(10): 1849-1852.
- Sanchez C, Julián B, Belleville P, Popall M. Applications of hybrid organic-inorganic nanocomposites. J Mater Chem 2005; 15(35-36): 3559-3592.
- Mohammad Pour Zehab M, Shariati-Sharifi F, Jamshidian A, Hajinezhad M R. The effect of Syrian mesquite (*Prosopis farcta*) seed extract on thioacetamide-induced oxidative stress in rats. Feyz 2018; 22(1): 25-30 (Persian).

8. Kiranmai G, Reddy AR. Antioxidant status in MgO nanoparticle-exposed rats. *Toxicol Ind Health* 2013; 29(10): 897-903.
9. Hamzeh M, Amiri FT, Beklar SY, Hosseinimehr SJ. Nephroprotective effect of cerium oxide nanoparticles on cyclophosphamide-induced nephrotoxicity via anti-apoptotic and antioxidant properties in BALB/c mice. *Marmara Pharm J* 2018; 22(2): 180-189.
10. Keshk WA, Zahran SM. Mechanistic role of cAMP and hepatocyte growth factor signaling in thioacetamide-induced nephrotoxicity: Unraveling the role of platelet rich plasma. *Biomed Pharmacother* 2019; 109: 1078-1084.
11. LI, Jinqun, Wang B, Cai C, Yang X, Chai Z, et al. ZnO nanoparticles act as supportive therapy in DSS-induced ulcerative colitis in mice by maintaining gut homeostasis and activating Nrf2 signaling. *Sci Rep* 2017, 7: 43126.
12. Warheit DB, Sayes CM, Reed KL. Nanoscale and fine zinc oxide particles: can in vitro assays accurately forecast lung hazards following inhalation exposures? *Environ Sci Technol* 2009; 43(20): 7939-7945.
13. Vanderbreil Rob J, Dejong Wim H. A review of mammalian toxicity of ZnO nanoparticles. *Nanotechnol Sci Appl* 2012, 5: 61-71.
14. Díez-Pascual AM, Díez-Vicente AL. Wound healing bionanocomposites based on castor oil polymeric films reinforced with chitosan-modified ZnO nanoparticles. *Biomacromolecules* 2015; 16(9): 2631-2644.
15. Iman M, Araghi M, Panahi Y, Mohammadi R. Effects of Chitosan-Zinc Oxide Nanocomposite Conduit on Transected Sciatic Nerve: An Animal Model Study. *Bull Emerg Trauma* 2017; 5(4): 240-248.
16. Soofi Zamiri F, Hajinezhad M, Samzadeh-Kermani A, Jahantigh M, Ahmadvpour S. Comparison the effects of ZnO nanoparticles and ZnO nanocomposites on Lipid Peroxidation in Rats. *JNKUMS* 2017; 9(2): 263-270 (Persian).
17. Rahdar A, Aliahmad M, Hajinezhad MR, Samani M. Xanthan gum-stabilized nano-ceria: Green chemistry based synthesis, characterization, study of biochemical alterations induced by intraperitoneal doses of nanoparticles in rat. *J Mol Struct* 2018; 1173: 166-172.
18. Taimoory SM, Rahdar A, Aliahmad M, Sadeghfar F, Hajinezhad MR, Jahantigh M, et al. Computational, experimental details, and biological raw data accompanying the publication: "The synthesis and characterization of a nanomagnetite with potent antibacterial activity and low mammalian toxicity". *Data in Brief* 2018; 21: 2518-2521.