

بررسی اثرات ترکیب نانو ذرات نقره گیاهی بر کنترل شته برگ برنج (*Rhopalosiphum padi* (L.)) (Hem. Aphididae) و تاثیرات سرطانی آن بر موش‌های آزمایشگاهی

آیدا صدیقی^۱، سهراب ایمانی^{۲*}، غلامرضا مشتاقی کاشانیان^۳، حسین نجفی^۴، یعقوب فتحی پور^۵

۱-فارغ التحصیل دکتری حشره شناسی کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات

۲-استادیار، عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات گروه گیاه پزشکی

۳-دانشیار، استاد دانشکده پزشکی دانشگاه کرمان

۴-دانشیار عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات گیاهپزشکی

۵-استاد، عضو هیات دانشگاه تربیت مدرس دانشکده کشاورزی گروه حشره شناسی کشاورزی

چکیده

در حال حاضر استفاده از آفت کش‌های شیمیایی روش اصلی کنترل حشرات است. به کارگیری فناوری نانو سبز در تولید سموم آفت کش جدید می‌تواند به عنوان روشی مکمل در کنترل آفات مورد توجه و استفاده قرار گیرد. از این رو در پژوهش حاضر از نانو ذرات نقره گیاهی تولید شده از عصاره پوست گیاه پرتقال *Citrus sinensis* استفاده شد. ویژگی‌های نانو ذرات تولید شده به وسیله میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) پراش اشعه XRD، اسپکتوفتومتری تعیین گردید. اثرات حشره کشی نانو ذرات نقره بر روی شته برگ برنج در شرایط آزمایشگاهی در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار هر تکرار شامل ۲۰ شته بالغ با پنج غلظت (5/12 ppm)، 25، 50، 100، 169 به روش Filter paper residue صورت گرفت. تجزیه رگرسیونی پروبیت داده‌ها نشان داد که مقدار LC50 برابر 08/30 PPM و 69/2 روز تخمین زده شد. اثرات نانو ذرات نقره بر روی بافت کبد و کلیه ۳۲ سر موش آزمایشگاهی ۴ گروه (0 ppm)، 42، 48 (169 هشت تایی به مدت سه ماه از طریق تزریق درون صفاقی صورت گرفت. بررسی بافت شناسی کبد و کلیه ارتشاح سلولی‌های آماسی، هایپرپلازی سلول‌های کوپفر، پر خونی، دژنراسانس در سلول‌های کبدی و افزایش تعداد کانون‌های لنفوسیتی در بافت کلیه را نشان داد. همچنین میزان آنزیم‌های SGOP، SGPT و ALK نیز در مواجهه با نانو ذرات نقره افزایش ($p < 0.05$) پیدا کرد. بطور کلی نتایج پژوهش حاضر حاکی از آن است که به کارگیری نانو ذرات نقره با توجه به فراگیری وسیع آن دارای اثرات زیان بار زیست محیطی است.

واژه‌های کلیدی: نانو ذرات نقره، *Rhopalosiphum padi*، بیواسی، بافت شناسی، سم شناسی

* نویسنده رابط، پست الکترونیکی: manisohrab@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۹۹/۲/۳ - تاریخ پذیرش مقاله: ۹۹/۶/۲



مقدمه

تغییر در فناوری‌های مربوط به صنعت کشاورزی مهمترین عامل در ایجاد کشاورزی مدرن است. در این میان فناوری نانو، زمینه مناسبی را در تولید محصولات غذایی و کشاورزی فراهم آورده است. همچنین گسترش نانو ابزار و نانو مواد مختلف، کاربردهای جدیدی را در زیست فناوری گیاهی و کشاورزی ایجاد نموده است. گسترش محصولات اصلاح شده ژنتیکی، مواد شیمیایی محافظ گیاه و روش‌های دقیق کشاورزی از جمله مزیت‌های کاربرد این فناوری به شمار می‌رود. ابزارهای نانو مقیاس با خصوصیات ویژه، سیستم‌های کشاورزی را متحول ساخته است. به علاوه سیستم‌های آزادسازی هوشمند در کشاورزی باید قابلیت‌های مهمی همچون کنترل زمان هدف گیری، تنظیم و خود تنظیمی را دارا باشند تا برای رسیدن به هدف خود با موانع بیولوژیکی برخورد نداشته باشند. فناوری نانو نقش مهمی را در بهبود روش‌های مدیریت محصول ایفا می‌کند. معمولاً غلظت بسیار کمی از مواد شیمیایی، که بسیار کمتر از حداقل غلظت مورد نیاز گیاه است. به مکان هدف می‌رسد که ناشی از مشکلاتی مانند نشت مواد شیمیایی به خارج از گیاه، تخریب به واسطه فتولیز، هیدرولیز و تخریب میکروبی است. از این رو برای داشتن کنترلی مؤثر تکرار ضروری است. اما ممکن است منجر به اثرات ناخواسته ای همچون آلودگی آب و خاک شود. در چنین مواردی، مواد شیمیایی گیاهی، نانو کپسوله شده، باید به گونه‌ای طراحی شود که شامل تمام خواص مورد نیاز همچون غلظت مؤثر، حلالیت بالا، پایداری، اثربخشی، رهایش کنترل شده با زمان در پاسخ به محرک‌های خاص، افزایش فعالیت‌های هدفمند شده و خطرات کمتر برای محیط زیست با ساز و کار رهایش آسان و ایمن باشند که از استفاده مجدد آنها جلوگیری نماید. کنترل علف‌های هرز با علف کش‌های نانو کپسوله شده که موجب کاهش اثر سمیت علفکش‌ها بر غلات می‌شوند، نمونه‌ای مناسب از این نوع مواد است. در دهه‌های اخیر نانو تکنولوژی در زمینه‌های مختلف از جمله هوا - فضا، صنایع مختلف اعم از نظامی، غذایی، شیمیایی و غیره، داروسازی، پزشکی و حشره کش‌ها گسترش چشمگیری داشته است. حشره‌کش‌های نانو از اهمیت اقتصادی، بهداشتی و پزشکی بسیار بالایی برخوردارند زیرا با اثربخشی بیشتر در مقایسه با انواع معمولی خود در مبارزه با بندپایان آفت محصولات کشاورزی و ناقلین بیماری‌های مهمی نظیر مالاریا کاربرد دارند. تاکنون نمونه‌هایی از حشره کش‌های نانو به روش‌های مختلف تولید شده است ولی با توجه به نیاز جدی برای گسترش این گروه از حشره کش‌ها، شناسایی روش‌های مناسب تهیه نانو ذرات حشره کش‌ها لازم است. موضوع دیگری که سبب ضرورت پژوهش و توسعه در زمینه آفت کش‌های نانو می‌شود، پدیده مقاومت آفات نسبت به آفت کش‌ها می‌باشد که این موضوع موجب کاهش جدی تعداد آفت کش‌های مناسب به خصوص در مصارف بهداشتی شده است. در عین حال معرفی بیشتر موضوع حشره کش‌های نانو به پژوهشگران موجب رونق پژوهش و توسعه در این زمینه نسبتاً جدید می‌شود. از نانو ذرات، نقره و طلا که به صورت سبز تولید شده اند بر علیه آفات *Anopheles stephensi* و ناقلین فیلاریا و *Culex quinquefasciatus* مورد استفاده قرار گرفت. مطالعات آنها نشان داد که *A. stephensi* نسبت به سایر حشرات به کار گرفته شده دارای اثرات حشره کشی است. همچنین مطالعه ای از اثرات نانو نقره تولید شده از عصاره گیاهی پرتقال بر علیه مگس سرکه *Drosophilla melanogaster* صورت گرفته است. نتایج حاکی از آن بود که این نانو ذرات دارای قدرت کشندگی بالا بر روی لارو، شفیره و بالغین مگس داشته است (Araj et al., 2005). به علاوه ترکیب بین نانو ذرات نقره با گیاه *Cinnamomum zeylanicum* (Chowdappa and shivakumar,

2013) و *Ficus racemosa* (Velayutham et al., 2013) بر علیه لاروهای دوبالان و *Anopheles stephensi* سبب ایجاد مرگ و میر ۱۰۰ درصدی شد. مطالعات دیگری بر روی اثر حشره کشی نانو ذرات نقره بر روی شته ها (Rouhani et al., 2012) و *Tetranychus urtica* کنه تارتن دو نقطه ای (Jalalizand et al., 2013) صورت گرفته است. اثرات محیطی در سلامتی نانو ذرات نقره قبل از اینکه بطور تجاری تولید شوند باید بطور کامل مورد بررسی قرار گیرند. نانو ذرات به واسطه کاربردهای کشاورزی وارد خاک می‌شود، و یا در اتمسفر انباشته و یا طی مسیرهای مختلف در محیط تجمع پیدا می‌کنند. نانو ذرات بیشتر درون خاک تجمع پیدا می‌کنند، بدلیل کم تحرکیشان در خاک آنجا باقی می‌مانند. از آنجا که این علم بسیار نوظهور بوده و هنوز آگاهی اندکی نسبت به آن وجود دارد، انجام پژوهشات گسترده پیرامون اثرات این فناوریها بر محیط و جایگاه واقعی آن برای رسیدن به کشاورزی پایدار، امری ضروری است. در مطالعه ای، ۳۶ موش‌های یک ماهه نژاد وسیتار در قالب ۶ گروه شش تایی دسته بندی شدند، محلول‌های نانو نقره در غلظت‌های ۵ppm، ۲۰، ۳۵، ۶۵، ۹۵ بجای آب آشامیدنی خوراندند. تعداد گلبول‌های سفید خون کاهش معنی داری را داد. اما تعداد گلبول‌های قرمز خون و سطح هموگلوبین و هماتوکریت تغییر معنی داری نداد. سطوح هرمونی T4 بر کورتیزول خون به صورت وابسته به دز کاهش یافته است (Roshanai et al., 2012). در مطالعه ای نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم بصورت تزریق وریدی به موش‌های صحرایی در دز ۰/۹۵ mg/kg وزن بدن موش، بکار گرفتند. غلظت‌های خونی دی اکسید تیتانیوم ۴۲۰ ng/kg و ۱۹ ng/kg در ۵ و ۱۵ دقیقه پس از تزریق بود که نشان دهنده پاک کنندگی سریع در خون است. در ۶ ساعت پس از تزریق بیشترین غلظت‌های خونی از دی اکسید تیتانیوم در کبد یافت شد. پس از آن اندام‌های طحال، ریه ها، کلیه ها، قلب و خون به ترتیب ۰/۲۶٪، ۰/۱۴٪، ۰/۲۳٪، ۰/۱۷٪ و ۲٪ دارای بیشترین میزان Tio₂ را خود بودند. میزان غلظت Tio₂ در کبد و طحال پس از ۳۰ روز از دوره آزمایش باقی ماندند. دفع Tio₂ از ادرار و مدفوع نسبت به کنترل تفاوت نداشت (Shinohara et al., 2013). از نانو ذرات کادمیوم تلوریوم (Methoxy-PEG-500 coating; Znshell; Cdete core) با قطر تقریبی ۱۳ نانومتر استفاده شد (Yang et al., 2007). آنها این نانو ذرات را به رگ دم موش‌های آزمایشگاهی تزریق کردند. موش‌ها در ساعتهای ۱ و ۴ و ۲۴ و همچنین ۳ و ۷ و ۲۴ و ۲۸ روز پس از تزریق کشته شدند. اندام‌هایی مانند مغز، کلیه ها، طحال، ماهیچه ها، چربی، پوست و استخوان‌ها جهت بررسی و گرفتن بافت از بدن جانور جدا شدند. میزان غلظت کادمیوم در طحال، کبد و کلیه بسیار بالا بود. بررسی درصد میزان نانو ذره باقی مانده در اندام‌های مختلف بصورت ذیل بود: در کبد ۲۹ درصد، خون ۱۰ درصد، طحال ۴/۸ درصد و کلیه ۱/۵ درصد (در اولین روز پس از تزریق). در این مطالعه نانو ذرات نقره با بهره گیری از روش تولید سبز نانو، با استفاده از عصاره گیاهی پرتقال تولید شد. نظر به این که نانو ذرات نقره می‌توانند بطور مستقیم بر روی فعالیت طبیعی سلول‌های بدن تاثیر بگذارند و باعث اختلال در عملکرد اندام‌های بدن شوند، لذا تعیین سمیت آنها در محیط زنده از اهمیت خاصی برخوردار است. بنابراین در پژوهش حاضر، بافت کبد و کلیه و آنزیم‌های کبد مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به این که بیش تر سموم وارد شده به بدن وارد کبد می‌شوند در مطالعه حاضر اثر حاد نانو ذرات نقره روی سلول‌های خونی تغییرات بافتی و آنزیمی کبد و کلیه، متعاقب تزریق نانو ذرات نقره مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تولید نانو ذرات نقره با استفاده از عصاره گیاه پرتقال: مقدار ۱۶ گرم از پوست پرتقال تازه به همراه ۲۰۰ میلی‌لیتر آب دیونایز در یک بشر به مدت ۳۰ دقیقه روی حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجه سلسیوس جوشانده، سپس محلول حاصل از صافی شماره یک عبور داده شد. سپس عصاره آبی استخراج شده از پوست پرتقال به محلول ۰/۰۰۱ مولار نیترات نقره $AgNO_3$ به نسبت ۸۰:۲۰ شد. محلول حاصل به مدت ۵۰ دقیقه در معرض نورخورشید قرار گرفت (Samadi, 2014). عوامل احیا کننده گیاهی در عصاره‌ها سبب کاهش در محلول شد. تغییر رنگ محلول حاصل از زرد کم‌رنگ به قهوه‌ای یکی از عوامل اتصال ذرات نانو شده به عوامل احیاگر گیاهی می‌باشد. با استفاده از روش‌های مشخصه یابی نانو ذرات که در زیر بیان شده است، تولید نانو ذرات نقره مورد بررسی قرار گرفته است.

روش‌های تشخیص نانو ذرات تولید شده: نانو ذرات به علت دارا بودن رزونانس پلاسمون سطحی دارای جذب در محدوده ۳۵۰ تا ۵۵۰ نانومتر می‌باشند. برای آنالیز اسپکتروفوتومتری UV-Visible جذب محلول قهوه‌ای رنگ (عصاره + نیترات نقره) حاصل از برهم‌کنش عصاره گیاهی پوست پرتقال و نمک نقره با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتری در بازه طول موج ۳۵۰ تا ۵۵۰ نانومتری بررسی شد. برای تست XRD نمونه باید جامد باشد. بنابراین نانو ذرات نقره سنتز شده توسط عصاره پوست پرتقال را جهت کامل خشک شدن در آن در دمای ۶۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. برای آنکه پس از خارج شدن حلال، باقیمانده قابلیت استفاده جهت تست XRD را داشته باشد، یک عدد لام شیشه‌ای در ته ظرف حاوی محلول سنتز شده قرار می‌دهیم تا نانو ذرات روی لام بنشینند و لام در دستگاه گذاشته شود. بررسی نانو ذرات نقره تهیه شده در این پژوهش با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری در دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده فنی مهندسی انجام گرفت.

بررسی اثرات حشره‌کشی نانو ذرات نقره تولید شده توسط عصاره *C. sinensis* گیاه پرتقال، زیست سنجی شته برگ برنج *Ropalosiphum padi* به منظور پرورش شته‌ها و تامین محیط مناسب برای زندگی آنها احتیاج به کشت گیاه مناسب و مطلوب برای رشد شته بود. از این رو از گیاه گندم که از میزبان‌های مهم و اصلی این شته است، استفاده شد. به منظور پرورش گیاه گندم از گلدان‌های پلاستیکی کوچکی به قطر ۸ سانتی‌متر استفاده شد. همچنین به منظور دسترس بودن گیاه گندم تازه و سالم برای شته‌ها، احتیاج به کاشت هفتگی گلدان بود. گلدان‌ها حاوی شته‌ها در دمای $27 \pm 3^\circ C$ و رطوبت نسبی $65 \pm 5\%$ و دوره نوری ۱۴ ساعت تاریکی و ۱۰ ساعت روشنایی بودند. از آنجایی که یکی از اهداف پژوهش حاضر بررسی اثرات حشره‌کشی غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره گیاهی می‌باشد، نیاز به پرورش و داشتن کلنی شته برگ برنج بود. برای جمع‌آوری شته‌ها بازدیدهای متعددی در اوایل پاییز ۱۳۹۵ از مزارع گندم کرج صورت گرفت. شته مورد نظر از منطقه محمد شهر کرج جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. گونه مورد نظر پس از شاسایی و تهیه اسلاید از آن روی گیاه گندم رهاسازی شد. برای ممانعت از فرار شته‌ها و آلودگی کلی به دیگر حشرات و پارازیتوئیدها استوانه‌های بلندی به قطر ۷ سانتی‌متر و به ارتفاع ۴۰ سانتی‌متر که از دو طرف پنجره‌های توری داری مجهز بود استفاده شد. پس از سپری شدن یک هفته گیاه گندم زرد می‌شود، بنابراین تعدادی از شته‌ها با قطع ساقه و قرار دادن بر روی گیاه سالم تر و تازه، سبب افزایش جمعیت حشره مورد نظر شد. اثرات حشره‌کشی نانو ذرات نقره گیاهی تولید شده در این مطالعه، به روش طالبی، ۱۳۹۱ صورت گرفت. این آزمایش نیز در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج غلظت نانو ذرات نقره (۱۲/۵ppm و ۲۵ و ۵۰ و ۱۰۰ و ۱۶۹) با سه تکرار در هر تکرار ۲۰ شته

بالغ مورد ارزیابی قرار گرفت. برگه‌های کاغذ صافی بصورت دایره‌هایی به اندازه ته پتری دیش‌ها آماده کرده و به اندازه پنج میلی‌لیتر هر کاغذ صافی را به نانو ذره نقره آغشته ساخته سپس کاغذها را رها کرده تا در دمای محیط خشک شوند. حشرات بالغ را روی آنها رها کرده و در داخل هر پتری گیاه گندم سالم در اختیار شته‌ها قرار داده می‌شد. درب ظروف مورد نظر را با پارافیم مسدود شد و در داخل انکوباتور با دمای $23 \pm 2^\circ\text{C}$ و دوره نوری ۱۶:۸ (تاریکی: روشنایی) قرار داده شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت روزانه، حشرات مرده، پوره‌ها شمارش و از محیط حذف شدند. مرگ و میر به مدت پنج روز ثبت شد. درصد مرگ و میر تجمعی به دست آمده توسط فرمول ابوت اصلاح شد. لازم به ذکر است که آزمایش‌های مقدماتی به منظور تعیین غلظت‌های اصلی، آزمایش‌های متعددی با غلظت‌های مختلف انجام شد و نهایتاً غلظت‌های حد اقل و حداکثر که سبب کمترین و بیشترین تلفات (۸۰-۲۰ درصد تلفات) شده بود تعیین شد.

اثر سمیت نانو نقره گیاهی بر روی تغییرات هستوپاتولوژیک کبد، کلیه، آنزیم ها و سلولهای خونی موشهای آزمایشگاهی: در این مطالعه از ۳۲ راس موش نر نژاد NMIR استفاده شد. این حیوانات از انستیتو پاستور تهران خریداری شد و به منظور آماده سازی برای آزمایش به مدت دو هفته در اتاق حیوانات در قفس‌های مخصوص در رطوبت مناسب (۵۰-۷۰) درصد و درجه حرارت‌های مناسب آزمایشگاهی ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) و نور کافی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. حیوانات آزمایشگاهی با میانگین وزنی ۳۰ تا ۳۲ گرم بودند و به چهار گروه هشت تایی، (یک گروه کنترل و سه گروه تیمار) تقسیم شدند. در ابتدا غلظت‌های مورد نظر از نانو ذرات نقره تهیه شد. گروه‌های تیمار نانو ذرات نقره گیاهی با غلظت‌های ppm ۱۶۹، ۸۴ و ۴۲ به صورت یک روز درمیان با سرنگ انسولین در شرایط استریل به صورت داخل صفاقی به هر موش تزریق شد. به گروه کنترل یک سی سی آب مقطر استریل تزریق شد. این آزمایش به مدت ۹۰ روز ادامه پیدا کرد. پس از سپری کردن سه ماه، موشهای تیمار شده توزین شده و برای خونگیری و تهیه بافت‌های کبدی و کلیوی آماده شدند. جهت انجام آزمایشات بیوشیمیایی نمونه خون از هر موش به صورت مستقیم از قلب بوده (بدلیل محدود بودن مقادیر خونی) این موش‌ها صورت گرفت. نمونه خون گرفته شده از هر موش به منظور جدا سازی سرم در لوله‌های مخصوص سانتریفیوژ قرار گرفت. همچنین نمونه‌های خون در ظرف مخصوص CBC که حاوی ماده ضد انعقاد خون EDTA بوده منتقل شد. جهت بررسی آزمایشات بیوشیمیایی خون نمونه‌ها تحویل آزمایشگاه تشخیص طبی شد.

تشریح و نمونه برداری بافتی: پس از گذشت سه ماه از دوره در معرض قرار گیری موشهای آزمایشگاهی وزن حیوانات اندازه‌گیری شد. موشها توسط اتر بیهوش شدند. ابتدا خون اندامهای کبد و کلیه پس از تشریح با دقت و ظرافت به کمک پنس و قیچی جراحی جدا در سرم فیزیولوژیک شسته شدند و سپس در داخل فرمالین ۱۰ درصد تثبیت و برای آزمایشهای هستوپاتولوژی (Histopathologic tests) نگهداری شدند. فرمالدهید ۱۰ درصد قبلا به صورت اختلاط ۱۰۰ml فرمالدهید، سدیم دی هیدروژن، فسفات ۶/۵ گرم و ۹۰۰ ml آب مقطر تهیه شد. برای تهیه نمونه بافت ها مراحل آبیگری، شفاف سازی، آغشتگی با پارافین و در نهایت قالب گیری انجام گرفت. از هر نمونه سه لام به طور تصادفی انتخاب شد. توسط میکروسکپ نوری از آنها تصویر میکروسکوپی تهیه شد. تمام لامهای تهیه شده توسط متخصصین آسیب شناس مورد بررسی قرار گرفت. برش‌های تهیه شده از این دو بافت توسط روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین (H and E) استاندارد به شرح زیر رنگ

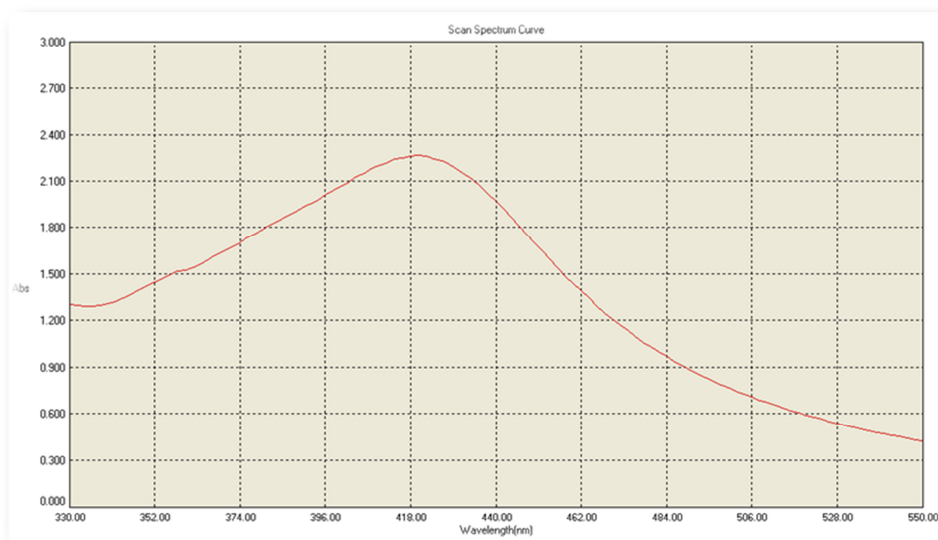
آمیزی شد. برشها به مدت ده دقیقه در هماتو کسپلین قرار داده شدند و پس از شستشو با آب به مدت دو دقیقه در ائوزین قرار گرفتند.

جذب اتمی: در آنالیز شیمیایی برای تعیین مقادیر عناصر، چه در روشهای کلاسیک مانند تیتراسیون (حجم سنجی)، وزن سنجی و طیف سنجی نور مرئی و ماوراء بنفش و چه در روشهای جدیدتر مانند طیف سنجی جذب اتمی و طیف سنجی نشر اتمی در محیط پلاسمای جفت شده القایی، نمونه مورد نظر باید به طور کامل حل شود. در این مطالعه یک گرم نمونه خشک را درون بوته تفلونی توزین نموده و به آن ۷ میلی لیتر اسید نیتریک غلیظ و یک میلی لیتر اسید کلریدریک اضافه شد. هضم به کمک دستگاه های ماکرو ویو آزمایشگاهی انجام شد.

بررسی آماری داده های حاصل از نتایج: پس از جمع آوری داده ها آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SAS (statistical Analysis software) و همچنین آزمون توکی انجام گرفت. جهت تعیین غلظت های کشنده LC_{25} ، LC_{50} ، LC_{90} شته های تیمار شده از نرم افزار Polo plus (version 20) استفاده شد. مرگ و میر اصلاح شده توسط فرمول ابوت محاسبه شد. بدین ترتیب که مرگ میر حشرات مرده تقسیم بر تعداد کل حشرات موجود در آزمایش است. برای آنالیز واریانس (ANOVA) از نرم افزار SPSS (version 16) استفاده شد.

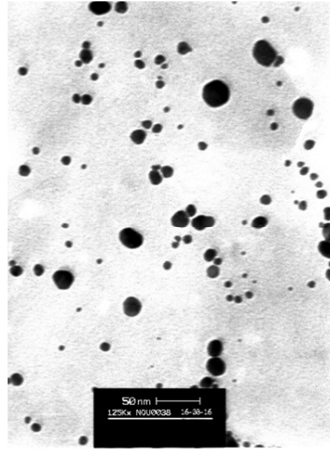
نتایج

مشخصه یابی نانو ذرات نقره: نتایج حاصل از دستگاه طیف سنجی UV-Vis، بیشترین جذب را در بازه طول موج ۵۰۰-۳۵۰ نانومتر نشان داد (شکل ۱). عصاره حاصله از پوست پرتقال به همراه $AgNO_3$ رنگی بین زرد روشن بود که با گذشت زمان به قهوه ای تمایل پیدا کرد. این پدیده گواهی از تشکیل نانو ذرات است. با توجه به شکل (۱) ماکزیمم پیک جذب در حدود طول موج ۴۱۸ نانومتر نشان دهنده وجود نانو ذرات نقره و در واقع تولید نانو ذرات توسط عصاره است.



شکل ۱ طیف uv-vis نانو ذرات نقره تولید شده توسط عصاره گیاه پرتقال *C. sinensis*
 Fig. 1 UV-VIS absorption spectra of Ag NPs synthesized by *C. sinensis* peel extract

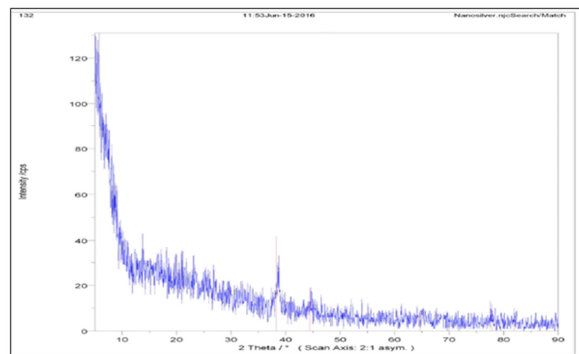
میکروسکوپ الکترونی (TEM) **Transmission Electron Microscopy**: برای تعیین اندازه و شکل نانو ذرات نقره گیاهی تولید شده از میکروسکوپ الکترونی گزاره استفاده شد. عکس‌های حاصل از این میکروسکوپ نشان داد که اندازه نانو ذرات ۵۰ نانومتر و شکل آنها کروی است. الگوی پراکنش نانو ذرات حاکی از پایداری عوامل موجود در محلول بوسیله اتصال AgNO_3 به عوامل کاهنده گیاهی است (شکل ۲).



شکل ۲- تصویر میکروسکوپ الکترونی گزاره از نانو ذرات نقره تولید شده از عصاره گیاهی *C. sinensis*

Fig. 2 Transmission electron microscopy image of the green Ag NPs synthesized with *C. sinensis* peel extract

طیف سنجی پراش اشعه ایکس (XRD) الگوی پراش اشعه ایکس نانو ذرات نقره در شکل (۳) نمایش داده شده است. طیف به دست آمده نشان دهنده حضور ذرات نقره است. بیشترین پیک جذبی در ۳۸ نشان داده شده است. الگوی پراش نشان داد که پیک‌هایی در 2θ ، $38/26^\circ$ ، $44/47^\circ$ ، $64/71^\circ$ ، $77/7^\circ$ و $81/90^\circ$ است که مربوط به سطوح (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰)، (۳۱۱) و (۲۲۲) نانو کریستال Ag_2O است (JCPDS No.006-5378). فراوان ترین و پرتنش ترین جهت مربوط به سطح (۱۱۱) می‌باشد. سطوح پیک ها گواه این مطلب است که ذرات در محدوده رژیم نانویی قرار دارند. همچنین پیک ها در شکل مدل استاندارد خود قرار دارند که نشان دهنده حضور ذرات نانو نقره در عصاره آبی است (نانو ذرات نقره دارای صفحات کریستالی ۱۱۱ و ۲۰۰ و ۳۱۱ است).



شکل ۳- الگوی پراش اشعه ایکس (XRD) نانو ذرات نقره گیاهی تولید شده از عصاره گیاهی پوست پرتقال *C. Sinensis*

Fig.3 XRD pattern of green Ag nanoparticles synthesized by *C. sinensis* peel extract.

جذب اتمی نانو ذرات نقره در بافت کبد و کلیه موشهای آزمایشگاهی: جذب اتمی یکی از دقیق ترین روش ها برای تشخیص و تعیین مقدار فلزات در محلول ها می باشد. به طوری که عناصر فلزی مقادیر بسیار جزئی را اندازه گیری می کند. جذب اتمی نانو ذرات نقره نشان داد که مقدار کافی از نانو ذرات به ترتیب ۳/۸، ۳/۷۵ میلی گرم بر لیتر نانو نقره گیاهی در حجم بافت کبد و کلیه موشهای صحرایی تیمار شده با نانو ذرات نقره گیاهی منتشر شده با عصاره گیاهی وجود دارد. زیست سنجی شته برگ برنج *R. padi* با نانو ذرات نقره: تجزیه و تحلیل رگرسیون لگاریتمی پروبیت داده های مربوط به غلظت مرگ و میر نشان داد که مقدار LC₂₅ برابر ۸/۱۱ ppm، LC₅₀ برابر با ۳۰/۰۸ و LC₉₀ برابر با ۳۶۲/۶۱ ppm تخمین زده شد (جدول ۲). میزان مرگ و میر برای بیشترین غلظت (۱۶۹ ppm) ۸۱٪ گزارش شده است و کمترین مرگ و میر برای غلظت ۱۲/۵، ۲۹٪ می باشد. تجزیه واریانس مرگ و میر تجمعی شته های بالغ *R. padi* در قالب طرح کاملاً تصادفی در جدول (۱) نشان داده شده است.

جدول ۱- تجزیه واریانس مرگ و میر تجمعی شته های بالغ *R. padi* در قالب طرح کاملاً تصادفی

Table 1. Analysis of cumulative mortality variance *R. padi* in a completely random design

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	P
نانو ذرات نقره	۵	۴۲۷/۷	۸۵۰۵۵	۱۵۴	۰/۰۰۱
خطا	۱۲	۶۶/۶	۰/۵۵		
CV	۷/۰۶				

جدول ۲ نتایج تجزیه پروبیت نانو ذرات نقره گیاهی بر روی شته های بالغ *R. padi*

Table 2. Lethal concentration values for AgNPs toxicity on *R. padi* after five days exposure.

حشره	LC ₂₅ (حد بالا-حد پایین)	LC ₅₀ (حد بالا-حد پایین)	LC ₉₀ (حد بالا-حد پایین)	Slope ± SE
<i>R. padi</i>	۸/۱۱ (۱۵/۴۴ - ۱/۷۷)	۳۰/۰۸ (۴۵/۳۳ - ۱۶/۰۱)	۳۶۲/۶۱ (۴۵/۳۳ - ۱۷۳/۱۳)	۱/۱ ± ۰/۲

LC₅₀ غلظت کشندگی ۵۰٪ افراد بالغ که در معرض نانو ذرات نقره قرار گرفته اند. Slope: شیب خط

SE = standard error

LC₅₀ = Expressed in ppm (lower and upper limits) in 0.1 % probability

Chi-square testing linearity of dose-mortality response.

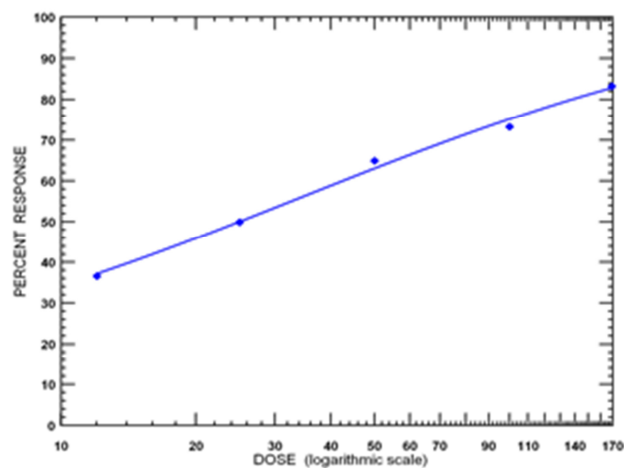
ppm) Mortality for the highest dose (169

مقدار LT₅₀ برای این آزمایش ۲/۶۹ روز تخمین زده شده است. بیشترین LC₅₀ مربوط به کمترین دز ۱۲ ppm و بیشترین مرگ و میر مربوط به غلظت ۱۶۹ ppm می باشد. در زیست سنجی شته های تیمار شده با نانو ذرات نقره درصد مرگ و میر شته ها با افزایش غلظت نانو ذرات نقره گیاهی افزایش یافت (شکل ۴). نتایج تجزیه شاخص های توصیفی شته ها بالغ *R. padi* تیمار شده با نانو ذرات نقره گیاهی در جدول (۳) نشان داده شده است.

جدول ۳- نتایج تجزیه شاخص‌های توصیفی شته‌ها بالغ *R. padi* تیمار شده با نانو ذرات نقره گیاهی

Table 3. Description of the analysis of descriptive indicators of *R. padi* treated with AgNPs

P	انحراف معیار	پاسخ مورد انتظار	پاسخ مشاهده شده	تعداد شته‌ها	غلظت
۰/۸	۰/۱	۴۹/۶۱	۵۰	۶۰	PPM۱۶۹
۰/۷	۰/۳	۴۵/۱۲	۴۴	۶۰	PPM۱۰۰
۰/۶	۰/۲	۳۷/۹۷	۳۹	۶۰	PPM۵۰
۰/۵	۰/۰۳	۳۰/۱۴	۳۰	۶۰	PPM۲۵
۰/۳	۰/۰۴	۲۲/۱۵	۲۲	۶۰	PPM۱۲/۵



شکل ۴- نمودار لگاریتمی غلظت درصد مرگ و میر شته‌های تیمار شده با نانو ذرات نقره گیاهی

Fig4- Logarithmic diagram of mortality percentage aphids treated with plant silver nanoparticles

بررسی هیستوپاتولوژیک تأثیرات نانو ذرات گیاهی نقره بر کبک: در مطالعه حاضر سمیت نانو ذرات نقره گیاهی بر کبک موش نژاد NMRI مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج مشاهدات تشریحی کبک در گروه‌های تیمار با غلظت‌های ۱۶۹ ppm، ۸۴، ۴۲ نانو ذره نقره طیفی از تغییرات پاتولوژیک نظیر هایپر پلازی سلولهای کوپفر، ارتشاح سلولی در پارانشیم و فضای پورتال، دژنره و پرخونی را نشان داد (جدول ۴). در عین حال هیستوپاتولوژی بافت کبک در موشهای مورد تیمار نانو ذرات نقره هیچ گونه تغییر پاتولوژیک در ارتباط با نکروز و فیبروز از خود نشان نداد. آسیب‌ها در گروه تیمار با افزایش غلظت نانو ذره نقره بیش‌تر شده است.

جدول ۴ تجزیه واریانس تغییرات پاتولوژیک هایپر پلازی سلول‌های کویپر، ارتشاح سلولی در پارانشیم و فضای پورتال، دژنره و پرخونی در بافت کبد

Table 4-Analysis of variance of pathological changes of Cupfer cell hyperplasia, cell infiltration in parenchyma and portal space, degeneration and hyperemia in liver tissue

میانگین مربعات (MS) صفات							درجه	منابع تغییرات
فیروز	نکروز	پرخونی	دژنره	هایپرپلازی کویپر	انفیلتراسیون پورتال	انفیلتراسیون پارانشیم	آزادی	
۰	۰	۹/۹۲ **	۷/۶۷ **	۸/۶۲ **	۹/۴۱ **	۷/۶۷ **	۳	نانو نقره
۰	۰	۰/۱	۰/۰۸	۰/۱	۰/۲	۰/۳	۹۲	خطا
		۵۲/۳۱	۹۲/۶۲	۸۰/۳۲	۳۸/۹۳	۲۲/۱		F
		۱۷	۳/۱۵	۷/۱۶	۲۱/۱۲	۱/۲۷		CV %

*, **, ns. به ترتیب معنی دار در سطح ۵ درصد، در سطح ۱ درصد و غیر معنی دار

مطالعات هیستوپاتولوژیک بافت کبد در گروه‌های تیمار پس از ۹۰ روز نشان داد که ارتشاح سلول‌های آماسی، هایپرپلازی سلول‌های کویپر، پرخونی و دژنراسانس که شامل گرانوله شدن سیتوپلاسم و واکوئله شدن سلول‌های کبدی با افزایش غلظت نانو ذرات تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد را نشان داد (جدول ۵). بررسی بافت کبد در موشهای در معرض نانو ذرات نقره نشان می‌دهد که در دز پایین نانو نقره آسیب بافتی کمتری مشاهده می‌شود. دزهای بالاتر نانو ذرات نقره بر بافت کبد بیشتر تاثیر داشته است. به عبارت دیگر، اثر نانو ذرات نقره بر بافت کبد بصورت وابسته به دز است و با افزایش غلظت آسیب‌های وارد شده به کبد نیز بیشتر می‌شود.

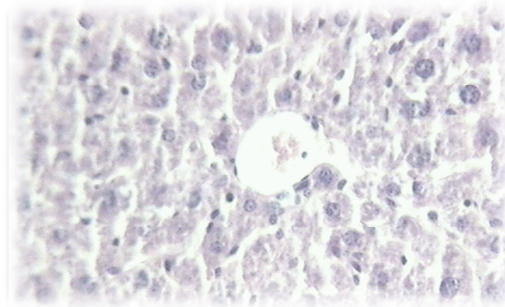
جدول ۵ مقایسه میانگین تغییرات پاتولوژیک هایپر پلازی سلول‌های کویپر، ارتشاح سلولی در پارانشیم و فضای پورتال، دژنره و پرخونی در بافت کبد

Table5-Comparison of the average changes in the pathological changes of hyperplasia of the copfer cells, cell infiltration in the parenchyma and portal space, degeneration and hyperemia in the liver tissue

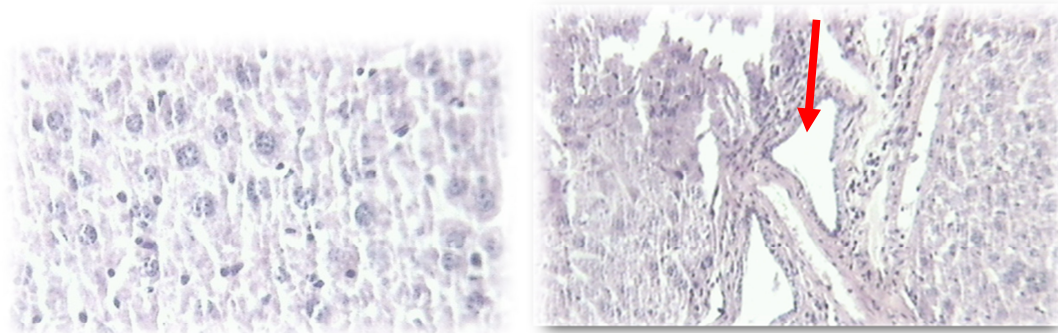
دژنره	پر خونی	انفیلتراسیون پورتال	انفیلتراسیون	هایپرپلازی کویپر	صفت
Degeneration	(Conjestion)	(Anfiteration Portal)	(Anfiteration Parenchyma)	(hyperplasia Copfer)	تیمار
۲/۲۱ ± ۰/۴۱ a	۲/۳۳ ± ۰/۰۵ a	۲/۵۸ ± ۰/۰۵ a	۲/۳۳ ± ۰/۰۴۸ a	۲/۲۱ ± ۰/۴۱۵ ab	ppm ۱۶۹
۲/۰۸ ± ۰/۲۸ a	۲/۳۷ ± ۰/۰۴۹a	۲/۲۵ ± ۰/۰۴ a	۲/۳۳ ± ۰/۰۴۸ a	۲/۲۹ ± ۰/۰۴۶۴ a	ppm ۸۴
۲/۰۸ ± ۰/۰۰۵ a	۱/۷۵ ± ۰/۰۰۹b	۲/۴۶ ± ۰/۰۱ a	۲/۲۱ ± ۰/۰۱۸ a	۲/۰۴ ± ۰/۰۰۴ b	ppm ۴۲
۱ ± ۰ b	۱ ± ۰ c	۱/۲۱ ± ۰/۰۱ b	۱/۱۷ ± ۰/۰۰۷ b	۱ ± ۰ c	شاهد ۰

حروف غیر مشابه در ستون اختلاف معنی دار در سطح یک درصد را نشان می‌دهد. (P < 0.05; Tukey test)
Similar letters in the column indicate a significant difference at the level of one percent. (P < 0.05; Tukey test)

در بررسی بافت‌های کبد، در گروه کنترل، سلول‌های کبدی دارای سیتوپلاسم صورتی یکنواختی و هسته‌های بزرگ است که بصورت شعاعی در اطراف سیاهرگ مرکزی لوبولی آرایش یافته اند (شکل ۵). بافت‌های کبدی با پارانشیم طبیعی و فضای پورت نرمال در اشکال (۶ و ۷) نمایش داده شده است.



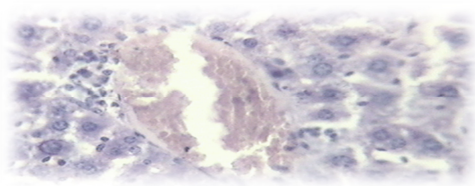
شکل ۵- Central vein به همراه هپاتوسیت اطراف (پارانشیم نرمال) در بافت کبد موش های آزمایشگاهی گروه شاهد
Fig 5 - Central vein with peripheral hepatocytes (normal parenchyma) in the liver tissue of control mice



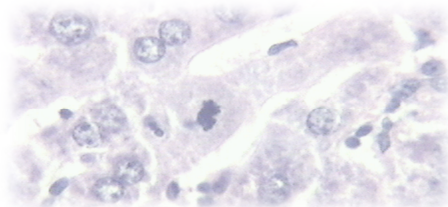
شکل ۷- پارانشیم طبیعی کبد موشهای گروه کنترل
Fig7- Normal liver Parenchyma in mice control

شکل ۶- فضای پورت نرمال
Fig 6- Normal Port space

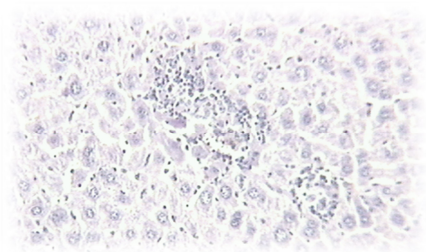
در گروه تیمار با غلظت ۱۶۹ppm، تجمع خون در عروق ناحیه پورتال (پرخونی) و عروق سیاهرگی کبدی مشاهده شد (شکل ۸). همچنین آسیب دژنره در گروه موش‌های ۱۶۹ppm نانو ذرات نقره شواهدی از واکنش شدن سیتوپلاسم، افزایش هسته‌ها با اندازه‌ها متفاوت و میتوز در مرکز دیده شد. (شکل ۹). مطالعات هستیتوپاتولوژیک بافت کبد در گروه تیمار ۱۶۹ppm مورد تهاجم سلول‌های آماسی قرار گرفته است که ارتشاح سلولی در داخل پارانشیم (شکل ۱۰) و همچنین داخل فضای پورت و به صورت شدید (شکل ۱۱) مشاهده شد. از آسیب‌های دیگر که به سلول‌های کبدی وارد شده، هایپرپلازی سلول‌های کوپفر (شکل ۱۲) می‌باشد.



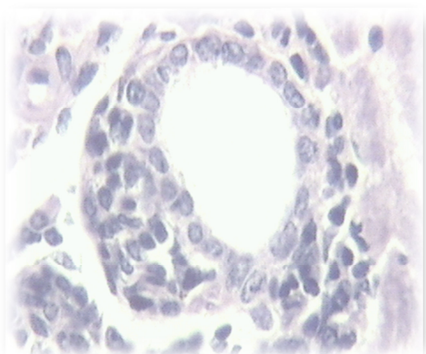
شکل ۸- گروه موش‌های آزمایشگاهی تیمار شده با غلظت ۱۶۹ppm، تجمع خون در عروق ناحیه پورتال (پرخونی)
Fig 8 - treated mice with a concentration of 169 ppm, blood collection in the vessels of the portal area (hypertension)



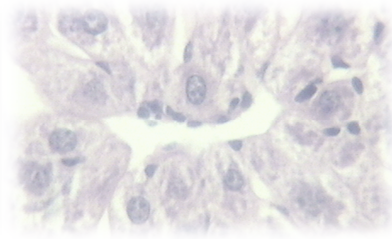
شکل ۹- آسیب دژنره در گروه موش‌های تیمار شده با ۱۶۹ppm نانو ذرات نقره گیاهی
Fig 9 - Degeneration damage in the group of mice treated with 169 ppm of plant silver nanoparticles



شکل ۱۰- انفیلتراسیون داخل پارانشیم (ارتشاح سلولی)
Fig 10 - Infiltration into parenchyma (cell infiltration)



شکل ۱۱- انفیلتراسیون داخل پورت (ارتشاح سلولی داخل پورت) در بافت کبد موش‌های آزمایشگاهی تیمار شده با غلظت ۱۶۹ppm
Fig 11- Intra-port infiltration (intra-port cell infiltration) in the liver tissue of mice treated with 169 ppm



شکل ۱۲- هایپرپلازی سلولهای کوپفر در بافت کبد موش های آزمایشگاهی تیمار شده با غلظت ۱۶۹ppm
 Fig 12 - Cupfer cell hyperplasia in liver tissue of mice treated with 169 ppm

مطالعات صورت گرفته در بافت کبد در تیمار ۸۴ppm شواهدی از ارتشاح سلولی، هایپرپلازی سلولهای کوپفر و، کانون پرخونی گزارش شد. در گروه تیمار با غلظت ۴۲ppm نانو ذرات نقره ارتشاح سلولی داخل پارانشیم و ارتشاح داخل فضای پورت بصورت خفیف نیز رویت شد.

بررسی هیستوپاتولوژیک تاثیرات نانو ذرات نقره بر کلیه: در بررسی هیستوپاتولوژیک بافت کلیه، در موشهای در معرض نانو ذرات نقره در مطالعه حاضر به بررسی تعداد کانون‌های لنفوسیتی (حضور سلولهای آماسی، انفیلتراسیون لنفوسیتی) پرداخته شده است (جدول ۶).

جدول ۶- تجزیه واریانس تغییرات تعداد کانونهای لنفوسیتی

Table 6- Analysis of variance of changes in the number of lymphocyte foci

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات (MS) صفات
نانو نقره	۳	۳۲۵/۶۵
خطا	۱۲۴	۱۱/۷۵
F		۲۷/۷۱
CV %		۲۵/۵

بررسی بافت شناسی کلیه نشان می‌دهد که دزهای بالای نانو ذرات نقره بر بافت کلیه آسیب بیشتری داشته است.

به طوری که اثر تعداد کانونهای لنفوسیتی در کلیه با افزایش غلظت افزایش پیدا کرده است (جدول ۷).

مقایسه تعداد کانونهای ارتشاح سلولی در بافت کلیه موشهای آزمایشگاهی نشان داد که در دو غلظت ۸۴ppm و ۱۶۹ppm تعداد کانونهای ارتشاح سلولی در آنها افزایش قابل توجهی نسبت به غلظت ۴۲ppm داشته است. مطالعه هیستوپاتولوژیک بافت کلیه در گروه کنترل در حالت نرمال با فضای سیتوپلاسمی یکنواخت تر

Collecting duct فاقد ارتشاح سلولی و گلومرولهای طبیعی می‌باشد. در گروه تیمار ۱۶۹ppm کانون ها ارتشاح سلولی

اطراف گلومری و اطراف کپسول بومن، اطراف عروق مشاهده شد. ارتشاح لنفوسیتی شدید در بافت کلیه موشهای تیمار شده با نانو ذرات نقره ۸۴ppm دیده شد. در گروه تیمار ۴۲ppm نیز کانون ارتشاح سلولی مشاهده شد.

جدول ۷- مقایسه میانگین تغییرات تعداد کانونهای لنفوسیتی در بافت کلیه در مواجهه با نانو ذرات نقره گیاهی

Table 7- Comparison of the mean changes in the number of lymphocyte foci in kidney tissue in the presence of silver nanoparticles

انفیتراسیون لنفوسیتی	صفت تیجار
۸/۸۹ ± ۳/۰۱ab	ppm ۱۶۹
۸/۸۴ ± ۴/۹ a	ppm ۸۴
۶/۵۶ ± ۳/۴۵b	ppm ۴۲
۲ ± ۱/۱c	شاهد

حروف غیر مشابه در ستون اختلاف معنی دار در سطح یک درصد را نشان می‌دهد. (P < 0.05; Tukey test)

Similar letters in the column indicate a significant difference at the level of one percent. (P < 0.05; Tukey test)

تأثیر نانو ذرات نقره بر میزان تغییرات آنزیمها SGOT (serum glutamic-oxaloacetic transaminase)، SGPT (Serum glutamic- pyruvictransaminase) و آلکالین فسفاتاز (ALK): تغییرات آنزیمهای کبدی SGOT یا سرم گلواماتیک اگزالیک آمیناز و SGPT سرم گلواماتیک پیرویک ترسمیناز و همچنین آلکالین فسفاتاز و کراتینین موشهای آزمایشگاهی تیمار شده با نانو ذرات نقره، مورد بررسی قرار گرفت. میانگین مقادیر آنزیمهای SGOT و SGPT و ALK تفاوت معنی داری نسبت به شاهد از خود نشان دادند. (جدول ۸)

جدول ۸- تجزیه واریانس آنزیمهای کبدی موشهای تیمار شده با نانو ذرات نقره

Table 8- Analysis of variance of liver enzymes in mice treated with silver nanoparticles

منابع	درجه	میانگین مربعات (MS) صفات			
تغییرات	آزادی	Cr	ALK	PT	OT
نانو نقره	۳	۰/۰۰۲ ^{ns}	۲۹۰۸۸/۰ ^{**}	۱۶۴۲۷۳/۴ ^{**}	۲۳۱۱۱۰۰/۳ ^{**}
خطا	۲۸	۰/۰۰۳	۸۰۱/۱۴	۴۴۴/۱۸	۸۳۵۹/۰۵
F		۰/۸۱۹	۳۶/۰۳	۳۶۹/۸۳	۲۷۶/۴۷
CV %		۲۲/۴	۱۸/۲	۱۲/۸	۱۱/۵

ns، **، ***، * به ترتیب معنی دار در سطح ۵ درصد، در سطح ۱ درصد و غیر معنی دار

Serum glutamic- pyruvictransaminase (PT)

Serum glutamic-oxaloacetic transaminase (OT)

مقایسه میانگین میزان آنزیمهای کبدی، ALK پس از تزریق نانو ذرات نقره با غلظت های ۱۶۹ ppm و ۸۴ و ۶۲ افزایش معنی داری داشته است. (جدول ۹) بطوریکه با افزایش دز مقادیر این عوامل نسبت به شاهد افزایش یافته است.

جدول ۹-مقایسه میانگین میزان آنزیمهای کبدی موشهای تیمار شده با نانو ذرات نقره

Table 9 - Comparison of the mean levels of liver enzymes in mice treated with silver nanoparticles

ALK	PT	OT	صفت تیمار
۲۱۶/۷۵۰ ± ۱۱/۹۷ a	۳۷۳/۵ ± ۸/۵۳ a	۱۵۹۱/۶۲ ± ۵۸/۱۱a	ppm ۱۶۹
۱۸۳/۷۵۰ ± ۱۰/۱۰a	۱۳۵/۸۳ ± ۱۱/۲۳ b	۶۱۱/۶۲ ± ۱۶/۵۶ b	ppm ۸۴
۱۴۴/۱۲۵ ± ۱۱/۶۵b	۹۲/۳۱ ± ۲/۴ c	۵۵۰/۸۷ ± ۲۰/۷۵b	ppm ۴۲
۷۶/۵۷ ± ۴/۴۶c	۵۵/۴۶ ± ۴/۰۱ d	۴۲۲/۶۲ ± ۹/۸c	شاهد

(P < 0.05; Tukey test). حروف غیر مشابه در ستون اختلاف معنی دار در سطح ۱ درصد را نشان میدهد.

Similar letters in the column indicate a significant difference at the level of one percent. (P < 0.05; Tukey test)

تاثیر نانو ذرات نقره بر سلولهای خونی موشهای آزمایشگاهی NMRI: در بررسی سلولهای خونی موشهای تحت تیمار نانو ذرات نقره گلبول قرمز خون (RBC)، گلبول سفید (WBC)، هموگلوبین (HGB)، هماتوکریت (HCT)، پلاکت ها (PLT)، قطر پلاکتها (PCT)، میانگین حجم گلبولهای قرمز (MCV)، میانگین هموگلوبین در سلول (MCH)، میانگین غلظت هموگلوبین در سلول (MCHC)، میانگین حجم پلاکت (MPV)، پهنای گلبولهای قرمز (ضریب تغییرات) (RDW) نشان داد که نانو ذرات نقره بر روی WBC و RDW و PDW و PLK اثر معنی داری داشت، به طوری که با افزایش غلظت تعداد آنها افزایش یافت. نانو ذرات نقره بر روی سایر فاکتورهای مورد بررسی تغییر معناداری ایجاد نکرد (جدول ۱۰).

جدول ۱۰- تجزیه واریانس سلولهای خونی موشهای تحت تیمار نانو ذرات نقره

Table 10 - Analysis of variance of blood cells of mice treated with silver nanoparticles

میانگین مربعات (MS) صفات											درجه	منابع		
PDW	MPV	RDW	MCHC	MCH	MCV	PCT	PLT	HCT	HGB	RBC	WBC	آزادی	تغییرات	
	۳۵/۷۳*	۸/۳۴ ^{ns}	۶/۶۱*	۳/۲ ^{ns}	۲/۱۶*	۸/۵۸ ^{ns}	۰/۰۲۲ ^{ns}	۶۲۸۰۲/۲*	۱۹/۰۱ ^{ns}	۱/۴ ^{ns}	۰/۹۳ ^{ns}	۴/۴۱*	۳	نانو نقره
	۳/۳۲	۴/۴۴	۰/۶	۲/۷۸	۰/۹۸	۳/۵۰	۰/۰۱	۲۹۹۶۷/۸۵	۱۷/۷۶	۱/۴۱	۰/۷۲	۰/۱۱	۲۸	خطا
	۲۲/۳	۲۵/۵	۵/۴	۸/۷	۶/۱	۳/۷	۲۸	۲۷	۲۴/۱	۲۰/۴	۲۲/۹	۱۰/۹		CV %

*، **، ***، ns، به ترتیب معنی دار در سطح ۵ درصد، در سطح ۱ درصد و غیر معنی دار

تفاوت معنی داری بین تیمارها مشاهده نشد. اما در تعداد گلبولهای سفید (WBC)، (PLT)، (PDW) و پهنای گلبول قرمز در منحنی ضریب تغییرات اندازه گیری گلبول قرمز تفاوت معنی داری بین تیمارها مشاهده شد (جدول ۱۰). تعداد گلبولهای سفید با افزایش غلظت نانو ذرات نقره افزایش یافته بطوریکه در غلظت ۱۶۹ppm (۴/۰۷ ± ۰/۱۳) نسبت به گروه شاهد (۲/۳۱ ± ۰/۰۸) افزایش معنی داری را نشان داد.

جدول ۱۱- مقایسه میانگین سلولهای خونی موشهای تحت تیمار نانو ذرات نقره

Table 11 - Comparison of the mean blood cells of mice treated with silver nanoparticles

PDW %	RDW %	PLT	WBC (count/ μ l)	صفت تیمار
$7/72 \pm 0/4$ a	$13/33 \pm 0/34$ c	$672/5 \pm 187/43$ a	$4/07 \pm 0/13$ a	ppm ۱۶۹
$5/62 \pm 0/79$ ab	$13/95 \pm 0/16$ b	$522/62 \pm 107/9b$	$2/92 \pm 0/11$ b	ppm ۸۴
$3/47 \pm 1/06$ b	$14/07 \pm 0/14$ b	$438/8 \pm 118/36$ b	$2/83 \pm 0/13$ b	ppm ۴۲
$3/18 \pm 1/11$ b	$15/48 \pm 0/36$ a	$260/1 \pm 70/04$ c	$2/31 \pm 0/08$ C	شاهد

حروف غیر مشابه در ستون اختلاف معنی دار در سطح یک درصد را نشان میدهد (P < 0.05; Tukey test)

Similar letters in the column indicate a significant difference at the level of one percent. (P < 0.05; Tukey test)
 MCH: Mean corpuscular hemoglobin, MCHC: Mean corpuscular concentration, PLT: platelets or thromtocytes count, HB: Hemoglobin, RBC: Red blood cell, WBC: White blood cell, PDW: Platelets distribution width, RDW: Red distribution width, MPV: Mean platelets volume, HCT: Hematocrit, PCT: Procalcitonin, MCV: Mean corpuscular volume

بحث

در کشاورزی مدرن حفاظت از گیاهان بوسیله آفت کشهای شیمیایی یک فاکتور اساسی در افزایش تولید بشمار می آید. از پیامدهای اساسی کاربرد حشره کش ها تاثیرات سوء این ترکیبات بر روی جانوران غیر هدف به ویژه حشرات مفید و همچنین تاثیر روی محیط زیست و سلامتی انسان است. اثرات زیست محیطی مصرف زیاد آفت کش ها و همچنین گسترش و طغیان آفات، ضرورت بازنگری در کنترل شیمیایی برای کاهش میزان مصرف آفت کش ها را ایجاب می کند. در مطالعه حاضر، حشره کشی نانو ذرات نقره گیاهی تولید شده از عصاره پوست پرتقال بر روی شته برگ برنج مورد ارزیابی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل رگرسیون لگاریتمی پروبیت داده های مربوط به غلظت مرگ و میر نشان داد که مقدار LC_{50} برای نانو ذرات نقره به کار گرفته بر علیه شته برگ برنج $30/08$ ppm بود. میزان مرگ و میر شته ۸۱ درصد گزارش شده است. تاثیرات نانو ذرات نقره بر روی بندپایان فراوانی مورد مطالعه قرار گرفته است. مانند *Spodoptera litura* (Debnath et al., 2012)، بر روی که تارتن دو نقطه *Tetranychus urticae* (Jalalizand et al., 2013) همچنین بر روی شته *Aphis neri* (Rouhani et al., 2012). نتایج نشان داده است که نانو ذرات نقره که با عصاره گیاهی تولید شده است، دارای اثرات بالقوه های بر روی کنترل شته ها دارد. ارزیابی آسیب و ضایعات هیستوپاتولوژیک نشان داد که نانو ذرات نقره در غلظتهای مختلف باعث آسیب های متفاوتی به بافت کبد و کلیه شده است، بطوریکه در غلظتهای مختلف نانو ذره نقره سبب ارتشاح سلول های آماسی، دژنره سلولی، هایپرپلازی سلول های کوپفر، پرخونی شد. چنین نتایجی به وسیله سایر پژوهشگران نیز گزارش شده است. تاثیر نانو ذره نقره 30 نانومتری بر موش BALB/c سبب ایجاد تغییراتی در کبد شامل اتساع در ورید مرکزی، پرخونی، تورم و افزایش سلول های کوپفر و همچنین ارتشاح سلول های التهابی وابسته به زمان شد (Heydarnejad et al., 2013). همچنین در مطالعه ای سمیت ذرات نقره را بر بافت کبد موشهای صحرائی بررسی شد (Kim et al., 2009). آسیب بافتی وابسته به نانو ذرات نقره در لوپول های کبدی، سلول های کوپفر و سینوزوئیدها و نیز آماس هپاتوست ها در کبد موش ها مشاهده کردند. بعلاوه در مطالعه ای دیگر سمیت خوراکی نانو ذرات نقره (60 نانومتری) با دز 300 ، 3000 ، 10000 در طی یک دوره 28 روز در موش های نژاد sprague-

Dawley مورد بررسی قرار گرفت. تغییرات قابل توجهی در تجمع نانو ذرات نقره در خون، ریه ها، کلیه، مغز و کبد مشاهده شد. دژنراسیون هیپاتوسیت ها و اتساع سیاهرگ مرکزی نیز از جمله آسیب‌های کبدی بود (Kim et al., 2008). در مطالعه‌ای دیگر نانو ذرات نقره ۵mg/kg در اندازه‌های ۲۰nm و ۲۰۰nm بصورت داخل وریدی تزریق شد. تجمع وابسته به زمان ذرات نانو نقره مورد بررسی قرار گرفت. غلظت نقره در بافتهای کلیه و مغز در طول آزمایش افزایش یافت که بالاترین غلظت در روز ۲۸ مشاهده شد (Dziendzikowska et al., 2012). زمانی که یک موجود زنده بیش از حد در معرض اکسیدان ها قرار بگیرد توانایی آنتی اکسیدانی پلاسمای خون دچار مشکل شده و ممکن است این توانایی کاهش یابد. گزارش شده است که نانو ذرات نقره از طریق استرس اکسیداتیو درون سلولی می‌توانند به سلول‌ها آسیب بزنند. بر اساس مطالعات صورت گرفته عوارض جانبی ایجاد شده در سلول‌های انسان در معرض نانو ذرات، ممکن است به علت تولید رادیکال‌های آزاد و گونه اکسیژن فعال (ROS) باشد که سبب آسیب درون سلولی می‌شود (Rastogi, 2012). همچنین یون‌های نقره می‌توانند از طریق تعامل با گروه‌های تیول غشاء داخلی میتوکندری سبب آسیب میتوکندری شوند، بطوریکه این اثرات یون‌های نقره، توسط معرف‌های سولفیدریل مانند گلوپتایون احیاء شده نقش مهمی در حفظ ساختار و عملکرد مناسب سلول‌های خونی و نیز از بین بردن پراکسیدهای آلی دارند (Drake and Hazelwood, 2005). نانو ذرات نقره باعث سمیت کبد و کلیه می‌شوند و دز بالای آن منجر به مرگ می‌شود. نانو ذرات نقره، همچنین باعث تغییرات هیستوپاتولوژیکال در کبد و کلیه و طحال می‌شود که تمایل یون‌های نقره برای اتصال به گروه‌های تیول (thiol) در کبد را نشان می‌دهد (Hendi, 2011). تجمع بیش از حد ROS میتواند پاسخ التهابی را آغاز کند و منجر به تخریب میتوکندری شود، در نتیجه سطح Glutathione sulfate (GSH) Hydrogenase به دلیل التهاب کاهش یابد، بنابراین فاکتورهای آپوپتوز از جمله سیتوکروم C آزاد شده منجر به مرگ سلول شود (Zamani et al., 2013). یکی از فرآیندهای مهم در پاتوژن کبد ارتشاح لنفوسیت‌ها میباشد که با ورود مواد سمی به کبد تعداد لنفوسیت‌ها و گلبول‌های سفید تک هسته‌ای دریافت افزایش می‌یابد که باعث آزادسازی رادیکال‌های آزاد و آنزیم‌های بافتی می‌شود. همانطور که در نتایج ارزیابی آسیب و هیستوپالوژیک کبد و کلیه اشاره شد با افزایش غلظت نانو ذره ارتشاح سلول‌های آماسی در کبد بیشتر و تعداد کانون‌های تشکیل شده در کلیه نیز بیشتر مشاهده شد. بنابر این در مطالعه حاضر صدمات وارد شده به ساختار کبد باعث هجوم شدید گلبول‌های سفید شد. همچنین بررسی ضایعات هیستوپالوژیک کبد وجود انواع اشکال هسته‌ها ریز (آنیزوسیتوز)، واکوئله شدن در اطراف هسته، وجود ساختارهای واکوئله مانند (حفره حفره) نشان می‌دهد حاکی از دژنراسیون سلولی است. بافت اصلی کبد توسط بافت پیوندی احاطه شده است. کبد دارای چهار لوب ناقص جداگانه است. فضای پورت، فضای سه گوش در اطراف رئوس لولهای مجاور است. هر فضای پورت از بافت همبند و حاوی شریان، ورید و مجرای صفراوی و اغلب یک برگ لنگاوی است. در مطالعه حاضر ارتشاح سلولی و پرخونی از جمله آسیب‌هایی است که در ناحیه پورت اتفاق افتاد. سلول‌های پارانشیمی یا سلول‌های کبدی صفحات متخلخل منشعب و متصل به هم که اسفنجی شکل است، تشکیل شده است و بین آنها فضاهای سینوزوئیدی قرار دارد. بندرت سلول دو هسته‌ای یافت می‌شود. میتوز در سلولهای بالغ کبدی نادر ولی به دنبال ضایعه و ترمیم کبد به فراوانی یافت می‌شود که علائم دژنره سلولی است. اولین عملی که در ارتباط با سیستم ایمنی بدن بوقوع می‌پیوندد عبارت است از به دام اندازی و نابود کردن و به عبارتی فاگوسیت کردن هر ماده خارجی که وارد بدن می‌شود. سلول‌های کوپفر ماکروفاژهای که جدار سینوزوئیدهای کبد را می‌پوشانند اطلاق

می‌شود. هایپرپلازی سلولهای کوپفر اغلب پاسخی اولیه به تحریک غیر طبیعی و در واقع پاسخ فیزیولوژیک طبیعی به یک محرک خاص در نظر گرفته شده است، که این روند که در تمام موشهای مورد تیمار بوضوح دیده شده است. افزایش تعداد سلولهای کوپفر گواهی از اهمیت آنها در از بین بردن نانو ذرات نقره در کبد است (Sadauska et al., 2007). زمانیکه نانو ذرات بوسیله ماکروفاژها از کبد پاک می‌شوند، رادیکال‌های آزاد افزایش پیدا می‌کنند. بنابراین تعداد سلولهای کوپفر می‌تواند مقدار آسیب به کبد را نشان دهد. اثرات پوستی نانو ذرات نقره را بر روی خوکیچه هندی بررسی شد (Korani et al., 2011). سلولهای کوپفر وابسته به دز و زمان بود. همچنین افزایش تعداد سلولهای کوپفر در غلظت 10ppm مشاهده شد (Heydarynejad et al., 2013). در مطالعه حاضر تاثیر 3 غلظت 2ppm، 84، 169 بر میزان فعالیت آنزیم‌های در ارتباط با کبد SGPT، SGOT و ALK از طریق تزریق درون صفتی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج بیوشیمیایی این مطالعه، مواجهه موشهای سوری با غلظتهای مختلف نانو ذرات نقره در مقایسه با گروه کنترل بخصوص در غلظت بالا، موجب افزایش معنی‌داری مقادیر آنزیم‌ها شد. این آنزیم‌ها بطور طبیعی در سلول‌های برخی از اندام‌ها از جمله کبد قرار دارند. SGPT آنزیم اختصاصی کبد و SGOT در سایر اندام‌ها نظیر قلب نیز یافت می‌شود. یکی از دلایل افزایش سطح سرمی این آنزیم‌ها ممکن است تغییر در نفوذپذیری غشای پلاسمایی سلولهای کبدی و یا صدمات سلولی حاصل از قرار گرفتن در معرض نانو ذره نقره باشد. بنابراین بررسی نشت آنزیم‌های کبدی به داخل خون ابزار بسیار مفیدی در مطالعات آسیب کبدی با نانو ذره نقره می‌باشد. تجویز خوراکی نانو ذره نقره به موشها در طی 28 روز باعث افزایش آنزیم‌های SGPT، SGOT و ALK شد. به‌طوری‌که در غلظتهای بالای نانو ذره نقره این تغییرات معنی‌دار بود که با نتایج مطالعه ما همخوانی دارد (Adeyemi and Adewumi, 2014). علاوه در راستای نتایج مطالعه حاضر، پژوهشی نشان داد که تجویز دزهای 50 و 100 میلی‌گرم بر کیلوگرم نانو ذره نقره به روش گاوآژ به موش آئینو باعث افزایش آنزیم‌های SGOT، SGOT و ALK شد (Awashati et al., 2015). نتایج مطالعات صورت گرفته بر روی تغییرات آنزیم کبدی گواهی بر افزایش این آنزیم‌ها در مواجهه با نانو ذرات نقره بود (Najjaran et al., 2014). با تزریق درون صفتی نانو ذره نقره چهار نانومتری در نژاد موش ویستار تغییری در آنزیم ALT در دزهای بالا ایجاد نشد، که با مطالعات صورت گرفته در این پژوهش همسویی ندارد (Naghsh et al., 2012). در مطالعه که اثرات نانو ذرات نقره بر روی تغییرات آنزیم‌های کبدی SGPT، SGOT صورت گرفت. تغییرات معنی‌داری بر روی سطوح آنزیم‌های ذکر شده دیده نشد (Gheibi et al., 2017). نانو ذرات نقره در ابتدای تزریق ممکن است با سلولها و پروتئین‌های پلاسمای خون روبرو شوند. اتصال به پروتئین‌های پلاسمای نقش مهمی را در تعیین درجه تجمع درون تنی نانو ذرات و میزان جذب توسط تک سلول‌های فاگوسیتی ایفا می‌کند (Saptarshi et al., 2013). نانو ذرات برای رسیدن به هر بافتی باید از خلال پوشش داخلی عروق عبور کنند تا بتوانند از خون خارج شوند. نفوذ مولکول‌های کوچک و بزرگ از پوشش بافت‌های سالم از خلال روزنه‌های کوچک موجود در بین سلولهای پوششی بافت عروقی با اندازه ای در حد 45A° و یا بزرگتر در حدود 25A° انجام می‌شود. این مطلب نشان می‌دهد که ذرات بزرگ تر از حدود 25 نانو متر به راحتی توانایی عبور از خلال پوشش‌های عروقی را ندارد. ساختار پوششی عروق در کبد و طحال دارای پنجره‌هایی (fenestration) با قطر 100 نانومتر هستند که برای ورود ذرات بزرگتر سازگار شده اند. این ویژگی به همراه حضور فراوان فاگوسیت‌های تک سلولی دلیل واضح برای تجمع نانو ذرات در آنها است (Lan Kveld et al., 2010). بدلیل بسیاری از ضایعات بافتی بسیاری از آنزیمها از سلولها خارج شده و وارد

جریان خون شده ولی فقط تعداد کمی از این آنزیمها در تشخیص بیماری‌ها مورد آزمایش قرار می‌گیرند. مهمترین آنزیم‌های کبدی آسپاراتات آمینوترنسفرز و آلانین آمینوترنسفرز SGPT به مقادیر زیاد در سیتوپلاسم بافت‌های قلب و کبد وجود دارد و در موارد آسیب نسجی به سرم راه می‌یابد. آنزیم SGOT بعنوان آنزیم اختصاصی کبد بوده، تغییرات این آنزیم عموماً به موازات SGPT صورت می‌گیرد (Part and Kaplan, 2005). آلکالین فسفاتازها به آن دسته از فسفاتازها اطلاق می‌شود که در PH قلیایی فعالیت می‌کنند. این آنزیم در غشاء سلولی جای دارد و در انسداد مجاری صفراوی سطح آن بالا می‌رود. با توجه به اهمیت بالینی آن ارزیابی نحوه عملکرد سلول‌های کبدی به عنوان تست‌های استاندارد از آن استفاده می‌شود. در این پژوهش بررسی آماری در مورد آزمایش CBC موشهای آزمایشگاهی نشان داد که تعداد سلولهای خونی گلبولهای قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت، قطر پلاکتها، میانگین حجم گلبولهای قرمز خون، میانگین هموگلوبین در سلول و میانگین غلظت هموگلوبین در سلول، میانگین حجم پلاکت تغییر معنی داری نداشته است. بررسی آنالیز آماری بین گروه‌های تیمار و کنترل نشان داد که تفاوت معنی داری در تعداد گلبولهای سفید خود (WBC) وجود دارد. بطوریکه با افزایش دز مقادیر WBC نیز افزایش یافته است. در مطالعه‌ای مقادیر WBC در مواجهه با نانو ذرات نقره که بصورت تزریق صفاتی وارد بدن موش‌ها شده است نسبت به شاهد افزایش یافته است (Naghsh *et al.*, 2012). همچنین در مطالعات صورت گرفته دیگر، می‌توان گفت که با ورود نانو ذرات نقره و همچنین یون‌های نقره سبب افزایش تعداد گلبولهای سفید برای بیگانه خواری شود (Portney and Ozkan, 2006). بعلاوه افزایش معنی داری در شمارش گلبول‌های سفید گروه تیمار در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد (جعفر زاده سامانی و همکاران، ۱۳۹۴). بنابراین نتایج مشابه مطالعات فوق بر روی گلبولهای سفید خون بیانگر این مسئله می‌تواند باشد که سمیت نقره عمدتاً به دلیل حضور یون‌های نقره آزاد شده می‌باشد. که فرضیه پیشنهادی (Wijnhoven *et al.*, 2009) مبنی بر اینکه سمیت نقره عمدتاً به علت یون‌های آزاد شده از نانو ذرات نقره می‌باشد. البته لازم به ذکر است که نانو ذرات وارد شده به بدن می‌تواند با اجزاء سیستم ایمنی واکنش داده و بر اساس برخی مطالعات، قادرند با اجزاء سیستم ایمنی وارد واکنش شده و سبب افزایش سیتوکینین‌های مختلف شوند. البته نانو ذرات مختلف ممکن است اثرات متفاوتی بر روی سیستم ایمنی داشته باشند و سبب تحریک و یا محار سیستم ایمنی شوند (Dwiveeli *et al.*, 2009). از سوی دیگر در مطالعات دیگر هیچ تغییر در سایر سلولهای خونی در موشهایی که به صورت خوراکی نانو ذرات نقره را دریافت کرده اند دیده نشد (رضایی زارچی و همکاران، ۱۳۹۲). روشنایی و رضویان (۲۰۱۲) نیز اثر نانو ذرات نقره خوراکی بر عوامل خونی، هورمونی و ادراری موشهای صحرائی نژاد ویستار را بررسی کردند و تغییر معنی داری در تعداد گلبول‌های قرمز خون، سطح هموگلوبین و هماتوکریت مشاهده نکردند. کوچکی اندازه نانو ذرات سبب موفقیت آنها در عبور از غشاء سلولی در غلظتهای بالا شده است. بنابراین نانو ذرات نقره بر روی میتوکندری‌های سلول‌های گلبولهای سفید اثر گذاشته و سبب تغییرات در انجام فعالیت‌های آنزیمی آنها می‌شود. در مطالعه‌ای ثابت شد که، نانو ذرات نقره می‌توانند آنزیم‌های Caspase میتوکندری را فعال کنند. بخصوص آنزیم Caspase در سلول‌های سرطانی لنفوسیتی که سبب آپوپتوز و مرگ سلولی می‌شود (Sriram *et al.*, 2010). پس از جذب نانو ذرات نقره از سیستم گوارشی، وارد سیستم گردش خون شده و این ذرات با متابولیت‌های مختلف مانند پروتئین‌های پلاسما، فاکتورهای انعقادی خون و سایر سلولهای خونی وارد تعامل می‌شود (Lovric *et al.*, 2005). پلاکتها، بعنوان ریز دانه‌های ضد انعقادی از انواع سلولهای خونی اند که نقش بسیار مهمی در انعقاد خون بازی می‌کنند. زمانی که خونریزی اتفاق می‌افتد این ریز دانه‌ها

به هم متصل شده و مانع خونریزی می‌شوند. تعداد پلاکت‌ها پس از ورود نانو ذرات نقره با افزایش غلظت نانو ذره افزایش پیدا کرده است. در مطالعه‌ای افزایش معنی دار تعداد پلاکت‌ها نیز گزارش شده است (Abdohalim and Moussa, 2012). نانو ذرات نقره با توجه به دز استفاده شده از آن توانست بطور موثری در عملکرد انعقادی پلاکت‌ها که شامل تجمع پلاکت‌ها، چسبیدن پلاکت‌ها به همدیگر و چسبیدن پلاکت‌ها به فیبرینوژن و کلاژن سبب ایجاد اختلال شود. این اثر بازدارندگی می‌تواند مربوط به تغییر ساختمانی اینتگرین سطح پلاکت‌ها و فسفوپروتئین موجود در پلاکت‌ها باشد. نانو ذرات نقره می‌تواند به داخل پلاکت‌ها نفوذ کرده و فضاهای واکوئلی و گرانول‌ها را اشغال نموده و مانع گسترش هیالوپلاسمبک و کاهش تجمع پلاکت‌ها شوند. پلاکت‌ها پس از تماس یا ورود نانو ذرات نقره، لیز نمی‌شوند و آزاد نشدن LDH داخل پلاکتی این این موضوع را ثابت می‌کند (رضایی زارچی و همکاران، ۱۳۹۲).

نتیجه گیری

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که نانو ذرات نقره بکارگرفته بر روی بافت کبد و کلیه دارای اثرات سمی می‌باشد. آسیب‌های بافتی وارد شده بر بافت کبد و کلیه با افزایش دز نانو نقره بیشتر مشاهده می‌شود. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که نانو ذرات نقره سبب تحرک سیستم ایمنی می‌شوند و باعث افزایش گلبولهای سفید می‌شود. همچنین آسیب به کبد باعث پراکسیداسیون لیپیدهای غشای آن و در نتیجه کاهش سیالیت غشاء و از بین رفتن ساختمان و عملکرد آن شده. متعاقباً منجر به افزایش غلظت آنزیم‌های کبدی در خون شده است. بنابراین بالا رفتن این آنزیم‌ها نشانه‌ای از تخریب سلول‌های کبدی است. البته با بررسی سطح نقره در خون و سنجش بیومارکرهای استرس اکسیداتیو می‌توان اثرات این نانو ذرات را بهتر توجیه کرد. همچنین با توجه به اثر نانو ذرات نقره بر روی اختلاف اندازه اشکال پلاکت PDW و اختلاف اشکال گلبولهای قرمز (RDW) پیشنهاد می‌شود که علل تاثیر نانو ذرات نقره بر روی این سلول‌ها و اثر نانو ذرات بر روی اشکال گلبولهای سفید مورد بررسی قرار گیرد.

References

- Abdelhalim, M. and Moussa, S. A. A. 2012.** The Dimensional Hematological Alterations Induced in Blood of Rats In vivo by Intraperitoneal Administration of Gold Nanoparticles. *Nano medicine Nanotechnology*. 3:138. doi:10.4172/2157-7439.1000138
- Adeyemi, O., and Adewumi, O., 2014.** Biochemical Evaluation of Silver Nanoparticles in Wistar Rats. Hindawi Publishing Corporation. *International Scholarly Research Notice*. Volume 2014, Article ID 196091, 8 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/196091>.
- Araj, S. A., Salem, N. M., Ghabeish, I. H., and Awwad, A. M. 2015.** Toxicity of Nanoparticles against *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *Journal of Nanomaterials*., Article ID 758132, 9 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/75813262>.
- Awasthi, K. K., Verma, R., Awasthi, A., Awasthi, K. and John, P.J. 2015.** In vivo genotoxic assessment of silver nanoparticles in liver cells of Swiss albino mice using comet assay. *Advanced Materials Letters*. 6(3): 187-193.
- Chowdappa, P., and Shivakumar, G. 2013.** Nanotechnology in crop protection: Status and scope. *Pest Management in Horticultural Ecosystems*. 19, (2), 131-151.
- Debnath, N., Das, S., Seth, D., Chandra, R., Bhattacharya, S. and Goswami, A. 2011.** Entomotoxic effect of silica nanoparticles against *Sitophilus oryzae* (L.). *Journal of Pest Science* 84(1):99-105.

doi:10.1007/s10340-010-0332-3.

- Drake, P. L. and Hazelwood, K. J. 2005.** Exposure-related health effects of silver and silver compounds: A review. *Annals of Occupational Hygiene*. 49(7): 575-85.
- Dwivedi, P.d., Misra, A., Shanker, R. and Das, M. 2009.** Are nanomaterials a threat to the immune system? *Nanotoxicology*. 3(1): 19-26.
- Dziendzikowska, K., Gromadzka-Ostrowska J., Lankoff, A., Oczkowski, M., Krawczynska, A. and Chwastowska, J. 2012.** Time-dependent bio distribution and excretion of silver nanoparticles in male Wistar rats. *Applied Toxicology*. 32(11): 920-8.
- Gheibi, N., Edris, M., Sofiabadi, M. and Samieirad, F. 2017.** Effect of silver nanoparticles orally consumption on blood biochemical factors in male rats. *Research on medicine*. 40(4): 178-181.
- 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. *Environmental Science Technology*. 43:9216–9222.
- Hendi A. 2011.** Silver nanoparticles mediate differential responses in some of liver and kidney functions during skin wound healing. *Journal of King Saud University*. 23(1): 47–52.
- Heydarnejad, M. S., Yarmohammadi-Samani, P., Mobini Dehkordi, M., Shadkhast, M. and Rahnama, S. 2013.** Histopathological effects of nanosilver (Ag-NPs) in liver after dermal exposure during wound healing. *Nanomedicine*. 1(3): 191-197.
- Jalalizand, A. R., Gavanji, SH., karimzadeh Esfahani, J., Besharatnejad, M. H., Emami, M. S., and Larki, B. 2013.** The effect of Silver nanoparticles on *Tetranychus urticae*. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*. 5 (8), 820-827.
- Kim (a), S., Choi, J.E., Choi, J., Chung, K.H., Park, K. and Yi, J., 2009.** Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicology in vitro*. 23(6): 1076-84.
- Kim (c), Y. S., Kim, J. S., Cho, H. S., Rha, D. S., Kim, J. M. and Park, J. D. 2008.** Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhalation Toxicology*. 2008; 20(6): 575-83.
- Korani, M., Rezayat, S., Gilani, K., Bidgoli, S. A. and Adeli, S. 2011.** Acute and sub chronic dermal toxicity of nanosilver in guinea pig. *International Journal of Nanomedicine*. 6(1):855–862.
- Lankveld, D.P., Oomen, A.G., Krystek, P., Neigh, A., Troost-de Jong, A. and Noorlander, C.W. 2013.** The kinetics of the tissue distribution of silver nanoparticles of different sizes. *Biomaterials*. 31(32): 8350-8361.
- Lovric, J., Bazzi, H.S., Cuie, Y., Fortin, G.R., Winnik, F.M. and Maysinger, D. 2005.** Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe quantum dots. *Journal of Molecular Medicine* 83: 377-385.
- Naghsh, N., Noori, A., Aqababa, H. and Amirkhani-Dehkordi, S. 2012.** Effect of nanosilver particles on alanine amino transferase (ALT) activity and white blood cells (WBC) level in male wistar rats, in vivo condition. *Zahedan Journal of Research Medicine Science*. 14(7): 34-37.
- Najjaran, A., Asghari Moghaddam, N., Zarchi, S.R., Mohsenifar, J. and Rasoolzadeh, R. 2014.** Toxicity effects of nanosilver on liver enzymes, liver and lung tissues. *International journal of Biomedical Engineering and Science*. 1(1): 11-15.
- Portney, N.G. and Ozkan, M. 2006.** Nano-oncology: drug delivery, imaging, and sensing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*; 384(3): 620-30.
- Pratt, D. S. and Kaplan, M. M. 2005.** Evaluation of liver function. In: Braunwald E, Kasper AS, Fauci AL, editors. *Harrison's principles of internal medicine*. 21st edition. New York: McGraw Hill. p. 1813-1817.
- Rezaei-Zarchi, S., Taghavi-Foumani, M. H., Razavi Sheshdeh, S. A. R. and Negahdary, M. 2013.** The effect of silver nanoparticles on blood cells in male rats. *Science journal Blood*; 10(2):147-153.
- Roshanaee, K., Razaviyan, S.M.H., Heydariye, N., and Masae Manesh, M.B. 2012.** The effect of Nanosilver on Blood, Hormone in Rats. *Qome medicine university journal*. 6(3):65-70.

- Rouhani (b), M., Samih, M. A., and Kalantari, S., 2012.** Insecticide Effect of Silver and Zinc Nanoparticles against *Aphis Nerii* Boyer De Fonscolombe (Hemiptera: Aphididae). Chilean Journal of Agricultural Research.72 (4), 590 – 594.
- Sadauskas, E., Wallin, H., Stoltenberg, M., Vogel, U., Doering, P. and Larsen, A. 2007.** Kupffer cells are central in the removal of nanoparticles from the organism. Particle and Fibre Toxicology. 4(10): 1-7.
- Samadi-Baboli, R. 2014.** Green synthesis of silver nanoparticles by planets extract and determination of antibacterial effect. Islamic Azad University Science and Research Branch. Faculty of Basic Science – Department of Chemistry Thesis for receiving »M.Sc. « degree on Analytical Chemistry.135.
- Saptarshi, S. R., Duschl, A., and Lopata, A. L. 2013.** Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. J. Nanobiotechnology.11:26. doi: 10.1186/1477-3155-11-26.
- Shinohara, N., Danno, N. and Ichinose, T., 2013.** Tissue distribution and clearance of intravenously administered titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles. Nanotoxicology. doi:10.3109/17435390.2012.763001.
- Sriram, M.I., Kanth, S.B., Kalishwaralal, K., and Gurunathan, S.2010.** Antitumor activity of silver nanoparticles in Dalton's lymphoma ascites tumor model. International Journal of Nano medicine 5: 753-762.
- Talebi Jahromi., kh.2012.** Pesticides toxicology. Tehran University. Issue 5.p507.
- Velayutham, K., Abdul Rahuman, A., Rajakumar, G., Roopan, S, M., Elango, G., Kamaraj, CH., Marimuthu, S., Santhoshkumar, TH., Iyappan, M., and Siva, CH. 2013.** Larvicidal activity of green synthesized silver nanoparticles using bark aqueous extract of *Ficus racemosa* against *Culex quinquefasciatus* and *Culex gelidus*. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 95-101.
- Wijnhoven, S.W., Peijnenburg, W.J., Herberts, C.A., Hagens, W.I., Oomen, A.G., Heugens, E.H., 2009.** Nano-silver—a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. Nanotoxicology. 3(2): 109-38.
- Yang, F., Liu, C., Gao, F., Su, M., Wu, X., Zheng, L.2007.** The improvement of spinach growth by nano-anatase TiO₂ treatment is related to nitrogen photoreduction. Biological Trace Element Research. 119:77–88.
- Zamani, N., Naghsh, N. and Fathpour, H. 2013.** Comparing poisonous effects of thioaceta silver nanoparticles on enzymic changes and liver tissue in Syrian mice. Zahedan Journal Research Medical Science.16 (2): 54-7.

Efficacy of Phyto-synthesized Silver Nanoparticle against *Rhopalusiphum padi* L. (Hem. Aphididae) and its Carcinogenicity Effect on Mice

A. Sedighi¹, S. Imani², G. R. Moshtaghi-Kashanian³, H. Najafi⁴, Y. Fathipour⁵

1-Graduated student, Islamic Azad University, Tehran

2- Associate Professor, Department of Entomology, College of Agriculture and Natural Resources, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran

3- Associate Professor, Biochemistry Department, Medical School, Kerman University of Medical Sciences, Kerman

4- Associate Professor, Iranian Research Institute of Plant Protection, Weed Research Department, Tehran,

5- Professor, Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran

Abstract

At present, the use of chemical pesticides is the main method of insect control. The use of nano-green technology in the production of new pesticides can be considered and used as a complementary method for pest control. Therefore, in the present study, silver nanoparticles (AgNPs) synthesized from Citrus sinensis orange peel extracts. The synthesized nanoparticles were characterized with UV- visible spectroscopy, X- ray Diffraction, and Transmission Electron Microscopy. The insecticidal effects of silver nanoparticles on Bird cherry-oat aphid, *Rhopalusiphum padi* L. were conducted under laboratory conditions in a completely randomized design with three replicates of each replication including 20 adult aphids with five concentrations (12.5, 25, 50, 100, 169 ppm) by Filter paper residue. The LC25, LC50 and LC90 of the green synthesized AgNPs against aphids were 8.11 ppm, 30.08 ppm and, 362.61 ppm, respectively. The effects of silver nanoparticles on the liver and kidney tissues of 32 mice were performed in four concentrations (0, 42, 48, 169 ppm) for three months by intraperitoneal injection. Histological examination of the liver and inflammatory cells, hyperaplasia of copper cells, digestion, and degeneration in the liver cells, and increased number of lymphocytes in the kidney tissue were observed. Also, SGOP, SGPT and ALK enzymes increased ($p < 0.05$) in exposure to silver nanoparticles. In general, the results of this study indicate that the use of silver nanoparticles due to its widespread use has adverse environmental effects.

* Corresponding Author, E-mail: anisohrab@gmail.com

Received: 22 Apr. 2020– Accepted: 23 Aug. 2020