

مقایسه‌ی سنجش ایمونوگلوبولین تام با استفاده از دو روش کدورت‌سنجی و رسوبی در ماهی کپور معمولی در مواجهه با نانوذرات نقره‌ی سنتز شده از جلبک سارگاسوم

سراج بیتا^{۱*}، مهرزاد مصباح^۲، علی شهریاری^۳ و مسعود قربانپور^۴

تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۱۱

تاریخ پذیرش: ۹۵/۵/۳

چکیده

ایمونوگلوبولین‌ها پروتئین‌های سرم هستند که توسط پلاسما سل‌ها تولید می‌شوند و جزء مهم پاسخ ایمنی همورال می‌باشند، که به طور رایج به وسیله‌ی روش‌های سرم‌شناسی مخصوص اندازه‌گیری می‌شوند. در این مطالعه ابتدا تولید نانوذرات نقره با روش زیستی خارج سلولی از جلبک سارگاسوم انجام شد، سپس تأثیر این نانوذرات بر میزان ایمونوگلوبولین تام با استفاده از دو روش کدورت-سنجی و رسوبی در ماهی کپور ماهی در مواجهه با سه غلظت شامل ۰/۱۱، ۱/۱۲ و ۵/۶۷ mg/L AgNP به مدت ۱۴ روز مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج طیف سنجی UV-Vis و TEM تولید زیستی نانوذرات نقره با استفاده از جلبک مورد آزمایش تأیید شد. طبق تصاویر به دست آمده از TEM، میانگین اندازه‌ی نانوذرات نقره تولید شده ۲۲/۵۴ نانومتر و کروی شکل بودند. حداکثر پیک جذب نانوذرات در محدوده‌ی ۴۰۶ نانومتر شناسایی شد. نتایج حاصل از سنجش ایمونوگلوبولین سرم با استفاده از دو روش کدورت‌سنجی و رسوبی، نشان‌دهنده‌ی عدم اختلاف معنی‌دار در تیمارهای مختلف با تیمار شاهد می‌باشد ($p > 0.05$). همچنین بین مقادیر ایمونوگلوبولین سرم در هر تیمار نیز در روزهای مختلف نمونه‌برداری اختلاف معنی‌داری از نظر آماری مشاهده نشد ($p > 0.05$). نتایج مطالعه‌ی ما نشان داد که نانوذرات نقره‌ی سنتز شده از جلبک سارگاسوم، بر میزان ایمونوگلوبولین تام سرم با هر دو روش اندازه‌گیری هیچ گونه اثرات مهار یا تحریک‌کنندگی نداشت.

کلمات کلیدی: ایمونوگلوبولین، تست کدورت‌سنجی و رسوبی، نانوذرات نقره، کپور معمولی

مقدمه

شیمیایی برای سنتز نانوذرات، به کار برده شوند (Prathna et al. 2010). یکی از این منابع که می‌توانند در بحث نانوتکنولوژی و سنتز نانوذرات مورد استفاده قرار گیرند، گیاهان دریایی یا جلبک‌های دریایی هستند. در بحث نانوبیوتکنولوژی، جلبک‌های دریایی به دلیل فراوانی و دارا بودن انواع ترکیبات فیتوشیمیایی متنوع از قبیل پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها، آکالوئیدها، استروئیدها، فنول‌ها، ساپونین و فلاونوئیدها (Mansuya et al. 2010) می‌توانند نقش مهمی در احیای یون‌های فلزی و تبدیل آن به

کاربرد نانوذرات در دهه‌های اخیر به طور گسترده‌ای افزایش یافته است. امروزه نانو مواد و محصولات متفاوتی در زمینه‌ی نانو به صورت تجاری در دسترس می‌باشند، که یکی از مهم‌ترین آن‌ها نانوذرات نقره است، که در صنایع مختلف کاربرد بسیار زیادی دارد و شاید بتوان آن را پرکاربردترین نانو ماده در حال حاضر در صنعت نانوفناوری دانست (Ahmed et al. 2008). تحقیقات نشان داده که منابع زیستی موجود در طبیعت می‌توانند به عنوان منبع مناسب و جایگزین ترکیبات

E-mail: serajbita@yahoo.com (نویسنده‌ی مسئول)

*^۱ استادیار گروه شیلات، دانشکده‌ی علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار

^۲ استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

^۳ دانشیار گروه علوم پایه، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

^۴ استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

شهدید چمران اهواز انتقال داده شد. در آنجا پس از شستشو با آب مقطر به مدت یک هفته در زیر سایه قرار داده شدند تا خشک گردند (Singaravelu et al. 2007). نمونه‌های خشک شده توسط ابزار خرد کننده یا آسیاب به شکل پودر در آورده شدند. به منظور تهیه‌ی عصاره، ۱۰ گرم از پودر خشک شده جلبک با ۱۰۰ سی سی آب مقطر دیونیزه شده در داخل ارلن مایر ۵۰۰ سی سی همراه با مگنت، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی-گراد جوشانده شد سپس محلول حاصل به مدت ۲۵ دقیقه در دور ۴۰۰۰rpm دوبار سانتریفیوژ گردید و محلول رویی با استفاده از کاغذ صافی واتمن NO.1، فیلتر شد (Jegadeeswaran et al. 2012). برای سنتز نانوذرات نقره از محلول نیترات نقره به عنوان دریافت کننده یا پیش ساز استفاده شد. مقدار ۱۷ میلی گرم نیترات نقره در ۱۰۰ سی سی آب مقطر حل شد (یک میلی مولار). به منظور احیاء یون‌های Ag^+ ، ۱۰ سی سی عصاره‌ی جلبک به ۹۰ سی سی محلول نیترات نقره یک میلی مولار اضافه شد (Jegadeeswaran et al. 2012). در نهایت برای تعیین ویژگی‌ها و اطمینان از تولید و کیفیت نانوذرات نقره سنتز شده از دستگاه‌های طیف‌سنج فرابنفش مرئی (UV-vis) مدل Perkin-Elmer, Lambda 12 (جهت تأیید سنتز نانوذرات نقره) میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) مدل LEO 906E (برای تعیین شکل و اندازه‌ی نانوذرات و توزیع ذرات) و دستگاه طیف‌سنجی اتمی نشری پلاسمای جفت شده‌ی القایی (ICP-EOS) مدل Perkin-Elmer Optima 8300 DV (به منظور اندازه‌گیری میزان یون‌های نقره در سوسپانسیون نانوذرات نقره) استفاده شد. تعداد ۴۰۰ قطعه ماهی کپور معمولی با میانگین وزنی $78/99 \pm 16/45$ گرم (انحراف معیار \pm وزن)، از مزارع پرورش ماهی شوشتر تهیه و برای تطابق با شرایط آزمایشگاه، به مدت دو هفته در آکواریوم‌های با حجم ۱۵۰ لیتر در آزمایشگاه تحقیقاتی بهداشت آبزیان دانشگاه شهید چمران اهواز نگهداری شدند و در طول این مدت به میزان ۲ درصد وزن بدن، در دو نوبت (صبح و عصر)،

فرم نانو را به شکل خارج سلولی داشته باشند. سیستم ایمنی در ماهیان به عنوان خط دفاعی در برابر عوامل بیماری‌زا مطرح می‌باشد. پاسخ ایمنی در حیوانات و ماهی‌ها شامل ایمنی ذاتی و ایمنی اکتسابی می‌باشد. ایمنی ذاتی شامل دو قسمت دفاع سلولی و دفاع هومورال و ایمنی اکتسابی نیز شامل دو قسمت دفاع سلولی و دفاع هومورال می‌باشد (علیشاهی ۱۳۸۸). بخشی از ایمنی داخلی به وسیله‌ی ایمنوگلوبولین‌ها ایجاد می‌شود که نقش مهمی را در ایمنی هومورال ایفاء می‌کنند (Savan et al. 2005). غلظت پروتئین و ایمنوگلوبولین تام در سرم و پلاسما نسبت به محدوده‌ی پایه‌ای، به عنوان یک شاخص بالینی در سنجش میزان سلامتی و وضعیت بدنی موجودات آبی به کار برده می‌شود (Riche 2008). مطالعه‌ی سمیت نانوذرات نه تنها بر روی سلامت انسان (Asharani et al. 2009)، بلکه بر روی باکتری‌ها، رده‌های سلولی پستانداران و دیگر حیوانات آزمایشگاهی انجام شده است (Hansen et al. 2007)، اما تا کنون هیچ مطالعه‌ای در رابطه با اثرات نانوذرات فلزی سنتز شده با روش زیستی بر میزان ایمنوگلوبولین تام ماهی کپور معمولی گزارش نشده است. هر چند که جهت سنجش ایمنوگلوبولین تام از روش‌های انتشار در ژل شعاعی تک گانه یا نفلومتری و الایزا استفاده می‌شود که این روش‌ها زمان‌بر و هزینه‌بر می‌باشند، اما سنجش ایمنوگلوبولین تام با روش‌های کدورت سنجی و رسوبی ارزان‌تر و ساده‌تر می‌باشد (Britti et al. 2005). هدف از این مطالعه مقایسه‌ی سنجش میزان ایمنوگلوبولین تام با دو روش کدورت‌سنجی و رسوبی در ماهی کپور معمولی در مواجهه با نانوذرات نقره‌ی سنتز شده از جلبک سارگاسوم می‌باشد.

مواد و روش کار

جلبک دریایی سارگاسوم (*Sargassum angustifolium*) پس از جمع‌آوری از سواحل بوشهر به آزمایشگاه بهداشت آبزیان دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه

می‌شد، پس از خون‌گیری، نمونه‌های خون بدون کاربرد مواد ضد انعقاد، بلافاصله در دور ۳۰۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و گلبول‌های قرمز خون ترسیب و از سرم تفکیک گردید. سرم (فاز رویی) به آرامی توسط سمپلر کشیده و به میکروتیوب‌های اپندورف ۱/۵ میلی-لیتر جدید منتقل می‌شد. غلظت ایمونوگلوبولین بر اساس روش شرح داده شده توسط McEvan و همکاران در سال ۱۹۷۰، با استفاده از دو روش کدورت‌سنجی (ZST)^۱ و رسوبی با سولفات روی (ZSP)^۲، اندازه‌گیری شد.

در روش کدورت‌سنجی با سولفات روی، ۲۵ میکرولیتر سرم در داخل میکروتیوب‌های ۱/۵ سی‌سی افزوده شد، سپس ۱۴۰۰ میکرولیتر سولفات روی ۰/۷ میلی‌مولار و pH برابر ۵/۸، به آن اضافه گردید، مخلوط حاصل به خوبی تکان داده شد و پس از ۲ ساعت نگهداری در دمای اتاق، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول حاصل به داخل پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای شکل الایزا، منتقل شد و جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۹۰ نانومتر، توسط دستگاه قرائت‌کننده‌ی جذب نوری اندازه‌گیری شد.

در روش رسوبی با سولفات روی، ۲۵ میکرولیتر سرم در داخل میکروتیوب‌های ۱/۵ سی‌سی افزوده شد، سپس ۱۴۰۰ میکرولیتر سولفات روی ۰/۷ میلی‌مولار و pH برابر ۵/۸، به آن اضافه گردید، سپس مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شده و مایع رویی به آرامی با استفاده از سمپلر کشیده شده و در داخل میکروتیوب‌های ۱/۵ سی‌سی منتقل گردید، سپس میزان پروتئین مایع رویی به روش برادفورد با استفاده از دستگاه قرائت‌کننده‌ی جذب نوری در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد، در نهایت میزان ایمونوگلوبولین تام با تفریق پروتئین مایع رویی از پروتئین کل (برادفورد ۱۹۷۶)، محاسبه شد (Rohlenova et al. 2011).

داده‌های مربوط به سنجش فاکتورهای مختلف به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد (Mean \pm SD)، بیان

غذادهی شدند. پس از اتمام دوره‌ی سازگاری و ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش‌ها، غذادهی به ماهیان قطع گردید. از آن‌جا که تا کنون مقادیر دقیق ۵۰ درصد غلظت کشندگی (LC₅₀) نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره‌ی جلبک دریایی *Sargassum angustifolium* در ماهی کپور معمولی تعیین نشده، در ابتدا با انجام آزمایش‌های مقدماتی، مقدار واقعی ۵۰ درصد غلظت کشندگی به میزان ۱۱/۳۴ mg/L AgNP در طی ۹۶ ساعت مواجهه به دست آمد. بنابراین تأثیر این نانوذره بر شاخص‌های ایمنی ماهی کپور معمولی در غلظت‌هایی شامل LC₅₀ ۱ درصد (mg/L) و AgNP (۰/۱۱)، LC₅₀ ۱۰ درصد (۱/۱۳ mg/L AgNP) و LC₅₀ ۵۰ درصد (۵/۶۷ mg/L AgNP) در سه تیمار غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره به مدت ۱۴ روز، همراه با تیمار شاهد (هر کدام با سه تکرار) مورد بررسی قرار گرفت.

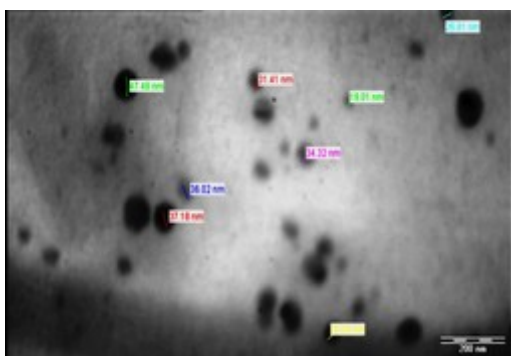
پس از انجام آزمایش‌های مقدماتی و تعیین LC₅₀، ماهیان در تیمارهای مختلف با غلظت‌هایی معادل ۱ درصد، ۱۰ درصد و ۵۰ درصد میزان LC₅₀ نود و شش ساعته به منظور بررسی تأثیر نانوذرات نقره بر میزان ایمونوگلوبولین تام سرم ماهی کپور معمولی در آکواریوم-های ۱۰۰ لیتری به تعداد ۲۵ قطعه ماهی در هر آکواریوم مجاور شدند. در طی دوره‌ی آزمایش تعویض آب به میزان ۲۰ درصد حجم آب هر ۴۸ ساعت یک بار انجام می‌شد. بعد از هر بار تعویض آب، میزان نانوذرات نقره مدنظر در هر آکواریوم مجدداً تنظیم گردید (کلباسی و همکاران ۱۳۹۱).

به منظور سنجش میزان ایمونوگلوبولین تام، ۹ ماهی از هر تیمار در فواصل زمانی ۱، ۳، ۷ و ۱۴ به صورت تصادفی انتخاب گردید. در هنگام نمونه‌برداری، ماهیان با وارد کردن کم‌ترین تنش و به آرامی به وسیله‌ی تور دستی، صید شده و ماهیان مربوط به هر تیمار، جداگانه در داخل سطل‌های پلاستیکی ۱۰ لیتری حاوی محلول ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر پودر گل میخک بیهوش شدند. بلافاصله پس از بیهوشی، خون‌گیری از ناحیه‌ی ساقه‌ی دمی انجام

1- Zinc sulfate turbidity test

2- Zinc sulfate precipitation test

بودند (شکل ۲). به طوری که بر اساس شکل ۳، جدا از شکل کروی و اندازه‌ی مناسب نانوذرات نقره سنتز شده، تمام ذرات دارای پراکندگی مناسب بوده و تقریباً به خوبی در همه جای سطح نمونه توزیع شده‌اند و در تماس مستقیم با هم دیگر نیستند.



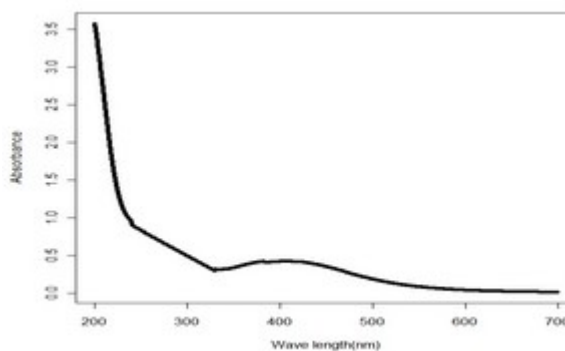
شکل ۲: تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) از نانوذرات نقره سنتز شده

نتایج حاصل از مقادیر ایمنوگلوبولین سرم در تیمارهای مختلف در جدول ۱ نشان داده شده‌اند. طبق نتایج میزان ایمنوگلوبولین سرم در اندازه‌گیری با هر دو روش کدورت‌سنجی و رسوبی، در تمام تیمارها با تیمار شاهد از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($p > 0.05$). میزان ایمنوگلوبولین تام سنجش شده با استفاده از هر دو روش، در روزهای مختلف نمونه‌برداری دارای نوسانات کاهشی و یا افزایشی بوده است. بیش‌ترین میزان آن در هر دو روش کدورت‌سنجی و رسوبی مربوط به تیمار 10 LC_{50} درصد و در روز هفتم بوده است (جدول ۱). نتایج نشان داد که میزان ایمنوگلوبولین با استفاده از هر دو روش در هر تیمار تقریباً در دامنه‌ی یکسان بوده است. همچنین میزان ایمنوگلوبولین در روزهای مختلف نمونه‌برداری در هر تیمار نیز اختلاف معنی‌داری نداشت ($p > 0.05$).

شده‌اند. اختلاف بین داده‌ها و مقایسه‌ی میانگین نمونه‌ها در تیمارهای مختلف با سنجش واریانس دو طرفه در نرم-افزار spss نسخه ۲۱، انجام و در صورت وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها، آزمون تکمیلی Tukeys HSD، برای گروه‌بندی میانگین‌های دارای اختلاف معنی‌دار استفاده شد و $P < 0.05$ ، به عنوان معیار معنی‌دار بودن نتایج تعیین گردید.

نتایج

نتایج حاصل از دستگاه طیف سنجی فرابنفش مرئی برای تایید سنتز نانوذرات نقره از جلبک سارگاسوم نشان داد که بهترین پیک بعد از گذشت ۲ ساعت از زمان واکنش و در محدوده‌ی ۴۰۶ نانومتر تشکیل شده است، که پیک مشاهده شده در این محدوده، نشان دهنده‌ی احیای یون‌های نقره و در نتیجه سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره‌ی جلبک سارگاسوم می‌باشد (شکل ۱).



شکل ۱: طیف UV-Vis نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از جلبک سارگاسوم

میزان یون‌های نقره موجود در سوسپانسیون نانوذرات نقره سنتز شده که با استفاده از دستگاه ICP اندازه‌گیری شده است، به مقدار $105/7$ میلی‌گرم بر لیتر تعیین شد. طبق تصاویر به دست آمده از TEM، میانگین اندازه‌ی نانوذرات نقره سنتز شده، $32/54$ نانومتر و با شکل کروی

جدول ۱: نتایج حاصل از تغییرات مقادیر ایمونوگلوبولین تام سرم (میلی گرم بر میلی لیتر) در ماهی کپور معمولی در مواجهه با نانوذرات نقره‌ی سنتز شده از جلبک سارگاسوم

روش سنجش	روز نمونه برداری	شاهد	AgNP ۱٪	AgNP ۵۰٪
کدورت سنجی	۱	A,a ۸/۹۴ ± ۰/۳۶	A,a ۱۰/۸۴ ± ۱/۵۲	A,a ۹/۰۹ ± ۲/۰۰
	۳	A,a ۹/۰۳ ± ۱/۲۸	A,a ۱۲/۹۷ ± ۵/۹۸	A,a ۱۱/۱۵ ± ۲/۵۶
	۷	A,a ۹/۸۹ ± ۱/۲۰	A,a ۹/۴۴ ± ۲/۱۱	A,a ۱۱/۵۷ ± ۱/۷۷
	۱۴	A,a ۸/۸۳ ± ۲/۴۶	A,a ۶/۹۰ ± ۲/۸۸	A,a ۱۰/۹۸ ± ۰/۸۰
رسوبی	۱	A,a ۹/۰۴ ± ۰/۵۹	A,a ۱۰/۴۳ ± ۳/۳۶	A,a ۷/۳۸ ± ۲/۷۵
	۳	A,a ۹/۷۷ ± ۱/۸۶	A,a ۱۲/۶۶ ± ۰/۸۲	A,a ۱۰/۷۱ ± ۰/۸۶
	۷	A,a ۹/۵۱ ± ۰/۲۲	A,a ۹/۱۲ ± ۱/۶۶	A,a ۱۱/۶۷ ± ۲/۵۸
	۱۴	A,a ۸/۷۷ ± ۰/۷۱	A,a ۶/۶۰ ± ۱/۹۹	A,a ۱۰/۵۸ ± ۲/۱۸

حروف غیرهمنام کوچک در سطرها، نشان دهنده‌ی تفاوت معنی دار در میزان فعالیت ایمونوگلوبولین تام بین تیمارها ($P < 0.05$) و حروف غیرهمنام بزرگ در هر ستون نشان دهنده‌ی تفاوت معنی دار در میزان فعالیت ایمونوگلوبولین تام در بین روزهای مختلف نمونه‌گیری ($P < 0.05$) برای هر تیمار می‌باشند.
AgNP: نانوذرات نقره

بحث

داده می‌شود (Suriya et al. 2012). تشکیل پیک در این محدوده توسط سایر محققین جهت سنتز نانوذرات نقره گزارش شده است (Kannan et al. 2013, Kumar et al. 2012, Saraniya et al. 2013, Suriya et al. 2012). در این مطالعه میانگین اندازه‌ی نانوذرات ۳۲/۵۴ نانومتر و با شکل کروی بود. طبق تصاویر به دست آمده از TEM، نانوذرات نقره سنتز شده در مطالعه‌ی حاضر دارای توزیع یکنواخت بوده و تقریباً به خوبی در همه جای سطح نمونه توزیع شده‌اند و در تماس مستقیم با همدیگر نیستند که یکی از دلایل احتمالی آن می‌تواند به واسطه نقش پروتئین‌ها در تولید نانوذرات نقره باشد که مولکول‌های پروتئین سبب می‌شوند تا نانوذرات تولید شده، پایدار بوده و از توزیع یکنواختی برخوردار باشند (Nithya and Ragunathan 2009). ایمونوگلوبولین‌ها دسته‌ای از گلیکوپروتئین‌ها می‌باشند، که در سرم و مایعات بافتی تمام مهره‌داران یافت می‌شوند، کاهش سطح فعالیت آن‌ها،

اخیراً سنتز نانوذرات نقره با استفاده از گیاهان و جلبک‌های دریایی به خاطر سازگاری این روش با محیط زیست، خیلی متداول شده است (Li et al. 2007). در این تحقیق سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره‌ی جلبک *Sargassum angustifolium* به صورت بیولوژیکی خارج سلولی با روش پایین به بالا انجام شد. در این مطالعه، حداکثر میزان جذبی نانوذرات بعد از گذشت ۲ ساعت از زمان واکنش در طول موج ۴۰۶ نانومتر شناسایی شد، این پیک، نشان دهنده‌ی احیاء یون‌های نقره و تشکیل نانوذرات نقره با استفاده از عصاره‌ی جلبک *Sargassum angustifolium* می‌باشد. نقره در حالت توده‌ای دارای پیک جذبی در طول موج ۳۱۶ نانومتر است، در حالی که پیک تشکیل شده در محدوده‌ی ۴۳۰-۴۰۰ نانومتر نشان دهنده‌ی تشکیل نانوذرات نقره (باباپور و همکاران ۱۳۸۶) و مربوط به رزونانس پلاسمون سطحی نانوذرات نقره می‌باشد، که به القاء الکترون‌های آزاد در نانوذرات نسبت

تام بر خلاف مطالعه‌ی ما در تمام دوره روند افزایشی یکنواختی داشت. نتایج به دست آمده از سنجش ایمنوگلوبولین تام با دو روش کدورت‌سنجی و رسوبی نشان می‌دهد که میزان ایمنوگلوبولین تام با استفاده از سنجش با هر دو روش تفاوت چندانی نداشته است. طبق نتایج کم‌ترین میزان ایمنوگلوبولین تام سرم با استفاده از هر دو روش کدورت‌سنجی و رسوبی مربوط به تیمار LC_{50} درصد نانوذرات نقره و در روز چهاردهم می‌باشد که نشان می‌دهد با کاهش غلظت نانوذرات نقره و افزایش زمان مواجهه، میزان ایمنوگلوبولین تام به طور چشم‌گیری کاهش یافته است البته این اختلاف از نظر آماری بین روز مختلف نمونه‌برداری معنی‌دار نبوده است ($p > 0.05$). کاهش در میزان ایمنوگلوبولین تام سرم در روز چهاردهم نمونه‌برداری با بقیه روزها در تیمار LC_{50} درصد نانوذرات نقره حکایت از نقش و درگیری بیش‌تر سیستم ایمنی غیراختصاصی ماهی بر علیه نانوذرات نقره‌ی سنتز شده در این غلظت با گذشت زمان دارد. همچنین افزایش یا کاهش در میزان فعالیت ایمنوگلوبولین تام سرم می‌تواند یک پاسخی برای تعدیل سلول‌های ایمنی در مواجهه با رادیکال‌های آزاد تولید شده از نانوذرات باشد (Canesi et al. 2010). در مطالعه‌ی توسط Klaper و همکاران در سال ۲۰۱۰، مشخص شد که نانولوله‌ی کربنی سبب تحریک لیزوزیم و بیان ژن اینترلوکین 1β (IL-1 β) در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌شود، اما بر میزان ایمنوگلوبولین تام سرم اثر معنی‌داری نداشت که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد. بیش‌ترین میزان ایمنوگلوبولین تام سرم با استفاده از هر دو روش اندازه‌گیری ایمنوگلوبولین مربوط به روز سوم و در تیمارهای LC_{50} درصد و $10LC_{50}$ درصد نانوذرات نقره می‌باشد، این افزایش احتمالاً به دلیل رادیکال‌های آزاد تولید شده از نانوذرات نقره می‌باشد که نشان دهنده‌ی توانایی نانوذرات نقره در القای پاسخ التهابی در ماهی می‌باشد (Canesi et al. 2010).

می‌تواند منجر به تضعیف سیستم ایمنی ماهی‌ها گردد، بنابراین سنجش سطح ایمنوگلوبولین سرم خون ماهی نیز شاخص مناسبی برای بررسی وضعیت ایمنی‌شناسی ماهیان می‌باشد. نتایج حاصل از سنجش ایمنوگلوبولین سرم با استفاده از دو روش کدورت‌سنجی و رسوبی، نشان‌دهنده‌ی عدم اختلاف معنی‌دار در تیمارهای مختلف با تیمار شاهد می‌باشد ($p > 0.05$). همچنین بین مقادیر ایمنوگلوبولین سرم در هر تیمار نیز در روزهای مختلف اختلاف معنی‌داری از نظر آماری مشاهده نشد ($p > 0.05$). طبق اطلاعات ما تاکنون هیچ مطالعه‌ای در رابطه با تأثیر نانوذرات بر مقادیر پروتئین کل و ایمنوگلوبولین سرم خون ماهی گزارش نشده است، اما محققین اظهار داشته‌اند که به طور کل کاهش در مقادیر پروتئین کل و ایمنوگلوبولین سرم خون ماهی در مواجهه با آلاینده‌ها نشان دهنده سرکوب سامانه ایمنی در اثر آن آلاینده می‌باشد (Sweety et al. 2007). میزان ایمنوگلوبولین تام سنجش شده با استفاده از هر دو روش، در روزهای مختلف نمونه‌برداری دارای نوسانات کاهشی و یا افزایشی بوده است، که این افزایش و کاهش احتمالاً می‌تواند به علت حضور نانو ذرات نقره و همچنین یون‌های نقره آزاد شده به عنوان یک ماده‌ی خارجی در داخل بدن باشد که سبب تحریک سیستم ایمنی در ماهی کپور معمولی شده است. همچنین مواجهه‌ی ماهیان با عامل بیگانه و یا آلاینده‌ها ممکن است منجر به پاسخ دوفازی در ماهی بشود، یعنی یا سبب تحریک ایمنی ماهی در مواجهه با غلظت‌های پایین می‌شود یا این که سبب سرکوب ایمنی و ایمنوتوکسیسیتی در غلظت‌های بالاتر می‌شود (Sharma et al. 1988). در مطالعه‌ی توسط عطایی‌مهر و همکاران در سال ۱۳۹۳، افزایش میزان ایمنوگلوبولین تام در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان را ناشی از تحریک پاسخ ایمنی توسط برخی از ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در عصاره‌ی آلوئه‌ورا گزارش کرده‌اند. در مطالعه‌ی توسط Amar و همکاران در سال ۲۰۰۴ با بررسی اثر جلبک دونالی‌لا بر ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، میزان ایمنوگلوبولین

منابع

- protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, (72): 248-254.
- Britti, D.; Massimini, G.; Angelo, P.; Luciani, A. and Boari, A. (2005). Evaluation of serum enzyme activities as predictors of passive transfer status in lambs. *JAVMA, Journal of the American Veterinary Medical Association*, 226: 951-955.
- Canesi, L.; Ciacci, C.; Vallotto, D.; Gallo, G.; Marcomini, A. and Pojana, G. (2009). In vitro effects of suspensions of selected nanoparticles (C60 fullerene, TiO₂, SiO₂) on *Mytilus* hemocytes. *Aquatic Toxicology*, 96 (2): 151-158.
- Hansen, B.H.; Romma, S.; Garmo, O.A.; Pedersen, S.A.; Olsvik, P.A. and Andersen, R.A. (2007). Induction and activity of oxidative stress-related proteins during waterborne Cd/Zn-exposure in brown trout (*Salmo trutta*). *Chemosphere*, 67 (11): 2241-2249.
- Jegadeeswaran, P.; Shivaraj, R. and Venckatesh, R. (2012). Green synthesis of silver nanoparticles from extract of *Padina tatrastromatica* laef. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 7 (3): 991-998.
- Kannan, R.R.; Arumugam, R.; Ramya, D.; Manivannan, K. and Anantharaman, P. (2013). Green synthesis of silver nanoparticles using marine macroalga *Chaetomorpha linum*. *Applied Nanosci*, 3: 229-233.
- Klaper, R.; Arndt, D.; Setyowati, K.; Chen, J. and Goetz, F. (2010). Functionalization impacts the effects of carbon nanotubes on the immune system of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Toxicology*, 100 (2): 211-217.
- Kumar, P.; Senthamil Selvi, S.; Lakshmi Prabha, A.; Prem Kumar, K.; Ganeshkumar, R.S. and Govindaraju, M. (2012). Synthesis of silver nanoparticles from *Sargassum tenerrimum* and screening phytochemicals for its antibacterial activity. *Nano Biomedicine Engineering*, 4 (1): 2-16.
- Li, S.; Shen, Y.; Xie, A.; Yu, X.; Qiu, L.; Zhang, L. and Zhang, Q. (2007). Green synthesis of silver nanoparticles using *Capsicum annuum* leaf extract. *Green Chemistry*, 9: 852-858.
- Mansuya, P.; Aruna, P.; Sridhar, S.; Kumar, J.S. and Babu, S. (2010). Antibacterial activity and qualitative phytochemical analysis of selected seaweeds from Gulf of Mannar Region. *Journal of Experimental Science*, 1 (8): 23-26.
- باباپور، عباس؛ سمیعی، لاله؛ اخوان، امید و مشفق، علیرضا (۱۳۸۶). تأثیر غلظت نیترات نقره بر تشکیل نانوذرات نقره در سیستم Ag-SiO₂ به روش سل-ژل، مجله پژوهش فیزیک ایران. دوره ۷، شماره ۴، صفحات ۲۱۳-۲۱۸.
- عطایی مهر، ب؛ باقری، پ؛ امتیازجو، م و یوسفی-سیاهکلرودی، س. (۱۳۹۳). بررسی اثر گیاه آلونه‌ورا بر تغییرات میزان ایمونوگلوبولین‌های IgG, IgM و IgA، پروتئین کل و شمارش تفریقی گلبول‌های سفید ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان. مجله پژوهش‌های جانوری، دوره ۲۷، شماره ۱، صفحات ۸۹-۹۹.
- علیشاهی، مجتبی (۱۳۸۸). مقدمه‌ای بر ایمنی‌شناسی آبزیان. تالیف: پی. سوآین، پی. کی. ساهو واس. آبیان. چاپ اول، انتشارات دانشگاه شهید چمران اهواز، صفحات ۵۹-۵۸، ۴۰۰.
- کلباسی، محمدرضا؛ عبدالله‌زاده، اسماعیل و سالاری‌جو، حمید (۱۳۹۱). تأثیرات نانوذرات نقره کلونیدی بر جمعیت فلور باکتریایی روده ماهی قزل‌آلای رنگین-کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، مجله تحقیقات دامپزشکی. دوره ۶۷، شماره ۲، صفحات ۱۸۹-۱۸۱.
- Ahmed, M.; Karns, M.; Goodson, M.; Rowe, J.; Hussain, S.M.; Schlager, J.J. and Hong, Y. (2008). DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 233 (3): 404-410.
- Amar, E.C.; Kiron, V.; Satoh S. and Watanabe, T. (2004). Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. *Fish shellfish Immunology*, 16 (4): 527-537.
- Asharani, P.V.; Mun, G.L.K.; Hande, M.P. and Valiyaveettil, S. (2009). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* 3 (2): 279-290.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of

- McEvan, A.D.; Fisher, E.W.; Selman, I.E. and Penhale, W.J. (1970). A turbidity test for the estimation of immune globulin levels in neonatal calf serum. *Clinica Chimica Acta*, 27: 155-163.
- Nithya, R. and Ragunathan, R. (2009). Synthesis of silver nanoparticle using *Pleurotus sajor caju* and its antimicrobial study. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 4 (4): 623-629.
- Prathna, T.C.; Mathew, L.; Chandrasekaran, N.; Raichur, A.M. and Mukherjee, A. (2010). *Biomimetic Synthesis of Nanoparticles: Science, Technology and Applicability*, Edited A. Mukherjee, InTech Publishers, Croatia, Pp: 1-20.
- Remya, S.R.; Ramesh, M.; Sajwan, K.S. and Senthil Kumar, K. (2008). Influence of zinc on cadmium induced hematological and biochemical responses in freshwater teleost fish *Catla catla*. *Fish physiology and Biochemistry*, 34 (2): 169-174.
- Riche, M. (2007). Analysis of refractometry for determining total plasma protein in hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) at various salinities. *Aquaculture*, 264 (1-4): 279-284.
- Rohlenova, K.; Morand, S.; Hyršl, P.; Tolarova, S.; Flajšhans, M. and Šimkova, A. (2011). Are fish immune systems really affected by parasites? an immunoeological study of common carp (*Cyprinus carpio*). *Parasites and Vectors*, 4: 120-138.
- Saraniya, J.; Bhimba, B.V. and Peter, D.M. (2013). Production of biogenic silver nanoparticles using *Sargassus longifolium* and its applications. *Indian Journal of Geo-Marine Science*, 42 (1): 125-130.
- Sharma, R.P. (1988). Evaluation of pesticide immunotoxicity. *Toxicology and Industrial Health*, 4 (3): 3-25.
- Singaravelu, G.; Arockiamary, J.S.; Kumar, V.G. and Govindaraju, K. (2007). A novel extracellular synthesis of monodisperse gold nanoparticles using marine alga, *Sargassum wightii* Greville. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 57 (1): 97-101.
- Suriya, J.; Bharathi R.S.; Sekar, V. and Rajasekaran, R. (2012). Biosynthesis of silver nanoparticles and its antibacterial activity using seaweed *Urospora* sp. *African Journal of Biotechnology*, 11 (58): 12192-12198.

Compare the total immunoglobulin assays using turbidity and precipitation test in common carp exposed to synthesized silver nanoparticles using sargassum seaweed

Bitá, S.¹; Mesbah, M.²; Shahryari, A.³ and Ghorbaanpoor, M.⁴

Received: 30.04.2016

Accepted: 24.07.2016

Abstract

Immunoglobulins are serum proteins that produced by the plasma and humoral immune responses are important components commonly by serological methods for the measurement. In this study, at first the synthesis of silver nanoparticles was performed using biological method with sargassum seaweed, then the impact of this nanoparticle on the total immunoglobulin of common carp using two different methods of turbidity and precipitation test. The impact of nanoparticles on the total immunoglobulin using two methods: turbidity and sediment exposed to three concentration (0.11, 1.13, 5.67 mg/L AgNP) of this silver nanoparticles were studied for 14 days.. using were compared. Results obtained from UV-Vis spectroscopy and TEM confirmed biosynthesis of silver nanoparticles using this algae. The synthesized silver nanoparticles were predominately spherical shape and 32/54 nm size and maximum absorption peaks were detected in the range of 406 nm. The results of the measurement of serum immunoglobulin using turbidity and precipitation tests indicating no significant differences in the treatments with control ($p>0.05$). As well as between the amount of serum immunoglobulin in each treatment sample at different days showed no statistically significant difference ($p>0.05$). In conclusion, our results indicate that silver nanoparticles synthesized using *Sargassum angustifolium*, had no effect on total serum immunoglobulin levels measured by both methods inhibition or stimulation.

Key words: Immunoglobulin, turbidity and precipitation tests, silver nanoparticles, common carp

1-Assistance Professor, Department of Fisheries, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran

2- Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

3- Associate Professor of Basic Sciences department, Faculty of Veterinary, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

4- Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Corresponding Author: Bitá, S., E-mail: serajbita@yahoo.com