



شاخص‌های خون‌شناسی ماهی پرت

(Cichlasoma synspilum ♀ × *Cichlasoma citrinellum* ♂)

تغذیه‌شده با مکمل غذایی آستاگزانتین و نمک صفراوی در مواجهه با نانوذرات نقره

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

گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ۸۳۱۱۱-۸۴۱۵۶ ایران

نوع مقاله:	چکیده
پژوهشی	هدف از این مطالعه بهبود شاخص‌های خون‌شناسی ماهی پرت خونی ♀ × <i>Cichlasoma synspilum</i> (<i>Cichlasoma citrinellum</i> ♂) در مواجهه با تنش نانوذرات نقره بود. تعداد ۲۰۰ قطعه ماهی پرت (Parrot Fish) (میانگین وزنی ۲۵/۵ ± ۶/۲ گرم) در سه تیمار، شاهد (جیره پایه)، جیره غنی شده با آستاگزانتین و جیره غنی شده با آستاگزانتین و نمک صفراوی با سه تکرار به مدت ۹۰ روز تغذیه شدند و سپس به مدت پنج روز در معرض ۲۵۰ µg/L نانوذرات نقره محلول در آب قرار گرفتند. خون‌گیری در زمان قبل و بعد از تنش نانونقره صورت گرفت. در پایان دوره تغذیه، هیچ‌یک از شاخص‌های خون‌شناسی به جز تعداد گلبول‌های سفید که در اثر تغذیه با جیره‌های حاوی آستاگزانتین به‌تنهایی یا در تلفیق با نمک صفراوی، به‌طور معناداری افزایش‌یافته بود ($P < 0.05$)، تحت تأثیر تیمارهای تغذیه‌ای قرار نگرفتند ($P > 0.05$). پس از تنش نانوذرات نقره میزان هماتوکریت و هموگلوبین در همه تیمارها و تعداد گلبول‌های سفید تنها در تیمار شاهد در مقایسه با قبل از تنش به‌طور معناداری کاهش یافت ($P < 0.05$). نتایج نشان داد استفاده از آستاگزانتین و نمک صفراوی می‌تواند اثرات مخرب نانوذرات نقره محلول در آب را تعدیل نماید.
کلمات کلیدی:	
آستاگزانتین	
خون‌شناسی	
ماهی پرت	
نانوذرات نقره	
نمک صفراوی	
تاریخچه مقاله:	
دریافت: ۹۷/۰۱/۲۸	
اصلاح: ۹۷/۰۲/۱۳	
پذیرش: ۹۸/۰۲/۱۳	

مقدمه

فناوری نانو در معنای ساده استفاده از مواد و ساختارهایی در مقیاس نانو (حداقل با قطر ۱ تا ۱۰۰ نانومتر) است. توانایی دست‌کاری ماده در چنین مقیاس اتمی و مولکولی کوچکی، سبب کاربرد وسیع این علم در شیمی، زیست‌شناسی، فیزیک، داروسازی و علوم مهندسی شده است (Masciangioli and Zhang, 2003). افزایش تولیدات و محصولات نانو به‌ناچار منجر به افزایش فاضلاب نانو مواد می‌شود. در نهایت این نانوذرات وارد واکنش با موجودات زنده و عوامل غیرزنده می‌شوند، اما اثرات مضر و تخریب‌کننده آن‌ها کاملاً شناخته‌نشده است و این عدم شناخت کافی منجر به ایجاد نگرانی برای سلامت انسان و محیط‌زیست شده است (Scown et al., 2010). از نانو محصولات تولیدشده امروزی می‌توان به دی‌اکسید تیتانیوم، نقره، آهن، اکسید روی و همچنین نانولوله‌های کربنی و گرافن اشاره کرد. نانوذرات نقره به دلیل خاصیت ضد میکروبی کاربردهای گسترده‌ای داشته و در تولید محصولات بهداشتی، پودر ماشین لباس‌شویی، فیلتر تصفیه آب، پارچه،

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: Aminarcher@yahoo.com

حسگرها، داروسازی از نانوذرات نقره استفاده شده است (Razmara *et al.*, 2014). مطالعات مختلف نشان داد که نانوذرات نقره می‌تواند منجر به افزایش پراکسیدایون چربی (Arora *et al.*, 2008) ایجاد اکسیژن واکنش‌پذیر، کاهش عمل کرد میتوکندریایی (Carlson *et al.*, 2008)، مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول و تنش اکسیداتیو شود (Hussain *et al.*, 2008). سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی سلولی می‌تواند با خنثی کردن رادیکال‌های آزاد، از طریق اتصال به فلزات سنگین و تغییر در شکل زیستی آن در دفع فلزات سنگین اضافی از سلول‌ها عمل نماید (Xu *et al.*, 2003). از این‌رو تغییر ظرفیت آنتی‌اکسیدان تام سلولی می‌تواند در ایجاد تعادل و خنثی نمودن رادیکال‌های آزاد و حفاظت از سلول مؤثر باشد. 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 تبدیل شده است (Banaee *et al.*, 2015). کاروتنوئیدها، آنتی‌اکسیدان‌های زیستی قوی هستند که با جذب انرژی تحریکی اکسیژن منفرد، باعث تخریب مولکول خود می‌شوند اما از تخریب مولکولی سایر بافت‌ها جلوگیری می‌کنند (Beutner *et al.*, 2001). همچنین کاروتنوئیدها از ایجاد واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکال‌های آزاد که با تخریب اسیدهای چرب غیراشباع شروع می‌شود و در نهایت باعث تخریب غشاهای لیپیدی می‌گردند، جلوگیری می‌نماید. آستاگزانتین کاروتنوئیدی است که در حفاظت از فسفولیپیدهای غشایی و لیپیدهای دیگر در برابر اکسیداسیون مؤثر است. طی مطالعات انجام‌شده، توان آنتی‌اکسیدانی آستاگزانتین حدود ۵۵۰ برابر ویتامین E و ۱۰ برابر بتاکاروتن است. به همین دلیل آن را سوپر ویتامین E می‌نامند (Naguib, 2000). آستاگزانتین یک مکمل غذایی با پایه چربی و وزن مولکولی ۵۹۶/۸ دالتون و فرمول مولکولی $C_{40}H_{52}O$ ، در آب غیر محلول و چربی‌دوست است (Yonouchi *et al.*, 1995). حیوانات توانایی تولید آستاگزانتین را ندارند و این نیاز خود را از طریق جیره تأمین می‌کنند. میزان جذب کاروتنوئید در میان آبزیان متفاوت است و بستگی به نوع گونه، طول دوره تغذیه، غلظت کاروتنوئید، وزن و سن ماهی مورد مطالعه، دارد؛ به‌عنوان مثال قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با وزن متوسط ۴۰۰ گرم تنها ۴٪ از کاروتنوئید موجود در جیره را جذب می‌کند (Torrissen *et al.*, 1990). با توجه به قیمت بالای آستاگزانتین اگر بتوان میزان جذب آن را افزایش داد، علاوه بر میزان افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی در بدن ماهی، هزینه‌های تأمین جیره نیز کاهش می‌یابد. نمک صفاوی می‌تواند فرآیند امولسیون‌شدگی چربی‌ها را تسهیل نماید و میزان جذب ترکیبات با پایه چربی را در روده کوچک افزایش دهد (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. نمک صفاوی می‌تواند این فرآیند را افزایش دهد و تسریع نماید (Zhou *et al.*, 2002). یکی از این نمک‌های صفاوی، ترکیب Sodium Taurocholate با فرمول شیمیایی $C_{26}H_{44}NNaO_7S$ است که به هضم و جذب چربی‌ها کمک می‌کند و منجر به جذب بیشتر و سریع‌تر آستاگزانتین می‌شود. خون شاخص مفیدی در تعیین سلامتی یک موجود است. شاخص‌های خون‌شناسی در تشخیص وضعیت عملکردی جانورانی که در تماس با مواد سمی بوده‌اند، بسیار مهم است. به دلیل اینکه سیستم گردش خون و محیط خارجی با یکدیگر در ارتباط هستند، شاخص‌های خون‌شناسی برای تشخیص اثرات مواد تنش‌زا و سمی استفاده می‌شود. فاکتورهای سلولی در خون (تعداد گلبول‌های قرمز و سفید) شاخص‌های مفیدی در واکنش‌های حاصل از تنش خارجی هستند که در نهایت سبب تغییرات مورفولوژیکی و توزیع سلولی در خون می‌شوند (Srivastava *et al.*, 1995). در مطالعات Rehulka (۲۰۰۰) تأثیر مقایسه استفاده از جیره حاوی آستاگزانتین و جلبک هماتوکوکوس مورد بررسی قرار گرفت. فاکتورهای مربوط به رشد در جیره حاوی جلبک هماتوکوکوس در مقایسه با آستاگزانتین، به‌صورت معناداری بیشتر بود. تیمار شاهد در مقایسه با دو تیمار دیگر، بدترین علائم را در شاخص‌های خون‌شناسی نشان داد. این تیمار بالاترین میزان گلوکز، تری‌گلیسرید، کلسترول، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوکاتون پر اکسیداز را داشت و میزان این فاکتورها با افزایش میزان آستاگزانتین و جلبک هماتوکوکوس در جیره کاهش یافته بود. در مطالعه Davis (۲۰۱۰) گزارش شده است مواد تنش‌آور محیطی می‌تواند سبب ایجاد پاسخ‌هایی در پروفیل گلبول‌های سفید شود. تاکنون اطلاعات اندکی در مورد اثر مکمل آستاگزانتین و نمک صفاوی و نانوذرات بر روی خون ماهی گزارش شده است. از جمله آن می‌توان به مطالعات انجام‌شده بر تیلاپیا موزامبیک (*Oreochromis mossambicus*) اشاره کرد. نانوذرات نقره سبب ایجاد تغییرات معنادار در تعداد گلبول سفید و قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین

خون تیلاپیا شد (Karthikeyeni *et al.*, 2013). این مطالعه بر پرت خونی (Blood parrot) که از دگرآمیزی دو گونه *Cichlasoma citrinellum* ♂ *Cichlasoma synspilum* ♀ تولید می‌شود، انجام شد. این ماهی در سال ۱۹۸۰، برای اولین بار در کشور تایلند تولید و سپس در سال‌های بعد، تولید آن به کشورهای ژاپن و چین راه یافت (Yang *et al.*, 2012). با توجه به این که امروز استفاده از نانوذرات نقره در فلیترهای آکواریوم مرسوم شده است و این نانوذرات می‌تواند اثرات مضر برای آبزیان داشته باشد، به نظر می‌رسد استفاده از مکمل‌های غذایی که خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند می‌تواند باعث جلوگیری از این اثرات مضر شوند. هدف از این مطالعه بررسی شاخص‌های خون‌شناسی ماهی پرت تغذیه‌شده با مکمل غذایی آستاگزانتین و نمک صفاوی به عنوان یک مکمل غذایی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی در مواجهه با نانوذرات نقره بود.

مواد و روش‌ها

برای انجام این مطالعه، ۲۰۰ قطعه ماهی پرت از سالن تکثیر و پرورش معتبری واقع در اصفهان با میانگین وزنی $25/5 \pm 6/2$ گرم و میانگین طولی $6/34 \pm 0/43$ سانتی‌متر تهیه و به مدت دو هفته با شرایط آزمایشگاهی سازگار شدند. برای این آزمایش، سه تیمار با سه تکرار و هر تکرار شامل ۲۲ قطعه ماهی شامل تیمار شاهد، تیمار تغذیه‌شده با ۴ گرم بر کیلوگرم آستاگزانتین و تیمار تغذیه‌شده با ۴ گرم بر کیلوگرم آستاگزانتین و ۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم نمک صفاوی 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 جیره ۳۷/۷ درصد، چربی خام ۲۷/۰۳ درصد، رطوبت ۳/۸۳ درصد و فیبر خام ۳/۳۶ درصد و میزان انرژی جیره ۲۰/۳ کیلوژول بر هر کیلوگرم جیره بود. ترکیبات جیره بر اساس استاندارد NRC توسط نرم‌افزار محاسبه و در جدول ۱ گزارش شده است (NRC, 2011). در این آزمایش از نانوذرات نقره ساخت شرکت Nanocid Colloid ایران استفاده شد (جدول ۲). در ابتدا به دلیل مشخص

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

آستاگزانتین - نمک صفاوی	آستاگزانتین	شاهد	تیمارهای آزمایش
			اجزای جیره
۲۱/۱۶	۲۱/۱۶	۲۱/۱۶	پودر ماهی
۲۱/۱۶	۲۱/۱۶	۲۱/۱۶	سویا
۱۵/۸۷	۱۵/۸۷	۱۵/۸۷	کلزا
۲۴/۹۳	۲۴/۹۳	۲۴/۹۳	ذرت
۱۱/۱۲	۱۱/۱۲	۱۱/۱۲	جو
۰/۵	۰/۵	۰/۵	روغن آفتاب‌گردان
۰/۴	۰/۴	۰	آستاگزانتین ^۱
۰/۱۲	.	۰	نمک صفاوی ^۲
۰	۰/۱۲	۰/۵۲	نمک خوراکی
۲/۳۸	۲/۳۸	۲/۳۸	مکمل معدنی ^۳
۲/۳۸	۲/۳۸	۲/۳۸	مکمل ویتامینی ^۴
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	مجموع

^۱ شرکت BASF آلمان، خلوص ۱۲٪

^۲ شرکت FULKA آمریکا

^۳ مکمل معدنی ساخت شرکت خوراک دام و آبزیان مازندران، ایران (آهن ۲۱/۶۲ درصد، روی ۳۶/۰۵ درصد، سلنیوم ۰/۰۷ درصد، کبالت ۰/۳۶ درصد، مس ۲۱/۶۳ درصد، منگنز ۱۸/۰۲ درصد، ید ۲/۱۶ درصد، کولین کلراید ۰/۰۴ درصد).

^۴ مکمل ویتامینی ساخت شرکت ارس بازار، ایران محتوای ویتامین‌های A ۱۵/۲۴ درصد، D₃ ۳/۰۴ درصد، K₃ ۰/۶۰ درصد، E ۳/۰۴ درصد، B₁ ۶/۰۹ درصد، B₂ ۰/۹۱ درصد، B₆ ۰/۹۱ درصد، C ۳۰/۴۸ درصد، کلسیم پنتوتنات ۹/۱۴ درصد، متیونین ۱۸/۲۹ درصد، سیستئین ۹/۱۴ درصد).

نبودن میزان LC_{50} نانوذرات نقره، ماهی پرت در معرض غلظت‌های 1000 ، 500 و 250 $\mu\text{g/L}$ از نانوذرات نقره قرار گرفتند تا بیشترین 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 دُزهای ذکرشده قرار گرفتند. ماهی‌های مواجه شده با غلظت‌های 1000 و 500 $\mu\text{g/L}$ نانوذرات نقره کمتر از ۲۴ ساعت تلف شدند و ماهی‌های مواجهه شده با غلظت 250 $\mu\text{g/L}$ تا ۵ روز پس از معرض‌گذاری زنده ماندند. سپس هر یک از تیمارهایی که با جیره‌های ذکرشده تغذیه شده بودند، در دو تکرار، هر تکرار ۱۵ قطعه ماهی در معرض نانوذرات نقره با غلظت 250 $\mu\text{g/L}$ برای مدت ۵ روز قرار گرفتند. تانک‌های آزمایش ۲۴ ساعت قبل از اضافه کردن ماهی به دُز مورد نظر رسیدند تا میزان کاهش دُز 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 دُز مورد نظر هر ۴۸ ساعت یک‌بار انجام شد (Razmara *et al.*, 2014).

این مطالعه در سالن آکواریوم دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان انجام شد. در این آزمایش از آکواریوم‌هایی به ابعاد $100 \times 40 \times 35$ سانتی‌متر برای نگهداری ماهی استفاده شد. آب سیستم پرورشی مورد استفاده از لوله‌کشی شهری تأمین و پس از کلرزدایی (به‌واسطه نگهداری آب به مدت دو روز) در آکواریوم‌ها، توزیع شد. آکواریوم‌ها دارای هوادهی مداوم بودند. در طول دوره آزمایش، میانگین دمای آب $26 \pm 1/5$ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول $5/8 \pm 0/5$ میلی‌گرم بر لیتر، میزان pH $7/1 \pm 0/7$ ، هدایت الکتریکی $42 \pm 2/482$ میکروزیمنس، آمونیم $4/37 \pm 0/4$ میلی‌گرم بر لیتر و فسفات کل $2/02 \pm 0/09$ قسمت در میلیون بود.

نمونه‌گیری

به منظور ارزیابی شاخص‌های خون‌شناسی، خون‌گیری از ماهیان در دو مرحله، پس از پایان دوره ۹۰ روزه تغذیه با جیره‌های آزمایشی به عنوان تیمار قبل از تنش و ۵ روز پس از اعمال تنش نانوذرات نقره انجام شد. به این منظور، در هر مرحله ۵ قطعه ماهی از هر تکرار به طور تصادفی صید و پس از بیهوشی با 100 میلی‌گرم بر لیتر گل‌میخک، خون‌گیری از ورید ساقه دمی با استفاده از سرنگ هیپارینه $2/5$ میلی‌لیتری انجام شد. در ادامه، شاخص‌های خون‌شناسی به شرح زیر مورد بررسی قرار گرفت.

شاخص‌های خون‌شناسی

شمارش تعداد گلبول‌های سفید (هزار در میلی‌متر مکعب) و قرمز (میلیون در میلی‌متر مکعب) پس از رقیق‌سازی نمونه خون

جدول ۲. برخی از مشخصات اندازه‌گیری شده کلونید نانوذرات نقره (Razmara *et al.*, 2014)

پارامتر	روش سنجش	فراسنجه	توضیحات
غلظت mg/L	ICP-AES ¹	۲۰۰۰	با غلظت اعلام‌شده از کارخانه تولیدی اختلاف معناداری 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 ۱۳-۱۰۰ nm دارند
خلوص	EDX ³		تنها عنصر نقره کلونید نانوذرات نقره وجود داشت

¹ Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy

² Transmission electron microscopy

³ Energy-dispersive X-ray

با استفاده از محلول دیس^۱ (برای تهیه محلول دایس ابتدا ۰/۱ گرم برلیانت کریزل آبی با ۳/۸ گرم سدیم سیترات و ۰/۲۰ میلی‌لیتر فرمالین ۳۷٪ مخلوط شد و سپس ترکیب حاصل با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسید) و با استفاده از پیت ملانژور سفید یا قرمز و لام هماتوسیتومتر به صورت دستی صورت گرفت. برای تعیین میزان هماتوکریت از روش میکروهیاتوکریت استفاده شد. ابتدا بیش از دو سوم لوله هماتوکریت از خون منعقد نشده پرشد، سپس لوله‌های هماتوکریت درون دستگاه سانتریفیوژ میکروهیاتوکریت قرار گرفت و پس از سپری شدن ۳ دقیقه با دور گردش (rpm) ۱۳۰۰۰ مقدار هماتوکریت به وسیله صفحه مدرج مخصوص خوانده شد. برای تعیین مقدار هموگلوبین از روش استاندارد سیانومت هموگلوبین^۲ استفاده شد (Houston, 1990).

اندازه‌گیری فاکتورهای ثانویه خونی

برای اندازه‌گیری شاخص‌های MCV^3 ($nm^3 cell^{-1}$)، MCH^4 ($\mu g cell^{-1}$) و $MCHC^5$ ($g Hb cell^{-1}$) از رابطه زیر استفاده شد (Dorafshan *et al.*, 2008):

$$MCV (nm^3 cell^{-1}) = Hct (\%) \times 10 / RBC (10^6 mm^3)$$

$$MCH (\mu g cell^{-1}) = Hb / RBC (10^6 mm^3)$$

$$MCHC (g Hb cell^{-1}) = Hb (g/dl) / Hct \times 100$$

تحلیل آماری

برای بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون Kolmogorov-Smiranov و آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS 19 و Excel 2013 انجام شد. این آزمایش در طرح کاملاً تصادفی انجام و با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One Way ANOVA) وجود اختلاف معنادار بین تیمارها در سطح $P < 0.05$ تحلیل شد. برای مقایسه میانگین تیمارهای مختلف پیش یا پس از تنش از آزمون Duncan در سطح معناداری ۰/۰۵ درصد استفاده شد. برای مقایسه میانگین هر شاخص در هر تیمار پیش از تنش و پس از تنش از آزمون آماری *t*-student در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P < 0.05$) استفاده شد.

نتایج

نتایج فراسنجه‌های خون‌شناسی نشان داد که استفاده از مکمل غذای آستاگزانتین به تنهایی یا در تلفیق با نمک صفاوی به مدت ۹۰ روز هیچ تأثیر معناداری بر شاخص‌های هماتوکریت، هموگلوبین و تعداد گلبول‌های قرمز نداشت (شکل ۱-الف، ب و ج؛ $P > 0.05$) اگرچه باعث افزایش تعداد گلبول‌های سفید شد (شکل ۱-د؛ $P < 0.05$). پس از تنش نانوذرات نقره به مدت ۵ روز شاخص‌های هماتوکریت و هموگلوبین در همه تیمارها و تعداد گلبول سفید تنها در تیمار شاهد در مقایسه با زمان قبل از تنش به صورت معناداری کاهش یافت (شکل ۱-الف، ب و د؛ $P < 0.05$) درحالی‌که کاهش تعداد گلبول‌های سفید در تیمارهای آستاگزانتین و آستاگزانتین-نمک صفاوی مشاهده نشد (شکل ۱-د؛ $P > 0.05$). تعداد گلبول‌های قرمز در تیمارهای شاهد و آستاگزانتین پس از تنش نانوذرات نقره به صورت معناداری کاهش پیدا کرد (شکل ۱-ج؛ $P < 0.05$) ولی این کاهش در تیمار آستاگزانتین-نمک صفاوی مشاهده نشد (شکل ۱-ج؛ $P > 0.05$).

با توجه به نتایج حاصل می‌توان دریافت تغذیه با مکمل غذایی آستاگزانتین و نمک صفاوی به مدت ۹۰ روز تأثیر معناداری بر شاخص‌های ثانویه خون از جمله MCHC، MCH و MCV نداشته است (جدول ۳؛ $P > 0.05$). ولی میزان شاخص MCV پس از

¹ Dace

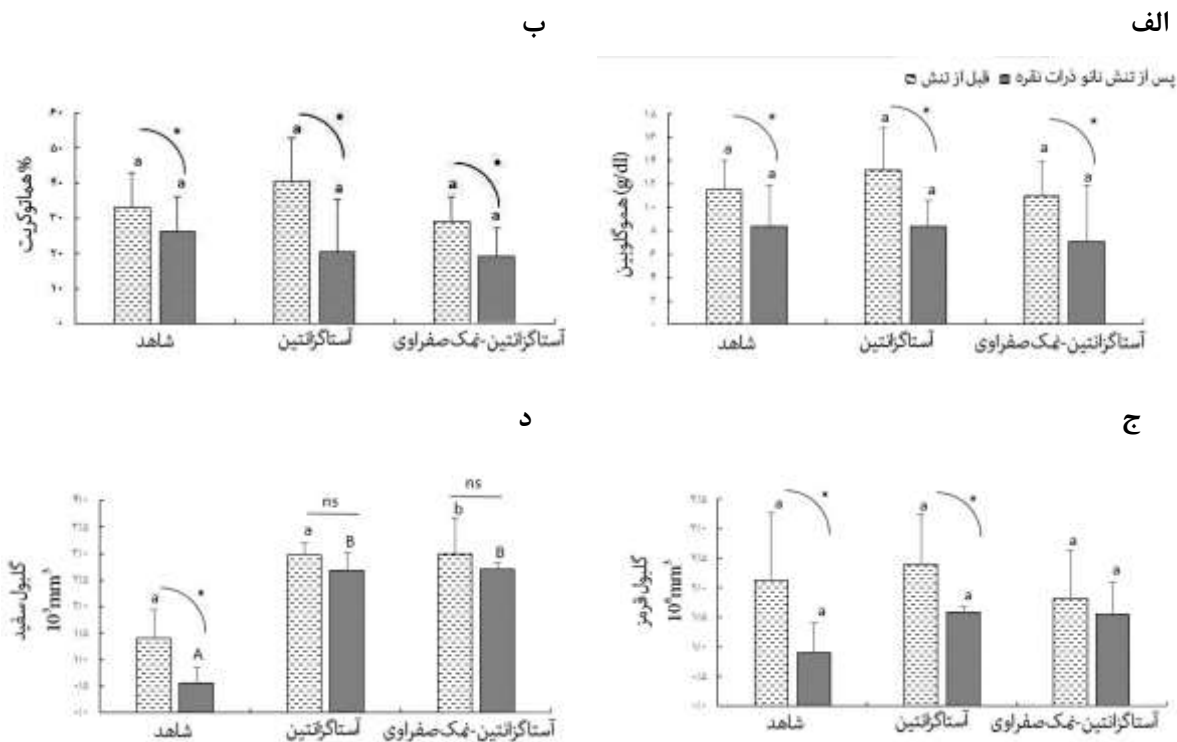
² Cyanmethemoglobin

³ Mean Cell Volume

⁴ Mean Cell Hemoglobin

⁵ Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration

تنش نانوذرات نقره در مقایسه با قبل از تنش در تمام تیمارها به صورت معناداری افزایش پیدا کرد (جدول ۳؛ $P < 0.05$)؛ درحالی‌که میزان شاخص‌های MCH و MCHC تغییرات معناداری در مقایسه با قبل از تنش در هیچ‌یک از تیمارها نشان نداد (جدول ۳؛ $P > 0.05$).



شکل ۱. شاخص‌های خون‌شناسی ماهی پرت تغذیه‌شده با جیره‌های مختلف آزمایشی پیش و پس از قرار گرفتن در معرض تنش نانوذرات نقره محلول در آب با غلظت $250 \mu\text{g/L}$ به مدت ۵ روز. الف: هموگلوبین ب: هماتوکریت ج: گلبول قرمز د: گلبول سفید. حروف کوچک نشان‌دهنده تفاوت معنادار در بین تیمارها پیش از تنش و حروف بزرگ نشان‌دهنده تفاوت معنادار بین تیمارهای مختلف آزمایشی پس از تنش نانوذرات نقره می‌باشد علامت (*) نشان‌دهنده تفاوت معنادار بین زمان پیش از تنش و پس از تنش نانوذرات نقره در یک تیمار مشخص است.

جدول ۳. شاخص‌های ثانویه خون‌شناسی ماهی پرت تغذیه‌شده با جیره‌های مختلف آزمایشی پیش و پس از قرار گرفتن در معرض تنش نانوذرات نقره محلول در آب با غلظت $250 \mu\text{g/L}$ به مدت ۵ روز. میانگین \pm خطای استاندارد

MCHC (g Hb cell ⁻¹)	MCV (nm ³ cell ⁻¹)	MCH ($\mu\text{g cell}^{-1}$)	زمان انجام آزمایش	تیمارهای مورد آزمایش
$35/28 \pm 3/07$	$254/45 \pm 26/94$	$85/90 \pm 8/22$	پیش از تنش	شاهد
$38/32 \pm 12/62$	$*461/41 \pm 27/79$	$90/26 \pm 16/65$	پس از تنش	شاهد
$33/60 \pm 7/46$	$233/14 \pm 22/44$	$75/30 \pm 7/59$	پیش از تنش	آستاگزانتین
$47/03 \pm 13/53$	$*383/82 \pm 9/09$	$78/24 \pm 16/07$	پس از تنش	آستاگزانتین
$39/21 \pm 10/82$	$199/17 \pm 8/87$	$82/76 \pm 6/42$	پیش از تنش	آستاگزانتین-نمک
$30/77 \pm 2/62$	$*234/09 \pm 11/14$	$89/93 \pm 4/25$	پس از تنش	آستاگزانتین-نمک-صفرای

علامت * نشان‌دهنده تفاوت معنادار در یک تیمار، مقایسه دو تیمار در زمان قبل و پس از تنش نانوذرات نقره است.

بحث

در مطالعه حاضر تعداد گلبول سفید در تیمارهای تغذیه‌شده با آستاگزانتین و نمک صفرای به مدت ۹۰ روز به طور معناداری

افزایش پیدا کرده‌اند. ولی این مکمل‌ها، اثر معناداری بر دیگر شاخص‌های خون‌شناسی همچون هماتوکریت و هموگلوبین و تعداد گلبول‌های قرمز نداشته‌اند. به نظر می‌رسد آستاگزانتین شاخص‌های ایمنی ماهی پرت را (با افزایش تعداد گلبول‌های سفید) تقویت می‌کند، علاوه بر این آستاگزانتین به دلیل ویژگی آنتی‌اکسیدانی، رادیکال‌های آزاد را از بین می‌برد. افزایش رادیکال‌های آزاد در بدن موجب تخریب گلبول‌های سفید می‌شود (Hill and Johnson, 2012) به عبارت دیگر می‌توان گفت با افزودن آستاگزانتین می‌توان از تخریب گلبول‌های سفید جلوگیری کرد. همان‌طور در تحقیق حاضر کمترین تعداد گلبول سفید در تیمار شاهد مشاهده شد. نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج Torrissen و همکاران (۱۹۹۰) که از مکمل آستاگزانتین در جیره ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) استفاده کرده‌اند، مطابقت دارد (Torrissen et al., 1990). با توجه به نتایج حاصل از شاخص‌های ثانویه می‌توان دریافت که مکمل آستاگزانتین و نمک صفرای هیچ تأثیر معناداری بر شاخص‌های MCH، MCV، MCHC ندارد. تاکنون مطالعات کمی در رابطه با اثرات آستاگزانتین بر شاخص‌های ثانویه خون‌شناسی ماهی صورت گرفته است از این میان می‌توان به مطالعه Adhami و همکاران (۲۰۱۷) اشاره کرد. نتایج این مطالعه نشان داد استفاده از مکمل آستاگزانتین، هویج و لبو تأثیر معناداری بر شاخص‌های ثانویه خون ماهی قزل‌آلای رنگین کمان نداشته است (Adhami et al., 2017).

در مطالعه حاضر تنش نانوذرات نقره باعث کاهش معنادار میزان شاخص هماتوکریت و هموگلوبین در همه تیمارهای مورد آزمایش و کاهش تعداد گلبول‌های قرمز در تیمارهای شاهد و آستاگزانتین شده است. کاهش تعداد گلبول‌های قرمز معمولاً به دلیل تجمع ترکیبات آب‌گریز در غشاء و تخریب آن‌ها توسط تنش اکسیداتیو (عدم توانایی تبدیل مت هموگلوبین به هموگلوبین توسط سیستم‌های آنزیمی) می‌باشد. همچنین آسیب‌های ساختاری به بافت‌های خون‌ساز از قبیل کلیه، طحال می‌تواند دلیل دیگری برای کاهش تعداد گلبول‌های قرمز باشد (Houston, 1990). کاهش تعداد گلبول قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین در ماهی فلاندر (*Pleuronectes fleus*) پس از در معرض گذاری با غلظت‌های ۵، ۵۰، ۵۰۰ میکروگرم بر لیتر دلتا-آمینولینیک اسیددی‌هیدرات ۶ به مدت ۴ و ۹ هفته (Houston et al., 1990) و در ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) پس از ۱، ۳ و ۵ هفته در معرض گذاری با غلظت ۵/۵ میکروگرم بر لیتر کادمیوم گزارش شده است (Al-Attar et al., 2005). با این‌وجود، بررسی اثر نانوذرات نقره و نیترات نقره بر گربه‌ماهی رنگین کمان (*Pangasius hypophthalmus*) نشان داد که میزان هماتوکریت، هموگلوبین و تعداد گلبول قرمز پس از ده روز مواجه منجر به بروز تفاوت معنادار در شاخص‌های مورد بررسی نمی‌شود (Razmara et al., 2014). در مطالعه حاضر تعداد گلبول‌های سفید در تیمار شاهد پس از تنش نانونقره کاهش معناداری پیدا کرده است ولی این کاهش در تیمارهای آستاگزانتین و آستاگزانتین-نمک صفرای مشاهده نشد. گلبول سفید نقش مهمی در ایمنی غیراختصاصی ایفا می‌کند و تعداد آن‌ها شاخصی از میزان سلامتی در ماهیان است، به نظر می‌رسد که پاسخ فیزیولوژیک افزایش یا کاهش تعداد گلبول‌های سفید در مواجه با آلاینده‌ها، متأثر از دوره در معرض گذاری و شدت (غلظت) آلاینده باشد. در درازمدت ممکن است به دلیل تأثیر نامطلوب آلاینده‌ها بر بافت‌های تأمین‌کننده گلبول سفید خون، تعداد آن‌ها کاهش یابد. اغلب گزارش‌ها بیانگر کاهش تعداد گلبول‌های سفید در معرض آلودگی با فلزات سنگین نظیر کادمیوم، به دلیل تخریب بافت خون‌ساز ماهی هستند از جمله می‌توان به گزارش موجود در خصوص قزل‌آلای رنگین کمان اشاره کرد (Thuvander et al., 1989). با توجه به نتایج به نظر می‌رسد تنش نانوذرات نقره باعث کاهش تعداد گلبول‌های سفید می‌شود درحالی‌که استفاده از جیره حاوی آستاگزانتین می‌تواند از این کاهش تعداد گلبول‌های سفید جلوگیری کند.

در مطالعه حاضر میزان شاخص MCV در تمام تیمارها پس از قرارگیری در معرض تنش نانوذرات نقره به‌صورت معناداری افزایش پیدا کرد ولی این افزایش در تیمار شاهد شدیدتر بود. درحالی‌که تنش نانوذرات بر شاخص MCHC و MCH اثرات معناداری نداشت. شاید دلیل این تغییر، نیاز ماهی به اکسیژن بیشتر تحت تنش مواجه با نانونقره در آب باشد. به نظر می‌رسد برای جبران کاهش تعداد گلبول‌های قرمز خون، نسبت به افزایش اندازه و محتوای هموگلوبین ذره‌ای آن‌ها اقدام نموده است تا به این طریق ظرفیت حمل اکسیژن هر یاخته گلبول افزایش یافته و به‌طور موقت به‌عنوان پاسخ سازشی اولیه مطرح شود

⁶ Delta-Aminolevulinic Acid Dehydrate

(Karthikeyeni *et al.*, 2013). با این وجود به نظر می‌رسد پاسخ شاخص ثانویه خون‌شناسی به عوامل تنش‌زای محیطی متأثر از عوامل مختلفی همچون نوع گونه، شرایط زیستی، مدت‌زمان در معرض قرارگیری، نوع و غلظت آلاینده باشد. در خصوص تأثیر عوامل تنش‌زا از جمله آلاینده‌های محیطی بر شاخص‌های ثانویه خون‌شناسی ماهیان اطلاعات متناقضی منتشر شده است. به‌عنوان مثال مواجه تیلاپیای موزامبیک (*Oreochromis mossambicus*) با نانوذرات اکسید آهن پس از ۹۶ ساعت سبب افزایش MCV و MCH شد (Karthikeyeni *et al.*, 2013). Razmara و همکاران (۲۰۱۴) با بررسی اثرات نانوذرات نقره بر گربه‌ماهی رنگین‌کمان بیان کردند که پس از ده روز تفاوت معناداری در شاخص‌های ثانویه خون مشاهده نمی‌شود؛ با این وجود کاهش شاخص‌های ثانویه خون در تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) پس از مواجه با کادمیوم مشاهده شد (Berg *et al.*, 2006).

با توجه به مطالعه حاضر به نظر می‌رسد که جیره حاوی آستاگزانتین و نمک صفراوی تأثیر معنی‌داری بر شاخص‌های خون‌شناسی به غیر از تعداد گلبول سفید ندارد و این مکمل می‌تواند باعث افزایش گلبول سفید شود و پس از تنش نانوذرات نقره نیز تعداد گلبول‌های سفید در تیمار شاهد کاهش معنی‌داری یافت درحالی‌که این کاهش در تیمارهای آستاگزانتین و آستاگزانتین-نمک صفراوی مشاهده نشد. وقتی ترکیبات موجود در خون مثل گلوکز، چربی در اثر تنش کاهش می‌یابند، فشار اسمزی خون کاهش یافته و مقدار زیادی آب از خون خارج می‌گردد و در نتیجه خون رقیق‌تر می‌شود. کاهش فشار اسمزی خون هم‌چنین باعث جذب مقداری از آب توسط گلبول قرمز می‌شود، این امر باعث افزایش حجم متوسط گلبولی (MCV) می‌گردد. بنابراین به نظر می‌رسد دلیل کاهش تعداد گلبول قرمز و افزایش MVC پس از تنش نانوذرات نقره در همه تیمارها این باشد که ماهی برای جبران کاهش تعداد گلبول‌های قرمز حجم آن‌ها را افزایش داده است. پیشنهاد می‌شود در صنعت آبی‌پروری برای بهبود شاخص‌های ایمنی از جمله تعداد گلبول‌های سفید از جیره حاوی آستاگزانتین استفاده شود و برای درک بهتر عملکرد نمک صفراوی در مطالعات آتی یک تیمار مجزا با جیره حاوی نمک صفراوی مورد بررسی قرار گیرد.

منابع

- Adhami, B., Jafari, S., Janikhalili, K. 2017. Effect of natural (carrot and beetroot) and artificial pigments (astaxanthin) on growth, blood indices, and color changes in skin, tissue and blood in the diet of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fisheries Science and Technology*. 5(4): 1-11. (in Persian)
- Al-Attar, A.M. 2005. Biochemical effects of short-term cadmium exposure on the freshwater fish, *Oreochromis niloticus*. *International Journal of Biological Science*. 5: 260-265.
- Arora, S., Jain, J., Rajwade, J., Paknikar, K. 2008. Cellular responses induced by silver nanoparticles: *in vitro* studies. *Toxicology Letters*. 179(2): 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 & Environmental Chemistry*. 97(5): 200-207. (in Persian)
- Berg, S., Trollfors, B., Persson, E., Backhaus, E., Larsson, P., Ek, E., Claesson, B.E., Jonsson, L., Radberg, G., Johansson, S. 2006. Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolated from blood and cerebrospinal fluid related to vaccine serotypes and to clinical characteristics. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 38(2): 427-432.
- Beutner, S., Bloedorn, B., Frixel, S., Hernandez Blanco, I., Hoffmann, T., Martin, H.D., Mayer, B., Noack, P., Ruck, C., 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(4): 559-568.
- Carlson, C., Hussain, S., Schrand, A.M., Braydich, K., Hess, K.L., Jones, R.L., Schlager, J. 2008. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size dependent generation of reactive oxygen species. *American Chemical Society*. 112(43): 13608-13619.
- Davis, M.W. 2010. Fish stress and mortality can be predicted using reflex impairment. *Fish and Fisheries*. 11(5): 1-11.

- Dorafshan, S., Kalbassi, M.R., Pourkazemi, M., Amiri, B.M., Karimi, S.S. 2008. Effects of triploidy on the Caspian salmon *Salmo trutta caspius* haematology. *Fish Physiology and Biochemistry*. 34(3): 195-200.
- Erdman, J. 1988. The physiologic chemistry of carotenes in man. *Clinical Nutrition*. 2(7): 101-05.
- 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(5): 1091-1098.
- Hill, G.E., Johnson, J.D. 2012. The vitamin A–redox hypothesis: a biochemical basis for honest signaling via carotenoid pigmentation. *The American Naturalist*. 180(2): 127-150.
- Hussain, S.M., Schrand, A.M., Braydich-Stolle, L., Hess, K.L., Jones, R.L., Schlager, J. 2008. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *The Journal of Physical Chemistry*. 112(5): 13608-13619.
- Houston, A. 1990. Blood and circulation. *Methods for Fish Biology*. 1st edition. *Methods for Fish Biology*. 488 p.
- Jyonouchi, H., Sun, S., Tomita, Y., Gross, M.D. 1995. Astaxanthin, a carotenoid without vitamin A activity, augments antibody responses in cultures including T-helper cell clones and suboptimal doses of antigen. *The Journal of Nutrition*. 125(2): 2483-2492.
- Karthikeyeni, S., Siva Vijayakumar, T., Vasanth, S., Arul Ganesh, M.M., Subramanian, P. 2013. Biosynthesis of iron oxide nanoparticles and its haematological effects on fresh water fish *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Academia and Industrial Research*. 10(1): 645-649.
- Masciangioli, T., Zhang, W. 2003. Environmental technologies at the nanoscale. *Fisheries Science*. 37(2): 102-108.
- Naguib, Y.M. 2000. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2(3): 48-52.
- NRC. 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp. National Academies Press, Washington 5: 17-22.
- Razmara, P., Peykan, H.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)
- Rehulka, J. 2000. Influence of astaxanthin on growth rate, condition, and some blood indices of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*. 190(4): 27-47.
- 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. 2010. Effects of aqueous exposure to silver nanoparticles of different sizes in rainbow trout. *Toxicological Sciences*. 115(1): 521-534.
- Srivastava, S., Singh, N., Srivastava, A.K., Sinha, R. 1995. Acute toxicity of malachite green and its effects on certain blood parameters of a catfish, *Heteropneustes fossilis*. *Aquatic Toxicology*. 31(2): 241-247.
- Thuvander, A. 1989. Cadmium exposure of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson: effects on immune functions. *Journal of Fish Biology*. 35: 521-529.
- Torrissen, O., Hardy, R., Shearer, K., 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*. 4(88): 351-362.
- Xu, J., Maki, D., Stapleton, S.R. 2003. Mediation of cadmium-induced oxidative damage and glucose phosphate dehydrogenase expression through glutathione depletion. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 17(2): 67-75.
- Yang, H., Mu, X., Luo, D., Hu, Y., Song, H., Liu, C., Luo, J. 2012. Sodium taurocholate, a novel effective feed-additive for promoting absorption and pigmentation of astaxanthin in blood parrot (*Cichlasoma synspilum*♀ × *Cichlasoma citrinellum*♂). *Aquaculture*. 350(1): 42-45.
- Zhou, L., Zhou, G., Chen, B. 2002. Effects of bile salt on intestinal absorption of carotenoids in goats. *Journal of Nanjing Agricultural University*. 2(25): 61-64.