[DOI: 10.32598/hms.25.4.270]
Downloaded from hms.gmu.ac.ir at 13:44 +0330 on Monday January 13th 2020

بررسی اثرات سمیّت و تراتوژنیک نانوذرات سولفیدِ روی بر جنین جوجه و کشت سلول‌های فیبروبلاستی جوجه

*اسداله اسدی[۱]، آرش عبدالملکی[۲،۳]

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.
۲. گروه علوم مهندسی، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه محقق اردبیلی، نمین، ایران.
۳. گروه علوم مهندسی، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه فناوری‌های نوین سبلان، نمین، ایران.

تاریخ دریافت: ۰۷ بهمن ۱۳۹۷
تاریخ پذیرش: ۰۱ مرداد ۱۳۹۸
تاریخ انتشار: ۰۹ مهر ۱۳۹۸

چکیده

اهداف نانوذرات (ذرات با قطر ۱۰ تا ۵۰۰ نانومتر) در حال حاضر در صنعت آرایشی و بهداشتی همچنین برای دارورسانی، تصویربرداری تشخیصی و مهندسی بافت استفاده می‌شوند. از آنجا که این نانوذرات در صنعت و دارورسانی استفاده می‌شود، امکان استفاده از آن‌ها توسط مادران باردار نیز وجود دارد. از این رو، هدف این مطالعه بررسی اثرات ناهنجاری‌زایی و سیتوتوکسیسیتی نانوذرات سولفید روی در سطح جنین جوجه و کشت سلول‌های فیبروبلاستی جنینی است.

مواد و روش‌ها در این مطالعه نانوذرات سولفید روی سنتز شدند. سپس ترکیب حاصل در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر / تخم مرغ، در سه تکرار و در روز سوم انکوباسیون جنین مرغ، درون کیسه هوا تزریق شد. سپس تخم مرغ‌های تیمارشده و شاهد، در روز ۱۹ انکوباسیون، باز و جنین‌ها توزین شدند. سپس میزان مرگ‌ومیر آن‌ها ثبت شد. سلول‌های فیبروبلاستی از جنین شاهد جداسازی، کشت و تیمار و تغییرات مورفولوژیک و درصد بقای سلول‌ها ثبت شدند.

یافته‌ها نتایج نشان داد میزان درصد بقای جنین‌ها بستگی به غلظت نانوذارت دارد؛ به طوری که در بالاترین غلظت تنها ۳۶/۳۲ درصد از جنین‌ها زنده ماندند و میزان(LD_{50}) دُز کشنده در ۵۰ درصد جمعیت برابر با ۳۲/۴۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر / تخم‌مرغ برآورد شد. از نظر شکل ظاهری، ناهنجاری از نوع پاچنگی و از نظر ناهنجاری‌های اسکلتی، حذف مهره‌های دمی مشاهده شد. نتایج بررسی سایتوتوکسیسیتی نانوذرات سولفید روی بر سلول‌های فیبروبلاستی جنین نشانگر کسر زنده‌مانی ۸۸/۴۵، ۶۸/۷۵ و ۴۹/۳۲ درصد بود و میزان IC_{50} آن برابر با ۱۴۶۰ میکرومولار محاسبه شد.

نتیجه‌گیری یافته‌های حاصل نشان داد در غلظت‌های پایین، نانوذرات سولفید روی، اثرات سمی قابل توجهی بر جنین و کشت سلول‌های فیبروبلاستی جوجه ندارد.

کلیدواژه‌ها:
نانوذرات ، سمیت، ناهنجاری‌زایی، جنین جوجه، سولفید روی

مقدمه

حوزه فناوری نانو به‌سرعت در حال رشد است و تخمین زده شده است در آینده ۱۲ تریلیون دلار سرمایه‌گذاری در فناوری نانو در سراسر جهان وجود خواهد داشت [۱]. نانوذرات (ذرات با قطر ۱۰ تا ۵۰۰ نانومتر) در حال حاضر در حوزه‌ها و صنایع مختلف از جمله آرایشی و بهداشتی همچنین برای دارورسانی، تصویربرداری تشخیصی و مهندسی بافت استفاده می‌شود. با افزایش تنوع، تعداد و کاربرد نانوذرات و درنتیجه افزایش قرارگرفتن انسان در معرض این ترکیبات نیاز فزاینده به بررسی اثرات زیان‌آور آن‌ها وجود دارد [۲].

خطر ذاتی نانوذرات، تولیدشان و همچنین قرارگرفتن در معرض آن‌هاست. مطالعات انجام‌شده روی برهمکنش نانوذرات با جنین در حال تکوین، به لحاظ کاربردی و سم‌شناسی اهمیت ویژه‌ای دارد. قرارگرفتن جنین در معرض دُزهای مختلف نانوذرات حتی ممکن است روی خصوصیات تراتولوژی و حتی زنده‌ماندن جنین‌ها تأثیر بگذارد. در بدن یک جنین جوجه به عنوان مدل تکوین جانوری، نانوذرات از راه‌های مختلفی می‌توانند سبب مسمومیت سلولی و جنینی شوند که شایع‌ترین آن‌ها تخریب غشاء، آزادسازی مواد سمی و پاسخ‌های ایمونولوژیک است [۳، ۴].

نانوذرات در حال حاضر از طیف وسیعی از مواد ساخته می‌شوند. معمول‌ترین آن‌ها نانوذرات سرامیکی است که به دو

* نویسنده مسئول:
دکتر اسداله اسدی
نشانی: اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی.
تلفن: ۳۱۵۰۵۱۸۷ (۴۵) ۹۸+
پست الکترونیکی: asad.asady@gmail.com

www.SID.ir

[DOI: 10.32598/hms.25.4.270]
Downloaded from hms.gmu.ac.ir at 13:44 +0330 on Monday January 13th 2020

بخش سرامیک‌های اکسید فلزی نظیراکسیدهای تیتانیوم، روی، آلومینیوم و آهن و نانوذرات سیلیکاتی (سیلیکات‌ها یا اکسیدهای سیلیکون نیز سرامیک هستند) تقسیم می‌شوند. در این میان نانوذرات روی در مصارف پزشکی، داروسازی و آرایشی استفاده می‌شوند و همچنین استفاده از آن‌ها در روش فتوکاتالیز[1] برای پاک‌سازی هوا و تصفیه آب و فاضلاب که تشکیل یک‌سری فرایندهایی به نام فناوری‌های اکسیداسیون پیشرفته[2] می‌دهند بیشتر از همه مورد توجه قرار گرفته است [۵].

از دیدگاه سم‌شناسی عوامل مختلفی در موجودات زنده به عنوان عوامل ناهنجاری‌زا در دوران جنینی محسوب می‌شوند. بزرگ‌ترین دسته عوامل ناهنجاری‌زا شامل مواد شیمیایی و داروها هستند. در برخی موارد حتی ماده‌ای که در متابولیسم طبیعی درگیر است، اگر به میزان زیاد و در زمان‌های خاص و مهم دوران جنینی حضور داشته باشد، می‌تواند اثرات مخربی به بار آورد. علاوه بر مواد شیمیایی طبیعی، صدها ترکیب مصنوعی جدید نیز هر ساله وارد جامعه صنعتی می‌شود که ممکن است اثرات زیان‌آوری روی جنین داشته باشد. مصرف بیش از ۵۰ هزار ترکیب مصنوعی مرسوم و رایج است و هر ساله نیز بین ۲۰۰ تا ۵۰۰ ترکیب جدید ساخته می‌شود [۶].

اگرچه ترکیبات ناهنجاری‌زا همیشه با ما هستند، ولی با ورود ترکیبات آزمایش‌نشده به محیط اطراف ما، خطر ابتلا به این ناهنجاری‌ها هر روز بیشتر و بیشتر می‌شود؛ زیرا اکثر مواد شیمیایی صنعتی و همچنین برخی امواج الکترومغناطیسی از نظر اثرات ناهنجاری‌زایی آزمایش و غربالگری نشده‌اند [۷]. اسدی و همکاران در پژوهشی اثرات نانوپلیمر BDP18 را به عنوان حامل با قدرت رهش دارویی آهسته که در درمان سرطان مورد استفاده می‌شود بر جنین جوجه ارزیابی کردند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد BDP18 اثرات سمی و تراتوژنیک کمی را فقط در دُزهای بالا دارد، از این رو می‌توان از آن در غلظت‌های پایین به عنوان یک سیستم رهش دارویی مؤثر استفاده کرد [۸].

در پژوهش دیگری اثرات سمیت و فیزیولوژیک نانوذرات پلاتین که به طور گسترده در درمان استفاده می‌شود بر روند رشد و نمو جنین جوجه بررسی شده است. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد این نانوذرات سبب القای آپوپتوز در سلول‌های عصبی می‌شود [۹].

جنین جوجه یکی از مدل‌های آزمایشگاهی جانوری مناسب است که محققان رشته‌های مختلف از جمله جنین‌شناسی، فارماکولوژی، فیزیولوژی و بیوشیمی از آن استفاده می‌کنند. دلیل این امر راحتی تهیه آن به هر تعداد و کوتاهی طول دوران جنینی آن است. همچنین مراحل عمومی و طبیعی در تکوین اسکلت جنین جوجه نه‌تنها در مطالعات جنین‌شناسی تجربی و تراتولوژیک به عنوان نمونه کنترل استفاده می‌شود، بلکه جهت مقایسه در بدشکلی‌های اسکلتی ناشی از موتانت‌ها نیز می‌تواند استفاده شود [۱۰]. جنین پرندگان از نظر ساختار، عملکرد فیزیولوژیکی و مراحل عمومی تکوین، شباهت فراوانی به جنین پستانداران دارد، از این رو، از آن برای مطالعه روند تکوین پستانداران استفاده می‌شود. علاوه بر این، جنین جوجه را می‌توان به‌راحتی کشت داد. مزایای مذکور راه را برای بسیاری از تحقیقات که نیاز به میکروجراحی دارند و همچنین بررسی تأثیر مواد شیمیایی و دارویی روی جنین همواره کرده است [۱۱، ۱۲].

در مورد اثرات نانوذرات بر سلول‌ها و جنین، اطلاعات بسیار محدودی در دسترس است. نانوذرات دارای خواص شیمیایی و فیزیکی منحصر به فردی هستند که اخیراً در پژوهش‌های درمانی مورد توجه زیادی قرار گرفته است، با این حال اطلاعات ما درباره سمیت و تأثیر آن بر سلامت عمومی کم است؛ از این رو بررسی اثرات نانوذرات بر جنین اهمیت بالایی دارد. با توجه به اینکه نانوذرات سولفید روی به طور گسترده در داروسازی و سنتز مواد آرایشی همچنین در تصفیه آب و فاضلاب استفاده می‌شوند، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات ناهنجاری‌زایی و سیتوتوکسیسیتی نانوذرات سولفید روی در سطح جنین جوجه و کشت سلول‌های فیبروبلاستی جنینی است.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع تجربی است که در آزمایشگاه تحقیقاتی گروه زیست‌شناسی دانشگاه محقق اردبیلی و با حمایت گروه زیست‌شناسی دانشگاه محقق اردبیلی انجام شده است.

تهیه نانوذرات سولفید روی با استفاده از امواج ریزموج

برای تهیه نانوذرات سولفید روی، ابتدا در یک بشر ۰/۰۲ مول استات روی دوآبه در ۲۲۵ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر، تحت همزدن ملایم حل شد، سپس ۰/۰۲ مول تیواستامید را در بشر دیگری در ۲۲۵ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر حل شد و پس از انحلال کامل، قطره‌قطره به محلول اولیه تهیه‌شده اضافه شد. برای اطمینان از کامل‌شدن واکنش، محلول ۳۰ دقیقه تحت همزدن شدید قرار گرفت. سپس محلول ۱۵ دقیقه درون دستگاه ریزموج با توان ۵۵۰ وات، قرار گرفت. محلول شیری‌رنگ به‌دست‌آمده را تحت سانتریفیوژ قرار داده شد تا رسوبات حاصل جدا شود. سپس رسوبات به‌دست‌آمده، سه بار با آب و اتانول شست‌وشو شد و در انتها به منظور خشک‌کردن، رسوبات ۲۴ ساعت در دمای ۶۰°C در داخل آون قرار داده شد [۱۳].

تیمار جنین جوجه

۹۰ تخم مرغ بارور نژاد راس از شرکت محلی (آرتا جوجه)

1. Photocatalysis
2. Advanced Oxidation Technologies (AOTs)

www.SID.ir

[DOI: 10.32598/hms.25.4.270]
Downloaded from hms.gmu.ac.ir at 13:44 +0330 on Monday January 13th 2020

خریداری شد. تخم مرغ‌ها در شرایط دمایی مناسب ۱۰ تا ۱۲ درجه سلسیوس نگهداری شدند. برای بررسی فعالیت بیولوژیکی نانوذرات سولفید روی[3] در آب مقطر دو بار تقطیرشده، حل شد و سپس در روز سوم گرماگذاری، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول‌های نانوذرات سولفید روی در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر / تخم مرغ و با استفاده از سرنگ هامیلتون به داخل کیسه هوا تزریق شد. تزریق در شرایط استریل و از قسمت قاعده پهن تخم مرغ به درون کیسه هوا صورت گرفت و بلافاصله محل تزریق توسط پارافین مذاب بسته شد و تخم مرغ‌ها در دمای ۳۷/۷ تا ۳۸ درجه سانتی‌گراد و در رطوبت ۶۵ درصد گرماگذاری شدند.

به عنوان شاهد از تعداد تکرار یکسان تخم مرغ با تزریق ۱۰۰ میکرولیتر آب‌مقطر دو بار تقطیر شده استفاده شد. جهت بررسی و کنترل آلودگی باکتریایی و قارچی تعدادی تخم مرغ اضافی گرماگذاری شد که به طور تصادفی انتخاب شدند و آلودگی آن‌ها بررسی شد. جهت کنترل رشد جنینی در طول انکوباسیون، به طور متوسط چهار بار کندلینگ انجام گرفت. در این پژوهش برای هر غلظت به طور متوسط سه گروه پنج‌تایی انتخاب شد

بررسی سمیّت و تراتوژنیک

تخم مرغ‌های تیمارشده و شاهد، در روز ۱۹ انکوباسیون، باز و جنین‌های حاصل توزین شدند. سپس میزان مرگ‌ومیر آن‌ها ثبت با فرمول شماره ۱ محاسبه شد [۱۴].

۱.

$$\text{درصد مرگ‌ومیر} = \frac{\text{درصد مرگ‌ومیر شاهد- درصد مرگ‌ومیر تیمار}}{\text{درصد مرگ‌ومیر شاهد- ۱۰۰}} \times ۱۰۰$$

به منظور بررسی ناهنجاری‌های مورفولوژیکی، جنین‌ها پس از بیرون‌آمدن از تخم، از نظر هرگونه ناهنجاری ظاهری قابل تشخیص معرفی‌شده توسط رومانوف[4] در کتاب «پاتوژنز و ناهنجاری‌شناسی جنین پرندگان» بررسی و نوع ناهنجارهای ظاهری قابل تشخیص با چشم در مقایسه با گروه کنترل ثبت شد. جهت بررسی ناهنجاری‌های اسکلتی جنین، روش سریع شفاف‌سازی و رنگ‌آمیزی نمونه‌ها برای نشان‌دادن استخوان توسط گرین و همکارانش استفاده شد؛ به طور خلاصه در این روش ابتدا پوست جنین جدا و محتویات شکمی تخلیه شد و سه روز در محلول دو درصد هیدروکسید پتاسیم[5] قرار گرفتند. سپس، جنین‌ها در محلول یک درصد هیدروکسید پتاسیم حاوی آلیزارین قرمز (۰/۱ درصد) به مدت سه روز رنگ‌آمیزی شدند. شفاف‌سازی نهایی با قراردادن جنین در گلیسرول (۱۰۰ درصد) انجام شد. سپس از نمونه‌ها تصویر تهیه شد و از نظر ناهنجاری‌های اسکلتی با نمونه‌های کنترل مقایسه شد و ناهنجاری‌های ایجادشده ثبت شد [۱۵].

جداسازی و کشت سلول‌های فیبروبلاستی جوجه

جهت جداسازی سلول‌های فیبروبلاستی، جنین‌ها در روز دهم گرماگذاری از تخم خارج شده و در شرایط استریل، سر و محتویات شکمی آن‌ها جدا شدند و باقی‌مانده جنین درون PBS[6] حاوی آنتی‌بیوتیک قرار گرفت و به قطعات کوچکی تقسیم شد سپس پنج دقیقه ظرف حاوی محلول آنزیمی تریپسین و تکه‌های بافت جنین روی همزن مغناطیسی قرار گرفت. در ادامه به ظرف محیط کشت حاوی سرم گاوی اضافه شد، سوسپانسیون به‌دست‌آمده سانتریفیوژ شد و به محیط کشت تازه (RPMI[7]) همراه با آنتی‌بیوتیک منتقل و در فلاسک‌های T75 کشت شد. سپس در پاساژ سوم درون پلیت‌های ۲۴خانه کشت شد [۱۴].

بررسی سمیت سلولی

برای بررسی اثرات سایتوتوکسیسیتی نانوذره سولفید روی، از ارزیابی MTT[8] که روشی برای بررسی قابلیت زنده‌مانی سلول‌ها و تعیین سمیت سلولی ترکیبات مورداستفاده در محیط کشت است استفاده شد. MTT نمک تترازولیوم محلول در آب است که با شکست حلقه تترازولیوم با آنزیم سوکسینات دهیدروژناز در داخل میتوکندری به فورمازان بنفش غیرمحلول تبدیل می‌شود. این تغییر رنگ با استفاده از روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۴۰ نانومتر قابل اندازه‌گیری است. اولین گام در انجام این تست، کشت سلول‌ها در داخل فلاسک‌های کشت ۹۶خانه‌ای است. ۲۴ ساعت پس از کشت سلول‌ها، زمانی که سلول‌ها از نظر تعداد برای اثردادن ترکیب موردنظر آماده شدند، غلظت‌های ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکرومولار به مدت ۱۶ ساعت روی سلول‌ها اثر داده می‌شدند. سپس ظروف کشت ۹۶خانه‌ای در داخل انکوباتور قرار داده شد و در مقاطع زمانی خاص پس از تیمار موردنظر، هرکدام از ظرف‌های کشت از داخل انکوباتور خارج و به هریک از خانه‌های آن‌ها در شرایط استریل، بدون خارج‌کردن محیط کشت، ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT تازه تهیه‌شده اضافه شد. سپس ظرف کشت چهار ساعت داخل انکوباتور قرار داده شد. در پایان این دوره زمانی، محیط کشت کلیه خانه‌های ظرف کشت، خارج و در هرکدام از آن‌ها ۲۰۰ میکرولیتر از DMSO[9] اضافه شد. همان‌طور که می‌دانیم DMSO بلورهای فورمازان بنفش‌رنگ را در داخل خود حل می‌کند و به حالت محلول درمی‌آورد. با

3. Zinc Sulfide (ZnS)
4. Romanoff
5. Potassium Hydroxide (KOH)
6. Phosphate buffered saline
7. Roswell park memorial institute medium
8. (4,5-dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
9. Dimethylsulfoxide

www.SID.ir

[DOI: 10.32598/hms.25.4.270]
Downloaded from hms.gmu.ac.ir at 13:44 +0330 on Monday January 13th 2020

حل‌شدن کامل بلورها و ایجاد محلول‌های یکنواخت، جذب نوری هرکدام از خانه‌ها با استفاده از دستگاه Elisa reader خوانده شد و میزان درصد زنده‌مانی سلول از رابطه شاهد OD / تیمار OD محاسبه شد [۱۴].

تحلیل آماری

طرح آزمایش از نوع طرح کاملاً تصادفی است. برای تحلیل داده‌ها از نسخه ۱۶ نرم‌افزار SPSS، برای تحلیل واریانس از تحلیل واریانس یک‌طرفه[10]، جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن[11] و برای محاسبه LD_{50} از ارزیابی پروبیت[12] استفاده شد. سطح معنی‌داری ($P<0/05$) به عنوان مرز استنتاج آماری قرار داده شد.

یافته‌ها

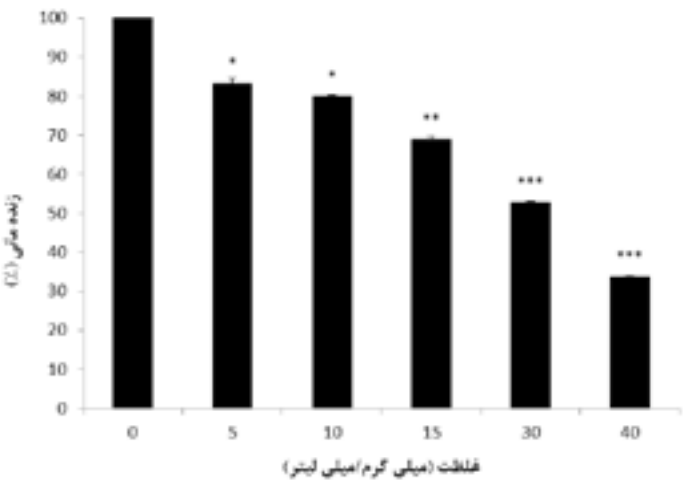
سه گروه آزمایشی پنج‌عددی و درمجموع ۱۵ تخم مرغ برای هر غلظت و یک گروه شم ۱۵عددی به ازای هر غلظت تزریقی نانوذرات به تخم مرغ‌ها، از نظر کسر بقای جنین مطالعه شدند. یافته‌ها نشان داد در تیمار تخم مرغ‌ها با غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر / تخم مرغ به ترتیب ۸۳/۳۴، ۸۰، ۶۸/۹، ۵۲/۸۵ و ۳۳/۷۵ درصد در روز نوزدهم زنده مانده‌اند. بررسی رابطه خطی بین غلظت تیمار و درصد جنین‌های زنده‌مانده بیانگر LD_{50} برابر ۳۲/۴۷ میلی‌گرم / تخم مرغ بود. بررسی آماری داده‌ها نشان داد اختلاف بین گروه کنترل و هریک از غلظت‌های موردبررسی در سطح ۵ درصد معنی‌دار است. همچنین مقایسه اختلاف بین غلظت‌های تیمار نیز در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود. به عبارتی دیگر، افزایش مرگ‌ومیر نسبت به افزایش غلظت نانوذرات سولفید روی در سطح پنج درصد معنی‌دار است (تصویر شماره ۱).

بررسی ریخت‌شناسی ظاهری جنین‌ها نشانگر ناهنجاری‌های محدودی در نمونه‌های تیمار بود؛ به طوری که تا غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر/تخم مرغ هیچ‌گونه ناهنجاری‌ای مشاهده نشد. با افزایش غلظت تیمار ناهنجاری از نوع پاهای چنگکی با درصد کمی در نمونه‌ها مشاهده شد (جدول شماره ۱ و تصویر شماره ۲). همچنین هیچ‌گونه تغییرات وزنی معنی‌داری در جنین‌های تیمارشده با نانوذرات سولفید روی در مقایسه با گروه شم مشاهده نشد.

بررسی ساختار اسکلتی جنین‌های تحت تیمار نشان داد تا غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر / تخم مرغ هیچ‌گونه ناهنجاری‌ای مشاهده نشد و با افزایش غلظت، ناهنجاری از نوع حذف مهره‌های دمی مشاهده شد (جدول شماره ۱ و تصویر شماره ۳).

مطالعه تأثیر غلظت‌های ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکرومولار ZnS روی سلول‌های فیبروبلاستی جنین جوجه پس از ۱۶ ساعت، به ترتیب نشانگر کسر زنده‌مانی ۸۸/۴۵، ۶۸/۷۵ و ۴۹/۳۲ درصد بود. این ترکیب با دُز کشنده، ۵۰ درصد سلول‌ها (IC_{50}) برابر ۱۴۶۰ میکرومولار رشد سلولی را مهار می‌کند. نتایج حاصل از مطالعات مورفولوژیک سلول‌های تیمارشده نشان داد با افزایش غلظت نانوذرات سولفید روی در سلول‌های فیبروبلاستی اتصالات بین‌سلولی گسسته می‌شود، سلول‌ها گرد و حاشیه آن‌ها نامنظم می‌شوند. همچنین در سلول‌های تیمارشده، گرانول‌های سیتوپلاسمی افزایش‌یافته و در غلظت ۱۵۰۰ میکرومولار سلول‌ها کاملاً متراکم شده و توده متراکم سلولی به‌تدریج گسسته می‌شود (تصویر شماره ۴).

10. ANOVA
11. Duncan
12. Probit



افق دانش

تصویر ۱. اثرات غلظت‌های مختلف نانوذرات سولفید روی (۱۰ تا ۴۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر / تخم مرغ) بر زنده‌مانی جنین‌های جوجه. در هر غلظت ۱۵ جنین بررسی شده است که در مقایسه با گروه کنترل معنادار است.

$^{*}P<0/05$، $^{**}P<0/01$ و $^{***}P<0/001$

www.SID.ir

[DOI: 10.32598/hms.25.4.270]
Downloaded from hms.gmu.ac.ir at 13:44 +0330 on Monday January 13th 2020

جدول ۱. ناهنجاری‌های مربوط به غلظت‌های مختلف نانوذرات سولفید روی، بر جنین جوجه

غلظت میکرومولار / تخم مرغ	درصد ناهنجاری مورفولوژیکی	نوع ناهنجاری	درصد ناهنجاری اسکلتی	نوع ناهنجاری
۰	تشخیص داده نشد	–	تشخیص داده نشد	–
۵	تشخیص داده نشد	–	تشخیص داده نشد	–
۱۰	تشخیص داده نشد	–	تشخیص داده نشد	–
۱۵	تشخیص داده نشد	–	تشخیص داده نشد	–
۳۰	۵/۸۸	پاهای چنگکی	۶/۲۵	حذف مهره‌های دمی
۴۰	۱۳/۳۳	پاهای چنگکی	۵/۸۸	حذف مهره‌های دمی

افق دانش

بحث

مطالعه حاضر نشان داد تزریق نانوذرات سولفید روی در روز سوم انکوباسیون به تخم مرغ‌های نطفه‌دار سبب کاهش در بیرون‌آمدن جوجه‌ها و تأخیر در بیرون‌آمدن آن‌ها و همچنین با افزایش غلظت، سبب افزایش مرگ‌ومیر جنین‌ها می‌شود. در غلظت‌های بالای ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر / تخم مرغ، نانوذرات سولفید روی چون زنده‌مانی جنین‌ها را به‌شدت تحت تأثیر قرار می‌دهد نمی‌توان این غلظت‌ها را از نظر تراتوژنیکی بررسی کرد، اما در غلظت‌های پایین‌تر از آستانه، هیچ‌گونه اثرات ناهنجاری‌زایی و سمیت وابسته به دُزی مشاهده نشد. مطالعات نشان داده‌اند مرگ‌ومیر جنین‌ها پس از تزریق درون تخم می‌تواند به علت تخریب و به‌هم‌خوردن تعادل هوموستازی جنینی به علت تزریق مواد باشد و همچنین حساسیت جنین‌ها به مرحله رشد و نمو آن‌ها وابسته است [۱۵، ۱۶]. بسیاری از محققین اثر تراتوژنیک آنتی‌بیوتیک‌ها و عوامل رشد را وقتی که در طول هفته اول جنینی درون تخم تزریق می‌شوند اثبات کرده‌اند [۱۷، ۱۸]. در چند دهه گذشته، انواعی از نانوذرات ساخته شده‌اند و به عنوان عوامل ایجادکننده کنتراست در امور تشخیص و تصویربرداری و دارورسانی استفاده شده‌اند [۱۹].

تأثیر ترکیب نانوذرات سولفید روی بر جنین جوجه به ایجاد ناهنجاری اسکلتی از نوع حذف مهره‌های دمی منجر شد که می‌تواند ناشی از تأثیر مستقیم ترکیب بر مرگ سلول‌های جنینی در حال رشد در مهره دمی باشد. در این راستا بررسی

تصویر ۲. ناهنجاری مورفولوژیکی

الف: از نوع پای چنگکی در غلظت ۴۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر/ تخم مرغ؛ ب: در مقایسه با نمونه جوجه سالم حاصل از جنین شاهد

افق دانش

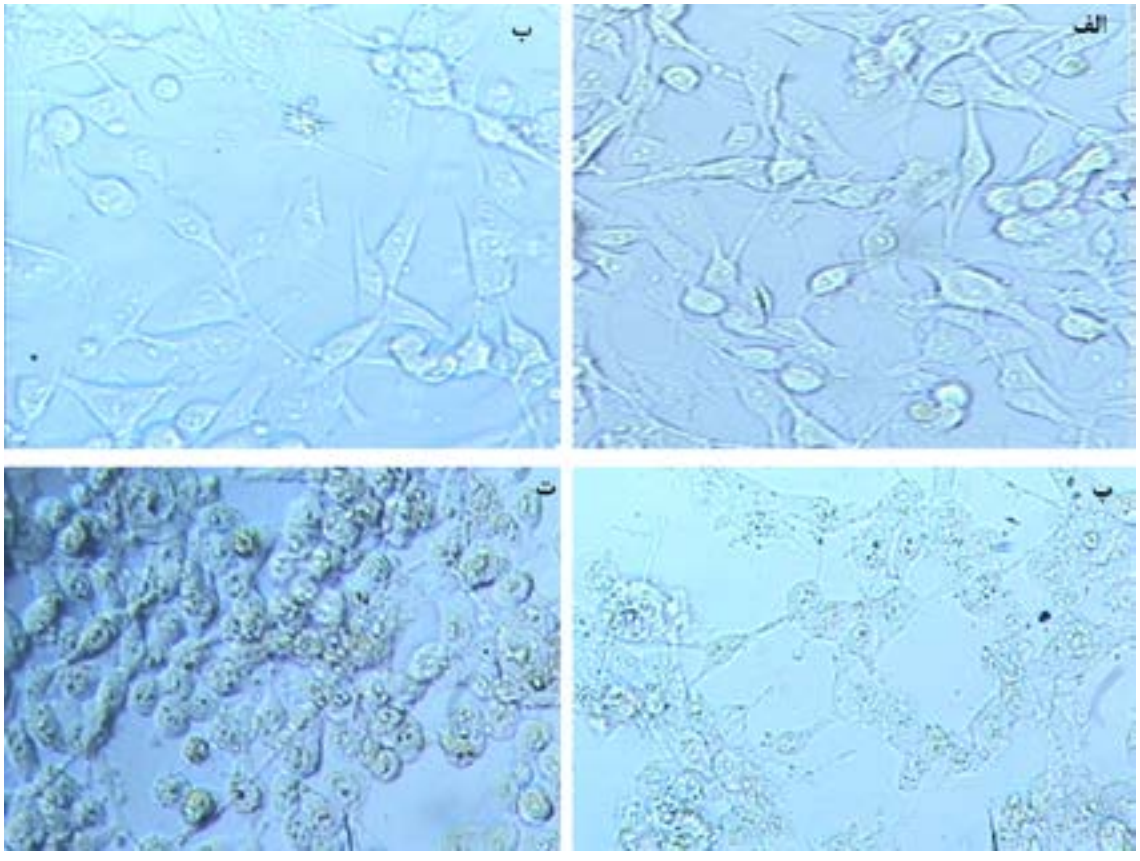
www.SID.ir

[DOI: 10.32598/hms.25.4.270]
Downloaded from hms.gmu.ac.ir at 13:44 +0330 on Monday January 13th 2020

افق دانش

تصویر ۳. ناهنجاری اسکلتی

الف: ناشی از غلظت ۴۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر / تخم مرغ به صورت حذف مهره‌های دمی؛ ب: در مقایسه با نمونه جوجه سالم حاصل از جنین شاهد



افق دانش

تصویر ۴. تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات سولفید روی در سلول‌های فیبروبلاستی استخراج‌شده از جنین جوجه پس از تیمار ۱۶ساعته

سلول‌های فیبروبلاستی شاهد، غلظت صفر: الف، تیمار با غلظت ۵۰۰ میکرومولار؛ ب: تیمار با غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار؛ پ: تیمار با غلظت ۱۵۰۰ میکرومولار؛ ت: سولفید روی

www.SID.ir

[DOI: 10.32598/hms.25.4.270]
Downloaded from hms.gmu.ac.ir at 13:44 +0330 on Monday January 13th 2020

اثر داروی متاتورکسات در موش‌های صحرایی نشان داد بیشتر ناهنجاری‌های ایجادشده در رت‌ها به دنبال تزریق متاتورکسات محدود به مهره‌های دمی است [۲۰]. بررسی یافته‌های قبلی نشان می‌دهد استخوان‌های اندام‌های انتهایی تحت تأثیر مواد تراتوژن، بیشتر دچار نقص می‌شوند [۲۱]. بارنس و همکارانش در سال ۱۹۹۶ نشان دادند اسید والپوریک از میزان رونویسی Pax1 در سومایت‌های جوجه می‌کاهد. این کاهش موجب ایجاد ناهنجاری در سومایت‌ها و ناهنجاری‌های مشابه در مهره‌ها و دنده‌ها می‌شود [۲۲].

استودنیکا و همکارانش در سال ۲۰۰۹ اثرات نانوذرات آلیاژ نقره‌پالادیوم بر رشد و نمو جنین جوجه را بررسی کردند و نشان دادند این نانوذرات بر رشد و نمو جنین تأثیر ندارند و همچنین هیچ تأثیری بر وزن جنین‌های جوجه ندارند [۲۳]. همچنین ناهنجاری مورفولوژیکی مشهود مشاهده‌شده، تحت تأثیر نانوذرات سولفید روی پاچنگکی بود که این ناهنجاری می‌تواند به علت وجود ترکیباتی باشد که خاصیت تقلیدگری کولین دارند. علت این نوع ناهنجاری تحلیل و عدم تکامل بافت ماهیچه‌ای است که در نتیجه رقابت با استیل کولین برای متصل‌شدن به گیرنده‌های استیل کولین روی می‌دهد [۲۴، ۲۵].

تمام غلظت‌های عامل ناهنجاری‌زا نمی‌تواند منشأ تولید ناهنجاری جنینی باشد، زمانی که غلظت عامل ناهنجاری‌زا بیشتر از غلظت آستانه شود، علائم سمیت ظاهر می‌شود [۲۶، ۲۷]. در این پژوهش آستانه تأثیر نانوذرات سولفید روی ۳۲/۴۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر / تخم مرغ بود. در پژوهش دیگری اثرات تراتوژنیک کمپلکس سالن وانادیوم اکساید بر جنین جوجه و کشت سلول‌های کبدی و فیبروبلاستی حاصل از آن ارزیابی شد؛ نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد در غلظت‌های بالا در محیط کشت اتصالات بین‌سلولی، سلول‌های فیبروبلاستی گسسته شده و حاشیه سلول‌ها نامنظم می‌شوند. همچنین تراکم سیتوپلاسمی درون سلول افزایش یافته و سلول‌ها واکوئله می‌شود [۲۸].

باوانیلاتا و همکارانش اثرات نانوذرات نقره را روی جنین جوجه ارزیابی کردند و پس از تزریق نانوذرات به تخم مرغ‌های نطفه‌دار در روز ۱۸ انکوباسیون پس از بیرون‌آوردن جوجه‌ها بافت‌های قلب، چشم و کبد ارزیابی بافتی شد؛ نتایج حاصل از این پژوهش هیچ‌گونه تغییراتی در سلول‌های بافت قلب و بافت چشم و بافت کبد نشان نداد [۲۹].

نتیجه‌گیری

آستانه تأثیر نانوذرات سولفید روی در این مطالعه ۳۲/۴۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر / تخم مرغ بود که در دُزهای پایین‌تر از آستانه، اثرات چندانی بر جنین نداشت و همچنین هیچ اثر تراتوژنی از نظر مورفولوژیکی و اسکلتی در دُزهای پایین‌تر از آستانه مشاهده نشد. از این رو، هنگام استفاده از نانوذرات سولفید روی درصنایع مختلف همچون داروسازی، به عنوان حامل دارویی یا در تهیه محصولات آرایشی و بهداشتی و سایر کاربردهای آن در صنایع مشابه میزان آستانه آن جهت ایجاد توکسیتی جنین و ایجاد ناهنجاری در جنین باید مورد توجه قرار گیرد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

انجام کلیه آزمایش‌ها در آزمایشگاه زیست‌شناسی دانشگاه محقق اردبیلی مطابق دستورالعمل اخلاقی موجود درباره کار با حیوانات آزمایشگاهی و با کد اخلاقی شماره ۱۳۲۵ انجام شد. همچنین تلاش شد از تعداد حیوانات کمتری استفاده شود.

حامی مالی

دانشگاه محقق اردبیلی از این پژوهش حمایت مالی کرده است.

مشارکت نویسندگان

پژوهشگر اصلی، روش‌شناس و نگارنده مقاله: اسداله اسدی (۵۰ درصد)؛ پژوهشگر کمکی، نگارنده مقاله و تحلیلگر داده‌ها: آرش عبدالملکی (۵۰ درصد).

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی تقدیر و تشکر می‌شود.

www.SID.ir

[DOI: 10.32598/hms.25.4.270]
Downloaded from hms.gmu.ac.ir at 13:44 +0330 on Monday January 13th 2020

References

[1] Hullmann A. Measuring and assessing the development of nanotechnology. Scientometrics. 2007; 70(3):739-58. [DOI:10.1007/s11192-007-0310-6]

[2] Jones MG, Blonder R, Gardner GE, Albe V, Falvo M, Chevrier J. Nanotechnology and nanoscale science: Educational challenges. International Journal of Science Education. 2013; 35(9):1490-512. [DOI:10.1080/09500693.2013.771828]

[3] Hardman R. A toxicologic review of quantum dots: Toxicity depends on physicochemical and environmental factors. Environmental Health Perspectives. 2005; 114(2):165-72. [DOI:10.1289/ehp.8284] [PMID] [PMCID]

[4] Wallace WE, Keane MJ, Murray DK, Chisholm WP, Maynard AD, Ong TM. Phospholipid lung surfactant and nanoparticle surface toxicity: Lessons from diesel soots and silicate dusts. In: Maynard AD, Pui DYH, editors. Nanotechnology and Occupational Health. Berlin: Springer; 2006. [DOI:10.1007/978-1-4020-5859-2_4]

[5] Hu H, Wang X, Liu F, Wang J, Xu C. Rapid microwave-assisted synthesis of graphene nanosheets-zinc sulfide nanocomposites: Optical and photocatalytic properties. Synthetic Metals. 2011; 161(5):404-10. [DOI:10.1016/j.synthmet.2010.12.018]

[6] Janzen FJ, Paukstis GL. Environmental sex determination in reptiles: Ecology, evolution, and experimental design. The Quarterly Review of Biology. 1991; 66(2):149-79. [DOI:10.1086/417143]

[7] Abdolmaleki A, Sanginabadi F, Rajabi A, Saberi R. The effect of electromagnetic waves exposure on blood parameters. International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research. 2012; 66(2):131-34.

[8] Asadi A, Abdolmaleki A, Najafi F. [Study of teratogenic and cytotoxic effects of bdp18 tri-block copolymer (PLA-pEG2000-pLA) on chicken embryos (Persian)]. Journal of Ardabil University of Medical Sciences. 2013; 13(1):16-23.

[9] Prasek M, Sawosz E, Jaworski S. Influence of nanoparticles of platinum on chicken embryo development and brain morphology. Nanoscale Research Letters. 2013; 8(1):251-9. [DOI:10.1186/1556-276X-8-251] [PMID] [PMCID]

[10] Petrovová E, Sedmera D, Misek I, Lesnik F, Luptáková L. Bendiocarbamate toxicity in the chick embryo. Folia Biologica. 2009; 55(2):61-6.

[11] Zahri S, Bezaatpour A, Abdolmaleki A. [Teratogenic and cytotoxic effects of Salen, A current ligand in vanadium complexes (Persian)]. Journal of Molecular and Cellular Research. 2014; 27(3):367-76.

[12] Männer J, Seidl W, Heinicke F, Hesse H. Teratogenic effects of suramin on the chick embryo. Anatomy and Embryology. 2003; 206(3):229-37. [DOI:10.1007/s00429-002-0292-3] [PMID]

[13] Wu X, Li K, Wang H. Facile synthesis of ZnS nanostructured spheres and their photocatalytic properties. Journal of Alloys and Compounds. 2009; 487(1-2):537-44. [DOI:10.1016/j.jallcom.2009.08.010]

[14] Abdolmaleki A, Zahri S. Comparison of toxicity and teratogenic effects of salen and vo-salen on chicken embryo. Drug and Chemical Toxicology. 2016; 39(3):344-9. [DOI:10.3109/01480545.2015.1121492] [PMID]

[15] Green MC. A rapid method for clearing and staining specimens for the demonstration of bone. The Ohio Journal of Science. 1952; 52(1):31-8.

[16] Bruggeman V, Swennen Q, De Ketelaere B, Onagbesan O, Tona K, Decuypere E. Embryonic exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in chickens: Effects of dose and embryonic stage on hatchability and growth. Comparative Biochemistry and Physiology Part C. 2003; 136(1):17-28. [DOI:10.1016/S1532-0456(03)00168-6]

[17] Roelens SA, Beck V, Maervoet J, Aerts G, Reyns GE, Schepens P, et al. The dioxin-like PCB 77 but not the ortho-substituted PCB 153 interferes with chicken embryo thyroid hormone homeostasis and delays hatching. General and Comparative Endocrinology. 2005; 143(1):1-9. [DOI:10.1016/j.ygcen.2005.02.015] [PMID]

[18] Van der Geyten S, Van den Eynde I, Segers IB, Kühn ER, Darras VM. Differential expression of iodothyronine deiodinases in chicken tissues during the last week of embryonic development. General and Comparative Endocrinology. 2002; 128(1):65-73. [DOI:10.1016/S0016-6480(02)00065-5]

[19] Panariti A, Miserocchi G, Rivolta I. The effect of nanoparticle uptake on cellular behavior: Disrupting or enabling functions? Nanotechnology, Science and Applications. 2012; 5:87-100. [DOI:10.2147/NSA.S25515] [PMID] [PMCID]

[20] Skalko RG, Gold MP. Teratogenicity of methotrexate in mice. Teratology. 1974; 9(2):159-63. [DOI:10.1002/tera.1420090206] [PMID]

[21] Singh J, Singh S. Skeletal malformations induced by mitomycin C in chick embryos. Acta Orthopaedica. 1976; 47(5):509-14. [DOI:10.3109/17453677608988729] [PMID]

[22] Gilbert SF, Epel D. Ecological developmental biology: Integrating epigenetics, medicine, and evolution. Swarthmore: Swarthmore Colledge; 2009.

[23] Studnicka A, Sawosz E, Grodzik M, Chwalibog A, Balcerak M. Influence of nanoparticles of silver/palladium alloy on chicken embryos' development. Annals of Warsaw University of Life Sciences. 2009; 46:237-42.

[24] Forsyth C, Frank A, Watrous B, Bohn A. Effect of coniine on the developing chick embryo. Teratology. 1994; 49(4):306-10. [DOI:10.1002/tera.1420490410] [PMID]

[25] Landauer W. Cholinomimetic teratogens: Studies with chicken embryos. Teratology. 1975; 12(2):125-45. [DOI:10.1002/tera.1420120206] [PMID]

[26] Magras I, Kotsaki-Kovatsi V, Kovatsis A, Adamidou L. Teratogenic effects of a mixture of scopolamine and hyoscyamine in chick embryos. Veterinary and Human Toxicology Journal. 1993; 35(5):434-5.

[27] Kumar K, Devi K. Teratogenic effects of methyl parathion in developing chick embryos. Veterinary and Human Toxicology Journal. 1992; 34(5):408-10. [PMID]

[28] Abdolmaleki A, Zahri S, Bezaatpour A. [Teratogenic and cytotoxic effects of VO salen complex on chicken embryos, hepatic and fibroblastic- cell cultures (Persian)]. Tehran University of Medical Sciences. 2013; 71(1):7-14.

[29] Muthiah B, Stanley S. In vivo toxicity assessment of silver nanoparticles synthesized from marine sponges (Haliclona implexiformis). Journal of Pharmacy Research. 2010; 3(10):2552-4.

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.32598/hms.25.4.270]

Downloaded from hms.gmu.ac.ir at 13:44 +0330 on Monday January 13th 2020

www.SID.ir