DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.4.1.4

توسعه برنامه‌ای برای بررسی خودکار سمیت ترکیبات زیست فعال با استفاده از آزمون *Artemia* spp.

فاطمه سلیمی[1*]، علی متین نژاد[2]، هلیا فرخ نیا[3] و مینا نصرت زاده[3]

[1]ایران، دامغان، دانشگاه دامغان، دانشکده زیست شناسی، گروه زیست شناسی سلولی-مولکولی

[2]ایران، تهران، دانشگاه علم و صنعت ایران، دانشکده مهندسی کامپیوتر

[3] ایران، تهران، مرکز ملی توسعه استعدادهای درخشان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۱۹

چکیده

ترکیبات مورد استفاده در صنایع دارویی، غذایی و آرایشی-بهداشتی بایستی غیرسمی باشند. یکی از آزمونهای تعیین سمیت، با استفاده از لاروهای *Artemia* spp. به عنوان موجود حساس به سموم مختلف صورت می‌گیرد. در این آزمونها ویژگیهای مختلف این لاروها بررسی می‌شود. یکی از پرکاربردترین این فاکتورها بررسی بقاء و مرگ لاروهاست. تشخیص لاروهای زنده و مرده بر اساس حرکت یا عدم حرکت آنها صورت می‌گیرد. اگرچه حرکت سریع لاروها شمارش آنها را مشکل می‌سازد و قابلیت اطمینان آزمون کاهش می‌یابد. مطالعه حاضر با هدف توسعه برنامه‌ای برای تمایز خودکار لاروهای زنده و مرده و شمارش آنها در زمانی کوتاه و با دقتی بالا انجام شده است. در این راستا برنامه‌ای در محیط MATLAB با روشهایImage Analysis به منظور تشخیص لاروها توسعه داده شد. حرکت لاروهای زنده با روش Image Subtraction تشخیص داده شد. برنامه، تصاویر ارسالی را از دوربین در دو بازه زمانی ۲۰ ثانیه‌ای در انتهای دوره مجاورت لاروها در حضور ماده مورد بررسی دریافت و پردازش می‌کند. در هر بازه تصویر زمینه برای همان بازه محاسبه می‌شود. این کار موجب می‌شود لاروهایی که تاکنون مرده‌اند به تصویر زمینه اضافه گردند و در تشخیص لاروهای زنده شمارش نشوند. برنامه طراحی شده توانست با دقت بالا لاروهای زنده و مرده را شمارش کند. یافته‌های به دست آمده از برنامه با یافته‌های ارائه شده توسط کاربر متخصص به لحاظ آماری اختلاف معنا داری نداشتند ($P>0.05$). مزایای این آزمون بهبود داده شده با برنامه نویسی عدم نیاز به شرایط آسپتیک، مواد و تجهیزات پرهزینه، حضور کاربر و خطای کاهش یافته است.

واژه های کلیدی: *Artemia* spp، آزمونهای سمیت حاد، درصد بقاء و مرگ، Image analysis، MATLAB

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۳۳۵۲۲۰۲۲۳، پست الکترونیکی: f.salimi@du.ac.ir

مقدمه

آزمونهای ارزیابی سمیت حاد، نخستین مرحله برای تعیین خطر ترکیبات شیمیایی جدید است. در این راستا، سمیت این ترکیبات شیمیایی بایستی توسط آزمونهای سمیت در شیشه (*In vitro*) با استفاده از گلبولهای قرمز خون، رده-های مختلف سلولهای یوکاریوتی و حتی مخمر *Saccharomyces cerevisiae* با به کارگیری معرفهای مختلفی همانند متیل تیازول تترازولیوم و تریپان بلو و همچنین آزمونهای سمیت در زیوه (*In vivo*) با استفاده از حیوانات آزمایشگاهی نظیر موش، موش صحرایی و خرگوش مورد ارزیابی قرار گیرد. علاوه بر این طیف وسیعی از ماهیها، پرندگان و دوزیستان به منظور ارزیابی اثر سمیت ترکیبات مورد استفاده در صنایع مختلف نظیر کشاورزی در آزمونهای سمیت مورد استفاده قرار می-گیرند(۹).

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.4.1.4

به منظور پیاده سازی قوانین بین المللی در مورد ارزیابی و محدودسازی اثرات سوء مواد شیمیایی، اطلاعات سم شناسی گسترده در مورد این مواد شیمیایی مورد نیاز است، در این راستا استفاده محدودتر از مهره داران در آزمونهای سمیت و به کار گرفتن راهکارهای جایگزین با استفاده از بی‌مهرگان، گیاهان و نیز کشت بافت و سلول مورد تشویق قرار گرفته است (۱۱).

در طول ۵۰ سال گذشته، بی‌مهرگان زیادی برای ارزیابی حساسیت آنها به بسیاری از ترکیبات شیمیایی و زیستی با هدف استفاده احتمالی آنها به عنوان مدلهای پیش غربالگری یا غربالگری سمیت، مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. یکی از این بی‌مهرگان بین المللی که رایج ترین گونه مورد استفاده در آزمونهای سمیت حاد است، خرچنگ آب شور، *Artemia* spp. ، است که به عنوان میمون دریایی شناخته می‌شود(۳۶). این خرچنگ آب شور متعلق به فرمانروی جانوران، شاخه بندپایان، زیرشاخه سخت پوستان، رده آبشش پایان، راسته پری میگوها، تیره آرتمیایان است و یک تاکسون اصلی در زیستگاههای آب شور در سراسر جهان می باشد (۳۴). آنها اهمیت اقتصادی بالایی در صنایع آبزی پروری و آکواریومی دارند(۳۳).

سیستها پس از قرار گرفتن در آب دریا برای ۲۰-۱۵ ساعت، موجوداتی به نام لارو یا ناپلی تولید می‌کنند جهت انجام این آزمون از لارو یا ناپلی در مرحله دوم و سوم استفاده می‌شود. این جانداران صرفاً در این دو مرحله به سموم حساسیت دارند. علاوه بر این، لاروها در این مراحل نیاز به تغذیه نداشته و از ذخیره کیسه زرده خود استفاده می‌نمایند (۲۴).

مزیتهای اصلی استفاده از خرچنگهای آب شور در آزمونهای سمیت حاد شامل سرعت بالای پاسخ دهی آزمون، مقرون به صرفه بودن آن، قابلیت دسترسی بالا به لاروهای تفرج شده از سیستهای پایدار، دسترسی به دانش کافی در مورد زیست شناسی و بوم شناسی *Artemia* spp.، تفرج و نگهداری آسان سیستها، اندازه کوچک بدن لاروها که امکان اجرای آزمون سمیت حاد را در میکروپلیتها فراهم می‌سازد و سازگاری بالا به شرایط متنوع آزمون می-شود (۱۷ و ۲۳).

لاروها برای بررسی سمیت حاد طیف گسترده ای از مواد شیمیایی همانند فلزات سنگین از جمله آرسنیک(۵)، کادمیوم، کروم(۱۸)، کبالت(۱۵)، مس(۴)، جیوه(۱۸)، نیکل(۱۶)، روی(۱۴)، پتاسیم پرمنگنات، پتاسیم دی کرومات، نقره نیترات (۳ و ۳۵)، آنتی‌بیوتیکها (۲۵)، نانومواد مهندسی شده(۷)، پلی استیرن در ابعاد نانو (۲)، پنبه نسوز (۳۲)، ترکیبات فنلی(۱۴)، اتانول آمینها (۱۹) علف کشها، حشره کشها و آفت کشها (۳۷)، عصاره‌های گیاهی(۶)، میکربی(۳۱)، توکسینها (۱)، پسابها و آب دریاها به کار گرفته شده است(۲۰). به طور معمول آزمونهای متنوع ارزیابی سمیت با *Artemia* spp. در دسترس هستند که شامل روشهای کوتاه مدت از جمله بررسی نشانگرهای زیستی آنها (شامل استیل کولین استراز، گلوتاتیون-پراکسیداز، گلوتاتیون S-ترنسفراز، گلوتاتیون ردوکتاز، آلدهید دهیدروژناز و آدنیل پیروفسفاتاز)، درصد تفرج (شامل بررسی زیتوده خشک، اختلالات شکلی و اندازه-ای)، رفتاری (سرعت شنا کردن و طول مسیر شنا) و بلند مدت که بر روی رشد، تکثیر، بقاء و مرگ از مرحله لاروی تا بلوغ متمرکز می‌گردد، می‌شود (۲۱ و ۲۲). آزمونهای سمیت کوتاه مدت بیشتر به کار گرفته می‌شوند. البته این آزمون علی رغم مزیتهای ذکر شده محدودیتهایی از جمله حساسیت کم به علت خطای احتمالی کاربر دارد.

تحرک و سرعت شنا پرکاربردترین آزمون رفتارشناسی جهت ارزیابی سمیت ترکیبات بر فیزیولوژی ارگانیسمهای آبزی همانند *Artemia* spp. است. تحرک، همانند شنا کردن، به عنوان شاخص استرس در چندین مطالعه سم شناسی اکولوژیکی به کار گرفته شده است و مقیاسی حساس از استرس ناشی از حضور سم را برای طیف

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.4.1.4

وسیعی از آلاینده‌های محیطی ارائه داده است. در طی ده سال اخیر، رفتار شنا کردن به عنوان پاسخ بی‌مهرگان همانند *Artemia* spp. به واسطه قرارگیری در معرض آلاینده‌های آلی یا غیرآلی مطالعه شده است(۱۲). اگرچه هنوز هم فقدان اساسی حسگرهای زیست سازگار اتوماتیک و الگوریتمها جهت ارزیابی و آنالیز داده‌های رفتاری *Artemia* spp. برای مطالعات سم شناسی وجود دارد. به عبارتی در تمامی مطالعات در زمینه بررسی سمیت حاد ترکیبات آلی و غیر آلی نتایج به صورت دستی بررسی می‌شوند و کوچک بودن و حرکت سریع این ارگانیسم می-تواند منجر به افزایش خطای آزمون و در نتیجه مانع غربالگری سمیت با کارایی بالا جهت بررسی سمیت تعداد وسیعی از ترکیبات در زمان کوتاه شود. از این رو قابلیت اطمینان این آزمون به طور عمده‌ای وابسته به تجربه کاربر در تمایز لاروهای زنده و مرده و همچنین دقت در شمارش لاروهای مرده است. علاوه بر این در اکثریت مطالعات تعداد لاروهای مرده و زنده پس از گذشت ۲۴ ساعت مورد شمارش قرار می گیرد، در حالی که با استفاده از این نرم افزار بدون نیاز به حضور کاربر می توان تعداد لاروهای مرده و زنده را در فواصل زمانی کوتاه تر مورد بررسی قرار داد و به این وسیله به نتایج دقیق تری دست یافت.

درحال حاضر بسیاری از روشهای قدیمی علوم آزمایشگاهی به واسطه وجود تجهیزات پیشرفته و مدرن با روشهای رایانه‌ای و خودکار جایگزین شده‌اند و درنتیجه آن، دو عامل خطا و زمان در انجام آزمایشات بسیار کاهش یافته‌اند. در مطالعه حاضر تلاش شد تا با استفاده از امکانات تصویربرداری و Image Analysis، نرم‌افزاری توسعه داده شود که بدون نیاز به دخالت کاربر اثرات آزمون را در مقاطع زمانی تعیین شده گزارش کند. این نرم‌افزار در محیط MATLAB توسعه داده شده است و برای اجرا تنها به یک رایانه و یک دوربین تصویربرداری ساده نیاز دارد.

مواد و روشها

تهیه عصاره مایع تخمیر باکتری *Nocardia* sp. UTMC 751 : به منظور تهیه عصاره مایع تخمیر باکتری *Nocardia* sp. UTMC 751، این باکتری در ارلن مایر ۲۵۰ml دارای ۵۰ml محیط پیش کشت FA (نشاسته ۱۰ g/L، عصاره مخمر ۴ g/L و پپتون ۲ g/L) استریل شده با اتوکلاو (دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد، به مدت ۲۰ دقیقه) تلقیح شد. ارلن تلقیح شده در شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجه و دور ۱۸۰ rpm به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد. پس از طی اتمام گرماگذاری و اطمینان از عدم آلودگی کشت، به میزان ۵ درصد حجمی-حجمی از محیط پیش کشت به محیط تخمیر (FA) تلقیح انجام شد. سپس فلاسک تخمیر در دمای ۲۸ درجه به مدت ۷ روز در شیکر انکوباتور با دور ۱۸۰ rpm گرماگذاری شد. در پایان دوره گرماگذاری زیتوده با استفاده از سانتریفیوژ با دور ۲۵۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه جداسازی شد. به منظور استخراج ترکیبات زیست فعال، معادل با حجم سوپرناتانت به دست آمده، اتیل استات تقطیر شده به فاز آبی اضافه گردید و در ادامه ارلن دارای این مخلوط به مدت ۹۰ دقیقه روی همزن قرار داده شد تا دو فاز در این مدت با همدیگر مخلوط شوند. در پایان فاز آلی که دارای متابولیتهای استخراج شده می‌باشد از فاز آبی به تدریج جدا شده و روی آن قرار می‌گیرد. در پایان این مرحله برای بازیافت حلال و تغلیظ متابولیتها، فاز آلی به دستگاه تبخیرگر دوار منتقل شده تا در دمای ۳۸ درجه و دور ۷۰rpm حلال از نمونه جدا شده و عصاره خام تغلیظ شده به دست آید که نهایتاً حلال اضافی باقی مانده در عصاره به کمک گاز ازت تبخیر گردید تا عصاره در وضیت کاملاً خشک در فریز ۲۰- نگهداری شود (۳۰).

تفرج سیستهای *Artemia salina* : جهت انجام این آزمون ابتدا سیستهای *Artemia salina* در آب مصنوعی دریا (جدول۱) تحت هوادهی و نور مصنوعی طی ۲۴ ساعت تفرج شدند. سپس تعداد ۱۰ تا ۲۰ عدد از لاروها به کمک

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.4.1.4

سمپلر به هر یک از چاهکهای پلیت ۴۸ خانه منتقل شدند و به چاهکها عصاره اتیل استاتی باکتری *Nocardia* sp. UTMC 751 با غلظتهای نهایی ۱ µg/ml، ۵ µg/ml، و ۱۰ µg/ml (گروههای آزمون) یا بافر فسفات (گروه شاهد) در سه تکرار افزوده شد. لاروها با استفاده از استرئومیکروسکوپ مشاهده شدند و با کمک دوربین فیلم برداری از لاروها به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. سپس فیلمهای تهیه شده برای طراحی و پیاده‌سازی الگوریتمی کارا به منظور تشخیص و شمارش خودکار لاروهای زنده و مرده بر اساس تحرک یا عدم تحرک آنها مورد استفاده قرار گرفتند.

جدول۱- نمکهای استفاده شده جهت تهیه آب دریای مصنوعی (۱۰)

ترکیبات	میزان (گرم در لیتر)
سدیم کلراید	۲۳/۳۷۵
منیزیم سولفات	۴/۹۲۵
پتاسیم بروماید	۰/۲
کلسیم کلراید	۰/۷۴۵
منیزیم کلراید.۶آبه	۴/۶۲۵
pH ۷/۲	

تشخیص لاروهای زنده با روش Image Subtraction : همان طور که پیش‌تر توضیح داده شد، مطالعه حاضر با هدف توسعه نرم‌افزاری برای شمارش تعداد لاروهای زنده و مرده در فواصل زمانی معین انجام گرفته است. روش استفاده شده برای تفکیک لاروهای زنده از مرده برمبنای تشخیص تحرک لاروهای زنده است. به عبارتی اگر یک لارو طی چند فریم متوالی (در فیلم تهیه‌شده) در جای خود ثابت مانده باشد آن لارو در شمارش به حساب نمی‌آید، زیرا برنامه فقط لاروهایی که حرکت داشته‌اند را تشخیص می‌دهد.

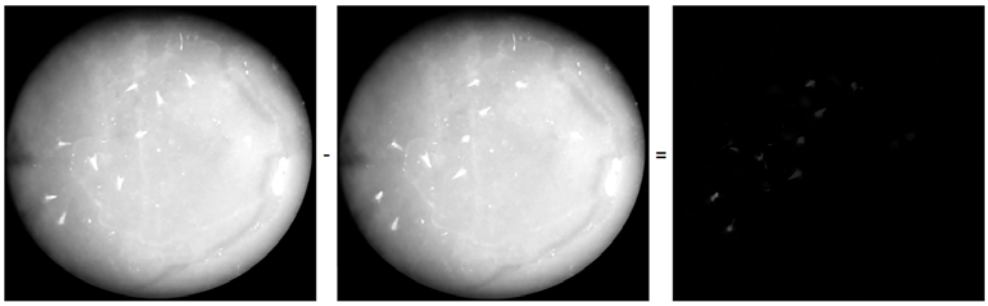
تشخیص حرکت یک لارو بین دو فریم با محاسبه تفاضل آن دو فریم امکان پذیر است. منظور از Image Subtraction تفریق شدت نور پیکسلهای متناظر در دو تصویر (فریم) است. از آنجاکه در تصویر شدت نور منفی معنا ندارد، هر تفریقی به عددی منفی برسد حاصل آن صفر در نظر گرفته خواهد شد. برای این کار ابتدا لازم است تصویر رنگی (RGB) به تصویر تک‌رنگ (Monochrome) تبدیل شود. در تصویر تک‌رنگ هر پیکسل مقداری عددی بین ۰ الی ۲۵۵ خواهد داشت که مشخص‌کننده شدت نور در آن نقطه است. پیکسلی با مقدار ۰ کاملاً سیاه و با مقدار ۲۵۵ کاملاً سفید خواهد بود.

وقتی دو تصویر مشابه از یکدیگر تفریق شوند نتیجه تصویری کاملاً سیاه خواهد بود. زیرا عدد هر پیکسل از خودش کم می‌شود و حاصل تفریق در تمام نقاط صفر خواهد بود. اما اگر در ناحیه‌ای تغییرات رخ داده باشد حاصل تفریق در آن نقاط دیگر صفر نخواهد بود و در تصویر حاصل رنگ خاکستری خواهد داشت. به این ترتیب می‌توان نواحی دارای تغییرات (ناشی از تحرک لاروها) بین دو فریم را تشخیص داد (شکل ۱).

افزایش دقت تشخیص با محاسبه تصویر زمینه: تشخیص حرکت لاروها به کمک روش Image Subtraction هرچند روشی ساده و ظاهراً کارآمد است اما ممکن است گاهی دچار خطا شود، زیرا این روش صرفاً بر مبنای تغییرات عددی پیکسلها عمل می‌کند. به طور مثال اگر در یک ناحیه یک لارو زنده قرار داشته باشد و جا به جا شود و به طور اتفاقی لارو زنده دیگری در همان ناحیه قرار گیرد آن ناحیه تغییر شدت نور نداشته و در شمارش به حساب نمی‌آید. این مشکل خصوصا در اوایل آزمایش که تعداد لاروهای زنده زیاد است نمود بیشتری دارد.

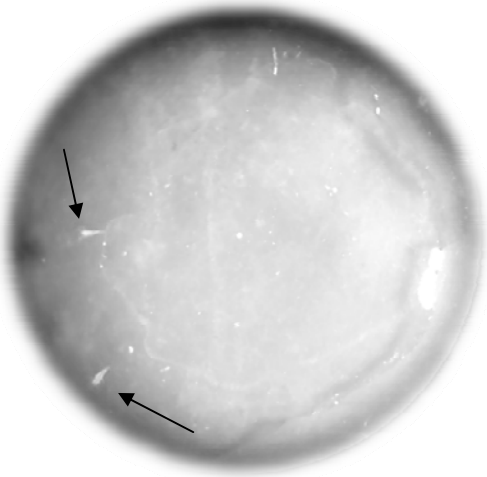
روش پیشنهادی برای حل این مشکل تفریق فریم از یک تصویر ثابت خالی از لارو زنده می‌باشد. به این معنا که برای تشخیص لاروهای زنده درون یک فریم، تفاضل آن با تصویر زمینه چاهک محاسبه گردد.

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.4.1.4



شکل ۱- تفریق دو فریم با فاصله زمانی ۱۳۸ میلی ثانیه

اما تصویر زمینه چاهک نباید خالی از لاروهای مرده باشد. زیرا در این صورت هنگام محاسبه تفاضل، لاروهای مرده نیز در شمارش محاسبه می‌شوند. درنتیجه لازم است تصویر زمینه چاهک شامل لاروهای مرده اما خالی از لاروهای زنده باشد. پس باید به جای داشتن یک تصویر زمینه ثابت در طول آزمایش، در هر مقطع زمانی تصویر زمینه‌ای متناسب با آن مقطع محاسبه و استفاده شود. برای به دست آوردن چنین تصویری از روش میانگین‌گیری استفاده شده است. در این روش تمامی فریمهای ویدیو در یک بازه زمانی (مثلا ۵ ثانیه) با هم جمع شده و میانگین آنها محاسبه می‌شود. به این ترتیب در تصویر حاصل لاروهای مرده حضور دارند اما اثر لاروهای زنده از بین می‌رود (شکل ۲).



شکل ۲- تصویر زمینه محاسبه‌شده با حضور دو لارو مرده

شمارش لاروهای زنده و مرده: در بخشهای قبلی تصاویری به دست آمدند که درواقع تفاضلی از دو تصویر مشخص بودند. در تفاضل مهم است که آیا یک پیکسل در ماتریس تفاضل به صفر نزدیک است یا از صفر دور است. اگر مقدار یک پیکسل در ماتریس تفاضل به صفر نزدیک باشد یعنی آن پیکسل در هر دو تصویر یکسان بوده است. به همین ترتیب اگر مقدار یک پیکسل در ماتریس تفاضل از صفر دور باشد، می‌توان نتیجه گرفت آن پیکسل در دو تصویر دست‌خوش تغییر شده است. در اینجا باید حدآستانه مناسبی انتخاب کرد تا به کمک آن بتوان این شباهت یا عدم شباهت پیکسلها در دو تصویر را به درستی تشخیص داد. این حدآستانه از طریق مشاهده نمونه‌های تهیه شده و با آزمون و خطا مشخص می شود.

در ادامه از حد آستانه تعیین شده، جهت تعیین ایجاد تغییر یا عدم ایجاد تغییر در تصاویر مورد بررسی استفاده شد. به این معنی که در این تصاویر پیکسلهای کمتر از حد آستانه کاملاً سیاه و پیکسلهای بیشتر از حد آستانه کاملاً سفید قرار داده شد. این کار کمک می‌کند ماتریس حاصل تنها شامل اعداد ۰ و ۱ باشد و پردازش آن ساده‌تر شود. اما تصویر فعلی هنوز آماده شمارش نیست. مسائلی همچون تغییرات نور محیط، ریزذره‌های درون چاهک و درهم رفتگی لاروها باعث ایجاد نویز و پیوستگیهای نا به جا در تصویر می‌شود که امر شمارش را با خطا مواجه می‌کند. لذا لازم است پیش از شمارش لاروها چند مرحله عملیات

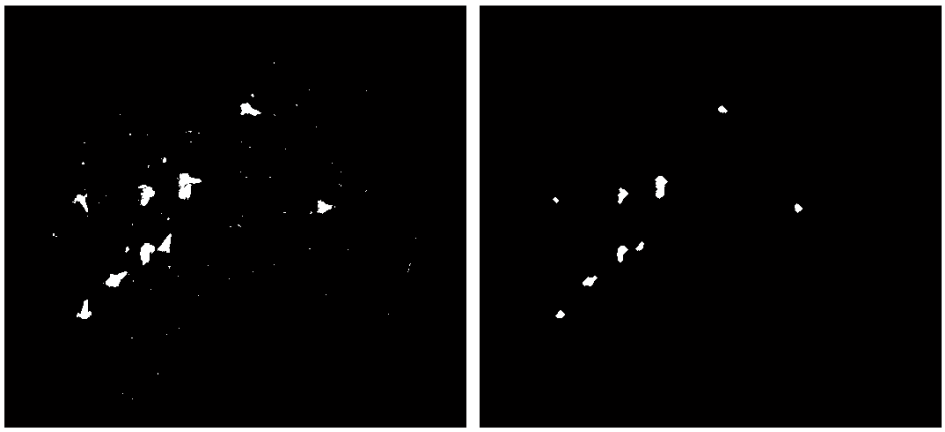
DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.4.1.4

مورفولوژی بر روی تصویر اعمال شود. این مراحل در بخش نتایج عنوان شده‌اند.

پس از اعمال فیلترهای مورفولوژی و حذف اجزای اضافی تصویر آماده شمارش می‌شود. در تصویر نهایی رنگ زمینه کاملاً سیاه بوده و فقط توده‌هایی سفید رنگ در برخی نواحی به چشم می‌خورد که نشان‌دهنده لاروهای زنده هستند. برای شمارش این توده‌ها برنامه تصویر را پیمایش می‌کند تا به پیکسلی سفید برسد. با پیداشدن یک پیکسل سفید تمامی پیکسلهای سفید متصل به آن (همسایگی ۸) به روش بازگشتی پیدا شده و سیاه می‌شوند. درنتیجه هرگاه یک توده سفید در تصویر پیدا شود ابتدا شمارش شده و سپس به طور کامل حذف می‌گردد و برنامه به پیمایش خود ادامه می‌دهد. به این ترتیب در پایان تعداد کل توده‌های سفید شمارش شده‌اند و به عنوان تعداد لاروهای زنده در آن مقطع گزارش می‌شوند (شکل ۳).

عملیات مورفولوژی به مجموعه عملیاتی گفته می شود که بر روی تصاویر باینری اعمال شده و هدف از آن ایجاد تغییرات هندسی در اجزای داخل تصویر است.

در یک ساختار ماتریسی هر خانه با دو خانه مجاورت عمودی (بالا و پایین)، با دو خانه مجاورت افقی (چپ و راست)، و با چهار خانه مجاورت مورب (بالا راست، بالا چپ، پایین راست و پایین چپ) دارد. منظور از همسایگی ۴ خانه‌هایی است که با مرکز مجاورت عمودی و افقی دارند. منظور از همسایگی ۸ تمامی هشت خانه‌ای است که با مرکز مجاورت عمودی و افقی و مورب دارند.



شکل ۳- تصویر لاروهای زنده پیش(چپ) و پس(راست) از عملیات مورفولوژی

نتایج

تفرج لاروهای *Artemia salina* : تعداد زیادی از سیستهای افزوده شده به آب مصنوعی دریا تحت شرایط ذکر شده تفرج شدند (۹۵ درصد) و بر این اساس تعداد زیادی از لاروهای موجود در مرحله اول و دوم لاروی جهت ادامه مطالعه در دسترس بودند.

تمایز لاروهای زنده با روش Image Subtraction : اساس برنامه طراحی شده در مطالعه حاضر تشخیص ایجاد تغییر یا عدم تغییر در پیکسلهای تصاویر متوالی حاصل شده از فیلم تهیه شده بود. به منظور تشخیص لاروهای زنده و مرده بر اساس قابلیت تحرک لاروهای زنده، برای پیکسلهایی که در دو فریم متوالی تغییری نداشته‌اند، دارای لارو مرده، حاصل برابر با صفر خواهد شد. پس می‌توان نتیجه گرفت طی این دو فریم در آن نقطه تغییر صورت نگرفته است. به همین ترتیب اگر در ماتریس Image Subtraction مقادیر غیرصفر وجود داشت می‌توان گفت در آن پیکسلها جا به جایی به واسطه حضور لاروهای زنده رخ داده است.

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.4.1.4

افزایش دقت تشخیص با محاسبه تصویر زمینه و شمارش لاروهای زنده و مرده: تصویر زمینه نیز با میانگین گیری میان چند تصویر متوالی حاصل شد و از آن جهت تشخیص صحیح لاروها از سایر اجزای موجود در محیط به طور موفقیت آمیزی انجام گردید. با استفاده از تعیین حد آستانه لاروهای موجود در تصویر تشخیص داده شد و استفاده از کدهای مورفولوژی منجر به پردازش تصویر و اصلاح از طریق حذف نویزها شد. در نهایت تصویر پردازش شده برای شمارش نهایی تعداد لاروهای مرده و زنده پیمایش می‌شود. مراحل عملیات مورفولوژی از جمله پر کردن حفره‌ها برای جلوگیری از شکست و تجزیه یک لارو (شکل ۴-ب)، حذف نویز برای از بین بردن اجزای اضافی (شکل ۴-ج)، باریک کردن اجزا به منظور تفکیک لاروهای به هم چسبیده (شکل ۴-د) و حذف نویز برای از بین بردن نقاط جدا افتاده (شکل ۴-ه) در شکل ۴ نشان داده شده است.

بررسی اختلاف میانگین نتایج تفسیر شده توسط کاربر و برنامه طراحی شده: به علت عدم پیروی داده از توزیع طبیعی نرمال ($P<0.05$)، اختلاف میانگین داده‌های بررسی سمیت حاد عصاره اتیل استاتی به دست آمده از باکتری *Nocardia* sp. UTMC 751 توسط برنامه طراحی شده و کاربر (۳ تکرار) با استفاده از آزمون Mann-Whitney U در نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۱ بررسی شد، نتایج نشان دهنده عدم اختلاف معنادار میانگین دو گروه مورد بررسی بود ($P>0.05$) (جدول ۲) (۳۱).

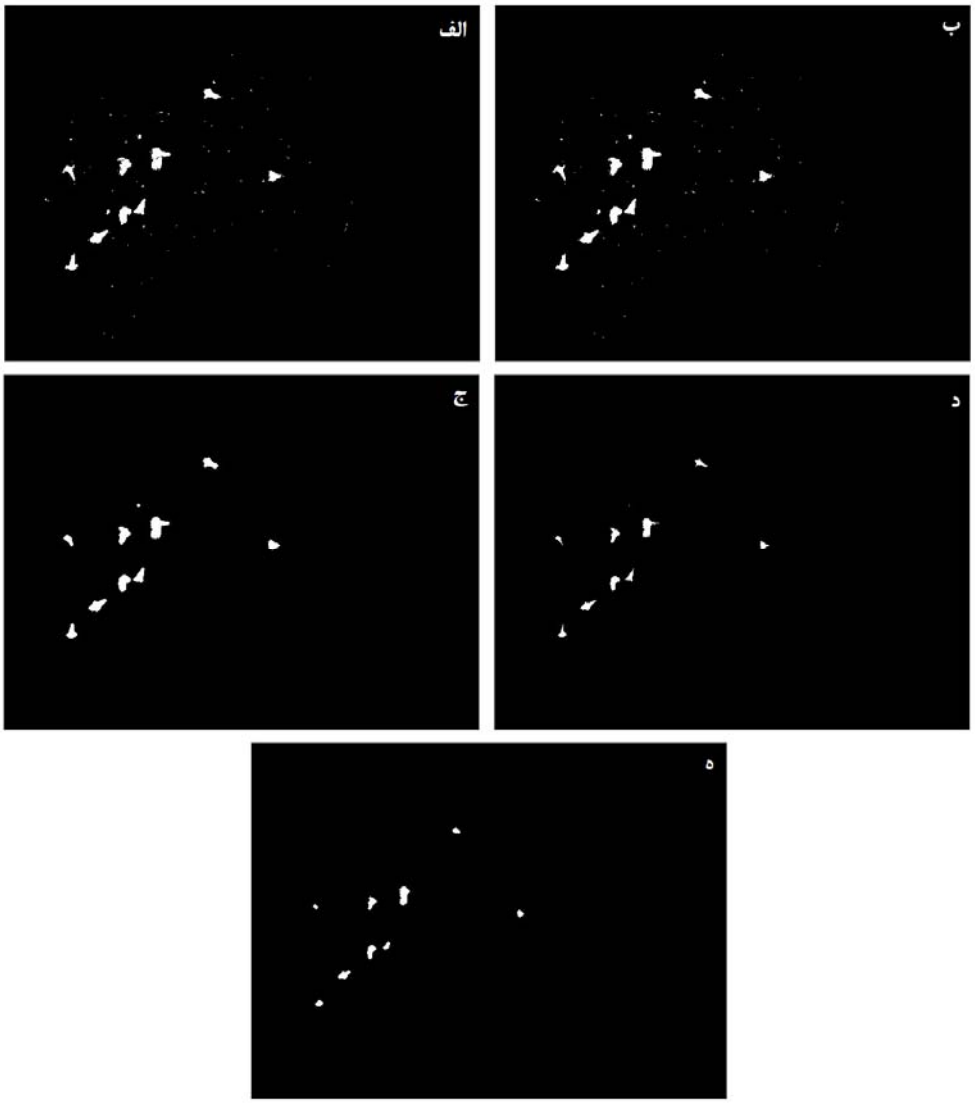
جدول ۲- مقایسه آماری نتایج به دست آمده از دو آزمون سمیت انجام شده توسط کاربر و برنامه طراحی شده

آزمون سمیت	درصد بقای *Artemia salina* (٪)			آزمون Mann-Whitney U
	۱µg/ml	۵µg/ml	۱۰µg/ml	
آزمون خرچنگ آب شور با تفسیر کاربر	۱۰۰	۱۰۰	۹۲	$P>0.05$
	۱۰۰	۱۰۰	۹۰	
	۱۰۰	۱۰۰	۹۴	
آزمون خرچنک آب شور با استفاده از نرم افزار شمارش خودکار	۱۰۰	۱۰۰	۹۰	
	۱۰۰	۱۰۰	۹۱	
	۱۰۰	۱۰۰	۹۰	

بحث

تعداد زیاد ترکیبات شیمیایی جدید در صنعت داروسازی انسانی و دامی، صنایع کشاورزی و غذایی منجر به تقاضای افزایش یافته برای غربالگریهای ایمنی به منظور اطمینان یافتن از توسعه موفق آمیز دارو شده است. بخشی از این فرآیند غربالگری شامل تعیین سمی بودن این ترکیبات جدید با به کار گیری آزمونهای معتبر بین المللی سم شناسی در شیشه (*In vitro*) و در زیوه (*In vivo*) می‌شود. از این رو آزمونهای سم شناسی ضروری هستند. آزمونهای سم شناسی می‌توانند در برخی تحقیقات پایه ای اطلاعاتی را فراهم نماید که در نهایت منجر به توقیف ترکیبات شیمیایی ویژه ای به واسطه سمیت اثبات شده آنها در این آزمونها شوند(۵).

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.4.1.4



شکل ۴- (الف)تصویر پردازش‌نشده. (ب)پر کردن حفره‌ها برای جلوگیری از شکست و تجزیه یک لارو. (ج) حذف نویز برای از بین بردن اجزای اضافی. (د)باریک کردن اجزا به منظور تفکیک لاروهای به هم چسبیده. (ه)حذف نویز برای از بین بردن نقاط جدا افتاده.

رت، موش، همستر، خوک، خوکچه، خرگوش، مرغ، سگ و میمون از جمله حیواناتی هستند که در آزمونهای سم شناسی در زیوه با اهداف مختلف تا کنون مورد استفاده قرار گرفته اند. قوانین حمایت از حیوانات در حال حاضر در اغلب کشورها برای جلوگیری از سوء استفاده از حیوانات در آزمایشهای سم شناسی قابل اجراست (۵).

مدلهای سلولی در مقایسه با مدلهای حیوانی نسبتاً مقرون به صرفه تر و به آسانی قابل نگهداری و دستورزی هستند. مدلهای در شیشه مطالعه تأثیرات مستقیم سموم را بر روی انواع سلولها و بافتهای ویژه در یک محیط کنترل شده امکان پذیر می‌سازد. معایب عمده سیستمهای در شیشه نسبت به سیستمهای در زیوه، فقدان اثرات سراسری، سیستم متابولیسم بیگانه‌زیستها و حذف سموم است. اگرچه این معایب می‌تواند با استفاده از سیستمهای فعال کننده متابولیکی همانند معرفی نیکوتین آدنین دی نوکلئوتید فسفات هیدروژن فعال کننده میکروزومها یا روی یک رده

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.4.1.4

سلولی کبدی تا حدودی برطرف شود، اما هر کدام از این عوامل هزینه بر خواهند بود و هزینه تمام شده آزمون سمیت را تا حد قابل ملاحظه ای افزایش خواهند داد و امر این آزمونها را برای غربالگری اولیه تعداد زیادی از ترکیبات نامناسب می‌سازد. محدودیت دیگر کشت سلول این است که بسیاری از سیستمهای سلولی فاقد پیچیدگی میانکنش‌های سلول-سلول در بافت هستند، این محدودیت می‌تواند تا حدودی با استفاده از سیستمهای کشت همزمان یا کشت بافت برطرف شود، که این امر نیاز به تخصص بالای کاربر در این زمینه دارد(۵).

همچنین همه کشتهای سلول بایستی به منظور کاهش آلودگی میکربی تحت شرایط استریل تهیه و نگهداری شوند. سلولها بایستی تحت شرایط تعریف شده‌ای از رطوبت، pH و دما نگهداری شوند. آنها بایستی در محیط کشتی ویژه که ممکن است دارای تعدادی از اجزا مکمل همانند آنتی بیوتیکها، گلوتامین، سرم و غیره باشد، رشد داده شوند(۵).

آزمون متداول استفاده شده در بررسی اثرات سمی یا سایتوتوکسیک ترکیبات طبیعی، سنتزی و نیمه سنتزی آزمون سمیت با استفاده از معرف تترازولیوم است (۸ و ۲۸).

در مطالعه ای رجبی و همکاران از *Artemia salina* به عنوان ارگانیسم مدل در بررسی سمیت نانوذرات استفاده و نتایج حاصله را با آزمون بررسی سمیت با استفاده از متابولیسم تنفسی سلولها با کمک رنگهای حیاتی مانند مشتقات نمک تترازولیوم مقایسه نمودند. نتایج نشان داد که داده‌های حاصل از هر دو آزمون اختلاف معناداری با یکدیگر ندارند ($P<0.05$) و بنابراین می‌توان از *Artemia salina* برای تسریع و کاهش هزینه‌های مربوط به آزمونهای سمیت حاد استفاده نمود (۲۹). (۲۷ و ۲۹)

همان طور که ذکر شد، به علت عدم نیاز به شرایط سترون، عدم نیاز به فاکتورهای رشد پرهزینه همانند سرم جنین گاوی در آزمون سمیت سلول بنیان به استفاده از *Artemia* spp. در آزمونهای سم شناسی وجود دارد. این آزمون در ابتدا توسط میشل و همکاران در سال ۱۹۵۹ پیشنهاد شد و بعدها به وسیله بسیاری از تکنسینها به عنوان یک روش جهت ارزیابی اولیه سمیت بهینه سازی شد(۲۶).

با توجه به موارد مذکور، *Artemia salina* یکی از انواع مهم و نسبتا گسترده سخت پوستان در آبهای لب شور تا شور ارگانیسمی مناسب جهت ارزیابی سمیت ترکیبات مختلف به عنوان غربالگری اولیه محسوب می‌شود. سیستهای *Artemia salina* دارای یک پوسته و پوشش غشایی اطراف جنین است و به طور معمول دارای ۶ تا ۱۰ درصد رطوبت و قابلیت بقا تا ۵۰ سال هستند.

در این راستا مطالعات اخیر ویژگیهای مختلف این لاروها را با استفاده از الگوریتمهای متفاوت جهت افزایش سهولت استفاده از آنها در آزمونهای سمیت، بررسی نموده اند. در این میان می‌توان به مطالعه Kokkali و همکاران اشاره نمود که در راستای بررسی سمیت فلزات سنگین از جمله یونهای مس، کادمیوم، آهن در غلظتهای مختلف با استفاده از آزمون خرچنگ آب شور از آنها فیلم برداری نمودند و فیلم گرفته شده را با استفاده از الگوریتم کاوشگر تحرک که قابلیت حرکت لاروها را مورد بررسی قرار می داد، پردازش نمودند. علی رغم تعداد کم لاروهای به کار برده شده، این سیستم حساسیت بالایی در بررسی تحرک لاروها داشت. علاوه بر این مقادیر بسیار کم از ترکیبات سمی قابل ردیابی با این برنامه بودند(۹).

در مطالعه Kim و همکاران نرخ تفرج *Artemia* به وسیله شمارش خودکار سیستها بر اساس اطلاعات رنگی به دست آمده از آنها طی آزمایشهای تفرج شدن با به کارگیری روش پردازش تصویر اندازه گیری شد. نرخ تفرج با استفاده از اطلاعات تصویری به دست آمده تحت شرایط آزمایشگاهی مختلف در طیف ۴۸-۳۴ درصد برآورد شد. اختلاف ۱۰/۹ درصد درصدی میان نتایج به دست آمده از

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.4.1.4

شمارش خودکار و شمارش دستی توسط کاربر مشاهده شد(۱۵).

در مطالعه Garaventa و همکاران احتمال بهبود آزمون سمیت با برآورد ویژگی رفتاری (تغییر در سرعت شنا کردن) لاروهای خرچنگ آب شور *Artemia* sp. و روتیفر *Brachionus plicatilis* در مطالعات سم شناسی مورد ارزیابی قرار دادند. نخستین آزمایش به منظور آنالیز سرعت شنا کردن دو ارگانیسم مذکور به منظور تأیید کارایی سیستم ردیابی ویدیویی انجام شد. آزمایش دوم با قرار گیری ارگانیسمها در برابر ترکیبات سمی انجام شد. تغییر سرعت شنا کردن همزمان با نرخ مرگ و میر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمون نخست نشان داد که ثبت رفتار شنا کردن ابزاری مناسب برای اندازه گیری سرعت شنا کردن دو ارگانیسم است. نتایج آزمون سمیت نشان داد که سرعت شنا کردن و یک شاخص حساس برای شناسایی تنش مواد سمی در غلظتهای ناچیز است(۱۳).

مطالعه حاضر کارایی آزمون ارزیابی سمیت با استفاده از *Artemia salina* را به کمک نرم افزار توسعه داده شده، به طور قابل ملاحظه ای افزایش داد. در این روش نیازی به حضور کاربر جهت بررسی تعداد لاروهای مرده و زنده در بازه‌های زمانی مختلف نیست و برنامه با دقت بالایی تعداد لاروهای زنده و مرده را که شاخص مستقیمی از سمیت ترکیب مورد بررسی است، ارزیابی می‌نماید. برنامه توسعه داده شده می‌تواند نرخ مرگ لاروهای *Artemia salina* را در گذر زمان مشخص سازد و لذا بین دو ماده با میزان مرگ و میر مشابه در انتهای یک دوره زمانی مشخص اما با سرعت کشندگی مختلف تمایز قائله شود، لذا در مطالعه حاضر می‌تواند اهمیت و کاربرد بالایی در بررسی همزمان سمیت تعداد زیادی از ترکیبات مختلف در بازه‌های زمانی مختلف داشته باشد.

منابع

1. Beattie KA, Ressler J, Wiegand C, Krause E, Codd GA, Steinberg CE, et al. 2000. Comparative effects and metabolism of two microcystins and nodularin in the brine shrimp Artemia salina. Aquat. Toxicol. 62(3):219-26.
2. Bergami E, Bocci E, Vannuccini ML, Monopoli M, Salvati A, Dawson KA, et al. 2016. Nano-sized polystyrene affects feeding, behavior and physiology of brine shrimp Artemia franciscana larvae. Ecotox Environ Safe. 123:18-25.
3. Boone E, Baas-Becking L. 1931. Salt effects on eggs and nauplii of Artemia salina L. J Gen Physiol.14(6):753-63.
4. Brix K, Gerdes R, Adams W, Grosell M. Effects of copper, cadmium, and zinc on the hatching success of brine shrimp (Artemia franciscana). 2006. Arch Environ Contam Toxicol. 51(4):580-3.
5. Brix KV, Cardwell RD, Adams WJ. 2003. Chronic toxicity of arsenic to the Great Salt Lake brine shrimp, Artemia franciscana. Ecotox Environ Safe.54(2):169-75.
6. Cáceres A, López B, González S, Berger I, Tada I, Maki J. 1998. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. J Ethnopharmacol.62(3):195-202.
7. Callegaro S, Minetto D, Pojana G, Bilanicová D, Libralato G, Ghirardini AV, et al. 2015. Effects of alginate on stability and ecotoxicity of nano-TiO2 in artificial seawater. Ecotox Environ Safe. 117:107-14.
8. Choori M, Boozarpour S, Moradi AV, Jorjani E. 2018. Investigation of *POU5F1* and *NANOG* gene expression in colon cancer cell line (Caco-2) treated by dendrosomal nano-curcumin. J Mol Cell Res. 3(3): 394-406.
9. Council NR. 2007. Toxicity testing in the 21st century: a vision and a strategy: National Academies Press.
10. Dietrich G, Kalle K. 1957. General Oceanography; an introduction.
11. Dvorak P, Benova K, Vitek J. 2012. Alternative biotest on Artemia franciscana. Ecotoxicology: IntechOpen.

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.4.1.4

12. Faimali M, Garaventa F, Piazza V, Greco G, Corra C, Magillo F, et al. 2006. Swimming speed alteration of larvae of Balanus amphitrite as a behavioural end-point for laboratory toxicological bioassays. Mar Biol.149(1):87-96.

13. Garaventa F, Gambardella C, Di Fino A, Pittore M, Faimali M. 2010. Swimming speed alteration of Artemia sp. and Brachionus plicatilis as a sub-lethal behavioural end-point for ecotoxicological surveys. Ecotoxicology.19(3):512-9.

14. Guerra R. 2001. Ecotoxicological and chemical evaluation of phenolic compounds in industrial effluents. Chemosphere.44(8):1737-47.

15. Kim S, Cho H-Y. 2013. Automatic estimation of Artemia hatching rate using an object discrimination method. Ocean Polar Res.35(3):239-47.

16. Kissa E, Moraitou-Apostolopoulou M, Kiortsis V. 1984. Effects of four heavy metals on survival and hatching rate of Artemia salina(L.). Archiv fur Hydrobiologie Stuttgart. 102(2):255-64.

17. Kokkali V, Katramados I, Newman JD. 2011. Monitoring the effect of metal ions on the mobility of Artemia salina nauplii. Biosensors.1(2):36-45.

18. Leis M, Manfra L, Taddia L, Chicca M, Trentini P, Savorelli F. 2014. A comparative toxicity study between an autochthonous Artemia and a non native invasive species. Ecotoxicology. 23(6):1143-5.

19. Libralato G, Ghirardini AV, Avezzù F. 2010. Seawater ecotoxicity of monoethanolamine, diethanolamine and triethanolamine. J Hazard Mater.176(1-3):535-9.

20. Libralato G, Annamaria VG, Francesco A. 2010. How toxic is toxic? A proposal for wastewater toxicity hazard assessment. Ecotox Environ Safe. 73(7):1602-11.

21. Libralato G. 2014. The case of Artemia spp. in nanoecotoxicology. Mar Environ Res.101:38-43.

22. Libralato G, Prato E, Migliore L, Cicero A, Manfra L. 2016. A review of toxicity testing protocols and endpoints with Artemia spp. Ecol Indic. 69:35-49.

23. Manfra L, Savorelli F, Pisapia M, Magaletti E, Cicero AM. 2012. Long-term lethal toxicity test with the crustacean Artemia franciscana. J Vis Exp. 14(62):e3790

24. Meyer B, Ferrigni N, Putnam J, Jacobsen L, Nichols Dj, McLaughlin JL. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Planta Med. 45(05):31-4.

25. Migliore L, Civitareale C, Brambilla G, Di Delupis GD. 1997. Toxicity of several important agricultural antibiotics to Artemia. Water Res. 31(7):1801-6.

26. Nourisson M. 1959. Quelques données relatives au développement post-embryonnaire du crustacé Phyllopode chirocephalus stagnalis shaw. La Terre et la vie.

27. Rajabi S, Ramazani A, Hamidi M, Naji T. 2015. Artemia salina as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. DARU. 23(1):20.

28. Rezaei A, Pourali P, Yahyaei B. 2017. Assessment of the cytotoxicity of gold nanoparticles produced by *Bacillus cereus* on hepatocyte and fibroblast cell lines. J Mol Cell Res. 9 (3):291-301.

29. Sachana M, Hargreaves AJ. 2018. Toxicological testing: in vivo and in vitro models. Veterinary Toxicology: Elsevier. p. 145-61.

30. Salimi F, Hamedi J, Motevaseli E, Mohammadipanah F. 2018. Isolation and screening of rare Actinobacteria, a new insight for finding natural products with antivascular calcification activity. J App Microbiol. 2018 124(1):254-66.

31. Salimi F, Jafari-Nodooshan S, Zohourian N, Kolivand S, Hamedi J. 2018. Simultaneous anti-diabetic and anti-vascular calcification activity of Nocardia sp. UTMC 751. Lett Appl Microbiol. 66(2):110-7.

32. Stewart S, Schurr K. 1980. Effects of asbestos on Artemia survival. The Brine Shrimp Artemia. 1:234-51.

33. Treece GD. 2000. Artemia production for marine larval fish culture: Southern Regional Aquaculture Center Stoneville, Mississippi.

34. Triantaphyllidis G, Abatzopoulos T, Sorgeloos P. 1998. Review of the biogeography of the genus Artemia (Crustacea, Anostraca). J. Biogeogr. 25(2):213-26.

35. Vanhaecke P, Persoone G, Claus C, Sorgeloos P. 2000. Research on the development of a short term standard toxicity test with Artemia nauplii.

36. Van Steertegem M, Persoone G. 1993. Cyst-based toxicity tests. V. Development and critical evaluation of standardized toxicity tests with the brine shrimp Artemia (Anostraca, Crustacea). rogress in Standardization of Aquatic

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.4.1.4

Toxicology Tests Boca Raton, Florida, USA: Lewis Publishers. 81-97.

37. Varó I, Navarro J, Amat F, Guilhermino L. 2002. Characterisation of cholinesterases and evaluation of the inhibitory potential of chlorpyrifos and dichlorvos to Artemia salina and Artemia parthenogenetica. Chemosphere. 48(6):563-9.

Software Development for Auto-Evaluation of Toxicity of Bioactive Compounds using *Artemia* spp. Test

Salimi F.[1*], Matinnejad A.[2], Farrokhnia H. [3] and Nosratzade M.[3]

[1] Cellular and Molecular group, Dept. of Biology, Damghan University, Damghan, I.R. of Iran.

[2] Faculty of Computer Engineering, Iran University of Science and Technology, I.R. of Iran.

[3]National Organization for Development of Exceptional Talents, Tehran, I.R. of Iran.

Abstract

Compounds used in pharmaceutical, nutritional and cosmetic should be non-toxic. One of the toxicity tests is performed using *Artemia* spp. as sensitive organisms to various toxins. In these tests, various characteristics of these larvae are investigated. One of the most commonly used factors is evaluation of the survival and death rate of larvae. Detection of live and dead larvae is based on the motility of larvae. However, the rapid movement of larvae makes it difficult to count, and thus the reliability of the test decreases. This study aimed to develop a program for the automatic differentiation of live and dead larvae and their counting in a short time and with high precision. In this regard, a program was designed using image processing rotes to distinguish larvae in MATLAB software. Motility of larvae was detected by image subtraction. The program receives images sent from the camera at two-time range (20 seconds) at the end of incubation period and then processes. At each interval, the background is calculated for the same interval. This will cause larvae that have died so far to be added to the background and not counted in the detection of live larvae. Eventually, the program could accurately count live and dead larvae. There is no significant difference between findings from the program and the findings provided by the expert user (P>0.05). Benefits of this improved test with programming are lack of need to aseptic conditions, costly materials and equipment and user presence as well as reduced errors.

Key words: *Artemia* spp, Acute toxicity tests, Survival and death rates, Image analysis, MATLAB