



اثرات القایی تیمار حاد نانوذرات شیمیایی و بیوستنزی اکسید آهن (Fe_3O_4) بر تغییرات شاخص‌های خون‌شناسی، بیوشیمیایی و ایمنی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

سکینه مشجور^۱، مرتضی یوسف‌زادی^{۲*}، حسین ذوالقرنین^۳، احسان کامرانی^۴، مجتبی علیشاهی^۵

تاریخ دریافت: آبان ۹۶

تاریخ پذیرش: بهمن ۹۶

چکیده

نظر به کاربردهای متنوع نانوذرات اکسید آهن (مگنتیت، Fe_3O_4 -NPs) و دریافت نهایی آن‌ها به اکوسیستم‌های آبی، در مطالعه حاضر اثرات مواجهه حاد (۹۶ ساعته) با Fe_3O_4 -NPs شیمیایی (غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و 2000 mg/L) و بیوستنزی شده ($Bio-Fe_3O_4$ -NPs) توسط جلبک *Ulva prolifera* (۵۰۰ و 1000 mg/L)، بر تغییرات شاخص‌های خونی شامل تعداد کل و درصد افتراقی گلبول‌های سفید (WBC)، تعداد گلبول‌های قرمز (RBC)، میزان هموگلوبین، هماتوکریت، شاخص‌های گلبول قرمز شامل MCV، MCH و MCHC، شاخص‌های بیوشیمیایی سرم شامل گلوکز و آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) و شاخص ایمنی آزمون احیای نیتروبلوترازولیوم، در مقایسه با گروه شاهد (بدون نانوذره) در بچه‌ماهیان کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) (میانگین وزن $10/04 \pm 1/83$ گرم) بررسی شد. نتایج نشان داد که با وجود عدم سمیت حاد هر دو نوع نانوذره مگنتیت در ماهی کپور معمولی، با افزایش غلظت Fe_3O_4 -NPs و $Bio-Fe_3O_4$ -NPs افزایش معنی‌داری در شاخص‌های هماتوکریت، هموگلوبین، RBC، WBC (نانوشیمیایی)، گلوکز و ALP و کاهش معنی‌داری در MCV و MCH مشاهده شد. در این میان RBC به عنوان کارآمدترین نشانگر معرفی شد ($P < 0/00001$). $r_b = 0/982$ ؛ $r_c = 0/952$. با این حال در غلظت‌های مشابه، شدت تغییرات شاخص‌ها در گروه تیمار با $Bio-Fe_3O_4$ -NPs پایین‌تر از Fe_3O_4 -NPs بود که احتمال می‌رود علت آن ناشی از تفاوت ماهیت، روش ساخت و توان زیست‌سازگاری $Bio-Fe_3O_4$ -NPs باشد.

واژگان کلیدی: سمیت، *Cyprinus carpio*، نانوذرات مگنتیت، شاخص‌های خونی.

- ۱- دکتری زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.
 - ۲- دانشیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.
 - ۳- دانشیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران.
 - ۴- استاد گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.
 - ۵- استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
- * نویسنده مسئول: morteza110110@gmail.com

مقدمه

الکترونیکی، نوری، کارآمدی اندازه ذره، نسبت سطح به حجم بالا (Pottler et al., 2015) و نیز طبقه‌بندی در گروه نانومواد غیرسمی و زیست‌سازگار (Kunzmann et al., 2011)، در محوریت تمرکز بسیاری از مطالعات در حوزه‌های نانوفناوری کاربردی قرار گرفته است و به نانوذراتی مطلوب در حوزه دانش و پرتقاضا در بخش صنعت برای طیف وسیعی از کاربردها مانند نانوزیست‌پالایی (حذف آلاینده‌های زیست‌محیطی به کمک جاذب‌های نانویی) (Xu et al., 2012; Adeleye et al., 2016)، بهره‌برداریهای آزمایشگاهی در شرایط *in vivo* و *in vitro* افزایش تمایز و کنترست در تصویربرداری تشدید مغناطیسی (MRI) (Bulte et al., 2001)، ترمیم بافت، ایمنی سنجی، انتقال ژن، کاربردهای انتقال دارو و غیره بدل شده‌اند (Dobson, 2006; Sunderland et al., 2006; Laurent et al., 2008). از این رو راهیابی آن‌ها به خاک، فاضلاب و نهایتاً مسیرهای آبی منتهی به دریاها و اقیانوس‌ها و در معرض قرارگیری ماهیان و دیگر آبزیان با این ترکیبات نوظهور امری اجتناب‌ناپذیر خواهد بود. بنابراین، با توجه به کمبود اطلاعات در ارتباط با پتانسیل

در دهه‌های اخیر رشد و توسعه نانوفناوری که صنعتی با تولیدی بالغ بر میلیون‌ها تن نانومواد در سال است (Simonet and Valcarcel, 2009; Klaine et al., 2012) یکی از پرشتاب‌ترین بخش‌های اقتصاد کشورهای پیشرفته به شمار می‌آید و کاربرد تولیدات این صنعت در سطح جهان رشد و توسعه شگرفی را در پی داشته است. به نحوی که تا حوزه‌های پزشکی، دارویی، زیست‌فناوری، توسعه فرآیندهای مواد-انرژی و زیست‌پالایی محیطی نیز پیش رفته است. در میان انواع نانومواد اکسیدهای فلزی، ذرات آهن در مقیاس نانو با فرمول Fe_xO_y و $FeOOH$ (در ۱۶ فرم پلی‌مورفیک) و به فرم‌هایی چون اکسید آهن مغناطیسی (مگنتیت یا Fe_3O_4 NPs)، هماتیت ($\alpha-Fe_2O_3$) و ماگمیت ($\gamma-Fe_2O_3$) و نانوذرات آهن صفر ظرفیتی ($nZVI$) (Li et al., 2008; Kharisov et al., 2012)، به علت ویژگی‌های سوپرپارامغناطیسی، توان کاتالیتیکی و کاربردهای متنوع و رو به توسعه آن همواره مورد توجه بوده‌اند. در این میان، نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی (Fe_3O_4) نظر به ویژگی‌های منحصر به فرد مغناطیسی،

1- Non Zero Valent Iron

خام استفاده می‌شود (Silva et al., 2015) که قادر هستند به عنوان عوامل احیاگر و تثبیت کننده طبیعی یون‌های فلزی عمل کنند و بدون بهره‌گیری از هیچ نوع افزودنی و یا کنشگرهای شیمیایی دیگر مانند حلال‌ها، تولید انواع مختلفی از نانوذرات غیرارگانیک چون نانوذرات اکسیدهای فلزی را امکان‌پذیر سازند (Nadagouda and Varma, 2009).

توسعه این فناوری جدید در حوزه تولید نانوترکیبات شیمیایی می‌تواند راه‌کاری امید بخش را در جهت تعدیل نگرانی‌های مطرح در بحث آلاینده‌های آتی نانوذرات و ترکیبات سمی و شیمیایی آن‌ها در اکوسیستم‌های طبیعی ارائه دهد.

در ارتباط با آلاینده‌های نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی در سیستم‌های آبی، یکی از نگرانی‌های پیش رو احتمال استرس‌زایی آن‌ها برای ماهیان و دیگر آبزیان است. استرس با ایجاد اختلال در تعادل هومئوستاز باعث ایجاد اثرات مخرب در رفتار، رشد، تولیدمثل، عملکرد سیستم ایمنی و مقاومت در برابر بیماری‌ها می‌شود (Chen et al., 2004; Morales et al., 2005). ارزیابی اثرات سمیت و استرس‌زایی یک آلاینده مانند نانوذرات بر زیست‌مندان آبی، توسط شاخص‌های زیستی مختلفی در

اثرات منفی این نانوذرات بر زیست‌بوم آبی و متعاقباً تاثیرپذیری سرنوشت، رفتار و سمیت آن‌ها از دیگر پدیده‌های زیستی، در سال‌های اخیر رویکردهای نانوبوم‌سم‌شناسی دریایی عمدتاً در جهت ارزیابی و پیش‌بینی مخاطرات احتمالی نانوذرات به عنوان نسل جدیدی از آلاینده‌ها بر زیست‌مندان آبی هدف‌گیری شده‌اند.

تا کنون نانوذرات مگنتیت به روش‌های فیزیکی و شیمیایی مختلفی ساخته شده‌اند، با این وجود در اکثریت این روش‌های مرسوم در تولید نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی از واکنشگرهای شیمیایی و تولیدات فرعی خطرناکی استفاده می‌شود که می‌توانند بسیار سمی باشند و برای کاربری این نانوذرات به ویژه در حوزه‌های پزشکی- کلینیکی نگران کننده باشد (Laurent et al., 2008; Kalantari et al., 2014). از نقطه نظر نانوزیست‌سازگاری^۲ تولید سبز^۳ حوزه‌ای از نانوفناوری است که رویکردی قدرتمند، ایمن، پایدار، غیرسمی، پاک و دوستدار محیط زیست را برای تولید نانوذرات ارائه می‌دهد. در این روش از سیستم‌های زیستی و یا زیست‌ماده

2- Nanobiocompatibility
3- Green Synthesis

مکانیسمی نانوذرات اکسید آهن مگنتیت از هر دو نوع شیمیایی و بیوسنتزی در بوم‌سازگان‌های آبی، تعیین غلظت‌های مرتبط با سمیت بالقوه حاد و پاسخ‌های فیزیولوژیکی جاندار، ارزیابی تفاوت ماهیت و روش ساخت نانوذرات بر پتانسیل سمیت‌زایی آن‌ها در سیستم‌های زیستی و برنامه‌ریزی برای تعدیل و تنظیم پیامدهای آتی مواجهه با آن‌ها، در مطالعه حاضر و طی اقدامی پیشگام، اثرات القایی نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی (Fe_3O_4) که به صورت شیمیایی ساخته شده است و نیز هم‌تای بیوسنتزی آن که به روش زیست-جلبکی با استفاده از عصاره آبی ماکرو جلبک سبز دریایی *Ulva prolifera* (Chlorophyceae) تولید شده است، بر تغییرات شاخص‌های خون‌شناسی، بیوشیمیایی و پاسخ‌های ایمنی در شرایط *in vivo* در بچه‌ماهیان کپور معمولی، طی یک مواجهه حاد (۹۶ ساعته) ارزیابی و مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی شیمیایی پودر خالص و سیاه رنگ نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی مگنتیت (Fe_3O_4) که به روش

هر دو شرایط *in vitro* و *in vivo* امکان‌پذیر است. در این بین، شاخص‌های بیوشیمیایی، خون‌شناسی (هماتولوژی) و ایمنی از ابزارهای بسیار مفید در ارزیابی تغییرات متابولیکی در سطوح پلاسمایی و تفسیر پاسخ‌های فیزیولوژیکی ماهیان در مواجهه با عوامل استرس‌زای محیطی است (McCormick, 2001; Chen et al., 2004). زیرا ورود آلاینده‌ها در پیکره ماهی می‌تواند منجر به بروز تغییراتی در پروفایل بیوشیمیایی خون شود که خود بازتابی از وقوع تغییرات در فرآیندهای متابولیسمی آلاینده‌ها در خلال سیستم‌های آنزیمی سم‌زدایی در ماهیان است (Edsall, 1999). در میان انواع ماهیان، ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) به علت پراکنش وسیع در سطح جهان، حساسیت به آلاینده‌ها و پتانسیل تجمع زمانی زئوبیوتیک‌ها در بافت‌ها، به عنوان یک ارگانیزم زیستی شاخص به ویژه در مطالعات نانوبوم‌شناسی شناخته شده است (رضایی و همکاران، ۱۳۹۳؛ Zhao et al., 2011؛ Hedayati, Hao and Chen, 2012؛ Chupani et al., 2018؛ et al., 2012).

نظر به اندک مطالعات موجود و نبود هیچ نوع رهنمود معتبر و استاندارد برای ارزیابی پتانسیل خطر و یا سمیت‌سنجی کمی و

شیمیایی تولید و تجاری سازی شده بودند با درجه خلوص ۹۹/۵٪ بدون پوشش با اندازه ذره ۲۰-۱۵nm و شکل کروی (US NANO، آمریکا) در ایران به واسطه شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان تهیه شد. برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی این محصول عبارت هستند از چگالی این نانوذرات $4/8 \text{ g/cm}^3$ و مساحت سطحی BET برابر با $81/9 \text{ m}^2/\text{g}$ بود و تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره $4(\text{TEM})$ (FBI، آمریکا) آن در شکل ۱- الف نشان داده شده است. میانگین پتانسیل زتا نانوذرات اکسید آهن که توسط دستگاه زتاسایزر (Malvern، انگلستان) اندازه‌گیری شد، $17/2 \pm 6/07 \text{ mV}$ بود و میانگین اندازه قطر هندسی آن‌ها که توسط دستگاه پارتیکل سایزر (Scatterscope-I Qudix، کره جنوبی) اندازه‌گیری شد، $8/05 \text{ nm}$ بود.

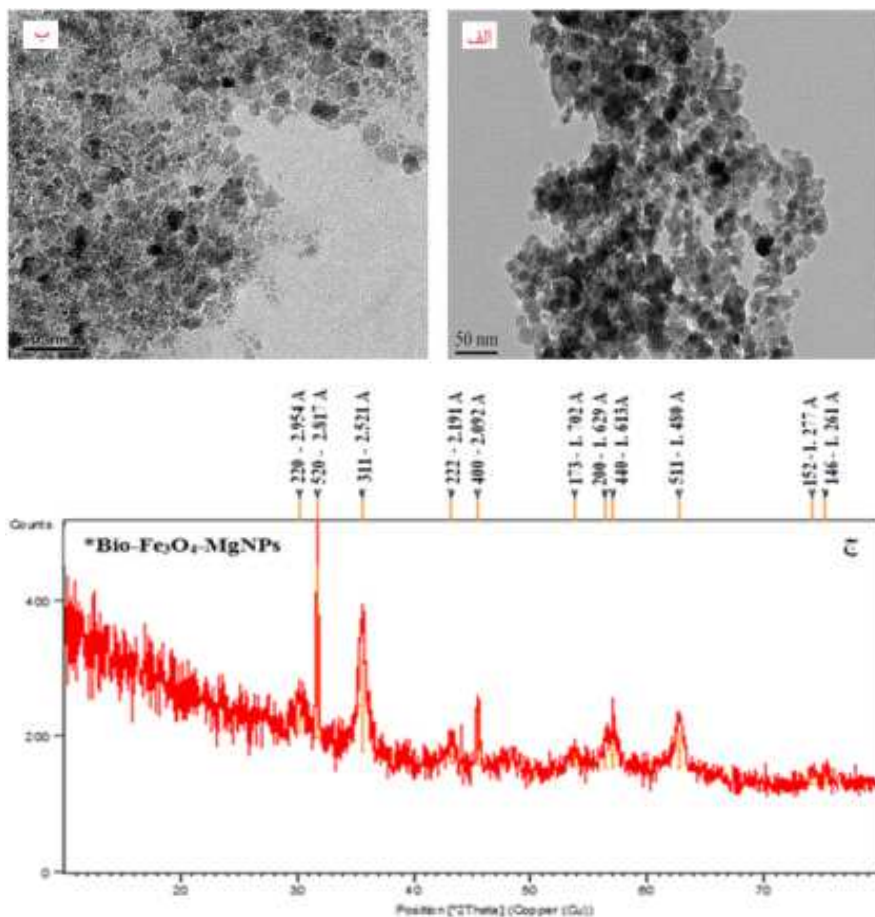
ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی بیوسنتزی

در مطالعه حاضر، برای سنجش اثرات سمیت نوع بیوسنتزی نانوذرات مگنتیت از نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی بیوسنتز شده $(\text{Bio-Fe}_3\text{O}_4)$ توسط عصاره آبی ماکروجلبک

سبز دریایی *U. prolifera* با اعمال اصلاحاتی در روش پیشنهادی Awwad و Salem (۲۰۱۲) استفاده شد (Mashjoor et al., 2015). در این رویکرد بیوسنتزی احیای نانوذرات مگنتیت در محلول کلرید آهن فرو و فرس (با نسبت مولی ۱:۲) به روش زیستی و با بهره‌گیری از عصاره آبی جلبک سبز (۶۶/۶ گرم در لیتر) صورت پذیرفت (Mashjoor et al., 2015). این نانوذرات مگنتیت بیوسنتز شده دارای ساختار پلی‌دیسپرسال کروی-مکعبی، مقیاس نانویی برابر با $9/59 \text{ nm}$ و میانگین پتانسیل زتای $35/2 \pm 8/21 \text{ mV}$ بود و بنا بر نتایج ارائه شده با همتای شیمیایی آن از منظر مشخصات کیفی برابری نسبی داشت (Mashjoor et al., 2015). ویژگی‌های ریخت‌شناسی نانوذره مانند شکل، توزیع ذرات، اندازه نانوذره و طبیعت کریستاله آن نیز با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره تعیین شد (شکل ۱- ب). ساختار کریستالوگرافیک و تشخیص فازی نانوذرات مگنتیت بیوسنتزی توسط دستگاه پراش اشعه ایکس (XRD) (Panalytical، هلند) بررسی و ماهیت مگنتیت این نانوذرات تایید شد (شکل ۱- ج) (Mashjoor et al., 2015).

5- X-ray Diffractometer

4- Transmission Electron Microscopy



شکل ۱: نتایج آنالیز تشخیص کیفی نانوذرات مگنتیت. الف) تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) از نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی شیمیایی (Fe_3O_4) در مقیاس ۵۰ نانومتر. ب) تصویر TEM از نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی بیوستنزی ($Bio-Fe_3O_4$) در مقیاس ۵۰ نانومتر. ج) الگوی پراش اشعه ایکس (XRD) از نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی بیوستنزی.

شرایط تیمار حاد و نمونه‌گیری

تعداد ۳۰۰ قطعه بچه‌ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) با وزن متوسط 10.04 ± 1.83 گرم از کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان گرم آبی آزادگان (واقع در بیست کیلومتری جاده اهواز- آبادان) تهیه و به آزمایشگاه آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل شد. آکواریوم‌های نگهداری بچه‌ماهیان ابتدا ضدعفونی و آماده‌سازی شدند و سپس آبیگری آن‌ها صورت پذیرفت. بچه‌ماهیان پیش از شروع تیمارهای سمیت‌سنجی، به مدت ۲ هفته با شرایط آزمایشگاه سازگار شدند و با غذای استاندارد ماهی کپور (فردانه، ایران) به نسبت ۲٪ وزن بدن، تغذیه شدند. غذادهی ۴۸ ساعت پیش از شروع تیمار با نانوذرات قطع شد. در تیمار بندی حاد ماهیان، به منظور پیشگیری از واکنش و رسوبدهی نانوذرات اکسید آهن با املاح موجود در آب، از آب شهری تصفیه، هوادهی و کلرزدایی شده با خصوصیات کیفی شامل دما $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ، pH 8.1 ± 0.32 (Suntex, TS1)، هدایت الکتریکی (EC) $220 \mu\text{S}/\text{cm}^2$ (HACH, Sension5)، اکسیژن محلول (DO) $7.8 \pm 1.1 \text{ppm}$ (HACH, Sension1).

آمریکا)، میزان یون‌های NO_2 و NH_3 و 1ppm و 0.1ppm استفاده شد. به علاوه برای حفظ و پایداری صحیح غلظت‌های نانوذرات و ممانعت از رسوبدهی با وجود طراحی سیستمی با جریان هوادهی تحت فشار، غلظت‌ها در تیمار حاد به صورت روزانه و به طور کامل تمدید شد. در طول دوره قرارگیری در معرض نانوذرات، ماهیان غذادهی نشدند تا احتمال جذب نانوذرات به غذا و یا مواد دفعی نیز به حداقل برسد و به حفظ سلامت و کیفیت آب کمک کند (Hao and Chen, 2012).

در مطالعه حاضر به منظور ارزیابی شاخص‌های خونی، از آزمون سمیت حاد مطابق بر رهنمود استاندارد شماره ۲۰۳ «سازمان توسعه و همکاری اقتصادی» برای آزمون‌های سمیت‌سنجی استاندارد ویژه ماهیان (OECD, 1992) استفاده شد. با توجه به نتایج به دست آمده از این آزمون در تعیین غلظت کشندگی نانوذرات اکسید آهن، برای آزمایش سمیت حاد، ۵ غلظت شامل ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر از نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی شیمیایی و دو غلظت ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر برای نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی بیوسنتزی با

6- Micro Siemens per Centimeter

جداسازی سرم و سنجش شاخص‌های بیوشیمیایی، بخشی از خون به دست آمده به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (Hettich، آلمان) شد تا سرم کاملاً از فاز لخته شده جدا شود. بخش دیگر خون نیز در ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میکرولیتر ماده ضدانعقاد هپارین به منظور انجام آزمایش‌های خون‌شناسی در مجاورت یخ نگهداری شد.

اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی، خون‌شناسی و ایمنی

شمارش تعداد کل گلبول‌های قرمز (RBC)^۱ و سفید (WBC)^۲ با استفاده از لام نئوبار و رقیق کردن خون با محلول نات هرپک صورت پذیرفت (Feldman et al., 2000; Thrall, 2004). شمارش افتراقی گلبول‌های سفید، پس از تهیه لام گسترش خونی و رنگ‌آمیزی با گیمسا، با شمارش ۱۰۰ عدد گلبول سفید و تعیین درصد لنفوسیت (Lym)^۳، مونوسیت (Mon)^۴، ائوزینوفیل (Eos)^۵، نوتروفیل (Neu)^۱ و بازوفیل (Bas)^۲

- 1- Red Blood Cell
- 2- White Blood Cell
- 3- Lymphocyte
- 4- Monocyte
- 5- Eosinophil

احتساب گروه شاهد (غلظت نانوذره ۰ mg/L) در سه تکرار و هر تکرار با ۱۵ قطعه بچه‌ماهی، در نظر گرفته شد. در تیمار بندی با نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی بیوسنتزی به منظور ارتقا احتمال اثرگذاری نانوذرات آهن، صرفاً حداکثر غلظت‌های مجاز آن انتخاب شد. در این پژوهش از پودر نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی شیمیایی و بیوسنتزی Fe_3O_4 ، حل شده در آب دیونیزه (بسیار خالص) استفاده شد و برای دستیابی به یک محلول کلئیدی پایدار و نیز ممانعت از نشست نانوذرات، استوک‌های تهیه شده از هر یک از غلظت‌ها به مدت ۴ ساعت در دستگاه اولتراسونیکاتور حمام‌دار (Elma، آلمان) با شرایط ۱۰۰W و ۴۰kHz (Hao and Chen, 2012).

در این مطالعه، از بچه‌ماهی‌ها پس از ۹۶ ساعت مواجهه با غلظت‌های نامبرده از هر دو نوع نانوذره اکسید آهن مغناطیسی شیمیایی و بیوسنتزی (تیمار حاد) نمونه‌گیری صورت پذیرفت. برای این منظور پس از بیهوش کردن ماهیان با ماده بیهوشی Sigma-MS222 (Aldrich، آلمان)، خون‌گیری توسط سرنگ ۲/۵ میلی‌لیتری هپارینه شده از سیاهرگ ساقه دمی ماهی انجام پذیرفت. سپس به منظور

متوسط گلبول قرمز (MCV)^۵، میزان متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز (MCH)^۶ و غلظت متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز (MCHC)^۷ نیز با بهره‌گیری از رابطه‌های ۱ تا ۳ محاسبه شد (Thrall, 2004).

رابطه ۱:

$$MCV (fL) = [PCV (\%) / RBC (10^6, mm^{-3})] \times 10$$

رابطه ۲:

$$MCH (pg) = [Hb (g/dL) / RBC (10^6, mm^{-3})] \times 10$$

رابطه ۳:

$$MCHC (g/dL) = [Hb (g/dL) / PCV (\%)] \times 100$$

به منظور تعیین شاخص‌های بیوشیمیایی خون شامل گلوکز و آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP)، از نمونه‌های سرم خون (۶ تکرار از هر تیمار) به روش رنگ‌سنجی^۸ مطابق بر دستور العمل کیت تشخیصی (پارس آزمون، ایران) و به وسیله دستگاه اتوانالیزر (BT 1500, Eppendorf, آلمان) در طول موج‌های ۵۴۶ نانومتر (گلوکز) و ۴۰۵ نانومتر (ALP) استفاده شد.

(Bas)^۲ با استفاده از میکروسکوپ نوری (Olympus, آمریکا) با بزرگنمایی ۱۰۰ و با بهره‌گیری از روغن امرسیون در لام‌های گسترش خونی شاهد و تیمارهای نانوذره انجام شد. برای تعیین درصد هماتوکریت (PCV)^۳، لوله‌های موئینه تا دو سوم ظرفیت از خون پر شدند، سپس به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه میکروسانتریفیوژ (Hettich, 32A ROTOFIX, آلمان) شدند و در نهایت به کمک خط‌کش مخصوص، درصد هماتوکریت نمونه‌ها تعیین شد (Lim et al., 2007 2000; Fiess et al., 2007 2000). مقدار هموگلوبین (Hb)^۴ نیز به روش سیانومت و به واسطه افزودن ۱۰ میکرولیتر از خون به ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول درابکین، انکوباسیون به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق، خواندن جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۴۶nm توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Milton Roy, فرانسه) و تعیین میزان هموگلوبین بر اساس منحنی استاندارد صورت پذیرفت (Feldman et al., 2000). پس از تعیین میزان Hb و درصد PVC، شاخص‌های گلبول قرمز شامل حجم

5- Mean Corpuscular Volume
6- Mean Corpuscular Hemoglobin
7- Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration
8- Colorimetric

1- Neutrophil
2- Basophil
3- Packed Cell Volume
4- Hemoglobin

آزمون‌های آماری

برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS 19 و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Microsoft Excel 2007 استفاده شد. تمامی مقادیر داده‌ها بر حسب میانگین \pm خطای استاندارد ارائه شده است. نرمال بودن داده‌ها و همگنی واریانس‌ها توسط آزمون Shapiro-Wilk بررسی شد ($P < 0.05$). سپس به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و پس‌آزمون چند دامنه‌ای Duncan برای تعیین معنی‌داری اختلاف میان تیمارهای مختلف استفاده شد. به منظور تعیین کارآمدترین نشانگر، آزمون رابطه همبستگی پیرسون بین شاخص‌های مورد ارزیابی (خون‌شناسی، ایمنی و بیوشیمی) و غلظت نانوذرات مگنتیت شیمیایی و بیوسنتزی با استفاده از نرم‌افزار IBM SPSS 19 انجام پذیرفت.

نتایج

در مطالعه حاضر نرخ تلفات کمتر از ۱۰ درصد در بچه‌ماهیان کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) طی یک مواجهه حاد ۹۶ ساعته با نانوذرات اکسید آهن شیمیایی (تلفاتی برابر با ۲، ۴ و ۸ درصد به ترتیب در

ارزیابی تاثیر نانوذرات اکسید آهن بر سیستم ایمنی ماهی نیز توسط فرآیند انفجار تنفسی طی فرآیند بیگانه‌خواری گلبول‌های سفید یا احیای NBT^۱ و تعیین نرخ رهاسازی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) از سلول‌های ایمنی (نوتروفیل و منوسیت) در مواجهه با عامل استرس‌زا انجام شد. برای این منظور ۱۰۰ میکرولیتر از خون هیپارینه درون یک ویال ۰/۵ میلی‌لیتری ریخته شد و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول زرد رنگ ۰/۲ درصد NBT به آن افزوده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از این مخلوط به یک لوله آزمایش محتوی ۲ میلی‌لیتر دی‌متیل فراماید^۲ اضافه شد. سپس این مخلوط به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (Hettich، آلمان) شد. در ادامه جذب نوری مایع رویی در طول موج ۶۲۰nm توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. نرخ احیای NBT به صورت واحد جذب در طول موج ۶۲۰nm بیان شد (Uspur and Mustafa, 2005).

1- Nitro Blue Tetrazolium

2- N,N-dimethyl Formamide

میزان هماتوکریت در خون بچه ماهیان کپور معمولی پس از مواجهه حاد با Fe_3O_4 شیمیایی با افزایش غلظت نانوذرات تا 2000mg/L به تبعیت از غلظت به طور معنی داری افزایش یافت ($P < 0.05$) و روند مشابهی هم در نمونه های تحت تیمار با نانوذرات اکسید آهن بیوسنتزی در غلظت های 500 و 1000mg/L مشاهده شد، ولی اختلاف در میزان هماتوکریت بین تیمار با نانوذرات بیوسنتزی آهن و گروه شاهد برخلاف همتای شیمیایی آن معنی دار نبود ($P > 0.05$)؛ جدول (۱).

میزان هموگلوبین در خون بچه ماهیان نیز پس از مواجهه حاد با نانوذرات اکسید آهن با افزایش غلظت نانوذرات افزایش یافت، ولی تنها در غلظت های بالای نانوذرات ($1000-2000\text{mg/L}$) اختلاف آن با گروه شاهد معنی دار بود ($P < 0.05$) و در تیمار با نانوذرات بیوسنتزی این روند معنی دار نبود ($P > 0.05$)؛ جدول (۱).

در مواجهه حاد با افزایش غلظت نانوذرات، تعداد کل گلبول های قرمز (RBC) به طور معنی داری افزایش یافت ($P < 0.05$)؛ جدول (۱).

مواجهه با غلظت های 500 ، 1000 و 2000 میلی گرم بر لیتر) و بیوسنتزی (تلفاتی برابر با 0 و 2 درصد به ترتیب در مواجهه با غلظت های 500 و 1000 میلی گرم بر لیتر) مشاهده شد. این نتایج حاکی از عدم سمیت حاد هر دو نوع نانوذرات مگنتیت شیمیایی و بیوسنتزی در بچه ماهی کپور معمولی است. با این وجود، نرخ تلفات ماهیان طی مواجهه با نانوذرات بیوسنتزی در مقایسه با همتای شیمیایی آن کمتر بود.

بنا بر نتایج به دست آمده، اگرچه سمیت این نانوذرات در بچه ماهیان کپور معمولی پایین بود، اما هر دو نوع شیمیایی و بیوسنتزی از نانوذرات مگنتیت توانستند القاگر برخی تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی در بچه ماهیان کپور معمولی باشند به نحوی که در پایان دوره 96 ساعته تیمار حاد ماهیان با نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی شیمیایی (Fe_3O_4) و بیوسنتزی ($Bio-Fe_3O_4$)، داده های حاصل از تحلیل واریانس یک طرفه اختلاف معنی داری را بین گروه شاهد و تیمارهای مختلف در برخی شاخص ها نشان داده اند (جدول ۱).

جدول ۱: نتایج به دست آمده از شاخص‌های خون‌شناسی بچه‌ماهی کپور معمولی پس از مواجهه حاد با نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی شیمیایی (Fe_3O_4) و بیوستتزی ($\text{Bio-Fe}_3\text{O}_4$) (میانگین \pm خطای استاندارد)

نوع نانوذر	غلظت Fe_3O_4 (mg/L)		غلظت $\text{Bio-Fe}_3\text{O}_4$ (mg/L)		شاهد	گروه‌ها*
	۱۰	۱۰۰	۱۰۰	۵۰۰		
PCV (%)	۲۴/۰ \pm ۱/۳۸ ^{de}	۲۶/۳ \pm ۰/۳۳ ^{cd}	۲۹/۸ \pm ۰/۳۰ ^{abc}	۳۰/۶ \pm ۰/۶۱ ^{ab}	۳۲/۶ \pm ۰/۳۳ ^a	۲۷/۳ \pm ۰/۸۸ ^{bcd}
Hb (g/dL)	۶/۱ \pm ۰/۳۳ ^c	۶/۸ \pm ۰/۶۶ ^c	۷/۵ \pm ۰/۳۹ ^c	۹/۷ \pm ۰/۷۵ ^b	۱۱/۸ \pm ۰/۷۷ ^a	۶/۸ \pm ۰/۲۴ ^c
RBC ($\times 10^6 \text{mm}^{-2}$)	۲/۰ \pm ۰/۰۸ ^d	۲/۵ \pm ۰/۲۳ ^c	۳/۹ \pm ۰/۰۴ ^{ab}	۴/۰ \pm ۰/۰۹ ^a	۴/۳ \pm ۰/۰۶ ^a	۲/۸ \pm ۰/۱۳ ^c
MCV (fL)	۱۲۰/۴ \pm ۱۲/۱۰ ^{ab}	۱۲۳/۹ \pm ۱۱/۳۸ ^a	۱۰۷/۳ \pm ۱۰/۳۵ ^{abc}	۷۵/۲ \pm ۱۰/۰۷ ^d	۷۵/۲ \pm ۴/۲۲ ^d	۹۶/۷ \pm ۴/۹۷ ^{bcd}
MCH (pg)	۳۵/۸ \pm ۰/۶۵ ^a	۳۰/۴ \pm ۱/۹۲ ^{ab}	۲۷/۸ \pm ۳/۸۱ ^{bc}	۱۹/۰ \pm ۰/۹۱ ^d	۲۳/۲ \pm ۱/۲۴ ^{cd}	۲۴/۲ \pm ۱/۹۳ ^{bcd}
MCHC (g/dL)	۳۱/۱ \pm ۳/۷۳ ^{ab}	۲۵/۳ \pm ۱/۵۰ ^{bc}	۲۶/۸ \pm ۲/۲۴ ^{bc}	۲۵/۵ \pm ۱/۱۴ ^{bc}	۳۰/۸ \pm ۲/۱۰ ^{ab}	۲۵/۰ \pm ۱/۸۰ ^a
WBC ($\times 10^3 \text{mm}^{-2}$)	۴/۰ \pm ۰/۳۶ ^b	۴/۱ \pm ۰/۳۸ ^b	۴/۰ \pm ۰/۰۹ ^b	۴/۷ \pm ۰/۱۹ ^b	۴/۸ \pm ۰/۱۸ ^b	۵/۹ \pm ۰/۳۶ ^a
Lym (%)	۷۲/۵ \pm ۵/۸۵ ^a	۸۳/۵ \pm ۳/۸۳ ^a	۴۲/۵ \pm ۴/۲۳ ^c	۵۲/۰ \pm ۳/۸۰ ^{bc}	۷۱/۳ \pm ۴/۳۷ ^a	۶۷/۰ \pm ۶/۶۶ ^{ab}
Neu (%)	۱۳/۶ \pm ۱/۸۳ ^{cd}	۱۲/۰ \pm ۲/۰۷ ^d	۲۳/۰ \pm ۲/۰۳ ^{bcd}	۲۶/۲ \pm ۴/۹۱ ^b	۳۴/۰ \pm ۴/۰۸ ^{bc}	۱۳/۳ \pm ۱/۴۵ ^{cd}
Eos (%)	۲/۰ \pm ۱/۰۰ ^a	۰/۷۵ \pm ۰/۲۳ ^a	۲/۰ \pm ۰/۳۶ ^a	۱/۵ \pm ۰/۰۴ ^a	۱/۲ \pm ۰/۰۳ ^a	۰/۳ \pm ۰/۰۳ ^a
Mon (%)	۲/۴ \pm ۰/۵۱ ^{bc}	۱/۴ \pm ۰/۹۹ ^c	۱/۲ \pm ۰/۲۵ ^c	۸/۲ \pm ۲/۲۱ ^a	۹/۲۵ \pm ۲/۲۳ ^a	۷/۲ \pm ۱/۷۳ ^{ab}
Bas (%)	۱/۶ \pm ۰/۴۰ ^{ab}	۱/۲ \pm ۰/۹۷ ^b	۲/۰ \pm ۰/۳۱ ^{ab}	۳/۲ \pm ۱/۳۹ ^{ab}	۴/۵ \pm ۱/۱۸ ^a	۳/۸ \pm ۱/۳۸ ^{ab}
NBT	۰/۴۰ \pm ۰/۰۳ ^c	۰/۴۵ \pm ۰/۰۱ ^c	۰/۶۸ \pm ۰/۰۲ ^d	۱/۱۹ \pm ۰/۰۳ ^b	۱/۸۶ \pm ۰/۰۴ ^a	۱/۸۸ \pm ۰/۰۹ ^a

*: تعداد نمونه در هر گروه ۶ قطعه بوده است. حروف غیرمشابه در هر ردیف نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح خطای ۰/۰۵ بین تیمارهای مختلف نانوذرات اکسید آهن و گروه شاهد است. داده‌ها به صورت ارائه شده است.
 PCV: هماتوکریت؛ Hb: هموگلوبین؛ RBC: تعداد کل گلبول‌های قرمز؛ MCV: حجم متوسط گلبول قرمز؛ MCH: مقدار متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز؛ MCHC: غلظت متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز؛ WBC: تعداد کل گلبول‌های سفید؛ Lym: لنفوسیت؛ Neu: نوتروفیل؛ Eos: ائوزینوفیل؛ Mon: مونوسیت؛ Bas: بازوفیل؛ NBT: انفجار تنفسی (جذب در طول موج ۶۲۰ nm).

همان‌طور که در شکل ۲ و ۳ مشاهده ریخت‌شناسی گلبول‌های قرمز نیز تحت تاثیر می‌شود، به ویژه در غلظت‌های بالا، در استرس حاد مواجهه با نانوذرات اکسید آهن،

هموگلوبین گلبول قرمز (MCHC)، در مواجهه حاد در تیمارهای شیمیایی تا غلظت 500 mg/L روند تغییرات کاهشی و پس از آن تا غلظت 2000 mg/L افزایشی بود و در تیمار بیوسنتزی هم روند تغییرات MCHC افزایشی بود ($P > 0/05$ ؛ جدول ۱).

تعداد کل گلبول‌های سفید طی مواجهه حاد با هر دو نوع نانوذره Fe_3O_4 شیمیایی و بیوسنتزی با افزایش غلظت نانوذرات افزایش یافت ولی به استثنای بالاترین غلظت (2000 mg/L) اختلاف در مقایسه با گروه شاهد، معنی‌دار نبود ($P > 0/05$).

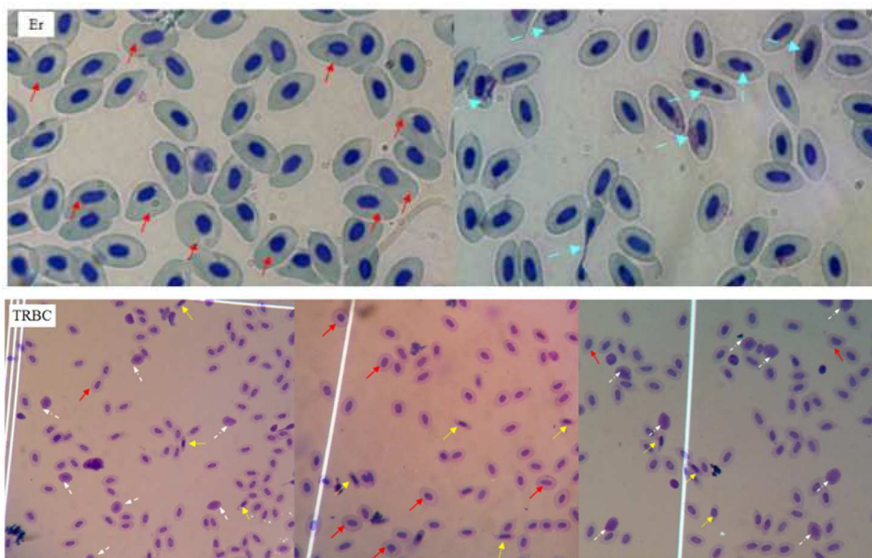
در ارتباط با شمارش افتراقی گلبول‌های سفید (شکل ۳) نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نانوذرات Fe_3O_4 شیمیایی تا غلظت 500 mg/L و همتای بیوسنتزی آن تا 1000 mg/L تعداد لنفوسیت‌ها روند کاهشی داشت ولی پس از آن در غلظت 1000 و 2000 mg/L از نانوذرات شیمیایی تعداد لنفوسیت‌ها افزایش یافت ($P > 0/05$ ؛ جدول ۱). تعداد نوتروفیل‌ها، مونوسیت‌ها و بازوفیل‌ها نیز طی مواجهه حاد با هر دو نوع نانوذره اکسید آهن شیمیایی و بیوسنتزی با افزایش غلظت نانوذرات افزایش یافت ولی به استثنای غلظت 1000 mg/L برای نوتروفیل‌ها (تیمار نانوذرات

تغییراتی در اندازه گلبول (تورم بیش از حد گلبول‌های قرمز)، میزان هموگلوبین (تورم و تیرگی غیرمعمول برخی از گلبول‌های قرمز در مشاهدات میکروسکوپی، شکل ۲ پیکان سفید)، افزایش نرخ ناهنجاری‌های گلبول‌های قرمز مانند گلبول‌های قرمز فعال شده^۱ (گلبول قرمز شکل باریک و نواری به خود گرفته است)، در برخی موارد حتی تکه تکه شده، انواع مختلفی از ناهنجاری‌های هسته‌ای (میکرونوکلئوس و هسته‌های در حال تقسیم) و سیتوپلاسمی (القای تشکیل نقاط بازوفیلی) و نیز افزایش شمار گلبول‌های قرمز در فاز مرگ مشاهده شد.

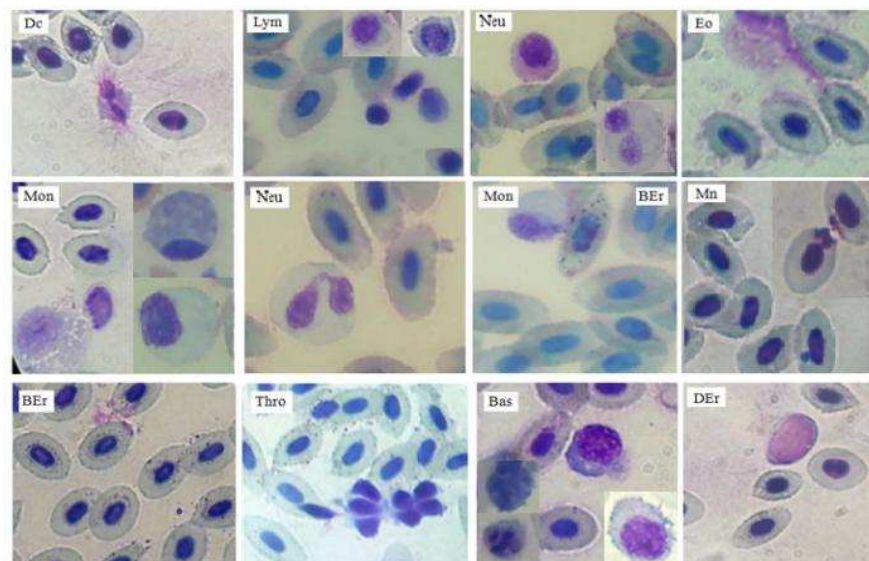
حجم متوسط گلبول قرمز (MCV) و میزان هموگلوبین در گلبول قرمز (MCH) نیز در مواجهه حاد با افزایش غلظت نانوذرات Fe_3O_4 شیمیایی و بیوسنتزی روند کاهشی را نشان داد. با این حال MCV به استثنای غلظت‌های بالای Fe_3O_4 ($2000-500 \text{ mg/L}$) و $\text{Bio-Fe}_3\text{O}_4$ (1000 mg/L)، در بقیه تیمارها اختلاف معنی‌داری را با گروه شاهد نشان نداد ($P > 0/05$). ولی تفاوت MCH در تیمارها نسبت به گروه شاهد معنی‌دار بود ($P < 0/05$ ؛ جدول ۱). در ارتباط با غلظت متوسط

1- Activated Erythrocyte

شیمیایی مگنتیت)، در سایر تیمارها اختلاف تعداد نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). تعداد آنوزینوفیل‌ها نیز با افزایش غلظت نانوذرات اکسید آهن روندی کاهشی داشت ولی در مقایسه با گروه شاهد، اختلاف معنی‌دار نبود ($P > 0.05$ ؛ جدول ۱).



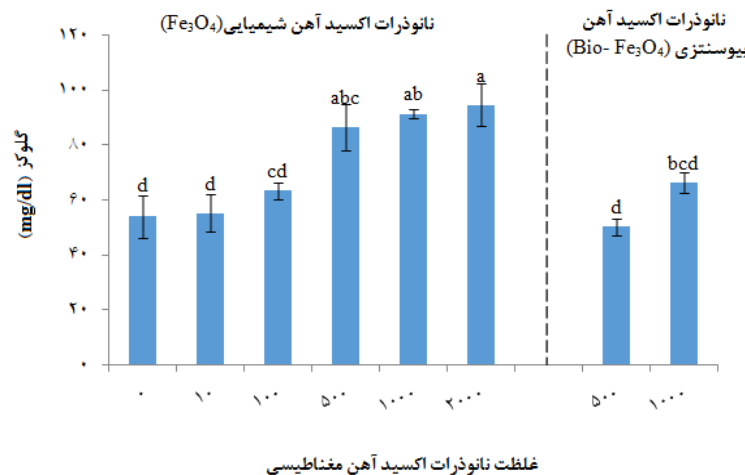
شکل ۲: نمایی از گلبول‌های قرمز (Er) با اندازه غیرطبیعی (پیکان قرمز - خط ممتد) در گسترش خونی تهیه شده از خون بچه‌ماهی کپور معمولی طی مواجهه با نانوذرات اکسید آهن. این نوع گلبول‌های غیرطبیعی به ویژه در تیمار با غلظت‌های بالای 500 mg/L نانوذرات آهن دیده شدند. ناهنجاری‌های هسته‌ای و تکه تکه شدن (پیکان آبی - دونقطه خط چین)، به همراه تصویری از لام هموسیتومتر (شمارش TRBC) و شکل‌گیری گلبول‌های قرمز فعال به شکل باریک و کشیده (پیکان زرد - خط نقطه چین)، گلبول‌های قرمز با تجمع غیرمعمول هموگلوبین (پیکان سفید - خط چین) و گلبول‌های قرمز متورم (پیکان قرمز - خط ممتد).



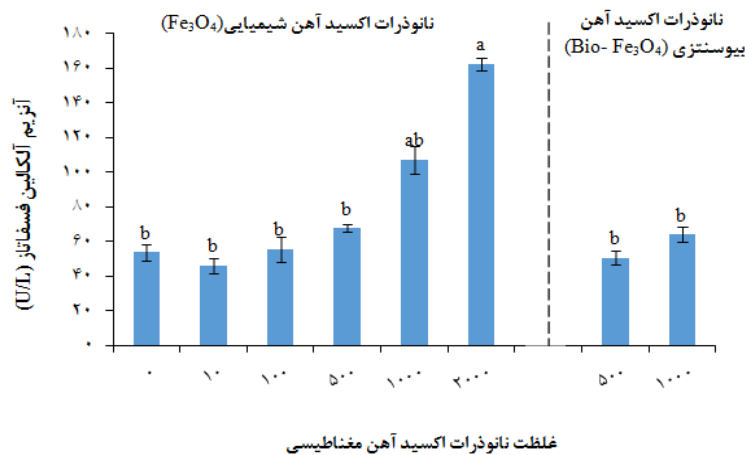
شکل ۳: انواع مختلف گلبول‌های سفید در گسترش خونی بچه‌ماهیان کپور معمولی پس از مواجهه حاد با نانوذرات اکسید آهن. Eo: اتوزینوفیل؛ Neu: نوتروفیل؛ Lym: لنفوسیت و لنفوسیت فعال (حالتی که هسته لنفوسیت از سیتوپلاسم فاصله گرفته است)؛ Dc: سلول‌های دندریتی (Dendritic Cell). Mon: مونوسیت و مونوسیت‌های فعال (سلول‌های دندریتی)؛ Mn: گلبول‌های قرمز با ناهنجاری‌های هسته مانند میکرونوکلئوس (Micronucleus). BEr: گلبول‌های قرمز دارای نقاط بازوفیلی (Basophilic Stippling)؛ Thro: پلاکت‌ها یا ترومبوبلاست. Bas: بازوفیل؛ DEr: گلبول‌های قرمز در حال مرگ (Dead Erythrocyte).

مواجهه حاد و با افزایش غلظت نانوذرات Fe_3O_4 شیمیایی و بیوسنتزی افزایش یافت ولی اختلاف میزان گلوکز در گروه تیمار با گروه شاهد معنی‌دار نبود. آنزیم ALP به استثنای غلظت 2000 mg/L در سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری در میزان این آنزیم در ماهیان قرار گرفته در معرض نانوذرات اکسید آهن و گروه مشاهده نشد ($P > 0.05$ ؛ شکل‌های ۴ و ۵).

نرخ تولید ROS و آنیون‌های سوپراکسید نیز طی فرآیند انفجار تنفسی (NBT) با افزایش غلظت نانوذرات Fe_3O_4 شیمیایی و بیوسنتزی روند افزایشی را نشان داد و در غلظت‌های بالاتر از 100 mg/L اختلاف آن با گروه شاهد معنی‌دار بود ($P < 0.05$ ؛ جدول ۱). در ارتباط با تغییر شاخص‌های بیوشیمیایی، میزان گلوکز و آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) سرم خون در



شکل ۴: مقایسه میزان گلوکز (میلی گرم در دسی لیتر) در سرم خون بچه ماهیان کپور معمولی پس از مواجهه با غلظت‌های مختلف از نانوذرات اکسید آهن شیمیایی (Fe_3O_4) و بیوسنتزی ($Bio-Fe_3O_4$) در مقایسه با گروه شاهد در طول یک بازه زمانی ۹۶ ساعته (میانگین \pm خطای استاندارد). حروف غیرمشابه اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف و گروه شاهد را نشان می‌دهند.



شکل ۵: مقایسه میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز (واحد در لیتر) در سرم خون بچه ماهیان کپور معمولی پس از مواجهه با غلظت‌های مختلف از نانوذرات اکسید آهن شیمیایی (Fe_3O_4) و بیوسنتزی ($Bio-Fe_3O_4$) در

مقایسه با گروه شاهد در طول یک بازه زمانی ۹۶ ساعته (میانگین \pm خطای استاندارد). حروف غیرمشابه اختلاف معنی دار بین تیمارهای مختلف و گروه شاهد را نشان می دهند.

در ارزیابی کارآمدترین نشانگر در مطالعه حاضر، نتایج آماری نشان داد که رابطه همبستگی معنی دار و مثبتی بین شاخص‌ها و غلظت‌های مختلف نانوذرات مگنتیت شیمیایی به ترتیب در شاخص‌های هماتوکریت (P<۰/۰۰۰۰۱، $r_c=۰/۸۸۹$)، هموگلوبین RBC (P<۰/۰۰۰۰۱، $r_c=۰/۸۰۴$)، WBC (P<۰/۰۰۰۰۱، $r_c=۰/۹۵۲$)، گلوکز (P<۰/۰۰۱، $r_c=۰/۵۹۲$)، آنزیم آلفالین فسفاتاز (P<۰/۰۰۱، $r_c=۰/۷۴۴$) و رابطه همبستگی معنی دار و منفی نیز در شاخص‌های MCV (P<۰/۰۰۰۰۱، $r_c= -۰/۸۴۷$) و MCH (P=۰/۰۱۱، $r_c= -۰/۵۸۲$) مشاهده شد. ولی رابطه همبستگی در شاخص MCHC (P=۰/۰۰۵، $r_b=۰/۸۳۵$)، هموگلوبین RBC (P=۰/۰۲۳، $r_b=۰/۷۳۹$)، آنزیم آلفالین فسفاتاز (P=۰/۰۰۵، $r_b= -۰/۸۳۸$)، گلوکز (P=۰/۰۹۵، $r_b= -۰/۵۸۹$)، آنزیم آلفالین فسفاتاز (P=۰/۱۶۸، $r_b=۰/۵۰۲$)، WBC (P=۰/۸۹۷، $r_b=۰/۲۱۶$) و MCHC (P=۰/۰۰۶، $r_b=۰/۹۸۲$) معنی دار و مثبت و در شاخص‌های MCV (P=۰/۰۰۵، $r_b= -۰/۸۳۸$) معنی دار و منفی بود و در شاخص‌های MCHC (P=۰/۰۹۵، $r_b= -۰/۵۸۹$)، گلوکز (P=۰/۱۶۸، $r_b=۰/۵۰۲$)، آنزیم آلفالین فسفاتاز (P=۰/۲۱۶، $r_b=۰/۴۵۷$) و WBC (P=۰/۸۹۷، $r_b=۰/۲۱۶$) معنی داری نبود. از این رو بنا بر نتایج ارائه شده، شاخص RBC بالاترین میزان همبستگی را با غلظت نانوذرات شیمیایی و بیوسنتزی نشان داد.

بحث

از منظر نانوبوم سم‌شناسی، مطالعه حاضر در تایید مطالعات پیشین مبنی بر فقدان اثرات سمیت حاد نانوذرات مگنتیت بر رده سلولی Watanabe et) in vitro A549 در شرایط (al., 2013) و عدم سمیت نانوذرات هماتیت Fe_2O_3 در شرایط in vivo بر ماهیانی چون کپور هندی Saravanan et) *Labeo rohita* (al., 2015) و ماهی گورخری *Danio rerio* (Caceres-Velez et al., 2016) نشان داد که نانوذرات شیمیایی اکسید آهن (Fe_3O_4) و

2- Pearson Correlation in Chemogenic Fe_3O_4 NPs
3- Pearson Correlation in Biogenic Fe_3O_4 NPs

WBC می‌توانند نشانگرهای قدرتمندی در سنجش توان آلودگی‌زایی آلاینده‌های فلزی در آبزیانی چون ماهیان باشند (Remya et al., 2015). در این راستا در مطالعه حاضر ارزیابی پاسخ‌ها و نشانگرهای فیزیولوژیکی، خون‌شناسی و ایمنی ماهیان کپور معمولی در پاسخ به استرس حاد مواجهه با نانوذرات شیمیایی و بیوسنتزی مگنتیت هدف‌گیری شد تا بتوان تحلیل کارشناسانه‌تری را در ارتباط با بحث سلامت نانوذرات مگنتیت و توان تحمل و یا حذف پیامدهای سمیت آن‌ها در ماهیان ارائه کرد.

نتایج به دست آمده از تغییرات هموگرام^۴ (خون‌نگاره) بچه‌ماهی کپور معمولی در پژوهش حاضر در تایید یافته‌های اخیر مبنی بر تاثیر معنی‌دار استرس ناشی از مواجهه حاد (۹۶ ساعته) با نانوذرات Fe_2O_3 شیمیایی و بیوسنتز شده از نشاسته سیب‌زمینی بر تغییر شاخص‌های خونی به ترتیب در ماهیان کپور هندی (*L. rohita*, Saravanan et al., 2015) و تیلاپیای موزامبیک (*Oreochromis mossambicus*, Karthikeyeni et al., 2013) بود. در بچه‌ماهیان کپور معمولی نیز میزان هماتوکریت، هموگلوبین و تعداد کل

نیز نانوذرات اکسید آهن بیوسنتز شده با استفاده از عصاره آبی جلبکی *U. prolifera* (Bio- Fe_3O_4) حتی در بالاترین غلظت‌ها ($2000-1000$ mg/L) فاقد اثرات سمیت حاد بر بقای بچه‌ماهیان کپور معمولی بود (تلفات کمتر از ۱۰٪). از این رو، با توجه به دسته‌بندی ارائه شده توسط سازمان ملل متحده آمریکا مبنی بر این که چنانچه ماده‌ای در ماهیان واجد سمیت حاد با غلظت کشنده میانی LC_{50} ۹۶h بیشتر از 100 mg/L باشد، جز مواد غیر سمی تلقی می‌شود (UN, 2009)، می‌توان هر دو نوع شیمیایی و بیوسنتزی نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی را جز گروه آلاینده‌های غیرسمی دسته‌بندی کرد. با این وجود، شواهد علمی بسیاری اذعان می‌دارند که ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی برخی نانوذرات تولید شده به روش شیمیایی می‌تواند بر نرخ دسترسی زیستی و پتانسیل سمیت آن‌ها اثرگذار باشد (Nel et al., 2006) و مشاهده عدم سمیت در سطح حیات کلی جاندار نمی‌تواند تاییدی بر نبود پتانسیل‌هایی از سمیت در سطح سلولی-مولکولی و پاسخ‌های فیزیولوژیک آن باشد. به علاوه گزارش‌های اخیر به روشنی نشان داده‌اند که وقوع تغییرات در پروفایل خون‌شناسی و شاخص‌های خونی مانند Hb، PCV، RBC و

4- Hemogram

ناهنجاری‌های گلبول‌های قرمز مانند گلبول‌های قرمز بیش از حد متورم (تغییر در اسمولاریته غشا گلبول قرمز)، باریک و فعال شده (Claver and Quaglia, 2009)، تکه تکه و یا در فاز مرگ، دارای ناهنجاری‌های هسته‌ای (ناشی از نقص در رشته‌های دوک در طول مرحله آنافاز میتوز) و یا حامل نقاط بازوفیلی در فضای سیتوپلاسمی (نشانگان استرس در گلبول‌های قرمز) مشاهده شد. Svobodova و همکاران (۱۹۹۴)، نیز بیان می‌دارند که از جمله تغییرات مرسوم در هموگرام ماهیان در شرایط استرس حاد یا مزمن، افزایش شمار گلبول‌های قرمز، غلظت هموگلوبین و هماتوکریت است. زیرا یکی از پاسخ‌های فیزیولوژیک ماهیان به افزایش مطالبات سوخت و سازی در شرایط استرسی، افزایش غلظت هموگلوبین، هماتوکریت و افزایش ظرفیت حمل اکسیژنی خون به منظور ارتقا نرخ اکسیژن‌رسانی به اندام‌های اصلی مانند آبشش و کبد است (Dobsikova et al., 2009; Saravanan et al., 2015). رضایی و همکاران (۱۳۹۳) نیز گزارش کردند که تزریق درون صفاقی نانوذرات اکسید آهن در غلظت‌های ۰/۰۰۳، ۰/۰۰۶ و ۰/۰۱۱ mg/L توانست در یک بازه زمانی ۱۶۸ ساعته افزایش معنی‌دار تعداد گلبول‌های قرمز

گلبول‌های قرمز در خون پس از مواجهه حاد با نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی شیمیایی (Fe_3O_4) و بیوسنتزی ($Bio-Fe_3O_4$) طی یک روندی تابع غلظت افزایش یافته بود (جدول ۱). هماتوکریت از جمله شاخص‌های مهم در بررسی روند تغییرات گلبول‌های قرمز است. میزان هموگلوبین نیز تا حدی تحت تاثیر پدیده‌هایی مانند غلیظ و یا رقیق شدن خون در زمان مواجهه ماهیان با عوامل استرس‌زا است. از طرفی مشاهده روند صعودی تغییر میزان و غلظت هموگلوبین و نیز هماتوکریت خود نشانی از وقوع تغییراتی در خون مانند کاهش حجم پلاسما، تورم گلبول‌های قرمز و نیز تولید و رهایش تعداد بیشتری از گلبول‌های قرمز به خون توسط بافت‌های خون‌ساز است (Benfey and Biron, 2000). به علاوه، بنا بر نتایج ارائه شده در مطالعه حاضر، در غلظت‌های بالای تیمار حاد نانوذرات مگنتیت شیمیایی، تحت تاثیر استرس وقوع تغییراتی نیز در ریخت‌شناسی گلبول‌های قرمز مانند تغییر در میزان هموگلوبین و تیرگی گلبولی که می‌تواند متاثر از نفوذ نانوذرات Fe_3O_4 به خون، نقش و اهمیت آهن در ساختار هموپروتئین‌ها، تشکیل و تجمع بیشتر هموگلوبین در گلبول‌های قرمز باشد. افزایش نرخ

بخش‌های پورفیرینی، القای ناپایداری در زیرواحدهای هموگلوبین و ایجاد تمایل به تغییر از وضعیت داکسی به اُکسی هموگلوبین است (Crichton, 2009). از این رو، این احتمال می‌رود که مواجهه حاد با نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی و افزایش میزان دسترسی گلبول‌های خونی ماهیان به ذرات آهن آن هم در مقیاس نانو به نوعی در تحریک بافت‌های خون‌ساز به تولید تعداد بیشتر گلبول‌های قرمز و بهره‌گیری از این نانوذرات آهن در بخش هم و افزایش غلظت هموگلوبین و هماتوکریت و نیز ترغیب واکنش‌های اکسایشی سلولی اثرگذار باشد. به علاوه اگرچه آهن یک عنصر غذایی ضروری و کم‌مصرف برای جانوران و گیاهان است و جز عوامل محدود کننده رشد محسوب می‌شود که می‌تواند در واکنش‌های غیرآلی شیمیایی-زیستی با اکسیژن واکنش دهد و نقش دهنده و گیرنده الکترون را در بسیاری واکنش‌های سلولی به ویژه در زنجیره‌های انتقال الکترون فتوسنتز (به علت حضور آهن و مس در سیتوکروم اکسیداز) و تنفس ایفا کند، اما تجمع بیش از حد آن درون سلول می‌تواند منجر به اثرات سمیت سلولی و استرس اکسیداتیو شود (Connolly and Guerinet, 2008).

در خون ماهی کپور معمولی را تا غلظت 0.06 mg/L در پی داشته، راهکاری برای درمان کم خونی در ماهیان باشد. اما در غلظت های بالاتر چون 0.1 mg/L اثرات سمی و کاهشی بر RBC را نشان داد. Xiaoshan و همکاران در سال ۲۰۰۸ نیز با ارزیابی اثرات سمیت نانوذرات اکسید آهن بدون پوشش هماتیت ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) بر مراحل اولیه حیات (ELS)^۵ ماهی گورخری *D. rerio* نشان دادند که غلظت‌های $\geq 10 \text{ mg/L}$ نانوذرات Fe_2O_3 محرک اثرات سمیت در مراحل نمو جنینی است و می‌تواند منجر به مرگ و میر، تاخیر در تخم‌گذاری و بدشکلی‌های جنینی شود و از منظر شاخص‌های خون‌شناسی نیز افزایش تعداد گلبول‌های قرمز و پرخونی در بالغین را در پی دارد.

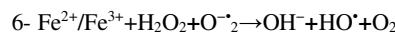
آهن به عنوان یک عنصر متابولیک قادر است با اتم‌های نیتروژن در مولکول‌های پورفیرین (بخش هم) باند شود و در ساختار پروتئین‌های آهن‌دار موسوم به هموپروتئین‌ها (مانند هموگلوبین و میوگلوبین) در اتصال با اکسیژن و در امر اکسیژن‌رسانی به بافت‌ها مشارکت کند. به علاوه اندازه ذرات آهن کلیدی‌ترین عامل در نرخ اتصال آن‌ها به

5- Early Life Stage

گلبول‌های قرمز (افزایش تعداد گلبول‌های قرمز اعم از طبیعی و غیر طبیعی، در مخرج کسر و در نتیجه کاهش عددی شاخص) باشد نه کم خونی. زیرا از نقطه نظر کینتیکی نرخ جایگزینی گلبول‌های قرمز ماهیان بسته به گونه دارای یک طیف زمانی از ۵۰۰-۸۰ روز (Fischer et al., 1998) و زمان بلوغ آن ۱۷ تا ۲۳ روز است (Dinnen et al., 1987)، اما در شرایط استرس حاد و تغییر در متابولیسم ماهی این بازه زمانی می‌تواند تغییر کند و بنا بر نتایج ارائه شده روند تولید و جایگزینی گلبول‌های قرمز طی مواجهه حاد با نانوذرات مگنتیت به شدت تسریع شده، در طول ۹۶ ساعت حتی به مرز ۴ میلیون در تیمار ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ mg/L از نانوذرات Fe₃O₄ شیمیایی رسید که بسیار غیرطبیعی و نادر است. به علاوه تولید نرخ بالای ROS و رادیکال‌های آزاد و در نتیجه افزایش نرخ آسیب به سلول‌های خونی، افزایش تعداد گلبول‌های قرمز با تنوعی از ناهنجاری‌های هسته‌ای-سیتوپلاسمی، افزایش تعداد گلبول‌های قرمز فعال یا حامل نقاط بازوفیلی و یا بسیار متورم، تکه تکه، در حال تقسیم یا در فاز مرگ را نیز به همراه داشت (شکل ۳). یافته‌های مطالعه حاضر در روند افزایشی تولید ROS و

زیرا آهن آزاد در واکنش Fenton^۶ به عنوان یک کاتالیزور عمل می‌کند و تولید رادیکال‌های آزاد مانند رادیکال هیدروکسیل و گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را افزایش می‌دهد (Crichton, 2009). این رادیکال‌های تولید شده بسیار فعال و مخرب هستند و تخریب لپیدها، پروتئین‌ها، DNA و در نهایت مرگ سلولی را به دنبال خواهند داشت.

در مطالعه حاضر، حجم متوسط گلبول قرمز (MCV) و مقدار متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز (MCH) در مواجهه حاد با افزایش غلظت نانوذرات اکسید آهن شیمیایی و بیوسنتزی روند کاهشی را نشان داد، ولی روند تغییرات غلظت متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز (MCHC) افزایشی بود (جدول ۱). بنا بر گزارش‌های ارائه شده کاهش میزان MCV و MCH در ماهیان معمولاً ناشی از کم خونی است (Saravanan et al., 2015)، اما بنا بر یافته‌های پژوهش حاضر به نظر می‌رسد کاهش این دو شاخص در کپور ماهیان در مواجهه حاد با نانوذرات اکسید آهن شیمیایی و بیوسنتزی بیشتر متوجه نقش متابولیکی آهن و تاثیر آن در القای تولید تعداد بسیار بیشتری از



جریان الکترونی زنجیره‌های تنفسی، القای تولید ROS، و نهایتاً آپوپتوز می‌شود که این امر نیز ممانعت از ساخت ATP، مصرف انبوه NAD و نهایتاً فروپاشی ATP سلولی را شدت می‌بخشد (Lapresta-Fernandez et al., 2012). از این رو در شرایط استرس حاد مواجهه با نانوذرات، محدوده طول عمر گلبول‌های قرمز نسبتاً کوتاه‌تر شده، سرعت تخریب آن‌ها بالا می‌رود (Guyton and Hall, 2005). از این رو نیاز به تولید بیشتر و جایگزینی سریع‌تر گلبول‌های قرمز در ماهیان افزایش می‌یابد.

در پژوهش حاضر، نتایج به دست آمده نشان داد که تعداد کل گلبول‌های سفید، تعداد نوتروفیل‌ها، مونوسیت‌ها و بازوفیل‌ها طی مواجهه حاد با هر دو نوع نانوذرات اکسید آهن شیمیایی و بیوسنتزی با افزایش غلظت نانوذرات افزایش یافت، ولی تعداد ائوزینوفیل‌ها روند کاهشی را در مقایسه با گروه شاهد نشان داد ($P > 0.05$; جدول ۱). هر چند میزان ائوزینوفیل‌ها در خون ماهیان کلا پایین است و در شرایط طبیعی تنها ۲ تا ۳ درصد از کل گلبول‌های سفید خونی را تشکیل می‌دهند (McDonald and Milligan, 1992).

آنیون‌های سوپراکسید طی فرآیندی موسوم به انفجار تنفسی و به تبعیت از افزایش غلظت نانوذرات مگنتیت شیمیایی و بیوسنتزی در مواجهه حاد ماهیان نیز این فرضیه را مورد تایید قرار داد (جدول ۱). در شرایط استرس، علاوه بر عملکرد آسیب‌رسان ROS، انرژی ماهیان (بر مبنای آدنوزین تری فسفات، ATP) نیز عمدتاً معطوف به بافت‌های متابولیسمی چون کبد می‌شود و برای نگهداری شکل گلبول قرمز، انعطاف‌پذیری و فشار اسمزی آن‌ها انرژی کمتری سوگیری می‌شود (Cheesbrough, 2005). از این رو کمبود ATP به عنوان یکی از نتایج تحمیلی استرس سبب ناتوانی گلبول قرمز در انتقال سدیم اضافی خارج غشای سلولی شده، متعاقباً به همولیز گلبول‌های قرمز منتهی می‌شود (Emelike et al., 2008). با وجود این که بنا بر دانش موجود، مکانیسم عملکرد سمی نانوذرات هنوز ناشناخته است (Valdiglesias et al., 2015)، اما یکی از اصلی‌ترین پیشنهادها مطرح شده در ارتباط با جذب نانوذرات، احتمال ورود آن‌ها به واسطه اندوسیتوز و یا انتشار از خلال غشای سلولی آبشش‌ها در ماهیان است که منجر به ایجاد تداخل در گرادیان الکتروشیمیایی غشا و

استرس از طریق تاثیر بر روی محور هیپوتالاموس-هیپوفیز- فوق کلیه و ترشح هورمون محرک غدد فوق کلیوی و کورتیکواستروئیدها در خون باعث بروز تغییراتی در شاخص های خونی می شوند (Benfey and Biron, 2000) که نشانی از تحریک سیستم ایمنی اختصاصی در بازه کوتاه مدت استرس دارد و به نوعی واکنش دفاعی جاندار در برابر استرس تحمیل شده، است (Saravanan et al., 2015)، مانند کاهش ائوزینوفیل ها که ائوزینوفیلیا^۷ نامیده می شود و یا تحریک ماکروفاژی به عنوان خط نخست سیستم دفاعی بدن جاندار (Ruane et al., 2002). به طور معمول در شرایط استرس، تعداد گلبول های سفید در خون ماهیان افزایش می یابد و منجر به وقوع پدیده لکوسیتوز^۸ می شود (Witeska, 2004). زیرا استرس می تواند محرک مهاجرت گلبول های سفید از قسمت قدامی کلیه به خون نیز باشد (Ortuno et al., 2001). در ارتباط با لنفوسیت ها، داده های به دست آمده در مطالعه حاضر نشان داد که تعداد لنفوسیت ها که با افزایش غلظت نانوذرات اکسید آهن شیمیایی تا غلظت

۵۰۰mg/L و همتای بیوسنتزی آن تا ۱۰۰۰mg/L روند کاهشی داشت، ولی پس از آن با افزایش غلظت نانوذرات شیمیایی تا ۲۰۰۰ mg/L تعداد لنفوسیت ها افزایش یافت و بنا بر مشاهدات میکروسکوپی (شکل ۲) در گروه تیمار با نانوذرات شیمیایی بسیاری از آن ها به شکل لنفوسیت های فعال دیده شدند که نشانی از تحریکات سیستم ایمنی بچه ماهیان کپور معمولی در پاسخ به استرس مواجهه با نانوذرات اکسید آهن است. در ماهیان گاهی تحت تاثیر استرس تعداد گلبول های سفید به ویژه لنفوسیت ها کاهش می یابد (Witeska, 2004; Balabanova et al., 2009). این پدیده که لینفوپنیا^۹ نامیده می شود می تواند تحت تاثیر اثرات ثانویه استرس مرتبط با آزادسازی کاتکول آمین ها باشد، زیرا در شرایط تشدید عوامل استرس زا، کورتیزول پلازما مستقیماً بر لنفوسیت ها اثرات سیتولیتیک^{۱۰} خود را اعمال می کند (Wiik et al., 1989; Engelsma et al., 2003) و یا این کاهش لنفوسیتی می تواند پیامد نفوذ لنفوسیت ها به اپیتلیوم آبشش، پوست و یا روده باشد. Saravanan و همکاران (۲۰۱۵) نیز

9- Lymphopenia
10- Cytolytic

7- Eosinophilia
8- Leucocytosis

نتایج مشابهی را در ارتباط با وقوع لکوسیتوز، لینفوپنیا و نوتروفیلیا گزارش کردند و بیان داشتند که نانوذرات هماتیت Fe_2O_3 حتی در غلظت‌های اندک (1 mg/L) نیز قادر به تاثیرگذاری بر شاخص‌های خونی، بیوشیمیایی، تنظیم یون و شاخص‌های آنزیمی در ماهی کپور هندی بودند.

در ارتباط با تغییر شاخص‌های بیوشیمیایی، میزان گلوکز و آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) سرم خون، روندی افزایشی به تبعیت از غلظت نانوذرات مگنتیت شیمیایی و بیوسنتزی را در خون ماهیان تحت تیمار نشان داد (شکل‌های ۴ و ۵)، به نحوی که میزان گلوکز خون در بالاترین غلظت از تیمار نانوذرات شیمیایی (2000 mg/L) و بیوسنتزی (1000 mg/L) به ترتیب به $94/6 \pm 7/86\text{ mg/dL}$ و $66/3 \pm 3/84\text{ mg/dL}$ رسید و این نتایج با گزارش Saravanan و همکاران (۲۰۱۵) نیز همخوانی داشت. زیرا در ماهیان همچون دیگر جانداران افزایش گلوکز خون نشان از قرارگیری جاندار در شرایط نامساعد و استرسی، وقوع هیپوکسی، تداخل در دریافت اکسیژن تنفسی (به دلیل شدت واکنش‌های فسفوریلاسیون اکسیداتیو در میتوکندری‌ها و کاهش سطح تولید ATP) و گلکونئوژنز سلولی دارد (Kavitha et al., 2012).

بنابراین، افزایش ذخیره انرژی می‌تواند به حیات اندام‌ها برای غلبه و دوام در برابر مطالبات شدید انرژی در شرایط استرس کمک کند (Banaee et al., 2008). با وجود این که آنزیم ALP در تمامی بافت‌های ماهیان از جمله اپیتلیوم مجاری صفراوی، سلول‌های کبدی و نیز مخاط روده و کلیه‌ها تولید می‌شود (Agrahari and Gopal, 2009)، سطح این آنزیم تنها در زمانی که اختلالات، آسیب‌ها و نکروز بافتی کبد، انسداد و یا آسیب اپیتلیوم مجاری صفراوی داخل و خارج کبدی، سیروز و یا آسیب بافتی در روده ماهی رخ دهد، به شدت افزایش می‌یابد. زیرا در چنین شرایطی این آنزیم توسط سلول‌های آسیب دیده تولید و در خون رها می‌شود و سطح آن در سرم خون ارتقا می‌یابد (Banaee et al., 2008).

به علاوه ALP در کبد نقش مهمی را نیز در متابولیسم گلیکوژن ایفا می‌کند و با غیرفعال‌سازی آنزیم‌های فسفوریلاز در زنجیره تنفسی، محرک تولید و تجزیه گلیکوژن کبدی در شرایط استرس است و برای تامین ذخایر انرژی عمل می‌کند (Saha and Kaviraj, 2009). از این رو، وقوع آسیب‌ها و نکروز کبدی در غلظت‌های بالای تیمار حاد در ماهیان مواجه شده با نانوذرات اکسید آهن

تحرکات و تغییر شاخص‌ها در ماهیان تحت تیمار با نانوذرات مگنتیت شیمیایی بسیار بالاتر از ماهیان تحت تیمار با نانوذرات مگنتیت بیوسنتز شده از عصاره جلبک سبز دریایی بود. اگرچه مکانیسم فیتوشیمیایی حقیقی در فراسوی بیوسنتز گیاهی نانوذرات تا حدودی هنوز ناشناخته است، اما به نظر می‌رسد نشست گروه‌های عاملی فیتوشیمیایی گیاهی به شکل یک پوش‌لایه بر سطح نانوذرات که عمدتاً متابولیت‌های ثانویه چون پلی‌فنول‌ها، فلاونوئیدها، آلدهیدها و آمیدها هستند (Das et al., 2016)، می‌تواند در افزایش زیست‌سازگاری و تعدیل سمیت نانوذرات مگنتیت بیوسنتزی برای سلول‌های خونی اثرگذار باشد به علاوه بنا بر داده پتانسیل زتا، مثبت‌تر بودن بار سطحی نانوذرات شیمیایی ($17/2 \pm 6/07 \text{ mV}$) در قیاس با نانوذرات بیوسنتزی مگنتیت ($-35/2 \pm 8/21 \text{ mV}$) می‌تواند منجر به القایی برهم‌کنش الکترومغناطیسی بین نانوذرات مگنتیت شیمیایی (بار مثبت) و غشای سطحی سلولی‌های خونی (بار منفی) شود و اثرات اکسایشی را تشدید کند. حال آن که نشست پوش‌لایه جلبکی بر سطح نانوذرات مگنتیت بیوسنتزی و منفی‌تر شدن بار سطحی آن‌ها

شیمیایی و بیوسنتزی می‌تواند دلیل احتمالی افزایش سطح ALP در سرم خون آن‌ها باشد. نتایج آماری ارائه شده از ارزیابی کارآمدترین نشانگر در مطالعه حاضر نیز نشان داد که شاخص RBC بالاترین میزان همبستگی را با غلظت نانوذرات شیمیایی و بیوسنتزی داشت. از این رو، به عنوان بهترین شاخص در ارزیابی اثرات استرس‌زایی نانوذرات در سطح خون‌شناسی و ایمونوشیمی ماهی کپور معمولی معرفی می‌شود.

در انتها به نظر می‌رسد ماهی کپور معمولی به عنوان یک ارگانیزم شاخص زیستی توانسته است نسبت به اثرات استرس‌زا و آسیب‌رسان نانوذرات اکسید آهن در تمامی سطوح تغییرات هموگرام، بیوشیمیایی و ایمنی ماهی به خوبی پاسخ داده، در پیش‌بینی اثرات زیست‌محیطی آتی نانوذرات در مطالعات نانوبوم‌سم‌شناسی آبزیان بسیار موثر باشد. مقایسه نتایج به دست آمده از اثرات القایی تیمار حاد نانوذرات شیمیایی و بیوسنتزی Fe_3O_4 بر تغییرات شاخص‌های خونی، بیوشیمیایی و ایمنی در ماهی کپور معمولی نشان داد که با وجود این که نانوذرات Fe_3O_4 جز گروه آلاینده‌های غیرسمی محسوب می‌شوند، در بیشتر موارد در غلظت‌های مشابه (500 و 1000 mg/L)، شدت

سبز، کم هزینه و دوستدار محیط زیست، تولید زیستی نانوذرات Fe_3O_4 را جایگزین رویکرد تولید شیمیایی- صنعتی موجود کند و در امر توسعه و تولید نانوذرات با اهداف بوم‌مدیریتی بسترسازی کند.

(Ngenefeme et al., 2013; Yew et al., 2016) تعدیل القای استرس اکسیداتیو را در سلول‌های خونی در پی دارد. از این رو، با اتخاذ فناوری بیوسنتز نانوذرات به ویژه نانوذرات Fe_3O_4 می‌توان طی رویکردی

منابع

- اکسید آهن بر تعداد گلبول‌های قرمز ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). محیط زیست جانوری، ۶(۳): ۲۰۳-۱۹۷.
- Adeleye A.S., Conway J.R., Garner K., Huang Y., Su Y. and Keller A.A. 2016.** Engineered nano-materials for water treatment and remediation: Costs, benefits, and applicability. *Chemical Engineering Journal*, 286: 640–662.
- Agrahari S. and Gopal K. 2009.** Fluctuations of certain biochemical constituents and markers enzymes as a consequence of monocrotophos toxicity in the edible freshwater fish, *Channa punctatus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 94: 5–9.
- Awwad A.M. and Salem N.M. 2012.** A green and facile approach for synthesis of magnetite nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2(6): 208–213.
- Balabanova L.V., Mikryakov D.V. and Mikryakov V.R. 2009.** Response of common carp (*Cyprinus carpio* L.) leucocytes to hormone-induced stress. *Inland Water Biology*, 2(1): 86–88.
- Banaee M., Mirvagefei A.R., Rafei G.R. and Majazi Amiri B. 2008.** Effect of sub-lethal diazinon concentrations on blood plasma biochemistry. *International Journal of Environmental Research*, 2: 189–198.
- Benfey T.C. and Biron M. 2000.** Acute stress response in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Aquaculture*, 184: 167–176.
- Bulte J.W., Douglas T., Witwer B., Zhang S.C., Strable E., Lewis B.K., Zywicke H., Miller B., Van Gelderen P., Moskowitz B.M., Duncan I.D. and Frank J.A. 2001.** Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and in vivo tracking of stem cells. *Nature Biotechnology*, 19: 1141–1147.
- Caceres-Velez P.R., Fascineli M.L., Grisolia C.K., De Oliveira Lima E.C., Sousa M.H., De Moraes P.C. and Bentes De Azevedo R. 2016.** Genotoxic and histopathological biomarkers for assessing the effects of magnetic exfoliated vermiculite and exfoliated vermiculite in *Danio rerio*. *Science of the Total Environment*, 551-552: 228–237.
- رضایی ف.، جمیلی ش.، احتشامی ف.، ماشینچیان مرادی ع. و شهیدیان نامگی م. ۱۳۹۳. بررسی غلظت‌های مختلف نانوذرات

- Cheesbrough M. 2005.** Blood Cell Production. Distinct Laboratory Practice in Tropical Countries. Cambridge University Press, United Kingdom, 464P.
- Chen C., Wooster G.A. and Bowser P.R. 2004.** Comparative blood chemistry and histopathology of tilapia infected with *Vibrio vulnificus* or *Streptococcus iniae* or exposed to carbon tetrachloride, gentamicin or copper sulfate. *Aquaculture*, 239: 421–443.
- Chupani L. Niksirat H. Velisek J. Stara A. Hradilova S. Kolarik J. Panacek A. and Zuskova E. 2018.** Chronic dietary toxicity of zinc oxide nanoparticles in common carp (*Cyprinus carpio* L.): Tissue accumulation and physiological responses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147: 110–116.
- Claver J.A. and Quaglia A.I.E. 2009.** Comparative morphology, development, and function of blood cells in nonmammalian vertebrates. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 18(2): 87–97.
- Connolly E.L. and Guerinot M.L. 2002.** Iron stress in plants. *Genome Biology*, 3(8): 1–4.
- Crichton R. 2009.** Iron Metabolism-From Molecular Mechanisms to Clinical Consequences. John Wiley and Sons, USA. 576P.
- Das R.K., Brar S.K. and Verma M. 2016.** Checking the biocompatibility of plant-derived metallic nanoparticles: Molecular perspectives. *Trends in Biotechnology*, 34(6): 440–449.
- Dinnen R.D., Tomlinson S.M., Hart D., Chopra C. and Hedde J.A. 1987.** Application of micronucleus assay to the peripheral blood cells of the rainbowtrout *Salmo gairdneri*. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences, 1607: 69–78.
- Dobsikova R., Svobodova Z., Blahova J., Modra H. and Velisek J. 2009.** The effect of transport on biochemical and haematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Czech Journal of Animal Science*, 54(11): 510–518.
- Dobson J. 2006.** Gene therapy progress and prospects: Magnetic nanoparticle-based gene delivery. *Gene Therapy*, 13: 283–287.
- Edsall C.C. 1999.** A blood chemistry profile for lake trout. *Journal of Aquatic Animal Health*, 11(1): 81–86.
- Emelike F.O., Odeyenuma C., Jeremiah Z.A. and Obigwe B.U. 2008.** The use of anti-coagulated and defibrinated blood samples for the evaluation of red cell osmotic fragility. *International Journal of Natural and Applied Sciences*, 4(2): 204–208.
- Engelsma M.Y., Hougee S., Nap D., Hofenk M., Rombout J.H., Van**

- Muiswinkel W.B. and Lidy Verburg-Van Kemenade B.M. 2003.** Multiple acute temperature stress affects leukocyte populations and antibody response 517 in common carp, (*Cyprinus carpio* L). *Fish and Shellfish Immunology*, 15: 397–410.
- Feldman B., Zinkl J. and Jain N. 2000.** Schalm's Veterinary Hematology. Lippincott Williams and Wilkins, USA. 1344P.
- Fieiss J.C., Kunkel-Patterson A., Mathias L., Riley L.G., Yancey P.H., Hirano T. and Grau E.G. 2007.** Effects of environmental salinity and temperature on osmoregulatory ability, organic osmolytes, and plasma hormone profiles in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology (A)*, 146: 252–264.
- Fischer U., Ototake M. and Nakanishi T. 1998.** Life span of circulating blood cells in ginbuna crucian carp (*Carassius auratus Langsdorfi*). *Fish and Shellfish Immunology*, 8: 339–349.
- Guyton A.C. and Hall J.E. 2005.** Destruction of red blood cells. Haemolytic anoema. *Medical Physiology*, 10: 388–389.
- Hao L. and Chen L. 2012.** Oxidative stress responses in different organs of carp (*Cyprinus carpio*) with exposure to ZnO nanoparticles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 80: 103–110.
- Hedayati A., Shaluei F. and Jahanbakhshi A. 2012.** Comparison of toxicity responses by water exposure to silver nanoparticles and silver salt in common carp (*Cyprinus carpio*). *Global Veterinaria*, 8(2): 179–184.
- Kalantari K., Mansor B., Ahmad M.B., Shameli K., Hussein M.Z.B., Khandanlou K. and Khanehzaei H. 2014.** Size-controlled synthesis of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles in the layers of montmorillonite. *Journal of Nanomaterials*, 2014: 1–9.
- Karthikeyeni S., Vijayakumar S., Vasanthi S., Ganesh A., Manimegalai M. and Subramanian P.T. 2013.** Biosynthesis of Iron oxide nanoparticles and its haematological effects on fresh water fish *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Academia and Industrial Research*, 1(10): 645–649.
- Kavitha C., Ramesh M., Senthil Kumaran S. and Audhi Lakshmi S. 2012.** Toxicity of moringa oleifera seed extract on some hematological and biochemical profiles in a freshwater fish *Cyprinus carpio*. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64(7-8): 681–687.

- Kharisov B.I., Dias R.H.V., Kharissova O.V., Jimenez-Perez V.M., Perez B.O. and Flores B.M. 2012.** Iron-containing nanomaterials: Synthesis, properties, and environmental applications. *RSC Advances*, 2: 9325–9358.
- Klaine S.J., Koelmans A.A., Horne N., Carley S., Handy R.D., Kapustka L., Nowack B. and Von Der Kammer F. 2012.** Paradigms to assess the environmental impact of manufactured nanomaterials. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(1): 3–14.
- Kunzmann A., Andersson B., Vogt C., Feliu N., Ye F., Gabrielsson S., Toprak M.S., Buerki-Thurnherr T., Laurent S., Vahter M., Krug H., Muhammed M., Scheynius A. and Fadeel B. 2011.** Efficient internalization of silica-coated iron oxide nanoparticles of different sizes by primary human macrophages and dendritic cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 253: 81–93.
- Lapresta-Fernandez A., Fernandez A. and Blasco J. 2012.** Nanoecotoxicity effects of engineered silver and gold nanoparticles in aquatic organisms. *Trends in Analytical Chemistry*, 32: 40–59.
- Laurent S., Forge D., Port M., Roch A., Robic C., Vander Elst L. and Muller R.N. 2008.** Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physico-chemical characterizations, and biological applications. *Chemical Reviews*, 108: 2064–2110.
- Li Q., Mahendra S., Lyon D.Y., Brunet L., Liga M.V., Li D. and Alvarez P.J. 2008.** Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. *Water Research*, 42: 4591–4602.
- Lim C., Klesius P.H., Li M.H. and Robinson E.H. 2000.** Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, hematology, immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge. *Aquaculture*, 185: 313–327.
- Mashjoo S., Yosefzadi M., Alishahi M., Zarei Z. and Azodi M. 2015.** Optimization of biogenic synthesis of magnetic iron oxide (Fe₃O₄) nanoparticles using marine macroalgae from the Persian Gulf. *First Middle East and Central Asia Aquaculture Conference, Iran*. 274P.
- McCormick S.D. 2001.** Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. *American Zoologist*. 41: 781–794.
- McDonald D.G. and Milligan C.L. 1992.** 2 Chemical properties of the blood. *Fish Physiology*, 12: 55–133.
- Morales A.E., Cardenete G., Abellan E. and Garcia-Rejon L. 2005.** Stress related physiological

- responses to handling in common dentex (*Dentex dentex* Linnaeus, 1758). *Aquaculture Research*, 36: 33–40.
- Nadagouda M.N. and Varma R.S. 2009.** Risk reduction via greener synthesis of noble metal nanostructures and nanocomposites. *NATO Science for Peace and Security*, 3: 209–217.
- Nel A., Xia T., Madler L. and Li N. 2006.** Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311: 622–627.
- Ngeneleme F.T.J., Eko N.J., Mbom Y.D., Tantoh Y.N.D. and Rui K.W.M. 2013.** A one pot green synthesis and characterisation of iron oxide-pectin hybrid nanocomposite. *Open Journal of Composite Materials*, 3: 30–37.
- OECD. 1992.** OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test. Organization for Economic Cooperation and Development, France.
- Ortuno J., Esteban M.A. and Meseguer J. 2001.** Effects of short-term crowding stress on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response. *Fish and Shellfish Immunology*, 11: 187–197.
- Pottler M., Staicu A., Zaloga J., Unterweger H., Weigel B., Schreiber E., Hofmann S., Wiest I., Jeschke U., Alexiou C. and Janko C. 2015.** Genotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in granulosa cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 16: 26280–26290.
- Remya A.S., Ramesh M., Saravanan M., Poopal R.K., Bharathi S. and Nataraj D. 2015.** Iron oxide nanoparticles to an Indian major carp, *Labeo rohita*: Impacts on hematology, iono regulation and gill Na^+/K^+ ATPase activity. *Journal of King Saud University-Science*, 27: 151–160.
- Ruane N.M., Carballo E.C. and Komen J. 2002.** Increased stocking density influences the acute physiological stress response of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture Research*, 33: 777–784.
- Saha S. and Kaviraj A. 2009.** Effects of cypermethrin on some biochemical parameters and its amelioration through dietary supplementation of ascorbic acid in freshwater catfish *Heteropneustes fossilis*. *Chemosphere*, 74: 1254–1259.
- Saravanan M., Suganya R., Ramesh M., Poopal R.K.N. and Ponpandian G.N. 2015.** Iron oxide nanoparticles induced alterations in haematological, biochemical and ionoregulatory responses of an Indian major carp *Labeo rohita*. *Journal of Nanoparticle Research*, 17(274): 1–12.

- Silva L.P., Reis I.G. and Bonatto C.C. 2015.** Green synthesis of metal nanoparticles by plants: Current trends and challenges. P: 259–275. In: Basiuk V.A. and Basiuk E.V. (Eds.). *Green Processes for Nanotechnology*. Springer International Publishing, Germany.
- Simonet B.M. and Valcarcel M. 2009.** Monitoring nanoparticles in the environment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393: 17–21.
- Sunderland C.J., Steiert M., Talmadge J.E., Derfus A.M. and Barry S.E. 2006.** Targeted nanoparticles for detecting and treating cancer. *Drug Development*, 67: 70–93.
- Svobodova Z., Vykusova B. and Machova J. 1994.** The effect of pollutants on selected haematological and biochemical parameters in fish. P: 39–52. In: Muller R. and Lloyd R. (Eds.). *Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Fresh-water Fish*. FAO- Fishing News Books. Cambridge, UK.
- Thrall M.A. 2004.** *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Lippincott Williams and Wilkins, USA. 402P.
- UN (United Nation). 2009.** Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). United Nations, New York and Geneva. 568P.
- Uspur U. and Mustafa D.R.C. 2005.** A study on the effects of levamisole on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Walbaum. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 29: 1169–1176.
- Valdiglesias V., Kilic G., Costa C., Fernandez-Bertolez N., Pasaro E., Teixeira J.P. and Laffon B. 2015.** Effects of iron oxide nanoparticles: cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 56(2): 125-148.
- Watanabe M., Yoneda M., Morohashi A., Hori Y., Okamoto D., Sato A., Kurioka D., Nittami T., Hirokawa Y., Shiraishi T., Kazuaki Kawai K., Kasai H. and Totsuka Y. 2013.** Effects of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles on A549 cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 14: 15546–15560.
- Wiik E., Andersen K., Uglenes I. and Egidius E. 1989.** Cortisol-induced increase in susceptibility of Atlantic salmon, *Salmo salar*, to *Vibrio salmonicida*, together with the effects on the blood cell patterns. *Aquaculture*, 83: 201–215.
- Witeska M. 2004.** The effect of toxic chemicals of blood cell morphology

in fish. Fresenius Environmental Bulletin, 13(12): 1379–1384.

Xiaoshan Z., Shengyan T. and Zhonghua C. 2008. Toxicity assessment of iron oxide nanoparticles in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. Journal of Environmental Science and Health, 43: 278–284.

Xu P., Zeng G.M., Huang D.L., Feng C.L., Hu S., Zhao M.H., Lai C., Wei Z., Huang C., Xie G.X. and Liu Z.F. 2012. Use of iron oxide nanomaterials in waste water treatment: A review. Science of the Total Environment, 424: 1–10.

Yew Y.P., Shameli K., Miyake M., Kuwano N., Khairudin N.B.B.A., Mohamad S.E.B. and Lee K.X. 2016. Green synthesis of magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles using seaweed (*Kappaphycus alvarezii*) extract. Nanoscale Research Letters, 11(276): 1–7.

Zhao J., Wang Z., Liu X., Xie X., Zhang K. and Xing B. 2011. Distribution of CuO nanoparticles in juvenile carp (*Cyprinus carpio*) and their potential toxicity. Journal of Hazardous Materials, 197: 304–310.



Induced effects of acute exposure of chemogenic and biosynthetic iron oxide (Fe₃O₄) nanoparticles on alteration of haematological, biochemical and immune indices in common carp (*Cyprinus carpio*)

Sakineh Mashjoor¹, Morteza Yousefzadi^{2*}, Hossein Zolgharnein³, Ehsan Kamrani⁴, Mojtaba Alishahi⁵

Received: November 2017

Accepted: February 2018

Abstract

Based on the various applicants of iron oxide nanoparticles (magnetite, Fe₃O₄-NPs) and their final entrance to aquatic ecosystems, the present study was conducted to investigate impacts of acute exposure (96 hours) of chemogenic Fe₃O₄-NPs (concentrations of 10, 100, 500, 1000, 2000 mg/L) and Bio-Fe₃O₄-NPs (500.1000 mg/L) were biosynthesized by algae *Ulva prolifera* to changes in hematological indices including total and differential count of white blood cells (WBC), red blood cell (RBC) count, hemoglobin, hematocrit, RBC indices including MCV, MCH and MCHC, biochemical parameters including glucose and alkaline phosphatase (ALP), and immune responses including nitroblutterazolium (NBT) test in common carp (*Cyprinus carpio*) (average weight of 10.04±1.83g) compared to the control group (without NPs). The results showed that, despite the no acute toxicity of both types of magnetite nanoparticles in common carp, with increasing concentrations of Fe₃O₄-NPs and Bio-Fe₃O₄-NPs, a significant increase in hematocrit, hemoglobin, RBC, WBC (chemical type), glucose, and ALP, and a significant decrease in MCV and MCH were observed, while RBC was introduced as the most effective marker ($r_c = 0.952$, $r_b = 0.982$, $P < 0.00001$). However, at the same concentrations, the intensity of the changes in the indices in the exposed group to Bio-Fe₃O₄-NPs was lower than Fe₃O₄-NPs, which is probably due to differences in nature, synthesizing method and biocompatibility potential of Bio-Fe₃O₄-NPs.

Key words: *Toxicity, Cyprinus carpio, Magnetite Nanoparticle, Haematological Indices.*

1- Ph.D. in Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, Hormozgan University, Bandar Abbas, Iran.

2- Associate Professor in Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, Hormozgan University, Bandar Abbas, Iran.

3- Associate Professor in Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, Khoramshahr University of Marine Science and Technology, Khoramshahr, Iran.

4- Professor in Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, Hormozgan University, Bandar Abbas, Iran.

5- Professor in Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

*Corresponding Author: morteza110110@gmail.com