Archive of SID

Journal of Fisheries Science and Technology
Volume 9, Issue 1, Winter 2020
Pages: 39-49
Type: Original Research

Effect of Copper Sulfate Replacement with Copper Oxide Nanoparticles in Diet on Growth Performance, Enzymatic Activity, and Pathology of Liver Tissue of Goldfish (*Carassius auratus*)

Karimian Kakolaki S.*[1] *MSc*, Shaluei F.[1] *PhD*, Shadkhast M.[2] *PhD*, Arab Markadeh M.[3] *MSc*

[1] Fisheries Sciences Department, Faculty of Natural Resources and Earth Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
[2] Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
[3] Faradaneh Group, Aquatic Animals Feed Producer, Shahrekord, Iran

Abstract

Aims: The purpose of the current study was to investigate the effect of replacement of copper sulfate ($CuSO_4$) with copper oxide nanoparticles (Cu-NPs) in diet on growth and survival, enzymatic activity, and pathology of liver tissue of goldfish in 2018.

Materials & Methods: The five experimental diets were formulated to contain different levels of Cu-NPs (0, 3, 5, and 10mg/kg), 3mg/kg $CuSO_4$. Fish were handfed at 4% body weight at a frequency of two times a day for 60 days. The body was fed manually. At the end of the trial period, growth and survival indices (final weight mean, body weight gain percentage, specific growth rate, status index, liver index, and visceral and survival index), liver enzymes activity (alkaline phosphatase, aspartate transaminase, and alanine aminotransferase), as well as liver tissue pathology, were evaluated.

Findings: Based on the results, using Cu-NPs at different levels of 3, 5, and 10mg/kg diet instead of $CuSO_4$ in the diet can improve the growth performance and survival of goldfish. Copper sulfate also has more negative effects on liver tissue than nanoparticles, as well as alkaline phosphatase, aspartate aminotransferase, and alanine aminotransferase enzymes. Therefore, the replacement of copper sulfate with copper nanoparticles in the diet seems to reduce the negative effects on the aquatics. On the other hand, histopathological results of liver tissue treatment with 5 and 10mg Cu/kg diet showed that Cu nanoparticles cause tissue lesions and deleterious effects (albeit less than copper sulfate).

Conclusion: It is better to replace Copper sulfate with copper nanoparticles at levels of 3mg/kg diet.

Keywords
Nanoparticles
Copper
Copper Sulfate
Enzyme
Histology
Liver
Goldfish (*Carassius auratus*)

*Corresponding Author
Tel: -
Fax: -
Post Address: Faculty of Natural Resources, Shahrekord University, Rahbar Boulevard, Shahrekord, Iran. Postal Code: 8818634141
Soheila_karimian@yahoo.com
Received: December 3, 2019 Accepted: June 26, 2020 ePublished: August 17, 2020

www.SID.ir

Archive of SID

اثر جایگزینی سولفات‌مس با نانواکسیدمس در جیره غذا بر شاخص‌های رشد، فعالیت آنزیمی و آسیب‌شناسی بافت کبد ماهی قرمز (*Carassius auratus*)

سهیلا کریمیان کاکلکی* MSc
گروه شیلات و محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و و علوم زمین، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
فردین شالویی PhD
گروه شیلات و محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و و علوم زمین، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
محمد شادخواست PhD
گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
مهدی عرب مارکده MSc
گروه فرادانه، کارخانه تولید خوراک آبزیان، شهرکرد، ایران

چکیده

هدف: مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر جایگزینی سولفات‌مس با نانواکسیدمس در جیره غذایی بر رشد و بازماندگی، فعالیت آنزیمی و آسیب‌شناسی بافت کبد ماهیان قرمز در سال ۱۳۹۷ انجام شد.

مواد و روش‌ها: پنج رژیم آزمایشی شامل مقادیر متفاوت نانوذرات مس (صفر، ۳، ۵ و ۱۰میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) و ۳میلی‌گرم سولفات مس در کیلوگرم جیره غذایی تنظیم شد. ماهی‌ها طی یک دوره ۶۰روزه، ۲ بار در روز به میزان ۴% وزن بدن و به روش دستی تغذیه شدند. در پایان دوره آزمایشی، شاخص‌های رشد و بازماندگی (میانگین وزن نهایی، درصد افزایش وزن بدن، نرخ رشد ویژه، شاخص وضعیت، شاخص کبدی و شاخص احشایی و بازماندگی)، فعالیت آنزیم‌های کبدی (آلکالین‌فسفاتاز، آسپارتات‌ترانس‌آمیناز و آلانین‌آمینوترانسفراز) و همچنین آسیب‌شناسی بافت کبد مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها: براساس نتایج، استفاده از نانوذرات مس در سطوح مختلف ۳، ۵ و ۱۰میلی‌گرم در کیلوگرم به‌جای سولفات‌مس در جیره غذایی می‌تواند باعث بهبود عملکرد رشد و بازماندگی ماهیان قرمز شود. همچنین سولفات‌مس نسبت به نانوذرات اثرات منفی بیشتری بر بافت کبد و همچنین آنزیم‌های آلکالین‌فسفاتاز، آسپارتات‌آمینوترانسفراز و آلانین‌آمینوترانسفراز دارد. از این رو به نظر می‌رسد جایگزینی سولفات‌مس با نانوذرات مس در جیره غذایی می‌تواند سبب کاهش اثرات منفی بر آبزیان شود. از طرف دیگر نتایج آسیب‌شناسی بافت کبد در تیمار حاوی ۵ و ۱۰میلی‌گرم نانوذره مس در کیلوگرم جیره غذایی نشان داد که نانوذرات مس سبب ایجاد ضایعات بافتی و اثرات مخرب (البته کمتر از سولفات‌مس) می‌شوند.

نتیجه‌گیری: بهتر است جایگزینی سولفات‌مس با نانوذرات مس در سطوح ۳میلی‌گرم در کیلوگرم جیره غذایی باشد.

کلیدواژه‌ها: نانوذرات، مس، سولفات‌مس، آنزیم، بافت‌شناسی، کبد، ماهی قرمز (*Carassius auratus*)

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۹/۱۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۴/۰۶

*نویسنده مسئول: Soheila_karimian@yahoo.com

مقدمه

به‌دنبال افزایش جمعیت و تامین نیاز رو به رشد غذای انسان، استفاده از منابع آبزیان به‌عنوان تامین‌کننده بخشی از نیازهای پروتئینی افزایش یافته است. در این بین ماهی با داشتن میزان قابل توجه ویتامین‌ها، مواد معدنی و اسیدهای چرب امگا۳، در تامین نیازهای غذایی انسان و سلامت قلب، جسم و روان آن نقش ویژه‌ای دارد[1]. امروزه توجه به تولید و پرورش گونه‌های مربوط به آب شیرین افزایش یافته است و براساس پیش‌بینی‌های FAO، به نظر می‌رسد که تقریباً ۶۰% سهم تولیدات آبزی‌پروری را شامل شوند[2]. مطالعه نیازهای غذایی گونه‌های مختلف آبزی سبب پیشرفت در فرمولاسیون جیره‌های غذایی با تعادل مطلوب مواد مغذی برای بهبود میزان رشد ماهیان، افزایش سلامت و کیفیت آنها و نهایتاً موفقیت در پرورش به‌صورت متراکم می‌شود. طی سالیان اخیر مطالعات متعددی به‌منظور بررسی و تعیین جیره غذایی مطلوب تجاری انجام شده است تا بتوان به چنین فرمولاسیون غذایی دست یافت[3]. مواد معدنی از جمله مهم‌ترین اجزای جیره غذایی آبزیان هستند که در تغذیه، فیزیولوژی و حیات اهمیت زیادی دارند[4]. مس یک عنصر حیاتی یا ضروری کمیاب در جیره غذایی حیوانات از جمله ماهی است که نقش مهمی در استخوان‌سازی، تشکیل بافت پیوندی، قلب، سیستم ایمنی، ترمیم بافت‌های آسیب‌دیده دارد[5]. مس در ترکیب آنزیم‌های سیتوکروم‌اکسیداز، تیروزیناز، سوپراکسیددیسموتاز، آمین‌اکسیداز، لیزیل‌اکسیداز و سرولوپلاسمین وجود دارد. همچنین به نظر می‌رسد وجود عنصر مس برای تشکیل رنگدانه ملانین و رنگدانه‌های پوستی ضروری باشد. همچنین این عنصر جزیی از بخش هِم در هموسیانین سخت‌پوستان، کوفاکتور در تیروزیناز و اسیداسکوبیک‌اکسیداز است[6].

غذای تجاری باید میزان مس لازم را در یک فرم بیولوژیکی پرانرژی تامین کند، که این به خواص فیزیکی و شیمیایی فرم مکملی بستگی دارد که به جیره افزوده شده است. میزان نیاز آبزی به مس به شرایط فیزیولوژیکی، نوع گونه، محتوای مس آب و میزان یون‌های روی، کادمیوم، آهن و مولیبدن غذا بستگی دارد که همگی به‌عنوان آنتاگونیست‌های متابولیکی مس است[7]. مس به میزان ۳ تا ۱۱میلی‌گرم در هر کیلوگرم جیره غذایی، عنصری ضروری در خوراک بیشتر گونه‌های آبزی است. به‌کارگیری ۳میلی‌گرم مس در هر کیلوگرم جیره غذایی موجب افزایش رشد ماهی کپور معمولی انگشت‌قد و قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌شود[8]. سولفات‌مس یک ترکیب معدنی متشکل از مس، گوگرد و اکسیژن و مهم‌ترین منبع تامین مس در خوراک دام، طیور و آبزیان است[5]. براساس مطالعات، مس آلی یا مس به فرم نانوذرات در مقایسه با مس معدنی زیست فراهمی بیشتری دارد و اگر اندازه ذرات مولکول‌های بزرگ مس به اندازه ذرات نانو کاهش یابند، مولکول‌های کوچک به‌آسانی می‌توانند از روده جذب شوند و درنتیجه گوارش‌پذیری مس در دستگاه گوارش افزایش می‌یابد. با این وجود، همچنان صنعت خوراک به دلایل توجیه اقتصادی سولفات‌مس را ترجیح می‌دهد[5]. اندازه ذرات نانو به‌طور متوسط در محدوده ۱ تا ۱۰۰نانومتر است. با تغییر اندازه ذرات از میکرومتر به نانومتر که برابر 10^{-9}متر است،

www.SID.ir

Archive of SID

به‌دلیل افزایش نسبت سطح به حجم ذرات، تمام خواص فیزیکی و شیمیایی تغییر می‌کنند و واکنش‌پذیری ذره به‌شدت افزایش می‌یابد[9]. نانوذرات با توجه به خواص منحصربه‌فرد فیزیکی و شیمیایی خود، می‌توانند در مطالعات بیولوژیکی و زیست‌محیطی مورد استفاده قرار گیرند و از این رو توجه دانشمندان و محققان زیادی را به خود جلب کرده‌اند. لازم به ذکر است که انواع نانوذرات همانند نانوذرات مس براساس مقادیر آنها در فرآیندهای زیستی به‌عنوان محرک و یا بازدارنده رشد و ایمنی عمل می‌کنند، بنابراین باید به میزان کاربرد آنها در جیره غذایی و سمیت آنها در آبزیان مختلف توجه ویژه‌ای شود.

رشد به‌عنوان یک هدف مهم در آبزی‌پروری به‌صورت تغییرات قابل توجه در ویژگی‌هایی مثل طول، وزن و حتی میزان انرژی ماهی دیده می‌شود[10]. عوامل بسیاری در فرآیند رشد و کسب انرژی موثر هستند که از مهم‌ترین آنها خوراک و مدیریت تغذیه است[11]. از روابط طول- وزن و شاخص وضعیت به‌عنوان مهم‌ترین پارامترهای زیستی، در بررسی میزان رشد، دسترسی زیستی به منابع غذایی و حتی تفاوت‌های احتمالی بین ذخایر مجزای گونه‌های یکسان، ارزیابی و مدیریت صنعت صید و بهره‌برداری در گونه‌های مختلف استفاده می‌شود[12, 13].

کبد اندام اصلی برای فرآیند سم‌زدایی و تغییر فرم زیستی برخی از ترکیبات است، بنابراین با چنین عملکرد مهمی که بر عهده دارد منبع دریافت بسیاری از سموم و آلاینده‌ها و درنتیجه آسیب‌پذیرترین اندام نسبت به این مواد است. بررسی‌هایی که در زمینه سلامت ماهی انجام می‌شود می‌تواند نشان‌دهنده بروز پیامدهای حاصل از مواد آلاینده و سموم در اکوسیستم‌های آبی باشد[14]. تغییرات ساختمانی و آنزیمی کبد در ارزیابی سلامتی ماهی قابل توجه است و اثرات آلاینده‌های مختلف زیست‌محیطی را نشان می‌دهد[15].

ماهی قرمز (*Carassius auratus*) یک ماهی بسیار مهم از لحاظ اقتصادی و مطالعاتی است. علاوه بر این، گونه بسیار مناسبی برای مطالعات تولیدمثلی، ایمنی‌شناسی، مطالعه فیزیولوژی غدد داخلی، سم‌شناسی و سلولی و مولکولی است، زیرا از اندازه مناسبی برای تحقیقات آزمایشگاهی برخوردار است و همچنین در اندازه کوچک به بلوغ جنسی می‌رسد و لقاح مصنوعی و پرورش لارو نسبتاً آسانی دارد. درواقع از این گونه به‌عنوان مدل برای بررسی کپور ماهی‌ها استفاده می‌شود[16]. با وجود اهمیت اقتصادی ماهی قرمز، اطلاعات زیادی در مورد نیازهای غذایی آن به‌خصوص عناصر ضروری مثل مس و کارآیی انواع آن در این ماهی وجود ندارد. بنابراین، با توجه به محدودبودن اطلاعات در این زمینه، این مطالعه با هدف تعیین اثرات نانوذرات مس در مقایسه با سولفات‌مس بر عملکرد آنزیم‌های کبدی و آسیب‌شناسی بافت کبد در ماهی قرمز انجام شد.

مواد و روش‌ها

مراحل عملی و اجرایی مطالعه در سال ۱۳۹۷ و به‌صورت یک طرح کاملاً تصادفی انجام شد. ماهیان قرمز به تعداد ۱۰۵ قطعه از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان زینتی استان چهارمحال و بختیاری تهیه و به مرکز تحقیقاتی آبزی‌پروری دانشگاه شهرکرد انتقال یافت. ماهیان دارای میانگین طول ۰/۴۳±۵/۸۶سانتی‌متر و میانگین وزن ۰/۶۷±۷/۷۸گرم بودند. دوره سازش‌پذیری ماهیان به شرایط آزمایشگاه، ۱۴ روز بود. طی یک دوره ۶۰روزه، ماهی‌ها دو بار در روز به میزان ۴% وزن بدن و به روش دستی تغذیه شدند. پارامترهای آب با استفاده از دستگاه مولتی‌پارامتر دوکاناله مدل HQ40D (HACH؛ ایالات متحده) اندازه‌گیری شدند و اطلاعات آنها ثبت شد. طی دوره آزمایش، میانگین درجه حرارت آب ۲±۲۰°C، اکسیژن محلول با میانگین ۷میلی‌گرم بر لیتر، سختی آب به میزان ۱۹۰میلی‌گرم بر لیتر کلسیم‌کربنات، pH در حدود ۷/۶ و EC به میزان ۴۵۰میکروزیمنس بر سانتی‌متر بود.

در این مطالعه از یک تیمار شاهد و ۳ غلظت نانواکسیدمس (۳، ۵ و ۱۰میلی‌گرم در کیلوگرم غذا) و غلظت توصیه‌شده سولفات‌مس برای کپور ماهیان به میزان ۳میلی‌گرم در کیلوگرم غذا استفاده[8] و برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. همچنین جیره غذایی پایه براساس نیازهای غذایی ماهی قرمز و مخلوط معدنی فاقد ترکیبات مس به کار برده شد و سولفات‌مس ($CuSO_4.5H_2O$؛ سیگماآلدریچ، ایالات متحده) و نانواکسیدمس (US Research Nanomaterials؛ ایالات متحده) با قطر ۴۰نانومتر با توجه به تیمارهای آزمایشی توزین و با جیره غذایی به‌خوبی مخلوط شدند و در نهایت خمیر حاصل به وسیله چرخ‌گوشت، پلت شد و برای خشک‌کردن، به مدت ۲۴ ساعت در معرض جریان هوا قرار داده شدند. پس از اتمام مرحله ساخت، جیره‌های غذایی تا زمان مصرف در شیشه‌های مخصوص در دمای ۲۰°C- نگهداری شدند. اجزای غذایی مورد استفاده و آنالیز بیوشیمیایی آنها در جدول ۱ آورده شده است. همچنین شکل ۱ تصویر الکترونی نگاره (SEM) و نمودار ۱ طیف پراش اشعه X نانواکسیدمس مورد استفاده را نشان می‌دهد.

به‌منظور بررسی میزان عملکرد رشد ماهیان قرمز، از فرمول‌های زیر استفاده شد[18]:

$$\text{درصد افزایش وزن بدن (WG)} = \frac{\text{وزن ابتدایی} - \text{وزن نهایی}}{\text{وزن ابتدایی}} \times ۱۰۰$$

$$\text{میانگین وزن نهایی بر حسب گرم (FAW)} = \frac{\text{وزن کلی ماهیان در انتهای دوره (گرم)}}{\text{شمار ماهیان در انتهای دوره}}$$

$$\text{نرخ رشد ویژه (SGR)} = \frac{\ln \text{وزن ابتدایی} - \ln \text{وزن نهایی}}{\text{کل روزهای پرورش}} \times ۱۰۰$$

$$\text{درصد بازماندگی (SUR)} = \frac{\text{شمار بچه‌ماهیان انتهای دوره}}{\text{شمار بچه‌ماهیان ابتدای دوره}} \times ۱۰۰$$

$$\text{شاخص کبدی (HIS)} = \frac{\text{وزن کبد (گرم)}}{\text{وزن بدن (گرم)}} \times ۱۰۰$$

$$\text{شاخص وضعیت (CF)} = \frac{\text{وزن بدن (گرم)}}{(\text{طول کل بدن})^3} \times ۱۰۰$$

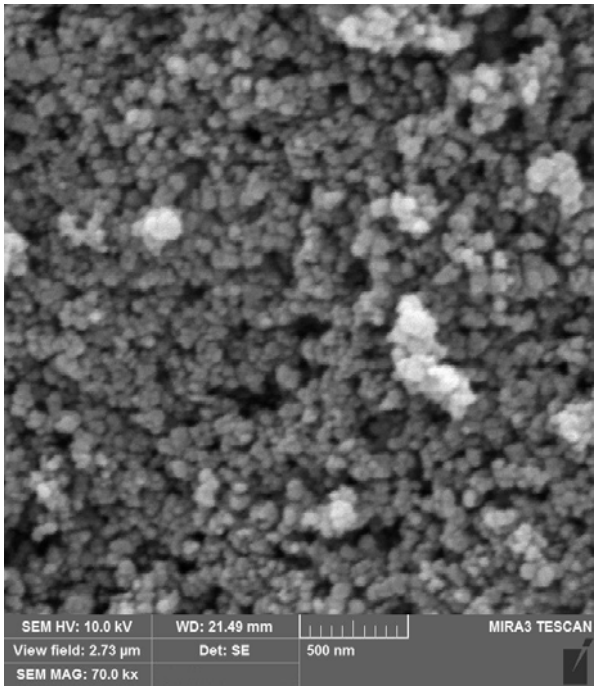
$$\text{شاخص احشایی (VSI)} = \frac{\text{وزن کل دستگاه گوارش (گرم)}}{\text{وزن بدن (گرم)}} \times ۱۰۰$$

www.SID.ir

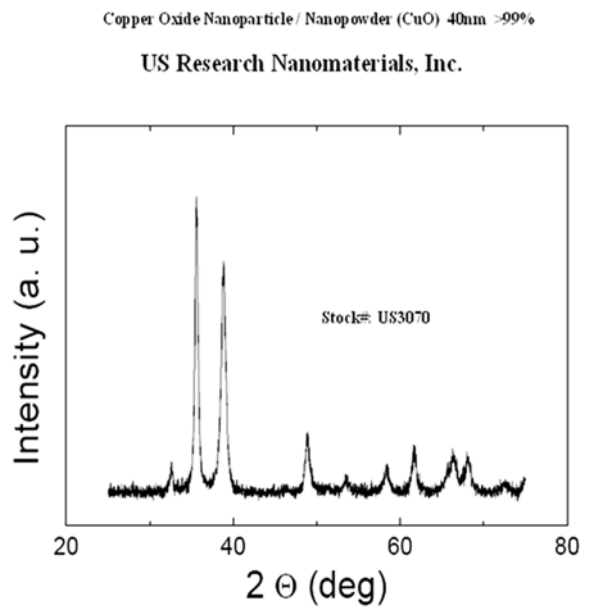
Archive of SID

جدول ۱) اجزای غذایی مورد استفاده و آنالیز بیوشیمیایی جیره‌های غذایی آزمایشی

اجزای غذایی جیره	میزان
اجزای مختلف جیره غذایی (گرم بر کیلوگرم)	
پودر ماهی کیلکای صنعتی	۴۰
پودر ماهی جنوب HP	۴۰
پودر ماهی جنوب LP	۲۰
پودر گوشت	۱۳۰
آرد سویا	۲۴۰
آرد گندم	۱۱۶
آرد کلزا	۱۰۰
گلوتن گندم	۱۲/۵
آرد ذرت	۱۵۰
سبوس گندم	۱۲۵
دی‌کلسیم‌فسفات	۱۰
کربنات‌کلسیم	۴
مخلوط مواد معدنی و ویتامین	۱۲/۵
آنالیز شیمیایی جیره غذایی	
پروتئین خام (درصد)	۳۱/۷۱
پروتئین قابل هضم (درصد)	۲۱/۷۶
چربی خام (درصد)	۶/۹۰
رطوبت (درصد)	۱۱/۴۲
خاکستر (درصد)	۸/۵۳
نشاسته (درصد)	۲۳/۲۵
فیبر (درصد)	۵/۱۷
انرژی خام (کیلوکالری بر کیلوگرم)	۳۴۰۰
انرژی قابل هضم (کیلوکالری بر کیلوگرم)	۲۸۹۰
انرژی قابل متابولیزم (کیلوکالری بر کیلوگرم)	۲۳۸۰
متیونین (درصد)	۰/۶۷
متیونین و سیستئین (درصد)	۱/۰۶
لیزین (درصد)	۱/۹۵
ترئونین (درصد)	۱/۱۷
لوسین (درصد)	۲/۲۸
والین (درصد)	۱/۵۲
آرژنین (درصد)	۲/۰۱
ضریب پروتئین	۵/۴۸
DP/CP (درصد)	۶۰/۵۶
DE/DP (کیلوکالری بر گرم)	۱۳
مواد معدنی جیره غذایی (گرم یا میلی‌گرم بر کیلوگرم) [17]	
فسفر (گرم بر کیلوگرم)	۶-۸
منیزیم (گرم بر کیلوگرم)	۰/۴-۰/۵
آهن (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۱۵۰
روی (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۱۵-۳۰
منگنز (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۱۳
مس (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	متغیر
کبالت (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۰/۱
ویتامین‌های جیره غذایی (میلی‌گرم بر کیلوگرم) [17]	
تیامین	۰/۵
پانتوتنیک‌اسید	۳۰
ریبوفلاوین	۷
پیریدوکسین	۶
نیاسین	۲۸
بیوتین	۱
کولین	۵۰۰
اینوزیتول	۴۴۰
ویتامین A (واحد بین‌المللی)	۴۰۰۰
ویتامین E	۱۰۰
ویتامین C	متغیر



شکل ۱) تصویر الکترونی نگاره (SEM)



نمودار ۱) طیف پراش اشعه X نانوذرات اکسیدمس

برای سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی در پایان ۶۰ روز دوره پرورشی، ۳ قطعه ماهی از هر تکرار (۹ قطعه از هر تیمار) به‌صورت تصادفی انتخاب و به وسیله پودر گل میخک به میزان ۳۰میلی‌گرم بر لیتر بیهوش شدند[19]. ابتدا با استفاده از سرنگ غیرهپارینه (۲میلی‌لیتری) از قلب ماهی خونگیری و به یک میکروتیوب استریل انتقال داده شد و سپس با استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار مدل UNIVERSAL 320R (۳۰۰۰دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه) نمونه‌ها سانتریفیوژ و پس از آن با پی‌پت سرم خون جداسازی و به میکروتیوب ۱میلی‌لیتری انتقال داده شدند[20]. میکروتیوب‌ها در فریزر ۸۰°C- نگهداری و در نهایت برای سنجش فعالیت آنزیم‌های

www.SID.ir

Archive of SID

ALP (آلکالین‌فسفاتاز)، AST (آسپارتات‌ترانس‌آمیناز) و ALT (آلانین‌آمینوترانسفراز) از کیت مربوطه (پارس‌آزمون؛ ایران) و دستگاه اسپکتروفتومتر UV/Vis مدل DR6000 (HACH؛ ایالات متحده) استفاده و میزان فعالیت آنها براساس واحد بر میلی‌گرم پروتئین گزارش شد.

پس از بیهوشی، تشریح سطح شکمی ماهیان و نمونه‌برداری از کبد انجام شد. نمونه‌ها با استفاده از سرم فیزیولوژی شسته و در ظروف حاوی فرمالین ۱۰% بافر (مرک؛ آلمان) قرار داده شدند. برای تثبیت بهتر بافت‌ها بعد از ۲۴ ساعت نمونه‌ها خارج و در ظروف فرمالین جدیدی با همان ترکیب قرار داده شدند. پس از تثبیت‌سازی بقیه مراحل تهیه مقاطع بافتی انجام شد. از نمونه‌ها پس از انجام عملیات معمول بافت‌شناسی مقاطع بافتی به ضخامت ۶میکرون تهیه و سپس به روش معمول رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین انجام شد. در نهایت از لام‌های تهیه‌شده زیر میکروسکوپ نوری Olympus CKX53 (Olympus؛ ژاپن) مجهز به دوربین با بزرگ‌نمایی ۴۰۰X عکس‌برداری شد[21].

پس از بررسی نرمال‌بودن داده‌ها، به‌منظور آنالیز از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه استفاده و وجود تفاوت معنی‌دار در داده‌ها در سطح احتمال $p\leq$۰/۰۵ به کمک پس‌آزمون دانکن، بررسی شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با کمک نرم‌افزار SPSS 19 و رسم نمودارها با استفاده از Excel 2007 انجام شد.

یافته‌ها

نتایج اثرات جایگزینی سولفات‌مس با نانواکسیدمس در جیره بر شاخص‌های رشد و بازماندگی ماهیان قرمز در جدول ۲ آمده است. در انتهای دوره آزمایشی، میزان افزایش وزن بدن بین تیمارهای سولفات‌مس با نانوذره مس ۱۰میلی‌گرم دارای اختلاف معنی‌دار بود ($p<$۰/۰۵) و در سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($p>$۰/۰۵). در میانگین وزن نهایی تیمار سولفات‌مس نسبت به تیمارهای نانوذرات ۵ و ۱۰میلی‌گرم دارای کاهش معنی‌داری بود ($p<$۰/۰۵). بین نرخ رشد ویژه تیمار سولفات‌مس با تیمار نانوذره مس ۱۰میلی‌گرم اختلاف معنی‌دار وجود داشت و نرخ رشد ویژه تیمار سولفات‌مس نسبت به سایر تیمارها کمتر بود ($p<$۰/۰۵). همچنین از نظر بازماندگی تیمار سولفات‌مس نسبت به نانوذره مس ۵میلی‌گرم کاهش معنی‌داری داشت ($p<$۰/۰۵). در مقایسه تیمارها نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری دیده نشد ($p>$۰/۰۵). میزان شاخص وضعیت تیمار سولفات‌مس با تیمارهای نانوذرات ۵ و ۱۰میلی‌گرم دارای کاهش معنی‌دار بود ($p<$۰/۰۵) و با سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار نداشت ($p>$۰/۰۵). در مورد میزان شاخص کبدی و شاخص احشایی، در بین هیچ‌کدام از تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($p>$۰/۰۵).

نتایج اثرات جایگزینی سولفات‌مس با نانواکسیدمس در جیره بر آنزیم‌های کبدی ماهیان قرمز در نمودارهای ۲، ۳ و ۴ آورده شده است. براساس نتایج، فعالیت آنزیم ALP در تیمار سولفات‌مس نسبت به تیمارهای نانوذرات مس و شاهد دارای افزایش معنی‌داری بود ($p<$۰/۰۵) و فعالیت این آنزیم در تیمارهای نانوذرات مس با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت ($p>$۰/۰۵). فعالیت آنزیم AST از لحاظ آماری در تیمارهای نانوذرات اکسیدمس اختلاف معنی‌داری با تیمارهای شاهد و سولفات‌مس داشت ($p<$۰/۰۵) و بین تیمار شاهد و سولفات‌مس اختلاف معنی‌داری دیده نشد ($p>$۰/۰۵). فعالیت آنزیم ALT در تیمارهای نانوذرات نسبت به دو تیمار شاهد و سولفات‌مس افزایش معنی‌داری داشته است ($p<$۰/۰۵). همچنین میان فعالیت آنزیمی ALT تیمار سولفات‌مس با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($p>$۰/۰۵).

نتایج اثرات جایگزینی سولفات‌مس با نانواکسیدمس در جیره بر بافت کبد ماهیان قرمز در جدول ۳ و شکل ۲ نشان داده شده است. براساس نتایج، در تیمار شاهد، کبد دارای اندکی خونریزی و نکروز بافتی بود و به‌طور کلی سلول‌ها به نسبت سالم بودند. در تیمار سولفات‌مس، پرخونی و نکروز شدید و تخریب سلولی مشاهده شد. در مورد تیمار دارای ۳میلی‌گرم بر کیلوگرم نانواکسیدمس، وضعیت کبد تقریباً طبیعی بود ولی اندکی نکروز و پرخونی مشاهده شد. تیمارهای دارای ۵ و ۱۰میلی‌گرم بر کیلوگرم نانواکسیدمس سبب پرخونی و تخریب سلول‌های کبد شدند. البته شدت این آسیب‌ها در تیمار ۱۰میلی‌گرم بر کیلوگرم نانواکسیدمس بیشتر بود.

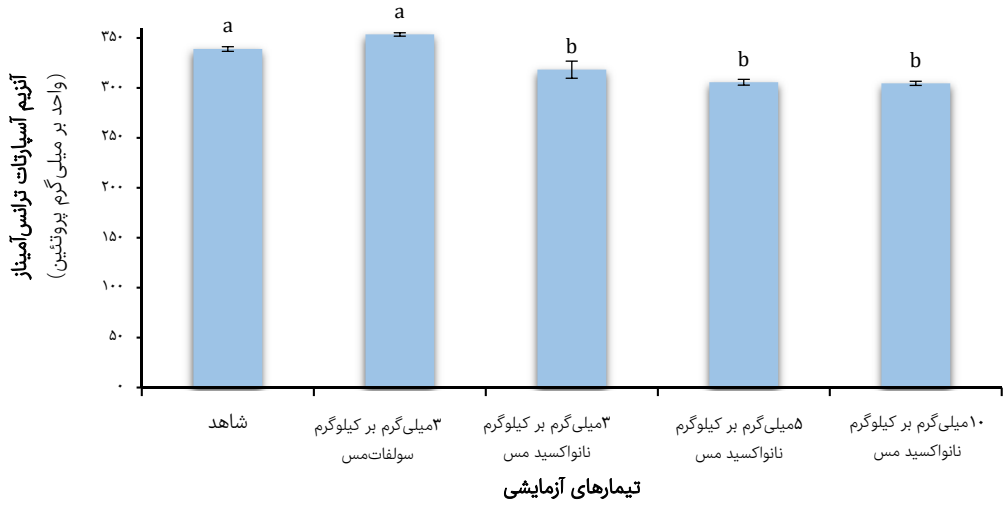
جدول ۲) میانگین آماری اثرات جایگزینی سولفات‌مس با نانواکسیدمس بر شاخص‌های رشد و بازماندگی ماهیان قرمز (سه تکرار)

تیمار	درصد افزایش وزن	وزن نهایی	نرخ رشد ویژه	درصد بازماندگی	شاخص وضعیت	شاخص کبدی	شاخص احشایی
شاهد	۷۹/۴۱±۳/۶۸^{ab}	۱۳/۲۴±۰/۲۶^{ab}	۰/۹۷±۰/۰۴^{ab}	۹۰/۴۷±۴/۷۷^{ab}	۳/۰۳±۰/۰۶^{ab}	۶/۸۱±۰/۱۳^{a}	۵/۸۴±۰/۲۳^{a}
سولفات‌مس (۳میلی‌گرم)	۷۲/۱۹±۴/۰۳^{a}	۱۲/۶۸±۰/۲۵a	۰/۹۱±۰/۰۴^{a}	۷۱/۴۰±۰/۰۰^{a}	۲/۸۸±۰/۰۶^{a}	۶/۴۰±۰/۱۸^{a}	۵/۵۲±۰/۲۱^{a}
نانوذرات مس (۳میلی‌گرم)	۸۳/۹۰±۱/۶۶^{ab}	۱۳/۵۶±۰/۱۳ab	۱/۰۲±۰/۰۱^{ab}	۹۰/۴۷±۹/۵۳^{ab}	۳/۱۳±۰/۰۷^{ab}	۶/۷۱±۰/۱۳^{a}	۵/۸۵±۰/۱۱^{a}
نانوذرات مس (۵میلی‌گرم)	۸۸/۶۵±۴/۴۰^{ab}	۱۳/۹۵±۰/۳۱b	۱/۰۶±۰/۰۴^{ab}	۹۵/۲۳±۴/۷۷^{b}	۳/۲۰±۰/۰۷^{b}	۶/۶۸±۰/۲۸^{a}	۵/۵۵±۰/۱۰^{a}
نانوذرات مس (۱۰میلی‌گرم)	۸۹/۶۱±۴/۲۱^{b}	۱۴/۰۲±۰/۲۹^{b}	۱/۰۷±۰/۰۴^{b}	۸۵/۷۰±۸/۲۶^{ab}	۳/۲۴±۰/۰۴^{b}	۶/۷۲±۰/۱۴^{a}	۵/۴۹±۰/۱۲^{a}

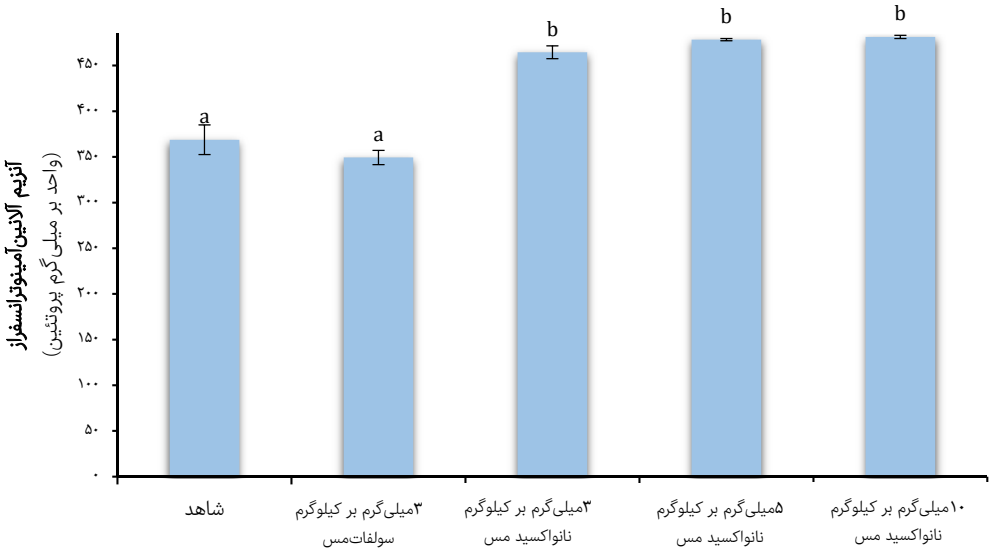
حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی است.

www.SID.ir

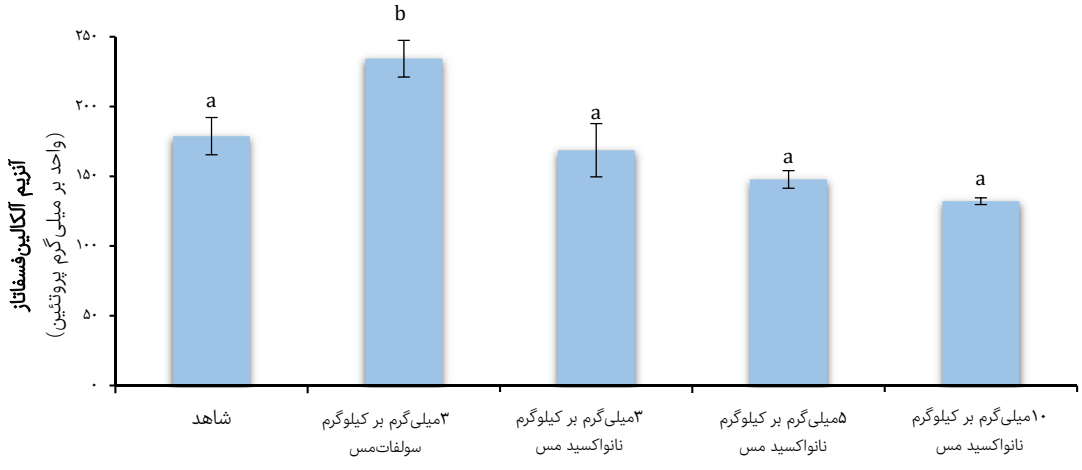
Archive of SID



نمودار ۲) اثر جایگزینی سولفات‌مس با نانواکسیدمس در جیره غذایی بر آنزیم کبدی آلکالین‌فسفاتاز ماهیان قرمز



نمودار ۳) اثر جایگزینی سولفات‌مس با نانواکسیدمس در جیره غذایی بر آنزیم کبدی آسپارتات‌ترانس‌آمیناز ماهیان قرمز



نمودار ۴) اثر جایگزینی سولفات‌مس با نانواکسیدمس در جیره غذایی بر آنزیم کبدی آلانین‌آمینوترانسفراز ماهیان قرمز

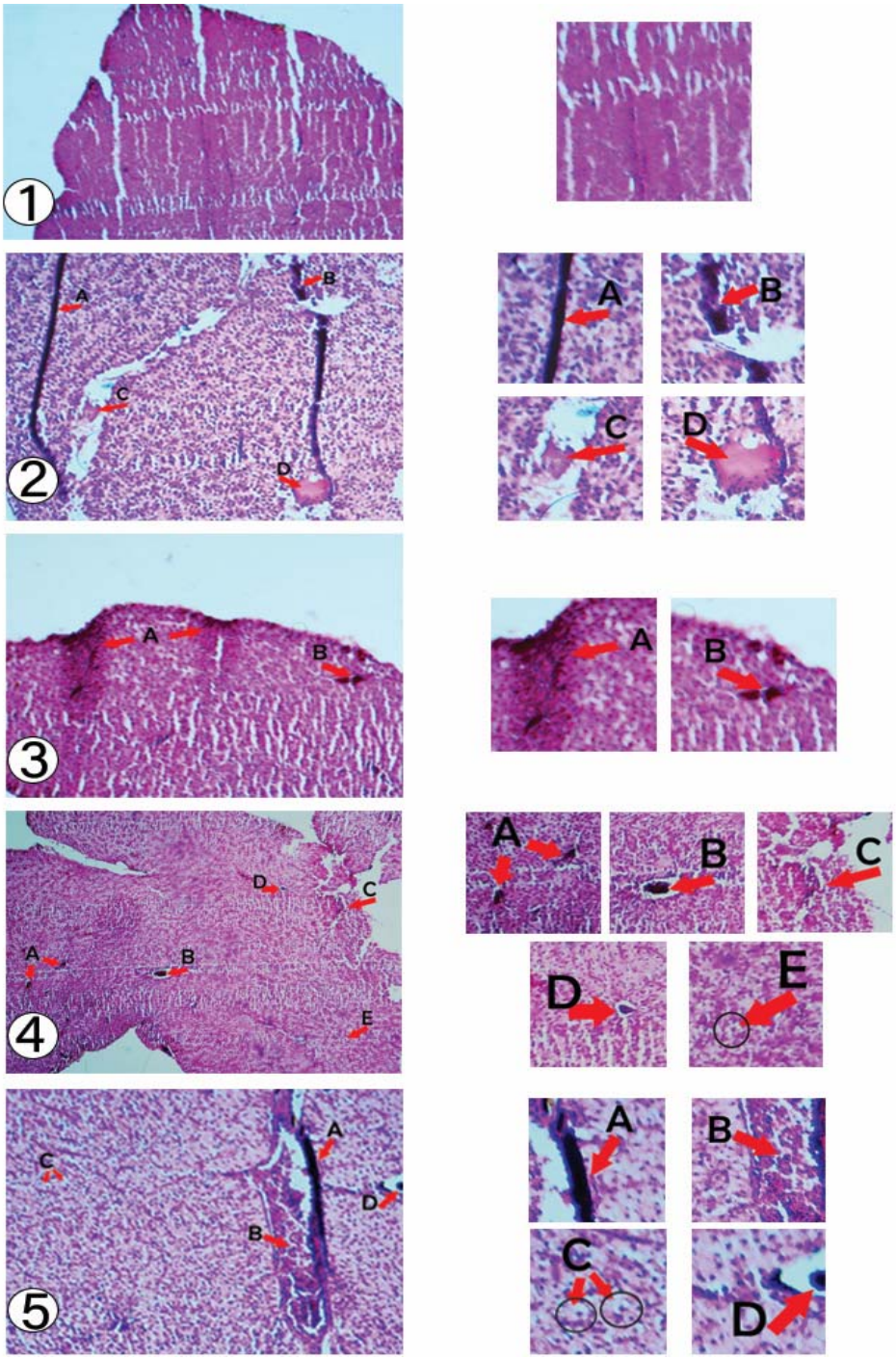
www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳) آسیب‌شناسی بافت کبد در تیمارهای مختلف آزمایشی

تیمار	التهاب	نکروز	پرخونی	حفره‌شدن سلول
شاهد	-	-	-	-
سولفات‌مس (۳میلی‌گرم بر کیلوگرم)	***	***	***	***
نانوذره مس (۳میلی‌گرم بر کیلوگرم)	-	*	*	-
نانوذره مس (۵میلی‌گرم بر کیلوگرم)	-	**	**	*
نانوذره مس (۱۰میلی‌گرم بر کیلوگرم)	**	**	**	**

علایم - و * به ترتیب نشان‌دهنده عدم وجود عارضه و وجود عارضه هستند و تعدد علامت * شدت آسیب رانشان می‌دهد.



شکل ۲) تصاویر آسیب‌شناسی مقاطع بافتی کبد در تیمارهای آزمایشی مختلف؛ ۱) شاهد؛ ۲) سولفات‌مس (۳میلی‌گرم بر کیلوگرم)، A: خط نکروز، B: پرخونی، C: تخریب سلول‌های کبدی، D: آتروفی‌شدن سلول‌های کبدی؛ ۳) نانوذره مس (۳میلی‌گرم بر کیلوگرم)، A: نکروز کبدی، B: پرخونی؛ ۴) نانوذره مس (۵میلی‌گرم بر کیلوگرم)، A: نقاط نکروز، B: پرخونی، C: تخریب بافتی، D: حفره‌دارشدن، E: تجمع چربی در بافت کبد؛ ۵) نانوذره مس (۱۰میلی‌گرم بر کیلوگرم)، A: خط نکروز شدید، B: تخریب بافت کبد، C: تجمع چربی در بافت، D: نقطه پرخونی

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

براساس نتایج مطالعه حاضر، کاربرد نانوذرات مس در مقایسه با تیمار سولفات‌مس توانسته است اثرات مثبتی ایجاد کند. فاکتورهای رشد در تیمارهای نانوذرات ۵ و ۱۰میلی‌گرم نسبت به تیمار سولفات‌مس افزایش معنی‌داری داشتند که می‌تواند به‌دلیل اثرات مستقیم بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی و درنتیجه هضم و بهره‌وری بیشتر از جیره غذایی باشد. همچنین در بافت کبد تیمارهای نانوذرات ۵ و ۱۰میلی‌گرم تجمع چربی مشاهده شده است که افزایش چربی بدن را نشان می‌دهد. این اثرات می‌تواند به اندازه ریز نانوذرات و توانایی نفوذ و واکنش‌پذیری بیشتر و به دنبال آن افزایش گوارش‌پذیری و جذب نانوذرات در مقایسه با سولفات‌مس مرتبط باشد. در این راستا، نتایج مطالعه *عبدالهزاده* و همکاران[22] نیز نشان داد که شاخص‌های رشد ویژه، شاخص وضعیت، میانگین وزن نهایی و درصد بازماندگی بچه‌ماهیان آمور در گروه‌های سولفات‌مس ۱/۵میلی‌گرم در لیتر و نانوذره اکسیدمس ۲۰۰میلی‌گرم در لیتر، نسبت به سایرگروه‌ها کاهش یافته بود که می‌تواند در ارتباط با تاثیرگذاری فلزات سنگین بر مخاط و پرزهای روده و اثر تخریبی این ماده بر پرزهای روده در این گروه‌ها باشد و با مطالعه دیگری با عنوان اثر نانوذرات مس بر نوجوان کپور هم‌راستا است و نشان می‌دهد که نانوذرات مس ابتدا در روده و بعد از آن در آبشش تجمع می‌کنند[23]. همچنین براساس مطالعه *الباسوینی* و همکاران که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد، مشخص شد که افزودن مکمل نانوذره مس به میزان ۲میلی‌گرم بر کیلوگرم در جیره غذایی می‌تواند عملکرد رشد و تغذیه، ضریب تبدیل غذایی، وضعیت آنتی‌اکسیدانی و پاسخ ایمنی را به‌طور معنی‌داری در ماهی سی‌بریم بهبود بخشد. همچنین مکمل مس در فرم نانوذره در مقایسه با فرم طبیعی (سولفات‌مس)، موثرتر است و سبب کاهش خطر بالقوه مس در غلظت‌های بالا می‌شود[24]. *شاو* و همکاران[25] با قراردادن قزل‌آلای رنگین‌کمان در معرض غلظت‌های ۱۰۰میکرولیتر سولفات‌مس و نانوذرات مس و مشاهده به ترتیب میزان ۸۵ و ۱۴% مرگ‌ومیر در هر کدام از این تیمارها، به این نتیجه رسیدند که سمیت یک عنصر فلزی به‌صورت نانوذرات در مقایسه با ترکیب یونی همان عنصر به مراتب کمتر است. برخلاف مطالعه حاضر، در مطالعه *آباد روزالس* و همکاران[26]، مواجهه میگوی وانامی با یون مس باعث کاهش رشد در این گونه شده است. این محققان دلیل این امر را افزایش سوخت‌وساز بدن برای سم‌زدایی و حفظ تعادل و همچنین افزایش دفعات پوست‌اندازی میگو بیان کردند.

به‌طور کلی باید بیان کرد که استفاده از شاخص‌هایی نظیر درصد افزایش وزن بدن و شاخص‌های تغذیه‌ای همیشه نمی‌تواند گویای وضعیت سلامت ماهیان در شرایط رویارویی با سطوح مختلف مواد معدنی در جیره‌های غذایی به‌ویژه نانوذرات باشد. استفاده از شاخص‌های بیوشیمیایی نظیر اندازه‌گیری آنزیم‌ها و شاخص‌های آسیب‌شناسی می‌تواند در اطلاع از وضعیت سلامت موجود موثر باشد. مهم‌ترین آنزیم‌های تشخیص سلامت کبد، آمینوترانسفرازها هستند. اصولاً این آنزیم‌ها به‌طور 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. به‌طوری که در آسیب‌های خفیف ALT درون سیتوپلاسم هپاتوسیت‌ها، به محیط خارج سلولی نشت می‌کند ولی با افزایش جراحت و یا در آسیب‌های بزرگ‌تر و بیشتر، AST که در اندامک‌های سلولی از قبیل میتوکندری‌ها وجود دارد، به بیرون نشت می‌کند و وارد جریان خون می‌شود. درواقع در زمان جراحات خفیف بافت‌ها مقدار غالب آسپارتات‌آمینوترانسفراز از نوع سیتوپلاسمی آن و مقدار کمی هم آسپارتات‌آمینوترانسفراز میتوکندریایی است. آسیب‌های شدید بافت‌ها منجر به آزادسازی مقادیر زیادی آنزیم آسپارتات‌آمینوترانسفراز میتوکندری می‌شود. سطوح بالای ترانس‌آمینازها می‌تواند علایم سوء تغذیه و آسیب ارگان‌ها را بروز دهد، بنابراین کاهش این آنزیم نشان‌دهنده بهبود این فاکتورها در لارو ماهیان تحت تیمار است[27]. از آنجایی که میزان فعالیت آنزیم ALT در تیمارهای دارای نانوذرات مس نسبت به تیمار سولفات‌مس بیشتر است می‌تواند حاکی از آسیب سلولی خفیف در تیمارهای مورد تغذیه با نانوذرات باشد و با توجه به اینکه میزان آنزیم AST در تیمار سولفات‌مس نسبت به تیمارهای نانوذرات مس بیشتر است می‌تواند آسیب حاد واردشده به سلول‌های پارانشیم کبد ناشی از سولفات‌مس را بیان کند. نتایج نشان‌دهنده اثرات منفی بیشتر سولفات‌مس نسبت به نانوذرات مس بر ماهیان قرمز بوده است. ALT و AST اجزای سرمی آنزیم‌های غیرعملکردی پلاسما هستند که به‌طور طبیعی در سلول‌های برخی اندام‌ها از جمله کبد قرار گرفته‌اند. آسیب‌های وارده به سلول‌های کبدی یا دستخوش تغییرشدن نفوذپذیری در سطح غشای پلاسمایی آنها زمانی که در مواجهه با نانوذرات قرار می‌گیرند، می‌تواند منجر به بالارفتن سطح این آنزیم‌ها در سرم شود[28]. آمینوترانسفرازها، سلامت سلول‌های کبدی را نشان می‌دهند و در مراحل ابتدایی آسیب‌های بافت کبدی، به نظر می‌رسد نفوذپذیری غشا در اثر ورود آنزیم‌های سیتوپلاسمی هپاتوسیت‌ها از سلول‌ها به خون بیشتر می‌شود. آلکالین‌فسفاتاز یک آنزیم عمومی است و در بافت‌های مختلف وجود دارد. در اثر آسیب‌های کبدی، میزان این آنزیم در خون افزایش می‌یابد[27]. افزایش فعالیت سرمی این آنزیم در تیمار دارای سولفات‌مس، به آسیب‌های واردشده به بافت‌های مختلف از جمله بافت کبد باز می‌گردد، چرا که به نظر می‌رسد سولفات‌مس از طریق دستگاه گردش خون به بافت‌های مختلف از جمله کبد وارد و موجب تخریب بافت‌ها شده است، در حالی که میزان آن در تیمار شاهد و تیمارهای دارای نانوذرات مس به‌ویژه تیمار نانوذرات مس ۱۰میلی‌گرم، کمتر است. بافت کبد تیمار سولفات‌مس دارای آسیب و تخریب سلولی شدید بود که با افزایش آزادسازی آنزیم ALP به جریان خون همراه بود و این آنزیم در تیمار سولفات‌مس نسبت به تیمارهای دیگر به‌صورت معنی‌داری با فعالیت بیشتری ارزیابی شد. در بافت کبد تیمارهای ۵ و ۱۰میلی‌گرم نانوذرات نیز آسیب شدید ایجاد کرد و

www.SID.ir

Archive of SID

درنتیجه این آسیب‌ها، ترشح آنزیم ALT در این تیمارها افزایش داشته است. افزایش غلظت آنزیم‌های کبدی در خون را می‌توان ناشی از افزایش ایجاد رادیکال‌های آزاد و انواع اکسیژن فعال به‌واسطه برخی نانوذرات دانست، به این صورت که آسیب وارده به کبد و ازبین‌رفتن سلول‌های کبدی منجر به رهاسازی این آنزیم‌ها در خون می‌شود، بنابراین افزایش این آنزیم‌ها نشانه‌ای از آسیب سلول‌های کبدی است که با نتایج هیستولوژی و آنزیمی بافت کبد در این مطالعه مطابقت دارد.

در مطالعه *احمدی* و همکاران[29]، غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰میلی‌گرم در لیتر نانوذره اکسیدمس سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های AST، ALP، LDH و ALT در پلاسمای خون ماهی کپور معمولی شد. وقوع نکروز یا آسیب غشای سلول باعث رهاشدن این آنزیم‌ها به گردش خون می‌شود. افزایش سطح AST در سرم، آسیب کبد نظیر هپاتیت‌های ویروسی، انفارکتوس قلبی و صدمات عضلانی را نشان می‌دهد. همچنین در مطالعه دیگری نانوذره اکسیدمس در غلظت‌های ۷/۵ و ۱۵میلی‌گرم در لیتر در مدت زمان دو هفته باعث افزایش سطح فعالیت آنزیم‌های ALT، AST و ALP کبد ماهی تیلاپیا شد و اختلال کامل مشخص و معنی‌داری در عملکرد کبد و کلیه تیلاپیای نیل ایجاد کرد. در مطالعه *حسینی* و همکاران[15] که به مدت ۱۴روز بر روی ماهی کپور معمولی انجام گرفت، افزایش معنی‌داری در سطح آنزیم AST تحت تاثیر سولفات‌مس و آنزیم ALT تحت تاثیر نانوذره مس و سولفات‌مس نسبت به شاهد در پلاسمای خون این ماهی مشاهده شد.

در کنار بررسی اثرات سولفات‌مس و نانوذرات مس بر میزان آنزیم‌های کبدی، برای ارزیابی دقیق‌تر روند آسیب‌ها، نمونه‌های آزمایشی از لحاظ بافت‌شناسی مورد بررسی قرار گرفتند. در مطالعه حاضر، نتایج بافت‌شناسی نشان داد که میزان آسیب‌های بافتی کبد در تیمار سولفات‌مس نسبت به تیمارهای دارای نانوذرات مس بیشتر و شدیدتر بود و در تیمارهای دارای نانوذرات مس به شکل وابسته به دوز، این آسیب‌ها افزایش یافته‌اند که حاکی از سمیت سولفات‌مس و غلظت‌های بالای نانوذرات مس است و نشان می‌دهد توانایی جذب در این تیمارها کاهش داشته و به‌صورت آسیب بافتی بروز کرده است. بافت کبد تیمار سولفات‌مس دارای آسیب سلولی بالا به‌صورت نکروز و پرخونی شدید وهمچنین آتروفی‌شدن سلول‌های کبدی بود که باعث افزایش آزادسازی آنزیم ALP به جریان خون شده است. در بافت کبد تیمارهای ۵ و ۱۰میلی‌گرم نانوذرات نیز آسیب به‌صورت نکروز و پرخونی نمود پیدا کرد و در نتیجه این آسیب‌ها، ترشح آنزیم ALT در این تیمارها با افزایش همراه بود.

در مطالعه آقامیرکریمی و همکاران[30]، نانوذرات مس سبب هیپرتروفی سلولی، پرخونی در ورید مرکزی، واکوئله‌شدن، نکروز، پرخونی در سینوزئیدها و پیکنوزه‌شدن هسته در کبد ماهی کلمه دریای خزر شده که بسته به افزایش دوز و مدت زمان نانوذرات، این آسیب‌ها تشدید شده است. مطالعات روی برخی از موجودات اینگونه اظهار داشته‌اند که نانوذرات باعث می‌شوند که ایجاد رادیکال‌های آزاد به‌قدری شدت یابند که از درجه تحمل زیستی یک موجود بالاتر باشد و همین امر آسیب‌های کبدی را در پی خواهد داشت، اما در ادامه چنین عنوان کرده‌اند که یک دوره بهبودی، آسیب‌های تحمیل‌شده به کبد را برطرف خواهد کرد[31]. همچنین براساس مطالعه *نورین* و همکاران[32]، نانوذرات مس و اکسیدمس سبب ایجاد آسیب‌های بافتی مانند نکروز، تورم هپاتوسیت‌ها و دژنره‌شدن آنها، پیکنوزه‌شدن هسته سلول‌ها، آسیب سیاهرگ مرکزی، هایپرتروفی سلولی، اتساع سینوسی و دژنراسیون کامل (در حالت وابسته به دوز) شد. همچنین در مطالعه دیگری روی ماهیان تلاپیای نیل، قرارگرفتن در معرض ۱۵میلی‌گرم بر لیتر (و یا بیشتر) سولفات‌مس سبب ایجاد آسیب‌های قابل توجه در آبشش، کبد و بافت پانکراس، هیپرپلازی اپی‌تلیال و ادم در اپی‌تلیوم فیلامنت‌ها می‌شود و شدت ضایعات با افزایش غلظت سولفات‌مس افزایش می‌یابد[33]. همچنین در این مطالعات به آسیب‌های بافتی مثل افزایش حفره‌حفره‌شدن سیتوپلاسم، کاسته‌شدن از تعداد هسته‌های هپاتوسیت و پیکنوز هسته‌ای ناشی از تاثیر سولفات‌مس بر روی بافت کبد این ماهیان اشاره شده است. نانوذرات با ازبین‌بردن دیواره سلولی و همچنین موانع خونی- مغزی، به‌سهولت در خون جریان می‌یابند و با ورود به قلب، مغز و زرده در بافت‌های مختلف تجمع پیدا می‌کنند و در نهایت ادم در آن بافت‌ها را منجر می‌شوند[34]. مطالعه *وانگ* و همکاران[35] نیز نشان داد که درصد آپوپتوزیس و نکروز بافت‌های مختلف در ماهی هامور معمولی پس از قرارگیری در معرض نانوذرات مس و سولفات‌مس به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد بود. همچنین در مطالعه *حسینی* و همکاران[15] مشخص شد که هر دو نوع مس (سولفات‌مس و نانوذرات مس)، به کبد و کلیه ماهی آسیب می‌رسانند، اما سولفات‌مس منجر به آسیب شدید نسبت به نانوذرات مس می‌شود و به‌طور کلی به نظر می‌رسد سولفات‌مس سمی‌تر از نانوذرات مس برای ماهی کپور معمولی است که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد. در مطالعه دیگری نیز با بررسی اثرات هیستوپاتولوژیک نانوذرات نقره و مس بر ماهی خاویاری سیبری دریافتند که این نانوذرات سبب ایجاد ساختار نامنظم و پیکنوزه‌شدن هسته سلول‌های اپیدرمی و کبد، به‌هم‌چسبیدن لاملاهای ثانویه آبشش، نکروز اپی‌تلیال، بلندشدن رشته‌های آبششی، آماس فضای سینوسی و پرشدن بیش از حد رگ‌های خونی می‌شوند[17]. خاصیت نفوذپذیری زیاد نانوذرات ممکن است صدمات زیادی را در بافت‌ها به همراه داشته باشد، بنابراین لازم است که به‌منظور درک پیامدهای پاتولوژیک این ترکیبات و کاهش اثرات مخرب آنها به میزانی که ممکن است، از نظر سم‌شناسی به‌طور وسیع و همه‌جانبه مورد بررسی قرار گیرند. از طرف دیگر باید به این موضوع توجه داشت که این ترکیبات می‌توانند به مدت طولانی در بدن موجود باقی بمانند و روی عملکرد و همچنین بقای آن به‌عنوان بخشی از یک سیستم اکولوژی تاثیرگذار باشند، به همین دلیل از چنین موضوعی نباید غفلت کرد.

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه‌گیری

استفاده از نانوذرات مس در سطوح مختلف ۳، ۵ و ۱۰میلی‌گرم در کیلوگرم به‌جای سولفات‌مس در جیره غذایی می‌تواند باعث بهبود عملکرد رشد ماهیان قرمز شود. همچنین سنجش فعالیت آنزیم‌های کبدی و آسیب‌شناسی بافتی نشان داد که سولفات‌مس و غلظت‌های بالای نانوذرات مس در تیمار ۵ و ۱۰میلی‌گرم نانوذره مس در کیلوگرم جیره غذایی اثرات منفی بر آنزیم‌های کبدی دارند و باعث ایجاد ضایعات بافتی و اثرات مخرب می‌شوند. آسیب‌های غلظت بالای نانوذرات مس (۱۰میلی‌گرم بر کیلوگرم) با آسیب‌های غلظت پایینی از سولفات‌مس (۳میلی‌گرم بر کیلوگرم) برابری می‌کند که این نشان‌دهنده سمیت و مخرب‌بودن این ماده حتی در غلظت‌های پایین است. به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که میزان ۳میلی‌گرم نانوذره مس در ۱کیلوگرم رژیم غذایی باعث بهبود کارآیی رشد و سلامت کبد بوده است، در حالی که غلظت مشابه از سولفات‌مس تاثیرات منفی بر کبد و رشد ماهی قرمز داشت و بهتر است جایگزینی سولفات‌مس با نانوذرات مس در سطوح ۳میلی‌گرم در کیلوگرم جیره غذایی باشد. غلظت ۳میلی‌گرم بر کیلوگرم سولفات‌مس برای ماهی قرمز سمی است و توصیه می‌شود مطالعات بعدی، غلظت‌های پایین‌تر را مورد آزمایش قرار دهند.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از زحمات کارشناسان آزمایشگاه مرکزی، همچنین کارشناس مرکز آبزی‌پروری دانشگاه شهرکرد تقدیر و تشکر می‌کنند.

تاییدیه اخلاقی: در تمامی مراحل انجام مطالعه اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافعی میان آنها وجود ندارد.

سهم نویسندگان: سهیلا کریمیان کاکلکی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۳۵%)؛ فردین شالویی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۲۵%)؛ محمد شادخواست (نویسنده سوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۲۵%)؛ مهدی عرب مارکده (نویسنده چهارم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۱۵%)

منابع مالی: مطالعه حاضر از پایان‌نامه کارشناسی ارشد استخراج شده و تحت حمایت مالی دانشگاه شهرکرد به اجرا رسیده است.

منابع

1- Wu Y, Zhou Q, Li H, Liu W, Wang T, Jiang G. Effects of silver nanoparticles on the development and histopathology biomarkers of Japanese medaka (Oryzias latipes) using the partial-life test. Aquat Toxicol. 2010;100(2):160-7.

2- FAO. The state of world fisheries and aquaculture: Contributing to food security and nutrition for all. Rome: FAO; 2016.

3- Iuliana A, Aida V, Gabriela G, Aurelia I, Elpida P. Evaluation of nutritional quality of the common carp (Cyprinus carpio) enriched in fatty acids. The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati. Fascicle VI-Food Technology. 2012;36(1):61-73.

4- Antony Jesu Prabhu P, Geurden I, Fontagné-Dicharry S, Veron V, Larroquet L, Mariojouls C, et al. Responses in micro-mineral metabolism in rainbow trout to change in dietary ingredient composition and inclusion of a micro-mineral premix. PLoS One. 2016;11(2):e0149378.

5- Scott A, Vadalasetty KP, Chwalibog A, Sawosz E. Copper nanoparticles as an alternative feed additive in poultry diet: A review. Nanotechnol Rev. 2018;7(1):69-93.

6- Lall SP, Milley JE. Trace mineral requirements of fish and crustaceans. In: Schlegel P, Durosoy S, Jongbloed AW, editors. Trace elements in animal production systems. Wageningen: Wageningen Academic Publishers; 2008. pp. 203-14.

7- Kamunde C, Grosell M, Higgs D, Wood CM. Copper metabolism in actively growing rainbow trout (Oncorhynchus mykiss): Interactions between dietary and waterborne copper uptake. J Exp Biol. 2002;205(2):279-90.

8- Lundebye AK, Berntssen MH, Bonga SW, Maage A. Biochemical and physiological responses in Atlantic salmon (Salmo salar) following dietary exposure to copper and cadmium. Mar Pollut Bull. 1999;39(1-12):137-44.

9- Liu GL, Kim J, Lu YU, Lee LP. Optofluidic control using photothermal nanoparticles. Nat Materi. 2006;5(1):27-32.

10- De Silva SS, Anderson TA. Fish nutrition in aquaculture. Dordrecht: Springer Netherlands; 1994.

11- Caruso G, G Denaro M, Genovese L. Digestive enzymes in some teleost species of interest for Mediterranean aquaculture. Open Fish Sci J. 2009;2(1):74-86.

12- Moutopoulos DK, Stergiou KI. Length-weight and length-length relationships of fish species from the Aegean Sea (Greece). J Appl Ichthyol. 2002;18(3):200-3.

13- Isa MM, Rawi CS, Rosla R, Shah SA, Shah AS. Length-weight relationships of freshwater fish species in Kerian River Basin and Pedu Lake. Res J Fish Hydrobiol. 2010;5(1):1-8.

14- Abdel-Khalek AA, Elhaddad E, Mamdouh S, Marie MA. Assessment of metal pollution around sabal drainage in River Nile and its impacts on bioaccumulation level, metals correlation and human risk hazard using Oreochromis niloticus as a bioindicator. Turk J Fish Aquat Sci. 2016;16(2):227-39.

15- Hoseini SM, Hedayati A, Mirghaed AT, Ghelichpour M. Toxic effects of copper sulfate and copper nanoparticles on minerals, enzymes, thyroid hormones and protein fractions of plasma and histopathology in common carp Cyprinus carpio. Exp Toxicol Pathol. 2016;68(9):493-503.

16- Munakata A, Kobayashi M. Endocrine control of sexual behavior in teleost fish. Gen Comp Endocrinol. 2010;165(3):456-68.

17- Ostaszewska T, Chojnacki M, Kamaszewski M, Sawosz-Chwalibóg E. Histopathological effects of silver and copper nanoparticles on the epidermis, gills, and liver of Siberian sturgeon. Environ Sci Pollut Res. 2016;23(2):1621-33.

18- Montero D, Grasso V, Izquierdo MS, Ganga R, Real F, Tort L, et al. Total substitution of fish oil by vegetable oils in gilthead sea bream (Sparus aurata) diets: Effects on hepatic Mx expression and some immune parameters. Fish Shellfish Immunol. 2008;24(2):147-55.

19- Velisek J, Svobodova Z, Piackova V, Groch L, Nepejchalova L. Effects of clove oil anaesthesia on

www.SID.ir

Archive of SID

28- Park EJ, Bae E, Yi J, Kim Y, Choi K, Lee SH, et al. Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. Environ Toxicol Pharmacol. 2010;30(2):162-8.
29- Ahmadi H, Naeemi AS, Nazarhaghighi F, Ghafuri H. Subacute effects of copper oxide nanoparticles on some hematological indices and gill tissue of the juvenile carp (Cyprinus carpio). J Aquac Dev. 2016;10(4):1-14. [Persian]
30- Aghamirkarimi Sh, Mashinchian Moradi A, Sharifpour I, Jamili Sh, Ghavam Mostafavi P. Effect of copper nanoparticles in the Caspian Roach (Rutillus rutillus caspicus), changing antioxidant activities and liver histopathology. Iran Fish Sci Res Inst. 2019;27(5):125-34. [Persian]
31- Parveen A, Rizvi SH, Gupta A, Singh R, Ahmad I, Mahdi F, et al. NMR-based metabonomics study of sub-acute hepatotoxicity induced by silica nanoparticles in rats after intranasal exposure. Cell Mol Biol. 2012;58(1):196-203.
32- Noureen A, Jabeen F, Tabish TA, Yaqub S, Ali M, Chaudhry AS. Assessment of copper nanoparticles (Cu-NPs) and copper (II) oxide (CuO) induced hemato-and hepatotoxicity in Cyprinus carpio. Nanotechnology. 2018;29(14):144003.
33- Alkobaby AI, Abd El-Wahed RK. The acute toxicity of copper to Nile tilapia (Oreochromis niloticus) fingerlings and its effects on gill and liver histology. J Aquac Res Dev. 2017;8(1):465.
34- Krian Reddy T, Janavdana Reddy S, Prasad T. Effect of silver nanoparticles on energy metabolism in selected tissues of aeromonas hydrophila infected Indian major carp, catla catla. IOSR J Pharm. 2013;3:49-55.
35- Wang T, Chen X, Long X, Liu Z, Yan S. Copper nanoparticles and copper sulphate induced cytotoxicity in hepatocyte primary cultures of Epinephelus coioides. PLoS One. 2016;11(2):e0149484.
common carp (Cyprinus carpio L.). Vet Med. 2005;50(6):269-75.
20- Acerete L, Balasch JC, Espinosa E, Josa A, Tort L. Physiological responses in Eurasian perch (Perca fluviatilis, L.) subjected to stress by transport and handling. Aquaculture. 2004;237(1-4):167-78.
21- Martoja R, Martoja-Pierson M. Initiation aux techniques de l'histologie animale. Paris: Masson; 1967.
22- Abdollahzadeh F, Khayatzadeh J, Ghasemzadeh F. Comparing study of the effects of copper nanoparticles and copper sulphate on gill histopathology and growth rate of grass carp (Ctenopharyngodon idella). Iran Fish Sci Res Inst. 2018;27(2):81-90. [Persian]
23- Zhao J, Wang Z, Liu X, Xie X, Zhang K, Xing B. Distribution of CuO nanoparticles in juvenile carp (Cyprinus carpio) and their potential toxicity. J Hazard Mater. 2011;197:304-10.
24- El Basuini MF, El-Hais AM, Dawood MA, Abou-Zeid AE, EL-Damrawy SZ, Khalafalla MM, et al. Effect of different levels of dietary copper nanoparticles and copper sulfate on growth performance, blood biochemical profiles, antioxidant status and immune response of red sea bream (Pagrus major). Aquaculture. 2016;455:32-40.
25- Shaw BJ, Al-Bairuty G, Handy RD. Effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on rainbow trout,(Oncorhynchus mykiss): Physiology and accumulation. Aquat Toxicol. 2012;116-117:90-101.
26- Abad-Rosales SM, Frías-Espericueta MG, Inzunza-Rojas A, Osuna-López I, Páez-Osuna F, Lozano-Olvera R, et al. Histological effects of Cu^{2+} to white shrimp Litopenaeus vannamei (Crustacea: Decapoda) juveniles at low salinities. Revista de biología marina y oceanografía. 2010;45(1):99-105.
27- Banaee M, Mirvagefei A, Rafei G, Amiri BM. Effect of sub-lethal Diazinon Concentrations on Blood Plasma Biochemistryl. Int J Environ Res. 2008;2(2):189-98.

www.SID.ir