تاثیر سطوح مختلف نانواکسید روی (ZnO NPs) بر شاخص های هماتولوژی ماهی کوی (*Cyprinus carpio*)

مرجان بخشی و محمد کاظمیان*
گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال
تاریخ دریافت:۹۴/۱۲/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۲۰

چکیده

روند صعودی مصرف نانو ذرات در صنعت، احتمال ذخیره ی آنها در اکوسیستم های آبی و به خطر افتادن حیات موجودات آبزی را افزایش داده است، لذا هدف این مطالعه، بررسی اثر سمی نانو ذره اکسید روی (۰، ۱، ۲، ۴ و ۸ میلی گرم بر لیتر) به روش ساکن بر پارامترهای مشخص هماتولوژی ماهی کوی (*Cyprinus carpio*) در یک دوره ۲ و ۱۰ روزه بود. اختلاف معنی داری در کاهش میزان هموگلوبین (Hb)۷/۳±۰/۱۹، تعداد گلبول های قرمز (RBC)۱/۴۱±۰/۰۳ و سفید (WBC) ۱/±۰/۱۹، هماتوکریت (Hct)۲۲±۰/۶۶، حجم متوسط گلبول قرمز (Mean Corpuscular Volume)۱۵۵/۳۵±۵/۲۹ و مقدار وزن متوسط هموگلوبین در یک گلبول قرمز (Mean Corpuscular Hemoglobin)۵۱/۲±۲/۰۷ (به جز دز ۴ میلی گرم بر لیتر) در دوره ده روزه ی مورد بررسی در مقایسه با گروه شاهد ثبت شد (p<۰/۰۵). در مقابل غلظت متوسط هموگلوبین در گلبول های قرمز (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration)۴±۰/۲۳ در طول این بررسی افزایش یافته بود. نتایج حاصل حاکی از آن است که در محیط های آبی با غلظت های بالای ZnO NPs می تواند اثرات نامناسبی داشته و پارامترهای خونی ماهی کوی را دچار تغییرات شدید نماید.

واژگان کلیدی: نانو اکسید روی، شاخص های خونی، ماهی کوی
***نگارنده پاسخگو: Aquaculture@live.com**

مقدمه

تولید مواد نانو ذره به صورت چشمگیری (میلیون تن در سال) در جهان روبه رشد است (Klanic *et al.*, 2008)که به دلیل خصوصیات فیزیکی و شیمیایی منحصر به فرد این ترکیبات مانند سطح تماس بیشتر و واکنش پذیری بالای آنها می باشد (Petersen & Henry, 2012). افزایش تعداد و حجم کارخانجات مرتبط با نانو ذرات در تمامی بخش ها مانند صنایع شیمیایی، الکترونیک، داروهای زیستی، افزودنی های غذا و نیمه هادی ها باعث هموار شدن ورود نانوذرات از طرق مختلف به محیط زیست می شود (Blaise *et al.*, 2008). امروزه نانو اکسید روی در تولیداتی از قبیل پلاستیک، شیشه، لاستیک، روان کننده ها، سیمان، عایق آتش و غیره استفاده می گردد (Ma *et al.*, 2013).

همواره احتمال رسوب نانو ذرات در محیط های آبی وجود دارد و به این ترتیب به راحتی جذب موجودات آبزی مانند نرمتنان، سخت پوستان و ماهیان می شود (George *et al.*, 2014). ماهیان همواره به عنوان شاخص نمایش آلودگی های شیمیایی در محیط های آبی مطرح می باشند (Little *et al.*, 1993) و به هر گونه تغییرات فیزیکی وشیمیایی محیط حساس می باشند (Sadiq Bukhari *et al.*, 2012). از این رو مطالعات هماتولوژی روش مهمی برای ارزیابی آثار محیطی آلاینده ها برای ماهیان می باشد (Stentiford *et al.*, 2003) و به طور موثری اثرات مواجهه با آلاینده های محیطی را انعکاس می دهند. تاکنون اطلاعات اندکی در مورد اثر نانوذرات بر روی خون ماهی گزارش شده است. Alkaladi و همکاران در سال ۲۰۱۵ تاثیر ویتامین Cو E را در ماهی *Oreochromis niloticus* در حضور نانوذرات اکسید روی بر فاکتورهای بیوشیمیایی و خون شناسی انجام دادند که Lc50 ۹۶ ساعت نانو ذرات روی، را ۳,۱ میلی گرم در لیتر تعیین کردند و اثر کم خونی را در ماهیان مورد بررسی گزارش کردند. Rajkumar و همکاران در سال ۲۰۱۵ اثر سمیت نانوذرات اکسید نقره مورد بررسی قرار داده و دریافتند که توانایی تجمع در بافت های آبشش، کبد و عضله ماهی *Labeo rohita* را داشته و باعث تخریب بافت کبدی و همچنین تغییر معنی دار تعداد گلبول های قرمز و سفید نست به گروه شاهد می گردد. همچنین نتایج آزمایش بر روی ماهی گورخری *Danio rerio* نشان داد که نانو ذرات روی باعث کاهش طول کل و میزان هچ لاروها شده است و نانوذرات به دلیل اندازه ی کوچکتر اثر سمیت بیشتری دارند (Liu *et al.*,2014). از آنجایی که کشورمان در زمینه فناوری نانو و کاربرد این علم در صنایع مختلف از کشور های پیش رو می باشد لذا در این تحقیق تاثیر سطوح مختلف نانو اکسید روی بر شاخص های خونی ماهی کوی مورد بررسی قرار گرفته است تا شاید بتوان مارکر مناسب خونی برای ZnO NPs مشخص نمود.

مواد و روش ها

تحقیق حاضر، در دی ماه سال ۱۳۹۴ در یک کارگاه خصوصی در تهران انجام شده است. تعدادی ماهی کوی(*Cyprinus carpio*) به مدت ۱۰روز با جیره غذایی پایه تغذیه و با سیستم پرورشی سازگار شدند. پس از اتمام دوره سازگاری، ۱۵۰ قطعه ماهی با ظاهر سالم (عدم وجود بدشکلی و خوردگی باله) و با میانگین طولی ۱/۲۷±۹/۵۸ سانتی متر و میانگین وزنی۵/۶±۲۰/۱۲ گرم انتخاب شدند. این آزمایش به صورت طرح کاملا تصادفی با پنج تیمار در سه تکرار که در مجموع شامل ۱۵ واحد تانک، هر واحد شامل ۱۰ قطعه ماهی کوی، در مدت ۱۰روز انجام گرفت. تقسیم‌بندی تیمارها به صورت: شاهد (صفر میلی‌گرم در لیتر نانو اکسید روی)، تیمار یک (۱ میلی‌گرم درلیتر نانواکسید روی)، تیمار دو (۲ میلی‌گرم در لیتر نانو اکسید روی) و تیمار سه (۴ میلی‌گرم در لیتر نانو اکسید روی) تیمار چهار (۸ میلی‌گرم در لیتر نانو اکسید روی) انجام شد. دوزهای انتخابی زیر حد کشندگی بوده و با توجه به تحقیقات صورت گرفته و روش سایر تحقیقات بوده است (شکوری و همکاران،۱۳۹۱;Hao *et al.*, 2013). نمونه های خون از ماهیان بعد از بیهوشی با فنوکسی اتانول ۲۵درصد، بعداز ۲و۱۰روز گرفته شد. نمونه گیری خون

دربچه ماهیان بوسیله قطع ساقه دمی و بدون فشار و به آرامی، به صورتی که منجر به شکسته شدن گلبول های قرمز و لیز شدن خون و اختلال در تهیه سرم مطلوب نگردد انجام شد و نمونه ها داخل لوله های هپارینه و غیرهپارینه ریخته و به آزمایشگاه منتقل شد. تعدادکل گلبول های قرمز و سفید با استفاده از پیپت ملانژورهای قرمز و سفید، لام نئوبار و محلول های رقیق کننده گاوروتورک شمارش گردید (Blaxhall & Daisley, 1973).

سنجش هماتوکریت با روش میکروهماتوکریت (لوله های موئین) صورت گرفت (Nelson & Morris, 1989). شاخص های میانگین حجم گلبول MCV، میانگین هموگلوبین گلبول MCH و میانگین غلظت هموگلوبین گلبولMCHC با استفاده از روابط (۱ الی ۳) محاسبه گردید (Blaxhall & Daisley, 1973).

رابطه (۱) $M.C.V = \frac{HCT(\%) \times 10}{RBC}$

رابطه (۲) $M.C.H = \frac{Hb \times 10}{RBC}$

رابطه (۳) $M.C.H.C = \frac{100}{HCT}$

تجزیه و تحلیل داده‌ها

در تجزیه و تحلیل آماری قبل از آنالیز، داده ها نرمال سازی شدند و با توجه به توزیع نرمال داده ها، از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) استفاده شد و سپس مقایسه داده ها با استفاده از آزمون دانکن در نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ با سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام شد.

نتایج

شمارش سلول های خونی

تغییرات تعداد سلول های خونی سفید، قرمز، میزان هموگلوبین و هماتوکریت مورد سنجش قرار گرفت (جداول ۱و ۲). از بررسی تغییرات هماتولوژی می توان نتیجه گرفت که سطوح تمامی پارامتر ها در تیمار چهارم (۸ میلی گرم بر لیتر نانو اکسید روی) نسبت به گروه شاهد کاهش داشته و دارای تغییرات معنادار بود ($p<۰/۰۵$). بررسی درصد نوتروفیل، لنفوسیت و مونوسیت بیانگر کاهش معنی دار در تیمار چهارم نسبت به گروه شاهد است($p<۰/۰۵$) (جدول های ۳و۴).

اندیس های خونی

اندیس های خونی مانندMCV و MCH در تمامی تیمارها در روز دهم به جز تیمار اول و سوم در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی داری داشته است و کمترین میزان MCV در تیمار دوم روز دهم به میزان ۶/۱۶±۳۱/ ۱۷۳ثبت گردید. در حالی که میزان MCHC تیمار چهارم نسبت به گروه شاهد دارای افزایش معنی داری بود($p<۰/۰۵$) (جدول های ۵ و ۶).

جدول ۱- نتایج حاصل از سطوح مختلف نانو اکسید روی بر تعداد گلبول سفید، گلبول قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت در ماهیان کوی بعد از۲روز (انحراف معیار ± میانگین ، n=۹)

میزان نانو ذرات اضافه شده آب ($mg\ L^{-1}$)	خون			
	گلبول سفید (cell/ cu. mm)	گلبول قرمز (*10 cells/μl)	هموگلوبین (g/dL)	هماتوکریت (%)
۰	۱۳/۰۵±۰/۶۳^{d}	۱/۹±۰/۸۶^{d}	۱۲/۳۲±۰/۶^{c}	۳۷±۱^{d}
۱	۱۱/۵۵±۰/۳۹^{c}	۱/۹±۰/۰۴^{d}	۱۲±۰/۷^{c}	۳۶±۰/۷^{c}
۲	۱۱±۰/۴۳^{b}	۱/۸±۰/۰۳^{c}	۱۰/۶۱±۰/۴۱^{b}	۳۲±۱/۲۲^{b}
۴	۱۰/۶۶±۰/۳۵^{b}	۱/۷±۰/۰۵^{b}	۱۰/۴۴ ±۰/۸۲^{b}	۳۲±۱/۴۱^{b}
۸	۱/۶±۰/۰۶^{a}	۳۰±۰/۵^{a}	۹/۳۳±۰/۳۵^{a}	۳۰±۰/۵^{a}

(حروف انگلیسی نامشابه نشان دهنده ی وجود اختلاف معنی دار است ($p<۰/۰۵$)

جدول ۲- نتایج حاصل از سطوح مختلف نانو اکسید روی بر تعداد گلبول سفید،گلبول قرمز،هموگلوبین و هماتوکریت در ماهیان کوی بعد از ۱۰روز (انحراف معیار ±میانگین ، n=۹)

میزان نانو ذرات اضافه شده به آب ($mg\ L^{-1}$)	خون			
	گلبول سفید (cell/ cu. mm)	گلبول قرمز (*10 cells/μl)	هموگلوبین (g/dL)	هماتوکریت (%)
۰	۱۰/۰۵±۰/۳۹^{d}	۱/۹۱±۰/۳۳^{e}	۱۱/۶۱±۰/۶۲^{d}	۳۵±۱/۱۱^{d}
۱	۴/۶۱±۰/۵۴^{c}	۱/۸±۰/۰۵^{d}	۱۱±۰/۶۲^{c}	۳۳±۰/۷^{c}
۲	۴/۵±۰/۴۳^{c}	۱/۶۱±۰/۰۵^{c}	۹/۳۱±۰/۴۲^{b}	۲۸±۰/۷^{b}
۴	۱/۴±۰/۳۹^{b}	۱/۵±۰/۰۶^{b}	۹/۳ ±۰/۵۵^{b}	۲۸±۱/۱۱^{b}
۸	۱±۰/۱۹^{a}	۱/۴۱±۰/۰۳^{a}	۷/۳±۰/۱۹^{a}	۲۲±۰/۶۶^{a}

(حروف انگلیسی نامشابه نشان دهنده ی وجود اختلاف معنی دار است) ($p<۰/۰۵$)

جدول ۳- نتایج حاصل از سطوح مختلف نانو اکسید روی بر درصدلنفوسیت،مونوسیت و نوتروفیل در ماهیان کوی بعد از۲روز (انحراف معیار ±میانگین ، n=۹)

میزان نانو ذرات اضافه شده به آب ($mg\ L^{-1}$)	خون		
	لنفوسیت (%)	مونوسیت(%)	نوتروفیل(%)
۰	^{e}۰/۷±۲۹	^{d}۰/۵۵±۲/۳۳	^{e}۳/۷۷±۷۰
۱	^{d}۱±۲۸	^{c}۰/۲۵±۲	^{d}۱/۸۷±۶۸
۲	^{c}۰/۵±۲۶	^{b}۰/۳۵±۱	^{c}۱±۶۳
۴	^{b}۰/۷±۲۴	۰	^{b}۰/۷ ±۶۱
۸	^{a}۰/۴۷±۲۰	۰	^{a}۰/۶۶±۵۵

(حروف انگلیسی نامشابه نشان دهنده ی وجود اختلاف معنی دار است) ($p<۰/۰۵$)

جدول ۴- نتایج حاصل از سطوح مختلف نانو اکسید روی بر درصد لنفوسیت، مونوسیت و نوتروفیل در ماهیان کوی بعد از ۱۰روز (انحراف معیار ±میانگین، n=۹)

میزان نانو ذرات اضافه شده به آب ($mg\ L^{-1}$)	خون		
	لنفوسیت (%)	مونوسیت (%)	نوتروفیل (%)
۰	۳۰/۰۱±۰/۲۸^{d}	۵±۰/۴۳^{d}	۶۵±۳/۰۴^{d}
۱	۲۹/۱۶±۰/۶۶^{c}	۲±۰/۳۵^{c}	۶۰±۰/۸۶^{c}
۲	۲۵±۰/۷^{b}	۱±۰/۳۳^{b}	۴۳±۱/۶۵^{b}
۴	۰	۰	۰
۸	۰	۰	۰

(حروف انگلیسی نامشابه نشان دهنده ی وجود اختلاف معنی دار است) ($p<۰/۰۵$)

جدول ۵- نتایج حاصل از سطوح مختلف نانو اکسید روی بر میزان MCV ،MCH و MCHC در ماهیان کوی بعد از۲روز (انحراف معیار ±میانگین ، n=۹)

میزان نانو ذرات اضافه شده به آب ($mg\ L^{-1}$)	خون		
	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (%)
۰	۱۹۵/۰۷±۹/۹۲^{b}	۶۴/۸۶±۱/۸۷^{b}	۲/۷۱±۰/۰۵^{a}
۱	۱۸۹/۴۴±۵/۵۳^{b}	۶۳/۱۶±۳/۶۴^{b}	۲/۷۷±۰/۰۵^{a}
۲	۱۷۷/۲۱±۵/۸۴^{a}	۵۸/۸±۳/۱۲^{a}	۳/۱۲±۰/۱۱^{c}
۴	۱۸۷/۸۳±۱۲/۰۴^{b}	۶۱/۱۳±۵/۷۴^{ab}	۳/۱۲ ±۰/۱۳^{c}
۸	۱۸۷/۷۸±۸/۷۹^{b}	۵۸/۴۲±۳/۵۴^{a}	۲/۹۴±۰/۱^{b}

(حروف انگلیسی نامشابه نشان دهنده ی وجود اختلاف معنی دار است) (p<۰/۰۵)

جدول ۶- نتایج حاصل از سطوح مختلف نانو اکسید روی بر میزان MCV ،MCH و MCHC در ماهیان کوی بعد از ۱۰روز (انحراف معیار ±میانگین، n=۹)

میزان نانو ذرات اضافه شده به آب ($mg\ L^{-1}$)	خون		
	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (%)
۰	۱۸۳/۱۵±۵/۶۶^{c}	۶۰/۷۹±۳/۹۸^{bc}	۲/۸۳±۰/۱^{a}
۱	۱۸۲/۸۵±۴/۷۱^{c}	۶۰/۹۸±۴/۲۳^{bc}	۳/۰۳±۰/۰۶^{b}
۲	۱۷۳/۳۱±۶/۱۶^{b}	۵۷/۶۷±۳/۸۲^{b}	۳/۵۷±۰/۰۹^{c}
۴	۱۸۶/۸۹±۹/۸۸^{c}	۶۲/۰۷±۴/۲۳^{c}	۳/۵۷ ±۰/۱۴^{c}
۸	۱۵۵/۳۵±۵/۲۹^{a}	۵۱/۲±۲/۰۷^{a}	۴±۰/۲۳^{d}

(حروف انگلیسی نامشابه نشان دهنده ی وجود اختلاف معنی دار است) (p<۰/۰۵)

بحث و نتیجه گیری

هر چند که نانو اکسید روی دارای ویژگی های کاربردی مناسب مختلفی است، اما اثرات مضر قابل توجهی در سلامت انسان و محیط زیست دارد (Kasemets *et al*., 2009). مطالعات هماتولوژیک، روش مهمی برای ارزیابی آثار محیطی آلاینده ها بر روی ماهیان است (Stentiford *et al*., 2003).

نتایج به دست آمده از بررسی تاثیر سطوح مختلف روی نانو اکسید (Zn O N Ps) بر شاخص های هماتولوژیک ماهی کوی نشان داد که هیچ مرگ و میری در این ماهیان در غلظت های ۱ تا ۸ میلی گرم بر لیتر از نانو اکسید روی در طی ۱۰ روز مشاهده نشد و این امر حاکی از آن است که این غلظت ها سمیت کشنده بر روی این ماهیان را ندارد که نتیجه حاصله با مطالعات Hao و همکاران در سال ۲۰۱۳ نیز منطبق است. در تحقیقی مشابه، اثرات نانو اکسید روی بر تیلاپیا، غلظت ۱۰ میلی گرم بر لیتر تنها باعث مرگ یک ماهی شده است ولی

تنظیمات اسمزی- یونی در این ماهی دچار اختلال شده است (Kaya *et al*., 2016).

نتایج تحقیق حاضر حاکی از افزایش تعداد گلبول قرمز و هماتوکریت در تیمار چهارم روز دوم است که این امر می تواند به جهت مقابله طبیعی بدن با اثرات سمی نانو ذرات اکسید روی در قبال کاهش کم خونی باشد که پس از سپری شدن ۱۰ روز بعد از آغاز آزمایش، بدن توانایی خود را از دست داده و قادر به جبران نقصیه ی وارده نمی باشد و در این حالت گلبول قرمز به همراه هماتوکریت در تمامی تیمارها کاهش یافته است. این وضعیت در واقع می تواند به جهت ایجاد یک نوع کم خونی Normocytic normochromic (نوعی کم خونی که میانگین اندازه سلول های قرمز خون و هموگلوبین طبیعی است اما تعداد آنها کم است) و یا به دلیل تحت تاثیر قرار گرفتن سلول های بنیادی مغز استخوان باشد. همچنین سایر سلول های خونی (هموگلوبین وگلبول سفید) پس از ده روز در مجاورت ماهی کوی با نانو ذرات اکسید روی کاهش یافته است. این نوع کم خونی نیز در ماهیان *Oreochromis niloticus* که طی هفت روز در مجاورت با نانو اکسید روی قرار گرفته بودند توسط Alkaladi و همکاران در سال ۲۰۱۵ گزارش شده و علت آن کاهش چرخه زیستی سلول های قرمز خون ذکر شده و همچنین به کاهش معنی دار تعداد گلبول های قرمز و غلظت هماتوکریت در غلظت های یک و دو میلی گرم در لیتر، اشاره شده است. در مطالعه ای که توسط Rajkumar و همکاران در سال ۲۰۱۵ بروی ماهی آب شیرین *Labeo rohita* صورت گرفت کاهش معنی دار گلبول قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت، در اثر تماس با نانوذرات نقره در غلظت ۲۵ ml/kg ذکر شده است. در تحقیق Panigrahi و Misra در سال ۱۹۸۷ میزان هموگلوبین و تعداد گلبول قرمز در ماهی *Anabas scandens* که در معرض آلودگی با جیوه قرار گرفته بودند؛ کاهش یافته بود. در تحقیقی دیگر کاهش Hct و Hb به همراه کاهش اریتروسیت ها در گونه *Clarias batradrus* که در معرض جیوه کلرید قرار گرفته بودند نیز گزارش شده است(Maheswaran *et al*., 2008). تغییرات پارامترهای هماتولوژی می تواند در نتیجه استرس وارده بواسطه ورود مواد سمی و اختلال در متابولیسم و عملکرد طبیعی بدن باشد (Blaxhal, 1972).

براساس نتایج بدست آمده تحقیق حاضر، تغییرات شاخص های خونی مانند Hb، Hct، MCV ، MCH و MCHC در مقایسه با گروه شاهد می تواند نشان دهنده ی تغییر در ترکیب بافت خونی و کاهش تدریجی ظرفیت اکسیژن قابل حمل در تمامی گروه های مورد آزمایش باشد (جداول۱، ۲، ۵و ۶). در ماهیان اغلب گلبول های قرمز به عنوان شاخص در معرض قرارگیری مواد سمی، مورد استفاده قرار می گیرند (Mitchelmore & Chipman, 1998). از سویی در مطالعه حاضر اثر نانوذرات اکسید روی باعث کاهش معنی دار گلبول های قرمز بعد از ده روز در تمامی تیمارها شد که می تواند به دلیل پاسخ جبرانی به کاهش ظرفیت حمل اکسیژن بوده تا به پایداری انتقال گازها کمک کند و همچنین می تواند نشان دهنده تغییر در تیغه های آبششی برای مبادله گازی بین خون و محیط آب باشد (Jee *et al*., 2005). آلاینده ها از طریق آبشش ماهی که به طور مداوم در معرض محیط آبی قرار دارند وارد شده و سبب کاهش جذب اکسیژن در سطح آبشش و کاهش ظرفیت حمل اکسیژن خون در ماهیان می گردند (Christine & Gokhale, 2000). از سوی دیگر، کاهش گلبول های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت باعث استرس می شوند که به نوبه خود موجب کاهش رشد شده که تمام این عوامل می توانند کم خونی ناشی از ماده آلاینده را شدیدتر کنند (James & Sampath, 1999).

نتایج تحقیق اخیر حاکی از آن بود که حجم متوسط گلبول قرمز در تیمارهای یک و دو در روزهای دوم و دهم با کاهش و در تیمار سوم در روز دوم و دهم با افزایش همراه بود. وزن هموگلوبین در گلبول قرمز تغییرات معنی داری را نداشته و غلظت متوسط هموگلوبین نیز با افزایش، در تیمارهای روز دهم همراه بود. MCHC شاخص مناسبی جهت تعیین وضعیت انتقال اکسیژن است و میزان MCV و MCHC در ظرفیت انتقال

اکسیژن اهمیت دارد (Wells & Baldwin, 1990). کاهش مقادیر اندیس های خونی به دنبال حضور نانو ذرات اکسید روی در مطالعه حاضر می تواند نشان دهنده کم خونی از نوع ماکروسیتی باشد. در واقع این کاهش بیانگر واکنش دفاعی در مقابل آلاینده یا در نتیجه کاهش گلبول های قرمز، هموگلوبین و مقادیر هماتوکریت به دنبال اثرات سوء آن باشد (Vaseem & Banerjee, 2012). کاهش Hb و MCV مبین وضعیت اندازه ی اریتروسیت ها و تقسیم غیر طبیعی در طی مرحله ی تولید سلول های قرمز خون در مغز استخوان می باشد (Zorriehzahra *et al*., 2010). نتایج متناقضی نیز در ارتباط با تاثیر عوامل تنش زا مانند آلاینده های محیطی بر شاخص های ثانویه خون شناسی وجود دارد. به عنوان نمونه، اثر نانوذرات اکسید آهن پس از ۹۶ ساعت، باعث افزایش MCV و MCHC در تیلاپیای موزامبیک شده است(Karthikeyeni *et al*., 2013) . در صورتی که تاثیر کادمیوم محلول در آب، در تاسماهی استرلیاد منجر به تغییر معنی دار در شاخص های ثانویه خون شناسی نشده است (Orojali & *et al*., 2013). به نظر می رسد پاسخ شاخص های ثانویه خون شناسی به عوامل تنش زای محیطی، متاثر از عوامل مختلفی همچون نوع گونه، شرایط زیستی، نوع و غلظت مواد آلاینده باشد (رزم آرا و همکاران، ۱۳۹۳).

نتایج تحقیق صورت گرفته نشان داد که با مواجه شدن ماهیان کوی با نانو ذرات اکسید روی، تعداد گلبول های سفید، همچنین درصدهای مونوسیت، لنفوسیت و نوتروفیل کاهش یافته که با ادامه روند آزمایش در روز دهم و با افزایش دوز نانوذرات اکسید روی در تیمار mg/l ۸ ، کاهش معنی دار یافته است. به طورکلی نانوذرات اکسید روی می تواند با کاهش گلبول های سفید باعث کاهش ایمنی و به دنبال آن افزایش حساسیت به بیماری ها شود. Remya و همکاران در سال ۲۰۱۵، کاهش معنی دار تعداد گلبول های سفید نوعی ماهی کپور با نام علمی *Labeo rohita* در مواجهه با نانواکسید آهن را نسبت به گروه شاهد گزارش کرده است و افزایش درگیری سلول ها در فرایندهای ایمنی موجب کاهش تعداد سلول های خونی می شود (Zhang *et al*., 2010). در واقع گلبول های سفید برای حفاظت بدن، جریان خون را ترک کرده و به سمت بافت آسیب دیده حرکت می کنند (Wepener,1990) لذا از تعداد آنها در خون کاسته شده که این وضعیت مطابق با یافته های این تحقیق می باشد. همچنین مطالعه حاضر استفاده از گلبول های سفیدرا به عنوان شاخص زیستی ایمونوتوکسیکولوژی تایید می کند.

یاخته های لنفوسیت با تولید آنتی بادی های ویژه و افزایش آن در ماکروفاژها سیستم دفاعی و ایمنی بدن ماهی را در برابر شرایط نامساعد و بد محیطی ارتقا می بخشند. کاهش شدید لنفوسیت ها در تحقیق انجام شده در اثر ورود ZnO NPs ثبت شد که به دلیل از بین رفتن آنها در اثر ورود ماده ی مورد آزمایش می باشد. البته Gail و همکاران نیز در سال ۱۹۹۹ دریافتند که تعداد لنفوسیت های ماهیان قزل آلا در مجاورت با مس و روی به نسبت شاهد کاهش یافته است. Kosai و همکاران در سال ۲۰۰۹، اظهار داشتند که ۷ روز مواجهه ی ماهی *Oreochromis niloticus* با ۱۰ میلی گرم بر لیتر فلز مس باعث تورم لوله های توبولار، آتروفی گلومرول و نکروز بافت کلیوی شد. اگر لنفوسیت از حد طبیعی آن پایین تر رود، نشان دهنده ی نقص در سیستم ایمنی بدن بوده و ماده ی مخرب وارد شده به بدن می تواند ذخیره لنفوسیت بدن را کاهش دهد (Banaee *et al*., 2008).

لنفوسیت ها نیز به عنوان شاخص سلول های ایمنی در نظر گرفته شده اند (Maheswaran *et al*., 2008) . کاهش تعداد لنفوسیت ها یک واکنش طبیعی بدن ماهیان در قبال ورود مواد خارجی (آلاینده ها) می باشد که می تواند باعث تغییر فرایند های فیزیولوژیکی در ماهیان شود (Gail *et al*., 1995).

در بسیاری از موارد، تنش های فیزیولوژیک می تواند منجر به تغییر تعداد مونوسیت ها و نوتروفیل ها گردد. علاوه بر لنفوسیت ها، نوتروفیل ها و مونوسیت ها، ماهیان را در قبال ورود مواد آلاینده با فعالیت فاگوسیتوز حفاظت می کنند. در تیمارهای تحقیق حاضر به ویژه در

تیمارهای ۴ و ۸ میلی گرم در لیتر که در معرض نانوذرات اکسید روی قرار داشتند، کاهش شدید تعداد مونوسیت ها و نوتروفیل ها، ثبت شد. کاهش تعداد نوتروفیل ها و افزایش مونوسیت ها در اثر استرس ورود فلز سنگین جیوه در ماهیان *Oreochromis niloticus* توسط Ishikawa و Ranzani در سال ۲۰۰۷ گزارش شده است. کاهش تعداد مونوسیت ها در تحقیق اخیر می تواند به دلیل توقف فعالیت بیگانه خواری آنها در اثر نانوذرات اکسید روی باشد که نانوذرات به دلیل داشتن سطح تماس بیشتر، در نتیجه دارای اثر سمیت بیشتر بوده و خصوصیت از بین برندگی شدیدی بر روی تعداد مونوسیت ها و در نهایت سیستم ایمنی دارا می باشد. در تحقیقی که توسط Raina و Sachar در سال ۲۰۱۴ انجام شد کاهش معنی دار مونوسیت ها و نوتروفیل ها در ماهی *Labeo Boga* زمان مواجه شدن با سم کاربومیت ثبت شد در حالیکه مونوسیت های ماهی مورد بررسی تنها در حضور فلز روی، افزایش یافته بودند. مجموعه لکوسیت ها در پاسخ به محرک های مختلف محیطی تغییر می کنند (Johansson-Sjobeck & Larsson, 1979). احتمال می رود تغییرات فاکتورهای هماتولوژی به واسطه شرایط استرس زا بوده و متابولیسم و عملکرد طبیعی فیزیولوژی ماهیان را دچار اختلال می نماید (Blaxhall & Daisley, 1973). امروزه آلودگی های ناشی از نانوذرات به عنوان مسأله ای جدی و خطرناک مطرح شده است (Zhang *et al*., 2010). هرچند استفاده از نانوذرات بسیار کم تر از سایر مواد اثرات مشابه به محیط زیست آسیب رسانده و بهداشت انسانی را تهدید می کند اما ماندگاری نانوذرات اکسید فلزی در محیط و زنجیره غذایی زیاد است، که تداوم مسمومیت های ناشی از آنها را به دنبال دارد (Hoet *et al*., 2004). با توجه به تحقیق انجام شده، شاخص های اریتروسیتی خون می توانند به عنوان بیومارکرهای مناسب آلودگی نانوذرات اکسید روی در ماهی کوی معرفی گردند. همچنین نانوذرات پس از ورود به آب های سطحی، باعث شده تا اثرات نامناسبی بر موجودات زنده منجمله آبزیان موجود در ستون های آبی و رسوبات شده و به این ترتیب، وارد زنجیره غذایی شوند که در نهایت به انسان منتهی می گردد. بنابراین، علاوه بر ارزیابی اثرات نامطلوب این ترکیب بر سایر آبزیان، کنترل و پایش آن از لحاظ ایجاد محدودیت ورود این ماده با توجه به استفاده گسترده ی آن در صنعت، کشاورزی و پزشکی به منابع آبی پیشنهاد می شود.

منابع

شکوری، م.، ابدالی، س.، نگارستان، ح. و حلاجیان، ع. ۱۳۹۱. بررسی اثر سمیت روی بر برخی از پارامترهای بیوشیمیایی خون بچه ماهی فیتوفاگ *Hypophthalmichthys molitrix*. مجله پژوهش های علوم و فنون دریایی، ۷(۳): ۸۶-۷۱.

رزم آرا، پ.، پیکان حیرتی، ف. و درافشان، س.۱۳۹۳. اثر نانو ذرات نقره بر برخی شاخص های خون شناسی گربه ماهی رنگین کمان. مجله سلول و بافت، ۵(۳): ۲۷۲-۲۶۳.

Alkaladi, A., El-Deen, N. A.M., Afifi, M. & Abu Zinadah, O. A. 2015. Hematological and biochemical investigations on the effect of vitamin E and C on *Oreochromis niloticus* exposed to zinc oxide nanoparticles. *Saudi journal Biology sciences*, 22:556-563

Banaee, M., Mirvagefei, A.R., Rafei, G.R. & Majazi Amiri, B. 2008. Effect of sub-lethal Diazinon concentration on blood plasma biochemistry. *International Journal of Environmental Research*, 2(2): 189-198.

Blaise, C., Gagne F., Fe´ rard, J.F & Eullaffroy, P. 2008. Ecotoxicity of selected nanomaterials to aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 223: 591–598.

Blaxhall, P.C. & Daisley, K.W. 1973. Routine hematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology*, 5:771-781.

exposed to sublethal concentrations of mercury. *Brazilian Journal of Zoology*, 50(4):619-626.

James, R. & Sampath, K. 1999. Effect of the ion-exchanging agent, Zeolite, on reduction of cadmium toxicity: an experimental study on growth and elemental uptake in *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Journal of Aquaculture in the Tropics*, 62: 222-229.

Jee, J.H., Masroor, F. & Kang, J.C. 2005. Responses of cypermethrin-induced stress in hematological parameters of Korean rockfish, *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf). *Aquaculture Research*, 36: 898-905.

Johansson-Sjobeck, M. & Larsson, A. 1979. Effects of inorganic lead on delta-aminolevulinic dehydrates activity and hematological variables in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 8: 419-431.

Karthikeyeni, S., Vijayakumar, T.S., Vasanth, S. & Ganesh, A. 2013. Biosynthesis of Iron oxide nanoparticles and its haematological effects on fresh water fish *Oreochromis mossambicus*, *Journal Academic Industrial*, 1(10): 645-649.

Kasemets, K., Lvask, A., Dubourguier, H.C. & Kahru, A. 2009. Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO2 to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicology in Vitro*, 23(6):1116-1122.

Kaya, H., Aydin, F., Gurkan, M., Yilmaz, S., Ates, M., Demir, V. & Arslan, Z. 2016. A comparative toxicity study between small and large size zinc oxide nanoparticles in tilapia *(Oreochromis niloticus):* Organ pathologies, osmoregulatory

Christine, C. & Gokhale, K.S. 2000. Selected oxidative enzymes and histopathological changes in the gills of *Cyprinus carpio* and *Oreochromis mossambicus* cultured in secondary sewage effluent. *Water Research*, 34(11):2997–3004.

Gail, M. D., Daniel, S., Jonathan, T. H. & Howard, C. B. 1999. Alterations in physiological parameters of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with exposure to copper and copper/zinc mixtures. *Journal of ecotoxicology and environmental safety*, 42:253–264.

Gail, N., van Vuren, J.H.J. & Preez, H.H. 1995. Effect of copper on the differential white blood cell coints of the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 111C: 381-388.

George, S., Gardner, H., Seng, E.K., Chang, H., Wang, C., Fang, C.S.Y., Richards, M., Valiyaveettil, S. & Chan, W.K. 2014. Differential effect of solar light in increasing the toxicity of silver and titanium dioxide nanoparticles to a fish cell line and zebrafishembryos. *Environmental Science and Technology*, 48(11) 6374–6382.

Hao, L., Chen, L., Hao, J. & Zhong, N. 2013. Bioaccumulation and sub-acute toxicity of Zinc Oxide nanoparticles in juvenile Carp (*Cyprinus Carpio*). *Ecotoxicology and environmental safety*, 91:52-60.

Hoet, P.H.M, Irene Brüske-Hohlfeld, B.H. & Salata, O.V. 2004. Nanoparticles – known and unknown health risks. *Journal of Nanobiotechnology*, 2:12.

Ishikawa, N.M., Ranzani-Paiva, M.J.T., Lombardi, J.V., Ferreira, C.M. 2007. Haematological parameters in Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*

water fish, *Clarias batradrus* (L) exposed to mercuric chloride. *International Journal of Integrative Biology*, 2(1): 49-54.

Mitchelmore, C.L. & Chipman, J.K. 1998. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutation Research*, 399: 135-147.

Nelson, D.A. & Morris, M. W. 1989. Basic methodology hematology &coagulation. Part IV. Saunders

Company. Philadelphia, USA.

Orojali, M., Paykan Heyrati, F., Mahboobi Soofiani, N. & Dorafshan, S. 2013. Cadmium sub-lethal concentration effects on the haematological parameters of starlet (*Acipenser ruthenus*). *Journal Fish Scientific Technology*, 2(2):11-22.

Panigrahi, A.K. & Misra, B.N. 1987. Toxicological effects of mercury on a fresh waterfish Anabas

Scandens, CUV and VAL and their ecological implications. *Environment Pollution*, 16: 31-39.

Petersen, E.J. & Henry, T.B. 2012. Methodological considerations for testing the ecotoxicity of carbon

Nano tubes and fullerenes: review. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31 (1): 60–72.

Raina, S. & Sachar A. 2014. Effect of heavy metal, zinc and carbamate pesticide, sevin on haematological parameters of fish, *Labeo Boga*. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 3(5):12636- 12644.

Rajkumar, K. S., Kanipandian, N. & Thirumurugan, R., 2015. Toxicity assessment on haemotology, biochemical and histopathological alterations of silver nanoparticles-responses and immunological parameters. *Chemosphere*, 144:571-582.

Klaine, S.J., Alvarez, P.J.J., Batley, G.E., Fernandes, T.F., Handy,R.D., Lyon, D.Y., Mahendra, S.,

McLaughlin, M.J. & Lead, J.R. 2008. Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27: 9.1825–1851.

Kosai, P., Jiraungkoorskul, W., Thammasunthorn, T. & Jiraungkoorskul, K. 2009. Reduction of copper-induced histopathological alterations by calcium exposure in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Toxicology Mechanisms and Methods*, 19: 461-467.

Little, E.E., Fairchild, J.F. .& DeLonay, A.J. 1993. Behavioral methods for assessing the impacts of contaminants on early life stage fishes. In American Fisheries Society Symposium 14 water Quality and the Early Life Stages of Fishes. L. Fuiman (ed). America Fisheries Society. Bethesda.

Liu, J., Fan, D., Wang, L., Shi, L., Ding, J., Chen, Y. & Shen, S. 2014. Effects OF ZnO, CuO, Au, and TiO2 Nanoparticles on *Daphnia magna* and early Life stages of Zebrafish *Danio rerio. Environmental Protection Engineering*, 40: 140-149.

Ma, H., Williams, P.L. & Diamond, S.A. 2013. Ecotoxicity of manufactured ZnONPs – A Review. *Environmental Pollution*, 172: 76-85.

Maheswaran, R., Devapanl, A., Muralidharan, S., Velmurugan, B. & Ignaeimuthu, S. 2008. Haematological studies of fresh

enzymes in *Tilupiu spurrmunii* (Cichlidae). M.Sc.-Thesis, Rand Afrikaans University. South Africa.

Zhang, X.D., Wu, H.Y., Wu, D., Wang, Y.Y., Chang, J.H., Zhai, Z.B., Meng, A.M., Liu, P.X., Zhang, L.A. & Fan, F.Y. 2010. Toxicologic effects of gold nanoparticles in vivo by different administration routs. *International Journal of Nanomedicine*, 5:771-781.

Zorriehzahra, M.J., Hassan, M.D., Gholizadeh, M. & Saidi, A.A. 2010. Study of some hematological and biochemical parameters of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry in western part of Mazandaran province, Iran. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 9(1): 185-198.

exposed freshwater fish *Labeo rohita*. *Apply Nanoscience*, 6:19–29.

Remya, A.S., Ramesh,.M., Saravanan, M., Poopal, R.K., Bharathi, S. & Nataraj, D. 2015. Iron oxide nanoparticles to an Indian major Carp, *Labeo rohita*: Impacts on hematology, iono regulation and gill Na+/K+ ATPase activity. *Journal of King Saudi University*, 27: 151–160.

Sadiq Bukhari, A., Syed Mohamed, H.E., Broos, K.V., Stalin, A., Singhal, R.K. & Venubabu, P. 2012.

Histological variations in liver of freshwater fish *Oreochromis mossambicus* exposed to 60Co gamma, of

Irradiation. *Journal of Environmental Radioactivity*, 113: 57-62.

Stentiford, G.D., Longshaw, M., Lyons, B.P., Jones, G., Green, M. & Feist, S.W. 2003.Histophathological

biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. *Marine*

Environmental Research, 55(2): 137-159.

Vaseem, H. & Banerjee, T.K. 2012. Toxicity analysis of effluent released during recovery of metals from polymetallic sea nodules using fish haematological parameters. The Functioning of Ecosystem. Edition: 1st, Chapter: 13, Publisher Intech. Rijeka, Croatia.

Wells, R.M.G., Baldwin, J. 1990. Oxygen transport potential in tropical reef fish with special reference to blood viscosity and haematocrit. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 141: 131-142.

Wepener, V. 1990. The effect of heavy metals at different pH on the blood physiology and metabolic

Effect of nano-zinc oxide (ZnO NPs) on hematological indices of Koi fish (*Cyprinus carpio*)

Bakhshi, M., Kazemian*, M
Dept. of Fisheries, Faculty of Marine Science and Technology, Islamic Azad University, Tehran North Branch

Abstract
The increased industrial applications of nanoparticles increase the possibility their deposition into aquatic ecosystems and thereby threatening the aquatic life. Therefore, this study aimed to provide the toxicological effects of ZnO NPs (0, 1,2,4,8 $mg.L^{-1)}$ on certain hematological indices of Koi fish for a period of 2 and 10 days, under static bioassay. A significant decrease in hemoglobin (Hb) content 7.3±0.19, red blood cell (RBC) count 1.41±0.03, hematocrit (Hct) value 22±0.66, mean cellular volume (MCV) 155.35±5.29 and mean cellular hemoglobin (MCH) 51.2±2.07 (except on 4 $mg.L^{-1}$dose) was noticed throughout the study period of 10 days when compared to control groups. In contrast, mean cellular hemoglobin concentration (MCHC) levels 4±0.23 were found to increase during the study period. Our results demonstrate that high ZnO NPs concentrations in the aquatic environment may have adverse effects and cause acute changes on hematological parameters of Koi fish.

Key words: Nano Zinc Oxide, Hematological Indices, Koi Fish

***Corresponding author**: Aquaculture@Live.com