



دانشگاه گنبد کاووس

نشریه "پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی"

دوره چهارم، شماره چهارم، زمستان ۹۵

<http://jair.gonbad.ac.ir>

تغییرات آسیب‌شناسی بافت آبشش و کبد عروس‌ماهی زاینده‌رود *Petroleuciscus esfahani* Coad & Bogutskaya, 2010 پس از مواجهه با نانوذرات نقره و نیترات نقره محلول در آب

میثم راکی^۱، فاطمه پیکان حیرتی^۲، سالار درافشان^{۲*}

^۱دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

^۲استادیار، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۵/۵/۱۶

چکیده

اثر نانوذرات نقره (AgNPs) و نیترات نقره (AgNO_3) بر تغییرات آسیب‌شناسی آبشش و کبد در عروس‌ماهی زاینده‌رود (*P. esfahani*) به‌عنوان یک گونه حایز اهمیت اکولوژیک، مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور ۱۰۰ قطعه عروس‌ماهی زاینده‌رود (میانگین وزنی ۲۶ گرم) به مدت ۱۰ روز تحت شرایط ساکن-تجدید در معرض مقادیر ۱ و ۲۵ میکروگرم در لیتر از نانوذرات نقره (میانگین قطر هیدرودینامیکی ۵۴/۸ نانومتر) و یا نیترات نقره قرار گرفتند. یک گروه آزمایشی حاوی ۲۰ قطعه ماهی نیز به‌عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد. پس از پایان آزمایش، تغییرات ساختاری بافت‌ها به روش بافت‌شناسی کلاسیک مورد ارزیابی گرفت و علاوه بر توصیف آسیب‌ها، کمی‌سازی آن‌ها با محاسبه شاخص اندام (I_{Org}) انجام شد. بروز آسیب بافتی در هر دو بافت آبشش و کبد در عروس‌ماهی زاینده‌رود حتی پس از مواجهه با غلظت‌های اندک نانوذره یا نیترات نقره محلول در آب نسبت به گروه شاهد مشهود بود. شدیدترین عارضه بافتی در ماهیان خصوصاً پس از مواجهه با غلظت‌های بالای این ترکیبات، شامل هاپرپلازی و ادم در بافت آبشش و پرخونی و نکروز در بافت کبد بود. شدت آسیب‌ها با افزایش غلظت هر دو ترکیب در آب به‌طور معنی‌داری افزایش یافت، به‌طوری که بیشترین سطح آسیب بافتی بر پایه محاسبه شاخص اندام در مواجهه با غلظت ۲۵ میکروگرم در لیتر نیترات نقره و پس از آن غلظت ۲۵ میکروگرم در لیتر از نانوذرات نقره مشاهده شد. نتایج بیانگر حساسیت نسبتاً یکسان هر دو

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

بافت به عوامل آلاینده بود. اثرگذاری نیترات نقره خصوصاً در غلظت‌های بالا بر تغییرات بافتی در هر دو بافت آبشش و کبد به‌طور معنی‌داری بیشتر از نانوذرات نقره بود که می‌تواند بیانگر سمیت بالاتر نیترات نقره برای عروس ماهی زاینده رود در مقایسه با نانوذرات نقره باشد.

واژه‌های کلیدی: *P. esfahani*، سم‌شناسی، نانوذرات، نیترات نقره، بافت‌شناسی

مقدمه

توانایی دستکاری ماده در مقیاس اتمی و مولکولی و تولید محصولاتی با قطر حداقل برابر با ۱-۱۰۰ نانومتر سبب کاربرد وسیع علم نانو تکنولوژی در شیمی، زیست‌شناسی، فیزیک، داروسازی و علوم مهندسی شده است (Masciangioli and Zhang, 2003). افزایش تولیدات و محصولات نانو به ناچار منجر به افزایش فاضلاب نانومواد می‌شوند. محیط‌های آبی محل ورود و تجمع بسیاری از این نانوذرات و فاضلاب‌های شیمیایی هستند و لذا در نهایت این ترکیبات پس از ورود به محیط زیست در کنش با موجودات زنده و عوامل غیر زنده قرار می‌گیرند. اثرات مضر و تخریب‌کننده این ترکیبات هنوز به‌طور کامل شناخته نشده که خود سبب ایجاد نگرانی‌هایی برای سلامت انسان و محیط زیست شده است (Scown *et al.*, 2010). نانوذرات نقره به‌دلیل خاصیت ضد میکروبی کاربردهای گسترده‌ای دارند به‌طوری‌که بالاترین کاربرد نانومواد در صنایع مختلف را به خود اختصاص می‌دهند (Perelshtein *et al.*, 2008). نانوذرات نقره می‌توانند منجر به افزایش پراکسیداسیون چربی، ایجاد تنش اکسیداتیو، کاهش عملکرد میتوکندریایی و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی شوند (Arora *et al.*, 2008). فرآیند سمیت نانوذرات نقره احتمالاً متفاوت از فلز نقره باشد، این مسأله می‌تواند به‌دلیل شکل و یا اندازه نانوذرات یا میزان رهاسازی یون نقره از نانوذرات باشد، بنابراین سمیت نانوذرات نقره باید همواره با اثرات حاصل از غلظت‌های برابر از یون نقره مقایسه شود (Scown *et al.*, 2010; Johari *et al.*, 2014).

فلزات در شرایط متفاوت محیطی به طرق مختلف جذب بدن ماهی می‌شوند. سطوح مختلف بدن ماهی که در تماس با محیط قرار دارند ممکن است محلی برای انتقال، رسوب و تجمع فلزات سنگین باشند. آبشش، مهم‌ترین مسیر در جذب فلزات سنگین محسوب می‌شود. آبشش‌ها به همراه پوست از جمله مهم‌ترین اندام‌هایی هستند که به‌طور مستقیم تحت تأثیر آلاینده‌ها آسیب می‌بینند (Genten *et al.*, 2009). آبشش ماهیان دارای عملکرد مختلفی همچون تبادل گازهای تنفسی، تنظیم اسمزی، دفع نیتروژن و تعادل اسید- باز می‌باشند و به جهت این عملکردها، دارای ویژگی‌های خاصی بوده که در تبادل مواد شیمیایی سمی بین ماهی و محیط، اثرگذار هستند (Hibiya, 1982). کبد (به‌عنوان غده اصلی در دستگاه گوارش ماهیان) نقش مهمی در سم‌زدایی و نگهداری هموستاز متابولیک بدن و نیز

نقش کلیدی در سنتز پروتئین‌های پلازما دارد. این بافت همچنین اندام هدف اولیه گزنوبیوتیک‌ها و انباشت آن‌ها مطرح هستند.

مطالعات متعددی در زمینه اثر نانوذرات بر ساختارهای بافتی در ماهیان گزارش شده است. بافت آبشش ماهی گورخری بالغ (*Danio rerio*) پس از مواجهه با نانوذرات نقره و نیترات نقره دچار تغییرات مختلف آسیب‌شناسی شد. در این تحقیق تیمار نیترات نقره منجر به افزایش بیشتر ضخامت رشته‌های آبششی در مقایسه با تیمار نانوذرات نقره شد (Griffitt *et al.*, 2009). تغییرات هیستوپاتولوژیک معنی‌داری را در اثر مواجهه با نانوذرات نقره در آبشش قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مشاهده نشد (Scown *et al.*, 2010). مهم‌ترین تغییرات بافتی ناشی از حضور نانوذرات نقره در محیط پرورشی قزل‌آلای رنگین‌کمان در بافت آبشش (هایپرپلازی و هایپرتروفی) و روده (انیفلامیشن، چسبیدگی و نکروز ریزپُرزها) در اثر مواجهه با کلونید نانوذرات نقره پدید آمد (Johari *et al.*, 2014). در سال ۲۰۰۹ اثرات مخرب نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم (TiO_2 NPs) بر لارو ماهی کپور معمولی نشان داد که در معرض قرارگیری آن‌ها با دی‌اکسید تیتانیوم منجر به افزایش ضخامت لاملاها، ادم، ادغام یا همجوشی و هایپرپلازی رشته‌های آبششی و نیز واکنش شدن، نکروز و لیپیدوزیس در کبد شد (Linhu *et al.*, 2009). اخیراً اثرات مخرب نانوذرات و نیترات نقره بر ساختار بافت آبشش (Razmara *et al.*, 2013) و برخی ویژگی‌های خون‌شناسی (Razmara *et al.*, 2014) در گربه‌ماهی رنگین‌کمان (*Pangasianodon hypophthalmus*) مورد اشاره قرار گرفته است.

عروس‌ماهی زاینده‌رود (*Petroleuciscus esfahani*) گونه‌ای بومی از خانواده کپورماهیان (Cyprinidae) در ایران است. این گونه در حوضه دجله، زاینده‌رود و حوضه دریاچه نمک پراکنش دارد. اما پراکنش اصلی آن در مناطق میانی و بالادست رودخانه زاینده‌رود بوده و لذا از منظر اکولوژیک و صید ورزشی در این حوضه بسیار حایز اهمیت است (Keivany *et al.*, 2015). اثر مخرب فلزاتی نظیر نقره به‌عنوان یک فلز سنگین بر ماهیان اثبات شده است (Grosell *et al.*, 1999). با این وجود، همواره تفاوت‌هایی در نوع و شدت پاسخ به حضور این عنصر در آب به صورت یون یا نانوذره وجود داشته است. دامنه این تفاوت‌ها به‌دلیل کنش‌های محتمل با محیط آبی و نیز تنوع زیاد آبیان وسیع‌تر می‌شود، لذا این تحقیق با هدف ارزیابی اثر نانوذرات نقره محلول در آب در دو غلظت متفاوت و مقایسه آن با غلظت‌های متناظر از نیترات نقره بر تغییرات آسیب‌شناسی بافتی عروس‌ماهی زاینده‌رود به‌عنوان یک گونه حایز اهمیت اکولوژیک اجرا شد.

مواد و روش‌ها

برای انجام این پژوهش، ابتدا ۱۰۰ قطعه عروس‌ماهی زاینده‌رود میانگین وزنی $1/3 \pm 26/4$ گرم و طولی $0/33 \pm 12/5$ سانتی‌متر (میانگین \pm خطای استاندارد) از چشمه دیمه واقع در استان چهارمحال و بختیاری با استفاده از تورپره صید گردید. ماهیان پس از صید در شرایط استاندارد به سالن آکواریوم دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان منتقل شدند. آن‌ها به مدت ۱۰ روز جهت سازش با شرایط جدید نگهداری شدند و سپس به آکواریوم‌هایی با حجم کلی ۱۰۰ لیتر، هوادهی شده و پر شده با آب لوله‌کشی شهری بدون کلر مستقر شدند. هر آکواریوم شامل ۱۵ قطعه ماهی بود و آزمایش در ۵ گروه شامل غلظت‌های $1 \mu\text{g/L}$ نانوذرات نقره (1AgNPs)، $1 \mu\text{g/L}$ نیترات نقره (1AgNO_3)، $25 \mu\text{g/L}$ نانوذرات نقره (25AgNPs) و $25 \mu\text{g/L}$ نیترات نقره (25AgNO_3) و گروه شاهد اجرا شد. مشخصات نانوذرات نقره مورد استفاده در جدول ۱ ارائه شده است. غلظت پائین ($1 \mu\text{g/L}$) به‌منظور ارزیابی اثرات سمیت این مواد در محیط طبیعی و غلظت بالا ($25 \mu\text{g/L}$) به‌منظور پی بردن به سمیت بحرانی یا کم‌ترین غلظتی که سبب کاهش زنده‌مانی می‌شود، طی آزمایش مجزایی انتخاب شدند (Raki, 2014). به‌منظور مقایسه غلظت یکسان از نقره در دو ترکیب نانوذره و نیترات نقره، مقادیر حقیقی یون نقره در نمک نیترات نقره و نیز درصد خلوص آن مورد توجه قرار گرفت. به‌طوری که حدود ۶۳ درصد از نمک مذکور به یون نقره اختصاص داشت و جهت محاسبه غلظت‌ها برای نیترات نقره این مهم در نظر گرفته شد. ماهی‌ها به مدت ۱۰ روز در تماس با این مواد بودند و در طولانی مدت تغذیه نشدند (Sun *et al.*, 2008). به لحاظ این‌که اثر نانوذرات بسیار متأثر از قطر آن‌ها است و همچنین تمایل آن‌ها به اتصال به یکدیگر و افزایش اندازه، لازم است تا پیش از استفاده از این آن‌ها حداقل به مدت ۳۰ دقیقه جهت تفکیک ذرات از یکدیگر و توزیع یکنواخت آن‌ها عمل سونیکاسیون بر روی آن‌ها صورت گیرد (Razmara *et al.*, 2013 and 2014). تانک‌های آزمایش ۲۴ ساعت قبل از اضافه کردن ماهی به غلظت موردنظر رسیدند، سپس شسته شده و مجدداً قبل از اضافه کردن ماهی به غلظت مورد نظر رسیدند تا میزان کاهش غلظت ذرات موردنظر که در اثر چسبیدن به سنگ هوا و شیشه تانک ایجاد می‌شود، به حداقل برسد. تعویض آب و تنظیم غلظت مورد نظر هر ۴۸ ساعت یک‌بار تحت شرایط ساکن - تجدید (Static-renewal) انجام شد (Schrand *et al.*, 2008).

جدول ۱- برخی از مشخصات اندازه‌گیری شده کلئوئید نانوذرات نقره (Salari Joo et al., 2013)

پارامتر	روش سنجش	نوع یا مقدار	توضیحات
غلظت	ICP-AES	۳۹۸۰ mg/L	با غلظت اعلام شده از کارخانه تولیدی اختلاف ناچیزی دارد.
شکل	TEM	کروی	-
اندازه ذرات (قطر هیدرودینامیکی)	Zetasizer	۳/۹ تا ۱۶۳/۵ nm	۵۴/۱ درصد از ذرات قطر هیدرودینامیکی کم‌تر از ۱۰۰ nm دارند.
میانگین قطر هیدرودینامیکی	Zetasizer	۵۴/۸nm	-
قطر بیشینه	TEM	۱۲۹ nm	۶۵/۱۴ درصد از ذرات قطری بین ۱۳-۱۰۰ nm دارند.
خلوص	EDX		تنها عنصر نقره در کلئوئید نانوذرات نقره وجود دارد.

به لحاظ این‌که پاسخ‌های فیزیولوژیک آبزیان در مواجهه با شرایط نامطلوب زیستی از جمله حضور آلاینده‌ها خصوصاً فلزات سنگین در آب متأثر از ویژگی‌های فیزیوشیمیایی آب خصوصاً درجه حرارت و سختی است، لذا سنجش این ویژگی‌ها در طول دوره سهم رتبه صورت گرفت. دما با دامسنج و اکسیژن محلول، pH و هدایت الکتریکی به ترتیب به وسیله اکسیژن‌متر (مدل WTW DO meter, USA)، pH متر (مدل Research Jenway 3330, UK) و EC متر (مدل 4310, UK Research Jenway) اندازه‌گیری شد. میزان آمونیوم به روش تیتراسیون و جذب در طول موج‌های ۲۲۰ و ۲۷۵ نانومتر با اسپکتروفوتومتر (مدل Jascov- 530 ساخت کشور ژاپن) اندازه‌گیری شد. برای سنجش فسفات کل از تیتراسیون و اسپکتروفوتومتری در طول موج ۸۸۰ نانومتر و قلیائیت از طریق تیتراسیون آب با HCl ۰/۰۲ مولار و سختی با تیتراسیون ۱۰۰ میلی‌لیتر آب با HCl ۰/۱ نرمال اندازه‌گیری شد (Radojevic and Baskin, 2006). در طول دوره دما در گستره (۲۰-۲۲/۵) درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول (۶/۹-۵/۸ میلی‌گرم برلیتر)، pH (۷/۸-۸)، هدایت الکتریکی (۴۱۹/۵ میکروزیمنس بر سانتی‌متر)، آمونیوم (۱/۹ میلی‌گرم برلیتر)، فسفات کل (۰/۰۹ قسمت در میلیون) و سختی (۲۰۴ میلی‌گرم برلیتر کربنات کلسیم) بود.

در پایان آزمایش، روز دهم، بافت آبشش و کبد حداقل چهار قطعه ماهی از هر تیمار به صورت تصادفی نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها در فرمالین بافر ۱۰ درصد با pH برابر ۷/۴ تثبیت شد. سپس مراحل مختلف آبیگری از طریق الکل با درجات مختلف، شفاف‌سازی با استفاده از گزلیول، پارافینه کردن، قالب‌گیری و برش اجرا شد. رنگ‌آمیزی اسلایدهای بافتی به روش کلاسیک هماتوکسیلین-ائوزین انجام گردید (Mumford, 2004). از هر بافت هر قطعه ماهی، حداقل ۳ اسلاید با ضخامت ۴ الی ۵ میکرون تهیه شد. بافت‌ها برای مشاهده هر گونه علائم تغییر آسیب‌شناسی با استفاده از میکروسکوپ نوری ارزیابی شدند. تغییرات ساختاری آبشش نظیر هایپرتروفی، هایپرپلازی، نکروز و ادم و برای بافت

کبد پرخونی، نکروز، کاریولیز هسته‌ای و سایر تغییرات ریختی محتمل در مقایسه با گروه شاهد مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق هایپرپلازی به معنی افزایش تعداد سلول‌ها و هایپرتروفی به مفهوم افزایش اندازه سلول‌ها مد نظر قرار گرفت. نکروز به‌عنوان ضایعه‌ای که در آن سلول‌ها و بافت‌ها فعالیت کمتری دارند و یا حتی می‌میرند، در نظر گرفته شد. سلول‌های دچار نکروز، تغییرات هسته و سیتوپلاسمی را نشان می‌دهند. همراه با نکروز کانونی معمولاً هسته سلول‌های نکروز شده دچار تغییراتی مانند پیکنوزیس هسته‌ای، کاریولیز هسته‌ای و کاریورکسی می‌شوند. در مرحله پیکنوزه شدن، هسته چروکیده و تیره می‌شود و هستک دیده نمی‌شود. در مرحله کاریورکسی، تکه تکه شدن غشای هسته و قطعه قطعه شدن کروماتین رخ می‌دهد. در مرحله کاریولیز نیز تقریباً هسته متلاشی شده است (Genten et al., 2009).

کمی‌سازی آسیب بافتی: برای شرح کمی تغییرات بافت‌شناسی از روش پیشنهادی (Bernet et al., 1999) و برای توصیف شدت تغییر آسیب‌شناسی از روش (Riba et al., 2005) استفاده شد. به‌عنوان مثال برای بررسی هایپرپلازی رشته‌ها و تیغه‌های ثانویه آبششی در صورتی که تعداد رشته‌های آسیب دیده کمتر از ۱۰ رشته بود، بافت بدون آسیب و با علامت (-) در نظر گرفته شد. آسیب ۱۰-۲۰ رشته با علامت (+) و به صورت 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. برای کمی‌سازی شدت آسیب از شاخص اندام با استفاده از فاکتور اهمیت و ارزش نمره استفاده شد (Bernet et al., 1999):

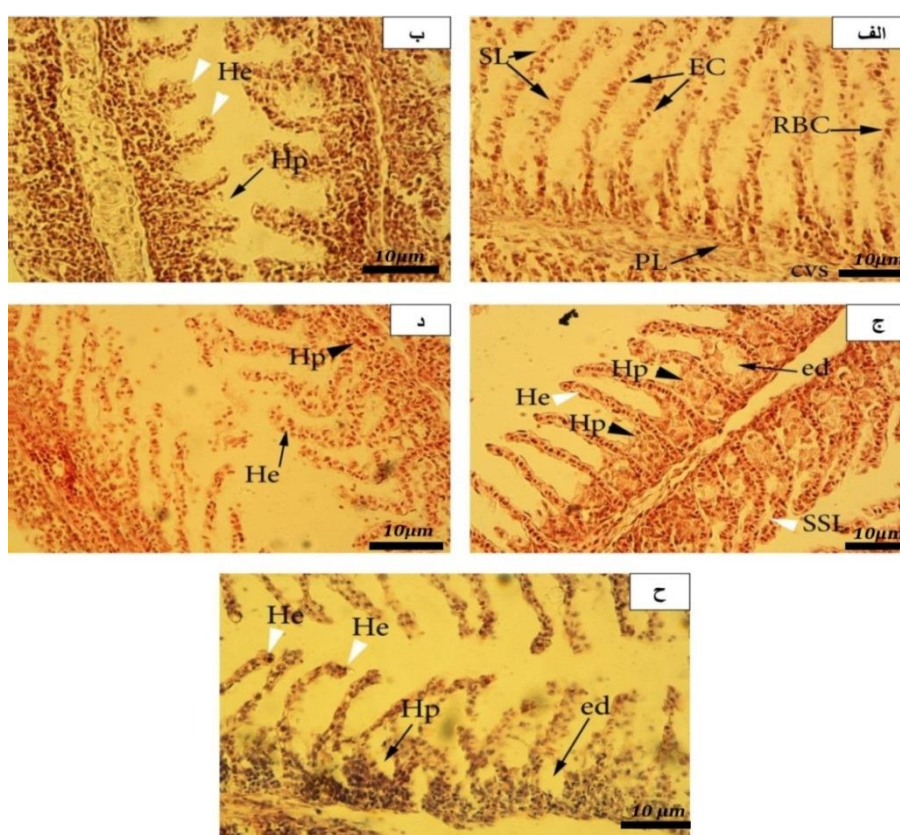
$$I_{org} = \sum_{rp} \sum_{alt} (a_{org\ rp\ alt} \times W_{org\ rp\ alt})$$

I_{org} : شاخص اندام یا ارگان، Org: اندام یا بافت مورد مطالعه در اینجا آبشش یا کبد، alt: تغییرات، rp: الگوی واکنش، a: ارزش نمره، w: فاکتور اهمیت. بر اساس این فرمول به‌عنوان مثال هایپرپلازی بافت آبشش دارای فاکتور اهمیت ۲ و ارزش نمره برابر ۴ است (Bernet et al., 1999). شاخص اندام، درجه آسیب یک اندام یا بافت را نشان می‌دهد که حاصل ضرب اهمیت فاکتور و ارزش نمره همه تغییرات یافت شده در بافت مورد آزمایش است.

آنالیز آماری شامل مقایسه فراوانی و شدت ضایعات ایجاد شده در بافت آبشش و کبد گروه‌های آزمایشی و نیز مقایسه شدت تغییرات ایجاد شده از نظر کمی بین دو بافت مذکور در یک گروه آزمایشی بود. به‌این منظور ابتدا پراکنش نرمال داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف-اسمیرنف سنجیده شد. میزان شدت تغییرات وارده به آبشش یا کبد با استفاده از نرم‌افزار SPSS (ver:18) و آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون چند دامنه دانکن مقایسه شد. سطح معنی‌داری در تمام آزمون‌ها $p < 0/05$ و داده‌ها به صورت $mean \pm SE$ بیان شد. جهت رسم نمودار از Excel ۲۰۰۷ استفاده شد.

نتایج

تغییرات آسیب‌شناسی بافت آبشش: با بررسی تغییرات آسیب‌شناسی بافت آبشش عروس‌ماهی زاینده‌رود در گروه‌های مختلف مشاهده گردید که برخی آسیب‌های بافتی در ماهیان گروه شاهد نیز وجود داشت. با این وجود با افزودن آلاینده‌ها به آب آکواریوم ماهیان، شدت آسیب‌ها به طرز چشمگیری افزایش یافت. پرخونی، ادم و هایپرپلازی از جمله عوارض شایع در بافت آبشش ماهیان پس از در معرض قرارگیری با سطوح بالای نیترات نقره یا نانوذرات نقره بود (شکل ۱).



شکل ۱- انواع تغییرات بافتی مشاهده شده در آبشش عروس‌ماهی زاینده‌رود (*P. esfahani*) پس از مواجهه با نانوذرات نقره و نیترات نقره، بزرگنمایی $\times 400$. شکل‌های الف تا ح به ترتیب مرتبط با بافت آبشش ماهیان گروه شاهد، $1AgNO_3$ ، $25AgNO_3$ و $25AgNPs$ است. عوارض بافتی در تمامی گروه‌های آزمایشی حتی گروه شاهد مشاهده می‌شود، با این وجود، شدت آسیب‌های بافتی خصوصاً ادم و هایپرپلازی و پرخونی یا گریزی شدن انتهای تیغه‌های ثانویه در تصاویر (ج و ح) ناشی از حضور غلظت بالای مواد آلاینده بیشتر است. RBC: گلبول قرمز، PL: لاملائی اولیه، SL: لاملائی ثانویه، EC: سلول‌های اپیتلیال، CVS: سیاهرگ مرکزی، Hp: هایپرپلازی، He: پرخونی، SSL: کوتاه شدن تیغه‌های ثانویه، ed: ادم.

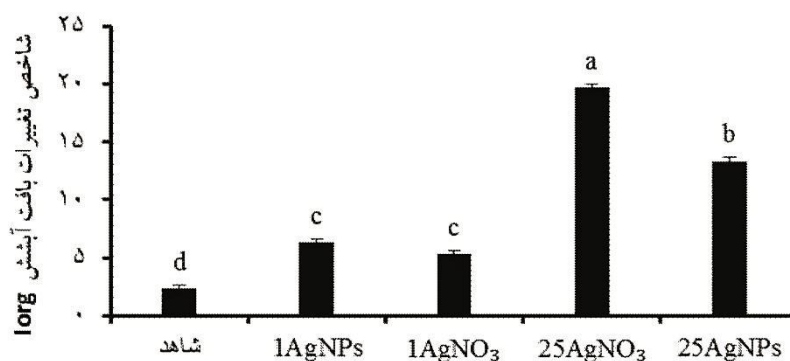
در توصیف نیمه کمی آسیب‌های آبششی نیز مشخص گردید که اگرچه تغییرات آسیب‌شناسی بافت آبشش در همه تیمارها وجود دارد، شدت آن از گروه شاهد تا غلظت بالای نانوذرات نقره و نیترات نقره افزایش می‌یابد. هایپرپلازی در تمام گروه‌های آزمایشی مشاهده شد اما شدت آن در گروه شاهد ضعیف، در گروه‌های 1AgNO_3 و 1AgNPs متوسط و در گروه‌های 25AgNO_3 و 25AgNPs خیلی شدید ارزیابی شد. شدت پرخونی در ماهیان مرتبط با گروه 1AgNO_3 ضعیف، در تیمارهای 1AgNPs و 25AgNO_3 متوسط و در تیمار 25AgNPs شدید بود. کوتاه شدن تیغه‌های ثانویه فقط در ماهیان گروه 25AgNO_3 به صورت خیلی شدید مشاهده شد. از طرف دیگر، عارضه ادم فقط در ماهیان تیمار 25AgNO_3 و 25AgNPs مشاهده شد و شدت آن به ترتیب متوسط و شدید ارزیابی شد (جدول ۲).

جدول ۲- درجه بندی کمی آسیب‌های آبشش عروس ماهی زاینده رود (*P. esfahani*) پس از مواجه با نانوذرات نقره و نیترات نقره

تیمار					آسیب
25AgNPs	25AgNO_3	1AgNPs	1AgNO_3	شاهد	
++++	++++	++	++	+	هایپرپلازی
+++	++	++	+	-	پرخونی
++	+++	-	-	-	ادم
-	+++	-	-	-	کوتاه شدن تیغه‌های ثانویه

ارزش نمره: خیلی ضعیف ۰، ضعیف +، متوسط ++، شدید +++، خیلی شدید ++++.

مقایسه کمی تأثیر نانوذرات نقره و نیترات نقره بر بافت آبشش عروس ماهی زاینده رود در گروه‌های مختلف با استفاده از محاسبه شاخص اندام (I_{org})، صورت گرفت. این شاخص در گروه شاهد معادل $2/33$ بود که به طور معنی‌داری کمتر از سایر تیمارها ارزیابی شد ($p < 0/05$). در ماهیان متعلق به گروه‌های 1AgNO_3 و 1AgNPs شاخص اندام به ترتیب به حدود $5/33$ و $6/33$ افزایش یافت که به طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد بود. شدت تغییرات بر اساس شاخص اندام در گروه 25AgNPs معادل $13/33$ و تیمار 25AgNO_3 معادل $19/66$ محاسبه شد که بیانگر افزایش معنی‌دار شاخص در این گروه‌ها در مقایسه با غلظت‌های پایین آلاینده‌ها بود ($p < 0/05$). از نظر کمی، بالاترین مقدار شاخص، مرتبط با شدت آسیب‌ها، به ترتیب در تیمار 25AgNO_3 و سپس 25AgNPs دیده شد، که در مقایسه آماری، شدت آسیب در تیمار نیترات نقره به طرز چشمگیری از نانوذره نقره بالاتر بود ($p < 0/05$) (شکل ۲).



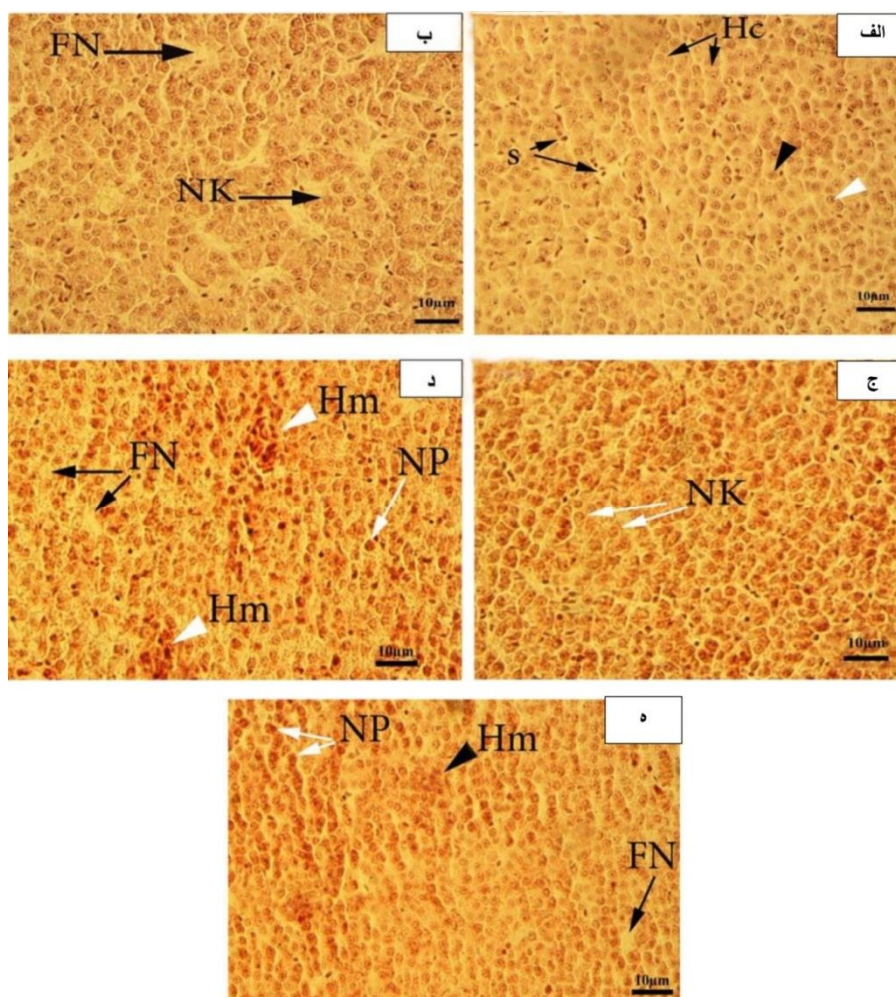
گروه‌های آزمایشی

شکل ۲- میانگین (\pm خطای استاندارد) میزان شاخص تغییرات I_{org} بافت آبشش در عروس‌ماهی زاینده‌رود (P. *esfahani*) در گروه‌های مختلف آزمایشی. میانگین‌های دارای حرف مشابه، فاقد اختلاف معنی‌دار هستند ($p > 0.05$).

تغییرات آسیب‌شناسی بافت کبد: تغییرات آسیب‌شناسی بافتی کبد عروس‌ماهی زاینده‌رود در گروه‌های مختلف آزمایشی در شکل (۳) ارایه شده است. در گروه شاهد، فضاهای سینوزوئیدی و سلول‌های هپاتوسیت در تصویر دیده می‌شود. تیمار ماهیان با نیترات نقره در غلظت یک میکروگرم در لیتر منجر به بروز عوارضی هرچند خفیف نظیر نکروز کانونی و کاربولیز هسته‌ای شد. کبد ماهیان تیمار شده با 1AgNPs، عوارضی نظیر کاربولیز هسته‌ای را نشان داد. با افزایش غلظت نیترات نقره در آب، کبد با آسیب بیشتری مواجه شد به طوری که ماهیان تیمار 25AgNO₃، پیکنوزیس هسته‌ای، پرخونی و نکروز کانونی را با فراوانی نسبتاً بالایی نشان دادند. آسیب‌های بافت کبد در ماهیان تیمار 25AgNPs نسبتاً مشابه با غلظت بالای نیترات نقره بود و عوارضی همچون پرخونی، نکروز کانونی و پیکنوزیس هسته‌ای را نشان داد (شکل ۳).

در مقایسه نیمه کمی تغییرات آسیب‌شناسی بافت کبد، عوارض با شدت متفاوت در ماهیان نمونه‌برداری شده از تمامی تیمارهای آزمایشی به جز گروه شاهد مشاهده شد (جدول ۳). در بافت سالم کبد ماهیان گروه شاهد، سلول‌های کبدی و با هسته سلولی واضح قابل تشخیص بود. نکروز کانونی عارضه‌ای شایع در ماهیان تیمارهای مختلف آزمایشی به جز گروه شاهد بود با این وجود شدت آن در ماهیان قرارگرفته در معرض غلظت 25 μ g/l از نیترات نقره بسیار شدید و در غلظت 25AgNPs و 1AgNO₃ متوسط ارزیابی شد. پرخونی در کبد در هر دو گروه ماهیان در معرض قرار گرفته با غلظت‌های بالای نانو ذرات و نیترات نقره مشاهده شد، اما شدت عارضه در گروه 25AgNO₃ خیلی شدید و در گروه 25AgNPs شدید برآورد شد. پیکنوزیس هسته‌ای عارضه‌ای خاص غلظت‌های بالای

نیترات نقره یا نانوذرات نقره بود و در غلظت‌های اندک این دو ترکیب یا گروه شاهد مشاهده نشد (جدول ۳ و شکل ۳).



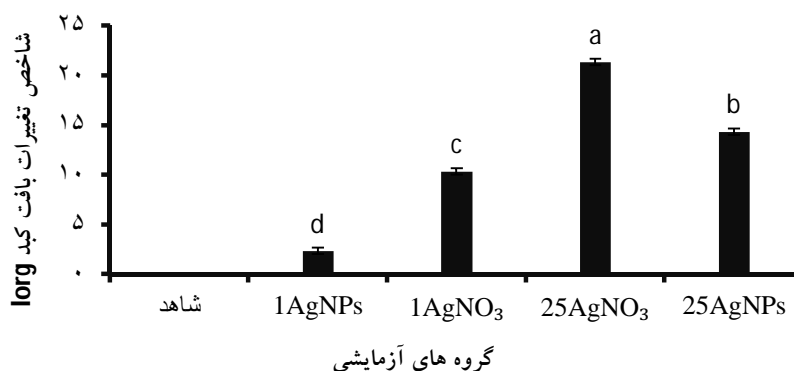
شکل ۳- انواع تغییرات بافتی مشاهده شده در کبد عروس‌ماهی زاینده‌رود پس از مواجهه با نانوذرات نقره و نیترات نقره، بزرگنمایی $\times 400$. شکل‌های الف تا ه به ترتیب مرتبط با بافت کبد ماهیان گروه شاهد، $1AgNO_3$ ، $1AgNPs$ ، $25AgNO_3$ و $25AgNPs$ است. عوارض بافتی در تمامی گروه‌های آزمایشی حتی گروه شاهد مشاهده می‌شود، با این وجود، شدت آسیب‌های بافتی خصوصاً پیکنوزیس هسته‌ای و نکروز کانونی در تصاویر (د و ه) ناشی از حضور غلظت بالای مواد آلاینده، خصوصاً نیترات نقره بیشتر است. نکروز کانونی (FN)، کاربولیز هسته‌ای (NK)، پیکنوزیس هسته‌ای (NP)، پرخونی (Hm)، سلول کبدی (Hc).

جدول ۳- درجه‌بندی کمی آسیب‌های کبد عروس‌ماهی زاینده‌رود (*P. esfahani*) پس از مواجهه با نانوذرات نقره و نیترات نقره

تیمار					آسیب
25AgNPs	25AgNO ₃	1AgNPs	1AgNO ₃	شاهد	
+++	++++	-	-	-	پرخونی
++	++++	-	++	-	نکروز کانونی
++	++	-	-	-	پیکنوزیس هسته‌ای
-	-	+	++	-	کاربولیز هسته‌ای

ارزش نمره: خیلی ضعیف ۰، ضعیف +، متوسط ++، شدید +++، خیلی شدید +++++.

شدت آسیب‌ها بر مبنای شاخص اندام، کمی‌سازی شد. مقایسه آماری شدت تغییرات بافتی بر اساس شاخص اندام بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار در بین تیمارهای مختلف بود ($p < 0.05$). بیشترین شدت شاخص اندام در تیمار 25AgNO₃ با مقداری در حدود ۲۱/۳۳ برآورد گردید که به‌طور معنی‌داری بالاتر از مقادیر شاخص اندام در سایر تیمارها و در نتیجه نشان دهنده آسیب شدید بافتی به کبد ماهیان تحت تأثیر مقادیر بالای نیترات نقره محلول در آب بود. مقدار شاخص اندام در تیمار 25AgNPs معادل ۱۴ سنجش شد که پس از ماهیان قرار گرفته در معرض غلظت ۲۵ میکروگرم در لیتر نیترات نقره، از سایر گروه‌های آزمایشی بالاتر بود ($p < 0.05$). شاخص اندام بافت کبد در ماهیان متعلق به تیمارهای 1AgNO₃ و 1AgNPs در سطح نسبتاً نازلی و به‌ترتیب در مقادیر حدود ۱۲ و ۳ قرار داشت که به‌طور معنی‌داری از مقادیر این شاخص در تیمار شاهد بالاتر بود ($p < 0.05$). در مجموع با مقایسه نتایج آسیب بافتی کبد در غلظت‌های ۱ و ۲۵ میکروگرم در لیتر از نیترات یا نانوذره نقره، می‌توان نتیجه گرفت نیترات نقره همواره آسیب بافتی شدیدتری را در بافت کبد در مقایسه با نانوذره نقره ایجاد کرده است (شکل‌های ۳ و ۴) (جدول ۳).



شکل ۴- میانگین (\pm خطای استاندارد) میزان شاخص تغییرات I_{org} بافت کبد در عروس‌ماهی زاینده‌رود (*P. esfahani*) در گروه‌های مختلف آزمایشی. میانگین‌های دارای حرف مشابه، فاقد اختلاف معنی‌دار هستند.

بحث و نتیجه‌گیری

تغییرات در اندام‌های حیاتی، به‌عنوان یک نشانگر زیستی ریخت‌سنجی در ارزیابی آلودگی‌های محیطی به‌کار می‌رود. نانوذرات نقره به‌دلیل اندازه بسیار کوچک و نسبت سطح به حجم زیاد واکنش‌پذیری بالایی با غشای سلول دارند و به‌عنوان یک عامل تنش‌زا عمل می‌کنند (Scown *et al.*, 2010). پاسخ به تنش در ماهیان توسط سیستم پیچیده عصبی- درون ریز کنترل می‌شود و در نهایت می‌تواند منجر به مرگ آبی شود (Mayer *et al.*, 2003).

همان‌گونه که بیان شد، پس از قرار گرفتن ماهی در معرض نانوذره یا نیترات نقره، اختلالات شدیدی در سلول‌های اپیتلیوم بافت آبشش مشاهده شد، اگرچه این اختلالات تا حدودی در گروه شاهد نیز وجود داشت، که علت آن را می‌توان در صید ماهیان از محیط طبیعی و احتمالاً حضور برخی مواد آلاینده در محیط آب رودخانه محل زندگی آن‌ها جستجو کرد. در این خصوص عروجعلی و همکاران (Orojali *et al.*, 2013)، حضور علائم اولیه آسیب آبششی را در ماهیان استرلیاد (*Acipenser ruthenus*)، در گروه شاهد گزارش کردند و بیان نمودند که حضور این عوارض احتمالاً بیانگر در معرض قرارگیری ماهی در مراحل قبلی آزمایش با برخی مواد آلاینده آب باشد. حضور ترکیبات آلاینده مختلف در رودخانه زاینده رود، حتی در مناطق بالادست گزارش شده است، از آن جمله، درافشان و همکاران (Dorafshan *et al.*, 2015) غلظت‌های نسبتاً بالای کادمیوم و کروم را در ماهیان مناطق بالادست رودخانه زاینده‌رود گزارش کردند. همچنین، گیلان‌نژاد و همکاران (Gilannejad *et al.*, 2016)، به حضور عوامل آلاینده سیستم اندوکرینی در آب رودخانه زاینده‌رود پرداختند. لذا به نظر می‌رسد وجود آسیب‌های بافتی آبشش حتی در گروه شاهد به‌دلیل در معرض قرارگیری ماهی در مراحل پیشین آزمایش با مواد آلاینده در محیط طبیعی زیست آن‌ها باشد. آسیب‌های بافتی آبشش می‌تواند بر فعالیت حیاتی سلول‌های این بافت تأثیرگذار باشد. این تغییرات همچنین ممکن است نقش دفاعی را علیه آلودگی ایفا کنند (Khoshnood *et al.*, 2011). به‌طور کلی، یکی از اثرات مضر مواد شیمیایی بر آبشش ماهیان اختلال در انتشار گازها و تبادل یون‌ها است. در این رابطه افزایش تعداد سلول‌های آبشش (هایپرپلازی) بر اثر تماس با مواد شیمیایی می‌تواند سبب بهبود عملکرد آبشش برای مقابله با این مواد شود. تورم و هایپرپلازی اپیتلیوم آبشش می‌تواند منجر به افزایش فاصله انتشار بین جریان آب و خون شده و در نتیجه کاهش احتمال ورود فلز سنگین به خون شود. همچنین تغییرات گسترده در اپیتلیوم تیغه‌های ثانویه ممکن است ضخامت اپیتلیوم را افزایش داده و در نهایت منجر به کاهش نرخ ورود نقره به گردش خون شود و یا آن را با تأخیر مواجه کند (Orojali *et al.*, 2013). بنابراین به‌نظر می‌رسد تغییرات آسیب‌شناسی بافتی ایجاد شده در آبشش عروس‌ماهی زاینده رود پس از مواجهه با نانوذرات و نیترات نقره نوعی پاسخ فیزیولوژیک

است که جاندار برای ممانعت از ورود این مواد به بدن و جلوگیری از آسیب‌های وارده به بدن خود ایجاد کرده است.

در این تحقیق غلظت بالای نیترات نقره سبب ایجاد بیشترین آسیب در بافت آبشش شد. گرچه غلظت بالای نانوذرات نقره نیز سبب ایجاد ناهنجاری‌هایی نسبت به گروه شاهد شد. نقره در ماهیان آب شیرین از جمله مواد دارای پتانسیل سمی برای بافت آبشش است که سبب اختلال در عملکرد پمپ Na^+/K^+ می‌شود (Morgan *et al.*, 2004). پاسخ مورفولوژیکی آبشش پس از مواجهه با نقره در ماهیان آب شیرین به‌خوبی شناخته شده نیست، اما انتظار می‌رود مانند سایر مواد سمی سبب به هم ریختن تعادل و تنظیمات یونی شود (Griffitt *et al.*, 2007). نتایج مشابهی روی سایر گونه‌های ماهیان منتشر شده است، اگرچه شدت و نوع این تغییرات می‌تواند نسبت به گونه ماهی، غلظت ماده و طول دوره در معرض‌گذاری متفاوت باشد (Lee *et al.*, 2012). به‌عنوان مثال، آنالیزهای بافت‌شناسی در ماهی کپور معمولی نشان داد که نانوذرات نقره اثرات مخربی بر بافت آبشش داشته می‌تواند سبب دوشاخگی رشته‌های آبششی، افزایش در اندازه و تعداد سلول‌های موکوسی و هایپرپلازی اپیتلیوم لاملا شود. در ماهی سوف (*Perca fluviatilis*) نیز نانوذرات نقره سبب اختلال در عملکرد آبشش برای گرفتن اکسیژن در شرایط کمبود اکسیژن در آب شد. به‌نظر می‌رسد این مواد بر سطح آبشش اثر گذاشته که در نهایت منجر به اختلال در تبادل گازها می‌شود (Bilberg *et al.*, 2010). در تحقیق دیگری که در سال ۲۰۱۳ انجام گرفت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به مدت ۱۰ روز در تماس با غلظت ۲۰ و ۱۰۰ میکروگرم در لیتر از نانوذرات مس و یون مس (حاصل از سولفات مس) قرار گرفت. نتایج بافت‌شناسی بیانگر بروز هایپرپلازی، افزایش تعداد سلول و نکروز در بافت آبشش بود. تغییرات آسیب‌شناسی بافتی نانوذرات مس با تغییر نسبت به یون مس ظاهر می‌شود و شدت آن در تیمارهای یون مس بیشتر از نانوذرات مس بود (Al-Bairuty *et al.*, 2013).

کبد، اندامی مهم برای تنظیم سوخت و ساز و فعالیت سم‌زدایی در بدن ماهی است که نسبت به حضور آلاینده‌ها بسیار حساس است. تحقیقات متعددی به بررسی پاسخ آسیب‌شناسی بافت کبد پس از مواجهه با مواد آلاینده پرداخته‌است. به‌عنوان مثال، بررسی غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر فلز سرب بر بافت کبد ماهی کلمه (*Rutilus caspius*) نشان داد که فلز سرب باعث تغییرات آسیب‌شناسی بافتی در کبد از جمله واکوئل شدن، پرخونی، پیکنوزیس هسته‌ای، نکروز کانونی و تجمع هموسیدرین در سلول‌های ملانوماکروفاژها شد (Mohammadzadeh *et al.*, 2011). هر دو ترکیب نانوذره (CuNPs) و سولفات مس ($CuSO_4$) تأثیر مشابهی بر بافت کبد در قزل‌آلای رنگین‌کمان را پس از چهار روز مواجهه نشان دادند که شامل پیکنوزیس هسته‌ای، واکوئل شدن سیتوپلاسم، نکروز کانونی و همچنین افزایش ملانوماکروفاژها بود (Al-Bairuty *et al.*, 2013). پاسخ‌های بافتی کبد در

ماهی (*Hoplias malabaricus*) که در معرض جیوه و متیل جیوه قرار گرفته بود شامل نکرز کانونی، کاربویلیز هسته‌ای و آتروفی هپاتوسیت‌ها بود (Mela et al., 2007).

در تحقیق حاضر نیز هر دو ترکیب نانوذره نقره و نیترات نقره منجر به بروز آسیب‌های بافتی در کبد عروس‌ماهی زاینده‌رود شد. شدت آسیب‌ها با افزایش غلظت این مواد در آب افزایش یافت با این وجود به نظر می‌رسد که اثرگذاری منفی نیترات نقره بر بافت کبد در غلظت‌های یکسان مشابه نظیر آنچه در بافت آبشش مشاهده شد، بیش از نانوذره نقره است. به نظر می‌رسد واکنش‌پذیری زیستی بیشتر یون نقره نسبت به نانوذرات به دلیل نسبت سطح به حجم بالاتر در بروز این پدیده مؤثر باشد. اگرچه عوامل متعددی نظیر نوع گونه، مدت زمان در معرض‌گذاری و قطر ذرات نانو می‌تواند در شدت و نوع پاسخ بافتی بسیار تأثیرگذار باشد (Scown et al., 2010). به‌طور کلی بروز این ضایعات بافتی به دلیل تجمع ترکیبات سمی در داخل سلول‌های کبدی است چرا که کبد به‌عنوان یکی از جایگاه‌های سم‌زدایی در بدن عمل می‌کند. علاوه بر این هجوم ماکروفاژها برای از بین بردن ترکیبات خارجی می‌تواند سبب ایجاد اتساع و تورم فضای بین هپاتوسیت‌ها شود. در مجموع رخداد چنین تغییراتی در ساختار معمول سلول‌های کبدی می‌تواند فعالیت طبیعی کبد در متابولیسم نمودن مواد غذایی و تولید آنزیم‌ها و ترکیبات ضروری بدن مختل سازد.

به‌طور کلی با توجه به تغییرات ایجاد شده در بافت‌های آبشش و کبد عروس‌ماهی زاینده‌رود، به نظر می‌رسد هر دو ترکیب نانوذره و نیترات نقره حتی در غلظت‌های اندک حدود ۱ میکروگرم در لیتر در مدت ۱۰ روز قادر به ایجاد تغییرات آسیب‌شناسی نسبتاً وسیع بر بافت‌های حیاتی این ماهی هستند. با این وجود، در تمامی غلظت‌های مورد مطالعه، شدت بروز آسیب‌های بافتی در گروه تیمار شده با نیترات نقره بیشتر بود که احتمالاً بیانگر واکنش‌پذیری بیشتر یون نقره در مقایسه با نانوذره نقره در بافت‌های مورد مطالعه است. بروز چنین تغییراتی در دراز مدت شاید بتواند با تأثیر بر عملکردهای فیزیولوژیک آبی، منجر به بروز پاسخ‌های تنشی شدید و در نتیجه کاهش رشد و مرگ آبی شود. پیشنهاد می‌شود، تا در مطالعات آتی میزان تجمع نقره همراه مطالعات بافت‌شناسی، خون‌شناسی و ایمونولوژیکی تلفیق شده تا اطلاعات تکمیلی در این خصوص فراهم گردد.

تشکر و قدردانی

هزینه‌های انجام این تحقیق از محل پژوهانه شماره ۵۰۲/۹۱/۲۵۲۴۸ پرداختی از سوی معاونت پژوهشی دانشگاه صنعتی اصفهان به دکتر فاطمه‌پیکان حیرتی و نیز حمایت مالی ستاد فناوری نانو ریاست جمهوری در قالب پایان‌نامه دانشجویی مقطع کارشناسی ارشد رشته بوم‌شناسی آبیان شیلاتی تأمین شده است.

منابع

- 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., Jain J., Rajwade J.M., Paknikar K.M. 2008. Cellular responses induced by silver nanoparticles: in vitro studies. *Toxicology Letter*, 179, 93-100.
- Bernet D., Schmidt H., Neier W., Burkhardt Hom P., Wahli T. 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Disease*, 22: 25-34.
- Bilberg K., Malte H., Wang T., Baatrup E. 2010. Silver nanoparticles and silver nitrate cause respiratory stress in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). *Aquatic Toxicology*, 96: 159-165.
- Dorafshan S., Shojaee N., Mirghaffari N. 2015. Heavy metals (Cd and Cr) concentration in different tissues (muscle, gill, kidney and intestine) of Zayandehrood chub, *Petroleuciscus esfahani*. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 24: 43-52. (In Persian).
- Genten F., Terwinghe E., Danguy A. 2009. *Atlas of Fish Histology*, CRC Press. 224 P.
- Gilannejad N., Dorafshan S., Heyrati F.P., Soofiani N.M., Asadollah S., Martos-Sitcha J.A., Prat F., Yúfera M., Martínez-Rodríguez G. 2016. Vitellogenin expression in wild cyprinid *Petroleuciscus esfahani* as a biomarker of endocrine disruption along the Zayandeh Roud River, Iran. *Chemosphere*, 144: 1342-1350.
- Griffitt R.J., Hyndman K., Denslow N.D., Barber D.S. 2009. Comparison of molecular and histological changes in zebrafish gills exposed to metallic nanoparticles. *Toxicological Science*, 107: 404-415.
- Griffitt R.L., Weil R., Hyndman K.A., Denslow N.D., Powers K., Taylor D., Barber D.S. 2007. Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in zebrafish (*Dania rerio*). *Environmental Science and Technology*, 41(23): 8178-8186.
- Grosell M., De Boeck G., Johannsson O., Wood C.M. 1999. The effects of silver on intestinal ion and acid-base regulation in the marine teleost fish, *Parophrys vetulus*. *Comparive Biochemistry and Physiology*, 124(3): 259-270.
- Hibiya T. 1982. *An atlas of fish histology: normal and pathological features*. Gustav Fischer Verlag, 147 P.
- Johari S.A., Kalbassi M.R., Yu I.J., Lee J.H. 2014. Chronic effect of waterborne silver nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): histopathology and bioaccumulation. *Comparative Clinical Pathology*, 24 (5): 995-1007.
- Keivany Y., Nasri M., Abbasi K., Abdoli A. 2015. *Atlas of Inland Water Fishes of Iran*. Department of Environment, Tehran, Iran. 176 P. (In Persian).

- Khoshnood Z., Khodabandeh S., Shahryari Moghaddam M., Mosafer Khorjestan S. 2011. Histopathological and pathomorphological effects of mercuric chloride on the gills of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) fry. International Journal of Natural Resources and Marine Science 1(1): 23-32.
- Lee B., Duong C.N., Cho J., Lee J., Kim K., Seo Y., Kim P., Choi K., Yoon J. 2012. Toxicity of citrate-capped silver nanoparticles in common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Biomedicine and Biotechnology, 262670: 1-14.
- Linhua H., Zhenyu W., Baosan X. 2009. Effect of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Environmental Science, 21: 1459-1466.
- Masciangioli T., Zhang W. 2003. Environmental technologies at the nanoscale. Environmental Science and Technology, 37: 102-108.
- Mayer G.D., Leach A., Kling P., Olsson P.E., Hogstrand C. 2003. Activation of the rainbow trout metallothionein-a promoter by silver and zinc. Biochemistry and Molecular Biology, 134: 181-188.
- Mela M., Randi Ventura D.F., Carvalho C.E.V., Pelletier E., Oliveira Ribeiro C.A. 2007. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish (*Hoplias malabaricus*). Ecotoxicology and Environmental Safety, 68(3): 426-435.
- Mohammadzadeh P., Jamili Sh., Mashinchian A., Matinfar A., Rostami M. 2011. Study on the lead effect on liver and gill tissues of *Rutilus rutilus caspius*. Animal Environment, 3(1): 59-68. (In Persian).
- Morgan T.P., Grosell M., Playle R.C., Wood C.M. 2004. The time course of silver accumulation in rainbow trout during static exposure to silver nitrate: Physiological regulation or an artifact of the exposure conditions?. Aquatic Toxicology, 66: 55-72.
- Mumford S.L. 2004. Histology for Finfish. In: US Fish & Wildlife Service (Eds.). National Wild Health Fish Survey, Laboratory Procedures Manual, Washington D.C., pp: 4-10.
- Orojali M., Paykan Heyrati F., Dorafshan S., Mahboobi Soofianai N. 2013. The sub-lethal effects of Cadmium on some gill histopathology in the cultivated Sterlet (*Acipenser ruthenus*). Iranian Scientific Fisheries Journal, 22: 71-82. (In Persian).
- Perelshtein I., Applerot G., Perkas N., Guibert G., Mikhailov S., Gedanken A. 2008. Sonochemical coating of silver nanoparticles on textile fabrics (nylon, polyester and cotton) and their antibacterial activity. Nanotechnology, 19: 245705.
- Radojevic M., Baskin V.N. 2006. Practical Environmental Analysis. Royal Society of Chemistry, UK, London. 480 P.

- Raki M. 2014. Histopathological and hematological effects of waterborne silver nanoparticles and silver nitrate on Zayandehrud chub (*Petroleuciscus esfahani*). MSc. Thesis, Isfahan University of Technology, Isfahan. (In Persian).
- Razmara P., Dorafshan S., Paykan Heyrati F., Talebi M., Ranjbar M. 2013. Effect of water-born colloidal silver nanoparticles and silver nitrate on gill histopathology of Rainbow catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*. Journal of Aquatic Ecology, 3(3): 10-18 (In Persian).
- Razmara P., Paykan Heyrati F., Dorafshan S. 2014. Effect of silver nanoparticles on some hematological indices of Rainbow catfish (*Pangasius hypophthalmus*). Journal of Cell and Tissue, 5(3): 263-272. (In Persian).
- Riba I., Blasco J., Jimenez-Tenorio N., Gonzalez de Canales M.L., Delvas A. 2005. Heavy metal bioavailability and effects: II. Histopathology-bioaccumulation relationships caused by mining activities in the Gulf of Cadiz (SW, Spain). Chemosphere, 58: 671-682.
- Salari Joo F.L., Kalbassi M.R., Yu I.J., Lee J.H., Johari S.A. 2013. Bioaccumulation of silver nanoparticles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Influence of concentration and salinity. Aquatic Toxicology, 140: 398-406.
- Schrand A.M., Braydich-Stolle L.K., Schlager J.J., Dai L., Hussain S.M. 2008. Can silver nanoparticles be useful as potential biological labels?. Nanotechnology, 19(235104): 1-14.
- Scown T.M., Santos E.M., Johnston B.D., Gaiser B., Baalousha M., Mitov S., Lead J.R., Stone V., Fernandes T.F., Jepson M., Aerle R.V., Tyler C.R. 2010. Effects of aqueous exposure to silver nanoparticles of different sizes in rainbow trout. Toxicological Science, 115 (2): 521-534.
- Sun L., Singh A.K., Vig K., Pillai S.R., Singh S.R. 2008. Silver nanoparticles inhibit replication of respiratory syncytial virus. Journal of Biomedical Nanotechnology, 4: 149-158.

