



مقاله پژوهشی

اثر غلظت‌های مختلف تحت کشنده نانوذرات نقره بر هورمون‌های تیروئیدی، هورمون رشد، شاخص‌های خونی و آنزیم‌های کبدی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

اکرم تهرانی‌فرد^{۱*}، سینا مولود صدری^۲

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۹

تاریخ پذیرش: شهریور ۱۴۰۰

چکیده

ماهی در بالاترین سطح زنجیره غذایی آبی قرار گرفته است و توانایی بزرگ‌نمایی زیستی فلزات سنگین، حتی در غلظت‌های پایین موجود در محیط را دارد. روش‌های بیوشیمیایی و سنجش شاخص‌های خونی از جمله شاخص‌های زیستی مهمی هستند که در ارزیابی وضعیت سلامت ماهیان به طور گسترده استفاده می‌شوند. هدف از این مطالعه بررسی اثرات نانوذرات نقره بر هورمون‌های تیروئیدی، هورمون رشد، شاخص‌های خونی و آنزیم‌های کبدی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) است. در این مطالعه از ۱۵۰ قطعه ماهی ۱۲-۱۵ گرمی پس به دست آوردن سمیت حاد (LC_{50} 96h)، به طور تصادفی به مدت ۷ روز در معرض غلظت‌های ۰ (شاهد)، ۵، ۱۰ و ۱۵ میکروگرم LC_{50} 96h در لیتر از نانوذرات نقره با سه تکرار قرار گرفتند. پس از اتمام دوره خون‌گیری از ساقه دمی ماهی‌ها انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات نقره منجر به اختلاف معنی‌داری در تعداد گلبول سفید، درصد نوتروفیل، لنفوسیت و ائوزینوفیل و همچنین مقدار ALT و AST در تیمارها شد ($P < 0/05$). همچنین نانوذرات نقره دارای تاثیرات منفی بر شاخص‌های خونی و بیوشیمیایی ماهی کپور معمولی بود.

واژگان کلیدی: نانوذرات نقره، هورمون رشد، شاخص‌های خونی، کپور معمولی.

- ۱- استادیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران.
- ۲- کارشناس ارشد زیست‌شناسی دریا، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران.

* نویسنده مسئول: akram.tehranifard95@gmail.com

مقدمه

هورمون‌های تیروئیدی در کنترل سوخت و ساز، رشد، تنظیم اسمزی، تجمع رنگدانه‌های پوست، تکامل و متامورفوسیم، فعالیت‌های حرکتی، رشد اسکلتی و وظایف دستگاه عصبی مرکزی نیز نقش دارند (Abdollahpour et al., 2018). هورمون‌های تیروئیدی T_3 (تری‌یدوتیرونین) و T_4 (تیروکسین) محصول غده تیروئید در تمام مهره‌داران هستند. نقش آن‌ها در مراحل اولیه رشد پستانداران و دوزیستان شناخته شده است (Leatherland et al., 1990). هورمون‌های تیروئیدی T_3 و T_4 از اسید آمینه تیروزین مشتق می‌شوند. حدود ۹۵ درصد از هورمون ترشح شده در غده تیروئید به صورت T_4 است. هورمون T_3 با وجود ترشح اندک، نقش اصلی را به عهده دارد. ۸۰ درصد T_3 موجود در خون در کبد و ۲۰ درصد آن در تیروئید ساخته می‌شود (Kandel et al., 2012).

بیوسنتز هورمون‌های تیروئیدی، تنظیم مرکزی فعالیت غده تیروئید و مسیرهای سوخت و سازی هورمون‌های تیروئیدی در ماهیان، خزندگان، پرندگان و پستانداران بسیار مشابه یکدیگر است (Blanton and Specker, 2007).

ماهی کپور معمولی از خانواده کپورماهیان (Cyprinidae) با نام علمی *Cyprinus carpio* یکی از ماهیان پرورشی مهم اقتصادی در آب شیرین است که به دلیل سهولت پرورش، به طور وسیعی در جهان پرورش داده می‌شود و جزء سومین گونه معرفی شده به صنعت آبی‌پروری در دنیا است (Saikia and Das, 2009). ماهی به عنوان یک موجود آبی با اهمیت برای ارزیابی اثر آلاینده‌های محیطی در بوم‌سامانه سازگان آبی در نظر گرفته می‌شود. ماهی در بالای زنجیره غذایی آبی قرار گرفته است و توانایی بزرگ‌نمایی زیستی فلزات سنگین، حتی در غلظت‌های پایین موجود در محیط را دارد (Bhagwant and Bhikagee, 2000).

سنجش شاخص‌های خونی می‌تواند در تشخیص کم‌خونی‌ها، مسمومیت‌ها، کمبودهای مواد غذایی و بیماری‌های عفونی کاربردهای فراوانی داشته باشد (Wood et al., 2012). روش‌های بیوشیمیایی و سنجش شاخص‌های خونی از جمله شاخص‌های زیستی مهمی هستند که در ارزیابی وضعیت سلامت ماهی به طور گسترده استفاده می‌شوند (Bhagwant and Bhikagee, 2000).

هر چند ممکن است که این مواد شیمیایی اثرات زیانبخش شدیدتری بر موجودات زنده نداشته باشند ولی به طور غیرمستقیم تعادل اکولوژیکی موجود در اکوسیستم را بر هم زده، عمل خودتنظیمی محیط را مختل می‌کنند و موجبات زوال زیستی اکوسیستم‌های آبی را فراهم می‌سازد (زمینی، ۱۳۷۵). استفاده از نانوذرات نقره در صنایع مختلف از جمله در مبارزه با بیماری‌ها و عوامل بیماری‌زا توسعه بی‌سابقه‌ای یافته است. با توجه به اثرات ضدباکتریایی بالا در مبارزه با عوامل بیماری‌زا، نانوذرات نقره از اهمیت ویژه برخوردار است (Sondi and Salopek-Sondi, 2004). خطرات استفاده از مواد ضدباکتریایی رایج، مشکلات زیست‌محیطی، انتقال مقاومت دارویی به عوامل بیماری‌زای انسانی و هزینه بالای مصرف، باعث گرایش بیشتر پژوهشگران به مواد جایگزین مناسب همچون نانوذرات نقره به عنوان مواد ضد میکروبی رایج شده است (بیتا و همکاران، ۱۳۹۶؛ Chopra, 2007؛ Sondi and Salopek-Sondi, 2004). اکوسیستم‌های آبی مقصد نهایی تمام آلاینده‌هایی است که وارد محیط زیست می‌شوند، به همین دلیل زیست‌مندان آبی می‌توانند تحت تاثیر انواع آلاینده‌ها قرار بگیرند.

هورمون رشد (GH) در ماهیان یا سوماتوتروپین به وسیله سلول‌های سوماتوتروپ بخش قدامی هیپوفیز ساخته می‌شود و وزن مولکولی تقریبی آن ۲۱ تا ۲۳ کیلوالتون است (ستاری، ۱۳۸۱). این هورمون که یک هورمون پروتئینی تک پلی‌پپتیدی است، در تنظیم فرآیندهای متعدد و پیچیده فیزیولوژیک، تسریع رشد سوماتیکی، رشد و نمو گنادی، بسیج انرژی، تنظیم متابولیسم چربی‌ها، پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها، تنظیم اسمزی، کارکردهای سیستم ایمنی، تولیدمثل، دگردیسی و تکوین، اشتها و رفتارهای اجتماعی مشارکت دارد. با توجه به این که رشد ماهیان در تمامی طول عمر ادامه پیدا می‌کند، می‌توان برای فعالیت‌های GH یک شبکه منظم و پیچیده که بسیاری از شاخص‌های اندوکروینی و محیطی را در بر می‌گیرد، تعریف کرد (Canosa et al., 2007). داده‌های به دست آمده از آزمایش‌های اکوتوکسیکولوژی به منظور ارزیابی مقادیر آلاینده‌ها در محیط زیست و سرنوشت آن‌ها، ارزیابی خطر آلوده‌کننده‌ها و متابولیت‌های آن‌ها برای موجودات زنده، ارائه توصیه‌هایی در مورد مقادیر مجاز و استانداردهایی که باید رعایت شوند و پیشگیری اثرات مواد در محیط زیست مورد استفاده قرار می‌گیرند (شریعتی، ۱۳۸۲).

با توجه به استفاده بیشتر نانوذرات نقره نسبت به نانومواد دیگر در محصولات مصرفی انسان، احتمال ورود این ماده به محیط زیست نیز بیشتر است (جوهری و حسینی، ۱۳۹۳). ورود فضلاب‌های آلوده به نانوذرات نقره به محیط آبی می‌تواند باعث تغییراتی در زیست‌بوم آبزیان شود که این تغییرات ممکن است بر موجودات زنده آبی اثر بگذارد.

آزمون‌های سمیت حاد یا تعیین غلظت نیمه‌کشنده (LC_{50}) به عنوان یک شاخص زیستی مهم به منظور اندازه‌گیری استعداد و پتانسیل مرگ و میر توده جانوری به مواد شیمیایی خاص است که باعث مرگ ۵۰ درصد جمعیت مورد مطالعه می‌شود (Shah and Altindag, 2005). به طور کلی آبزیان از طریق آب و غذا ممکن است در معرض نانوذرات قرار گیرند. با توجه به این که آبزیان و به ویژه ماهی کپور معمولی از منابع غذایی مهم مورد استفاده بشر هستند، ضرورت انجام مطالعات بیشتر در این زمینه احساس می‌شود. مطالعات زیادی در رابطه با سم‌شناسی نانومواد مختلف بر روی گونه‌های مختلف ماهی منتشر شده است (Johari et al., 2013). در مطالعات انجام شده توسط علیشاهی و مصباح (۱۳۸۹) با مقایسه سمیت نانوذرات نقره در ماهیان آمو

(Ctenopharyngodon idella)، شیربت
(Barbus grypus)، اسکار
(Astronotus ocellatus) و سوروم
(Cichlasoma severums) نشان داده شد که ماهی‌های آکواریومی (اسکار و سوروم) در برابر نانوذرات نقره مقاومت بیشتری نسبت به ماهیان پرورشی (آمو) و ماهیان وحشی (شیربت) داشتند. همچنین ماهی شیربت که یک گونه وحشی است بیشتر از ماهی‌های دیگر به نانوذرات نقره حساس بود (علیشاهی و مصباح، ۱۳۸۹). رزم‌آرا و همکاران (۱۳۹۳) با بررسی اثر نانوذرات نقره بر برخی شاخص‌های خون‌شناسی گربه‌ماهی رنگین‌کمان (*Pangasius hypophthalmus*) نشان دادند که تغییر معنی‌دار RBC، هماتوکریت، هموگلوبین، WBC، فراوانی آن‌ها و میزان گلوکز در غلظت بالای نانوذرات نقره می‌تواند نشان دهنده سمیت ترکیب مورد استفاده و بروز تنش در گونه مورد بررسی باشد. ملاحی (۱۳۹۷) با بررسی اثرات سطوح مختلف پروبیوتیک و نانوذرات نقره بر شاخص‌های رشد و ترکیب لاشه بچه ماهی کپور معمولی نشان دادند که LC_{50} در این ماهی ۰/۲۳ میلی‌گرم در لیتر بود و غلظت‌های بررسی شده نانوذرات نقره با افزایش غلظت، در سطح آنزیم‌های کبدی افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد از خود

با توجه به استفاده بیشتر نانوذرات نقره نسبت به نانومواد دیگر در محصولات مصرفی انسان، احتمال ورود این ماده به محیط زیست نیز بیشتر است (جوهری و حسینی، ۱۳۹۳). ورود فضلاب‌های آلوده به نانوذرات نقره به محیط آبی می‌تواند باعث تغییراتی در زیست‌بوم آبزیان شود که این تغییرات ممکن است بر موجودات زنده آبی اثر بگذارد.

آزمون‌های سمیت حاد یا تعیین غلظت نیمه‌کشنده (LC_{50}) به عنوان یک شاخص زیستی مهم به منظور اندازه‌گیری استعداد و پتانسیل مرگ و میر توده جانوری به مواد شیمیایی خاص است که باعث مرگ ۵۰ درصد جمعیت مورد مطالعه می‌شود (Shah and Altindag, 2005). به طور کلی آبزیان از طریق آب و غذا ممکن است در معرض نانوذرات قرار گیرند. با توجه به این که آبزیان و به ویژه ماهی کپور معمولی از منابع غذایی مهم مورد استفاده بشر هستند، ضرورت انجام مطالعات بیشتر در این زمینه احساس می‌شود. مطالعات زیادی در رابطه با سم‌شناسی نانومواد مختلف بر روی گونه‌های مختلف ماهی منتشر شده است (Johari et al., 2013). در مطالعات انجام شده توسط علیشاهی و مصباح (۱۳۸۹) با مقایسه سمیت نانوذرات نقره در ماهیان آمو

دکتر کیوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان واقع در بندر چمخاله منتقل شد. سازگاری در مخزن ۲۰۰۰ لیتری مجهز به سیستم هواده از کف، به مدت ۱۴ روز انجام شد.

شرایط فیزیوشیمیایی آب

در این آزمایش از ۱۲ آکواریوم ۳۰ لیتری استفاده شد. ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش آب چاه داخل آکواریوم ریخته و اکسیژن‌دهی انجام شد. ۱۰ قطعه ماهی کپور معمولی وزن شده به هر آکواریوم انتقال یافت. برای دوره آزمایش دما ۲۵ درجه سانتی‌گراد، $pH 8.5 \pm 0.5$ و اکسیژن محلول $8 \pm 1/2$ میلی‌گرم در لیتر در نظر گرفته شد (Rubio et al., 2005). شاخص‌های فیزیوشیمیایی آب شامل دما، اکسیژن و pH به صورت روزانه توسط دستگاه مولتی‌متر (WTW، آلمان) اندازه‌گیری شدند.

نانوذرات نقره

مشخصات نانوذرات نقره استفاده شده در این پژوهش (پیشگامان نانومواد ایرانیان، ایران) در جدول ۱ و تصویر آن در شکل ۱ آورده شده است.

نشان دادند. فروهر و همکاران (۱۴۰۰) با بررسی پاسخ‌های کشندگی نانوذرات نقره بر ماهی قرمز (*Carassius auratus gibelio*) نشان دادند که در طی مدت زمان ۲۴ تا ۹۶ ساعت با افزایش غلظت نانونقره، مرگ و میر نسبی ماهی‌ها افزایش پیدا کرد. ضیایی‌نژاد و همکاران (۱۳۹۷) تجمع بافتی کلونید نانوذرات نقره را در بافت‌های آبشش و عضله ساقه دم در ماهی کپور معمولی مطالعه کردند و نشان دادند که تجمع نانوذرات نقره در بافت‌های آبشش و عضله ساقه دم ماهی کپور معمولی، در پایان دوره تیمار بندی، از اختلاف معناداری بین تیمارها با غلظت‌های متفاوت برخوردار بود.

هدف از این مطالعه بررسی اثرات نانوذرات نقره بر هورمون‌های تیروئیدی، هورمون رشد، شاخص‌های خونی و آنزیم‌های کبدی کپور معمولی است.

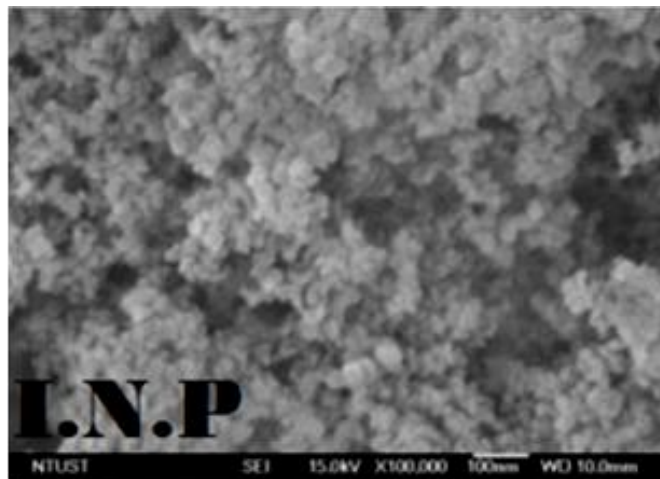
مواد و روش‌ها

تهیه کپور معمولی

تعداد ۱۵۰ قطعه بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) با میانگین وزن ۱۵-۱۲ گرم از مزارع پرورش ماهی اطراف لنگرود تهیه و به مرکز تحقیقات علوم شیلاتی و فنون دریایی

جدول ۱: مشخصات کلی نانوذره نقره

مقادیر	شاخص‌ها
۱۰/۵	چگالی (g/cm^3)
۹۹/۹	درجه خلوص (%)
سیاه	رنگ
کروی	شکل ذرات
۲۰	اندازه ذرات (nm)



شکل ۱: تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از نانوذرات نقره مورد استفاده در این مطالعه.

روش تعیین سمیت کشندگی (LC_{50}) نانوذرات نقره
 ابتدا با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی پلاسمای جفت شده القایی و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) کیفیت نانوذرات نقره از نظر خلوص مورد استفاده ارزیابی شد. برای تعیین سمیت نانوذرات نقره از استاندارد OECD (Organization Economic Cooperation Development) استفاده شد (OECD, 2001). ابتدا آزمایش‌های مقدماتی در سطح کوچک برای به دست آوردن حدود غلظت کشنده انجام شد، سپس برای رسیدن به غلظت‌های واقعی چندین بار آزمایش‌های اولیه انجام شد تا اندازه‌های تقریبی مورد نظر سم به

ساعت قبل از شروع آزمایش غذادهی قطع شد. با توجه به این که در مطالعه حاضر روش Renewal- Static Condition Test برای جلوگیری از اثر متابولیت‌ها و مواد آلی دفعی ماهی و نگهداری غلظت نانوذرات نقره در حد غلظت اولیه در نظر گرفته شد، آب تمامی مخازن هر سه روز یکبار با آب حاوی همان غلظت نانوذرات نقره تعویض می‌شد (Alishahi et al., 2016). در طول آزمایش، ماهی‌های بی‌حرکت و فاقد حرکت سرپوش آبششی مرده محسوب شده، از آب خارج می‌شدند. هر ۲۴ ساعت یکبار میزان مرگ و میر ثبت شد و در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت نتایج با روش آماری Probit Analysis در نرم‌افزار ToxTAT ثبت شد.

برای تعیین حداکثر غلظت مجاز ماده سمی، میزان عددی M.A.C Value در مدت ۹۶ ساعت طبق رابطه ۳ محاسبه شد (T.R.C., 1984).

رابطه ۳:

$$\text{M.A.C Value (mg/L)} = \text{LC}_{50} \text{ 96h} / 10$$

برای تعیین غلظت زیر حدکشدگی نانوذرات نقره بر ماهیان کپور معمولی، با حفظ رعایت شرایط استاندارد نگهداری در آزمایشگاه،

دست آید. انتخاب اعداد بین دو مقدار حداقل و حداکثر (x) به روش لگاریتمی و طبق رابطه ۱ محاسبه شد (TRC, 1984).

رابطه ۱:

$$x = (\log m - \log a) / m - 1$$

m: تعداد تیمار؛ a: عدد ثابت.

برای تعیین LC₅₀ 96h نانوذرات نقره برای ماهی کپور معمولی، چهار تیمار با غلظت‌های ۰/۲، ۰/۴، ۰/۵ و ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر نانوذره نقره و یک تیمار شاهد (بدون نانوذره نقره) در سه تکرار در نظر گرفته شد. فواصل غلظت نانوذرات نقره در تیمارها به صورت لگاریتمی محاسبه شد و سپس از محلول استوک اولیه به وسیله پمپت مدرج به اندازه غلظت‌های به دست آمده برداشته شد و به آب آکواریوم‌ها با حجم ثابت ۳۰ لیتر اضافه شد. برای تعیین غلظت از رابطه ۲ استفاده شد (Mortimer, 1967).

رابطه ۲:

$$M_1 V_1 = M_2 \times V_2$$

M₁: غلظت محلول اولیه (مول در لیتر)؛ V₁: حجم محلول اولیه (لیتر)؛ M₂: غلظت محلول ثانویه مول در لیتر)؛ V₂: حجم محلول ثانویه (لیتر).

در طی انجام آزمایش اندازه‌گیری سمیت حاد هیچ تغذیه‌ای صورت نگرفت و حتی ۲۴

سنجش شاخص‌های خون‌شناختی

شمارش گلبول‌های قرمز (RBC) به روش دستی و با استفاده از لام هموسیتمتر نئوبار صورت گرفت. برای این کار، ابتدا نمونه با محلول رقیق کننده نات-هریک و با استفاده از ملانژور قرمز به نسبت ۱ به ۲۰۰ رقیق شد. سپس نمونه رقیق شده به لام هموسیتمتر منتقل و پس از ۵ دقیقه برای ته‌نشین شدن گلبول‌های قرمز، تعداد آن‌ها در ۵ مربع متوسط ۱۶ خانه‌ای از مربع بزرگ مرکزی شمارش و تعداد سلول‌های شمارش شده در عدد ۱۰۰۰۰ ضرب شد و تعداد گلبول‌های قرمز در هر میلی‌متر مکعب تعیین شد (Rad et al., 2014).

میزان هموگلوبین (Hb) با استفاده روش سیان مت هموگلوبین و فتومتری توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (۷۴۱۵، شرکت جنوی انگلستان) در طول موج ۵۴۰ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت. سپس مقدار به دست آمده با منحنی استاندارد مقایسه و میزان هموگلوبین بر حسب گرم بر دسی‌لیتر تعیین شد (Rad et al., 2014).

اندازه‌گیری هماتوکریت (Hct) با استفاده از لوله‌های میکروهیاتوکریت صورت گرفت و نمونه خون توسط میکروسانتریفوژ (RST24S، شمیم رومینای فردوس، ایران) در دور ۳۰۰۰rpm به

ماهیان به مدت ۷ روز در معرض غلظت‌های ۰ (شاهد)، ۵، ۱۰ و ۱۵ میکروگرم نانوذرات نقره از استوک LC₅₀ 96h در لیتر با سه تکرار قرار داده شدند. بعد از این مدت اقدام به خون‌گیری و آزمایش‌های خون‌شناختی شد.

خون‌گیری

برای خون‌گیری، ماهیان هر تیمار از آکواریوم خارج شده، پس از بیهوشی با غلظت ۲۲۰ میلی‌گرم در لیتر از گل میخک، ابتدا با یک حوله خشک شدند. سپس با استفاده از سرنگ‌های هیپارینه ۵ میلی‌لیتری از سمت جانبی و با زاویه ۴۵ درجه از سیاهرگ ساقه دمی خون‌گیری شد (Blaxhall and Daisley, 1972). مقدار ۲ میلی‌لیتر از خون گرفته شده به لوله‌های هیپارینه منتقل شد. لوله‌های هیپارینه به مدت ۸ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰rpm سانتریفیوژ شدند و پلاسما از خون جدا شد. باقی مانده خون در کوتاه‌ترین زمان (زیر ۳ ساعت) و در دمای زیر ۴ درجه سانتی‌گراد برای بررسی شاخص‌های سلولی خونی شامل شمارش گلبول‌های قرمز و سفید، اندازه‌گیری غلظت هموگلوبین و هماتوکریت به آزمایشگاه انتقال داده شد (Rad et al., 2014).

سنجش آسپاراتات آمینو ترانسفراز و آلانین آمینو ترانسفراز

از روش IFCC (فدراسیون بین المللی شیمی بالینی و طب آزمایشگاهی) و بدون افزودن Pyridoxal-5-phosphate برای سنجش آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) و آسپاراتات آمینو ترانسفراز (AST) به ترتیب با استفاده از کیت‌های آنزیمی ALAT(GPT) و ASAT(GPT) (شرکت پارس آزمون)، قطر کووت یک سانتی‌متر، دما ۳۷ درجه سانتی‌گراد و اسپکتروفتومتر با بلانک هوا روی صفر، در طول موج ۳۴۰ نانومتر استفاده شد (Acerete et al., 2004).

سنجش آلکالین فسفاتاز

میزان آلکالین فسفاتاز (ALP) کل با استفاده از کیت آنزیمی Alkaline Phosphatase (شرکت پارس آزمون) در با طول موج ۴۰۵ نانومتر (حساسیت ۳ μL، درصد ضریب تغییرات ۱/۵، قطر کووت یک سانتی‌متر، دما ۳۷ درجه سانتی‌گراد) به روش فوتومتری سینتیکی استاندارد شده مطابق با DGKC (استاندارد انجمن بیوشیمی آلمان) با بلانک هوا روی صفر، مورد سنجش قرار گرفت (Moss and Henderson, 1999).

مدت ۱۰ دقیقه سانتیفریوژ شد. در نهایت درصد هماتوکریت توسط خط‌کش مخصوص سنجیده شد.

شاخص‌های گلبول قرمز شامل حجم متوسط گلبول قرمز (MCV)، میزان متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MCH) و غلظت متوسط هموگلوبین در گلبول‌های قرمز (MCHC) با استفاده از رابطه‌های ۴ تا ۶ محاسبه شد (Rad et al., 2014).

رابطه ۴:

$$MCV (fL) = [Hct / RBC \text{ (per million)}] \times 10$$

رابطه ۵:

$$MCH (pg) = [Hb / RBC \text{ (per million)}] \times 10$$

رابطه ۶:

$$MCHC (g/dL) = (Hb / Hct) \times 100$$

برای شمارش گلبول‌های سفید، ابتدا خون با محلول رقیق کننده ریس-هریک توسط ملانژور سفید به نسبت ۱ به ۲۰ رقیق شد. پس از انتقال نمونه به لام هموسیتومتر نوبار تعداد گلبول‌های سفید در ۴ مربع بزرگ کناری شمارش و در عدد ۵۰ ضرب شد و به این ترتیب تعداد گلبول‌های سفید در هر میلی‌متر مکعب خون محاسبه شد (Rad et al., 2014).

استاندارد نسبت عکس دارد (Hagmar et al., 1998).

سنجش هورمون رشد

سنجش هورمون رشد (GH) با کیت hGH- (ELISA) monobind (IBL، آمریکا) در دمای ۲۰-۲۷ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. برای آماده‌سازی سوبسترا به میزان لازم، حجم‌های مساوی از محلول‌های A و B با هم مخلوط و ۱۵ دقیقه در محیط تاریک قرار داده شد. برای آماده‌سازی به هیچ عنوان نباید از لوله‌های Acid Wash استفاده کرد. محلول یاد شده حداکثر ۲۴ ساعت در دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد پایدار است و باید حتما در محیط تاریک و یا ویال کدر نگه‌داری شود (Lal and Singh, 2005).

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و پس‌آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P < 0.05$) در نرم‌افزار SPSS 22 انجام شد و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Microsoft Excel 2013 استفاده شد.

سنجش هورمون‌های تیروئیدی T₃ و T₄

سنجش هورمون‌های تیروئیدی بر پایه ایمنونواسی آنزیمی رقابتی تنظیم شد. در آزمایش T₃ کونژوگه T₃ و در آزمایش T₄ کونژوگه T₄ متصل به آنزیم به همراه سرم یا استاندارد که در هر آزمون حاوی T₃ و T₄ طبیعی (بدون آنزیم) بود به چاهک‌های پوشیده شده با آنتی‌بادی‌های T₃ و T₄ اضافه شد. در زمان انکوباسیون در هر آزمایش رقابتی بین T₃ و T₄ کونژوگه و T₃ و T₄ سرم یا استاندارد برای اتصال به آنتی‌بادی‌های سطح چاهک ایجاد شد. پس از ۶۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، چاهک‌ها ۵ بار با محلول شستشو، شسته شدند. این عمل برای خارج کردن کونژوگه‌های غیرمتصل انجام شد. سپس محلول رنگ‌زا به چاهک‌ها اضافه شد و نمونه برای ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه شد. این عمل باعث ایجاد رنگ آبی شد. بعد از آن گسترش رنگ آبی با اضافه کردن HCl یک نرمال متوقف و رنگ محلول به زرد تبدیل شد. جذب نوری در طول موج ۴۵۰ و رفرنس ۶۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. شدت رنگ ایجاد شده در هر آزمایش با مقدار T₃ و T₄ متصل به آنزیم T₃ و T₄ کونژوگه که به آنتی‌بادی‌های سطح چاهک اتصال یافتند نسبت مستقیم ولی با غلظت T₃ و T₄ نمونه و

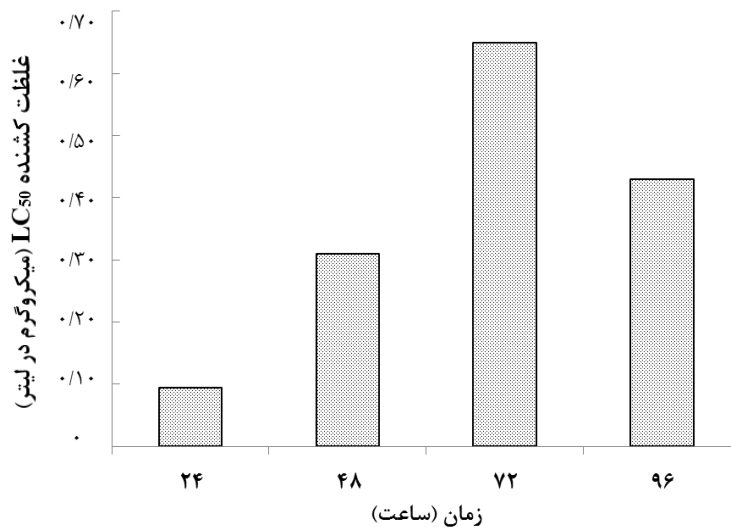
نتایج

میکروگرم LC_{50} 96h در لیتر) نشان داد که مقدار گلبول سفید و درصد نوتروفیل، لنفوسیت و اتوزینوفیل از اختلاف معنی‌داری برخوردار بود ($P < 0/05$). همچنین بیشترین اختلاف در تیمار سوم مشاهده شد (جدول ۳).

نتایج به دست آمده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه در غلظت‌های تحت کشنده نانوذرات نقره بر شاخص‌های بیوشیمیایی ماهی کپور معمولی تیمارهای آزمایشی نشان داد که ALT و AST اختلاف معنی‌دار داشتند ($P < 0/05$ ؛ جدول ۴).

در مطالعه حاضر میزان LC_{50} نانوذرات نقره برای ماهی کپور معمولی در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ ساعت با استفاده از برنامه آماری Probit Analysis به ترتیب ۰/۰۹۵، ۰/۳۱، ۰/۶۵ و ۰/۴۳ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد (شکل ۲).

نتایج به دست آمده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه در غلظت‌های تحت کشنده نانوذرات نقره بر شاخص‌های خونی ماهی کپور معمولی در تیمارهای آزمایشی (۰، ۵، ۱۰ و ۱۵



شکل ۲: مقادیر LC_{50} نانوذرات نقره در زمان‌های مختلف در گونه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

جدول ۳: اثرات غلظت‌های تحت کشنده نانوذرات نقره بر شاخص‌های خونی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

شاخص	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
گلبول سفید (mm^{-3})	۴۷۵۰/۰۰ a	۵۸۶۶/۶۷ ab	۶۷۶۶/۶۷ b	۱۰۸۰۰/۰۰ c
گلبول قرمز (mm^{-3})	۱۱۷۵۰۰۰ a	۱۲۰۵۰۰۰ a	۱۲۲۳۳۳۳ a	۱۲۴۳۳۳۳ a
مقدار هموگلوبین (g/dL)	۴/۷ a	۶/۷ a	۷/۳ a	۷/۳ a
هماتوکریت (%)	۲۸/۵ a	۲۹/۴ a	۳۰/۰ a	۳۱/۰ a
MCV (fl)	۲۴۲/۵ a	۲۴۲/۰ a	۲۴۵/۰ a	۲۵۰/۰ a
MCH (pg)	۵۶/۳۰ a	۵۷/۶۷ a	۵۹/۰۰ a	۵۹/۰۰ a
MCHC (g/dL)	۲۱/۹۵ a	۲۳/۷۳ a	۲۳/۶۶ a	۲۳/۶۷ a
نوتروفیل (%)	۱۱/۰۰ a	۱۲/۳۳ a	۱۳/۰۰ a	۱۹/۰۰ b
لنفوسیت (%)	۸۴/۵۰ a	۸۲/۶۷ a	۸۲/۳۳ a	۷۴/۰۰ b
مونوسیت (%)	۴/۰۰ a	۴/۰۰ a	۴/۳۳ a	۵/۶۷ b
اُتوزینوفیل (%)	۰/۸۸ ab	۰/۹۹ ab	۰/۹۶ a	۱/۰۴ b

در هر ردیف، حروف غیرمشترک نشان دهنده اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$).

تیمار ۱: ۵ میکروگرم در لیتر نانوذرات نقره LC_{50} 96h؛ تیمار ۲: ۱۰ میکروگرم در لیتر نانوذرات نقره LC_{50} 96h؛

تیمار ۳: ۱۵ میکروگرم در لیتر نانوذرات نقره LC_{50} 96h.

MCV: حجم متوسط گلبول قرمز؛ MCH: مقدار متوسط وزن هموگلوبین در یک گلبول قرمز؛ MCHC: غلظت متوسط هموگلوبین گلبولهای قرمز.

جدول ۴: اثرات غلظت‌های تحت‌کشنده نانوذرات نقره بر شاخص‌های بیوشیمیایی ماهی کیپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

شاخص	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
T ₄ (ng/mL)	۱۷/۶۰ ^a	۱۷/۸۰ ^a	۱۸/۳۷ ^a	۱۸/۶۴ ^a
T ₃ (ng/mL)	۰/۶۰۹۵ ^a	۰/۶۰۹۵ ^a	۰/۶۰۲۳ ^a	۰/۵۷۵۷ ^a
GH (μIU/mL)	۰/۰۹۹۵ ^b	۰/۰۷۲۷ ^a	۰/۰۶۸۳ ^a	۰/۰۶۸۳ ^a
ALP (U/L)	۱۱۱/۵ ^b	۲۲۳/۰ ^a	۲۵۹/۰ ^a	۲۷۷/۰ ^a
ALT (U/L)	۱۲/۵۰ ^a	۱۸/۳۳ ^a	۲۲/۰۰ ^b	۲۲/۰۰ ^b
AST (U/L)	۴۱۲/۵۰ ^a	۴۴۷/۶۷ ^a	۵۶۴/۰۰ ^b	۵۶۸/۳۳ ^b

در هر ردیف، حروف غیرمشترک نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$). تیمار ۱: ۵ میکروگرم در لیتر نانوذرات نقره LC₅₀ 96h؛ تیمار ۲: ۱۰ میکروگرم در لیتر نانوذرات نقره LC₅₀ 96h؛ تیمار ۳: ۱۵ میکروگرم در لیتر نانوذرات نقره LC₅₀ 96h. T₄: هورمون تیروکسین؛ T₃: هورمون تری‌یدوتیرونین؛ GH: هورمون رشد؛ ALP: آلکالین فسفاتاز؛ ALT: آلانین آمینو ترانسفراز؛ AST: آسپارات آمینو ترانسفراز.

بحث

اُتوزینوفیل در خون بعضی از ماهی‌های استخوانی که دچار آلودگی ویروسی شده‌اند به مقدار فراوان یافت می‌شود. البته یک حادثه استرس‌زا مثل صید، تراکم زیاد و گرسنگی نیز باعث افزایش اُتوزینوفیل‌ها می‌شود (Ellis, 1971). اُتوزینوفیل ماهی همانند پستانداران در فاگوسیتوز و از بین بردن عوامل بیماری‌زا نقش دارد (هدایتی و همکاران، ۱۳۹۲). لنفوسیت‌ها در ماهیان درصد بالایی از گلبول‌های سفید را به خود اختصاص می‌دهند (Thrall et al., 2012). در مطالعه رزم‌آرا و همکاران (۱۳۹۳) نانوذرات نقره موجب کاهش درصد لنفوسیت

در پاسخ به استرس و یا عفونت موجود در محیط آبی، کاهش تعداد گلبول‌های سفید می‌تواند بیانگر سرکوب ایمنی موجود و افزایش میزان آن‌ها می‌تواند نشان‌دهنده پاسخ به استرس یا عفونت باشد (Adams, 2002). مطالعات نشان داده‌اند که با افزایش غلظت نانوذرات نقره تعداد گلبول سفید در بدن افزایش می‌یابد (رضایی زارچی، ۱۳۹۰). در این مطالعه تیمارها با افزایش غلظت نانوذرات نقره تفاوت معنی‌داری را از خود نشان دادند که با مطالعات رضایی زارچی (۱۳۹۰) مطابقت دارد.

میکروگرم بر لیتر نانوذرات نقره، ۱ میکروگرم بر لیتر نیترات نقره، ۲۰ میکروگرم بر لیتر نانوذرات نقره، ۲۰ میکروگرم بر لیتر نیترات نقره) افزایش یافت و در تیمار سوم (۲۰ میکروگرم بر لیتر نانوذرات نقره) نسبت به شاهد تفاوت معنی‌دار داشت (Razmara et al., 2014). تغییر معنی‌دار تعداد گلبول‌های سفید و درصد لنفوسیت، نوتروفیل و اتوزینوفیل در مقدار بالای نانوذرات نقره می‌تواند نشان دهنده سمیت ترکیب مورد استفاده و بروز تنش در گونه مورد بررسی باشد (رزمارا و همکاران، ۱۳۹۳). یافته‌های مطالعه حاضر همسو با نتایج بالا است. مطالعه شاخص‌های MCH، MCV و MCHC می‌تواند در تشخیص انواع کم‌خونی‌ها مفید باشد. پایین بودن مقدار MCV می‌تواند به عنوان یک شاخص خونی مثبت باشد، زیرا با کوچک شدن حجم گلبول‌های قرمز حرکت آن‌ها در رگ‌های خونی آسان‌تر و سریع‌تر می‌شود و از ایجاد لخته جلوگیری می‌کند (Ferguson et al., 2010). در مطالعه حاضر MCH، MCV و MCHC در تیمارهای دوم (۱۰ میکروگرم در لیتر نانوذرات نقره LC₅₀ 96h) و سوم (۱۵ میکروگرم در لیتر نانوذرات نقره LC₅₀ 96h) افزایش داشتند، ولی اختلاف معنی‌داری در آن‌ها مشاهده نشد.

در گریه‌ماهی رنگین‌کمان شد. همچنین Khabbazi و همکاران (۲۰۱۵) در مطالعه‌ای نشان دادند که نانوذرات اکسید مس باعث کاهش معنی‌دار در میزان لنفوسیت و نوتروفیل در قزل‌آلای رنگین‌کمان شد. لنفوسیت‌ها نسبت به گلبول‌های سفید دیگر طول عمر زیادتری دارند و اغلب در مواجهه با آلودگی کاهش پیدا می‌کنند. در تحریک یا سرکوب سیستم ایمنی، لنفوسیت‌ها نشانگرهای زیستی کارآمدی محسوب می‌شوند (جهانبخشی و همکاران، ۱۳۹۳). گلبول‌های سفید از نوع لنفوسیت بخشی از سیستم ایمنی اختصاصی هستند که نوسان در تعداد آن‌ها می‌تواند به عنوان یک شاخص مناسب در ارتباط با پاسخ ماهیان به عوامل استرس مطرح باشد (Stoskopf, 1993). نوتروفیل وظایف زیادی از جمله فاگوسیتوز ذرات کوچک، پاسخ به التهاب، تجزیه آلاینده و فرآیندهای متابولیکی مانند نابود کردن سلول‌ها را به عهده دارد. بنابراین افزایش نوتروفیل در مواجهه با آلاینده‌ها دور از انتظار نیست (Evans, 2008). در مطالعه Razmara و همکاران (۲۰۱۴) افزایش درصد نوتروفیل در گریه‌ماهی رنگین‌کمان پس از مواجهه با نانوذرات نقره گزارش شده است. در این مطالعه، میزان نوتروفیل در همه تیمارها (غلظت‌های ۱

نداشت. هورمون تیروئید با اثر بر روی دامنه وسیعی از بافت‌های بدن، از مهم‌ترین عوامل تنظیم‌کننده متابولیسم پایه به شمار می‌آید (Besson et al., 2020). این هورمون‌ها بر روی میزان مصرف اکسیژن، تحریک گوانین برای تجمع در پوست و در تغییر میزان سوخت و ساز مواد قندی و نیتروژن اثر می‌گذارند (ستاری، ۱۳۸۱). بسیاری از عوامل شیمیایی و تغذیه‌ای می‌توانند اثرات مثبت یا سویی را بر متابولیت‌های بدن بجا بگذارند. هورمون‌های تیروئیدی با افزایش میزان جذب غذا و افزایش فعالیت‌های آنزیم‌های روده‌ای، میزان رشد موجود را کنترل می‌کنند. غده تیروئیدی در تنظیم میزان رشد، تمایز سلولی، تکامل جنسی، سیستم عصبی و تولیدمثل ماهیان تاثیر بسزایی دارد. هورمون‌های تیروئیدی بر تکامل سیستم ایمنی ماهیان موثر هستند (Lam et al., 2006). در مطالعه حاضر مقدار هورمون‌های T_3 و T_4 در همه تیمارها افزایش داشت اما از اختلاف معنی‌دار برخوردار نبود. در مطالعه صورت گرفته توسط Tassinari و همکاران (۲۰۱۴)، نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم سبب تغییرات بافتی قابل توجه در غده تیروئید و همچنین کاهش سطح سرمی هورمون T_3 شد. نتایج متناقض گزارش شده در رابطه با اثر

هورمون رشد در مهره‌داران در سلول‌های سوماتروپ غدد هیپوفیز تولید می‌شود. در ماهیان عمدتاً این سلول‌ها در پروکسیمال پارسی دیستال در هیپوفیز غدایی قرار دارند (Huang and Specker, 1994). هورمون رشد دارای یک عملکرد فیزیولوژیک پلی‌تروپیک اندوکرینی است که به طور مستقیم با افزایش ساخت DNA و پروتئین و تجزیه چربی در ماهیچه و به طور غیرمستقیم با وادار کردن کبد و پانکراس به تولید و ترشح IGF (فاکتور رشد شبه انسولین) همراه است (Riley et al., 2003). یکی از دلایل کاهش رشد ماهیان بر اثر مواجهه با مواد سمی، اختلال در ترشح و عملکرد هورمون‌های تیروئیدی و هورمون رشد است. به عنوان مثال در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در اثر مواجهه با فلز کادمیوم تاخیر در بیان ژن هورمون رشد مشاهده شد (Jones et al., 2001). بررسی هورمون رشد (GH) در مطالعه حاضر نشان داد که مقدار این هورمون در تیمارهای مختلف نانوذرات نقره اختلاف معنی‌داری نداشت و ماهیان دچار کاهش رشد نبودند. Ramsden و همکاران (۲۰۰۹) نیز نشان دادند که تغذیه با نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر شاخص‌های رشد و خون‌شناسی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تاثیر معنی‌داری

است به نقش آن‌ها در تنظیم فرآیند گلوکونئوژنز برای پاسخ به تقاضای انرژی جانور در شرایط استرس (ناشی از وجود نانوذرات نقره) مرتبط باشد. تخریب یا صدمه سلول‌های کبدی باعث آزادسازی آنزیم ALT می‌شود. انسداد مجاری صفراوی ALP سرم خون را افزایش می‌دهد. این امر در نتیجه تخریب سلول‌های کبدی و بلوکه کردن مجاری صفراوی، ایجاد می‌شود (Karen et al., 1998). در مطالعه حاضر نیز احتمالاً به علت تغییرات بافتی و آسیب سلولی در شرایط مواجهه با نانوذرات نقره میزان ALP در ماهی افزایش یافت. در بررسی تاثیر نانوذرات نقره بر شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مشخص شد که نانوذرات نقره سبب افزایش میزان فعالیت آنزیم ALP می‌شود (Louei Monfared and Soltani, 2013). افزایش ALT در پلاسمای خون ماهی کپور معمولی در تماس با نانوذرات اکسید روی گزارش شده است (Lee et al., 2014) که هم راستا با نتایج مطالعه حاضر است. در این مطالعه مقدار AST نیز افزایش یافت و اختلاف معنی‌داری در آن مشاهده شد که در راستای آن پژوهشگران ارتباط معنی‌داری بین تغییرات هیستوپاتولوژیک کبد و آنزیم AST گزارش کردند (Chen et al., 2004).

نانوذرات بر غلظت هورمون‌های تیروئیدی ممکن است به دلیل تفاوت در نوع نانوذره، شکل، اندازه و خواص فیزیکی و شیمیایی آن باشد (Tassinari et al., 2014). ماهیان پاسخ‌های آنزیمی متفاوتی را (شامل کاهش یا افزایش فعالیت آنزیم) در مقابل آلودگی نشان می‌دهند که نوع گونه ماهی، ماده آلوده کننده، غلظت مورد مطالعه و شرایط فیزیکیوشیمیایی آب در این زمینه به عنوان عوامل موثر معرفی شده‌اند (Sanchez et al., 2005). آنزیم‌های AST و ALT به طور معمول برای تشخیص آسیب‌های بافتی به ویژه کبد ماهیان مورد استفاده قرار می‌گیرند. همچنین این آنزیم‌ها می‌توانند به طور حساسی میزان آلودگی محیط را قبل از بروز اثرات خطرناک نشان دهند (Oner et al., 2009). Younis و همکاران (۲۰۱۲) افزایش معنی‌دار آنزیم‌های AST و ALT را در سرم خون تیلاپپای نیل (*Oreochromis niloticus*) در شرایط مواجهه با غلظت‌های تحت کشنده روی (Zn) مشاهده کردند و علت آن را آسیب کبد به علت تجمع فلز روی و رهاسازی این آنزیم‌ها در سرم خون بیان کردند. از طرف دیگر با توجه به این که AST و ALT جزء خانواده آنزیم‌های آمینوترانسفراز هستند و افزایش فعالیت آن‌ها در مطالعه حاضر ممکن

تشکر و قدردانی

نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات نقره منجر به اختلاف معنی‌داری در تعداد گلبول سفید، درصد نوتروفیل، لنفوسیت و اتوزینوفیل و همچنین مقدار ALT و AST در تیمارها شد. همچنین نانوذرات نقره دارای تاثیرات منفی بر شاخص‌های خونی و بیوشیمیایی ماهی کپور معمولی بود.

از پژوهشگر گرامی شهریار تقی‌پور کوه بنه جهت پیشبرد اهداف علمی این پژوهش کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

- بی‌تا س.، مصباح م. و اکبری پ. ۱۳۹۶. تاثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر فاکتورهای خونی و بیوشیمیایی سرم خون ماهی شیربت (*Barbus grypus*) پرورشی در استان خوزستان. مجله علمی تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک، ۳۰(۳): ۱۸۰-۱۷۰.
- جهانبخشی ع.، هدایتی ع.ا. و قادری رمازی ف. ۱۳۹۳. سم‌شناسی آبزیان. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ۲۱۲ص.
- جوهری س.ع. و حسینی س. ۱۳۹۳. سمیت تغذیه‌ای کلونید نانوذرات نقره در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۳(۱): ۳۱-۲۳.
- رزم‌آرا پ.، پیکان حیرتی ف. و درافشان س. ۱۳۹۳. اثر نانوذرات نقره بر برخی شاخص‌های خون‌شناسی گربه‌ماهی رنگین‌کمان (*Pangasius hypophthalmus*). مجله سلول و بافت، ۵(۲): ۲۷۲-۲۶۳.
- رضایی زارچی س. ۱۳۹۰. اثر نانوذرات اکسید تیتانیوم روی میزان سلول‌های خونی و آنزیم‌های کبدی موجود در خون رت نژاد ویستار. مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، ۱۹(۵): ۶۲۶-۶۱۸.
- زمینی ع.ع. ۱۳۷۵. تعیین غلظت کشنده LC₅₀96h فلزات سرب و کادمیم بر روی دو گونه از کپور ماهیان چینی (آمور و فیتوفاگ).
- پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی. ۵۶ص.
- ستاری م. ۱۳۸۱. ماهی‌شناسی (۱)، تشریح و فیزیولوژی. انتشارات نقش مهر. ۶۵۹ص.
- شریعتی ف. ۱۳۸۲. تعیین سمیت و LC₅₀ فنل و ۱- نفتول روی ماهیان انگشت‌قد سیم و سفید. مجله علمی شیلات ایران، ۱۲(۴): ۶۸-۵۷.
- ضیایی نژاد س.، دلاوریان ر.، خاکی ف. و جوهری س. ۱۳۹۷. تجمع بافتی کلونید نانوذرات نقره در بافت‌های آبشش و عضله ساقه دمی در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). توسعه آبی‌پروری، ۱۲(۴): ۹۴-۸۳.
- علیشاهی م. و مصباح م. ۱۳۸۹. مقایسه سمیت نانوذرات نقره در ماهیان آمور (*Ctenopharyngodon idella*)، شیربت (*Barbus grypus*)، اسکار (*Astronoru ocellatus*)، سوروم (*Cichlosoma severums*). مجله بیولوژی دریا، ۲(۷): ۵۱-۴۵.
- فروهر م.، ایمانپور م.، شعبانی ع. و هدایتی ع.ا. ۱۴۰۰. بررسی پاسخ‌های کشندگی نانوذرات نقره بر ماهی قرمز (*Carassius auratus gibelio*). فصلنامه علوم و تکنولوژی محیط زیست، ۲۳(۵): ۸۰-۷۱.
- ملاحی ه. ۱۳۹۷. مقاوم‌سازی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در مواجهه با نانوقره با استفاده از پروبیوتیک، پریبیوتیک و سین بیوتیک جیره. پایان‌نامه کارشناسی ارشد،

مس (CuO Nps) و نانودی‌اکسید تیتانیوم (TiO₂ Nps) و بررسی اثرات سمیت تحت کشنده آن‌ها بر فاکتورهای خون و بافت آبشش ماهی قرمز، کپور معمولی و کلمه. طرح پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۲۹ص.

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۷۹ص.

هدایتی ع.ا.، قربانی ر.، باقری ط.، احمدوند ش. و جهانبخشی ع. ۱۳۹۲. بررسی اثرات سمیت کشنده نانوآکسید روی (Zno Nps)، نانوآکسید

Abdollahpour H., Falahatkar B., Efatpanah I., Meknatkhah B. and Van Der Kraak G. 2018. Influence of thyroxine on spawning performance and larval development of Sterlet sturgeon *Acipenser ruthenus*. *Aquaculture*, 497: 134–139.

Acerete L., Balasch J.C., Espinosa E., Josa A. and Tort L. 2004. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. *Aquaculture*, 237: 167–178.

Adams S.M. 2002. Biological Indicators of Aquatic Ecosystem Stress. American Fisheries Society, USA. 219P.

Alishahi M., Mohammadi A., Mesbah M. and Razi Jalali M. 2016. Haemato-immunological responses to diazinon chronic toxicity in *Barbus sharpeyi*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 15: 870–885.

Besson M., Feeney W.E., Moniz I., Francois L., Brooker R.M., Holzer G., Metian M., Roux N., Laudet V. and Lecchini D. 2020.

Anthropogenic stressors impact fish sensory development and survival via thyroid disruption. *Nature Communications*, 11: 1–10.

Bhagwant S. and Bhikagee M. 2000. Induction of hypochromic macrocytic anemia in *Oreochromis hybrid* (Cichlidae) exposed to 100mg/L (sub lethal dose) of Aluminum. *University of Mauritius Research Journal*, 5: 9–20.

Blanton M.L. and Specker J.L. 2007. The hypothalamic-pituitary thyroid (hpt) axis in fish and its role in fish development and reproduction. *Critical Reviews in Toxicology*, 37: 97–115.

Blaxhall P. and Daisley K.W. 1972. Rutine hematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology*, 5: 771–781.

Canosa L.F., Chang J.P. and Peter R.E. 2007. Neuroendocrine control of growth hormone in fish. *Endocrinology*, 151: 1–26.

Chen C., Gregory Y. and Wooster P.R. 2004. Bowser comparative blood chemistry and

- histopathology of tilapia infected with *Vibrio vulnificus* or *Streptococcus iniae* or exposed to carbon tetrachloride, gentamicin, or copper sulfate. *Aquaculture*, 239: 421–443.
- Chopra I. 2007.** The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: A useful development or a cause for concern. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59: 587–590.
- Ellis A.E. 1971.** The leukocytes of fish: A review. *Journal of Fish Biology*, 11: 453–491.
- Ferguson R.M.W., Merrifield D.L., Harper G.M., Rawling M.D., Mustafa S., Picchetti S., Blacazar J.L. and Davies S.J. 2010.** The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Applied Microbiology*, 109: 851–862.
- Hagmar L., Persson-Moschos M., Akesson B. and Schutz A. 1998.** Plasma levels of selenium, selenoprotein P and glutathione peroxidase and their correlations to fish intake and serum levels of thyrotropin and thyroid hormones: A study on Latvian fish consumers. *European Journal of Clinical Nutrition*, 52: 796–800.
- Huang L. and Specker J.L. 1994.** Growth hormone-and prolactin-producing cells in the pituitary gland of striped bass (*Morone saxatilis*): Immunocytochemical characterization at different life stages. *General and Comparative Endocrinology*, 94: 225–236.
- Johari S.A., Kalbassi M.R., Soltani M. and Yu I.J. 2013.** Toxicity comparison of colloidal silver nanoparticles in various life stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 12: 76–95.
- Jones I., Kille P. and Sweeney G. 2001.** Cadmium delays growth hormone expression during rainbow trout development. *Journal of Fish Biology*, 59: 1015–1022.
- Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessell T.M., Siegelbaum S.A. and Hudspeth A.J. 2012.** Principles of Neural Science. McGraw-Hill, USA. 1760P.
- Karen V., Vitorovic S., Tutundzic V. and Poleksic V. 1998.** Functional enzymes activity and gill histology of carp after copper sulfate exposure and recovery. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 40: 49–55.
- Khabbazi M., Harsij M., Hedayati S.A., Gholipoor H., Gerami M.H. and Ghafari Farsani H. 2015.** Effect of CuO nanoparticles on some hematological indices of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their potential

- toxicity. *International Journal of Nanomedicine*, 2: 67–73.
- Lal B. and Singh A.K. 2005.** Immunological and physiological validation of enzyme-linked immunosorbent assay for growth hormone of the Asian catfish, *Clarias batrachus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 31: 289–293.
- Lam S.H., Wu Y.L., Vega V.B., Miller L.D., Spitsbergen J., Tong Y., Zhan H., Lee S., Mathavan S., Murthy K.R.K., Buhler D.R., Liu E. and Gong Z. 2006.** Conservation of gene expression signatures between zebrafish and human liver tumors and tumor progression. *Nature Biotechnology*, 24: 73–75.
- Leatherland J.F., Hilliard R.W., Macey D.J. and Potter I.C. 1990.** Changes in serum thyroxine and triiodothyronine concentrations during metamorphosis of the Southern Hemisphere lamprey *Geotria australis*, and the effect of propylthiouracil, triiodothyronine and environmental temperature on serum thyroid hormone concentrations of ammocoetes. *Fish Physiology and Biochemistry*, 8: 167–177.
- Lee J., Kim J., Shin Y., Ryu J.E. and Lee J.S. 2014.** Serum and ultrastructure responses of common carp (*Cyprinus carpio* L.) during long-term exposure to and histopathology of the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 184: 28–35.
- Louei Monfared A. and Soltani S. 2013.** Effects of silver nanoparticles administration on the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): histological and biochemical studies. *European Journal of Experimental Biology*, 3(2): 285–289.
- Mortimer C.E. 1967.** *Chemistry: A Conceptual Approach*. Reinhold Publishing, USA. 692P.
- Moss D.W. and Henderson A.R. 1999.** Clinical enzymology. P: 617–721. In: Burtis C.A. and Ashwood E.R. (Eds.). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. USA.
- OECD (Organization Economic Cooperation Development). 2001.** Guideline testing of chemicals: no.210. Section 2: Effect on biotic system diversion. OECD, France. 139P.
- Oner M., Atli G. and Canli M. 2009.** Effects of metal (Ag, Cd, Cr, Cu, An) exposures on some enzymatic and non-enzymatic indicators in the liver of *Oreochromis niloticus*. *Environmental Contamination and Toxicology*, 82: 317–321.
- Rad A., Alishahi M., Ghorbanpour M. and Zarei M. 2014.** The effects of oral administration of extracted chitosan from white leg shrimp

- (*Litopenaeus vannamei*) on hematological and growth indices in common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Veterinary Research*, 69: 385–393.
- Ramsden S.R., Smith T.J., Shaw B.J. and Handy R.D. 2009.** Dietary exposure to titanium dioxide nanoparticles in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): No effect on growth, but subtle biochemical disturbances in the brain. *Ecotoxicology*, 18: 939–951.
- Razmara P., Heyrati Peykan F. and Dorafshan S. 2014.** Effect of silver nanoparticles on some hematological indices of rainbow catfish (*Pangasius hypophthalmus*). *Journal of Cell and Tissue*, 5: 263–272.
- Riley L.G., Hirano T. and Grau E.G. 2003.** Effects of transfer from seawater to fresh water on the growth hormone/insulin-like growth factor-I axis and prolactin in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology (B)*, 136: 647–655.
- Rubio V.C., Sanchez-Vazquez F.J. and Madrid J.A. 2005.** Effects of salinity on food intake and macronutrient selection in European sea bass. *Physiology and Behavior*, 85: 333–339.
- Saikia S.K. and Das D.N. 2009.** Feeding ecology of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in a rice-fish culture system of the Apatani plateau (Arunachal Pradesh, India). *Aquatic Ecology*, 43: 559–568.
- Sanchez W., Palluel O., miunier L., Coquery M., Porcher J.M. and Ait-Aissa S. 2005.** Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback, relationship with hepatic metal levels. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19: 177–183.
- Shah S.L. and Altindag A. 2005.** Effects of heavy metal accumulation on the 96-h LC₅₀ values in tench *Tinca tinca* L., 1758. *Turkish Journal of Veterinary*, 29: 139–144.
- Sondi I. and Salopek-Sondi B. 2004.** Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275: 177–182.
- Stoskopf M.A. 1993.** *Fish Medicine*. Saunders Company, USA. 882P.
- Tassinari R., Cubadda F., Moracci G., Aureli F., D'Amato M., Valeri M., Berardis B., Raggi A., Mantovani A., Passeri D., Rossi M. and Maranghi F. 2014.** Oral, short-term exposure to titanium dioxide nanoparticles in Sprague-Dawley rat: Focus on reproductive and endocrine systems and spleen. *Nanotoxicology*, 8: 654–662.

- Thrall M.A., Weiser G., Allison R.W. and Campbell T.W. 2012.** Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. Wiley-Blackwell, USA. 784P.
- TRC. 1984.** OECD guideline for testing a chemicals section 2, on biotic systems. OECD, France. 39P.
- Wood C., Farrell A. and Brauner C. 2012.** Fish Physiology: Homeostasis and Toxicology of Essential Metals. Academic Press, USA. 520P.
- Younis E.M., Abdel-Warith A.A. and AL-Asgan N.A. 2012.** Hematological and enzymatic responses of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, during short and long term sub lethal exposure to zine. African Journal of Biotechnology, 11: 4442–4446.



Research Paper

Effects of different sub-lethal concentrations of silver nanoparticles on thyroid hormones, growth hormone, blood factors and liver enzymes of common carp (*Cyprinus carpio*)

Akram TehraniFard^{1*}, Sina Moloud Sadri²

Received: November 2020

Accepted: August 2021

Abstract

Fish is in the highest level of aquatic food chain and has the ability to biologically magnify heavy metals, even at low concentrations in the environment. Biochemical methods and measuring blood parameters are among the important biological indicators that are widely used in assessing the health status of fish. The aim of this study was to investigate the effects of silver nanoparticles on thyroid hormones, growth hormone, blood factors and liver enzymes of common carp (*Cyprinus carpio*). In this study, 150 fish with weight of 12-15g after obtaining acute toxicity (LC₅₀ 96h), randomly exposed to concentrations of 0 (control), 5, 10 and 15 µg/L of LC₅₀ 96h silver nanoparticles with three replications for 7 days. At the end of the experimental period, blood samples were withdrawn by puncturing the vein in the fish tail. The results of this study showed that silver nanoparticles led to a significant difference in the number of white blood cells, percentage of neutrophils, lymphocytes and eosinophils and also amount of ALT and AST in the treatments (P<0.05). Also silver nanoparticles have negative effects on blood and biochemical parameters of common carp.

Key words: *Silver Nanoparticles, Growth Hormone, Blood Factors, Common Carp.*

1- Assistant Professor in Department of Marine Biology, Faculty of Sciences, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.

2- M.Sc. in Marine Biology, Department of Marine Biology, Faculty of Sciences, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.

*Corresponding Author: akram.tehranifard95@gmail.com