

Alteration in capacity and function of proximal and distal convoluted tubules in kidney exposed by Molybdenum trioxide nanoparticles in female rats (Stereological technique)

Simin Fazelpour¹, Mona Maleki², Tahereh Naji², Ali Kalantari-Hesari³, Mohammad Babaei⁴

¹ Department of Anatomy, Faculty of Tehran Medical Science, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Department of Basic Sciences, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran Medical Sciences Islamic Azad University, Tehran, Iran

³ Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

⁴ Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

Abstract

Background: One of the applications of molybdenum trioxide nanoparticles (MTNPs) is to use it as an antibacterial agent. The kidney is also one of the most important organs in the body to excrete waste products and regulate many blood factors. Due to widespread use of MTNPs and the importance of the kidney, the aim of this study was to investigate this drug effect on kidney tubules.

Materials and methods: Thirty Wistar rats were divided into a control group, a sham group (receiving normal saline) and 3 experimental groups (receiving 50, 100, and 200 mg/kgBW MTNPs). The intraperitoneal injections were carried for 35 days. At the end of the treatment, the animals were euthanized after collecting blood samples. Then, their right kidney was removed and after tissue preparation, the samples were examined by stereology to determine changes in the volume, length, and surface area of tubules and epithelium height.

Results: The results showed that MTNPs caused significantly increases the volume of epithelium and the length and volume of the distal tubule compared to the control and sham group. Also, epithelium height and surface area of tubules and renal length in high levels of MTNPs were indicated significantly increases. These nanoparticles made changes most of stereological parameters which investigated in renal tubules and serum levels of creatinine.

Conclusion: Due to the widespread use of MTNPs in the industry as an antimicrobial as well as its adverse effects on renal tubules, the uncontrolled use of antimicrobial containing molybdenum trioxide should be avoided.

Keywords: *Nephron, Renal damage, Antimicrobial, Renal tubules.*

Cited as: Fazelpour S, Maleki M, Naji T, kalantari-Hesari A, Babaei M. Alteration in capacity and function of proximal and distal convoluted tubules in kidney exposed by Molybdenum trioxide nanoparticles in female rats (Stereological technique). Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2023; 33(1): 40-49.

Correspondence to: Simin Fazelpour & Ali kalantari-Hesari

Tel: +98 9120796671

E-mail: simin_fazelpour@yahoo.com & a.kalantarihesari@basu.ac.ir

ORCID ID: 0000-0002-6067-0351 & 0000-0002-9079-753X

Received: 14 Jul 2022; **Accepted:** 2 Oct 2022

تغییر در ظرفیت و عملکرد لوله‌های پیچیده دور و نزدیک در کلیه مواجه شده با نانوذرات تری‌اکسید مولیبدن در موش صحرایی ماده (تکنیک استریولوژی)

سیمین فاضلی پور^۱، مونا ملکی^۲، طاهره ناجی^۲، علی کلانتری حصار^۳، محمد بابائی^۴

^۱ گروه علوم تشریحی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۲ گروه علوم پایه، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۳ گروه پاتوبیولوژی، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

^۴ گروه علوم درمانگاهی، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

چکیده

سابقه و هدف: یکی از کاربردهای نانوذره تری‌اکسید مولیبدن استفاده از آن به عنوان میکروپوش است. کلیه یکی از اندام‌های مهم بدن در کنترل و ثابت نگاه داشتن مواد موجود در خون است. به دلیل مصرف گسترده تری‌اکسید مولیبدن و نیز اهمیت کلیه، بخصوص لوله‌های نفرون در سیستم تصفیه خون، بر آن شدیم که اثر این نانو ذرات بر لوله‌های کلیه را مورد مطالعه و بررسی قرار دهیم.

روش بررسی: سی سر موش صحرایی نژاد ویستار به دو گروه کنترل و شش (دریافت‌کننده سرم فیزیولوژی) و سه گروه تجربی (به ترتیب دریافت کننده سطوح ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم از نانوذره تری‌اکسید مولیبدن) تقسیم شدند. تزیقات به صورت داخل صفاقی و به مدت ۲۵ روز انجام گرفت. در پایان، پس از خونگیری حیوانات آسان‌کشی شده و نمونه کلیه سمت راست اخذ و پس از تثبیت و آماده‌سازی بافتی، با روش استریولوژی جهت تعیین تغییرات حجم، طول، مساحت سطح لوله‌ها و ارتفاع اپیتلیوم بررسی شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که این نانوذره موجب افزایش معنی‌دار حجم اپیتلیوم و طول و حجم لوله پیچیده دور نسبت به گروه کنترل و شش گردید. همچنین ارتفاع اپیتلیوم لوله و مساحت سطح لوله و طول کلیه در گروه دریافت‌کننده این نانو ذرات با سطح بالا افزایش معنی‌داری را نشان داد. این نانوذره سبب تغییر اکثر فراسنجه‌های استریولوژیک مورد بررسی در لوله‌های کلیوی و سطح سرمی کراتینین شد.

نتیجه‌گیری: به دلیل مصرف گسترده نانو ذرات تری‌اکسید مولیبدن در صنعت به عنوان میکروپوش، همچنین اثرات سوء آن بر لوله‌های کلیوی از مصرف بی‌رویه میکروپوش‌های حاوی تری‌اکسید مولیبدن در صورت امکان خودداری شود.

واژگان کلیدی: نفرون، آسیب کلیوی، میکروپوش، لوله‌های کلیوی.

مقدمه

نانو ذرات به دلیل ابعاد و ترکیبات آنها دارای فواید و خواصی هستند که موجب تحولات اساسی در دهه‌های اخیر شده‌اند. از جمله مصارف این ذرات می‌توان به کاربرد آن در دارورسانی

پوستی، مواد ضد میکروبی و ضد سرطانی، داروهای پیتیدی و پروتئینی، داروهای ضد التهاب و تنفسی و غیره اشاره کرد. علی‌رغم اینکه نانو ذرات می‌توانند در سلول تجمع یابند ولی مطالعات مختلف نشان داده که قطر نانوذرات در تأثیرگذاری بسیار اهمیت دارد. چنانکه با قطر تقریبی ۷۵ نانومتر کلیه را هدف قرار می‌دهند (۱). مهم‌ترین عملکرد کلیه‌ها ثابت نگه داشتن حجم و ترکیبات بدن است. اگر مقدار عملکرد نفرون‌ها به کمتر از ۲۰ درصد حد طبیعی کاهش یابد، انجام درمان جایگزین ضروری است (۲). با توجه به اطلاعات حاصل از

آدرس نویسنده مسئول: گروه علوم تشریحی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی تهران & گروه پاتوبیولوژی، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، سیمین فاضلی پور، علی کلانتری

حصاری (email: simin_fazelipour@yahoo.com, a.kalantarihesari@basu.ac.ir)

ORCID ID: 0000-0002-6067-0351, 0000-0002-9079-753X

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۴/۲۳

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۷/۱۰

پیمایش های جمعیتی، تخمین زده شده است که حداقل ۶ درصد از جمعیت بالغ آمریکا دارای بیماری مزمن کلیه در مراحل ۱ و ۲ بیماری مزمن کلیوی (Chronic kidney disease (CKD) هستند (۳).

مولیدن تری اکسید اورتورومبیک ($\text{MoO}_2\text{-}\alpha$) دارای ساختار بلوری لایه ای است (۴). نانوذره های سنتز شده مولیدن تری اکسید که در فعالیت میکروپ کشتی علیه باکتری های گرم منفی و مثبت نقش داشته و تأثیر سایتوتوکسیک آن بر روی سرطان سینه و ریه گزارش شده است (۵). گزارش ها در مورد مسمومیت ناشی از مولیدین در انسان بسیار نادر است (۶). بیشتر مشاهدات مربوط به مسمومیت زایبی مولیدین براساس داده های حیوانی است. افزایش مولیدین در غذای احشام موجب بروز بیماری های حاد همچون اسهال، کم خونی، لاغری و بعضاً منجر به مرگ می گردد. بعلاوه تنوع گزارشات موجود در مورد میزان بی خطر بودن مصرف مولیدین در حیوانات، از قطعیت بالایی برخوردار نیست. معمولاً حد بی خطر مولیدین ۵ تا ۱۰ گرم در تن در مراتع در نظر گرفته می شود. در آزمایش های دقیق میزان Ld50 پایین (به معنی قدرت مسمومیت بالا) برای ترکیبات مولیدین تعیین شده است. برخی از موارد نشان دهنده Ld50 پایین، بعلاوه تغذیه طولانی مدت رخ می دهد. Ld50 دهانی دقیق تر اکسید مولیدین، با درجه خلوص بالا، در موش ها بین ۲۹۶۰ تا ۳۵۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم تعیین شده است (۷، ۸).

دانیل و همکارانش در سال ۲۰۱۰ مطالعه ای بر روی سمیت و فعالیت ایمنی نانوذرات نقره انجام و توزیع نانو ذرات نقره را در مغز، کلیه، کبد، شش، طحال و قلب تشخیص و گزارش کردند (۹). در مطالعه دیگری تأثیر حاد سم شناسی پودر اکسید با مقیاس نانو و زیر میکرو بر روی موش های بالغ انجام گرفت (۱۰). طبق نتایج به دست آمده از مطالعه یان و همکارانش نانوذرات اکسید روی باعث تغییر سمیت و تغییر متابولیسم کلیه در موش ها می شوند (۱۱). در بررسی حاد تعامل بین کادمیوم، کلسیم و روی در طول نفرون در موش صحرایی داخل بدن مشخص شد که میتوکندری کلیه از اهداف اولیه داخل سلولی جیوه برای ایجاد تخریب کلیوی است. در مواجهه با فلزات سنگین این مواد می توانند در بافت کلیه انباشته شده و هم چنین مقداری از آن از طریق ادرار دفع شوند (۱۲). در یک مطالعه بر روی حلالیت نانو اکسید روی در عوامل مهم زیست محیطی و بیولوژیکی نشان داده شد که نانوذرات اکسید روی می تواند سبب برهم زدن سوخت و ساز انرژی و اختلال میتوکندری و غشای سلول در کلیه موش شود (۱۳). همچنین

مطالعه دیگری بر روی کلیه نشان داد که سلول های لوله های پیچیده دور و نزدیک در کلیه دارای گیرنده هایی هستند که نسبت به برخی از مواد واکنش نشان داده و منجر به تکثیر سلول های اپیتلیال لوله های کلیوی می شوند (۱۴).

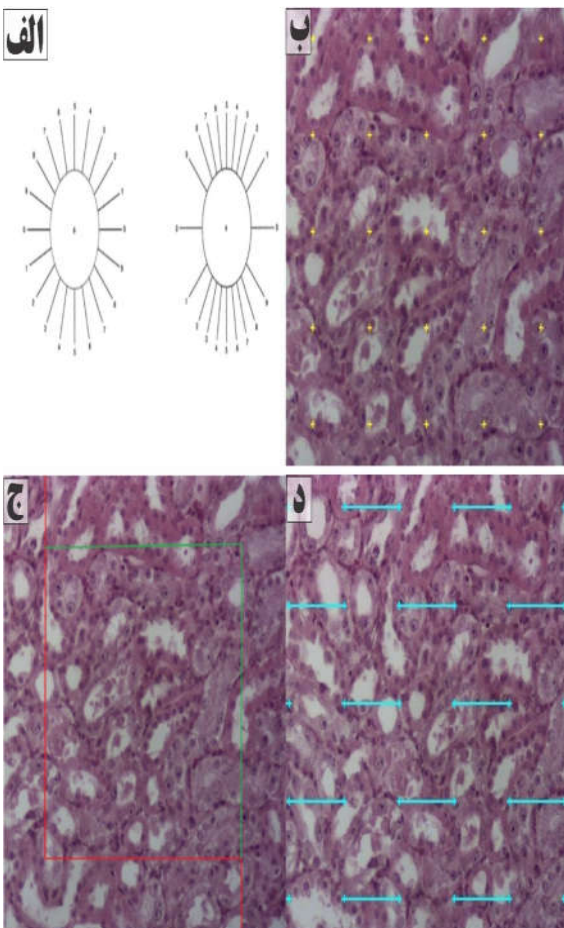
استریولوژی علم روابط هندسی بین یک ساختار در فضا های سه بعدی و برش مقطعی آن ساختار در فضا های دو بعدی می باشد. اغلب روش های استریولوژی بر روی تصاویر میکروسکوپی حاصل از میکروسکوپ های نوری و الکترونیکی اعمال می شود (۱۵). صادقی نژاد و نیگارد در سال ۲۰۱۹ به بررسی کلیه گربه با تکنیک استریولوژی پرداختند (۱۶). در مطالعه سلیمانی و توکلیان در سال ۲۰۱۳ اثر پارا نونیل فنول (para-Nonylphenol) به تنهایی و همراه با ویتامین E بر روی کلیه و بخش های مختلف نفرون با تکنیک استریولوژی انجام گرفت (۱۷). همچنین در مطالعه ای بر روی موش های صحرایی نر نشان داده شد که طول و حجم لوله پیچیده دور می تواند در اثر مصرف بیس فنول (Bisphenol) افزایش یابد (۱۸). در مطالعه ای دیگری اثرات نانودرولون دکانات ($\text{Nandrlone decanoate}$) بر کلیه گزارش شد (۱۹). همچنین در گزارشی بیان شده است که نانوذرات نقره با ایجاد آسیب هاس کلیوی سبب تغییرات سطح متابولیت های سرمی می شود (۲۰).

در مطالعه حاضر به دلیل اهمیت نانو ذرات در علم داروسازی و ارزش کلیه جهت تنظیم بسیاری از فاکتورهای خونی و جوامع کنونی بر آن شدیم که اثر مولیدین تری اکسید را بر لوله های پیچیده دور و نزدیک کلیه با تکنیک استریولوژی که تاکنون مطالعه دقیقی در این زمینه انجام نشده است مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روشها

تری اکسید مولیدین پودر کریستالی سفید رنگ مایل به خاکستری و آبی کمرنگ به ابعاد ۱۳۰-۸۰ نانومتر که از کمپانی خراسان ایران (Khorasan Iran) با درجه خلوص ۹۹٪ تهیه و با سطح ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم استفاده شد. برای حل کردن نانو ذره از سرم فیزیولوژی استفاده شد. در ادامه تعداد ۳۰ سر موش صحرایی از نژاد ویستار به وزن ۱۸۰ تا ۲۵۰ از انستیتو پاستور تهیه و به اتاق حیوانات دانشکده پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی انتقال داده شد. حیوانات به مدت ۲ هفته در آزمایشگاه نگهداری شدند تا به شرایط محیطی عادت نمایند سپس آنها را وزن نموده و به طور تصادفی به ۵ گروه تقسیم و در

پیچیده نزدیک و دور در کلیه با استفاده از فریم شمارش و محاسبه گردید (۲۱). برای محاسبه مساحت سطح اپی تلیوم لوله-های کلیوی نیز از پروب خطی استفاده شد (۲۲).



شکل ۱. نحوه برش، گرید، فریم و پروب مورد استفاده در بررسی استریولوژیکی لوله‌های کلیه. الف: ساعت‌های مورد استفاده در روش ارینتیتور؛ ب: گرید نقطه‌ای برای تخمین استریولوژیکی حجم لوله‌ها؛ ج: فریم شمارش برای تخمین استریولوژیکی طول لوله‌ها؛ د: پروب خطی برای تخمین استریولوژیکی مساحت سطح اپی تلیوم لوله‌ها.

بررسی‌های سرمی نیز شامل سنجش میزان کراتینین، سدیم و پتاسیم در سرم اخذ شده از موش‌های گروه کنترل، کنترل شم و تجربی بود. در انتها پس از جمع‌آوری اطلاعات مورد نیاز داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS ورژن ۱۸ تجزیه و تحلیل شد. جهت مقایسه نتایج حاصل از گروه‌های کنترل و تجربی از آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA و تست TUKEY استفاده شد و معنی‌دار بودن اطلاعات با $p < 0.05$ بیان شد.

قفس‌های جداگانه جهت تیمار به مدت ۳۵ روز نگهداری شدند. آب و غذا آزادانه در اختیار حیوانات قرار گرفت. دمای اتاق 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی لحاظ شد. اصول اخلاقی کار با حیوانات نیز برابر نظر کمیته کار با حیوانات آزمایشگاهی (با کد اخلاق به‌شماره IR.IAU.PS.REC.1398.201) رعایت گردید. موش‌ها به‌طور تصادفی به ۵ گروه ۶ تایی تقسیم کردیم:

گروه اول (گروه کنترل): که هیچ دارویی دریافت نکردند.
گروه دوم (گروه شم): گروه دریافت‌کننده سرم فیزیولوژی به‌میزان ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن.
گروه سوم (گروه تجربی ۱): گروه دریافت‌کننده تری‌اکسید مولیبدن به‌میزان ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن.
گروه چهارم (گروه تجربی ۲): گروه دریافت‌کننده تری‌اکسید مولیبدن به‌میزان ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن.
گروه پنجم (گروه تجربی ۳): گروه دریافت‌کننده تری‌اکسید مولیبدن به‌میزان ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن.

حیوانات به‌مدت ۳۵ روز تیمار شدند. تمامی تجویزات به‌صورت تزریق داخلی صفاقی انجام گرفت. پس از پایان دوره تیمار، حیوانات توزین و پس از بیهوشی با کتامین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) جهت تعیین فراسنجه‌های سرمی مرتبط با کلیه خون‌گیری انجام گرفت. سپس محوطه شکمی آنها را باز نموده، کلیه راست اخذ و پس از شستشو با سرم فیزیولوژی با استفاده از ترازوی دیجیتالی توزین شد. سپس نمونه‌ها در محلول فرمالین ده درصد قرار داده شدند. پس از تثبیت نمونه‌ها، برش‌های سیستماتیک یکنواخت تصادفی از بافت کلیه تهیه شد. برای تهیه برش از بافت کلیه از روش اورینتیتور استفاده گردید (۲۱) (شکل ۱). سپس نمونه‌ها وارد مراحل پاساژ بافتی (آگیری شامل الکل‌های ۷۰٪، ۸۰٪، ۹۰٪، مطلق، شفاف سازی با استفاده از دو ظرف گزبلول و نهایتاً آغشتگی با پارافین در دو ظرف حاوی پارافین مذاب) شده و پس از تهیه بلوک‌های پارافینی، برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرومتر تهیه شد. برش‌های تهیه شده وارد مراحل رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین (H&E) شدند (۲۲). به منظور انجام استریولوژی، تصاویر از لام‌های بافتی با میکروسکوپ نوری مدل (Jenus CX40 ساخت کشور چین) متصل به دوربین میکروسکوپی (مدل Jenus Is1000 ساخت کشور چین) تهیه شد. تصاویر با استفاده از نرم افزار Image و پلگین‌های اختصاصی استریولوژی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. پس از محاسبه حجم کلی کلیه، فراسنجه‌های حجمی کلیه (شامل لوله-های پیچیده نزدیک و دور و اپی تلیوم لوله‌ها) با استفاده از گریدهای نقطه‌ای محاسبه گردید. همچنین طول لوله‌های

یافته‌ها

بررسی حجم اپی‌تلیوم لوله نزدیک گروه‌های کنترل، شم و گروه‌های تجربی برحسب سانتی‌متر مکعب نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها وجود ندارد. در حالی که بررسی فرکشن حجم اپی‌تلیوم لوله نزدیک نشان داد که گروه دریافت‌کننده نانو ذره تری‌اکسید مولیبدن با سطح ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن با سایر گروه‌ها دارای اختلاف معنی‌دار بود ($P < 0.05$). این در حالی بود که بین سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۱).

بررسی حجم اپی‌تلیوم لوله پیچیده دور گروه‌های کنترل، شم و گروه‌های تجربی برحسب سانتی‌متر مکعب نشان داد

که هر سه گروه دریافت‌کننده نانو ذره تری‌اکسید مولیبدن در مقایسه با یکدیگر فاقد اختلاف معنی‌دار، ولی در مقایسه با گروه کنترل و شم دارای اختلاف معنی‌دار بودند ($P < 0.05$). در حالی که بررسی فرکشن حجم اپی‌تلیوم لوله پیچیده دور نشان داد که گروه دریافت‌کننده با سطح ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن با سایر گروه‌ها دارای اختلاف معنی‌دار بود ($P < 0.05$). این در حالی بود که در مقایسه گروه کنترل و شم، و همچنین مقایسه دو گروه دریافت‌کننده سطح ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم با سطح ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانو ذره تری‌اکسید مولیبدن اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۱).

جدول ۱. نتایج حاصل از بررسی حجم اپی‌تلیوم لوله نزدیک و دور برحسب سانتی‌متر مکعب و فرکشن

حجم اپی‌تلیوم لوله دور (فرکشن)	حجم اپی‌تلیوم لوله دور (cm^3)	حجم اپی‌تلیوم لوله نزدیک (فرکشن)	حجم اپی‌تلیوم لوله نزدیک (cm^3)	
$3/0.317 \pm 0.5144^a$	0.0141 ± 0.0015^a	$70/6100 \pm 0.9730^a$	$0/3102 \pm 0.0307^a$	گروه کنترل
$3/1.050 \pm 0.742^a$	0.0150 ± 0.0016^a	$58/2483 \pm 19/1042^a$	$0/3168 \pm 0.1124^a$	گروه کنترل شم
$7/1983 \pm 1/8165^b$	0.0310 ± 0.0083^b	$60/4300 \pm 2/3428^{ab}$	$0/3240 \pm 0.0151^a$	گروه ۵۰ mg/kg
$5/3733 \pm 1/0130^b$	0.0373 ± 0.0154^b	$59/9367 \pm 8/1878^{ab}$	$0/3489 \pm 0.0795^a$	گروه ۱۰۰ mg/kg
$10/4900 \pm 1/3761^c$	0.0459 ± 0.0108^b	$56/5167 \pm 1/4549^b$	$0/2494 \pm 0.0675^a$	گروه ۲۰۰ mg/kg

حروف غیرمشابه نشان دهنده دارا بودن اختلاف معنی است ($P < 0.05$).

جدول ۲. نتایج حاصل از بررسی حجم لوله پیچیده نزدیک و دور برحسب سانتی‌متر مکعب و فرکشن

حجم لوله دور (فرکشن)	حجم لوله دور (cm^3)	حجم لوله نزدیک (فرکشن)	حجم لوله نزدیک (cm^3)	
$6/8767 \pm 0/4884^a$	$0/296 \pm 0.0035^a$	$89/5167 \pm 0/6057^a$	$0/3884 \pm 0.0369^a$	گروه کنترل
$7/1217 \pm 0/7193^a$	$0/302 \pm 0.0008^a$	$88/7767 \pm 0/5419^a$	$0/3900 \pm 0.0282^a$	گروه کنترل شم
$9/6533 \pm 1/2988^b$	0.0549 ± 0.0111^b	$86/2900 \pm 2/8189^{ab}$	$0/4761 \pm 0.0645^b$	گروه ۵۰ mg/kg
$12/5500 \pm 2/3779^c$	0.0655 ± 0.0140^{bc}	$82/8050 \pm 3/0677^b$	$0/4356 \pm 0.0347^{ab}$	گروه ۱۰۰ mg/kg
$17/8917 \pm 1/7358^d$	0.0806 ± 0.0270^c	$77/9500 \pm 2/2766^c$	$0/3366 \pm 0.0761^d$	گروه ۲۰۰ mg/kg

حروف غیرمشابه نشان دهنده دارا بودن اختلاف معنی است ($P < 0.05$).

جدول ۳. نتایج حاصل از بررسی ارتفاع اپی‌تلیوم لوله پیچیده نزدیک و دور (برحسب میکرومتر) و مساحت سطح لوله پیچیده نزدیک و دور (برحسب سانتی‌متر مربع)

ارتفاع اپی‌تلیوم لوله پیچیده نزدیک (μm)	ارتفاع اپی‌تلیوم لوله پیچیده دور (μm)	مساحت سطح لوله پیچیده نزدیک (cm^2)	مساحت سطح لوله پیچیده دور (cm^2)	
$25/8217 \pm 2/3581^a$	$13/9600 \pm 0/7455^a$	$121/56 \pm 14/1035^a$	$10/500 \pm 1/2844^a$	گروه کنترل
$25/9967 \pm 4/3128^a$	$14/4567 \pm 0/3341^a$	$113/25 \pm 31/9717^a$	$12/2717 \pm 1/2528^a$	گروه کنترل شم
$28/4386 \pm 3/0143^a$	$15/3517 \pm 3/3381^{ab}$	$126/36 \pm 35/6218^a$	$21/0050 \pm 8/8189^{ab}$	گروه ۵۰ mg/kg
$28/0600 \pm 2/0368^a$	$17/5283 \pm 3/9920^{ab}$	$114/66 \pm 14/7808^a$	$23/9900 \pm 1/7912^{ab}$	گروه ۱۰۰ mg/kg
$29/1300 \pm 1/0415^a$	$24/1817 \pm 11/3905^b$	$85/3467 \pm 23/9500^a$	$32/9667 \pm 22/8284^{bc}$	گروه ۲۰۰ mg/kg

حروف غیر مشابه نشان دهنده دارا بودن اختلاف معنی است ($P < 0.05$).

جدول ۴. نتایج حاصل از بررسی طول لوله پیچیده نزدیک و دور (برحسب متر)، حجم کلیه (برحسب سانتی متر مکعب) و طول کلیه (برحسب میلی متر)

طول لوله پیچیده نزدیک (m)	طول لوله پیچیده دور (m)	حجم کلیه (cm ³)	طول کلیه (mm)	
۲۳۱/۸۷ ± ۳۰/۲۴۱۳ ^a	۵۴/۸۹۱۷ ± ۸/۷۸۵۰ ^a	۰/۶۹۰۱ ± ۰/۰۴۵۶ ^a	۱۷/۶۶۷ ± ۰/۸۱۶۵ ^a	گروه کنترل
۲۲۶/۷۵ ± ۲۶/۶۶۶۳ ^a	۵۷/۰۰۰ ± ۴/۲۴۶۴ ^a	۰/۷۲۴۸ ± ۰/۰۴۱۵ ^a	۱۷/۶۹ ± ۱/۱۶۹ ^a	گروه کنترل شم
۲۱۱/۲۸ ± ۸/۸۵۱۴ ^{ab}	۵۹/۳۰۰ ± ۱۲/۵۷۹۲ ^a	۰/۸۷۷۸ ± ۰/۱۰۳۷ ^b	۱۷/۵۰ ± ۱/۰۴۸۸ ^a	گروه ۵۰ mg/kg
۱۷۹/۹۴ ± ۱۲/۰۷۰ ^b	۸۱/۲۵۱۷ ± ۱۰/۸۷۳۷ ^b	۰/۸۳۰۰ ± ۰/۰۷۰۶ ^{ab}	۱۹/۵۰ ± ۱/۳۷۸۴ ^b	گروه ۱۰۰ mg/kg
۱۹۵/۸۰ ± ۳۹/۱۸۷۳ ^{ab}	۹۳/۵۹۵۰ ± ۱۱/۳۰۹۷ ^b	۰/۶۳۴۸ ± ۰/۱۷۰ ^c	۱۹/۴۱۷ ± ۱/۲۰۰۷ ^b	گروه ۲۰۰ mg/kg

حروف غیر مشابه نشان دهنده دارا بودن اختلاف معنی است ($p < 0.05$).

جدول ۵: نتایج حاصل از بررسی میزان کراتینین، سدیم و پتاسیم سرمی

کراتینین (m mol/L)	سدیم (m mol/L)	پتاسیم (m mol/L)	
گروه کنترل	۰/۵۲ ± ۰/۰۹ ^a	۱۳۶/۲ ± ۱/۱۲ ^a	۵/۰۳ ± ۲/۳ ^a
گروه کنترل شم	۰/۵۹ ± ۰/۰۹ ^a	۱۳۶/۷۱ ± ۱/۱۷ ^a	۴/۹ ± ۲/۲ ^a
گروه ۵۰ mg/kg	۰/۸۵ ± ۰/۰۹ ^b	۱۳۸/۱ ± ۱/۲۴ ^a	۴/۵۷ ± ۲/۲ ^a
گروه ۱۰۰ mg/kg	۰/۹۱ ± ۰/۰۹ ^b	۱۳۷/۳ ± ۱/۹۱ ^a	۴/۶۵ ± ۲/۱۲ ^a
گروه ۲۰۰ mg/kg	۰/۸۵ ± ۰/۰۸ ^b	۱۳۹/۰ ± ۱/۵۳ ^a	۴/۷۹ ± ۱/۲ ^a

حروف غیرمشابه نشان دهنده دارا بودن اختلاف معنی است ($p < 0.05$).

دریافت کننده نانو ذره تری اکسید مولیبدن با سطح ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن با دو گروه دریافت کننده نانو ذره تری اکسید مولیبدن با سطوح ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن فاقد اختلاف معنی دار ولی در مقایسه با دو گروه کنترل و کنترل شم دارای اختلاف معنی دار بود ($p < 0.05$) (جدول ۳).

بررسی سطح لوله نزدیک گروه های کنترل، کنترل شم و گروه های تجربی برحسب سانتی متر مربع نشان داد که اختلاف معنی داری بین گروه ها وجود ندارد. در حالی که بررسی سطح لوله پیچیده دور برحسب سانتی متر مربع نشان داد که گروه دریافت کننده نانو ذره تری اکسید مولیبدن با سطح ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن با دو گروه دریافت کننده نانو ذره تری اکسید مولیبدن با سطوح ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن فاقد اختلاف معنی دار ولی در مقایسه با دو گروه کنترل و کنترل شم دارای اختلاف معنی دار بود ($p < 0.05$) (جدول ۳).

بررسی طول لوله پیچیده نزدیک گروه های کنترل، کنترل شم و گروه های تجربی برحسب متر نشان داد که گروه دریافت کننده سطح ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم از نانو ذره تری اکسید مولیبدن در مقایسه با دو گروه دیگر دریافت کننده این نانو ذره فاقد اختلاف معنی دار، اما در مقایسه با گروه های کنترل و کنترل شم دارای اختلاف معنی دار بود ($p < 0.05$) (جدول ۴). همچنین بررسی طول لوله پیچیده

بررسی حجم لوله نزدیک گروه های کنترل، کنترل شم و گروه های تجربی برحسب سانتی متر مکعب نشان داد که دو گروه دریافت کننده نانو ذره تری اکسید مولیبدن با سطح ۵۰ میلی گرم و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن با یکدیگر فاقد اختلاف معنی دار ولی با سایر گروه ها دارای اختلاف معنی دار بودند ($p < 0.05$). در حالی که بررسی فرکشن حجم لوله نزدیک نشان داد که گروه دریافت کننده نانو ذره تری اکسید مولیبدن با سطح ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن در مقایسه با سایر گروه ها دارای اختلاف معنی دار بود ($p < 0.05$) (جدول ۲).

بررسی حجم لوله پیچیده دور گروه های کنترل، شم و گروه های تجربی برحسب سانتی متر مکعب نشان داد که هر سه گروه دریافت کننده نانو ذره تری اکسید مولیبدن در مقایسه با یکدیگر فاقد اختلاف معنی دار، ولی در مقایسه با گروه کنترل و شم دارای اختلاف معنی دار بودند ($p < 0.05$). در حالی که بررسی فرکشن حجم لوله پیچیده دور نشان داد که هر سه گروه دریافت کننده نانو ذره تری اکسید مولیبدن در مقایسه با یکدیگر و سایر گروه ها دارای اختلاف معنی دار بودند ($p < 0.05$) (جدول ۲).

بررسی ارتفاع اپی تلیوم لوله نزدیک گروه های کنترل، کنترل شم و گروه های تجربی برحسب میکرومتر نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار بین گروه ها بود. در حالی که بررسی ارتفاع اپی تلیوم لوله پیچیده دور نشان داد که گروه

دور در گروه های کنترل، کنترل شم و گروه های تجربی برحسب متر نشان داد که دو گروه دریافت کننده سطوح ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم از نانو ذره تری اکسید مولیبدین در مقایسه با یکدیگر فاقد اختلاف معنی دار، اما در مقایسه با سایر گروه ها دارای اختلاف معنی دار بود ($p < 0.05$) (جدول ۴).

بررسی حجم کلیه در گروه های کنترل، کنترل شم و گروه های تجربی برحسب سانتی متر مکعب نشان داد که گروه دریافت کننده نانو ذره تری اکسید مولیبدین با سطح ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن با سایر گروه ها دارای اختلاف معنی دار است ($p < 0.05$). همچنین گروه دریافت کننده نانو ذره تری اکسید مولیبدین با سطح ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم فقط با گروه دریافت کننده نانو ذره تری اکسید مولیبدین با سطح ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم فاقد اختلاف معنی دار، اما در مقایسه با سایر گروه ها دارای اختلاف معنی دار بود ($p < 0.05$) (جدول ۴). نهایتاً بررسی طول کلیه برحسب میلی متر نشان داد که دو گروه دریافت کننده نانو ذره تری اکسید مولیبدین با سطوح ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن با یکدیگر فاقد اختلاف معنی دار ولی در مقایسه با سایر گروه ها دارای اختلاف معنی دار بود ($p < 0.05$) (جدول ۴).

در بررسی میزان کراتینین سرمی در گروه های کنترل، کنترل شم و تجربی، هر سه گروه دریافت کننده نانو ذره تری اکسید مولیبدین (با سطوح ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) نسب به گروه کنترل و کنترل شم دارای افزایش معنی دار بودند ($p < 0.05$). این در حالی بود که مقایسه مابین سه گروه دریافت کننده نانو ذره تری اکسید مولیبدین اختلاف معنی داری را نشان نداد. این در حالی بود که در بررسی میزان سدیم و پتاسیم سرمی در گروه های کنترل، کنترل شم و تجربی، اختلاف معنی داری مشاهده نشد (جدول ۵).

بحث

نانو ذرات رایج ترین عناصر در علم و فناوری نانو بوده و خواص جالب توجه آنها باعث شده که کاربردهای بسیار متنوعی در صنایع شیمیایی، پزشکی، دارویی، الکترونیک، صنایع فضایی و کشاورزی داشته باشند. علیرغم اثرات سودمند نانو ذرات برخی از محققین به اثرات سوء تماس با این مواد اشاره کرده اند (۲۷-۲۳). این ذرات در زمینه تحویل داروهای هوشمند نقش مهمی را ایفا می کنند، زیرا می توانند عوامل درمانی را مستقیماً

به محل مورد نظر انتقال دهند. علی رغم اینکه این ذرات می توانند در سلول تجمع یابند، ولی مطالعات مختلف نشان داده است که قطر نانو ذرات در میزان تأثیرگذاری بر بیمار اهمیت دارد چنانکه ذراتی با قطر تقریبی ۷۵ نانومتر می تواند کلیه را مورد هدف قرار دهند (۲۸). در مطالعه حاضر اثر نانو ذرات تری اکسید مولیبدین بر کلیه به کمک تکنیک استریولوژی که ساختار سه بعدی را بهتر از نتایج پارامترهای دو بعدی قابل بررسی می نماید مورد مطالعه قرار گرفت.

در مطالعه ای که روی اثر پارا نونیل فنول بر روی کلیه با تکنیک استریولوژی انجام گرفت، نشان داده شد که در گروه دریافت کننده پارا نونایل فنل طول لوله پیچیده دور نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری را نشان داد، همچنین طول لوله پیچیده نزدیک در گروه دریافت کننده پارا نونیل فنول نسبت به کنترل کاهش داشت (۱۷). این مطلب بیانگر این موضوع است که طول لوله های پیچیده نزدیک و دور در نفرون ها بسیار حساس و تحت تأثیر مواد سمی مانند پارا نونیل فنول هستند. در مطالعه حاضر نیز طول لوله پیچیده دور در گروه های دریافت کننده تری اکسید مولیبدین نسبت به گروه کنترل و شم افزایش نشان داد که این افزایش در گروه های دریافت کننده تری اکسید مولیبدین با سطوح بیشتر معنی دار بود. این تغییر در طول لوله پیچیده نزدیک در گروه های دریافت کننده تری اکسید مولیبدین کاهش نشان داد که این کاهش در سطح ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم معنی دار بود. تغییر به صورت افزایش در طول لوله پیچیده دور و کاهش در طول لوله پیچیده نزدیک می تواند نشان از تفاوت در گیرنده های سلول های اپی تللیال تشکیل دهنده لوله پیچیده نزدیک و دور باشد.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که شاید افزایش طول لوله پیچیده دور تحت تأثیر نانو ذرات تری اکسید مولیبدین به دلیل آماس سلول های تشکیل دهنده لوله پیچیده دور باشد. دلیل اثبات این مطلب افزایش معنی دار ارتفاع سلول های اپی تللیال تشکیل دهنده لوله پیچیده دور در گروه های دریافت کننده تری اکسید مولیبدین است و حجم اپیتلیوم لوله پیچیده دور که در گروه های دریافت کننده سطح بیشتر افزایش معنی داری را نسبت به گروه کنترل و شم نشان می دهد (۱۷). در تأیید این مطلب می توان به افزایش حجم لوله پیچیده دور در گروه های دریافت کننده تری اکسید مولیبدین اشاره کرد که در گروه های دریافت کننده با سطح بیشتر نیز افزایش حجم نسبت به گروه کنترل و شم معنی دار بود.

همچنین فرکشن حجم لوله پیچیده دور نیز افزایش معنی داری را خصوصاً در گروه های دریافت کننده سطح بالاتر نیز

تری اکسید مولیبدن واکنش زیادی از نظر تغییر حجم نشان ندادند با توجه به اینکه بازجذب اصلی در سلول‌های این لوله انجام می‌شود یعنی بیش از نیمی از آب و الکترولیت‌ها به-همراه تمام مواد مغذی آلی مانند اسید آمینه و گلوکز و ویتامین که از پلاسما تصفیه شده بودند بطور طبیعی در لوله پیچیده نزدیک بازجذب می‌شوند که می‌تواند این بازجذب به-صورت فعال یا غیرفعال صورت گیرد، ولی نتایج نشان داد که تغییرات لوله پیچیده نزدیک نسبت به تری اکسید مولیبدن خیلی محسوس نیست.

مطالعه‌ای که با استفاده از روش استریولوژی بر روی کلیه موش‌های ماده انجام گرفت نشان داد استفاده از ناندروژن دکانات در به میزان ۳ میلی گرم بر کیلوگرم، حجم لوله پیچیده نزدیک و دور، وزن و حجم کلیه این حیوانات افزایش معنی‌داری در گروه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل نشان داد. ولی طول این لوله‌ها افزایش حاصل نکرد این نتایج نشان از هیپرتروفی لوله‌های پیچیده نزدیک و دور دارد (۱۹).

اثرات مختلف آندروژن توسط تراکم گیرنده‌های آندروژن و آنزیم کنترل‌کننده متابولیسم استروئید با اثر بر روی ارگان‌های مختلف منجمله کلیه (۳۱، ۳۲) موجب تحریک گیرنده‌های آندروژن که در سطح سلول‌های لوله پیچیده نزدیک قرار داده شده و تحریک رشد سلول که شامل هیپرتروفی هیپرپلازی می‌باشد را موجب شده‌اند و موجب افزایش حجم لوله‌های پیچیده نزدیک شده است (۸، ۳۳). همین تفسیر را می‌توان برای علل افزایش حجم لوله پیچیده دور در تحقیق حاضر در نظر گرفت. در تحقیق حاضر نیز افزایش طول و حجم و مساحت لوله پیچیده دور می‌تواند دال بر این مطلب باشد که شاید تری اکسید مولیبدن توانسته بر لوله‌های پیچیده دور اثر کرده و رسپتورهای آن را جهت مقابله با این ماده سمی فعال کرده و هیپرتروفی این لوله را موجب شده که به دنبال آن افزایش حجم در سلول‌های اپیتلیالی تشکیل‌دهنده این لوله‌ها و همچنین افزایش حجم و افزایش مساحت سطح این لوله‌ها را موجب شده است. در مورد افزایش حجم لوله‌های پیچیده نزدیک همانطور که اشاره شد تفاوت معنی‌داری در گروه‌های دریافت‌کننده تری اکسید مولیبدن نسبت به کنترل مشاهده نگردید.

در مطالعه‌ای که توسط گروهی از محققین بر روی نانوذرات نقره انجام گرفت نشان داده که این ذرات با تجمع در بافت کلیه سبب آماس سلول‌های کلیوی و آسیب بافتی می‌شود؛ که این آسیب دلیل افزایش کراتینین در دریافت‌کننده‌های نانو ذرات نقره است (۳۴). در تحقیق حاضر نیز افزایش در میزان

نشان دهنده تأیید مطلب فوق در ارتباط با افزایش مساحت سطح لوله پیچیده دور در گروه‌های دریافت‌کننده تری اکسید مولیبدن نسبت به گروه کنترل و شم باید اشاره کرد. لوله پیچیده دور در بازجذب مواد نقش دارد ولی نقش آن نسبت به لوله پیچیده نزدیک کمتر است، بنابراین آماس این سلول‌ها موجب اثر در عملکرد آن‌ها می‌شود و بازجذب آن‌ها را نسبت به گروه کنترل کاهش خواهد داد زیرا در اندام‌های بدن تغییر در ساختار موجب تغییر در عملکرد آن‌ها خواهد شد؛ بنابراین می‌توان گفت نانو ذرات بر روی لوله‌های پیچیده دور بی‌تفاوت عمل نکرده و روی ساختار و عملکرد آن‌ها موثر خواهند بود. در این ارتباط گزارشات نشان داده‌اند که حجم اپیتلیوم لوله پیچیده دور در مصرف مواد آلاینده محیط‌زیست کاهش یافته و با مصرف آنتی‌اکسیدان‌ها حجم آن‌ها نسبت به گروه کنترل تفاوت کمتری را نشان می‌دهد (۱۷). مطالعات نشان می‌دهد که بیس‌فنول باعث نکرز سلول‌های اپیتلیال لوله‌های ادراری در کلیه می‌شود (۱۸). که شاید بتوان تغییر حجم کلیه در مطالعه حاضر را به تغییرات حاصل از نکرز مرتبط دانست. همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داده شده که اتساع در لومن لوله پیچیده نزدیک و دور می‌تواند در اثر مواد مختلف حاصل شود. در گزارشات دیگری نیز اتساع لوله پیچیده دور گزارش شده که با نتایج تحقیقات فوق هم راستا است (۲۹، ۳۰).

مطالعه‌ای که توسط گروهی از محققین بر روی کلیه انجام گرفت نشان داد که سلول‌های لوله‌های پیچیده دور و نزدیک در کلیه دارای گیرنده‌هایی هستند که نسبت به برخی از مواد که فرمول مشابهی دارند روی گیرنده‌ها اثر گذاشته و موجب عکس‌العمل آن‌ها می‌شوند و ممکن است حتی اثر بعضی از مواد بر روی سلول‌های اپیتلیالی لوله‌ها منجر به تکثیر سلول‌های آن‌ها شود (۱۴). در ارتباط با تحقیقی که اثر بیس‌فنول را روی لوله‌های پیچیده دور با تکنیک استریولوژیک انجام گرفت نشان داد که در گروه‌های دریافت‌کننده بیس‌فنول افزایش معنی‌داری در حجم لوله‌های پیچیده دور حاصل می‌شود (۱۸). در مطالعه حاضر طول لوله پیچیده نزدیک اختلاف معنی‌داری نشان نداد. همچنین ارتفاع سلول‌های اپیتلیالی لوله پیچیده نزدیک نیز تغییر معنی‌دار نداشت. حجم اپیتلیوم سلول‌های تشکیل‌دهنده لوله پیچیده نزدیک نیز تغییرات معنی‌داری نسبت به کنترل و شم نشان نداد ولی حجم لوله پیچیده نزدیک در دریافت‌کننده‌های با سطح بالاتر تری اکسید مولیبدن کاهش معنی‌داری نشان داد. بنابراین در مطالعه اخیر نتایج نشان داد که گیرنده‌های لوله پیچیده نزدیک نسبت به

کراتینین در دریافت کننده های اکسید مولیبدن مشاهده گردید که با تحقیق فوق هم راستا بود. در مطالعه دیگری مصرف خوراکی نانو ذرات نقره و اثرات آن در سطوح سرمی سدیم و پتاسیم بررسی و گزارش گردید که این ذرات اثر سمی بر روی سدیم و پتاسیم دارند (۳۵). همچنین مطالعه دیگری نشان داد که ذرات نقره باعث افزایش نفوذپذیری غشای سلول ها نسبت به سدیم و پتاسیم و مختل شدن فعالیت پمپ سدیم-پتاسیم و میتوکندری ها می شود. این اختلالات باعث تغییر در سطوح سدیم و پتاسیم سرم خون می شود (۳۶). گزارشات نشان می دهد که نانو ذرات نقره موجب اختلال در فعالیت سدیم پتاسیم آتی ساز و احتباس پتاسیم در داخل سلول شده و نهایتاً باعث تغییر در سطوح سدیم و پتاسیم می شود (۳۷). در تحقیق حاضر تغییر معنی داری در میزان سدیم و پتاسیم در گروه های دریافت کننده تری اکسید مولیبدن مشاهده نشد. مطالعه میانگین میزان سدیم در سرم خون حیوانات دریافت کننده تری اکسید مولیبدن در مقایسه با گروه کنترل تغییرات محسوس را نشان نداد که می تواند دلیل دیگری بر تأثیر کم این نانو ذرات بر سلول های اپی تلیالی دیواره لوله پیچیده نزدیک و حجم آنها باشد.

نانو ذرات تری اکسید مولیبدن می توانند موجب افزایش حجم و طول و مساحت لوله های پیچیده دور شده، ولی بر لوله پیچیده نزدیک تأثیر ساختاری محسوس ندارد. بنابراین به دلیل اهمیت کلیه در دفع مواد زاید از مصرف بی رویه میکروپ کش- های حاوی تری اکسید مولیبدن جدا باید خودداری نمود. به- دلیل مصرف گسترده نانو ذرات در سطوح مختلف زندگی انسان و اثرات نامطلوب مصرف مداوم آنها مطالعه در مورد اثر نانو ذرات مختلف بر اندام های مختلف بدن خصوصاً با تکنیک استریولوژی که از نظر کمی تأثیر ماده را بر اندام ها بخوبی نشان می دهد را ضروری می سازد.

تشکر و قدردانی

هزینه این تحقیق توسط معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تأمین شده است. نویسندگان این مقاله کمال تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی به خاطر حمایت های مالی اعلام می دارند.

REFERENCES

1. Choi CHJ, Zuckerman JE, Webster P, Davis ME. Targeting kidney mesangium by nanoparticles of defined size. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 6656-61.
2. Hester RL, Brown AJ, Husband L, Iliescu R, Pruett D, Summers R, Coleman TG. HumMod: a modeling environment for the simulation of integrative human physiology. *Front Physiol* 2011; 13: 12.
3. Smith PL, Buffington DA, Humes HD. Kidney epithelial cells. *Methods Enzymol* 2006; 419: 194-207.
4. Illyaskutty N, Sreedhar S, Kumar GS, Kohler H, Schwotzer M, Natzeck C, Pillai VM. Alteration of architecture of MoO₃ nanostructures on arbitrary substrates: growth kinetics, spectroscopic and gas sensing properties. *Nanoscale* 2014; 6: 13882-94.
5. Krishnamoorthy K, Veerapandian M, Yun K, Kim SJ. New function of molybdenum trioxide nanoplates: toxicity towards pathogenic bacteria through membrane stress. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2013; 112: 521-4.
6. Kaiser BN, Gridley KL, Ngair Brady J, Phillips T, Tyerman SD. The role of molybdenum in agricultural plant production. *Ann Bot* 2005; 96: 745-54.
7. Hosokawa S, Yoshida O. Clinical studies on molybdenum in patients requiring long-term hemodialysis. *ASAIO J* 1994; 40: M445-9.
8. Czerwinski F. Current Trends in Automotive Lightweighting Strategies and Materials. *Materials* 2021; 14: 6631.
9. Pourali P, Yahyaei B. Biological production of silver nanoparticles by soil isolated bacteria and preliminary study of their cytotoxicity and cutaneous wound healing efficiency in rat. *J Trace Elem Med Biol* 2016; 34: 22-31.
10. Hong TK, Tripathy N, Son HJ, Ha KT, Jeong HS, Hahn YB. A comprehensive in vitro and in vivo study of ZnO nanoparticles toxicity. *J Mater Chem B* 2013; 1: 2985-92.
11. Yan G, Huang Y, Bu Q, Lv L, Deng P, Zhou J, et al. Zinc oxide nanoparticles cause nephrotoxicity and kidney metabolism alterations in rats. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 2012; 47: 577-88.
12. Barbier O, Jacquillet G, Tauc M, Poujeol P, Cougnon M. Acute study of interaction among cadmium, calcium, and zinc transport along the rat nephron in vivo. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 287: F1067-F75.
13. Reed RB, Ladner DA, Higgins CP, Westerhoff P, Ranville JF. Solubility of nano-zinc oxide in environmentally and biologically important matrices. *Environ Toxicol Chem* 2012; 31: 93-99.

14. Concolino G, Lubrano C, Ombres M, Santonati A, Flammia G, Di Silverio F. Acquired cystic kidney disease: the hormonal hypothesis. *Urology* 1993; 41: 170-5.
15. Gaucher G, Poreba M, Ravenelle F, Leroux JC. Poly (N-vinylpyrrolidone)-block-poly (D, L-lactide) as polymeric emulsifier for the preparation of biodegradable nanoparticles. *J Pharm Sci* 2007; 96: 1763-75.
16. Sadeghinezhad J, Nyengaard JR. Cat Kidney Glomeruli and Tubules Evaluated by Design-Based Stereology. *Anat Rec (Hoboken)* 2019; 302: 1846-54.
17. Mehranjani MS, Noorafshan A, Momeni HR, Abnosi MH, Mahmoodi M, Anvari M, Hoseini SM. Stereological study of the effects of vitamin E on testis structure in rats treated with para-nonylphenol. *Asian J Androl* 2009; 11: 508-16.
18. Mohebbati R, Shafei MN, Beheshti F, Soukhtanloo M, Roshan NM, Anaigoudari A et al. Mixed hydroalcoholic extracts of *Nigella sativa* and *Curcuma longa* improves adriamycin-induced renal injury in rat. *Saudi J Kidney Dis Transplant* 2017; 28: 1270.
19. Patanè FG, Liberto A, Maria Maglitta AN, Malandrino P, Esposito M, Amico F, et al. Nandrolone decanoate: use, abuse and side effects. *Medicina* 2020; 56: 606.
20. Adeyemi OS, Adewumi I, Faniyan TO. Silver nanoparticles influenced rat serum metabolites and tissue morphology. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2015; 26: 355-61.
21. Howell K, Hopkins N, McLoughlin P. Combined confocal microscopy and stereology: a highly efficient and unbiased approach to quantitative structural measurement in tissues. *Exp Physiol* 2002; 87: 747-56.
22. Nyengaard JR. Stereologic methods and their application in kidney research. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 1100-23.
23. Hyvönen S, Peltonen L, Karjalainen M, Hirvonen J. Effect of nanoprecipitation on the physicochemical properties of low molecular weight poly (L-lactic acid) nanoparticles loaded with salbutamol sulphate and beclomethasone dipropionate. *Int J Pharm* 2005; 295: 269-81.
24. Mallikarjuna K, Narasimha G, Dillip GR, Praveen B, Shreedhar B, Lakshmi CS, et al. Green synthesis of silver nanoparticles using *Ocimum* leaf extract and their characterization. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. 2011; 6: 181-6.
25. Vimbela GV, Ngo SM, Frazee C, Yang L, Stout DA. Antibacterial properties and toxicity from metallic nanomaterials. *Int J Nanomed* 2017; 12: 3941.
26. Dwivedi AD, Gopal K. Plant-mediated biosynthesis of silver and gold nanoparticles. *J Biomed Nanotechnol* 2011; 7: 163-4.
27. Narayanan KB, Sakthivel N. Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototrophic and heterotrophic eukaryotes and biocompatible agents. *Adv Colloid Interface Sci* 2011; 169: 59-79.
28. Zhang X, Yan S, Tyagi R, Surampalli R. Synthesis of nanoparticles by microorganisms and their application in enhancing microbiological reaction rates. *Chemosphere* 2011; 82: 489-94.
29. Xia X, Hu Z, Marquez M. Physically bonded nanoparticle networks: a novel drug delivery system. *J Control Release* 2005; 103 :21-30.
30. Gules O, Yildiz M, Naseer Z, Tatar M. Effects of folic acid on testicular toxicity induced by bisphenol-A in male Wistar rats. *Biotech Histochem* 2019; 94: 26-35.
31. Tyl R, Myers C, Marr M, Thomas B, Keimowitz A, Brine D, et al. Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci* 2002; 68: 121-46.
32. Berger FG, Watson G. Androgen-regulated gene expression. *Ann Rev Physiol* 1989; 51: 51-65.
33. Wilson JD, Griffin JE. The use and misuse of androgens. *Metabolism* 1980; 29: 1278-95.
34. Sung JH, Ji JH, Park JD, Yoon JU, Kim DS, Jeon KS, et al. Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles. *Toxicol Sci* 2009; 108: 452-61.
35. Takahashi N, Boysen G, Li FY, Li Y, Swenberg JA. Tandem mass spectrometry measurements of creatinine in mouse plasma and urine for determining glomerular filtration rate. *Kidney Int* 2007; 71: 266-71.
36. He M, Ichinose T, Yoshida S, Ito T, He C, Yoshida Y, Arashidani K, Takano H, Sun G, Shibamoto T. PM_{2.5}-induced lung inflammation in mice: Differences of inflammatory response in macrophages and type II alveolar cells. *J Appl Toxicol* 2017; 37: 1203-18.
37. Kone BC, Kaleta M, Gullans SR. Silver ion (Ag⁺)-induced increases in cell membrane K⁺ and Na⁺ permeability in the renal proximal tubule: reversal by thiol reagents. *The Journal of membrane biology* 1988; 102: 11-9.