



Original Research Paper

Effect of Nickel Oxide Size on Acute and Chronic Toxicity of aqueduct Fish

Javad Kharkan, Mohammad Hossein Sayadi *, Mohammad Reza Rezaei, Mahmood Hajiani

Department of Environmental Engineering, Faculty of Natural Resources and Environment, University of Birjand, Birjand, Iran

Key Words

Nickel oxide nanoparticles
Histopathological changes
Hematology
Erythrocytes
Liver enzymes

Abstract

Introduction: Extensive use of nanoparticles in various sectors causes uncontrolled entry into the environment and because there are no laws and regulations on the environmental safety of nanomaterials in many countries around the world Therefore, there is still not enough information about their harmful effects on the environment.

Materials & methods: Acute toxicity of nickel oxide nanoparticles and nickel oxide on black fish was calculated based on OECD method. The bioaccumulation of nickel oxide nanoparticles and nickel oxide in the tissues of gill, intestine, liver and kidney of black fish was calculated for a period of 28 days. Then the fish were placed in clean water for a period of 28 days to calculate the depuration of these compounds. The toxicity effects of nickel oxide nanoparticles and nickel oxide on gill and intestinal tissues and its effects on blood markers and liver enzymes were investigated.

Results: Acute toxicity values for nickel oxide nanoparticles and nickel oxide were reported to be 207.82 and 104.79 mg / l, respectively, so nickel oxide toxicity is higher than nickel oxide nanoparticles. The trend of changes in the bioaccumulation of nickel oxide was equal to liver> intestine> kidney> gill, respectively. Nickel oxide causes histopathological changes to swelling goblet cells, increases the number of goblet cells and increases the number of blood cells in the intestine. The number of RBCs (million/mm³) in the blood of fish exposed to nickel oxide nanoparticles, nickel oxide and control were 3.7±0.29, 2.1±0.18 and 4.1±0.28, respectively. The number of RBCs in fish exposed to nickel oxide was significantly lower than the control group (p<0.05). Nickel oxide nanoparticles cause deformed of blackfish erythrocytes, while nickel oxide causes deformed and vacuolated of black fish erythrocytes. The levels of liver enzymes ALP, AST and ALT in fish exposed to nickel oxide nanoparticles and nickel oxide were significantly (p<0.05) higher than the control group after 28 days.

Conclusion: Evaluation of the toxicity effects of nickel oxide nanoparticles and nickel oxide on aquatic organisms is essential to protect organisms from the harmful effects of these compounds.

* Corresponding Author's email: mh_sayadi@birjand.ac.ir

Received: 30 January 2022; Reviewed: 28 February 2022; Revised: 29 March 2022; Accepted: 31 May 2022

(DOI): [10.22034/AEJ.2022.339476.2794](https://doi.org/10.22034/AEJ.2022.339476.2794)

مقاله پژوهشی

تأثیر اندازه اکسیدهای نیکل بر روی سمیت حاد و مزمن در ماهی های قنات

جواد خارکن، محمدحسین صیادی^{*}، محمدرضا رضائی، محمود حاجیانی

گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران

کلمات کلیدی

نانوذرات اکسید نیکل
تغییرات هیستوپاتولوژی
هماتولوژی
گلبول قرمز
آنزیم های کبدی

چکیده

مقدمه: استفاده گسترده از نانوذرات در بخش های مختلف منجر به ورود غیرقابل کنترل در محیط زیست می شود و به دلیل این که قوانین و نظارتی در مورد ایمنی محیط زیستی نانومواد در بسیاری از کشورهای جهان وجود ندارد هنوز اطلاعات کافی در مورد اثرات زیان بار آنها در محیط وجود ندارد.

مواد و روش ها: سمیت حاد نانوذرات اکسیدنیکل و اکسیدیکل بر روی سیاه ماهی براساس روش OECD محاسبه شد. میزان تجمع زیستی نانوذرات اکسیدنیکل و اکسیدیکل در بافت های آبشش، روده، کبد و کلیه سیاه ماهی برای یک دوره ۲۸ روز محاسبه شد سپس ماهیان برای یک دوره ۲۸ روزه در آب تمیز قرار گرفتند تا میزان دفع این ترکیبات محاسبه شود. اثرات سمیت نانوذرات اکسیدنیکل و اکسید نیکل بر روی بافت های آبشش و روده و اثرات آن بر روی شاخص های خونی و آنزیم های کبدی بررسی شد.

نتایج: مقادیر سمیت حاد برای نانوذرات اکسیدنیکل و اکسیدیکل به ترتیب برابر ۲۰۷/۸۲ و ۱۰۴/۷۹ میلی گرم بر لیتر گزارش شد. لذا سمیت اکسیدنیکل از نانوذرات اکسیدنیکل بیش تر می باشد. روند تغییرات تجمع زیستی اکسیدنیکل به ترتیب برابر کبد < روده < کلیه < آبشش بوده است. اکسیدنیکل سبب آسیب های هیستوپاتولوژی تورم سلول های گابلت، افزایش تعداد سلول های گابلت و افزایش تعداد سلول های خونی در روده می شود. تعداد گلبول های قرمز (میلیون بر میلی متر مکعب) در خون ماهیان در معرض نانوذرات اکسیدنیکل، اکسیدیکل و کنترل به ترتیب ۳/۷±۰/۲۹، ۲/۱±۰/۱۸ و ۴/۱±۰/۲۸ می باشد. تعداد گلبول های قرمز (RBC) خون ماهیان در معرض اکسیدنیکل به طور معنی داری کم تر از گروه کنترل می باشد ($p < 0/05$). نانوذرات اکسیدنیکل سبب تغییر شکل گلبول های قرمز سیاه ماهی می شود در حالی که اکسید نیکل سبب تغییر شکل و واکنوله شدن گلبول های قرمز سیاه ماهی می شود. سطح آنزیم های کبدی آلکالین فسفاتاز (ALP)، آسپارات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) در ماهیان در معرض نانوذرات اکسیدنیکل و اکسیدیکل به طور معنی داری ($p < 0/05$) پس از ۲۸ روز بیش تر از گروه کنترل می باشد.

بحث و نتیجه گیری: ارزیابی اثرات سمیت نانوذرات اکسیدنیکل و اکسیدیکل بر موجودات آبی ضروری است تا بتوان ارگانسیم ها را از اثرات مضر این ترکیبات محافظت کرد.

مقدمه

امروزه نانوتکنولوژی یک رشته علمی در حال رشد است این رشته، از اوایل دهه ۹۰ جزء فناوری‌های مدرن می‌باشد. تحقیقات علمی گسترده‌ای در زمینه فناوری نانو انجام شده است که منجر به توسعه انواع مختلفی از نانومواد شده است. یکی از رایج‌ترین نانومواد، نانوذرات مهندسی شده می‌باشد که دارای حداقل یک بعد بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر می‌باشد. نانوذرات به دلیل خواص منحصر به فرد خود مانند سطح ویژه و واکنش پذیری زیاد عملکردی بهتری نسبت به سایر مواد دارد (۱، ۲). بدون شک نانوذرات برای بهبود کیفیت زندگی انسان ضروری می‌باشند اما از سوی دیگر استفاده گسترده از نانوذرات در بخش‌های مختلف منجر به تخلیه غیرقابل کنترل در محیط زیست می‌شود (۳). به دلیل این که قوانین و نظارتی در مورد ایمنی محیط زیستی نانومواد در بسیاری از کشورهای جهان وجود ندارد و یا در حال توسعه می‌باشد هنوز اطلاعات کافی در مورد نحوه انتشار و اثرات زیان‌بار آن‌ها در محیط وجود ندارد (۴). بنابراین، نگرانی‌های سم‌شناسی از قبیل درک بهتر تحرک نانومواد، فراهمی زیستی و میزان سمیت آن در محیط وجود دارد (۵). در میان طیف گسترده‌ای از نانوذرات، نانوذرات نیکل به عنوان یکی از محبوب‌ترین نانومواد مورد استفاده در بخش صنعتی، سنتز، مهندسی و پزشکی هستند (۶). نانو ذرات اکسیدنیکل به دلیل خاصیت مغناطیسی آن‌ها در بسیاری از محصولات صنعتی و تجاری مانند سلول‌های خورشیدی، سلول‌های سوختی، مبدل‌های کاتالیزوری در اتومبیل، باتری‌های یونی لیتیومی و حسگرهای زیستی کاربرد گسترده‌ای دارند (۶) لذا باعث توزیع گسترده آن‌ها در محیط زیست می‌شود و از آنجایی که در نهایت این نانوذرات وارد محیط‌های آبی می‌شوند اثرات مضر زیادی بر روی اورگانیزم‌های آبی می‌گذارند (۷). پایداری زیاد و حلالیت کم نانو ذرات اکسیدنیکل در محیط‌های آبی باعث می‌شود که این نانوذرات به فرم جامد در محیط باقی‌مانند (۸) لذا پس از ورود به آب می‌توانند توسط موجودات زنده بلعیده شوند یا به اندام‌های خارجی آن‌ها متصل شوند و یا جذب غشاهای داخلی موجودات زنده شوند در نتیجه می‌توانند باعث سمیت شوند (۹) از طرفی نانوذرات نیکل به دلیل کوچک بودن اندازه آن این توانایی را دارند تا از طریق بزرگ‌نمایی زیستی وارد زنجیره غذایی شکارچیان بالاتر شوند (۱۰). آسیب‌شناسی بافتی و مطالعات خون‌شناسی می‌توانند بررسی مناسبی از سلامت بافت و خون در موجود زنده فراهم کنند و میزان اثرات مواجهه با آلاننده‌های محیطی را منعکس کنند و می‌تواند به عنوان شاخص آلودگی محیط مورد ارزیابی قرار گیرد (۱۱). گزارشات نشان می‌دهند که نانوذرات اکسید فلزی و نمک‌های آن در محیط‌های آبی رفتار

متفاوتی دارند و می‌توانند اثرات سم‌شناسی متفاوتی بر روی آبزیان داشته باشند. مطالعات نشان می‌دهند که نانوذرات اکسید آهن باعث آسیب‌های آنوریزم، نکروز و هایپرپلازی در بافت آبشش سیاه ماهی و افزایش تعداد سلول‌های گلبت، افزایش تعداد لنفوسیت‌ها و تورم سلول‌های گلبت در بافت روده سیاه ماهی می‌شود (۱۲). بررسی آسیب‌های بافتی ناشی از نانوذرات مس بر روی آبشش ماهی (*Cyprinus carpio*) شامل هایپرپلازی، نکروز، هم‌جوشی لاملاهای ثانویه و اودما می‌باشد (۱۳). در محیط‌های آبی، ماهیان درازبایی‌های اکوتوکسیکولوژیک مدل‌های عالی هستند زیرا طیف تحمل گسترده‌ای دارند و شاخص‌های خوبی برای بررسی اثرات طولانی مدت آلاننده‌ها می‌باشند (۱۴). سیاه ماهی جزء ماهیان بسیار مهم قناتی در شرق ایران می‌باشند این گونه دارای رنگ خاکستری متمایل به سیاه بر روی سر و دو طرف بدن، رنگ روشن‌تر در باله‌ها و رنگ سفید در ناحیه شکمی می‌باشد و بدنی دوکی شکل دارد (۱۵). مطالعه حاضر سعی دارد به مقایسه سمیت نانوذرات اکسیدنیکل و اکسیدنیکل پیردازد لذا هدف از این مطالعه مقایسه سمیت حاد، سمیت مزمن، تغییرات هیستوپاتولوژی و مطالعات هماتولوژی نانوذرات اکسیدنیکل (NiO NPs) در مقایسه با اکسیدنیکل (NiO) بر روی سیاه ماهی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نانوذرات اکسیدنیکل با شکل ظاهری کروی، رنگ سیاه و درجه خلوص ۹۹/۵ درصد (کد محصول ۱-۹۹-۱۳۱۳) از شرکت سیگما آلدريج و اکسیدنیکل با شکل ظاهری بلوری، رنگ سبز و درجه خلوص ۹۹ درصد از شرکت مرک آلمان خریداری شد. در این پژوهش سیاه ماهیان از قنات‌های مختلف اشکفتوک ($32^{\circ}N$ $97^{\circ}W$ $32^{\circ}N$ $97^{\circ}W$)، حاجی‌آباد ($28^{\circ}N$ $46^{\circ}W$ $32^{\circ}N$ $46^{\circ}W$)، مهدی‌آباد ($28^{\circ}N$ $46^{\circ}W$ $32^{\circ}N$ $46^{\circ}W$) و سریشه ($28^{\circ}N$ $46^{\circ}W$ $32^{\circ}N$ $46^{\circ}W$) جمع‌آوری شدند و به همراه آب قنات به آزمایشگاه لیمنولوژی دانشگاه بیرجند منتقل شدند. آب قنات‌های مورد بررسی دارای pH (۷/۹۷-۸/۲۶)، شوری (۱۴۸۸ تا ۱۰۹۳ میکروزیمنس بر سانتی‌متر) و دمای متوسط ۱۹ درجه سانتی‌گراد می‌باشند. سیاه‌ماهیان به مدت ۱۰ روز پیش از شروع آزمایشات در مخازن فایبرگلاس ۲۰۰ لیتری همراه با هوادهی نگه‌داری شدند در طول این مدت ماهی‌ها روزانه ۲ بار و هر بار به میزان ۱ درصد وزن بدن تغذیه شدند.

سمیت حاد: برای بررسی سمیت حاد نانوذرات اکسیدنیکل و اکسیدنیکل بر روی سیاه‌ماهی (طول کل بدن به طور متوسط 4 ± 2.4 سانتی‌متر؛ وزن متوسط بدن 2 ± 0.17 گرم) براساس دستورالعمل

جدا شد بدین صورت که ۳ عدد ماهی به صورت کاملاً تصادفی از گروه کنترل و ماهی‌های مورد مواجهه با نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل خارج شد و بافت‌های مذکور تشریح شدند نمونه‌ها بعد از فیکس شدن در محلول بافر فرمالین ۱۰٪ به مدت ۲۴ ساعت، جهت آگیری و نگه‌داری در الکل اتانول ۷۰ درصد قرار داده شد مراحل آگیری با استفاده از الکل‌های ۹۰، ۹۵ و ۱۰۰ درصد و نهایتاً با الکل بوتیلیک (۱۲ ساعت) انجام گرفت نمونه‌ها بعد از ۹ ساعت نگه‌داری درون پارافین مایع (در آن با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد) قالب‌گیری شد و با استفاده از میکروتوم برش‌های ۵ میکرومتری از آن‌ها تهیه گردید. برش‌ها بر روی لام چسبانده شد، در آن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد برای مطالعه بافت‌شناسی نمونه‌ها بعد از پارافین زدائی و آگیری با استفاده از هماتوکسیلین اتوزین رنگ‌آمیزی شده و با میکروسکوپ نوری معمولی مطالعه و عکس‌برداری صورت گرفت. خونگیری از ماهیان بی‌هوش شده از طریق ورید دمی با استفاده از سرنگ پلاستیکی یک بار مصرف، مجهز به سوزن ۲۳ انجام شد و در لوله‌های ضد انعقاد EDTA پتاسیم جداگانه جمع‌آوری شدند و بلافاصله در جعبه یخ نگه‌داری شدند برای جمع‌آوری سرم، مقدار کمی خون در ویال‌های اپندورف بدون ضد انعقاد به مدت ۵ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند پس از لخته شدن خون، نمونه‌ها با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند سپس سرم جمع‌آوری شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد و برای بررسی آنزیم‌های کبدی فریز شدند. برای اندازه‌گیری میزان تجمع زیستی نیکل، سرم نمونه‌های خون جمع‌آوری شد سپس به نمونه‌ها با نسبت ۲:۱ پرکلریک اسید و نیتریک اسید اضافه شد و در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد هضم شدند پس از سرد شدن نمونه‌های هضم شده، آب مقطر به آن اضافه و سپس فیلتر شد. غلظت یون نیکل در سرم با استفاده از طیف‌سنجی جذب اتمی کوره گرافیتی اندازه‌گیری شد و به صورت میکروگرم در لیتر خون بیان شد.

مطالعات هماتولوژی: شمارش تفریقی گلبول‌های قرمز (RBC)

خون به صورت دستی پس از رقیق شدن با محلول ایزوتونیک نمک طعام (کلرید سدیم ۰/۸۵ گرم و آب مقطر ۱۰۰ میلی‌لیتر) توسط لام نئوبار با استفاده از فرمول ۱ انجام شد. بدین ترتیب که جهت شمارش گلبول‌های قرمز ابتدا لوله حاوی نمونه کاملاً تکان داده شد تا خون کاملاً یکنواخت گردد سپس با استفاده از پمپ ملانژور مخصوص شمارش گلبول قرمز و محلول رقیق‌کننده، رقت ۱ به ۲۰۰ به دست آمد. شمارش گلبول‌های قرمز بر روی لام نئوبار (در ۵ خانه از ۲۵ خانه) و در زیر میکروسکوپ انجام شد (۱۶). فرمول ۱:

= تعداد گلبول‌های قرمز در یک میلی‌متر مکعب خون
 $200 \times 10 \times 5$ مجموع تعداد گلبول‌های قرمز شمارش شده در ۵ مربع کوچک

OECD عمل شد تا در نهایت غلظت دوز متوسط‌کننده (Lethal concentration 50) مشخص شود. ابتدا یک محلول ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از نانوذرات اکسی نیکل و اکسید با آب مقطر تهیه شد. برای سنجش سمیت حاد پیش‌تستی انجام شد که در آن غلظت‌های متفاوتی برای نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل در معرض ماهیان قرار گرفتند (غلظت‌های ۵، ۲۰، ۳۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر برای نانوذرات اکسید نیکل و نمک‌های نیکل به مدت ۹۶ ساعت در معرض ۱۰ تا ماهی قرار گرفتند). در طول آزمایش مقادیر مرگ و میر در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت اندازه‌گیری و ثبت شدند و در نهایت براساس داده‌های به دست آمده میزان سمیت حاد محاسبه شد.

سمیت مزمن (تجمع زیستی و دفع نانوذرات اکسید نیکل)

و اکسید نیکل در بافت‌های مختلف سیاه ماهی): برای انجام سمیت مزمن، سیاه‌ماهی در معرض نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل برای دو دوره تجمع زیستی و دفع قرار گرفتند. بر اساس مقدار سمیت حاد محاسبه شده در دوره سمیت حاد، معادل یک دهم از مقدار سمیت حاد برای نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل، به ترتیب ۲۰/۷۸ و ۱۰/۴۷ میلی‌گرم بر لیتر به عنوان غلظت زیر کشندگی انتخاب شد. سیاه‌ماهی در ۳ گروه ۳۰ قطعه‌ای (یک گروه کنترل) در معرض نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل برای دوره تجمع زیستی و دفع قرار گرفتند. در طول دوره تجمع زیستی، ماهی‌ها در طی سه دوره ۱۴، ۷ و ۲۸ روز در گروه‌های مختلف در آکواریوم قرار گرفتند سپس ماهی‌های باقی‌مانده درون آب تمیز قرار گرفتند تا میزان کاهش نانو ذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل در سه زمان ۷، ۱۴ و ۲۸ روز محاسبه شود. پس از پایان هر دوره بافت‌های آبشش، روده، کبد و کلیه سیاه‌ماهی جدا شد و هضم اسیدی بافت‌های سیاه‌ماهی با استفاده از مخلوط اسید نیتریک و اسید پرکلریک با نسبت ۲ به ۱ میلی‌لیتر انجام شد و نمونه‌ها بر روی حمام آب به مدت ۴ تا ۶ ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا هضم اسیدی انجام شود پس از فیلتر کردن نمونه‌ها توسط کاغذ صافی، غلظت یون نیکل در هر بافت با استفاده از طیف‌سنجی جذب اتمی کوره گرافیتی (ContrAA 700, Analytik Jena AG, Germany) اندازه‌گیری شد. برای جلوگیری از رسوب نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل به طور روزانه ۵۰ درصد آب آکواریوم‌ها جایگزین شد. حد تشخیص و انحراف استاندارد نسبی (relative standard deviation) (RSD) دستگاه جذب اتمی کوره گرافیتی برای نیکل به ترتیب ۰/۵۵ میلی‌گرم بر لیتر و ۲ درصد بود.

مطالعات هیستوپاتولوژی: برای انجام مطالعات هیستوپاتولوژی

بافت‌های آبشش و روده سیاه ماهی از هر ۳ گروه (یک گروه کنترل)

برای بررسی تغییرات ساختاری در گلبول‌های قرمز خون سیاه‌ماهیان پس از ۲۸ روز، بلافاصله پس از جمع‌آوری خون، اسمیر خون روی یک لام شیشه‌ای تهیه شد و در معرض هوا خشک شد. سپس لام با استفاده از متانول ثابت شد و برای رنگ‌آمیزی از رنگ‌آمیزی گیمسا استفاده شد. در نهایت تغییرات ساختاری گلبول‌های قرمز زیر میکروسکوپ مشاهده شد (۱۹). تعیین مقدار آنزیم‌های کبدی آلکالین فسفاتاز، آسپارات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز به وسیله دستگاه اتوانالایزر انجام شد. برای اندازه‌گیری آنزیم‌های کبدی، خون گرفته شده از سیاه‌ماهی در دستگاه سانتریفیوژ با ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند و سرم جداسازی شده برای تعیین مقادیر آنزیم‌های کبدی در دستگاه اتوانالایزر مدل gc san Chem 200 قرار گرفتند. برای بررسی آنزیم‌های کبدی خونگیری از ۵ ماهی به‌طور تصادفی از هر آکواریوم انجام شد و نمونه‌های خون با همدیگر مخلوط شدند و در نهایت یک نمونه خون از هر آکواریوم به‌دست آمد.

تحلیل آماری: برای بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف اسمیرنوف استفاده شد با توجه به نرمال نبودن داده‌ها از آزمون‌های ناپارامتریک کروسکال والیس برای تعیین اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های تیمار شده در سطح احتمال $p < 0.05$ استفاده شد. تمام داده‌های به‌دست آمده به‌صورت میانگین $\pm$ و انحراف معیار (S.D.) آورده شده است. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام شد.

نتایج

سمیت حاد: مقادیر سمیت حاد برای نانوذرات اکسیدنیکل و اکسیدنیکل به‌ترتیب برابر $207/82$ و $104/79$ میلی‌گرم بر لیتر گزارش شد (جدول ۱). مقدار سمیت حاد برای نانوذرات اکسیدنیکل و اکسید نیکل در سیاه‌ماهی با افزایش زمان قرارگیری در معرض نانوذرات اکسیدنیکل و اکسیدنیکل از ۲۴ ساعت به ۹۶ ساعت کاهش پیدا می‌کند. براساس این یافته‌ها، اکسیدنیکل نسبت به نانوذرات اکسید نیکل سمیت بالاتری دارد. نتایج نشان داد که در ۲۴ ساعت اول قرار گرفتن در معرض ترکیب‌های مختلف نیکل، نانوذرات اکسیدنیکل سمیت بیش‌تری نسبت به اکسیدنیکل دارند. اما در ۹۶ ساعت سمیت اکسیدنیکل بیش‌تر از نانوذرات اکسیدنیکل می‌باشد. در طی دوره آزمایش، پارامترهای کیفیت آب از قبیل درجه حرارت ($22/5 \pm 2$) درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ($6/4 \pm 0/3$) میلی‌گرم بر لیتر، pH ($7/8 \pm 0/2$)، سختی کل (385 ± 16) میلی‌گرم بر لیتر و هدایت الکتریکی (1379 ± 61) میکروزیمنس بر سانتی‌متر اندازه‌گیری شد.

عدد ۱۰ ضریب تصحیح فاصله بین لام و لامل و عدد ۲۰۰ ضریب رقت می‌باشد

جهت شمارش گلبول‌های سفید (WBC) با استفاده از پیت ملانژور سفید و محلول رقیق‌کننده مارکانو (اسیداستیک گلاسیال ۲ میلی‌لیتر، محلول ویوله دووانسین یک درصد ۱ میلی‌لیتر و آب مقطر ۱۰۰ میلی‌لیتر) رقت ۱ به ۲۰ تهیه شد سپس تعداد گلبول‌های سفید خون بر روی لام نئوبار (در ۴ خانه مخصوص گلبول‌های سفید) در زیر میکروسکوپ با استفاده از فرمول ۲ محاسبه شد (۱۶). فرمول ۲:

$10 \times 20 \times (W/4) =$ تعداد گلبول‌های سفید در یک میلی‌متر مکعب خون
W: تعداد گلبول‌های سفید در هر خانه لام نئوبار، عدد ۱۰ ضریب تصحیح فاصله بین لام و لامل و عدد ۲۰ ضریب رقت می‌باشد.

میزان هموگلوبین (Hb) توسط هموگلوبینومتر سه‌لی تخمین زده شد. هموگلوبینومتر سه‌لی از چهار قسمت مجزا پیت، لوله همومتر مدرج، میله هم‌زن و قطره چکان تشکیل شده است. اسیدکلریدریک در لوله همومتر مدرج تا علامت مشخص ریخته شد و لوله همومتر در هموگلوبینومتر سه‌لی قرار داده شد ۲۰ میکرولیتر خون توسط پیت به لوله همومتر اضافه شد و نمونه‌های خون و اسیدکلریدریک با میله هم‌زن مخلوط شدند و محلول به مدت ۱۰ دقیقه در لوله همومتر باقی ماند تا اسید هماتین تشکیل شود سپس اسید هماتین با افزودن آب مقطر با قطره چکان رقیق شد تا رنگ لوله هماتین (حاوی اسید هماتین) با رنگ لوله کالیبراسیون دستگاه منطبق شود. عدد نشان داده شده بر روی لوله همومتر مقدار هموگلوبین خون را نشان می‌دهد (۱۷). برای محاسبه مقادیر هماتوکریت (Ht)، $\frac{2}{3}$ لوله موبینه با نمونه خون پر شدند و درب آن با خمیر هماتوکریت بسته شد و با ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و با استفاده از فرمول ۳ میزان هماتوکریت برحسب درصد محاسبه شد (۱۸). فرمول ۳:

(ارتفاع گلبول قرمز و پلاسما) / (ارتفاع گلبول قرمز $\times 100$)

اندیس‌های گلبولی مانند حجم متوسط گلبول‌های قرمز (MCV)، حجم متوسط گلبول‌های قرمز (MCH) و غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MCHC) براساس فرمول‌های ۴، ۵ و ۶ محاسبه شدند. فرمول ۴:

(بر حسب فمتولیتر) (مقدار گلبول قرمز) / (هماتوکریت $\times 10$)

فرمول ۵:

(بر حسب پیکوگرم) (مقدار گلبول قرمز) / (هموگلوبین $\times 10$)

فرمول ۶:

(میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) $100 \times$ (هماتوکریت) / (هموگلوبین $\times 10$)

جدول ۱: غلظت کشنده ۵۰ (Lethal concentration 50) یا غلظت یک ماده شیمیایی که ۵۰٪ از جمعیت نمونه را می کشد، بر روی سیاه ماهی در معرض نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل

غلظت (میلی گرم بر لیتر)	LC				نانوذرات اکسید نیکل / اکسید نیکل
	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت	
نانوذرات اکسید نیکل	۸۰۳/۱۶	۳۷۲/۴۰	۲۶۹/۸۱	۲۰۷/۸۲	LC ₅₀
اکسید نیکل	۱۷۰۳/۶۱	۴۰۳/۳۷	۱۸۳/۶۴	۱۰۴/۷۹	LC ₅₀

تجمع زیستی و دفع نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل

در بافت های مختلف سیاه ماهی: الگوی تجمع زیستی نانوذرات اکسید نیکل از ۷-۲۸ روز دارای روند نزولی به ترتیب روده < کبد > کلیه < آبشش می باشد هم چنین روند تغییرات تجمع زیستی اکسید نیکل به ترتیب برابر کبد < روده > کلیه < آبشش بوده است (شکل ۱). نتایج نشان می دهد که بیش ترین میزان تجمع زیستی نانوذرات اکسید نیکل در بافت روده سیاه ماهی ($5/52 \pm 0/44$ میکروگرم بر لیتر) می باشد و کم ترین میزان تجمع زیستی در بافت آبشش سیاه ماهی ($0/39 \pm 0/03$ میکروگرم بر لیتر) بوده است و بیش ترین میزان تجمع زیستی اکسید نیکل در بافت کبد سیاه ماهی ($1/65 \pm 0/14$ میکروگرم بر لیتر) می باشد و کم ترین میزان تجمع زیستی اکسید نیکل در بافت آبشش سیاه ماهی ($0/27 \pm 0/01$ میکروگرم بر لیتر) بوده است. نتایج نشان می دهد که بافت هدف برای تجمع زیستی نانوذرات اکسید نیکل، روده و برای اکسید نیکل، کبد سیاه ماهی می باشد. الگوی دفع نانوذرات اکسید نیکل در طی ۲۸-۵۶ روز دارای روند نزولی روده < آبشش > کلیه < کبد می باشد و روند تغییرات دفع اکسید نیکل دارای روند نزولی روده < کبد > آبشش < کلیه بوده است این مطالعه نشان می دهد که نانوذرات اکسید نیکل در بافت های روده، آبشش، کلیه و کبد به ترتیب ۹۸/۲۴، ۸۴/۶۲، ۸۳/۶۷ و ۷۵/۱۱ درصد و اکسید نیکل در بافت های روده، کبد، آبشش و کلیه به ترتیب ۷۹/۸۵، ۷۴/۵۵، ۷۴/۰۷ و ۵۱/۵۵ درصد کاهش داشته اند. به طور کلی نتایج این مطالعه نشان می دهد که در پایان دوره دفع بیش ترین میزان دفع نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل در بافت روده سیاه ماهی می باشد. سیاه ماهی در طول انجام سمیت مزمن در معرض نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل تغییرات رفتاری متفاوتی را از خود نشان دادند ماهیانی که در معرض نانوذرات اکسید نیکل قرار گرفتند رفتارهایی از قبیل باز و بسته کردن سریع آبشش ها، شنا و فعالیت زیاد را از خود نشان دادند و ماهیانی که در معرض اکسید نیکل قرار گرفتند رفتارهایی مثل ضعف و بی حالی شنا در اطراف سنگ های هوا را داشتند.

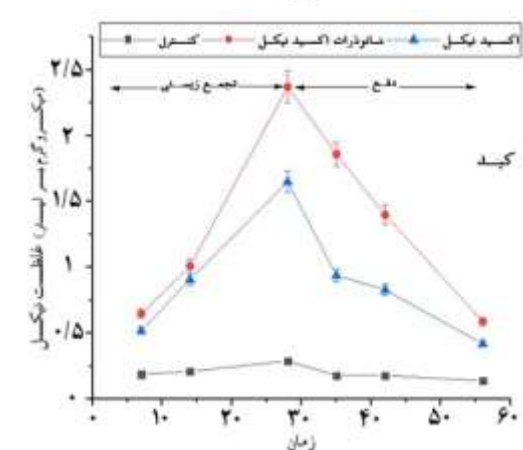
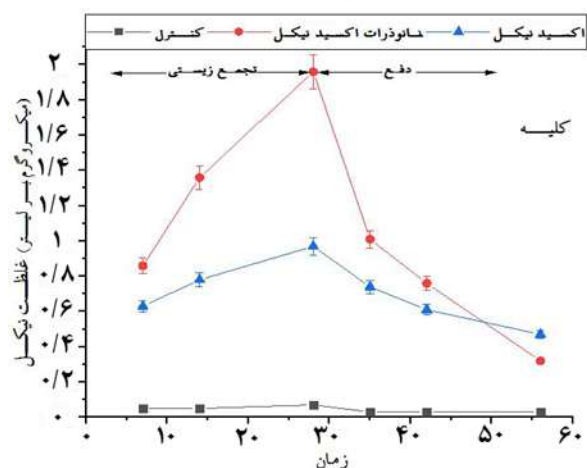
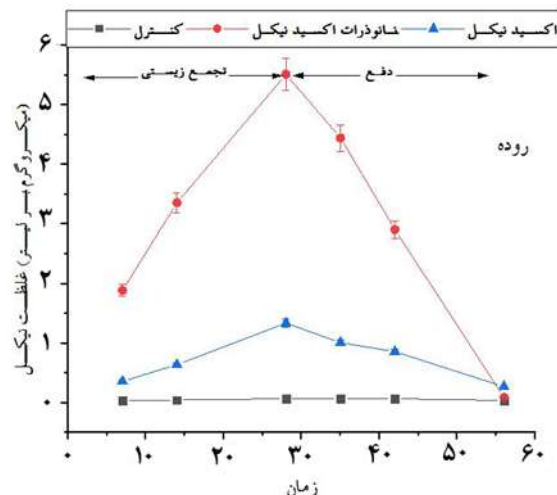
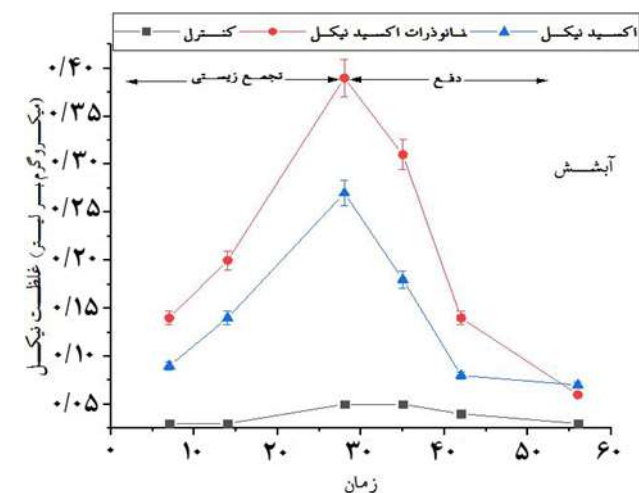
مطالعات هیستوپاتولوژی: برخی از آسیب های هیستوپاتولوژی

بر روی آبشش سیاه ماهی شامل هم جوشی لاملاهای ثانویه، کوتاه

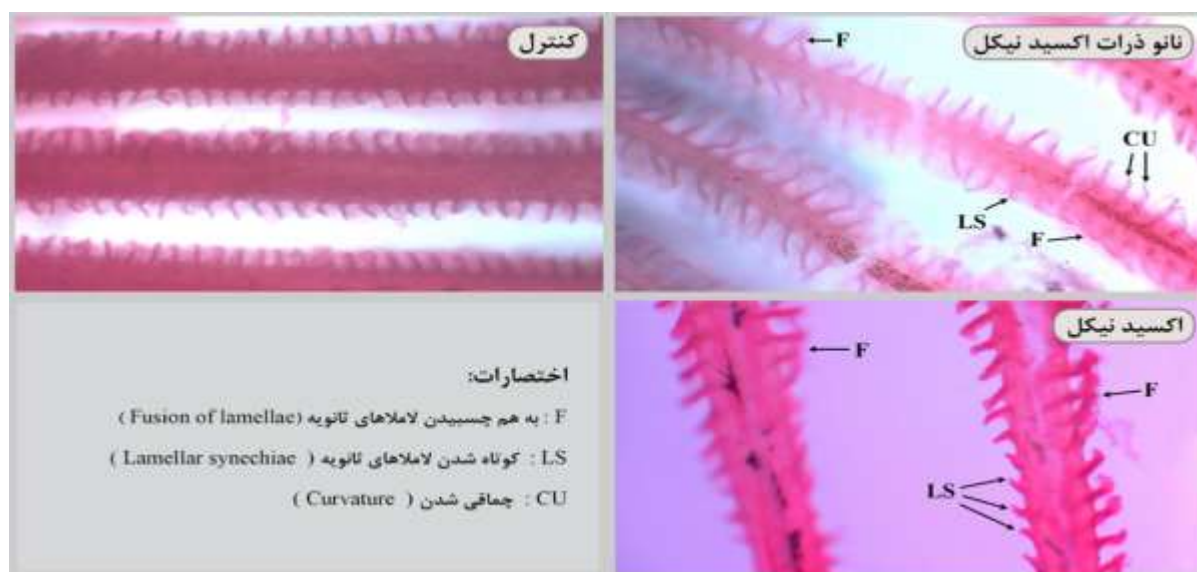
شدن لاملاهای ثانویه و چماقی شدن می باشد که ممکن است مربوط به یک درجه از استرس باشد. میزان سمیت ناشی از نانوذرات اکسید نیکل بر روی بافت آبشش سیاه ماهی نسبت به اکسید نیکل بیش تر می باشد و باعث آسیب های هیستوپاتولوژی بیش تری بر روی آبشش می شود. نانوذرات اکسید نیکل در آبشش سیاه ماهی سبب آسیب هایی از قبیل هم جوشی لاملاهای ثانویه، کوتاه شدن لاملاهای ثانویه و چماقی شدن را نشان دادند در حالی که اکسید نیکل سبب هم جوشی لاملاهای ثانویه و کوتاه شدن لاملاهای ثانویه در آبشش می شود (شکل ۲). در روده پس از ۲۸ روز قرار گرفتن در معرض نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل برخی از آسیب های هیستوپاتولوژی شامل تورم سلول های گابلت، افزایش تعداد سلول های گابلت و افزایش تعداد سلول های خونی می باشد میزان سمیت اکسید نیکل بر روی بافت روده سیاه ماهی نسبت به نانوذرات اکسید نیکل بیش تر می باشد و سبب ایجاد آسیب های بیش تری در روده سیاه ماهی می شود نانو ذرات اکسید نیکل در روده سیاه ماهی سبب آسیب هایی از قبیل تورم سلول های گابلت و افزایش تعداد سلول های گابلت می شود در حالی که اکسید نیکل سبب تورم سلول های گابلت، افزایش تعداد سلول های گابلت و افزایش تعداد سلول های خونی در روده می شود (شکل ۳).

میزان تجمع زیستی نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل

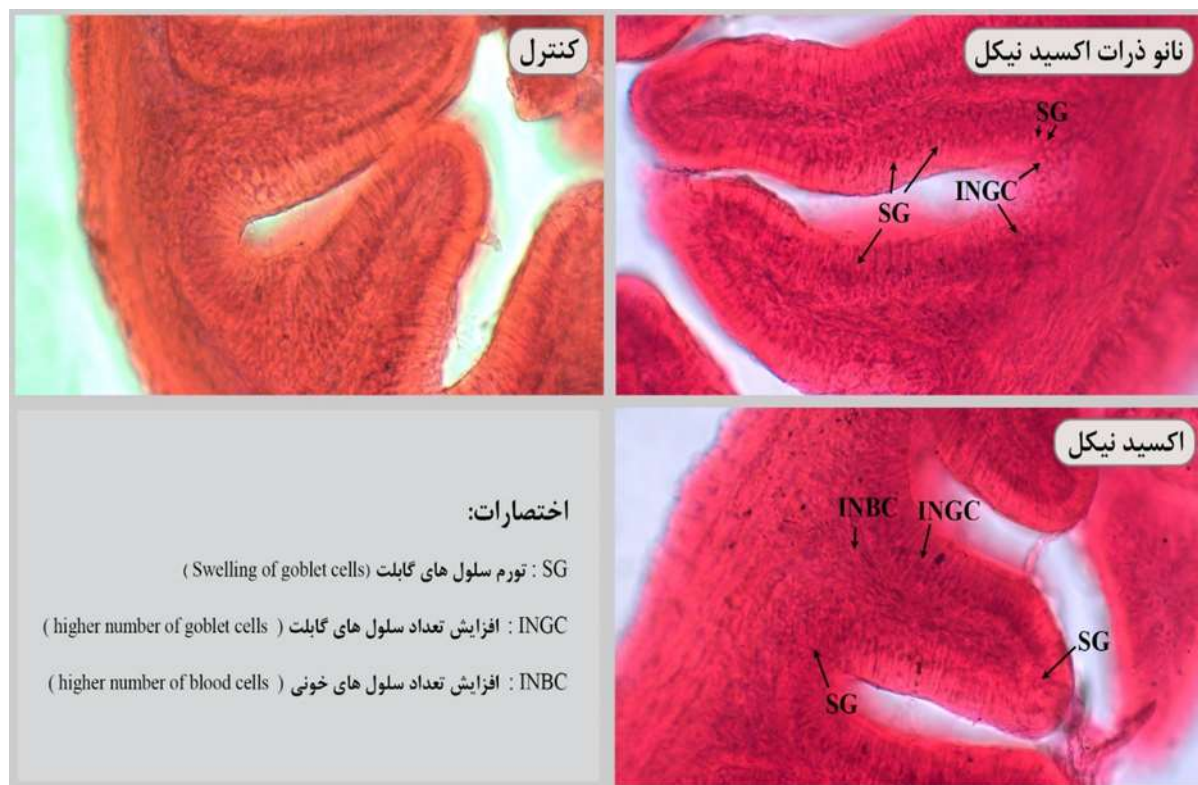
در خون سیاه ماهی: براساس نتایج به دست آمده میزان تجمع زیستی یون نیکل برای سه دوره ۷، ۱۴ و ۲۸ روز در ماهیانی که در معرض نانوذرات اکسید نیکل بوده اند به ترتیب $52/61 \pm 4/20$ ، $64/83 \pm 6/48$ و $86/94 \pm 6/08$ میکروگرم بر لیتر می باشد و برای ماهیانی که در معرض اکسید نیکل بوده اند به ترتیب برابر $36/52 \pm 2/92$ ، $41/47 \pm 3/73$ و $62/84 \pm 5/65$ میکروگرم بر لیتر می باشد. نتایج نشان می دهد که میزان تجمع زیستی یون نیکل در خون ماهیان در معرض نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل با گذشت زمان از ۷-۲۸ روز افزایش پیدا می کند و میزان تجمع زیستی نانوذرات اکسید نیکل در خون سیاه ماهی بیش تر از اکسید نیکل می باشد (شکل ۴).



شکل ۱: میزان تجمع زیستی و دفع نیکل (میکروگرم بر لیتر) در بافت‌های آبشش، روده، کبد و کلیه سیاه ماهی در معرض نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل

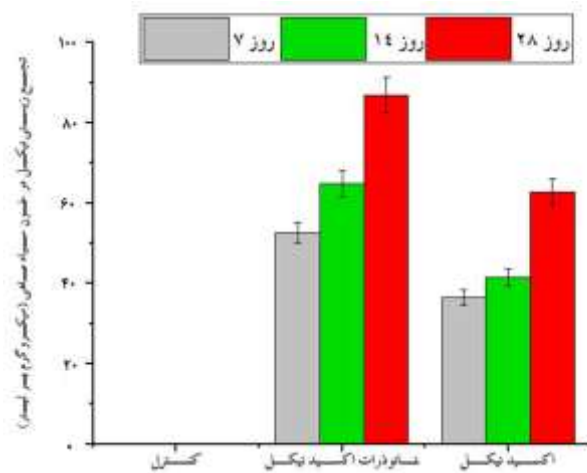


شکل ۲: آسیب‌های هیستوپاتولوژی در آبشش سیاه ماهی در معرض نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل پس از ۲۸ روز (X۴۰۰)



شکل ۳: آسیب های هیستوپاتولوژی در روده سیاه ماهی در معرض نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل پس از ۲۸ روز (X۴۰۰)

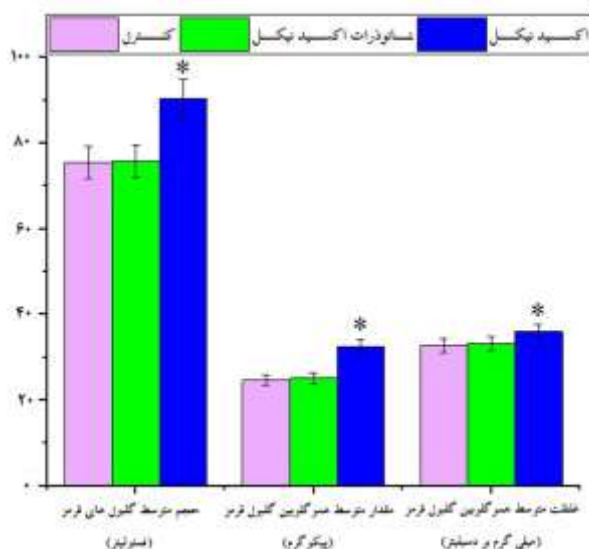
معنی داری کم تر از گروه کنترل می باشد ($p < 0.05$). به همین ترتیب، براساس شکل ۵ تعداد گلبول های سفید (هزار بر میلی متر مکعب) در خون ماهیان در معرض نانوذرات اکسید نیکل، اکسید نیکل و کنترل به ترتیب 21.9 ± 2.19 ، 14.3 ± 1.14 و 24.7 ± 2.22 می باشد. نتایج نشان می دهد که تعداد گلبول های سفید خون ماهیان در معرض اکسید نیکل به طور معنی داری کم تر از گروه کنترل می باشد ($p < 0.05$). علاوه بر این قرار گرفتن سیاه ماهی در معرض نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل سبب تغییرات قابل توجهی در میزان هموگلوبین و هماتوکریت شده است به گونه ای که میزان هموگلوبین (میلی گرم بر دسی لیتر) ماهیان در معرض نانوذرات اکسید نیکل، اکسید نیکل و کنترل به ترتیب 9.29 ± 0.65 ، 6.83 ± 0.54 و 10.12 ± 0.80 می باشد و میزان هماتوکریت به ترتیب 2.28 ± 0.52 ، 1.9 ± 0.95 و 3.1 ± 2.79 درصد می باشد نتایج نشان می دهد که میزان هموگلوبین و هماتوکریت (درصد) خون ماهیان در معرض اکسید نیکل به طور معنی داری ($p < 0.05$) کم تر از گروه کنترل می باشد.



شکل ۴: میزان تجمع زیستی نیکل در خون سیاه ماهی در معرض نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل برای سه دوره ۷، ۱۴ و ۲۸ روز

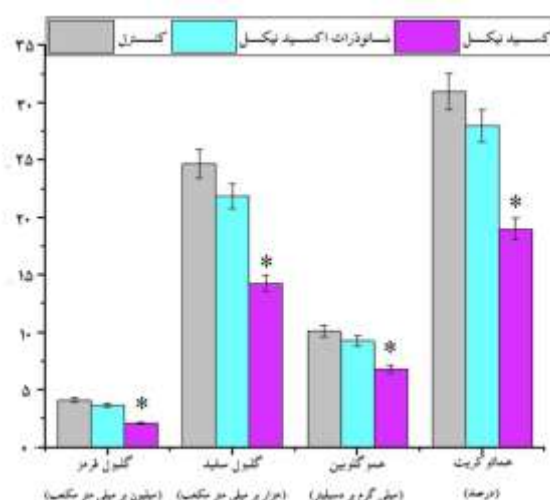
سمیت نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل بر روی پارامترهای

هماتولوژی سیاه ماهی: تعداد گلبول های قرمز (میلیون بر میلی متر مکعب) در خون ماهیان در معرض نانوذرات اکسید نیکل، اکسید نیکل و کنترل به ترتیب 3.7 ± 0.29 ، 2.1 ± 0.18 و 4.1 ± 0.28 می باشد. تعداد گلبول های قرمز خون ماهیان در معرض اکسید نیکل به طور



شکل ۵: تغییر در تعداد گلبول قرمز، گلبول سفید، هموگلوبین و هماتوکریت خون سیاه ماهی در معرض نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل پس از ۲۸ روز

(*) اختلاف معنی داری ($p < 0.05$) با گروه کنترل دارد)



شکل ۶: تغییر در تعداد گلبول قرمز، گلبول سفید، هموگلوبین و هماتوکریت خون سیاه ماهی در معرض نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل پس از ۲۸ روز

(*) اختلاف معنی داری ($p < 0.05$) با گروه کنترل دارد)

شاخص‌های خونی حجم متوسط گلبول قرمز، مقدار متوسط هموگلوبین گلبول قرمز و غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز: اثرات نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل بر روی شاخص‌های خونی حجم متوسط گلبول قرمز، مقدار متوسط هموگلوبین گلبول قرمز و غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز در شکل ۶ نشان داده شده است. بر اساس نتایج به دست آمده مقدار حجم متوسط گلبول قرمز، مقدار متوسط هموگلوبین گلبول قرمز و غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز خون ماهیان در معرض نانوذرات اکسید نیکل هیچ گونه اختلاف معنی داری با گروه کنترل نداشتند اما مقدار شاخص‌های حجم متوسط گلبول قرمز، مقدار متوسط هموگلوبین گلبول قرمز و غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز خون ماهیان در معرض اکسید نیکل به طور معنی داری ($p < 0.05$) بیش تر از گروه کنترل می باشد.

تغییرات ساختار گلبول‌های قرمز خون سیاه ماهی در معرض نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل: تغییر در ساختار گلبول‌های قرمز ناشی از سمیت نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل را می توان پس از ۲۸ روز مشاهده کرد (شکل ۷). میزان سمیت اکسید نیکل بر روی ساختار گلبول‌های قرمز بیش تر از نانوذرات اکسید نیکل می باشد. نانوذرات اکسید نیکل سبب تغییر شکل گلبول‌های قرمز سیاه ماهی می شود در حالی که اکسید نیکل سبب تغییر شکل و واکتوله شدن گلبول‌های قرمز سیاه ماهی می شود.



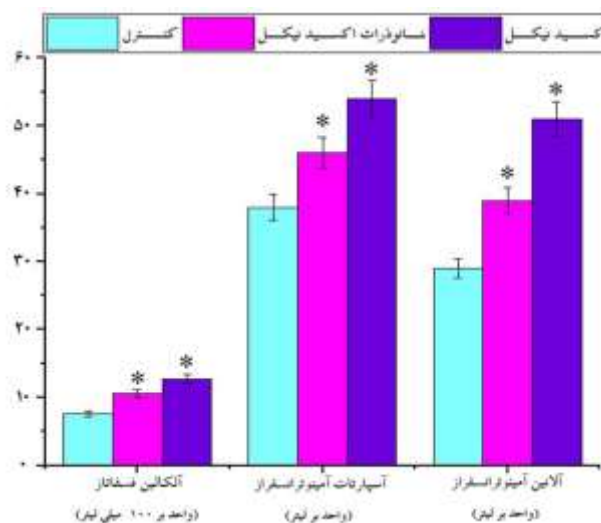
شکل ۷: تغییرات ساختار گلبول‌های قرمز خون سیاه ماهی در معرض نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل پس از ۲۸ روز (X400)

اثر نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل بر روی آنزیم‌های کبدی سیاه ماهی: اثر نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل بر عملکرد کبد از نظر فعالیت آنزیم‌های کبدی (آلکالین فسفاتاز، آسپارات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز) در شکل ۸ نشان داده شده است. نتایج نشان می دهد که سطح آنزیم‌های کبدی آلکالین فسفاتاز، آسپارات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز در ماهیان در معرض نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل به طور معنی داری ($p < 0.05$) پس از ۲۸ روز بیش تر از گروه کنترل می باشد.

گراف به ترتیب برابر ۲/۶ و ۶۵/۱ میلی گرم بر لیتر می باشد و بیان کردند که سمیت حاد با افزایش زمان قرارگیری در معرض نانوذرات از ۲۴ ساعت به ۹۶ ساعت کاهش پیدا می کند (۲۲). Kumar و همکاران، سمیت حاد نانوذرات سلیوم و نمک سلیوم را در ماهی (*P. hypophthalmus*) محاسبه کردند و بیان کردند که مقدار سمیت حاد نانوذرات سلیوم و نمک سلیوم به ترتیب برابر ۳/۹۷ و ۵/۸۲ میلی گرم بر لیتر می باشد و با گذشت زمان از ۲۴ ساعت به ۹۶ ساعت میزان سمیت حاد کاهش پیدا می کند (۲۳). Song و همکاران، میزان سمیت حاد نانوذرات مس را بر روی سه گونه ماهی (*Oncorhynchus mykiss*)، (*Pimephales promelas*) و (*Danio rerio*) به ترتیب ۰/۶۸، ۰/۲۸ و ۰/۲۲ میلی گرم بر لیتر گزارش دادند و بیان کردند که با گذشت زمان از ۲۴ ساعت به ۹۶ ساعت میزان سمیت حاد کاهش پیدا می کند (۲۴).

تجمع زیستی و دفع نانوذرات اکسیدنیکل و اکسیدنیکل در بافت های مختلف سیاه ماهی: در این پژوهش الگوی تجمع زیستی نانوذرات اکسید نیکل در سیاه ماهی دارای روند نزولی به ترتیب روده < کبد < کلیه < آبشش می باشد. هم چنین روند تغییرات تجمع زیستی اکسیدنیکل به ترتیب برابر کبد < روده < کلیه < آبشش بوده است از طرفی الگوی دفع نانوذرات اکسیدنیکل دارای روند نزولی روده < آبشش < کلیه < کبد می باشد و روند تغییرات دفع اکسیدنیکل دارای روند نزولی روده < کبد < آبشش < کلیه بوده است. تجمع زیستی، افزایش سطح آلاینده ها در بدن یک موجود زنده است جذب آب و غذا دو راه ورود هر آلاینده به بدن است (۴) از آن جایی که نانوذرات در نهایت وارد محیط های آبی می شوند به دلیل کوچک بودن اندازه آن، این توانایی را دارند تا از طریق بزرگ نمایی زیستی وارد زنجیره غذایی اورگانسم های مختلف شوند (۱۰). دریافت نانوذرات توسط موجود زنده می تواند دو اثر داشته باشد، یا در بدن ذخیره می شود یا به شکل خوش خیم دفع می شود ماهیان توانایی تجمع زیستی نانو ذرات مختلف را از طریق جذب به دست می آورند (۲۵). در مطالعات مشابه Sayadi و همکاران، گزارش دادند که بالاترین میزان تجمع زیستی نمک های آهن در آبشش بوده و پس از آن به ترتیب در روده، کبد و کلیه می باشد هم چنین، دفع نمک های آهن ابتدا در بافت آبشش شروع شده و پس از آن به ترتیب در کلیه، کبد و روده رخ داده است (۱۲). میزان تجمع زیستی نانوذرات نیکل در بافت های مختلف ماهی تیلاپیا موزامبیک (*Oreochromis mossambicus*) به ترتیب کبد < آبشش < پوست می باشد بنابراین نتایج نشان می دهد که کبد، بافت هدف برای تجمع زیستی نانوذرات نیکل در ماهی تیلاپیا موزامبیک می باشد (۲۶). Mansouri و همکاران، گزارش دادند که تجمع زیستی مس در بافت های مختلف ماهی کپور به ترتیب برابر کبد < آبشش < عضله < روده می باشد (۲۷).

مطالعات هیستوپاتولوژی: مطالعات بافت شناسی ماهی یکی از تکنیک های مفید در سم شناسی آبیان است که می تواند اطلاعات



شکل ۸: تغییرات آنزیم های کبدی در خون سیاه ماهی در معرض نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل پس از ۲۸ روز (*: اختلاف معنی داری ($p < 0.05$) با گروه کنترل دارد)

بحث

استفاده های گسترده از نانوذرات مختلف سبب توزیع آن در اکوسیستم های آبی می شود و در نهایت سلامت موجودات آبی را تحت تاثیر قرار می دهد نانوذرات در اکوسیستم های آبی سبب سمیت سلولی و سمیت ژنتیکی در موجودات آبی می شوند و موجودات آبی با تغییر در فیزیولوژی مولکولی و رفتارشان به این سمیت پاسخ می دهند (۲۰). تجمع زیستی نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل در سیاه ماهی مورد مطالعه ما سبب تغییرات هیستوپاتولوژی در بافت آبشش و روده، تغییرات هماتولوژی و آنزیم های کبدی می شود. **سمیت حاد:** مقادیر سمیت حاد برای نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل به ترتیب برابر ۲۰۷/۸۲ و ۱۰۴/۷۹ میلی گرم بر لیتر می باشد که با افزایش زمان قرارگیری در معرض نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل از ۲۴ ساعت به ۹۶ ساعت کاهش پیدا می کند هنگامی که ماهی در معرض غلظت ثابتی از یک آلاینده قرار می گیرد، مقاومت ماهی با گذشت زمان کاهش پیدا می کند و این آلاینده شانس بیش تری برای اثرگذاری بر روی ماهی دارد هم چنین در برخی موارد، تجمع آلاینده در بافت های مختلف ماهی نیز اثرات نامطلوب خود را بر روی ماهی افزایش می دهد و مقدار سمیت حاد را طی ۹۶ ساعت پس از آزمایش کاهش می دهد (۲۱). در مطالعات مشابه Sayadi و همکاران، مقادیر سمیت حاد برای نانوذرات اکسید آهن و نمک های مختلف آهن را محاسبه کردند و بیان کردند که نمک های مختلف آهن نسبت به نانوذرات آهن سمیت بالاتری دارد و با گذشت زمان از ۲۴ ساعت تا ۹۶ ساعت مقدار سمیت حاد این ترکیبات کاهش پیدا می کند (۱۲) هم چنین Sayadi و همکاران، گزارش دادند که مقدار سمیت حاد برای نانوذرات اکسید روی و

که تعداد گلبول قرمز، گلبول سفید، هموگلوبین و هماتوکریت خون ماهیان در معرض اکسید نیکل به طور معنی داری کم تر از گروه کنترل می باشد ($p < 0.05$). در مطالعه حاضر، کاهش قابل توجه گلبول های قرمز در خون سیاه ماهیان در معرض اکسید نیکل ممکن است به دلیل تجمع نیکل در گلبول قرمز باشد که باعث تغییر در ساختار و عملکرد آن شده و اثرات مخربی بر روی آن ها داشته است (۳۵). تجمع اکسید نیکل در خون و ناهنجاری های ساختاری نیز در مطالعه حاضر مشهود است و به ترتیب در شکل ۴ و ۷ نشان داده شده است. نتایج مشاهده شده در مقدار گلبول سفید، هموگلوبین و هماتوکریت ممکن است ناشی از تغییرات در تعداد و ساختار گلبول های قرمز به دلیل تجمع اکسید نیکل باشد در نتیجه، اثرات مضر اکسید نیکل بر روی شاخص های خونی سیاه ماهی ممکن است شامل تجزیه گلبول های قرمز باشد که ممکن است به دلیل پراکسیداسیون اسیدهای چرب در غشای پلاسماتوسط اکسید نیکل باشد، زیرا اکسید نیکل باعث استرس اکسیداتیو در ماهی می شود (۳۶). در مطالعات مشابه Rajkumar و همکاران، بیان کردند که نانوذرات نقره سبب کاهش قابل توجهی در مقدار گلبول قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت در ماهی (*Labeo rohita*) می شود (۳۷). Abdulkareem and Owolabi، بیان کردند که نانوذرات اکسید روی سبب کاهش مقدار گلبول قرمز و هموگلوبین خون ماهی (*Heterobranchus longifilis*) نسبت به گروه کنترل می شود (۳۸). Ibrahim و همکاران، گزارش کردند که نانوذرات کادمیوم سبب کاهش مقدار گلبول قرمز، سفید، هماتوکریت و هموگلوبین خون ماهی (*Oreochromis niloticus*) نسبت به گروه کنترل می شود (۳۹). Mahboub و همکاران، گزارش کردند که نانوذرات نقره سبب کاهش مقدار گلبول قرمز، سفید، هماتوکریت و هموگلوبین خون ماهی (*Clarias gariepinus*) نسبت به گروه کنترل می شود (۴۰). Akbary و همکاران، بیان کردند که اکسید مس سبب کاهش مقدار گلبول قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین خون ماهی (*Mugil cephalus*) نسبت به گروه کنترل می شود (۴۱). Shabbazi Naserabad و Hedayati، بیان کردند که کلرید سرب سبب کاهش قابل توجهی در مقدار گلبول قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت خون ماهی فیتوفاگ می شود (۴۲).

شاخص های خونی حجم متوسط گلبول قرمز، مقدار متوسط

هموگلوبین گلبول قرمز و غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز: نتایج نشان می دهد که مقدار شاخص های خونی حجم متوسط گلبول قرمز، مقدار متوسط هموگلوبین گلبول قرمز و غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز ماهیان در معرض نانوذرات اکسید نیکل اختلاف معنی داری با گروه کنترل نداشتند در حالی که اکسید نیکل سبب افزایش معنی دار شاخص های خونی حجم متوسط گلبول قرمز، مقدار متوسط هموگلوبین گلبول قرمز و غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز نسبت به گروه کنترل شده است ($p < 0.05$). در این پژوهش افزایش مقدار حجم متوسط گلبول قرمز و مقدار متوسط هموگلوبین

مفیدی برای شناسایی سمیت فلزات و نانوذرات ارائه دهد (۲۷). در این پژوهش نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل سبب تغییرات هیستوپاتولوژی هم جوشی لاملاهای ثانویه، کوتاه شدن لاملاهای ثانویه و چماقی شدن در بافت آبشش و تغییرات هیستوپاتولوژی تورم سلول های گابلت، افزایش تعداد سلول های گابلت و افزایش تعداد سلول های خونی در بافت روده سیاه ماهی می شود. بافت آبشش وظیفه تبادل گازها و تنظیم اسمزی را برعهده دارد و در تماس مستقیم با محیط های آبی می باشد و لذا مکان مناسبی برای جذب مواد آلاینده می باشد به نظر می رسد که هم جوشی لاملاهای ثانویه یک مکانیسم حفاظتی است که سطح آبشش را در تماس با آلاینده محدود می کند و سرعت جذب آلاینده را کاهش می دهد و ممکن است منجر به اختلالات تنفسی در ماهی شود (۲۸). هم چنین خمیدگی و جسدگی اپیتلیوم در لاملاهای ثانویه اغلب به عنوان یک نشانه اولیه بافت شناسی از تاثیر سموم بر گونه های آبی می باشد (۲۷). در مطالعات مشابه Sayadi و همکاران، گزارش دادند که نانوذرات اکسید روی باعث آسیب های هیستوپاتولوژی هیپرپلازی، همجوشی لاملاهای ثانویه، آنوریکس و کوتاه شدن لاملاهای ثانویه در بافت آبشش سیاه ماهی می شود (۲۲). هم چنین Sayadi و همکاران، بیان کردند که آسیب های هیستوپاتولوژی ناشی از نانوذرات اکسید آهن و نمک های آهن در بافت آبشش سیاه ماهی شامل آنوریکس، هایپرپلازی، فیوزن لاملا و نکروز می باشد و بیان کردند که بیش ترین آسیب هیستوپاتولوژی هم جوشی لاملاهای ثانویه و هایپرپلازی اپی تلیال در آبشش زمانی اتفاق می افتد که ماهی در معرض نانوذرات اکسید آهن و سولفات آهن می باشد (۱۲). هم چنین Sayadi و همکاران، بیان کردند که مخلوط نانوذرات دی اکسید روی و گرافن سبب آنوریکس، هایپرپلازی، هم جوشی لاملاهای ثانویه و کوتاه شدن لاملاهای ثانویه در آبشش و افزایش تعداد سلول های گابلت، تورم سلول های گابلت و افزایش تعداد سلول های خونی در روده سیاه ماهی می شود (۲۹). Fathi و همکاران، بیان کردند که کلرید جیوه و نانوذرات نقره باعث افزایش تعداد سلول های گابلت، تورم سلول های گابلت و تخریب در ساختار ویلی در روده ماهی (*Carassius auratus*) می شود (۳۰). هم چنین Rahmani و همکاران، گزارش دادند که نانوذرات نقره و جیوه باعث افزایش تعداد سلول های گابلت و تورم سلول های گابلت در روده ماهی (*Cyprinus carpio*) می گردد (۳۱). Pirsaeheb و همکاران، بیان کردند که نانوذرات دی اکسید تیتانیوم سبب آنوریکس و هایپرپلازی در آبشش ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) می شود (۳۲). Lotfi و همکاران، بیان کردند که سولفات مس سبب آنوریکس و بروز خونریزی به خصوص در ورید مرکزی آبشش ماهی قزل آلا رنگین کمان می شود (۳۳).

مطالعات هماتولوژی: آزمایشات خون شناسی اطلاعات دقیقی

از سلامتی موجود زنده فراهم می کند و به طور مؤثری اثرات مواجهه با آلاینده های محیطی را نشان می دهد (۳۴). نتایج نشان می دهد

- lethal, behavioural, & histopathological effects. *Ecotoxicology*. 31(3): 425-439.
3. Cazenave, J., Ale, A., Bacchetta, C. and Rossi, A.S., 2019. Nanoparticles toxicity in fish models. *Current Pharmaceutical Design*. 25(37): 3927-3942.
4. Wang, W.X., 2016. Bioaccumulation and biomonitoring. In: *marine ecotoxicology*. Academic Press. 99-119. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803371-5.00004-7>.
5. Mohan, S., Princz, J., Ormeci, B. and DeRosa, M.C., 2019. Morphological transformation of silver nanoparticles from commercial products: modeling from product incorporation, Weathering through Use Scenarios, and Leaching into Wastewater. *Nanomaterials*. 9(9): 1258.
6. Schrittwieser, S., Reichinger, D. and Schotter, J., 2018. Applications, surface modification and functionalization of nickel nanorods. *Materials*. 11(1): 45.
7. Avila-Arias, H., Nies, L.F., Gray, M.B. and Turco, R.F., 2019. Impacts of molybdenum-, nickel-, and lithium-oxide nanomaterials on soil activity and microbial community structure. *Science of the Total Environment*. 652: 202-211.
8. Oukarroum, A., Zaidi, W., Samadani, M. and Dewez, D., 2017. Toxicity of nickel oxide nanoparticles on a freshwater green algal strain of *Chlorella vulgaris*. *BioMed research international*. 8.
9. Buxton, S., Garman, E., Heim, K.E., Lyons-Darden, T., Schlekat, C.E., Taylor, M. D. and Oller, A.R., 2019. Concise review of nickel human health toxicology and ecotoxicology. *Inorganics*. 7(7): 89.
10. Au, S.Y., Lee, C.M., Weinstein, J.E., van den Hurk, P. and Klaine, S.J., 2017. Trophic transfer of microplastics in aquatic ecosystems: identifying critical research needs. *Integrated environmental assessment and management*. 13(3): 505-509.
11. Farkas, J., Christian, P., Gallego-Urrea, J.A., Roos, N., Hasselöv, M., Tollefsen, K.E. and Thomas, K.V., 2011. Uptake and effects of manufactured silver nanoparticles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill cells. *Aquatic Toxicology*. 101(1): 117-125.
12. Sayadi, M.H., Mansouri, B., Shahri, E., Tyler, C.R., Shekari, H. and Kharkan, J., 2020. Exposure effects of iron oxide nanoparticles and iron salts in blackfish: Acute toxicity, bioaccumulation, depuration, and tissue histopathology. *Chemosphere*. 247: 125900.
13. Noureen, A., Jabeen, F., Tabish, T.A., Ali, M., Iqbal, R., Yaqub, S. and Shakoor Chaudhry, A., 2019. Histopathological changes and antioxidant responses in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to copper nanoparticles. *Drug and chemical toxicology*. 1-8.
14. Jaramillo-Villa, U. and Caramaschi, É.P., 2008. Índices de integridade biótica usando peixes de água doce: uso nas regiões tropical e subtropical. *Oecologia Brasiliensis*. 12(3): 7.
15. Johari, S.A., Coad, B.W., Mazloomi, S., Kheyri, M. and Asghari, S., 2009. Biological and morphometric characteristics of, *Capoeta fusca*, a cyprinid fish living in the qanats of south Khorasan, Iran: (Osteichthyes: Cyprinidae). *Zoology in the Middle East*. 47(1): 63-70.
16. Simmons, A., 1997. Hematology. UK: Simmons, Butterworth-Heinemann. 507 p.
17. Damayanthi, M.N., Seema, P. and Kumar, K.J., 2015. Anemia among adolescents in urban field practice area of Rajarajeswari Medical College, Bangalore. *Al Ameen Journal of Medical Sciences*. 8(4): 288-292.
18. Dancan, J.R., Prasse, K.W. and Mahaffy, E.A., 1994. Veterinary laboratory medicine. *Clinical pathology*. 3rd ed. Iowa state university press. Ames, Iowa. USA. 243: 21-56.
19. Ghiasi, F., Mirzargar, S.S., Badakhshan, H. and Shamsi, S., 2010. Lysozyme in Serum, Leukocyte Count and Phagocytic Index in *Cyprinus carpio* under the Wintering Conditions. *Journal of fisheries and Aquatic Science*. 5(2): 113-119.
20. Khalid, M., Hassani, S. and Abdollahi, M., 2020. Metal-induced oxidative stress: An evidence-based update of advantages and disadvantages. *Current opinion in toxicology*. 20: 55-68.

گلبول قرمز در سیاه ماهیان در معرض اکسید نیکل نشان دهنده کم خونی ماکروسیتی می باشد (۴۳) که با نتایج سایر مطالعات هم خوانی دارد (۴۵، ۴۴، ۳۵).

تغییرات ساختار گلبول های قرمز خون سیاه ماهی در معرض

نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل: امروزه مطالعات مورفولوژیکی گلبول های قرمز به عنوان یکی از حساس ترین شاخص ها در تحقیقات سم شناسی برای بررسی اثرات احتمالی ناشی از سموم مورد استفاده قرار می گیرند. برای ارزیابی اثرات بالقوه نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل بر روی فیزیولوژی ماهی، بسیار ضروری است که تغییرات مورفولوژیکی در گلبول های قرمز بررسی شود زیرا تغییر در ساختار گلبول های قرمز می تواند باعث اختلالات تنفسی در ماهی شود (۳۵). در این پژوهش نانوذرات اکسید نیکل سبب تغییر شکل گلبول های قرمز سیاه ماهی می شود در حالی که اکسید نیکل سبب تغییر شکل و واکنش شدن گلبول های قرمز سیاه ماهی می شود. این ناهنجاری ها اثرات سمیت نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل را بر روی سیاه ماهی آشکار می کند که باعث توزیع نابرابر هموگلوبین و کاهش آن می شود (۳۵). نتایج این پژوهش با سایر مطالعات هم خوانی دارد (۴۷، ۴۶، ۳۵).

اثر نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل بر روی آنزیم های

کبدی سیاه ماهی: آنزیم های آسپاراتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز عمدتاً در کبد یافت می شوند و آنزیم های داخل سلولی هستند که با گلوکونوژنز و متابولیسم اسید آمینه مرتبط هستند به دلیل سمی ناشی از آلانینده های مختلف، ممکن است اختلالاتی در کبد ایجاد شود که باعث نشت این آنزیم ها به داخل خون می شوند آلکالین فسفاتاز آنزیم مهم دیگری است که هر گونه تغییر در غشای سلول های کبدی می تواند فعالیت آن را در سرم تغییر دهد (۴۸). در این پژوهش نتایج نشان می دهد که سطح آنزیم های کبدی آلکالین فسفاتاز، آسپاراتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز در ماهیان در معرض نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل به طور معنی داری ($p < 0.05$) پس از ۲۸ روز بیش تر از گروه کنترل می باشد که نشان می دهد نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل سبب ایجاد آسیب هایی در بافت کبد سیاه ماهی شده است. نتایج این پژوهش با سایر مطالعات هم خوانی دارد (۴۹، ۵۰، ۵۱). بنابراین، ارزیابی اثرات سمیت ترکیبات مختلف نیکل به ویژه اکسید نیکل بر موجودات آبی ضروری است تا بتوان ارگانسیم ها را از اثرات مضر این ترکیبات محافظت کرد.

منابع

1. US EPA. 2017. Technical Fact Sheet-nanomaterials Office of Land and Emergency Management 5106P EPA 505-F-17-002. United States Environmental Protection Agency.
2. Sayadi, M.H., Pavlakis, M.D., Loureiro, S., Martins, R., Tyler, C.R., Mansouri, B. and Shekari, H., 2022. Co-exposure of zinc oxide nanoparticles and multi-layer graphenes in blackfish (*Capoeta fusca*): evaluation of

- toxicities in zebrafish: histopathological changes and oxidative stress. The Journal of Toxicological Sciences. 44(11): 737-751.
37. **Rajkumar, K.S., Kanipandian, N. and Thirumurugan, R., 2016.** Toxicity assessment on haematology, biochemical and histopathological alterations of silver nanoparticles-exposed freshwater fish *Labeo rohita*. Applied Nanoscience. 6(1): 19-29.
 38. **Abdulkareem, S.I. and Owolabi, O.D., 2019.** Acute toxicity of zinc oxide nanoparticles on blood cell morphology, haematology and histopathology of *Heterobranchius longifilis*. Animal Research International. 16(1): 3174-3185.
 39. **Ibrahim, A.T.A., Banaee, M. and Sureda, A., 2021.** Genotoxicity, oxidative stress, and biochemical biomarkers of exposure to green synthesized cadmium nanoparticles in *Oreochromis niloticus* (L.). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. 242: 108942.
 40. **Mahboub, H.H., Khedr, M.H., Elshopakey, G.E., Shakweer, M.S., Mohamed, D.I., Ismail, T.A. and Rahman, A.N.A., 2021.** Impact of silver nanoparticles exposure on neuro-behavior, hematology, and oxidative stress biomarkers of African catfish (*Clarias gariepinus*). Aquaculture. 544: 737082.
 41. **Akbary, P., Sartipi Yarahmadi, S. and Jahanbakhshi, A., 2018.** Hematological, hepatic enzymes' activity and oxidative stress responses of gray mullet (*Mugil cephalus*) after sub-acute exposure to copper oxide. Environmental Science and Pollution Research. 25(2): 1800-1808.
 42. **Shahbazi Naserabad, S. and Hedayati, A.A., 2019.** Evaluation of hematological changes and stress indices of phytophagous fish in the face of lethal and sub-lethal concentrations of lead chloride. Journal of Animal Environment. 12(2): 251-259. (In Persian)
 43. **Saravanan, M., Vemu, A.K. and Barik, S.K., 2011.** Rapid biosynthesis of silver nanoparticles from *Bacillus megaterium* (NCIM 2326) and their antibacterial activity on multi drug resistant clinical pathogens. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 88(1): 325-331.
 44. **Svoboda, M., Luskova, V., Drastichova, J. and Žlabek, V., 2001.** The effect of diazinon on haematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Acta Veterinaria Brno. 70(4): 457-465.
 45. **Svobodova, Z., 1971.** Some haematological and metabolic changes in fish occurring after pesticide intoxication. Bull. VUR VodAany. 7: 29-36.
 46. **Shabrangharehdasht, M., Mirvaghefi, A. and Farahmand, H., 2020.** Effects of nanosilver on hematologic, histologic and molecular parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic Toxicology. 225: 105549.
 47. **Zulfahmi, I., Rahmi, A., Muliori, M., Akmal, Y., Paujiah, E., Sumon, K.A. and Rahman, M.M., 2021.** Exposure to lead nitrate alters growth and haematological parameters of Milkfish. Bulletin of environmental contamination and toxicology. 107(5): 860-867.
 48. **Banaee, M., Sureda, A., Mirvaghefi, A.R. and Ahmadi, K., 2011.** Effects of diazinon on biochemical parameters of blood in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Pesticide biochemistry and physiology. 99(1): 1-6.
 49. **Abdel-Khalek, A., Kadry, M., Hamed, A. and Marie, M.A., 2015.** Ecotoxicological impacts of zinc metal in comparison to its nanoparticles in Nile tilapia. The Journal of Basic & Applied Zoology. 72: 113-125.
 50. **El-Houseiny, W., Mansour, M.F., Mohamed, W.A., Al-Gabri, N.A., El-Sayed, A.A., Altohamy, D.E. and Ibrahim, R.E., 2021.** Silver nanoparticles mitigate *Aeromonas hydrophila*-induced immune suppression, oxidative stress, and apoptotic and genotoxic effects in *Oreochromis niloticus*. Aquaculture. 535: 736430.
 51. **Abdel-Latif, H.M., Dawood, M.A., Mahmoud, S.F., Shukry, M., Noreldin, A.E., Ghetas, H.A. and Khallaf, M.A., 2021.** Copper oxide nanoparticles alter serum biochemical indices, induce histopathological alterations, and modulate transcription of cytokines, HSP70, and oxidative stress genes in *Oreochromis niloticus*. Animals. 11(3): 652.
 21. **Minetto, D., Ghirardini, A.V. and Libralato, G., 2016.** Saltwater ecotoxicology of Ag, Au, CuO, TiO₂, ZnO and C60 engineered nanoparticles: an overview. Environment international. 92: 189-201.
 22. **Sayadi, M.H., Pavlaki, M.D., Martins, R., Mansouri, B., Tyler, C.R., Kharkan, J. and Shekari, H., 2021.** Bioaccumulation and toxicokinetics of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) co-exposed with graphene nanosheets in the blackfish. Chemosphere. 269: 128689.
 23. **Kumar, N., Krishnani, K.K. and Singh, N.P., 2018.** Comparative study of selenium and selenium nanoparticles with reference to acute toxicity, biochemical attributes, and histopathological response in fish. Environmental Science and Pollution Research. 25(9): 8914-8927.
 24. **Song, L., Vijver, M.G., Peijnenburg, W.J., Galloway, T.S. and Tyler, C.R., 2015.** A comparative analysis on the in vivo toxicity of copper nanoparticles in three species of freshwater fish. Chemosphere. 139: 181-189.
 25. **Yilmaz, A.B. and Doğan, M., 2008.** Heavy metals in water and in tissues of himri (*Carasobarbus luteus*) from Orontes (Asi) River, Turkey. Environmental monitoring and assessment. 144(1): 437-444.
 26. **Jayaseelan, C., Rahuman, A.A., Ramkumar, R., Perumal, P., Rajakumar, G., Kirthi, A.V. and Marimuthu, S., 2014.** Effect of sub-acute exposure to nickel nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Mozambique tilapia. Ecotoxicology and Environmental Safety. 107: 220-228.
 27. **Mansouri, B., Maleki, A., Davari, B., Johari, S.A., Shahmoradi, B., Mohammadi, E. and Shahsavari, S., 2016.** Histopathological effects following short-term coexposure of *Cyprinus carpio* to nanoparticles of TiO₂ and CuO. Environmental monitoring and assessment. 188(10): 575.
 28. **Beegam, A., Lopes, M., Fernandes, T., Jose, J., Barreto, A., Oliveira, M. and Pereira, M.L., 2020.** Multiorgan histopathological changes in the juvenile seabream *Sparus aurata* as a biomarker for zinc oxide particles toxicity. Environmental Science and Pollution Research. 27(25): 30907-30917.
 29. **Sayadi, M.H., Pavlaki, M.D., Loureiro, S., Martins, R., Tyler, C.R., Mansouri, B. and Shekari, H., 2022.** Co-exposure of zinc oxide nanoparticles and multi-layer graphenes in blackfish (*Capoeta fusca*): evaluation of lethal, behavioural, and histopathological effects. Ecotoxicology. 31(3): 425-439.
 30. **Fathi, M., Binkowski, L.J., Azadi, N.A., Hamesadeghi, U. and Mansouri, B., 2018.** Co-exposure effects of mercury chloride and silver nanoparticles (Ag-NPs) on goldfish (*Carassius auratus*): histopathological changes, oxidative stress response, and bioaccumulation. Desalination and Water Treatment. 105: 264-272.
 31. **Rahmani, R., Hamesadeghi, Y. and Mansouri, A., 2019.** Toxicity effects of mercury and silver nanoparticles on common carp (*Cyprinus carpio*). Comparative Clinical Pathology. 28(3): 811-816.
 32. **Pirsaheb, M., Azadi, N.A., Miglietta, M.L., Sayadi, M.H., Blahova, J., Fathi, M. and Mansouri, B., 2019.** Toxicological effects of transition metal-doped titanium dioxide nanoparticles on goldfish (*Carassius auratus*) and common carp. Chemosphere. 215: 904-915.
 33. **Lotfi, Z., Borhani, S., Jamili, S. and Kadkhodai, A., 2012.** Toxic effect of copper sulfate on gill and liver tissue of *Oncorhynchus mykiss*. Journal of Animal Environment. 5(4):79-84. (In Persian)
 34. **Matouke, M.M., Sanusi, H.M. and Enejo, A.S., 2021.** Interaction of copper with titanium dioxide nanoparticles induced hematological and biochemical effects in *Clarias gariepinus*. Environmental Science and Pollution Research. 28(47): 67646-67656.
 35. **Samim, A.R. and Vaseem, H., 2021.** Assessment of the potential threat of nickel (II) oxide nanoparticles to fish *Heteropneustes fossilis* associated with the changes in haematological, biochemical and enzymological parameters. Environmental Science and Pollution Research. 1-17.
 36. **Yokota, S., Nakamura, K. and Kamata, R., 2019.** A comparative study of nickel nanoparticle and ionic nickel