کاهش آسیب‌های هیستوپاتولوژیک آبشش ماهی پرت (*Cichlasoma synspilum* ♀ × *Cichlasoma citrinellum* ♂) در مواجهه با نانو ذرات نقره محلول در آب از طریق تغذیه با جیره حاوی آستاگزانتین و نمک صفراوی

امین مخلص آبادی فراهانی، سالار درافشان*، فاطمه پیکان حیرتی

گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، ۸۴۱۵۶۸۳۱۱۱، اصفهان، ایران.

*نویسنده مسئول: sdorafshan@cc.iut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۲۵

چکیده

مطالعه حاضر جهت بررسی اثرات مواجهه با نانو ذرات نقره محلول در آب بر بافت آبشش ماهی پرت و همچنین اثرات جیره حاوی آستاگزانتین و نمک صفراوی در حفاظت از بافت آبشش در مقابل اثرات مخرب نانو نقره انجام گرفت. برای انجام این مطالعه، ۲۰۰ قطعه ماهی پرت (میانگین وزنی۶/۲± ۲۵/۵ گرم) در سه تیمار، شامل تیمار شاهد (جیره پایه)، تیمار آستاگزانتین (۴ گرم بر کیلوگرم) و آستاگزانتین- نمک صفراوی (۴ گرم بر کیلوگرم و ۱۲۰۰میلی‌گرم بر کیلوگرم) به مدت ۹۰ روز تغذیه شدند، ماهیان سپس به مدت پنج روز در معرض۲۵۰ µg/L نانو ذرات نقره محلول در آب قرار گرفتند. میزان تجمع نقره و بافت‌شناسی آبشش قبل و پس از تنش نانو ذرات نقره موردبررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که پس از مواجهه با نانو ذرات نقره میزان تجمع نقره در بافت آبشش شاهد به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت، ولی این افزایش در تیمارهای تغذیه‌شده با آستاگزانتین و نمک صفراوی مشاهده نشد. پس از تنش نانو ذرات نقره آسیب‌های همچون هایپرپلازی، هایپرتروفی، حلقه‌ای شدن، ادم، نکروز و همجوشی در بافت آبشش در تمامی تیمارها مشاهده شد، ولی این شدت آسیب‌ها در ماهیان تغذیه‌شده با جیره حاوی آستاگزانتین و آستاگزانتین- نمک صفراوی در مقایسه با ماهیان گروه شاهد به‌صورت محسوسی کمتر بود. در نهایت می‌توان گفت که آستاگزانتین و نمک صفراوی به‌عنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدان می‌توانند آسیب‌های وارده به آبشش را در مواجهه با نانو ذرات نقره کاهش دهد.

واژگان کلیدی: ماهی پرت، آستاگزانتین، نمک صفراوی، نانو ذرات نقره.

مقدمه

تجارت جهانی ماهیان زینتی بیشتر از ۱/۵ میلیارد قطعه ماهی در سال تخمین زده می‌شود (Saxby *et al.*, 2010). یکی از این ماهیان زینتی، ماهی پرت خونی است و از دگر آمیزی دو گونه (*Cichlasoma synspilum* ♀ و *Cichlasoma citrinellum* ♂) تولید می‌شود، این ماهی در سال ۱۹۸۰، برای اولین بار در کشور تایلند تولید شد و سپس در سال‌های بعد تولید آن به کشورهای ژاپن و چین راه یافت (Yang *et al.*, 2012). حمل نقل و دست‌کاری‌های در طی تجارت آبزیان می‌توان منجر به تلفات بالایی (حدود ۷۳ درصد) شود، ولی می‌توان این تلفات را به ۲ درصد کاهش داد. نهادهای صنعتی همچون انجمن تجارت ماهیان زینتی (Ornamental Aquatic Trade Association) استانداردهایی برای کاهش تلفات و تنش‌های ماهیان در زمان مواجهه با تنش‌ها ایجاد کرده است، ولی متأسفانه مطالعات بسیار کمی در خصوص حفظ سلامت آبزیان زینتی و کاهش تنش‌های موجود انجام‌شده است.

از جمله تنش‌هایی ماهیان زینتی در معرض آن قرار می‌گیرند، کیفیت پایین آب، حمل‌ونقل، آلودگی های محیطی، محرومیت غذایی و وجود فلزات سنگین ازجمله نانو ذرات نقره هست. نانو سم‌شناسی علم نسبتاً جدیدی است و در حال گسترش در عرصه‌های مختلف علمی است. با توسعه روزافزون به‌کارگیری از نانوتکنولوژی در علوم مختلف نگرانی زیادی در رابطه با پتانسیل خطرات نانو ذرات برای سلامتی محیط‌زیست و جانوران وجود دارد و اخیراً توجه زیادی به مباحث ایمنی درروند تولید، مصرف و رهایش نانو ذرات به اکوسیستم‌های آبی معطوف گشته است (Scown *et al.*, 2010; Masciangioli and Zhang, 2003). نانو ذرات

نقره به‌دلیل خواص ضد میکروبی خود محبوبیت زیادی به‌دست آورده‌اند، خاصیت ضد میکروبی آن‌ها به میزان یون نقره رهاشده از آن بستگی دارد (Schrand *et al*., 2008) نانو ذرات نقره با توجه به‌اندازه کوچک و امکان واکنش‌پذیری زیاد، ممکن است اثرات سمی بر آبزیان داشته باشند. آن‌ها ممکن است باعث صدمه به DNA و یا به‌صورت غیرمستقیم با افزایش تنش اکسیداتیو شوند (Arora *et al*., 2008). تنش اکسیداتیو می‌تواند باعث اختلال و تخریب میتوکندری و در نتیجه آن مرگ سلول شود. سایر سطوح سلولی که در ارتباط با این نوع مکانیسم سمیت تغییر می‌کنند شامل گلوتاتیون (GSH) و ژن‌های التهابی هستند. مکانیسم اصلی سمیت نانو ذرات نقره ناشی از آزادسازی یون‌های نقره از نانو ذرات است که منجر به تنش اکسیداتیو آسیب چربی‌ها، کربوهیدرات‌ها، پروتئین و DNA می‌شود (Hussain *et al*., 2008).

برای ارزیابی میزان سمیت آلاینده‌های محیطی شاخص‌های فیزیولوژیکی متفاوتی در ماهی‌ها از جمله بافت‌شناسی اندام‌های حیاتی نظیر آبشش مورد استفاده قرار می‌گیرد. مطالعات بافت‌شناسی در سال‌های اخیر به‌عنوان یکی از روش‌های اساسی در بررسی مسمومیت آبزیان مورد توجه قرارگرفته است و اطلاعات مفیدی را برای درک بهتری از آسیب‌های ناشی از آلاینده‌های شیمیایی فراهم می‌کند. آبشش‌ها از با اهمیت‌ترین اندام‌های هستند که در معرض مستقیم سموم و آلاینده‌های محیطی قرار دارند و می‌توانند تحت تأثیر آلودگی محیط قرار بگیرند. آبشش‌ها در بسیاری در فعالیت‌های فیزیولوژیکی آبزیان ازجمله: دفع متابولیک‌ها، تنظیم فشار اسمزی و تعادل اسید و باز شرکت می‌کنند و ازاین جهت بافت آبشش به‌عنوان یکی از اندام‌های اصلی برای بررسی اثرات سمی آلاینده‌های شیمیایی محسوب می‌شود. برخی از محققین دو نوع از آسیب‌های ناشی از آلاینده‌ها را بر روی بافت آبشش تعریف کردند که عبارت‌اند از (الف) آسیب‌های ناشی از واکنش دفاعی شامل: هایپرپلازی رشته‌های آبششی و تورم لاملا آبششی که ممکن است نقش دفاعی را علیه آلودگی ایفا کند و (ب) آسیب مستقیم همچون نکروز و کنده شدن تیغه‌های ثانویه آبششی. تغییرات ساختاری آبشش می‌تواند به‌عنوان شاخصی مؤثر برای درک بهتری از سطوح آلودگی آب و درجه مسمومیت ماهی در اثر مواجهه شدن با آلاینده‌های شیمیایی مورد ارزیابی قرار گیرد.

یکی از راه‌های حفاظت در برابر آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها است. آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که با جذب رادیکال آزاد و درنتیجه ممانعت از اکسیداسیون از اثرات منفی رادیکال‌های آزاد جلوگیری می‌کند (Xu *et al*., 2003). امروزه استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و سنتتیک نظیر ویتامین‌ها و کاروتنوئیدها مثل آستاگزانتین در افزایش کارایی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی سلول و پیشگیری از تأثیرات سمی آلاینده‌های زیستی محیطی به امری رایج تبدیل‌شده است (Banaee *et al*., 2015). آستاگزانتین در آب غیر محلول بوده و چربی‌دوست است. آستاگزانتین فعالیت آنتی‌اکسیدانی بسیار قوی دارد به‌طوری‌که ۱۰ برابر بیشتر از بتاکاروتن و ۵۰۰ مرتبه مؤثرتر از آلفا توکوفرول است، به‌نحوی‌که آستاگزانتین را به‌عنوان سوپر ویتامین E مطرح‌شده است (Jyonouchi *et al*., 1994). میزان جذب کاروتنوئید ها ازجمله آستاگزانتین در گونه‌های مختلف متفاوت است، قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) فقط ۴ درصد از آستاگزانیتن موجود در جیره را جذب می‌کند (Hardy *et al*., 1990). به‌نظر می‌رسد بتوان با استفاده مکمل غذایی نمک صفراوی میزان جذب آستاگزانتین را افزایش داده و در نتیجه اثرات آنتی اکسیدانی آن نیز به‌مراتب بهبود خواهد یافت. نمک صفراوی می‌تواند فرآیند امولسیون شدگی چربی‌ها را تسهیل نماید و میزان جذب ترکیبات با پایه چربی را در روده کوچک افزایش دهد

جدول ۱- ترکیبات مورد استفاده در تهیه جیره مورد آزمایش (٪ از جیره).

تیمارهای آزمایشی / اجزائ جیره	شاهد	آستاگزانتین	آستاگزانتین- نمک صفراوی
پودر ماهی	۲۱/۱۶	۲۱/۱۶	۲۱/۱۶
سویا	۲۱/۱۶	۲۱/۱۶	۲۱/۱۶
کلزا	۱۵/۸۷	۱۵/۸۷	۱۵/۸۷
ذرت	۲۴/۹۳	۲۴/۹۳	۲۴/۹۳
جو	۱۱/۱۲	۱۱/۱۲	۱۱/۱۲
روغن آفتاب‌گردان	۰/۵	۰/۵	۰/۵
آستاگزانتین	۰	۰/۴	۰/۴
نمک صفراوی	۰	۰	۰/۱۲
نمک خوراکی	۰/۵۲	۰/۱۲	۰
مکمل‌های معدنی[1]	۲/۳۸	۲/۳۸	۲/۳۸
مکمل‌های ویتامینی[2]	۲/۳۸	۲/۳۸	۲/۳۸
مجموع	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

۱. مکمل معدنی ساخت شرکت خوراک دام و آبزیان مازندران ، ایران (آهن ۲۱/۶۲ درصد، روی ۳۶/۰۵ درصد، سلنیوم ۰/۰۷ درصد، کبالت ۰/۳۶درصد، مس ۲۱/۶۳ درصد، منگنز ۱۸/۰۲ درصد، ید ۲/۱۶ درصد، کولین کلراید ۰/۰۴ درصد).

۲. مکمل ویتامینی ساخت شرکت ارس بازار، ایران محتوای ویتامین‌های A ۱۵/۲۴درصد، D_3 ۳/۰۴ درصد، K_3 ۰/۶۰درصد، E ۳/۰۴ درصد، B_1 ۶/۰۹ درصد، B_2 ۰/۹۱ درصد، B_6 ۰/۹۱ درصد، C ۳۰/۴۸ درصد، کلسیم پنتوتنات ۹/۱۴ درصد، متیونین ۱۸/۲۹ درصد، سیستئین ۹/۱۴ درصد).

(Erdman, 1988). چربی‌ها ابتدا در روده کوچک به شکل آزاد به کمک انتقال‌دهنده‌های لیپوپروتئینی جذب خون می‌شوند. در این مرحله آستاگزانتین موجود در جیره غذایی آزاد و وارد سیستم گوارش می‌شود (Barros *et al.*, 2001). نمک صفراوی می‌تواند این فرآیند را افزایش و تسریع نماید (Chen *et al.*, 2001). یکی از این نمک‌های صفراوی، Soudium Taucholate، $C_{26}H_{44}NNaO_7S$ است که به هضم و جذب چربی‌ها کمک می‌کند که طی آن فرآیند جذب آستاگزانتین را بیشتر و سریع‌تر می‌شود. مطالعه حاضر جهت پاسخ به این سؤال که آیا تغذیه با جیره حاوی آستاگزانتین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان به‌تنهایی و توأم با نمک صفرای می‌تواند منجر به کاهش اثرات مخرب نانو ذرات نقره محلول در آب بر بافت آبشش ماهی پرت شود، انجام شد.

مواد و روش‌ها

برای انجام این مطالعه، ۲۰۰ قطعه ماهی پرت با میانگین وزنی ۶/۲±۲۵/۵ گرم و میانگین طولی ۰/۴۳±۶/۳۴ سانتی‌متر به مدت دو هفته با شرایط آزمایشگاهی سازگار شدند. برای این آزمایش، سه تیمار شامل تیمار شاهد، تیمار تغذیه شده با ۴ گرم بر کیلوگرم آستاگزانتین (شرکت BASF آلمان) و تیمار تغذیه شده با ۴ گرم بر کیلوگرم آستاگزانتین و ۱۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نمک صفراوی (ساخت شرکت Fulka آمریکا به فرمول شیمیایی $C_{26}H_{44}NNaO_7S$) بر مبنای نتایج Yang و همکاران (۲۰۱۲) تنظیم شد. ماهیان تحت آزمایش به مدت ۹۰ روز با جیره‌های تعیین‌شده روزانه ۳ بار (۸ صبح، ۱۲ ظهر و ۴ بعدازظهر) به میزان ۲ درصد وزنی تغذیه شدند (جدول ۱). میزان پروتئین خام جیره۳۷/۴۷ درصد، چربی خام ۲۷/۰۳ درصد ، رطوبت ۳/۸۳ درصد و فیبر خام ۳/۳۶ درصد و میزان انرژی جیره ۲۰/۰۳ کیلوژول بر هر کیلوگرم جیره بود (NRC, 2011).

در این آزمایش از نانو ذرات نقره ساخت شرکت Nanocid Colloid ایران استفاده شد (جدول ۲). در ابتدا به دلیل مشخص نبودن میزان LC_{50} نانو ذرات نقره، ماهی پرت در معرض غلظت‌های µg/L ۱۰۰۰، ۵۰۰ و ۲۵۰ از نانو ذرات نقره قرار گرفتند تا بیشترین

جدول ۲- برخی از مشخصات اندازه‌گیری شده کلوئید نانو ذرات نقره (رزم‌آرا و همکاران، ۱۳۹۲).

پارامتر	روش سنجش	فرا سنجه	توضیحات
غلظت mg/L	ICP-AES[1]	۲۰۰۰	با غلظت اعلام‌شده از کارخانه تولیدی اختلاف معنی-داری داشته است
شکل	TEM	کروی	-
اندازه ذرات (قطر هیدرودینامیکی) (nm)	Zetasizer	۱۶۳/۵ الی ۳/۹	٪۵۴/۱ از ذرات قطر دینامیکی کمتر از ۱۰۰ nm دارند
میانگین قطر هیدرودینامیکی (nm)	Zetasizer	۵۴/۸	-
قطر بیشینه (nm)	TEM[2]	۱۲۹	٪۶۵/۱۴ از ذرات بین ۱-۱۳ nm دارند
خلوص	EDX[3]		تنها عنصر نقره کلوئید نانو ذرات نقره وجود داشت

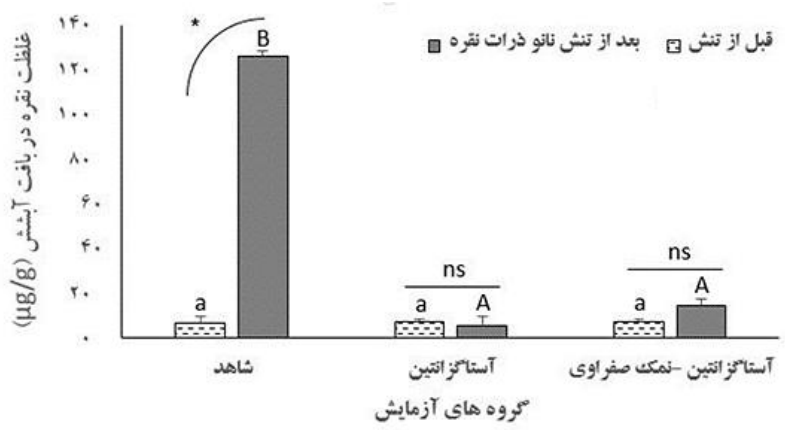
[1] Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy
[2] Transmission Electron Microscopy
[3] Energy-Dispersive X-Ray

غلظتی که باعث کاهش زنده‌مانی نمی‌شود، مشخص شود (Govindasamy and Rahuman, 2012). بدین منظور پنج قطعه ماهی پرت برای هر غلظت در نظر گرفته شد. ماهی‌ها پس از گذراندن دوره تطابق در معرض غلظت‌های ذکرشده قرار گرفتند. سپس هر یک از تیمارهایی که با جیره‌های ذکرشده تغذیه‌شده بودند، در دو تکرار، هر تکرار ۱۵ قطعه ماهی در معرض نانو ذرات نقره با غلظت ۲۵۰ µg/L برای مدت ۵ روز قرار گرفتند. تانک‌های آزمایش ۲۴ ساعت قبل از اضافه کردن ماهی به غلظت مورد نظر رسیدند؛ سپس شسته شده و مجدداً قبل از اضافه کردن ماهی به غلظت مورد نظر رسیدند تا میزان کاهش غلظت ذرات مورد نظر که در اثر چسبیدن به سنگ هوا و شیشه تانک ایجاد می‌شود، به حداقل برسد. تعویض آب به مقدار ۹۰ درصد و تنظیم غلظت موردنظر هر ۴۸ ساعت یک‌بار انجام شد (رزم‌آرا و همکاران، ۱۳۹۲).

شرایط آزمایش: این مطالعه در سالن آکواریوم دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان در تاریخ مهر ۱۳۹۵ انجام شد. در این آزمایش از آکواریوم‌هایی به ابعاد ۳۵×۴۰×۱۰۰ سانتی‌متری برای نگهداری ماهی استفاده شد. آب سیستم پرورشی مورداستفاده از لوله‌کشی شهری تأمین و پس از کلرزدایی (به‌واسطه نگهداری آب به مدت دو روز) در آکواریوم‌ها، توزیع شد. آکواریم ها دائما هوادهی می شدند. در طول دوره آزمایش، میانگین دمای آب ۱/۵±۲۶ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۰/۵±۵/۸ میلی‌گرم بر لیتر، میزان pH ۰/۷±۸/۱، هدایت الکتریکی ۴۲±۴۸۲/۲ میکرو زیمنس، توتال آمونیوم ۰/۴±۱/۳۷ میلی‌گرم بر لیتر و فسفات کل ۰/۰۰۲±۰/۰۹ قسمت در میلیون بود.

سنجش میزان نقره در بافت: در پایان دوره ۹۰ روزه تغذیه با جیره‌های مورد آزمایش و پس از تنش نانو ذرات نقره به‌مدت ۵ روز، از هر تکرار ۵ ماهی به‌صورت تصادفی صید شد و پس از آسان کشی (توسط غلظت بالای پودر گل میخک)، آبشش آن‌ها را جدا کرده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از هضم نمونه‌ها در محلول ۴:۱ اسید نیتریک ۶۵ درصد و اسیدکلریدریک ۶۰ با استفاده از دستگاه جذب اتمی شعله‌ای مدل (A analyst 700) ساخت شرکت Perkin Elmer (آمریکا) میزان تجمع نانو ذرات نقره در طول‌موج ۳۲۸/۱ نانومتر خوانده شد (Burrows and Whitton, 1983). میزان نقره در آب نیز با استفاده از همین دستگاه مورد بررسی قرار گرفت. جهت اطمینان، سنجش برای هر نمونه سه مرتبه انجام و میانگین آن به‌عنوان مقدار واقعی برای هر نمونه ثبت شد.

بافت‌شناسی آبشش: در پایان دوره ۹۰ روزه تغذیه با جیره‌های مورد آزمایش قبل و پس از تنش نانو ذرات نقره به مدت ۵ روز، ۵ قطعه ماهی از هر تکرار به‌صورت تصادفی صید شده و پس از بیهوشی با ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر گل میخک بافت آبشش ۵



شکل ۱ - میزان تجمع نقره در بافت آبشش ماهی پرت تغذیه شده با جیره‌های مختلف آزمایشی پیش و پس از قرار گرفتن در معرض تنش نانو ذرت نقره محلول در آب با غلظت ۲۵۰ µg/L به مدت ۵ روز. حروف کوچک نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در بین تیمارها پیش از تنش و حروف بزرگ نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف آزمایشی پس از تنش نانو ذرات نقره است (Duncan, $P<0.05$) و علامت (*) نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین زمان پیش و پس از تنش نانو ذرات نقره در یک تیمار مشخص است (t. test ;$P<0.05$).

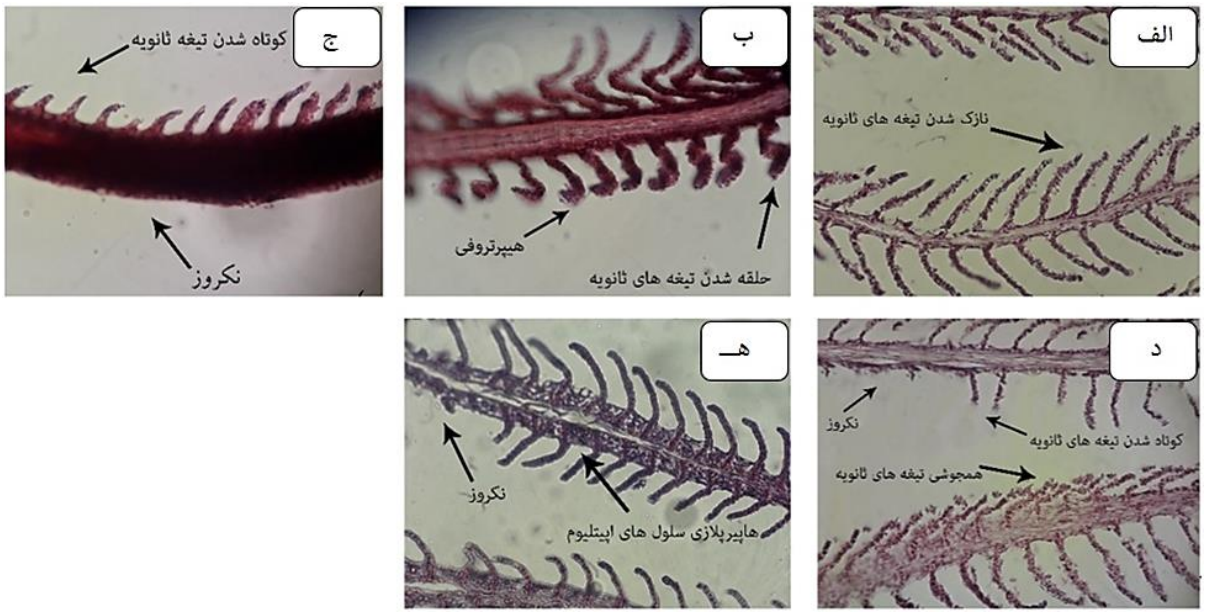
قطعه ماهی از هر تیمار نمونه‌برداری شده و در بافر فرمالین ۱۰٪ با pH ۷/۲ تثبیت شد؛ سپس آبگیری با درجه‌های مختلفی (۹۰ و ۱۰۰ درصد) الکل اتانول (رازی، ایران) و قالب‌گیری به کمک پارافین (Merck, Germany)، برش‌هایی ۵ میکرونی از بافت آبشش تهیه و به روش هماتوکسیلین-ائوزین زنگ آمیزی شد و آسیب‌ها با میکروسکوپ نوری (Olympus, Germany) مورد بررسی قرار گرفت (Ganji and Arvand, 2000).

توصیف آسیب بافتی: برای شرح توصیفی تغییرات بافت‌شناسی، از روش Riba و همکاران (۲۰۰۵) استفاده شد. هایپرپلازی رشته‌ها و تیغه‌های ثانویه آبشش در صورتی‌که تعداد رشته‌های آسیب‌دیده کمتر از ۱۰ رشته بود، بافت بدون آسیب و با علامت (-) در نظر گرفته شد. آسیب ۱۰-۲۰ رشته با علامت (+) و به‌عنوان آسیب خفیف، ۲۰-۳۰ رشته با علامت (++)، به‌عنوان آسیب متوسط، آسیب ۳۰-۴۰ رشته با علامت (+++)، به‌عنوان آسیب شدید و آسیب بیش از ۴۰ رشته با علامت (++++) و به‌عنوان آسیب بسیار شدید در نظر گرفته شد. برای سایر آسیب‌های بافتی نظیر حلقه‌ای شدن تیغه‌های ثانویه آبششی و نکروز تیغه‌های ثانویه نیز رویه مشابهی اتخاذ شد.

تحلیل آماری: برای بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون Kolmogorov-Smirnov و آنالیز داده‌ها با استفاده نرم‌افزارهای SPSS 19 و Excell 2013 انجام شد. این آزمایش در طرح کاملاً تصادفی انجام و با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One way ANOVA) وجود اختلاف معنی‌دار بودن بین تیمارها در سطح $P<0.05$ تحلیل شد. برای مقایسه میانگین تیمارهای مختلف پیش یا پس از تنش با استفاده از آزمون Duncan در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ درصد استفاده شد. برای مقایسه میانگین هر شاخص در هر تیمار پیش و پس از تنش در معرض گذاری با نانو نقره محلول در آب از آزمون آماری t-test مستقل در سطح اطمینان ($P<0.05$) استفاده شد.

نتایج

تجمع نقره در بافت آبشش: قبل از در معرض-گذاری با نانو ذرات نقره، میزان نقره در بافت آبشش ماهیان در محدوده ۵ الی ۷ میکروگرم بر گرم (وزن خشک) و بدون تفاوت معنی‌دار در بین گروه‌های مختلف آزمایشی بود (شکل ۱) ($P>0/05$). پس از در معرض‌گذاری با نانو ذرت نقره محلول در آب با غلظت ۲۵۰ µg/L به مدت ۵ روز میزان تجمع در بافت آبشش ماهیان تیمار شاهد به‌صورت معنی‌داری



شکل ۲ - تغییرات هیستوپاتولوژیک بافت آبشش ماهی پرت بعد از تغذیه به مدت ۹۰ روز با جیره‌های مورد آزمایش و پس از تنش نانو ذرات نقره به مدت پنج روز با غلظت ۲۵۰ µg/L. (الف) قبل از تنش نانو ذرات نقره (نازک شدن تیغه‌های ثانویه)، (ب، و ج) تیمار شاهد پس از تنش (هیپرتروفی، حلقه‌ای و کوتاه شدن تیغه‌های ثانویه، نکروز)، (د) تیمار آستاگزانتین پس از تنش (کوتاه شدن و همجوشی تیغه‌های ثانویه، نکروز)، و (ه) تیمار آستاگزانتین- نمک صفراوی (هایپرپلازی سلول‌های اپیتلیوم). شدت آسیب در ماهیان گروه شاهد به‌طور محسوسی بالاتر از سایر گروه‌ها بود. رنگ‌آمیزی شده به روش هماتوکسیلین- ائوزین، بزرگ‌نمایی X۴۰۰.

افزایش یافت و به حدود ۱۲۰ میکروگرم بر گرم وزن خشک رسید که به‌طور معنی‌داری بسیار بیشتر از مقدار اولیه آن بود ($P>0/05$) درحالی‌که در تیمارهای آزمایشی تغذیه شده با آستاگزانتین به‌تنهایی یا در تلفیق با نمک صفراوی، میزان افزایش تجمع معنی‌دار نبود (شکل ۱) ($P>0/05$).

تغییرات هیستوپاتولوژیک بافت آبشش: بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیک بافت آبشش ماهی پرت در تیمارهای مختلف آزمایشی پیش و پس از در معرض با نانو ذرات نقره محلول در آب نشان داد که عوارضی همچون کوتاه شدن تیغه‌های ثانویه، نکروز، همجوشی تیغه‌های ثانویه، هایپرپلازی، حلقه‌ای شدن تیغه‌های ثانویه و هیپرتروفی در تمامی تیمارهای آزمایشی مشاهده می‌شود (شکل ۲، جدول ۳). بااین‌وجود بافت آبشش ماهیان تغذیه‌شده با آستاگزانتین به‌تنهایی پس از قرارگیری در معرض نانو ذرات نقره نسبت به تیمار شاهد داری تغییرات کمتری بودند ازجمله تغییرات ایجادشده در این گروه می‌توان به نازک شدن تیغه‌های ثانویه، کوتاه شدن تیغه‌های ثانویه و همچنین نکروز و همجوشی تیغه ثانویه اشاره کرد (شکل ۲-د، جدول ۳). نانو ذرات نقره همچنین باعث ایجاد هایپرپلازی در بافت اپیتلیوم و نازک شدن تیغه‌های ثانویه و نکروز در بافت آبشش در ماهیان تغذیه‌شده با آستاگزانتین- نمک صفراوی شد (شکل ۲-هـ جدول ۳).

بحث

تحقیقات نشان داده است که بافت آبشش از فعال‌ترین اندام‌ها در تجمع فلزات سنگین در ماهی است (Mansouri *et al.*, 2013) و تجمع بالای فلزات در این اندام می‌تواند به دلیل باند شدن فلزات با متالوتیونئین (Metallothionein Protein) باشد (Hamer, 1986). متالوتیونئین با دارا بودن سطوح بالایی از گروه‌های تیول (Thiol Groups) در باند شدن با آنیون‌های فلزات سنگین بسیار کارآمد است (Wimmer *et al.*, 2005). بافت آبشش در تماس مستقیم با محیط با بیرون است و معمولاً اولین اندامی است که در معرض سموم محلول در آب قرار

جدول ۳ - درجه‌بندی نیمه کمی آسیب آبشش ماهی پرت پس از تنش نانو ذرت نقره محلول در آب با غلظت ۲۵۰ µg/L به مدت ۵ روزبه روش Riba و همکاران (۲۰۰۵).

گروه آزمایشی / آسیب*	شاهد	آستاگزانتین	آستاگزانتین- نمک صفراوی
هایپرپلازی	++++	+	++
هایپرتروفی	+++	+	+++
ادم	++	++	++
حلقه‌ای شدن	++	+	+
نکروز	++++	+++	+++
همجوشی	+++	++	+

*ارزش نمره: بدون آسیب (-)، کم (+) ،ملایم (++)، متوسط (+++)، شدید (++++).

می‌گیرد و می‌تواند مکان مناسبی برای ذخیره عناصر آلوده همچون فلزات سمی باشد (Oliveira-Filho *et al.*, 2010).

در مطالعه حاضر میزان تجمع نقره در بافت آبشش پس از قرارگیری در معرض تنش نانو ذرات نقره در تیمار شاهد افزایش معنی‌داری یافت، ولی این افزایش در تیمارهای آستاگزانتین و آستاگزانتین- نمک صفراوی مشاهده نشد. آستاگزانتین یکی از آنتی‌اکسیدان‌های زیستی قویی است که انرژی تحریکی اکسیژن منفرد را جذب می‌کند و این عمل باعث تخریب مولکول آستاگزانتین می‌شود (Beutner *et al.*, 2001). احتمالاً با همین فرآیند از جذب نانو ذرات نقره در آبشش تیمارهای آستاگزانتین و آستاگزانتین- نمک صفراوی جلوگیری می‌کند. با این‌وجود درک مکانیسم دقیق این فرایند نیازمند بررسی بیشتر است. اخیراً Pournori و همکاران (۲۰۱۷) بیان کردند که تغذیه گربه‌ماهی رنگین‌کمان (*Pangasius hypophthalmus*)، با جیره حاوی نوکلئونید می‌تواند باعث کاهش جذب نانو ذرات نقره محلول در آب در بافت آبشش شود.

در مطالعه حاضر پس از تنش نانو ذرات نقره برخی آسیب‌های بافتی از قبیل هایپرپلازی، هایپرتروفی، ادم، حلقه‌ای شدن، نکروز و همجوشی در بافت آبشش ماهی پرت در همه تیمارها مشاهده شد. به نظر می‌رسد که هایپرپلازی یک شاخص کلی در آسیب بافت آبشش براثر سیمت نانو ذرات است. ممانعت از فعالیت پمپ Na^+/K^+ ATPase توسط فلزات محلول و درنتیجه تجمع مواد محلول در اپیتلیال سلول باعث جذب اسمزی آب و نهایتاً ایجاد هایپرپلازی می‌شود. این فرایند ممکن است همچنین توجیه‌کننده هایپرپلازی به هنگام در معرض قرار گرفتن ماهی در معرض نانو فلزات باشد، زیرا نانو ذرات نیز همانند یون‌های محلول عملکرد پمپ Na^+/K^+ ATPase را مختل می‌کنند (Al-Bairuty *et al.*, 2013). تورم و هاپیرپلازی اپیتلیوم آبشش می‌تواند منجر به افزایش فاصله انتشار بین جریان آب و خون و کاهش احتمال ورود فلزات سنگین به خون شود و یا ورود آن را با تأخیر مواجهه کند (عروجعلی و همکاران، ۱۳۹۲). بنابراین به نظر می‌رسد این تغییر بافت‌شناسی ایجاد شده در آبشش ماهی پس از مواجهه با نانو ذرات نقره می‌تواند نوعی پاسخ فیزیولوژیک تلقی شود که ماهی برای ممانعت از ورود این مواد به بدن و جلوگیری از آسیب‌های وارده ایجاد کرده است و ازاین‌رو سبب بهبود عملکرد آبشش شود و همچنین می‌توان گفت هایپرپلازی یک مکانیسم دفاعی برای جذب نانو ذرات نقره توسط آبشش است. سمیت نانو ذرات نقره ممکن است به دلیل دو فاکتور اصلی، یکی خود نانو ذرات نقره و دیگری یون نقره آزادشده از نانو ذرات باشد، به‌نحوی‌که نانو ذرات نقره از طریق چسبیدن به سطح عشای سلولی و مختل کردن نفوذپذیری و افزایش نفوذپذیری غشاء از طریق ایجاد حفره و تجمع درون غشاء سبب ایجاد آسیب در بافت آبشش می‌شوند. پس از ورود نانو ذرات نقره به محیط آبی یون نقره آزاد می‌کند و میزان رهاسازی

یون نقره توسط نانو ذرات نقره به‌وسیله عواملی از قبیل پارامترهای کیفی آب مانند: اکسیژن محلول، pH، دما، شوری، قدرت یونی و حضور مواد آلی طبیعی و همچنین توسط خواص فیزیکی و شیمیایی از قبیل اندازه اولیه ذرات و غلظت ذرات تعیین می‌شود. میزان یون نقره برای دامنه وسیعی از گونه‌ها حتی در غلظت‌های نسبتاً پایین سمی است و به‌عنوان یک فاکتور مهم در تعیین سمیت نانو ذرات نقره در نظر گرفته می‌شود (Lee *et al*., 2012). منفرد و همکاران (۱۳۹۳) مشاهده کردند که مواجهه با نانو ذرات نقره سبب هایپرپلازی و هایپرتروفی در آبشش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و همچنین سبب افزایش ترشح موکوس در آبشش می‌شود؛ همچنین مواجهه با نانو ذرات نقره در آلوین قزل‌آلای رنگین‌کمان سبب افزایش قطر لاملاها در فیلامنت‌ها و هایپرپلازی و پرخونی شدید در آبشش شده که تا حدودی هم سو با نتایج این تحقیق در ماهی پرت است (منفرد و همکاران، ۱۳۹۳). مواجهه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم نیز سبب ایجاد ادم و افزایش ترشح موکوس در بافت آبشش شده به‌عنوان یک سازوکار دفاعی برای جلوگیری از رسیدن ماده سمی به سلولی‌های حساس اپیتلوم آبشش مفید است (Al-Bairuty *et al*., 2003). آنالیزهای بافت‌شناسی در ماهی کپور معمولی نشان داد که نانو ذرات نقره اثر مخربی بر ماهی دارد. یکی از اثرات نانو ذرات نقره در ابتدا سبب دوشاخه شدن رشته‌های آبششی، افزایش در اندازه و تعداد سلول‌های موکوس و هایپرپلازی اپیتلیوم لاملی در ماهی کپور معمولی شد (Lee *et al*., 2012). مطالعه دیگری به بررسی تأثیر حاصل از نانو ذرات کربن بر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرداختند و در بافت آبشش آسیب‌هایی مانند چماقی شدن، تورم و هایپرپلازی را در تیغه‌های آبشش مشاهده کردند (Chen *et al*., 2011).

در مطالعه حاضر همچنین تأثیر آستاگزانتین و نمک صفراوی جیره به‌عنوان یک عامل کاهنده تنش ناشی از نانو ذرات نقره بر بافت آبشش موردبررسی قرار گرفت و مشاهده که میزان آسیب‌های بافتی در تیمارهای آستاگزانتین و آستاگزانتین-نمک صفراوی در مقایسه با تیمار شاهد به کمتر بود. در بافت آبشش گروه‌های تغذیه شده با آستاگزانتین در مقایسه با گروه شاهد که در معرض نانو ذرات نقره قرارگرفته تفاوت معنی‌داری ازنظر میزان تجمع نقره در بافت نشان دادند، به‌طوری‌که پس از مواجهه با نانو ذرات نقره میزان تجمع نقره در بافت آبشش گروه تغذیه‌شده با آستاگزانتین به‌طور بسیار محسوسی کمتر از ماهیان گروه شاهد بود. با توجه به تجمع کمتر نقره در بافت آبشش گروه تغذیه‌شده با آستاگزانتین و نمک صفراوی نسبت به گروه شاهد، میزان آسیب بافتی مشاهده‌شده در تیمار این تیمار نیز نسبت به گروه شاهد کمتر بوده است، که می‌تواند نشان‌دهنده کاهش اثرات مضر نانو ذرات نقره با استفاده از مکمل آستاگزانتین باشد. نتایج مشابهی در مطالعه نازدار و همکاران (۱۳۹۵) مشاهده شد. نتایج این مطالعه نشان داد ماهیانی که از جیره حاوی نانو ذرات اکسید نیکل و سیلیمارین دریافت کرده بودند در مقایسه با تیماری که فقط از جیره حاوی نانو ذرات اکسید نیکل تغذیه‌شده بود، شدت آسیب بافت آبشش کمتری را نشان دادند. نازدار و همکاران (۱۳۹۵) دلیل این امر را خاصیت آنتی‌اکسیدانی سیلیمارین دانست، که می‌تواند از صدمات بافتی ناشی از نانوذره اکسید نیکل در جیره غذایی جلوگیری کند.

نتایج نشان می‌دهد میزان تجمع نقره در بافت آبشش پس از تنش نانو ذرات نقره در تیمارهای تغذیه‌شده با آستاگزانتین و نمک صفرای به‌صورت معنی‌داری کمتر تیمار شاهد است و همچنین آسیب‌های واردشده به بافت آبشش در تیمارهای آستاگزانتین و آستاگزانتین-نمک صفراوی به‌صورت محسوسی کمتر از تیمار شاهد بود. با توجه به این دو مورد می‌توان بیان داشت که استفاده از آستاگزانیتن و نمک صفراوی در جیره می‌تواند باعث کاهش آسیب‌های وارده به آبشش در مقابل نانو ذرات نقره

شـود. همچنـین پیشـنهاد مـی‌شـود بـرای کـاهش آسیب‌هـای وارده بـه بافـت آبشـش در منـاطقی کـه احتمال حضور فلزات سنگین است از آنتی‌اکسیدان‌هـا ازجمله آستاگزانتین استفاده شود و بـرای درک بهتـر عملکرد نمک صفراوی در مطالعات بعدی اثرات نمـک صفراوی به‌تنهایی نیز موردبررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

هزینه‌های انجام این تحقیق از محل پژوهانه شماره ۵۰۲/۹۱/۵۳۹۴۹ پرداختی از سوی معاونت پژوهشی دانشگاه صنعتی به دکتر سالار درافشان و نیز حمایت مالی ستاد فناوری نانو ریاست جمهوری در قالب پایان‌نامه دانشجویی مقطع کارشناسی ارشد رشته تکثیر و پرورش آبزیان تأمین شده است.

منابع

رزم‌آرا پ.، درافشـان س.، پیکـان حیرتـی ف.، طـالبی م.، رنجبر م. ۱۳۹۲. اثر نانو ذرات نقره کلوئیدی و نیترات نقـره محلـول در آب بـر تغییـرات بـافتی آبشـش گربـه‌مـاهی رنگـین‌کمـان *Pangasianodon hypophthalmus*. مجله بوم‌شناسـی ایـران ۳، ۱۰-۱۸.

عروجعلی م.، درافشـان س.، پیکـان حیرتـی ف.، محبـوبی صـوفیانی ن. ۱۳۹۱. اثـر غلظـت‌هـای تحـت کشـنده کادمیوم بـر برخـی تغییـرات بـافتی در آبشـش بچـه تـاس‌مـاهی اسـترلیاد پرورشـی (*Acipenser ruthenus*). *مجله علمی شیلات ایران* ۲۲، ۷۱-۸۲.

منفرد ع.، خلیلی ع.، خلیلی ل.، کلباسی م. ۱۳۹۳. بررسی تغییرات بافتی آبشش در لاروهـای تـازه تفـریخ شـده مـاهی قـزل‌آلای رنگـین‌کمـان (*Oncorhynchus mykiss*) متعاقب تجـویز غلظـت‌هـای مختلـف نـانو ذرات نقره. *زیست جانوری تجربی* ۳، ۱۳-۲۲.

نازدار ن.، فرهنگی م.، ایمانی الف.، سروی مغانلو ک.، رازی م. ۱۳۹۵. تاثیر سیلیمارین جیـره غـذایی در کـاهش آسـیب بافـت آبشـش قـزل آلای رنگـین کمـان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شده بـا نـانو ذره اکسـید نیکـل. *نشـریه پـژوهش‌هـای مـاهی شناسـی کاربردی* ۴، ۹۸-۱۱۱.

Al-Bairuty G.A., Shaw B.J., Handy R.D., Henry T.B. 2013. Histopathological effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on the organs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 126,104-115.

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

Banaee M., Mohammadipour S., Madhani S. 2015. Effects of sublethal concentrations of permethrin on bioaccumulation of cadmium in zebra cichlid (*Cichlasoma nigrofasciatum*). *Toxicological and Environmental Chemistry* 97, 200-207.

Barros M.P., Pinto E., Colepicolo P., Pedersen M. 2001. Astaxanthin and peridinin inhibit oxidative damage in Fe^{2+}-loaded liposomes: scavenging oxyradicals or changing membrane permeability? *Biochemical and Biophysical Research Communications* 288, 225-232.

Beutner S., Bloedorn B., Frixel S., Hernandez Blanco I., Hoffmann T., Martin H.D., Mayer P., Noack C., Ruck B., Schmidt M. 2001. Quantitative assessment of antioxidant properties of natural colorants and phytochemicals: carotenoids, flavonoids, phenols and indigoids. The role of β- carotene in antioxidant functions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81, 559-568.

Burrows I., Whitton B. 1983. Heavy metals in water, sediments and invertebrates from a metal-contaminated river free of organic pollution. *Hydrobiologia* 106, 263-273.

Chen B., Zhou G.H., Liu Q. 2001. Study on the effect of carotenoid, bile salts and free fatty acids on carotenoids uptake by intestinal cells in vitro acta zoonutrimenta. *Journal of Geophysical Research* 2, 13-19.

Erdman J. 1988. The physiologic chemistry of carotenes in man. *Clinical Nutrition* 7, 101-105.

Ganji F.K., Arvand M. 2000. Practical histology. University of Medical Sciences.

Govindasamy R., Rahuman A.A. 2012. Histopathological studies and oxidative stress of synthesized silver nanoparticles in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Journal of Environmental Sciences* 24, 1091-1098.

Chemosphere 58, 659-669.

Saxby A., Adams L., Snellgrove D., Wilson R. W., Sloman K.A. 2010. The effect of group size on the behaviour and welfare of four fish species commonly kept in home aquaria. *Applied Animal Behaviour Science* 125, 195-205.

Schrand L.K., Hussain M., Braydich K.L. 2008. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *Journal of Physical Chemistry* 112**,** 13608-13619.

Scown T.M., Santos M., Johnston B., Gaiser B. 2010. Effects of aqueous exposure to silver nnoparticles of different sizes in rainbow trout. *Toxicological Sciences* 115, 521-534.

Wimmer U., Wang Y., Georgiev O., Schaffner W. 2005. Two major branches of anti-cadmium defense in the mouse. *Nucleic Acids Research* 33, 5715–5727.

Xu J., Maki D., Stapleton S. 2003. Mediation of cadmium induced oxidative damage and glucose- 6- phosphate dehydrogenase expression through glutathione depletion. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 17, 67-75.

Yang H., Mu X., Luo D., Hu Y., Song H., Liu C.J. 2012. Bile salts, a novel effective feed additive for promoting absorption and pigmentation of astaxanthin in Parrot (*Cichlasoma synspilum*♀× *Cichlasoma citrinellum*♂). *Aquaculture* 350, 42-45.

Hamer D.H. 1986. Metallothionein. Ann. *Review. Biochem* 913, 51-55.

Hardy K., Torrissen O., Shearer R., Scott T., Stone F. 1990. Effects of dietary canthaxanthin level and lipid level on apparent digestibility coefficients for canthaxanthin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 88, 351-362.

Hussain L.K., Schrand A.M., Braydich K. 2008. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *Journal of Physical Chemistry* 43, 13608-13619.

Jyonouchi H., Sun S., Tomita T., Gross M. 1995. Astaxanthin, a carotenoid without vitamin A activity, augments antibody response in cultures including T-helper cell clones and suboptimal doses of antigen. *Journal of Nutrition* 125, 2483-2490.

Lee B., Duong C.N., Cho J., Kim K., Seo Y., Kim P., Choi K., Yoon J. 2012. Toxicity of citrate-capped silver nanoparticles in common carp (*Cyprinus carpio*). *Biomed Research International* 20, 1-14.

Mansouri B., Baramaki R., Pourkhabbaz A., Zareh M., Hamidian A.H. 2013. Bioaccumulation and depuration of copper in the kidney and liver of freshwater fish *Capoeta fusca*. *Toxicol* 7, 808-814.

Masciangioli T., Zhang W. 2003. Environmental technologies at the nanoscale. *Environmental Science and Technology* 37, 102-108.

NRC. 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp: *National Academies Press*, Washington, DC.

Oliveira-Filho E.C., Muniz D.H.F., Ferreira M.F.N. 2010. Cesar koppe grisolia evaluation of acute toxicity, cytotoxicity and genotoxicity of a nickel mining waste to *Oreochromis niloticus*. Bull *Environ Contam Toxicol* 23, 261-282.

Pournori B., Paykan Heyrati F., Dorafshan D. 2017. Histopathological changes in various tissues of striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*, fed on dietary nucleotides and exposed to water-borne silver nanoparticles or silver nitrate. *Iranian Journal of Aquatic Animal Health* 3, 36-52.

Riba I., Blasco J., Jimenez-Tenorio N., Delvalls T.A. 2005. Heavy metal bioavailability and effects: I. Bioaccumulation caused by mining activities in the Gulf of Cadiz.

Gill histophatological alternation reduction in parrot fish (*Cichlasoma synspilum* ♀ × *Cichlasoma citrinellum* ♂) after exposure to water-born silver nanoparticle by feeding on astaxanthin and bile salt

Amin Mokhlesabady Farahany, Salar Dorafshan*, Fatemeh Paykan Heyrati

Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, 84156-83111, Iran.
*Corresponding author: sdorafshan@cc.iut.ac.ir

Received: 2018/1/6 Accepted: 2018/3/16

Abstract

This study aimed to investigate the effects of water-born silver nanoparticles (AgNPs) on gill histopathological alternation of Parrot and the possible protective effects of diet enriched with astaxanthin alone or in combination with bile salt. 200 Parrot fishes (average weight 25.5±6.2) were randomly distributed in three different groups: control (basic diet), astaxanthin alone (4g/kg) or in combination with bile salt (1200 mg/kg). The fish were fed for 90 days and then subjected to AgNPs, 250 µg/L for 5 days. The silver bioaccumulation and gill histopathology analysis were done before and after exposure period. The results showed significant increase in silver concentration in the gill tissues of the control group after AgNPs exposure ($P<0.05$), while feeding fish on diet enriched with astaxanthin alone or in combination with bile salt did not show such elevation in silver concentration ($P>0.05$). After exposure to AgNPs, different gill histopathological alterations such as hyperplasia, hypertrophy, looping, necrosis and fusion were observed in fish from all treated groups, although the intensity of them were significantly lower in the groups of fish fed on astaxanthin alone or in combination with bile salt, comparison to the control group. In general, it can be concluded that diet enriched with astaxanthin alone or in combination with bile salt as antioxidant supplement can reduce the harmful effects of AgNPs on the gills.

Keywords: Parrot fish, Astaxanthin, Bile salt, Silver nanoparticles.