

## Research Paper

# Toxicity and Teratogenic Effects of Zinc Sulfide Nanoparticles on Chick Embryo and Chick Fibroblast Cell Culture



\*Asadollah Asadi<sup>1</sup>, Arash Abdolmaleki<sup>2,3</sup>

1. Department of Biology & Geology, Faculty of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
2. Department of Engineering Sciences, Faculty of Advanced Technologies, University of Mohaghegh Ardabili, Namin, Iran.
3. Department of Engineering, Faculty of Advanced Technologies, Sabalan University of Advanced Technologies, Namin, Iran.



**Citation** Asadi A, Abdolmaleki A. [Evaluation of Toxic and Teratogenic Effects of Zinc Sulfide Nanoparticles on Chicken Embryos and Fibroblastic Cells Culture (Persian)]. Quarterly of "The Horizon of Medical Sciences". 2019; 25(4):270-281. <https://doi.org/10.32598/hms.25.4.270>

<https://doi.org/10.32598/hms.25.4.270>



Received: 27 Jan 2019

Accepted: 23 Jul 2019

Available Online: 01 Oct 2019

### Key words:

Nanoparticles, Toxicity, Malformation, Chick embryo, Zinc sulfide

## ABSTRACT

**Aims** Nanoparticles (particles with a diameter of 10-500 nm) are currently used in the cosmetics industry as well as for pharmaceuticals, diagnostic imaging, and tissue engineering. Since these nanoparticles are used in industry and drug delivery, they can also be used by pregnant women. Thus, the current study investigated the teratogenic and cytotoxic effects of Zinc Sulfide (ZnS) nanoparticles on the embryo and their fibroblastic cell culture.

**Methods & Materials** Zinc sulfide (ZnS) nanoparticles were synthesized. Then, nanoparticles at the concentrations of 5, 10, 15, 30, and 40 mg/mL/egg were injected into the air sac of the eggs in three replicates on the third day of incubation. Next, the treated and control eggs, on day 19 of incubation were opened, and embryos were weighted, and the relevant mortality rate was recorded. Fibroblast cells were isolated, cultured, and treated from the control embryo, and morphological changes and cell survival percentages were recorded.

**Findings** The obtained results revealed that the embryos' survival rate depends on the nanoparticle concentration. As a result, at the highest concentration, only 36.32% of the embryos survived, and the lethal dose 50% (LD50) was equal to 32.47 mg/egg. Morphological study of the treated embryos club foot and skeletal staining suggested the deletion of caudal vertebrae. The cytotoxicity study results of ZnS nanoparticles on fibroblastic cells indicated the survival fractions of 88.45%, 68.75%, and 49.32%, respectively, and its IC50 value was measured as 1460 µM.

**Conclusion** The present study results suggested that ZnS nanoparticles had no significant toxic effects on the embryos and culture of chicken fibroblastic cells at low concentrations.

## Extended Abstract

# N

### 1. Introduction

anoparticles (particles with a diameter of 10-500 nm) are currently used in the cosmetics industry as well as for pharmaceuticals, diagnostic imaging, and tissue engineering. Since

these nanoparticles are used in industry and drug delivery, they can also be used by pregnant women. Thus, the current study investigated the teratogenic and cytotoxic effects of Zinc Sulfide (ZnS) nanoparticles on the embryo and their fibroblastic cell culture.

### \* Corresponding Author:

Asadollah Asadi, PhD.

Address: Department of Biology & Geology, Faculty of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

Tel: +98 (45) 31505187

E-mail: [asad.asady@gmail.com](mailto:asad.asady@gmail.com)

## 2. Methods

Asadi et al. evaluated the effects of nano polymer BDP18, as a carrier with slow drug-release property used in cancer treatment on chick embryos. Their results indicated that BDP18 has low toxic and teratogenic effects only at high doses; therefore, it can be used at low concentrations as an effective drug release system [1]. In another study, the toxic and physiological effects of platinum nanoparticles widely used in the treatments were estimated on chick embryo development. The relevant results reflected that these nanoparticles induce apoptosis in the brain tissues [2].

Ninety Ross hatching eggs were obtained from a local company (Arta Jujeh). The research was carried out in the research laboratory of the Biology Department of Mohaghegh Ardabili University in Summer 2018.

### Sampling

In this study, a random sampling method was used. Moreover, for each concentration, on average, 3 groups of 5 samples were selected.

### Tools

Alizarin red staining, culture medium, Dimethyl Sulfoxide (DMSO), Multi-and Table Tournament (MTT) colorimetric assay were used in the present research.

## 3. Results

The morphological examination of embryos suggested low abnormalities in the treated specimens; no abnormality was observed up to the concentration of 30 mg/mL per egg. The assessment of the relationship between treatment concentration and frequency of survived embryos revealed a lethal dose 50% (LD50) of 32.47 mg/egg. The results of the effect of 500, 1000, and 1500  $\mu$ M ZnS concentrations on chick embryo fibroblastic cells after 16 hours reported the survival fractions of 88.45%, 68.75%, and 49.32% respectively. Therefore, it can inhibit cell growth with an LC50 of 1460  $\mu$ M.

## 4. Discussion

Studies have indicated that embryonic mortality after injection into the egg can be due to the destruction and disruption of embryonic homeostasis, as well as the susceptibility of embryos to their developmental stage [3]. Many researchers have demonstrated the teratogenic effect of antibiotics and growth factors when injected into the egg during the first week of pregnancy [4]. Various nanopar-

ticles have been generated and used as contrast agents in diagnosis and imaging, as well as drug delivery [5].

The effect of ZnS nanoparticles on chick embryos resulted in the skeletal malformations of the caudate vertebrae. This may be due to its direct effect on the loss of embryonic cells growing in the caudate vertebra. In this regard, evaluating the effect of methotrexate in rats suggested that most of the abnormalities in rats were due to the injections of methotrexate confined to caudal vertebrae [6]. Previous studies have indicated that the bones of the lower extremities are more prone to be affected by teratogenic drugs [7]. Barnes et al. (1996) argued that valproic acid reduces the transcription rate of Pax1 in chicken somites [8].

Studnicka et al. examined the effect of nanoparticles of silver/palladium alloy on chicken embryo development; they concluded that these nanoparticles do not affect embryo growth and weight [9]. Bavanilatha and Stanley assessed the effect of silver nanoparticles on chicken embryo. Heart, eye, and liver tissues were examined after chickens were injected on day 18 of incubation. Their results reflected no changes in heart, eye, and liver tissue cells [10]. In another study, teratogenic and cytotoxic effects of salen-vanadium complex on chicken embryos, hepatic, and fibroblastic-cell cultures were evaluated. According to their results, at high concentrations in the culture medium, fibroblastic cells became dense, and their interconnections were loosed [28].

### Recommendations

It is recommended to investigate the chemical properties of nanoparticles and provide further information in this respect.

### Limitations

There were no limitations to the current study.

## 5. Conclusion

The threshold effect of ZnS nanoparticles in this study was 32.47 mg/mL per egg. It had no significant effects on the chick embryo at lower doses and no morphological and skeletal teratogenic effects at doses lower than the threshold value. Therefore, when using ZnS in various industries, such as pharmacy, cosmetics production, and other related industries, its threshold level of toxicity and malformations for embryo should be considered.

## Ethical Considerations

### Compliance with ethical guidelines

All animal experiments were carried out in accordance with local University of Mohagheh Ardabili (UMA) committee for Human and Animal ethics.

### Funding

University of Mohagheh Ardabili support the financial of this study.

### Authors' contributions

Participated in research design: Asadollah Asadi, Conducted experiments: Arash Abdolmaleki; Performed data analysis, wrote or contributed to the writing of the manuscript: All authors.

### Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

### Acknowledgements

The authors would like to thank the Research Council of University of Mohagheh Ardabili for the financial support of this study.

## بررسی اثرات سمیت و تراژونیک نانوذرات سولفید روی بر جنین جوجه و کشت سلول‌های فیبروبلاستی جوجه

\*اسداله اسدی<sup>۱</sup>، آرش عبدالملکی<sup>۲،۳</sup>

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، سلیمان، نمین، ایران.

### چکیده

تاریخ دریافت: ۰۷ بهمن ۱۳۹۷

تاریخ پذیرش: ۰۱ مرداد ۱۳۹۸

تاریخ انتشار: ۰۹ مهر ۱۳۹۸

**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 سیتوتوکسیسیته 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 تیمار شده 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 نانوذرات دارد؛ به طوری که در بالاترین غلظت تنها ۳۶/۳۲ درصد از جنین‌ها زنده ماندند و میزان (LD<sub>50</sub>) دز کشنده در ۵۰ درصد جمعیت برابر با ۳۲/۴۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر / تخم مرغ برآورد شد. از نظر شکل ظاهری، ناهنجاری از نوع پانچگی و از نظر ناهنجاری‌های اسکلتی، حذف مهره‌های دمی مشاهده شد. نتایج بررسی سایتوتوکسیسیته نانوذرات سولفید روی بر سلول‌های فیبروبلاستی جنین نشانگر کسر زنده‌مانی ۸۸/۴۵، ۶۸/۷۵ و ۴۹/۳۲ درصد بود و میزان IC<sub>50</sub> 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

خطر ذاتی نانوذرات، تولیدشان و همچنین قرار گرفتن در معرض آن‌هاست. مطالعات انجام‌شده روی برهمکنش نانوذرات با جنین در حال تکوین، به لحاظ کاربردی و سم‌شناسی اهمیت ویژه‌ای دارد. قرار گرفتن جنین در معرض دُزهای مختلف نانوذرات حتی ممکن است روی خصوصیات تراژولوژی و حتی زنده ماندن 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 غشا، آزادسازی مواد سمی و پاسخ‌های ایمنولوژیک است [۳، ۴]. نانوذرات در حال حاضر از طیف وسیعی از مواد ساخته می‌شوند. معمول‌ترین آن‌ها نانوذرات سرامیکی است که به دو

حوزه فناوری نانو به سرعت 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 در نتیجه افزایش قرار گرفتن انسان در معرض این ترکیبات نیاز فزاینده به بررسی اثرات زیان‌آور آن‌ها وجود دارد [۲].

\* نویسنده مسئول:

دکتر اسداله اسدی

نشانی: اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی.

تلفن: ۳۱۵۰۵۱۸۷ (۴۵) ۰۹۸+

پست الکترونیکی: asad.asady@gmail.com

تکوین اسکلت جنین جوجه نه تنها در مطالعات جنین‌شناسی تجربی و ترانژنومیک 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 به راحتی کشت داد. مزایای مذکور راه را برای بسیاری از تحقیقات که نیاز به میکروجرراحی 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 سیتوتوکسیسیته 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 کامل شدن 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 خشک کردن، 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)

بخش سرامیک‌های اکسید فلزی نظیر اکسیدهای 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<sup>۱</sup> برای پاک‌سازی هوا و تصفیه آب و فاضلاب که تشکیل یک‌سری فرایندهایی به نام فناوری‌های اکسیداسیون پیشرفته 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 ترانژنومیک کمی را فقط در دُرهای 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

1. Photocatalysis
2. Advanced Oxidation Technologies (AOTs)

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 ایجاد شده 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<sup>۶</sup> 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 به دست آمده سانتریفیوژ شد و به محیط کشت تازه (RPMI) همراه با آنتی‌بیوتیک منتقل و در فلاسک‌های T75 کشت شد. سپس در پاساژ سوم درون پلیت‌های ۲۴ خانه کشت شد [۱۴].

### بررسی سمیت سلولی

برای بررسی اثرات سایتوتوکسیسیته نانوذر سولفید روی، از ارزیابی MTT<sup>۸</sup> که روشی برای بررسی قابلیت زنده‌مانی سلول‌ها و تعیین سمیت سلولی ترکیبات مورد استفاده 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 غیر محلول 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 ۹۶ خانه‌ای است. ۲۴ ساعت پس از کشت سلول‌ها، زمانی که سلول‌ها از نظر تعداد برای اثر دادن ترکیب مورد نظر آماده شدند، غلظت‌های ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکرومولار به مدت ۱۶ ساعت روی سلول‌ها اثر داده می‌شدند. سپس ظروف کشت ۹۶ خانه‌ای در داخل انکوباتور قرار داده شد و در مقاطع زمانی خاص پس از تیمار مورد نظر، هر کدام از ظرف‌های کشت از داخل انکوباتور خارج و به هریک از خانه‌های آن‌ها در شرایط استریل، بدون خارج کردن محیط کشت، ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT تازه تهیه شده 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 هر کدام از آن‌ها ۲۰۰ میکرولیتر از DMSO<sup>۹</sup> اضافه شد. همان‌طور که می‌دانیم DMSO بلورهای فورمازان بنفش رنگ را در داخل خود حل می‌کند و به حالت محلول درمی‌آورد. با

خریداری شد. تخم مرغ‌ها در شرایط دمایی مناسب ۱۰ تا ۱۲ درجه سلسیوس نگهداری شدند. برای بررسی فعالیت بیولوژیکی نانوذرات سولفید روی<sup>۲</sup> در آب مقطر دو بار تقطیر شده، حل شد و سپس در روز سوم گرماگذاری، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول‌های نانوذرات سولفید روی در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۳۰ و ۴۰ میلی گرم در میلی لیتر / تخم مرغ و با استفاده از سرنگ هاملتون 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 آب مقطر 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 سمیت و تراژونیک

تخم مرغ‌های تیمار شده 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.

$$\text{درصد مرگ‌ومیر شاهد} - \text{درصد مرگ‌ومیر تیمار} \times 100 = \text{درصد مرگ‌ومیر} \\ \text{درصد مرگ‌ومیر شاهد} - 100$$

به منظور بررسی ناهنجاری‌های مورفولوژیکی، جنین‌ها پس از بیرون آمدن از تخم، از نظر هرگونه ناهنجاری ظاهری قابل تشخیص معرفی شده توسط رومانوف<sup>۴</sup> در کتاب «پاتوزنز و ناهنجاری‌شناسی جنین پرندگان» بررسی و نوع ناهنجاری‌های ظاهری قابل تشخیص با چشم در مقایسه با گروه کنترل ثبت شد. جهت بررسی ناهنجاری‌های اسکلتی جنین، روش سریع شفاف‌سازی و رنگ‌آمیزی نمونه‌ها برای نشان دادن 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<sup>۵</sup> قرار گرفتند. سپس، جنین‌ها در محلول یک درصد هیدروکسید پتاسیم حاوی آلزارین قرمز (۰/۱ درصد) به مدت سه روز رنگ‌آمیزی

6. Phosphate buffered saline

7. Roswell park memorial institute medium

8. (4,5-dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

9. Dimethylsulfoxide

3. Zinc Sulfide (ZnS)

4. Romanoff

5. Potassium Hydroxide (KOH)

بود. به عبارتی دیگر، افزایش مرگومیر نسبت به افزایش غلظت نانوذرات سولفید روی در سطح پنج درصد معنی دار است (تصویر شماره ۱).

بررسی ریخت‌شناسی ظاهری جنین‌ها نشانگر ناهنجاری‌های محدودی در نمونه‌های تیمار بود؛ به طوری که تا غلظت ۳۰ میلی گرم بر میلی لیتر / 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 تیمار شده با نانوذرات سولفید روی در مقایسه با گروه شم مشاهده نشد.

بررسی ساختار اسکلتی جنین‌های تحت تیمار نشان داد تا غلظت ۳۰ میلی گرم بر میلی لیتر / 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 دز کشنده، ۵۰ درصد سلول‌ها ( $IC_{50}$ ) برابر ۱۴۶۰ میکرومولار رشد سلولی را مهار می‌کند. نتایج حاصل از مطالعات مورفولوژیک سلول‌های تیمار شده نشان داد با افزایش غلظت نانوذرات سولفید روی در سلول‌های فیبروبلاستی اتصالات بین سلولی گسسته می‌شود، سلول‌ها گرد و حاشیه آن‌ها نامنظم می‌شوند. همچنین در سلول‌های تیمار شده، گرانول‌های سیتوپلاسمی افزایش یافته و در غلظت ۱۵۰۰ میکرومولار سلول‌ها کاملاً متراکم شده و توده متراکم سلولی به تدریج گسسته می‌شود (تصویر شماره ۴).

حل شدن کامل بلورها و ایجاد محلول‌های یکنواخت، جذب نوری هر کدام 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<sup>۱</sup>، جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن<sup>۱۱</sup> و برای محاسبه  $LD_{50}$  از ارزیابی پروبیت<sup>۱۲</sup> استفاده شد. سطح معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) به عنوان مرز استنتاج آماری قرار داده شد.

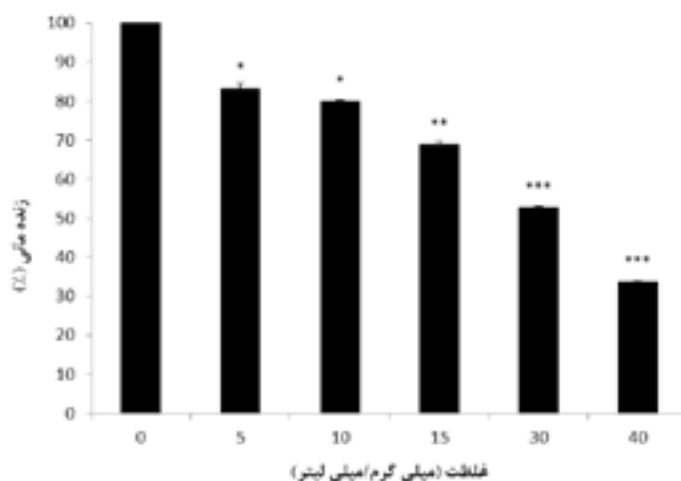
### یافته‌ها

سه گروه آزمایشی پنج‌عددی و در مجموع ۱۵ تخم مرغ برای هر غلظت و یک گروه شم ۱۵ عددی 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 میلی گرم در میلی لیتر / تخم مرغ به ترتیب ۸۳/۳۴، ۶۸/۹، ۵۲/۸۵ و ۳۳/۷۵ درصد در روز نوزدهم زنده مانده‌اند. بررسی رابطه خطی بین غلظت تیمار و درصد جنین‌های زنده مانده بیانگر  $LD_{50}$  برابر ۳۲/۴۷ میلی گرم / تخم مرغ بود. بررسی آماری داده‌ها نشان داد اختلاف بین گروه کنترل و هر یک از غلظت‌های مورد بررسی در سطح ۵ درصد معنی دار است. همچنین مقایسه اختلاف بین غلظت‌های تیمار نیز در سطح ۵ درصد معنی دار

10. ANOVA

11. Duncan

12. Probit



### فوق دانش

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

$***P < 0.001$  و  $**P < 0.01$ ،  $*P < 0.05$

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

تخریب و به هم خوردن تعادل هوموستازی جنینی به علت تزریق مواد باشد و همچنین حساسیت جنین‌ها به مرحله رشد و نمو آن‌ها وابسته است [۱۶، ۱۵]. بسیاری از محققین اثر تراژونیک آنتی‌بیوتیک‌ها و عوامل رشد را وقتی که در طول هفته اول جنینی درون تخم تزریق می‌شوند اثبات کرده‌اند [۱۸، ۱۷]. 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

### بحث

مطالعه حاضر نشان داد تزریق نانوذرات سولفید روی در روز سوم انکوباسیون به تخم مرغ‌های نطفه‌دار سبب کاهش در بیرون آمدن جوجه‌ها و تأخیر در بیرون آمدن 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 به شدت تحت تأثیر قرار می‌دهد نمی‌توان این غلظت‌ها را از نظر تراژونیک 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



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

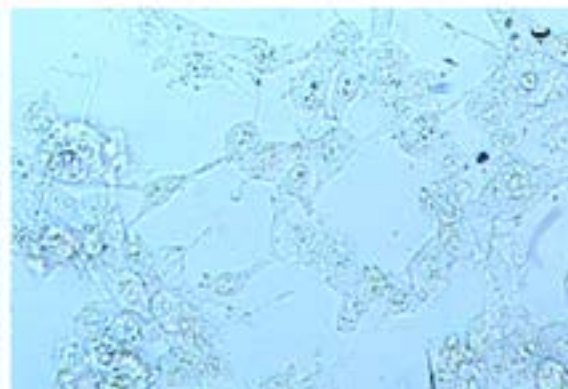
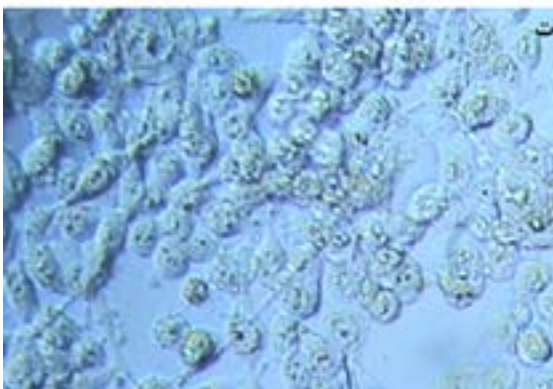
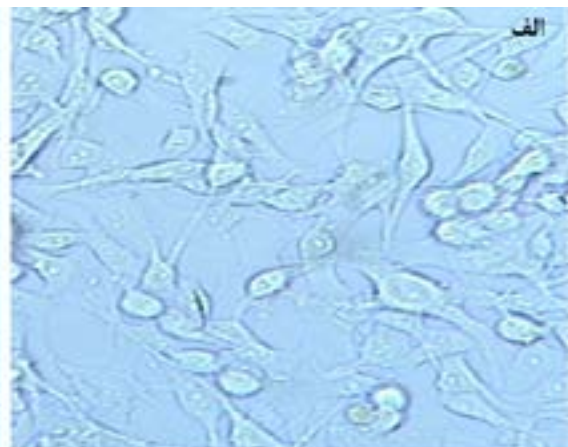
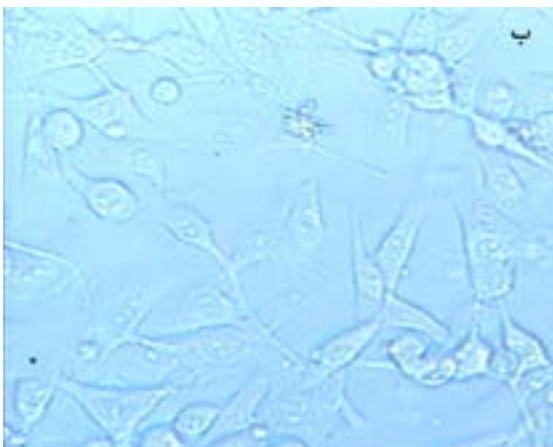




افتخ دانش

تصویر ۳. ناهنجاری اسکلتی

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



افتخ دانش

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

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

روی در صنایع 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 توکسیته 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

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی تقدیر و تشکر می‌شود.

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

استودنیکا و همکارانش در سال ۲۰۰۹ اثرات نانوذرات آلیاژ نقره-پالادیوم 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 مشاهده شده، تحت تأثیر نانوذرات سولفید روی پانچگی 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 متصل شدن 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 تراژونیک 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 بین سلولی، 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 بیرون آوردن 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 تراژونی از نظر مورفولوژیکی و اسکلتی در دُزهای پایین‌تر از آستانه مشاهده نشد. از این رو، هنگام استفاده از نانوذرات سولفید

## 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, Decuyper 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 (*Haliciona implexiformis*). *Journal of Pharmacy Research*. 2010; 3(10):2552-4.

