

ORIGINAL RESEARCH PAPER

Investigating the protective effects of aqueous extract of the wormwood plant (*Artemisia absinthium*) on alumina nanoparticle-induced pulmonary toxicity in male Wistar rats

Esmaeil Karami¹, Zahra Goodarzi², Reza Chahardoli³, Mahmoud Ghazi Khansari⁴, Mehrafarin Kiani⁵, Seyed Jamaledin Shahtaheri^{1*}

¹ Department of Occupational Health Engineering, School of Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

² Department of Occupational Health Engineering, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

³ Department of Cellular & Molecular Nutrition, School of Nutrition Sciences & Dietetic, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

⁴ Department of Pharmacology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

⁵ Department of Anatomical sciences, Faculty of medical sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Received: 2022-02-01

Accepted: 2022-04-19

ABSTRACT

Introduction: Although aluminum oxide nanoparticles (Al₂O₃-NPs) are the most widely used nanomaterials, limited studies have been reported on their toxicology. Therefore, the present study aimed to investigate the potential toxicity of aluminum oxide (alumina) nanoparticles and the protective role of aqueous extract of wormwood plant on nanomaterial-induced disorders in the lung of rats.

Material and Methods: Here, 36 male Wistar rats were randomly divided into six groups. Next, the rats were first exposed to 200 mg/kg of the aqueous extract of wormwood plant (by gavage) for 15 days and then received a dose of 30 mg/kg of aluminum oxide nanoparticles as an intraperitoneal injection for 14 days. Furthermore, various features of clinical signs, body weight, biochemical parameters, gene expression changes, lung weight ratio, histopathological observations, and metal content in lung tissue were evaluated during the experiment. Eventually, the ANOVA (Analysis of Variance) and Tukey's range test were employed to analyze and compare the mean of the data.

Results: The results revealed that aluminum oxide nanoparticles at a concentration of 30 mg/kg body weight led to changes in antioxidant enzyme activities, e.g., T-SOD, CAT, GPx, and TAC, lipid peroxidation, and iNOS for exposed rats. Also, the above biochemical disorders were associated with altered expression of oxidative stress-related genes (HO-1, MT-1) and histological changes in the lung tissue. On the other hand, simultaneous intake of aqueous extract of wormwood plant and aluminum oxide nanoparticles in rats significantly improved the studied parameters ($p < 0.05$).

Conclusion: Our findings showed that the γ -Al₂O₃ NPs were more toxic than α -Al₂O₃ NPs, which can be attributed to changes related to their size and shape characteristics. Also, it was observed that the wormwood plant could play a protective role against aluminum oxide nanoparticles-induced pulmonary toxicity in rats.

Keywords: Aluminum oxide nanoparticle, Gene expression, Histopathology, Nanoparticles, Wormwood plant

HOW TO CITE THIS ARTICLE

Karami E, Goodarzi Z, Chahardoli R, Ghazi Khansari M, Kiani M, Shahtaheri SJ. Investigating the protective effects of aqueous extract of the wormwood plant (*Artemisia absinthium*) on alumina nanoparticle-induced pulmonary toxicity in male Wistar rats. *J Health Saf Work.* 2022; 12(2): 288-308.

* Corresponding Author Email: shahtaheri@tums.ac.ir

1. INTRODUCTION

Aluminum oxide (Al_2O_3) nanoparticles have diverse applications in industry and medical sciences owing to their physical and chemical properties, high specific surface area (surface-to-volume ratio), and superior physical properties, such as thermal stability and mechanical strength. Alumina (Al_2O_3) is an oxidized state of aluminum that is relatively stable in the air and has several crystalline structures (such as α , θ , δ , and γ -aluminum oxides). According to the evidence, the Permissible Exposure Limits (PEL) for total alumina dust and its respirable fraction for an 8-hour TWA were considered equal to 15 and 5 mg/m^3 by the Occupational Safety and Health Administration (OSHA), respectively. Accordingly, since aluminum oxide nanoparticles have many applications in industry, medical sciences, environmental sciences, and others, concerns have been raised about the health risks of humans. Therefore, further studies are needed about nanoparticles' safety and health in the lungs. Over the past three decades, the use of herbal products and supplements has increased dramatically. *Artemisia absinthium* (Abs) is a volunteer plant belonging to the Asteraceae family, which grows in most areas of Asia and Europe. In this regard, the extract of this plant also has antioxidant and antiseptic properties that can naturalize and inhibit free radicals. Accordingly, this study aimed to investigate aluminum oxide nanoparticles-induced pulmonary toxicity in rats. Then, the effects of compounds extracted from the wormwood plant, which has anti-inflammatory and antioxidant properties, were investigated on pulmonary disorders caused by aluminum oxide nanoparticles in rat lungs.

2. MATERIAL AND METHODS

In this experimental study, 36 male Wistar rats (170-220 g) were randomly divided into 6 groups, including 1) control group, 2) $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ (20nm) 30mg/kg (ip) for two weeks, 3) $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ (80nm) 30 mg/kg (ip) for two weeks, 4) $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ (20nm) 30 mg/kg (ip) + *Artemisia absinthium* 200 mg/kg (oral) for 15 days, 5) $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ (20nm) 30 mg/kg (ip) + *Artemisia absinthium* 200 mg/kg (oral) for 15 days, and 6) *Artemisia absinthium* 200 mg/kg (oral) for 15 days.

The $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ NPs (80nm) (purity 99%, density 3.97 g/cm^3) and $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ -NPs (20nm) (purity 99% and density 3890 Kg/m^3) were purchased from US Research (CAS No 1344-28-1, USA). The

specific surface area of nanoparticles using the BET analysis and their size and shape were by the TEM technique were determined. Also, the antioxidant activities of the aqueous extract of wormwood were measured by the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl-hydrate) method, adapted from the method proposed by Stojičević et al. In this study, the antioxidant quercetin, a stable anti-radical compound, was employed to compare antioxidant activities, and its anti-radical activity (RSA) was also determined. Also, the enzymatic activities of malondialdehyde (MDA: lipid peroxidation), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), total superoxide dismutase (T-SOD), total antioxidant capacity (T-AOC), and nitric oxide synthase (iNOS) were read using the ZellBio (GmbH, Germany) kits (according to the kit instructions). In this experiment, the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR) assay was used for the mRNA expression of metallothionein-1 and heme oxygenase-1, and GAPDH was employed as structural genes for internal controls. Ultimately, the relative expression ratio was estimated using the Pfaffl method, and the inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) was also utilized for determining the content of total aluminum (Al) in lung tissue. It should be noted that lung specimens were fixed by 10% formalin, and molding and H&E (Hematoxylin and Eosin) staining were then performed for histopathological analyses following hydration and dehydration processes.

Statistical analysis

The obtained data were analyzed using SPSS-24, and the One-way ANOVA and HSD test were used to compare means at $p < 0.05$. Also, charts were drawn using Graph-Pad Prism-8 software.

3. RESULTS AND DISCUSSION

In this study, the specific surface areas (BET) for the two state of alpha and gamma were SSA: $>14 \text{ m}^2/\text{g}$ and SSA: $>135 \text{ m}^2/\text{g}$, respectively. TEM results showed that the gamma state had a nearly spherical shape with an average diameter of 20 nm, and the alpha state had a nearly irregular polygonal shape with an average diameter of 80nm (Fig. 1). In addition, IC50 values in DPPH radical scavenging activity for wormwood extract and Quercetin were evaluated equal to 512 ± 30 and $1.336 \pm 0.11 \mu\text{g}/\text{ml}$, respectively.

In the present study, it was observed a non-significant increase in body weight for rat groups

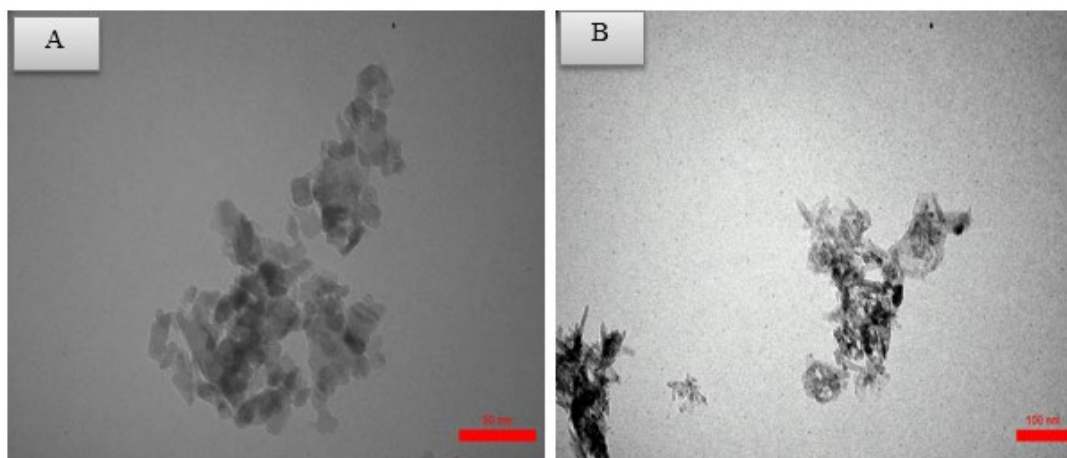


Fig. 1. Transmission electron microscope (TEM) image of aluminium oxide nanoparticles (Al_2O_3); A: Gamma aluminium oxide 20nm, B: Alpha aluminium oxide 80 nm.

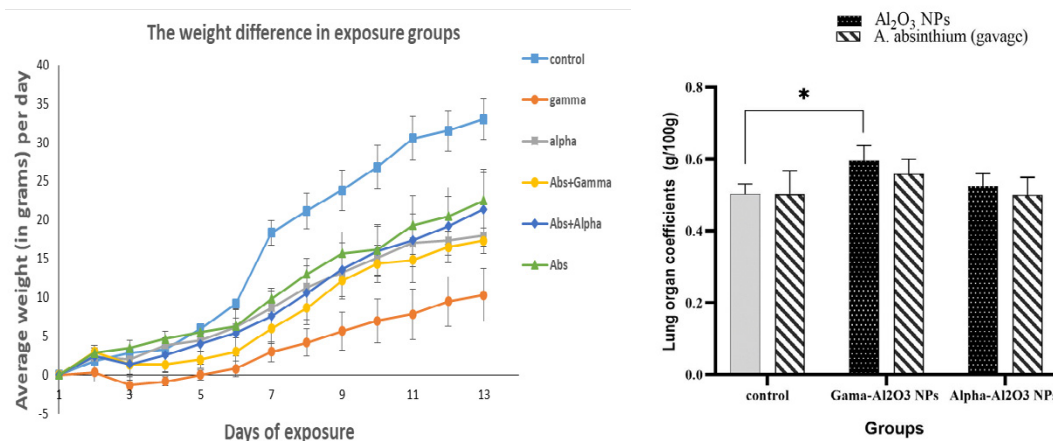


Fig. 2. The average body weight and the Lung organ coefficients in treatment groups. Values are expressed as Means \pm SD; n=6 rats/group. *P<0.01.

treated with nanoparticles. Also, simultaneous intake of wormwood extract and aluminum could increase rats' weight. Results of statistical analysis showed that although there was a significant increase in lung weight ratios in the groups treated with γ - Al_2O_3 NPs and the control group ($P < 0.05$), no significant changes were observed for other groups (Fig. 2).

Our findings revealed that aluminum nanoparticles (in both gamma and alpha phases) increased MDA in the lung tissue (Fig. 3a). Regarding antioxidant properties of the wormwood plant, changes related to the content of MDA was adjusted in the group receiving α - Al_2O_3 (80nm) 30 mg/kg (ip)+ Artemisia absinthium 200 mg/kg (Group V), which could indicate the positive effects of the plant extract in reducing toxicity effects of

alpha type. Results also showed that exposure of rats to nano alumina (in both gamma and alpha state) had adverse and significant effects on the contents of GPx, SOD, CAT, and TAC in lung tissue (Figs. 3b, c, d, and e), which can be due to the mechanism of reactive oxygen species and lead to oxidative stresses. Results related to the antioxidant activities of wormwood extract in inhibiting aluminum nanoparticles-induced oxidative stresses showed that simultaneous intake of aqueous extract of wormwood and aluminum nanoparticles increased enzymatic activities of GPx, SOD, CAT, and TAC so that SOD and TAC contents significantly increased (at $p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively) in alpha state. Therefore, it can be concluded that γ - Al_2O_3 NPs have led to a depletion of antioxidant reserves than the alpha phase. Morsy et al. Showed

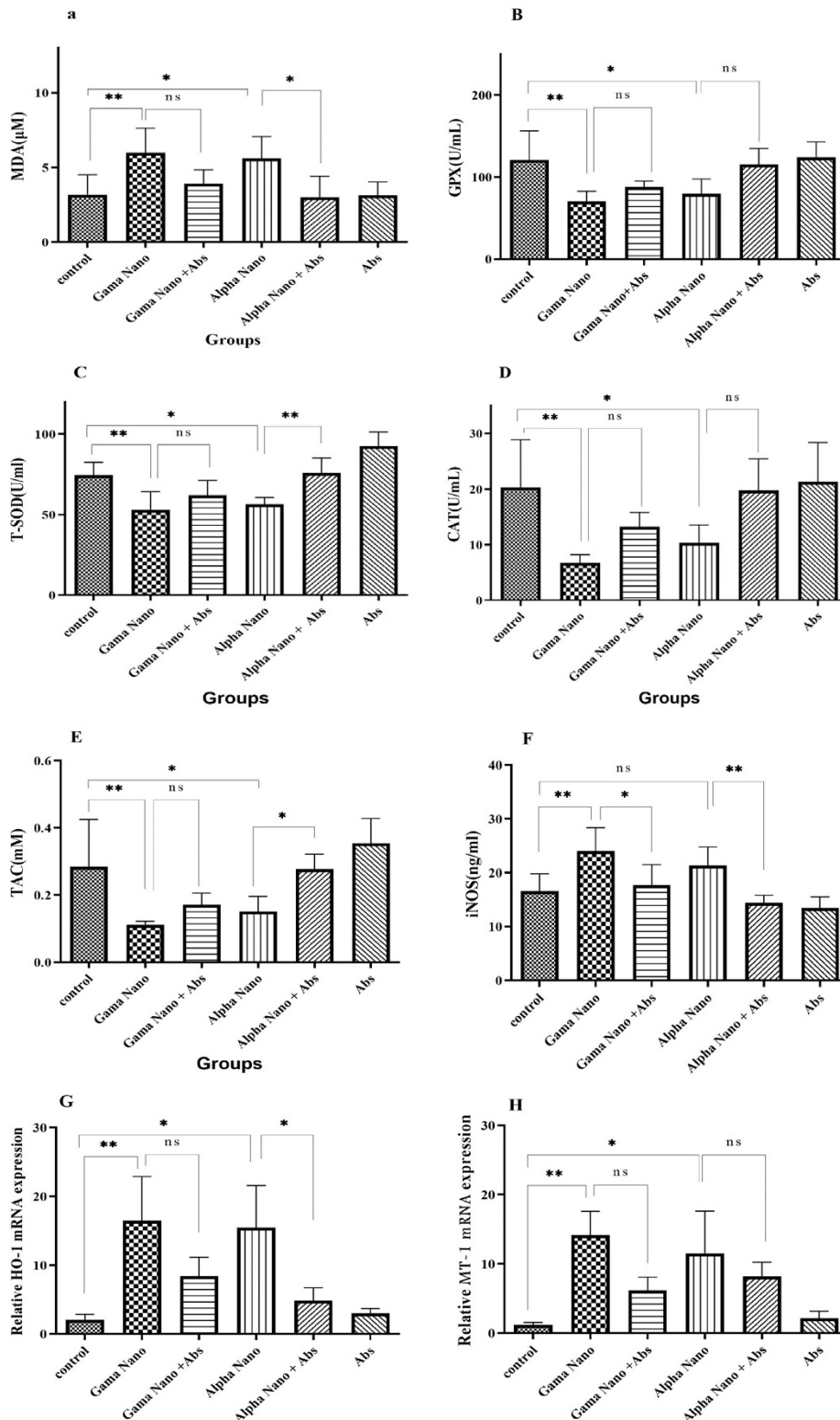


Fig. 3. Effect of *A. absinthium* on the activity of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in Al_2O_3 -NPs-treated rat lung. (a) MDA activity; (b) GPx activity; (c) SOD activity; (d) CAT activity; (e) TAC activity; (f) iNOS activity, Relative expression levels of HO-1 (G), and MT-1 (H) mRNA in the lung. All values are expressed as Mean±SD. One-way ANOVA-student followed by Tukey's post-hoc test (n=6). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

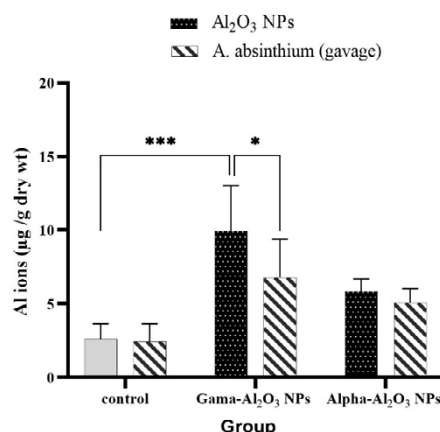


Fig. 4. The concentrations of Al ions in the lung of male rats. Values are expressed as Means±SD; n=6 rats/group. *P<0.01.

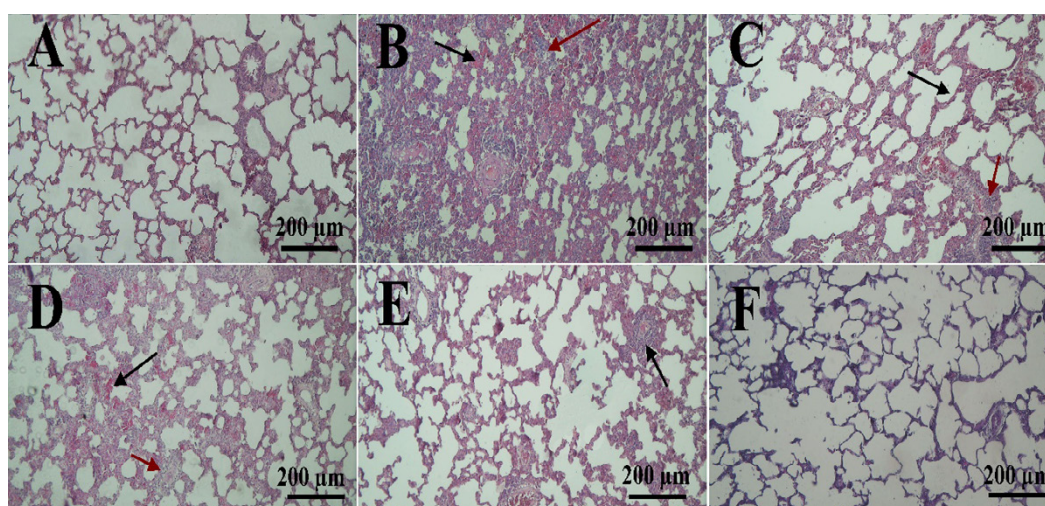


Fig. 5. H&E staining of rat lung sections. Scale bars: 200µm.

that Al₂O₃ cause oxidative stress in the brain, liver, and kidneys of rats. These results are consistent with our findings in lung tissue. Nitric oxide in the respiratory system can cause relaxation of blood vessels and respiratory tracts and even balance its levels. Induced nitric oxide synthase (iNOS) levels significantly increased in the γ-Al₂O₃ NPs-treated groups, while the aqueous extract of the wormwood significantly decreased iNOS levels in both nanoparticle-receiving groups (Fig. 3f).

The HO-1 and MT-1 genes, as a protective mechanism against cellular stress, are rapidly regulated by proinflammatory cytokines or oxidative stresses. Accordingly, considering the role of heme oxygenase, it can be assumed that alumina nanoparticles affect the expression of the heme

oxygenase enzyme and can cause inflammation and tissue damage. In the present study, expressing the MT-1 gene in lung tissue significantly increased, indicating the high levels of nano alumina, while the use of wormwood extract caused a relative modulation of toxicity caused by nanoparticles in the present study (Fig. 3G, H).

Results also demonstrated that aluminum levels in rats receiving γ-Al₂O₃ NPs increased significantly compared to the control group, and the aqueous extract of the wormwood plant significantly decreased the accumulation of aluminum metal in lung tissue (Fig. 4).

Histopathological examinations of lung tissue and diagnosis of pulmonary changes: Figure 5-a displays the normal structure of the lung tissue

in the control group. Figure 5-b shows the severe response of lung tissue in the second group. Figure 5-c indicates a decrease in the severity of the lung tissue reaction in the third group compared to the second group. Figure 5-d demonstrates a decrease in the destruction of alveolar walls of the fourth group compared to the second group. Figure 5-e shows the mild lung response and slight changes in the lung tissue in the fifth group. Figure 5-f demonstrates that the natural structure of lung tissue is preserved in the sixth group.

4. CONCLUSIONS

In line with the existing hypotheses, our findings found that nanoparticles with smaller sizes and higher specific surfaces and reactivity could form severe side effects and toxicities. Results showed that $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ NPs produced more severe pulmonary toxicity than $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ NPs. In

addition, the role of antioxidants, e.g., the aqueous extract of wormwood, as complementary and alternative medicine in reducing oxidative stress and nitrate stress levels and increasing the content of antioxidant capacity was known as the most prominent findings of this study. Since reducing work-related complications and maintaining health are the main programs and policies of the occupational safety and health agency, the present study investigated the protective effects of aqueous extract of wormwood plant (oral). However, further studies with larger sample sizes on different animal models are needed to understand and reduce the probable adverse effects in workers exposed to aluminum oxide nanoparticles.

5. ACKNOWLEDGMENT

The study was founded by Tehran University of Medical Sciences (TUMS).

بررسی اثر حفاظتی عصاره آبی گیاه افسنتین (*Absinthium Artemisia*) بر آسیب‌های ریوی حاصل از مواجهه با نانوذره آلومینا در موش صحرایی نر نژاد ویستار

اسماعیل کرمی^۱، زهرا گودرزی^۲، رضا چهاردولی^۳، محمود قاضی خوانساری^۴، مهرآفرین کیانی^۵، سید جمال‌الدین شاه طاهری^{*۱}

^۱ گروه مهندسی بهداشت حرفه‌ای، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

^۲ گروه مهندسی بهداشت حرفه‌ای، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

^۳ گروه تغذیه سلولی مولکولی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

^۴ گروه سم‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

^۵ گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۱۲، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۳۰

چکیده

مقدمه: نانو ذرات اکسید آلومینیوم (Al_2O_3 NPs) از جمله پرکاربردترین نانو مواد در صنایع هستند. با این حال، اطلاعات نسبتاً کمی در مورد سم‌شناسی آن‌ها در دسترس است. هدف از این مطالعه بررسی سمیت بالقوه نانو ذرات اکسید آلومینیوم و نقش حفاظتی افسنتین بر آسیب‌های حاصل از نانو مواد بر روی ریه موش‌های صحرایی است.

روش کار: در مطالعه تجربی حاضر، ۳۶ سر موش صحرایی به‌طور تصادفی در ۶ گروه قرار گرفتند. موش‌ها شامل؛ گروه ۱ یا کنترل (روزانه ۱ میلی‌لیتر نرمال سالین)، گروه ۲ (روزانه دوز ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گاما نانو آلومینیوم به مدت دو هفته داخل صفاقی)، گروه ۳ (روزانه دوز ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آلفا نانو آلومینیوم به مدت دو هفته داخل صفاقی)، گروه ۴ (روزانه دوز ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گاما نانو آلومینیوم در دو هفته داخل صفاقی و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم افسنتین به مدت ۱۵ روز به‌صورت گاوآژ)، گروه ۵ (روزانه دوز ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آلفا نانو آلومینیوم به مدت دو هفته داخل صفاقی و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم افسنتین به مدت ۱۵ روز به‌صورت گاوآژ)، گروه ۶ (روزانه ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم افسنتین به مدت ۱۵ روز به‌صورت گاوآژ) در معرض قرار گرفتند. در طول دوره آزمایش، علائم بالینی، تغییر وزن بدن، پارامترهای بیوشیمیایی بافت، تغییرات بیان ژن، ضریب وزن ریه، یافته‌های هیستوپاتولوژی و محتوی غلظت فلز بافت ریه ارزیابی گردید. معنی‌داری نتایج توسط آنالیز واریانس (ANOVA) به همراه تست توکی تعیین شد.

یافته‌ها: بررسی نتایج نشان داد که نانو ذرات اکسید آلومینیوم باعث تغییرات در لیپید پراکسیداسیون، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند، سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوکاتیون پراکسیداز، ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی و نیتریک اکسید سنتاز القایی در موش‌های تحت درمان شد. این اختلالات بیوشیمیایی با تغییرات در بیان ژن‌های اکسیداتیو متالوتیونین-۱ و هم اکسیژناز-۱ و تغییرات بافت‌شناسی در ریه تأیید شد. مواجهه هم‌زمان با افسنتین و نانو ذرات اکسید آلومینیوم در موش‌های صحرایی به‌طور معنی‌داری باعث بهبود تغییرات در پارامترهای آزمون گردید ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری: یافته‌های حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که فرم گاما نانو ذرات اکسید آلومینیوم سمی‌تر از فرم آلفا هستند که تغییر در اندازه و شکل نانوذره باعث تفاوت در سمیت آن‌ها شده است. همچنین، گیاه افسنتین می‌تواند نقش محافظتی در برابر سمیت ریوی ایجادشده توسط نانو ذرات اکسید آلومینیوم در موش صحرایی داشته باشد.

کلمات کلیدی: نانو ذرات، نانو اکسید آلومینیوم، هیستوپاتولوژی، افسنتین، بیان ژن

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول مکاتبه: shahtaheri@tums.ac.ir

مقدمه

in vivo ایجاد سمیت در سلول‌های اپیتلیال ریه موش صحرایی (۶، ۱۳)، آسیب ژنتیکی در سلول‌های خون موش با استفاده از روش Comet و تست میکرونوکلئوس (۱۴)، پاسخ التهابی نانو ذرات آلومینا در چسبندگی سلول اندوتلیال (۱۵)، سرطان‌زایی در سلول‌های اپیتلیال پوست موش (۱۶) سمیت سلولی (۱۷)، تولید گونه‌های واکنش‌دهنده اکسیژن (ROS) (۱۸) و اختلال عملکرد میتوکندری (۱۷) یا اختلال در عملکرد فاگوسیتیک در ماکروفاژهای آلوئول انسان می‌شوند (۱۹).

در مطالعه روی کارگران، استنشاق نانو ذرات اکسید آلومینیوم با فیبروز ریوی مرتبط بوده است (۲۰). آسم شغلی یکی از بیماری‌های شغلی ناشی از مواجهه با آلومینیوم در محیط‌های کاری است (۲۱). با این حال، مکانیسم‌های مولکولی دقیقی که توسط آن نانو ذرات Al_2O_3 در سائز و شکل‌های مختلف باعث آسیب ریوی می‌شوند، هنوز مبهم باقی‌مانده است (۲۲).

استفاده از فرآورده‌ها و مکمل‌های دارویی گیاهی طی سه دهه گذشته به‌طور چشمگیری افزایش یافته است و حداقل ۸۰ درصد از مردم در سراسر جهان برای بخشی از مراقبت‌های بهداشتی اولیه به آن‌ها تکیه می‌کنند (۲۳). بسیاری از محققین به دلیل خطرات ناشی از شکست درمان، مقاومت دارویی و هزینه‌های بالای درمان به گیاهان دارویی علاقه‌مند هستند (۲۴). افسنتین با نام علمی *Artemisia Absinthium* گیاه خودرویی از خانواده آستره‌آ است که از گیاهان بومی ایران به‌خصوص در نواحی شمالی و شرقی (استان‌های شمالی، آذربایجان، کردستان، تهران و خراسان) بوده و در اکثر کشورهای اروپا، آسیا، عراق، سوریه، پاکستان و هند) رشد می‌کند و در کشور انگلستان با نام *Worm Wood* چوب کرمی شکل و در ایران با نام‌هایی خاراگوش، گندواش، مروه و افسنتین معروف است. عصاره افسنتین دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدعفونی است و می‌تواند منجر به مهار رادیکال‌های آزاد شود (۲۵، ۲۶). در مطالعه‌ای اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی افسنتین بر روی استرس اکسیداتیو ناشی از سرب در خون، مورد بررسی قرار گرفت

نانو ذرات اکسید آلومینیوم^۱ به دلیل خواص فیزیکی و شیمیایی، سطح ویژه بالا، پایداری مکانیکی و حرارتی در صنایع و پزشکی از جمله سرامیک، دفاع، رنگرزی و اپتیک و همچنین در سوخت موشک، غذا، ایمپلنت، دارو و تولید واکسن و در محصولات مراقبت شخصی، کاربرد زیادی دارند (۱-۳). نانوآلومینا^۲ شکل اکسید شده نانو آلومینیوم است و در چندین فاز کریستالی (γ , δ , θ , α) وجود دارد (۴). نانو ذرات اکسید آلومینیوم با فاز گاما دارای سائز کوچک‌تر و نقطه ذوب پایینی هستند و بیشتر به‌عنوان حامل‌های کاتالیزوری استفاده می‌شوند. فاز آلفای این نانو ذرات دارای مقاومت ویژه بالایی است و به دلیل دارا بودن خاصیت عایقی بیشتر در مواد عایق حرارتی استفاده می‌شوند (۵). این نانو ذرات به شکل اکسید آلومینیوم (Al_2O_3) در هوا نسبتاً پایدار است (۶). اداره بهداشت و ایمنی شغلی ایالات متحده^۳ مقدار حد مجاز مواجهه^۴ برای گردوغبار کل را 15 mg/m^3 و برای کسر قابل تنفس 5 mg/m^3 برای یک روز کاری ۸ ساعته را تعیین کرده است (۷). مواجهه استنشاقی با نانو ذرات اکسید آلومینیوم از طریق سیستم تنفسی جذب می‌شود و می‌توانند از سد خونی در سائز بین $3-30 \mu\text{m}$ از سلول‌های اپیتلیال آلوئولی عبور و در جریان خون حرکت کنند (۸). شکل و سائز از ویژگی‌های مهم در ایجاد سمیت نانو مواد است (۹). با توجه به استفاده فراوان از نانو ذرات اکسید آلومینیوم، نگرانی‌ها در مورد ریسک سلامت انسان وجود دارد، بنابراین نیاز به تحقیقات بیشتر در زمینه ایمنی و بهداشت در مورد این نانو ذرات بر روی ریه می‌باشد (۱۰). مطالعات میدانی و تجربی، میزان مواجهه با نانوذره آلومینا را در محیط‌های شغلی و تحقیقاتی گزارش کرده‌اند که افراد در معرض مواجهه با غلظت‌های کمتر از ۱۰۰ نانومتر هستند (۱۱، ۱۲). برخی از مطالعات نشان دادند که این نانو ذرات باعث آپوپتوز و استرس اکسیداتیو در شرایط *in vitro* و

1- Aluminium oxide nanoparticles (Al_2O_3 -NPs)2- Al_2O_3

3- Occupational Safety and Health Administration (OSHA)

4- Permissible exposure limit (PEL)

5- Reactive Oxygen Species

روش کار

به منظور انجام این مطالعه تجربی، ۳۶ سر موش صحرایی نژاد نر ویستار با وزن ۱۷۰-۲۲۰ گرم از گروه داروسازی دانشگاه تهران خریداری شد. حیوانات در قفس‌های استیل با شرایط محیطی (رطوبت نسبی بین ۴۰ تا ۶۰٪ و دمای 20 ± 2 و ۱۲ ساعت شب/روز) نگاه‌داری شد.

پس از تطابق حیوانات با شرایط آزمایشگاه به مدت یک هفته، حیوانات به صورت روزانه وزن شدند و همچنین اختلاف وزن روز اول و روز پانزدهم اندازه‌گیری شد. سپس حیوانات به صورت تصادفی در ۶ گروه زیر تقسیم بندی شدند: شروع با افسنتین از روز اول تا روز پانزدهم به صورت گاواژ در طی ۱۵ روز (۲۸)، هم‌زمان پس از روز دوم تجویز دوز تزریقی گروه‌های مشخص شده در زیر به صورت داخل صفاقی نانو ذرات اکسید آلومینیم دریافت کردند:

گروه ۱: گروه کنترل: دریافت نرمال سالین (درون صفاقی) گروه ۲: گروه دریافت کننده ی نانو ذرات اکسید آلومینیم فاز گاما با اندازه ۲۰ نانومتر برای ۲ هفته (درون صفاقی، دوز 30mg/kg b.w)

گروه ۳: گروه دریافت کننده ی نانو ذرات اکسید آلومینیم فاز آلفا با اندازه ۸۰ نانومتر برای ۲ هفته (درون صفاقی، دوز 30mg/kg b.w)

گروه ۴: مواجهه توام افسنتین و نانو ذرات اکسید آلومینیم نوع گاما به فاصله زمانی نیم ساعت دریافت کردند. ابتدا افسنتین (200 mg/kg) برای ۱۵ روز گاواژ شد و نیم ساعت بعد نانو ذرات اکسید آلومینیم نوع گاما با اندازه 20 nm (درون صفاقی، دوز 30mg/kg b.w) برای ۱۴ روز تجویز گردید.

گروه ۵: مواجهه توام افسنتین و نانو ذرات اکسید آلومینیم نوع آلفا به فاصله زمانی نیم ساعت دریافت کردند. ابتدا افسنتین (200 mg/kg) برای ۱۵ روز گاواژ شد و نیم ساعت بعد نانو ذرات اکسید آلومینیم نوع آلفا با اندازه 80 nm (درون صفاقی، دوز 30mg/kg b.w) برای ۱۴ روز تجویز گردید.

و مشخص شد که سرب به‌طور معنی‌داری باعث افزایش سطح آنزیم‌های SOD¹ و GPX² و کاهش معنی‌داری در سطح ویتامین‌های E و C و گلوکوتانیون در گلبول‌های قرمز می‌شود. نتایج نشان داد که افسنتین اثرات آنتی‌اکسیدانی مثبتی را برجا گذاشته است. افسنتین باعث تجدید فعالیت آنزیم‌های مختل شده در مواجهه با سرب می‌شود و از لیپید پراکسیداسیون جلوگیری می‌کند (۲۷). همچنین، افسنتین به دلیل ترکیبات کلرژنیک اسید و مشتقات کوئرتستین دارای اثرات حفاظتی روی کبد دارد. از طرفی گزارش شده که سزکویی ترپن‌هاو فلاونوئیدهای استخراج شده از گونه‌های آرتیمیزیا خاصیت ضدالتهابی دارند.

از آنجاکه نانو ذرات اکسید آلومینیم به‌عنوان یک آلاینده مخاطره‌آمیز در محیط کار و محیط‌زیست محسوب می‌شود؛ بنابراین نیاز به اطلاعات بیشتر در مورد سمیت این نانو ذرات در مواجهه شغلی، بسته به‌اندازه و شکل آن‌ها وجود دارد، زیرا کارگران می‌توانند مستقیماً از طریق استنشاق در معرض نانو ذرات اکسید آلومینیم قرار گیرند (۱۰). بنابراین، به تحقیقات بیشتری به‌منظور ارزیابی ایمنی نانو ذرات اکسید آلومینیم در ریه نیاز است. علاوه بر این، نقش استرس اکسیداتیو و نیتراتیو و به‌خصوص ژن‌های تعیین‌کننده در سمیت ریوی حیوانات مواجهه یافته با نانو ذرات اکسید آلومینیم ناشناخته است. پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر نانو ذرات اکسید آلومینیم با بررسی شاخص‌های مختلف سمیت ریوی از جمله پارامترهای بیوشیمیایی اکسیداتیو و نیتراتیو، لیپید پراکسیداسیون، ضریب وزن ریه به وزن بدن، آزمایشات هیستوپاتولوژیک، بیان ژن mRNA هم اکسیژناز 1-(HO) و متالوتیونین 1-(MT) و بررسی سایز و شکل ذرات در ایجاد آسیب در مدل موش صحرایی انجام گرفت. پس از بررسی اختلالات و اثرات سمیت، اثرات ترکیب گیاهی افسنتین که خاصیت ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی دارد روی اختلالات ریوی ناشی از نانو ذرات اکسید آلومینیم در ریه موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفت.

1- Superoxide Dismutase

2- Glutathione Peroxidase



سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی افسنتین با استفاده از روش DPPH¹

در این روش از به دام اندازی میزان رادیکال‌هایی آزاد، ماده‌ایی به نام ۲ و ۲-دی فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) با استفاده از عوامل آنتی‌اکسیدانی استفاده می‌گردد که سبب کاهش مقادیر جذب در ۵۱۷ نانومتر می‌شود. در مطالعه حاضر برای مشخص کردن فعالیت آنتی رادیکال (DPPH) بر اساس روش استوجیچویچ و همکاران صورت گرفت (۲۹). برای مقایسه از آنتی‌اکسیدان کوئرستین به عنوان ترکیب آنتی رادیکال پایدار استفاده شد و میزان فعالیت RSA² آن تعیین گردید. میزان فعالیت RSA عصاره گیاه افسنتین به صورت سه بار تکرار انجام شد و اطلاعات حاصله با استفاده از نرم‌افزار SPS:SV24 تجزیه و تحلیل شدند.

$$RSA (\%) = 100 (1 - ((As - Ab) / Ac))$$

As: جذب نمونه تیمار، حاوی محلول عصاره و DPPH

Ac: جذب نمونه شاهد

Ab: جذب نمونه blank

آماده‌سازی نمونه نانو ذرات اکسید آلومینیم

نانو ذرات اکسید آلومینیم به دو فرم آلفا و گاما از شرکت یواس ریسرچ (US Research) خریداری شد.

1- Organic chemical compound 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH)
2- radical scavenging activity

گروه ۶: گروه دریافت کننده ی افسنتین (از طریق گاوژ، دوز 200mg/kg b.w)

روز شانزدهم آزمایشات، حیوانات با استفاده از ۸۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کتامین ۱۰٪ و ۱۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم زایلازین ۲٪ به صورت ترکیبی بی‌هوش گردیدند و بافت ریه حیوانات به چهار قسمت تقسیم شد و به منظور انجام آزمایش‌هایی بیوشیمیایی، بیان ژن، محتوی غلظت فلز بافت و هیستولوژی استفاده شد.

بازه زمانی آزمایش گروه‌های تحت مواجهه به صورت ذیل می‌باشد.

تهیه عصاره آبی افسنتین

۲۰۰ گرم از گیاه افسنتین از کوه‌های فیروزکوه (گردنه ورسک) تهیه شد و هویت آن‌ها توسط واحد گیاه دارویی دانشکده داروسازی، علوم پزشکی تهران تأیید (کد هرباریومی -L.Family:Composite7119) TEH گردید. سپس ساقه‌های هوایی گیاه همراه با گل در ۲ لیتر آب مقطر به مدت ۱۲ ساعت خیسانده و با روش استخراج مداوم گرم در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲۰ دقیقه بر روی همزن برقی عمل استخراج انجام گرفت. در نهایت عصاره با فیلتر واتمن تصفیه و سپس با دستگاه فریز، درایر لیوفیلیزه شد. باقیمانده گیاه جمع آوری شده (yield 31 gram) در ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد (۲۷).

ریه به لوله‌های فاکون منتقل گردید. سپس، نمونه‌ها در اسید نیتریک غلیظ به‌طور کامل هضم شد. سطح Al ریه به‌صورت میکروگرم بر گرم بافت بیان شد (۱۰).

تهیه نمونه بافت ریه

بافت ریه در فرمالین ده درصد فیکس شده و پس از مراحل آبیگری و آبدهی، عمل قالب‌گیری در پارافین مذاب صورت گرفت و نمونه‌ها برای برش با ضخامت ۵ میکرومتر با میکروتوم آماده شدند. سپس رنگ آمیزی هماتوکسیلین-آنوزین (H&E) و تفسیرها به‌صورت دوسوکور انجام شدند.

تحلیل آماری داده‌ها

داده‌ها به‌صورت میانگین و انحراف معیار (\pm Mean SD) ارائه شده است. در تحلیل، اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها توسط آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey در سطح معنی‌داری $P < 0.05$ به کمک نرم‌افزار Graph-Pad Prism-8 و SPSS-24 مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

بر اساس نتایج جدول ۱ مشخص شد که فعالیت رادیکال زدایی عصاره آبی افسنطین با افزایش غلظت افزایش می‌یابد. IC50 برای مهار فعالیت رادیکال DPPH، 215 ± 30 میکروگرم بر میلی‌لیتر و مقادیر IC50 برای کوئرستین $1/336 \pm 0/11$ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

میزان سطح ویژه (BET) برای دو فاز آلفا و گاما بر حسب مترمربع بر گرم برای ۸۰ و ۲۰ نانومتر به ترتیب برابر با $SSA: >14 \text{ m}^2/\text{g}$ و $SSA: >135 \text{ m}^2/\text{g}$ بدست آمد. همچنین بر اساس نتایج TEM در شکل ۱ مشخص گردید نانو ذره گاما تقریباً به صورت کروی و میانگین قطر آن ۲۰ nm و نانو ذره آلفا تقریباً به صورت چند ضلعی نامنظم و میانگین قطر آن ۸۰ nm می‌باشد.

بررسی‌های وزن هر یک از موش‌ها در روزهای مواجهه در دو هفته و وزن ریه انتهایی آزمایش اندازه‌گیری شد.

مرحله بعد سطح ویژه نانو ذرات^۱ با روش^۲ BET و اندازه و شکل نانو ذرات آلومینا با استفاده از TEM^۳ تعیین شد. نمونه نانو ذرات اکسید آلومینیوم در فیزیولوژیکال سالین در غلظت‌های مدنظر دیسپرس شد. نانو ذرات آلومینا به مدت ۱۰ دقیقه با دستگاه هموژنایزر التراسونیک در ۷۷۵۰W برای جلوگیری از آگلومره شدن مخلوط شدند و سپس برای یکنواختی بهتر برای تزریق به حیوانات با استفاده ارتعاش مکانیکی ذرات دیسپرس به مدت ۵ دقیقه به‌صورت معلق درآمد.

سنجش استرس اکسیداتیو

مقادیر لیپیدپراکسیداسیون (MDA)، کاتالاز (CAT)، گلوکاتیون پراکسیداز (GPX)، سوپراکسیددیسموتاز کل (T-SOD) و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی (T-AOC) بافت ریه با استفاده از کیت‌های زلیبو آلمان مطابق با دستورالعمل‌های کیت شرکت قرائت گردید.

تعیین بیان ژن با استفاده از روش Real-time PCR

حدود ۱۰۰ mg از بافت ریه برای آنالیز RT-qPCR برای سطح بیان mRNA متالوتیونین و هم اکسیژناز برداشته و سپس استخراج کل RNA مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده کیت انجام شد. جهت ساخت cDNA از دستورالعمل کیت شرکت سازنده پیروی و GAPDH به‌عنوان ژن ساختمانی جهت کنترل داخلی استفاده گردید. در نهایت سطح بیان ژن‌ها با استفاده از روش Pfaffl محاسبه شد (۳۰).

محتوی غلظت آلومینیوم بافت ریه

غلظت کل آلومینیوم (Al) در بافت ریه با استفاده از طیف‌سنجی جرمی پلاسمایی جفت شده القایی (ICP-MS) اندازه‌گیری شد. به‌طور خلاصه، بافت ریه ابتدا در محفظه کوره در دمای ۱۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت خشک شد. تقریباً ۵۰ میلی‌گرم از بافت خشک

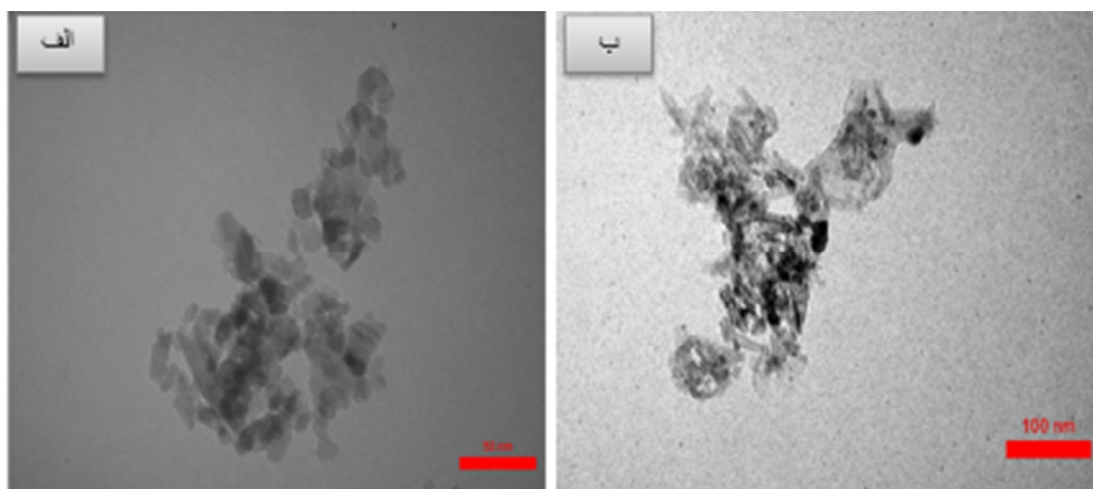
1- Specific surface area

2- Brunauer Emmett Teller

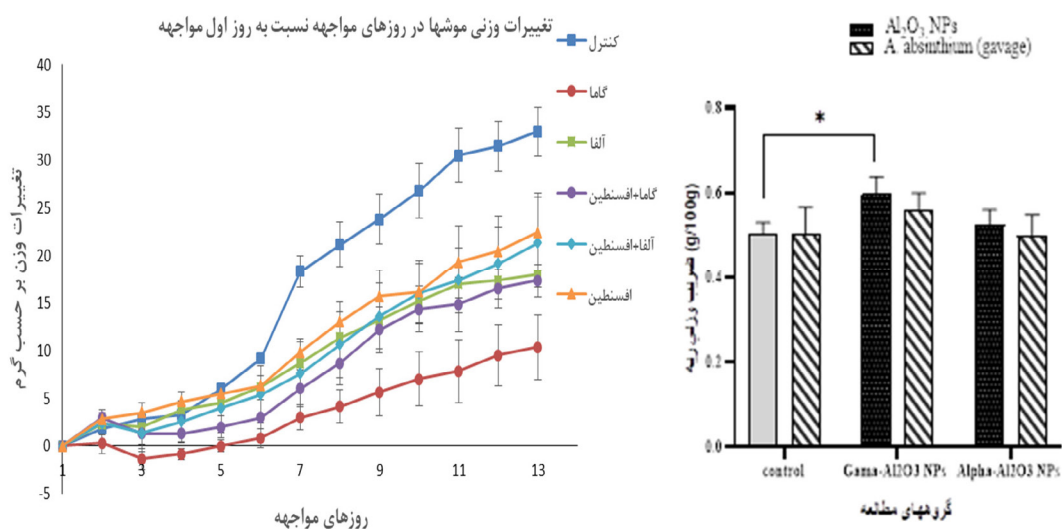
3- Transmission electron microscopic

جدول ۱. مقادیر غلظت و جذب نمونه اصلی آرتیمیزیا افسنتین

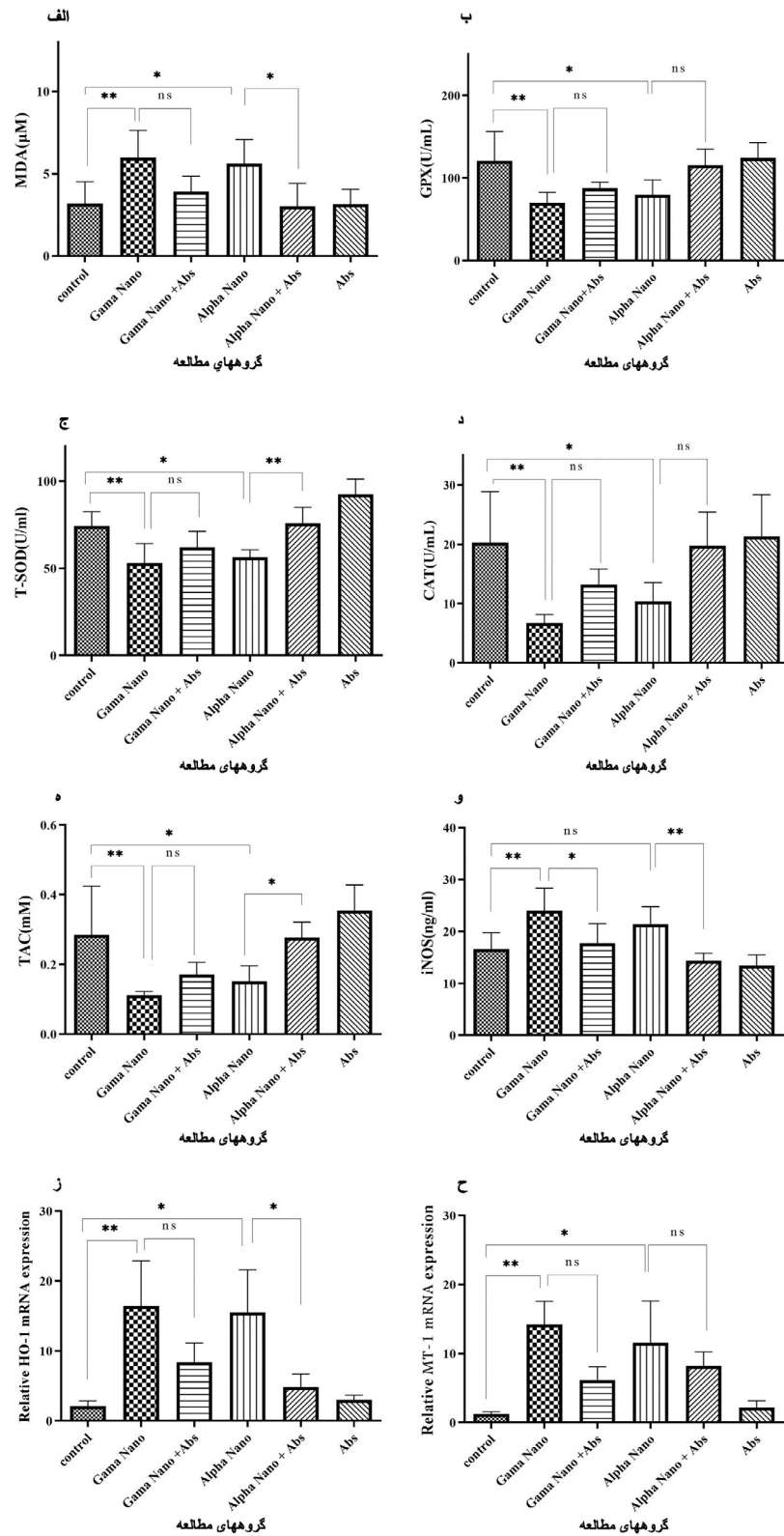
شماره	غلظت	جذب با سه تکرار			انحراف معیار \pm میانگین	درصد مهار RSA (%)
۱	۶/۲۵	۰/۱۶۴	۰/۱۶۷	۰/۱۵۶	۰/۱۶۲۳۳۳ \pm ۰/۰۰۵۶۸	۸۰
۲	۳/۱۲	۰/۳۰۴	۰/۳۰۷	۰/۳۰۴	۰/۳۰۵ \pm ۰/۰۰۱۷۳	۶۲/۳۴
۳	۱/۵۶	۰/۴۰۸	۰/۴۰۵	۰/۴۳	۰/۴۱۴۳۳۳ \pm ۰/۰۱۳۶	۴۸/۸۸
۴	۰/۷۵	۰/۴۱۷	۰/۴۱۵	۰/۴۱۹	۰/۴۱۷ \pm ۰/۰۰۲	۴۸/۵۱
۵	۰/۳۷	۰/۴۴۵	۰/۴۵۲	۰/۴۸۲	۰/۴۵۹۶۶۷ \pm ۰/۰۱۹۶۵	۴۲/۳۳



شکل ۱. الف؛ نمونه TEM گاما ۲۰ نانومتری نانو آلومینیوم ب؛ نمونه TEM آلفا ۸۰ نانومتری



شکل ۲. الف) میانگین اختلاف وزن بدن در گروه‌های مورد مواجهه، ب) ضریب وزن ریه در گروه‌های مورد مواجهه



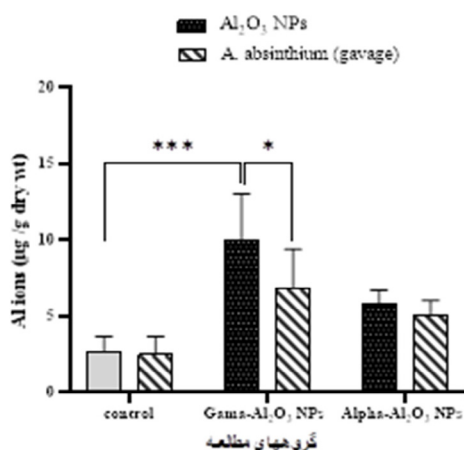
شکل ۳. الف-ح: شاخص‌های استرس اکسیداتیو، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و بیان ژن‌های اکسیداتیو در گروه‌هایی تیمار و تحت درمان. مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان می‌شوند: $^{***}P < 0.001$ ، $^{**}P < 0.01$ ، $^{*}P < 0.05$

سطح iNOS را در هر دو گروه دریافت کننده نانو ذرات کاهش داد (شکل ۳).

سطح بیان نسبی ژن HO-1 و MT-1 در حیواناتی که با نانو ذرات اکسید آلومینیوم گاما و آلفا تیمار شدند به طور معنی داری در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت و عصاره افسنتین این افزایش را بهبود داد (شکل ۳، ج). سطح معنی داری در گروه‌های دریافت کننده نانو ذرات اکسید آلومینیوم گاما نسبت به گروه‌های دریافت کننده نانو ذرات اکسید آلومینیوم آلفا بیشتر بوده است.

سطوح آلومینیوم در گروه‌های کنترل و گروه‌های نانو ذرات اکسید آلومینیوم در شکل ۴ نشان داده شده است. مواجهه با نانو ذرات اکسید آلومینیوم گاما باعث افزایش قابل توجه غلظت آلومینیوم در ریه شد. یافته‌ها نشان داد که سطح آلومینیوم در موش‌هایی که نانو ذرات آلفا دریافت کردند، بیشتر از گروه کنترل بود اما معنی داری مشاهده نشد. افسنتین سطح آلومینیوم در موش‌هایی دریافت کننده نانو ذرات اکسید آلومینیوم گاما را به طور معنی داری کاهش داد و در گروه‌هایی که دریافت کننده نانو ذرات اکسید آلومینیوم آلفا بودند کاهش مشاهده شده معنی دار نبود (شکل ۴).

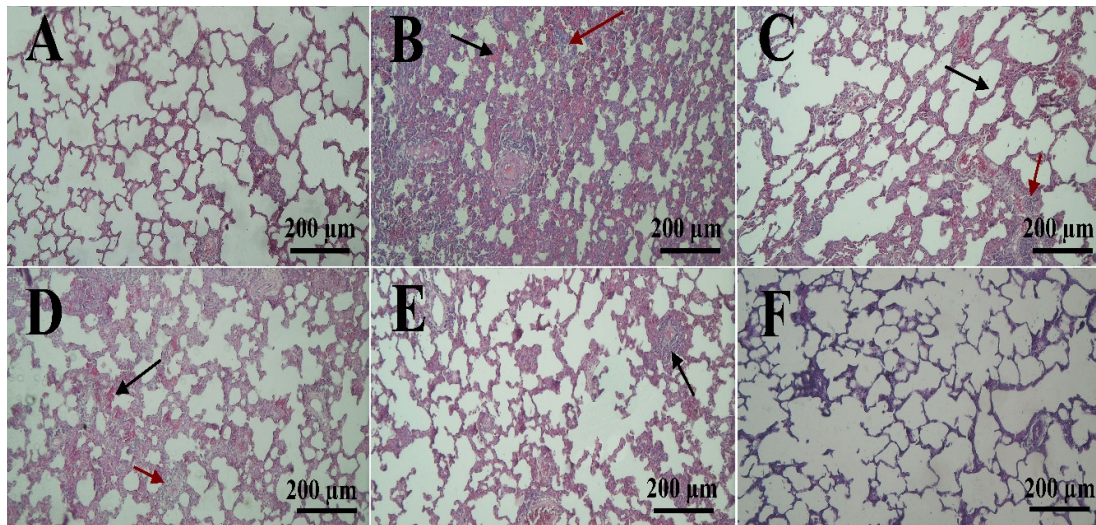
با بررسی‌های کیفی صورت گرفته بر روی نمونه‌های



شکل ۴. غلظت یون آلومینیوم در ریه موش‌های صحرایی نر تزریق شده با نانو ذرات اکسید آلومینیوم پس از ۱۴ روز. مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان می‌شوند: $^{***}P < 0.001$, $^{*}P < 0.05$

نتایج حاصل از اندازه‌گیری میانگین اختلاف وزن (بر حسب گرم) در موش‌های صحرایی در مواجهه با نانو ذرات اکسید آلومینیوم در تمام مدت مواجهه، افزایش وزن کمتری نسبت به گروه کنترل مشاهده شد، اما تغییرات معنی دار نبود. همچنین مشخص است مواجهه با نانو ذرات آلومینیوم ۲۰ نانومتری گاما کمترین میزان افزایش وزن گیری را داشته است و مشاهده شد که دریافت عصاره افسنتین همزمان با دریافت آلومینیوم، می‌تواند باعث بهبود در افزایش وزن موش‌ها شود (شکل ۲، الف). نتایج حاصل از آزمون‌های آماری نشان داد افزایش معنی داری در ضرایب اندام ریه بین نانو ذرات اکسید آلومینیوم گاما و گروه کنترل وجود داشت $P < 0.05$. در سایر گروه‌ها تغییرات معنی دار نبوده است (شکل ۲، ب).

نمودار ۳ الف نشان داد، گروه‌های دریافت کننده نانو ذرات اکسید آلومینیوم نوع گاما و آلفا، افزایش معنی داری در غلظت مالون دی آلدئید (MDA) در مقایسه با گروه کنترل دارند. افسنتین در گروهی که نانو ذرات اکسید آلومینیوم آلفا دریافت کردند، باعث کاهش معنی داری در غلظت MDA در مقایسه با گروه دریافت کننده نانو ذرات گاما شد. گروهی که نانو ذرات اکسید آلومینیوم گاما و افسنتین دریافت کردند، باعث کاهش غلظت مالون دی آلدئید شد، اما میزان کاهش معنی دار نبود (شکل ۳ الف). گروه‌های دریافت کننده نانو ذرات اکسید آلومینیوم گاما و آلفا باعث کاهش معنی داری در سطح گلووتاتیون پر اکسیداز (GPx)، سطح سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC) بافت ریه شد. افسنتین باعث افزایش سطح GPx، SOD، CAT و TAC در بافت ریه حیوانات دریافت کننده نانو ذرات اکسید آلومینیوم آلفا و گاما شد اما افزایش در SOD و TAC تنها در نوع آلفا معنی دار بود (شکل ۳، ب، ج، د، ه). سطح نیتریک اکسید سنتاز القایی (iNOS) در گروه‌های تیمار با نانو ذرات اکسید آلومینیوم گاما به طور معنی داری افزایش را نشان دادند و در گروه‌های تیمار با نانو ذرات اکسید آلومینیوم آلفا سطح iNOS افزایش داشت اما معنی دار نبود. افسنتین به طور معنی داری



شکل ۵. رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین از بافت ریه رت. تصویر A نشان دهنده بافت طبیعی ریه است. تصویر B نشان دهنده تخریب آلوئولها، حضور سلولهای التهابی (فلش قرمز) و خون (فلش مشکی) در بافت است. تصویر C نشان دهنده ضخیم شدن دیواره آلوئولها (فلش مشکی) و حضور سلولهای التهابی (فلش قرمز) است. تصویر D نشان دهنده خون (فلش مشکی)، تعدادی سلول التهابی (فلش قرمز) در بافت است. تصویر E نشان دهنده بافت طبیعی ریه و حضور اندک سلولهای التهابی (فلش مشکی) است. تصویر F نشان دهنده حفظ ساختار طبیعی بافت ریه است.

در بافت همچنان مشاهده می شود. شکل 5E بیانگر این است که در گروه پنجم پاسخ ریه خفیف بوده و تغییرات بافتی جزئی ایجاد شده است و تعداد اندکی سلول التهابی مشاهده می شود. شکل 5F در گروه ششم نشان دهنده این است که ساختار طبیعی بافت ریه حفظ شده است.

بحث

نانوتکنولوژی امروزه کاربرد زیادی دارد و در نتیجه نگرانی‌هایی در مورد اثرات روی سلامت کارگران و همچنین خطرات زیست محیطی این نانو مواد در حال افزایش است، به ویژه برای افرادی که در تماس مداوم با نانو ذرات اکسید آلومینیوم می باشند (۳۱). از طرفی اطلاعات محدودی در شناسایی خطر و ارزیابی نانو مواد، از جمله داده‌های سم شناسی در دسترس است؛ بنابراین در این مطالعه، سمیت نانو ذرات اکسید آلومینیوم به دو فرم آلفا و گاما روی فاکتورهای استرس اکسیداتیو، استرس نیتراتیو و بیان ژن روی ریه موش ارزیابی شد. همچنین نقش حفاظتی افسنتین روی آسیب‌ها و تغییرات ایجاد

تهیه شده از ریه گروه‌های مختلف آزمایش، توسط میکروسکوپ نوری، نتایج هیستوپاتولوژی در شکل ۵ حاصل شد. بررسی هیستوپاتولوژیکی نشان دهنده پاسخ التهابی بافت ریه به نانو ذرات و اثر آنتی‌اکسیدان در کاهش شدت پاسخ التهابی بافت ریه می باشد. شکل 5A، ساختار طبیعی ریه در گروه کنترل را نشان می دهد که شامل آلوئولها با ساختار نرمال و برونشیول که اپی‌تلیوم نرمال دارد را نشان می دهد. شکل 5B نشان دهنده واکنش شدید بافت ریه در گروه دوم است. در این گروه تعداد زیادی از آلوئولها تخریب شده‌اند. ضخیم شدگی دیواره آلوئولها و تهاجم سلولهای التهابی و خونریزی مشاهده می شود. شکل 5C نشان می دهد در گروه سوم پاسخ بافت ریه به نسبت به گروه دوم شدت کمتری دارد. در گروه ۳ پنوموتوراکس (کلاپس) تعدادی از آلوئولها، تهاجم سلولهای التهابی قابل مشاهده است. شکل 5D نشان می دهد در گروه چهارم، تخریب ساختارهای آلوئولی نسبت به گروه دوم کمتر است و تعداد سلولهای التهابی نیز خیلی کمتر مشاهده می شود و مقداری خونریزی

ایجاد و منجر به استرس اکسیداتیو می‌شوند. استرس اکسیداتیو رایج‌ترین مکانیسمی است که از طریق آن سمیت به دنبال مواجهه با نانو ذرات رخ می‌دهد (۳۴). رادیکال‌های آزاد، هر دو گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و گونه‌های نیتروژن فعال (RNS) باعث استرس اکسیداتیو، استرس نیترات و از همه مهمتر، ایجاد آسیب بالقوه به بیومولکول‌های یک سیستم زنده می‌شوند. تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد می‌تواند گونه‌های اکسیژن فعال را به لیپیدها (۳۵)، پروتئین‌ها (۳۶) و DNA (۳۷) متصل کند و در نهایت منجر به افزایش استرس اکسیداتیو، تغییر و آسیب شود. به این ترتیب، می‌توان اظهار نمود که با کاهش میزان این آنتی‌اکسیدان‌ها در سلول‌ها، فرصت لازم برای عملکرد رادیکال‌های آزاد فراهم شده و به دنبال آن استرس اکسیداتیو امکان بروز و آسیب‌های سلولی فراوانی را بر جای خواهد نهاد. گرچه در شرایط عادی سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن قادر به خنثی کردن این گونه‌های فعال واکنشی هستند لیکن برخی عوامل خارجی مانند نانو ذرات، در تولید بیش از حد این رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو منتج از آن نقش دارند (۳۸). در این مطالعه فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه افسنتین در مهار استرس اکسیداتیو ناشی از نانوذره آلومینیوم مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاضر نشان داد که تجویز همزمان عصاره آبی افسنتین و نانوذره آلومینیوم نوع گاما منجر به افزایش فعالیت GPx، SOD، CAT و میزان TAC نسبت به نانوذره گاما شد اما با این وجود معنادار نبود. در خصوص تجویز همزمان عصاره آبی افسنتین و نانوذره آلومینیوم نوع آلفا فعالیت GPx، SOD، CAT و میزان TAC افزایش پیدا کرد که در نوع آلفا ($P < 0.01$) و SOD ($P < 0.05$) به طور معنادار تغییر پیدا کرد؛ بنابراین اینگونه می‌توان نتیجه گرفت که نانو آلومینیوم نوع گاما ذخایر آنتی‌اکسیدانی را نسبت به نوع آلفا بیشتر تخلیه کرده است. همچنین، نتایج حاضر نشان داد که نانو آلومینیوم در هر دو فاز گاما و آلفا منجر به افزایش MDA در ریه می‌شود. در گروه دریافت کننده همزمان نانوآکسید آلومینیوم نوع آلفا و عصاره آبی

شده در بافت ریه توسط این دو فرم نانو ذرات مورد بررسی قرار گرفت. در طی مطالعه هیچ گونه مرگ و میر در طول دوره آزمایش مشاهده نشد. با این حال، در پایان دوره مطالعه، موش‌های تحت مواجهه الگوهای رفتاری غیرطبیعی مانند خستگی و کسلی، بی حالی، سرگیجه و کم تحرکی را نشان دادند. علاوه بر این، موش‌هایی که نانو ذرات اکسید آلومینیوم دریافت کردند، کاهش جزئی در مصرف غذا داشتند. گروه‌های تیمار شده با نانو ذرات، افزایش جزئی در وزن بدن را نشان دادند اما این افزایش معنادار نبود که دلیل آن را می‌توان اینگونه عنوان نمود که مواجهه با Al_2O_3 می‌تواند باعث تولید رادیکال‌های آزاد شود، متعاقب آن افزایش رادیکال‌های آزاد می‌تواند باعث آسیب سلولی و نهایتاً جلوگیری از وزن‌گیری نرمال موش‌ها شود. در مطالعه‌ای که توسط Imen Mrad و همکاران انجام شد نشان داد که مواجهه با Al_2O_3 -NPs باعث کاهش وزن‌گیری می‌شود اما این مقدار کاهش معنا دار نبوده است (۳۲). از طرفی افسنتین باعث بهبود وزن در گروه‌های دریافت کننده نانوآکسید آلومینیوم شد و همچنین گروه دریافت کننده افسنتین در مقایسه با گروه کنترل در ابتدای مواجهه، دارای تغییرات وزن بیشتر بود اما در طی ادامه مواجهه با افسنتین، تغییرات وزن در مقایسه با گروه کنترل کمتر دیده شد. علت این تغییرات را می‌توان اینگونه توجیه نمود که بر اساس مطالعات صورت گرفته دلیل افزایش وزن در روزهای اولیه به سبب اشتها آور بودن افسنتین است. از طرفی در ادامه مواجهه با افسنتین در هفته دوم، به سبب خاصیت چربی سوزی افسنتین وزن‌گیری حیوانات کمتر از گروه کنترل بوده است (۳۳).

نتایج این پژوهش نشان داد که مواجهه با نانوآکسید آلومینیوم در هر دو فاز گاما و آلفا تأثیر معنی داری در سطح گلوتاتیون پراکسیداز (GPx)، سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC) بافت ریه دارد و باعث اختلال و کاهش این آنزیم‌های درون آنتی‌اکسیدانی می‌شود که این اختلال و کاهش به واسطه مکانیسم گونه‌های فعال اکسیژن،

روز با دوز ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و تأثیر اسید گالیک با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم پرداخت، نتایج نشان داد که درمان با GA به طور قابل توجهی غلظت NO می‌کارد را بهبود داده است (۴۴) که این نتایج با یافته‌های ما در تغییرات پارامترهای نیترا تیو ریه، هم خوانی دارد. با توجه به نقش گسترده NO در سیستم‌های بیولوژیک بدن، می‌توان از آن به‌عنوان یکی از اهداف آسیب شناسی ناشی از مواجهه‌های شغلی با آلاینده‌ها در کارگران صنایع استفاده کرد.

ژن‌های HO-1 و MT-1 به سرعت توسط سیتوکین‌های پیش التهابی یا استرس اکسیداتیو به‌عنوان یک مکانیسم محافظتی در برابر استرس سلولی تنظیم می‌شوند. HO-1 به طور گسترده‌ای به‌عنوان یک نشانگر حساس پاسخ استرس در آسیب اکسیداتیو ناشی از زنبوبیوتیک‌ها استفاده می‌شود (۴۵). بیان این آنزیم به وسیله هم و بسیاری از القاء کننده‌هایی غیر همی مثل فلزات، شوک حرارتی، استرس اکسیداتیو و هایپوکسی القاء می‌شود. از این موضوع می‌توان اینگونه نتیجه‌گیری کرد که آنزیم هم اکسیژناز علاوه بر نقشی که در تجزیه هم دارد می‌تواند نقش سودمندی در حفظ هموستازی سلولی نیز داشته باشد. با توجه به مطالب فوق مبنی بر نقش هم اکسیژناز می‌توان این فرضیه را مطرح کرد که نانو ذرات آلومینا با اثر بر بیان آنزیم هم اکسیژناز، می‌تواند موجب التهاب و آسیب به بافت گردد. متالوتیونین‌ها گروهی از پروتئین‌های استرس هستند که نقش مهمی در حفاظت سلولی در مقابل فلزات دارند. بیان MT-1 در حضور غلظت بالای فلزات به میزان زیادی القاء می‌گردد و ویژگی منحصر به فردی در اتصال به فلزها، تعویض یون و کاهش فلز دارد. مطالعات متعدد نشان داده است که رابطه‌ی مستقیمی بین میزان سنتز این پروتئین با غلظت فلزات در بافت‌هایی بدن وجود دارد و از این نظر می‌توان به‌عنوان نشانگر زیستی فلزات استفاده کرد (۴۷). افزایش سطح بیان MT-1 در کبد به دنبال مواجهه با نانونیکل از طریق تزریق داخل صفاقی مشاهده شد (۴۵). در مطالعه حاضر بیان ژن MT-1 و HO-1 در بافت ریه

افسنطین با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم با توجه به خاصیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه، تغییرات MDA به حالت تعدیل رسیده که این امر نشان دهنده مؤثر بودن این گیاه در کاهش اثرات سمی نوع آلفا است. در مطالعه‌ای نانو ذرات اکسید آلومینیوم به طور وابسته به دوز و زمان، باعث استرس اکسیداتیو در مغز، کبد و کلیه رت‌ها می‌شود (۳۹). علاوه بر این، در جوندگان مختلف نشان داده شده است که نانو ذرات اکسید آلومینیوم می‌توانند با القای اثرات سیتوتوکسیک، اثرات ژنوتوکسیک و رویدادهای التهابی در مغز باعث ایجاد سمیت عصبی شوند (۲، ۴۰). مراد و همکاران در مطالعه خود نشان دادند که نانو ذرات اکسید آلومینیوم موجب افزایش سطح MDA و کاهش فعالیت SOD در هیپوکامپ رت شده است (۴۱)؛ که این نتایج با یافته‌های ما که نانو ذرات آلومینا باعث تغییرات پارامترهای اکسیداتیو روی ریه می‌شود، هم خوانی دارد. نیتریک اکسید از متابولیت‌های طبیعی سلول و یک رادیکال آزاد با واکنش پذیری بسیار بالا است که به‌عنوان یک سیگنال بیولوژیک در طیف وسیعی از فرآیندهای فیزیولوژیک بدن نقش حائز اهمیتی دارد (۴۲). همانند ROS، تولید بیش از حد RNS هم ضمن اختلال در سیستم آنتی‌اکسیدانی سبب ایجاد استرس نیتروژاتیو می‌شود. همچنین در سیستم تنفسی نیز باعث شل شدن عروق و مجاری تنفسی شده و عدم تعادل در میزان آن منجر به التهابی پاتولوژیک می‌شود (۴۳). نیتریک اکسید توسط آنزیم‌هایی نیتریک اکساید سنتاز (NOS) از تبدیل L-Arginine در حضور اکسیژن و ترکیبی به نام NADPH^1 صورت می‌گیرد. سطح نیتریک اکسید سنتاز القایی (iNOS) در گروه‌های تیمار با نانو ذرات اکسید آلومینیوم گاما به طور معنی‌داری افزایش را نشان دادند و در گروه‌های تیمار با نانو ذرات اکسید آلومینیوم آلفا سطح iNOS افزایش داشت اما معنی‌دار نبود. از طرفی افسنطین به طور معنی‌داری سطح iNOS در هر دو گروه دریافت کننده نانو ذرات را کاهش داد (شکل ۴). در مطالعه‌ای که به بررسی اثرات نانو ذرات اکسید آلومینیوم به مدت ۱۴

1- Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate

شواهد مفیدی برای ارزیابی ایمنی تجویز نانوذره آلومینا ارائه کند. مهم ترین یافته های تحقیق حاضر این بود که مصرف مکمل افسنتین می تواند سطح استرس اکسیداتیو و استرس نیتراتیو را کاهش و میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی را به دنبال مصرف آن افزایش دهد. از آنجا که یکی از اهداف اصلی بهداشت حرفه ای کاهش عوارض ناشی از کار و حفظ سلامتی است، در این مطالعه اثر حفاظتی عصاره گیاه افسنتین به صورت خوراکی مورد بررسی قرار گرفت؛ بنابراین با آزمایشات در مدل های مختلف حیوانی و بررسی های بیشتر در این زمینه می توان اثرات زیان آور ناشی از مواجهه با نانو ذرات اکسید آلومینیم را در کارگران در معرض مواجهه کاهش داد.

محدودیت ها

از جمله محدودیت هایی که می توان در این مطالعه به آن اشاره داشت، راه مواجهه با نانو ذرات آلومینا از طریق استنشاقی نیازمند وجود دستگاه تولید و اندازه گیری نانو ذرات ۲۰ میکرونی بود که متأسفانه در حال حاضر این تجهیزات در دسترس نبود.

پیشنهادات

در مطالعات آتی باتوجه به اهمیت سیستم تنفسی، پیشنهاد می شود سایر قسمت های سیستم تنفسی نیز مانند برونش ها بررسی گردد. همچنین با توجه به خاصیت ضدالتهابی افسنتین فاکتورهای ضدالتهابی مانند TNF- α برای بررسی دقیق تر اثرات گیاه افسنتین مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی تهران با شناسه اخلاق IR.TUMS.SPH.REC.1399.214 است؛ لذا پژوهشگران به جهت حمایت های مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی تهران برای انجام این طرح نهایت سپاسگزاری را دارند.

به طور معنی داری افزایش پیدا کرده است که نشان دهنده تحلیل ظرفیت آنتی اکسیدانی و افزایش استرس اکسیداتیو ناشی از تجویز نانوالومینا در موش صحرایی است. افزایش تدریجی میزان استرس اکسیداتیو با اختلال در تنظیم ردوکس بر رونویسی ژن تأثیر می گذارد (۴۶). همچنین افسنتین نشان داده که می تواند تا حدودی کمبود ظرفیت آنتی اکسیدانی را جبران کند.

در مطالعه ی ژانگ و همکاران نشان دادند که مواجهه با آلومینیوم به مدت ۲۸ روز باعث افزایش معناداری در سطح یون آلومینیوم در قشر مغز و ریه ها شده است این نتایج با مطالعه ما که غلظت آلومینیوم نوع گاما در ریه افزایش معناداری را نشان داد همخوانی دارد (۴۷).

بر اساس یافته های تحقیق می توان این فرضیه را بیان کرد که ذرات با اندازه کوچک تر و همچنین با سطح ویژه و واکنش پذیری بالاتر می تواند سمیت بیشتری را ایجاد کنند، بنابراین نانو ذرات نوع گاما ممکن است یون های بیشتری را برای جذب و تحرک درون سلولی آزاد کند که منجر به فراهم زیستی بالاتری نسبت به نانو ذرات نوع آلفا می شود. به منظور بررسی تأثیر اندازه ذرات، سمیت ریه پس از تجویز نانو ذرات آلومینا مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاضر نشان داد که نانو ذرات نوع گاما سمیت ریوی قوی تری نسبت به نانو ذرات نوع آلفا ایجاد می کنند.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که تجویز نانوذره آلومینا از طریق تزریق داخل صفاقی منجر به عدم تعادل اکسیداسیون و آنتی اکسیدان ها و همچنین بروز استرس نیتراتیو در ریه موش ها شد. همچنین، مطالعه حاضر نشان داد که آسیب ریوی ممکن است با استرس نیتراتیو، استرس اکسیداتیو و بیان غیر طبیعی mRNA HO-1 و MT-1 ناشی از نانوذره آلومینا مرتبط باشد. با این حال، مکانیسم دقیق سمیت ریوی ناشی از نانوذره نانوالومینا نامشخص است و مطالعات بیشتری در شرایط *in vitro* و *in vivo* مورد نیاز است. یافته های کنونی ممکن است

REFERENCES

- Said S, Mikhail S, Riad M. Recent processes for the production of alumina nano-particles. *Mater Sci Energy Technol.* 2020;3:344-63.
- Prabhakar P, Reddy UA, Singh S, Balasubramanyam A, Rahman M, Indu Kumari S, et al. Oxidative stress induced by aluminum oxide nanomaterials after acute oral treatment in Wistar rats. *J Appl Toxicol.* 2012;32(6):436-45.
- Yang S-T, Wang T, Dong E, Chen X-X, Xiang K, Liu J-H, et al. Bioavailability and preliminary toxicity evaluations of alumina nanoparticles in vivo after oral exposure. *Toxicol Res (Camb).* 2012;1(1):69-74.
- Piriyawong V, Thongpool V, Asanithi P, Limsuwan P. Preparation and characterization of alumina nanoparticles in deionized water using laser ablation technique. *J Nanomater.* 2012;2012.
- Ates M, Demir V, Arslan Z, Daniels J, Farah IO, Bogatu C. Evaluation of alpha and gamma aluminum oxide nanoparticle accumulation, toxicity, and depuration in *Artemia salina* larvae. *Environ Toxicol.* 2015;30(1):109-18.
- Li X, Zhang C, Zhang X, Wang S, Meng Q, Wu S, et al. An acetyl-L-carnitine switch on mitochondrial dysfunction and rescue in the metabolomics study on aluminum oxide nanoparticles. *Part Fibre Toxicol.* 2015;13(1):1-19.
- Rule F. Office of the Federal Register, National Archives and Records Administration. US Government Printing Office, Washington, DC.
- Teagarden DL, Kozłowski JF, White JL, Hem SL. Aluminum chlorohydrate I: Structure studies. *J Pharm Sci.* 1981;70(7):758-61.
- Sharifi S, Behzadi S, Laurent S, Forrest ML, Stroeve P, Mahmoudi M. Toxicity of nanomaterials. *Chem Soc Rev.* 2012;41(6):2323-43.
- Kim Y-S, Chung Y-H, Seo D-S, Choi H-S, Lim C-H. Twenty-eight-day repeated inhalation toxicity study of aluminum oxide nanoparticles in male Sprague-Dawley rats. *Toxicol Res.* 2018;34(4):343-54.
- Tsai S-JC, Ada E, Isaacs JA, Ellenbecker MJ. Airborne nanoparticle exposures associated with the manual handling of nanoalumina and nanosilver in fume hoods. *J Nanopart Res.* 2009;11(1):147-61.
- Xing M, Zou H, Gao X, Chang B, Tang S, Zhang M. Workplace exposure to airborne alumina nanoparticles associated with separation and packaging processes in a pilot factory. *Environ Sci Process Impacts.* 2015;17(3):656-66.
- Kwon J-T, Seo G-B, Lee M, Kim H-M, Shim I, Jo E, et al. Pulmonary toxicity assessment of aluminum oxide nanoparticles via nasal instillation exposure. *J Environ Sci.* 2013;39(1):48-55.
- Balasubramanyam A, Sailaja N, Mahboob M, Rahman MF, Hussain SM, Grover P. In vivo genotoxicity assessment of aluminium oxide nanomaterials in rat peripheral blood cells using the comet assay and micronucleus test. *Mutagenesis.* 2009;24(3):245-51.
- Oesterling E, Chopra N, Gavalas V, Arzuaga X, Lim EJ, Sultana R, et al. Alumina nanoparticles induce expression of endothelial cell adhesion molecules. *Toxicol Lett.* 2008;178(3):160-6.
- Dey S, Bakthavatchalu V, Tseng MT, Wu P, Florence RL, Grulke EA, et al. Interactions between SIRT1 and AP-1 reveal a mechanistic insight into the growth promoting properties of alumina (Al₂O₃) nanoparticles in mouse skin epithelial cells. *Carcinogenesis.* 2008;29(10):1920-9.
- Chen L, Yokel RA, Hennig B, Toborek M. Manufactured aluminum oxide nanoparticles decrease expression of tight junction proteins in brain vasculature. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2008;3(4):286-95.
- Di Virgilio AL, Reigosa M, De Mele MFL. Response of UMR 106 cells exposed to titanium oxide and aluminum oxide nanoparticles. *J Biomed Mater Res A.* 2010;92(1):80-6.
- Braydich-Stolle LK, Speshock JL, Castle A, Smith M, Murdock RC, Hussain SM. Nanosized

- aluminum altered immune function. *ACS nano*. 2010;4(7):3661-70.
20. Jederlinic PJ, Abraham JL, Churg A, Himmelstein J, Epler G, Gaensler E. Pulmonary fibrosis in aluminum oxide workers. *Am Rev Respir Dis*. 1990;142(5):1179-84.
 21. Willhite CC, Karyakina NA, Yokel RA, Yenugadhati N, Wisniewski TM, Arnold IM, et al. Systematic review of potential health risks posed by pharmaceutical, occupational and consumer exposures to metallic and nanoscale aluminum, aluminum oxides, aluminum hydroxide and its soluble salts. *Crit Rev Toxicol*. 2014;44(sup4):1-80.
 22. Li X, Yang H, Wu S, Meng Q, Sun H, Lu R, et al. Suppression of PTPN6 exacerbates aluminum oxide nanoparticle-induced COPD-like lesions in mice through activation of STAT pathway. *Part Fibre Toxicol*. 2017;14(1):1-14.
 23. Ekor M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Front Pharmacol*. 2014;4:177.
 24. Kim H-J, Yu B-P, Chung H-Y. Molecular exploration of age-related NF- κ B/IKK downregulation by calorie restriction in rat kidney. *Free Radic Biol Med*. 2002;32(10):991-1005.
 25. Gonzalez-Coloma A, Bailen M, Diaz CE, Fraga BM, Martínez-Díaz R, Zuniga GE, et al. Major components of Spanish cultivated *Artemisia absinthium* populations: Antifeedant, antiparasitic, and antioxidant effects. *Ind Crops Prod*. 2012;37(1):401-7.
 26. Kamarauskaite J, Baniene R, Raudone L, Vilkickyte G, Vainoriene R, Motiekaityte V, et al. Antioxidant and Mitochondria-Targeted Activity of Caffeoylquinic-Acid-Rich Fractions of Wormwood (*Artemisia absinthium* L.) and Silver Wormwood (*Artemisia ludoviciana* Nutt.). *Antioxidants*. 2021;10(9):1405.
 27. Kharoubi O, Slimani M, Krouf D, Seddik L, Aoues A. Role of wormwood (*Artemisia absinthium*) extract on oxidative stress in ameliorating lead induced haematotoxicity. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2008;5(3):263-70.
 28. Bora KS, Sharma A. Neuroprotective effect of *Artemisia absinthium* L. on focal ischemia and reperfusion-induced cerebral injury. *J Ethnopharmacol*. 2010;129(3):403-9.
 29. Stojičević SS, Stanisavljević IT, Veličković DT, Veljković VB, Lazić ML. Comparative screening of the anti-oxidant and antimicrobial activities of *Sempervivum marmoreum* L. extracts obtained by various extraction techniques. *Glas Hem Drus Beogr*. 2008;73(6):597-607.
 30. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9):e45-e.
 31. Arul Prakash F, Dushendra Babu G, Lavanya M, Shenbaga Vidhya K, Devasena T. Toxicity studies of aluminium oxide nanoparticles in cell lines. *Int J Nanotechnol Appl*. 2011;5(2):99-107.
 32. Mrad I, Sakly M, Amara S. Aluminum oxide nanoparticles induced cognitive deficits and oxidative stress in frontal cortex and cerebellum of rat. *Adv J Toxicol Curr Res*. 2017;1:007-14.
 33. Goud BJ, Swamy B. A review on history, controversy, traditional use, ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Artemisia absinthium* Linn. *Int J Adv Res Eng Appl Sci*. 2015;4(5):77-107.
 34. Yang H, Liu C, Yang D, Zhang H, Xi Z. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. *J Appl Toxicol*. 2009;29(1):69-78.
 35. Ylä-Herttuala S. Oxidized LDL and Atherogenesis a. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1999;874(1):134-7.
 36. Stadtman ER, Levine RL. Protein oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2000;899(1):191-208.
 37. Bokov A, Chaudhuri A, Richardson A. The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech Ageing Dev*. 2004;125(10-11):811-26.
 38. Afshar P, Shokrzadeh M, ROOZBEH NL, Ghorbani HA, Naghizadeh RS, Alimi M.

- Antioxidants protective effects on oxidative stress damage induced by mycotoxins: A Review. 2020.
39. Morsy GM, Abou El-Ala KS, Ali AA. Studies on fate and toxicity of nanoalumina in male albino rats: oxidative stress in the brain, liver and kidney. *Toxicol Ind Health*. 2016;32(2):200-14.
 40. Shrivastava R, Raza S, Yadav A, Kushwaha P, Flora SJ. Effects of sub-acute exposure to TiO₂, ZnO and Al₂O₃ nanoparticles on oxidative stress and histological changes in mouse liver and brain. *Drug Chem Toxicol*. 2014;37(3):336-47.
 41. M'rad I, Jeljeli M, Rihane N, Hilber P, Sakly M, Amara S. Aluminium oxide nanoparticles compromise spatial learning and memory performance in rats. *EXCLI J*. 2018;17:200.
 42. Kurutas EB. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutr J*. 2015;15(1):1-22.
 43. Mirzaei F, Khazaei M. Role of nitric oxide in biological systems: a systematic review. *Majallahi Danishgahi Ulumi Pizishkii Mazandaran*. 2017;27(150):192-222.[Persian]
 44. El-Hussainy E-HM, Hussein AM, Abdel-Aziz A, El-Mehasseb I. Effects of aluminum oxide (Al₂O₃) nanoparticles on ECG, myocardial inflammatory cytokines, redox state, and connexin 43 and lipid profile in rats: possible cardioprotective effect of gallic acid. *Can J Physiol Pharmacol*. 2016;94(08):868-78.
 45. Yu S, Liu F, Wang C, Zhang J, Zhu A, Zou L, et al. Role of oxidative stress in liver toxicity induced by nickel oxide nanoparticles in rats. *Mol Med Rep*. 2018;17(2):3133-9.
 46. Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-κB and cytokine-inducible enhancers. *The FASEB Journal*. 1995;9(10):899-909.
 47. Zhang X, Xu Y, Zhou L, Zhang C, Meng Q, Wu S, et al. Sex-dependent depression-like behavior induced by respiratory administration of aluminum oxide nanoparticles. *Int J Environ Res Public Health*. 2015;12(12):15692-705.