

اثر استنشاقی نانو ذرات مغناطیسی اکسید آهن بر روی بیان پروتئین p53 در بیضه موش‌های نژاد Balb/C به روش ایمونوهیستوشیمی

حامده کریمی^۱، M.Sc.، ویدا حجتی^۲، Ph.D.*، عبدالحسین شیروی^۳، Ph.D.

– گروه زیست شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان ایران
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: vida.hojati@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۳/۷

چکیده

هدف: هدف از مطالعه حاضر، بررسی تاثیر نانو ذرات مغناطیسی اکسید آهن بر روی بیان پروتئین p53 در بافت بیضه‌ی موش آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، هجده سر موش آزمایشگاهی نژاد Balb/C به سه گروه شش تایی تقسیم شدند که شامل: گروه کنترل که نانو ذرات را استنشاق نکردند. گروه‌های تجربی ۱ و ۲ به ترتیب نانو ذرات مغناطیسی اکسید آهن را با دوزهای ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌طور روزانه به مدت ۴۵ دقیقه در طی ۸ روز، استنشاق کردند. در پایان هشت روز، موش‌ها تشریح شده، بافت بیضه خارج شده و پردازش بافتی انجام شد. تغییرات ایجاد شده در میزان بیان پروتئین p53 با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی (رنگ-آمیزی آویدین - بیوتین) و شمارش سلول‌ها ارزیابی شد.

نتایج: نانو ذرات اکسید آهن استنشاقی با نفوذ به بافت بیضه باعث افزایش معنی‌دار بیان پروتئین p53 در گروه‌های تجربی شدند ($p < 0.05$).

نتیجه‌گیری: با استنشاق نانو ذرات مغناطیسی اکسید آهن در دوزهای ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، افزایش معنی‌داری در بیان پروتئین p53 در بافت بیضه نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. با افزایش دوز نانوذرات، بیان پروتئین نیز افزایش یافت.

واژگان کلیدی: نانو ذرات مغناطیسی اکسید آهن، استنشاق، پروتئین p53، بیضه، ایمونوهیستوشیمی

مقدمه

سرطان بیماری مهلکی است که برخلاف کشف داروهای ضد سرطان همچنان منجر به مرگ و میر می‌شود (۱). اخیراً استفاده از نانو ذرات با قطر کمتر از ۱۰۰ نانومتر (nm) منجر به پیشرفت‌های مهمی در تشخیص و درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان در هر دو محیط *in vivo* و *in vitro* شده است (۲).

مطالعات نشان می‌دهد که نانو ذرات بر اساس اندازه، شکل، ترکیب، پوشش و ... تاثیرات متفاوتی نشان می‌دهند (۳). نانو ذرات اکسید آهن تنها نانو ذرات اکسید فلز تایید شده برای استفاده کلینیکی در تشخیص سرطان هستند (۴ و ۵).

نانو ذرات به دلیل اندازه بسیار کوچک و میزان سطح به حجم بسیار بالا، دارای ویژگی‌های منحصر به فردی هستند که در علوم پزشکی از این ویژگی‌ها جهت تشخیص و درمان بیماری‌ها بهره گرفته می‌شود (۶ و ۷). بسیاری از محققین اخیراً درصدد دستیابی به موارد استفاده دارویی به‌خصوص دارورسانی هدفمند و تصویربرداری پزشکی با کمک نانو ساختارها هستند (۸).

توسعه دانش نانو تکنولوژی، بحث و تبادل نظر در مورد سمیت نانو مواد و تاثیر آن‌ها بر محیط زیست و سلامت انسان را به همراه دارد. مواد سمی منجر به پاسخ‌های گوناگونی در محیط سلول می‌شوند (۹).

با وجود مطالعات گسترده در زمینه سمیت نانو مواد بر آسیب میتوکندری‌ها، استرس اکسیداتیو، آسیب ژنوم، تغییر تنظیمات چرخه سلولی و دنا توره کردن پروتئین‌ها، مکانیسم چگونگی عمل آن‌ها بر اجزای بدن هنوز ناشناخته مانده است. یکی از مکانیسم‌های محتمل در ارتباط با مکانیسم عمل نانو ذرات، ایجاد رادیکال‌های واکنش‌گر اکسیژن (ROS یا reactive oxygen species) و در نتیجه آن ایجاد استرس اکسیداتیو است که منجر به وقوع تغییراتی در میزان کلسیم خارج سلولی، وقوع پاسخ‌های التهابی سلول، فعال‌سازی فاکتورهای رونویسی (p53 یک فاکتور رونویسی است) و افزایش تولید سیتوکین‌ها می‌شود. التهاب و استرس اکسیداتیو سبب آسیب دیدگی مولکول‌های زیستی شامل لیپیدها، پروتئین‌ها و ژنوم می‌شود که خود منجر به تخریب سلول-

ها و بافت‌ها و در نهایت سمیت ژنی و سمیت سلولی می‌شود (۱۰).

قابل توجه‌ترین روش قرار گرفتن در معرض نانو ذرات، روش تنفس است. تنفس عمیق نانو ذرات، ممکن است سبب فرار این ذرات از فاگوسیت‌ها و غشاهای سلولی ریه شده و به دیگر بخش‌های بدن انتشار یافته و باعث اثرات مخرب می‌شود (۱۱).

ذرات کوچکتر از ۱۰۰ نانومتر از طریق بازدم خارج نمی‌شوند و تقریباً همه آن‌ها در آلوئول‌ها باقی مانده و ناراحتی‌های مزمن را ایجاد می‌کنند. نانو ذرات دارای قابلیت و توانایی ورود، جابه‌جایی در درون بدن و آسیب به موجودات زنده می‌باشند. این توانایی، عمدتاً به‌خاطر اندازه کوچک آن‌هاست که اجازه نفوذشان به موانع فیزیولوژیک و عبور در داخل سیستم گردش خون میزبان را می‌دهد (۱۲).

ژن p53 یک ژن سرکوبگر تومور است که در موش روی کروموزوم ۱۱ و در انسان روی کروموزوم ۱۷ قرار دارد (۱۳). ژن p53 و پروتئین آن تکثیر و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول را کنترل نموده و نقش مهمی در درمان سرطان ایفا می‌کند (۱۴، ۱۵ و ۱۶).

در طی تحقیقاتی گزارش شده است که حضور نانو ذرات مغناطیسی یک مسمومیت سلولی وابسته به دوز را تحریک می‌کند و منجر به افزایش بیان p53 در سطح mRNA در سلول‌های کشت شده فئوکروموسیتوم (pc12) می‌شود (۱۷ و ۱۸).

نانوذرات به صورت استنشاقی، خوراکی، تزریقی و پوستی وارد بدن موجودات زنده از جمله انسان شده و از آنجا که توانایی عبور از غشاهای زیستی را دارند می‌توانند تاثیرات بالقوه سوء بر سلامت انسان و محیط زیست داشته باشند. مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر استنشاق نانو ذرات مغناطیسی اکسید آهن بر روی بیان پروتئین p53 در بافت بیضه‌ی موش آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روش‌ها

هجده سر موش سوری نر نژاد Balb/C شش هفته‌ای با وزن ۲۵ تا ۳۰ گرم از انستیتو پاستور تهران تهیه شده و در حیوانخانه دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان نگهداری شدند. موش‌ها به‌صورت تصادفی به قفس‌های پلاستیکی منتقل شدند و اجازه داده شد تا یک هفته قبل از شروع

سپس در محلول H_2O_2 به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفته و مجدداً با PBS شسته شدند. به ترتیب از محلول بیوتین و آویدین به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد و شستشو با PBS انجام شد. سپس از DAB رقیق شده به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی استفاده شد.

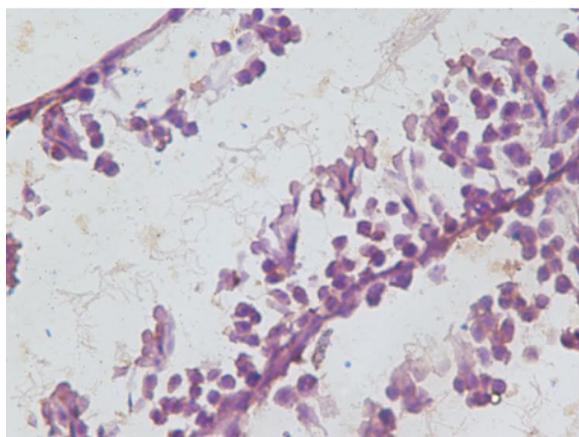
سپس نمونه‌ها با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند. سلول‌های مثبت که نشان‌دهنده تجمع پروتئین p53 بودند به رنگ قهوه‌ای درآمدند.

برای هر کدام از گروه‌ها، سلول‌های رنگ‌آمیزی شده (به رنگ قهوه‌ای) و کل سلول‌ها در هشت اسلاید شمارش شد.

بعد از جمع‌آوری اطلاعات، جهت تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم‌افزارهای Microsoft Excel، SPSS (آزمون t تست مستقل) و Prism با سطح معنی‌داری $p < 0.05$ و $p < 0.01$ استفاده شد.

نتایج

نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی نشان داد که میزان بیان پروتئین p53 در بافت بیضه موش‌هایی که تحت تاثیر استنشاقی نانوذرات اکسید آهن قرار گرفته بودند، در هر دو غلظت ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به طور چشم‌گیری افزایش یافته بود. در گروه کنترل، تجمع این پروتئین در سلول‌ها مشاهده نشد (شکل ۱).



شکل ۱: بافت بیضه موش در حالت طبیعی (گروه کنترل). رنگ آمیزی آویدین - بیوتین، بزرگ‌نمایی $400\times$

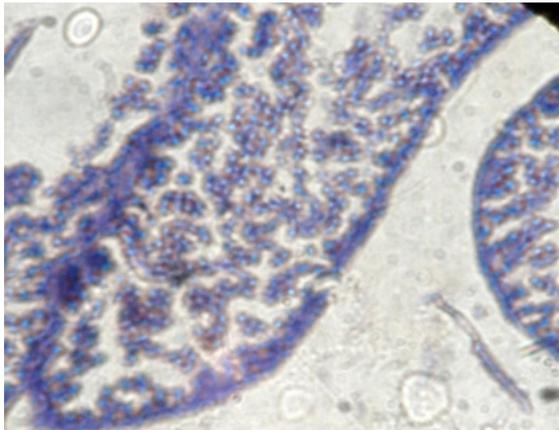
در دوزهای ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تجمع پروتئین در سلول‌ها به رنگ قهوه‌ای مشاهده شد (شکل‌های ۲ و ۳).

آزمایش با محیط خو بگیرند. محیط آزمایشگاه دارای شرایط استاندارد با دمای آزمایشگاه 23 ± 2 درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۴۵ تا ۶۵ درصد و چرخه نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بود و غذا و آب همیشه در دسترس موش‌ها فراهم بود.

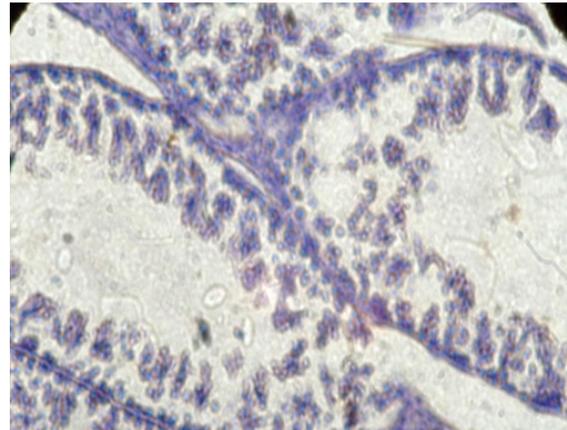
پودر نانو ذرات مغناطیسی آهن از شرکت پیشگامان نانومواد مشهد تهیه شد. برای تهیه محلول نانو ذرات، پودر سیاه‌رنگ نانو ذرات مغناطیسی آهن با اندازه ۱۵ تا ۲۰ نانومتر در آب مقطر حل شد. دوزهای متفاوت با فرمول $C1V1=C2V2$ تهیه شد.

موش‌ها به‌طور تصادفی به سه گروه شش‌تایی تقسیم شدند: گروه صفر یا کنترل که نانو ذرات را دریافت نکردند؛ گروه تجربی ۱ و گروه تجربی ۲ که به ترتیب نانو ذرات مغناطیسی اکسید آهن را به میزان ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌طریق استنشاقی دریافت کردند. موش‌های سوری روزانه به مدت ۴۵ دقیقه این نانو ذرات را در نبولایزر، استنشاق کردند. نبولایزر نانوذرات مصرفی را که به صورت محلول است، به ذرات ریز تقسیم می‌کند. این کار توسط پمپ هوای داخل دستگاه که برای کمپرس کردن هوای داخل دستگاه تعبیه شده صورت می‌گیرد. گاز از طریق یک روزنه خارج شده و از بالای یک لوله موئین حاوی محلول نانوذرات عبور می‌کند. بعلت فشار منفی ایجاد شده از حرکت هوای فشرده شده، محلول از دیواره موئین محفظه به بالا کشیده شده و از قسمت انتهایی نبولایزر خارج می‌شود. این نانوذرات به مدت هشت روز به حیوانات داده شد.

بعد از هشت روز، موش‌ها توسط کلروفرم بی‌هوش شده و تشریح شدند. سپس بافت بیضه جدا گردیده و در فرمالین ۱۰ درصد فیکس شد. به دنبال آن، بافت‌ها آگیری و در پارافین قالب‌گیری شدند. بعد از مقطع‌گیری با دستگاه میکروتوم و انتقال نمونه‌ها بر روی لام، رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی با تکنیک آویدین - بیوتین (Avidin-Biotin) صورت گرفت. بدین ترتیب که پارافین‌زدایی لام‌ها و آب‌دهی با درجات نزولی الکل انجام شد و لام‌ها در سه مرحله پنج دقیقه‌ای با محلول PBS شستشو شدند. سپس در محلول بلاک‌کننده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در ظرف مرطوب به مدت یک ساعت قرار داده شدند. نمونه‌ها به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در آنتی‌بادی قرار گرفته، لام‌ها با PBS شسته شده



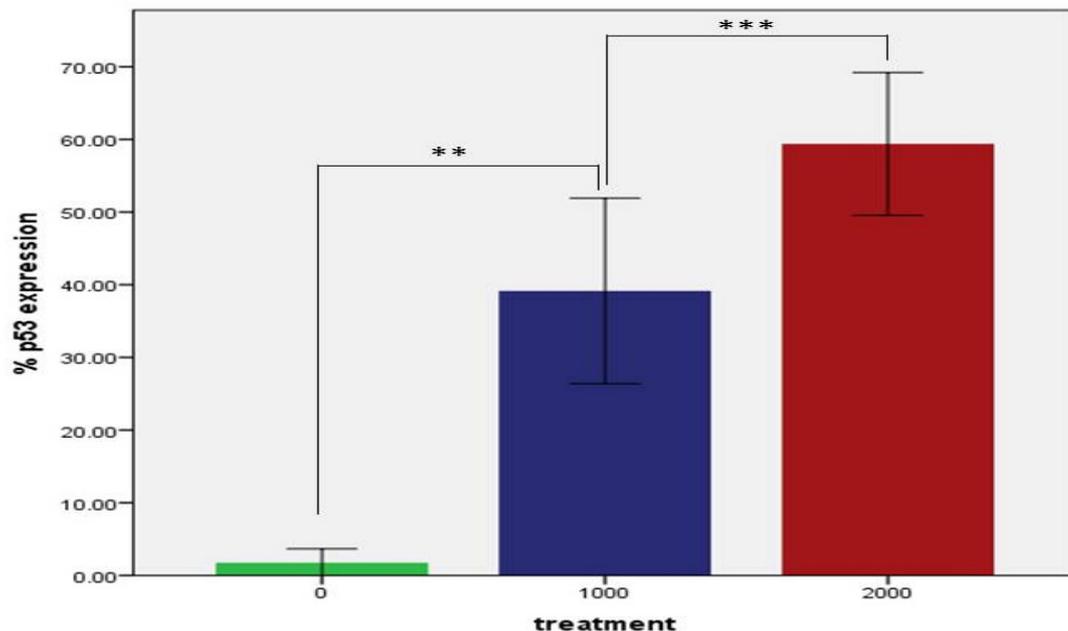
شکل ۳: بافت بیضه موش تحت تاثیر استنشاق نانو ذرات مغناطیسی اکسید آهن با غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر. نوک فلش نشان دهنده سلول های بیان کننده پروتئین (به رنگ قهوه ای)، رنگ آمیزی آویدین - بیوتین، بزرگ نمایی $\times 400$



شکل ۲: بافت بیضه موش تحت تاثیر استنشاق نانو ذرات مغناطیسی اکسید آهن با غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر. نوک فلش نشان دهنده سلول های بیان کننده پروتئین (به رنگ قهوه ای)، رنگ آمیزی آویدین - بیوتین، بزرگ نمایی $\times 100$

در میزان بیان پروتئین p53 با افزایش میزان نانو ذرات مغناطیسی اکسید آهن از گروه تجربی ۱ (۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به گروه تجربی ۲ (۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) وجود دارد ($p < 0/01$).

نمودار ۱ نشان می دهد که تغییر معنی داری در میزان بیان پروتئین p53 در گروه ۱ (۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) نسبت به گروه کنترل مشاهده می شود ($p < 0/05$). همچنین نمودار ۱ بیانگر این است که افزایش معنی داری



نمودار ۱: بیان پروتئین p53 در بافت بیضه موش تحت تاثیر نانو ذرات مغناطیسی اکسید آهن. داده ها بصورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده است. از آنالیز آماری t-test استفاده شده است. *** نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح $p < 0/05$ در گروه کنترل (غلظت صفر) با گروه تجربی ۱ (غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر). *** نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح $p < 0/01$ در گروه تجربی ۱ (غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) با گروه تجربی ۲ (غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر).

بحث

طی مطالعه‌ی دیگری بر روی اثر استنشاقی نانو ذرات انجام شد مشخص شد که این ذرات می‌توانند برای بدن سمی باشند (۲۲). همچنین در مطالعه‌ای دیگر که بر روی موش‌ها انجام شد مشخص شد که نانو ذرات مغناطیسی پوشش داده شده با دکستران بعد از تزریق به حیوانات پس از گذشت پنج دقیقه در کبد و طحال تجمع پیدا می‌کنند (۲۳).

طی مطالعه‌ای که بر روی موش سوری توسط نانو ذرات مغناطیسی اکسید آهن با پوشش DMSA انجام دادند، مشاهده کردند که تجمع نانو ذرات در ریه‌ها منجر به ایجاد پاسخ التهابی در این اندام‌ها می‌شود (۲۴). همچنین مشخص شد که این نانو ذرات باعث افزایش نفوذپذیری سلول‌های اندوتلیال عروق ریز می‌شوند (۲۵).

در تحقیقات دیگر، نشان داده شد که تزریق نانو ذرات مغناطیسی پوشش‌دار شده با پلی‌آسپارتیک اسید به موش‌ها، در طی گذشت سی روز از تیمار منجر به کاهش تعداد لنفوسیت‌ها و افزایش همزمان مونوسیت‌ها می‌شود که احتمال دارد نشانگر پاسخ التهابی بدن به عوامل خارجی باشد (۲۶). نتایج مطالعات فوق تا حدودی با نتایج مطالعه حاضر در خصوص تجمع نانوذرات و آسیب بافتی حاصل از دوزهای بالا مطابقت دارد.

ژن P53 و پروتئین حاصل از آن بطور طبیعی تقسیم و رشد سلول را تحت نظارت دارد. وظایف پروتئین P53 در حال طبیعی تنظیم تقسیم سلول‌ها، مسن شدن سلول‌ها، جلوگیری از ساختن عروق تازه، تمایز یافتن سلول‌ها، و متابولیسم DNA است. همکاری پروتئین P53 با دو پروتئین CDC2 و CDK1-P2، سلول‌های سرطانی را در مراحل G1 و G2 تقسیم سلول نگه می‌دارد. پروتئین P53 پس از صدمات ژن‌های دیگر به DNA متصل می‌شود و باعث تولید پروتئین P21 می‌شود که خود به پروتئین CDK2 می‌چسبد و اجازه ورود چرخه سلولی به مرحله بعدی تقسیم را نمی‌دهد. اعمال ضد سرطانی این پروتئین از مسیرهای زیر انجام می‌شود: ۱- زمانی که DNA آسیب دیده است پروتئین p53 می‌تواند پروتئین‌های ترمیم-کننده DNA را فعال کند. ۲- پروتئین P53 تقسیم سلولی را در مرحله G1/S نگه می‌دارد تا فرصتی برای تعمیر باشد. ۳- در صورتی که آسیب DNA زیاد و غیرقابل تعمیر باشد می‌تواند مرگ برنامه‌ریزی شده سلول را آغاز

کند. در یک سلول معمولی P53 توسط یک تنظیم کننده به نام MDM2 غیرفعال می‌شود. در هنگام آسیب DNA یا استرس‌های دیگر، P53 فسفوریله شده و خاصیت چسبیدن به MDM2 را از دست می‌دهد. بنابراین کمپلکس P53 و MDM2 از هم جدا شده و P53 باعث توقف چرخه سلولی می‌شود. این توقف یا باعث ترمیم و بقای سلول شده یا باعث مرگ و حذف شدن سلول آسیب دیده می‌شود. P53 بعد از فعال شدن به DNA متصل می‌شود و بیان چندین ژن مانند WAF1 و CIP1 که پروتئین P21 را کد می‌کنند، فعال می‌کند. P21 کمک می‌کند تا چرخه سلولی در مرحله G1 به S متوقف شود. P53 در صورت جهش یافتن به DNA نمی‌چسبد و در نتیجه پروتئین P21 نخواهد توانست به عنوان یک علامت برای توقف تقسیم سلول ایفای نقش کند. بنابراین سلول‌ها به طور غیرقابل کنترل تقسیم می‌شوند و تومور تشکیل می‌دهند. آسیب سلولی باعث افزایش نیمه عمر پروتئین P53 و تجمع سریع این پروتئین در سلول‌های تنش دیده می‌شود و همچنین باعث ایجاد یک تغییر ساختاری و فعال شدن این پروتئین به عنوان تنظیم‌کننده نسخه-برداری می‌شود. فعال شدن P53 مربوط به فسفوریلاسیون جایگاه نیتروژن انتهایی (N ترمینال) آن است. این جایگاه شامل تعداد زیادی از بخش‌های فسفوریلاسیون است که می‌توانند به عنوان هدف اولیه برای پروتئین‌کینازها در نظر گرفته شوند که علائم تنش را منتقل می‌کنند (۲۷) و (۲۸).

مطالعه حاضر که بررسی اثر نانو ذرات با روش استنشاقی می‌باشد، نتایج مشابهی در راستای تحریک سلول‌ها و افزایش بیان پروتئین p53 در بافت بیضه را نشان می‌دهد. استنشاق نانوذرات اکسید آهن در هر دو غلظت ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث افزایش بیان این پروتئین در سلول‌های بافت بیضه شده است.

به طور کلی، شواهد موجود برای خطرناک ارزیابی کردن بالقوه نانوذرات اکسید آهن برای سلامت انسان کافی نمی‌باشد و تحقیقات بیشتری در این زمینه از جمله مطالعات در مورد اثرات درازمدت و دوزهای متفاوت این نانوذرات مورد نیاز است.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که تغییر معنی داری در بیان پروتئین مذکور در بافت بیضه نسبت به گروه شاهد وجود داشت. این نانو ذرات می توانند سبب تغییرات چشم گیری در بیان پروتئین p53 در بافت بیضه در هر دو غلظت ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر شوند. افزایش بیان پروتئین p53 در بافت بیضه نشانه ورود و ماندگاری (عدم دفع) نانو ذرات آهن به مدت طولانی و آسیب به بافت بیضه می باشد. افزایش بیان پروتئین p53 با افزایش غلظت نانو ذرات تنفسی، نشانگر افزایش صدمه نانو ذرات اکسید آهن به بافت های بیضه همراه با افزایش غلظت آنها می باشد.

منابع

- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011; 61(2): 69-90.
- Heath JR, Davis ME. Nanotechnology and cancer. *Annu Rev Med*. 2008; 59: 251-265.
- Stone V, Johnston H, Clift MJD. Air pollution, ultrafine and nanoparticle toxicology: cellular and molecular interactions. *IEEE Trans Nanobiosci*. 2007; 56(6): 331-340.
- Szalay B. Iron oxide nanoparticles and their toxicological effects: in vivo and in vitro studies: szte. PhD Thesis. Department of Public Health, Faculty of Medicine, University of Szeged. 2012; 1-18.
- Peng XH, Qian X, Mao H, Wang AY, et al. Targeted magnetic iron oxide nanoparticles for tumor imaging and therapy. *Int J Nanomedicine*. 2008; 3(3): 311-21.
- Das M, Saxena N, Dwivedi PD. Emerging trends of nanoparticles application in food technology: Safety paradigms. *Nanotoxicol*. 2009; 3(1): 10-18.
- Iavicoli I, Leso V, Bergamaschi A. Toxicological Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles: *Eur Review Med Pharmacol Sci*. 2011; 15(5): 481-508.
- Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2008; 295(3): L400-411
- Mao HY, Laurent S, Chen W, Akhavan O, et al. Graphene: promises, facts, opportunities, and challenges in nanomedicine. *Chem Rev*. 2013; 113(2013): 3407-3424.
- Foley S, Crowley C, Smaih M, Bonfils C, et al. Cellular localization of a water-soluble fullerene derivative. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 294(2002): 116-119.
- Johnston HS. Atmospheric ozone. *Annu Rev Phys Chem*. 1992; 43: 1-31.
- Kim WY, Kim J, Park JD, Ryu HY, et al. Histological study of gender differences in accumulation of silver nanoparticles in kidneys of fischer 344 rats. *J Toxicol Environ*. 2009; 72(21-22): 1279-1284.
- Sampson EJ, Whitner VS, Burtis CA, McKneally SS, et al. An interlaboratory evaluation of the IFCC method for aspartate aminotransferase with use of purified enzyme materials. *Clin Chem*. 1980; 26(8): 1156-1164.
- McBride OW, Merry D, Givol D. The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). *PNAS*. 1986; 83(1): 130-134.
- Hartmann A, Blaszyk H, Kovach JS, Sommer SS. The molecular epidemiology of p53 gene mutations in human breast cancer. *TIG*. 1997; 13(1): 27-33.
- Ye W, Xu P, Jen R, Feng E, et al. Zeranol Down-Regulates p53 Expression in Primary Cultured Human Breast Cancer Epithelial Cells through Epigenetic Modification. *IJMS*. 2011; 12: 1519-1532.
- Sharpless NE, Alson S, Chan S, Silver DP, et al. p16INK4a and p53 deficiency cooperate in tumorigenesis. *Cancer Res*. 2002; 62: 2761-2765.
- Wu J, Sun J. Investigation on mechanism of growth arrest induced by iron oxide nanoparticles in PC12 cells. *J Nanosci Nanotechnol*. 2011; 11(5): 11079-11083.
- Card JW, Zeldin DC, Bonner JC, Nestmann, ER. Pulmonary applications and toxicity of engineered nanoparticles. *Am J*

19. Sampson EJ, Whitner VS, Burtis CA, McKneally SS, et al. An interlaboratory evaluation of the IFCC method for aspartate aminotransferase with use of purified enzyme materials. *Clin Chem*. 1980; 26(8): 1156-1164.
20. Naqvi S, Samim M, Abdin MZ, Jalees Ahmed F, et al. Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. *Inter J Nanomed*. 2010; 5: 983-989.
21. Chaves SB, Lacava LM, Lacava ZGM, Silva O, et al. Light microscopy and magnetic resonance characterization of a DMSA-coated magnetic fluid in mice. *IEEE Trans Magn*. 2002; 38(5): 3231-3233.
22. Garcia C, Mirkin CA. DNA-Gold-Nanoparticles Conjugates. In: *Nanobiotechnology: Concepts, Application and perspectives*. Wiley-VCH. 2003; 289-307.
23. Lacava LM, Garcia VAP, Kückelhaus S, Azevedo RB, et al. Long-term retention of dextran-coated magnetite nanoparticles in the liver and spleen. *J Magn Magn Mater*. 2004; 272(3): 2434-2435.
24. Oberdorster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, et al. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol*. 2004; 16(6-7): 437-445.
25. Apopa PL, Qian Y, Shao R, Guo NL, et al. Iron oxide nanoparticles induce human microvascular endothelial cell permeability through reactive oxygen species production and microtubule remodeling. *Part Fibre Toxicol*. 2009; 6: 1.
26. Sadeghiani N, Barbosa LS, Silva LP, Azevedo RB, et al. Genotoxicity and inflammatory investigation in mice treated with magnetite nanoparticles surface coated with polyaspartic acid. *J Magn Magn Mater*. 2005; 289: 466-468.
27. Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations". 1994; *Science*. 265(5170): 346-55.
28. Read AP, Strachan T. *Cancer Genetics: Human molecular genetics 2*. New York: Wiley. 1999; Chapter 18.

The Effect of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles on Expression of P53 Protein in Testis Tissue of Balb/C Mice by Immunohistochemically Staining

Karimi H. M.Sc., Hojati V. PhD*, Shiravi A, PhD

- Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

* Email corresponding author: vida.hojati@gmail.com

Received: 10 Jan. 2017

Accepted: 28 May. 2017

Abstract

Aim: The purpose of this study was to investigate the effect of iron oxide magnetic nanoparticles on expression of p53 protein in testis tissue of mouse.

Material and methods: In this study, 18 male Balb/C mice were divided in three groups (six in each): The control group did not inhale nanoparticles and experimental 1 and 2 groups were treated with inhalation exposure to iron oxide nanoparticles with concentration of 1000 and 2000 µg/ml for 45 minutes daily, during 8 days. At the end of eight days, mice were dissected and testes were removed and tissue processing was performed. Changes in the expression of p53 protein were evaluated using immunohistochemically method (Avidin-Biotin staining) and cell counting.

Results: Inhaled iron oxide nanoparticles by penetrating into the testicular tissue, increased the expression of p53 protein in experimental groups significantly ($p < 0.05$).

Conclusion: With the inhalation of iron oxide nanoparticles at doses of 1000 and 2000 µg/ml, a significant increase in expression of p53 protein was observed in testicular tissue compared to the control group. By increasing the dose of nanoparticles, protein expression also increased.

Keywords: Iron oxide nanoparticles, Inhalation, P53 protein, Testis, Immunohistochemistry.