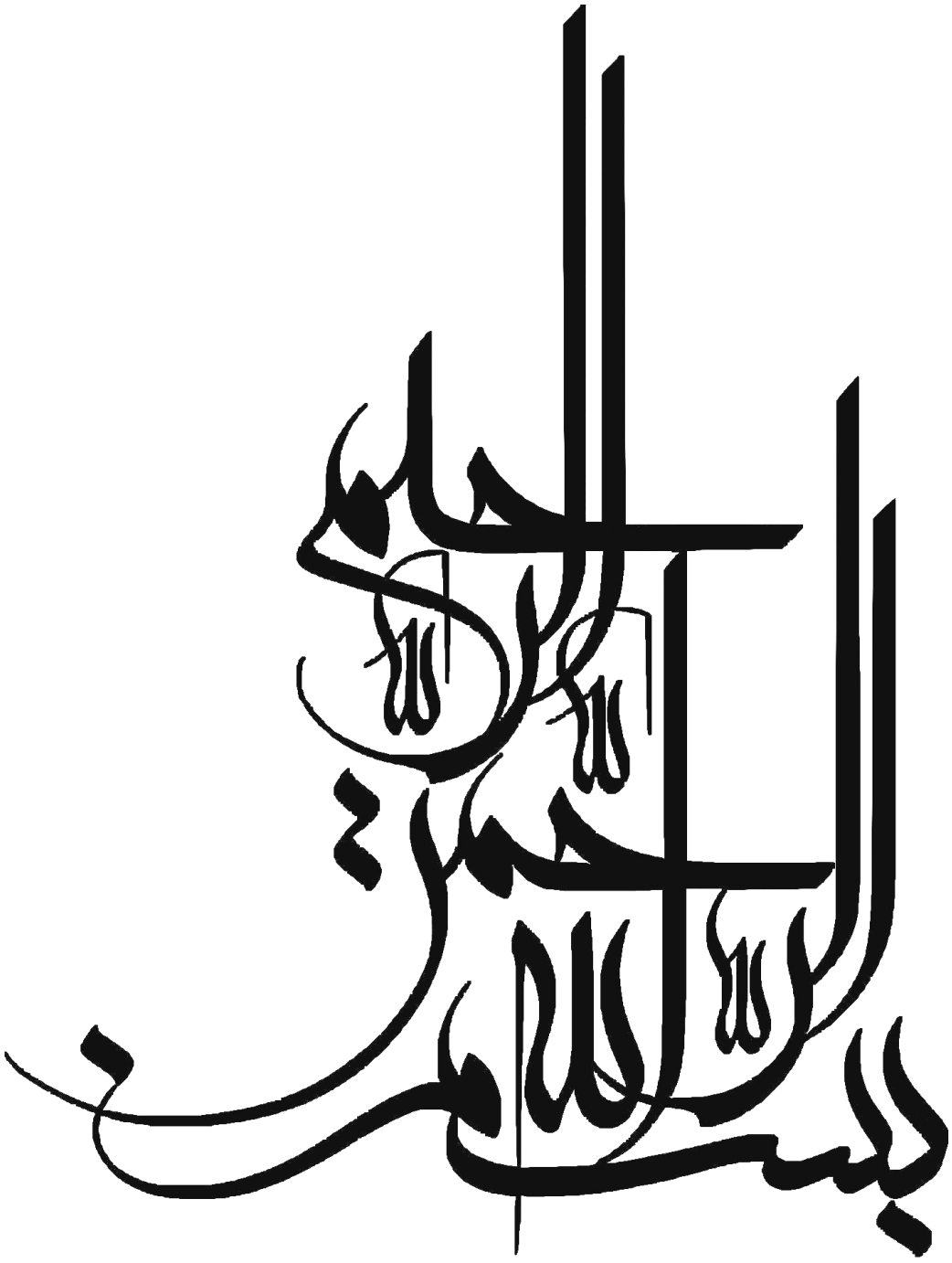

دانشکده دامپزشکی

پایان نامه دکتری حرفه ای رشته‌ی دامپزشکی

بررسی اثر نانو ذره سلنیوم بر بیومارکرهای استرس اکسیداتیو کلیه و کبد موش در مسمومیت تجربی با سرب

استاد راهنما:
دکتر افشین جعفری دهکردی

استاد مشاور:
دکتر عبد الناصر محبی
دکتر محمد رضا اصلانی

پژوهشگر:
ناصر صالحی اردکانی

آبان ماه ۱۳۹۳

دانشکده دامپزشکی

گروه علوم درمانگاهی

پایان‌نامه **آقای ناصر صالحی اردکانی** جهت اخذ درجه دکتری دامپزشکی با عنوان **بررسی اثر نانو ذره سلنیوم بر بیومارکرهای استرس اکسیداتیو کلیه و کبد موش در مسمومیت تجربی با سرب**در تاریخ **۱۳۹۳/۶/۳۱**با حضور هیئت داوران زیر بررسی و با رتبه/ نمره ..... مورد تصویب نهایی قرار گرفت.

۱. استاد راهنمای پایان نامه

دکتر افشین جعفری دهکردی با مرتبه علمی استادیار **امضاء**

۲. استاد مشاور پایان نامه

دکتر محمدرضا اصلانی با مرتبه علمی استاد **امضاء**

دکتر عبد الناصر محبی با مرتبه علمی استادیار **امضاء**

۳. استادان داور پایان نامه

دکتر غلامعلی کجوری با مرتبه علمی استاد **امضاء**

دکترسعید حبیبیان دهکردی با مرتبه علمی دانشیار **امضاء**

مسئولیت کلیه عقاید و نظراتی که در این پایان نامه آورده شده است به عهده نگارنده بوده و دانشکده دامپزشکی هیچ مسئولیتی را در این زمینه تقبل نمی‌نماید.

دکتر محمد رضا اصلانی
معاون پژوهشی و تحصیلات تکمیلی
دانشکده دامپزشکی

دکتر ناصر شمس اسفندآبادی
رئیس دانشکده دامپزشکی

کلیه حقوق مادی حاصله از نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه متعلق به دانشگاه شهرکرد است.

تقدیر و تشکر

سپاس و ستایش حضرت حق را که گوهر اندیشه و دانش را در صدف وجود انسان به ودیعه گذاشت تا او را از دیگر آفریده ها ممتاز سازد.

با سپاس و تشکر فراوان از اساتید گرانقدر و مهربانم **جناب آقای دکتر افشین جعفری دهکردی، جناب آقای دکتر محمدرضا اصلانی و جناب آقای دکتر عبدالناصر محبی** که در تمام مراحل انجام این پایان نامه رو تشکر راهم بودند و توصیه و راهنماییهای ارزنده شان همواره راهگشای زندگیم بوده و خواهد بود.

سپاس فراوان دارم از اساتید بزرگوارم **جناب آقای دکتر غلامعلی کجوری و جناب آقای دکتر سعید حسینیان دهکردی** که مسؤلیت داوری این پایان نامه را بر عهده گرفتند و با صبر و بردباری تمام، مرا در تصحیح آن یاری نمودند.

سپاسگزارم از تمامی کارمندان محترم دانشکده دامپزشکی شهرکرد و همه ی همکلاسی های خوبم (دامپزشکی ورودی ۸۷).

تقدیم به:

پدر بزرگوارم

که پاکی طینت و صفای باطنش آرام بخش دل و روشنی بخش راه زندگیم است. او که حال و آینده‌ام از آن زحمات بی‌دریغ اوست. او که چروک دستانش مقدس‌ترین خطوط کتاب آفرینش است. او که توانش را داد تا توانا باشم و سپید موی گشت تا سپیدروی بمانم.

مادر عزیزم

که تقدیم زندگی‌ام نیز تلافی گر یک نگاه محبت آمیزش نیست. وجودم برایش همه رنج بود و وجودش برایم همه مهر. او که لبانش بارگاه ترنم نغمه‌های آسمانی دعاست. فرشته مهربانی که وجودش سراسر مهر و قلبش تجلی گاه عشق است.

و

همسر مهربان و فداکارم

به پاس قدردانی از قلبی آکنده از عشق و معرفت که محیطی سرشار از سلامت و امنیت و آرامش و آسایش برای من فراهم آورده است

برادران عزیز و همیشه همراه ام

چکیده

سرب با تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و از بین بردن منابع آنتی‌اکسیدان باعث استرس اکسیداتیو در بدن می‌شود. استرس اکسیداتیو نشان دهنده ی عدم تعادل بین تولید رادیکال های آزاد و توانایی سیستم بیولوژیکی در خنثی سازی آنها به واسطه های واکنش پذیر و یا تعمیر آسیب ناشی از آنها می باشد. مهم‌ترین کاربرد سلنیوم، نقش آن در ساختمان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از قبیل گلوتاتیون پراکسیداز است که عملکرد آن‌ها حذف رادیکال‌های آزاد و گونه‌های اکسیژن فعال می‌باشد. نانو ذرات سلنیوم به دلیل توانایی جذب و توزیع بالا در بدن و کاهش اثرات سمی، توجه گسترده‌ای را به خود جلب نموده است. هدف از این تحقیق بررسی تأثیر آنتی‌اکسیدانتی نانو ذرات سلنیوم بر میزان فاکتورهای اکسیدانی بافت کبد و کلیه بوده است. به منظور انجام این تحقیق از ۳۰ سر موش صحرایی بالغ استفاده شد. پس از یک هفته نگهداری و تطابق‌پذیری، موش‌ها به‌طور تصادفی به ۶ گروه تقسیم‌بندی شدند (گروه ۱؛ دریافت‌کننده جیره تجاری معمول، گروه ۲؛ دریافت‌کننده سلنیت سدیم به میزان ۰/۱mg/kg، گروه ۳؛ دریافت‌کننده نانو سلنیوم به میزان۰/۱mg/kg، گروه ۴؛ دریافت‌کننده استات سرب به میزان ۱g/Lit ، گروه ۵؛ دریافت‌کننده استات سرب و سلنیت سدیم ، گروه ۶؛ دریافت‌کننده استات سرب و نانو سلنیوم). تمامی موش‌های صحرایی از هر گروه با استفاده از اتر ابتدا بی‌هوش و سپس اقدام به باز کردن حفره‌ی شکمی و خارج کردن کبد و کلیه هر کدام از موش‌های صحرایی شد. میزان مالون‌دی‌آلدهید، کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز بافت کبد و کلیه به‌عنوان شاخص‌هایی از میزان استرس اکسیداتیو محاسبه شدند. نتایج بدست آمده نشان داد که میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز کلیه و کبد در گروه دریافت کننده‌ی سرب تغییرات قابل ملاحظه‌ای نسبت به سایر گروه‌ها نشان داد. به این صورت که مقدار این آنزیم در گروه دریافت کننده‌ی سرب به حداقل خود کاهش یافته بود. نتایج TBARS در گروه دریافت‌کننده سرب افزایش بیشتری را نسبت به گروه کنترل و سایرگروه‌ها نشان داد. همچنین میزان مالون دی آلدئید در گروه دریافت کننده نانوسلنیوم و سرب کمتر از میزان آن در گروه دریافت کننده‌ی سلنیت سدیم و سرب می باشد. نتایج حاصل از آزمون کاتالاز هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری را بین گروه‌ها نداشت. نتایج حاضر نشان دادند فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز کلیه و کبد در گروه‌های دریافت کننده‌ی نانوسلنیوم دارای روند افزایشی بوده درحالی‌که در گروه دریافت کننده‌ی سرب از یک روند کاهشی نسبت به گروه کنترل پیروی می‌کند.

کلید واژه ها: نانو سلنیوم، مسمومیت با سرب، استرس اکسیداتیو، TBARS، کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز.

فهرست مطالب

عنوان **شماره صفحه**

فصل اول-مقدمه ۷

فصل دوم-کلیات

۲-۱- نانوذرات ۹

۲-۱-۱- مزایای نانوذرات ۱۰

۲-۱-۲- روش تولید نانوذرات ۱۰

۲-۱-۲-۱- چگالش شیمیایی فاز بخار ۱۰

۲-۱-۲-۲- تبخیر ۱۱

۲-۱-۲-۳- احتراق ۱۱

۲-۱-۲-۴- تشعشع ۱۱

۲-۱-۲-۵- فرآیند مکانیکی – شیمیایی ۱۲

۲-۲- سلنیوم ۱۲

۲-۲-۱- اهمیت تامین سلنیوم در بدن ۱۲

۲-۲-۲- وظایف سلنیوم ۱۴

۲-۲-۳- جذب سلنیوم ۱۴

۲-۲-۴- انتقال و ذخیره سازی سلنیوم ۱۵

۲-۲-۵- دفع سلنیوم ۱۵

۲-۲-۶- منابع سلنیوم ۱۵

۲-۲-۷- مسمومیت با سلنیوم ۱۶

۲-۲-۸- سلنوپروتئین ها ۱۷

۲-۲-۸-۱- تیروردوکسین ردوکتاز ۱۷

۲-۲-۸-۲- یدوتیرونین دیدیناز ۱۷

۲-۲-۸-۳- سلنوپروتئین P ۱۷
۲-۲-۸-۴- سلنوپروتئین W ۱۷
۲-۲-۸-۵- سلنوپروتئین کپسول اسپرم ۱۷
۲-۳- نانوسلنیوم ۱۸
۲-۳-۱- مزایای نانوسلنیوم ۱۸
۲-۴- سرب ۱۸
۲-۴-۱- جذب سرب ۱۹
۲-۴-۲- انتقال و ذخیره سازی سرب ۱۹
۲-۴-۳- دفع سرب ۲۰
۲-۴-۴- تشخیص مسمومیت با سرب ۲۰
۲-۴-۵- مکانیسم یونی مسمومیت با سرب ۲۰
۲-۵- رادیکال های آزاد ۲۱
۲-۵-۱- تولید رادیکال های آزاد ۲۲
۲-۵-۲- انواع رادیکال آزاد ۲۲
۲-۵-۲-۱- سوپراکسید ۲۲
۲-۵-۲-۲- پراکسید هیدروژن ۲۳
۲-۵-۲-۳- رادیکال هیدروکسیل ۲۳
۲-۵-۲-۴- اکسیژن منفرد ۲۳
۲-۵-۲-۵- نیتریک اکسید ۲۳
۲-۵-۳- نقش فیزیولوژیکی رادیکال آزاد ۲۳
۲-۵-۴- آسیب مولکولی ناشی از رادیکال های آزاد ۲۴
۲-۵-۴-۱- اکسیداسیون پروتئین ها ۲۴
۲-۵-۴-۲- اکسیداسیون کربوهیدرات ها ۲۵
۲-۵-۴-۳- اکسیداسیون DNA ۲۵
۲-۵-۴-۴- پراکسیداسیون لیپیدی ۲۵
۲-۵-۴-۵- اکسیداسیون هموگلوبین ۲۶

۲-۶- استرس اکسیداتیو ۲۶
۲-۷- آنتی اکسیدان ها ۲۶
۲-۷-۱- کاتالاز ۲۸
۲-۷-۲- سوپراکسید دسموتاز ۲۹
۲-۷-۳- گلوتاتیون پراکسیداز ۳۰

فصل سوم- مواد و روش کار

۳-۱- روش و طرح تحقیق ۳۲
۳-۱-۱- مواد مصرفی مورد استفاده ۳۲
۳-۱-۲- وسایل مورداستفاده ۳۲
۳-۱-۳- تهیه‌ی نانو سلنیوم ۳۲
۳-۱-۴- تهیه‌ی سرب ۳۳
۳-۲- فرآیند تحقیق ۳۳
۳-۳- جامعه‌ی آماری ۳۳
۳-۴- پرورش و درمان ۳۳
۳-۴-۱- نمونه‌گیری ۳۴
۳-۴-۲- شستشوی بافتی ۳۴
۳-۴-۳- تهیه هموژنیت بافت کبد وکلیه ۳۴
۳-۵- سنجش بیومارکرهای بافتی ۳۴
۳-۵-۱- روش اندازه‌گیری پروتئین به روش بردفورد ۳۴
۳-۵-۱-۱- استاندارد Bradford ۳۴
۳-۵-۲- آزمایش سنجش مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی ۳۵
۳-۵-۲-۱- تهیه‌ی نمونه‌ی بلانک و روش کار ۳۵
۳-۵-۳- آزمایش سنجش کاتالاز ۳۵
۳-۵-۳-۱- محلول‌ها ۳۵
۳-۵-۳-۲- روش کار ۳۶
۳-۵-۴- آزمایش سنجش سوپراکسید دیسموتاز ۳۶
۳-۵-۴-۱- تهیه محلول ۳۶
۳-۵-۴-۲- روش کار ۳۶
۳-۵-۵- آزمایش سنجش GPX ۳۷
۳-۵-۵-۱- شناساگرها ۳۷
۳-۵-۵-۲- روش کار ۳۷
۳-۶- تجزیه و تحلیل آماری ۳۷

فصل چهارم- نتایج

۴-۱- نتایج آزمایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی ۴۰
۴-۲- نتایج سنجش میزان فعالیت کاتالاز ۴۳
۴-۳- نتایج سنجش میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز ۴۴
۴-۴- نتایج سنجش میزان فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز ۴۷

فصل پنجم- بحث ۴۹

منابع ۵۳

فهرست شکل‌ها

عنوان **شماره صفحه**

شکل ۳-۱- نگهداری گروه های مختلف موش ها ۳۸

شکل ۳-۲- اتر و بی هوش کردن موش ها ۳۹

شکل ۳-۳- باز کردن حفره‌ی شکمی و خارج کردن کبد و کلیه ۳۹

شکل ۴-۱- تغییرات سطح بافتی TBARS کلیه ۴۱

شکل ۴-۲- تغییرات سطح بافتی TBARS کبد ۴۲

شکل ۴-۳- تغییرات سطح کاتالاز کلیه ۴۳

شکل ۴-۴- تغییرات سطح کاتالاز کبد ۴۴

شکل ۴-۵- تغییرات سطح بافتی سوپراکسید دیسموتاز کلیه ۴۵

شکل ۴-۶- تغییرات سطح بافتی سوپراکسید دیسموتاز کبد ۴۶

شکل ۴-۷- تغییرات سطح بافتی گلوتاتیون پراکسیداز کلیه ۴۷

شکل ۴-۸- تغییرات سطح بافتی گلوتاتیون پراکسیداز کبد ۴۸

فهرست جدول‌ها

عنوان **شماره صفحه**

جدول ۳-۱- اندازه نانوسلنیوم ۳۳

جدول ۳-۲- استاندارد بردفورد ۳۵

جدول ۴-۱- تغییرات میانگین و انحراف معیار میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی کلیه ۴۱

جدول ۴-۲- تغییرات میانگین و انحراف معیار میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی کبد ۴۲

جدول ۴-۳- تغییرات میانگین و انحراف معیار میزان کاتالاز کلیه ۴۳

جدول ۴-۴- تغییرات میانگین و انحراف معیار میزان کاتالاز کبد ۴۴

جدول ۴-۵- تغییرات میانگین و انحراف معیار میزان سوپراکسید دیسموتاز کلیه ۴۵

جدول ۴-۶- تغییرات میانگین و انحراف معیار میزان سوپراکسید دیسموتاز کبد ۴۶

جدول ۴-۷- تغییرات میانگین و انحراف معیار میزان گلوتاتیون پراکسیداز کلیه ۴۷

جدول ۴-۸- تغییرات میانگین و انحراف معیار میزان گلوتاتیون پراکسیداز کبد ۴۸

فصل اول

مقدمه

سرب فلزی است با وزن اتمی ۲۰۷/۲۱ و نقطه ذوب ۳۲۷ درجه سلسیوس، نقطه جوش ۱۶۲۰ درجه سلسیوس و دارای آثاری همچون دلدرد، ناراحتی‌های معدی-روده‌ای، کم خونی، ضعف و اثرات زیان‌آور و مخرب روی سلسله اعصاب می‌باشد. سرب جزء فلزات سنگین تقسیم بندی می شود که دارای قوامی نرم به رنگ خاکستری متمایل به آبی یا نقره ای کبود است[۱۲].

سرب به طور گسترده‌ای در محیط زیست اعم از آب و هوا و خاک یافت می‌شود. سرب در هوا به خودی خود اکسید شده و یک لایه‌ی اکسید سرب خاکستری روی آن را می پوشاند. در طبیعت به دو شکل سخت و بلوری بی‌شکل یافت می‌شود. سرب دارای سختی نمی‌باشد تا در اثر چکش کاری به صورت ورقه درآمده و یا به سیم نازک تبدیل گردد ولی آنرا در اثر فشار به لوله و یا بصورت ورقه‌های پیچیده تبدیل می‌نمایند. سرب به خوبی و آسانی در اسید نیتریک حل می‌شود و نیز تا حدودی در اسیدهای آلی مانند اسید استیک و اسیدهای موجود در اغذیه قابل حل شدن است. همچنین سرب به واسطه وجود نیترات‌ها، املاح آمونیوم و گاز کربونیک محلول می‌تواند از لوله‌های سربی در آب حل شود. وجود کربنات‌های سنگ‌های گچ و آهکی عمل فوق را متوقف نموده و تولید قشری در داخل لوله‌های سربی می‌نماید که از اثر عوامل مذکور در بالا جلوگیری خواهد کرد. از ترکیبات آلی سرب می توان به تتراتیل و تترامتیل اشاره نمود که در صنعت سوخت مورد استفاده قرار می گیرند[۳].

فلزات سنگینی مانند سرب می‌توانند با گروه سولفیدریل و تورین واکنش داده و به راحتی از غشای سلول عبور کنند و باعث افزایش رادیکال‌های آزاد در سلول شوند. همچنین با کاهش فلزات ضروری مانند مس و روی

که در ساختار برخی آنزیم‌ها و حتی متالوتیونین‌ها شرکت دارند، تولید فرآورده‌های زیان‌باری مثل پراکسیداسیون لیپید و رادیکال‌های هیدروکسیل را افزایش دهند که اکسیداسیون لیپید سبب تغییراتی در ساختار غشای سلولی و هسته شده و عملکرد میتوکندری را مختل می‌کند. گاهی در اثر اتصال این فلزات سنگین با ترکیبات آنتی‌اکسیدان، گروه SH آزاد می‌گردد و با اتصال مستقیم SH به تعدادی از پروتئین‌های مهم باعث تخریب آنها می شود[۴۳].

از آنجایی که آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی دارای ماهیت پروتئینی بوده، لذا می‌توانند بعنوان یکی از اهداف رادیکال‌های آزاد در داخل و خارج سلول (در هنگام استرس اکسیداتیو) محسوب گردند. در همین راستا Nel و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که هرگاه میزان رادیکال‌های آزاد محیط، بیشتر از حد طبیعی گردد، نوعی مهار عملکردی برای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پدیدار شده است که نتیجه‌ی آن آسیب در بسیاری از قسمت‌های سلول نظیر غشای سلولی و اندامک‌های درون آن و نیز DNA سلول می‌باشد[۶۷].
سلنیوم از عناصر کمیاب و اجزاء کاربردی آنزیم های مورد نیاز برای کارکرد صحیح سیستم ایمنی است و اثرات ضد سرطانی دارد. این عنصر بعنوان هسته مرکزی سلنوپروتئین ها از جمله گلوتاتیون پراکسیداز (Glutathione peroxidase)، فسفولیپید هیدروکسیداز و تایوردوکسین (Thioredoxin) عمل می کند[۴۵،۷۹]. در دهه‌ی ۱۹۵۰ اهمیت سلنیوم در تغذیه‌ی دام مشخص گردید و نخستین بار در سال ۱۹۵۷ محققین دریافتند که عنصر سلنیوم می تواند جایگزین ویتامین E در جیره ی غذایی موش و جوجه شود، بنابراین آن را جزء عناصر ریز مغذی قرار دادند. در سال ۱۹۷۳ معلوم شد عنصر ذکر شده جزئی از گلوتاتیون پراکسیداز است[۸۵،۱۰۹]. باید توجه نمود که نقش زیستی و میزان سمیت سلنیوم وابسته به ترکیب و فرمول شیمیایی آن است، در این بین می توان به نانو ذره سلنیوم اشاره کرد که ذره ای قرمز رنگ می باشد و قابلیت زیستی مشابهی با سلنیت سدیم دارد در حالی که میزان سمیت نانوسلنیوم ۷ برابر کمتر از سلنیت است[۴۹].

امروزه در علم داروسازی استفاده از نانوذرات به جهت قابلیت زیستی بالا وکاهش سمیت به عوارض جانبی داروها و ویژگی های جدیدی که ذرات نانو از خود بروز می‌دهند، از قبیل سطح مقطع بالا، فعالیت سطحی بالا، توانایی جذب زیاد، اثر بخشی بالا و سمیت کمتر نسبت به مکمل‌های معمول سلنیوم گسترش زیادی پیدا کرده است[۲۸،۷۵].

نانو سلنیوم می تواند با سمیت کم تر به عنوان یک آنتی اکسیدان و عامل محافظت کننده شیمیایی مورد استفاده قرار گیرد، که القای Glutathione S-transferase توسط سلنیوم از مکانیسم های اصلی محافظتی است[۷۱]. Kojouri و همکاران در سال ۲۰۱۱ در مطالعه ای گزارش کردند که اثرات آنتی اکسیدانی سلنیوم و میزان سمیت و دسترسی سلول ها به آن، وابسته به شکل شیمیایی آن است[۵۴]. بطور خلاصه نانوسلنیوم تاثیر مطلوب همراه با سمیت کمتر در افزایش فعالیت Glutathione peroxidase، Thioredoxin reductase و Glutathione S-transferase دارد و بعنوان یک عامل محافظت کننده با خطر سمیت کمتر نسبت به سلنیوم کارایی دارد[۶۶].

صادقیان و همکاران در سال ۲۰۱۱ طی تحقیقات خود به این نتیجه رسیدند که تجویز خوراکی نانو ذره سلنیوم و سلنیت سدیم به طور غیر منتظره منجر به افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی می شود هر چند که نانو ذره سلنیوم در مدت زمان کوتاه تری نسبت به سلنیت سدیم این نقش را القا می نماید [۸۱].

فصل دوم

کلیات

۲-۱- نانوذرات

نانوتکنولوژی امروزه مورد توجه خاص محققین و بسیاری از شرکت های تولیدی قرار گرفته و دنیا را در آستانه انقلابی به نام "انقلاب نانوتکنولوژی" قرار داده است. این فن آوری جدید منحصر به هیچ رشته خاصی نبوده و گستره ای به پهنای تمام علوم دارد. یکی از زمینه هایی که مربوط به فعالیت این فن آوری می باشد، تولید نانوذرات است[۱].

نانوذرات موادی هستند که به علت دارا بودن خواص منحصر به فرد خود در نوع خاصی از تولید به نام تولید پایین به بالا مورد استفاده فراوان قرار می گیرند. در تولید پایین به بالا به جای اینکه ماده مورد نظر را از تراش دادن ماده ی توده ای بسازند، آن را از ذرات و مولکول های تشکیل دهنده اش می سازند. این روش با روش معمولی بسیار متفاوت است زیرا در تولید معمولی حجم بسیار زیادی از مواد زاید حاصل از تراش دور ریخته می شود ولی در تولید پایین به بالا علاوه بر این که چنین مشکلی وجود ندارد، استحکام ماده تولیدی نیز به علت ایجاد پیوندهای قوی تر بین ذرات تشکیل دهنده بالا می رود[۱].

نانو ذرات همچنین دارای کاربردهای فراوانی در زمینه سیستم های بیولوژیکی، پزشکی، توزیع دارو در بدن، کاتالیست ها، سرامیک ها، الکترونیک، مغناطیس و ... می باشد. پتانسیل های فراوانی که برای کاربرد نانوذرات در دنیای فن آوری وجود دارد موجب پیدایش تحقیقات فراوانی جهت یافتن راه های جدید تولید این مواد و برطرف ساختن مشکلات موجود در مسیر تولید آنها شده است. از جمله مشکلات عمده ای که در تولید نانوذرات وجود دارد می توان اجتماع و به هم چسبیدن ذرات و نیز اکسید شدن سطح آنها را نام برد. یکی از پارامترهای کلیدی در کیفیت نانوذرات، کوچک بودن ابعاد آنهاست[۱].

لذا فرآیند تولید باید به گونه ای طراحی شود که این ذرات به هم نچسبند و به اصطلاح کلوخه نشوند زیرا این پدیده موجب رشد ناخواسته ذرات می شود. همچنین سطح تماس ذرات با کوچک شدن ابعاد آنها بالا رفته و موجب اکسید شدن سطح ذرات فلزی می شود و این پدیده در مواردی که هدف تولید ذرات فلزی و غیراکسیدی نظیر نیتریت‌ها باشد، یکی از مشکلات است که باید بر آن غلبه نمود[۱].
از جمله مسائل مهم دیگر در فرآیند تولید و مطالعه نانوذرات، روش آنالیز نتایج و محاسبه و بررسی اندازه ذرات است. ذرات تولید شده معمولا توسط پراش اشعه ایکس (XRD) یا میکروسکوپ الکترونی انتقالی (TEM) مورد مطالعه قرار می گیرند[۱].

۲-۱-۱- مزایای نانوذرات

نانوذرات به علت سطوح بزرگ اختصاصی، فعالیت کاتالیتیک بالا، توانایی جذبی بالا و از همه مهمتر سمیت کمتر مورد استفاده قرار می گیرند. با توجه به این مزایا نانوذرات در حال حاضر در برنامه های کاربردی دارویی برای افزایش فراهمی زیستی دارو و هدف قرار دادن اندام خاص توسط عوامل درمانی مورد استفاده قرار گرفته اند[۲۷].

۲-۱-۲-روش تولید نانوذرات

با توجه به گستردگی کاربرد نانوذرات، روش های مختلفی برای تولید آنها به کار گرفته می شود، که نوع روش بستگی به نوع ماده مورد نظر و نیز مورد کاربرد آن دارد. گاهی ذرات بطور خالص تهیه می شوند تا پس از تولید مورد استفاده قرار گیرند و در بعضی موارد آنها را در بستری که مورد استفاده قرار می گیرند تولید می کنند. روش های تولید را می توان به دو نوع کلی شیمیایی و فیزیکی، تقسیم نمود. البته در کنار این روش ها می توان فرآیندهای مکانیکی – شیمیایی را جهت تولید برخی ذرات مشاهده نمود. در روش های فیزیکی بدون انجام واکنش شیمیایی و فقط توسط فرآیندهای فیزیکی تولید می شود، ولی در روش های شیمیایی ابتدا یک واکنش شیمیایی بین تولیدکننده ها صورت گرفته، سپس نانوذرات تولید شده بر حسب نوع فرآیند، به روش های مختلفی از محیط استحصال می شود. در روش های مکانیکی – شیمیایی نیز ترکیبی از هر دو روش فوق وجود دارد[۱].

۲-۱-۲-۱- چگالش شیمیایی فاز بخار (Chemical Vapor Condensation)

این روش به طور کلی بر مبنای پیرولیز ماده اصلی تولید نانوذرات استوار است و فرآیند آن بدین گونه است که یک گاز حامل بی اثر و خالص وارد محفظه حاوی مایع اصلی تولید نانوذرات می شود. مایع در این محفظه توسط یک مشعل تجزیه شده و به وسیله گاز حامل به مبرد فرستاده می شود. بخارات در مبرد چگالیده شده و به صورت دانه یا خوشه در می آید.
نانوذرات مغناطیسی آهن و کبالت را می توان توسط این روش تولید نمود. بررسی تصاویر TEM تهیه شده از این ذرات نشان می دهد که تولید ذراتی با ابعاد حدود ۱۰ نانومتر توسط این روش عملی است[۱].

۲-۱-۲-۲- تبخیر

اساس کار در این روش بدین صورت است که محلول اولیه ای با پایه پلیمری را تبخیر می کنند تا به ذرات مورد نظر برسند. از این فرآیند تولید می توان برای دست یابی به پودرهای مولیبدات فلزاتی چون؛ نیکل، روی، مس، کلسیم ... استفاده نمود. یون های فلزی به صورت ترکیب با اسیدتترااستیک اتیلن دی آمین (ATED) در محلول اولیه موجود است. در این محلول همچنین دی اتانول آمین (DEA) و یک معرف پلیمری متشکل از پلی وینیل الکل (PVA) و ساکاروز وجود دارد. حرارت دهی این محلول تا حدود ۲۵۰ درجه سانتیگراد موجب آبگیری کامل از محلول شده و توده جرمی حجیمی را به وجود می آورد. انجام فرآیند حرارتی در حدود ۵۰۰ درجه سانتیگراد و DEA به منظور جلوگیری از تجمع ذرات و کلوخه شدن آنها صورت می گیرد. زیرا وجود DEA در محیط باعث می شود که یون های فلزی با ATED به صورت کمپلکس در آمده و به هم نچسبند و به منظور جداسازی این یون های فلزی از کمپلکس، محلولی از ساکاروز و PVA به محیط افزوده می شود. فرآیند حرارتی نیز به منظور کاهش کربن و ایجاد پودرهای خالص انجام می گیرد[۱].

۲-۱-۲-۳- احتراق

روش احتراق به طور کلی شامل تجزیه گرمازای یک سوخت (مانند اسیدسیتریک، اوره و ...) و یک اکسید کننده (مانند نیترات ها) بوده و برای تولید پودرهای نانومتری سرامیک های اکسیدی مورد استفاده قرار می گیرد. گرمادهی این فرآیند توسط یک شعله با دمایی بالغ بر ۱۰۰۰ درجه سانتیگراد انجام می گیرد. حجم بالای گاز تولید شده توسط چنین فرآیندی به سرعت باعث سرد شدن محصول و هسته زایی کریستال ها بدون رشد آنها می شود. همچنین این حجم گاز، مانع از به هم پیوستن ذرات و کلوخه شدن آنها شده و نهایتا محصولی را با دانه بندی بسیار ریز تولید می کند.

به عنوان نمونه پودرهای نانوکریستالی "اکسید توریم" (ThO_2) را می توان توسط چنین فرآیندی و با بکارگیری گلیسین (Glycine) به عنوان سوخت و نیترات توریم به عنوان اکسید کننده تولید نمود[۱].

۲-۱-۲-۴- تشعشع

واکنش با H_2S یا بخار گوگرد در فاز گاز، واکنش های فاز جامد و روش های پیرولیزی از جمله روش هایی است که برای تولید سولفیدهای مختلف استفاده می شود. اما استفاده از ترکیبات زیان آوری چون H_2S در این روش ها موجب تبدیل شدن آنها به فرآیندهایی مضر و زیان آور شده است. لذا با توجه به کاربردهای فراوان چنین ذراتی بهره گیری از روشی جهت تولید آنها که اولا زیان آور نبوده و ثانیا محصولات آن به صورت مجتمع و بهم چسبیده نباشند امری ضروری است. چنین فرآیندی می باید در دمایی نسبتا پایین انجام بگیرد و زمان واکنش کوتاهی داشته باشد تا دست یابی به پارامترهای مورد نظر را عملی سازد[۱].

یکی از فرآیندهای جدیدی که شرایط فوق را داراست، روش واکنش شیمیایی به کمک میکروویو است. در این روش گرمادهی بدون ایجاد قوس الکتریکی انجام می شود. اثر حرارتی این فرآیند به علت اثرات متقابل بین گشتاور در قطبی مولکول ها با تشعشع الکترومغناطیسی فرکانس بالا (2.45GHz) است و آب به موجب این که یک دوقطبی خیلی شدید است یکی از بهترین حلال ها جهت انجام واکنش به کمک میکروویو است[۱].

نتایج حاصل از مطالعات XRD و بررسی تصاویر TEM نشان می دهد که با چنین روشی می توان نانوذرات CdS و ZnS را با ابعادی به ترتیب در حدود ۹ و ۳ نانومتر تولید نمود[۱].

۲-۱-۲-۵- فرآیند مکانیکی – شیمیایی(MCP)

با انجام فرآیندهای مکانیکی – شیمیایی بر روی نمک های برخی از فلزات، می توان پودرهای کمپوزیتی با ابعاد نانومتری تهیه کرد. پودرهای تولید شده بدین روش، ساختار یکنواخت و خواص مکانیکی مناسبی دارد.
روش هایی که برای تولید نانوذرات مورد بررسی قرار گرفت، در واقع گوشه هایی از دنیای پهناور نانوذرات می باشد و با توجه به رویکرد گسترده جهان امروز به نانوتکنولوژی، هر روز روش ها و تکنیک های تولید جدیدتری کشف شده و ثبت می رسد. لذا عرصه برای فعالیت تمام مراکز دانشگاهی، تحقیقاتی و صنعتی در زمینه نانوتکنولوژی و بخصوص نانوذرات به عنوان بخشی از این فن آوری جدید باز است و موارد نامحدودی برای تحقیق و تولید در این زمینه وجود دارد[۱].

۲-۲- سلنیوم

عنصر کمیاب به عنصری گفته می شود که کمتر از ۰/۰۱ درصد از وزن خشک بدن را تشکیل دهد. عناصر کمیاب به دو دسته اساسی (ضروری) و غیر اساسی (غیر ضروری) تقسیم می شوند. عناصر کمیاب ضروری عبارتند از: کلر، کبالت، مس، آهن، ید، پتاسیم، منیزیم، منگنز، سدیم، نیکل، سلنیوم، روی، احتمالا کروم، فلور، سیلیکن، قلع، وانادیوم و برمیدیوم نیز جزء عناصر کمیاب ضروری می باشند.
سلنیوم از دستهٔ عناصر کمیاب ضروری است و تنها عنصر کمیابی است که متابولیسم آن با کنترل ژنتیکی انجام می گیرد و به صورت سلنوسیستئین (اسیدآمینه شماره ۲۱) در جایگاه فعال سلنوپروتئین ها قرار گرفته است، که در حقیقت از ۱۲۱ اسیدآمینه تشکیل شده اند[۴]. در ساختمان این اسیدآمینه، سلنیوم جایگزین گوگرد موجود در سیستئین شده است[۱۰۰]. این اسیدآمینه بر خلاف سایر اسیدهای آمینه غیر معمول همزمان با روند ترجمه وارد ساختار پپتیدی می شود[۴۸،۱۰۰]. کدون مربوط به وارد شدن سلنوسیستئین، UGA است[۱۱،۱۴،۱۰۰]. این کدون در عین حال به عنوان کدون اختتام (پایان) ترجمه در پستانداران در نظر گرفته شده است. نظریه کنونی این تناقص را با حضور عاملی در سیتوپلاسم به نام عامل وارد کننده سلنیوم یا SCIS (Seleno Cysteine Insertion Sequence) توجیه می نمایند، که یک ساختمان چهار حلقه ای است و در ناحیه ۳ ترجمه نشده mRNA قرار دارد[۴۸،۷۵،۱۰۰].

۲-۲-۱- اهمیت تامین سلنیوم در بدن

یکی از مشکلات تغذیه مردم در کشورهای در حال رشد، کمبود پروتئین می باشد. گوشت، شیر و سایر مواد لبنی از مهم ترین منابع پروتئین حیوانی هستند، که نقشی اساسی در سلامت و رشد جسمانی و فکری انسان ها ایفا می کنند. بدین لحاظ اهمیت و ارزش این مواد حیاتی با افزایش مداوم جمعیت و رشد اقتصادی جوامع بشری نمود بیشتری پیدا می کند. جهت تامین نیاز مواد غذایی جمعیت فعلی کشور و با توجه به روند رو به رشد موجود، الزاما بایستی پروژه های تحقیقاتی و تولیدی در دام در جهت افزایش بهره وری از منابع و امکانات موجود و تامین مواد غذایی برای نسل حاضر و نسل های آتی تدوین و به مرحله اجرا در آید.

بنابراین لازم است به تمامی عواملی که از طرق مختلف منجر به کاهش تولیدات دام می گردند، دقت کافی مبذول داشت. از میان این عوامل می توان به کمبود بعضی از عناصر غذایی که در حیات و تولیدات حیوان نقش موثری دارند، اشاره نمود. در بین این عوامل غذایی می توان از کمبود عنصر سلنیوم که همه ساله گزارشاتی از نقاط مختلف کشور مبنی بر عوارض ناشی از کمبود آن به دست می رسد را مطرح نمود.

در دهه ۱۹۵۰ اهمیت سلنیوم در تغذیه دام مشخص گردید و نخستین بار در سال ۱۹۵۷ محققین دریافتند که عنصر سلنیوم می تواند جایگزین ویتامینE جیره غذایی موش و جوجه شود، لذا آن را در زمره عناصری که دارای نقش تغذیه ای می باشند قرار دادند. در سال ۱۹۷۳ معلوم شد عنصر مزبور جزئی از گلوتاتیون پراکسیداز یا آنزیمی است که در حذف هیدروژن پراکسید به عنوان کاتالیزور عمل می کند و به این نحو نقش بیوشیمیایی آن در بدن مشخص گردید. مطالعات نشان می دهد که سلنیوم ناهنجاری های حاصل از کمبود ویتامینE را کاهش داده و یا برطرف می کند. نقش بیوشیمیایی سلنیوم همراه با ویتامینE صورت می گیرد. در نتیجه با فعالیت آنتی اکسیدانی در ارتباط است. زیرا اثرات فیزیولوژیک سلنیوم بیشتر به آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز که یک سلنوآنزیم است مربوط می گردد و ویتامینE نیز به عنوان یک آنتی اکسیدان محلول در چربی در غشا سلول عمل می کند و در مجموع این دو ماده به کمک هم، سبب کاهش ترکیبات فعال اکسیژن در سلول شده و اهمیت این موضوع بیشتر در حفظ غشاهای سلولی و ارگانل ها است، زیرا این بخش ها از سطوح نسبتا بالایی از چربی های پیچیده غیر اشباع تشکیل شده اند و اگر به خوبی در برابر اکسیدان ها محافظت نشوند، در معرض اکسیداسیون و نابودی قرار خواهند گرفت[۷]. عدم کنترل پراکسیداسیون غشاها به واسطه حضور برخی کمبودها و یا عملکرد ضعیف سیستم حفاظت کننده، می تواند برای سلامت حیوان مخاطراتی در پی داشته باشد[۲].

در این شرایط آنتی اکسیدان های بیولوژیک، مانند گلوتاتیون، آرژنین، سیترولین، تائولین، کراتین، سلنیوم، روی، مس، منگنز و ویتامین های A، C، E و آنزیم های آنتی اکسیدانی مثل سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز نقش مهمی را در بر داشت و نابودسازی گونه های واکنش زای اکسیژن دار می باشند[۳۶].

نقش سلنیوم نیز در همین زمان آشکار گشته و با تحکیم عملکرد گلوتاتیون پراکسیداز در انهدام پراکسیدازها، هیدروپراکسیدها و پراکسیدهیدروژن و احیا آنها به الکل ها، از خسارات ناشی از اکسیداسیون غشایی جلوگیری می نماید. از سویی دیگر ویتامین E نیز از اثرات مخرب اکسیداتیوهای موجود در جیره غذایی کاسته و در برخی موارد بطور جایگزین به جای سلنیوم عمل می نماید[۷].

فراهمی زیستی اشکال آلی سلنیوم (به عنوان مثال: سلنومتیونین) بیشتر از فرم غیرآلی (مانند: سلنیت سدیم) است[۲۷].

محققین چنین اظهار داشته اند که بدلیل ارتباط نزدیک اعمال فیزیولوژیک سلنیوم و ویتامینE به نظر نمی رسد که کمبود هر یک به تنهایی پدید آید. به هر حال امروزه مسلم گردیده که چندین بیماری در دام ها، در اثر کمبود سلنیوم یا ویتامینE یا هردو ایجاد می شود و اغلب با عوامل مستعد کننده مهمی از قبیل اسیدهای چرب اشباع نشده جیره غذایی، فعالیت های غیر معمول و رشد سریع در دام های جوان همراه می باشد.

از عوارض مربوط به کمبود ویتامینE و سلنیوم در گوسفند، می توان به بیماری ماهیچه سفید، دیستروفی عضلانی، عدم باروری، تاخیر در بره زایی، کاهش رشد، کاهش تولید پشم، بیماری های دهان و دندان و پوسته پوسته شدن پوست گوش ها و ... اشاره نمود[۷۷].