# مطالعه اثر القاء آپوپتوز نانو ذرات نقره در کلیه جوجه های گوشتی

**لقمان اکرادی[1*]، اسعد وزیری[2]، امجد فرزین پور[2]**

تاریخ دریافت: ۹۳/۸/۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۲


## چکیده

آپوپتوز نوعی مرگ سلولی است که اغلب به طور هدفمند و منظم در سلولهای بعضی از بافتهای بدن اتفاق می افتد ولی ممکن است تحت تاثیر برخی از پاتوژنها و یا سموم و داروها نیز القاء شود. در این مطالعه ۲۴۰ قطعه جوجه از نژاد راس ۳۰۸ در قالب یک طرح پایه کاملا" تصادفی با چهار تیمار صفر(گروه کنترل)ppm ۴، ppm۸ و ppm ۱۲ نانوسیلور در آب آشامیدنی، در چهار تکرار(در هر قفس ۱۵ قطعه جوجه) پرورش داده شدند. در پایان دوره پرورش از هر تکرار دو قطعه مرغ با وزن میانگین آن تکرار انتخاب شده و بافت کلیه درفرمالین بافر ۱۰٪ جهت بررسی سلولهای آپوپتوتیک با استفاده از روش تانل گرفته شد. بررسیهای انجام گرفته نشان میدهد که با افزایش مقدار نقره بویژه مقادیر بیش ازppm۸ به شدت بر تعداد سلولهای آپوپتوزی به طور معنی دار($p<0/05$) آنهم فقط در سلولهای پوششی توبولها اضافه میشود. با توجه به موارد فوق میتوان نتیجه گرفت که استفاده از نانوسیلور در مقادیر بیش از ppm ۸ در آب آشامیدنی باعث القاء آپوپتوز در سلولهای لوله ای کلیه میگردد.


**واژگان کلیدی:** آپوپتوز، نانو ذرات نقره، کلیه، جوجه گوشتی

## مقدمه

آپوپتوز نوعی مرگ سلولی در جانداران پر سلولی است که در اغلب مواقع به طور هدفمند و منظم در سلولهای بعضی از بافتهای بدن اتفاق می افتد. به همین دلیل آنرا به عنوان مرگ هدفمند یا مرگ برنامه ریزی شده سلول میدانند که در آن ، سلولها پس از رسیدن به سن خاص یا موقعیت خاصی تکه تکه شده و از بین میروند.آپوپتوز شامل یکسری وقایع بیوشیمیایی است که منجر به تغییرات مورفولوژیکی متنوعی از جمله حبابدارشدن غشاء، چروکیدگی سلول، تراکم کروماتین، تکه تکه شدن هسته و شکستنDNA میشود(٤). این امر در رشد و تکوین و هموستاز بدن نقش بسیار مهمی دارد. به همین دلیل مطالعات ژنتیکی، ملکولی و مورفولوژیکی آن هر روزگسترده تر میشود.

عوامل مختلف درونی و یا محیطی همانند اشعه‌های یونیزان، داروهای سیتوتوکسیک، هیپرترمیا، هورمونهای گلوکررتیکوئیدی وعوامل دیگری نظیر بعضی از عناصر، سموم مختلف، برخی باکتریهای پاتوژن داخل سلولی نظیر سالمونالا، شیگلا، لیستریا، و ...در خلال عفونت زایی خود با تغییر در برخی مسیرهای متابولیکی و بیوشیمیایی داخل سلولی می توانند، در هدایت سلول به سمت این نوع خاص از مرگ دخیل باشند. این روند توسط فعال شدن خانواده‌ای از پروتئازها موسوم به کاسپازها شروع می‌شود وبا دخالت یک توالی پروتئولیتیک ویژه به

۱- استادیار، گروه پاتوبیولوژی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران
۲- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی ، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران
*- پست الکترونیکی نویسنده مسئول: loghmanakradi@yahoo.com

انجام میرسد. کاسپازها آنزیمهایی هستند که در سلول به صورت پروکاسپازهای غیرفعال انبار می شوند اما به مجرد اینکه فعال شدند آنزیمها آزاد شده و پروکاسپازهای دیگر را فعال میکنند وموجب شروع یک توالی پشت سرهم میشوند که به سرعت پروتئینها را در داخل سلولها تجزیه میکنند و موجب میشود تا سلول کوچک گشته و متراکم شود،اسکلت سلولی خود را از دست بدهد و سطح سلولی خود را تغییر دهد به طوری که یک سلول فاگوسیتیک مجاور از قبیل ماکروفاژ بتواند به غشای سلولی بچسبد و سلول را هضم کند. سلول به این ترتیب ساختار خود را تخریب میکند و بقایای آن توسط سلولهای فاگوسیت از بین میرود(٤).

نانو سیلور از طریق کنترل فعالیت عوامل بیماری زا در صنایع مختلف مثل کشاورزی و دامپروری و غیره کاربرد دارد. این موادبه عنوان ضدعفونی کننده قوی با دارا بودن ذرات نقره در حد چندین نانو متر با ایجاد رادیکالهای آزاد سبب غیر فعال شدن عوامل میکروبی میشوند. بررسی‌های انجام گرفته در محیط کشت اثر نانوذرات نقره را بر ٦٥٠ نوع باکتری نشان داده است. بر این اساس معتقدند نانوپارتیکل‌های نقره قابلیت غیرفعال کردن عوامل عفونی ایجاد کننده بیماری‌های مختلف را دارد و از عفونت‌های ثانویه به دنبال جراحات حاصل از سوختگی ها جلوگیری می‌کند. همچنین با توجه به پایداری آنها و عدم نیاز به تهیه مجدد استفاده از آنها در ضدعفونی کردن جایگاههای نگهداری دام و طیور کاربردگسترده ای یافته است. اما این ماده نیز میتواند دارای اثرات و عوارض جانبی مختلفی روی بافتهای مختلف بدن باشد(٥و١).

کلیه از جمله بافتهای بسیار مهم وحیاتی و پرکار بدن است که صدمه به آن میتواند به عوارض وخیم و خطرناک و حتی مرگ منجر شود. کلیه در ماکیان یک جفت بوده که در گودیهای موجود در محل اتصال استخوانهای لگن مستقر شده اند. هر کلیه از سه لوب قدامی، میانی و خلفی تشکیل شده و هر لوب شامل لبولهایی است که هر کدام توسط شاخه ای مجزا از حالب تخلیه میشوند. هر لبول دارای بخش قشری و مرکزی است که مرز مشخصی ندارند. وزن کلیه ها حدود ٢/٦-٢٪ وزن بدن است(٢).

بیشتر داروهایی که وارد بدن میشوند از طریق کبد متابولیزه شده و اغلب از راه کلیه دفع میشوند و به همین دلیل میتوانند بر این دو بافت بیش از سایر بافتها تاثیر داشته باشند. نانو ذرات نقره نیز به عنوان داروی ضد میکروبی احتمالا" توانایی ایجاد ضایعه را در بافتهای بدن از جمله کلیه خواهند داشت. از آنجایی که بیشتر مطالعات ضد میکروبی این ماده در ارتباط با طیور و بیماریهای ماکیان بوده است این تحقیق نیز بر روی جوجه های گوشتی انجام گرفته است.

## مواد و روش کار

جهت انجام این تحقیق تعداد٢٤٠ قطعه جوجه (راس ٣٠٨) در قالب یک طرح پایه کاملا" تصادفی با چهار تیمار( ٠ و٤ و ٨ و ١٢ ppm) نانوسیلور و در چهار تکرار (قفس) به ابعاد ١/٥×١و ارتفاع یک متر پرورش داده شدند. تمام عوامل پرورش نظیر دما ، نور، آب، تهویه، تغذیه و بهداشت برای تمام تیمارها یکسان بودند. در هر قفس ١٥ قطعه جوجه به صورت تصادفی قرار گرفت.از همان روز اول پرورش نانوسیلور با مقادیر مذکور یعنی ٤ و ٨ و ١٢ ppm روزانه به آب آشامیدنی اضافه گردید.گروه کنترل از آب بدون نانوسیلور استفاده کرد.

نانوسیلور مورد استفاده در این تحقیق به نام نانوسید(Nanocid L2000) محصول شرکت نانو نصب پارس حاوی ٤٠٠٠ ppm در لیتر نانو ذره نقره با متوسط اندازه ١٨ نانومتر به شکل مایع قهوه ای رنگ محلول در آب میباشد. جیره غذایی جوجه ها نیز بر اساس دستورالعمل پرورش جوجه های گوشتی نژاد راس در دو دوره آغازی(starter) تا ٢١ روزگی و رشد(grower) ٤٢-٢١ روزگی بر پایه ذرت و کنجاله

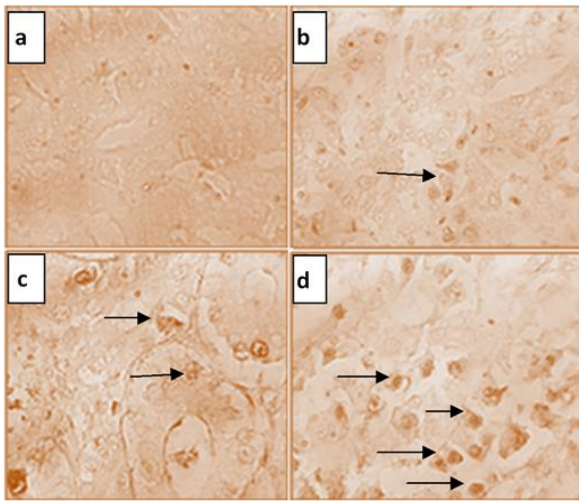
سویا تهیه گردید و در اختیار تمام تیمارها قرار گرفت.

در پایان دوره پرورش از هر تکرار دو قطعه مرغ با وزن میانگین آن تکرار انتخاب وسپس کشتار شده و بلافاصله از کلیه آنها نمونه های بافتی به ضخامت حداکثر یک سانتی متر جدا کرده وبا ثبت مشخصات کامل نمونه داخل فرمالین بافر ۱۰٪ انداخته و فیکس گردید(۳). نمونه ها را به آزمایشگاه برده و پس از طی مراحل پاساژ بافت و برش با میکروتوم ، آنها را روی لامهای پلی لایزین قرار داده و جهت بررسی آپوپتوزیس با استفاده از روش استرپتاویدین بایوتین پراکسیداز غیر مستقیم تعدادی از لامها را به روش ایمنوهیستوشیمی تانل ساخت شرکت Promega آمریکا (DeadEndTM Colorimetric TUNEL System G7130)، به شرح زیر رنگ آمیزی کرده و مورد بررسی قرار میدهیم:

ابتدا مقاطع بافتی تهیه شده را پارافین زدائی و آبدهی کرده سپس با پروتئیناز K مجاورنموده و ۱۰۰ میکرولیتر rTdT (۹۸ میکرولیتر بافر اکویلیبراتور + ۱ میکرولیتر بیوتینیلات نوکلئوتید + ۱ میکرولیتر آنزیم rTdT) بر روی هر نمونه بافتی قرار داده و پس ازپوشاندن سطح مقاطع با پوشش پلاستیکی آنها رابه مدت یکساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوباسیون نموده سپس با محلول فسفات بافر شستشو میدهیم. مقاطع بافتی به ترتیب با محلولهای پراکسید هیدروژن، استرپتاویدین HRP، و سپس با محلول دی آمینوبنزیدین مجاور گردیده، سپس با محلول فسفات بافر شستشو داده شدند. در پایان این مراحل قطعات DNA در هسته سلولهای آپوپتوزی به رنگ قهوه ای تیره در زمینه کرم یا زرد روشن دیده میشوند.

## نتایج

در این روش هسته سلولهای آپوپتوزی رنگ قهوه‌ای تیره به خود میگیرد و از سایر سلولها متمایز می‌گردد. همانگونه که در نگاره شماره ۱مشاهده می‌گردد تعداد این سلولها در گروه کنترل بسیار کم (شکلa) ولی در تیمارها با افزایش دز نقره بر تعداد آنها افزوده میشود (اشکالb,c,d). نکته قابل ذکر این است که تنها سلولهای پوششی توبولی دچار آپوپتوز شده و در سلولهای گلومرولها دیده نمی‌شود، در نتیجه میتوان گفت که نقره از راه ترشح توبولی دفع میگردد و تصفیه گلومرولی در دفع آن نقشی ندارد.




شکل۱- تصاویر مقاطع بافتی از نمونه های کلیه در گروه کنترل (a) ،تیماراول۴ppm(b)،تیماردوم۸ppm(c) وتیمارسوم ۱۲ppm(d) که با تانل رنگ آمیزی شدند. در این روش هسته سلولهای آپوپتوزی (پیکان) رنگ قهوه ای تیره به خود میگیرد(x۴۰۰)

آنالیز آماری میانگین تعداد سلولهای آپوپتوتیک در ۱۰ میدان دید میکروسکوپی با استفاده از نرم افزار SAS و روش آنالیز واریانس یک طرفه اختلاف بسیار معنی داری ($p<0/01$) را بین تیمارها و گروه کنترل نشان میدهد که در نمودار زیر قابل مشاهده میباشد. همانگونه که دیده میشود با افزایش غلظت نقره تعداد سلولهای آپوپتوتیک به شدت افزایش میابد.

**جدول ۱- میانگین تعداد سلولهای آپوپتوتیک در تیمارهای مختلف. حروف کوچک نشان دهنده معنی دار بودن اختلاف است.**

| تیمار | کنترل | ۴ppm | ۸ppm | ۱۲ppm |
|---|---|---|---|---|
| تعداد سلولهای آپوپتوتیک | ۰/۸±۰/۸۳$^{c}$ | ۳/۴±۱/۸$^{b}$ | ۱۰/۸±۳$^{a}$ | ۳۲/۸±۶/۵$^{a}$ |

## بحث

نانومواد و نانوذرات به دلیل خواص منحصر به فرد خود اخیرا مورد توجه خاصی قرار گرفته اند. نانو ذرات نقره از جمله این مواد است که دارای خواص ضد میکروبی میباشد و بطور گسترده ای از آن در علوم و صنایع مختلف استفاده می شود(۱). با وجود استفاده گسترده از نانونقره ، مطالعات انجام شده نسبتا اندکی در مورد اثرات بیولوژیکی آن وجود دارد. در این مطالعه اثرات آپوپتوتیک وابسته به دز نانوسیلور که به روش رنگ آمیزی تانل انجام گرفت به خوبی نمایان بود. آپوپتوزیس یا مرگ برنامه ریزی شده سلولی یک پروسهٔ فیزیولوژیکی حیاتی برای نمو فعال و طبیعی و همچنین حفظ هموستازی میباشد اما عوامل دیگری نظیر سموم و برخی باکتریهای پاتوژن داخل سلولی نیز با تغییر در برخی مسیرهای متابولیکی و بیوشیمیایی داخل سلولی می توانند در ایجاد آن دخیل باشند. همانگونه که ملاحظه گردید مقادیر کم نانوسیلور در حد ٤ppm به ندرت اثر آپوپتوزی دارد ولی مقادیر ۸ppm و بیشتر از آن به شدت تعداد سلولهای آپوپتوزی را افزایش داده است.در مطالعات متعددی اثرات سایتوتوکسیک نانوسیلور به اثبات رسیده است (۱۵و٦،۸،۷،۱۲) از جمله نگارنده در تحقیقات قبلی خود اثرات هپاتوتوکسیک و نفروتوکسیک نانوسیلور را بررسی نموده و علاوه بر آن اثر آپوپتوتیک بر سلولهای کبدی را نیز بیان نموده بود( ۵و۱) که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد.در این رابطه Govender و همکاران در سال ۲۰۱۳ بیان کرده اند که نانوسیلور با فعال نمودن مسیر آپوپتوز داخلی وابسته به میتوکندری باعث مرگ سلولهای کارسینوم ریوی انسان میگردد(۱۰). همچنین Jeyaraj و همکاران در سال ۲۰۱۳ در تحقیق خود نشان دادند که نانوسیلور میتواند به طور انتخابی سلولهای سرطان سرویکس را از طریق صدمه به DNA و مرگ سلولی وابسته به کاسپازها (آپوپتوز) مهار نماید(۱۲). Yadav و همکاران در سال ۲۰۱۲ نیز بیان نموده اند که نانوسیلور با دز مشخص و کنترل شده میتواند سلولهای سرطان سینه را دچار آپوپتوز نماید (۱۵). AshaRani و همکاران در سال ۲۰۰۹ نقش نانویسلور را در صدمه به DNA و میتوکندری و کاهش ATP و در نتیجه مرگ در اثر آپوپتوز را بیان نموده اند(٦). Hsin و همکاران در سال ۲۰۰۸ در مقاله خود بیان نموده اند که نانوسیلور آپوپتوز وابسته به میتوکندری را در فیبروبلاستها در اثر آزاد کردن سیتوکروم c و جابجایی Box در سیتوزول میتوکندریها و نیز در اثر تولید رادیکالهای آزاد اکسیژن (ROS) و فعال کردن JNK القاء میکند(۱۱). همچنین Sung و همکاران در سال ۲۰۰۸ نقش ضد التهابی نانوسیلور را در اثر القاء آپوپتوز در سلولهای التهابی نشان داده اند (۱۳). Braydich و همکاران در سال ۲۰۰۵ نیز کاهش عملکرد میتوکندری سلولها واسترس اکسیداتیو ناشی از کاهش گلوتاتیون و افزایش سطح گونه های فعال اکسیژن (ROS) را عامل ایجاد آسیبهای سلولی میدانند (۷). نانوذرات نقره با پروتئینها و آنزیمهای دارای گروههای تیول در سلولهای پستانداران واکنش می دهند. این پروتئینها و آنزیمهای تیول دار مانندگلوتاتیون (Glutathione)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و تیوردوکسین (Thioredoxin) عوامل مهم مکانیسم دفاعی آنتی اکسیدان سلول و مسئول خنثی کردن استرس اکسیداتیو ناشی از گونه های فعال اکسیژن تولید شده در میتوکندریها هستند. نانوذرات نقره این مکانیسم دفاعی آنتی اکسیدانی سلول رامختل کرده در نتیجه منجر به تجمع گونه های فعال اکسیژن میشود. تجمع بیش از حد گونه های فعال اکسیژن میتواند باعث تخریب غشاء میتوکندری و انتشار عوامل آپوپتوژنیک (apoptogenic) مانند سیتوکروم c شود که نتیجه نهایی آن بروز آپوپتوز میباشد. به نظر Vaidyanathan در سال ۲۰۰۹ یون نقره میتواند با مداخله در زنجیره انتقال الکترون در تنفس سلولی مسیر داخلی آپوپتوز را از طریق فعال سازی کاسپاز-۳ آخرین

مولکول آبشار کاسپازها به راه بیاندازد (۱٤). Gopinath و همکاران در سال ۲۰۰۸ نیز بیان کرده اند که نقره با توانایی عبور از غشاء سلول باعث القاء آپوپتوز، و یا پارگی غشاء و درنتیجه نکروز سلول می‌شود (۹). نتایج حاصل از این تحقیق نیز به وضوح اثرات القای آپوپتوز توسط نانوذرات نقره را نشان می‌دهد که با نتایج حاصل از مطالعات فوق همخوانی دارد. به هر حال آنچه که از نتایج فوق برمی آید این است که نانو ذرات نقره با مهار عوامل آنتی اکسیدان از جمله GSH و SOD از خنثی شدن رادیکالهای آزاد موجود در سلول از جمله گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) ممانعت به عمل آورده و در نتیجه این عوامل مخرب فرصت پیدا میکنند که آسیبهای خود را بروز دهند. از جمله مکانهایی که توسط این عوامل مورد حمله قرار می‌گیرد غشاءهای اندامکها به ویژه میتوکندری و غشاء سلولی می باشد. صدمه به غشاء میتوکندری باعث آزاد شدن سیتوکروم c و به راه افتادن آبشار کاسپازها شده که نتیجه آن آپوپتوزیس میباشد. از طرف دیگر صدمه به غشاء سلولی باعث ایجاد نکروز سلولها و رها شدن عوامل کموتاکتیک و متعاقبا فراخوانی سلولهای التهابی به محل آسیب می‌گردد. حال بسته به اینکه کدام غشاء (غشاء میتوکندری یا غشاء سلولی) زودتر آسیب ببیند ممکن است آپوپتوز و یا نکروز اتفاق بیافتد.

## منابع


۱- اکرادی ل.، امیری اندی م.، سلیمی ناغانی ا.، احمدی ف. (۱۳۹۰): بررسی اثرات نفروتوکسیک نانوسیلور در ماکیان گوشتی. مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج، سنندج، ایران، ۵(۲): ۲۵-۳۱.

۲- پوستی ا.، ادیب مرادی م.، فضیلی ا. (۱۳۸۵): بافت شناسی مقایسه ای، چاپ ششم، انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ایران، صفحه: ۳۵۰-۳۳۷.

۳- ساسانی ف. (۱۳۸۳): اصول کالبد گشایی و نمونه برداری، انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ایران، صفحه: ۲۰٤-۱۹۰

٤- سهرابی ا.، مرتضوی پ.، جمشیدی ک. (۱۳۸٦): آسیب شناسی عمومی دامپزشکی، انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران، تهران، ایران، صفحه: ۳۰-۲۵

5- Akradi, L., Sohrabi Haghdoost I., Djeddi A.N., Mortazavi, P., (2012): Histopathologic and apoptotic effect of nanosilver in liver of broiler chickens. Afr. J.Biotech.11 (22): 6207-6211.

6- AshaRani, P.V., Grace, L. K. M., Manoor, P.H., Suresh, V., (2009): Cytotoxicity and Genotoxicity of SilverNanoparticles in Human Cells.acsnano.3 (2): 279–290.

7- Braydich-Stolle, L., Hussain, S., Schlager, J.J., Hofmann, M.C., (2005): In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. Toxicol. Sci. 88:412-419.

8- Eun, J.P., Jongheop, Y., Younghun, K., Kyunghee, C., Kwangsik, P., (2010): Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. Toxicol.In Vitro. 24: 872–878.

9- Gopinath, P., Gogoi, S.K., Chattopadhyay, A., Gosh, S.S., (2008): Implications of silver nanoparticle induced cell apoptosis for in vitro gene therapy. J. Nanotech. 1 (19):4-10.

10- Govender, R., Phulukdaree, A., Gengan, R.M., Anand, K., Chuturgoon, A.A., (2013): Silver nanoparticles of Albizia adianthifolia: the induction of apoptosis in human lung carcinomacell line. J. Nanobiotech.11:5

11- Hsin,Y.H., Chen, C.F., Hnang, S., Shih, T.S., Lai,P.S.,Chneh,P.T., (2008): The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. 10; 179(3):130-9.

12- Jeyaraj, M., Rajesha, M., Arunb, R., Davoodbasha, M., Gnanasekar, S., Ganeshan, S., Gnanajothi, K.D., Markandan, M., Kumpati, P., Nooruddin, T., Andy, G., (2013): An investigation on the cytotoxicity and caspase-mediated apoptotic effect of biologically synthesized silver nanoparticles using Podophyllum hexandrum on human cervical carcinoma cells. Colloids and Surfaces. Biointer. 102:708– 717.

13- Sung, J.H., Ji, J.H., Yoon, J.U., Kim, D.S., Song, M.Y., Jeong, J., Han, B.S., Han, J.H., Chung, Y.H., Kim, J., Kim, T.S., Chang, H.K., Lee, E.J., Lee, J.H., Yu, I.J., (2008): Lung function changes in Sprague-Dawley rats after prolonged inhalation exposure to silver nanoparticles. Inhal. Toxicol. 20:567_574.

14- Vaidyanathan, R., Kalishwaralal, K., Gopalram, S., Gurunathan, S., (2009): Nanosilver-The burgeoning therapeutic molecule and its green synthesis.:924-937.

15- Yadav, S., Seer, H., Murthy, R.R., (2012): Cytotoxic, apoptotic and anti angiogenic efficacy of silver nanoparticles, synthesized using tannic acid as reducing agent under controlled temperature. Ijprb. 1(5): 160-177.