Archive of SID

نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۱۳ زمستان ۱۳۹۵

آسیب شناسی نانوذره مس بر بافت کبد و فراسنجه‌های خونی و بیوشیمیایی بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) پیش و پس از یک دوره بازیابی

• **احمد ایمانی**
استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
• **کوروش سروی مغانلو (نویسنده مسئول)**
استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
• **سیران خانی**
دانش آموخته کارشناسی ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: دی ۹۴ تاریخ پذیرش: اسفند ۹۴

Email: k.sarvimoghanlou@urmia.ac.ir

چکیده

امروزه با توجه به رشد سریع و افزایش روز افزون کاربرد نانو ذرات، احتمال ورود این مواد به محیط های آبی و بروز مسمومیت در آبزیان وجـــود دارد. در مطالعه حاضر ۱۳۵ قطعه بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با وزن متوســـط ۳۰ گرم میان ۳ تیمار، در قالب یک طرح کاملا تصادفی دو مرحله‌ای، توزیع شـــدند. طی ۲۱ روز نخست (مرحله اول) ماهیان در معرض غلظت‌های مختلف نانوذره مس شـــامل گروه شـــاهد (بدون نانوذره) ، ppb ۲۵ و ppb ۵۰ قرار گرفتند. در نهایت با هدف بررســـی توانایی بازسازی آســـیب‌های احتمالی، ماهیان مزبور به مدت ۲۱روز دیگر در محیط فاقد نانوذره مس نگهداری شدند. در پایان روزهای ۲۱ و ۴۲ به منظور بررســـی آسیب‌های بافت کبد و فاکتورهای خونی و بیوشـــیمیایی در گروه های مختلف آزمایشی، نمونه‌برداری انجام شد. نتایج بافت شناسی کبد در مرحله اول نشـــان داد که هر دو تیمار حاوی نانو ذره باعث ایجاد آسیب‌هایی همچون پرخونی شدید در ساختار کبد و تخریب سیتوپلاسم شده است. همچنین دژنراسیون سیتوپلاسمی و واکوئلی هپاتوسیت‌های نزدیک به سینوزوئیدها در تیمار دوم رویت گردید. در تیمار سوم نیز نکروز کبدی، التهاب، تورم شدید در ناحیه مجاری صفراوی، کپسول‌ها و ترشحات ناشی از التهاب قابل ملاحظه بود. در مرحله دوم مطالعه نیز آسیب‌های بافتی به میزان کمتری قابل مشاهده بود. نتایج حاکی از وجود تفاوت معنی‌دار ($P<0/05$) در میزان فعالیت آنزیم GGT بود. تعداد گلبول‌های سفید خون بین تیمارهای ۱ و ۳ به طور معنی‌داری متفاوت بود ($P<0/05$). در مرحله دوم مطالعه نیز تعداد گلبول‌های قرمز و هماتوکریت، اختلاف معنی‌داری نشان ندادند ($P>0/05$). جمع بندی نتایج نشان می دهد نانو ذره مس سبب آسیب به بافت کبد بچه ماهیان می گردد که در غلظت های بالا، شـــدت این آسیب ها افزایش می یابد، به نحوی که برخی از این آسیب‌ها حتی پس از اتمام مرحله مواجهه نیز در بافت‌های هدف قابل مشاهده است. پژوهش‌های بیشتر در زمینه سمیت نانومواد می‌تواند در استفاده و دفع هوشیارانه این ترکیبات جهت کاهش و در برخی موارد بازیابی آثار زیان‌بار این ترکیبات در بوم‌سازگان‌های آبی در دستیابی به یک توسعه پایدار موثر باشد.

کلمات کلیدی: نانوتوکسیکولوژی، نکروز کبدی، شاخص‌های بیوشیمیایی سرم، قزل‌آلای رنگین‌کمان

www.SID.ir

Archive of SID

● Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 113 pp: 110-118

Pathology of copper nanoparticles on liver histoarchitecture and haemato-biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings before and after a recovery period

By: Imani, A., Assistant professor of Department of Fisheries, Faculty of Natural Resource, University of Urmia. Urmia, Iran. Sarvi Moghanlo, K., Assistant professor of Department of Fisheries, Faculty of Natural Resource, University of Urmia. Urmia, Iran. and Khani, S., M.Sc. of Fisheries Faculty of Natural Resource, University of Urmia. Urmia, Iran.

Email: k.sarvimoghanlou@urmia.ac.ir

Received: December 2015 Accepted: February 2016

Nowadays due to rapid development and wide applications of nanosized matters, the possibility of their discharge into water bodies and their subsequent toxicity to aquatics are also increased. Total of 135 fingerling rainbow trout with an average weight of 30g were randomly allocated to three treatments in a two-stage completely randomized design experiment. During first 21 days, fish were exposed to three concentrations of the nanoparticles, namely, 0, 25 and 50 ppb. The final post nanoparticle exposure stage was also lasted for 21 days to scrutinize the ability of fish to recover from damage of first stage. Some hematologic, hepatic and biochemical indices of rainbow trout were evaluated at the end of each stage (days 21 and 42). Light microscopic analyses demonstrated cytoplasmic and vacuolated degeneration in hepatocytes enclosed to sinusoids, which were changed to severe hepatic necrosis and inflammatory exudate accumulation. Results from the first stage indicated that GGT was significantly ($P<0.05$) different among treated cases. Remarkable ($P<0.05$) alteration was revealed in WBC amongst experimental groups. At the end of stage, no significant differences were observed regarding the number of red blood cells and hematocrit. In conclusion, it is conceivable that copper nanoparticles can cause noticeable damage to trout physiology which in some cases can exist even after prolonged post exposure recovery periods. An extensive investigation on the nanomaterial toxicity could considerably be helpful through wise application and disposal of engineered nanomaterials to reduce and in some circumstances ameliorate the adverse effects in aquatic ecosystems for the sake of sustainable development.

Key words: Nanotoxicology, Hepatic necrosis, Serum biochemical profile, Rainbow trout

مقدمه

نوآوری های جدید علمی در زمینه نانوذرات مهندسی شده (قطر کمتر از ۱۰۰ نانومتر حداقل در یک بعد) موجب ایجاد برنامه های کاربردی گسترده‌ای در مباحث الکترونیک، مواد شیمیایی، حفاظت از محیط زیست، تصویربرداری پزشکی، تشخیص بیماری، درمان سرطان، ژن درمانی و ... شده است (۶ و ۷). تاکنون بیش از ۴۰۰ نوع محصول مصرفی که فناوری نانو در آنها به کار رفته، تولید شده‌اند و بازار جهانی محصولات بر پایه فناوری نانو رو به افزایش است (۲۱). نانو مواد ممکن است از طریق دستگاه تنفسی، پوست (تماس پوستی) ، دستگاه گوارش (روده) خواسته یا ناخواسته وارد بدن موجودات شوند (۶). با افزایش تعداد و تنوع نانوذرات ساخته شده در محصولات صنعتی و مصرفی، خطر در معرض قرار گرفتن انسان و همچنین یوم سازگان های آبی افزایش می یابد، که ممکن است به یک تهدید جدی برای سلامت انسان و محیط زیست میدل شود (۱۹). مطالعات اولیه نشان می‌دهد که نانوذره‌ها می‌توانند در ستون آب بصورت سوسپانسیون باقی مانده و توسط موجودات آبزی جذب شوند. اطلاعات موجود حاکی از اثر متقابل نانوذره با محیط طبیعی و آثار اکولوژیکی نانوذره‌ها می‌باشد. اثرات سمی نانوذرات نه تنها در باکتری‌ها و ویروس‌ها دیده شده است بلکه در سایر موجودات آبی مانند گونه‌های مختلف جلبک‌ها، زئوپلانکتون‌ها و ماهی‌ها نیز قابل مشاهده می‌باشد (۲۴). با اینکه علوم نانو، هنوز در مراحل اولیه توسعه خود قرار دارد، ذرات و نانوذرات حاصل از مصارف صنعتی در محیط‌ها و منابع آبی شناسایی شده‌اند. با این وجود شناخت کمی از آثار بالقوه‌ی آنها روی سلامت بشر و محیط‌های آبی وجود دارد، که عمدتاً به دلیل مجموعه زیادی از عوامل مختلف مانند اندازه، شکل، پوشش‌های سطح و خواص فیزیکوشیمیایی محیط است. در مواجهه موجودات آبزی با نانوذرات، این مواد به سرعت جذب بدن آن‌ها می‌شوند (۳ و ۴). در اکثر مطالعات نانوتوکسیکولوژی تمرکز اصلی بر تجزیه و تحلیل بیان ژن، مطالعات بافت‌شناسی، تجمع زیستی، فاکتورهای خون‌شناسی و فاکتورهای بیوشیمیایی بوده است (۱۲، ۱۴ و ۱۶). البته اثرات ناشی از حضور یون‌های فلزی در محیط‌های آبی در گونه‌های مختلف ماهیان به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است (۲۸). آلاینده‌های موجود در آب، آثاری نظیر آسیب‌های بافتی، تغییر در رفتار، رشد و تولیدمثل و نشانگرهای زیستی در سطوح ژن،

www.SID.ir

Archive of SID

پروتئین یا آنزیم‌ها، در پی خواهند داشت. نانو ذرات سیستم ایمنی بدن و میزان گلبول‌های خونی را تغییر داده و مواجهه با آن‌ها برای بدن مضر می‌باشد (۱۳). نانو ذرات نیز دارای اثرات سمی بر سلول‌های ماهیان بوده و قابلیت زیست و تکثیر سلول‌های زنده را کاهش می‌دهند. به طور مثال Kovriznych و همکاران در سال ۲۰۱۴ به بررسی سمیت بلند مدت (۳۰ روزه) نانوذرات اکسید نیکل در ماهی گورخری (*Danio rerio*) بالغ پرداختند. یافته‌های حاصل نشان داد که سمیت حاد نانوذرات اکسید نیکل کم است اما تماس دراز مدت با این ترکیب می‌تواند منجر به تجمع آن در بافت شده و سمیت آن را افزایش دهد. همچنین این محققین بیان نمودند که با توجه به استفاده گسترده از نیکل در صنعت، سمیت مزمن نانوذرات اکسید نیکل ممکن است تأثیر منفی بر جمعیت موجودات آبزی و پویایی شبکه‌های غذایی در سازگان‌های آبی داشته باشد (۱۵). Chen و همکاران (۲۰۱۱) اثرات سطوح مختلف اکسید تیتانیوم (TiO_2) را از مرحله تخم تا شنای فعال ماهی گورخری، مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری در میزان لقاح، درصد تخم‌گشایی، بقا و ناهنجاری میان گروه‌های آزمایشی وجود نداشت (۸). Farkas و همکاران (۲۰۱۰) اثر نانو ذرات طلا و نقره را در سلول‌های کبد ماهی قزل‌آلا رنگین کمان مطالعه کردند. نانو ذرات طلا و نقره حتی در غلظت‌های کم اثرات سوء بر سلول‌های کبد ماهی قزل آلا رنگین کمان داشتند (۹). در مطالعه دیگری ماهی قزل‌آلای رنگین کمان به مدت ۸ هفته در معرض ۳، ۳۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر نانوذره نقره قرار گرفت. خونریزی و کاهش اندازه هپاتوسیت‌ها در بافت کبد ماهیان قابل مشاهده بود. همچنین با افزایش غلظت نانوذره نقره میزان پروتئین کل پلاسما به صورت معنی‌داری کاهش یافت (۱۸). مواجهه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان با ۲۰ و ۱۰۰ میکروگرم در لیتر نانوذره مس به مدت ۱۰ روز موجب تخریب بافت کبد با علائمی نظیر هپاتیت و متراکم شدن هسته سلول (Pyknosis) گردید (۲۸). قابل ذکر است که از سطوح پلاسمایی آسپارتات آمینو ترانسفراز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و فسفاتاز قلیایی (ALP) به عنوان شاخص سلامتی کبد استفاده می‌شود (۱۷). سموم موجب افزایش سطوح سرمی آنزیم‌های ALT، AST و ALP خون ماهیان می‌شوند که نشان دهنده آسیب‌های بافتی بویژه در کبد می‌باشد. AST، آنزیم مرتبط با سلول‌های پارانشیم کبد است که در آسیب‌های حاد کبد مطرح می‌باشد. همچنین ALP در سلول‌های پوششی مجاری صفراوی کبد وجود دارد که با تورم و انسداد مجاری صفراوی سطح سرمی آن‌ها افزایش می‌یابد. ALT نوعی آنزیم کبدی است که در زمان آسیب سلولی به خون نشت می‌کند (۲۲). Alishahi و Mesbah (۲۰۱۰) سمیت نانوذرات نقره را در چهار گونه مختلف از ماهیان شامل کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*)، شیربت (*Barbus grypus*)، اسکار (*Astronorus ocellatus*) و سوروم (*Cichlosoma severums*) مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که دو گونه اخیر در برابر نانوذرات نقره مقاومت بیشتری نسبت به دو گونه دیگر دارند. همچنین شیربت (*B. grypus*) به عنوان یک گونه وحشی حساسیت بیشتری نسبت به نانوذره نقره دارد (۲). بنابراین با توجه به اثرات شناخته شده نانوذرات مختلف بر ساختارهای سلولی آبزیان، در ارتباط با چگونگی استفاده از آن‌ها در محیط‌های آبی و همچنین مدیریت دفع پساب‌های آلوده باید توجه و جدیت بیشتری از سوی مراجع زیربط صورت پذیرد که خود مستلزم پژوهش‌های علمی در این زمینه می‌باشد. نگرانی‌هایی در مورد اینکه آیا نانوذرات فلزی خطری مشابه و یا متفاوت با نمک‌های فلزی دارند، در مجامع بین المللی مربوط به حفظ محیط زیست وجود دارد. گردآوری و همچنین افزایش اطلاعات علمی در زمینه سم‌شناسی نانوذرات جهت مدیریت و بهینه نمودن استفاده از این مواد بسیار اهمیت دارد. در همین راستا مطالعه حاضر جهت بررسی صدمات احتمالی ناشی از غلظت‌های مختلف نانوذره مس در بچه ماهیان قزل آلای رنگین کمان و همچنین امکان سنجی توانایی این ماهی در ترمیم و بازیابی فعالیت‌های زیستی خود طرح‌ریزی و اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه نانوذرات مس

نانوذرات مس با استفاده از کاهش شیمیایی نمک فلزی $CuCl_2$ در آب با L – اسید آسکوربیک به عنوان عامل احیا کننده و تثبیت کننده تهیه شد. به طور خلاصه، ۰/۳۴۰۹ گرم $CuCl_2,2H_2O$ و ۷/۰۴۵ گرم L–آسکوربیک اسید به طور جداگانه در ۱۰۰ میلی لیتر آب دی یونیزه حل شده و به مدت ۳۰ دقیقه با دستگاه اولتراسونیک پخش شد. ظرف حاوی محلول آبی $CuCl_2,2H_2O$ با کمک همزن مغناطیسی تا دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد در حمام روغن حرارت داده شد و همزمان با افزودن محلول L– اسید آسکوربیک، نانوذرات مس تهیه گردید. این مخلوط در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان به دست آمدن یک محلول تیره، نگهداری شد. سپس محلول حاصل به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید (۳۱).

تیمارهای مورد بررسی و اجرای آزمایش

ابتدا ۱۳۵ قطعه بچه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان با میانگین وزنی ۳۰ گرم از یکی از مراکز تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی کشور تهیه و به سالن تکثیر و پرورش آبزیان منتقل شد. پس از گذراندن یک هفته دوره قرنطینه و سازش با شرایط جدید، بچه ماهیان با محلول نمک ۳ درصد ضدعفونی شده (۲۶) و در قالب سه تیمار (با سه تکرار برای هر یک از تیمارها) در ۹ مخزن ۹۰ لیتری (که قبلاً با مواد ضد عفونی کننده نظیر هیپوکلریت سدیم کاملاً ضدعفونی شده بودند) حاوی ۴۵ لیتر آب با تراکم ۱۵ قطعه در هر مخزن ذخیره‌سازی شدند. تیمارهای مورد مطالعه شامل تیمار ۱ (فاقد نانو ذره مس به عنوان گروه شاهد)، تیمار ۲ (۲۵ µg/L نانوذره مس) و تیمار ۳ (۵۰µg/L نانو ذره مس) بودند (۲۸). تحقیق حاضر طی ۴۲ روز و در دو دوره ۲۱ روزه انجام گرفت. طی دوره اول تعویض آب به میزان ۸۰درصد در دو نوبت صبح و عصر انجام شد. شایان ذکر است که غلظت نانوذرات با احتساب میزان آب تعویضی مجدداً به سطوح مورد نظر رسانده می‌شد. در این مدت تغذیه ماهیان به صورت یک درصد وزن بدن و پس از تعویض آب صورت گرفت. در پایان روز بیست و یکم از هر تیمار ۶ ماهی به طور تصادفی انتخاب و پس از بیهوشی با پودر گل میخک، خونگیری از آن‌ها انجام شد. جهت بررسی فاکتورهای خونی (نظیر تعداد گلبول‌های سفید در میکرولیتر خون، اندازه‌گیری هماتوکریت، تهیه گسترش خونی برای شمارش تفریقی گلبول‌های سفید و اندازه‌گیری هموگلوبین) از ماده ضد انعقاد EDTA استفاده گردید و از روش‌های استاندارد پیروی شد (۲۹).

www.SID.ir

Archive of SID

در ادامه جهت بررسی توانایی ترمیم و بازیابی شرایط فیزیولوژیکی ماهیان، آزمایش به مدت ۲۱ روز دیگر در آب فاقد نانو ذره مس ادامه یافت و در پایان این دوره مشابه مرحله اول، نمونه‌برداری از ماهیان به منظور مطالعه فاکتورهای خونی و بیوشیمیایی صورت گرفت. برای تهیه سرم، نمونه‌های خون بلافاصله پس از اتمام نمونه‌گیری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ۶۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند و سرم‌های حاصل تا زمان انجام سنجش‌های مربوطه در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۱۱). برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم AST، ALP، GGT و ALT از کیت‌های سنجش این آنزیم‌ها (شرکت پارس آزمون، ایران) استفاده شد. در هر یک از مراحل نمونه‌برداری حداقل ۳ نمونه از بافت کبد ماهیان هر گروه آزمایشی به صورت تصادفی تهیه شد (۱۰). نمونه‌های فوق ابتدا در محلول بوئن شامل ۷۵ درصد اسید پیکریک اشباع، ۲۵ درصد فرمالین و ۵ درصد اسید استیک تثبیت گردیدند. نمونه‌های فوق پس از ۷۲ ساعت به الکل اتانول ۷۰ درصد منتقل و تا زمان انجام مطالعات بافت‌شناسی در محلول مزبور نگهداری شدند. در نهایت پس از قرآوری نمونه‌ها، برش‌های بافتی (۵-۶ µm) تهیه و رنگ‌آمیزی به شیوه H&E صورت گرفت (۲۵).

تجزیه و تحلیل‌های آماری

این آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی ساده اجرا شد. توزیع داده‌ها و همچنین همگنی واریانس گروه‌های آزمایشی به ترتیب با استفاده از آزمون‌های Shapiro-Wilk و Leven's مورد بررسی قرار گرفت و در صورت ضرورت از تبدیل Box-Cox استفاده گردید. برای مقایسه گروه‌های مختلف آزمایشی در هر مرحله آزمایش از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد. جهت بررسی اثر وجود و عدم وجود نانوذره مس در هر یک از مراحل آزمایش روی شاخص‌های بیوشیمیایی خون از مقایسات متعامد (Orthogonal) استفاده گردید (۳۰). سطح معنی داری آزمون‌ها $p \leq ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. برای انجام آنالیزهای آماری از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ استفاده گردید.

نتایج

شاخص‌های بیوشیمیایی خون

نتایج مربوط به سطوح سرمی آنزیم‌های کبدی ماهیان گروه‌های

جدول ۱- فراسنجه‌های بیوشیمیایی پلاسمای ماهیان تیمارهای مختلف (انحراف معیار ± میانگین)

تیمار	ALT	ALP	GGT	AST
مرحله اول آزمایش				
تیمار ۱	۴/۶۳±۲/۲۹	۴۲۷/۳۴±۱۵۳/۰۳	۱۱/۹۷±۵/۲۲[a] *	۴۸/۳۰±۲۷/۵۳
تیمار ۲	۳/۳۱±۲/۲۹	۵۸۵/۶±۳۲۶/۰۹	۴۷/۰۹±۵/۷۱[b]	۴۴/۳۳±۱۱/۲۹
تیمار ۳	۷/۲۸±۵/۷۳	۴۵۰/۳۱±۱۲۷/۰۱	۲۸/۹۵±۲/۳۲[c]	۳۰/۴۴±۱۵/۷۶
مرحله دوم آزمایش				
تیمار ۱	۱۷/۸۷±۹/۹۳	۱۴۷/۹۶±۲۶/۷۸	۱۶/۹۸±۹/۶۴[a]	۵۵/۵۸±۳/۴۴
تیمار ۲	۲۹/۷۸±۲۰/۷۲	۱۹۵/۷۵±۲۷/۱۵	۵۶/۷۴±۵/۳۱[b]	۱۱۹/۱۰±۷۸/۸۸
تیمار ۳	۳۵/۰۷±۲۶/۲۱	۲۰۶/۷۸±۱۴/۵۹	۳۸/۶۰±۷/۸۸b	۴۴/۹۹±۲۱/۱۵

* حروف متفاوت در هر ستون نشانه وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

جدول ۲- مقایسات متعامد فراسنجه‌های بیوشیمیایی پلاسمای ماهیان تیمارهای مختلف (اعداد نشان دهنده P-value هستند)

شاخص	ALP	GGT	AST	ALT
مرحله اول آزمایش	۰/۹۰۳	۰/۰۰۴	۰/۴۸۴	۰/۵۲۲
مرحله دوم آزمایش	۰/۰۲۲	۰/۰۱۵	۰/۶۳۹	۰/۳۲۵

جدول ۳- فراسنجه های سلولی خون ماهیان تیمارهای مختلف در مرحله اول مطالعه (انحراف معیار ± میانگین)

تیمار	هماتوکریت (٪)	تعداد گلبول سفید (µl/ ۱۰۳)	تعداد گلبول قرمز (µl/ ۱۰۶)
تیمار ۱	۲۸/۳۳±۳/۹۳	۲۳/۳۳±۳/۸۰ [a]	۲/۳۳± ۰/۴۵
تیمار ۲	۳۵±۵/۹۵	۲۶/۸۳±۳/۷۶ [ab]	۲/۴۷± ۰/۶۵
تیمار ۳	۲۹±۸/۳۵	۳۲±۵/۸۳ [b]	۳۷۱± ۰/۴۲

* حروف متفاوت در هر ستون نشانه وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

www.SID.ir

Archive of SID

مختلف آزمایشی در مرحله اول و دوم نشان داد که تنها آنزیم GGT میان گروه‌های مختلف از تفاوت آماری معنی دار برخودار بود (جدول ۱، P<۰/۰۵) و سایر آنزیم‌ها فاقد تفاوت معنی دار بودند (P>۰/۰۵). همچنین نتایج مربوط به مقایسات متعامد نشان داد که در مرحله اول آنزیم GGT تفاوت معنی‌داری داشت. همچنین در مرحله دوم آنزیم‌های GGT و ALP از تفاوت معنی‌داری میان گروه‌های مورد مطالعه برخوردار بودند (جدول ۲، P<۰/۰۵).

نتایج فراسنجه‌های خون شناسی

نتایج مربوط به شاخص‌های خونی گروه‌های آزمایشی در انتهای دوره اول پرورش در جدول (۳) آمده است. در این مرحله، تفاوت معنی‌داری از نظر مقدار هماتوکریت و شمارش گلبول‌های قرمز خون میان تیمارهای مختلف مورد مطالعه مشاهده نشد (P>۰/۰۵) ، اما تعداد گلبول‌های سفید خون بین سه تیمارهای یک و سه به طور معنی‌داری متفاوت بود (P<۰/۰۵). شمارش افتراقی گلبول‌های سفید خون در این مرحله نشان داد که تعداد نوتروفیل- هتروفیل و لنفوسیت بین دو تیمار یک و سه با یکدیگر متفاوت بود، به طوری که تعداد نوتروفیل‌ها و لنفوسیت‌ها در تیمار سه بیشتر از تعداد آن‌ها در تیمار یک بود (P <۰/۰۵). تعداد مونوسیت نیز در بین تیمارهای یک و دو تفاوت معنی‌داری داشتند و تعداد آنها در تیمار یک بیشتر از دو تیمار دارای نانو ذره مس بود (جدول ۴، P <۰/۰۵).

نتایج مربوط به شاخص‌های خونی ماهیان آزمایشی در انتهای مرحله دوم مطالعه در جدول (۵) آمده است. در این مرحله تعداد گلبول‌های قرمز و هماتوکریت اختلاف معنی‌داری نشان ندادند (P >۰/۰۵). تعداد گلبول‌های سفید خون در تیمار یک و تیمار دو اختلاف معنی‌داری داشت، به‌طوری که تعداد آن‌ها در تیمار یک و سه بیشترین مقدار و در تیمار دو کم‌ترین مقدار بود. شمارش تفریقی گلبول‌های سفید خون نیز نشان داد که نسبت

جدول۴- شمارش افتراقی گلبول های سفید خون ماهیان تیمارهای مختلف در مرحله اول مطالعه (انحراف معیار ± میانگین)

تیمار	لنفوسیت/نوتروفیل	نوتروفیل- هتروفیل (۱۰^۳/ µl)	لنفوسیت (۱۰^۳/ µl)	موتوسیت (۱۰^۳/ µl)	ائوزینوفیل (۱۰^۳/ µl)	بازوفیل (۱۰^۳/ µl)
تیمار ۱	۰/۱۰± ۰/۰۵	۲± ۰/۹۶[a]	۲۰/۴۰± ۲/۹۳[a]	۰/۵۸± ۰/۳۸[b]	۰/۰۳± ۰/۰۸	۰/۲۷± ۰/۴۵
تیمار ۲	۰/۱۴± ۰/۰۵	۳/۲۷± ۱/۴۰[ab]	۲۳/۳۸± ۲/۵۷[ab]	۰/۰۰± ۰/۰۰ [a]	۰/۰۵± ۰/۱۱	۰/۱۴± ۰/۲۴
تیمار ۳	۰/۱۴± ۰/۰۴	۳/۷۸± ۱/۰۸[b]	۲۷/۷۰± ۵/۸۶[b]	۰/۲۶± ۰/۴۸[ab]	۰/۱۷± ۰/۳۱	۰/۰۹± ۰/۱۴

* حروف متفاوت در هر ستون نشانه وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

جدول۵- فراسنجه‌های سلولی خون ماهیان تیمارهای مختلف در مرحله دوم مطالعه (انحراف معیار ± میانگین)

تیمار	هماتوکریت (٪)	تعداد گلبول سفید (۱۰^۳/ µl)	تعداد گلبول قرمز (۱۰^۶/ µl)
تیمار ۱	۲۹/۳۳± ۱/۸۶	۲۴/۴۲± ۱/۸۶ [b]	۳/۰۷± ۰/۴۵
تیمار ۲	۳۲± ۶/۴۵	۱۷/۱۷± ۱/۹۴ [a]	۲/۴۷± ۰/۳۵
تیمار ۳	۳۸/۰۰± ۴/۷۳	۲۵/۴۰± ۴/۲۳ [b]	۲/۱۷± ۰/۸۵

* حروف متفاوت در هر ستون نشانه وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

جدول۶- شمارش افتراقی گلبول های سفید خون ماهیان تیمارهای مختلف در مرحله دوم مطالعه (انحراف معیار ± میانگین)

تیمار	لنفوسیت/نوتروفیل	نوتروفیل- هتروفیل (۱۰^۳/ µl)	لنفوسیت (۱۰^۳/ µl)	موتوسیت (۱۰^۳/ µl)	ائوزینوفیل (۱۰^۳/ µl)	بازوفیل (۱۰^۳/ µl)
تیمار ۱	۰/۰۶± ۰/۰۴ [a]	۱/۳۷± ۰/۸۸ [a]	۲۲/۹۳± ۱/۶۶[b]	۰/۰۸± ۰/۱۲	۰/۰۴± ۰/۱۰	۰/۰۰± ۰/۰۰
تیمار ۲	۰/۰۶± ۰/۰۳ [a]	۰/۹۰± ۰/۳۷ [a]	۱۶/۱۶± ۲/۱۰ [a]	۰/۰۶± ۰/۰۹	۰/۰۳± ۰/۰۷	۰/۰۲± ۰/۰۶
تیمار ۳	۰/۱۴± ۰/۰۶ [b]	۳/۰۵± ۰/۷۸ [b]	۲۲/۳۵± ۴/۵۱[b]	۰/۱۷± ۰/۲۷	۰/۰۰± ۰/۰۰	۰/۰۰± ۰/۰۰

* حروف متفاوت در هر ستون نشانه وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

www.SID.ir

Archive of SID

نوتروفیل بر لنفوسیت و تعداد نوتروفیل- هتروفیل در تیمار سه به طور معنی‌داری بیشتر از تیمارهای یک و دو بود. کمترین تعداد لنفوسیت نیز در تیمار دو مشاهده شد که از لحاظ آماری با دو تیمار دیگر متفاوت بود (جدول ۶، P<۰/۰۵).

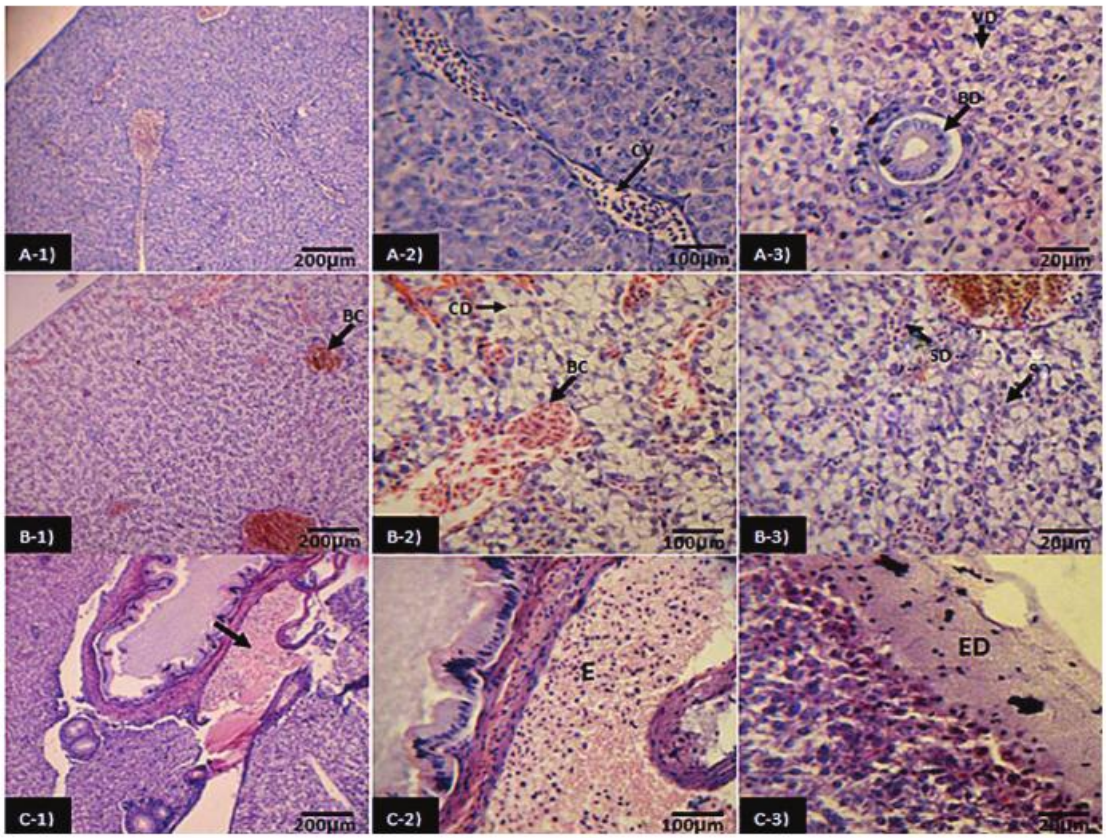
نتایج بررسی‌های بافت‌شناسی کبد

در مرحله نخست آزمایش، بافت کبد ماهیان تیمار اول نشان داد که هپاتوسیت‌ها (سلول های کبدی) حالت طبیعی دارند. بافت کبد ماهیان تیمار دوم حاکی از پرخونی شدید در ساختار کبد و تخریب سیتوپلاسم است. دژنراسیون سیتوپلاسمی نزدیک به سینوزوئیدها منجر به دژنراسیون واکوئلی گردیده است. در تیمار سوم پرخونی شدید (تجمع خون) ، تخریب شدید سیتوپلاسم و نکروز کبدی قابل مشاهده است. التهاب و تورم قابل ملاحظه در ناحیه مجاری صفراوی، کپسول‌ها و ترشحات ناشی از التهاب قابل ملاحظه بود (شکل ۱).

بررسی‌های بافت‌شناسی تیمارهای مختلف در مرحله دوم آزمایش نشان داد که کبد ماهیان تیمار اول شکل طبیعی داشت و هپاتوسیت‌ها دارای سیتوپلاسم دانه‌دار و وریدچه مرکزی طبیعی بودند. در تیمار دوم دژنراسیون عروقی خفیف، به همراه پرخونی در ساختار کبد مشاهده گردید. کبد ماهیان تیمار سوم دارای سلول‌های تک هسته‌ای ملتهب به همراه خیز قابل ملاحظه در اطراف مجاری صفراوی بودند. این در حالی است که مقایسه دو مرحله مطالعه با همدیگر کاهش قابل ملاحظه‌ای را در آسیب‌های بافتی در مرحله دوم مطالعه نشان می‌داد (شکل ۲).

بحث

خون به عنوان یک بافت سیال، یکی از مهم‌ترین مایعات بیولوژیک بدن به شمار می‌رود که ترکیب بیوشیمیایی آن تحت تأثیر حالات مختلف



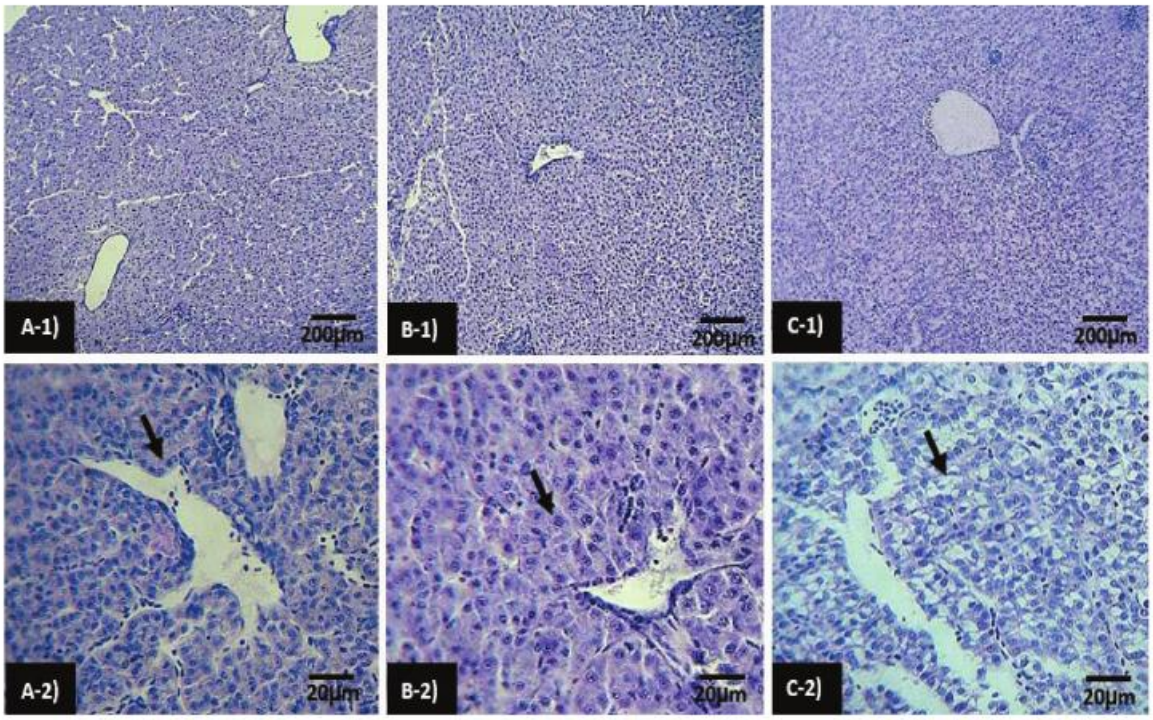
شکل۱- برش عرضی از بافت کبد ماهیان تیمارهای مختلف در مرحله اول مطالعه: A-1 تا A-3 (تیمار ۱ یا گروه شاهد) ، B-1 تا B-3 (تیمار ۲) ، C-1 تا C-3 (تیمار ۳). در گروه شاهد، هپاتوسیت ها با نمای بافت شناختی طبیعی دیده می شوند. وریدچه مرکزی طبیعی و سینوزوئید ها گشاد شدگی عروقی را نشان نمی دهند. این در حالی است که در گروه تیمار ۲ دژنراسیون سیتوپلاسمی، تجمع خونی و گشاد شدگی عروق به وضوح دیده می شود. در برش عرضی از کبد ماهیان تیمار ۳ آسیب های بافتی افزایش قابل ملاحظه ای را نشان می دهند. تجمع اکسودای بافتی (پیکان و E) در کنار مجرای صفراوی نفوذ سلولی های ایمنی در بافت همبندی، ادم و نکروز سلول های کبدی مشاهده می شود. رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین (×۲۰۰، ×۴۰۰ و ×۸۰۰). CV: سیاهرگ مرکزی، BD : مجاری صفراوی، VD: تخریب واکوئلی، BC: تجمع خون، SD: اتساع فضای سینوزوئیدی، E: اگزودا (تراوه) ، ED: خیز.

www.SID.ir

Archive of SID

فیزیولوژیک و پاتولوژیک دستخوش نوسان و تغییر می‌گردد (۱). مهم‌ترین آنزیم‌های تشخیص سلامت کبد، آمینوترانسفرازها هستند. اصولاً این آنزیم‌ها به طور عادی داخل سلول‌های کبدی وجود دارند، ولی اگر به هر دلیلی کبد آسیب ببیند، این آنزیم‌ها وارد جریان خون می‌شوند. با توجه به شدت آسیب، نشت ALT و AST متفاوت خواهد بود. به طوری که در آسیب‌های خفیف ALT درون سیتوپلاسم هپاتوسیت‌ها، به محیط خارج سلولی نشت می‌کند. اما با افزایش جراحت، AST که در اندامک‌های سلولی از قبیل میتوکندری‌ها وجود دارد، به بیرون نشت نموده و وارد جریان خون می‌گردد. ALP نیز یک آنزیم عمومی است و در بافت‌های مختلف وجود دارد. در اثر آسیب‌های کبدی شاهد افزایش این آنزیم در خون خواهیم بود. این آنزیم به همراه آنزیم GGT (گاماگلوتامین ترانسفراز) در غشای سلولی وجود داشته و طی بیماری‌های کبدی از سلول‌های این اندام، آزاد و وارد جریان خون می‌شوند. البته افزایش میزان آنزیم GGT در آسیب‌های اختصاصی‌تر شامل آسیب به مجاری صفراوی دیده می‌شود. با توجه به اختلاف معنی‌دار در مقدار آنزیم GGT در بین تیمارها این گونه به نظر می‌رسد که فعالیت این آنزیم می‌تواند شاخص خوبی برای سنجش اثرات حاصل از نانوذرات در بافت کبد باشد (۱۶). افزایش فعالیت سرمی این آنزیم به آسیب‌های وارد شده به بافت‌های مختلف از جمله بافت کبد باز می‌گردد. چرا که به نظر می‌رسد نانوذره از طریق دستگاه گردش خون به بافت‌های مختلف از جمله کبد وارد شده و موجب تخریب بافت‌ها شده است.

در مطالعه‌ایی، تأثیر نانو ذرات سیلیکات بر بافت کبد موش مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که نانو ذره، سبب افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های سرم (GGT و ALP) شده است (۲۳). که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد. در بررسی تأثیر نانو ذره نقره بر شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون ماهی قزل‌آلای رنگین کمان مشخص گردید که نانو ذره نقره سبب افزایش میزان فعالیت آنزیم ALP شد (۱۸) که همراستا با نتایج تحقیق حاضر می‌باشد. در کنار این موضوع برای ارزیابی دقیق تر روند آسیب‌ها و حصول اطمینان از آسیب‌های بافت کبدی، نمونه‌های کبدی از لحاظ بافت‌شناسی مورد بررسی قرار گرفتند. مشاهدات نشان دادند که میزان آسیب‌های بافتی به شکل وابسته به دوز در گروه‌های مورد مطالعه افزایش یافت: بدین صورت که آسیب‌ها از ادم و دژنراسیون سیتوپلاسمی تا نکروز، التهاب و همچنین



شکل ۲: برش عرضی از بافت کبد ماهیان تیمارهای مختلف در مرحله دوم مطالعه: A-1 تا A-2 (تیمار ۱ یا گروه شاهد)، B-1 تا B-3 (تیمار ۲)، C-1 تا C-3 (تیمار ۳).برش عرضی از گروه شاهد که هیچ گونه تغییر بافت شناختی را از خود نشان نمی دهد. این در حالی است که تیمارهای ۲ و ۳ به ترتیب کاهش قابل ملاحظه ای را در آسیب های بافتی نشان می دهند. تیمار ۲ ترمیم بافتی قابل توجهی داشته است. سلول های کبدی در بزرگنمایی بالاتر حالت طبیعی (پیکان) با سیتوپلاسم ائوزینوفیلی را نشان می دهند. اما در برش عرضی از گروه ۳ می‌توان تخلیه سیتوپلاسمی و دژنراسیون سیتوپلاسمی (پیکان) به همراه ادم ملایم را مشاهده کرد. رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، (×۴۰۰ و×۸۰۰).

www.SID.ir

Archive of SID

ادم بسیار واضح گسترش یافت. نتایج اخیر، تغییرات بیوشیمیایی سرمی را تأیید نمود. این در حالی است که همراستا با تغییرات بیوشیمیایی در دوره بهبودی (دوره دوم مطالعه) میزان آسیب‌های بافتی در سطح معنی‌داری کاهش یافته بود. بنابراین، با توجه به نتایج دوره بهبودی می‌توان انتظار داشت که با از بین رفتن منبع آلودگی و کاهش عوامل استرس‌زا، شرایط ماهی می‌تواند به بهبودی پیش رود. طبق نتایج بدست آمده از این تحقیق تفاوت‌های معنی‌داری در پارامترهای خون‌شناسی (تعداد گلبول‌های سفید خون، تعداد مونوسیت، نوتروفیل و لنفوسیت) در مقایسه با تیمار شاهد در مرحله اول مطالعه در سه تیمار مشاهده گردید. از نظر تعداد گلبول‌های قرمز و هماتوکریت اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد، البته تعداد آن‌ها از تیمار شاهد به سمت دو تیمار نانو ذره کاهش یافته بود که می‌تواند نشان‌دهنده اختلال در میزان خون‌سازی بعلت وجود نانو ذره باشد. با این وجود، Shaw و همکاران (۲۰۱۲) در بررسی تأثیر نانو ذره مس و سولفات مس بر شاخص‌های خونی قزل‌آلای رنگین کمان (به مدت ۱۰ روز با دوز ۲۰ و ۱۰۰ میکروگرم در لیتر) مشاهده کردند که در دوز ۱۰۰ میکروگرم در لیتر نانو ذره مس، هماتوکریت و گلبول‌های قرمز اختلاف معنی‌داری داشتند (۲۸). Mohammadnejad-Shamoushaki و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه‌ایی تاثیر دوزهای مختلف سم دیازینون را به مدت ۴۵ روز بر شاخص‌های خونی مولدین نر ماهی سفید مورد بررسی قرار دادند که نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد سم دیازینون سبب کاهش میزان گلبول‌های سفید، گلبول‌های قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت، حجم متوسط گلبول قرمز و لنفوسیت شد (۲۰). در مطالعه‌ایی که توسط Shaw و همکاران (۲۰۰۹) انجام گردید، تأثیر نانو ذره اکسید تیتانیوم در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان بر شاخص‌های خونی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد هیچ گونه اختلالی در شاخص‌های خونی (گلبول‌های سفید خون، گلبول‌های قرمز خون، هماتوکریت و هموگلوبین) مشاهده نشد (۲۷) که با نتایج تحقیق حاضر (عدم وجود اختلاف معنی‌دار در شاخص‌های گلبول‌های قرمز و هماتوکریت) همخوانی دارد. البته در مطالعه عنوان شده، در میزان گلبول‌های سفید خون اختلافی مشاهده نشد که با نتایج تحقیق حاضر هم‌خوانی ندارد. در مرحله دوم (دوره بهبودی) تعداد گلبول‌های سفید خون تیمار شاهد و تیمار دوم اختلاف معنی‌داری داشتند و تیمار یک و تیمار سه بیشترین مقدار گلبول‌های قرمز را به خود اختصاص دادند. تیمار شاهد و تیمار یک از نظر تعداد نوتروفیل و نسبت نوتروفیل به لنفوسیت اختلاف معنی‌داری داشتند. همچنین نتایج مقایسات متعامد (وجود و عدم وجود نانوذره در محیط) نشان داد که اختلاف معنی‌داری از نظر تعداد گلبول‌های سفید خون، نوتروفیل و نسبت لنفوسیت به نوتروفیل وجود داشت. براساس یافته‌های موجود در این مطالعه و سایر پژوهش‌ها، فاکتورهایی مانند عوامل محیطی (دوره‌ی نوری، تراکم پرورش، درجه حرارت و همچنین غلظت نانوذره) و عوامل فیزیولوژیکی (گونه، سن، جنس و شرایط تغذیه‌ای) زمان نمونه‌گیری و دقت در انجام آنالیزها می‌تواند باعث اختلاف در نتایج بدست آمده شود.

یکی از مهم‌ترین اعمال کبد نقش آن در سم‌زدایی آلاینده‌های محیطی و داروهای شیمیایی است. به طور کلی چندین هزارکارکرد بیوشیمیایی توسط کبد انجام می‌گیرد که تمام این اعمال توسط آنزیم‌ها صورت می‌گیرند. تغییر در میزان این آنزیم‌ها جهت ارزیابی عملکرد کبد مورد استفاده قرار می‌گیرد. بنابراین، کبد به طور وسیع در معرض آسیب‌ها است (۵). بر اساس مطالعه Louei Monfared و Soltani در سال ۲۰۱۳ مشخص شد که نانو ذره نقره سبب پرخونی شدید در ساختار کبد و تخریب سیتوپلاسم می‌شود که با نتایج تحقیق حاضر هم خوانی دارد (۱۸). با توجه به یافته‌های به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که کبد بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت تأثیر نانو ذره مس دچار آسیب‌های شدید بافتی می‌گردد که با وجود حذف نانوذره در مرحله دوم مطالعه، هنوز آسیب‌های بافتی هر چند با شدت کمتر قابل مشاهده بودند. چنین به نظر می‌رسد که نانوذرات با تشدید تولید رادیکال‌های آزاد در حدی فراتر از توان تحمل زیستی یک سازگان زنده موجب بروز آسیب‌های بافتی می‌گردد، که با فراهم آمدن یک دوره بازیابی امکان ترمیم صدمات وارده بر کبد فراهم می‌شود، یافته‌ای که در مطالعات انجام شده روی سایر حیوانات تأیید شده است (۲۳). بنابراین می‌توان چنین بیان نمود که نانو ذرات به دلیل نفوذپذیری بالا و ایجاد آسیب‌های فراوان، باید به طور جدی مورد مطالعات گسترده سم‌شناسی قرار گیرند تا با شناخت آثار پاتولوژیک آن‌ها بتوان از آثار سوء آن‌ها تا حد امکان کاست. علاوه بر این بررسی تغییرات فراسنجه‌های سلولی و بیوشیمیایی خون می‌تواند به عنوان ابزار ساده و مناسبی جهت ارزیابی تأثیر نانوذرات بر ماهی‌ها پیشنهاد می‌شود. با این وجود نباید از شدت آثار وارد بر پیکر حیوان و دست کم حضور طولانی مدت آن در بدن فرد که خود می‌تواند عملکرد زیستی و بوم شناختی حیوان به عنوان جزئی از پدنه عظیم یک سازگان بوم شناختی و سرانجام بقاء گونه‌ای غافل بود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله بخاطر حمایت‌های مالی و معنوی معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه نهایت تشکر و قدردانی خود را اعلام می‌دارد.

منابع مورد استفاده

1- Affonso, E.G., Polez, V.L.P., Correa, C.F., Mazoa, A.F., Araujo, M.R.R. and Moraes, G. 2002. Blood parameters and metabolites in teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 33: 375-382.

2- Alishahi, M. and Mesbah, M. 2010. Comparison of silver nanoparticle's toxicity in four fish species: *Ctenopharyngodon idella, Barbus grypus, Astronorus ocellatus* and *Cichlasoma severums*. *Mar. Biol.*, 7: 45-51. (In Persian).

3- Ates, M., Daniels, J., Arsalan, z. and Farahi, I.O. 2013a. Comparative evaluation of impact of Zn and ZnO on brine shrimp (*Artemia salina*) larvae: effects of particle size and solubility on toxicity. *Roy. Soc. Chem.*, 15: 225-233.

4- Ates, M., Daniels, J., Arsalan, Z. and Farahi, I.O. 2013b. Effects of aqueous suspensions of titanium dioxide nanoparticles on Artemia salina assessment of nanoparticle aggregation, accumulation and toxicity. *Environ. Monit. Assess.*, 85: 3339-3348.

www.SID.ir

Archive of SID

5- Bellentani, S. and Tiribelli, C. 2001. Spectrum of liver disease in the general population: Lessons from the Dionysos study. *J. Hepatol.*, 35: 531–537.

6- Carrola, J., Fernandes, A., Ferreira-Cardoso, J.V., Figueiredo-Fernandes, A., Fontainhas- Fernandes, A., Garcia-Santos, S., Matos, P. and Monteiro, S.M. 2007. Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. *Pesqui. Vet. Bras.*, 27(3) : 103-109.

7- Chen, X. and Schluesener, H.J. 2008. A nanoproduct in medical application. *Toxicol. Lett.*, 176 (1) : 1-12.

8- Chen, J., Dong, X., Xin, Y. And Zhao, M. 2011. Effects of titanium dioxide nano-particles on growth and some histological parameters of zebrafish (*Danio rerio*) after a long-term exposure. *Aquat. Toxicol.*, 101(3-4) :493-499.

9- Farkas, J., Christian, P., Urrea J.A., Roos, N., Hassellöv, M. and Tollefsen K.E. 2010. Effects of silver and gold nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat. Toxicol.*, 96(1) :44-52.

10- Ferraris, R. P., Tan, J. D. and Dela Cruz, M. C. 1987. Development of the digestive tract of Milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal): histology and histochemistry. *Aquaculture*, 61: 241-257.

11- Figueiredo-Silva, A. C., Corraze, G., Kaushik S., Peleteiro, J.B. and Valent, L. M. P. 2010. Modulation of blackspot seabream *(Pagellus bogaraveo)* intermediary metabolic pathways by dispensable amino acids. *Amino Acids*, 39: 1401–1416.

12- Handy, R.D., Al-Bairuty, G., Al-Jubory, A., Ramsden, C.S., Boyle, D., Shaw, B.J. and Henry, T.B. 2011. Effects of manufactured nanomaterials on fishes: a target organ and body systems physiology approach. *J. Fish Biol.*, 79: 821–853.

13- Hussain, S. M., Hess, K. L., Gearhart, J. M. and Geiss, K. T. 2005. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol. in Vitro*, 19(7) : 975–983.

14- Jing, X., Ye, W., Qunji, X. and Xuedong, W. 2011. Synthesis of highly stable dispersions of nanosized copper particles using L-ascorbic acid. *Green Chem,* 13: 900–904.

15- Kovriznych, J. A., Sotnikova, R., Zeljenkova, D., Rollerova, E. and Szabova, E. 2014. Long- term (30 days) toxicity of Nio nanoparticles for adult zebrafish *(Danio rerio)*. *Interdiscip. Toxicol.* 7(1) : 23- 26.

16- Lam, C.W., James, J.T. and McCluskey, R. 2006. A review of carbon nanotube toxicity and assessment of potential occupational and environmental health risks. *Crit. Rev. Toxicol.* 36: 189-217.

17- Longo, D., Fauci, A., Kasper, D., Hauser, S., Jameson, J. and Loscalzo, J. 2012. Harrison's Principles of Internal Medicine. Vol.1&2, 18th Edition, The McGraw-Hill Companies, New York, 2800 pages.

18- Louei Monfared, A. and Soltani, S. 2013. Effects of silver nanoparticles administration on the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): histological and biochemical studies. *European J. Exp. Biol.*, 3(2) : 285-2894.

19- Martirosyan, A., Polet, M., Bazes, A., Sergent, T. and Schneider, Y. J. 2012. Food Nanoparticles and Intestinal Inflammation: A Real Risk? INTECH Open Access Publisher.

20- Mohammadnejad-Shamoushaki., M., Soltani, M., Sharifpour, E. and Imanpour, M. 2011. The Effect of Diazinon on haematological indices of male Caspian kutum (*Rutilus frisii* kutum). J. Vet. Med., 5(16) :23-32 (In Persian).

21- Monteiro-Riviere, N.A. and Tran, C.L. 2007. Nanotoxicology-Characterization, Dosing and Health Effects. Informa Healthcare, New York.

22- Oluwafemi, F. and Taiwo, V.O. 2004. Reversal of toxigenic effects of aflatoxin B ,on cockerels by alcoholic extract of African nutmeg, *Monodora myristica. J. Sci. Food Agriculture,* 84: 330-340.

23- Parveen, A., Rizvi, S. H. M. and Gupta, A. 2012. NMR-Based metabonomics study of sub-acute hepatotoxicity induced by silica nanoparticles in rats after intranasal exposure. *Cell. Mol. Biol.*, 58 (1) : 196-203.

24- Perello, M. and Throck Morton, A., 2013. Effects of direct and dietary exposure to nanoparticle on tritrophic system national confrecean on under graduate, *Research (NCUR)* , 1-8.

25- Pousti, E. and Adibmoradi, M. 2004. "Comparative histology and histotechnique." University of Tehran Press, 519 pages (In Persian).

26- Sattari, M. 2014. Aquatic Animals health and diseases. Haghshenass publication, 736 pages (In Persian).

27- Shaw, B., Handy, R. and Smith, T. 2009. Dietary exposure to titanium dioxide nanoparticles in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*) : no effect on growth, but subtle biochemical disturbances in the brain. *Ecotoxicology*, 18(7) : 939-951.

28- Shaw, B.J., Al-Bairuty, G. and Handy, R. D. 2012. Effects waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): Physiology and accumulation. *Aquat.Toxicol.*, 116: 90– 101.

29- Simmons, A. 1997. Hematology. Simmons and Butterworth Heinemann Medical: 507 pages.

30- Steel, R.G., Torrie, J.H., Dickey, D.A. 1997. Principles and procedures of statistics: A biological approach. McGraw-Hill. 672 pages.

31- Xiong, J., Wang, Y., Xue, Q. and Wu, X. 2011. Synthesis of highly stable dispersions of nanosized copper particles using L-ascorbic acid. *Green Chem.*, 13: 900–904.

www.SID.ir