

اثر غلظت‌های تحت‌کشنده نانوذرات نقره و نیترات نقره بر بیان ژن HSP70 و آسیب‌های بافت‌های آبشش، کبد و روده در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio* L.)

- **خیراله خسروی‌کتولی:** گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران
- **علی شعبانی*:** گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران
- **حامد کلنگی‌میاندراه:** گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران
- **محمد رضا ایمانپور:** گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۶

چکیده

در این مطالعه به منظور بررسی اثرات نقره بر ماهی کپور معمولی، ماهیان در معرض غلظت‌های تحت حاد نانوذرات نقره و نیترات نقره قرار گرفتند. برای این منظور ابتدا غلظت حاد ۵۰٪ و ۹۶ ساعته برای نانوذرات نقره و نیترات نقره به دست آمد و سپس ماهیان به مدت ۲۱ روز در معرض غلظت‌های تحت حاد قرار (۰/۰۴ و ۰/۰۸ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره و ۰/۰۲۵ و ۰/۰۴۵ میلی‌گرم در لیتر نیترات نقره) گرفتند و شاخص‌های مورد نظر اندازه‌گیری قرار گرفت. پس از در معرض قرارگیری با دو شکل نقره، عوارض مختلفی در بافت‌ها مشاهده گردید از مهم‌ترین آن‌ها می‌شود به درخواستگی اپی‌تلیالی، کوتاهی و ریختگی لاملاهای ثانویه آبشش، تخریب و نکروز شدن هسته و هایپرتروف شدن هپاتوسیت‌های کبد و همچنین تخریب ساختار پرزهای روده و تورم آن‌ها اشاره کرد. نتایج این مطالعه نشان داد که در معرض گذاری بلندمدت با نانوذرات نقره باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن Hsp70 شد و پس از در معرض قرارگیری ماهیان کپور معمولی با نیترات نقره نیز، ژن Hsp70 به شدت افزایش پیدا کرد اما اختلافی بین دو ژن از نظر بیان ژن مشاهده نگردید. همچنین بیش‌ترین تاثیرات مشاهده شده در بین بافت‌های بررسی شده در این مطالعه، در کبد ماهیان در معرض قرار گرفته با دو شکل نقره و در بالاترین غلظت مشاهده گردید و اختلافی از نظر سم‌شناسی بین دو شکل نقره مشاهده نگردید.

کلمات کلیدی: ماهی، نانوذرات و نیترات نقره، بافت‌شناسی، بیان ژن



مقدمه

امروزه نانو فناوری نقش مهمی را در صنعت، بهداشت، بیوتکنولوژی و کشاورزی بازی می‌کند و کاربردهای فراوانی در انتقال دارو، تشخیص بیماری، انتقال ژن و لوازم الکتریکی و صنعتی دارند (Mishra و همکاران، ۲۰۱۳؛ Khosravi-Katuli و همکاران، ۲۰۱۷). مطالعات زیادی سمی بودن نانوذرات را روی موجودات مختلف نشان داده‌اند و با توجه به کاربردهای فراوان نانوذرات که روزبه‌روز بر سرعت توسعه و استفاده از آن‌ها نیز افزوده می‌شود، به نگرانی‌های مربوط به سلامت انسان و محیط نیز افزوده می‌شود (Klaper و Lovern، ۲۰۰۶) به طوری که در بسیاری از کشورها مراکزی را مخصوص مطالعه اثرات منفی این نانوذرات به وجود آورده‌اند. نانوذرات نقره با توجه به ویژگی‌هایی که دارند، در بسیاری از زمینه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (Madhumathi و همکاران، ۲۰۱۰؛ Wilkinson و همکاران، ۲۰۱۱). از مهم‌ترین ویژگی‌های این نانوذرات می‌توان به خواص ضد میکروبی آن‌ها اشاره کرد که هم در منازل و هم در آبی‌پروری مورد استفاده قرار می‌گیرند (Li و همکاران، ۲۰۱۱؛ Khosravi-Katuli و همکاران، ۲۰۱۷). به‌رغم استفاده و به‌دنبال آن احتمال ورود این مواد به محیط‌های آبی و خطرات جانی کاربرد آن، هنوز ابهامات زیادی برای تعیین اثرات آن‌ها به‌خصوص در سطح سلولی-مولکولی موجودات زنده وجود دارد. در مطالعات مواجهه آبزیان با غلظت‌های متفاوت این فلز پاسخ‌های متعددی از جمله آسیب‌های بافتی، تغییرات آنزیمی، تغییرات پارامترهای خون‌شناسی، ژنتیکی، رفتاری، تولیدمثلی و حتی مرگ در گونه‌های مختلف گزارش شده‌است (Nair و همکاران، ۲۰۱۱؛ Ringwood و همکاران، ۲۰۱۰؛ Scown و همکاران، ۲۰۱۰؛ Völker و همکاران، ۲۰۱۵) که از این تغییرات می‌توان به‌عنوان نشانگرهای زیستی به‌منظور بررسی وجود و اثرات آلاینده‌ها استفاده نمود. پس از در معرض قرارگیری موجودات زنده با آلاینده‌های مختلف، تغییرات بیوشیمیایی و مولکولی به‌عنوان اولین تغییرات قابل اندازه‌گیری می‌توانند اطلاعات زیادی در رابطه با اثرات این مواد تنش‌زا در این موجودات در اختیار ما قرار دهند (Rose و همکاران، ۲۰۰۶). مطالعات نشان داده است که سلول در پاسخ به تنش‌هایی هم‌چون دمای بالا، فلزات سنگین و سموم، گروهی از پروتئین‌ها را سنتز می‌کنند که معروف‌ترین نوع آن‌ها، پروتئین‌های شوک حرارتی (Heat shock protein) می‌باشد (Schlesinger و همکاران، ۱۹۹۰؛ Tedeschi و همکاران، ۲۰۱۵). انواع مختلفی از Hsp وجود دارد که Hsp70 معروف‌ترین نوع آن‌ها می‌باشد.

ژن Hsp70 در شرایط بدون تنش نیز بیان می‌شود، ولی در شرایط تنش میزان بیان ژن این پروتئین افزایش می‌یابد و با اتصال به پروتئین‌های هدف به حفظ ساختار آن‌ها کمک می‌نماید. بنابراین تغییر میزان بیان آن می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر زیستی برای هر کدام از تغییرات از جمله آلودگی با سموم به‌شمار آید (Bauer و همکاران، ۲۰۱۳؛ Li و همکاران، ۲۰۱۴؛ Tedeschi و همکاران، ۲۰۱۵). بافت‌شناسی به‌عنوان روشی ساده و مطمئن برای بررسی اثرات مضر مواد مختلف بر سلامت موجودات زنده کاربردهای فراوانی دارد (Cengiz و همکاران، ۲۰۰۶) و در واقع از تغییرات مختلف بافتی جهت پایش وضعیت سلامت موجودات در معرض قرار گرفته با آلاینده‌ها استفاده می‌شود. با توجه به نقش حیاتی آبشش در ماهیان و هم‌چنین موقعیت خارجی این بافت در بدن آن‌ها، در بسیاری از مطالعات از طریق بافت‌شناسی این بافت، میزان تأثیرات آلاینده‌ها را بر شرایط تنفسی و سلامتی ماهیان راتعیین کرده‌اند. تغییرات بافت‌شناسی کبد هم به‌عنوان بافتی که در سم‌زدایی در موجودات در معرض قرار گرفته با آلاینده‌ها نقش دارد، در مطالعات سم‌شناسی بسیاری به‌عنوان شاخص سلامت موجودات در برابر آلاینده‌ها مورد بررسی قرار گرفته است (Stehr و همکاران، ۲۰۰۴). روده به‌عنوان اندام گوارشی که محل تجمع آلاینده‌های مختلف می‌باشد و در مطالعات زیادی مورد بررسی قرار گرفته‌است (Fanta و همکاران، ۲۰۰۳؛ Sminth و همکاران، ۲۰۰۷). کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) متعلق به خانواده کپور ماهیان (Cyprinidae) می‌باشد و امروزه در تمام نقاط دنیا از جمله اروپا، آسیا و آفریقا، آمریکا و استرالیا یافت می‌شود (Jester و همکاران، ۱۹۷۴) و در ایران نیز به‌صورت بومی در دریای خزر وجود دارد (Bajer و همکاران، ۲۰۱۰). با توجه به جایگاه و اهمیت این گونه در چرخه غذایی دریای خزر و هم‌چنین اهمیت آن، هم به‌عنوان یک منبع غذایی و هم منبع درآمد، بسیار مورد توجه می‌باشد (Bajer و همکاران، ۲۰۱۰). با توجه به این که محیط‌های آبی مقصد نهایی بسیاری از آلاینده‌ها می‌باشد و از طرفی استفاده گسترده از نانو فن‌آوری در ایران و توسعه روزافزون این صنعت (Ghorshi Nezhad و همکاران، ۲۰۱۵)، احتمال ورود نانوذرات به محیط‌های آبی و ایجاد اثرات منفی در موجودات غیرهدف آبی را بالا برده است، به‌همین دلیل نیاز برای انجام مطالعات بیش‌تر جهت روشن شدن اثرات این نانوذرات بر جنبه‌های مختلف زندگی آبزیان ضروری به‌نظر می‌رسد. هدف از این مطالعه بررسی اثرات سم‌شناسی تحت حاد نانوذرات نقره بر بیان ژن Hsp70 و بافت‌شناسی بافت‌های



بافت‌ها در ازت مایع قرار گرفتند و سپس تا زمان سنجش بیان ژن‌ها، در دمای دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. به منظور بررسی تغییرات بافت‌شناسی، در روز ۲۱ از بافت‌های مختلف ماهیان نمونه‌برداری شد و سپس در دمای محلول فرمالین ۱۰٪ قرار گرفتند (Robert, ۱۹۸۹).

ارزیابی بیان نسبی ژن‌ها

استخراج RNA و سنتز cDNA: طبق دستورالعمل شرکت سازنده، برای تخلیص RNA کل، از ۱۰۰ میلی‌گرم بافت آبشش با استفاده از بافر (Bioflux-Bioer) BIOZOL استفاده شد. کمیت و کیفیت RNA با استفاده از اسپکتروفتومتری و ژل آگارز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت. DNA یا cDNA با استفاده از RNA استخراج شده، آنزیم Reverse- Transcriptase (Fermentase, France) و پرایمر Oligo-dt در حضور RNase inhibitor, (Fermentase, France) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده تهیه شد. برای طراحی پرایمر جهت انجام واکنش RT-qPCR برای ژن Hsp70 و Beta actin به ترتیب از توالی‌های جدول ۱ استفاده گردید.

جدول ۱: توالی پرایمرهای hsp70 و Bet actin

ژن	شماره دستیابی	آغازگرها: پیش‌رونده (forward) و پس‌رونده (reverse)
Hsp70	JN544930.1	F: GGCAGAAGGTGACAAATGCA R: TGGGCTCGTTGATGTTCTCA
Bet actin	M24113.1	F: CTCAAACATGATCTGTGTCAT R: AGACATCAGGGTGCATGTTGGT

cDNAهای سنتز شده با پرایمرهای ژن رفرنس (Bet actin) و هدف با استفاده از PCR استاندارد تکثیر و ارزیابی شدند. واکنش در حجم ۱۰ میکرولیتر انجام گرفت (۲/۵ میکرولیتر cDNA (۲ نانوگرم در میکرولیتر)، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر اختصاصی پیش‌رو و پس‌رو با غلظت ۱۰ پیکومول، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱X)، ۰/۱ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (۵۰)، ۲/۵ میکرولیتر MgCl₂ با غلظت (۵۰ mM) و ۰/۲ میکرولیتر dNTP با غلظت (۱۰ mM)). برنامه استفاده شده برای پرایمرها براساس دمای ذوب آن‌ها تنظیم گردید (Kolangi و همکاران، ۲۰۱۵). جهت اثبات تکثیر cDNA، محصول واکنش روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید (Kolangi و همکاران، ۲۰۱۵). به منظور اطمینان از بهینه بودن شرایط RT-PCR، سری غلظت‌های مختلف (۱/۵، ۱/۱۰، ۱/۲۰، ۱/۵۰، ۱/۱۰۰، ۲۰۰/۱، ۱/۱۰۰ و ۱/۵۰۰) از نمونه‌های cDNA مخلوط از تیمارهای متفاوت از بافت کبد تهیه و با هر دو پرایمر هدف و رفرنس در ۳ تکرار تکثیر شدند و منحنی استاندارد جهت تخمین کارایی (E) و تکرار پذیری آزمایش برای هر پرایمر ترسیم شد (Bustin

مختلف در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) بود و از تیمارهای نیترات نقره نیز به‌عنوان شاهد مثبت استفاده شد.

مواد و روش‌ها

نانوذرات نقره و نیترات نقره: نانوذرات نقره صنعتی از شرکت

نانونصب (تهران، ایران) خریداری شد. براساس اطلاعات شرکت سازنده، ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر نقره در محلول نانوذرات نقره وجود داشت. میانگین اندازه ذرات ۲۰ نانومتر و ذرات کروی شکل و خلوص بالای ۹۹٪ داشتند. پلت‌های نیترات نقره با خلوص بالای ۹۹٪ محصول شرکت سیگما (آلمان) خریداری شد. برای رسیدن به غلظت‌های مورد نظر، از آب مقطر برای رقیق‌سازی استفاده گردید.

مشخصات نانوذرات نقره: اندازه و سایر مشخصات نانوذرات

نقره خریداری شده از شرکت، در مطالعه Katuli و همکاران (۲۰۱۴a) به‌طور کامل مورد بررسی قرار گرفت که با توجه به نتایج، غلظت نانوذرات موجود در محلول ۳۸۵۶ میلی‌گرم در لیتر و پتانسیل زتا ۰/۱۵±۰/۵ میلی‌ولت بود. تعیین غلظت‌کنندگی متوسط براساس روش استاندارد شده سازمان توسعه و همکاری اقتصادی (OECD یا Organization for economic cooperation & development) راهنمای شماره ۲۰۳ تحت شرایط پایدار (Static) انجام پذیرفت و جهت انجام این آزمایش ۶ غلظت در نظر گرفته شد. غلظت‌های اسمی برای هر دو شکل نقره شامل ۰، ۰/۱، ۰/۱۲۵، ۰/۱۸۷، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر بود. قبل از ۲۴ ساعت از انجام این آزمایش، تغذیه ماهیان متوقف گردید. برای هر غلظت سه تکرار در نظر گرفته و در هر مخزن (تکرار) ۱۰ قطعه ماهی کپور به‌صورت تصادفی توزیع شد. تلفات ماهیان هر ۲۴ ساعت ثبت و جمع‌آوری شد و این کار تا انتهای ۹۶ ساعت (چهار روز) انجام پذیرفت. غلظت‌کنندگی متوسط با استفاده از آنالیز Probit انجام پذیرفت (هدایتی و همکاران، ۱۳۹۲). به‌منظور انجام مطالعه تحت حاد، ماهیان در معرض غلظت‌های ۰/۰۴ و ۰/۰۸ میلی‌گرم بر لیتر از نانوذرات نقره و ۰/۰۲۵ و ۰/۰۴۵ میلی‌گرم بر لیتر نیترات نقره به‌مدت ۲۱ روز قرار گرفتند. این غلظت‌ها براساس اطلاعات به‌دست آمده از قسمت قبلی آزمایش (حدود ۱۵ و ۳۰ درصد غلظت‌کنندگی متوسط) انتخاب شدند. جهت سنجش بیان ژن، نمونه‌برداری از بافت کبد در روزهای ۰ و ۲۱ از شروع آزمایش انجام گرفت و قبل از انجام نمونه‌برداری، ماهیان با استفاده از عصاره پودر گل میخک (۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) بی‌هوش شدند. پس از نمونه‌برداری،



ساعت و ۳۰ دقیقه گرین لایت، ۱۲-۳۰ ثانیه اسیداستیک ۱٪، ۱۳-۲ دقیقه الکل ۹۵٪، ۱۴-۴ دقیقه الکل ۱۰۰٪، ۱۵-۲ دقیقه بوتانول، ۱۶-۵ دقیقه گزین و ۱۷-۱۰ دقیقه گزین. در آخرین مرحله نیز لام‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری در بزرگ‌نمایی‌های ۱۰۰، ۴۰۰ و ۱۰۰۰ مورد بررسی قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل آماری: غلظت‌کشدگی متوسط با استفاده از آنالیز Probit انجام پذیرفت. نرمال بودن داده‌های خون‌شناسی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. برای بررسی اثر زمان و تیمار از آزمون آنالیز واریانس دوطرفه (Two-Way ANOVA) و دانکن انجام گرفت و سپس، آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) با آزمون تعقیبی چنددامنه دانکن برای بررسی اختلافات معنی‌دار بین تیمارها انجام گرفت. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (Chicago, version 19) و در سطح احتمال ۹۵ درصد ($P < 0.05$) در محیط ویندوز ۷ انجام گرفت.

نتیجه

غلظت متوسط کشدگی: تلفات ماهیان با افزایش غلظت نانوذرات نقره و نیترات نقره افزایش پیدا کرد، به طوری که بیش‌ترین تلفات در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر (در هر دو شکل نقره) مشاهده شد و حداقل تلفات نیز در گروه شاهد مشاهده گردید (جدول ۲). مقادیر LC₅₀ در ساعات ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ برای نانوذرات نقره به ترتیب شامل ۰/۴۳±۰/۰۷، ۰/۳۱±۰/۰۴، ۰/۲۹±۰/۰۸ و ۰/۲۹±۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر، و برای نیترات نقره شامل ۰/۳۸±۰/۰۲، ۰/۲۱±۰/۰۴، ۰/۱۶±۰/۰۷ و ۰/۱۵±۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر بود. همان‌طور که در بخش قبلی گفته شد، غلظت‌های تحت‌حاد براساس غلظت حاد ۹۶ ساعته به‌دست آمده در این قسمت از مطالعه انتخاب گردیدند که این مقادیر برای نانوذرات نقره شامل ۰/۰۴ و ۰/۰۸ میلی‌گرم در لیتر و برای نیترات نقره شامل ۰/۰۲۵ و ۰/۰۴۵ میلی‌گرم در لیتر بود.

بیان ژن hsp70: تاثیر نقره روی بیان نسبی ژن‌ها در ماهی کپور معمولی در شکل ۱ نشان داده شده است. هر دو فرم نقره روی ژن وابسته به استرس (hsp70) تاثیر داشتند به طوری که بیان نسبی ژن‌ها در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار بود ($P < 0.05$). همان‌طور که در شکل ۱، مشخص است، بیش‌ترین بیان ژن hsp70 پس از ۲۱ روز در بالاترین غلظت نانوذرات نقره و نیترات نقره غلظت نیترات نقره مشاهده شد ($P < 0.05$) (شکل ۱). هم‌چنین مقایسه بین غلظت‌های مشابه

و همکاران، ۲۰۰۹). واکنش RT-PCR بعد از بهینه‌سازی دما و مواد مصرفی، در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با استفاده از ۱ میکرولیتر پرایمرهای طراحی شده برای ژنهای Hsp70 و ژن رفرنس Beta actin، ۵ میکرولیتر از cDNA بافت کبد (۳ نمونه هر تکرار با هم مخلوط می‌شوند)، ۳ میکرولیتر آب و ۱۰ میکرولیتر کیت سایبر بیوپارس (دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان) براساس دستورالعمل استاندارد: در مرحله اول واکنش RT-PCR به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴°C و با ۴۰ چرخه در این دما در ۳۰ ثانیه انجام شده است. در مرحله بعد دما به ۵۶°C در مدت ۱۰ ثانیه کاهش یافت و پس از آن ۱۰ ثانیه در دمای ۷۲°C و در مرحله آخر به مدت ۷ دقیقه در این دما در دستگاه iQ5 شرکت بایورد و با استفاده از نرم‌افزار بایورد iQ5 اپتیکال (BioRad iQ5 optical system software version 2) در ۳ تکرار بیولوژیکی و ۳ تکرار تکنیکی انجام شد. میزان بیان ژن در دستگاه به صورت Ct ثبت شد. داده‌های به‌دست آمده جهت تعیین بیان نسبی ژن Hsp70 نسبت به Beta actin با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ مورد آنالیز قرار گرفتند.

بررسی آسیب‌های بافتی: در انتهای روز ۲۱، بخشی از بافت‌های آبشش، کبد و روده جهت مطالعات بافت‌شناسی در ظروف حاوی فرمالین ۱۰٪ نگه‌داری شد. به منظور نگه‌داری مناسب بافت، حجم فرمالین استفاده شده در این ظروف حدود ۵ برابر بافت موجود در ظرف بود و پس از ۲۴ ساعت فرمالین موجود در ظرف حاوی بافت‌ها، با فرمالین تازه جایگزین شد و بافت‌ها تا زمان ادامه مراحل بافت‌شناسی در همین محلول‌ها نگه‌داری شدند. در مرحله بعدی آگیری از بافت‌ها با استفاده از اتانول ۷۰٪ انجام گرفت و سپس با استفاده از گزین عمل شفاف‌سازی انجام پذیرفت. در ادامه مراحل، به منظور پر کردن حفرات به وجود آمده در بافت‌ها، از پارافین نرم (مرک، آلمان) در دمای ۶۰°C استفاده شد. در ادامه از بافت‌ها، قالب‌هایی برای قرارگیری در دستگاه میکروتوم تهیه شد و سپس با استفاده از دستگاه میکروتوم برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرون روی بافت‌ها تهیه شد. پس از قرارگیری برش‌ها روی لام‌ها، آن‌ها آماده رنگ‌آمیزی با هماتوکسلین-انوزین شدند که برای انجام آن مراحل زیر به‌طور کامل انجام شد:

۱- ۵ دقیقه گزین، ۲- ۵ دقیقه بوتانول، ۳- ۵ دقیقه الکل ۱۰۰٪، ۴- ۵ دقیقه الکل ۹۵٪، ۵- ۵ دقیقه الکل ۷۰٪، ۶- ۵ دقیقه شست و شو با آب جریان‌دار، ۷- ۵ دقیقه هماتوکسلین، ۸- ۲ ساعت و ۳۰ دقیقه هماتوکسلین، ۸- ۵ دقیقه شست و شو با آب جریان‌دار، ۹- ۲ ساعت و ۳۰ دقیقه انوزین، ۱۰- ۳۰ ثانیه اسیداستیک ۱٪، ۱۱- ۲

قرارگیری با نانوذرات نقره، نکرور شدن کانونی و تجمع هسته‌های هیاتوسیت، تخریب هسته هیاتوسیت و هاپرتروف شدن هیاتوسیت‌ها ایجاد شد (غلظت ۰/۰۴ میلی گرم در لیتر؛ شکل ۲D). هم‌چنین تغییرات بافت‌شناسی نشان داد که پس از در معرض قرارگیری با غلظت‌های مختلف نقره، پرزهای متورم (غلظت ۰/۰۸ میلی گرم در لیتر از نانوذرات نقره؛ شکل ۲E) مشاهده شد و در معرض قرارگیری با ۰/۰۴۵ میلی گرم در لیتر نیترا نقره باعث تخریب پرزها در روده ماهیان شد (شکل ۲F). جزئیات تغییرات بافتی در جداول ۳، ۴ و ۵ ارائه شده است.

جدول ۳: خلاصه تغییرات بافتی در آبشش ماهیان کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) پس از ۲۱ روز در معرض قرارگیری با نانوذرات نقره و نیترا نقره

عارضه‌های بافتی					
نکرور اپیتلیالی	آنوربسم	برخواستگی اپیتلیالی	خونریزی سطحی	ریختگی و گریز شدن لاملای ثانویه	کونلهی لاملای ثانویه
نانوذرات نقره					
شاهد					
+	++	++	+	+	+
+	++	+++	++	++	++
نیترا نقره					
شاهد					
+	++	++	+	++	+
++	++	++	++	++	++

علامه: فاقد اثر (-)، اثر ضعیف (+)، اثر متوسط (++)، و اثر شدید (+++)

جدول ۴: خلاصه تغییرات بافتی در کبد ماهیان کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) پس از ۲۱ روز در معرض قرارگیری با نانوذرات نقره و نیترا نقره

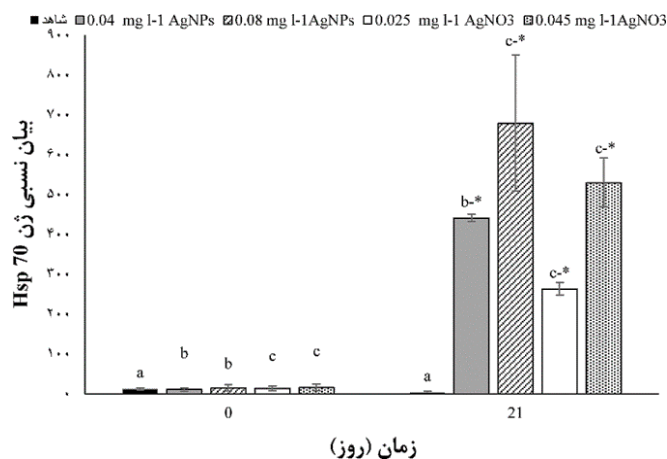
عارضه‌های بافتی					
تخریب هسته	دژنره شدن هیاتوسیت	تنگی هیاتوسیت	نکرور کانونی و تورم هیاتوسیت	به هم چسبیدگی هیاتوسیت‌ها	واکنش شدن سیتوپلاسمی
نانوذرات نقره					
شاهد					
+	+	+	++	++	+
+	++	+	+++	+++	++
نیترا نقره					
شاهد					
+	+	+	++	++	+
++	+	+	+++	+++	++

علامه: فاقد اثر (-)، اثر ضعیف (+)، اثر متوسط (++)، و اثر شدید (+++)

در زمان‌های ۰ و ۲۱ روز نشان داد که به‌استثنا گروه شاهد، میزان بیان ژن در همه گروه‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد ($P < 0.05$).

جدول ۲: میانگین غلظت کشنده نانوذرات نقره و نیترا نقره در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در ساعات ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ غلظت کشنده (میلی گرم بر لیتر) زمان در معرض گذاری (ساعت)

زمان در معرض گذاری (ساعت)	غلظت کشنده (میلی گرم بر لیتر)
۲۴	۰/۴۳ ± ۰/۰۷
۴۸	۰/۳۱ ± ۰/۰۴
۷۲	۰/۲۹ ± ۰/۰۸
۹۶	۰/۲۹ ± ۰/۰۲
نیترا نقره	
۲۴	۰/۳۸ ± ۰/۰۲
۴۸	۰/۲۱ ± ۰/۰۴
۷۲	۰/۱۶ ± ۰/۰۷
۹۶	۰/۱۵ ± ۰/۰۵

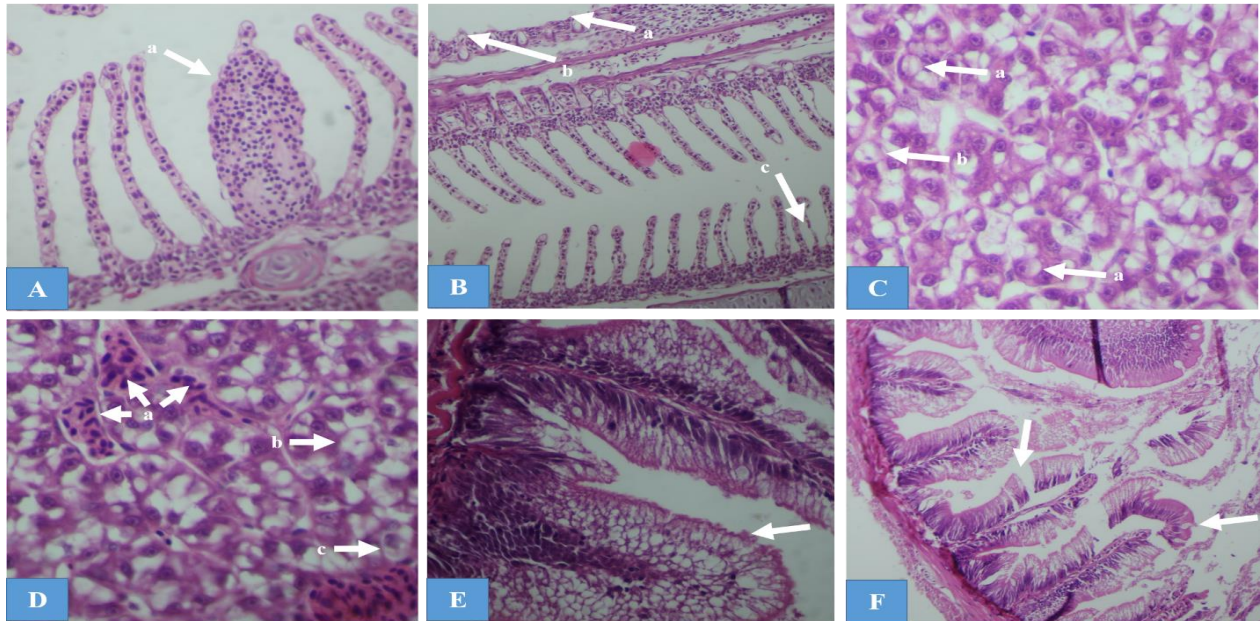


شکل ۱: بیان نسبی ژن‌های (a) hsp70 در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) پس از قرارگیری با غلظت‌های تحت‌حاد نانوذرات نقره و نیترا نقره

وجود حروف غیرمشابه در هر یک از زمان‌های نمونه‌برداری نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف است ($P < 0.05$)؛ وجود ستاره (*) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در یک تیمار در زمان‌های مختلف است ($P < 0.05$). داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار است.

تغییرات بافت‌شناسی: پس از در معرض قرارگیری با نقره، آنوربسم (غلظت ۰/۰۸ میلی گرم در لیتر از نانوذرات نقره؛ شکل ۲A) و برخواستگی اپیتلیالی، ریختگی و کوتاه شدن لاملای ثانویه (غلظت ۰/۰۴۵ میلی گرم در لیتر از نیترا نقره؛ شکل ۲B) در آبشش‌ها مشاهده شدند. در معرض قرارگیری با ۰/۰۲۵ میلی گرم بر لیتر از نیترا نقره باعث الفاء عوارض مختلفی از جمله هاپرتروف شدن هسته و تخریب شدن هسته هیاتوسیت شد (شکل ۲C). پس از در معرض





شکل ۲: تغییرات بافت آبشش (A-B)، کبد (C-D) و روده (E-F) در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) پس از ۲۱ روز قرار گیری با غلظت‌های تحت حاد نانوذرات نقره و نیترات نقره

A: در معرض گذاری با غلظت ۰/۰۸ میلی گرم در لیتر از نانوذرات نقره: (a) آنوریسم (X ۴۰۰)؛ B: در معرض گذاری با غلظت ۰/۰۴۵ میلی گرم در لیتر از نیترات نقره: (a) ریختگی لاملائی ثانویه، (b) کوتاهی لاملائی ثانویه، (c) برخواستگی اپیتلیالی (X ۱۰۰)؛ C: در معرض گذاری با غلظت ۰/۰۲۵ میلی گرم از نیترات نقره: (a) هایپرتروف شدن هیپاتوسیت، (b) تخریب شدن هسته هیپاتوسیت (X ۱۰۰)؛ D: در معرض گذاری با غلظت ۰/۰۴ میلی گرم در لیتر از نانوذرات نقره: (a) نکروز شدن کانونی و تجمع هسته‌های هیپاتوسیت، (b) تخریب هسته هیپاتوسیت، (c) هایپرتروف شدن هیپاتوسیت (X ۱۰۰)؛ E: در معرض گذاری با غلظت ۰/۰۸ میلی گرم در لیتر از نیترات نقره: پرز متورم (X ۴۰۰)؛ F: در معرض گذاری با غلظت ۰/۰۴۵ میلی گرم در لیتر از نیترات نقره: پرز تخریب شده (X ۱۰۰).

بحث

باتوجه به ویژگی‌های صنعت نانوفن آوری، در حال حاضر نانوذرات مختلف در صنایع زیادی کاربرد دارند و پیش‌بینی می‌شود در آینده نیز مقدار کاربرد آن‌ها بیش‌تر شود (Schmidh, ۲۰۰۹). افزایش استفاده از نانوذرات، خطرات ورود ناخواسته آن‌ها به محیط زیست و تاثیر بر موجودات زنده غیرهدف را زیاد می‌کند (Williams و همکاران، ۲۰۰۵). ورود ناخواسته این مواد از یک سو و از طرفی دیگر با توجه به این‌که محیط‌های آبی مقصد نهایی بسیاری از آلاینده‌ها می‌باشد، احتمال در معرض قرارگیری آبزیان با این نانوذرات بالا می‌باشد. از جمله مهم‌ترین نانوذرات پرکاربرد، نانوذرات نقره می‌باشد که مطالعات زیادی روی سمیت نقره در موجودات آبی انجام شده است (Nallamuthu و همکاران، ۲۰۱۳؛ Völker و همکاران، ۲۰۱۵)، اما به‌رغم استفاده گسترده از این فلز و امکان در ورود آن به محیط، نقاط مبهم زیادی در

جدول ۵: خلاصه تغییرات بافتی در روده ماهیان کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) پس از ۲۱ روز در معرض قرار گیری با نانوذرات نقره و نیترات نقره

عارضه‌های بافتی					
پرزهای متورم	واکوتل‌های متورم	تخریب نفوذ سلول‌های التهابی	تخریب شده	پرزهای متورم	نانوذرات نقره
-	-	-	-	-	شاهد
+	+	+	+	+	۰/۰۴ میلی گرم در لیتر
+++	++	++	++	++	۰/۰۸ میلی گرم در لیتر
نیترات نقره					
-	-	-	-	-	شاهد
++	++	+	+	++	۰/۰۲۵ میلی گرم در لیتر
++	++	+	+	++	۰/۰۴۵ میلی گرم در لیتر

علائم: فاقد اثر (-)، اثر ضعیف (+)، اثر متوسط (++) و اثر شدید (+++)



تغییرات بافت‌شناسی: شاخص‌های هیستوپاتولوژیکی به‌عنوان نشانگر زیستی در بررسی وضعیت سلامتی ماهی در معرض آلاینده‌هایی نظیر سموم و فلزات سنگین در مطالعات محیطی و آزمایشگاهی به‌طور وسیع مورد استفاده قرار می‌گیرند (De Cuna و همکاران، ۲۰۱۱). مطالعات انجام‌شده، بیش‌ترین تجمع مواد آلاینده را در بافت‌هایی نظیر آبشش، کلیه، کبد، پوست و ماهیچه نشان داده است (Jayakumar و Paul، ۲۰۰۶؛ Negro، ۲۰۱۵). آبشش اولین اندامی است که به جهت موقعیت قرار گرفتن، ساختار بسیار منشعب و در نتیجه سطح وسیع آن همراه با حجم زیاد آبی که از آن عبور می‌کند، بلافاصله از محیط آلوده آسیب می‌بیند (Da Cuna و همکاران، ۲۰۱۱؛ Negro، ۲۰۱۵). در این مطالعه اثرات سم‌شناسی نانوذرات نقره و نیترات نقره بر آبشش، کبد و روده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که پس از ۲۱ روز در معرض قرارگیری با غلظت‌های تحت‌حاد نقره، بیش‌ترین تغییرات در آبشش شامل آنوریسم، کوتاهی و ریختگی لاملای ثانویه و برخوردگی اپی‌تلیایی بود (شکل A-B۲ و جدول ۳). هم‌چنین در کبد این تغییرات شامل نکروز کانونی، دژنره شدن هیپاتوسیت، تخریب هسته، تنگی سینوسی (شکل C-D ۲ و جدول ۴) و در روده شامل پرزهای متورم، تخریب لایه موکوسی، نفوذ سلول‌های التهابی و تخریب ساختار پرزها بود (شکل E-F ۲ و جدول ۵). در مطالعات دیگر که به بررسی اثرات نانوذرات بر بافت آبیان پرداخته بودند مشخص شد که پس از ۳۰ روز در معرض قرارگیری با نانوذرات اکسیدروی، غشاء سلولی آبشش تخریب شد، سلول‌های آبششی نیز تخریب شدند و هم‌چنین هسته سلولی نیز در کبد ماهیان کپور معمولی تخریب شد (Hao و همکاران، ۲۰۱۳). در مطالعه Galloway و همکاران (۲۰۱۰) نتایج نشان داد که پس از ۱۰ روز در معرض قرارگیری *Arenicola marina* با نانوذرات اکسیدتیتانیوم، پرزهای دستگاه گوارش تخریب شد. هم‌چنین Osborne و همکاران (۲۰۱۵) و Rajeshkumar و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که پس از در معرض قراردادی به‌ترتیب زبرافیش (*Danio rerio*) و رویتو (*Labeo rohita*) با نانوذرات نقره، عوارض بافتی مختلفی در ماهیان گزارش شد. در مطالعه رزم‌آرا و همکاران (۱۳۹۳) به‌منظور بررسی تغییرات بافت‌شناسی، گربه‌ماهی رنگین‌کمان (*pangasianodon hypophthalmus*) به‌مدت ۱۰ روز در معرض غلظت‌های ۱ و ۲۰ میکروگرم در لیتر نانوذرات نقره و هم‌چنین نیترات نقره قرار گرفتند. آن‌ها مشاهده کردند که انواع آسیب‌های بافتی شامل هایپرپلازی رشته و تیغه ثانویه، کوتاه شدن و حلقه‌ای شدن تیغه‌های ثانویه در بافت

مورد تأثیرات ناخواسته آن بر جنبه‌های سلامتی موجودات زنده وجود دارد. در مطالعه حاضر سعی شد اثرات سم‌شناسی نانوذرات نقره را روی بافت‌شناسی بافت‌های آبشش، کبد و روده مورد بررسی قرار داده و هم‌چنین بیان ژن Hsp70 نیز به‌عنوان ژن شاخص استرس در ماهیان جوان کپور معمولی مورد بررسی قرار گرفت. هم‌چنین از نیترات نقره نیز به‌عنوان شاهد مثبت جهت مقایسه اثرات آن با نانوذرات نقره استفاده شده است.

سمیت حاد نانوذرات نقره: با توجه به این‌که رفتار نانوذرات در

محیط‌های آبی تحت تأثیر عوامل محیطی از جمله دما (Song و همکاران، ۲۰۱۵)، مقدار و نوع املاح (Grillo و همکاران، ۲۰۱۵) و pH (Baalousha و همکاران، ۲۰۰۸) می‌باشد، بنابراین این عوامل می‌توانند روی سم‌شناسی نانوذرات نیز موثر باشند. غلظت‌های به‌کارگرفته شده در این مطالعه بیش‌تر از غلظت‌های پیش‌بینی شده نانوذرات نقره در محیط بود که توسط Gottschalk و همکاران (۲۰۰۹) و Blaser و همکاران (۲۰۰۸) گزارش شده بود. غلظت‌های حاد در مورد نانوذرات نقره در سایر مطالعات انجام شده نیز به‌دست آمده بود. به‌طور مثال در مطالعه Kashiwada (۲۰۰۶)، Wu و همکاران (۲۰۱۰) و Kim و همکاران (۲۰۱۰) این غلظت حاد برای ماهی مداکا (*O. latipes*) بین ۱/۰۳ تا ۳۰ میلی‌گرم در لیتر گزارش شده بود. در زبرافیش (*D. rerio*) بالغ LC۵۰ گزارش شده برای نانوذرات نقره ۷/۰۷ میلی‌گرم در لیتر بوده است (Griffitt و همکاران، ۲۰۰۸). LC۵۰ گزارش شده در این مطالعه ۰/۲۹±۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر برای نانوذرات نقره و ۰/۱۵±۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر برای نیترات نقره بوده است (جدول ۱) که دلیل این اختلاف می‌تواند ناشی از اختلاف گونه‌ای، تغییر در فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب و هم‌چنین چگونگی ساخت نانوذرات و خواص فیزیکی و شیمیایی نانوذرات اشاره کرد (Baalousha و همکاران، ۲۰۰۸؛ Grillo و همکاران، ۲۰۱۵). با توجه به نتایج می‌توان گفت که در ماهی کپور معمولی، نیترات نقره سمی‌تر از نانوذرات نقره بوده است و تأثیر بیش‌تری روی سلامتی و بقاء آن‌ها داشته است (جدول ۱). در مطالعه Bilberg و همکاران (۲۰۱۱) مشخص شد که LC۵۰ در ماهی زبرافیش برای نانوذرات نقره و نیترات نقره به‌ترتیب حدود ۸۴ و ۲۵ میکروگرم در لیتر بود. با توجه به این نتایج می‌توان گفت که نیترات نقره با توجه به وابسته بودن سمیت نانوذرات نقره به عوامل مختلف (داخلی و محیطی)، سمیت بیش‌تری داشت که بخشی از این اختلاف نیز به‌علت خواص ذاتی نانوذرات است (Ribeiro و همکاران، ۲۰۱۴).



آبشش ماهیان مورد مطالعه ایجاد شد. نتایج کلی این آزمایش نشان داد که نانوذرات نقره تاثیر سم‌شناسی کم‌تری در مقایسه با نیترات نقره از خود بروز می‌دهند. هم‌چنین در مطالعه دیگری ماهیان قزل‌آلا را به مدت ۲۱ روز در معرض غلظت‌های ۰، ۲۵ و ۵۰ ppm قرار گرفتند و نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که بافت کبد دچار پرخونی، دژنراسیون سیتوپلاسمی و واکوئلی هیپاتوسیت شده بود (ایمانی و همکاران، ۱۳۹۵). هم‌چنین در مطالعه Griffitt و همکاران (۲۰۰۷) نیز تاثیر نانوذرات مس بر آبشش مورد بررسی قرار گرفت که نتایج مشابه با نتایج این مطالعه مشاهده گردید و عارضه‌های مختلف تحت تاثیر نانوذرات مس در بافت آبشش زرافیش (*Danio rerio*) به وجود آمد. با توجه به این که تخریب فیزیکی بافتی روی عملکرد بافت تاثیر می‌گذارد (Cengiz, ۲۰۰۶؛ Katuli و همکاران، ۲۰۱۴b) می‌توان گفت که در معرض‌گذاری با هر دو فرم نقره می‌تواند عملکرد آبشش، کبد و روده را تحت تاثیر قرار دهد و در نهایت سلامت و بقاء ماهی را با خطر مواجه سازد. لازم به ذکر است که برخی از عارضه‌های مشاهده شده، عارضه‌های تخریبی تحت تاثیر حضور نقره در بافت می‌باشد و برخی دیگر واکنش دفاعی بدن در برابر یک آلاینده می‌باشد. برای مثال مشاهده تخریب لایه اپی‌تیالی در آبشش ماهیان نشان از تاثیرات مستقیم آلاینده‌ها دارد. برخاستگی لایه اپی‌تیالی به‌عنوان یک پاسخ دفاعی است، به این ترتیب که با افزایش فاصله در قسمت سطحی لاملا نسبت به حالت طبیعی، باعث افزایش زمان رسیدن ماده آلاینده به خون ماهیان در معرض قرار گرفته و در نتیجه به تعویق افتادن مسمومیت در این موجودات می‌شود (Cengiz, ۲۰۰۶). چسبندگی لاملا در واقع پاسخ دفاعی برای حساسیت زیاد لایه سطحی آبشش در برابر آلاینده‌ها می‌باشد. هایپرپلازی در آبشش ممکن است به‌عنوان مکانیسمی جهت افزایش ناحیه تنفسی و هم‌چنین تاخیر در رسیدن سموم به خون می‌باشد (Cengiz, ۲۰۰۶). هزینه این پاسخ‌های دفاعی که جهت بقاء موجود می‌باشد، مستقیماً باعث کاهش کارایی تنفسی و هم‌چنین تبادل اسمزی در موجود آبی می‌شود. با توجه تعداد و شدت عوارض مشاهده شده در این مطالعه بیش‌ترین تغییرات به ترتیب در کبد < آبشش > و سپس روده مشاهده شد. هم‌چنین هیچ اختلافی بین مقدار و شدت اثر نانوذرات نقره و نیترات نقره روی عوارض مشاهده شده در بافت‌های مورد نظر مشاهده نشد.

تغییرات بیان ژن: علاوه بر آنالیزهای بیوشیمیایی، بافت‌شناسی و رفتارشناسی، اندازه‌گیری بیان ژن می‌تواند تکنیکی موثر در بررسی

تاثیر آلاینده‌های محیطی بر موجودات زنده مورد استفاده قرار بگیرد. به‌طوری که تغییرات ژنتیکی (تغییر در بیان، عملکرد و تنظیم ژنی) و تغییرات سطوح پروتئینی در موجودات می‌تواند به‌عنوان شاخص مواجهه با آلودگی در نظر گرفته شود. به‌ویژه اگر مولکول مورد بررسی قسمتی از مکانیزم دفاعی، ترمیمی و یا سم‌زدایی سلول باشد، که از آن جمله می‌توان به متالوتیونین‌ها (Chan, ۱۹۹۵)، آنزیم سیتوکروم P۴۵۰ (Colombo و همکاران، ۱۹۹۵)، گلوکوتیونین-S-ترانسفراز (Ahmad و همکاران، ۲۰۰۴)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) (Pandey و همکاران، ۲۰۰۳) و پروتئین‌های شوک حرارتی (HSP 70) (Duffy و همکاران، ۱۹۹۹) اشاره نمود. پروتئین‌های شوک حرارتی به‌عنوان شاخص مناسبی که به‌صورت عمومی در مورد بسیاری از عوامل تنش‌زا بیان می‌شود به‌شمار آیند (Rupik و همکاران، ۲۰۱۱؛ Kenkel و همکاران، ۲۰۱۴). در بین ایزوفرم‌های مختلف پروتئین‌های شوک حرارتی، Hsp70 پروتئینی است که غالباً به‌دنبال ورود آلودگی‌ها افزایش بیان پیدا می‌کند (Dong و همکاران، ۲۰۱۳). در مطالعات مختلف مشخص شده است که شدت پاسخ پروتئین‌های شوک حرارتی با توجه به گونه مورد بررسی، نوع و غلظت آلاینده و مدت مواجهه با آلاینده و بافت‌های مختلف متفاوت است (Dorts و همکاران، ۲۰۰۹؛ Bao و همکاران، ۲۰۱۱؛ Bauer و همکاران، ۲۰۱۳). در معرض‌گذاری ماهیان جوان کپور معمولی با غلظت‌های تحت حاد نانوذرات نقره و نیترات نقره باعث القاء بیان ژن Hsp70 شد (شکل ۱) که این نشان‌دهنده این است که این پروتئین می‌تواند به‌عنوان نشانگر زیستی آلودگی با فلز نقره مدنظر قرار گیرد. در مطالعات مختلف به بررسی بیان ژن Hsp70 پرداخته‌اند نتایج نشان داده که در برخی موارد بیان ژن‌ها کاهش داشته (Lee و همکاران، ۲۰۰۶) و در برخی موارد افزایش (سفری و همکاران، ۱۳۹۵؛ Rhee و همکاران، ۲۰۰۹). چنین مشاهداتی نشان می‌دهد که احتمالاً در القاء بیان ژن پروتئین شوک حرارتی تحت تاثیر آلاینده‌های مختلف، حالت انتخابی وجود دارد. Ahearn و همکاران (۲۰۰۴) کاهش بیان این ژن در مواجهه با برخی مواد را به کاهش بیان رستورهای ریانودین کانال‌های کلسیمی شبکه اندوپلاسمیک و Waisberg و همکاران (۲۰۰۳) افزایش بیان این ژن را به فسفریله کردن فاکتورهای رونویسی در محل پروموتور و یا راه‌انداز ژن مورد نظر نسبت دادند. با توجه به خاصیت چربی دوستی فلزات سنگین (Sparks, ۱۹۹۵)، به‌راحتی به‌داخل سلول نفوذ کرده و ممکن است با هسته آگریز پروتئین‌ها تداخل پیدا کنند و منجر به تخریب شدن پروتئین‌ها گردند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد بیان نسبی ژن Hsp70 در هر دو شکل نقره افزایش



منابع

۱. ایمانی، ا.؛ سروی مغانلو، ک. و خانی، س.، ۱۳۹۵. آسیب شناسی نانوذر مس بر بافت کبد و فراسنجه‌های خونی و بیوشیمیایی بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) پیش و پس از یک دوره بازیابی. شماره ۱۱۳، صفحات ۱۱۱ تا ۱۱۸.
 ۲. رزم‌آرا، پ.؛ درافشان، س.؛ پیکان‌حریتی، ف.؛ طالبی، م. و رنجبر، م.، ۱۳۹۲. اثر نانوذرات نقره کلونیدی و نیترات نقره محلول در آب بر تغییرات بافتی آبشش گربه ماهی رنگین‌کمان *Pangasianodon hypophthalmus*. مجله بوم‌شناسی آبزیان. سال ۳، شماره ۳، صفحات ۱۰ تا ۱۸.
 ۳. سفری، ر.ق.؛ شعبانی، ع.؛ رمضان‌پور، س. و کلنگی میاندره، ح.، ۱۳۹۴. اثر دوزهای تحت‌کشنده سم اندوسولفان بر بیان ژن Hsp70 و آسیب‌های بافت آبشش در تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus* Borodin, 1897). نشریه توسعه آبی‌پروری. سال ۹، شماره ۲، صفحات ۶۵ تا ۹۴.
 ۴. هدایتی، ع.؛ جهانبخشی، ع. و قادری‌رمازی، ف.، ۱۳۹۲. سم‌شناسی آبزیان. انتشارات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۲۱۰ صفحه.
 ۵. Ahearn, G.A.; Mandal, P.K. and Mandal, A., 2004. Calcium regulation in crustaceans during the molt cycle: a review and update. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Vol. 137, pp: 247-257.
 ۶. Ahmad, I.; Pacheco, M. and Santos, M.A., 2004. Enzymatic and nonenzymatic antioxidants as an adaptation to phagocyte-induced damage in (*Anguilla anguilla*). following in situ harbor water exposure. *Ecotoxicology and Environment Safety*. Vol. 57, pp: 290-302.
 ۷. Baalousha, M.; Manciualea, A.; Cumberland, S.; Kendall, K. and Lead, J.R. 2008. Aggregation and surface properties of iron oxide nanoparticles: influence of pH and natural organic matter. *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol. 27, No. 9, pp: 1875-1882.
 ۸. Bajer, P.G. and Sorensen, P.W., 2010. Recruitment and abundance of an invasive fish, the common carp, is driven by its propensity to invade and reproduce in basins that experience winter-time hypoxia in interconnected lakes. *Biological Invasions*. Vol. 12, No. 5, pp: 1101-1112.
 ۹. Bao, Y.; Wang, Q.; Liu, H. and Lin, Z., 2011. A small HSP group gene of bloody clam (*Tegillarca granosa*) involved in the immune response against vibrio parahaemolyticus and lipo polysaccharide. *Fish and Shellfish Immunology*. Vol. 30, pp: 729-733.
 ۱۰. Bauer, M.; Greenwod, S.J.; Clark, K. F.; Jackman, P. and Fairchild, W., 2013. Analysis of gene expression in
- معنی‌داری پیدا کرد که این می‌تواند به نقش HSP70 جهت جلوگیری از دناتوره شدن پروتئین‌ها نسبت داده شود و از این طریق منجر به بالارفتن تحمل ماهیان در معرض قرار گرفته شده‌اند (Buso و همکاران، ۲۰۰۲). Rajeshkumar و همکاران (۲۰۱۳) و Xing و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که پس از در معرض قراردادی به ترتیب خامه ماهی (*Chanos chanos*) و ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) با فلزات سنگین و علف‌کش، بیان hsp70 در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت. نتایج این مطالعه نشان داد که در روزهای ۱۴ و مخصوصاً ۲۱، افزایش بیان ژن Hsp70 در غلظت‌های بالاتر بیش‌تر بوده است که شاید دلیل آن انطباق بیش‌تر ماهی با غلظت‌های کم‌تر در گذر زمان بوده است. همچنین مقایسه بین بیان این ژن در نانوذرات و نیترات نقره نشان داد که، در روز اول میزان بیان ژن Hsp70 در تیمارهای نیترات نقره بیش‌تر از نانوذرات نقره بود که دلیل آن احتمالاً به‌خاطر تاثیرات منفی بیش‌تر این شکل از نقره بر بدن ماهیان می‌باشد. همچنین کم‌ترین غلظت نانوذرات نشان داد که در روز ۲۱ بیان آن افزایش زیادی داشت که این افزایش شاید به این دلیل باشد که تا روز ۱۴، غلظت ۰/۰۴ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره سمیت بالایی را در ماهیان در معرض قرار گرفته جهت القاء ژن Hsp70 نداشته است. تغییر در بیان ژن Hsp70 در زمان‌های نمونه‌برداری مختلف در ماهیانی که در معرض آلاینده‌ها قرار گرفته بودند پیش‌تر نیز گزارش شده است (Cui و همکاران، ۲۰۱۰؛ Fu و همکاران، ۲۰۱۱؛ Jing و همکاران، ۲۰۱۳)، که دلیل آن در برخی موارد عدم تحریک زیاد ژن نسبت آلاینده و همچنین سازگاری ماهی با شرایط استرسی در گذر زمان می‌باشد.
- با توجه به نتایج این مطالعه می‌توان گفت که هر دو شکل نقره روی بافت‌های آبشش، کبد و روده تاثیرگذار بود، اما با توجه به نقش بافت کبد در سم‌زدایی، بیش‌ترین تغییرات نیز در همین بافت مشاهده گردید. همچنین مقایسه بین دو شکل نقره نشان داد که بیش‌ترین عارضه‌ها در بالاترین غلظت‌های نقره مشاهده گردید، اما اختلافی در شدت تاثیرات بین دو شکل نقره در بافت‌ها مشاهده نشد. همچنین نتایج بررسی مولکولی در این مطالعه نشان داد که بیان ژن Hsp70 در ماهیان در معرض قرار گرفته با نانوذرات نقره و نیترات نقره به شدت افزایش یافت و می‌توان گفت این ژن می‌تواند به‌عنوان شاخص مناسبی جهت پایش وضعیت سلامت ماهیان در مورد استفاده قرار بگیرد. همچنین جهت انجام مطالعات آینده پیشنهاد می‌شود برای بررسی و تفسیر بهتر اثرات سم‌شناسی مواد مختلف، نمونه‌برداری از بافت‌ها در فاصله‌های کم‌تری انجام گردد.



۲۲. Dong, M.; Zhu, L.; Shao, B.; Zhu, Sh.; Wang, J.; Xie, H.; Wang, J. and Wang, F., 2013. The effects of endosulfan on cytochrome P450 enzymes and glutathione S-transferase in zebrafish (*Danio rerio*) livers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Vol. 92, pp: 1-9.
۲۳. Dorts, J.; Silvestre, F.; Tu, H.T.; Tyberghein, A.E.; Phuong N.T. and Kestemont, P., 2009. Oxidative stress protein carbonilation and heat shock proteins in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) following exposure to endosulfan and deltamethrin. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. Vol. 28, No. 2, pp: 302-310.
۲۴. Duffy, L.K.; Scofield, T.; Patton, M. and Bowyer, R.T., 1999. Comparative baseline levels of mercury, hsp70 and hsp90 in subsistence fish from the Yukon- Kuskokwim delta region of Alaska. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Vol. 124, No. 2, pp: 181-186.
۲۵. Fanta, E.; Rios, F.S.A.; Romão, S.; Vianna, A.C.C. and Freiburger, S., 2003. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotoxicology and environmental safety*. Vol. 54, No. 2, pp: 119-130.
۲۶. Fu, D.; Chen, J.; Zhang, Y. and Yu, Z., 2011. Cloning and expression of a heat shock protein 90 gene in the haemocytes of *Crassostrea hongkongensis* under osmotic stress and bacterial challenge. *Fish and Shellfish Immunology*. Vol. 31, pp: 118-125.
۲۷. Galloway, T.; Lewis, C.; Dolciotti, I.; Johnston, B.D.; Moger, J. and Regoli, F., 2010. Sublethal toxicity of nano titanium dioxide and carbon nanotubes in a sediment dwelling marine polychaete. *Environmental Pollution*. Vol. 158, pp: 1748-1755.
۲۸. Ghorshi Nezhad, M.R.; Zolfani, S.H.; Moztarzadeh, F.; Zavadskas, E.K. and Bahrami, M., 2015. Planning the priority of high tech industries based on Swara-Waspas methodology: The case of the nanotechnology industry in Iran. *Economic Research-Ekonomska Istraživanja*. Vol. 28, No. 1, pp: 1111-1137.
۲۹. Gottschalk, F.; Sonderer, T.; Scholz, R.W. and Nowack, B., 2009. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. *Environment science technology*. Vol. 43, pp: 9216-9222.
۳۰. Griffitt, R.J.; Brown-Peterson, N.J.; Savin, D.A.; Manning, C.S.; Boube, I.; Ryan, R. and Brouwer, M., 2012. Effects of chronic nanoparticulate silver exposure to adult and juvenile sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol. 31, pp: 160-167.
۳۱. Griffitt, R.J.; Weil, R.; Hyndman, K.A.; Denslow, N.D.; Powers, K.; Taylor, D. and Barber, D.S., 2007. Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in zebrafish (*Danio rerio*). *Environment Science Technology*. Vol. 41, pp: 8178-8186.
۳۲. Grillo, R.; Rosa, A.H. and Fraceto, L.F., 2015. Engineered nanoparticles and organic matter: a review of the state of the art. *Chemosphere*. Vol. 119, pp: 608-619.
- Homarus americanus larvae exposed to sublethal concentration of endosulfan during metamorphosis. *Comparative Biochemistry and physiology*. Vol. 8, pp: 300-308.
۱۱. Bauer, M.; Greenwod, S.J.; Clark, K. F.; Jackman, P. and Fairchild, W., 2013. Analysis of gene expression in *Homarus americanus* larvae exposed to sublethal concentration of endosulfan during metamorphosis. *Comparative Biochemistry and physiology*. Vol. 8, pp: 300-308.
۱۲. Bilberg, K.; Hovgaard, M.B.; Besenbacher, F. and Baatrup, E., 2011. In vivo toxicity of silver nanoparticles and silver ions in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of toxicology*.
۱۳. Blaser, S.A.; Scheringer, M.; MacLeod, M. and Hungerbuhler, K., 2008. Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: Contribution of nano-functionalized plastics and textiles. *Science of the Total Environment*. Vol. 390, pp: 396-409.
۱۴. Buso, D.; Post, M.; Cantalini, C.; Mulvaney, P. and Martucci, A., 2008. Gold Nanoparticle-Doped TiO₂ Semiconductor Thin Films: Gas Sensing Properties. *Advanced Functional Materials*. Vol. 18, No. 23, pp: 3843-3849.
۱۵. Bustin, S.A.; Benes, V.; Garson, J.A.; Hellemans, J.; Huggett, J.; Kubista, M.; Mueller, R.; Nolan, T.; Pfaffl, M.W. and Shipley, G.L., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real time PCR experiments. *Clinical chemistry*. Vol. 55, No. 4, pp: 611-622.
۱۶. Cengiz, E.I., 2006. Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. Vol. 22, pp: 200-204.
۱۷. Cengiz, E.I.; Unlu, E. and Balci, K., 2006. The histopathological effects of thiodan on the liver and gut of mosquitofish, *Gambusia affinis*. *Journal of Environmental Science and Health*. Vol. 36, No. 1, pp: 75-85.
۱۸. Chan, K.M., 1995. Methalothionin: Potential biomarker for monitoring heavy metal pollution in fish around Hong Kong. *Marine Pollution Bulletin*. Vol. 31, pp: 411-415.
۱۹. Colombo, A.; Bonfanti, P.; Orsi, F. and Camatini, M., 2003. Developmental effects of endocrine disturbing chemicals in wildlife and humans. *Environment Health Perspective*. Vol. 101, pp: 378-384.
۲۰. Cui, Z.; Liu, Y.; Luan, W.; Li, Q.; Wu, D. and Wang, Sh., 2010. Molecular cloning and characterization of a heat shock protein 70 gene in swimming crab (*Portunus trituberculatus*). *Fish and Shellfish Immunology*. Vol. 28, pp: 56-64.
۲۱. Da Cuna, R.H.; Vazquez, G.R.; Piol, M.N.; Guerrero, N.V.; Maggese, M.C. and Nostro, F.L., 2011. Assessment of the acute toxicity of organochlorine pesticide endosulfan in *Cichlasoma dimerus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Vol. 74, pp: 1056-1073.



۴۵. Li, Z.H.; Chen, L.; Wu, Y.H.; Li, P.; Li, Y.F. and Ni, Z.H., 2014. Effects of mercury on oxidative stress and gene expression of potential biomarkers in larvae of the Chinese rare minnow *Gobiocypris rarus*. Archives of environmental contamination and toxicology. Vol. 67, No. 2, pp: 245-251.
۴۶. Lovern, S.B. and Klaper, R., 2006. *Daphnia magna* mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C60) nanoparticles. Environmental toxicology and chemistry. Vol. 25, No. 4, pp: 1132-1137.
۴۷. Madhumathi, K.; Kumar, P.S.; Abhilash, S.; Sreeja, V.; Tamura, H.; Manzoor, K. and Jayakumar, R., 2010. Development of novel chitin/nanosilver composite scaffolds for wound dressing applications. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. Vol. 21, No. 2, pp: 807-813.
۴۸. Mishra, A.; Kaushik, N.K.; Sardar, M. and Sahal, D., 2013. Evaluation of antiplasmodial activity of green synthesized silver nanoparticles. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. Vol.7, No.111, pp: 713-718.
۴۹. Nair, K.K.; Kiremidjian, A.S. and Law, K.H., 2006. Time series-based damage detection and localization algorithm with application to the ASCE benchmark structure. Journal of Sound and Vibration. Vol. 291, No. 1, pp: 349-368.
۵۰. Nallamuthu, I.; Parthasarathi, A. Khanum, F., 2013. Thymoquinone-loaded PLGA nanoparticles: antioxidant and anti-microbial properties.
۵۱. Negro, C.L. 2015. Histopathological effects of endosulfan to hepatopancreas, gills and ovary of the fresh water crab *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda: Trichodactylidae). Ecotoxicology and Environmental Safety. Vol. 113, pp. 87-94.
۵۲. Osborne, O.J.; Lin, S.; Chang, C.H.; Ji, Z.; Yu, X.; Wang, X.; Lin, S.; Xia, T. and Nel, A.E., 2015. Organ-specific and size-dependent Ag nanoparticle toxicity in gills and intestines of adult zebrafish. ACS nano. Vol. 9, pp: 9573-9584.
۵۳. Pandey, S.; Parvaz, S.; Sayeed, I.; Haque, R.; Bin-Hafeez, B. and Raisuddin, S., 2003. Biomarker of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish Wallage attu. The Science of the Total Environment. Vol. 309, pp: 105-115.
۵۴. Rajeshkumar, S.; Mini, J. and Munuswamy, N., 2013. Effects of heavy metals on antioxidants and expression of HSP70 in different tissues of Milk fish (*Chanos chanos*) of Kaattupalli Island, Chennai, India. Ecotoxicology and Environ Safety. Vol. 98, pp: 8-18.
۵۵. Rhee, J.S.; Raisuddin, Sh.; Lee, K.W.; Seo, J.S.; Ki, J.S. and Kim, I.Ch., 2009. Heat shock protein (Hsp) gene responses of intertidal copepod (*Tigriopus japonicus*) to environmental toxicants. Comparative Biochemistry and Physiology. Vol. 149, pp:104-112.
۵۶. Ribeiro, F.; Gallego-Urrea, J.A.; Jurkschat, K.; Crossley, A.; Hassellöv, M.; Taylor, C.; Soares, A.M. and Loureiro, S., 2014. Silver nanoparticles and silver nitrate induce high toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*. Science of the Total Environment. Vol. 466, pp: 232-241.
۵۷. Ringwood, A.H.; Khambhammettu, S.; Santiago, P.; Bealer, E.; Stogner, M.; Collins, J. and Gonsalves, ۳۳. Hao, L.; Chen, L.; Hao, J. and Zhong, N., 2013. Bioaccumulation and sub-acute toxicity of zinc oxide nanoparticles in juvenile carp (*Cyprinus carpio*): A comparative study with its bulk counterparts. Ecotoxicology and Environmental Safety. Vol. 91, pp: 52-60.
۳۴. Jayakumar, P. and Paul, V.I., 2006. Pattern of cadmium accumulation in selected tissues of the cat fish (*Clarias batrachus*) exposed to sublethal concentration of cadmium chloride. Veterinarski Arhiv. Vol. 76, No. 2, pp. 167-177.
۳۵. Jester, D. B., 1974. Life history, ecology, and management of the carp, *Cyprinus carpio* Linnaeus. Elephant Butte Lake. New Mexico State University, Research Report. Vol. 273, 80 p.
۳۶. Jing, J.; Liu, H.; Chen, H.; Hu, S.; Xiao, K. and Ma, X., 2013. Acute effect of copper and cadmium exposure on the expression of heat shock protein 70 in the Cyprinidae fish (*Tanichthys albonubes*). Chemosphere. Vol. 91, No. 8, pp: 1113-1122.
۳۷. Kashiwada, S., 2006. Distribution of nanoparticles in the see-through medaka (*Oryzias latipes*). Environmental Health Perspective. Vol. 114, 1697 p.
۳۸. Katuli, K.K.; Massarsky, A.; Hadadi, A. and Pourmehrzan, Z., 2014a. Silver nanoparticles inhibit the gill Na⁺/K⁺-ATPase and erythrocyte AChE activities and induce the stress response in adult zebrafish (*Danio rerio*). Ecotoxicology and environmental safety. Vol. 106, pp: 173-180.
۳۹. Katuli, K.K.; Amiri, B.M.; Massarsky, A. and Yelghi, S., 2014b. Impact of a short-term diazinon exposure on the osmoregulation potentiality of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fingerlings. Chemosphere. Vol. 108, pp: 396-404.
۴۰. Kenkel, C.D.; Sheridan, C.; Leal, M.C.; Bhagooli, R.; Castillo, K.D.; Kurata, N.; McGinty, E.; Goulet, T.L. and Matz, M.V., 2014. Diagnostic gene expression biomarkers of coral thermal stress. Marine Ecology Research. Vol. 14, pp: 667-6780.
۴۱. Khosravi-Katuli, K.; Prato, E.; Lofrano, G.; Guida, M.; Vale, G. and Libralato, G., 2017. Effects of nanoparticles in species of aquaculture interest. Environmental Science and Pollution Research. pp: 1-21.
۴۲. Kim, J.; Park, Y.; Yoon, T.H.; Yoon, C.S. and Choi, K., 2010. Phototoxicity of CdSe/ ZnSe quantum dots with surface coatings of 3-mercaptopropionic acid or tri-n octylphosphine oxide/gum arabic in *Daphnia magna* under environmentally relevant UV-B light. Aquatic Toxicology. Vol. 97, pp:116-124.
۴۳. Kolangi Miandare, H.; Jafari, O. and Akbarzadeh, A., 2015. The transcription of Hypoxia-inducible factors (hif-1, hif-2) during normal development of Beluga sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1758). Journal of Aquatic Ecology. Vol. 4, No. 4, pp: 87-80.
۴۴. Lee, S.M.; Lee, S.B.; Park, C.H. and Choi, J. 2006. Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in (*Chironomus tentans*) larvae exposed to various environmental pollutants: a potential biomarker of fresh water monitoring. Chemosphere. Vol. 65, pp: 1074-1081.



۷۱. **Wilkinson, R.J.; Porter, M.; Woolcott, H.; Longland, R. and Carragher, J.F., 2006.** Effects of aquaculture related stressors and nutritional restriction on circulating growth factors (GH, IGF-I and IGF-II) in Atlantic salmon and rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. Vol. 145, No. 2, pp: 214-224.
۷۲. **Williams, D.; Amman, M.; Autrup, H.; Bridges, J.; Cassee, F.; Donaldson, K.; Fattal, E.; Janssen, C.; De Jong, W.; Jung, T.; Marty, J.P. and Rydzynski, K., 2005.** The appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies. In: risks Scoeanih, editor: European commission health and consumer protection directorate general. pp: 1-78.
۷۳. **Wu, Y.; Zhou, Q.; Li, H.; Liu, W.; Wang, T. and Jiang, G., 2010.** Effects of silver nanoparticles on the development and histopathology biomarkers of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using the partial-life test. *Aquatic Toxicology*. Vol. 100, pp: 160-167.
۷۴. **Xing, H.; Li, S.; Wang, X.; Gao, X.; Xu, S. and Wang, X., 2013.** Effects of atrazine and chlorpyrifos on the mRNA levels of HSP70 and HSC70 in the liver, brain, kidney and gill of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Chemosphere*. Vol. 90, No. 3, pp: 910-916.
- K.E., 2005.** Characterization, imaging and degradation studies of quantum dots in aquatic organisms. In *MRS Proceedings*. Cambridge University Press. Vol. 895, pp. 0895-G04
۵۸. **Roberts, R., 1989.** *Fish Pathology*, second ed. 467 p.
۵۹. **Rose, W.L.; Nisbet, R.M.; Green, P.G.; Norris, S.; Fan, T.; Smith, E.H.; Cherr, G.N. and Anderson, S.L., 2006.** Using an integrated approach to link biomarker responses and physiological stress to growth impairment of cadmium exposed larval topmelt. *Aquatic Toxicology*. Vol. 80, pp.298-308.
۶۰. **Rupik, W.; Jaslik, K.; Bembenek, J. and Wildlak, W., 2011.** The expression patterns of heat shock proteins and their role during vertebrate's development. *Comparative Biochemistry Physiology*. Vol. 159, pp: 349-366.
۶۱. **Schlesinger, M.J.; Santoro, M.G. and Garaci, E., 2012.** Stress proteins: induction and function. *Springer Science & Business Media*. Vol. 259, pp: 1309-1311.
۶۲. **Schmidt, C.W., 2009.** Nanotechnology-related environmental, health and safety research: examining the national strategy. *Environmental Health Perspectives*. Vol. 117, No. 4, pp: A158-A161.
۶۳. **Scown, T.M.; Santos, E.M.; Johnston, B.D.; Gaiser, B.; Baalousha, M.; Mitov, S. and Aerle, R., 2010.** Effects of aqueous exposure to silver nanoparticles of different sizes in rainbow trout. *Toxicological Sciences*. Vol. 115, No. 2, pp: 521-534.
۶۴. **Smith, C.J.; Shaw, B.J. and Handy, R.D., 2007.** Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology*. Vol. 82, No. 2, pp: 94-109.
۶۵. **Song, L.; Vijver, M.G.; Peijnenburg, W.J.; Galloway, T.S. and Tyler, C.R., 2015.** A comparative analysis on the in vivo toxicity of copper nanoparticles in three species of freshwater fish. *Chemosphere*. Vol. 139, pp: 181-189.
۶۶. **Sparks, D.L., 1995.** Sorption phenomena in soils. *Environmental soil chemistry*. pp: 99-139.
۶۷. **Stehr, C.M.; Myers, M.S.; Johnson, L.L.; Spencer, S. and Stein, J.E., 2004.** Toxicopathic liver lesions in English sole and chemical contaminant exposure in Vancouver Harbour, Canada *Marine Environment. Research*. Vol. 4, pp: 55-74.
۶۸. **Tedeschi, J.N.; Kennington, W.J.; Berry, O.; Whiting, S.; Meekan, M. and Mitchell, N.J., 2015.** Increased expression of Hsp70 and Hsp90 mRNA as biomarkers of thermal stress loggerhead turtle embryos (*Caretta caretta*). *Journal of thermal biology*. Vol. 47, pp: 42-50.
۶۹. **Völker, C.; Kämpken, I.; Boedicker, C.; Oehlmann, J. and Oetken, M., 2015.** Toxicity of silver nanoparticles and ionic silver: comparison of adverse effects and potential toxicity mechanisms in the freshwater clam *Sphaerium corneum*. *Nanotoxicology*. Vol. 9, No. 6, pp: 677-685.
۷۰. **Waisberg, M.; Joseph, P.; Hale, B. and Beyersmann, D., 2003.** Molecular and cellular mechanisms of cadmium. *Toxicology*. Vol. 192, pp: 95-117.

