ژنتیک نوین
دوره هشتم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۲
صفحه ۲۶۰-۲۵۱

مطالعه صدمات ناشی از نانوذرات نقره بر سلول‌های لاین گناد ماهی قزل آلای رنگین کمان در شرایط *in vitro*

Study of damage induced by silver nanoparticles on rainbow trout gonadal cell lines *in vitro* conditions

محمود قبادی[۱]، حمید فرحمند*[۲]، علی میرجلیلی[۳]

۱و۲- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد و دانشیار گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران
۳- استادیار، بخش بیوتکنولوژی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

Ghobadi M[1], Farahmand H*[2], Mirjalili M[3]

1, 2. Graduate MSc and Associate Professor, Faculty of Natural Resources, Department of Fisheries and Environmental Sciences, University of Tehran, Karaj, Iran
3. Assistant professor, Department of Biotechnology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: hfarahmand@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۱/۲/۲۲ – تاریخ پذیرش: ۹۱/۷/۴)

چکیده

این تحقیق با هدف بررسی اثرات سمیت سلولی و ژنتیکی نانوذرات نقره (nano-Ag)، در شرایط *in vitro* و با استفاده از سلول‌های لاین فیبروبلاستی گناد ماهی قزل آلای رنگین‌کمان (RTG-2 Cell line) به عنوان مدل آزمایشگاهی، انجام گرفت. آزمایش با ۹ تیمار از غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره (نانوسید) با میانگین اندازه کمتر از ۱۰ نانومتر، شامل صفر (گروه کنترل)، ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۵، ۱۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر، انجام گرفت. سلول‌ها در معرض غلظت‌های مورد نظر، قرار داده شدند و بعد از گذشت ۲۴ ساعت اثرات سمیت سلولی و سمیت ژنتیکی مورد سنجش قرار گرفت. همچنین اثر نانوذرات نقره بر روی رشد و مورفولوژی سلول‌ها، در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از در معرض نانوذرات نقره بودن، مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان دادند نانوذرات نقره دارای اثرات سمیت سلولی و ژنتیکی بر سلول‌های ماهی می‌باشند که این اثرات وابسته به غلظت است. نتایج حاصل از آزمون سمیت سلولی نشان داد که با افزایش غلظت نانوذرات نقره اثرات سمیت سلولی آن‌ها افزایش می‌یابد به طوری که در غلظت ۵۰ µg/ml تمامی سلول‌ها از بین رفتند. همچنین نتایج آزمون سمیت ژنتیکی نشان‌دهنده افزایش در فراوانی ریز هستک‌ها در تیمارهای مورد آزمایش در مقایسه با گروه شاهد بودند. به طوری که تیمار ۱ µg/ml با ۲۳۲ درصد ($P<۰/۰۵$) و تیمار ۵ µg/ml با ۲۵۱ درصد و تیمار ۱۰ µg/ml با ۲۶۱ درصد ($P<۰/۰۰۱$) افزایش در فراوانی ریز هستک‌ها نسبت به گروه کنترل، اختلاف کاملا معنی داری را نشان دادند. در نتیجه‌گیری کلی می‌توان بیان نمود به دلیل گستردگی تولید و مصرف محصولات حاوی نانوذرات نقره، احتمال رهایش این نانوذرات در محیط زیست آبی، دور از ذهن نیست. لذا این موضوع، لزوم مطالعه اثرات زیست محیطی رهایش این نانوذرات و راهکارهای جلوگیری یا کاهش این اثرات را، تأکید می‌نماید.

واژه‌های کلیدی

سمیت سلولی، ماهی، مورفولوژی، نانوذرات نقره، سمیت ژنتیکی

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.3.4.0]

مقدمه

استفاده از نانوذرات، در سطح جهان هر روزه در حال افزایش است ولی هنوز اطلاعات محدودی در مورد اثرات زیست محیطی آن‌ها، به ویژه برای موجودات آبزی در دسترس است (Farkas et al. 2011). نانو ذرات[1] موادی هستند که ابعاد آن‌ها بین ۱۰ تا ۱۰۰ نانومتر باشد (ASTM International 2006). این اندازه بسیار کوچک ویژگی‌های خاصی مانند سطح بسیار زیاد و واکنش پذیری بالا به آن‌ها می‌دهد که باعث شده نگرانی‌ها در مورد اثرات مضر آن‌ها بیشتر شود (Auffan et al. 2009). نانوذرات نقره اغلب به دلیل خواص ضد باکتریایی آن مورد استفاده قرار می‌گیرد (Farkas et al. 2011). Soltani et al. (2009) در مطالعه‌ای نشان دادند نانوذرات نقره با غلظت ۱۰ تا ۱۵ میکروگرم بر میلی لیتر، اثرات کشنده بر چهار گونه باکتری بیماری‌زا در ماهی‌ها شامل *Streptococcus iniae*، *Lactococcus garvieae*، *rucker Yersinia* و *Aeromonas hydrophila* دارند. امروزه در محصولات گوناگونی مانند پارچه، تجهیزات پزشکی، دستگاه‌های نگهداری غذا، لوازم آرایشی و غیره از نانوذرات نقره استفاده می‌شود (Cheng et al. 2004; Chen and Schluesener 2008). این در حالی است که سرنوشت نانوذراتی که در حین تولید و یا استفاده از این محصولات در محیط زیست رها می‌شوند، نامعلوم باقی مانده است. مطالعات اخیر نشان داده که به دلیل گستردگی محصولاتی که امروزه از نانوذرات نقره تولید می‌شود، رهایش و انتقال به محیط زیست آبی، بسیار محتمل است (Farkas et al. 2011). این در حالی است که در میان تعداد زیادی از نانوذرات در دسترس، نانوذرات نقره[2] از توجه و نگرانی خاص برای محیط زیست آبی برخوردار است چرا که نقره یونی، به عنوان یکی از مهمترین فلزات سمی برای ماهی‌ها و دیگر جانداران آبزی محسوب می‌شود که حتی در غلظت‌های بسیار پایین در حد میکروگرم بر لیتر کشنده می‌باشد (Davies et al. 1978).

مطالعات اخیر نشان داده که نانوذرات نقره به عنوان منبع یون نقره عمل می‌کنند. در مطالعه‌ای بر روی جلبک *Chlamydomonas reinhardtii* مشخص شده که نانوذرات نقره به عنوان منبع یون نقره عمل کرده و به مقدار زیادی در این پلانکتون‌ها تجمع می‌یابد و می‌تواند در طول زنجیره غذایی به سطوح تغذیه‌ای بالاتر و حتی سرانجام به انسان منتقل شود (Navarro et al. 2008). همچنین نانو ذرات در موجودات آبزی مانند صدف‌ها، سخت پوستان و ماهی‌ها نیز جذب و تجمع می‌یابد (Kashiwada 2006; Lee et al. 2007; Tao et al. 2009; Ward and Kach 2009). Griffitt et al. (2009) نشان دادند میزان یون نقره در بدن ماهی زبرا (*Danio rerio*) پس از قرار گرفتن در معرض ۱۰۰۰ میکروگرم بر لیتر نانوذرات نقره، به میزان بسیار زیادی افزایش یافت. آزمایشات *In vivo* نشان دادند نانوذرات نقره با اندازه میانگین ۲۰ نانومتر با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر، برای ماهی آزاد اقیانوس اطلس[3] (*Salmo salar*) کشنده می‌باشد و در غلظت‌های کمتر از آن باعث واکنش های بیومارکرهای تحت کشنده[4] می‌شود (Farkas et al. 2011). همچنین در مطالعه‌ای دیگر به صورت *In vivo*، عوارض جانبی نانو نقره بر ماهی زبرا (*Danio rerio*)، دافنی و دو گونه جلبک، گزارش شده است (Griffitt et al. 2008, 2009).

رفتار نانوذرات در محیط زیست آبی، تا حدود زیادی به خواص نانوذرات و شرایط زیست محیطی بستگی دارد؛ مانند خواص سطحی نانوذرات، خواص فیزیکی آن‌ها، قدرت یونی آن‌ها، pH محیط و حضور مواد آلی در محیط (Domingos et al. 2009; El Badawy et al. 2010). از آنجا که در آزمایشات مربوط به اثرات آلایندگی نانوذرات، در شرایط *In vivo*، کنترل تمام این شرایط بسیار دشوار می‌باشد لذا مطالعات اخیر بیشتر به سمت آزمایشات در شرایط *in Vitro*، و به خصوص با استفاده از سلول‌های لاین[5] (تیره‌های سلولی)، سوق یافته‌اند. در مطالعات اخیر تجمع نانوذرات در سلول‌هایی مانند ماکروفاژها و سلول‌های کبدی نشان داده شده است (Witsap et al. 2009; Johnston et al. 2010). مطالعات *in Vitro* اثرات سمی (سمیت سلولی[6] و ژنتیکی[7]) نانوذرات را به خوبی در سلول‌های کبد موش[8] ، سلول‌های

[1] Nanoparticle
[2] Nano-Ag
[3] Atlantic salmon
[4] Sub-lethal biomarker responses
[5] Cell lines
[6] Cytotoxicity
[7] Genotoxicity
[8] BRL 3A Cells

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.3.4.0]

فیبروبلاست انسانی[1] و سلول‌های کبدی انسان[2] و سلول‌های لاین ماهی[3] نشان داده‌اند (Hussain et al. 2005; Lee et al. 2007; Griffitt et al. 2009). بررسی اثرات سمیت ژنتیکی نانوذرات نقره بر سلول‌های لاین ماهی مداکا[4] (*Oryzias latipes*)، نشان داد که نانوذرات نقره حتی می‌توانند باعث اختلالات کرموزومی[5] شوند (Wise et al. 2010).

با توجه به مطالب ذکر شده، با اینکه تحقیقات در سطح جهان در زمینه نانوفناوری در سال‌های اخیر به سمت بررسی اثرات مخرب زیست محیطی آنها سوق یافته است، متأسفانه در ایران تحقیقات در این زمینه بسیار اندک می‌باشد. لذا این تحقیق با هدف بررسی اثرات سمیت سلولی و ژنتیکی نانوذرات نقره در شرایط *in Vitro* و با استفاده از سلول‌های لاین فیبروبلاستی گناد ماهی قزل آلای رنگین کمان[6] (RTG-2) به عنوان مدل آزمایشگاهی، انجام گرفت.

گرفت.

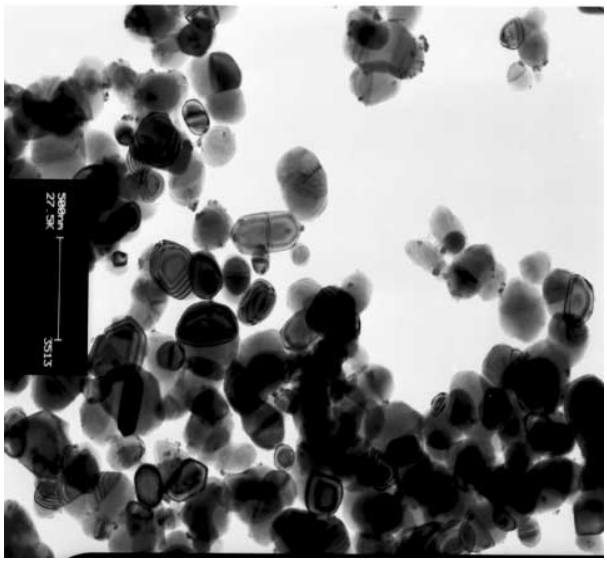
مواد و روش‌ها

تهیه نانو ذرات نقره

نانو ذرات نقره مورد استفاده در این تحقیق، از تولیدات شرکت نانو نصب پارس با نام تجاری نانوسید، مورد استفاده قرار گرفت (United State Patent application under No. US/2009/ 0013825). این ماده به صورت کلوئید در آب بوده و ماده حامل نانو ذرات نقره در این محصول آب مقطر می‌باشد. بر اساس تصاویر میکروسکوپ الکترونی (TEM)، میانگین نانوذرات این محصول کمتر از ۱۰ نانومتر از سوی شرکت سازنده اعلام شده است (شکل۱).

کشت سلولی

تمام مراحل کشت سلولی در آزمایشگاه کشت سلول‌های آبزیان و حشرات در واحد بانک ژن و سلول موسسه تحقیقات و سرم سازی رازی انجام شد. برای کشت سلول‌های RTG-2 از روش شرح داده شده در مطالعه‌ای مشابه، با مقداری اصلاحات و تغییرات با توجه به شرایط آزمایشگاهی موجود، استفاده شد (Marabini et al. 2011). برای احیای[7] سلول‌های RTG-2 از محیط کشت MEM[8] (Biosera, United Kingdom) که به عنوان محیط اختصاصی برای این سلول‌ها مطرح است، استفاده شد اما از آنجایی سلول‌ها در این محیط رشد مطلوبی نشان ندادند، لذا از محیط L15[9] استفاده شد. برای کشت سلول‌ها، آن‌ها در فلاسک‌های کشت سلولی ۲۵ cm^2، حاوی محیط کشت (Gibco®, USA) L15، ۱۰ درصد FBS[10] (Gibco®, USA) و یک درصد پنی‌سیلین- استروپتومایسین (Sigma–Aldrich, Germany)، در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و pH برابر با ۷/۳، انکوبه شدند تا سلول‌ها در فلاسک‌های کشت سلولی به طور کامل رشد کنند. سپس با تریپسیناز کردن و جدا کردن سلول‌ها از فلاسک و انجام عمل پاساژ سلولی و کشت‌های متوالی تعداد سلول‌های مورد نظر برای انجام آزمایشات بدست آمد (Marabini et al. 2011).



شکل۱- تصاویر میکروسکوپ الکترونی TEM از سوسپانسیون نانوذرات نقره (نانوسید) (برگرفته از وب سایت شرکت سازنده به نشانی www.nanocid.com)

طراحی آزمایش

آزمون سمیت سلولی[11]

[1] IMR-90 Cells
[2] HepG2 Cells
[3] Fish cell lines
[4] OLHNI2 cells
[5] Chromosomal aberrations and aneuploidy
[6] RTG-2 Cell line (Rainbow Trout gonad Cell line)

[7] Revive
[8] Medium with Earle salt
[9] L-15 Medium (Leibovitz)
[10] Fetal bovine serum
[11] Cytotoxicity assay

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.3.4.0]

برای تعیین اثرات سمیت سلولی ناشی از نانوذرات نقره، از آزمون MTT[1]، شرح داده شده توسط Ahmad et al. (2006) استفاده شد. شد. سنجش MTT، آزمایش دقیقی است که بوسیله آن می‌توان پاسخ سلول‌های مختلف را به فاکتورهای خارجی از جمله فاکتورهای رشد، مواد سایتوتوکسیک و سایر عوامل شیمیایی ارزیابی کرد. اساس آزمون MTT که یک روش رنگ سنجی است، شکستن نمک تترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز[2] میتوکندریایی سلول‌های زنده است. نتیجه این فعالیت ایجاد بلورهای فورمازان ارغوانی رنگ است که توسط دی متیل سولفوکساید[3] (DMSO) به صورت محلول در می‌آیند. هر چه سلول‌ها فعال تر و تعدادشان بیشتر باشد، میزان رنگ ایجاد شده بیشتر است (Francis et al. 1986; Ahmad et al. 2006).

برای انجام این تست، از پلیت‌های کشت سلولی ۹۶ خانه‌ای استفاده شد. بعد از کشت سلول‌ها در فلاسک‌های کشت سلولی، سلول‌ها با تراکم ۲۰۰۰۰ عدد در هر چاهک به پلیت ۹۶ خانه‌ای با همان شرایط کشت، منتقل شدند. بعد از ۲۴ ساعت، که سلول‌ها با شرایط پلیت سازگار شدند و دوباره در چرخه رشد قرار گرفتند، در معرض غلظت‌های مورد نظر (صفر، ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۵، ۱۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از نانوذرات نقره قرار داده شدند. این غلظت‌ها با توجه به مطالعات اخیر در زمینه اثرات سمیت سلولی نانوذرات نقره (Hussain et al. 2005; Arora et al. 2008; Gopinath et al. 2008; Wise et al. 2010) و همچنین انجام پیش آزمون‌هایی جهت بدست آوردن IC_{50}[4] (نتایج آورده نشده است)، انتخاب شد. بدین صورت که محیط کشت رویی آن‌ها حذف شد و با محیط کشت کامل که حاوی رقت‌های مورد نظر از نانوذرات نقره بود، جایگزین شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون سلول‌ها در معرض نانوذرات نقره، محیط کشت هر چاهک تخلیه شد و ۳۰ میکرولیتر از محلول MTT[5] (۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) (Sigma-Aldrich, Italy) به هر چاهک افزوده شد و پلیت به مدت ۴ ساعت دیگر در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد در تاریکی انکوبه شد. سپس مایع رویی هر چاهک خارج و ۱۳۰ میکرولیتر DMSO (Merck, Germany) به هر چاهک اضافه شد تا بلورهای فورمازان تشکیل شده در ته چاهک‌ها حل شوند. پلیت به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق بر روی پلیت شیکر قرار داده شد. سپس جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه الایزا[6] در طول موج ۴۱۵ نانومتر در مقابل بلانک خالی DMSO قرائت شد. لازم به ذکر است برای هر غلظت ۴ چاهک به عنوان تکرار در نظر گرفته شده بود و تمام مراحل نیز ۲ بار تکرار شد. در نهایت، میزان توکسیسیتی ایجاد شده با استفاده از معادله‌های زیر محاسبه شد (معادله۱و۲) (Francis et al. 1986; Ahmad et al. 2006).

معادله ۱)

$$\text{درصد سمیت سلولی} = 1 - \frac{\text{میانگین جذب در تیمار مورد نظر}}{\text{میانگین جذب در تیمار کنترل}} \times 100$$

معادله ۲)

$$\text{درصد زندگی} = 100 - \text{درصد سمیت سلولی}$$

آزمون سمیت ژنتیکی[7]

برای تعیین اثرات سمیت ژنتیکی ناشی از نانوذرات نقره، از آزمون ریز هسته‌ک[8] و از روش شرح داده شده توسط Hussain et al. (2005) استفاده شد. بدین منظور بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون سلول‌ها در معرض غلظت‌های مورد نظر از نانوذرات نقره، محتویات هر فلاسک کشت به لوله سانتریفیوژ منتقل شد (هر تیمار با تراکم 10^6 سلول) و بعد از سانتریفیوژ با دور g ۱۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه، محیط کشت رویی دور ریخته شد و سلول‌ها که در انتهای لوله رسوب کرده بودند، با استفاده از بافر فسفات (PBS) شستشو شده به بر روی لام منتقل شدند. پس از خشک شدن در معرض هوا، لام‌ها در متانول خالص به مدت ۱۰ دقیقه تثبیت و توسط محلول رنگی گیمسا ۱۰ درصد در بافر فسفات (PBS) به مدت ۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند و پس از گذشت چند ساعت جهت خشک شدن در معرض هوا، توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر (عدسی شیئی ۱۰۰ با استفاده از

[1] MTT assay
[2] Suksinat dehidrogenase
[3] Dimethyl sulfoxide
[4] half maximal inhibitory concentration
[5] 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
[6] Elayza reader
[7] Genotoxicity assay
[8] Micronucleus assay

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.3.4.0]

روغن ایمرسیون) مورد مشاهده قرار گرفتند و فراوانی ریز هستک‌ها با استفاده از معادله ۳ محاسبه و با گروه کنترل مقایسه شد (شکل۴). معیارهای زیر برای شناسایی ریزهستک در نظر گرفته شد؛ هیچ ارتباطی با هسته اصلی نداشته باشد، رنگ و شفافیت مشابه هسته اصلی باشد و اندازه‌ای کوچکتر از یک سوم هسته اصلی داشته باشد (Das and Nanda 1986).

معادله ۳)

$$\text{فراوانی ریزهستک} = \frac{\text{تعداد سلول های حاوی ریزهستک}}{\text{کل سلول های شمارش شده}}$$

بررسی اثرات نانوذرات بر رشد

سنجش قابلیت رشد و حیات سلول‌ها با روش‌های مختلفی انجام می‌شود که از جمله روش رنگ سنجی تریپان بلو است که روشی آسان برای ارزیابی یکپارچگی غشای سلول‌ها و در نتیجه حیات یا مرگ آن‌ها می‌باشد (Moldeus et al. 1978). اساس این روش این است که غشای سلول‌های زنده اجازه ورود رنگ‌های غیر الکترولیت را به درون سلول نمی‌دهد، اما سلول‌های مرده به خوبی رنگ می‌گیرند (Moldeus et al. 1978). بدین منظور بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون سلول‌ها در معرض غلظت‌های مورد نظر از نانوذرات نقره، ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی از هر تیمار، با یک میلی لیتر از محلول تریپان بلو مخلوط شد و بلافاصله با کمک یک هموسیتومتر (لام نئوبار) تعداد سلول‌های رنگ گرفته (مرده) و سلول‌های رنگ نشده (سلول‌های زنده) تعیین و سپس با استفاده از فرمول‌های زیر درصد فعالیت حیاتی محاسبه و سپس تعداد سلول‌های هر تیمار محاسبه شد (معادله ۴ و ۵) (Moldeus et al. 1978).

معادله ۴)

$$\text{درصد زندمانی} = \frac{\text{تعداد سلول های زنده}}{\text{تعداد کل سلول های شمارش شده}} \times 100$$

معادله ۵)

$$\text{تعداد کل سلول های زنده هر تیمار} = \text{درصد زندمانی} \times 10 \times 10^4$$

تجزیه و تحلیل آماری

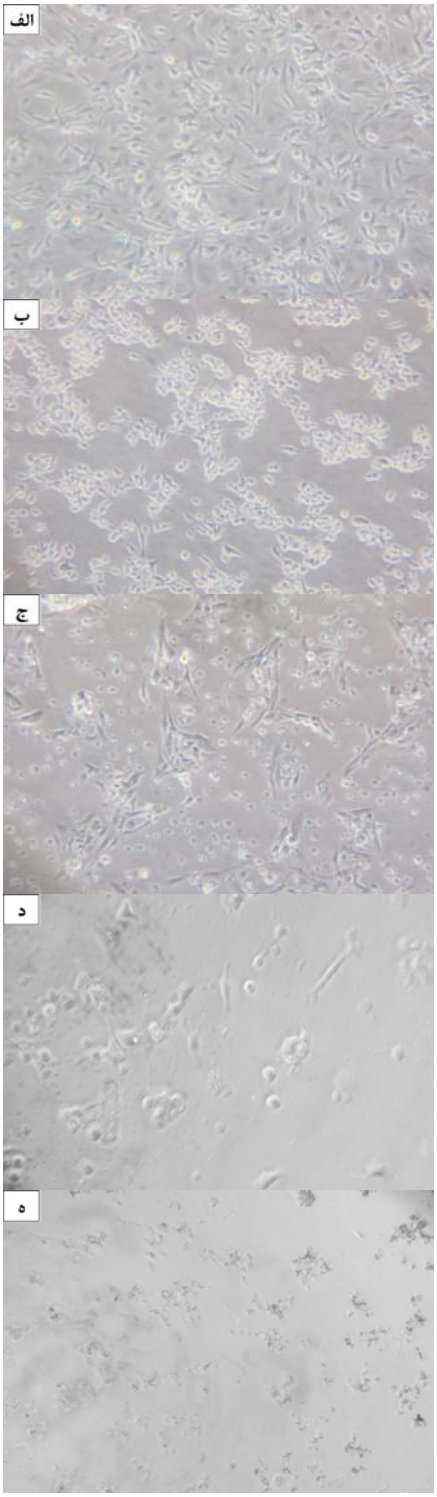
تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS 15 انجام شد. فروانی ریز هستک‌ها با استفاده آزمون کای مربع[1] مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای بقیه فاکتورها، تجزیه واریانس یک طرفه ANOVA استفاده شد و در صورت مشاهده اختلاف میان داده‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای تعیین معنادار بودن یا نبودن اختلاف موجود در سطح پنج درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

بررسی خصوصیات مورفولوژی سلول‌های تحت تیمار و گروه کنترل با استفاده از میکروسکوپ معکوس[2] (Olympus, Japan) نشان داد که نانوذرات نقره، تغییرات قابل توجهی در مقایسه با گروه کنترل (شکل۲- الف)، در خصوصیات مورفولوژی سلول‌ها ایجاد نموده است و با اینکه در تحقیق حاضر، داده‌های خصوصیات مورفولوژیک به داده‌های کمی جهت مقایسه آماری تبدیل نشده‌اند اما به وضوح می‌توان از لحاظ کیفی، تغییرات ایجاد شده را مشاهده و مقایسه نمود. سلول‌ها در معرض نانوذرات نقره قابلیت وابستگی به سطح[3] خود را از دست داده و به صورت گرد و سوسپانسیون ظاهر شدند. همچنین میزان گرانولیتی[4] سلول‌ها در مقایسه با گروه کنترل افزایش داشته و از اندازه سلول‌ها نیز کاسته شد و به نظر رسید سلول ها حالت جمع شدگی به خود گرفته‌اند (شکل۲- ب و ج). این تغییرات مورفولوژی وابسته به غلظت و زمان بود یعنی با کاهش غلظت نانوذرات نقره، از تغییرات مورفولوژیک کاسته می‌شود تا جایی که در پایین‌ترین غلظت (تیمار ۰/۰۱ µg/ml)، سلول‌ها از نظر مورفولوژیک تقریبا شبیه به گروه کنترل بودند. در صورتیکه در بالاترین غلظت (تیمار ۵۰ µg/ml) سلول‌ها به طور کامل از بین رفته بودند (شکل۲- د). همچنین هرچه از زمان در معرض بودن می‌گذشت تغییرات بیشتری در خصوصیات سلول‌ها قابل مشاهده بود.

[1] Chi-square test
[2] Inverted microscope
[3] Anchorage dependence
[4] Granulation

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.3.4.0]



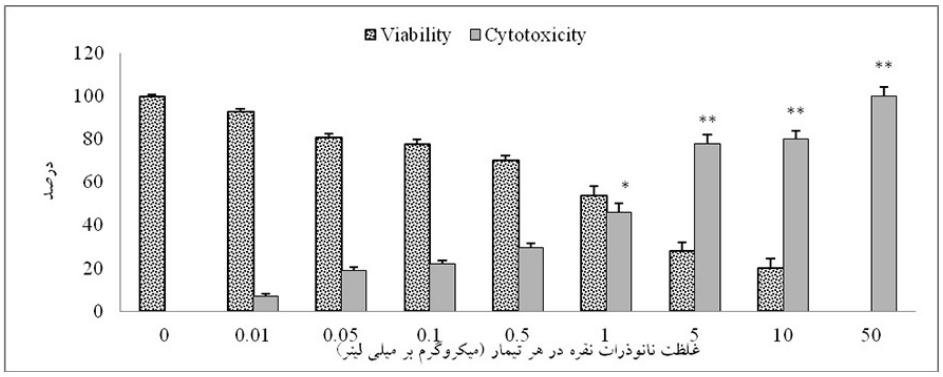
شکل۲- خصوصیات مورفولوژیک سلول های RTG-2 در گروه کنترل (الف) و تیمارهای در معرض نانوذرات نقره (ب، ج، د و ه). تصاویر بعد از ۲۴ ساعت از شروع آزمایش و با بزرگنمایی ×۲۰۰ گرفته شده است. الف) تیمار کنترل؛ ب) تیمار ۱ µg/ml از nano-Ag؛ ج) تیمار ۵ µg/ml از nano-Ag؛ د) تیمار ۱۰µg/ml از nano-Ag؛ ه) تیمار 50 µg/ml از nano-Ag

نتایج مربوط به اثرات سمیت سلولی (آزمون MTT) در شکل۳ آمده است. با افزایش غلظت نانوذرات اثرات سمی آن‌ها بسیار افزایش می‌یابد به طوری که در غلظت ۵۰ µg/ml تمامی سلول - ها از بین رفته‌اند. شکل۴ نتایج مربوط به آزمون ریز هستک را نشان می‌دهد. لازم به یادآوری است که در تیمار ۵۰ µg/ml هیچ سلول زنده‌ای وجود نداشت و در نتیجه از این آزمون حذف شد. نتایج نشان دهنده افزایش در فراوانی ریز هستک‌ها در تیمارهای مورد آزمایش در مقایسه با گروه شاهد بودند. اما این افزایش در تیمارهای ۰/۰۱، ۰/۰۵ و ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر، با گروه کنترل اختلاف معنی داری نشان نداد ($P<0/05$). تیمار µg/ml ۰/۵ با ۲۲۵ درصد و تیمار µg/ml یک با ۲۳۲ درصد ($P<0/05$) و تیمار ۵ µg/ml با ۲۵۱ درصد و تیمار ۱۰ µg/ml با ۲۶۱ درصد ($P<0/001$) افزایش در فراوانی ریز هستک‌ها نسبت به گروه کنترل، اختلاف کاملا معنی‌داری را نشان دادند.

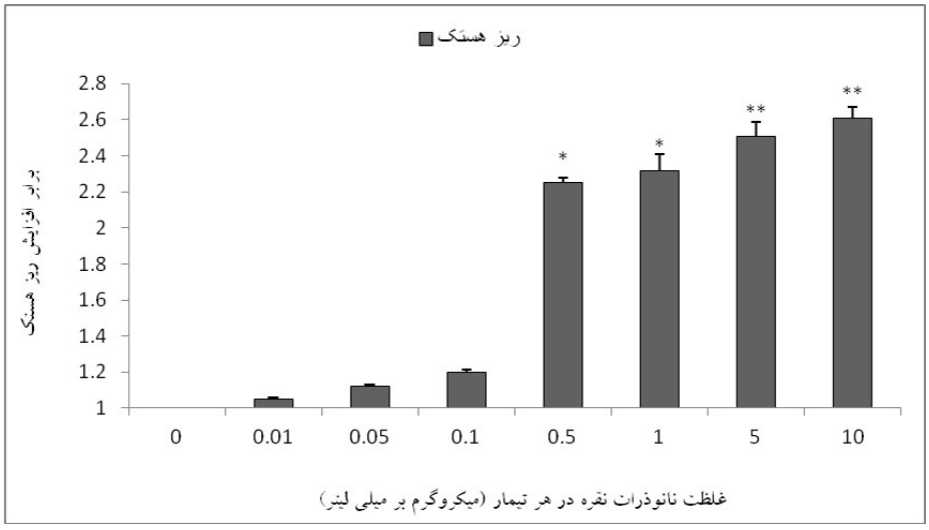
روند رشد سلول‌های RTG-2 در گروه کنترل و تیمارهای آزمایش، به عنوان تابعی از زمان انکوباسیون در شکل ۵ نشان داده شده است.

گزارش‌های اخیر نشان داده که نانوذرات نقره می‌توانند برای ماهی‌ها بسیار سمی باشند به طوری‌که نانو پودر نقره با ابعاد ۲۰ تا ۳۰ نانومتر، دارای LC_{50} ۴۸ ساعته برابر با ۷/۲۰ µg/ml– ۷/۰۷ برای ماهی زبرا (*Danio rerio*) می‌باشد (Griffitt et al. 2008). همچنین نانوذرات نقره اثرات سمیت ژنتیکی را، از طریق تغییر در بیان برخی از ژن‌ها، نشان داده‌اند (Griffitt et al. 2009). مطالعه- ای دیگر نشان داد نانوذرات نقره با اندازه ۵ تا ۲۰ نانومتر، با تجمع در آلبومین ذخیره تخمک، می‌توانند سبب اثرات سمیت جنینی شوند (Asharani et al. 2008). داده‌های تحقیق حاضر، همسو با این مطالعات، نشان دادند که نانوذرات نقره دارای اثرات سمیت سلولی و ژنتیکی می‌باشند که این اثرات وابسته به غلظت می‌باشد (شکل۳). داده‌های تحقیق حاضر همسو با مطالعات اخیر نشان دادند نانوذرات نقره علاوه بر آنکه طیفی از اثرات سمیت سلولی را بروز می‌دهند، موجب تحریک افزایش ریز هستک‌ها در سلول‌ها می‌شود (شکل۴).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.3.4.0]



شکل۳- تأثیر نانوذرات نقره بر فعالیت میتوکندریایی سلول های RTG-2 سنجش شده با آزمون MTT
* و ** به ترتیب اختلاف معنی دار در سطح پنج و یک درصد.

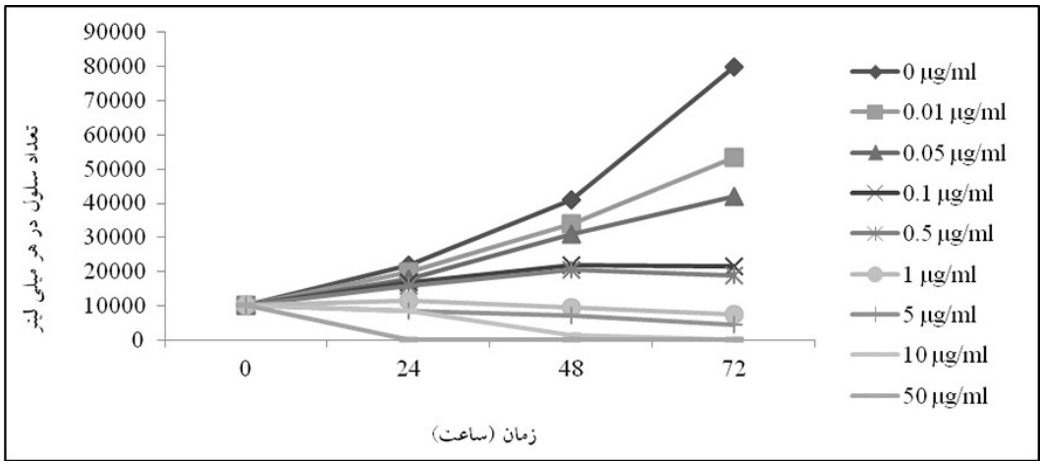


شکل۴- تأثیر سمیت ژنتیکی نانوذرات نقره بر سلول های RTG-2 سنجش شده با آزمون ریز هستک
* و ** به ترتیب اختلاف معنی دار در سطح پنج و یک درصد.

داده‌های مطالعه حاضر، با گزارش‌های اخیر در مورد آثار سمیت نانوذرات در دیگر سلول‌های لاین مطابقت دارد. پیش از این، مطالعات اثرات نانوذرات نقره بر فرایند مرگ سلولی[1] و مهار رشد سلولی را در سلول‌های کلیه همستر و سلول‌های لاین سرطان روده بزرگ انسان (که به مدت ۶ ساعت در معرض نانوذرات نقره بودند)، نشان دادند (Gopinath et al. 2008). در معرض قرار دادن سلول‌های کبد موش با نانوذرات نقره به مدت ۲۴ ساعت باعث اختلال در عملکرد میتوکندریایی و نفوذپذیری غشای سلولی شد (Hussain et al. 2005). همچنین، در معرض قرار دادن سلول‌های فیبروسارکومای انسان (HT-1080) و سلول‌های سرطان پوست (A431) باعث افزایش آپوپتوزیز، استرس اکسیداتیو و سمیت سلولی شد (Arora et al. 2008). در مجموع می‌توان گفت مطالعه حاضر در کنار تمام مطالعاتی که تنها در چندان سال اخیر در زمینه آلایندگی نانوذرات انجام شده‌اند، اثرات سمیت این مواد را بر سلول‌های ماهی، به اثبات می‌رساند.

[1] Apoptosis

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.3.4.0]



شکل۵- تأثیر نانوذرات نقره بر میزان رشد سلول های RTG-2

تحقیق حاضر گزارش می‌دهد که نانوذرات نقره می‌تواند برای سلول‌های ماهی‌ها، سمیت سلولی و ژنتیکی داشته باشد. این یافته با گزارش‌های اخیر در مورد آثار سمیت ژنتیکی نانوذرات تیتانیوم و کاربید تنگستن در سلول‌های ماهی قزل آلای رنگین کمان (Vevers and Jha 2008; Reeves et al. 2008; Singh et al. 2009; Kühnel et al. 2009) همسو است.

این نکته جالب توجه است که Vevers and Jha (2005) در مطالعه‌ای در زمینه آثار سمیت ژنتیکی نانوذرات تیتانیوم بر سلول-های ماهی قزل آلای رنگین کمان، هیچ گونه آثار تخریب کروموزومی با استفاده از آزمون ریز هستک، مشاهده نکردند در حالی که ما در تحقیق حاضر، با استفاده از همین آزمون، سمیت ژنتیکی ایجاد شده توسط نانوذرات نقره در سلول‌های ماهی قزل آلای رنگین کمان را نشان دادیم که این یافته با مطالعه Wise et al. (2011) که سمیت ژنتیکی نانوذرات نقره را در سلول‌های ماهی مداکا (*Oryzias latipes*) به اثبات رساندند، مطابقت دارد. توضیح این تفاوت نامشخص بوده به طوری‌که یا ممکن است به دلیل پتانسیل متفاوت نانوذرات نقره در مقابل نانوذرات تیتانیوم در ایجاد آسیب‌های کروموزومی باشد، یا ممکن است بدلیل حساسیت روش‌های بکار برده در تحقیق باشد.

لازم به ذکر است که سلول‌های لاین RTG-2، به عنوان سلول‌های مدل، در بسیاری از مطالعات مربوط به آلودگی حتی به عنوان مدلی برای سلامت انسان، مطرح است (Marabini et al. 2011). بنابراین با توجه به داده‌های مطالعه حاضر، پیشنهاد می‌شود که نانوذرات نقره می‌توانند پتانسیل بالقوه‌ای برای ایجاد مخاطرات ژنتیکی حتی برای انسان داشته باشند. همچنین از آنجا که مطالعات انجام شده با استفاده از سلول‌های لاین RTG-2، به راحتی قابل تعمیم به روش‌های *In vivo* بر روی ماهی‌ها می‌باشد (Marabini et al. 2011)، بنابراین داده‌های این تحقیق می‌تواند نشان دهنده خطرات بالقوه نانوذرات نقره برای محیط زیست آبی بویژه ماهی‌ها باشد. به هر حال مطالعات بیشتری لازم است تا مکانیسم چگونگی ایجاد آسیب‌های سلولی و ژنتیکی توسط نانوذرات، تاثیر اندازه و میزان انحلال نانوذرات، بر این آسیب‌ها و همچنین راهکارهای جلوگیری از این آسیب‌ها در عین استفاده کاربردی از نانوذرات را، مشخص کند.

تشکر و قدرانی

بدینوسیله از زحمات گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران و بخش بیوتکنولوژی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، بویژه جناب آقای منتظری از کارمندان بانک ژن و سلول این موسسه، و تمام عزیزانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند، تشکر و قدرانی می‌شود.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.3.4.0]

منابع

Ahmad S, Ahmad A, Schneider KB, White CW (2006) Cholesterol interferes with the MTT assay in human epithelial-like (A549) and endothelial (HLMVE and HCAE) cells. International Journal of Toxicology 25: 17-23.

Arora S, Jain J, Rajwade JM, Paknikar KM (2008) Cellular responses induced by silver nanoparticles: *in vitro* studies. Toxicology Letters 179: 93-100.

Asharani PV, Wu YL, Gong Z, Valiyaveettil1 S (2008) Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. Nanotechnology 19: 1-8.

Asharani PV, Mun GLK, Hande MP, Valiyaveettil S (2009) Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. ACS Nano 3: 279-290.

Auffan M, Rose J, Bottero J, Lowry GV, Jolivet J, Wiesner MR (2009) Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. Nature Nanotechnology 3: 634-641.

ASTM International (2006) ASTM E 2456-06. Terminology for Nanotechnology, available at http://www.astm.org.

Chen X, Schluesener HJ (2008) Nanosilver: a nanoproduct in medical application. Toxicology Letters 176: 1- 12.

Cheng D, Yang J, Zhao Y (2004) Antibacterial materials of silver nanoparticles application in medical appliances and appliances for daily use. China Medical Equipment 4: 26-32.

Das R, Nanda N, (1986) Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of fish Heteropneustes fossilis by mitomycin C and paper mill effluent. Mutation Research 175: 67-71.

Davies PH, Goettl JR, Smiley JR (1978) Toxicity of silver to rainbow trout. Water Research 12: 1113-1117.

Domingos RF, Tufenskji N, Wilkinson KJ (2009) Aggregation of titanium dioxide nanoparticles: role of fulvic acid. Environmental Science and Technology 43: 1282-1286.

El Badawy AM, Luxton TP, Silva RG, Scheckel KG, Suidan MT, Tolaymat TM (2010) Impact of environmental conditions (pH, ionic strength, and electrolyte type) on the surface charge and aggregation of silver nanoparticles. Environmental Science and Technology 44: 1260-1266.

Farkas J, Christian P, Gallego-Urrea JA, Roos N, Hassellöv M, Tollefsen KE, Thomas KV (2011) Uptake and effects of manufactured silver nanoparticles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill cells. Aquatic Toxicology 101: 117-125.

Francis D, Rita L (1986) Rapid colorometric assay for cell growth and survival. modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. Journal of Immunological Methods 89: 271-277.

Gopinath P, Gogoi SK, Chattopadhyay A, Ghosh SS, (2008) Implications of silver nanoparticle induced cell apoptosis for *in vitro* gene therapy. Nanotechnology 19: 1-10.

Griffitt RJ, Luo J, Gao J, Bonzongo JC, Barber DS (2008) Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. Environmental Toxicology and Chemistry 27: 1972-1978.

Griffitt RJ, Hyndman K, Denslow ND, Barber DS (2009) Comparison of molecular and histological changes in zebrafish gills exposed to metallic nanoparticles. Toxicological Sciences 107: 404-415.

Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ (2005) *in vitro* toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. Toxicology in vitro 19: 975-983.

Johnston HJ, Semmler-Behnke M, Brown DM, Kreyling W, Tran L, Stone V (2010) Evaluating the uptake and intracellular fate of polystyrene nanoparticles by primary and hepatocyte cell lines *in vitro*. Toxicology and Applied Pharmacology 242: 66-78.

Kashiwada S (2006) Distribution of nanoparticles in the see-through medaka (*Oryzias latipes*). Environmental Health Perspectives 114: 1697-1702.

Kühnel D, Busch W, Meisner T, Springer A, Potthoff A, Richter V, Gelinsky M, Schol S, Schirmer K. (2009) Agglomeration of tungsten carbide nanoparticles in exposure medium does not prevent uptake and toxicity toward a tainbow trout gill cell line. Aquatic Toxicology 93: 91 99.

Lee KJ, Nallathamby PD, Browning LM, Osgood CJ, Xu XN (2007) *In vivo* imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of zebrafish embryos. ACS Nano 1: 133-143.

Marabini L, Calò R, Fucile S (2011) Genotoxic effects of polychlorinated biphenyls (PCB 153, 138, 101, 118) in a fish cell line (RTG-2). Toxicology in Vitro 25: 1045-1052.

Moldeus T, Hogberg J, Orrhenius S, Fleischer S, Packer L (1978) Trypan blue dye exclusion method. Methods in enzymology 52: 60-71.

Niemeyer CM (2001) Nanoparticles, proteins, and nucleic acids: biotechnology meets materials science. Angewandte Chemie International Edition 40: 4128-4158.

Rahman-Nya J (2009) US Patent No: 2009/0075818.

Reeves JF, Davies SJ, Dodd NJF, Jha AN (2008) Hydroxyl radicals (OH) are associated with titanium dioxide (TiO2) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. Mutation Research 640: 113-122.

Singh N, Manshian B, Jenkins GJS, Griffiths SM, Williams PM, Maffeis TGG, Wright CJ, Doak SH (2009) NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. Biomaterials 30: 3891-3914.

Soltani M, Ghodratnema M, Ahari H, Ebrahimzadeh Mousavi H A, Atee M, Dastmalchi F, Rahmanya J (2009) The inhibitory effect of silver nanoparticles on the bacterial fish pathogens, *Streptococcus iniae*, *Lactococcus garvieae*, *Yersinia ruckeri* and *Aeromonas hydrophila*. International Journal of Veterinary Research 3: 137-142.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.3.4.0]

Witsap E, Kupferschmidt N, Bengtsson L, Hultenby K, Smedman C, Paulie S, Garcia-Bennett AE, Fadeel B, (2009) Efficient internalization of mesoporous silica particles of different sizes by primary human macrophages without impairment of macrophage clearance of apoptotic or antibody-opsonized target cells. Toxicology and Applied Pharmacology 239: 306-319.

Woodrow Wilson International Center for Scholars (2008) The Project on Emerging Nanotechnlogies. Consumer Products. An Inventory of Nanotechnology-Based Consumer Products Currently on the Market [cited 2008 May 31] http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer.

Tao X, Fortner JD, Zhang B, He Y, Chen Y, Huges JB (2009) Effects of aqueous stable fullerene nanochrystals (nC60) on *Daphnia magna*: evaluation of sub-lethal reproductive responses and accumulation. Chemosphere 77: 1482-1487.

Vevers WF, Jha, AN (2008) Genotoxic and cytotoxic potential of titanium dioxide (TiO_2) nanoparticles on fish cells *in vitro*. Ecotoxicology 17: 410-420.

Ward JE, Kach DJ (2009) Marine aggregates faciliate ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves. Marine Environmental Research 68: 137-142.

Wise JP, Goodale BC, Wise SS, Craig AG, (2010) Silver nanospheres are cytotoxic and genotoxic to fish cells. Aquatic Toxicology 97: 34-41.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.3.4.0]