

اثرات نیمه مزمن نانوذره‌ی اکسید مس بر فاکتورهای خونی و آنزیم‌های پلازما بچه فیل ماهی دریای خزر (*Huso huso*)

• سجاد معین نژاد

دانشگاه گیلان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، رشت، ایران

• اکرم سادات نعیمی (نویسنده مسئول)

دانشگاه گیلان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، رشت، ایران

دانشگاه گیلان، پژوهشکده حوضه آبی دریای خزر، گروه پژوهشی علوم دریایی، رشت، ایران

• فاطمه نظر حقیقی

باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت، رشت، ایران

• احسان نصر

شیلات اردبیل، اردبیل، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶-۱۲-۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷-۰۶-۱۱

Email: a_naeemi@guilan.ac.ir



چکیده

تولید و استفاده از نانو مواد مهندسی شده در صنایع مختلف بخصوص صنایع حوزه دریای خزر و نفوذ آن از طریق فاضلاب‌های صنعتی به محیط‌های آبی باعث ایجاد نگرانی‌هایی برای سلامت انسان و موجودات آبی شده است. هدف این مطالعه، بررسی میزان سمیت و ارزیابی اثرات نانوذره اکسید مس (CuO NPs) بر شاخص‌های خونی و آنزیم‌های بچه فیل ماهی دریای خزر به عنوان یک گونه ارزشمند می‌باشد. بچه فیل ماهی با میانگین وزن 40 ± 5 gr پس از تعیین غلظت‌کشنده، در رویارویی با ۲۰ درصد از LC50-96h نانوذره اکسید مس، به مدت ۱۴ روز در سه تکرار به همراه تیمار شاهد قرار گرفتند. از بچه فیل ماهیان پس از ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ ساعت و هفت و ۱۴ روز خون‌گیری شد. سپس فاکتورهای خونی، پروتئین کل، گلوکز، کورتیزول و آنزیم‌های پلازما مورد بررسی قرار گرفتند. تحت تأثیر نانوذره‌ی اکسید مس در مقایسه با شاهد تعداد گلبول‌های قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت و لنفوسیت بطور معنی‌داری کاهش و تعداد کل گلبول‌های سفید و نوتروفیل افزایش یافت ($P < 0/05$). آنالیز فعالیت آنزیم‌های متابولیک، نشان‌گر افزایش معنی‌دار آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آلکالین فسفاتاز (ALP)، لاکتات دهیدروژناز (LDH) و آسپارات ترانس آمیناز (AST) بود. گلوکز و پروتئین تام در اکثر تیمارها و کورتیزول پس از ۱۴ روز، نسبت به شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافتند ($P < 0/05$). با توجه به ایجاد تغییرات معنی‌دار در بیش‌تر پارامترهای مورد سنجش، می‌توان نتیجه گرفت که نانوذره‌ی اکسید مس در غلظت به‌کار برده شده، اثرات منفی بر سلامت بچه فیل ماهی دریای خزر دارد.

کلمات کلیدی: فیل ماهی، کورتیزول، آنزیم‌های پلازما، غلظت تحت کشنده، فاکتورهای خونی

- Veterinary Researches & Biological Products No 122 pp: 84-96

Sub-acute effects of copper oxide nanoparticles on enzymes and hematological parameters of the juvenile beluga (*Huso huso*)

By: Moeinnejad, S., Department of Biology, Faculty of sciences, University of Guilan, Rasht, Iran. Naeemi, A.S., (Corresponding Author) Department of Biology, Faculty of sciences, University of Guilan, Rasht, Iran, Department of Marine Sciences, Caspian Sea Basin Research Centre, University of Guilan, Rasht, Iran. Nazarhaghghi, F., Young Researchers and Elite Club, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran. and Nasr, E., Fisheries of Ardabil, Ardabil, Iran.

Received: 2018-03-16 Accepted: 2018-09-02

Email: a_naeemi@guilan.ac.ir

The widespread application of nanotechnology in industries, especially the Caspian Sea region and infiltration of them through industrial sewage to the aquatic environment cause concerns for human health and the aquatic organisms. The aim of the present study is to evaluate the acute toxicity and effects of copper oxide nanoparticles on some enzymes and hematological factors of the Caspian juvenile beluga as a valuable species. Juvenile beluga with an average weight of 40 ± 5 gr were prepared and after determination of the lethal concentration, were exposed to 20% of LC50-96h of CuO nanoparticles and control for 14 days in three replicates. Then the juveniles blood were sampled after 24, 48, 72, 96 hours and 7, 14 days and hematological factors, total protein, glucose, cortisol and enzymes in blood serum were examined. The number of red blood cells, hemoglobin, hematocrit and lymphocytes were decreased and the total number of white blood cells and neutrophils were significantly increased under CuO treatment ($P < 0.05$). Analysis of ALT, ALP, LDH and AST enzymes activity showed significant increase compared to control ($P < 0.05$). Furthermore, the levels of glucose and total protein in the most of the treatment and levels of cortisol only after 14 days treatment were significantly increased when compared to control ($P < 0.05$). Due to significant changes in the most of the parameters compared to the control, it can be concluded that the concentration of CuO NPs used for Juvenile beluga have negative effects on its health.

Key words: Beluga, Cortisol, Plasma enzymes, Sublethal concentration, Hematological factors

خونی، شاخص‌های قابل توجه تعیین وضعیت موجودات آبی است، که می‌تواند به راحتی اندازه‌گیری شوند (۴). علاوه بر این، شاخص‌هایی مانند گلوکز و کورتیزول برای شناسایی تغییرات فیزیولوژیکی و یا محیط زیست در موجودات به طور گسترده‌ای می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد (۴). تاکنون اثرات نانوذرات به خصوص نانو اکسیدهای فلزی از جمله نانوذرات اکسیدمس بر شاخص‌های خونی برخی از گونه‌های ماهی مورد مطالعه قرار گرفته است. از جمله در مطالعه‌ای که اثر نانوذره اکسید مس توسط احمدی و همکاران روی ماهی کپور معمولی انجام گرفت، شاخص‌های خونی دچار تغییر شد، همچنین در مطالعه دیگری خبازی و همکاران با بررسی اثر نانوذره اکسید مس در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان تغییر در اکثر فاکتورهای خونی مشاهده گردید (۲ و ۱۶). با این حال اطلاعات محدودی در مورد اثرات نانوذرات اکسیدمس بر گونه‌های ارزشمند اقتصادی و در معرض انقراض به ویژه تاس ماهیان وجود دارد (۱۹). ماهیان خاویاری از جمله ماهیان ارزشمند از نظر اقتصادی هستند،

مقدمه

توسعه فناوری نانو و اثرات آن بر محیط زیست و موجودات زنده در حال تبدیل شدن به یک مسئله مهم است (۴). از جمله راه‌هایی که باعث ورود نانو مواد به محیط زیست می‌شوند: اتمسفر، جریانات و رواناب‌های شهری و تصفیه خانه فاضلاب می‌باشند که تمامی این آلاینده‌ها، به اکوسیستم‌های آبی راه پیدا می‌کنند (۲۴). نانوذرات اکسید مس، ذرات بسیار ریز اکسید مس می‌باشند که دارای طیف وسیعی از خواص می‌باشند و باعث گرانبوی سیال و افزایش هدایت حرارتی می‌شود که امروزه در سنسورهای گازی، ابر رساناهای دمای بالا و بسیاری از صنایع دیگر کاربرد دارد (۱۰). این نانوذرات پس از استفاده، از طریق فاضلاب‌های صنعتی وارد محیط‌های آبی شده و می‌توانند از مسیرهای مختلف از جمله عبور مستقیم از طریق آبشش‌ها و دیگر سطوح اپیتلیال خارجی وارد بدن جانوران آبی شوند، در نتیجه موجودات آبی را تحت تأثیر قرار می‌دهند و ممکن است سبب مسمومیت آن‌ها گردند (۱۳). پارامترهای

۱۰۰ mg/l، میزان مرگ و میر، در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت ثبت گردید و مقادیر LC_{۱۰}، LC_{۵۰} و LC_{۹۰} بود از ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت مواجهه با نانوذره اکسید مس در بچه ماهیان اندازه‌گیری شدند. مقدار غلظت کشنده با محدوده اطمینان ۹۵ درصد با روش آنالیز Probit در نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ محاسبه شد (۱۱).

با استناد به نتایج حاصل از بخش اول آزمایش، تعداد ۷۲ قطعه بچه فیل ماهی به مدت ۱۴ روز در معرض غلظت ۱۰/۳۸ میلی‌گرم بر لیتر (۲۰ درصد از ۹۶h-LC_{۵۰}) نانوذره اکسید مس قرار گرفتند. به نحوی که در شش حوضچه ۲۰۰ لیتری با ۱۲۰ لیتر آب و شرایط فیزیکیوشیمیایی یکسان ریخته و در هر کدام ۱۲ بچه فیل‌ماهی قرار داده شد. سه حوضچه به عنوان تیمار که در هر یک آن‌ها، ماهیان در معرض غلظت ۱۰/۳۸ میلی‌گرم بر لیتر و سه حوضچه به‌عنوان شاهد (بدون آلاینده) در نظر گرفته شدند. به منظور بررسی اثرات نانو ذره اکسید مس بر شاخص‌های خونی و آنزیم‌های پلاسما فیل ماهی، در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت و همچنین هفت و ۱۴ روز پس از شروع آزمایش، از هر حوضچه یک بچه ماهی به طور تصادفی انتخاب و به وسیله سرنگ انسولین هیپارینه از محل سیاهرگ دمی خون‌گیری شد. بچه‌فیل ماهی‌ها بعد از خون‌گیری به حوضچه منتقل نشدند.

جهت تعیین هماتوکریت (Hct) نمونه‌های خون جمع‌آوری شده در لوله‌های موئین به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه با سانتیفریوژ مدل (Nuve) سانتیفریوژ شدند؛ مقدار هموگلوبین (Hb) نیز توسط دستگاه اسپکتروفتومتر با معرف درابکین (سیانومت هموگلوبین) در طول موج ۵۴۰ nm با استفاده از منحنی استاندارد و واحد (gr.dl) به دست آمد؛ تعداد گلبول‌های سفید و قرمز با استفاده از پیت ملانژور سفید، لام نئوبار و محلول (Lewis) شمارش شدند. تشخیص افتراقی با رنگ‌آمیزی گیمسا انجام گرفت. شاخص‌هایی چون MCV (حجم متوسط گلبول قرمز)، MCH (مقدار متوسط وزن هموگلوبین در یک گلبول قرمز) و MCHC (غلظت متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز) طبق فرمول‌های زیر محاسبه گردید (۲).

$$MCV (fL) = (Hct/RBC \text{ (per million)}) \times 10$$

$$((MCH (pg) = (Hb/RBC \text{ (per million)} \times 10$$

$$MCHC (\%) = (MCH/MCV) \times 100$$

آنزیم‌های ALT، AST، ALP و LDH با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون با روش فتومتریک اندازه‌گیری شدند (۱۵) و گلوکز با استفاده از کیت تشخیص (GOD POP) شرکت پارس آزمون با روش فتومتریک و سنجش پروتئین کل با کیت شرکت Bionik با روش کالریمتریک اندازه‌گیری شد. سنجش کورتیزول نیز بر اساس کیت Accu-bind شرکت Monobind انجام شد (۲۳).

نتایج حاصل از بررسی و شمارش‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد بیان شد. نرمالیت‌های داده‌ها با استفاده از روش Kolmogorov-Smirnov بررسی و اختلاف بین داده‌ها و مقایسه میانگین نمونه‌ها با آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) با استفاده از نرم افزار SPSS ۲۰ انجام گرفت. در صورت وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها، از پس‌آزمون چند دامنه دانکن استفاده شد. اختلاف در سطح اطمینان بالای ۹۵٪

که امروزه بدلیل صید غیر مجاز، آلوده شدن محیط زیست و از بین رفتن زیست‌گاه‌های تکثیر در معرض خطر انقراض قرار دارند (۹). فیل ماهی (*Huso huso*) مهم‌ترین گونه ماهیان خاویاری بومی دریای خزر و بزرگترین ماهی آب‌های داخلی می‌باشد که از نقطه نظر کیفیت خاویار رتبه اول را به خود اختصاص داده است (۱۷). به دلیل استفاده روز افزون صنایع از نانومواد بخصوص در استان‌های حاشیه خزر و ورود فاضلاب‌های حامل این مواد در دریای خزر و همچنین اهمیت فیل ماهی به عنوان یک گونه ارزشمند اقتصادی و در معرض خطر انقراض و از طرف دیگر نقش تعیین‌کننده‌ی شاخص‌های خونی و آنزیمی در بررسی‌های اکوتوکسیکولوژی، در این مطالعه اثرات نانوذرات اکسید مس بر برخی فاکتورهای خونی و آنزیم‌های متابولیکی فیل ماهی جوان دریای خزر مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

به منظور انجام این مطالعه، نانوذرات اکسید مس به حالت پودری (سیاه رنگ) تولید کارخانه US Research Nanomaterials با درصد خلوص ۹۹/۸٪، با ابعاد ۴۰ nm از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان (مشهد، ایران)، خریداری شد. این نانوذرات به منظور توزیع یکنواخت در سوسپانسیون، با مقدار مناسب آب مقطر مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه به وسیله دستگاه اولتراسوند (شرکت سازنده: QSonica، مدل: S۳۰۰۰) در دمای محیط اولتراسیون شدند. تعداد ۱۳۲ قطعه بچه فیل ماهی با میانگین وزن ۴۰ \pm ۵ gr و میانگین طول ۳۰ \pm ۵ cm تهیه و به آزمایشگاه زیست دریا دانشکده علوم پایه دانشگاه گیلان انتقال داده شدند. از حوضچه‌های فایبر گلاس ۱۰۰۰ لیتری جهت نگهداری و سازش‌دهی ماهیان با شرایط آزمایشگاه قبل از شروع آزمایش استفاده شد و برای انجام آزمایشات حوضچه‌های ۲۰۰ لیتری تهیه گردید. همچنین جهت محافظت از ماهی‌ها از توری و برای تأمین اکسیژن از سنگ هوا استفاده گردید. بچه‌فیل ماهیان به مدت یک هفته با هوادهی و دوره‌ی نوری ۱۲ ساعت روشنایی جهت سازگاری با شرایط آزمایشگاهی و تحت دمای ۱ \pm ۱۷ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول در آب ۱ mg/l \pm ۰/۱ و pH ۷ \pm ۰/۱ نگهداری شدند. این پارامترها روزانه کنترل شده و نتایج یادداشت گردید. تنظیم دما با اسپلنت، تنظیم اکسیژن با پمپ و سنگ هوا و تنظیم pH با اسید فسفریک خوراکی انجام شد. در طول این مدت به‌طور میانگین بچه فیل‌ماهیان روزانه دو بار و هر بار به میزان ۱۰ درصد وزن بدن با غذای غیرزنده گرانوله تغذیه گردیدند (۱۳).

انجام آزمایشات تعیین سمیت حاد طبق روش استاندارد OECD (استاندارد شماره ۲۰۳ سازمان همکاری و توسعه اقتصادی) انجام شد (۱۸). بعد از یک هفته سازگاری با شرایط آزمایشگاهی، نمونه‌ها به تعداد ۶۰ قطعه به حوضچه‌های فایبرگلاس ۲۰۰ لیتری حاوی ۱۰۰ لیتر آب هوادهی شده (روش ساکن) با دو تکرار همراه شاهد منتقل شدند و برای هر کدام از حوضچه‌ها ۱۰ قطعه ماهی در نظر گرفته شد. غذادهی ۲۴ ساعت قبل از شروع آزمایش متوقف گردید. ابتدا آزمایش‌های اولیه به منظور یافتن محدوده غلظت‌کشندگی نانوذره اکسید مس در بچه فیل‌ماهیان دریای خزر انجام شد و محدوده غلظت ۱۰ تا ۱۰۰ mg/l تعیین گردید. آنگاه، بر اساس آزمایش‌های انجام‌گرفته در غلظت‌های صفر، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و

آنزیم ALT در بین تمام تیمارها و نیز در مقایسه با شاهد دارای افزایش معنی‌دار بوده است ($P < 0/05$). آنالیز آنزیم AST نشان داد که شاهد تنها با تیمار روز ۱۴ تفاوت معنی‌داری دارد ($P < 0/05$). آنزیم ALP به جز تیمار ۹۶ ساعت در بقیه تیمارها نسبت به شاهد افزایش معنی‌دار داشت ($P < 0/05$). همچنین آنزیم LDH در تیمارهای ۲۴ ساعت، هفت روز و ۱۴ روز افزایش معنی‌دار نشان داد ولی در تیمارهای ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت تفاوت معنی‌داری نداشت ($P < 0/05$).

آنالیز فعالیت شاخص‌های استرس بچه فیل ماهی نشان داد که فعالیت کورتیزول فقط در تیمار ۱۴ روز در مقایسه با شاهد دارای افزایش معنی‌دار بوده است ($P < 0/05$). شاخص گلوکز به جز تیمار ۲۴ و ۹۶ ساعت در بقیه تیمارها نسبت به شاهد افزایش معنی‌دار داشت ($P < 0/05$). اما پروتئین کل در تیمارهای ۴۸ ساعت و ۱۴ روز در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد ($P < 0/05$).

بحث

به طور کلی از تست‌های سمیت حاد به عنوان یک شاخص مناسب به منظور بررسی اثرات کوتاه مدت آلاینده‌ها و همچنین یک مقایسه ساده بین مقدار اثرات مختلف آلاینده‌ها بر ماهی و همچنین میزان حساسیت ماهی استفاده می‌شود (۵). در تحقیق حاضر مقدار LC_{50} بچه فیل‌ماهی دریای خزر در مواجهه با نانوذره اکسید مس پس از گذشت ۹۶ ساعت $51/93 \text{ mg/l}$ محاسبه شد. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که نانوذرات به دلیل خصوصیات فیزیکی‌شیمیایی خاص و متفاوت نسبت به درشت ذرات، اثر و سمیت بیشتری نسبت به آن‌ها داشته‌اند. در یک تحقیق عبدالخالک و همکاران در سال ۲۰۱۵ مقدار LC_{50} نانوذره اکسید مس را در تیلاپپای نیل (*Oreochromis niloticus*) 150 mg/l گزارش داده‌اند، در حالیکه مقدار LC_{50} برای درشت ذره اکسید مس بسیار بیشتر از این مقدار بود که این امر نشان از سمیت حاد بیشتر نانوذره اکسید مس نسبت به درشت ذره آن دارد (۱). همچنین در مطالعه دیگری روبرت و همکاران (۲۲) در بررسی سمیت نانوذره اکسید مس بر گورخر ماهی (*Danio rerio*) با مقدار $1/5 \text{ Mg/L}$ LC_{50} این نانوذره را برای گورخر ماهی سمی اعلام کردند.

در مطالعه حاضر پارامترهای خونی بچه فیل ماهی در معارضه با نانوذرات اکسید مس دچار تغییر شدند. با توجه به نتایج حاصله میزان

($p < 0/05$) در نظر گرفته شد. نمودارها در نرم افزار Excel ۲۰۱۶ رسم گردید.

نتایج

مقدار LC_{50} نانوذره اکسیدمس در بچه فیل‌ماهیان دریای خزر $51/933 \text{ mg/l}$ محاسبه گردید. نتایج به‌دست‌آمده برای مقدار LC_{50} نشان می‌دهد که میزان LC_{50} با افزایش ساعات آزمایش کاهش یافته است؛ به عبارت دیگر هر چقدر ساعات آزمایش افزایش می‌یابد غلظت کمتری از این آلاینده لازم است تا ۵۰ درصد از جمعیت بچه ماهیان تلف شوند و مقدار LC_{50} در ساعات اولیه آزمایش همواره بیشتر از LC_{50} در پایان ۹۶ ساعت می‌باشد. با توجه به جدول ۱، میزان LC_{10} و LC_{90} نیز با افزایش ساعات آزمایش کاهش یافته است. لازم به ذکر است که در طول آزمایش سمیت، هیچ‌گونه مرگ‌ومیری در نمونه شاهد مشاهده نگردید. با توجه به این نتایج بخش دوم آزمایش اجرا شد و ماهیان در معرض غلظت $10/38$ (۲۰ درصد از LC_{50}) قرار گرفتند.

آنالیز پارامترهای خونی نشان داد که نانوذره اکسیدمس بطور معنی‌داری بر تعداد گلبول‌های قرمز (شکل ۱)، هموگلوبین (شکل ۲) و هماتوکریت (شکل ۳) در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ ساعت، هفت روز و ۱۴ روز در مقایسه با شاهد اثر کاهشی داشته است ($P < 0/05$).

آنالیز پارامترهای خونی نشان داد که نانوذره اکسیدمس بر شاخص محاسبه شده MCV تنها در بازه‌های زمانی ۲۴ ساعت نسبت به شاهد به طور معناداری کاهش نشان داد (شکل ۴) و در شاخص‌های MCH و $MCHC$ نمونه‌های در معرض نسبت به تیمار شاهد اثر معنی‌داری نداشته است. ($P < 0/05$) (شکل ۵ و ۶).

نتایج حاصل از بررسی گلبول‌های سفید نشان داد که تعداد کل گلبول‌های سفید شاهد با تیمارهای ۷۲ و ۹۶ ساعت همچنین هفت روز و ۱۴ روز به‌طور معنی‌داری افزایش داشته و در سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ($P < 0/05$) (شکل ۷).

تعداد نوتروفیل به طور کلی در تمام زمان‌ها نسبت به شاهد افزایش معنی‌دار یافت و تعداد لنفوسیت به طور کلی در تمام بازه‌های زمانی کاهش معنی‌دار نسبت به شاهد نشان داد. تعداد مونوسیت‌ها و ائوزینوفیل‌ها در مقایسه با شاهد تفاوت معنی‌داری نشان نداد. آنالیز فعالیت آنزیم‌های خون بچه فیل‌ماهی نشان داد که فعالیت

جدول ۱- میزان سمیت نانوذرات اکسیدمس (mg/l) در بچه فیل ماهی دریای خزر بعد از ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت مجاورت با استفاده از آنالیز Probit

غلظت کشنده	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
LC_{10}	۶۵/۲۶۶	۴۴/۶۱۴	۲۹/۶۲	۲۶/۹۰۹
LC_{50}	۱۲۶/۳۹۵	۱۰۴/۳۸۳	۷۰/۰۸۲	۵۱/۹۳۳
LC_{90}	۲۴۴/۷۷۸	۲۴۴/۲۲۶	۱۶۵/۸۰۶	۱۰۰/۲۲۷

کلیه، طحال، گلبول‌های قرمز و ... یافت می‌شوند و در هنگام بیماری یا صدمه دیدن این بافت‌ها به ویژه کبد، آنزیم AST به داخل خون آزاد می‌شود (۶).

آلکالین فسفاتاز (ALP) آنزیمی است که در ایتلیوم مجاری صفراوی، سلول‌های کبدی و نیز در مخاط روده و کلیه‌ها یافت می‌شود (۱۲). بر اساس نتایج به‌دست آمده در این مطالعه، فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP)، در همه‌ی تیمارها بجز تیمار ۹۶ ساعت افزایش داشته است. به نظر می‌رسد که یکی از مهم‌ترین دلایل افزایش سطح فعالیت این آنزیم در خون، آسیب‌های احتمالی وارده به کبد، روده و عضلات بچه ماهیان در معرض نانوذره‌ی اکسید مس باشد (۱). افزایش سطح فعالیت آنزیم‌های AST، ALT و ALP تحت تاثیر نانوذره اکسید مس در پلاسما‌ی خون ماهی کپور معمولی در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از نانوذره‌ی اکسید مس و ماهی تیلاپیا در معرض یک دهم و یک بیستم از LC۵۰ نانوذره‌ی اکسید مس در مدت زمان دو هفته گزارش شده است (۲۰۱). در برخی از مطالعات تحت تاثیر آلاینده‌های دیگر کاهش آنزیم ALP نیز مشاهده شده است. از جمله در مطالعه‌ای که در آن اثر نانوذره مس و سولفات مس به مدت ۱۴ روز بر روی ماهی کپور معمولی بررسی گردید، کاهش معنی‌دار آنزیم ALP نسبت به شاهد در پلاسما‌ی خون تحت تاثیر هر دو آلاینده گزارش شد. در این مطالعه مقدار آنزیم AST تحت تاثیر سولفات مس و مقدار ALT تحت تاثیر نانوذره مس و سولفات مس در مقایسه با شاهد افزایش نشان دادند (۱۲).

LDH آخرین آنزیم مسیر گلیکولیز در مهره‌داران بوده و یکی از آنزیم‌هایی است که در تشخیص آسیب‌های بافتی ناشی از آلاینده‌ها در بافت‌هایی نظیر کبد، عضله و آبشش در ماهی کاربرد دارد. در صورت آسیب دیدن غشای سلولی و یا نکروز سلول، این آنزیم به بیرون راه پیدا کرده و میزان آن در سرم خون افزایش می‌یابد (۷). برای آزاد شدن LDH از درون سلول‌ها، تحریک قوی مورد نیاز بوده تا بتواند ساختار غشای سلولی را برهم زده و موجبات نشت و خروج این مارکر از سیتوزول فراهم گردد. با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان اثرات نانوذرات اکسید مس را به عنوان تحریک مورد نیاز در نظر گرفت. از سوی دیگر نیز در ارتباط با LDH و چگونگی فعالیت آن، آزمایشات متنوع دیگری نیز به عمل آمده و مشخص گردیده که با تاثیر برخی از نانوذرات اکسید فلزی، نوعی اکسیداسیون مستقیم بر روی ساختار پروتئینی LDH اعمال شده و به این ترتیب عملکرد این آنزیم مهار می‌گردد. بررسی‌ها نشان می‌دهد که غلظت‌های بالاتر از n-CuO موجب حداکثر القای استرس اکسیداتیو می‌شود (۸). بنا بر آنالیزهای مطالعه حاضر آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) نیز در تیمارهای ۲۴ ساعت، هفت و ۱۴ روز دارای روند افزایشی معنی‌دار بود ($P < 0.05$). افزایش سطح LDH در پلاسما‌ی خون بچه ماهی کپور در معرض غلظت‌های تحت کشنده نانوذره اکسید مس گزارش شده است (۲). می‌توان موارد افزایش LDH پلاسما را به آسیب در بافت‌هایی از قبیل آبشش، کبد و کلیه نسبت داد و موارد بدون تغییر ماندن آنزیم در خون نیز می‌تواند به دلیل سازگاری حاصل از خون‌رسانی بیش‌تر و دسترسی سلول‌ها به اکسیژن باشد که مقدار LDH را کاهش می‌دهد (۲۳).

در مطالعه حاضر میزان گلوکز پلاسما‌ی خون بچه فیل ماهی‌ها به

هماتوکریت، هموگلوبین و گلبول‌های قرمز خون ماهی‌های معارضه شده با نانوذرات در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافتند ($P < 0.05$). در مطالعه‌ای که اثر غلظت‌های ۰/۱۵، ۰/۰۷۵، ۰/۰۳۷ و ۰/۰۱۲۵ mg/l نانوذرات اکسید مس در قزل‌آلای رنگین کمان توسط خبازی و همکاران (۱۶) در مدت هفت روز بررسی گردید، نیز میزان هموگلوبین، هماتوکریت و گلبول‌های قرمز کاهش یافته بود. همچنین مطالعه دیگری به مدت هفت و ۱۴ روز در غلظت‌های تحت کشنده نانوذره اکسید مس در بچه ماهی کپور نشان داد که این نانوذره باعث کاهش معنی‌دار میزان هماتوکریت، هموگلوبین و گلبول‌های قرمز خون در این ماهی می‌گردد (۲). پژوهشگران معتقدند که انتقال گاز اکسیژن بطور پیچیده‌ای با گلبول‌های قرمز در ارتباط است، بنابراین نانوذرات اکسید مس با ایجاد محدودیت‌های تنفسی باعث کاهش تعداد گلبول‌های قرمز می‌گردند و با کاهش گلبول‌های قرمز سایر پارامترهای خونی مرتبط مانند MCV، MCH و MCHC، همچنین هماتوکریت و هموگلوبین نیز تحت تاثیر قرار می‌گیرند (۱۶). در مطالعه‌ای که توسط احمدی و همکارانش در سال ۲۰۱۶ بر روی بچه ماهی کپور تحت تاثیر نانوذره اکسید مس انجام گرفت، پارامترهای خونی نظیر تعداد گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت در مقایسه با شاهد کاهش معناداری را نشان دادند و میزان شاخص‌های MCH، MCV و MCHC نیز کاهش یافت. در مطالعه حاضر نیز پارامترهای یاد شده به جز MCH و MCHC نسبت به کنترل دچار کاهش معنادار شدند (۲).

طبق آنالیزهای انجام شده در مطالعه حاضر در معارضه فیل ماهی با نانوذرات اکسید مس تعداد کل گلبول‌های سفید و نوتروفیل در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌دار داشت ($P < 0.05$). افزایش در تعداد گلبول سفید و نوتروفیل بر اثر قرارگیری در معرض نانوذره اکسید مس در بچه ماهی کپور و قزل‌آلای رنگین کمان نیز گزارش شده است (۲ و ۱۶). تغییر در تعداد گلبول‌های سفید نشان‌دهنده‌ی کارکرد ناسالم بافت‌های خونساز همچنین در پاسخ به بعضی بیماری‌های عفونی می‌باشد (۳). در مطالعه حاضر مقدار مونوسیت و ائوزینوفیل در طول زمان تغییری نکرد، اما تعداد لنفوسیت‌ها در اکثر تیمارها کاهش معناداری را نسبت به شاهد نشان داد. از آنجایی که نوتروفیل‌ها، لنفوسیت‌ها و مونوسیت‌ها در واکنش ایمنی به عنوان فاگوسیت‌ها شرکت می‌کنند، افزایش آن‌ها نشان‌دهنده‌ی واکنش سیستم ایمنی ماهی به نانوذره به عنوان یک عامل بیگانه می‌باشد. کاهش آن‌ها در طول زمان نیز می‌تواند به دلیل آسیب به بافت‌های خون‌ساز مثل طحال و کلیه باشد (۲).

سلول‌های موجود در بافت‌های بدن موجودات دارای آنزیم‌های مختلفی هستند که در ارتباط با کارکرد خاص سلول مربوط فعالیت می‌کنند و تمام واکنش‌های بیوشیمیایی داخل سلول‌ها توسط آن‌ها کاتالیز می‌شوند. وقتی که سلولی دچار آسیب شود، آنزیم‌ها به مایعات بین بافتی و از آنجا به سرم خون و مایع مغزی- نخاعی وارد می‌شوند (۲۰). طبق آنالیز داده‌های مطالعه حاضر سطح فعالیت آلانین آمینوترانسفراز ALT در تمامی تیمارها افزایش معنی‌دار نشان داد ($P < 0.05$). طبق نتایج مطالعه حاضر در میزان AST تنها در تیمار روز ۱۴ نسبت به شاهد تغییر معنی داری مشاهده شد ($P < 0.05$). این آنزیم‌ها در ماهی‌ها به طور عمده در کبد و به میزان کمتر در بافت‌های قلب،

- 3) Al-Bairuty, G. A., B. J. Shaw, R.D. Handy and T.B. Henry. 2013. Histopathological effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on the organs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 126: 104-115.
- 4) Bahmani, M., R. Kazemi and P.A. Donskaya. 2001. Comparative study of some hematological features in young reared sturgeons (*Acipenser persicus* and *Huso huso*). *Fish Physiology and Biochemistry* 4(2): 135-140.
- 5) Belfiore, N. M. and S.L. Anderson. 2001. Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms. *Mutation Research/ Reviews in Mutation Research* 489:97-122
- 6) Bhattacharya, H., Q. Xiao and L. Lun. 2008. Toxicity studies of nonylphenol on rosy barb (*Puntius conchonius*): A Biochemical and Histopathological Evaluation. *Tissue and Cell* 40: 243-249.
- 7) Bindu Bhaskaran, A. B., 2011. Hematological and toxicological studies on brackish water fish *Etroplus maculatus* (Bloch). PhD thesis. Cochin university of science and technology. Kochi, India.
- 8) Breccia, J.D., M.M. Andersson and R. Hatti-Kaul. 2002. The role of poly-ethyleneimine in stabilization against metal-catalyzed oxidation of proteins: a case study with lactate dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1570 (3): 165-173.
- 9) Carmona, R., A. Domezain, M. Garcia-Gallego, J. Antonio Hernandez, F. Rodriguez and M. Ruiz-Rejon. 2009. Biology, conservation and sustainable development of sturgeons. Springer, New York. p 467.
- 10) Chang, Y.N., M. Zhang, L. Xia, J. Zhang and G. Xing. 2012. The toxic effects and mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles. *Materials* 5(12): 2850-2871.
- 11) Finney, D. J. 1971. Probit analysis. Cambridge University Press, New York.
- 12) Hoseini, S. M., A. Hedayati, A. Taheri Mirghaed and M. Ghehlichpour. 2016. Toxic effects of copper sulfate and copper nanoparticles on minerals, enzymes, thyroid hormones and protein fractions of plasma and histopathology in common carp, *Cyprinus carpio*. *Experimental and Toxicologic Pathology* 68(9): 493-503.
- 13) Isani, G., M.L. Falcioni, G. Barucca, D. Sekar, G. Andreani, E. Carpenè and G. Falcioni. 2013. Comparative toxicity of CuO nanoparticles and CuSO₄ in Rainbow trout. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 97: 40-46.
- 14) Jamalzad Fallah, F., H. Khara, R. Daghygh Rooohi and M. Sayad Boorani. 2014. Hematological parameters of pike *Esox lucius* in relation to different ages and seasons. *Comparative clinical pathology* 23(4):949-953.
- 15) Jahanbakhshi, A., A. Hedayati and A. Pirbeigi. 2015. Determination of acute toxicity and the effects of sub-acute concentrations

جز تیمار ۲۴ و ۹۶ ساعت افزایش معنی‌داری داشت و میزان هورمون کورتیزول نیز در تیمار ۱۴ روز افزایش و در بقیه تیمارها اختلافی مشاهده نشد. در تجزیه و تحلیل این نتایج باید یادآور شد که کورتیزول و گلوکز شاخص‌های مناسب فیزیولوژیک و یا محیط زیست جهت بررسی رخدادهای استرس در ماهیان می‌باشند و به هنگام وقوع استرس مقادیر آن‌ها افزایش می‌یابد، در واقع می‌توان گفت کورتیزول کورتیکواستروئید اصلی تولید شده در ماهیان است. عوامل استرس‌زای مختلف محور هیپوتالاموس - هیپوفیز - غدد فوق کلیوی را فعال کرده و سبب رها شدن کورتیزول می‌گردند. افزایش سطح هورمون کورتیزول پاسخ‌های استرس ثانویه را در پی خواهد داشت (۲۰). مقدار گلوکز سرم خون نیز شاخص مناسبی برای پاسخ‌های ثانویه استرسی ماهی به شرایط نامناسب محیطی است و در این حالت گلوکز از کورتیکواستروئیدها آزاد می‌شود که افزایش آن اولین پاسخ به اکثر محرک‌های استرس می‌باشد (۲۵). عبدالخالک در سال ۲۰۱۵ نتایج مشابهی از افزایش میزان کورتیزول و گلوکز سرم خون بر اثر مواجهه با نانوذرات اکسید مس در گونه‌ی *Oreochromis niloticus* گزارش کرده‌اند (۱)، همچنین رزم آرا و همکاران (۲۱) نتایج مشابهی از افزایش میزان گلوکز سرم خون بر اثر مواجهه گربه ماهی رنگین کمان با نانوذرات نقره را گزارش کرده‌اند.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج حاصل شده از این تحقیق می‌توان گفت که حضور ناچیز نانوذره‌ی اکسیدمس می‌تواند سبب تأثیر بر پارامترهای خونی و آنزیمی بچه فیل ماهی دریای خزر گردد و در ادامه سایر فرآیندهای رشد و فیزیولوژی ماهی را نیز تحت تأثیر قرار دهد. در شاخص‌های سیستم ایمنی این ماهیان نیز تغییرات معنی‌داری مشاهده شد. تغییرات قابل توجه در میزان فعالیت آنزیم‌های هدف و مهم‌ترین شاخص‌های استرس در خون از دیگر تغییرات ایجاد شده در بچه فیل ماهی‌ها در مواجهه با نانوذره‌ی اکسیدمس بود که نشان‌دهنده‌ی ضرورت جلوگیری از ورود نانوذرات و آلاینده‌های مشابه به محیط‌های آبی و نظارت صحیح ارگان‌های مربوطه می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از پژوهشکده حوضه آبی دریای خزر دانشگاه گیلان بابت حمایت پژوهشی (طی قرارداد ۱۳۴۳۰۹/ک م)، تشکر و قدردانی به عمل می‌آورند.

منابع مورد استفاده

- 1) Abdel-Khalek, A., M. A. M. Kadry, S. R. Badran and M. A. S. Marie. 2015. Comparative toxicity of copper oxide bulk and nano particles in Nile Tilapia; *Oreochromis niloticus*: Biochemical and oxidative stress. *The Journal of Basic & Applied Zoology* 72: 43-57.
- 2) Ahmadi, H., A.S. Naemi, F. Nazarhaghghi and H. Ghafari. 2016. Effects of copper oxide nanoparticles on some hematological indices and gill tissue in the juvenile carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of aquaculture development* 10(4):1-14. (In Farsi)

of CuO nanoparticles on blood parameters in *Rutilus rutilus*. *Nanomedicine Journal* 2(3): 195-202.

16) Khabbazi, M., M. Harsij, S.A.K. Hedayati, H. Gholipoor, M.H. Gerami and H. Ghafari Farsani. 2015. Effect of CuO nanoparticles on some hematological indices of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and their potential toxicity. *Nanomedicine Journal* 2 (1): 67-73.

17) Mohseni, M., R.O.A. Ozorio, M. Pourkazemi and S.C. Bai. 2008. Effects of dietary Lcarnitine supplements on growth and body in beluga sturgeon (*Huso huso*) juveniles. *Journal of Applied Ichthyology* 24(6): 646-649.

18) OECD. 1992. Test Guideline 203. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Fish, Acute Toxicity Test. Paris. France.

19) Ostaszewska, T., M. Chojnacki, M. Kamaszewski and E. Sawosz-Chwalibóg. 2016. Histopathological effects of silver and copper nanoparticles on the epidermis, gills, and liver of Siberian sturgeon. *Environmental Science and Pollution Research International* 23: 1621-1633.

20) Peyghan, R., M.R. Jalaly and F. Dastuornejad. 2003. Study of normal serum anzymes (ALT, AST, ALP, LDH) levels in common carp, grass carp and silver carp. *Veterinary Researches and Biological Products* 16(1): 90-93. (In Farsi).

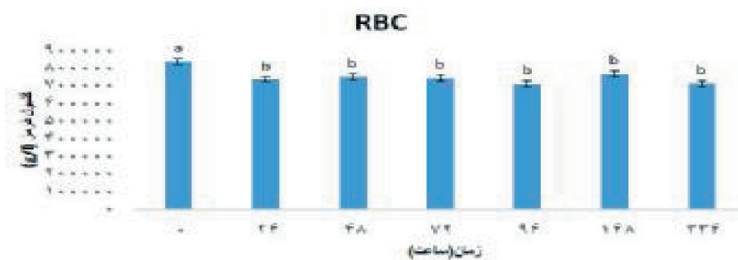
21) Razmara, P., F. Peykan Heyrati and S. Dorafshan. 2014. Effect of silver nanoparticles on some hematological indices of rainbow catfish (*Pangasius hypophthalmus*). *Cell & Tissue Journal* 5(3): 263-272. (In Farsi).

22) Robert, J., R.W. Griffitt, H. Kelly, D.N. Denslow, K.W. Powers, D. Taylor, and S.B. David. 2007. Exposure to Copper Nanoparticles Causes Gill Injury and Acute Lethality in Zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science & Technology* 41(23):8178-8186.

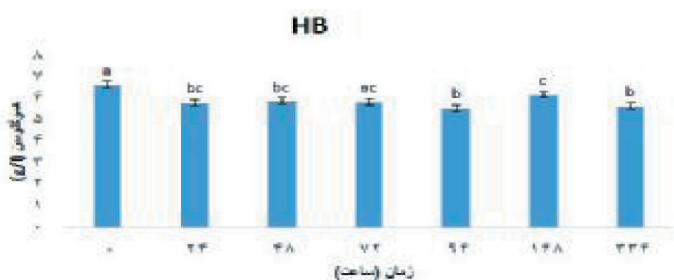
23) Shalvei, F., A. Hedayati, A. Jahanbakhshi, H. Kolangi and M. Fotovat. 2013. Effect of subacute exposure to silver nanoparticle on some hematological and plasma biochemical indices in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Human & Experimental Toxicology* 32(12):1270-1277.

24) Shandilya, N., O. Le Bihan, C. Bressot and M. Morgeneyer. 2015. Emission of titanium dioxide nanoparticles from building materials to the environment by wear and weather. *Environmental Science & Technology* 49: 2163-2170.

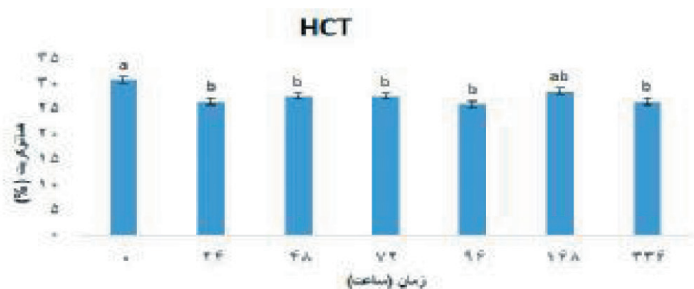
25) Vianen, G.J., G.E.E.J.M. Van Den Thillart, M. Van Kampen, T.I. Van Heel and A.B. Steffens. 2001. Substrate mobilization and hormonal changes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during stepwise decreasing oxygen levels. *Netherlands Journal of Zoology* 51: 33-50.



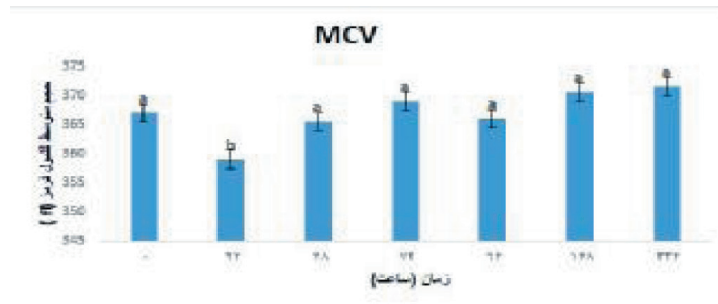
شکل ۱- تعداد گلبول‌های قرمز در نمونه شاهد و نمونه‌های در معرض نانوذره‌ی اکسید مس. حروف متفاوت نشان دهنده‌ی تفاوت معنی دار میان بازه‌های زمانی می‌باشد ($P < 0/05$).



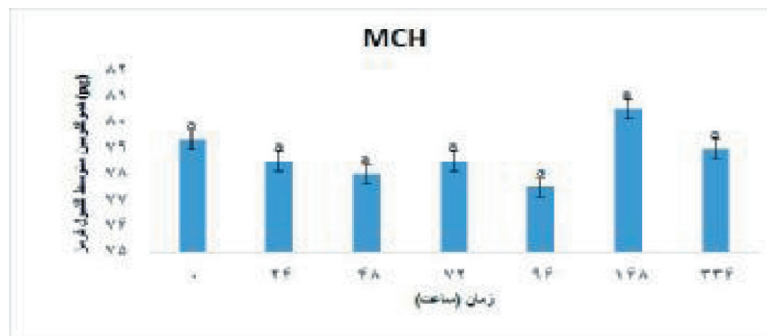
شکل ۲- مقدار هموگلوبین در نمونه شاهد و نمونه‌های در معرض نانوذره‌ی اکسید مس. حروف متفاوت نشان دهنده‌ی تفاوت معنی دار میان بازه‌های زمانی می‌باشد ($P < 0/05$).



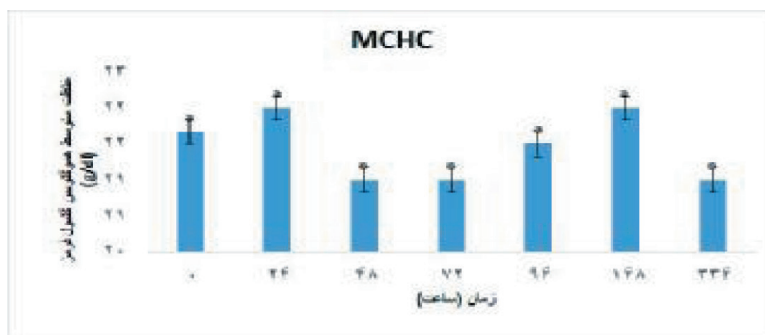
شکل ۳- مقدار هماتوکریت در نمونه شاهد و نمونه‌های در معرض نانوذره‌ی اکسید مس. حروف متفاوت نشان دهنده‌ی تفاوت معنی دار میان بازه‌های زمانی می‌باشد ($P < 0/05$).



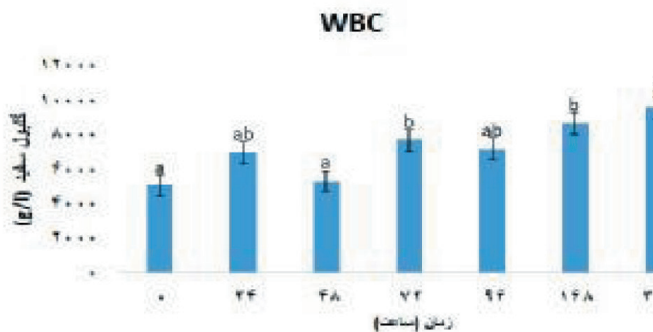
شکل ۴- مقدار MCV در نمونه شاهد و نمونه‌های در معرض نانوذره‌ی اکسید مس. حروف متفاوت نشان دهنده‌ی تفاوت معنی دار میان بازه‌های زمانی می‌باشد ($P < 0/05$).



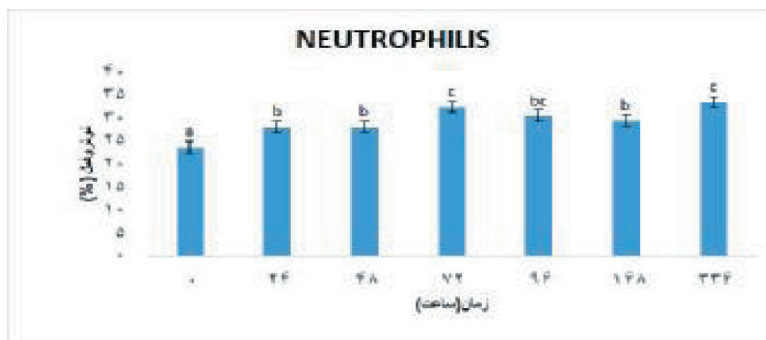
شکل ۵- مقدار MCH در نمونه شاهد و نمونه‌های در معرض نانوذره‌ی اکسید مس. حروف متفاوت نشان دهنده‌ی تفاوت معنی دار میان بازه‌های زمانی می‌باشد ($P < 0/05$).



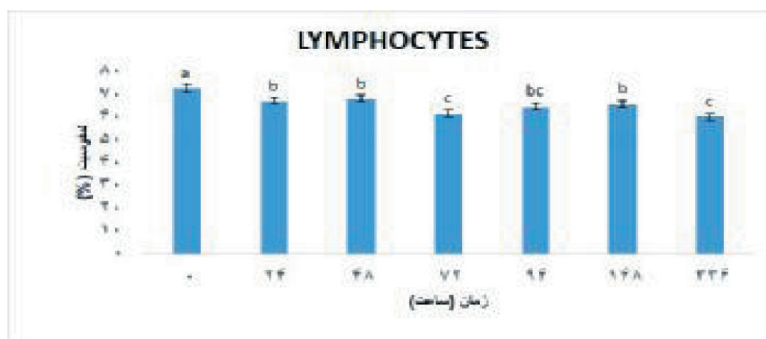
شکل ۶- مقدار MCHC در نمونه شاهد و نمونه‌های در معرض نانوذره‌ی اکسید مس. حروف متفاوت نشان دهنده‌ی تفاوت معنی دار میان بازه‌های زمانی می‌باشد ($P < 0/05$).



شکل ۷- مقدار WBC در نمونه شاهد و نمونه‌های در معرض نانوذره‌ی اکسید مس. حروف متفاوت نشان دهنده‌ی تفاوت معنی دار میان بازه‌های زمانی می‌باشد ($P < 0/05$).



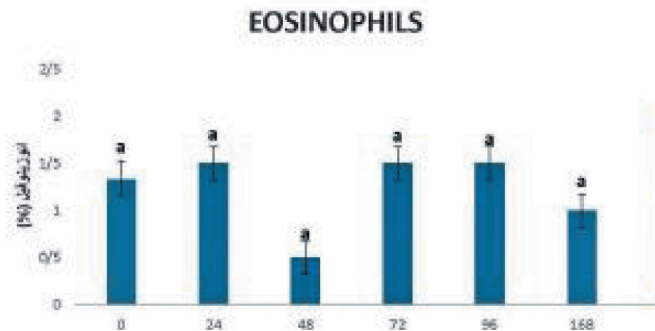
شکل ۸- مقدار Neutrophils در نمونه شاهد و نمونه‌های در معرض نانوذره‌ی اکسید مس. حروف متفاوت نشان دهنده‌ی تفاوت معنی دار میان بازه‌های زمانی می‌باشد ($P < 0/05$).



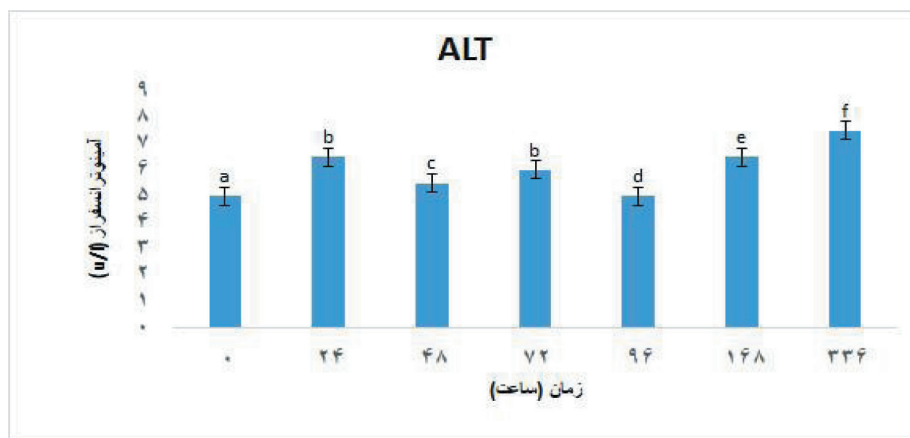
شکل ۹- مقدار Lymphocytes در نمونه شاهد و نمونه‌های در معرض نانوذره‌ی اکسید مس. حروف متفاوت نشان دهنده‌ی تفاوت معنی دار میان بازه‌های زمانی می‌باشد ($P < 0/05$).



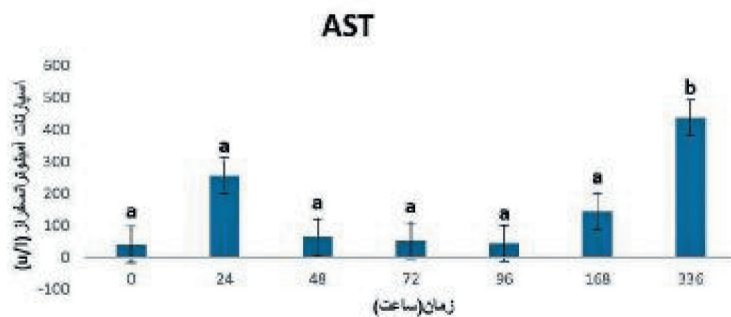
شکل ۱۰- مقدار Monocytes در نمونه شاهد و نمونه‌های در معرض نانو ذره‌ی اکسید مس. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار میان بازه‌های زمانی می‌باشد ($P < 0/05$).



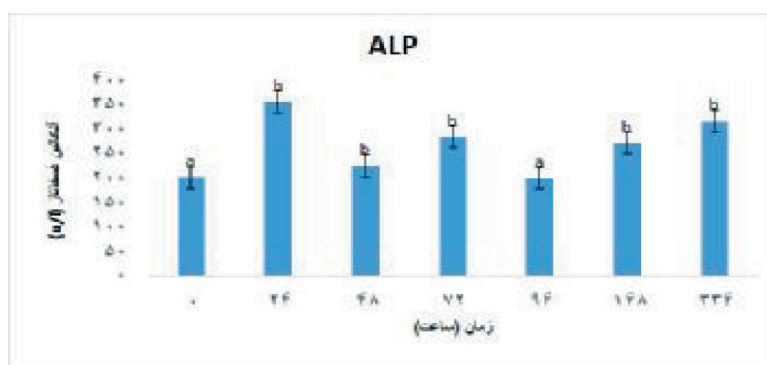
شکل ۱۱- مقدار ائوزینوفیل در نمونه شاهد و نمونه‌های در معرض نانو ذره‌ی اکسید مس. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار میان بازه‌های زمانی می‌باشد ($P < 0/05$).



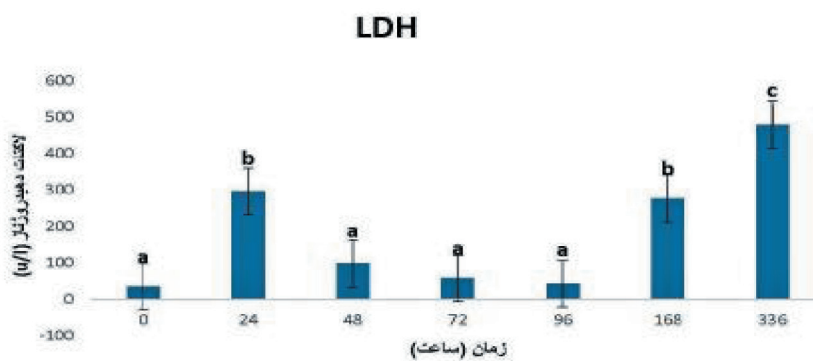
شکل ۱۲- میزان فعالیت آنزیم ALT در نمونه شاهد و نمونه‌های در معرض نانو ذره‌ی اکسید مس. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار میان بازه‌های زمانی می‌باشد ($P < 0/05$).



شکل ۱۳- میزان فعالیت آنزیم AST در نمونه شاهد و نمونه‌های در معرض نانوذره‌ی اکسید مس. حروف متفاوت نشان دهنده‌ی تفاوت معنی دار میان بازه‌های زمانی می‌باشد ($P < 0/05$).



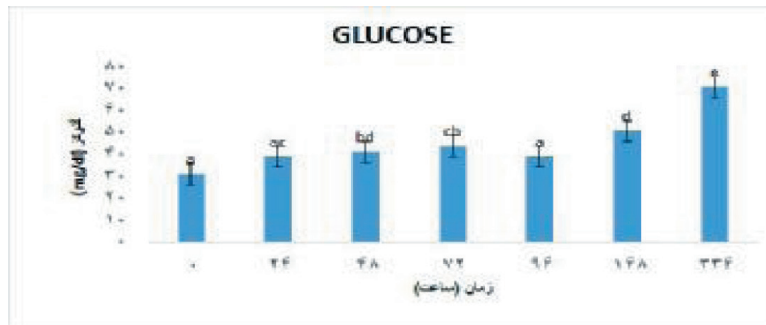
شکل ۱۴- میزان فعالیت آنزیم ALP در نمونه شاهد و نمونه‌های در معرض نانوذره‌ی اکسید مس. حروف متفاوت نشان دهنده‌ی تفاوت معنی دار میان بازه‌های زمانی می‌باشد ($P < 0/05$).



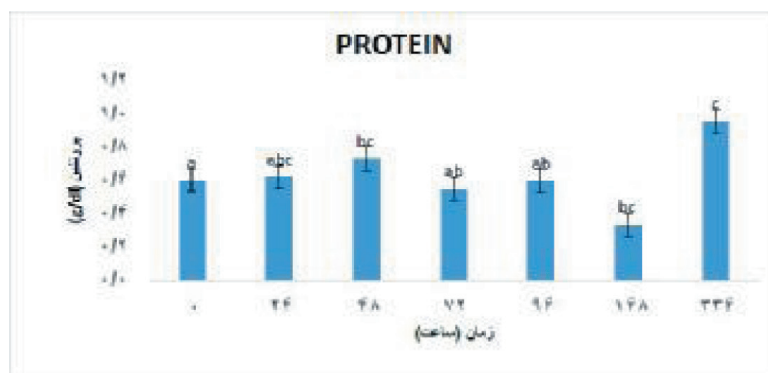
شکل ۱۵- میزان فعالیت آنزیم LDH در نمونه شاهد و نمونه‌های در معرض نانوذره‌ی اکسید مس. حروف متفاوت نشان دهنده‌ی تفاوت معنی دار میان بازه‌های زمانی می‌باشد ($P < 0/05$).



شکل ۱۶- میزان فعالیت کورتیزول در نمونه شاهد و نمونه‌های در معرض نانوذره‌ی اکسید مس. حروف متفاوت نشان دهنده‌ی تفاوت معنی دار میان بازه‌های زمانی می‌باشد ($P < 0/05$).



شکل ۱۷- میزان فعالیت گلوکز در نمونه شاهد و نمونه‌های در معرض نانوذره‌ی اکسید مس. حروف متفاوت نشان دهنده‌ی تفاوت معنی دار میان بازه‌های زمانی می‌باشد ($P < 0/05$).



شکل ۱۸- میزان فعالیت پروتئین در نمونه شاهد و نمونه‌های در معرض نانوذره‌ی اکسید مس. حروف متفاوت نشان دهنده‌ی تفاوت معنی دار میان بازه‌های زمانی می‌باشد ($P < 0/05$).

