



## اثرات مواجهه با نانوسیلور از طریق شیر مادر بر مغز نوزادان موش صحرایی

مهوش فاطمی<sup>۱</sup>، جمال مشتاقیان<sup>۲</sup>، غلامعلی نادر<sup>۳</sup>، نرگس جعفری دینانی<sup>۴</sup>

تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۱/۲۹

تاریخ ویرایش: ۹۳/۱۲/۰۱

تاریخ دریافت: ۹۳/۰۶/۳۱

### چکیده

**زمینه و هدف:** امروزه نانوسیلور به دلیل خواص ضد میکروبی اش کاربرد وسیعی در فرآورده های بهداشتی شخصی، پردازش غذا و حوزه پزشکی دارد. مطالعات اخیر نشان داده است که نانو ذرات قادرند از طریق جفت و شیر مادر به زاده ها انتقال یافته و در ارگان های مختلفی نظیر مغز تجمع یابند. نظر به اینکه استرس اکسیداتیو مکانیسمی کلیدی برای سمیت نانو ذرات است و مغز در حال رشد به استرس اکسیداتیو بسیار آسیب پذیر است، در این تحقیق پتانسیل نانو سیلور برای القاء استرس اکسیداتیو در مغز زاده های موش های صحرایی ارزیابی شد.

**روش بررسی:** مادران شیرده به دو گروه تیمار و کنترل تقسیم شدند که بطور گوارشی (گاواژ) به ترتیب با نانوسیلور (25mg/kg BW) و آب بدون یون از اولین تا دوازدهمین روز شیردهی تیمار شدند. مغز زاده ها در سیزدهمین روز پس از تولد جمع آوری شد. به منظور مطالعات هیستوپاتولوژیکی تعدادی از مغزها برش گیری و با هماتوکسیلین و اتوزین رنگ آمیزی شدند. میزان مالون دی آلدیید، گلوتاتیون، فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز و تراکم نقره در مغز زاده ها به ترتیب با استفاده از آزمون اسپکتروفتومتری و آنالیز ICP-MS تعیین گردید.

**یافته ها:** تعداد زیادی ساختار میکروواکوئلی، افزایش معنی داری در محتوای نقره و میزان مالون دی آلدیید ( $p < 0.001$ ) و کاهش معنی داری در فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز و سطح گلوتاتیون ( $p < 0.05$ ) در مغز زاده های گروه تیمار نسبت به گروه کنترل مشاهده شد.

**نتیجه گیری:** نتایج نشان داد که تراکم نقره در مغز احتمالاً از طریق کاهش ظرفیت مکانیسم دفاعی آنتی اکسیدانی آن منجر به استرس اکسیداتیو شده است. هر چند برای توضیح دقیق این نتایج باید آزمایشات بسیاری انجام داد.

**کلیدواژه ها:** نانوسیلور، شیر مادر، مغز در حال رشد، استرس اکسیداتیو، موش صحرایی.

### مقدمه

بدن مسمومیت ایجاد کند [۱،۳]. یکی از ارگان های هدف نانوسیلور مغز است. این نانوذره بالاترین نیمه عمر را نسبت به سایر نانوذرات در مغز دارد [۴] و به راحتی از سد خونی-مغزی عبور کرده و در این بافت متراکم می شود. تنگ و همکارانش در دو مطالعه مجزا پس از تزریق زیر پوستی نانوسیلور، این نانوذره را در مغز رت های بالغ ردیابی کردند [۵،۶].

تریکلر و همکارانش نشان دادند که میانکنش بین نانوسیلور و سلول های اندوتلیال عروق مغزی (به عنوان مدلی از سد خونی-مغزی) می تواند منجر به القاء التهاب و افزایش نفوذ پذیری سد خونی-مغزی شود [۷].

نانوتکنولوژی صنعت توانمندی است که با ساختار، ابزار و ذراتی با مقیاس کمتر از ۱۰۰ نانومتر حداقل در یک بعد در ارتباط است. یکی از پر مصرف ترین فرآورده های این صنعت نانوسیلور نام دارد که به دلیل خواص ضد میکروبی بالا، در صنایع و علوم متعددی کاربرد فراوان دارد [۱،۲]. آمارها میزان مواجهه انسان به نانوسیلور را به واسطه استفاده از سه گروه عمده از محصولات نانوتکنولوژی (فرآورده های پزشکی، بهداشتی و تغذیه) بین ۱۰۰۰۰ ppm - ۶ تخمین زده اند [۱]. این نانوذره قادر است از هر سه مسیر پوستی، استنشاقی و گوارشی به بدن نفوذ کرده، در ارگان های

۱ - گروه زیست شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران. (نویسنده مسئول) استادیار. fatemi@iaufala.ac.ir

۲ - استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

۳ - دانشیار، مرکز تحقیقات قلب و عروق اصفهان، پژوهشکده قلب و عروق اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

۴ - کارشناس ارشد فیزیولوژی، مرکز تحقیقات پرفشاری اصفهان، پژوهشکده قلب و عروق اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

مغز نوزادانی که از طریق شیر مادرانشان در معرض این نانوذره قرار گرفته بودند، مورد ارزیابی قرار گرفت.

### روش بررسی

تعداد ۳۰ موش صحرایی (رت) باردار از مرکز حیوانات دانشگاه اصفهان خریداری شد. رت های باردار هر کدام بطور جداگانه در قفسهایی تحت شرایط کنترل شده محیطی با دوره ۱۲ ساعته روشنایی/ تاریکی، درجه حرارت  $23 \pm 2$  درجه سانتی گراد و رطوبت ۵۰ درصد نگهداری شده و با آب آشامیدنی پاکیزه و غذای مناسب (به شکل دانه های کنساتره محتوی ۵۰ درصد نشاسته، ۲۰ درصد پروتئین، ۱۰ درصد سلولوز و ۱۵ درصد چربی و انواع ویتامین ها) تغذیه شدند. پس از زایمان، مادرانی که ۶-۸ زاده داشتند به همراه زاده هایشان به دو گروه تقسیم شدند. مادران گروه تیمار ( $n=8$ ) از روز اول تا روز دوازدهم شیردهی با نانوسیلور تهیه شده از شرکت سیگما ( $\sigma$ -Aldrich Prod, NO. 730793 روزانه به غلظت ۲۵ mg/kg و مادران گروه کنترل ( $n=8$ ) در این مدت تنها با آب بدون یون به روش گاوژ تیمار شدند. پس از اتمام دوره تیمار، نوزادان هر دو گروه با ترازوی دیجیتال (مدل KERN 2002 ساخت آلمان) وزن شدند، مغز آنها جداسازی شده و پس از شستشو با بافر فسفات پتاسیم (pH 7.0) وزن شده، نسبت وزن مغزها بر حسب میلی گرم به وزن بدن بر حسب گرم محاسبه شد و مغزها برای ادامه آزمون در درجه برودت ۸۰- درجه سانتی گراد ذخیره شد.

**آنالیز هیستوپاتولوژیکی:** برای مطالعه تغییرات بافتی، مطابق منبع شماره ۱۴ تعدادی از مغزها (یک نوزاد از هر مادر) به مدت ۴۸ ساعت به فرمالین ۱۰ درصد انتقال داده شد. پس از فیکساسیون و قالب گیری در پارافین، برش های ۵ میکرومتری از ناحیه کورتکس مغزها با استفاده از میکروتوم دیجیتال تهیه و با روش هماتوکسیلین- ائوزین رنگ آمیزی شد. اسلایدها به کمک میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت.

تا کنون افزایش گونه های اکسیژن فعال (ROS) و القاء استرس اکسیداتیو به عنوان کلیدی ترین مکانیسم توکسیسیتی ی نانوسیلور گزارش شده است [۸،۹،۱۰،۱۱،۱۲]. استرس اکسیداتیو یک عدم تعادل حالت اکسایش درون سلولی است که با افزایش ROS مرتبط است. در شرایط افزایش ROS در بدن، گلوتاتیون احیاء (GSH) به فرم اکسید (GSSG) تبدیل می شود و سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی قادر به خنثی سازی ROS اضافی نبوده در نتیجه استرس اکسیداتیو رخ می دهد و افزایش استرس اکسیداتیو با اکسیداسیون ترکیبات زیستی مهمی مانند پروتئین ها، DNA و پراکسیداسیون لیپیدها همراه می شود [۱۳]. در مطالعات لیبو و همکارانش افزایش میزان بالای ROS پس از تیمار رت های نر با نانوسیلور به غلظت های ۳ و ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم و در ادامه کاهش حافظه فضایی و پلاستیسیته سیناپسی در گروه های تیمار دیده شد. این محققان پیشنهاد دادند که نانوسیلور احتمالاً با نفوذ به بافت مغز مسبب ایجاد اختلال در این بافت شده است [۱۴]. در تحقیقی دیگر کاهش مشخصی در عملکرد میتوکندری و افزایش در تولید ROS در لاین سلول های نوروبلاستوما بعد از تیمار با نانوسیلور ۲۵ نانومتری به غلظت ۲۵  $\mu\text{g/ml}$  مشاهده شد [۱۵].

متأسفانه اکثر مطالعات در زمینه سمیت نانوذرات بر روی نمونه های بالغ انجام شده است و نوروبتوکسیسیتی تکوینی نانوذرات خصوصاً در پستانداران، کمتر مورد توجه قرار گرفته است. اخیراً ثابت شده است که نانوذرات به دلیل ابعاد بسیار ریز قادرند از سد جفت گذشته و همچنین از طریق شیر مادر به زاده ها منتقل شوند [۱۶-۱۸]؛ بنابراین با توجه به اینکه بافت مغز به ویژه در مراحل اولیه تکوین به دلیل مصرف بالای اکسیژن، متابولیسم بالا به واسطه رشد سریع، سطح پایین آنزیم های آنتی اکسیدانی، غلظت بالای چربی های غیر اشباع و تعداد کم سلول های گلیال نسبت به استرس اکسیداتیو بسیار آسیب پذیر است [۱۹]، در این پژوهش تاثیر نانوسیلور بر بافت

**۲- اندازه گیری سطح فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (GPX):** ۰/۲ ml سوپرناتانت به ۱ ml بافر فسفات پتاسیم ۰/۴M (pH 7.0) محتوی ۰/۴ ml EDTA، ۱ ml گلوتاتیون احیاء ۸ mM و ۱ ml سدیم آزید ۵ mM افزوده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس ۱ ml (۸H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mM) به مخلوط افزوده و به مدت ۱۰ دقیقه دیگر در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. برای اندازه گیری گلوتاتیون احیاء باقی مانده در مخلوط، ۱ ml تری کلرواستیک اسید ۵٪ به ۱ ml از مخلوط اضافه شد و بقیه آزمون مشابه روش فوق (اندازه گیری گلوتاتیون) ادامه یافت. لازم به ذکر است که یک واحد GPX مقدار آنزیم لازم برای اکسید کردن یک نانومول GSH در دقیقه می باشد [۸].

**۳- اندازه گیری میزان مالون دی آلدئید (MDA):** با استفاده از متد تیوباربیتوریک اسید [۲۱] بطور خلاصه ۱ ml تری کلرواستیک اسید ۵۰٪ در کلریدریک اسید ۰/۱ M و ۱ ml تیوباربیتوریک اسید ۲۶ mM به ۰/۲ ml سوپرناتانت افزوده و مخلوط حاصله به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری ۹۵ درجه سانتی گراد حرارت داده شد. پس از سانتریفوژ (۱۰۰۰ ×g) به مدت ۱۰ دقیقه (باسانتریفوژ مدل HERMLEZ320 ساخت آلمان)، جذب نوری سوپرناتانت در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد.

### آنالیز آماری

کل اطلاعات در این پژوهش به صورت  $\pm SE$  میانگین محاسبه شد. برای آنالیز اختلاف بین گروه های کنترل و تیمار از آنالیز آماری independent-*t*-test samples استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۶ انجام گرفت و  $p < 0.05$  و  $p < 0.001$  به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شد. نکته قابل توجه اینکه به منظور جلوگیری از یکنواختی آزمون، از هر زایمان تنها یک تا دو نوزاد نر و ماده بطور تصادفی انتخاب شد.

**اندازه گیری غلظت نقره در مغز و شیر درون معده نوزادان:** در این بخش از آزمون یک نوزاد از هر مادر بطور تصادفی انتخاب شد. مغز و محتوای شیر درون معده نوزادان که تحت تاثیر محیط معده جامد و پنیبری شکل بود به دقت از درون معده استخراج شد و بطور جداگانه به ظروف محتوی اسید پرکلریک و اسید نیتریک غلیظ به نسبت ۱ به ۴ انتقال داده شد. پس از هضم کامل بافت ها (به مدت ۲۴ ساعت) نمونه ها در حرارت ۱۲۰ درجه سانتی گراد انکوبه شد تا اسید اضافی کاملا تبخیر شود. سپس به هر یک از ظروف ۱ ml آب دو بار تقطیر شده اضافه [۵] و نمونه ها به مرکز تحقیقات انرژی اتمی اصفهان ارسال گردید تا با کمک تکنیک Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) غلظت نقره در نمونه ها اندازه گیری شود.

**اندازه گیری بیومارکر های استرس اکسیداتیو:** دو نوزاد از هر مادر بطور تصادفی انتخاب شد و مغز آنها (از هر گروه نوزاد  $n=16$ ) در بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار سرد (pH 7.4) هموژنیزه شد. نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ rpm با استفاده از میکروسانتریفوژ اپندورف سانتریفوژ و سوپرناتانت برای اندازه گیری سطح مالون دی آلدئید، میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز و سطح گلوتاتیون جمع آوری شد.

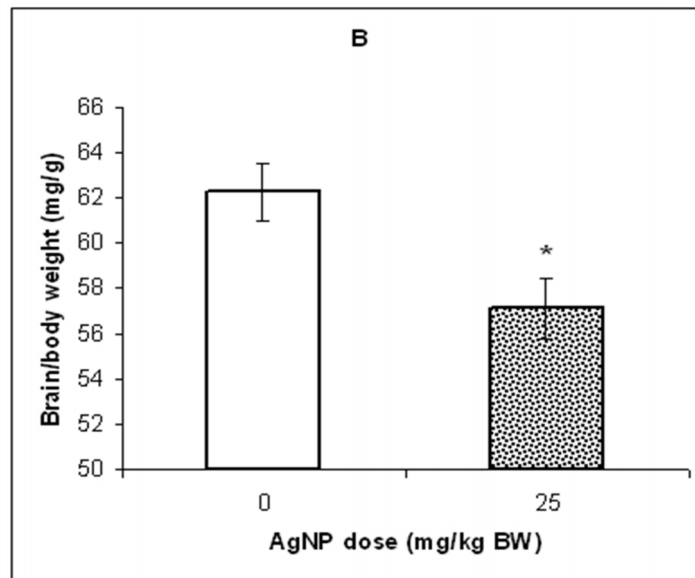
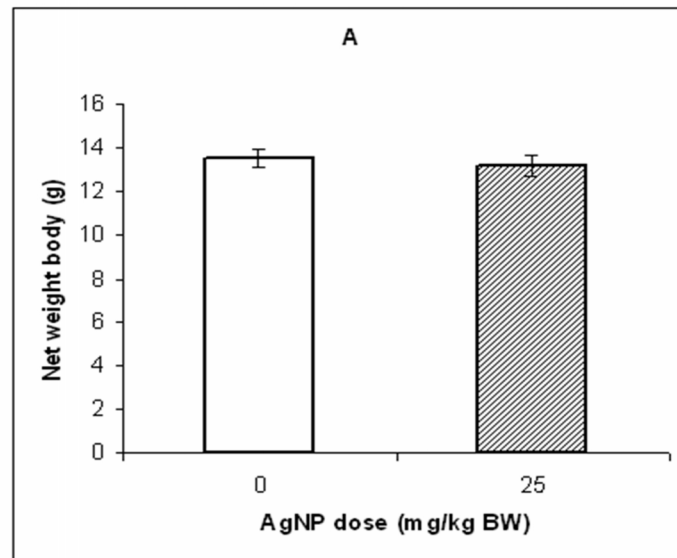
**۱- اندازه گیری سطح گلوتاتیون (GSH):** با استفاده از متد DTNB میزان گلوتاتیون در نمونه ها اندازه گیری شد [۲۰]. بطور خلاصه ابتدا برای حذف پروتئین ها ۱ ml تری کلرواستیک اسید ۵ درصد به ۱ ml سوپرناتانت افزوده شد و پس از سانتریفوژ، ۰/۱ ml از سوپرناتانت حاصله به ۲ ml بافر فسفات (pH 8.4)، ۰/۴ ml آب دو بار تقطیر شده و ۰/۵ ml از ۵٪ دی تیوبیس (۲- نیتروبنزویک اسید) (DTNB) اضافه شد و پس از هم زدن، جذب نوری نمونه ها طی ۱۵ دقیقه در طول موج ۴۱۲ نانومتر به روش اسپکتروفوتومتری با دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل Shimadzu uv-300 ساخت ژاپن خوانده شد.

**یافته ها**

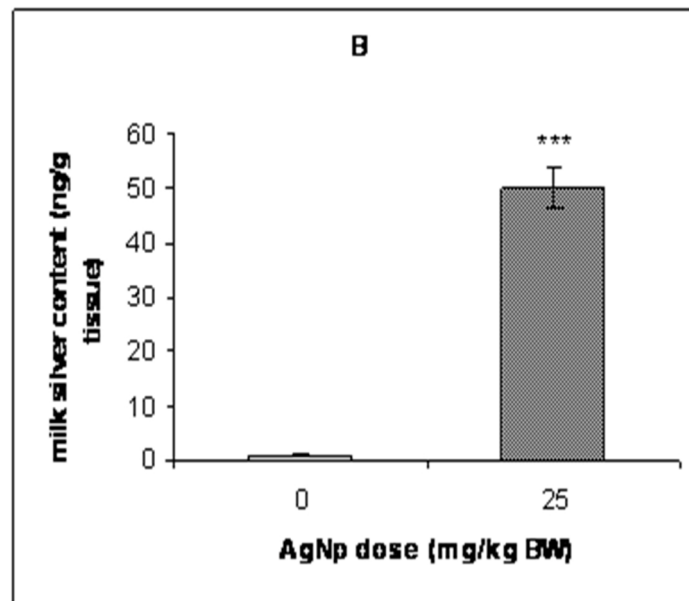
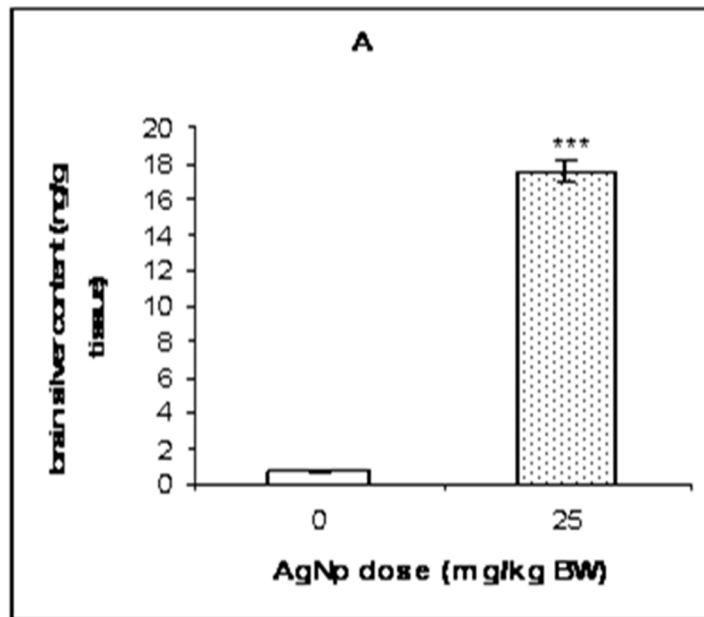
نتایج حاصل از این تحقیق نشان می دهد که:

۱- هیچ گونه اختلاف معنی داری در وزن بدن نوزادان گروه تیمار که از شیر مادران آلوده به نانوسیلور تغذیه شده بودند ( $13/15 \pm 0/15g$ ) نسبت به وزن نوزادان گروه کنترل ( $13/52 \pm 0/14g$ ) مشاهده

نمی شود (نمودار ۱A) ولی با توجه به نمودار ۱B کاهش نسبت وزن مغز به وزن بدن در گروه تیمار ( $57/99mg/g \pm 1/33$ ) نسبت به گروه کنترل ( $62/27 \pm 1/3$ ) کاملاً معنی دار ( $p < 0.05$ ) است.  
۲- با توجه به نمودارهای (A و B) ۲ محتوای نقره هم در شیر درون معده و هم در مغز نوزادان گروه تیمار



نمودار ۱- (A) مقایسه تغییرات وزن بدن نوزادان ۱۳ روزه تغذیه شده با شیر مادران آلوده به نانوسیلور ( $n=16$ ) نسبت به نوزادان گروه کنترل ( $n=16$ ). (B) تغییرات نسبت وزن مغز به وزن بدن نوزادان گروه تیمار در مقایسه با گروه کنترل ( $n=16$ ). مقادیر نشاندهنده میانگین  $\pm$  انحراف معیار است. علامت ستاره سطح معنی داری نسبت به گروه کنترل را نشان می دهد. ( $*p < 0.05$ ).



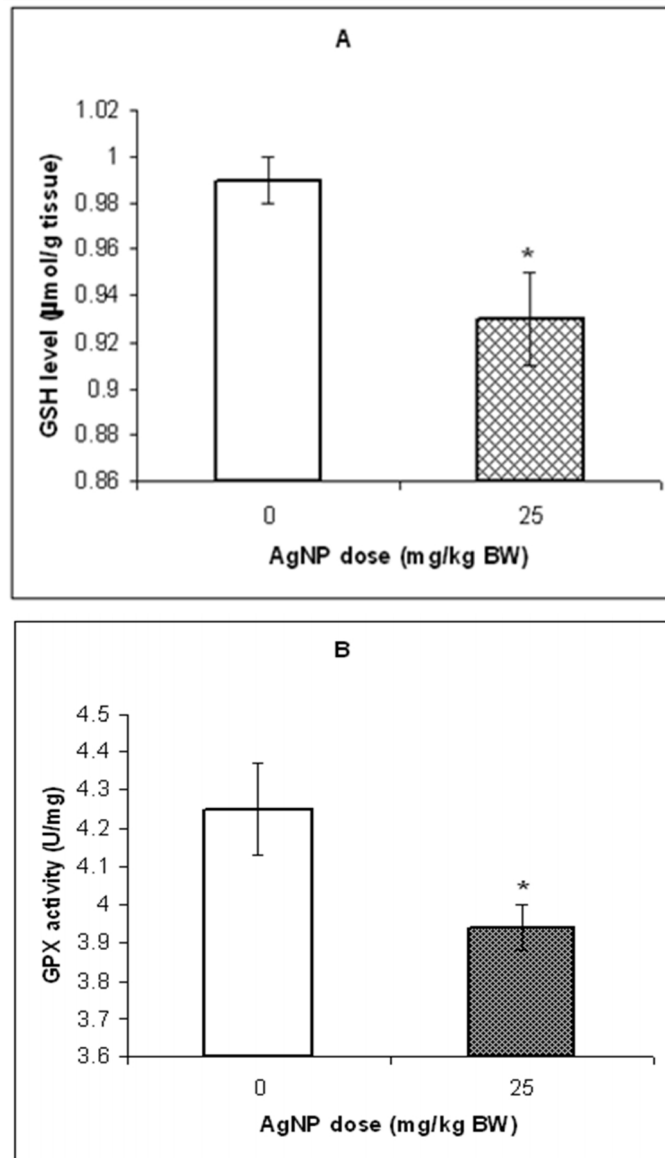
نمودار ۲- مقایسه محتوای نقره در بافت مغز (A) و شیر درون معده (B) نوزادان ۱۳ روزه تغذیه شده با شیر مادران آلوده به نانوسیلور (n=8) نسبت به نوزادان گروه کنترل (n=8). علامت ستاره سطح معنی داری نسبت به گروه کنترل را نشان می دهد. (\*\*\*) $p < 0.001$ .

نوزادان گروه تیمار نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است.

۴- نتایج حاصل از بررسی میزان مالون دی آلدئید در مغز نوزادانی که به واسطه شیر مادرانشان در معرض نانوسیلور بودند، افزایش کاملاً معنی داری ( $p < 0.001$ ) در سطح این فاکتور در مغز آن ها نسبت به نوزادان

بطور قابل ملاحظه ای ( $p < 0.001$ ) نسبت به نوزادان گروه کنترل افزایش نشان می دهد و تراکم نقره در شیر بالاتر از بافت مغز است.

۳- با توجه به نمودارهای (A و B) ۳ میزان گلوتاتیون احیاء و نیز سطح فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز بطور معنی داری ( $p < 0.05$ ) در بافت مغز



نمودار ۳- مقایسه تغییرات سطح GSH (A) و فعالیت آنزیم GPX (B) در بافت مغز نوزادان ۱۳ روزه تغذیه شده با شیر مادران آلوده به نانوسیلور (n=16) نسبت به نوزادان گروه کنترل (n=16). مقادیر نشاندهنده میانگین ± انحراف معیار است. علامت ستاره سطح معنی داری نسبت به گروه کنترل را نشان می دهد. (\*p<0.05).

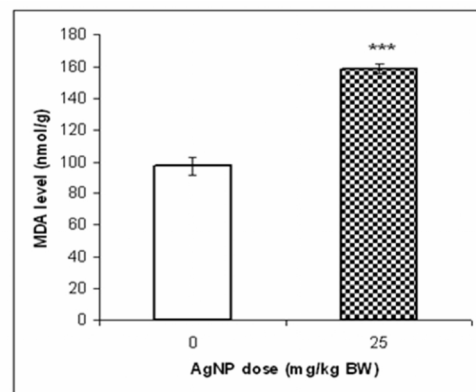
تیمار تعداد زیادی ساختار میکروواکوئلی دیده می شود که نشانگر دژنراسیون نورونی و تخریب بافتی است (شکل ۱B).

### بحث و نتیجه گیری

در تحقیق حاضر، به منظور بررسی نوروکسیسیتی

گروه کنترل نشان می دهد (نمودار ۴).  
۵- با مقایسه برشهای بافتی تهیه شده از هر دو گروه، مشاهده می شود که نورون های کورتکس مغز نوزادان گروه کنترل بطور منظم در سراسر بافت کنار هم قرار گرفته اند که نمایانگر طبیعی بودن بافت است (شکل ۱A). ولی در سراسر کورتکس مغز نوزادان گروه

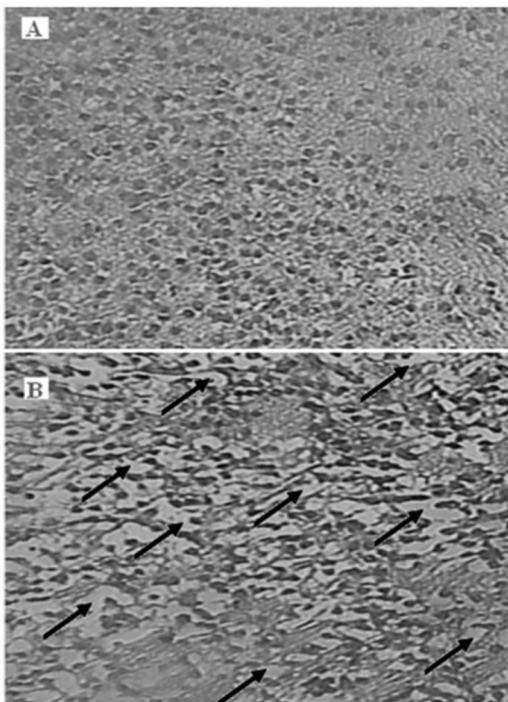
تحقیقات قدیمی در زمینه اثر فلزات موجود در شیر مادران بر زاده‌ها از یافته‌های انسانی مسموم با کادمیوم (موجود در دود سیگار) و متیل مرکوری (موجود در غلات آلوده در عراق و ماهیان مسموم به این ماده در ژاپن) بدست آمده است که البته نتایج ضد و نقیضی در این رابطه ارائه شده است [۲۷-۲۵].  
به منظور اطمینان از انتقال نانوسیلور از طریق شیر مادران به بدن زاده‌ها، میزان نقره در شیر درون معده و مغز نوزادان به روش ICP-MS اندازه‌گیری شد. نتایج افزایش کاملاً معنی‌داری ( $p < 0.001$ ) در سطح نقره هم در شیر و هم در مغز نمونه‌های تیمار با نانوسیلور را نسبت به گروه کنترل نشان داد که موید انتقال نانوسیلور نه تنها از مادران به زاده‌ها بلکه نفوذ این ذره به بافت مغز آن‌ها می‌باشد.  
در این رابطه نتایج مشابهی پس از استفاده از



نمودار ۴- مقایسه تغییرات غلظت MDA در بافت مغز نوزادان شیرخوار ۱۳ روزه گروه کنترل ( $n=16$ ) با گروه تیمار ( $n=16$ ). علامت ستاره سطح معنی‌داری نسبت به گروه کنترل را نشان می‌دهد. ( $***p < 0.001$ ). مقادیر نشان‌دهنده میانگین  $\pm$  انحراف معیار است.

نانوسیلور در مغز رت‌هایی که مادرانشان در دوران شیردهی به روش درون‌گوارشی (گاواژ) در معرض این ذره قرار گرفته بودند، غلظت ۲۵ mg/kg از نانوسیلور با قطر تقریبی ۲۰ nm انتخاب شد چرا که گروهی از محققان بر این باورند که نانوسیلور در غلظت‌های ۲/۵ تا ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (معادل ۲۰۰ mg/kg) القاگر استرس اکسیداتیو و مرگ سلولی در لاین سلول‌های مختلف است [۱۱، ۲۲، ۲۳]. علاوه بر این اخیراً میزان نفوذ نانوسیلور با قطرهای متفاوت از سد خونی-مغزی مورد ارزیابی قرار گرفت و مشخص شد نانوسیلور با قطر متوسط ۲۲ نانومتر بالاترین تراکم را در بافت مغز موش‌های بالغ نسبت به قطرهای بالاتر به خود اختصاص داده است [۲۴].

اولین نتایج کسب شده از این پژوهش، کاهش معنی‌دار نسبت وزن مغز به وزن بدن با وجود عدم تغییر در وزن بدن نوزادان گروه تیمار نسبت به گروه کنترل را نشان داد. کاهش نسبت وزن مغز به وزن بدن نوزادان در این تحقیق می‌تواند به واسطه اتصال نانوسیلور به ترکیبات موجود در شیر مادر و انتقال آن به بدن نوزادان و به دنبال آن نفوذ مستقیم این ذره به بافت مغز و تاثیر مستقیم بر ساختار این بافت باشد.  
متأسفانه مدارکی دال بر تاثیر نانوذرات موجود در شیر مادران بر وزن زاده‌ها یافت نشد. تنها گروهی از



شکل ۱- هیستوپاتولوژی کورتکس مغز نوزادان ۱۳ روزه موش صحرائی. گروه کنترل: نورون‌ها با سیتوپلاسم یکنواخت بدون هیچ بی‌نظمی و اختلال بافتی (A). گروه تیمار: دژنراسیون نورونی با توجه به حفرات میکروواکولولی فراوان (فلش‌ها) در سراسر بافت (B). (بزرگمایی میکروسکوپی  $\times 100$ )

شده است، در این تحقیق غلظت گلوکوتائین احیاء عمده آنتی اکسیدان غیر آنزیمی در مغز [۳۳] و فعالیت آنزیم گلوکوتائین پراکسیداز به عنوان دو بیومارکر استرس اکسیداتیو در مغز نوزادان دو گروه، مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج کاهش معنی داری ( $p < 0.05$ ) هم در سطح گلوکوتائین احیاء و هم در فعالیت آنزیم گلوکوتائین پراکسیداز در مغز نوزادان تغذیه شده با شیر آلوده به نانوسیلور نسبت به گروه کنترل را نشان داد. این نتایج می تواند بازتابی از تاثیر نانوسیلور بر آنزیم های بیوستنز کننده این آنتی اکسیدان ها و مهار تولید طبیعی آن ها و همچنین تاثیر در سطح بیان ژن های مرتبط با این آنتی اکسیدان ها در مغز نوزادان باشد. در ارتباط با این فرضیات، پیو و همکارانش مهار آنزیم های گاما گلوتامات سیستئین لیگاز و گلوکوتائین سنتتاز را که در بیوستنز گلوکوتائین نقش دارند به دنبال تیمار هیپاتوسیت های کبد با نانوسیلور و  $AgNO_3$  مشاهده کردند [۳۴]. رحمان و همکارانش نیز تغییر در بیان گروهی از ژن های مرتبط با استرس اکسیداتیو نظیر Sod 2,3, Gpx 2,3 و Gsr را در هیپوکامپ، کورتکس پیشانی و هسته دم دار (caudate nucleus) مغز موش ها پس از تیمار با نانوسیلور رویت کردند [۱۰].

در تحقیق کنونی غلظت MDA به عنوان یکی دیگر از مارکرهای استرس اکسیداتیو در مغز نوزادان اندازه گیری شد. نتایج افزایش کاملاً معنی داری ( $p < 0.001$ ) در غلظت این فاکتور در مغز نمونه های تیمار با نانوسیلور نسبت به نوزادان گروه کنترل را نشان داد. این افزایش غلظت نشانگر پراکسیداسیون لیپیدهای مغز می باشد چرا که بافت مغز غنی از چربیهای غیراشباع است [۳۵] که هدف بسیار مهمی برای تهاجم ROS می باشد.

پراکسیداسیون لیپیدهای مغز در مطالعه قدیمی ما پس از تیمار مادران رت باردار با همین نمونه نانوسیلور و با همین غلظت ( $25 \text{ mg/kg}$ )، در مغز نوزادان تازه متولد شده نیز مشاهده شد [۳۶]. در مجموع از حضور چشمگیر نقره در شیر و مغز

نانوذرات مختلف بدست آمده است [۲۸،۲۹]. ملنیک و همکارانش مادران رت را از چهاردهمین تا شانزدهمین روز شیردهی در معرض نانوسیلور نشاندار شده با  $Ag^{110m}$  به غلظت  $1/69 \text{ mg/kg}$  تا  $2/21$  قرار دادند و پس از ۴۸ ساعت تراکم  $1/94 \pm 0/29$  درصدی نانوسیلور (نسبت به دوز مصرفی اولیه) را در شیر مادران مشاهده کردند [۱۸].

محمدی پور و همکارانش نانوذره  $TiO_2$  به غلظت  $100 \text{ mg/kg}$  را به مدت ۲۱ روز به مادران رت شیرده (به روش گاواژ) خوراندند. آنها پس از انجام تست های فیزیولوژیک مربوط به حافظه (Morris water maze) کاهش حافظه و یادگیری را در زاده های این مادران مشاهده کردند. این محققان پیشنهاد دادند که کاهش حافظه می تواند بیانگر نفوذ نانوذره به مغز نوزادان شیرخوار باشد [۱۷].

در پژوهش حاضر با فرض بر اینکه نفوذ نانوسیلور به مغز نوزادان با اختلالات بافتی همراه است، احتمال ایجاد تغییرات پاتولوژیکی در مغز نوزادان نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. مقایسه نمونه های بافتی، حضور تعداد زیادی ساختار میکروواکوئلی در سطح کورتکس مغز نوزادان تغذیه شده با شیر مادران آلوده نسبت به نوزادان گروه کنترل را نشان داد.

ساختارهای میکروواکوئلی معرف تغییرات اسفنجی شکل (spongiform change) بافت مغز می باشد که یکی از نشانه های هیستوپاتولوژیکی دژنراسیون نورونی است. این تغییرات معمولاً در مناطق میلینه و محل دندریت ها دیده می شود [۳۰،۳۱،۳۲]. چنین ساختارهایی در کورتکس مغز رت های بالغی که در مواجهه با نانوسیلور ۲۳ و ۲۹ نانومتری [۸] و در ناحیه دندانه دار (dentate gyrus) هیپوکامپ رت های نری که در معرض نانوسیلور ۵۰ نانومتری [۱۴] بوده اند نیز دیده شده است که می تواند موید نتایج فوق باشد.

با توجه به نتایج بدست آمده می توان گفت احتمالاً نانوسیلور اثرات سمی بر بافت مغز نوزادان داشته است؛ بنابراین از آنجایی که تاکنون مهمترین مکانیسم توکسیسیته نانوسیلور القاء استرس اکسیداتیو عنوان



6. Tang J, Xiong L, Wang S, et al. Distribution, translocation and accumulation of silver nanoparticles in rats. *Journal of Nanoscience Nanotechnology*. 2009;9:4924-32.

7. Trickler WJ, Lantz SM, Murdock RC, et al. Silver nanoparticle Induced Blood-Brain Barrier inflammation and increased permeability in primary rat brain microvessel endothelial cells. *Toxicological Sciences*. 2010;118(1):160-170.

8. Hritcu L, Stefan M, Ursu L, Neagu A, Mihasan M, Tartau L. Exposure to silver nanoparticles induces oxidative stress and memory deficits in laboratory rats. *Central European Journal of Biology*. 2011;6(4):497-509.

9. Durán N, Marcato PD, Conti RD, Alves OL, Costa FTM, Brocchi M. Potential Use of Silver Nanoparticles on Pathogenic Bacteria, their Toxicity and Possible Mechanisms of Action. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2010; 21(6):949-959.

10. Rahman MF, Wang J, Patterson TA, et al. Expression of genes related to oxidative stress in the mouse brain after exposure to silver-25 nanoparticles. *Toxicology Letters*. 2009;187:15-21.

11. Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology In vitro*. 2005;19:975-983.

12. Foldbjerg R, Olesen P, Hougaard M, Dang DA, Hoffmann HJ, Autrup H. PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. *Toxicol Letters*. 2009;190:156-62.

13. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*, Oxford University Press, Oxford, 1999.

14. Liu Y, Guan W, Ren G, Yang Z. The possible mechanism of silver nanoparticle impact on hippocampal synaptic plasticity and spatial cognition in rats. *Toxicology Letters*. 2012;209:227- 231.

15. Schrand AM, Braydich-Stolle LK, Schlager JJ, Dai L, Hussain SM. Can silver nanoparticles be useful as potential biological labels? *Nanotechnology*. 2008; 19: 1-13.

16. Gao X, Yin S, Tang M, et al. Effects of Developmental Exposure to TiO<sub>2</sub> Nanoparticles on Synaptic Plasticity in Hippocampal Dentate Gyrus Area: an *In vivo* Study in Anesthetized Rats. *Biological Trace Element Research*. 2011; 143:1616-1628.

17. Mohammadipour A, Hosseini M, Fazel A, et al. The effects of exposure to titanium dioxide

نوزادان تغذیه شده با شیر مادران آلوده به نانوسیلور و همچنین از مشاهده تغییرات پاتولوژیکی در بافت مغز این نوزادان می توان نتیجه گرفت که نانوذره ۲۰ نانومتری مورد آزمون قابلیت عبور از شیر مادران به زاده ها را داشته و حتی از سد خونی-مغزی آنها عبور کرده و اختلالات بافتی ایجاد کرده است. به دنبال این نتایج با مشاهده اختلاف معنی دار در غلظت گلوکاتینون، مالون دی آلدئید و فعالیت آنزیم گلوکاتینون پراکسیداز در نوزادان هر دو گروه می توان احتمال داد که نانوسیلور با تضعیف سیستم آنتی اکسیدانی در مغز توانسته استرس اکسیداتیو را القا کند.

بنابراین با توجه به اینکه استرس اکسیداتیو عامل آغازگر بسیاری از بیماریهای نورودژنراتیو است [۳۷-۳۹]، پیشنهاد می دهیم که مادران حداقل در دوران بارداری و شیردهی از استفاده از فراورده های محتوی نانوسیلور خودداری کنند. البته برای اثبات این موضوع انجام تحقیقات زیاد ضروری به نظر می رسد.

## منابع

1. Wijnhoven SWP, Peijnenburg WJGM, Herberts CA, et al. Nano-silver – a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology*. 2009;3:109-138.
2. Pulit J, Banach M, Kowalski Z. Nanosilver – making difficult decisions. *Ecological Chemistry and Engineering*. 2011;18(2):185-195.
3. Roshanai K, Razavian MH, Ahmadi R, Heidari N, Maseaemanesh MB. The Effect of nanosilver Oral Consumption on some Hormonal, Hematological and Urine Parameters of Vistar Rats. *Qom University of Medical Sciences Journal*. 2012; 6(3): 65-70. [Persian]
4. Yang Z, Liu ZW, Allaker RP, et al. A review of nanoparticle functionality and toxicity on the central nervous system. *Journal of the Royal Society Interface*. 2010; 7:s411-s422.
5. Tang J, Xi T, Xiong L, et al. Influence of silver nanoparticles on neurons and blood-brain barrier via subcutaneous injection in rats. *Applied Surface Science*. 2008;255:502-504.

- Toxicology. 2010. 30(4):354-360.
29. Tozuka Y, Watanabe N, Osawa M, Toriba A, Kizu R, Hayakawa K. Transfer of polycyclic aromatic hydrocarbons to fetuses and breast milk of rats exposed to diesel exhaust. *Journal of Health Science*. 2004;50:497-502.
30. Muthuraju S, Pati S, Rafiqul M, Abdullah JM, Jaafar H. Effect of normobaric hyperoxia treatment on neuronal damage following fluid percussion injury in the striatum of mice: A morphological approach. *Journal of Bioscience*. 2013;38:93-103.
31. Rezaie P, Lantos PL. Microglia and the pathogenesis of spongiform encephalopathies. *Brain Research Reviews*. 2001;35(1):55- 72.
32. Hansen LA, Masliah E, Terry RD, Mirra SS. A neuropathological subset of Alzheimer's disease with concomitant Lewy body disease and spongiform change. *Acta Neuropathologica*. 1989;78:194- 201.
33. Funchal C, Carvalho CAS, Gemelli T, et al. Effect of Acute Administration of 3-Butyl-1-Phenyl-2-(Phenyltelluro)Oct-En-1-One on Oxidative Stress in Cerebral Cortex, Hippocampus, and Cerebellum of Rats. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2010;30:1135-1142.
34. Piao MJ, Kang KA, Lee IK, et al. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicology Letters*. 2011;201: 92-100.
35. Choi BH. Oxygen, Antioxidants and brain dysfunction. *Yonsei Medical Journal*. 1993;34(1):1-10.
36. Fatemi M, Hayati Roodbari N, Ghaedi K, Naderi G. The effects of prenatal exposure to silver nanoparticle on the developing brain in neonatal rats. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*. 2013; 20:233-242.
37. Hu R, Gong X, Duan Y, et al. Neurotoxicological effects and the impairment of spatial recognition memory in mice caused by exposure to TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Biomaterials*. 2010;31:8043-8050.
38. Cantu TI, Shuki H, Hale B, Joseph JA. Neurobehavioral aspects of antioxidants in aging. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2000;18(4-5):367-381.
39. Cui K, Luo X, Xu K, Ven Murthy MR. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychi*.
- nanoparticles during lactation period on learning and memory of rat offspring. *Toxicol Ind Health* published online 30 September 2013. DOI: 10.1177/0748233713498440.
18. Melnik EA, Buzulukov YuP, Demin VF, et al. Transfer of Silver Nanoparticles through the Placenta and Breast Milk during *in vivo* Experiments on Rats. *Acta naturae*. 2013; 3(18): 107-115.
19. Gupta RC. Brain regional heterogeneity and toxicological mechanisms of organophosphates and carbonates. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2004;14:103-143.
20. Sharma M, Gupta YK. Chronic treatment with trans resveratrol prevents intracerebroventricular streptozotocin induced cognitive impairment and oxidative stress in rats. *Life Sci*. 2002; 71: 2489-2498.
21. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*. 1979;95:351-358.
22. Arora S, Jain J, Rajwade JM, Paknikar KM. Cellular responses induced by silver nanoparticles: *In vitro* studies. *Toxicology letters*. 2008;179:93-100.
23. Hsin YH, Chen CF, Huang S, Shih TS, Lai PS, Chueh PJ. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicology Letters*. 2008;179:130-139.
24. Park EJ, Bae E, Yi J, et al. Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2010;30:162-168.
25. Johansson C, Castoldi AF, Onishchenko N, Manzo L, Vahter M, Ceccatelli S. Neurobehavioural and molecular changes induced by methylmercury exposure during development. *Neurotoxicity Research*. 2007;11:241-260.
26. Oskarsson A, Hall'en IP, Sundberg J, Graw'e KP. Risk assessment in relation to neonatal metal exposure. *Toxicology Division National Food Administration*. 1998;123:19-23.
27. Nishijo M, Nakagawa H, Honda R, Tanebe K, Teranishi H, Tawara K. Effects of maternal exposure to cadmium on pregnancy outcome and breast milk. *Occupational and Environmental Medicine*. 2002;59:394-397.
28. Sumner SCJ, Fennell TR, Snyder RW, Taylor GF, Lewin AH. Distribution of carbon-14 labeled C60 ([<sup>14</sup>C]C60) in the pregnant and in the lactating dam and the effect of C60 exposure on the biochemical profile of urine. *Journal of Applied*

## The effects of exposure to nanosilver via the maternal milk on the brain of newborn rats

M. Fatemi<sup>1</sup>, J. Moshtaghian<sup>2</sup>, Gh. Nadei<sup>3</sup>, N. Jafari Dinani<sup>4</sup>

Received: 2013/09/22

Revised: 2014/02/20

Accepted: 2014/04/18

### Abstract

**Background and aims:** Today, nanosilver has a wide range of applications in personal care products, food processing and medical fields because of its antimicrobial properties. Recent studies have revealed that nanoparticles are able to transfer from mothers to their offspring via the placenta and maternal milk and accumulate into various organs, including brain. Since oxidative stress is a key mechanism for nanoparticles toxicity and the developing brain is highly vulnerable to oxidative stress, in this study, we evaluated the potential of nanosilver to induce oxidative stress in the rat offspring brain.

**Methods:** The lactating mothers were divided into the treated and control groups that were treated orally with nanosilver (25 mg/kg BW) and deionized water (from 1th to 12th days of lactation), respectively. The offspring's brains were collected on postnatal day 13. For histopathological studies, some of the brains were sliced and stained with hematoxylin and eosin. The levels of Malondialdehyde, Glutathione, Glutathione peroxidase activity and silver accumulation in offspring's brains were determined using spectrophotometric assay and ICP-MS analysis, respectively.

**Results:** The high numbers of microvacuolar structures, significant increase in silver content and Malondialdehyde level ( $p < 0.001$ ) and significant decrease in Glutathione peroxidase activity and Glutathione level ( $p < 0.05$ ) were observed in the offspring brain of the treated group compared with those in the control group.

**Conclusion:** The results showed that accumulation of silver in the brain might cause oxidative stress via reduction of the capacity of the antioxidant defense mechanism. However, further experiments should be carried out to clarify these events in details.

**Keywords:** Brain, Maternal milk, Nanosilver, Oxidative stress, Rat.

1. Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran. (Corresponding author) Assistant Professor. fatemi@iaufala.ac.ir

2. Assistant Professor, Biology Department, School of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

3. Associate Professor, Cardiovascular Research Center, Isfahan Cardiovascular Research Institute, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

4. MSc animal physiology, Isfahan Hypertension Research Center, Isfahan Cardiovascular Research Institute, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.