Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics

Online ISSN: 2345-427X
Print ISSN: 2345-4288

The effect of sub-lethal concentrations of silver nitrate ($AgNO_3$) on some biochemical indices and P_{450} gene expression of common carp (*Cyprinus carpio*)

Behnam Tabari[1] | Hamed Paknejad[*2] | Seyed Aliakbar Hedayati[3] | Ali Shabani[4] | Kheirollah Khosravi[5]

1. M.Sc. Graduate of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: behnam.t.j.21@gmail.com
2. Corresponding Author, Associate Prof., Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: hkolangi@gmail.com
3. Associate Prof., Dept. of Fisheries and Aquatic Ecology, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: marinebiology1@gmail.com
4. Associate Prof., Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: ashabani@gau.ac.ir
5. Ph.D. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: khosravi.kh@alumni.ut.ac.ir

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 04.28.2021
Revised: 05. 30.2021
Accepted: 06.03.2021

Keywords:
Common carp,
Gene expression,
Heavy Metals,
Sub lethal

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the effect of sub-lethal concentrations of silver nitrate ($AgNO_3$) on some biochemical indices and P_{450} gene expression of common carp. For this purpose, Common carp with a weighing average of 7 ±0.33 g were divided into 3 treatments (T_1: 0.23, T_2: 0.68 and T_3: 1.13) and 1 control group, each containing 3 replicates, exposed to the effective concentrations of 0.23, 0.68 and 1.13 ppb for 14 day. At the end of the study, blood, gills and liver samples were collected to evaluate some biochemical indices (total protein, Immunoglobulin, albumin) and P_{450} gene expression. The results showed that P_{450} gene expression in the gills of treatment 3 was significantly increased as compared to the control group ($P<0.05$). The final results of this study in connection with exposure to silver nitrate toxin showed that with increasing duration and concentration of silver nitrate toxin has significant effects on biochemical indices of common carp and in most experiments reduces these indices. Total protein in the 2nd and 3rd groups significantly decreased compared to the control group ($P<0.05$). Total immunoglobulin levels increased with increasing concentrations of toxin, but this increase was not significant ($P>0.05$). Albumin level in treatment 3 was significantly lower than control group ($P<0.05$) but in other treatments no significant difference was observed with the control group. Also, the expression of P_{450}gene under the influence of toxin in the liver and gills on day 14 showed the highest expression. Therefore, it can be concluded that silver nitrate can have destructive effects on common carp, which is one of the most important resource of the Caspian Sea.

Cite this article: Tabari, Behnam, Paknejad, Hamed, Hedayati, Seyed Aliakbar, Shabani, Ali, Khosravi, Kheirollah. 2022. The effect of sub-lethal concentrations of silver nitrate ($AgNO_3$) on some biochemical indices and P_{450} gene expression of common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 10 (4), 1-13.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/japu.2022.19105.1586
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان

شاپا آنلاین: ۲۳٤٥-٤۲۷X
شاپا چاپی: ۲۳٤٥-٤۲۸۸

تأثیر غلظت‌های تحت کشنده نیترات نقره ($AgNO_3$) بر شاخص‌های بیوشیمیایی و بیان ژن سیتوکروم P_{450} در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

بهنام طبری[۱] | حامد پاک‌نژاد*[۲] | سید علی‌اکبر هدایتی[۳] | علی شعبانی[٤] | خیرا... خسروی[٥]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: behnam.t.j.21@gmail.com

۲. نویسنده مسئول، دانشیار گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: hkolangi@gmail.com

۳. دانشیار گروه تولید و بهره‌برداری آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: marinebiology1@gmail.com

٤. دانشیار گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: ashabani@gau.ac.ir

۵. دکتری تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: khosravi.kh@alumni.ut.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱٤۰۰/۰۲/۰۸
تاریخ ویرایش: ۱٤۰۰/۰۳/۰۹
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۰/۰۳/۱۳

واژه‌های کلیدی:
بیان ژن،
تحت کشنده،
فلزات سنگین،
کپور معمولی

چکیده

هدف از این پژوهش بررسی اثرات تحت کشنده نیترات نقره ($AgNO_3$) بر بیان ژن سیتوکروم P_{450} و برخی شاخص‌های بیوشیمیایی (پروتئین کل، آلبومین، ایمنوگلوبولین) در ماهی کپور معمولی می‌باشد. به این منظور بچه‌ماهیان کپور معمولی با میانگین وزنی ۷±۰/۳۳ گرم تهیه و در ۳ تیمار (تیمار یک: ۰/۲۳، تیمار دو: ۰/٦۸ و تیمار ۳: ۱/۱۳) و ۱ گروه شاهد که هر کدام شامل ۳ تکرار بودند، تقسیم‌بندی شدند. ماهیان در معرض غلظت‌های مؤثر ۰/۲۳ ppb، ۰/٦۸ و ۱/۱۳ به مدت ۱٤ روز قرار گرفتند. در پایان دوره، خونگیری و نمونه‌گیری از بافت کبد و آبشش جهت سنجش شاخص‌های بیوشیمیایی (پروتئین کل، آلبومین، ایمنوگلوبولین) و ارزیابی بیان ژن P_{450} صورت گرفت. نتایج نشان داد که بیان ژن P_{450} در آبشش در تیمار ۳ به‌صورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش یافته است ($P<۰/۰۵$). هم‌چنین کم‌ترین میزان بیان این ژن در آبشش در تیمار ۱ مشاهده شد. نتایج نهایی به‌دست آمده از این پژوهش در ارتباط با قرارگیری در معرض سم نیترات نقره نشان داد که با افزایش مدت زمان و غلظت سم نیترات نقره اثرات قابل‌توجهی بر شاخص‌های سرمی ماهی کپور معمولی داشت. پروتئین کل در تیمارهای ۲ و ۳ به طور قابل‌توجهی در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت ($P<۰/۰۵$). سطح ایمنوگلوبولین کل با افزایش غلظت سم به‌طور معناداری افزایش یافت ($P>۰/۰۵$). سطح آلبومین در تیمار ۳ به‌طور معنی‌داری کم‌تر از گروه شاهد بود ($P<۰/۰۵$) اما در سایر تیمارها

تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد مشاهده نشد هم‌چنین میزان بیان ژن P_{450} تحت‌تأثیر سم در کبد و آبشش در روز ١٤ بالاترین میزان بیان را نشان داد. بنابراین می‌توان چنین استنباط نمود نیترات نقره توانست آثار مخربی را بر ماهی کپور معمولی که یکی از مهم‌ترین ذخایر دریای خزر است، اعمال کند.

استناد: طبری، بهنام، پاک‌نژاد، حامد، هدایتی، سید علی‌اکبر، شعبانی، علی، خسروی، خیرا... (۱۴۰۰). تـأثیر غلظـت‌هـای تحـت کشـنده نیترات نقره ($AgNO_3$) بر شاخص‌های بیوشیمیایی و بیان ژن سیتوکروم P_{450} در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). *نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان*، ۱۰ (۴)، ۱۳-۱.

DOI: 10.22069/japu.2022.19105.1586

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

آلودگی‌های دریایی و اثرات آن بر آبزیان یکی از بزرگ‌ترین چالش‌های زیست‌محیطی می‌باشند (Shokuhi *et al*., 2014). سیستم‌های آبی، پیوسته با مشکلات ناشی از آلاینده‌هایی روبه‌رو هستند که از منابع مختلف مانند: فاضلاب‌های صنعتی، پساب‌های کشاورزی و فاضلاب‌های شهری وارد آن‌ها می‌شوند. آلاینده‌ها (فلزات سنگین، سموم و فرآورده‌های نفتی) برای آبزیان زیان‌آور بوده و عمدتاً بدون هیچ تصفیه‌ای وارد آب‌ها می‌شوند (Shahsavani *et al*., 2003). اکوسیستم آبی در پایین‌ترین سطح از ارتفاع قرار دارد؛ در نتیجه مقصد نهایی تمام آلاینده‌های محیطی آب است. در نتیجه آلوده شدن آب این مواد با تغذیه از آبزیان در نهایت در طول زنجیره غذایی به انسان انتقال یافته و در گذر زمان در بدن موجودات و انسان انباشته می‌شود (Esmaeeli, 2007). فلزات سنگین از جمله رایج‌ترین آلاینده‌هایی هستند که معمولاً در غلظت‌های بالا در فاضلاب صنایع یافت می‌شوند و موجب آسیب به محیط‌های آبی و به خطر افتادن سلامت موجودات زنده به خصوص انسان می‌گردند (Shokuhi *et al*., 2014).

در میان آلاینده‌های فلزی یون نقره بسیار سمی است و بالاترین درجه سمیت را در رده‌بندی مواد سمی به خود اختصاص داده است. سمی بودن آن برای بسیاری از میکروارگانیسم‌ها و هم‌چنین سمیت کم آن برای انسان منجر به تولید تعداد زیادی از محصولات بر پایه نقره شده است (Boenigk *et al*., 2014). یون نقره به طور گسترده‌ای در مراقبت‌های بهداشتی برای کنترل میکروارگانیسم‌ها به ویژه در سیستم تأمین آب مورد استفاده قرار می‌گیرد و به این دلیل که هیچ‌گونه تأثیر نامطلوب بر رنگ، بو و طعم آب ندارد، بسیار مورد توجه است (Yahya *et al*., 1992). در حالی که بخش وسیعی از نقره در آب‌های سطحی به صورت طبیعی وارد می‌گردد، فعالیت‌های بشری مانند: معدن، ساخت جواهرات و عکاسی می‌توانند سطوح نقره را در آب‌های محیطی افزایش دهند (Tarbali *et al*., 2013). در محیط‌های آبی، ماهی به عنوان یک آبزی برای ارزیابی اثر آلاینده‌های محیطی در بوم سامانه‌های آبی در نظر گرفته می‌شود. ماهی در بالاترین نقطه زنجیره غذایی قرار دارد و توانایی بزرگ‌نمایی زیستی فلزات سنگین، حتی در غلظت‌های پایین موجود در محیط را دارد (Bhagwant and Bhikagee, 2000).

شاخص‌های بیوشیمیایی برای تشخیص اثرات تحت کشنده مواد سمی مختلف از جمله فلزات سنگین در ماهیان به‌کار می‌روند. با توجه به این‌که تغییرات غلظت فلزات سنگین در محیط‌های آبی، اثرات سوء زیستی قابل‌توجهی را روی موجودات آبزی به ویژه انواع ماهی‌ها به وجود می‌آورد، تأثیر فلزات سنگین در حیات موجودات آبزی بسیار دارای اهمیت است (Safari *et al*., 2015). اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیک خون می‌تواند به‌عنوان یک ابزار تشخیصی در سم‌شناسی و پایش زیستی به‌کار رود. تغییر در میزان و سطوح این پارامترها می‌تواند منعکس‌کننده پاسخ‌های ماهیان به تغییرات در محیط زندگی آن‌ها باشد (Satheeshkumar *et al*., 2012). بافت خون به‌عنوان یک شاخص مهم، وضعیت فیزیولوژیک اندام‌های بدن را نشان می‌دهد. آنالیز خون از نظر پارامترهای هماتولوژی، سرولوژی و بیوشیمیایی در تشخیص بیماری‌های خونی، سم‌شناسی متابولیک و کنترل روند زیستی موجودات زنده از جمله آبزیان دارای اهمیت می‌باشد. مسلماً تغییرات پارامترهای بیوشیمیایی خون در اثر مسمومیت می‌تواند نمودی از تغییرات بافت‌های مختلف ماهی در خلال مسمومیت باشد (Gholamian, 2004). در ارزیابی اغلب

مسمومیت‌های فلزی ایجاد شده در ماهی می‌توان از پارامتر سطح پروتئین کل استفاده نمود. پروتئین سرم خون به عنوان یک سیستم بیوشیمیایی نسبتاً حساس شناخته شده است و می‌تواند به نوعی منعکس‌کننده وضعیت موجود تحت‌تأثیر عوامل استرس‌زا باشد (Shalaby, 2006). تغییرات فعالیت‌های آنزیمی یکی از مهم‌ترین پارامترهای بیوشیمیایی مورد بررسی در زمان تأثیر استرس‌های مختلف از جمله آلاینده‌ها بر موجودات می‌باشد. زمانی که یک بافت در اثر آلاینده‌ها دچار آسیب می‌شود تغییراتی در فعالیت آنزیم‌ها ایجاد و در نهایت موجب اختلال در عملکرد طبیعی بافت آسیب دیده می‌شود. در نتیجه، افزایش یا کاهش در مقدار آنزیم‌ها می‌تواند نشان‌دهنده میزان آسیب‌دیدگی بافت باشد (Valarmathi and Azariah, 2003).

P_{450} ها یک مخلوطی از مونواکسیژناز دارای حدود ۵۰۰ اسید آمینه و یک گروه آهن در جایگاه فعال خود هستند. آنزیم‌های سیتوکروم P_{450} ها جزء آن گروه از آنزیم‌هایی هستند که در اکسیداسیون بعضی ترکیبات از آهن استفاده می‌نمایند و با محلول ساختن مواد بالقوه خطرناک و زائد در آب، به‌راحتی شرایط اکسیداسیون آن‌ها را فراهم می‌نمایند. این آنزیم مسئول متابولیسم اکسیداتیو ترکیباتی چون پروستاگلاندین‌ها، اسیدهای چرب، متابولیت‌های گیاهی، استروئیدها و هم‌چنین مواد شیمیایی سرطان‌زا و آلاینده‌های زیست محیطی است. این آنزیم جزء آنزیم‌های اکسایشی است که در فاز اول متابولیسم آلاینده‌ها تولید می‌شود. P_{450} توسط بسیاری از آلاینده‌های زیست محیطی القا شده و در بسیاری از مطالعات پایش زیستی مورد استفاده قرار گرفته است. این پژوهش به منظور بررسی اثرنیترات نقره بر آنزیم‌های کبدی و میزان بیان ژن P_{450} ماهی کپور در غلظت تحت کشنده نیترات نقره بررسی می‌شود (Hedayati *et al*., 2013).

کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در بیش‌تر حوضه‌های آبریز ایران پراکنش دارد. این ماهی مهم‌ترین گونه پرورشی کشور می‌باشد و بسیاری از مزارع پرورش شمال کشور به تکثیر و پرورش آن اختصاص دارند (Metz *et al*., 2003). ماهی کپور معمولی یکی از گونه‌های مهم استخرهای پرورشی ماهیان گرم آبی است که حدود ۲۵ تا ۳۰ درصد کل ماهیان پرورشی در هر دوره را شامل می‌شود (Mesbah *et al*., 2016).

از آن‌جایی که حساسیت بیومارکرهای مختلف زیستی نسبت به انواع آلاینده‌ها در گونه‌های آبزیان متفاوت می‌باشد؛ امروزه مطالعات گسترده‌ای پیرامون شناسایی و چگونگی عملکرد بیومارکرها در حضور آلاینده‌های متعدد در گونه‌های مختلف آبزیان در حال انجام است. با توجه به این مطلب در این پژوهش به ارزیابی آنزیم‌های کبدی و شاخص‌های بیوشیمیایی و بیان ژن P_{450} در ماهی کپور معمولی به عنوان بیومارکر آلودگی غلظت تحت کشنده نیترات نقره پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

بچه‌ماهیان کپور معمولی با میانگین وزنی ۰/۳۳±۷ گرم تهیه و در شرایط آزمایشگاهی (نور طبیعی و تعویض مداوم آب) به مدت ۲ هفته جهت سازگاری نگهداری شدند. در شروع آزمایش بچه ماهیان به‌طور کاملاً تصادفی در ۱۲ آکواریوم با حجم ۵۰ لیتر تقسیم شدند. هر تانک شامل ۲۰ قطعه بچه ماهی کپور معمولی بوده که از نظر وزن اختلاف معنی‌داری نداشتند. برای هر کدام از گروه‌های تیمار و شاهد ۳ تکرار در نظر گرفته شد. سایر شرایط هوادهی، نور و دما برای همه آکواریوم‌ها یکسان‌سازی شد (Holbech *et al*., 2001). جهت بررسی اثرات نیترات نقره بر شاخص‌های بیوشیمیایی ماهی کپور، ماهیان تحت‌تأثیر ۳ غلظت مختلف از محلول نیترات

نقره قرار گرفتند و یک گروه به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. انتخاب غلظت‌ها، با توجه به مدت زمان آزمایش و پس از تعیین LC_{50} (سمیت کشندگی حاد) صورت گرفت. LC_{50} نیترات نقره مورد استفاده در مدت ۹٦ ساعت ٤/۵۵ میکروگرم بر لیتر بود. غلظت‌های مؤثر نیترات نقره به ترتیب بر اساس درصدهای LC_{50} (۰/۰۵٪، ۰/۱۵٪ و ۰/۲۵٪ LC_{50}) برابر با ۰/۲۳، ۰/٦۸ و ۱/۱۳ میکروگرم بر لیتر بودند و مدت زمان آزمایش ۱٤ روز در نظر گرفته شده بود. شرایط فیزیکوشیمیایی آب به طور روزانه کنترل می‌شد. هم‌چنین جایگزینی آب به صورت یکروز در میان با سیفون کردن از کف به اندازه ۵۰ درصد حجم آب انجام می‌گرفت. در صورت مشاهده هر گونه مرگ و میر، اطلاعات ثبت می‌شد.

جهت انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی به دلیل کوچک بودن اندازه ماهی و امکان‌پذیر نبودن خونگیری از کل بدن ماهی استفاده شد. به این صورت که در شرایط کاملاً استریل بعد از بیهوش کردن ماهی با پودر گل میخک با دوز ppm ۲۰۰۰، سر و باله‌های ماهی جدا شده و به تیوپ استریل انتقال داده شد و به نسبت ۱:۳ سرم فیزیولوژی ۰/۰۹ درصد به آن‌ها اضافه شد و سپس هموژن شدند و با دور ۱۰۰۰۰rpm در دمای ٤ درجه سیلسیوس به‌مدت ۱۵ دقیقه در سه مرحله سانتریفیوژ شدند؛ فاز رویی برداشته و به تیوپ دیگر انتقال داده شد (Holbech *et al.*, 2001). شاخص‌های مورد اندازه‌گیری شامل: پروتئین کل، ایمنوگلوبولین کل و آلبومین بود که به روش اسپکتروفتومتری و بر اساس طول موج‌های خاص تعیین شده توسط شرکت سازنده کیتزیست شیمی ایران و با توجه به پروتکل‌های پیشنهاد شده محاسبه شد.

به منظور بررسی بیان ژن P_{450}، ماهی‌ها پس از صید با استفاده از گل میخک بیهوش و کشته شدند و بلافاصله کبد و آبشش آن‌ها به منظور بررسی سطوح بیان P_{450} به سرعت جدا و در ازت مایع قرار گرفت و سپس در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. نمونه‌گیری با سه تکرار در روز ۱٤ انجام گرفت و پس از اتمام کار نمونه‌گیری، استخراج RNA از ۵۰ میلی‌گرم نمونه بافت کبد، آبشش با استفاده از کیت استخراج RNX-Plus انجام شد. جهت ارزیابی کیفی و کمی RNA استخراج شده به‌ترتیب از دستگاه الکتروفورز، ژل آگاروز ۱٪ و هم‌چنین دستگاه نانودراپ یا بایوفتومتر استفاده شد. سنتز cDNA با استفاده از مستر میکس سنتز cDNA شرکت جینت بایو محصول کشور کره و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. ۵ ماکرولیتر از RNA که قبلاً آماده شده به همراه ۱ ماکرولیتر از آغازگز الیگو به تیوب‌های جدید اضافه شد و با آب عاری از نوکلئاز به حجم ۱۰ ماکرولیتر مستر حاوی آنزیم ریورس ترانسکریپتاز به آن اضافه شد. در نهایت با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ٦۰ دقیقه و ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد و سپس محلول حاوی cDNA به حجم ۲۰ ماکرولیتر به دمای ۸۰- منتقل شد. آغازگرهای مورد استفاده در این آزمایش از مطالعات قبلی گرفته شده و با نرم‌افزار بایو ادیت با استفاده از توالی‌های موجود در بانک ژن آزموده شدند و با آزمایش کردن در دستگاه PCR بهترین دما برای تکثیر به‌دست آمد. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده شده است. به‌منظور اطمینان از بهینه بودن شرایط Real time PCR، سری غلظت‌های مختلف (۱/۱۰، ۱/۲۰، ۱/۵۰، ۱/۱۰۰ و ۱/۲۰۰) از نمونه‌های cDNA مخلوط از تیمارهای متفاوت هر پلیت تهیه و با هر دو آغازگر هدف و رفرنس در ٤ تکرار تکثیر شدند و جهت تخمین کارایی و تکرارپذیری آزمایش برای هر آغازگر منحنی استاندارد ترسیم شد و کارایی برای هر آغازگر ارزیابی گشت.

جدول ۱- توالی آغازگرهای استفاده شده برای بچه‌ماهیان کپور معمولی مواجهه شده با غلظت تحت کشنده نیترات نقره.

ژن	پرایمر (′3-′5)	اندازه محصول (bp)
P_{450}	CGTCGGAATCGTCAATGACCT AGACGTACAGTGAGGAATGGTGAA	۲۵۳
Beta actine	CCCTGCATGGATGTGTGGAT GGGTGACACCATCACCAGAG	۱۸۹

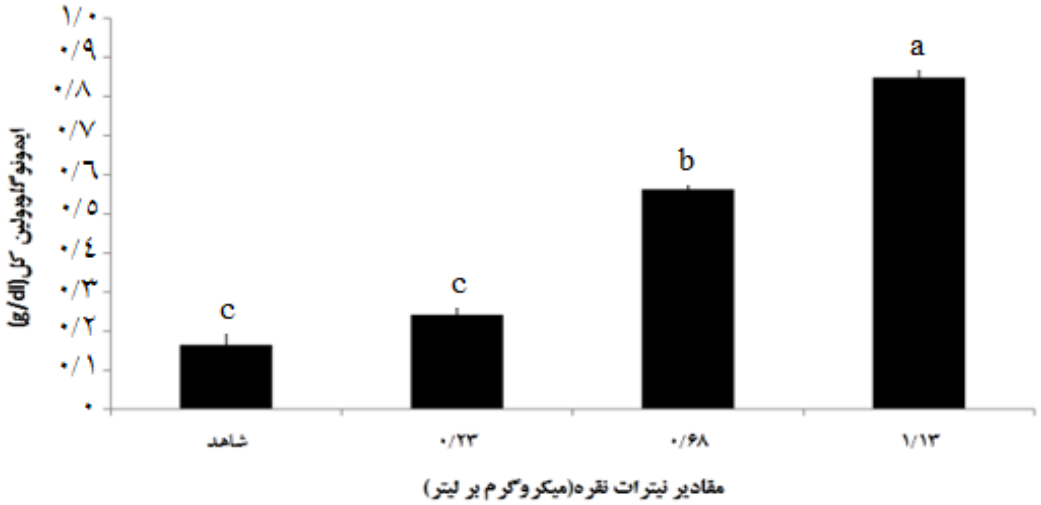
این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گردید. Ct به دست آمده برای ژن P_{450} با استفاده از فرمول $^{-\Delta\Delta ct}$۲ در فضای نرم افزار اکسل تبدیل به بیان نسبی ژن‌های مورد نظر نسبت به ژن رفرنس بتا اکتین گردید (Pfaffl *et al*., 2002). عدد به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۰ مرتب و نمودارهای آن رسم شد. هم‌چنین نرمال بودن داده ها با استفاده از آزمون کلموگراف اسمیرنف و همگن بودن واریانس داده‌ها با آزمون لون (Levene) (SPSS: 16.00) بررسی گردید. پس از تعیین محقق بودن شرط نرمال بودن داده‌ها، اختلاف بین تیمارها از طریق آنالیز واریانس یک طرفه One-way-ANOVA و اختلاف میانگین داده‌ها از طریق آزمون دانکن در سطح معنی‌داری (P<۰/۰۵) و با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۶ بررسی گردید.

نتایج

تأثیر سطوح مختلف تحت کشنده نیترات نقره بر میزان پروتئین کل در ماهی کپور معمولی در شکل ۱ آمده است. میزان پروتئین کل با افزایش میزان غلظت‌های تحت کشنده در تیمارهای دو و سه به‌صورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد کاهش یافت (P<۰/۰۵) اما در تیمار یک اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

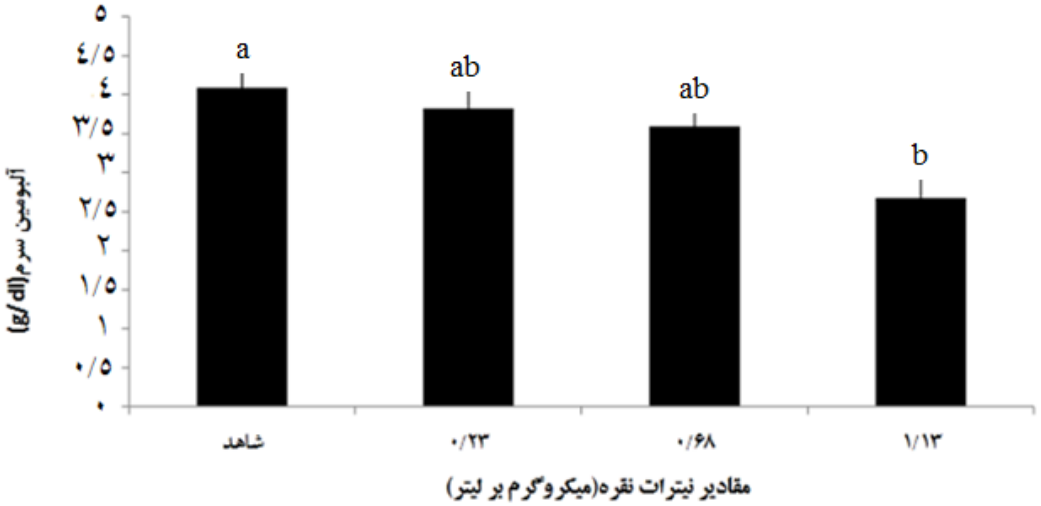
شکل ۱- تأثیر سطوح مختلف تحت کشنده نیترات نقره بر میزان پروتئین کل بر حسب گرم بر دسی‌لیتر در ماهی کپور معمولی.
حروف انگلیسی غیر مشترک نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۰/۰۵ در بین تیمارها می‌باشد (*P*<۰/۰۵).

تأثیر سطوح مختلف تحت کشنده نیترات نقره بر میزان ایمنوگلوبولین کل در ماهی کپور معمولی در شکل ۲ آمده است. میزان ایمنوگلوبولین کل با افزایش میزان غلظت‌های تحت کشنده افزایش یافت (P<۰/۰۵). بیش‌ترین میزان ایمنوگلوبولین کل در تیمار سه مشاهده شد که با گروه شاهد و سایر تیمارها اختلاف معنادار داشت (P<۰/۰۵).



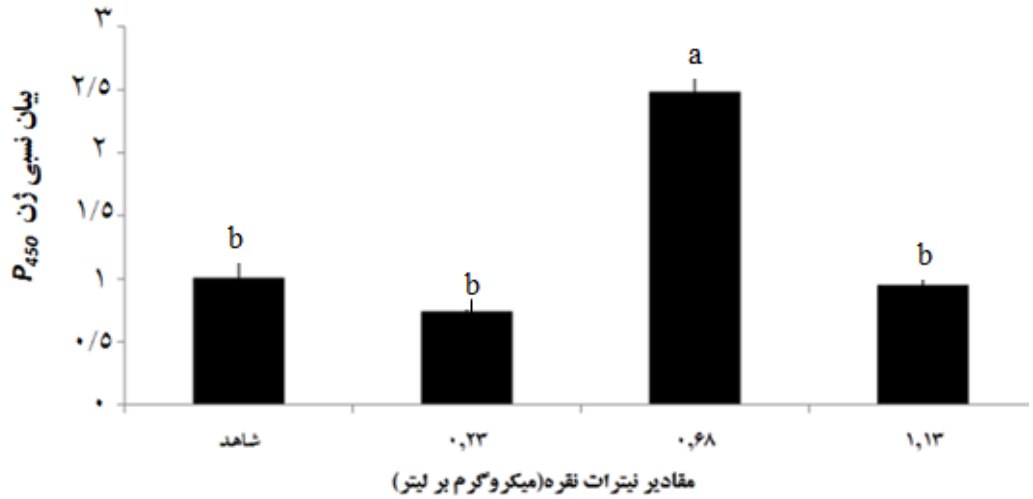
شکل ۲- تأثیر سطوح مختلف تحت کشنده نیترات نقره بر میزان ایمنوگلوبولین کل بر حسب گرم بر دسی‌لیتر در ماهی کپور معمولی.
حروف انگلیسی غیرمشترک نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۰/۰۵ در بین تیمارها می‌باشد (P<۰/۰۵).

تأثیر سطوح مختلف تحت کشنده نیترات نقره بر میزان آلبومین در ماهی کپور معمولی در شکل ۳ آمده است. میزان آلبومین با افزایش میزان غلظت‌های تحت کشنده در تیمار سه به صورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد کاهش یافت (P<۰/۰۵)؛ اما، در تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد مشاهده نشد (P>۰/۰۵).



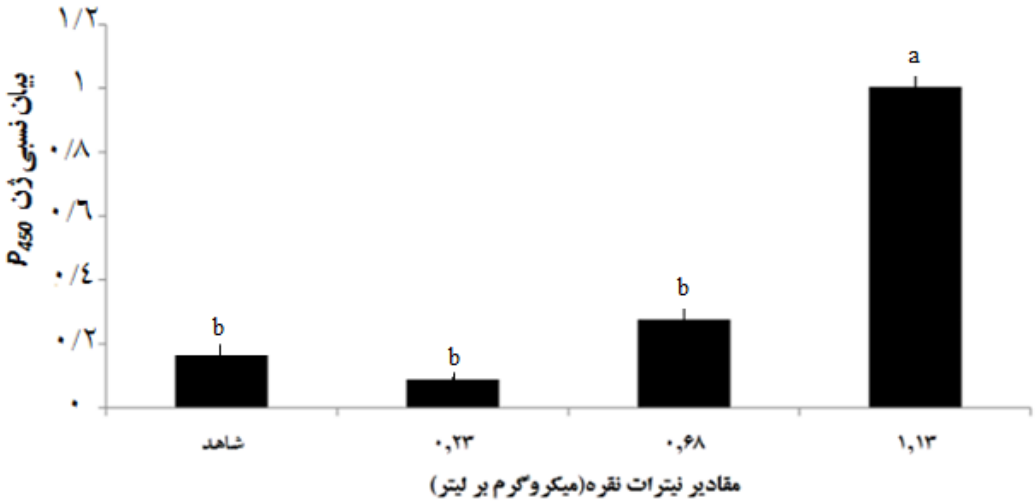
شکل ۳- تأثیر سطوح مختلف تحت کشنده نیترات نقره بر میزان آلبومین بر حسب گرم بر دسی‌لیتر در ماهی کپور معمولی.
حروف انگلیسی غیر مشترک نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۰/۰۵ در بین تیمارها می‌باشد (P<۰/۰۵).

تأثیر سطوح مختلف تحت کشنده نیترات نقره بر میزان بیان ژن P_{450} در کبد ماهی کپور معمولی در شکل ٤ آمده است. با توجه به شکل مشخص گردید که میزان بیان ژن P_{450} با افزایش میزان غلظت‌های تحت کشنده در تیمار دو به صورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش یافت (P<۰/۰۵)؛ اما، در بقیه تیمارها اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه شاهد مشاهده نشد (P>۰/۰۵).



شکل ٤- تأثیر سطوح مختلف تحت کشنده نیترات نقره بر میزان بیان ژن P_{450} در کبد ماهی کپور معمولی.
حروف انگلیسی غیر مشترک نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۰/۰۵ در بین تیمارها می‌باشد (P<۰/۰۵).

تأثیر سطوح مختلف تحت کشنده نیترات نقره بر میزان بیان ژن P_{450} در آبشش ماهی کپور معمولی در شکل ۵ آمده است. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌گردد، میزان بیان ژن P_{450} با افزایش میزان غلظت‌های تحت کشنده در تیمار سه به‌صورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش یافت (P<۰/۰۵)؛ اما، در بقیه تیمارها اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه شاهد مشاهده نشد (P>۰/۰۵).



شکل ۵- تأثیر سطوح مختلف تحت کشنده نیترات نقره بر میزان بیان ژن P_{450} در آبشش ماهی کپور معمولی.
حروف انگلیسی غیر مشترک نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۰/۰۵ در بین تیمارها می‌باشد (P<۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعات آزمایشگاهی نشان‌دهنده خطر بالقوه سموم در محیط‌های آبی می‌باشد. داده‌های حاصل از آزمایشات سم‌شناسی نشان‌دهنده تأثیرات وارد شده از سوی این سموم بر جمعیت ماهیان است (Francisco *et al.*, 1994). این مطالعه به منظور بررسی تأثیر غلظت‌های تحت کشنده سم نیترات نقره بر شاخص‌های بیوشیمیایی ماهی کپور معمولی انجام شد. این نکته قابل ذکر است که اندازه‌گیری و تفسیر پارامترهای بیوشیمیایی خون ماهیان در حالت مسمومیت‌ها کار بسیار دشواری می‌باشد که می‌تواند متأثر از عوامل مختلفی مثل: pH، سختی آب، حساسیت گونه‌ای، شکسته شدن اولین سد دفاعی بدن (پوست) و یا آسیب آبشش و غیره باشد. اکثر ماهیان نسبت به محیط اطراف هیپراسموتیک یا هیپواسموتیک می‌باشند و این مسأله در آسیب‌های جلدی موجب خروج و یا ورود حجم زیادی از آب به بافت بدن می‌گردد به‌طوری‌که در مسمومیت‌ها برخی از آنزیم‌ها دچار تغییرات شدید می‌شوند که معمولا با کاهش همراه می‌شوند (Poleski and Karan, 1999)

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که با افزایش غلظت‌های تحت کشنده نیترات نقره میزان پروتئین کل در تیمار دو و سه کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشت. هم‌چنین مقدار آلبومین نیز با افزایش غلظت‌های تحت کشنده نیترات نقره در تیمار سه کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد نشان داد؛ هم‌چنین، مقدار ایمنوگلوبولین کل با افزایش غلظت‌های تحت کشنده نیترات نقره افزایش یافت که اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد در آن مشاهده شد. پروتئین‌های خون به جز ایمنوگلوبولین‌ها در کبد ساخته می‌شوند. با توجه به اثر تخریبی سموم در بافت کبد، ساخت پروتئین‌ها و به خصوص مهم‌ترین آن‌ها یعنی آلبومین کاهش می‌یابد، افزون بر این‌ها، در اثر استرس ناشی از مسمومیت، تغذیه ماهی کاهش یافته که این مسأله خود در کاهش پروتئین کل نقش دارد که نتایج حاصل مطابق با نتایج به دست آمده از پژوهش‌های دیگر می‌باشد. از این‌رو می‌توان به پژوهش Gopal و همکاران (۱۹۹۷) در ارتباط با اثر فلزات سنگین بر سطوح پروتئین خون ماهی کپور معمولی به‌عنوان یک شاخص زیستی استرس‌زا اشاره کرد؛ نتایج نشان داد که سطوح پروتئین کل و ایمنوگلوبولین سرم خون ماهیان از ساعت ۲۰-۲ افزایش و سپس تا ساعت ۷۲ کاهش یافت. آن‌ها دریافتند که هر دو غلظت کشنده و تحت کشنده فلزات سنگین روند مشابهی را نشان دادند و بیان داشتند که اندازه‌گیری سطوح پروتئین و آلبومین به‌عنوان یک شاخص پاسخ به عوامل استرس‌زای محیطی مطرح می‌باشد. هم‌چنین، Nazifi و همکاران (۲۰۰۰) اعلام کردند تری کلروفن سبب کاهش میزان پروتئین کل و آلبومین در کپور نقره‌ای گردید؛ ولی، میزان ایمنوگلوبولین تغییری نکرد که نتایج حاصل از آن مشابه نتایج پژوهش حاضر می‌باشد. Adedeji (۲۰۱۰) گزارش داد دیازینون سبب کاهش میزان پروتئین کل و آلبومین خون در گربه ماهی آفریقایی (*Clarias batrachus*) گردید. از سویی دیگر، ثابت گردیده که پارامترهای سیستم ایمنی غیراختصاصی مانند فعالیت لیزوزیم و ایمنوگلوبین به طور عمومی برای سنجش اثر مواد افزودنی بر ایمنی به کار می‌رود (Lin and Shian, 2005a,b; Puangkaew et al., 2004). Mohseni و Sotudeh (۲۰۱۲) با بررسی اثر سطوح مختلف سلنیوم جیره غذایی بر روند رشد و استرس اکسیداتیو بچه فیل‌ماهیان پرورشی تغذیه شده با سطوح بالای مس بیان کردند که سطح ایمنوگلوبین ماهیان تغذیه شده با مس و تحت تیمار با سلنیوم کاهش یافت، اما در گروه شاهد بالاترین میزان ایمنوگلوبین مشاهده شد؛ که این امر نشان‌دهنده

واکنش سیستم ایمنی بدن در مقابله با شرایط استرس‌زا می‌باشد که با نتایج حاصل از پژوهش حاضر مطابقت داشت.

آنزیم سیتوکروم P_{450} نوعی هموپروتئین است که در سطح بالایی در کبد وجود دارد؛ ولی، در بافت‌های دیگر مانند: آبشش، کلیه، روده نیز گزارش شده است (Itakura *et al.*, 2005). در یوکاریوت‌ها این پروتئین با غشا شبکه اندوپلاسمیک و میتوکندری در ارتباط می‌باشد. این آنزیم جز آنزیم‌های اکسایشی است که در فاز اول متابولیسم آلاینده‌ها تولید می‌گردد و میزان آن متأثر از گونه مورد بررسی، جنسیت، نوع و غلظت و مدت مواجهه با آلاینده و حتی بافت مورد بررسی می‌باشد (Huang *et al.*, 2014). نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که بیان ژن P_{450} در هر دو بافت کبد و آبشش در روز ١٤ پس از مواجهه با سم نیترات نقره به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. گزارش‌های متفاوتی از تغییرات افزایشی یا کاهشی بیان ژن P_{450} در گونه‌های مختلف آبزیان در مواجهه با آلاینده‌های آلی، آفت‌کش‌ها و فلزات سنگین ارائه شده است (Dong *et al.*, 2013; Dong *et al.*, 2009; Dong *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2008). Dong و همکاران (٢٠٠٩) افزایش بیان ژن P_{450} را در ماهی زبرا در مواجهه با سم اندوسولفان گزارش کردند، هم‌چنین Zhang و همکاران (٢٠١٢) در بررسی بیان ژن P_{450} در مواجهه ٤ روزه با کادمیوم افزایش دو برابری بیان ژن را در غلظت‌های ١٠ میکروگرم بر لیتر نسبت به ٤٠ میکروگرم بر لیتر در روز دوم مواجهه گزارش نمودند. بسیاری از مواد آلاینده مانند: فلزات سنگین و سموم با تولید گونه‌های فعال اکسیژن، اثرات سمی بر سلول‌ها گذاشته و موجب نابودی مولکول‌های زیستی مانند: پروتئین، لیپید و DNA می‌گردند. اولین واکنش سلول به این شرایط تنش‌زا و استرسی تولید یکسری آنزیم‌های اکسایشی مانند P_{450} و آنتی‌اکسیدانتی می‌باشد که در صورت ادامه یافتن شرایط تنش منجر به مختل شدن متابولیسم طبیعی و نهایتاً مرگ سلول می‌گردد. افزایش بیان ژن P_{450} مشاهده شده در روز چهاردهم احتمالاً به علت کاهش میزان Ca^{+} ذخیره سلولی است؛ زیرا کاهش Ca^{+} منجر به باز شدن کانال‌های کلسیمی و در نتیجه افزایش ورود نقره به سلول‌های آبشش می‌گردد که می‌تواند سبب افزایش بیان ایزوفرم P_{450} *CYP1A* گردد. از آن‌جایی‌که ذخایر کلسیمی سلول مصرف شده کانال‌های کلسیمی بسته نمی‌شود و ورود نقره در تیمارهای بعدی ادامه می‌یابد و احتمالاً با افزایش زمان مواجهه هم‌چنان افزایش بیان ادامه داشته باشد.

به طور کلی این پژوهش نشان داد که نیترات نقره اثر سمیت شدیدی بر ماهی کپور معمولی داشته و حساسیت این گونه نسبتاً بالا می باشد. غلظت‌های مختلف تحت کشنده نیترات نقره می‌تواند بر فعالیت شاخص‌های مورد بررسی در ماهی کپور معمولی اثر معنی‌داری گذاشته و هم‌چنین باعث اختلال در شاخص‌های بیوشیمیایی خون در صورت مواجهه با سم نیترات نقره شود. در بین تیمارهای آزمایش تیمار سه بیش‌ترین تأثیر را بر شاخص‌های سرمی داشته است. در مجموع می‌توان بیان نمود که نیترات نقره اثرات سمی شدیدی بر ماهی کپور معمولی دارد که می‌تواند اثرات خطرناکی روی موجودات آبزی و محیط زیست آن‌ها ایجاد کند و با توجه به غلظت کشنده این فلز (٤/٥٥ میکروگرم بر لیتر)، حداکثر غلظت مجاز در اکوسیستم‌های آبی ٠/٤٥ میکروگرم بر لیتر پیشنهاد شد.

منابع

Adedeji, O.B. 2010. Acute effect of diazinon on blood plasma biochemistry in the African catfish (*Clariasgariepinus*). Journal of Clinical Medicine and Research, 2(1): 1-6.

Bhagwant, S., and Bhikagee, M. 2000. Induction of hypochromic Macrocytic *Anemiain Oreohromis* hybrid (Cichlidae) exposed to 100 mg/L (sub lethal dose) of Aluminum. Science and Technology-Research Journal, 5(1): 9-20.

Boenigk, J., Beisser, D., Zimmermann, S., Bock, C., Jakobi, J., Grabner, D., and Sures, B. 2014. Effects of silver nitrate and silver nanoparticles on a planktonic community: general trends after short-term exposure. PloS one, 9(4): 95340.

Dong, M., Zhu, L., Shao, B., Zhu, S., Wang, J., Xie, H., Wang, J., and Wang, F. 2013. The effects of endosulfan on cytochrome P_{450} enzymes and glutathione S-transferases in zebrafish (*Danio rerio*) livers. Ecotoxicology and environmental safety, 92: 1-9.

Dong, X., Zhu, L., Wang, J., Wang, J., Xie, H., Hou, X., and Jia, W. 2009. Effects of atrazine on cytochrome P_{450}enzymes of zebrafish (*Danio rerio*). Chemosphere, 77(3): 404-412.

Esmaeeli, A. 2007. The cycle of heavy elements lead, mercury, cadmium and how it is absorbed and its effects on aquatic animals. Proceedings of the First National Conference on the Proper Exploitation of Aquatic Reserves in the Persian Gulf and the Sea of Oman. Fisheries Joint Stock Company, pp. 269-277. (In Persian)

Francisco, A.A., Eugenio, L., and Megdalena, D.A. 1994. Acute toxicity of the herbicide glyposate to fish. Chemosphere, 28: 735-745.

Gholamian, S. 2004. Evaluation of copper toxicity effects on liver and measuring of crude protein and some blood serum emzymes in common carp (*Cyprinus carpio*). M.Sc. Thesis, pp. 5-8.

Gopal, V., Parvathy, S., and Balasubramanian, P.R. 1997. Effect of heavy metals on the blood protein biochemistry of the fish *Cyprinus carpio* and its use as a bio-indicator of pollution stress. Environmental monitoring and assessment, 48(2): 117-124.

Hedayati, A., Jahanbakhshi, A.R., and Ghaderi, F. 2013. Aquatic Toxicology. Gorgan University Press, First Edition, pp. 70-76. (In Persian)

Holbech, H., Andersen, L., Petersen, G.I., Korsgaard, B., Pedersen, K.L. and Bjerregaard, P. 2001. Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 130(1): 119-131.

Huang, G.Y., Ying, G.G., Liang, Y.Q., Liu, S.S., and Liu, U.S. 2014. Expression patterns of metallothionein, cytochrome P_{450} 1A and vitellogeningenesin westernmosquitofish (*Gambusia affinis*) in response to heavy metals. Ecotoxicology and Environmental Safety, 105: 97-102.

Itakura, T., Elkady, M., Mitsu, R., and Kaminishi, Y. 2005. Complementary DNA cloning and constitutive expression of cyticromeP_{450} ic1 in the gills off carp (*Cyprinus carpio*). Environmental Science, 12(2): 111-120.

Kim, J.H., Raisuddin, S., Ki, J.S., Lee, J.S., and Han, K.N. 2008. Molecular cloning and β-naphthoflavone-induced expression of a cytochrome P_{450} 1A (*CYP1A*) gene from an anadromous river pufferfish, *Takifuqu obscurus*. Marine pollution bulletin, 57(6-12): 433-440.

Lin, M.F., and Shiau, S.Y. 2005a. Requirements of vitamin C (L-ascorbyl-2-sulfate and L-ascorbyl-2-polyphosphate) and its effects on nonspecific immune responses of grouper, *Epinephelus malabaricus*. Aquaculture Nutrition, 11: 183-189.

Lin, Y.H., and Shiau, S.Y. 2005b. Dietary vitamin E requirements of grouper, *Epinephelus malabaricus*, under two lipid levels, and their effects on immune responses. Aquaculture, 248: 235-244.

Mesbah, M., Mohammadi, G.A., Khajeh, Gh., and Mombenni, A. 2016. Evaluation of physical and biochemical

characteristics of farmed common carp melt of Khuzestan province in winter season. Iranian veterinary journal, 12 (4): 10-17. (In Persian)

Metz, J.R., Van Den Burg, E.H., Bonga, S.E.W., and Flik, G. 2003. Regulation of bronchial Na+/K+-ATPase in common carp *Cyprinus carpio* L. acclimated to different temperatures. Journal of Experimental Biology, 206(13): 2273-2280.

Mohseni, M., and Sotudeh, A.M. 2012. The effects of dietary selenium on the oxidative stress of beluga, *Huso huso*, fed high copper. Iranian Scientific Fisheries Journal, 21(4): 105-114. (In Persian)

Nazifi, S., Firoozbakhsh, F., and Blouki, M. 2000. Evaluation of serum biochemical parameters in experimental intoxication with trichlorofon in silver carp (*Hypophthalmichthysmolitri*). Journal of Veterinary Research, 55(2): 55-60. (In Persian)

Puangkaew, J., Kiron, V., Somamoto, T., Okamoto, N., Satoh, S., Takeuchi, T., and Watanabe, T. 2004. Nonspecific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) in relation to different status of vitamin E and highly unsaturated fatty acids. Fish and Shellfish Immunology, 16: 25-39.

Poleski, V., and Karan, V. 1999. Effects of trifluraline on carp: biochemical and histological evaluation. Ecotocxicol Enviro, 42(2): 213:21.

Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., and Dempfle, L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Research, 30: 1-10.

Safari, R., Shabani, A., and Imanpour, M.R. 2015. Effect of sub lethal doses of CdCL2 on some blood parameters of stress in Juveniles of *Asipencerpersicus*. Journal of Animal Environment. 6(4): 6576. (In Persian)

Satheeshkumar, P., Ananthan, G., Senthilkumar, D., Khan, A.B., and andJeevanantham, K. 2012. Comparative investigation on haematological and biochemical studies on wild marine teleost fishes from *Vellar estuary*, southeast coast of India. Comparative Clinical Pathology, 21(3): 275-281.

Shahsavani, D., Mehri, M., and Nazari, K. 2003. A study of effects of anionic detergent (shampoo) on blood parameters of gold fish (*Carassius auratus*). Pajuhesh and Sazandegi, 61: 99-103. (In Persian)

Shalaby, A.M., Khattab, Y.A., and Abdel-Rahman, A.M. 2006. Effects of garlic Allium sativum and chloramphinicol on growth performance, physiological parameters and survival of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, 12(2): 172-201.

Shokohi, R., Ehsani, H.R., and Tarlani Azar, M. 2014. Removal of Lead and Cadmium by Coral Limestone Granules of Aquatic Solutions. Journal of Environmental Science and Technology, 16(1): 109-121. (In Persian)

Tarbali, N., Bahavar, M., Einollahi, N., and Nabatchian, F. 2013. Evaluation of Silver nitrate effect on horseradish peroxidase enzyme. Feyz, 16 (7): 713-714. (In Persian)

Valarmathi, S., and Azariah, J. 2003. Effect of copper chloride on the enzyme activities of the crab *Sesarma quadratum* (Fabricus). Turkish Journal of Zeology, 27: 253256.

Yahya, M.T., Straub, T.M., and Gerba, C.P. 1992. Inactivation of coliphage MS-2 and poliovirus by copper, silver, and chlorine. Canadian journal of microbiology, 38(5): 430-435.

Zhang, L., Gan, J., Ke, C., Liu, X., Zhao, J., You, L., and Wu, H. 2012. Identification and expression profile of a new cytochrome P_{450} isoform (*CYP414A1*) in the hepatopancreas of Venerupis (Ruditapes) philippinarum exposed to benzo [a] pyrene, cadmium and copper. Environmental toxicology and pharmacology, 33(1): 85-91.