نشریه علوم درمانگاهی دامپزشکی ایران؛ ۱۴۰۳؛ ۱۸(۱): ۶۱-۷۰.
http://doi.org/10.22034/IJVCS.2024.14429.1050

بررسی اثرات نانوزئولیت در روش تزریق داخل تخم‌مرغی بر سمیت رویان و ناهنجاری‌های مادرزادی جوجه مرغ: نگرشی به آسیب‌شناسی بافتی و ایمونوهیستوشیمی

محمد رسول امینی[1*]، مرضیه حجازی[2]

۱. رزیدنت بهداشت و بیماری های طیور، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۲. گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز- ایران.

دریافت: ۳۰ خردادماه ۱۴۰۲ **پذیرش:** ۳ بهمن‌ماه ۱۴۰۲

چکیده

زئولیت‌ها ساختارهای کریستالی آلومینوسیلیکات هستند که ساختار متخلخل داشته و قادر به جذب و آزادسازی مواد هستند. در دامپزشکی از زئولیت‌ها به عنوان افزودنی غذای حیوانات، تصفیه آمونیاک استخر ماهی، کنترل بو و رطوبت حیوانات خانگی، جذب مایکوتوکسین‌ها و کاهش پاتوژن‌های روده استفاده می‌گردد. این تحقیق به منظور بررسی ضایعات هیستوپاتولوژیک احتمالی زئولیت‌ها در کبد و کلیه جوجه مرغ طراحی شده است. ۸۰ عدد تخم مرغ نطفه دار از مرغ نژاد رأس ۳۰۸ تهیه و به طور تصادفی به ۴ گروه ۲۰ تایی (یک گروه کنترل و سه گروه آزمایش) تقسیم شدند. در گروه کنترل به میزان ۰/۳ میلی لیتر سرم فیزیولوژی تزریق و در گروه‌های آزمایش به ترتیب ۰/۳ میلی لیتر از محلول نانوزئولیت (۵، ۱۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) به کیسه هوایی تخم مرغ تزریق شد. سپس تخم مرغ‌ها در دستگاه هچری قرار داده شدند و در پایان روز ۲۰ انکوباسیون، از جنین‌ها نمونه کبد و کلیه گرفته شد. نتایج هیستوپاتولوژیک کلیه، گروه دریافت‌کننده نانوذره زئولیت با دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم از نظر علایم پاتولوژیک با بقیه گروه ها اختلاف معنی‌دار داشت ($P<۰/۰۵$). نشان داده شد که غلظت‌های مختلف نانوذرات زئولیت بر روی بافت کبد جنین اثر گذاشته و تغییرات پاتولوژیک بافت کبد با افزایش دوز بیشتر شد ($P<۰/۰۵$). در بررسی ایمنوهیستوشیمی میان گروه‌های تیمار با نانوذرات زئولیت و گروه کنترل اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$). نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده بیش از حد از نانوذرات زئولیت در صنایع مختلف ممکن است در طولانی مدت اثرات زیان‌باری را بر جوجه گوشتی داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: نانوزئولیت، جنین جوجه، ناهنجاری‌های مادرزادی، آسیب‌شناسی بافتی، ایمونوهیستوشیمی

مقدمه

استفاده از نانوذرات موجب افزایش تأثیرگذاری در غلظت‌های پایین‌تر ماده می‌گردد که می‌توان از ویژگی‌های آن در زمینه‌هایی نظیر کنترل بیماری‌ها، تغذیه و کاهش اثرات زیست محیطی و فعالیت‌های مرتبط با پرورش دام، طیور و آبزی پروری بهره برد (۲۸). ترکیب شیمیایی، سایز نانوذره، شکل، تغییرات سطحی و درجه آگلومراسیون بر میزان تجمع زیستی نانومواد و نوع ناهنجاری‌های تکاملی در مراحل مختلف جنینی اثر دارد. علاوه بر این اثرات پوشش‌های سطحی، غلظت نانوذرات، بار سطحی، پتانسیل زتا و شکل کریستال بر میزان سمیت جنینی مؤثر است. فاکتورهای متعددی نظیر PH محلول، غلظت نمک و حرارت می‌تواند فعالیت بیولوژیکی نانوذرات را مختل نماید، که بایستی در طی پژوهش به این فاکتورها بیشتر توجه کرد (۲۵). اگرچه کاهش اندازه در مقایسه با ذرات بزرگتر، سطح واکنش نانوذرات را به ازای واحد حجم افزایش و به مقدار زیادی تأثیر سدها و مکانیسم‌های مختلف را برای نفوذ ذرات و حرکت در بدن کاهش می‌دهد (۵)، اما تحقیقات انجام گرفته نشان داده نانوذرات می‌توانند باعث سمیت و استرس اکسیداتیو در رده‌های

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: rasool.amini71@yahoo.com

سلولی، در پستانداران و آبزیان شوند. اثرات سمی نانوذرات علاوه بر ترکیب شیمیایی، توسط اندازه، شکل و سطح ذرات و ترکیب شدن با مواد مختلف ایجاد می‌شود (۱، ۲و ۴). نانوذرات مبتنی بر سیلیس می‌تواند مکانیسم‌ها و سطح سمیت القا شده در سلول‌ها را تغییر دهد. زئولیت‌ها ساختارهای کریستالی آلومینوسیلیکات هستند که ساختار متخلخل داشته و توانایی جذب و آزادسازی مایعات و مولکول‌هایی که قطر مناسبی دارند را دارا هستند. همچنین انجام تبادلات کاتیونی بدون ایجاد تغییرات ساختاری از خصوصیات زئولیت‌ها به شمار می‌رود (۲۷). زئولیت در دامپزشکی به عنوان افزودنی غذای حیوانات، تصفیه آمونیاک استخر ماهی و آبزیان، کنترل بو و رطوبت حیوانات خانگی (بستر حیواناتی مثل سگ وگربه)، جذب فلزات سنگین مضر و مایکوتوکسین‌ها و به عنوان toxin binder استفاده می‌شود (۱۴). وقتی اندازه ذرات زئولیت از میکرون به سمت نانو می‌رود باعث ایجاد بهبود چشمگیری در کارآیی زئولیت‌ها در همه جنبه‌های کاربردی آن‌ها می‌شود ولی در صورت عدم رعایت مسائل ایمنی و برآورد خطرات آن‌ها می‌تواند باعث به خطر افتادن سلامت عمومی و دامی شوند (۹). سلول‌ها می‌توانند با یکی از دو مکانیسم اصلی بمیرند: نکروز یا آپوپتوز. نکروز، که می‌تواند در عرض چند ثانیه اتفاق بیفتد، مرگ سلول‌ها از طریق آسیب خارجی است که معمولاً از طریق تخریب غشای پلاسمایی یا تکیه گاه‌های بیوشیمیایی یکپارچگی آن انجام می‌شود. شکل اصلی دیگر مرگ سلولی، آپوپتوز، بسیار کندتر است و بر اساس مفهوم مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده است. آپوپتوز بسته به شروع‌کننده از چند ساعت تا چند روز نیاز دارد. تظاهرات آپوپتوز، چه بیوشیمیایی و چه مورفولوژیکی، منحصر به فرد است و کاملاً با نکروز متفاوت است (۸). جنین مرغ یک مدل بیولوژیکی دارای رشد سریع، مستقل از نفوذ خارجی و عمل‌آوری آن آسان است. این مدل به عنوان نمونه تحقیقی اولیه در آزمایش‌های سمیت، پزشکی و همچنین تغذیه استفاده می‌شود، که غالبا قبل از آزمایش بر روی انسان یا حیوانات انجام می‌گیرد (۳۱). جنین مرغ به عنوان یک ساختار زنده چند بافتی، مدل حیوانی بسیار بهتری از کلونی‌های سلولی است (۲۴). دوره بارداری، با توجه به وقوع روند سازمان‌دهی در سطح مولکولی و سلولی و حساسیت بالای جنین به سموم محیطی، دوره بحرانی می‌باشد.. با توجه به اندازه‌های بسیار کوچک، نانوذرات ممکن است از موانع غشاء سلولی بیولوژیکی و از سد جفت به راحتی نفوذ کرده و در زنده ماندن و رشد جنین اثر بگذارند (۲۹). جنین جوجه‌ها از روز دوم به بعد انکوباسیون در مطالعات تراتولوژی استفاده می‌گردند، در طی روز اول انکوباسیون، بیشتر مواد تراتوژنیک، منجر به نقایص سیستم عصبی مرکزی و ناهنجاری می‌شود (۱۳).

سلامت مواد غذایی به طور مستقیم بر سلامت انسان اثرگذار است، مطالعه و بررسی تراتوژن‌ها بعنوان موادی که سلامت جنین را تحت تأثیر قرار می‌دهند و عامل ایجادکننده ۱۰ درصد از نقایص هنگام تولد در انسان هستند، واجد اهمیت است (۲۰). تراتوژن‌ها، یک یا چند پاسخ پاتوژنیک را در طی تکوین جنین، القاء می‌کنند و به چند گروه تراتوژن‌های داروئی، صنعتی، محیطی، کشاورزی و بیماری‌های متابولیکی و عفونی تقسیم‌بندی می‌شوند (۳). مکانیسم عمل تراتوژن‌ها شامل موتاسیون، اختلال کروموزومی، مقابله با میتوز، مقابله با وظایف اسید نوکلئیک، کمبودهای تغذیه‌ای، اشکال در تهیه انرژی، تغییر در اسمولاریته، تغییرات ساختمانی در غشاء سلول و مهار آنزیمی است (۶). با توجه به اهمیت مطالب مطرح شده مطالعه حاضر با هدف بررسی هیستوپاتولوژیک و ایمنوهیستوشیمی اثرات امبریوتوکسیک و تراتوژنیک نانوزئولیت بر جنین جوجه مرغ در محیط تخم مرغ طراحی و اجرا شد.

مواد و روش کار

نانوزئولیت یا آلومینوسیلیکات هیدراته از دانشکده شیمی دانشگاه تبریز تهیه شد. همچنین تعداد ۸۰ تخم مرغ نطفه‌دار با وزن تقریبی ۳±۶۰ گرم از مرغ‌های نژاد رأس ۳۰۸ از یک مزرعه تجاری مرغ مادر تبریز (ایلخچی) با سن ۴۸ هفته به دست آمد و به مدت ۴ روز در دمای ۱۲ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. پس از ۴ روز، تخم مرغ‌ها وزن شدند و به طور تصادفی به ۴ گروه شامل گروه اول (گروه کنترل، تزریق۰/۳ سی‌سی نرمال سالین)، گروه دوم (تزریق ۰/۳ سی‌سی نانو زئولیت با دوز ۵ mg/kg)، گروه سوم (تزریق ۰/۳ سی‌سی نانو زئولیت با دوز ۵۰mg/kg) و گروه چهارم (تزریق ۰/۳ سی‌سی نانو

زئولیت با دوز mg/kg ۱۰۰) تقسیم شدند. برای تهیه‌ی رقت‌های نانوذرات زئولیت بر حسب ppm به ترتیب ۵ و۵۰ و۱۰۰ میلی‌گرم از مواد نانو را در یک لیتر آب مقطر حل کرده و محلول‌های لازم را با دوزهای مشخص بدست آوردیم. با استفاده از کندلینگ، کیسه هوایی تخم مرغ‌ها را پیدا و با مداد علامت‌گذاری شد و از غلظت‌های تهیه شده بر حسب ppm مقدار ۰/۳ میلی لیتر از ماده تزریقی را در سرنگ کشیده و به تخم مرغ تزریق شد. در روز اول جوجه‌کشی محل تزریق (پوسته بالای کیسه هوایی) را با اتانول ۷۰ درصد استریل کرده و اجازه دادیم سطح پوسته خشک شود. از پروب استریل استفاده شد تا در وسط کیسه هوایی تخم‌مرغ، روی پوسته سوراخی ایجاد کنیم. سر سوزن باید با زاویه ۴۵ درجه و خیلی به آرامی وارد کیسه هوایی شود. باید مراقب بود که سوزن در نزدیکی بلاستودرم یا بافت جنین قرار نگیرد و همچنین محل تزریق آنچنان سطحی نباشد که مواد تزریق شده از سوراخ پس بزند و در آخر با استفاده از یک قلم کوچک، سوراخ تزریق با قطره‌ای از پارافین مهر و موم گردید. بعد از این مراحل تخم مرغ‌ها به داخل دستگاه ستر دانشکده دامپزشکی تبریز واقع در بیمارستان این دانشکده منتقل شدند. دما، رطوبت و چرخش تخم مرغ‌ها در دستگاه جوجه‌کشی در دوره ستر (۱۸ روز اول انکوباسیون) و دوره هچر (۳ روز آخر انکوباسیون) بر اساس کاتالوگ دستگاه جوجه‌کشی تنظیم شد. پس از یک هفته با استفاده از کندلینگ زنده‌مانی جنین در تخم مرغ‌ها ارزیابی گشت.

برای تهیه مقاطع بافتی، در روز بیست انکوباسیون، تخم مرغ‌ها را از دستگاه خارج و با شکستن پوسته‌ی آن‌ها، شخصا به خارج کردن جنین های ۲۰ روزه از داخل تخم مرغ اقدام گردید. جهت تهیه مقاطع بافتی ابتدا نمونه‌های کبد و کلیه در فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفته سپس به آزمایشگاه بافت‌شناسی دانشکده دامپزشکی، منتقل گردیدند. پس از پایدار شدن کامل نمونه‌ها، هر بار از تمامی طول کبد و کلیه یک نمونه نیم سانتی‌متری با دقت توسط اسکالپل نیز برداشته و از آن قطعات حدود نیم سانتیمتر انتخاب و در ظروف کوچک جداگانه قرار داده شد و بمدت ۲۴ ساعت در فرمالین ۱۰ درصد نگهداری شد، در مراحل بعدی قالب‌گیری، برش بافت، چسباندن مقاطع بر روی لام و رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین به روش معمول انجام گرفت.

روش انجام تست ایمونوهیستوشیمی به این صورت بود که پس از ثبوت و طی مراحل معمول و استاندارد تهیه مقاطع بافتی، برش‌هایی به ضخامت ۳-۶ میکرومتر تهیه گردید. سپس مقاطع با استفاده از دو ظرف گزیلل، پارافین زدایی و با غلظت‌های کاهشی الکل آب‌دهی شدند و در نهایت سه مرتبه با محلول بافر فسفات عاری از نوکلئاز شستشو داه شدند. جهت از بین بردن پراکسیدازهای درون زاد، مقاطع با پراکسید هیدروژن ۰/۳ درصد در متانول به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای ۱۵- ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس مقاطع بعد از شستشو با بافر فسفات عاری از نوکلئاز با کمک پروتئین کیناز K یا تریپسین تیمار شدند. کیت آزمایشگاهی استفاده شده در این تحقیق کیت تشخیص مرگ سلولی POD ساخت شرکت روژ آلمان بود که تمامی مراحل طبق دستورالعمل همراه کیت انجام پذیرفت. به طور خلاصه مقاطع بافتی با مخلوط واکنش TUNEL در یک محفظه تاریک و مرطوب به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند و سپس سه مرتبه با محلول بافرفسفات عاری از نوکلئاز شستشو شدند. سپس مقاطع با POD به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و بعد از شستشو با محلول بافرفسفات عاری از نوکلئاز، محلول DAB به نمونه‌ها اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه (۱۵-۲۰ درجه سانتی گراد) و دور از نور قرار داده شدند. در نهایت نمونه‌ها سه مرتبه با آب مقطر دوبار تقطیر شده شستشو داده شد و با رنگ هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی افتراقی، و پس از آب‌گیری با غلظت‌های صعودی اتانول و شفاف‌سازی در گزیلل، آماده شده و زیر میکروسکوپ نوری بررسی و مطالعه شدند (۱۷). برای تعیین شاخص آپوپتوزی از هر ناحیه ۵ برش و در هر مقطع ۱۰ میدان دید میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی بالا بطور تصادفی انتخاب و هسته‌های TUNELمثبت (هسته‌هایی به رنگ قهوه‌ای تیره و یکنواخت) و TUNEL منفی (هسته‌های طبیعی به رنگ آبی) شمارش شده (۱۷) و در نهایت شاخص آپوپتوزی با فرمول زیر محاسبه و آنالیز گردید:

$$\text{Labeling index} = a/(a+b) \times 100$$

a: تعداد هسته‌های TUNEL مثبت در هر میدان میکروسکوپی

b: تعداد هسته‌های TUNEL منفی در هر میدان میکروسکوپی

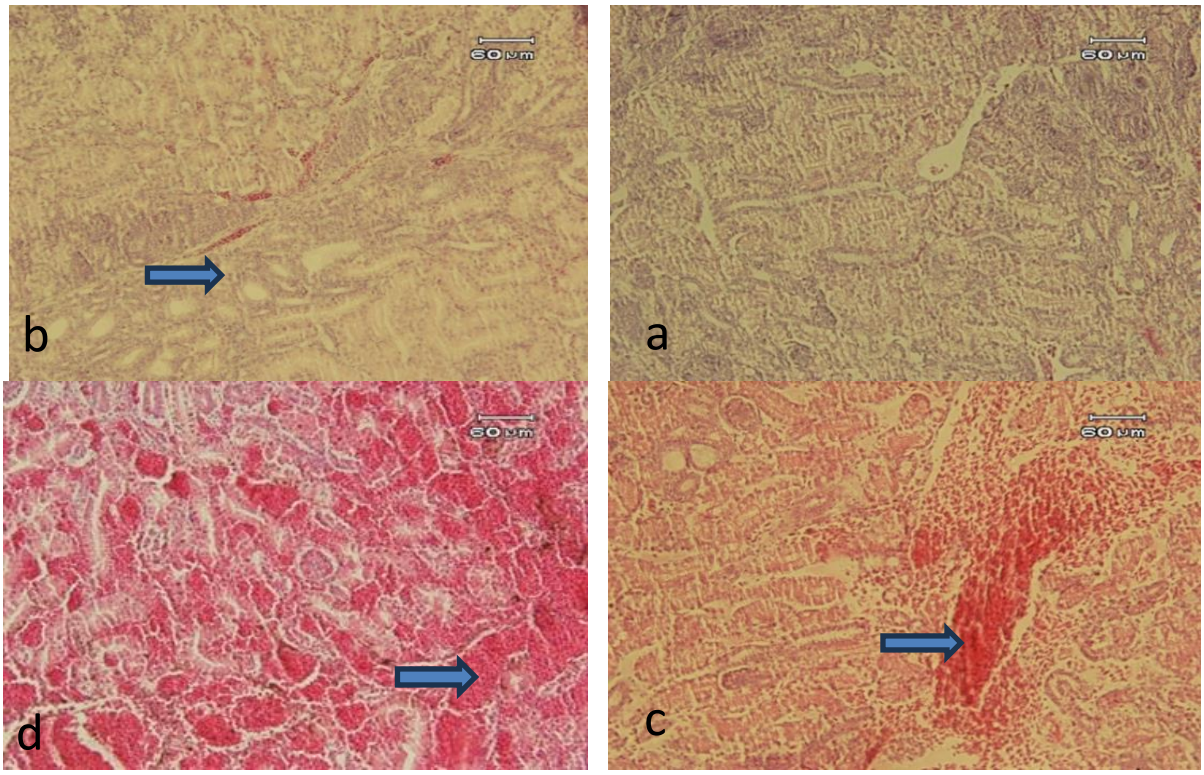
بررسی اسلایدها بدون اطلاع از کد آن‌ها و کاملا بصورت غیر مغرضانه انجام شد.

برای آنالیز آماری داده‌ها از نرم افزار SPSS22.0 و از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست تکمیلی Tukey استفاده شد. سطح معنی‌داری تست‌های آماری به میزان P <۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

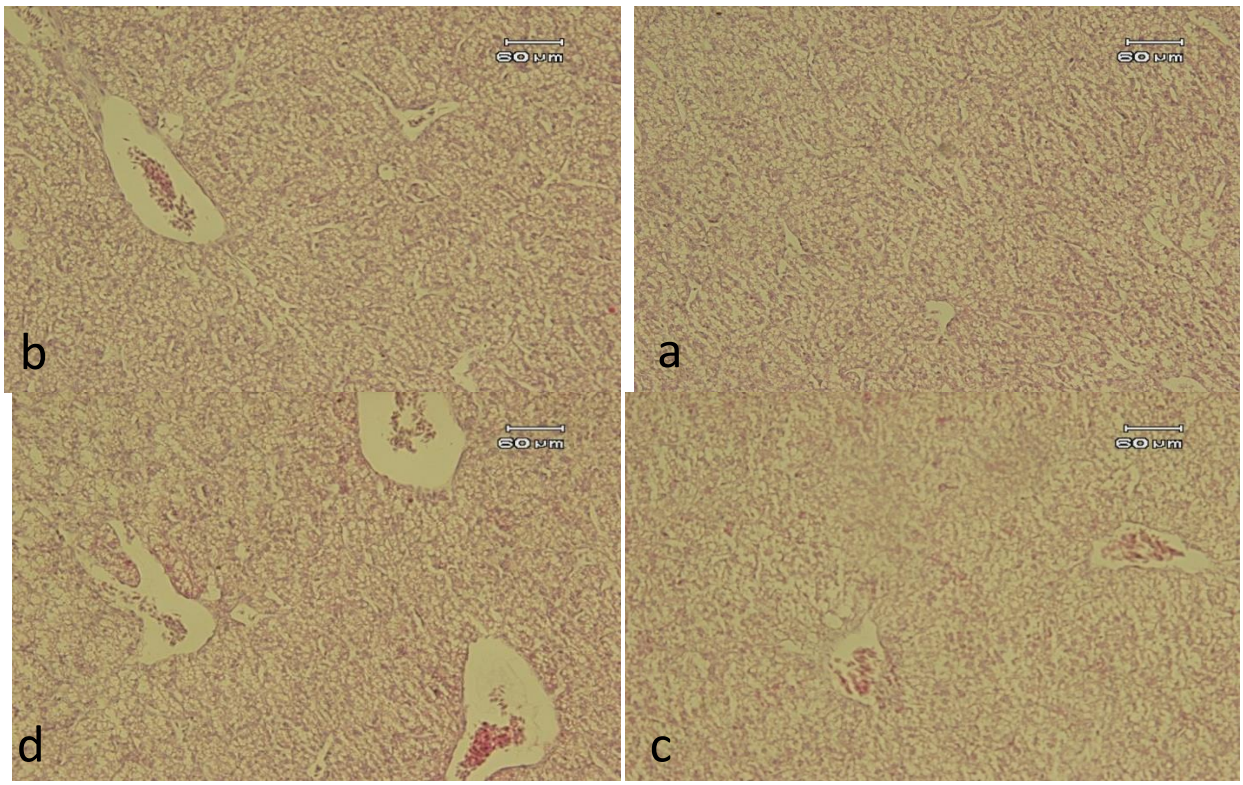
نتایج

نتایج حاصل از بررسی هیستوپاتولوژیک مقاطع بافتی کلیه نشان داد که در گروه کنترل ساختار بافت کلیه طبیعی بوده و تغییر پاتولوژیک خاصی در آن مشاهده نگردید. در گروه دریافت‌کننده نانوذره زئولیت با دوز ۵mg/kg دژنرسانس واکوئلی، خون‌ریزی و پرخونی با شدت خفیف مشاهده شد. به طوری که اختلاف آماری معنی‌داری با گروه کنترل مشاهده نشد (P>۰/۰۵). در گروه دریافت کننده نانوذره زئولیت با دوز ۵۰ mg/kg پرخونی با شدت خفیف، خون‌ریزی، دژنرسانس واکوئلی، تخریب توبول‌های کلیوی با شدت متوسط مشاهده گردید. در گروه دریافت‌کننده نانوذره زئولیت با دوز ۱۰۰ mg/kg شدت ضایعات پاتولوژیک شدید بوده، خونریزی‌های شدید، تخریب و از بین رفتن توبول‌ها، انفیلتراسیون سلول‌های التهابی و محو شدن لومن مشاهده گردید. به طوری که اختلاف آماری معنی‌دار بین گروه دریافت‌کننده نانوذره زئولیت با دوز ۱۰۰ mg/kg و تمامی گروه‌ها مشاهده گردید (P<۰/۰۵). در حالی که بین گروه دریافت‌کننده نانوذره زئولیت با دوز ۵۰mg/kg و ۵ mg/kg اختلاف آماری معنی‌داری با گروه کنترل مشاهده نشد (P>۰/۰۵). نتایج مطالعه هیستوپاتولوژیک نشان داد که غلظت‌های مختلف نانوذره زئولیت بر روی بافت کلیه جنین اثر گذاشت و تغییرات پاتولوژیک بافت کلیه با افزایش دوز بیشتر شد و آسیب‌ها با شدت بیشتری مشاهده گردید.

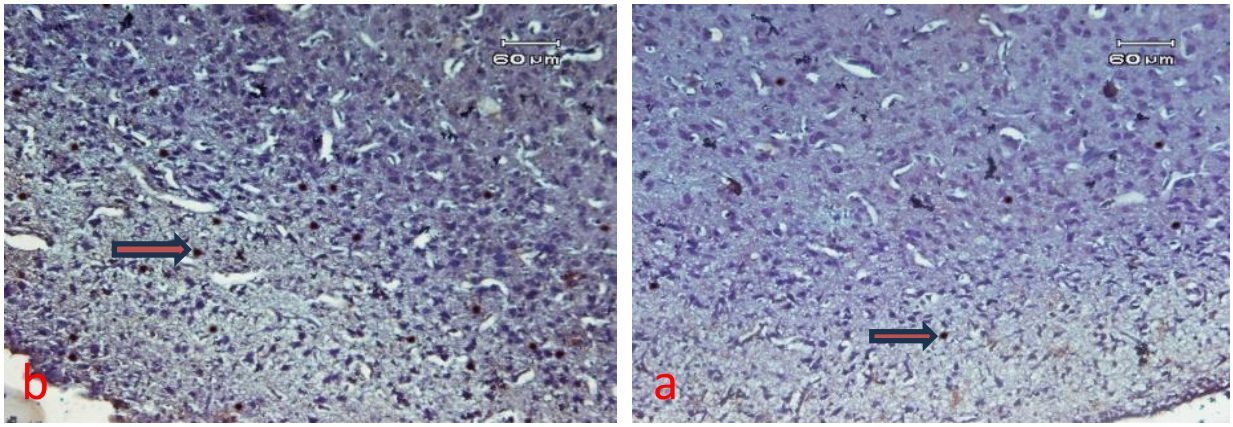
نتایج حاصل از بررسی هیستوپاتولوژیک مقاطع بافت کبد نشان داد که در گروه کنترل ساختار بافت کبد طبیعی بوده و تغییر پاتولوژیک خاصی در آن مشاهده نگردید. در گروه دریافت‌کننده نانوذره زئولیت با دوز ۵ mg/kg ساختار بافت کبد تقریبا طبیعی بود. به طوری که اختلاف آماری معنی‌داری با گروه کنترل مشاهده نشد (P>۰/۰۵). در گروه دریافت‌کننده نانوذره زئولیت با دوز ۵۰mg/kg پرخونی با شدت ملایم مشاهده گردید. در گروه دریافت‌کننده نانوذره زئولیت با دوز ۱۰۰ mg/kg پرخونی با شدت شدید مشاهده گردید. به طوری که اختلاف آماری معنی‌دار بین گروه دریافت‌کننده نانوذره زئولیت با دوز ۱۰۰ mg/kg و تمامی گروه‌ها مشاهده گردید (P<۰/۰۵). در حالی که بین گروه دریافت‌کننده نانوذره زئولیت با دوز ۵۰mg/kg و ۵ mg/kg اختلاف آماری معنی‌داری با گروه کنترل مشاهده نشد (P>۰/۰۵). نتایج مطالعه هیستوپاتولوژیک نشان داد که غلظت‌های مختلف نانوذره زئولیت بر روی بافت کبد جنین اثر گذاشت و تغییرات پاتولوژیک بافت کبد با افزایش دوز بیشتر شد و آسیب‌ها با شدت بیشتری مشاهده گردید. در بررسی ایمنو هیستوشیمی میان گروه‌های تیمار با نانوذرات زئولیت و گروه کنترل اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد (P>۰/۰۵).



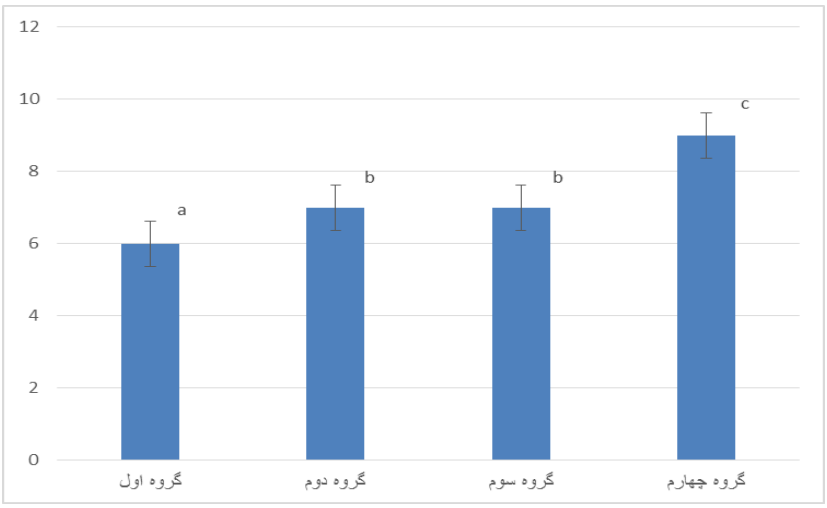
شکل ۱- بافت کلیه جنین جوجه: گروه اول (کنترل) (a)، گروه دوم (۵ mg/kg) (b)، گروه سوم (۵۰mg/kg) (c)،گروه چهارم (mg/kg ۱۰۰) (d)، افزایش ضایعات پاتولوژیک با افزایش دوز نانوزئولیت (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین _ائوزین x200)
(علامت پیکان نشان دهنده خونریزی است)



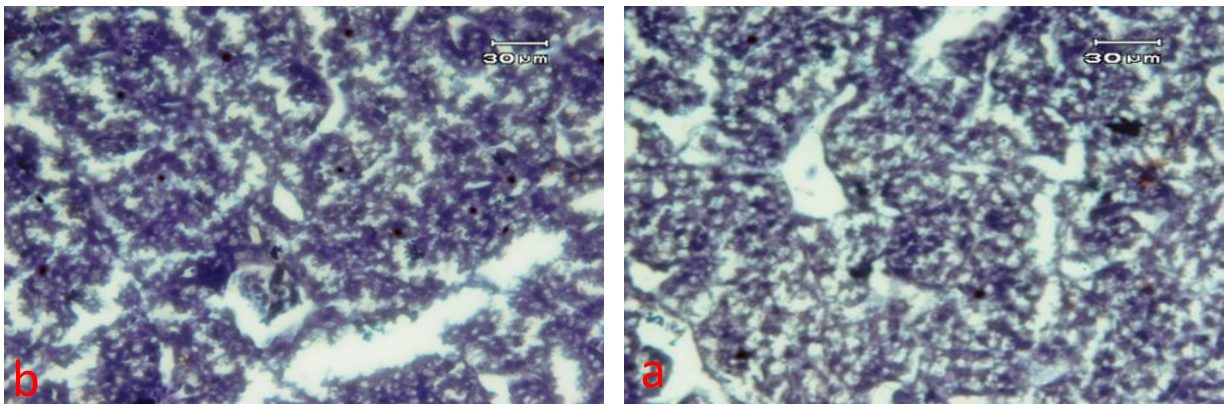
شکل ۲- بافت کبد جنین جوجه: گروه اول (کنترل) (a)، گروه دوم (۵ mg/kg) (b)، گروه سوم (۵۰mg/kg) (c)،گروه چهارم (mg/kg ۱۰۰) (d)، افزایش پر خونی با افزایش دوز نانوزئولیت (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین _ائوزین x200)



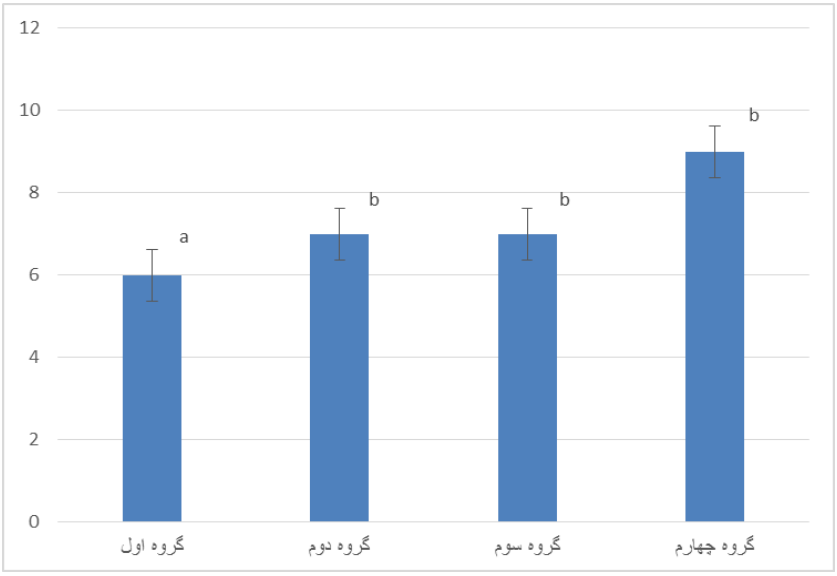
شکل ۳- مقطع ایمنوهیستوشیمیایی (تانل) بافت مغز جنین جوجه: گروه سوم (۵۰mg/kg) (a)،گروه چهارم (۱۰۰ mg/kg) (b)، افزایش آپوپتوز با افزایش دوز نانوزئولیت (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین _ائوزین x200) (نقاط سیاه رنگ سلول‌های آپوپتوز شده هستند)



شکل ۴- شاخص آپوپتوزی مغز جنین‌های تیمار شده با نانوزئولیت. درصد آپوپتوز در گروه چهارم (۱۰۰ mg/kg) نسبت به سه گروه دیگر افزایش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵)، ولی در گروه های دوم (۵ mg/kg) و سوم (۵۰mg/kg) تغییر معنی‌داری نسبت به گروه اول (کنترل) دیده نشد (P>۰/۰۵).



شکل ۵- مقطع ایمنوهیستوشیمیایی (تانل) بافت کبد جنین جوجه: گروه دوم (۵ mg/kg) (a)،گروه چهارم (۱۰۰ mg/kg) (b)، تغییر معنی‌داری در مقدار آپوپتوز با افزایش دوز نانوزئولیت دیده نمی‌شود (P>۰/۰۵). (نقاط سیاه رنگ سلول‌های آپوپتوز شده هستند) (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین _ائوزین x200)



شکل ۶- شاخص آپوپتوزی کبد جنین‌های تیمار شده با نانوزئولیت. درصد آپوپتوز در سه گروه تیمار اختلاف معنی‌داری نشان نداد (P>۰/۰۵). در صورتی که هر سه گروه تیمار با گروه کنترل اختلاف معنی‌دار داشتند (P<۰/۰۵).

بحث

استفاده گسترده از نانوذرات زئولیت در بسیاری از زمینه‌ها، از جمله پزشکی، کشاورزی، دامپزشکی و... باعث نگرانی در زمینه تأثیر و خطر احتمالی استفاده از آن‌ها برای سلامت انسان و محیط زیست شده است، از این رو ارزیابی اثرات و سمیت احتمالی آن در مدل‌های حیوانی دارای اهمیت می‌باشد (۲۱). جنین جوجه برای تست‌های سمیت تکاملی مدل بسیار مناسبی است و مواجهه کردن جنین با بیگانه زیست‌های مختلف در طی مراحل مختلف تکامل بسیار راحت است. مطالعات در زمینه سمیت نانوذرات در مدل جوجه مانند مدل دوزیستان اندک بوده و در سال‌های اخیر این مطالعات افزایش یافته است. نانوذرات می‌توانند از سد جفت عبور نموده و در جنین و بافت‌های اطراف آن تجمع پیدا کنند. در سال‌های اخیر توجه زیادی معطوف به اثرات نانوذرات بر جنین پستانداران و عبور نانوذرات از جفت شده است (۱۰). مطالعات در حیوانات مختلف نشان داد که نانوذرات به بسیاری از ارگان‌ها نظیر چشم، مغز و قلب توزیع شده و در جنین در مدت تکاملش باقی می‌مانند. تجمع مقادیر زیادی از نانوذرات در جنین می‌تواند باعث ناهنجاری و افزایش مرگ و میر و تغییرات رفتاری شود (۱۹). بخاطر سایز کوچک، نانوذرات می‌توانند به جریان خون وارد شده و وارد سلول شوند و اثرات و تداخلات با ارگان‌های سلولی داشته باشند. سمیت نانوذرات و اثرات آن‌ها بر مرگ و میر جنین و نقایص تکاملی اخیراً بیشتر توجه‌ها را به سوی خود کشانده است اما مکانیسم‌های آن‌ها هنوز مشخص نیست و فقط مطالعات محدودی بر روی پاسخ‌های سلولی جنین صورت گرفته است (۱۶). سمیت نانوذرات می‌توانند با اثرات مختلف بیولوژیکی آن‌ها نظیر القای استرس اکسیداتیو که به چربی‌ها، کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و DNA آسیب می‌زند، تعریف شود. از طرفی ورود نانوذرات به میتوکندری، فعال کردن پاسخ‌های ایمنی و تغییرات در رسپتورها یا عملکرد کانال‌های یونی بعد از مواجهه با نانوذرات لازم است بررسی گردد. همچنین تداخل نانوذرات با آنزیم‌ها، پتانسیل فاکتورهای فعال‌کننده آپوپتوز یا نکروز و القای فرآیندهای التهابی باید مد نظر قرار گیرند (۱۶). علاوه براین نانوذرات خصوصیات شبیه ویروس‌ها دارند و می‌توانند باعث تخریب DNA و یا آسیب به آن و تأخیر تکثیر سلولی شوند. نانوذرات می‌توانند فعالیت میتوکندری را کاهش داده و باعث ناهنجاری‌های شکلی و سلولی شوند. مکانیسم سمیت نانوذرات همچنین در انواع مختلف نانوذرات بسته به

ترکیب شیمیایی متفاوت است (۷). در این مطالعه شدت ضایعات پاتولوژیکی کبد و کلیه جنین هم با افزایش دوز تجویزی روند صعودی داشت و شدت ضایعات در گروه تحت تیمار با دوز ۱۰۰ mg/kg بیشتر از سایر گروه‌ها بود و اختلاف معنی‌داری با سایر گروه‌ها داشت. در تأیید داده‌های حاصل از این پژوهش، تعداد جنین‌های ناهنجار و تغییر فنوتیپ با افزایش غلظت نانوذرات به صورت وابسته به دوز نانوذرات نقره، در ماهی برنج ژاپنی و جنین ماهی قنات نشان داده شد (۱۸). ضایعات هیستوپاتولوژیک مشاهده شده بیانگر سمیت سلولی نانوذرات زئولیت می‌باشد. کیهارا و همکاران سمیت انواع مختلف نانوذرات حاوی زئولیت را در شرایط آزمایشگاهی را بررسی کرده و به این نتیجه رسیدند که اثرات سمیت سلولی می‌تواند تحت تأثیر شکل و اندازه کریستال آلومینیوم موجود در ترکیب و ساختار نانوذره (نسبت آلومینیوم به سیلیکون) باشد. سمیت نانو ذره به ترکیب ، فرم و اجزا سازنده، وزن مولکولی و.. می‌تواند مرتبط باشد (۱۵)، توماسن و همکاران سمیت سلولی نانوذرات حاوی زئولیت نوع A و Y را بررسی کردند: آنها به این نتیجه رسیدند که این نانوذرات سمیت بسیار پایینی را در مقایسه با ذرات سیلیکون آمورف استفاده شده به عنوان کنترل مثبت در مطالعه خود نشان دادند (۳۰). مکزیریسکا-ولگوس و همکاران نانوذرات حاوی زئولیت نوع A (BaA) عامل دار شده با مواد پلیمری (PEG) را بررسی کردند و نشان دادند که جذب سلولی، حفظ در داخل سلول و سمیت سلولی در شرایط آزمایشگاهی به وزن مولکولی PEG بستگی دارد (۲۱). مرضیه حجازی و همکاران اثرات تراتوژنیک و سمیت جنینی آن‌ها را در جنین جوجه به عنوان مدلی برای ارزیابی آسیب جنینی انسان بررسی کردند و آن‌ها اثرات تراتوژنیکی از جمله تغییر شکل پاها، بال‌ها، کبد و قلب را یافتند (۱۲). عامل اثرگذار دیگر در ارتباط با سمیت نانوذرات، مدت زمان تجویز و دوز استفاده شده است. به طور کلی مصرف مزمن و دوز پایین در برابر دوز متوسط و مصرف کوتاه مدت می‌تواند اثرات بارزتری ایجاد نماید (۳۲). در مطالعه توماسن و همکاران اثرات سمیت سلولی نانوذرات زئولیت با استفاده از تست MTT ارزیابی شد. نتایج این پژوهش نشان داد که پس از ۲۴ ساعت قرار گرفتن در معرض، هیچ فعالیت سیتوتوکسیک قابل توجهی برای دوزهای نانوزئولیت تا ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر مشاهده نشد همچنین افزودن سرم جنین گوساله به محیط کشت سلولی در طول مواجهه، این پاسخ کم را به طور قابل توجهی تغییر نداد (۳۰). هسته‌های تانل مثبت ثبت شده در ارزیابی ایمنوهیستوشیمی نشانگر آسیب بافتی مغز و کبد می‌باشد. در این مطالعه آسیب مغزی ناشی از نانوذرات زئولیت مشخص ومعنی‌دار بود. حسن‌وند و همکاران در مطالعه‌ای خواص کاربردی نانوذرات زئولیت را بررسی و عنوان داشتند بدلیل اندازه کوچک این نانوذرات براحتی از سد خونی مغزی عبور کرده و دارای قابلیت اثرگذاری می‌باشند (۱۱). در حقیقت مشخص شده است که سمیت سلولی زئولیت‌ها تا حد زیادی بستگی به نوع رده سلولی هدف مطالعه بستگی دارد (۲۲). در مطالعات دیگر نانوذرات پلاتین نیز بر رشد و تکامل جنین مرغ اثر سوئی نشان نداد. با این اوصاف القای آپوپتوز و کاهش تکثیر سلول‌ها در مغز گزارش شده است. از طرفی غلظت نانوذرات پلاتین در جنین جوجه کمتر از ماهی بوده است. افزایش آپوپتوز وابسته به دوز در سلول‌ها به همراه تغییرات و ناهنجاری‌های مورفولوژیک در دوزهای بالا مشابه با گورخر ماهی ایجاد شد (۲۶). در مطالعه پارک و همکاران، در بررسی ایمنوهیستوشیمی آسیب سیستم تناسلی شامل نقص در تولید روزانه اسپرم یا آسیب اعصاب جمجمه‌ای در نوزادان در تجویز زیر پوستی نانوذرات دی اکسیدتیتانیوم به موش‌های باردار مشاهده شد. مطالعات microarray بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز، تکامل مغزی و عملکرد سیستم عصبی مرکزی در جنین‌ها را نشان داد. نه تنها تزریق بلکه استنشاق نانوذرات دی اکسیدتیتانیوم در نوزادان تغییرات علائم رفتاری و عصبی را نشان داد. دوز خوراکی باعث افزایش تغییرات شکل جنین و افزایش مرگ و میر جنین شد (۲۳).

در مطالعات انجام گرفته، تا کنون ارزیابی هیستوپاتولوژی و ایمنوهیستوشیمی برای بررسی مسمومیت با نانو ذرات زئولیت گزارش نشده است. نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده بیش از حد از نانوذرات زئولیت در صنایع مختلف می‌تواند در طولانی مدت اثرات زیان باری را بدنبال داشته باشد، هرچند که پژوهش های بیشتری نیاز است تا مکانیسم های آسیب به خوبی شناخته و درجهت رفع آن گام برداشته شود.

منابع

1. Ahamed M, A Alhadlaq H, Alam J, Khan M, Ali D, Alarafi S. Iron oxide nanoparticle-induced oxidative stress and genotoxicity in human skin epithelial and lung epithelial cell lines. Current pharmaceutical design. 2013; 19(37): 6681-90.
2. Ahamed M, Ali D, Alhadlaq HA, Akhtar MJ. Nickel oxide nanoparticles exert cytotoxicity via oxidative stress and induce apoptotic response in human liver cells (HepG2). Chemosphere. 2013 (b); 93(10): 2514-22.
3. Ali N. Teratology in zebrafish embryos: a tool for risk assessment (Doctoral dissertation, Department of Biomedical Sciences and Veterinary Public Health, Swedish University of Agricultural Sciences). 2007.
4. Baratli Y, Charles AL, Wolff V, Ben Tahar L, Smiri L, Bouitbir J, Zoll J, Sakly M, Auger C, Vogel T, Abdelmelek H. Age modulates Fe 3 O 4 nanoparticles liver toxicity: dose-dependent decrease in mitochondrial respiratory chain complexes activities and coupling in middle-aged as compared to young rats. BioMed Research International. 2014; 2014.
5. Barlow S, Chesson A, Collins JD, Flynn A, Hardy A, Jany KD, Knaap A, Kuiper H, Larsen JC, Le Neindre P, Schans J. The potential risks arising from nanoscience and nanotechnologies on food and feed safety. EFSA JOURNAL. 2009;7(3).
6. Bishop JB, Witt KL, Sloane RA. Genetic toxicities of human teratogens. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 1997; 396(1-2): 9-43.
7. Buzea C, Pacheco II, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. Biointerphases. 2007 Dec 1;2(4):MR17-71.
8. D'arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. Cell biology international. 2019 Jun;43(6):582-92.
9. European Food Safety Authority (EFSA), Schoonjans R. Annual report of the EFSA Scientific Network of Risk Assessment of Nanotechnologies in Food and Feed for 2016. 2016 Dec.
10. Grodzik M, Sawosz E. The influence of silver nanoparticles on chick embryo development and bursa of Fabricius morphology. Journal of Animal and Feed Sciences. 2006; 15: 111.
11. Hassanvand A, Hajihassani M, Abdi M, Gharibzadeh S. Drug delivery using nano-pore zeolites and ultrasound. The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences. 2013; 25(1): E20-.
12. Hejazy M, Moradi M, Akbari G, Amini MR. Investigation on the teratogenic and embryotoxic effects of nanozeolite on chick embryos model. Nanomedicine Research Journal. 2018; 3(3): 169-73.
13. Jamkhande PG, Chintawar KD, Chandak PG. Teratogenicity: a mechanism based short review on common teratogenic agents. Asian Pacific Journal of Tropical Disease. 2014; 4(6): 421-32.
14. Karamanlis X, Fortomaris P, Arsenos G, Dosis I, Papaioannou D, Batzios C, Kamarianos A. The effect of a natural zeolite (clinoptilolite) on the performance of broiler chickens and the quality of their litter. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 2008; 21(11): 1642-50.
15. Kihara T, Zhang Y, Hu Y, Mao Q, Tang Y, Miyake J. Effect of composition, morphology and size of nanozeolite on its in vitro cytotoxicity. Journal of bioscience and bioengineering. 2011 Jun 1;111(6): 725-30.
16. Kohen R, Nyska A. Invited review: oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. Toxicologic pathology. 2002; 30(6): 620-50.
17. Kyrylkova K, Kyryachenko S, Leid M, Kioussi C. Detection of apoptosis by TUNEL assay. Odontogenesis: Methods and Protocols. 2012: 41-7.
18. Laban G, Nies LF, Turco RF, Bickham JW, Sepúlveda MS. The effects of silver nanoparticles on fathead minnow (Pimephales promelas) embryos. Ecotoxicology. 2010; 19: 185-95.
19. Lee KJ, Browning LM, Nallathamby PD, Xu XH. Study of charge-dependent transport and toxicity of peptide-

Nanotechnology, Biology and Medicine. 2013; 9(7): 945-50.
27. Salvestrini S, Sagliano P, Iovino P, Capasso S, Colella C. Atrazine adsorption by acid-activated zeolite-rich tuffs. Applied Clay Science. 2010; 49(3): 330-5.
28. Swain P, Nayak SK, Sasmal A, Behera T, Barik SK, Swain SK, Mishra SS, Sen AK, Das JK, Jayasankar P. Antimicrobial activity of metal based nanoparticles against microbes associated with diseases in aquaculture. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2014; 30: 2491-502.
29. Taylor U, Barchanski A, Kues W, Barcikowski S, Rath D. Impact of metal nanoparticles on germ cell viability and functionality. Reproduction in Domestic Animals. 2012; 47: 359-68.
30. Thomassen LC, Napierska D, Dinsdale D, Lievens N, Jammaer J, Lison D, Kirschhock CE, Hoet PH, Martens JA. Investigation of the cytotoxicity of nanozeolites A and Y. Nanotoxicology. 2012; 6(5):472-85.
31. Victorelli FD, de Oliveira Cardoso VM, Ferreira NN, Calixto GM, Fontana CR, Baltazar F, Gremião MP, Chorilli M. Chick embryo chorioallantoic membrane as a suitable in vivo model to evaluate drug delivery systems for cancer treatment: A review. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics. 2020; 153: 273-84.
32. Xiao J, Cao H, Guo S, Xiao S, Li N, Li M, Wu Y, Liu H. Long-term administration of low-dose selenium nanoparticles with different sizes aggravated atherosclerotic lesions and exhibited toxicity in apolipoprotein E-deficient mice. Chemico-Biological Interactions. 2021; 347: 109601.
functionalized silver nanoparticles using zebrafish embryos and single nanoparticle plasmonic spectroscopy. Chemical research in toxicology. 2013; 26(6): 904-17.
20. Mazzu-Nascimento T, Melo DG, Morbioli GG, Carrilho E, Vianna FS, Silva AA, Schuler-Faccini L. Teratogens: a public health issue–a Brazilian overview. Genetics and Molecular Biology. 2017; 40: 387-97.
21. Męczyńska-Wielgosz S, Piotrowska A, Majkowska-Pilip A, Bilewicz A, Kruszewski M. Effect of surface functionalization on the cellular uptake and toxicity of nanozeolite A. Nanoscale research letters. 2016; 11: 1-4.
22. Mellaerts R, Delvaux J, Levêque P, Wuyts B, Van den Mooter G, Augustijns P, Gallez B, Hermans I, Martens J. Screening protocol for identifying inorganic oxides with anti-oxidant and pro-oxidant activity for biomedical, environmental and food preservation applications. Rsc Advances. 2013; 3(3): 900-9.
23. Park MR, Gurunathan S, Choi YJ, Kwon DN, Han JW, Cho SG, Park C, Seo HG, Kim JH. Chitosan nanoparticles cause pre- and postimplantation embryo complications in mice. Biology of reproduction. 2013; 88(4): 88-1.
24. Rashidi H, Sottile V. The chick embryo: hatching a model for contemporary biomedical research. Bioessays. 2009; 31(4): 459-65.
25. Rogers NJ, Franklin NM, Apte SC, Batley GE. The importance of physical and chemical characterization in nanoparticle toxicity studies. Integrated Environmental Assessment and Management: An International Journal. 2007; 3(2): 303-4.
26. Roman D, Yasmeen A, Mireuta M, Stiharu I, Al Moustafa AE. Significant toxic role for single-walled carbon nanotubes during normal embryogenesis. Nanomedicine:

Vol. 17 - No. 2
Fall & Winter 2023/2024

Iran. J. Vet. Clin. Sci.; 2024; 18(1):61-70.
http://doi.org/10.22034/IJVCS.2024.14429.1050

Investigation of the effects of nanozeolite in the in ovo injection method on the toxicity of the embryo and congenital abnormalities in chicks: A perspective on Histopathology and immunohistochemistry

Mohammad Rasoul Amini[1*], Marzieh Hejazi[2]

1- DVSc Student, Department of Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
2- Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz University, Tabriz- Iran.

Received: 20 June 2023 ***Accepted:*** 23 January 2024

Summary

Zeolites are crystal structures that have a porous structure and are able to absorb and release substances. In veterinary medicine, zeolites are used as animal feed additives, fishpond ammonia purification, pet odor and moisture control, absorption of mycotoxins and reduction of intestinal pathogens. This research was designed to investigate possible histopathological lesions in the liver and kidney of chickens. 80 fertilized eggs were prepared from Ras 308 chickens and randomly divided into 4 groups of 20 (one control group and three experimental groups). In the control group, 0.3 ml of physiological serum was injected, and in the experimental groups, 0.3 ml of nanozeolite solution (5, 10 and 100 mg/liter) was injected into the air sac of the egg. Then eggs were placed in the hatchery machine and at the end of the 20th day of incubation, liver and kidney samples were taken from the embryos. The histopathological results of the kidney, the group receiving zeolite nanoparticles with a dose of 100 mg/kg had a significant difference with the rest of the groups in terms of pathological symptoms ($P<0.05$). It was shown that different concentrations of zeolite nanoparticles had an effect on fetal liver tissue and the pathological changes of liver tissue increased with increasing dose ($P<0.05$). In the immunohistochemistry analysis, no significant difference was observed between the treatment groups with zeolite nanoparticles and the control group ($P>0.05$). The results of this study showed that excessive use of zeolite nanoparticles in various industries may have long-term harmful effects on living organisms.

***Keywords*:** nanozeolite, chick embryo, teratogenic, histopathology, immunohistochemistry

***Corresponding author:** rasool.amini71@yahoo.com