

## 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.\*<sup>1</sup> MSc, Shaluei F.<sup>1</sup> PhD, Shadkhast M.<sup>2</sup> PhD, Arab Markadeh M.<sup>3</sup> MSc

<sup>1</sup> Fisheries Sciences Department, Faculty of Natural Resources and Earth Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

<sup>2</sup> Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

<sup>3</sup> 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<sub>4</sub>) 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<sub>4</sub>. 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<sub>4</sub> 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

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

سهیلا کریمیان کالکی<sup>\*</sup> MSc

گروه شیلات و محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

فریدین شالویی PhD

گروه شیلات و محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی 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 سولفات مس 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 ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) و ۳ میلی‌گرم سولفات مس در کیلوگرم جیره غذایی تنظیم شد. ماهی‌ها طی یک دوره ۶۰ روزه، 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 (آلکالین فسفاتاز، آسپارات ترانس آمیناز و آلانین آمینوترانسفراز) و همچنین آسیب‌شناسی بافت کبد مورد ارزیابی قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** براساس نتایج، استفاده از نانوذرات مس در سطوح مختلف ۳، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم به‌جای سولفات مس در جیره غذایی می‌تواند باعث بهبود عملکرد رشد و بازماندگی ماهیان قرمز شود. همچنین سولفات مس نسبت به نانوذرات اثرات منفی بیشتری بر بافت کبد و همچنین آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز، آسپارات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز دارد. از این رو به نظر می‌رسد جایگزینی سولفات مس 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 ۱۰ میلی‌گرم نانوذره مس در کیلوگرم جیره غذایی نشان داد که نانوذرات مس سبب ایجاد ضایعات بافتی و اثرات مخرب (البته کمتر از سولفات مس) می‌شوند.

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

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

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۹/۱۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۴/۰۶

\*نویسنده مسئول: Soheila\_karimian@yahoo.com

## مقدمه

به دنبال افزایش جمعیت و تامین نیاز رو به رشد غذای انسان، استفاده از منابع آبزیان به عنوان تامین‌کننده بخشی از نیازهای

پروتئینی افزایش یافته است. در این بین ماهی با داشتن میزان قابل توجه ویتامین‌ها، مواد معدنی و اسیدهای چرب امگا ۳، 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 به صورت متراکم می‌شود. طی سالیان اخیر مطالعات متعددی به منظور 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 سیتوکروم اکسیداز، تیروزیناز، سوپراکسید دیسموتاز، آمین اکسیداز، لیزیل اکسیداز و سرولوپلاسمین وجود دارد. همچنین به نظر می‌رسد وجود عنصر مس برای تشکیل رنگدانه ملانین و رنگدانه‌های پوستی ضروری باشد. همچنین این عنصر جزئی از بخش هم در هموسیانین سخت‌پوستان، کوفاکتور در تیروزیناز و اسید اسکویک اکسیداز است[6].

غذای تجاری باید میزان مس لازم را در یک فرم بیولوژیکی پراثرتری 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 به عنوان آنتاگونیست‌های متابولیکی مس است[7]. مس به میزان ۳ تا ۱۱ میلی‌گرم در هر کیلوگرم جیره غذایی، عنصری ضروری در خوراک بیشتر گونه‌های آبزی است. به کارگیری ۳ میلی‌گرم مس در هر کیلوگرم جیره غذایی موجب افزایش رشد ماهی کپور معمولی انگشت‌قد و قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌شود[8]. سولفات مس 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 زیست‌فراهمی بیشتری دارد و اگر اندازه ذرات مولکول‌های بزرگ مس به اندازه ذرات نانو کاهش یابند، مولکول‌های کوچک به‌آسانی می‌توانند از روده جذب شوند و در نتیجه گوارش‌پذیری مس در دستگاه گوارش افزایش می‌یابد. با این وجود، همچنان صنعت خوراک به دلایل توجیه اقتصادی سولفات مس را ترجیح می‌دهد[5]. اندازه ذرات نانو به‌طور متوسط در محدوده ۱ تا ۱۰۰ نانومتر است. با تغییر اندازه ذرات از میکرومتر به نانومتر که برابر ۱۰<sup>-۹</sup> متر است،

تکثیر و پرورش ماهیان زینتی استان چهارمحال و بختیاری تهیه و به مرکز تحقیقاتی آبی‌پروری دانشگاه شهرکرد انتقال یافت. ماهیان دارای میانگین طول  $5.86 \pm 0.43$  سانتی‌متر و میانگین وزن  $7.78 \pm 0.67$  گرم بودند. دوره سازش‌پذیری ماهیان به شرایط آزمایشگاه، ۱۴ روز بود. طی یک دوره ۶۰ روزه، 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  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ، اکسیژن محلول با میانگین ۷ میلی‌گرم بر لیتر، سختی آب به میزان ۱۹۰ میلی‌گرم بر لیتر کلسیم‌کربنات، pH در حدود ۷/۶ و EC به میزان  $450 \mu\text{S/cm}$  میکروزیمنس بر سانتی‌متر بود.

در این مطالعه از یک تیمار شاهد و ۳ غلظت نانواکسیدمس (۳، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا) و غلظت توصیه‌شده سولفات مس برای کپور ماهیان به میزان ۳ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا استفاده [۸] 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 سولفات مس ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )؛ سیگماآلد ریچ، ایالات متحده) و نانواکسیدمس (US Research Nanomaterials؛ ایالات متحده) با قطر  $40 \text{ nm}$  نانومتر 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  $20^\circ\text{C}$  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 [۱۸]:

$$\text{وزن کلی ماهیان در انتهای دوره (گرم)} \\ \text{شمار ماهیان در انتهای دوره} \\ \text{وزن ابتدایی - وزن نهایی} \\ \text{وزن ابتدایی} \times 100 = \text{درصد افزایش وزن بدن (WG)}$$

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

$$\text{وزن ابتدایی} - \ln \text{وزن نهایی} \\ \text{کل روزهای پرورش} \times 100 = \text{نرخ رشد ویژه (SGR)}$$

$$\text{شمار بچه‌ماهیان انتهای دوره} \\ \text{شمار بچه‌ماهیان ابتدای دوره} \times 100 = \text{درصد بازماندگی (SUR)}$$

$$\text{وزن کبد (گرم)} \\ \text{وزن بدن (گرم)} \times 100 = \text{شاخص کبدی (HIS)}$$

$$\text{وزن بدن (گرم)} \\ (\text{طول کل بدن})^3 \times 100 = \text{شاخص وضعیت (CF)}$$

$$\text{وزن کل دستگاه گوارش (گرم)} \\ \text{وزن بدن (گرم)} \times 100 = \text{شاخص احشایی (VSI)}$$

به دلیل افزایش نسبت سطح به حجم ذرات، تمام خواص فیزیکی و شیمیایی تغییر می‌کنند و واکنش‌پذیری ذره به شدت افزایش می‌یابد [۹]. نانوذرات با توجه به خواص منحصر به فرد 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 به عنوان 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 به عنوان یک هدف مهم در آبی‌پروری به صورت تغییرات قابل توجه در ویژگی‌هایی مثل طول، وزن و حتی میزان انرژی ماهی دیده می‌شود [۱۰]. عوامل بسیاری در فرآیند رشد و کسب انرژی موثر هستند که از مهم‌ترین آنها خوراک و مدیریت تغذیه است [۱۱]. از روابط طول-وزن و شاخص وضعیت به عنوان 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 [۱۲، ۱۳].

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 در نتیجه 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 [۱۴]. تغییرات ساختمانی و آنزیمی کبد در ارزیابی سلامتی ماهی قابل توجه است و اثرات آلاینده‌های مختلف زیست‌محیطی را نشان می‌دهد [۱۵].

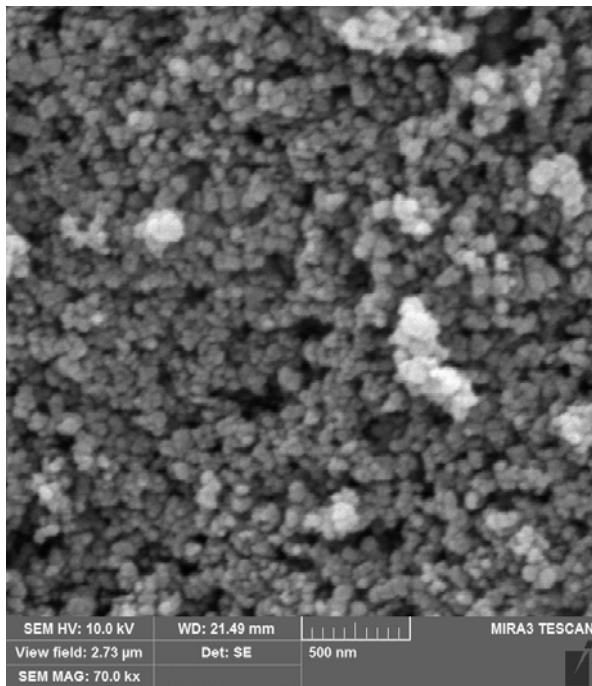
ماهی قرمز (*Carassius auratus*) یک ماهی بسیار مهم از لحاظ اقتصادی و مطالعاتی است. علاوه بر این، گونه بسیار مناسبی برای مطالعات تولیدمثلی، ایمنی‌شناسی، مطالعه فیزیولوژی غدد داخلی، سم‌شناسی و سلولی و مولکولی است، زیرا از اندازه مناسبی برای تحقیقات آزمایشگاهی برخوردار است و همچنین در اندازه کوچک به بلوغ جنسی می‌رسد و لقاح مصنوعی و پرورش لارو نسبتاً آسانی دارد. درواقع از این گونه به عنوان مدل برای بررسی کپور ماهی‌ها استفاده می‌شود [۱۶]. با وجود اهمیت اقتصادی ماهی قرمز، اطلاعات زیادی در مورد نیازهای غذایی آن به خصوص عناصر ضروری مثل مس و کارایی انواع آن در این ماهی وجود ندارد. بنابراین، با توجه به محدود بودن اطلاعات در این زمینه، این مطالعه با هدف تعیین اثرات نانوذرات مس در مقایسه با سولفات مس بر عملکرد آنزیم‌های کبدی و آسیب‌شناسی بافت کبد در ماهی قرمز انجام شد.

## مواد و روش‌ها

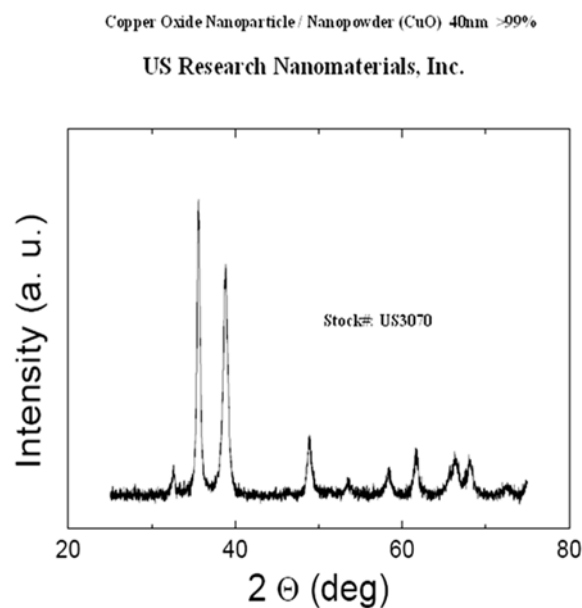
مراحل عملی و اجرایی مطالعه در سال ۱۳۹۷ و به صورت یک طرح کاملاً تصادفی انجام شد. ماهیان قرمز به تعداد ۱۰۵ قطعه از مرکز

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

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



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) به صورت تصادفی انتخاب و به وسیله پودر گل میخک به میزان ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر بیهوش شدند [19]. ابتدا با استفاده از سرنگ غیرهپارینه (۲ میلی‌لیتری) از قلب ماهی خونگیری و به یک میکروتیوب استریل انتقال داده شد و سپس با استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار مدل UNIVERSAL 320R (۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه) نمونه‌ها سانتریفیوژ و پس از آن با پی‌پت سرم خون جداسازی و به میکروتیوب ۱ میلی‌لیتری انتقال داده شدند [20]. میکروتیوب‌ها در فریزر  $-80^{\circ}\text{C}$  نگهداری و در نهایت برای سنجش فعالیت آنزیم‌های

تیمار سولفات مس نسبت به سایر تیمارها کمتر بود ( $p < 0.05$ ). همچنین از نظر بازماندگی تیمار سولفات مس نسبت به نانوذره مس ۵ میلی گرم کاهش معنی داری داشت ( $p < 0.05$ ). در مقایسه تیمارها نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی داری دیده نشد ( $p > 0.05$ ). میزان شاخص وضعیت تیمار سولفات مس با تیمارهای نانوذرات ۵ و ۱۰ میلی گرم دارای کاهش معنی دار بود ( $p < 0.05$ ) و با سایر تیمارها اختلاف معنی دار نداشت ( $p > 0.05$ ). در مورد میزان شاخص کبدی و شاخص احشایی، در بین هیچ کدام از تیمارها اختلاف معنی داری وجود نداشت ( $p > 0.05$ ).

نتایج اثرات جایگزینی سولفات مس با نانواکسیدمس در جیره بر آزمون‌های کبدی ماهیان قرمز در نمودارهای ۲، ۳ و ۴ آورده شده است. براساس نتایج، فعالیت آنزیم ALP در تیمار سولفات مس نسبت به تیمارهای نانوذرات مس و شاهد دارای افزایش معنی داری بود ( $p < 0.05$ ) و فعالیت این آنزیم در تیمارهای نانوذرات مس با تیمار شاهد اختلاف معنی داری نداشت ( $p > 0.05$ ). فعالیت آنزیم AST از لحاظ آماری در تیمارهای نانوذرات اکسیدمس اختلاف معنی داری با تیمارهای شاهد و سولفات مس داشت ( $p < 0.05$ ) و بین تیمار شاهد و سولفات مس اختلاف معنی داری دیده نشد ( $p > 0.05$ ). فعالیت آنزیم ALT در تیمارهای نانوذرات نسبت به دو تیمار شاهد و سولفات مس افزایش معنی داری داشته است ( $p < 0.05$ ). همچنین میان فعالیت آنزیمی ALT تیمار سولفات مس با تیمار شاهد اختلاف معنی داری وجود نداشت ( $p > 0.05$ ).

نتایج اثرات جایگزینی سولفات مس 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 به طور کلی سلول‌ها به نسبت سالم بودند. در تیمار سولفات مس، پرخونی و نکروز شدید و تخریب سلولی مشاهده شد. در مورد تیمار دارای ۳ میلی گرم بر کیلوگرم نانواکسیدمس، وضعیت کبد تقریباً طبیعی بود ولی اندکی نکروز و پرخونی مشاهده شد. تیمارهای دارای ۵ و ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم نانواکسیدمس سبب پرخونی و تخریب سلول‌های کبد شدند. البته شدت این آسیب‌ها در تیمار ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم نانواکسیدمس بیشتر بود.

ALP (آلکالین فسفاتاز)، AST (آسپارات ترانس آمیناز) و ALT (آلانین آمینوترانسفراز) از کیت مربوطه (پارس آزمون؛ ایران) و دستگاه اسپکتروفتومتر UV/Vis مدل DR6000 (HACH؛ ایالات متحده) استفاده و میزان فعالیت آنها براساس واحد بر میلی گرم پروتئین گزارش شد.

پس از بیهوشی، تشریح سطح شکمی ماهیان و نمونه برداری 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 تثبیت سازی بقیه مراحل تهیه مقاطع بافتی انجام شد. از نمونه‌ها پس از انجام عملیات معمول بافت‌شناسی مقاطع بافتی به ضخامت ۶ میکرون تهیه و سپس به روش معمول رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوژین انجام شد. در نهایت از لام‌های تهیه شده زیر میکروسکوپ نوری Olympus CKX53 (Olympus؛ ژاپن) مجهز به دوربین با بزرگ‌نمایی  $\times 400$  عکس برداری شد [21].

پس از بررسی نرمال بودن داده‌ها، به منظور آنالیز از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه استفاده و وجود تفاوت معنی دار در داده‌ها در سطح احتمال  $p \leq 0.05$  به کمک پس آزمون دانکن، بررسی شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با کمک نرم افزار SPSS 19 و رسم نمودارها با استفاده از Excel 2007 انجام شد.

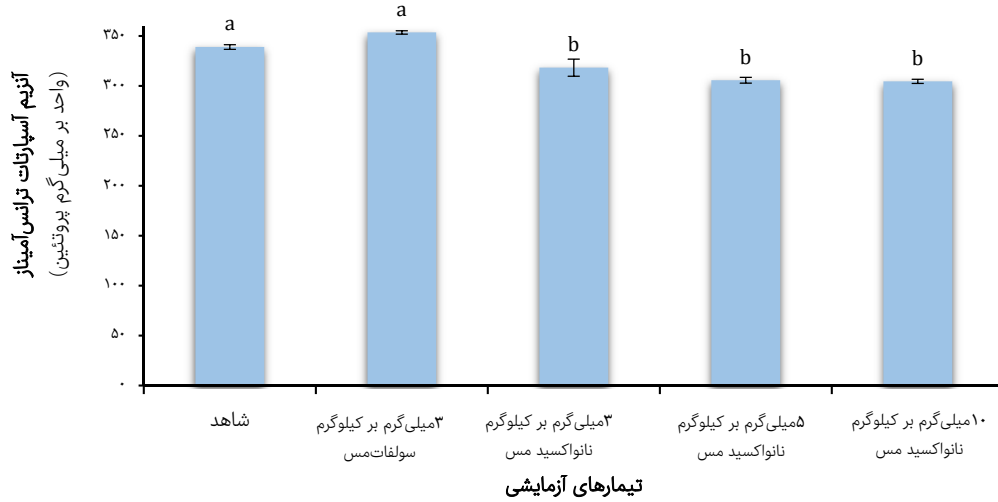
## یافته‌ها

نتایج اثرات جایگزینی سولفات مس 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 سولفات مس با نانوذره مس ۱۰ میلی گرم دارای اختلاف معنی دار بود ( $p < 0.05$ ) و در سایر تیمارها اختلاف معنی داری وجود نداشت ( $p > 0.05$ ). در میانگین وزن نهایی تیمار سولفات مس نسبت به تیمارهای نانوذرات ۵ و ۱۰ میلی گرم دارای کاهش معنی داری بود ( $p < 0.05$ ). بین نرخ رشد ویژه تیمار سولفات مس با تیمار نانوذره مس ۱۰ میلی گرم اختلاف معنی دار وجود داشت و نرخ رشد ویژه

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

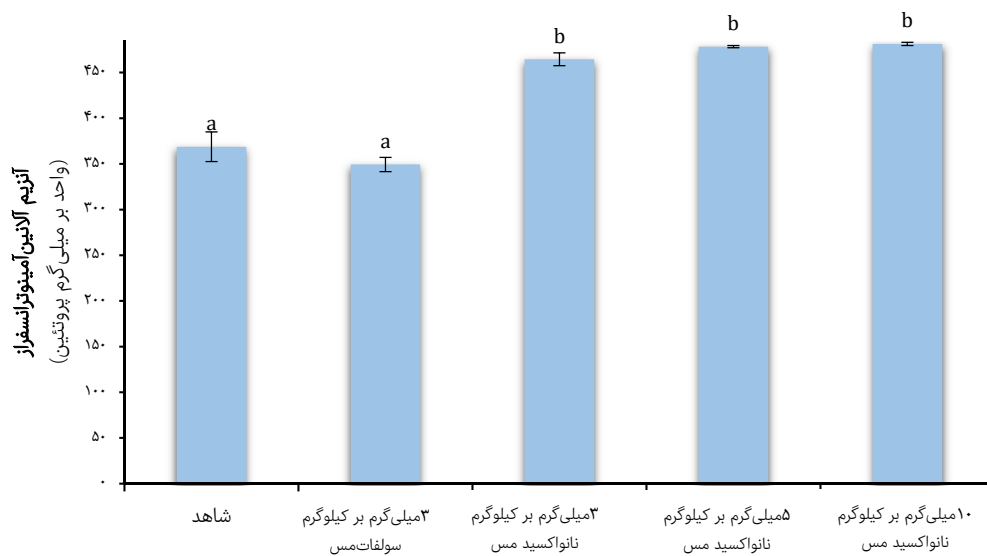
| تیمار                     | درصد افزایش وزن       | وزن نهایی             | نرخ رشد ویژه         | درصد بازماندگی        | شاخص وضعیت           | شاخص کبدی         | شاخص احشایی       |
|---------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-------------------|-------------------|
| شاهد                      | $79/41 \pm 3/68^{ab}$ | $13/24 \pm 0/26^{ab}$ | $0/97 \pm 0/04^{ab}$ | $90/47 \pm 4/77^{ab}$ | $3/03 \pm 0/06^{ab}$ | $6/81 \pm 0/13^a$ | $5/84 \pm 0/23^a$ |
| سولفات مس (۳ میلی گرم)    | $72/19 \pm 4/03^a$    | $12/68 \pm 0/25^a$    | $0/91 \pm 0/04^a$    | $71/40 \pm 0/00^a$    | $2/88 \pm 0/06^a$    | $6/40 \pm 0/18^a$ | $5/52 \pm 0/21^a$ |
| نانوذرات مس (۳ میلی گرم)  | $83/90 \pm 1/66^{ab}$ | $13/56 \pm 0/13^{ab}$ | $1/02 \pm 0/01^{ab}$ | $90/47 \pm 9/53^{ab}$ | $3/13 \pm 0/07^{ab}$ | $6/71 \pm 0/13^a$ | $5/85 \pm 0/11^a$ |
| نانوذرات مس (۵ میلی گرم)  | $88/65 \pm 4/40^{ab}$ | $13/95 \pm 0/31^b$    | $1/06 \pm 0/04^{ab}$ | $95/23 \pm 4/77^b$    | $3/20 \pm 0/07^b$    | $6/68 \pm 0/28^a$ | $5/55 \pm 0/10^a$ |
| نانوذرات مس (۱۰ میلی گرم) | $89/61 \pm 4/21^b$    | $14/02 \pm 0/29^b$    | $1/07 \pm 0/04^b$    | $85/70 \pm 8/26^{ab}$ | $3/24 \pm 0/04^b$    | $6/72 \pm 0/14^a$ | $5/49 \pm 0/12^a$ |

حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین گروه‌های آزمایشی است.



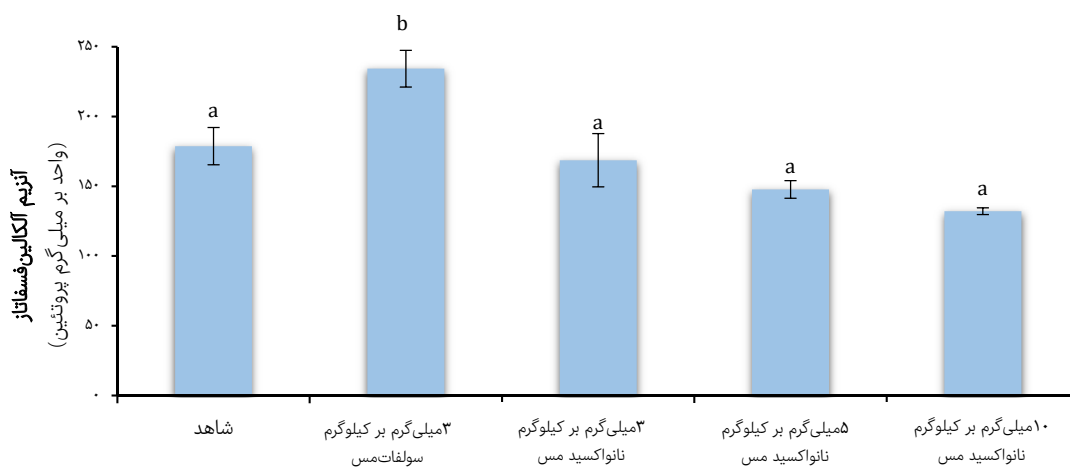
تیمارهای آزمایشی

نمودار (۲) اثر جایگزینی سولفات مس با نانواکسید مس در جیره غذایی بر آنزیم کبدی آلانین فسفاتاز ماهیان قرمز



تیمارهای آزمایشی

نمودار (۳) اثر جایگزینی سولفات مس با نانواکسید مس در جیره غذایی بر آنزیم کبدی آسپارات ترانس آمیناز ماهیان قرمز

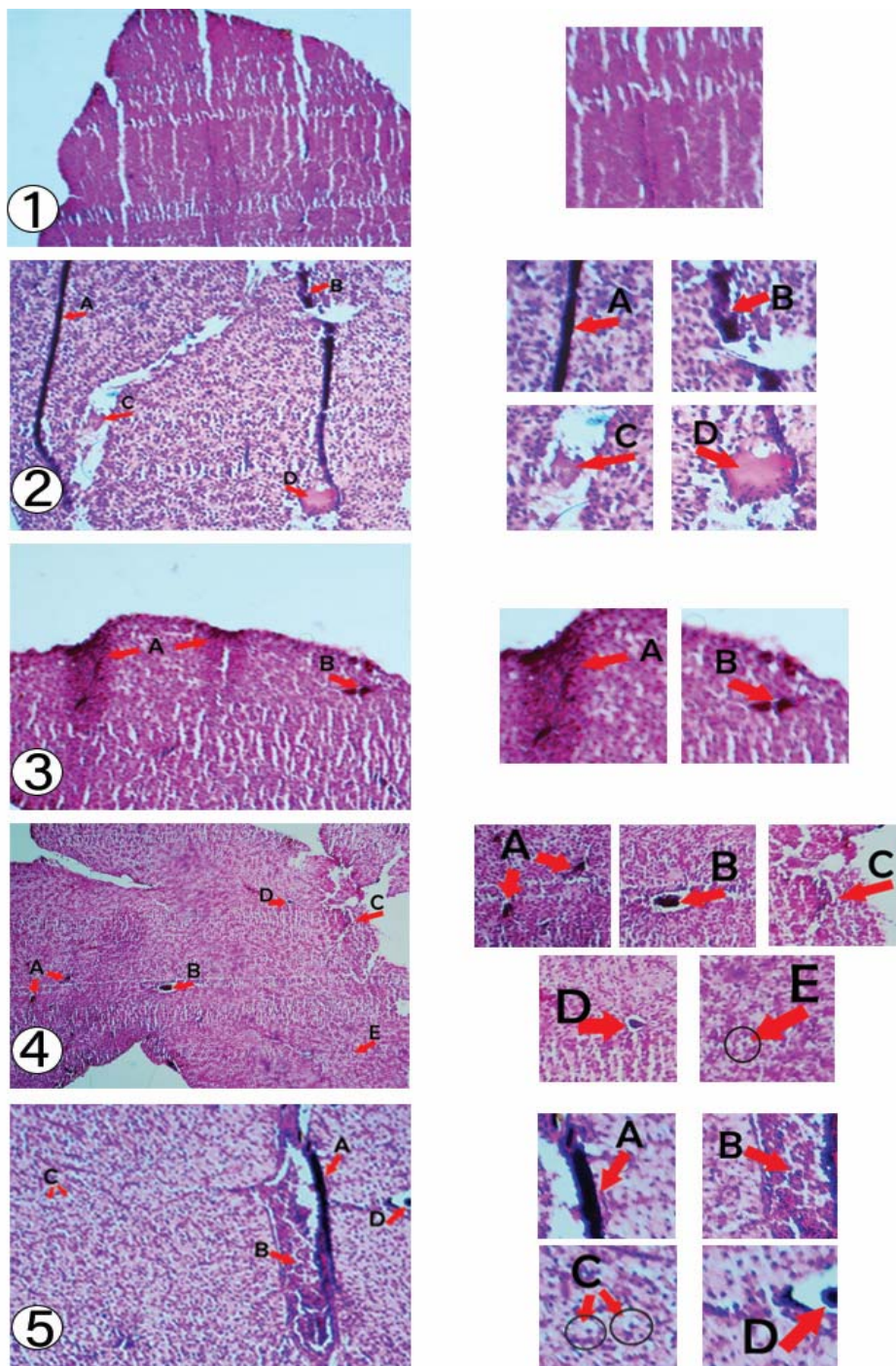


تیمارهای آزمایشی

نمودار (۴) اثر جایگزینی سولفات مس با نانواکسید مس در جیره غذایی بر آنزیم کبدی آلانین آمینوترانسفراز ماهیان قرمز

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

علامت - و \* به ترتیب نشان‌دهنده عدم وجود عارضه و وجود عارضه هستند و تعدد علامت \* شدت آسیب را نشان می‌دهد.



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

براساس نتایج مطالعه حاضر، کاربرد نانوذرات مس در مقایسه با تیمار سولفات مس توانسته است اثرات مثبتی ایجاد کند. فاکتورهای رشد در تیمارهای نانوذرات ۵ و ۱۰ میلی گرم نسبت به تیمار سولفات مس افزایش معنی داری داشتند که می تواند به دلیل اثرات مستقیم بر فعالیت آنزیم های گوارشی و در نتیجه هضم و بهره وری بیشتر از جیره غذایی باشد. همچنین در بافت کبد تیمارهای نانوذرات ۵ و ۱۰ میلی گرم تجمع چربی مشاهده شده است که افزایش چربی بدن را نشان می دهد. این اثرات می تواند به اندازه ریز نانوذرات و توانایی نفوذ و واکنش پذیری بیشتر و به دنبال آن افزایش گوارش پذیری و جذب نانوذرات در مقایسه با سولفات مس مرتبط باشد. در این راستا، نتایج مطالعه عبداله زاده و همکاران [22] نیز نشان داد که شاخص های رشد ویژه، شاخص وضعیت، میانگین وزن نهایی و درصد بازماندگی بچه ماهیان آمو در گروه های سولفات مس ۱/۵ میلی گرم در لیتر و نانوذره اکسید مس ۲۰۰ میلی گرم در لیتر، نسبت به سایر گروه ها کاهش یافته بود که می تواند در ارتباط با تاثیر گذاری فلزات سنگین بر مخاط و پرزهای روده و اثر تخریبی این ماده بر پرزهای روده در این گروه ها باشد و با مطالعه دیگری با عنوان اثر نانوذرات مس بر نوجوان کپور هم راستا است و نشان می دهد که نانوذرات مس ابتدا در روده و بعد از آن در آبشش تجمع می کنند [23]. همچنین براساس مطالعه // یاسوینی و همکاران که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد، مشخص شد که افزودن مکمل نانوذره مس به میزان ۲ میلی گرم بر کیلوگرم در جیره غذایی می تواند عملکرد رشد و تغذیه، ضریب تبدیل غذایی، وضعیت آنتی اکسیدانی و پاسخ ایمنی را به طور معنی داری در ماهی سی بریم بهبود بخشد. همچنین مکمل مس در فرم نانوذره در مقایسه با فرم طبیعی (سولفات مس)، موثرتر است و سبب کاهش خطر بالقوه مس در غلظت های بالا می شود [24]. شو و همکاران [25] با قراردادن قزل آلا رنگین کمان در معرض غلظت های ۱۰۰ میکرو لیتر سولفات مس و نانوذرات مس و مشاهده به ترتیب میزان ۸۵ و ۱۴٪ مرگ و میر در هر کدام از این تیمارها، به این نتیجه رسیدند که سمیت یک عنصر فلزی به صورت 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 سوخت و ساز بدن برای سم زدایی و حفظ تعادل و همچنین افزایش دفعات پوست اندازی میگو بیان کردند.

به طور کلی باید بیان کرد که استفاده از شاخص هایی نظیر درصد افزایش وزن بدن و شاخص های تغذیه ای همیشه نمی تواند گویای وضعیت سلامت ماهیان در شرایط رویارویی با سطوح مختلف مواد معدنی در جیره های غذایی به ویژه نانوذرات باشد. استفاده از شاخص های بیوشیمیایی نظیر اندازه گیری آنزیم ها و شاخص های آسیب شناسی می تواند در اطلاع از وضعیت سلامت موجود موثر باشد. مهم ترین آنزیم های تشخیص سلامت کبد، آمینوترانسفرازها

هستند. اصولاً این آنزیم ها به طور عادی داخل سلول های کبدی وجود دارند، ولی اگر به هر دلیلی کبد آسیب ببیند، این آنزیم ها وارد جریان خون می شوند. با توجه به شدت آسیب، نشت ALT و AST متفاوت خواهد بود. به طوری که در آسیب های خفیف ALT درون سیتوپلاسم هپاتوسیت ها، به محیط خارج سلولی نشت می کند ولی با افزایش جراحات و یا در آسیب های بزرگ تر و بیشتر، AST که در اندامک های سلولی از قبیل میتوکندری ها وجود دارد، به بیرون نشت می کند و وارد جریان خون می شود. در واقع در زمان جراحات خفیف بافت ها مقدار غالب آسپارات آمینوترانسفراز از نوع سیتوپلاسمی آن و مقدار کمی هم آسپارات آمینوترانسفراز میتوکندریایی است. آسیب های شدید بافت ها منجر به آزادسازی مقادیر زیادی آنزیم آسپارات آمینوترانسفراز میتوکندری می شود. سطوح بالای ترانس آمینازها می تواند علایم سوء تغذیه و آسیب ارگان ها را بروز دهد، بنابراین کاهش این آنزیم نشان دهنده 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 سولفات مس بیشتر است می تواند حاکی از آسیب سلولی خفیف در تیمارهای مورد تغذیه با نانوذرات باشد و با توجه به اینکه میزان آنزیم AST در تیمار سولفات مس نسبت به تیمارهای نانوذرات مس بیشتر است می تواند آسیب حاد وارد شده به سلول های پارانشیم کبد ناشی از سولفات مس را بیان کند. نتایج نشان دهنده اثرات منفی بیشتر سولفات مس نسبت به نانوذرات مس بر ماهیان قرمز بوده است. ALT و AST اجزای سرمی آنزیم های غیر عملکردی پلاسما هستند که به طور طبیعی در سلول های برخی اندام ها از جمله کبد قرار گرفته اند. آسیب های وارده به سلول های کبدی یا دستخوش تغییر شدن نفوذ پذیری در سطح غشای پلاسمایی آنها زمانی که در مواجهه با نانوذرات قرار می گیرند، می تواند منجر به بالا رفتن سطح این آنزیم ها در سرم شود [28]. آمینوترانسفرازها، سلامت سلول های کبدی را نشان می دهند و در مراحل ابتدایی آسیب های بافت کبدی، به نظر می رسد نفوذ پذیری غشا در اثر ورود آنزیم های سیتوپلاسمی هپاتوسیت ها از سلول ها به خون بیشتر می شود. آکالین فسفاتاز یک آنزیم عمومی است و در بافت های مختلف وجود دارد. در اثر آسیب های کبدی، میزان این آنزیم در خون افزایش می یابد [27]. افزایش فعالیت سرمی این آنزیم در تیمار دارای سولفات مس، به آسیب های وارده به بافت های مختلف از جمله بافت کبد باز می گردد، چرا که به نظر می رسد سولفات مس از طریق دستگاه گردش خون به بافت های مختلف از جمله کبد وارد و موجب تخریب بافت ها شده است، در حالی که میزان آن در تیمار شاهد و تیمارهای دارای نانوذرات مس به ویژه تیمار نانوذرات مس ۱۰ میلی گرم، کمتر است. بافت کبد تیمار سولفات مس دارای آسیب و تخریب سلولی شدید بود که با افزایش آزادسازی آنزیم ALP به جریان خون همراه بود و این آنزیم در تیمار سولفات مس نسبت به تیمارهای دیگر به صورت معنی داری با فعالیت بیشتری ارزیابی شد. در بافت کبد تیمارهای ۵ و ۱۰ میلی گرم نانوذرات نیز آسیب شدید ایجاد کرد و

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<sup>[31]</sup>. همچنین براساس مطالعه نورین و همکاران<sup>[32]</sup>، نانوذرات مس و اکسیدمس سبب ایجاد آسیب‌های بافتی مانند نکروز، تورم هیپاتوسیت‌ها 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 تلاپپای نیل، قرارگرفتن در معرض ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر (و یا بیشتر) سولفات مس 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 سولفات مس افزایش می‌یابد<sup>[33]</sup>. همچنین در این مطالعات به آسیب‌های بافتی مثل افزایش حفره‌حفره‌شدن سیتوپلاسم، کاسته‌شدن از تعداد هسته‌های هیپاتوسیت و پیکنوز هسته‌ای ناشی از تاثیر سولفات مس 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<sup>[34]</sup>. مطالعه وانگ و همکاران<sup>[35]</sup> نیز نشان داد که درصد آپوپتوزیس و نکروز بافت‌های مختلف در ماهی هامور معمولی پس از قرارگیری در معرض نانوذرات مس و سولفات مس به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد بود. همچنین در مطالعه حسینی و همکاران<sup>[15]</sup> مشخص شد که هر دو نوع مس (سولفات مس و نانوذرات مس)، به کبد و کلیه ماهی آسیب می‌رسانند، اما سولفات مس منجر به آسیب شدید نسبت به نانوذرات مس می‌شود و به‌طور کلی به نظر می‌رسد سولفات مس 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<sup>[17]</sup>. 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.

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<sup>[29]</sup>، غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذره اکسیدمس سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های ALT، 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 هیپاتیت‌های ویروسی، انفارکتوس قلبی و صدمات عضلانی را نشان می‌دهد. همچنین در مطالعه دیگری نانوذره اکسیدمس در غلظت‌های ۷/۵ و ۱۵ میلی‌گرم در لیتر در مدت زمان دو هفته باعث افزایش سطح فعالیت آنزیم‌های ALT، AST و ALP کبد ماهی تیلپایا شد و اختلال کامل مشخص و معنی‌داری در عملکرد کبد و کلیه تیلپایای نیل ایجاد کرد. در مطالعه حسینی و همکاران<sup>[15]</sup> که به مدت ۱۴ روز بر روی ماهی کپور معمولی انجام گرفت، افزایش معنی‌داری در سطح آنزیم AST تحت تاثیر سولفات مس و آنزیم ALT تحت تاثیر نانوذره مس و سولفات مس نسبت به شاهد در پلاسمای خون این ماهی مشاهده شد.

در کنار بررسی اثرات سولفات مس 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 سولفات مس 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 سولفات مس 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 سولفات مس دارای آسیب سلولی بالا به‌صورت نکروز و پرخونی شدید و همچنین آتروفی شدن سلول‌های کبدی بود که باعث افزایش آزادسازی آنزیم ALP به جریان خون شده است. در بافت کبد تیمارهای ۵ و ۱۰ میلی‌گرم 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<sup>[30]</sup>، نانوذرات مس سبب هایپرتروفی 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

## نتیجه گیری

استفاده از نانوذرات مس در سطوح مختلف ۳، ۵ و ۱۰ میلی گرم در کیلوگرم به جای سولفات مس در جیره غذایی می تواند باعث بهبود عملکرد رشد ماهیان قرمز شود. همچنین سنجش فعالیت آنزیم های کبدی و آسیب شناسی بافتی نشان داد که سولفات مس و غلظت های بالای نانوذرات مس در تیمار ۵ و ۱۰ میلی گرم نانوذره مس در کیلوگرم جیره غذایی اثرات منفی بر آنزیم های کبدی دارند و باعث ایجاد ضایعات بافتی و اثرات مخرب می شوند. آسیب های غلظت بالای نانوذرات مس (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) با آسیب های غلظت پائینی از سولفات مس (۳ میلی گرم بر کیلوگرم) برابری می کند که این نشان دهنده سمیت و مخرب بودن این ماده حتی در غلظت های پایین است. به طور کلی می توان نتیجه گرفت که میزان ۳ میلی گرم نانوذره مس در اکولوگرم رژیم غذایی باعث بهبود کارایی رشد و سلامت کبد بوده است، در حالی که غلظت مشابه از سولفات مس تاثیرات منفی بر کبد و رشد ماهی قرمز داشت و بهتر است جایگزینی سولفات مس با نانوذرات مس در سطوح ۳ میلی گرم در کیلوگرم جیره غذایی باشد. غلظت ۳ میلی گرم بر کیلوگرم سولفات مس برای ماهی قرمز سمی است و توصیه می شود مطالعات بعدی، غلظت های پایین تر را مورد آزمایش قرار دهند.

**تشکر و قدردانی:** نویسندگان از زحمات کارشناسان آزمایشگاه مرکزی، همچنین کارشناس مرکز آبی پروری دانشگاه شهرکرد تقدیر و تشکر می کنند.

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

**تعارض منافع:** نویسندگان اعلام می دارند که هیچ گونه تعارض منافی میان آنها وجود ندارد.

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

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

## منابع

- 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, Mariojouis 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 Mater. 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

- 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

- 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, Nazarhaghghi 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 (*Rutilus rutilus 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, Khayatzaadeh 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-Espéricueta MG, Inzunza-Rojas A, Osuna-López I, Páez-Osuna F, Lozano-Olvera R, et al. Histological effects of Cu<sup>2+</sup> 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 Biochemistry. *Int J Environ Res*. 2008;2(2):189-98.