

اثرات امبریوتوکسیک ارسنیت سدیم در القای پروتئین استرس در مدل تخم مرغ جنین دار

*دکتر الهام زاده هاشم^۱، دکتر جمیله سالار آملی^۲، دکتر عباس برین^۳، دکتر پریسا صدیق آرا^۴، طاهره علی اصفهانی^۵
مهدی اکبرزاده^۶، دکتر روح‌الله فردوسی^۷، دکتر محسن اسلامی^۸

تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۸۹/۶/۲۲

تاریخ اعلام وصول: ۸۹/۴/۷

چکیده

سابقه و هدف: آرسنیک یکی از مهمترین سموم محیطی رایج می‌باشد. مواجهه طولانی مدت با آرسنیک منجر به افزایش وقوع بیماری‌های پوستی، انواع سرطان‌ها، بیماری‌های عروقی، آسیب اعصاب محیطی و دیابت می‌شود. آرسنیک یکی از بزرگترین القای کننده‌های پروتئین استرس در چندین ارگان و سیستم می‌باشد. از شاخص‌های حساس و اصلی در پیگیری پروتئین استرس ارزیابی گروه‌های کربونیل و تیول پروتئین‌ها می‌باشد. لذا جهت ارزیابی پروتئین استرس در نتیجه مواجهه با ارسنیت سدیم در مدل تخم مرغ جنین دار، گروه کربونیل و گروه تیول پروتئین‌ها اندازه‌گیری شد.

مواد و روش‌ها: ۳۶ عدد تخم مرغ جنین دار در روز چهارم دوره انکوباسیون مورد آزمایش نوربینی قرار گرفتند و بعد از اطمینان از زنده بودن جنین، مقدار ۰/۵ میلی لیتر از غلظتهای ۰/۵ ppm و ۰/۱ ppm ارسنیت سدیم به کیسه زرده دو گروه ۱۲ تایی از تخم مرغ‌ها تزریق گردید. به گروه کنترل که شامل ۱۲ تخم مرغ دیگر بود نیز ۰/۵ میلی لیتر از سرم فیزیولوژی تزریق شد. در روز بیستم دوره انکوباسیون، جنین‌ها خارج شده و از لحاظ ناقص الخلقه زایی و جراحات خارجی مورد بررسی قرار گرفتند. سپس ۱ میلی لیتر از خون جنین‌ها جهت ارزیابی گروه تیول و کربونیل (بررسی فرایند پروتئین استرس) مورد استفاده قرار گرفت. آنالیز داده‌ها با نرم افزار SPSS (ویرایش ۱۶) و آزمون ANOVA و تست تکمیلی Tukey انجام شد. این مطالعه برگرفته از پایان‌نامه دانشجویی می‌باشد.

یافته‌ها: میانگین گروه کربونیل پروتئین در گروه‌های مواجهه شده با ارسنیت سدیم در گروه ۰/۱ ppm حدود ۰/۸۳۵ و در گروه ۰/۵ ppm حدود ۰/۸۴۴ و گروه کنترل ۰/۸۰۴ بود و این افزایش علاوه بر معنی دار بودن، رابطه مستقیم با دوز نیز داشت. اما میانگین گروه تیول پروتئین در گروه‌های مواجهه شده با ارسنیت سدیم در گروه ۰/۱ ppm حدود ۰/۰۵۳ و در گروه ۰/۵ ppm حدود ۰/۰۱۴ و گروه کنترل ۰/۰۵۴ بود و این کاهش علاوه بر معنی دار بودن، رابطه مستقیم با دوز تزریق نیز داشت.

بحث و نتیجه‌گیری: تغییرات گروه کربونیل و تیول پروتئین در سرم جنین‌های مواجهه یافته با ارسنیت سدیم، سمیت جنینی این عامل را در دوزهای مورد مطالعه، با القای پروتئین استرس، در جنین جوجه، نشان می‌دهد.

کلمات کلیدی: ارسنیت سدیم، پروتئین استرس، تخم مرغ جنین دار، ناقص الخلقه زایی، کربونیل، تیول.

مقدمه

می‌گردد (۱). این عنصر از مهمترین آلوده کننده‌های آب و هوا می‌باشد که سلامت و کیفیت زندگی بشر را تهدید می‌کند (۲، ۳) و همچنین به دلیل توزیع گسترده آرسنیک در محیط، دریافت مقادیری

آرسنیک یکی از عناصر مضر و خطرناک می‌باشد که از منابع متعددی نظیر آلیاژ فلزات مرکب و بخصوص ذوب سرب، مس و نیکل تولید

۱- پژوهشگر، ایران، تهران، دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، بخش سم شناسی (*نویسنده مسؤل)
تلفن: ۰۹۱۴۴۹۱۱۳۹۱ آدرس الکترونیک: zadehashem.elham@gmail.com

۲- دانشیار، ایران، تهران، دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، بخش سم شناسی

۳- استادیار، ایران، تهران، دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، بخش کلینیکال پاتولوژی

۴- پژوهشگر، ایران، تهران، دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، بخش سم شناسی

۵- پژوهشگر، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی آجا، کارشناسی ارشد آمار زیستی

۶- پژوهشگر، ایران، تهران، عضو هیات علمی انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی کشور

۸- پژوهشگر، ایران، تهران، دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، بخش مامایی و بیماری‌های تولید مثل

مرغ جنین دار، تحت انکوباسیون قرار گرفتند و در روز چهارم مورد آزمایش نوربینی قرار گرفتند تا از زنده بودن جنین‌ها اطمینان حاصل شود. سپس به هر تخم مرغ یک شماره مشخص داده شد و تخم مرغ‌ها به صورت تصادفی برای گروه‌های تزریق انتخاب شدند. برای این منظور سطح تخم مرغ‌ها با نتورید ضد عفونی و محل تزریق با استفاده از سوزن، سوراخ شده و با سرنگی که قبلاً طول آن جهت رسیدن به کیسه زرده امتحان شده بود، به ۱۲ عدد از آنها مقدار ۰/۵ میلی لیتر از غلظت ۰/۵ ppm و به ۱۲ عدد دیگر ۰/۵ میلی لیتر از غلظت ۰/۱ ppm ارسنیت سدیم که قبلاً در مطالعات دیگر آزمون‌های استرس-اکسیداتیو گزارش شده است، به تخم مرغ‌ها تزریق گردید (۱۸، ۱۹).

تعداد تخم مرغ‌ها با توجه به مطالعات انجام شده با این روش، در سال‌های ۱۹۹۸ و ۲۰۰۵، ۱۲ عدد تعیین گردید (۲۰، ۲۱). ۱۲ تخم مرغ‌های دیگر به عنوان کنترل منظور شدند و فقط ۰/۵ میلی لیتر از سرم فیزیولوژی به آنها تزریق گردید. محل تزریق در تخم مرغ‌ها با پارافین پوشانده شده و به صورت افقی در انکوباتور قرار گرفتند. درجه حرارت آن حدود $37/5 \pm 0/5$ و رطوبت نسبی آن ۸۰-۶۰ درصد بود. درجه حرارت و رطوبت در انکوباسیون هر روز باید کنترل می‌شد (۱۸). تخم مرغ‌ها هر ۶ ساعت ۹۰ درجه در انکوباتور چرخانده می‌شدند تا هم عامل تزریق شده بهتر درون تخم مرغ انتشار یابد و هم جنین‌ها داخل تخم مرغ طبیعی‌تر رشد کنند. تخم مرغ‌ها هر روز مورد آزمایش نوربینی قرار گرفته تا در صورت مشاهده جنین‌های مرده، بررسی ماکروسکوپی انجام شود و جهت سایر بررسی‌ها از جمله آزمایش‌های پاتولوژی در فرمالین ۱۰٪ نگهداری شوند. در روز بیستم دوره انکوباسیون، جنین‌ها خارج شده و از لحاظ ناقص الخلقه زائی و جراحات خارجی مورد بررسی قرار گرفتند. خون جنین‌ها جهت آزمایش‌های بیوشیمی جمع‌آوری شد و جهت ارزیابی گروه تیول و کربونیل (بررسی فرایند پروتئین استرس) مورد استفاده قرار گرفت. روش اندازه‌گیری گروه کربونیل پروتئین‌ها جهت ارزیابی استرس اکسیداتیو به صورت زیر می‌باشد (۲۲):

۱- در هر لوله آزمایش ۱۰۰ میکرولیتر از سرم هر نمونه با ۳۰۰ میکرولیتر از گوانیدینوم کلراید ۶ مولار با PH حدود ۲/۳ و یک میلی لیتر از DNPH ۱۰ میلی مولار در HCl (Hydrochloric acid) ۲ مولار مخلوط شد.

از آن به صورت روزانه دور از انتظار نیست (۱). تخریب اکسیداتیو اسیدهای چرب غیراشباع به دنبال فرایندی که لیپیدپراکسیداسیون نامیده می‌شود، به عنوان مکانیسم عمومی سمیت و آسیب سلولی آرسنیک شناخته شده است. همچنین در نوع دیگری از استرس اکسیداتیو که می‌شود، آسیب در DNA (Deoxyribonucleic acid) و پروتئین‌ها رخ می‌دهد و از آسیب به لیپیدها مهم‌تر است (۴-۶). چراکه اثرات سوء آن گسترده و از عوامل ایجادکننده انواع سرطان است (۷). به‌علاوه آرسنیک در منابع متعدد به عنوان یکی از عوامل تراژون (ناقص الخلقه زا) شناخته شده است (۸-۱۰). سمیت جنینی و ناقص الخلقه زایی ارسنیت سدیم که یکی از ترکیبات آرسنیک است به دلایلی از جمله تولید رادیکال‌های آزاد و در اثر استرس اکسیداتیو القا می‌شود (۱۱). از شاخص‌های حساس و اصلی در پیگیری استرس اکسیداتیو ارزیابی گروه‌های کربونیل و تیول پروتئین‌ها می‌باشند که از مزایای گروه کربونیل پروتئین، تشکیل سریع و از طرفی پایداری آن است (۱۲، ۱۳) و گروه تیول پروتئین‌ها نیز از عوامل عمده درگیر در واکنش‌های اکسیداسیون-احیای داخل و خارج سلول است و یکی از مهمترین آنتی اکسیدان‌ها در نظر گرفته می‌شود و نقش محوری در محافظت سلول در مقابله با انواع اکسیژن فعال بازی می‌کند (۱۴).

اخیراً اثرات آلودگی محیطی روی پرندگان به صورت گسترده بررسی شده است. در راستای این هدف یکی از روش‌های بررسی بیولوژیکی اثرات آلوده‌کننده‌ها، تزریق به داخل تخم مرغ جنین دار است (۱۵). با تزریق یک دوز از عامل مورد نظر در داخل کیسه زرده، قبل از خارج شدن جوجه از تخم مرغ، تمام دوره رشد جنینی تحت تاثیر قرار می‌گیرد (۱۶). در تزریق داخل تخم مرغ جنین دار عامل به صورت مستقیم و بدون واسطه مادر به جنین تزریق شده و اثر آن بدون فیزیولوژی مادر ارزیابی می‌شود (۱۷). لذا در این مطالعه با انجام آزمون "بررسی سمیت با استفاده از جنین جوجه"، روند احتمالی سمیت ارسنیت سدیم از طریق مکانیسم القای پروتئین استرس مورد بررسی قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در تابستان ۱۳۸۸ و در بخش سم شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انجام شد. در این مطالعه، ۳۶ عدد تخم

ج - سپس جذب نوری (OD) لوله شاهد که حاوی ۱ میلی لیتر بافر تریس ۲۰+ میکرو لیتر معرف DTNB و فاقد نمونه بود در ۴۱۲ نانومتر خوانده شد (B).

آنالیز داده‌ها

آنالیز داده‌ها با نرم افزار SPSS (ویرایش ۱۶) و با استفاده از آنالیز توصیفی (محاسبه میانگین، انحراف از میانگین، مقادیر حداقل و حداکثر) و آزمون ANOVA و تست تکمیلی Tukey انجام شد. سطح معنی داری برابر $p \leq 0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این مطالعه ۳۶ عدد تخم مرغ جنین دار هر روز مورد آزمایش نوربینی قرار گرفتند. تا روز بیستم دوره انکوباسیون موردی از مرگ و میر در آن‌ها مشاهده نشد. بنابراین در روز بیستم دوره انکوباسیون، جنین‌ها خارج شدند و از لحاظ ناقص الخلقه زائی و جراحات خارجی مورد بررسی قرار گرفتند که به جز سه مورد در گروه ۰/۵ ppm که در یک مورد بیرون زدگی احشا داخلی و در دو مورد دیگر عدم تشکیل استخوان جمجمه سر در آن‌ها مشخص بود، ناهنجاری دیگری مشاهده نشد. در پایان بررسی ماکروسکوپی حدود ۱ میلی لیتر از جنین‌ها خون گرفته شد و جهت بررسی فرایند پروتئین استرس، مقادیر گروه تیول و کربونیل پروتئین‌ها، در سرم اندازه‌گیری شدند.

تغییرات میزان فاکتورهای مورد آزمایش به صورت میانگین در جداول ۱ و ۲ آورده شده است که به شرح زیر می‌باشند:

میزان گروه کربونیل پروتئین در گروه کنترل و گروه‌هایی که ۰/۱ ppm و ۰/۵ ppm ارسنیت سدیم دریافت کرده بودند، به ترتیب ۰/۸۰۴، ۰/۸۳۵ و ۰/۸۴۴ نانومول در میلی گرم پروتئین بود. اختلاف

جدول ۱- میانگین و انحراف از میانگین گروه کربونیل پروتئین در نمونه‌های سرمی تخم مرغ‌های جنین دار مواجهه یافته با ارسنیت سدیم

تیمار	تعداد	Maximum	Minimum	Mean ± Std. Error
گروه کنترل	۱۲	۰/۸۱۵	۰/۷۹۵	۰/۸۰۴ ± ۰/۰۰۲
گروه ۰/۱	۱۲	۰/۸۴۰	۰/۸۳۰	۰/۸۳۵ ± ۰
گروه ۰/۵	۱۲	۰/۸۴۶	۰/۸۴۰	۰/۸۴۴ ± ۰

۲- لوله‌های آزمایش به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار داده شدند.

۳- ۱/۵ میلی لیتر از TCA (Trichloroacetic acid) ۲۰٪ سرد شده به هر لوله آزمایش اضافه شد.

۴- لوله‌های آزمایش به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ قرار داده شدند.

۵- لوله‌های آزمایش سانتریفیوژ شدند.

۶- پلیت پروتئینی تشکیل شده در ته لوله آزمایش در ۳ مرحله با ۶ میلی لیتر از ترکیب اتانول/اتیل استات (به نسبت ۱:۱) شسته شدند.

۷- به محتوای باقی مانده در هر لوله آزمایش ۳ میلی لیتر از گوانیدینوم کلراید ۶ مولار با PH حدود ۲/۳ اضافه شد.

۸- سپس جذب نوری (OD: Optical Density) نمونه‌ها در طول موج ۳۶۷ نانومتر در مقابل بلانک (آب مقطر) قرائت شد.

روش اندازه‌گیری گروه تیول پروتئین‌ها جهت ارزیابی استرس اکسیداتیو به صورت زیر می‌باشد (۲۳):

در نمونه‌های سرم گروه تیول تام با استفاده از روش Hu اندازه‌گیری شد. معرف‌های اندازه‌گیری گروه تیول عبارتند از:

۱- محلول دی تیو نیتروبنزویک اسید (DTNB) با غلظت ۱۰ میلی مول در متانول مطلق (۰/۱۹۸ گرم دی تیو نیتروبنزویک اسید در متانول مطلق) که این محلول به مدت دو هفته در ۴ درجه سانتیگراد و دور از نور در ظرف تیره، پایدار است.

۲- بافر تریس ۰/۲۵ مولار و (Ethylenediaminetetraacetic acid) EDTA دو میلی مولار با $PH = 8/2$ از بافر تریس و ۰/۰۵ گرم EDTA که با آب دوبار تقطیر به حجم رسانده شده است.

۳- بلانک: ۱ میلی لیتر بافر تریس

۴- لوله شاهد: ۱ میلی لیتر بافر تریس به اضافه ۲۰ میکرو لیتر معرف دی تیو نیتروبنزویک اسید (DTNB) (فاقد نمونه)

الف - در لوله‌های آزمایش یک میلی لیتر بافر تریس ریخته شد و به آن ۵۰ میکرو لیتر سرم اضافه گردید و جذب نوری (OD) آن در طول موج ۴۱۲ نانومتر در مقابل لوله بلانک که حاوی ۱ میلی لیتر بافر تریس بود خوانده شد (A_۱).

ب - به هریک از لوله‌ها ۲۰ میکرو لیتر معرف دی تیونیتروبنزویک اسید (DTNB) اضافه گردید و ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد و جذب نوری (OD) آن در ۴۱۲ نانومتر خوانده شد (A_۲).

زودرس بخصوص اگر حجم بالایی از حامل تزریق شود، اتفاق می افتد که می تواند اثر سوء روی نتیجه مطالعه داشته باشد (۱۸).

در این مطالعه به جز در سه مورد در گروه ۰/۵ ppm که در یک مورد بیرون زدگی احشا داخلی و در دو مورد دیگر عدم تشکیل استخوان جمجمه سر در آن ها مشخص بود، ناهنجاری دیگری مشاهده نشد. به علاوه مشخص شد که میزان گروه کربونیل پروتئین در گروه های مواجهه نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است و این افزایش علاوه بر معنی دار بودن، رابطه مستقیم با دوز هم دارد. اما در مورد تیول پروتئین، در گروه های مواجهه شده با ارسنیت نسبت به گروه کنترل، مقدار آن کاهش یافته است و این کاهش علاوه بر معنی دار بودن، با دوز آن نیز رابطه مستقیم دارد (با افزایش میزان ارسنیت، میزان کربونیل افزایش و میزان تیول کاهش می یابد).

در مطالعه ای، چانی و همکاران در سال ۱۹۹۶ جنین های موش را در مواجهه با ارسنیت قرار دادند و مرگ و میر و ناهنجاری هایی نظیر نقص لوله عصبی را در جنین ها مشاهده کردند. ناهنجاری اصلی در مواجهه با ارسنیت در جنین جوجه، نقص لوله عصبی، گانگلیا و قوس های branchial می باشد. و نیز از اثرات جنینی آن می توان به مرگ و میر، کاهش طول اندام ها و بدن و ناهنجاری های متقار اشاره کرد (۵). در بیشتر مقالات کاهش گروه تیول را از نشانه های استرس اکسیداتیو (۶) و از مکانیسم های مسمومیت می دانند (۲۶). در ارتباط با موارد مواجهه با آرسنیک تمایل بالای آرسنیک به گروه های تیول را در مکانیسم سمیت آن موثر می دانند. در رت های مواجهه یافته با آرسنیک با اندازه گیری مارکرهای استرس اکسیداتیو، افزایش و کاهش قابل توجهی به ترتیب در گره کربونیل پروتئین ها و تیول پروتئین ها مشاهده شد (۴). همچنین میزان تیول پروتئین ها در رت هایی که آنتی اکسیدان در مواجهه با آرسنیک دریافت نکرده بودند، نسبت به گروهی که آنتی اکسیدان دریافت کرده بودند، کاهش یافت (۱۴). در مطالعه ای نیز روی ارگانوکلره ها در ماهی، افزایش گروه کربونیل پروتئین در پاسخ به استرس اکسیداتیو ناشی از عامل ذکر شده، مشاهده شد (۲۰).

آهن کاتالیز شده در واکنش Haber-Weiss رادیکال آزاد هیدروکسیل را تولید می کند، بنابراین اکسیداسیون پروتئین ها افزایش می یابد. ارسنیت القا کننده قوی هموکسیژناز در بافت های مختلف می باشد و القای این آنزیم، آهن ۳ ظرفیتی را نیز در اثر متلاشی کردن هم

جدول ۲- میانگین و انحراف از میانگین گروه تیول پروتئین در نمونه های سرمی تخم مرغ های جنین دار مواجهه یافته با ارسنیت سدیم

تیمار	تعداد	Maximum	Minimum	Mean ± Std. Error
گروه کنترل	۱۲	۰/۰۹۸۹	۰/۰۲۲۰	۰/۰۵۴ ± ۰/۰۰۷
گروه ۰/۱	۱۲	۰/۰۷۵۴	۰/۰۱۷۳	۰/۰۵۳ ± ۰/۰۰۶
گروه ۰/۵	۱۲	۰/۰۳۰۰	۰/۰۰۶۳	۰/۰۱۴ ± ۰/۰۰۲

گزارش شده بین گروه ها از نظر آماری معنی دار بود.

میزان گروه تیول پروتئین در گروه کنترل و گروه هایی که ۰/۱ ppm و ۰/۵ ppm ارسنیت سدیم دریافت کرده بودند، به ترتیب ۰/۰۵۴، ۰/۰۵۳ و ۰/۰۱۴ میلی مول در لیتر بود. اختلاف گزارش شده بین گروه کنترل و مواجهه ۰/۱ ppm، از نظر آماری معنی دار نبود ولی اختلاف آماری هر یک از ۲ گروه مذکور با گروه مواجهه ۰/۵ ppm، معنی دار بود.

بحث و نتیجه گیری

۷۰ میلیون نفر از مردم جهان از مسمومیت مزمن با آرسنیک رنج می برند (۲۴). آرسنیک با بیماری های زیادی مثل پای سیاه، دیابت ملیتوس، بیماری فشار خون بالا و سرطان مثانه، ریه، پوست و کبد در ارتباط است (۱۴، ۲۵). در این تحقیق جهت ارزیابی اثرات ناشی از استرس اکسیداتیو در روند ترانوژنیسیته از مدل جنین تخم مرغ استفاده شده است. به دلیل این که رشد جنین در مدل تخم مرغ جنین دار در غیاب فاکتورهای مادر صورت می گیرد، مدل حیوانی مناسبی جهت مطالعات استرس می باشد. برخلاف پستانداران که جنین با فاکتورهای مادری در طول آبتنی روبرو می شود، در جوجه فاکتورهای مادری فقط داخل تخم مرغ است و مادر در طول انکوباسیون، یعنی زمانی که بیشترین توسعه جنینی حادث می شود، هیچ نقش دیگری ندارد (۱۶). در نتیجه با همه این دلایل و مزیت های مدل تخم مرغ جنین دار، در این مطالعه از این روش استفاده شد و ارسنیت سدیم در روز چهارم انکوباسیون به تخم مرغ های جنین دار تهیه شده تزریق شد. در برخی از منابع ذکر شده است که در تزریق بعد از شروع انکوباسیون، ممکن است دوره های مهم و حساس و بحرانی از دست برود. از طرفی مشخص شده است که در تزریق قبل از شروع انکوباسیون مرگ و میر و مرگ

استرس در بافت و سرم همخوانی نداشته باشد، لذا پیشنهاد می شود در مطالعات بعدی پارامترهای استرس در بافت نیز، ارزیابی گردند و نیز با توجه به این که فاکتورهای بررسی استرس دارای تنوع زیادی می باشند، لذا بهتر است، در مطالعات بعدی تعداد دیگری از آن ها نیز بررسی شوند. همچنین جهت بررسی دقیق تر عامل مورد مطالعه روی بافت ها، پیشنهاد می شود در تحقیقات بعدی از آزمایش های هیستوپاتولوژی هم استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کلیه همکاران و دوستان بخش سم شناسی و طیور دانشگاه تهران که ما را در تهیه و تدوین این پژوهش یاری نمودند، تشکر به عمل می آوریم.

References

- DeSesso JM, Jacobson CF, Scialli AR, Farr CH, Holson JF. An assessment of the developmental toxicity of inorganic arsenic. *Reprod Toxicol*. 1998;12 (4): 385-433.
- Fowler BA, Whittaker MH, Lipsky M, Wang G, Chen XQ. Oxidative stress induced by lead, cadmium and arsenic mixtures: 30-day, 90-day, and 180-day drinking water studies in rats: an overview. *Biometals*. 2004;17 (5): 567-8.
- Hillie T, Hlophe M. Nanotechnology and the challenge of clean water. *Nat Nanotechnol*. 2007;2 (11): 663-4.
- Samuel S, Kathirvel R, Jayavelu T, Chinnakkannu P. Protein oxidative damage in arsenic induced rat brain: influence of DL-alpha-lipoic acid. *Toxicol Lett*. 2005 15;155 (1): 27-34.
- Papaconstantinou AD, Brown KM, Noren BT, McAlister T, Fisher BR, Goering PL. Mercury, cadmium, and arsenite enhance heat shock protein synthesis in chick embryos prior to embryotoxicity. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2003;68 (6): 456-64.
- Hurd TR, Filipovska A, Costa NJ, Dahm CC, Murphy MP. Disulphide formation on mitochondrial protein thiols. *Biochem Soc Trans*. 2005;33 (Pt 6): 1390-3.
- Luza SC, Speisky HC. Liver copper storage and transport during development: implications for cytotoxicity. *Am J Clin Nutr*. 1996;63 (5): 812S-20S.
- Bencko V. Carcinogenic, teratogenic, and mutagenic effects of arsenic. *Environ Health Perspect*. 1977;19: 179-82.
- Honda K, Hatayama T, Takahashi K, Yukioka M. Heat shock proteins in human and mouse embryonic cells after exposure to heat shock or teratogenic agents. *Teratog Carcinog Mutagen*. 1991;11 (5): 235-44.
- Wlodarczyk BJ, Bennett GD, Calvin JA, Finnell RH. Arsenic-induced neural tube defects in mice: alterations in cell cycle gene expression. *Reprod Toxicol*. 1996;10 (6): 447-54.
- Gornati R, Monetti C, Vigezzi D, Bosisio S, Fortaner S, Sabbioni E, et al. Arsenic toxicity and HSP70 expression in *Xenopus laevis* embryos. *Altern Lab Anim*. 2002;30 (6): 597-603.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*. 2003;329 (1-2): 23-38.
- Temiz C, Temiz P, Demirel A, Sayin M, Umur AS, Ozer FD. Effect of sodium phenytoin concentration on neural tube development in the early stages of chicken embryo development. *J Clin Neurosci*. 2009;16 (2): 307-11.
- Ramanathan K, Balakumar BS, Panneerselvam C. Effects of ascorbic acid and alpha-tocopherol on arsenic-induced oxidative stress. *Hum Exp Toxicol*. 2002;21 (12): 675-80.
- de Roode DF, van den Brink NW. Uptake of injected PCBs from the yolk by the developing chicken embryo. *Chemosphere*. 2002;48 (2): 195-9.
- Carvalho MC, Nazari EM, Farina M, Muller YM. Behavioral, morphological, and biochemical changes after in ovo exposure to methylmercury in chicks. *Toxicol Sci*. 2008;106 (1): 180-5.
- Slotkin TA, Seidler FJ, Ryde IT, Yanai J. Developmental neurotoxic effects of chlorpyrifos on acetylcholine and serotonin pathways in an avian model. *Neurotoxicol Teratol*. 2008;30 (5): 433-9.
- DeWitt JC, Meyer EB, Henshel DS. Environmental toxicity studies using chickens as surrogates for wildlife: effects of vehicle volume. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2005;48 (2): 260-9.

افزایش می دهد. رادیکال سوپراکسید، آهن ۳ ظرفیتی را به آهن ۲ ظرفیتی تبدیل می کند که آن هم در واکنش Fenton تولید رادیکال هیدروکسیل می کند که منجر به افزایش اکسیداسیون پروتئین ها می شود. همچنین ترکیبات مختلف آرسنیک نظیر آرسنیت و آرسنات پروتئین فریتینی را که دارای ظرفیت بالای جهت ذخیره کردن آهن می باشد، دچار تغییرات اکسیداسیون نموده و منجر به آزادسازی بیشتر آهن می شوند. بنابراین گونه های اکسیژن وابسته به آهن را می توان از مکانیسم های سمیت آرسنیک به حساب آورد (۴).

این مطالعه تأییدکننده اثر سمیت آرسنیت سدیم بر جنین جوجه با مشاهده افزایش یافتن وابسته به دوز میزان کربونیل پروتئینی و کاسته شدن وابسته به دوز گروه تیول پروتئینی، با بررسی سرم جنینی می باشد. با توجه به این که ممکن است سطح تغییرات پارامترهای

- 19- DeSesso JM. Teratogen update: inorganic arsenic. *Teratology*. 2001;64 (3): 170-3.
- 20- Samiec PS, Drews-Botsch C, Flagg EW, Kurtz JC, Sternberg P, Jr., Reed RL, et al. Glutathione in human plasma: decline in association with aging, age-related macular degeneration, and diabetes. *Free Radic Biol Med*. 1998 15;24 (5): 699-704.
- 21- Pushpanjali, Pal AK, Prasad RL, Prasad A, Singh SK, Kumar A, et al. In ovo embryotoxicity of [alpha]-endosulfan adversely influences liver and brain metabolism and the immune system in chickens. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2005;82 (2): 103-14.
- 22- Akagawa M, Sasaki D, Ishii Y, Kurota Y, Yotsu-Yamashita M, Uchida K, et al. New method for the quantitative determination of major protein carbonyls, alpha-aminoacidic and gamma-glutamic semialdehydes: investigation of the formation mechanism and chemical nature in vitro and in vivo. *Chem Res Toxicol*. 2006;19 (8): 1059-65.
- 23- Humann-Ziehank E, Coenen M, Ganter M, Bickhardt K. Long-term observation of subclinical chronic copper poisoning in two sheep breeds. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*. 2001;48 (7): 429-39.
- 24- Bhadauria S, Flora SJ. Response of arsenic-induced oxidative stress, DNA damage, and metal imbalance to combined administration of DMSA and monoisoamyl-DMSA during chronic arsenic poisoning in rats. *Cell Biol Toxicol*. 2007;23 (2): 91-104.
- 25- Stummann TC, Hareng L, Bremer S. Embryotoxicity hazard assessment of cadmium and arsenic compounds using embryonic stem cells. *Toxicology*. 2008 30;252 (1-3): 118-22.
- 26- Brown IR, Rush SJ. Induction of a 'stress' protein in intact mammalian organs after the intravenous administration of sodium arsenite. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984, 16;120 (1): 150-5.

The effect of sodium arsenite in induction of protein stress in chicken embryo model

*Zadehashem. E¹, Salaramoli. J; PhD², Barin. A; PhD³, Sadighara. P⁴, Aliesfahani. T⁵
Akbarzadeh. M; MSc⁶, Ferdowsi R⁷, Eslami M⁸

Received: 28 Jun 2010

Accepted: 13 Sep 2010

Abstract

Background: Arsenic is one of the most important current environmental toxicants. Arsenic is one of the biggest protein stress inducer in several organs and systems. One of the basic and sensitive criteria for following protein stress is assessing carbonyl and thiol groups of proteins. Therefore, we assessed protein stress that produced by sodium arsenite in chicken embryos by measuring carbonyl and thiol proteins.

Materials & Methods: After 4 days of incubation, 36 fertilized eggs were candled. The eggs that had alive embryos received a single injection of 0.1 and 0.5 ppm arsenite sodium in two separate groups of 12 eggs and the rest 12 (control group) received 0.5 ml saline into the yolk sac. After 20 days of incubation, teratogenicity and external defects in embryos were investigated. one ml of embryo blood was analyzed for assaying protein thiol and carbonyl as well. Data were analyzed by SPSS (version 16) with ANOVA test (tukey).

Results: The mean of carbonyl protein was in 0.1 ppm group 0.835, 0.5 ppm group 0.844 and control group 0.804 and this change was significant and dose dependent. In addition, the mean of thiol protein was in 0.1 ppm group 0.053, 0.5 ppm group 0.014 and control group 0.054 and this change was also significant and dose dependent.

Conclusion: The carbonyl and thiol protein alterations in serum of embryos exposed to arsenite sodium, suggest the embryotoxicity of this agent induction of plasma carbonyl and thiol protein stress.

Keywords: arsenite sodium, protein stress, chicken embryo, carbonyl, thiol, embryotoxicity, teratogenicity

1- (*Corresponding Author) Researcher, Tehran University, Faculty of Veterinary Medicine, Dept. of Toxicology, Tehran, Iran
Tel: +98-9144911391 E-mail: zadehashem.elham@gmail.com

2- Associate Professor, Tehran University, Faculty of Veterinary Medicine, Dept. of Toxicology, Tehran, Iran

3- Assistant Professor, Tehran University, Faculty of Veterinary Medicine, Dept. of Clinical Pathology, Tehran, Iran

4, 5- Researcher, Tehran University, Faculty of Veterinary Medicine, Dept. of Toxicology, Tehran, Iran

6- Researcher, Aja University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

7- Researcher, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Tehran, Iran.

8- Researcher, Tehran University, Faculty of Veterinary Medicine, Dept. of Theriogenology, Tehran, Iran.