

بررسی پارامترهای بیوشیمیایی و هماتولوژیک خون در موش صحرایی نر بعد از مواجهه با نانوذره نیکل و کلرید نیکل

باقر سید علیپور^{۱*} (PhD)، فرنوش انوشا^۲ (MSc)، علی طراوتی^۱ (PhD)، سید محمد حسینی^۲ (PhD)

۱- گروه زیست سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران

۲- گروه زیست سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

۳- گروه پاتوبیولوژی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل

دریافت: ۹۶/۳/۱۳، اصلاح: ۹۶/۶/۱۹، پذیرش: ۹۶/۷/۱۱

خلاصه

سابقه و هدف: نیکل و ترکیبات آن جزء عوامل سرطان زا محسوب می شوند. با توجه به کاربرد نانوذرات نیکل و کلرید نیکل در پزشکی، صنایع دارویی، مواد غذایی، آرایشی و بهداشتی بررسی اثرات مخرب و سمیت نانو ذرات بر روی موجودات زنده اهمیت زیادی دارد. هدف از این مطالعه، بررسی سمیت نانوذره نیکل در مقایسه با کلرید نیکل بر پارامترهای بیوشیمیایی و هماتولوژی در موش صحرایی می باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۴۸ موش صحرایی نر بالغ به ۶ گروه تجربی و یک گروه کنترل و یک گروه شش تقسیم شدند ($n=6$). گروه کنترل هیچ تیماری دریافت نکردند. گروه شش سرم فیزیولوژیک و گروه های تیمار نانوذرات نیکل و کلرید نیکل با غلظت ۵، ۱۵ و ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم بصورت تزریق درون صفاقی دریافت کردند. پس از یک هفته تزریق، خونگیری از قلب صورت گرفت. پارامترهای بیوشیمیایی و هماتولوژی برای همه گروه ها اندازه گیری و مقایسه شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد میزان آلبومین در گروه کلرید نیکل و نانوذره نیکل با غلظت ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم نسبت به کنترل به ترتیب $(2/91 \pm 0/09)$ به $(3/25 \pm 0/33)$ ، $(2/95 \pm 0/13)$ به $(3/25 \pm 0/33)$ و $(3/25 \pm 0/33)$ به $(3/25 \pm 0/33)$ کاهش و اوره خون $(43/33 \pm 11/94)$ به $(43/33 \pm 11/94)$ و $(p < 0/001)$ و $(43/33 \pm 11/94)$ به $(43/33 \pm 11/94)$ ، $(p = 0/019)$ افزایش معنی داری را نشان داد. کراتینین و تعداد گلبول سفید در گروه کلرید نیکل با غلظت ۲۵ میلی گرم نسبت به کنترل به ترتیب $(0/53 \pm 0/05)$ به $(0/53 \pm 0/05)$ و $(0/53 \pm 0/05)$ به $(0/53 \pm 0/05)$ و $(0/53 \pm 0/05)$ به $(0/53 \pm 0/05)$ افزایش معنی داری را نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه نشان داد که نانوذره نیکل و کلرید نیکل باعث تحریک سیستم ایمنی، افزایش تعداد گلبول های سفید و تغییر پارامترهای بیوشیمیایی خون می شود که این نتایج سمیت نانوذره نیکل را تایید می کند.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات نیکل، کلرید نیکل، پارامترهای بیوشیمیایی، پارامترهای هماتولوژی، موش صحرایی نر.

مقدمه

آزادسازی در محیط‌های مختلف و خطرناک ناشی از نانوذرات صورت گرفته است و امنیت این ترکیب برای بشر همچنان نامشخص است. نیکل عنصری است فلزی و سخت، چکش خوار، به رنگ سفید-نقره ای که با نماد علمی Ni نمایش داده می شود. کارخانه ها و سوزاندن زباله ها دو عامل اصلی در تولید نیکل و ورود آن به هوا می باشند. نانوذرات نیکل و کلرید نیکل در پزشکی، صنایع دارویی، مواد غذایی، آرایشی و بهداشتی و مهندسی کاربرد دارند. بنابراین شناخت سمیت آنها در بدن اهمیت دارد. از مصارف معمول نیکل می توان به هیدروژن دهی روغنهای گیاهی، تولید ظروف ضدحرارت آزمایشگاهی، تولید سکه‌های پول، تهیه کامپوزیتهای پزشکی در داروسازی به عنوان ظرفیت حامل برای درمان و نفوذ از

فناوری نانو با بهره گیری از ویژگی های فیزیکی، شیمیایی و زیستی مواد در اندازه های کمتر از ۱۰۰ نانومتر در علوم و صنایع مختلف کاربرد دارد (۱). در سالهای اخیر فناوری نانو پیشرفت سریعی در بسیاری از شاخه های علم داشته است. نانوذرات عناصر اساسی و پایه ای در چارچوب فناوری نانو هستند (۲). این ذرات در انواع برنامه های کاربردی به دلیل خواص منحصر به فرد فیزیک و شیمیایی از جمله نسبت سطح به حجم بالا و اثرات کوانتومی، انحلال پذیری و سطح تحرک بالاتر استفاده می شوند (۳). استفاده رو به رشد نانوذرات مصنوعی در جوامع انسانی بی شک منجر به آزادسازی چنین موادی به انواع محیطها و اکوسیستمها خواهد شد. با این وجود تحقیقات کمی در مورد رفتار محیطی، میزان

این مقاله حاصل پایان نامه فرنوش انوشا دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال می باشد.

*مسئول مقاله: دکتر باقر سیدعلیپور

آدرس: ساری، دانشگاه مازندران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست سلولی و مولکولی. تلفن: ۰۱۱-۳۵۳۰۲۴۰۵

E-mail: b.alipour81@gmail.com

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، ۴۸ موش صحرایی نر ویستار بالغ با محدوده سنی ۱۴-۱۲ هفته و محدوده وزن ۲۲۰-۱۷۰ گرم از انستیتو پاستور آمل خریداری شد. موش‌ها در اتاق حیوانات دانشگاه مازندران تحت شرایط استاندارد، دمای $23 \pm 2^\circ\text{C}$ درجه سانتی گراد و رطوبت حدود $60 \pm 10\%$ دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند و آب و غذای مخصوص به شکل پلت همواره در دسترس آن‌ها قرار داشت. آزمایش‌ها روی تمامی گروه‌های مورد بررسی در شرایط کاملاً یکسان و مطابق اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی در دانشگاه مازندران و با کد اخلاق زیستی ۳۹۶۰۰۱ UMZ. REC. صورت گرفت. جهت انجام این مطالعه نانوذره نیکل از شرکت سیگما آلدریج و کلرید نیکل از شرکت مرک آلمان خریداری شد که مشخصات آنها در جدول ۱ نشان داده شده است. در این پژوهش تجربی ۴۸ موش صحرایی نر بالغ به ۸ گروه ۶ تایی شامل یک گروه کنترل، یک گروه شم و ۶ گروه آزمایشی به طور تصادفی تقسیم بندی شدند. ترکیبات تزریقی روزانه تهیه شده و در هر مرحله قبل از تزریق به مدت ۱۵ دقیقه در سرم فیزیولوژی حل گردید و یک میلی لیتر از هر غلظت و با استفاده از سرنگ انسولین، بصورت درون صفاقی به مدت یک هفته تزریق شد. به موش های گروه شم روزانه یک میلی لیتر سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد تزریق شد.

۶ گروه آزمایشی روزانه نانوذره نیکل و کلرید نیکل با غلظت های ۵، ۱۵ و ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم دریافت نمودند. پس از آخرین تزریق با رعایت شرایط ناشتا، خونگیری از قلب تحت بیهوشی عمیق صورت گرفت. ابتدا موش را با کلروفورم بیهوش کرده، جانور را فیکس و عمل جمع آوری خون از قلب به وسیله سرنگ ۵ سی سی انجام گرفت. سپس نمونه خون به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ شد تا سرم از لخته جدا شود. نمونه های سرم جمع آوری شده تا زمان انجام سنجش پارامتر های بیوشیمیایی در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. جهت اندازه گیری آلبومین، اوریک اسید، توتال پروتئین، اوره، کراتینین و CRP از دستگاه تمام اتوماتیک اتوانالایزر آلفا کلاسیک با بهره گیری از کیت های پارس آزمون بر روی نمونه سرم انجام شد. جهت کالبراسیون دستگاه از Trucal u و جهت کنترل پارامترها از Trulab P استفاده شد.

برای سنجش توتال پروتئین در سرم باروش فوتومتریک و کیت آنزیمی CO بیوشیمی (شرکت پارس آزمون) استفاده شد. این آزمایش بر اساس کالبریمتری می باشد. در این آزمایش پروتئین در محیط قلیایی با یونهای مس تشکیل کمپلکس لاجوردی رنگ را می دهد. شدت رنگ ایجاد شده متناسب با میزان پروتئین در نمونه است. برای سنجش آلبومین در سرم با روش فوتومتریک و کیت آنزیمی CO بیوشیمی (شرکت پارس آزمون) استفاده شد. در این آزمایش آلبومین موجود در سرم با معرف برموکروزول سبز در pH اسیدی یک کمپلکس رنگی سبز-آبی ایجاد می کند. شدت رنگ ایجاد شده متناسب با مقدار آلبومین در نمونه می باشد. برای تشخیص کمی اوره در سرم باروش فوتومتریک و کیت آنزیمی CO بیوشیمی (شرکت پارس آزمون) استفاده شد.

موانع سلولی برای تحویل دارو اشاره کرد (۴). از لحاظ تقسیم بندی سم شناسی ملی آمریکا، نیکل و ترکیبات آن جز عوامل سرطانزا محسوب می شوند و از نظر طبقه بندی آژانس بین المللی تحقیقات سرطان (IARC) نیکل در گروه یک قرار می گیرد (۴). جذب گوارشی این فلز به کندی انجام می شود اما استنشاق فیوم های نیکل موجب جذب آن می شود. بیشترین تجمع آن در ریه و مغز صورت می گیرد و دفع آن از طریق کلیه ها و صفرا است. ترکیبات نیکل از جفت عبور کرده و اثرات تراتوژنیک دارد (۵). استنشاق فیوم های نیکل باعث سرطان بینی، حنجره، ریه، معده و کلیه می شود (۶). همانند اکثر فلزات، سمیت نیکل وابسته به مسیر مواجهه و حلالیت ترکیبات نیکل می باشد.

مکانیسم اثر نیکل از طریق ایجاد اتصالات غیر برگشت با ماکرومولکولهای ضروری و حیاتی بدن از جمله آلبومین، ماکروگلوبولین-آلفا ۲ و ال-هیستیدین می باشد و به همین علت موجب اختلال در فعالیت بیولوژیکی سلولها می شود. وزن مولکولی پایین کمپلکس نیکل و ال-هیستیدین باعث می شود که بتواند به راحتی از غشای بیولوژیکی عبور کند. نیکل از مجرای رودی- معدی به شکل لیپوفیلیک با وزن مولکولی کم، جذب می شود (۷و۸).

مکانیسم مولکولی سمیت نانوذرات هنوز کاملاً درک نشده است ولی تحقیقات نشان داده اند که گونه های فعال اکسیژن نقش مهمی در اثرات سمیتی نانوذرات دارند. افزایش پارامترهای فیزیوشیمیایی نانومواد مانند اندازه، شکل، ساختار و اجزای تشکیل دهنده آن باعث شده بررسی اثرات سمیت سلولی نانومواد پیچیده و چالش برانگیز باشد (۹). برخی از پارادایم ها برای سمیت ایجاد شده با واسطه نانوذرات عبارت از استرس اکسیداتیو، التهاب، آسیب های ژنتیکی و مهار تقسیم سلولی و مرگ سلول است (۱۲-۱۰). گونه های فعال اکسیژن در زمینه های پیام رسانی سلولی و سیستم ایمنی بدن درگیر هستند. نانوذرات با تغییر دادن سطح ROS (Reactive Oxygen Species) باعث آسیب DNA، تغییرات در روند رونویسی ژن ها، تغییر در سایتوکین ها و آسیب به پروتئین و چربی می شود و اثرات زیان باری در سلول ایجاد می کند (۱۳). سلول های التهابی مانند نوتروفیل ها و ماکروفاژها با فاگوسیتوز نانوذرات از طریق سیستم آنزیم NADPH-اکسیداز تولید ROS زیادی می کنند. بنابراین ROS ناشی نانوذرات از طریق فعالیت مسیرهای علامت دهی سلولی مانند MAPK، NF- κ B، RTK و AKT باعث آشکار التهابی بیان کموکاین و سیتوکین می شود (۱۴و۱۵). نانوذرات قادر به جذب از طریق روده بوده و در بافت های مختلف مانند مغز، قلب، کبد، کلیه ... توزیع می گردند و بر این اندام ها تاثیر می گذارند. نانوذرات می توانند به اعماق بافت ها نفوذ پیدا کنند و به سیستم لنفاوی راه یابند و واکنشهای التهابی را افزایش دهند (۱۶). اطلاعات سمیت سلولی ترکیبات نیکل از جمله تغییرات ایجاد شده در سیستم خونی و پارامترهای بیوشیمیایی سرم در فاصله زمانی مختلف کمتر شناخته شده است. هدف از این مطالعه، بررسی سمیت نانوذره نیکل در مقایسه با کلریدنیکل بر میزان سلولهای خونی و بررسی فاکتورهای بیوشیمیایی سرم موش صحرایی از طریق تزریق درون صفاقی می باشد.

جدول ۱. مشخصات نانوذره نیکل و کلرید نیکل

نوع ماده	چگالی	شکل ظاهری	وزن مولکولی	رنگ	درصد خلوص	کد محصول	شرکت سازنده
نانوذره نیکل	$8/9 \text{ g/cm}^3$	کروی	$58/69 \text{ g/mol}$	سیاه	۹۹٪	۵۷۷۹۹۵	سیگما آلدریج
کلرید نیکل هگزا هیدرات	$92/1 \text{ g/cm}^3$	بلوری	$129/59 \text{ g/mol}$	سبز	۹۹٪	۱۰۶۷۱۷	مرک آلمان

نانوذره نیکل با غلظت ۲۵ میلی گرم بر کیلو گرم ($p=0/009$) اختلاف معنی داری نسبت به شم مشاهده شده است. مقدار آلومین در بین بقیه گروه های تجربی نسبت به همدیگر تفاوت معنی داری مشاهده نشد. آنالیز آماری در گروه های مورد مطالعه افزایش معنی داری را در غلظت کراتینین نشان داد ($p=0/023$). کراتینین در گروه کلرید نیکل با غلظت ۲۵ میلی گرم بر کیلو گرم ($0/66 \pm 0/05$) در مقایسه با کنترل ($0/53 \pm 0/05$) افزایش معنی داری ($p=0/05$) را نشان داد.

بین شم و بقیه گروه ها و همچنین بین گروه ها با هم اختلاف معنی داری مشاهده نشد (جدول ۲). نتایج نشان داد که اوره خون در گروه های تیمار شده بطور معنی داری افزایش یافت ($p<0/001$). بطوریکه اوره خون در گروه کلرید نیکل با غلظت ۵ میلی گرم بر کیلو گرم ($70/50 \pm 10/52$) به $43/33 \pm 11/94$ ، $p=0/013$ ، گروه کلرید نیکل با غلظت ۲۵ میلی گرم بر کیلو گرم ($90/33 \pm 13/95$) به $43/33 \pm 11/94$ و $p<0/001$ و گروه نانوذره نیکل با غلظت ۲۵ میلی گرم بر کیلو گرم ($69/50 \pm 12/28$) به $43/33 \pm 11/94$ و $p=0/019$ در مقایسه با کنترل افزایش معنی داری را نشان داد (جدول ۲).

همچنین در گروه کلرید نیکل با غلظت ۲۵ میلی گرم بر کیلو گرم نسبت به گروه شم ($90/33 \pm 13/95$ به $56/20 \pm 11/18$ ، $p=0/002$) اختلاف معنی داری مشاهده شد. کلرید نیکل با غلظت ۵ میلی گرم بر کیلو گرم اختلاف معنی داری با نانوذره نیکل با غلظت ۵ میلی گرم بر کیلو گرم ($p=0/03$) و نانوذره نیکل با غلظت ۱۵ میلی گرم بر کیلو گرم ($p=0/027$) نشان داد. کلرید نیکل با غلظت ۲۵ میلی گرم بر کیلو گرم اختلاف معنی داری با نانوذره نیکل با غلظت ۵ میلی گرم بر کیلو گرم ($p<0/001$) و نانوذره نیکل با غلظت ۱۵ میلی گرم بر کیلو گرم و کلرید نیکل با غلظت ۲۵ میلی گرم بر کیلو گرم تفاوت معنی داری ($p=0/018$) مشاهده شد.

بین نانوذره نیکل با غلظت ۱۵ میلی گرم بر کیلو گرم و نانوذره نیکل با غلظت ۲۵ میلی گرم بر کیلو گرم تفاوت معنی داری ($p=0/038$) مشاهده شد. آنالیز آماری در گروه های مورد مطالعه کاهش معنی داری را در اسید اوریک نشان داد ($p<0/001$). اسید اوریک در گروه کنترل با تمام گروه های مورد مطالعه بجز شم اختلاف معنی داری در سطح ($p<0/001$) نشان داد (جدول ۲). همچنین بین شم و بقیه گروه های مورد مطالعه اختلاف معنی داری در سطح ($p<0/001$) مشاهده شد. بین گروه کنترل و گروه شم، و همچنین بین بقیه گروه ها نسبت به هم اختلاف معنی داری مشاهده نشد. CRP در گروه های مورد مطالعه افزایش نشان داد اما این تفاوت نسبت به کنترل معنی دار نبود. نتایج نشان داد که توتال پروتئین در گروه های مورد مطالعه کاهش یافت اما این کاهش نسبت به کنترل معنی دار نبود (جدول ۲).

نتایج حاصل از تاثیر غلظت های مختلف نانوذره نیکل و کلرید نیکل بر سلول های خونی: برای بررسی سلول های خونی، بعد از خونگیری از موش ها نمونه CBC گرفته شد و از دستگاه تمام اتوماتیک سیستمس جهت شمارش سلول های خونی و میزان هموگلوبین و هماتوکریت و اندازه گیری MCV استفاده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که تعداد گلبول سفید در گروه های مورد مطالعه افزایش معنی داری دارد ($p<0/027$). تعداد گلبول سفید در گروه کلرید نیکل با غلظت ۲۵ میلی گرم بر کیلو گرم ($9/10 \pm 0/62$) در مقایسه با کنترل ($4/43 \pm 0/66$) افزایش معنی داری ($p=0/05$) را نشان داد (جدول ۲). بقیه گروه ها نسبت به هم و همچنین

در این آزمایش اوره در حضور اوره آز هیدرولیز شده و به آمونیاک و دی اکسید کربن تبدیل می شود. آمونیاک تولید شده با ۲-آگزوگلوتارات و NADH در حضور گلوتامات دهیدروژناز واکنش داده و NAD و گلوتامات تولید می کند. کاهش جذب محلول ها، به دلیل کاهش غلظت NADH در واحد زمان نسبت به غلظت اوره است. غلظت اوره بر حسب mg/dl گزارش شد. برای تشخیص کمی اسید اوریک در سرم با روش فتومتریک و کیت آنزیمی CO بیوشیمی (شرکت پارس آزمون) استفاده شد. این آزمایش بر اساس آنزیمی و کالریمتری با استفاده از روش Toos انجام شد (۱۷).

برای تشخیص کمی کراتینین در سرم با روش فتومتریک و کیت آنزیمی CO بیوشیمی (شرکت پارس آزمون) استفاده شد. در این آزمایش کراتینین با آلکان پیکرات تشکیل یک کمپلکس رنگی می دهد. شدت رنگ ایجاد شده متناسب با مقدار کراتینین در نمونه است. غلظت کراتینین بر حسب mg/dl گزارش شد. در این آزمایش جهت تشخیص کمی CRP در سرم، ذرات لاتکس حساس شده با آنتی CRP اختصاصی و خالص، هنگام مجاورت با نمونه حاوی CRP آگلوتینه می شود. آگلوتیناسیون ذرات لاتکس موجب تغییر در جذب نوری می گردد، که این تغییر با میزان CRP موجود در نمونه مورد آزمایش، در مقایسه با جذب نوری آن با جذب نوری کالیبراتور CRP محاسبه می شود. غلظت CRP بر حسب mg/dl گزارش شد. سنجش تمام پارامتر ها توسط روش پیشنهادی فدراسیون بین المللی شیمی بالینی (IFCC)، با کمک دستگاه اتوانالایزر COBAS MIRA انجام شد (۱۸).

شمارش سلول های خونی: جهت انجام آزمایش شمارش کامل سلول ها، نمونه خونی گرفته شده در ویال CBC حاوی ماده ضد انعقاد EDTA روی دستگاه رولر میکسر هماتولوژی به مدت ۲۹ دقیقه گذاشته شد تا نمونه ها مخلوط و همگن شود، سپس نمونه ها به دستگاه سل کانتر هماتولوژی مدل سیستمس داده شد و سلول های خونی و همچنین سطح هموگلوبین، هماتوکریت و MCV اندازه گیری شد.

روش آنالیز آماری: پس از جمع آوری داده ها تجزیه و تحلیل با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و آزمونهای آماری آنالیز واریانس یک طرفه (آنوا) و جهت مقایسه میانگین ها از آزمون توکی استفاده شد و $p<0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

نتایج حاصل از تاثیر غلظت های مختلف نانوذره نیکل و کلرید نیکل بر پارامترهای بیوشیمیایی خون: از نمونه سرم جهت اندازه گیری پارامترهای بیوشیمیایی استفاده شد. در بررسی پارامترهای بیوشیمیایی خون، نتایج این مطالعه تغییرات قابل ملاحظه ای را در اوره، اسید اوریک و آلومین نشان داد. آنالیز آماری در گروه های مورد مطالعه تغییرات معنی داری را مقدار آلومین نشان داد ($p=0/001$). مقدار آلومین در گروه کلرید نیکل با غلظت ۲۵ میلی گرم بر کیلو گرم ($2/91 \pm 0/09$)، $p=0/015$ و نانوذره نیکل با غلظت ۲۵ میلی گرم بر کیلو گرم ($3/29 \pm 0/13$)، $p=0/04$ کاهش معنی داری نسبت به کنترل ($3/25 \pm 0/33$) نشان داد (جدول ۲). مقدار آلومین در گروه نانوذره نیکل با غلظت ۵ میلی گرم بر کیلو گرم ($p=0/053$) و نانوذره نیکل با غلظت ۱۵ میلی گرم بر کیلو گرم ($p=0/003$) و

غلظت های مختلف کلرید نیکل و نانوذره نیکل در مقایسه با کنترل اختلاف معنی داری ندارد. اما مقدار هموگلوبین در گروه کلرید نیکل با غلظت ۱۵ میلی گرم بر کیلو گرم ($15/6 \pm 1/04$) در مقایسه با گروه کلرید نیکل با غلظت ۱۵ میلی گرم بر کیلو گرم ($13/03 \pm 1/00$) و گروه نانوذره نیکل با غلظت ۵ میلی گرم بر کیلو گرم ($13/8 \pm 0/30$) ($p=0/034$) تغییر معنی داری را نشان داد (جدول ۳). درصد هماتوکریت در گروه های مورد مطالعه تغییرات معنی داری نداشت ($p=0/096$).

آنالیز آماری نشان داد که مقدار حجم متوسط گلبول های قرمز در گروه های مورد مطالعه تغییرات معنی داری دارد ($p=0/018$). بطوریکه مقدار حجم متوسط گلبول های قرمز در گروه های تیمار شده با نانوذره نیکل در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت اما اختلاف معنی داری را نشان نداد (جدول ۳).

نسبت به شم تفاوت معنی داری را نشان ندادند. تعداد گلبول قرمز در گروه های مورد مطالعه تغییرات معنی داری داشت ($p<0/05$). به طوریکه تعداد گلبول قرمز در گروه های تیمار شده با غلظت های مختلف کلرید نیکل و نانوذره نیکل در مقایسه با کنترل و شم اختلاف معنی داری را نشان ندادند. تعداد گلبول قرمز در گروه تیمار شده ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم کلرید نیکل در مقایسه با کنترل کاهش یافت اما این اختلاف معنی دار نبود.

فقط بین گروه ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم کلرید نیکل ($6/46 \pm 0/40$) با گروه ۱۵ میلی گرم بر کیلوگرم کلرید نیکل اختلاف معنی داری در سطح ($p=0/017$) مشاهده شد. تعداد پلاکت ها در گروه های مورد مطالعه تغییرات معنی داری نداشت. نتایج این مطالعه نشان داد که مقدار هموگلوبین در گروه های مورد مطالعه تغییرات معنی داری دارد ($p=0/01$). مقدار هموگلوبین در گروه های تیمار شده با

جدول ۲. بررسی پارامترهای بیوشیمیایی خون پس از تزریق درون صفاقی غلظت های مختلف نانوذره نیکل و کلرید نیکل در موش صحرایی ($n=6$)

پارامترها	آلبومین (g/dl)	توتال پروتئین (g/dl)	کراتینین (mg/dl)	اوره (mg/dl)	اسیداوریک (mg/dl)	CRP(mg/dl)
گروه ها	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD
کنترل	۳/۲۵±۰/۳۳	۶/۴۶±۰/۲۳	۰/۵۳±۰/۰۵	۴۳/۳۳±۱۱/۹۴	۶/۶±۱/۴	۰/۱۰±۰/۰۸
شم	۳/۳۲±۰/۰۸	۶/۸۴±۰/۴۸	۰/۵۴±۰/۰۵	۵۶/۲۰±۱۱/۱۸	۷/۲±۱/۴	۰/۱۴۲±۰/۰۹
گروه تجربی ۱	۳/۰۵±۰/۰۸	۶/۲۸±۰/۱۴	۰/۶۱±۰/۰۷	۷۰/۵۰±۱۰/۵۲*	۳/۴±۰/۵۸***	۰/۱۷۵±۰/۱۶
گروه تجربی ۲	۳/۲۰±۰/۰۸	۶/۵۱±۰/۳۶	۰/۶۰±۰/۰۶	۶۴/۰۰±۸/۶۷	۳/۳±۰/۱۰***	۰/۱۷۰±۰/۱۱
گروه تجربی ۳	۳/۱۴±۰/۰۵	۶/۵۴±۰/۴۳	۰/۶۶±۰/۰۵*	۹۰/۳۳±۱۳/۹۵***	۳/۴±۰/۳۰***	۰/۱۹۶±۰/۲۰
گروه تجربی ۴	۳/۰۱±۰/۱۴	۶/۳۳±۰/۴۰	۰/۵۶±۰/۰۵	۴۵/۶۶±۴/۰۳	۳/۹±۰/۵۸***	۰/۱۲۵±۰/۱۳
گروه تجربی ۵	۲/۹۱±۰/۰۹*	۶/۱۵±۰/۳۶	۰/۵۶±۰/۰۸	۴۵/۳۳±۱۰/۳۴	۳/۷±۰/۶۵***	۰/۱۷۶±۰/۱۵
گروه تجربی ۶	۲/۹۵±۰/۱۳*	۶/۲۳±۰/۳۰	۰/۶۴±۰/۰۸	۶۹/۵۰±۱۲/۲۸*	۳/۹±۰/۵۷***	۰/۱۹۴±۰/۱۰

علامت ستاره سطح معنی داری در مقایسه با کنترل در نظر گرفته شده است. * $p<0/05$, ** $p<0/01$, *** $p<0/001$. گروه تجربی ۱، ۲ و ۳ به ترتیب غلظت کلرید نیکل ۵، ۱۵ و ۲۵ mg/kg، گروه تجربی ۴، ۵ و ۶ به ترتیب غلظت نانوذره نیکل ۵، ۱۵ و ۲۵ mg/kg

جدول ۳. بررسی سلولهای خونی پس از تزریق درون صفاقی غلظت های مختلف نانوذره نیکل و کلرید نیکل در موش صحرایی ($n=6$)

پارامترها	WBC ($10^3/\mu l$)	RBC ($10^6/\mu l$)	PLT ($10^3/\mu l$)	Hb (g/dl)	MCV (fL)	HCT
گروه ها	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD
کنترل	۴/۴۳±۰/۶۶	۷/۰۶±۰/۳۵	۹۳۰/۳۳±۱۷۹	۱۴/۴±۰/۵	۵۹/۳±۱/۵۲	۴۴/۱۶±۳/۴
شم	۵/۰۳±۱/۱۹	۷/۳۳±۰/۲۶	۱۰۴۰/۱۷±۱۱۸	۱۴/۶±۰/۳۵	۶۱±۱/۱	۴۴/۵۳±۲/۵
گروه تجربی ۱	۸/۷۶±۱/۹۶	۷/۲۰±۰/۲۴	۹۰۶/۶۷±۱۱۶	۱۴/۵±۰/۵۰	۵۸±۱/۱	۴۲±۱/۷۳
گروه تجربی ۲	۷/۵۶±۲/۳۳	۸/۰۶±۰/۹۹	۸۷۹/۶۰±۳۷۱	۱۵/۶±۱/۰۴	۵۹/۶±۱/۵۱	۴۵/۲۵±۱/۸۹
گروه تجربی ۳	۹/۱۰±۰/۶۲*	۶/۴۶±۰/۴	۹۳۷/۶۷±۵۷	۱۳/۰۳±۱	۵۹/۶±۰/۵۷	۳۹/۶۶±۳/۲۱
گروه تجربی ۴	۸/۱۵±۱/۷۸	۷/۰۵±۰/۲۸	۹۲۵/۰۰±۱۰۸	۱۳/۸±۰/۳	۵۷/۷±۰/۵	۴۱±۱/۴۱
گروه تجربی ۵	۷/۳۵±۱/۹۷	۷/۱۶±۰/۴۷	۹۰۸/۳۲±۵۹	۱۴/۴±۰/۸	۵۷/۶±۰/۵۷	۴۱/۶۶±۲/۸۸
گروه تجربی ۶	۷/۷۰±۱/۵۹	۷/۲۰±۰/۳	۹۲۶/۳۳±۱۰۰	۱۴/۲±۰/۹۹	۵۷/۳±۲/۳۳	۴۱/۶۶±۲/۵۱

علامت ستاره سطح معنی داری در مقایسه با کنترل در نظر گرفته شده است. * $p<0/05$, ** $p<0/01$. RBC (گلبول قرمز، میلیون در هر میکرولیتر)، WBC (گلبول سفید، هزار در هر میکرولیتر)، MCV (حجم متوسط گلبول قرمز، فمتو لیتر)، Hb (هموگلوبین، گرم بر دسی لیتر)، PLT (پلاکت، هزار در هر میکرولیتر)، HCT (درصد هماتوکریت). گروه تجربی ۱، ۲ و ۳ به ترتیب غلظت کلرید نیکل ۵، ۱۵ و ۲۵ mg/kg، گروه تجربی ۴، ۵ و ۶ به ترتیب غلظت نانوذره نیکل ۵، ۱۵ و ۲۵ mg/kg

بحث و نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد تزریق درون صفاقی کلرید نیکل و نانوذره نیکل در غلظت های مختلف اثرات متفاوتی بر پارامتر های بیوشیمیایی و هماتولوژیک خون در موش صحرایی دارد. برای استفاده از پاراکلینیک در تشخیص بیماری ها، ابتدا باید فعالیت طبیعی اندام ها و بافت ها و مقادیر طبیعی پارامترهای موجود در سرم به طور دقیق تعیین و اندازه گیری شود تا با به دست آمدن مقادیر غیر طبیعی، ارزیابی فعالیت ناهنجار اعضا و بافت ها در شرایط بیماری ممکن گردد. لذا اندازه گیری و به دست آوردن مقادیر طبیعی پارامترهای بیوشیمیایی اهمیت زیادی دارد.

در این مطالعه مقدار آلبومین تغییرات معنی داری را نشان داد بطوریکه در غلظت بالای کلرید نیکل و نانوذره نیکل کاهش معنی داری نسبت به کنترل مشاهده شده است. آلبومین عمده ترین پروتئین خون است که در کبد ساخته می شود و در واقع مثل آنتی اکسیدان ها عمل می کند و بافت ها و سلول ها را از آسیب رادیکال های آزاد محافظت می نماید. آلبومین به محصولات دفعی، سموم و داروهای مضر که ممکن است به بدن آسیب بزنند متصل و موجب دفع آنها می شود. علاوه بر آن، آلبومین باعث انتقال بسیاری از ویتامین ها، مواد معدنی و هورمون ها در خون می شود. غلظت سرمی آلبومین می تواند مستقیماً در اثر آسیب گومرولهای کلیه نیز تحت تاثیر قرار گیرد (۱۹).

عوامل متعددی در کاهش آلبومین سرم نقش دارند که می تواند به علت اختلال در سنتز آلبومین در بیماری های کبد و تشدید کاتابولیسم در عفونت و بدخیمی ها باشد که با کاهش ظرفیت انتقال ترکیبات متصل به آن همراه است و تاثیر بسزایی را در متابولیسم داروها و ترکیبات هورمونی و مواد اندوژن مانند کلسیم و بیلروبین خواهد داشت. مطالعه Magaye و همکارانش نشان داد که تزریق وریدی نانوذره نیکل به موش باعث افزایش آلبومین در غلظت ۱ میلی گرم بر کیلو گرم می شود اما در غلظت های ۲ و ۴ میلی گرم تغییراتی خاصی صورت نگرفت (۲۰) که با مطالعه ما همخوانی ندارد.

اندازه گیری نسبت پروتئین توتال ابزار مفیدی برای تشخیص بسیاری از نارسایی ها است. مقدار طبیعی پروتئین های تام سرم ماحصل تعادل سنتز و کاتابولیسم آنها در بدن است. کاهش پروتئین تام سرم با کمبود متعادل گلوبین و آلبومین همراه بوده و همچنین کاهش پروتئین های تام در مواردی با کاهش آلبومین همراه است که در بیماریهای شدید کبد (باعث کاهش سنتز پروتئین ها) و افزایش کاتابولیسم مشاهده می شود. کاهش غلظت توتال پروتئین در اثر سنتز ناقص پروتئین در کبد، جذب ناقص روده ای، از دست دادن پروتئین در اثر عملکرد نادرست کلیه ایجاد می گردد (۲۱ و ۲۲). مطالعه ما نشان داد که پروتئین های تام سرم در تمام گروه های مورد مطالعه کاهش یافت که با نتایج مطالعه Magaye و همکارانش مطابقت دارد (۲۰).

پروتئین C واکنش پذیر نوعی پروتئین سرمی و یکی از معروف ترین اعضای گروه پروتئین های فاز حاد است که در جریان التهاب ناشی از عفونت، استرس، جراحات و نکروز و بدخیمی افزایش می یابد. یکی از وظایف این پروتئین تشویق و تقویت بیگانه خواری لوکوسیت های خون در برابر عوامل بیماری زا است. افزایش CRP در بیماری های عفونی و التهاب به موازات سدیمنتاسیون گلوبول قرمز و افزایش لکوسیت های خون صورت می گیرد. سطح CRP در بدن افراد نرمال پایین است، اما در حین پاسخ التهابی در بدن این مقدار چند صد برابر افزایش

می یابد. مطالعه Deng و همکارانش نشان داد مقدار CRP سرم در غلظت های مختلف سولفات نیکل نسبت به کنترل افزایش یافت بطوریکه فقط در غلظت بالا این تغییرات معنی دار بود (۲۳). مطالعه ما نشان داد در تیمار با نانوذره و کلرید نیکل مقدار CRP سرم افزایش یافت اما این افزایش نسبت به کنترل معنی دار نبود. اسید اوریک محصول نهایی کاتابولیسم پورین ها در انسان می باشد که تحت اثر آنزیم گزانتین اکسیداز از متابولیت هایی واسط چون هیپوگزانتین و گزانتین تشکیل میشود. در انسان اسیداوریک فراوان ترین آنتی اکسیدان محلول می باشد، که در شرایط آسیب اکسیداتیو به عنوان یک عامل جمع اوری کننده رادیکال های آزاد درون سلولی در نظر گرفته می شود (۲۴).

کبد پس از تجزیه پروتئین های مورد استفاده در سلول های بدن آمونیاک تولید می کند که حاوی نیتروژن است. اغلب بیماری هایی که روی کبد و کلیه تاثیر می گذارند بصورت بالقوه روی میزان اوره خون نیز اثر می گذارند. اگر به علت فعالیت کبد، میزان اوره در خون بالا رود ولی میزان دفع آن از کلیه کم شود، غلظت اوره خون بالا می رود. کراتنیتن عمدتاً در کبد از آرژنین، گلیسین و متیونین ساخته می شود. سطوح پایین کراتنیتن در اثر دریافت ناکافی پروتئین، بیماری کبدی و حاملگی مشاهده می شود. افزایش میزان آن نیز در مشکلات کلیوی روی می دهد (۲۵). مطالعه Sheydaei و همکارانش نشان داد تاثیر نانو ذره اکسید روی بر برخی فاکتورهای کلیوی در موش سفید آزمایشگاهی باعث افزایش سطح کراتنیتن و اوره سرم در گروه تیمار با دوز ۸۰ mg/kg شد که نشان دهنده آسیب جدی کلیه می باشد (۲۶).

نتایج حاصل از این پژوهش با مطالعه ما در یک راستا قرار دارد. نتایج مطالعه نشان داد که مقدار نیتروژن اوره خون و کراتنیتن نسبت به کنترل بطور معنی داری افزایش یافت. کلیه ها وظیفه پاک سازی برخی مواد سمی حاصل از متابولیسم را بر عهده دارند. آزمایش کراتنیتن به همراه نیتروژن اوره خون نیز جهت بررسی عملکرد کلیه مورد استفاده قرار گرفتند. بنابراین نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که تزریق درون صفاقی نانوذره نیکل و کلرید نیکل بر روی عملکرد کلیه اثر می گذارد و آسیب کلیوی را نشان می دهد.

در پژوهش Naghsh و همکارانش، افزایش گلوبول های سفید و کاهش تعداد گلوبول های قرمز بعد از تاثیر نانوذرات نقره مشاهده شد. به طوریکه علت آن در غلظت بالا، لیز احتمالی گلوبول های قرمز و احتمالاً تحریک شدید سیستم ایمنی سلولی می باشد (۲۷). در پژوهش حاضر با تزریق درون صفاقی غلظتهای مختلف نانوذره نیکل و کلرید نیکل به مدت یک هفته، تعداد گلوبول های سفید در همه غلظت های مختلف نانوذره نیکل و کلرید نیکل نسبت به کنترل، افزایش را نشان داد. در مطالعه حاضر در تعداد گلوبول های قرمز تغییرات معنی داری مشاهده نشد به طوریکه در غلظت ۲۵ mg/kg کلرید نیکل نسبت به کنترل کاهش مشاهده شد، اما این کاهش معنی دار نبود.

به طور کل تزریق درون صفاقی نانوذره نیکل و کلرید نیکل سبب تحریک سیستم ایمنی و افزایش تولید گلوبول های سفید در موش صحرایی شد. گلوبول های سفید نقش مهمی در ایمنی دارند. مطالعات مختلف نشان داد که افزایش میزان گلوبول های سفید خون می تواند به علت غلظت زیاد نانوذرات باشد که به دلیل سطح تماس بیشتر و تاثیر بر غشای سلولها، باعث نفوذ در میتوکندری گلوبول سفید و تغییر فعالیت آنزیم های آنها می گردد (۲۸) و همچنین فعالیت آنتی اکسیدانی سلول را کاهش داده و در نتیجه میزان سلول های سفید خون کاهش

مانع گسترش هیالوپلاسمیک و کاهش تجمع پلاکت می شوند (۳۴). بدن در جهت مقابله با غلظت های کم نانوذره تولید گلبول های سفید را افزایش می دهد ولی با تضعیف بدن در غلظت های بالا با کاهش تولید گلبول های سفید مواجه هستیم. در نتیجه در مسمومیت های شدید کاهش تعداد سلول ها ظاهر می گردد. نانو ذرات همراه با فعالیت زیاد احتمالاً در بافت های هدف نفوذ می کنند و با ورود به سیستم لنفاوی واکنش های التهابی را افزایش می دهند. یافته های نشان داد که نانوذرات نیکل و کلرید نیکل در غلظت های بالا اثر سمیتی بیشتری بر پارامتر خونی و سرمی در مقایسه با غلظت های پایین دارد. کاهش در پارامتر هایی مانند هماتوکریت و سلول های قرمز خون، هموگلوبین و حجم متوسط گلبول قرمز نشانه ای از کم خونی هستند. این مطالعه نشان داد که تزریق درون صفاقی نانوذرات نیکل و کلرید نیکل باعث تحریک شدید سیستم ایمنی سلولی و افزایش تعداد گلبول های سفید در همه غلظت های مورد مطالعه نسبت به کنترل شد. به طور کلی نتایج این پژوهش سمیت نانوذرات نیکل و کلرید نیکل را تایید نمود و دقت در استفاده از غلظت های بالای این ترکیبات در زمینه های مربوط به سلامت ضروری می باشد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از خانم دکتر قدسیه کامرانی که در بررسی هیستوپاتولوژی کبد و کارشناس آزمایشگاه آقای علی رضا یوسف پور که در تهیه نمونه ها و بافت ها ما را یاری نمودند، تشکر و قدردانی می گردد.

می یابد. در نهایت بدن برای جبران، میزان گلبول های سفید خون را در غلظت های بالا افزایش می دهد (۲۹). بنابراین افزایش در تعداد سلول های سفید خون یک واکنش طبیعی فیزیولوژیک التهابی به مواد خارجی وارد شده به خون می باشد و همچنین کاهش تعداد سلول های سفید خون نشان از ورود بیش از حد نانوذره و عفونت است. رادیکال های آزاد تولید شده توسط نانوذرات باعث التهاب سلول های قرمز در نتیجه همولیز آنها می گردد (۳۰). همچنین کاهش تعداد گلبول های قرمز در غلظت های بالا احتمالاً می تواند ناشی از تاثیر نانوذرات بر سلول های بنیادی خون سازی در مغز استخوان باشد (۲۸). تحقیقات نشان داد نانوذرات با کاهش طول عمر گلبول های قرمز یا سرکوب فعالیت سلول های بنیادی مغز استخوان باعث کاهش تعداد گلبول های قرمز و در نتیجه کم خونی می شوند (۳۰). کاهش هموگلوبین، هماتوکریت و حجم سلول های خونی بعد از مواجهه با اشکال مختلف نیکل به صورت خوراکی مشاهده شده است (۳۱) که با یافته های حاصل از مطالعه ما در موش های صحرایی هم راستا می باشد. مطالعات متعدد نشان دادند رادیکال های آزاد تولید شده توسط نانوذرات می توانند باعث التهاب سلول های قرمز در نتیجه همولیز آنها گردد (۳۱ و ۳۲).

در مطالعه حاضر نانوذره نیکل و کلرید نیکل سبب کاهش تعداد گلبول های قرمز، میزان هماتوکریت، میزان هموگلوبین و حجم متوسط گلبول های قرمز و پلاکت گردید. Rezaei-Zarchi و همکارانش نشان دادند نانوذرات با تغییر ساختمان اینتگرین سطح پلاکت ها و فسفوپروتئین موجود در پلاکت ها باعث کاهش تعداد پلاکت می شوند (۳۳) این یافته ها با نتایج ارائه شده توسط ما مطابقت دارد. نانوذرات با نفوذ به پلاکت ها و اشغال فضاهای واکوئولی و گرانول ها

An Evaluation of Biochemical and Hematological Parameters of Blood in Male Rats after Exposure to Nickel and Nickel Chloride Nanoparticles

B. Seyedalipour (PhD)^{1*}, F. Anoosha (MSc)², A. Taravati (PhD)¹, S.M. Hoseini (PhD)³

1.Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, I.R.Iran

2.Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Life Sciences, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, I.R.Iran

3.Department of Veterinary Pathobiology, Faculty of veterinary Medicine, Islamic Azad University, Babol branch, Babol, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 19(11); Nov 2017; PP: 58-66

Received: Jun 3rd 2017, Revised: Sep 10th 2017, Accepted: Oct 3rd 2017.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Nickel and its compounds are considered as carcinogenic agents. Considering the application of nickel and nickel nanoparticles in medicine, pharmaceutical industries, food, and cosmetics, it is important to study the destructive effects and toxicity of these nanoparticles on living organisms. The aim of this study was to investigate the toxicity of nickel nanoparticles compared with nickel chloride on biochemical and hematological parameters in rats.

METHODS: In this experimental study, 48 adult male rats were divided into 6 experimental groups and one control group and one sham group (n=6). The control group did not receive any treatment. The sham group received physiologic serum and the treatment groups received nickel and nickel chloride nanoparticles at concentrations of 5, 15 and 25 mg/kg intraperitoneally. One week after injection, blood samples were collected from the heart. Biochemical and hematological parameters were measured and compared for all groups.

FINDINGS: The results showed that the level of albumin in the nickel and nickel chloride nanoparticle group at concentration of 25 mg/kg decreased compared to the control (2.91 ± 0.09 to 3.25 ± 0.33 , $p=0.015$) and (2.95 ± 0.13 to 3.25 ± 0.33 , $p=0.04$), while the level of blood urea increased significantly (90.33 ± 13.95 to 43.33 ± 11.94 , $p<0.001$) and (69.50 ± 12.28 to 43.33 ± 11.94 , $p=0.019$). Creatinine and white blood cell count at 25 mg/kg concentration of nickel chloride showed a significant increase compared to the control (0.66 ± 0.05 to 0.53 ± 0.05 , $p=0.05$) and (9.10 ± 0.62 to 4.43 ± 0.66 , $p=0.05$).

CONCLUSION: The results of the study showed that nickel and nickel chloride nanoparticles stimulate the immune system, increase the number of white blood cells and change the biochemical parameters of the blood, which confirms the toxicity of the nickel nanoparticle.

KEY WORDS: Nickel Nanoparticles, Nickel Chloride, Biochemical Parameters, Hematology Parameters, Male Rat.

Please cite this article as follows:

Seyedalipour B, Anoosha F, Taravati A, Hoseini SM. An Evaluation of Biochemical and Hematological Parameters of Blood in Male Rats after Exposure to Nickel and Nickel Chloride Nanoparticles. J Babol Univ Med Sci. 2017;19(11):58-66.

* Corresponding author: B. Seyedalipour (PhD)

Address: Department of Cellular and Molecular Biology, faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Sari, I.R.Iran

Tel: +98 11 35302405

E-mail: b.alipour81@gmail.com

References

1. Buzea C, Blandino I, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*. 2007;2(4):170-2.
2. Moreno-Vega AI, Gómez-Quintero T, Nuñez-Anita RE, Acosta-Torres LS, Castaño V. Polymeric and Ceramic Nanoparticles in Biomedical Applications. *J Nanotechnol*. 2012;2012.
3. David B. How meaningful are the results of nanotoxicity studies in the absence of adequate material characterization?. *Toxicol Sci*. 2008;101(2):183-5.
4. Cempel M, Nikel G. Nickel: A Review of Its Sources and Environmental Toxicology. *Polish J Environ Stud*. 2006;15(3):375-82.
5. Saini S, Nair N, Saini MR. Embryotoxic and teratogenic effects of nickel in Swiss albino mice during organogenetic period. *Biomed Res Int*. 2013 (2013).
6. Das KK, Buchner V. Effect of nickel exposure on peripheral tissues: Role of oxidative stress in toxicity and possible protection by ascorbic acid. *Rev Environ Health*. 2007;22(2):157-73.
7. Sunderman FW Jr, Hopfer SM, Sweeney KR, Marcus AH, Most BM, Creason J. Nickel absorption and kinetics in human volunteers. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1989;191(1):5-11.
8. Sunderman FW Jr. Biological monitoring of nickel in humans. *Scand J Work Env Hea*. 1993;19(1):34-8.
9. Pojlak-Blazi M, Jaganjac M, Zarkovic N. Cell oxidative stress, : risk of metal nanoparticles, in *Handbook of nanophysics: Nanomedicine and Nanorobotics*; NY, USA, 2010. pp:1-17.
10. Ju-Nam YR, Lead J. Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Sci Total Environ*. 2008;400(1-3):396-414.
11. Li N, Xia T, Nel AE. The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles. *Free Radic Biol Med*. 2008;44(9):1689-99.
12. Johnston HJ, Hutchison G, Christensen FM, Peters S, Hankin S, Stone V. A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Crit Rev Toxicol*. 2010;40(4):328-46.
13. Manke A, Wang L, Rojanasakul Y. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *Biomed Res Int*. 2013;942916:1-15.
14. Donaldson K, Poland CA. Inhaled nanoparticles and lung cancer—what we can learn from conventional particle toxicology. *Swiss Med Wkly*. 2012;142(13547):1-9.
15. Smith KR, Klei LR, Barchowsky A. Arsenite stimulates plasma membrane NADPH oxidase in vascular endothelial cells. *Am J Physiol*. 2001;280(3):442-9.
16. Hillyer JF, Albrecht RM. Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. *J Pharm Sci*. 2001;90(12):1927-36.
17. Kageyama N. A direct colorimetric determination of uric acid in serum and urine with uricase-catalase system. *Clin Chim Acta* 1971; 31:421-6.
18. Hedlund P. Clinical and experimental studies on C-reactive protein (acute phase protein). *Acta Med Scand Suppl*. 1961; 361:1-71.
19. Venkatesan N, Punithavathi D, Arumugam V. Curcumin prevents adriamycin nephrotoxicity in rats. *Brit J Pharmacol*. 2000;129(2):231-4.
20. Magaye R, Yue X, Zou B, Shi H, Yu H, Liu K. Acute toxicity of nickel nanoparticles in rats after intravenous injection. *Int J Nanomed*. 2014;9:1393-402.
21. Thomas L. Clinical laboratory diagnostics: use and assessment of clinical laboratory results, 1st ed. Frankfurt/Main: TH-Books-Verl.-Ges 1ed;1998.pp. 644-7.

22. Johnson A, Rohlf M, Silverman EM, Protein LM. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd, WB. Saunders Co, Philadelphia;1999. Pp.477-540.
23. Deng F, Guo X, Xia P, Liu H. Damage on lung and systemic inflammation induced by nickel sulfate intratracheal instillation in rats. J Hyg Res. 2009;38(3):269-72.
24. Hellsten Y, Tullson PC, Richter EA, Bangsbo J. Oxidation of urate in human skeletal muscle during exercise. Free Radic Biol Med. 1997;22(1-2):169-74.
25. Jacobs SD, DeMott RW, Oxley KD. Laboratory test handbook, 3rd ed. Lexi comp; 2004 .p.474-7.
26. Sheydaei P, Bayrami A, Azizian Y, Parvinroo S. Study on the toxicity effects of zinc oxide nanoparticles on hematological and serum parameters in mice. Arak Med Univ J. 2017;19(10):39-47. [In Persian].
27. Naghsh N, Nuri A, Aghababa H, Amirkhani-Dehkordi S. The effect of nanosilver particles on alanin aminotransferase (alt) activity and white blood cells level in male wistar rats, in vivo condition. Zahedan J Res Med Sci. 2012;13(9):1-7. [In Persian].
28. Razmara P, Heyrati PF, Dorafshan S. Effect of silver nanoparticles on some hematological indices of rainbow catfish (*pangasius hypophthalmus*). JCT autumn. 2014;5(3):263-72. [In Persian].
29. Vasantharaja D, Ramalingam V, Aadinaath Reddy G. Oral toxic exposure of titanium dioxide nanoparticles on serum biochemical changes in adult male Wistar rats. Nanomed J. 2015;2(1):46-53.
30. Faiz H, Zuberi A, Nazir S, Rauf M, Younus N. Zinc Oxide, zinc sulfate and zinc oxide nanoparticles as source of dietary zinc: comparative effects on growth and hematological indices of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Int J Agric Biol. 2015;17(3):568-74.
31. Das kk, Das SN, Dhundasi SA. Nickel, its adverse health effects & oxidative stress. Indian J Med Res. 2008;128(4):412-25.
32. Alkaladi A, El-Deen NAMN, Afifi M, Zinadah OAA. Hematological and biochemical investigations on the effect of vitamin E and C on *Oreochromis niloticus* exposed to zinc oxide nanoparticles. Saudi J Biol Sci. 2015;22(5):556-63.
33. Rezaei-Zarchi S, Taghavi-Foumani M, Razavi Sheshdeh S, Negahdary M. The effect of silver nanoparticles on blood cells in male rats. Sci J of Iran Blood Transfus Organ. 2013;10(2):147-53. [In Persian]
34. Najafzadeh H, Ghoreishi SM, Mohammadian B, Rahimi E, Afzalzadeh MR, Kazemivarnamkhasti M, et al. Serum biochemical and histopathological changes in liver and kidney in lambs after zinc oxide nanoparticles administration. Vet World. 2013;6(8):534-7.