



University of Guilan with collaboration of Iranian
Aquaculture Society

Aquatic Animals Nutrition

Vol. 9, No. 1, 2023, pages: 11-25
DOI: 10.22124/janb.2023.24281.1202



Histopathology of dietary exposure to the selenium and iron nanoparticles on the liver tissue of reared beluga, *Huso huso*

Forouzan Bagherzadeh Lakani ^{*1}, Soheil Bazari Moghaddam¹, Mehdi Masoumzadeh¹,
Ayoub Yousefi Jourdehi ²; Jalil Jalilpour¹

1- Department of Fish Health and Disease, International Sturgeon Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Guilan, Iran.

2- Department of Fish Physiology and Biochemistry, International Sturgeon Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Guilan, Iran.

Received 19 November 2022

Revised 13 March 2023

Accepted 16 March 2023

KEYWORDS ABSTRACT

Beluga (*Huso
huso*)
Nanoparticles
Selenium
Iron
Histopathology
Liver

This study aimed to investigate the effects of different levels of selenium nanoparticles (Se-NPs) and iron nanoparticles (Fe-NPs) on histopathology of the liver in the beluga juvenile, *Huso huso*. A total of 135 beluga juveniles (with initial weight of 276.4 ± 32.3 g and initial length of 40.0 ± 2.0 cm) were randomly distributed in 27 fiberglass tanks at 9 different treatments with three replicates. Treatments included T₁ (control, no added NPs); T₂ (1 mg/kg Se-NPs); T₃ (2 mg/kg Se-NPs); T₄ (100 mg/kg Fe-NPs); T₅ (100 mg/kg Fe-NPs + 1 mg/kg Se-NPs); T₆ (100 mg/kg Fe-NPs + 2 mg/kg Se-NPs); T₇ (200 mg/kg Fe-NPs); T₈ (200 mg/kg Fe-NPs + 1 mg/kg Se-NPs); T₉ (200 mg/kg Fe-NPs + 2 mg/kg Se-NPs). Before starting the experiment, the fish were adapted to the rearing conditions for one week. The amount of feeding during the rearing period was 2-3% based on the weight and water temperature, and the fish were fed three times a day (8:00, 15:00 and 21:00) for 8 weeks. In order to find the histopathological changes, the livers of six fish from each group (two fish of each replicate) were sampled at the end of the experiment. Samples were dehydrated by routine methods and embedded in paraffin wax. They were sectioned by microtome and stained with H & E. Vacuolar degeneration, necrosis, inflammation, irregular hepatocytes and hemorrhage were the tissue lesions observed in the liver. Given that, T₅ (100 mg/kg Fe-NPs + 1 mg/kg Se-NPs) had the lowest liver tissue damage, using 1 mg selenium nanoparticles with 100 mg iron nanoparticles in the diet of farmed beluga is recommended.

*Corresponding author: f.bagherzadeh.l@areeo.ac.ir





"مقاله پژوهشی"

آسیب شناسی بافت کبد در فیل ماهی *Huso huso* پرورشی تغذیه شده با نانوذرات سلیوم و آهن

فروزان باقرزاده لاکانی^{۱*}، سهیل بازاری مقدم^۱، مهدی معصوم زاده^۱، ایوب یوسفی جوردهی^۲، جلیل جلیل پور^۱

۱- بخش بهداشت و بیماری‌ها، انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان

تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، گیلان، ایران.

۲- بخش فیزیولوژی و بیوشیمی، انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان

تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، گیلان، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۵

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۱۲/۲۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۲۸

کلمات کلیدی

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی تأثیر سطوح مختلف نانوذرات سلیوم (Se-NPs) و نانوذرات آهن (Fe-NPs) بر ساختار بافت کبد فیل‌ماهی (*Huso huso*) پرورشی انجام شد. تعداد ۱۳۵ عدد فیل‌ماهی پرورشی (با میانگین وزنی $32/3 \pm$ گرم و میانگین درازای کل 40 ± 2 سانتی متر) به طور تصادفی در ۲۷ مخزن فایبرگلاس در ۹ تیمار مختلف با ۳ تکرار توزیع شدند. تیمارها شامل تیمار ۱: شاهد (بدون افزودن نانوذرات)، تیمار ۲: 1 mg/kg Se-NPs ، تیمار ۳: 2 mg/kg Se-NPs ، تیمار ۴: 100 mg/kg Fe-NPs ، تیمار ۵: $1 \text{ mg/kg Se-NPs} + 100 \text{ mg/kg Fe-NPs}$ ، تیمار ۶: $100 \text{ mg/kg Fe-NPs} + 1 \text{ mg/kg Se-NPs}$ ، تیمار ۷: 2 mg/kg Fe-NPs ، تیمار ۸: 200 mg/kg Fe-NPs ، تیمار ۹: $1 \text{ mg/kg Se-NPs} + 200 \text{ mg/kg Fe-NPs}$ ، تیمار ۱۰: $2 \text{ mg/kg Se-NPs} + 200 \text{ mg/kg Fe-NPs}$ بود. میزان غذایی به ماهی‌ها در طی دوره پرورش بر اساس وزن و درجه حرارت آب $2-3\%$ زی‌توده بوده و روزانه در سه نوبت (ساعات ۸، ۱۵ و ۲۱) و به مدت ۸ هفته انجام شد. در پایان آزمایش از بافت کبد شش ماهی از هر تیمار (دو ماهی از هر تکرار) نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها طبق روش استاندارد بافت‌شناسی با استفاده از دستگاه عمل‌آوری بافت، آبگیری، شفاف‌سازی، پارافینه و قالب‌گیری شدند. سپس توسط دستگاه میکروتوم برش داده شده و با روش هماتوکسیلین-ئوزین (H&E) رنگ آمیزی و توسط میکروسکوپ نوری بررسی شدند. آسیب‌های مشاهده شده در بافت کبد شامل دژنراسیون واکوولی، نکروز، التهاب، هیپاتوسیت‌های نامنظم و خونریزی بوده است. با توجه به اینکه تیمار ۵ ($100 \text{ mg/kg Fe-NPs} + 1 \text{ mg/kg Se-NPs}$) کمترین میزان آسیب بافت کبد را داشته است، بکارگیری ۱ میلی‌گرم نانوذرات سلیوم به همراه ۱۰۰ میلی‌گرم نانوذرات آهن در جیره غذایی فیل‌ماهی پرورشی توصیه می‌شود.

مقدمه

امروزه با توجه به افزایش روز افزون جمعیت جهان، تقاضا برای محصولات غذایی آبرزی بیشتر شده و به نظر می‌رسد که در آینده سهم زیادی از این تقاضا از طریق آبرزی پروری تأمین شود. تکثیر و پرورش آبریان از فعالیت‌های اقتصادی با ارزش محسوب می‌شود.

ماهیان خاویاری از جمله ماهیان ارزشمند اقتصادی هستند که صید و بهره‌برداری از آن‌ها به دلایل گوناگون از جمله تخریب بستر رودخانه‌های محل زیست و تخم‌ریزی طبیعی آن‌ها، سدسازی روی رودخانه‌ها، صید بی‌رویه و نظارت نامناسب بر آن، افزایش بار آلاینده‌ها به دریا و غیره در جهان با کاهش شدیدی مواجه شده است. لذا رویکرد جدید توسعه پرورش این ماهیان به عنوان گزینه‌ای مناسب حتی در کشورهایی که از داشتن این ماهیان به‌طور طبیعی بهره‌مند نیستند، بسیار مورد توجه قرار گرفته است (برادران نویری، ۱۳۹۰). فیل ماهی (*Huso huso*) مشهورترین ماهی خاویاری جهان است که خاویار آن ممتاز، درشت و گرانترین خاویار به‌شمار می‌رود. از خصوصیات جالب توجه این ماهی سرعت رشد حیرت‌انگیز و زاد و ولد بالای آن است. طول آن به ۵ متر و وزن آن به ۱۵۰۰ کیلوگرم نیز می‌رسد و تا ۱۰۰ سال عمر می‌کند. بیشترین آهنگ رشد این ماهی در چهار سال اول زندگی است و در شمال کشور طی ۳۶ ماه به وزن بالای ۱۰ کیلوگرم می‌رسد (یزدانی و همکاران، ۱۳۹۰). رشد سریع، ضریب تبدیل غذایی مناسب، تکثیر آسان در شرایط اسارت و سازگاری نسبت به شرایط نامساعد محیطی سبب انتخاب این گونه برای پرورش تجاری در کارگاه‌های پرورشی می‌شود (محمدیان، ۱۳۷۸).

امروزه از فناوری نانو به عنوان یک فناوری کلیدی و تأثیرگذار بر علم و صنعت یاد می‌شود (Gerf et al. 1994). نانوذرات مجموعه‌ای از چندین اتم با عنصری خاص هستند. ویژگی‌های مهم نانوذرات شامل اندازه کوچک، سطح وسیع‌تر، ویژگی‌های نوری خاص و پوشش سطحی ویژه آن‌هاست (Geiser et al. 2003; Chan, 2006). اندازه کوچک این ذرات می‌تواند به تغییرات اساسی در ساختار و خواص این عناصر منجر شود، به طوری که تا به امروز صدها تولید جدید برای اهداف مختلف در زمینه فناوری نانو ساخته شده است. ورود این

فناوری به عرصه آبرزی پروری و استفاده کاربردی از آن در بسیاری از کشورها گسترش یافته است.

سلنیوم عنصری کمیاب و ضروری برای حیوانات، از جمله ماهی است و یک ماده مغذی ضروری بسیار عالی برای افزایش محصول در آبرزی پروری به حساب می‌آید. سلنیوم یک جزء از آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز (GPX) است که از غشای یاخته‌ای در مقابل استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند (Rotruck et al. 1973; Watanabe et al. 1997). در همین راستا، با توجه به افزایش علاقه به موضوع مصرف سلنیوم در رژیم غذایی، نانوذرات سلنیوم به عنوان مکمل تغذیه‌ای جدید پیشنهاد شده است. نانوذرات سلنیوم با توجه به مزایای متعدد از قبیل پایداری شیمیایی، زیست‌فراهمی بالا، سازگاری زیستی و سمیت پایین، مورد توجه قرار گرفته است (Shi et al. 2010; Wang et al. 2013).

آهن جزء ریزمغذی‌هایی است که تأثیر به‌سزایی در انجام فعالیت‌های طبیعی اندام‌های بدن ماهی دارد و یک عنصر ضروری است که برای بسیاری از فرایندهای سوخت و ساز مانند حمل اکسیژن، سوخت و ساز داروها، تولید استروئیدها، ساختن DNA، تولید ATP و نقل و انتقال الکترون‌ها نیاز است (Crichton, 1991). آهن در سازوکارهای کنترل‌کننده تشکیل خون و تنفس دخیل است و همچنین، دارای اثرات تنظیم‌کننده کلیدی همسو با تولید هورمون و سوخت و ساز اسید چرب است (Brody, 1994). این عنصر جزو ترکیب تمام یاخته‌های بدن است و به خصوص در کبد و طحال ذخیره می‌شود. آهن برای سوخت و ساز صحیح ویتامین‌های B ضروری است. وظایف آهن انتقال اکسیژن در گلبول‌های قرمز، تولید هموگلوبین خون، مقاومت در برابر استرس و عملکرد صحیح آنزیم‌ها و تقویت دستگاه ایمنی است. با بهره‌گیری از فناوری نانو در صنعت آبرزی پروری اشکال جدید و متنوعی از مواد معدنی به‌خصوص آهن در مدل‌های متفاوت مانند نانوذرات صفر ظرفیتی (خنثی) و نانوذرات اکسید آهن در مقیاس‌های مختلف تولید می‌شود. با توجه به اینکه نیاز به یک سطح بهینه آهن در حفظ سلامتی ماهی به طور گسترده ثابت شده است، اما تا کنون چندین گزارش نتایج متضاد را برای میزان آهن مورد نیاز در ماهی‌ها نشان داده است که از گونه‌ای به گونه‌ای دیگر و در شرایط محیطی متنوع، متفاوت است (Hem, 1989).

مواد و روش ها

نانوذرات مورد استفاده

محلول کلئیدی نانو ذرات سلیوم در آب با خلوص بالا (۹۹٪/۹۵) و ابعاد ۱۰-۴۵ nm از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان تهیه شد. تصاویر SEM^۱ و TEM^۲ نانو ذرات سلیوم در شکل های ۱ و ۲ ارائه شده است. نانو ذرات آهن با خلوص بالا (۹۹٪/۵) و ابعاد ۳۵-۴۵ nm از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان تهیه شد. تصاویر SEM و TEM نانو ذرات آهن در شکل های ۳ و ۴ ارائه شده است.

ماهی و شرایط آزمایش

تأسیسات پرورشی در یک مکان سرپوشیده (بخش آبی پروری انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری) قرار داشت و دوره نوری به صورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بود. این تحقیق در قالب ۹ تیمار (هر تیمار دارای ۳ تکرار) انجام شد. قبل از شروع آزمایش ماهیان به مدت یک هفته با شرایط مخازن سازگار شدند. سپس ۱۳۵ عدد فیل ماهی پرورشی (با میانگین وزنی $32/3 \pm$ گرم و میانگین طول کل 2 ± 40 سانتیمتر) در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۲۷ مخزن فایبرگلاس نیم تنی (حاوی ۳۰۰ لیتر آب) توزیع شدند. غذای مورد استفاده در این مطالعه غذای تجاری آماده با قطر ۳ میلی متر حاوی مقادیر پروتئین خام ۴۸٪، چربی خام ۱۵٪، فیبر خام ۳٪، فسفر ۱/۵٪، خاکستر ۹٪، رطوبت ۱۱٪، کلسیم ۱/۸٪ و سدیم ۰/۵٪ بود. برای افزودن نانوذرات به غذا و تهیه جیره غذایی، از روش انحلال نانوذرات در آب مقطر و افشانه کردن در سطوح غذا و سپس آمیختن کامل این ترکیبات استفاده شد. لذا برای آماده سازی جیره های حاوی نانوذرات مطابق جدول ۱، در هر تیمار، مقدار محاسبه شده نانوذرات سلیوم و آهن برای دستیابی به دوزهای مورد نظر، ابتدا با آب مقطر به حجم ۵۰ میلی لیتر رسانده و سپس به صورت جداگانه به یک کیلوگرم غذا برای تیمار بندی اضافه شد و پس از ترکیب با غذای مصرفی، معادل نیاز روزانه ماهیان، استفاده شد. برای یکسان سازی شرایط، در مورد تیمار شاهد (فاقد نانو

در دیگر مطالعات، حاجی رحیمی و همکاران (۱۳۹۴) تأثیر نانوذرات اکسید آهن و روی را بر بافت کبد و عضله در ماهی قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بررسی کردند. ماهیان به ترتیب مقادیر ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم از نانوذرات روی و اکسید آهن را در هر گرم غذا به مدت ۶۰ روز دریافت کردند. ماهیان آسیب های جدی در یاخته های کبدی از جمله لیپیدوز، التهاب و برهم ریختن نظم لوپول کبدی نشان دادند. ابراهیمی و همکاران (۱۳۹۹) نیز اثرات مقادیر مختلف نانو ذره آهن (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) را بر عملکرد رشد، بقا، برخی شاخص های خونی-ایمنی و بافت کبد بچه ماهی ازون برون (*Acipenser stellatus*) بررسی و گزارش کردند که استفاده از نانو ذره آهن به مقدار ۵۰ میلی گرم در کیلوگرم سبب بهبود سلامت و بقای بچه ماهیان ازون برون شده، و اثر منفی بر کبد این ماهی نداشته است. صحرایی و همکاران (۱۴۰۱) اثرات بافتی تغذیه با منابع مختلف آهن و روی (نانو ذره و شکل معدنی) را در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) بررسی کردند. ماهیان به ترتیب مقادیر ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم از نانو ذرات آهن و روی را در هر گرم غذا به مدت ۶۰ روز دریافت کردند. مطالعات ریزبینی بافت کبد نشان داد که با افزایش میزان نانوذرات، آسیب های بافتی در کبد بیشتر می شود، اما یاخته های بافتی در مقادیر متوسط و کم هر دو نانو ذره و در مقدار بالای نانو ذره آهن با برداشتن عامل القایی می توانند دوباره فعالیت فیزیولوژیک خود را از سر بگیرند، اما در مقدار بالای روی این ترمیم بافتی برخلاف نانو ذرات آهن به صورت برگشت پذیر نبوده است. Mechlaoui و همکاران (۲۰۱۹) اثر اشکال مختلف سلیوم شامل سلیوم معدنی (سلیت سدیم) و سلیوم آلی (هیدروکسی سلنومیتونین) را در جیره غذایی ماهی سیم بررسی کردند. در ماهیان تیمار ۰/۲ میلی گرم در کیلوگرم سلنومیتونین در جیره غذایی اثر مثبتی بر رشد، ریخت شناسی بافت کبد و مقاومت در برابر استرس های مزمن و حاد و محافظت در برابر استرس اکسیداتیو داشت. با توجه به نتایج مطالعات انجام شده، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات نانوذرات سلیوم و آهن بر ساختار بافت کبد فیل ماهیان پرورشی انجام شد.

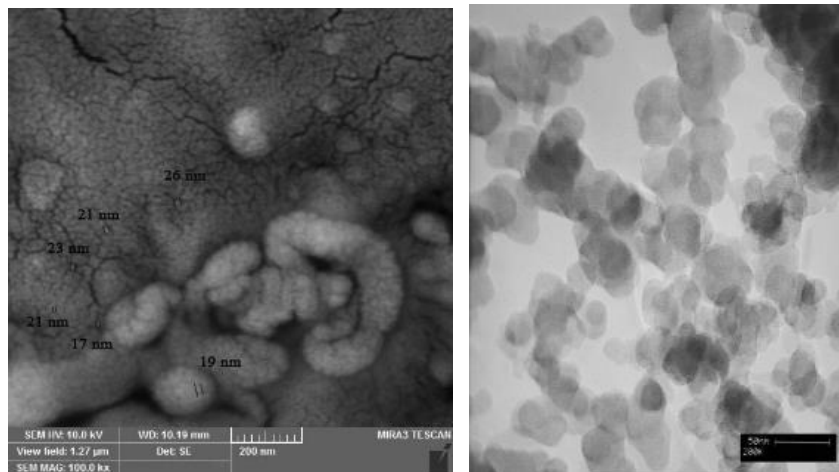
¹ Scanning electron microscopy

² Transmission electron microscope

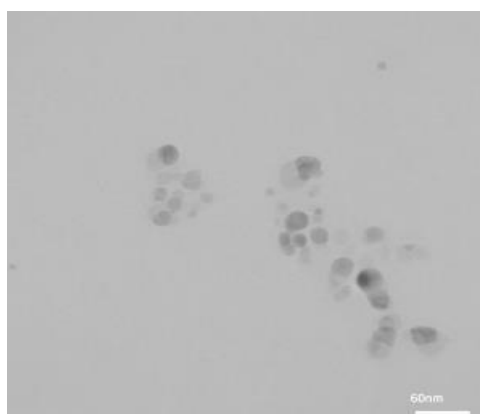
³ Completely Randomized Design

وعده‌های مختلف در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. میزان غذایی در طی دوره پرورش بر اساس وزن و درجه حرارت آب ۲-۳٪ زی‌توده بود و روزانه در سه نوبت (ساعات ۸، ۱۵ و ۲۱) ماهیان غذایی شدند. آب مخازن جریان‌دار بود و هوادهی انجام شد.

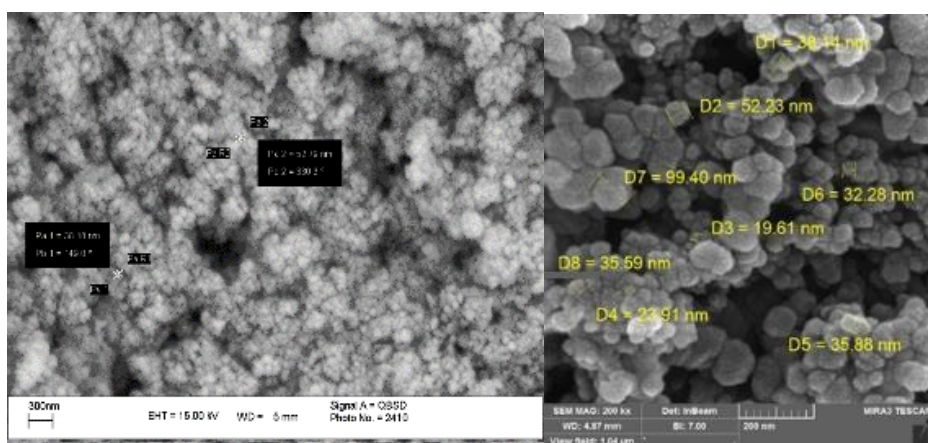
ذرات (نیز ۵۰ میلی لیتر آب مقطر (فاقد نانوذرات) بر روی غذا افشانه شد. برای محافظت غذاها و جلوگیری از رها شدن نانو ذرات و ورود آن‌ها به محیط آب، غذاهای آماده شده به روش فوق، توسط لایه‌ای از روغن پوشانده شد (Ramsden et al. 2009). غذای تولید شده در ظروف مخصوص درب‌دار ریخته، و سپس برای توزیع در



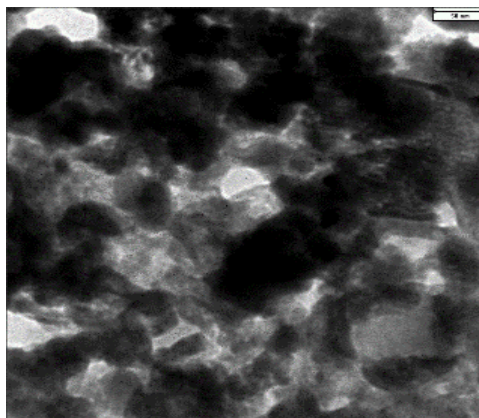
شکل ۱ تصاویر میکروسکوپ الکترونی (SEM) نانوذرات سلنیوم



شکل ۲ تصویر میکروسکوپ الکترونی (TEM) نانوذرات سلنیوم



شکل ۳ تصاویر میکروسکوپ الکترونی (SEM) نانوذرات آهن



شکل ۴ تصویر میکروسکوپ الکترونی (TEM) نانوذرات آهن

جدول ۱ سطوح مختلف سلنیوم آهن مورد استفاده برای آماده سازی جیره های آزمایشی.

تیمارها	میزان نانوذره سلنیوم (میلی گرم در کیلوگرم جیره غذایی)	میزان نانوذره آهن (میلی گرم در کیلوگرم جیره غذایی)
۱	۰	۰
۲	۱	۰
۳	۲	۰
۴	۰	۱۰۰
۵	۱	۱۰۰
۶	۲	۱۰۰
۷	۰	۲۰۰
۸	۱	۲۰۰
۹	۲	۲۰۰

فراسنجه های فیزیکی و شیمیایی آب

برای حفظ شرایط مناسب فیزیکی و شیمیایی آب، فراسنجه های کیفی آب در طی دوره، اندازه گیری و ثبت شد. اندازه گیری بعضی از فراسنجه ها از جمله

درجه حرارت، اکسیژن و pH آب به صورت روزانه انجام شد. اکسیژن با استفاده از دستگاه اکسی متر (OXI3230B/SET)، pH با استفاده از دستگاه pH meter (pH330i/SET) اندازه گیری شد.

جدول ۲ فراسنجه‌های فیزیکی و شیمیایی آب

تیماها	دما (°C)	اکسیژن (mg/l)	اشباعیت اکسیژن (%)	pH
۱	۱۷/۹ ± ۰/۲	۹/۱ ± ۰/۲	۹۷/۵ ± ۰/۱	۷/۷ ± ۰/۰
۲	۱۷/۸ ± ۰/۱	۹/۳ ± ۰/۲	۹۸/۶ ± ۰/۷	۷/۷ ± ۰/۱
۳	۱۷/۸ ± ۰/۲	۹/۱ ± ۰/۳	۹۶/۸ ± ۲/۶	۷/۸ ± ۰/۱
۴	۱۷/۸ ± ۰/۱	۹/۰ ± ۰/۲	۹۵/۲ ± ۲/۹	۷/۷ ± ۰/۰
۵	۱۷/۸ ± ۰/۲	۹/۲ ± ۰/۱	۹۷/۴ ± ۰/۹	۷/۸ ± ۰/۱
۶	۱۷/۸ ± ۰/۱	۹/۱ ± ۰/۲	۹۶/۲ ± ۲/۳	۷/۷ ± ۰/۱
۷	۱۷/۹ ± ۰/۱	۹/۱ ± ۰/۲	۹۵/۶ ± ۱/۴	۷/۶ ± ۰/۰
۸	۱۷/۹ ± ۰/۱	۹/۱ ± ۰/۲	۹۶/۲ ± ۲/۴	۷/۶ ± ۰/۰
۹	۱۷/۹ ± ۰/۱	۹/۲ ± ۰/۱	۹۷/۹ ± ۰/۵	۷/۷ ± ۰/۰

مطالعات آسیب‌شناسی کبد

در پایان دوره پرورش از کبد و روده شش بچه ماهی از هر تیمار (دو ماهی از هر تکرار) نمونه برداری شد و نمونه‌ها در محلول بوئن (شامل ۷۵٪ اسید پیکریک اشباع، ۲۵٪ فرمالین و ۵٪ اسید استیک) تثبیت شدند. نمونه‌های تثبیت شده طبق روش استاندارد بافت شناسی با استفاده از دستگاه عمل‌آوری بافت، آبگیری، شفاف سازی، پارافینه و قالب‌گیری شدند. سپس به وسیله دستگاه میکروتوم مقاطع ریزبینی ۷ میکرونی تهیه شد. مقاطع به روش هماتوکسیلین-ئوزین (H&E) رنگ آمیزی، و با میکروسکوپ نوری (Olympus, BH2, Japan) مجهز به دوربین Sony (Zeiss, Cyber-Shot, Japan) بررسی شدند. برای بررسی میزان آسیب‌ها به صورت کمی، تمام سطح مقطع در کلیه‌ی نمونه‌های بافت بررسی، و شدت عوارض به صورت زیر طبقه بندی شد:

- ❖ ۰ = طبیعی (بدون آسیب)
- ❖ ۱ = آسیب با شدت کم (۰-۲۵٪ بافت)
- ❖ ۲ = آسیب با شدت متوسط (۲۶-۵۰٪ بافت)
- ❖ ۳ = آسیب با شدت زیاد (۵۱-۷۵٪ بافت)
- ❖ ۴ = آسیب خیلی شدید (۷۶-۱۰۰٪ بافت)

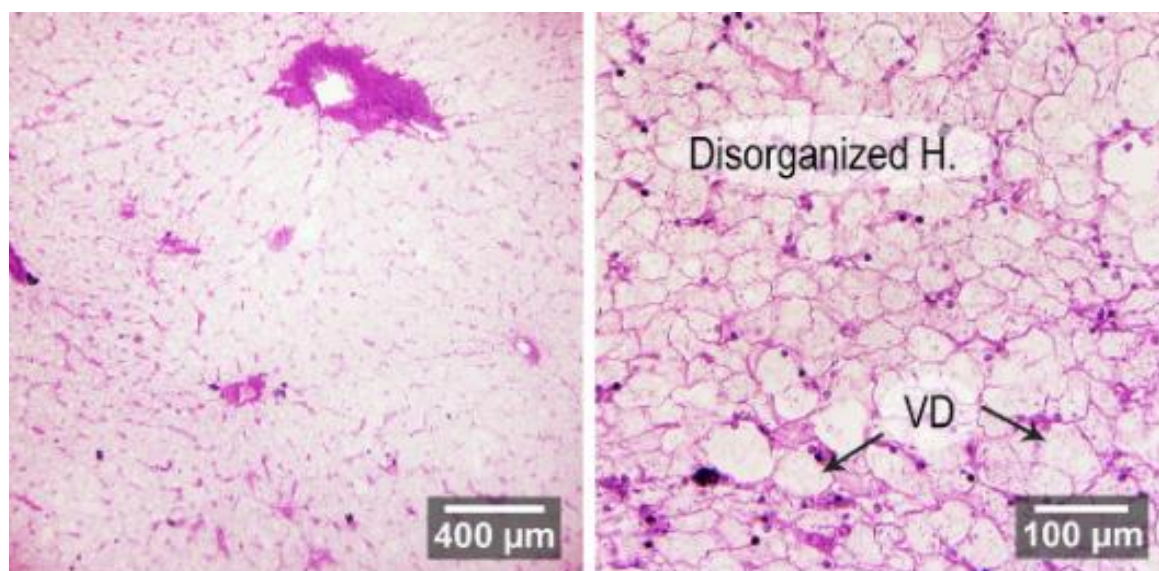
نتایج

نتایج بافت شناسی کبد فیل‌ماهیان پرورشی تغذیه شده با جیره‌های حاوی نانوذرات سلنیوم و آهن در شکل‌های ۵ تا ۱۳ ارائه شده است. عارضه‌های مشاهده شده در بافت کبد شامل استحال (دژنراسیون) واکوئولی^۱، نکروز^۲، التهاب^۳، وجود یاخته‌های کبدی (هپاتوسیت‌های) نامنظم^۴ و خونریزی^۵ در بافت بوده است. شدت عارضه‌های مشاهده شده نیز در جدول ۳ ارائه شده است. در مجموع، کمترین میزان آسیب بافت کبد در تیمار ۵ مشاهده شد.

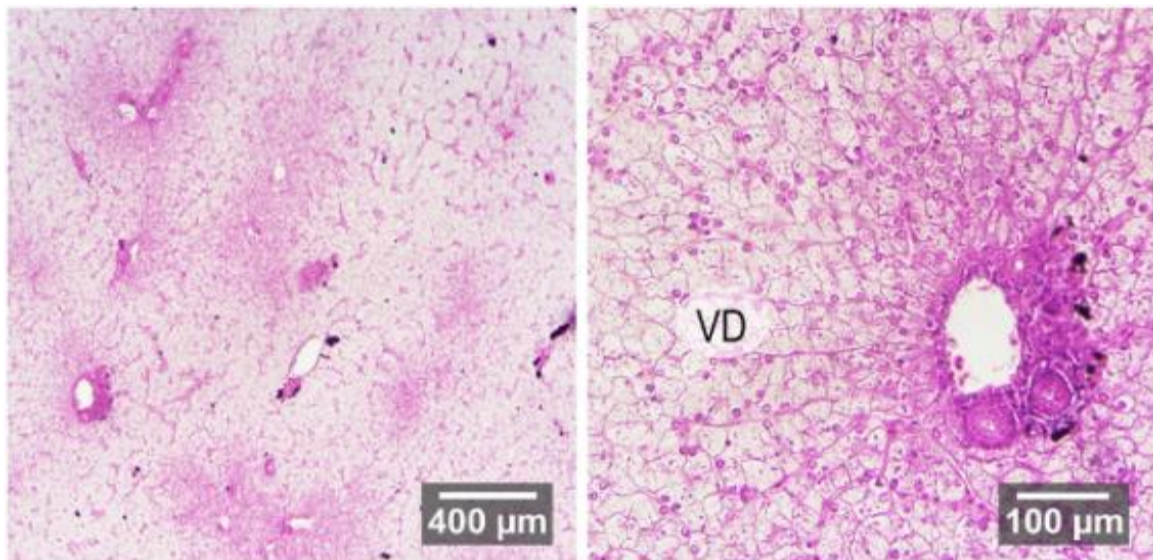
^۱ Vacuolar degeneration^۲ Necrosis^۳ Inflammation^۴ Disorganized Hepatocytes^۵ Haemorrhage

جدول ۳ عارضه‌های مشاهده شده در بافت کبد فیل ماهیان *Huso huso* پرورشی تغذیه شده با جیره های حاوی نانوذرات سلیوم و آهن (میانگین $\pm$ SD). تیمار ۱: شاهد (بدون افزودن نانوذرات)، تیمار ۲: ۱ mg/kg Se-NPs، تیمار ۳: ۲ mg/kg Se-NPs، تیمار ۴: ۱۰۰ mg/kg Fe-NPs، تیمار ۵: ۱۰۰ mg/kg Fe-NPs + ۱ mg/kg Se-NPs، تیمار ۶: ۲ mg/kg Se-NPs + ۱۰۰ mg/kg Fe-NPs، تیمار ۷: ۲۰۰ mg/kg Fe-NPs، تیمار ۸: ۲۰۰ mg/kg Fe-NPs + ۱ mg/kg Se-NPs، تیمار ۹: ۲۰۰ mg/kg Fe-NPs + ۲ mg/kg Se-NPs. شدت عارضه ها: ۰ = بدون آسیب، ۱ = آسیب با شدت کم، ۲ = آسیب با شدت متوسط، ۳ = آسیب با شدت زیاد و ۴ = آسیب خیلی شدید.

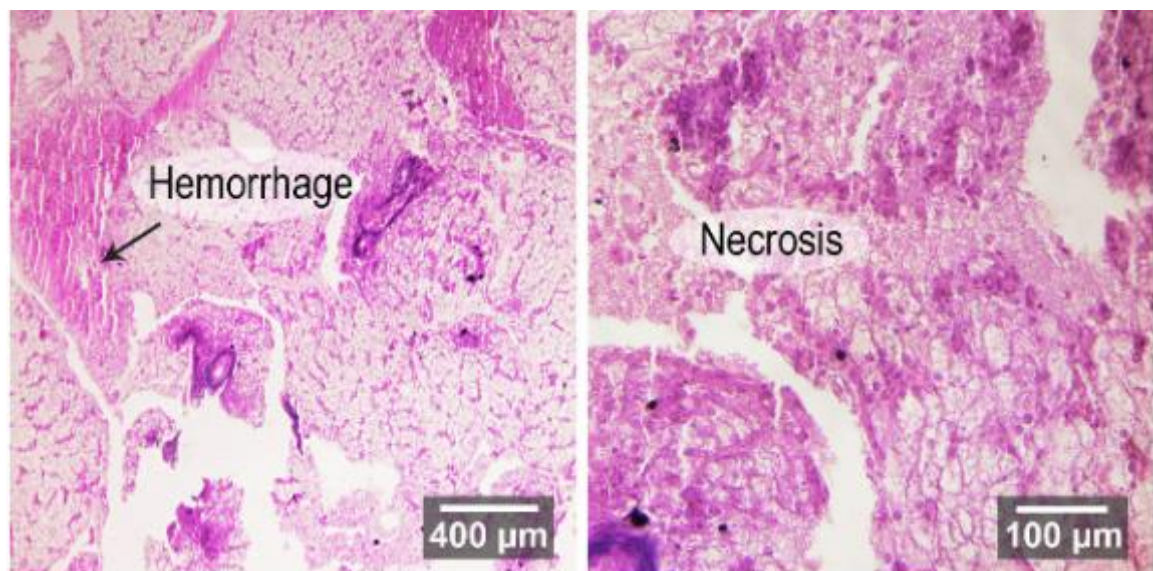
شدت عارضه‌های مشاهده شده					
تیمار	دژنراسیون واکوئولی	نکروز	التهاب	یاخته‌های کبدی نامنظم	خونریزی
۱	۴	۴	۴	۳	۳
۲	۴	۳	۴	۳	۱
۳	۳	۳	۲	۳	۴
۴	۴	۳	۲	۲	۱
۵	۱	۱	۱	۱	۲
۶	۴	۴	۳	۳	۳
۷	۴	۳	۴	۳	۳
۸	۲	۲	۲	۲	۱
۹	۴	۴	۲	۳	۲



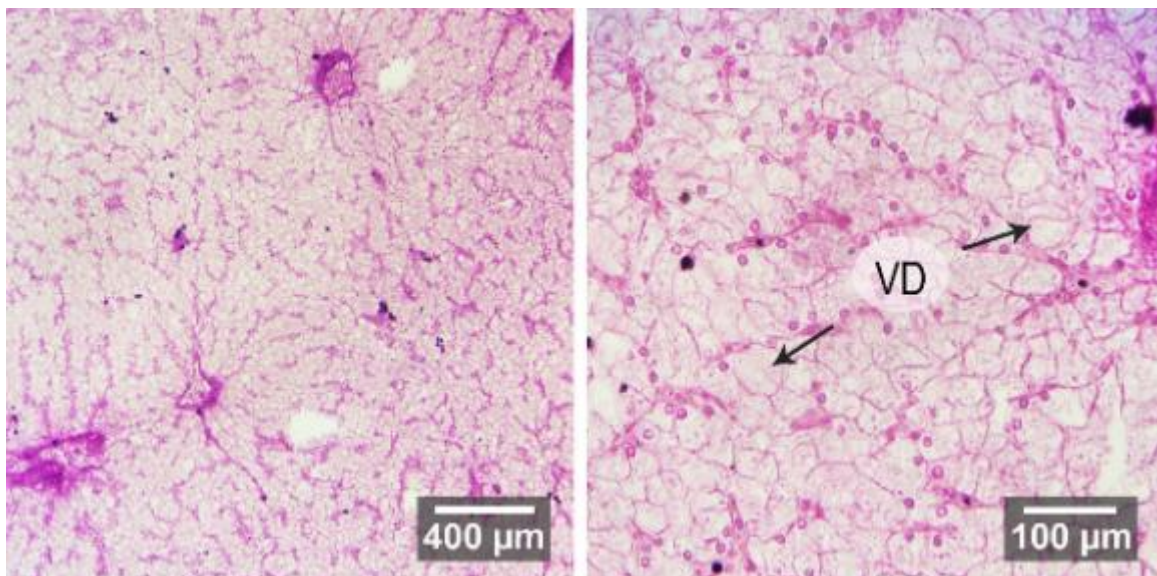
شکل ۵ بافت کبد تیمار ۱: شاهد (بدون افزودن نانوذرات) فیل ماهیان *Huso huso* پرورشی. VD: دژنراسیون واکوئولی، Disorganized H: یاخته‌های کبدی نامنظم.



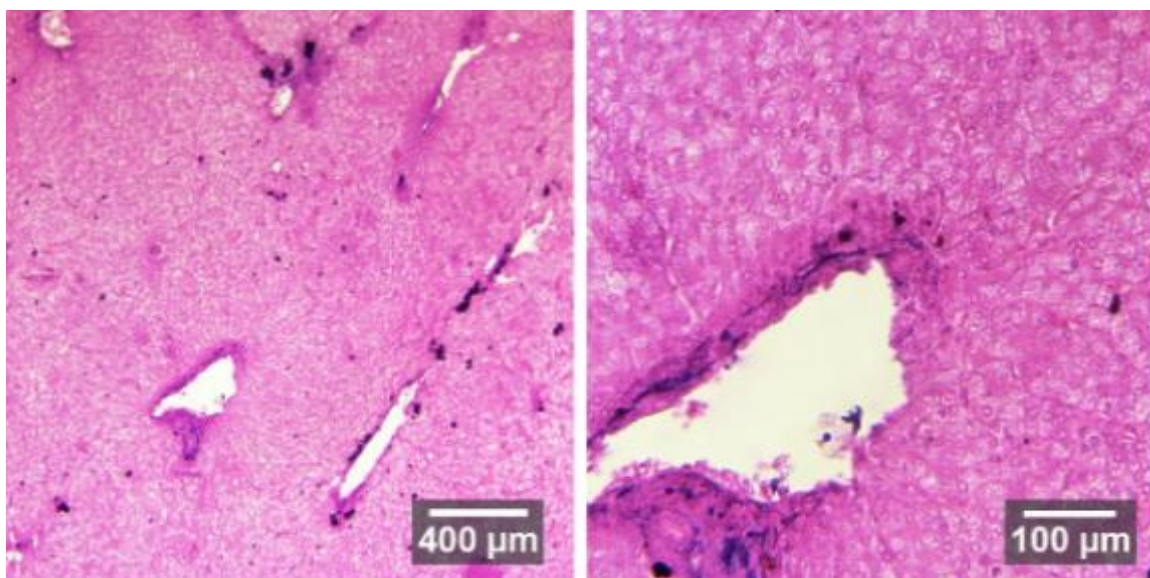
شکل ۶ بافت کبد تیمار ۲ (۱ mg/kg Se-NPs) فیل ماهیان *Huso huso* پرورشی تغذیه شده با جیره های حاوی نانوذرات سelenium و آهن (H&E). VD: دژنراسیون واکوئولی.



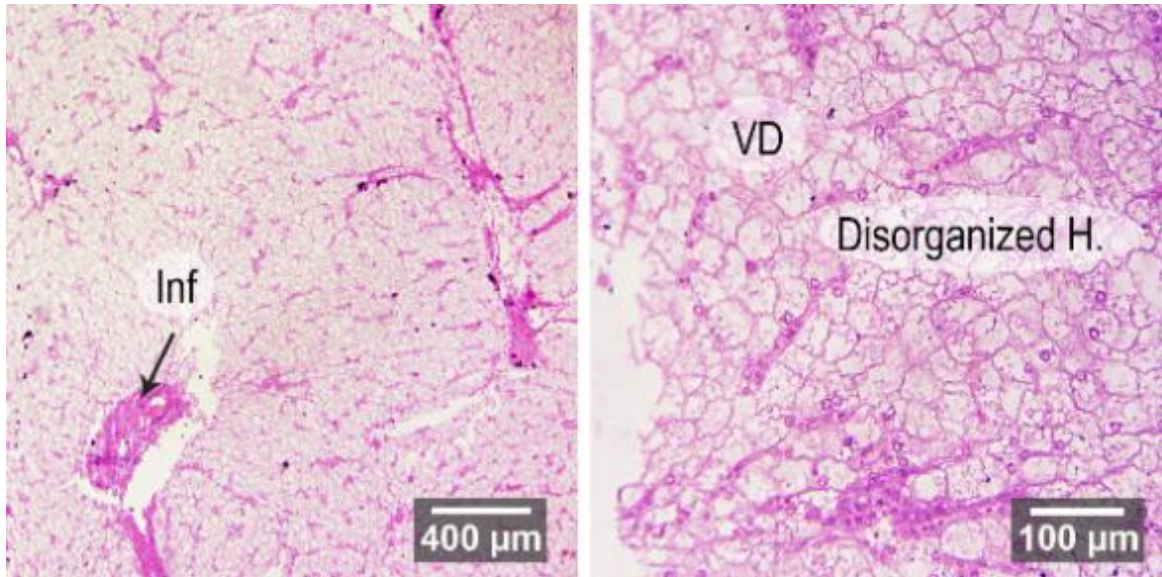
شکل ۷ بافت کبد تیمار ۳ (۲ mg/kg Se-NPs) فیل ماهیان *Huso huso* پرورشی تغذیه شده با جیره های حاوی نانوذرات سelenium و آهن (H&E). Hemorrhage: خونریزی، Necrosis: نکروز.



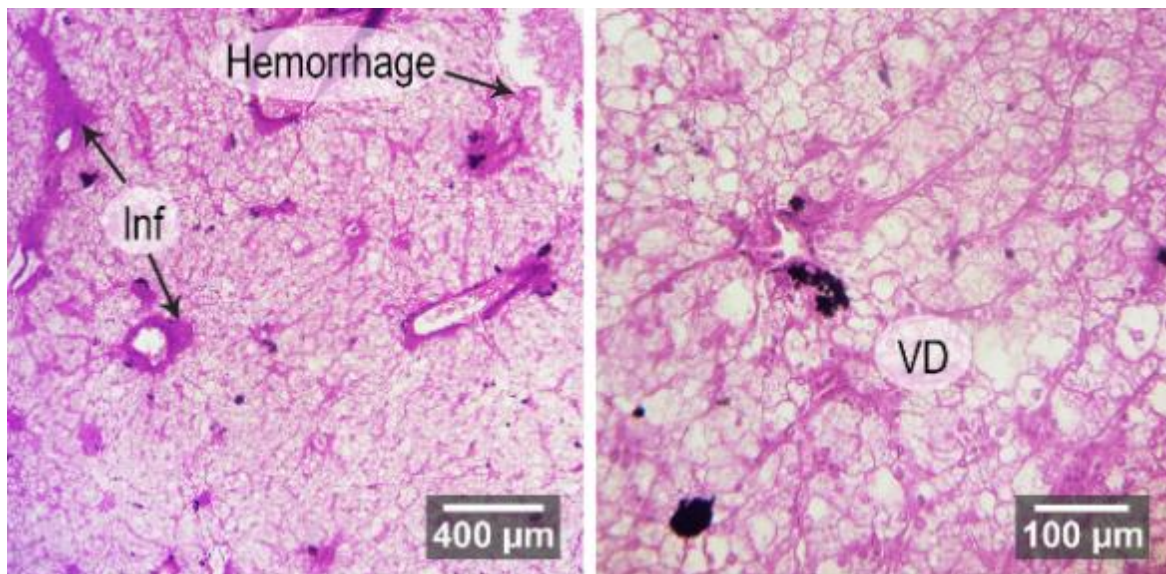
شکل ۸ بافت کبد تیمار ۴ (۱۰۰ mg/kg Fe-NPs) فیلماهیان *Huso huso* پرورشی تغذیه شده با جیره‌های حاوی نانوذرات سلنیوم و آهن (H&E). VD: دژنراسیون واکوئولی.



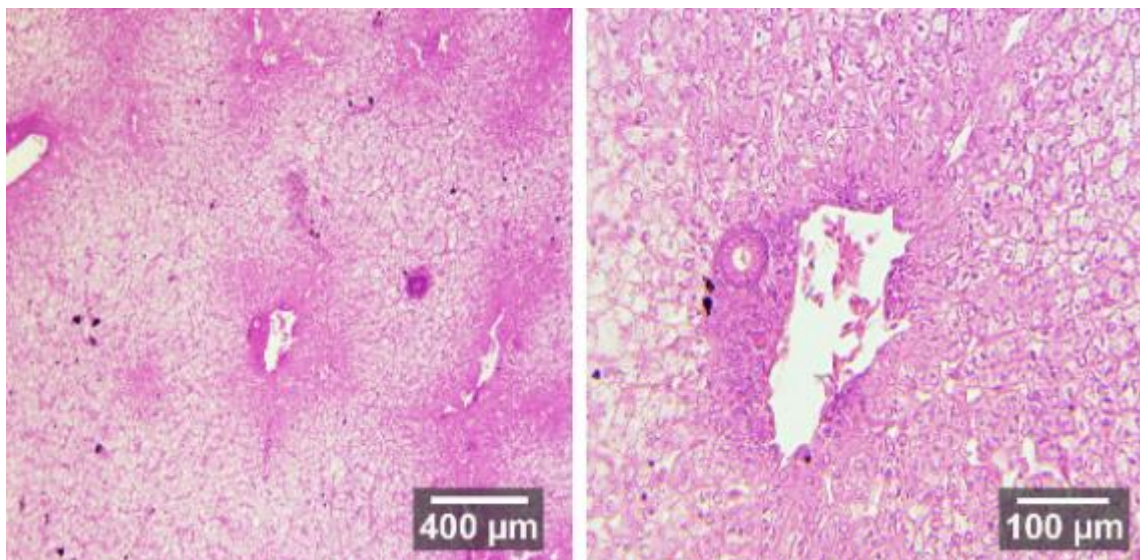
شکل ۹ بافت کبد تیمار ۵ (۱ mg/kg Se-NPs + ۱۰۰ mg/kg Fe-NPs) فیلماهیان *Huso huso* پرورشی تغذیه شده با جیره‌های حاوی نانوذرات سلنیوم و آهن (H&E).



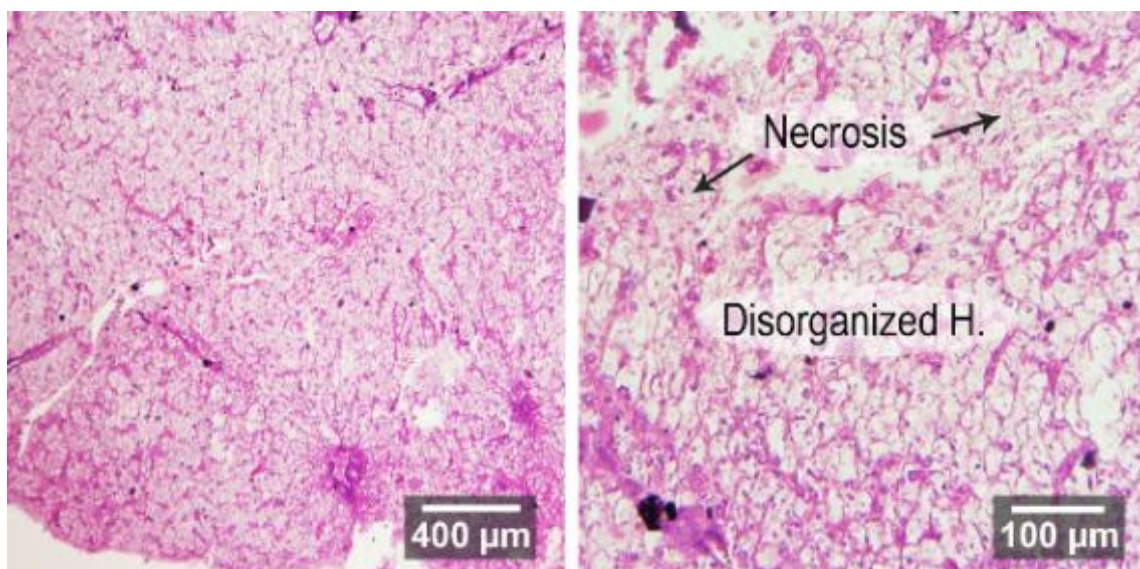
شکل ۱۰ بافت کبد تیمار ۶ (۱۰۰ mg/kg Fe-NPs + ۲ mg/kg Se-NPs) فیل ماهیان *Huso huso* پرورشی تغذیه شده با جیره‌های حاوی نانوذرات سلینیوم و آهن (H&E). VD: دژنراسیون واکوئولی، Disorganized H: یاخسته‌های کبدی نامنظم، Inf: التهاب.



شکل ۱۱ بافت کبد تیمار ۷ (۲۰۰ mg/kg Fe-NPs) فیل ماهیان *Huso huso* پرورشی تغذیه شده با جیره‌های حاوی نانوذرات سلینیوم و آهن (H&E). VD: دژنراسیون واکوئولی، Inf: التهاب، Hemorrhage: خونریزی.



شکل ۱۲ بافت کبد تیمار ۸ (۱ mg/kg Se-NPs + ۲۰۰ mg/kg Fe-NPs) فیل ماهیان *Huso huso* پرورشی تغذیه شده با جیره‌های حاوی نانوذرات سelenium و آهن (H&E).



شکل ۱۳ بافت کبد تیمار ۹ (۲ mg/kg Se-NPs + ۲۰۰ mg/kg Fe-NPs) فیل ماهیان *Huso huso* پرورشی تغذیه شده با جیره‌های حاوی نانوذرات سelenium و آهن (H&E). Disorganized H. یاخسته‌های کبدی نامنظم، Necrosis: نکروز.

غلظت فلز، گونه ماهی و مدت زمان مواجهه با آلاینده‌ها دارد (Paris-Palacios, 2000). کبد ماهی مستعد بروز صدمات ناشی از مواد شیمیایی است و این امر به دلیل جریان خون نسبتاً آهسته‌ای است که در مقایسه با برون‌ده قلبی دارد (Gingrich, 1982) و همچنین، ارتباط یاخسته‌های کبدی با دستگاه صفراوی که در مقایسه با پستانداران بسیار نزدیک‌تر است (Hinton and Lauren, 1990). Gingrich (۱۹۸۲) گزارش کرد که میزان جریان صفرا در ماهی تقریباً ۵۰ برابر کمتر از

بحث

کبد ماهیان نسبت به محرک‌های شیمیایی از جمله فلزات سنگین بسیار حساس است (شاپوری و همکاران، ۱۳۸۸). بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیک کبد، شیوه‌ای دقیق و مطمئن برای ارزیابی تأثیرات فلزات سنگین در محیط و شرایط آزمایشگاهی است. تأثیر آلاینده‌های سنگین به صورت افزایش یا کاهش فعالیت آنزیم‌های کبدی و ایجاد تغییرات هیستوپاتولوژیک کبدی بروز می‌کند. میزان این تأثیرات بستگی مستقیم به نوع و

پستانداران است که این موضوع نیز می‌تواند به حساسیت بیشتر ماهی به صدمات شیمیایی کمک کند، زیرا سرعت کم جریان صفر موجب کاهش سرعت حذف مواد شیمیایی سمی از کبد می‌شود. به هر حال، عوامل متعددی می‌توانند باعث آسیب کبدی شوند که با توجه به وظایف سوخت و سازی کبد، چنین صدماتی می‌توانند اثرات جدی روی سوخت و ساز کلی آبی داشته باشند. Roberts (۲۰۰۱) نکروز و دیگر تغییرات یاخته‌های کبدی را یکی از یافته‌های عمومی و مشترک کبد هنگام مواجهه با عفونت‌های ویروسی، قارچی، باکتریایی و همچنین، مسمومیت‌های ناشی از آفت‌کش‌ها، فلزات سنگین و انگل‌ها می‌داند. تحقیقاتی که Visoottiviseth و همکاران (۱۹۹۹) و Varanka و همکاران (۲۰۰۱) انجام دادند نیز نشان داد که بافت کبد ماهیانی که در برابر آلاینده‌های فلزات سنگین قرار گرفتند، عوارضی مانند تغییر شکل و برهم خوردن نظم پارانشیم کبدی و واکوئوله شدن یاخته‌های کبدی و در نهایت، نکروز ایجاد می‌شود. این تغییرات با افزایش دوز آلاینده شدت بیشتری پیدا می‌کند و در نهایت، منجر به مرگ ماهی می‌شود. دگرگونی‌های ایجاد شده بیشتر به علت دژنره شدن و نکروز یاخته‌های کبدی ایجاد می‌شود و گاهی این یاخته‌ها تجزیه شده و در نهایت، به مرگ جانور می‌انجامد. در مطالعه حاضر عارضه‌های مشاهده شده در بافت کبد شامل دژنراسیون واکوئولی، نکروز، التهاب، یاخته‌های کبدی نامنظم و خونریزی بوده است. ساز و کار اصلی نکروز بدین صورت است که در ابتدا pH به دلیل گلیکولیز کاهش می‌یابد. در نتیجه آن تجمع لاکتات‌ها و تجزیه استرهای فسفات به همراه تغییرات عمومی در سلول صدمه دیده رخ داده و منجر به صدمه لیزوزیم‌ها و نشأت آنزیم‌های هیدرولاز به داخل سیتوپلاسم می‌شود. در نتیجه، آنزیم‌های هیدرولیزکننده یاخته‌ها از بین رفته و شاهد افزایش اتوزینوفیلی در سیتوپلاسم خواهیم بود. این امر به علت از بین رفتن بازوفیلی طبیعی سیتوپلاسم و RNAها است که در اثر فعال شدن آنزیم‌های آزاد شده از لیزوزیم رخ می‌دهد. در نتیجه این عمل، ارگانل‌های پروتئینی داخل سیتوپلاسمی تجزیه و هیدرولیز می‌شود. با از بین رفتن ذرات گلیکوژن، جای آن‌ها سیتوپلاسم واکوئول‌دار ایجاد می‌شود. با یکی شدن واکوئول‌ها، هسته به یک طرف یاخته رانده شده و به دنبال آن و در مراحل

حادتر، کاریولیز، کاریورکسی و محو هسته رخ می‌دهد (صحرائی و همکاران، ۱۴۰۱). در دیگر مطالعات نیز حاجی رحیمی و همکاران (۱۳۹۴) تأثیر نانوذرات اکسید آهن و روی بر بافت کبد و عضله در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) را بررسی کردند. ماهیان به‌ترتیب مقادیر ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم از نانوذرات روی و اکسید آهن را در هر گرم غذا به مدت ۶۰ روز دریافت کردند. آسیب‌های جدی در یاخته‌های کبدی از جمله لیپیدوز، التهاب و برهم ریختن نظم لوپول‌های کبدی مشاهده شد. آن‌ها گزارش کردند که نانوذرات اکسید آهن در غلظت‌های بالا (۱۵۰ میکروگرم بر کیلوگرم) باعث افزایش معنی‌دار در غلظت آنزیم ALT می‌شوند. این آنزیم برای کبد اختصاصی است و آسیب یاخته‌های کبدی باعث افزایش آزاد شدن این آنزیم می‌شود. از این رو، ممکن است دلیل افزایش این آنزیم تأثیر تخریبی نانوذرات اکسید آهن روی یاخته‌های کبدی باشد (Christ-Crain et al. 2004). در مطالعه حاضر نیز در تیمار ۹ بیشترین میزان پرخونی (زیر لایه سروزی) و نفوذ یاخته‌های التهابی در لایه زیر مخاطی با شدت ۴ مشاهده شده است. این امر نشان می‌دهد که تلفیق دوز ۲۰۰ میلی‌گرم نانوذره آهن و ۲ میلی‌گرم نانوذره سلنیوم در هر کیلوگرم جیره غذایی فیل ماهی اثر تخریبی شدیدی بر کبد فیل ماهی دارد. بنابراین، این مقادیر ذکر شده برای سلامت فیل ماهی مضر بوده و مصرف آن توصیه نمی‌شود. ابراهیمی و همکاران (۱۳۹۹) اثرات مقادیر مختلف نانوذره آهن (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) بر بافت کبد بچه ماهی ازون برون را بررسی و گزارش کردند که استفاده از آن به مقدار ۵۰ میلی‌گرم سبب بهبود سلامت و بقای بچه‌ماهیان ازون‌برون شده و اثر منفی بر کبد ماهی ازون برون ندارد. یاخته‌های کبدی در همه تیمارها مشابه بودند و حالت غیرطبیعی در آن‌ها مشاهده نشد. با وجود این، نکروز خفیفی به دلیل دژنراسیون چربی در برخی قسمت‌های کبد مشاهده شد. سیتوپلاسم یاخته‌های کبدی در ماهیان همه گروه‌ها، دارای واکوئول‌های چربی بود. سینوزئیدهای کبدی دارای ساختاری طبیعی و بدون خونریزی بودند. همچنین، رنگدانه ملانین و مراکز ماکروفاژهای ملانینه در همه نمونه‌ها مشاهده شد و میزان آن با افزایش میزان نانو آهن مصرفی در غذا افزایش یافت. نتایج مطالعه حاضر نشان‌دهنده این امر است که دوز ۲۰۰

کمترین میزان آسیب بافت کبد را داشته است، به کارگیری ۱ میلی گرم نانوذرات سلنیوم به همراه ۱۰۰ میلی گرم نانوذرات آهن در جیره غذایی فیل ماهی پرورشی توصیه می‌شود.

(*Oncorhynchus mykiss*). مجله پژوهش های

جانوری (مجله زیست شناسی ایران) ۲۸: ۳۰۶-۲۹۳.

شاپوری، م.، عربان، ش. و اسماعیلی ساری، ع. ۱۳۸۸.

بررسی تأثیر فلز مس بر تغییرات هیستوپاتولوژیک

بافت های عضله، کبد و گناد ماهی کپور معمولی.

مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی ۶: ۲۹-۲۳.

صحرائی، ح.، هدایتی، س.ع.ا.، یار محمدی بربرستانی، ث.،

فخریان، م. ۱۴۰۱. بررسی اثرات بافتی تغذیه با منابع

مختلف آهن و روی (نانو ذره و شکل معدنی) در ماهی

کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). علوم و

تکنولوژی محیط زیست ۲۴: ۱۱۹-۱۳۹.

محمدیان، ح. ۱۳۷۸. ماهیان آب شیرین ایران، مرکز نشر

سپهر، ۱۷۸ ص.

Brody, T. 1994. Nutritional Biochemistry. Academic Press, San Diego, California, 658 p.

Chan, W.C.W. 2006. Biotechnology progress and advances. Biology of Blood and Marrow Transplantation 12: 87-91.

Christ-Crain, M., Meier Cpuder, J., Staub, J., Huber, P., Keller, U. 2004. Changes in liver function correlate with the improvement of lipid profile after restoration of euthyroidism in patients with subclinical hypothyroidism. EXCLI Journal 3: 1-9.

Crichton, R.R. 1991. Inorganic biochemistry of iron metabolism. West Sussex: Ellis Horwood Ltd., 355 p.

Geiser, M., Schurch, S., Gehr, P. 2003. Influence of surface chemistry and topography of particles on their immersion into the lung's surface-lining layer. Journal of Applied Physiology 94: 1793-1801.

Gingrich, W.H. 1982. Hepatic toxicology of fishes. In: Weber, L.F. (ed.), Aquatic Toxicology. Plenum Press, New York, USA, 55-105.

میلی گرم نانوذره آهن و ۲ میلی گرم نانوذره سلنیوم در هر کیلوگرم جیره غذایی فیل ماهی به تنهایی و یا به صورت ترکیبی سبب آسیب های جدی بافت کبد فیل ماهی پرورشی شده و مصرف این دوزها قابل ترویج نیست. با توجه به اینکه در مطالعه حاضر تیمار ۵ (mg/kg Fe-)

منابع

ابراهیمی، پ.، چنگیزی، ر.، قبادی، ش.، شهره، پ.، وطن

دوست، ص. ۱۳۹۹. اثرات نانو ذره آهن بر عملکرد

رشد، بقاء، برخی فاکتورهای خونی- ایمنی و بافت کبد

بچه ماهی ازون برون (*Acipenser stellatus*).

توسعه آبی پروری (علوم زیستی) ۱۴: ۱-۱۵.

برادران نویری، ش. ۱۳۹۰. پرورش تاسماهیان. انتشارات

حق شناس، ۱۲۵ ص.

حاجی رحیمی، ا.، فرخی، ف.، و توکمه چی، ا. ۱۳۹۴.

بررسی تأثیر نانوذرات اکسید آهن و روی بر بافت کبد و

عضله در ماهی قزل آلاي رنگین کمان

Gref, R., Minamitake, Y.M., Peracchia, T., Trubetskoy, V., Torchilin, V. Langer, R. 1994. Biodegradable long circulating polymeric nanospheres. Science 263: 1600-1603.

Hem, I.D. 1989. Study and Interpretation of the Chemical Characteristics of Natural Water. 3rd edition. US Geological Survey Water- Supply, Paper 2254, United States Government Printing Office, Washington, DC.

Hinton, D.E., Lauren, D.J. 1990. Integrative histopathological approaches to the detection of environmental stressors on fishes. American Fisheries Society Symposium 8: 51-65.

Mechlaoui, M., Dominguez, D., Robaina, L., Geraert, P. A., Kaushik, S., Saleh, R., Briens, M., Montero, D., Izquierdo, M. 2019. Effects of different dietary selenium sources on growth performance, liver and muscle composition, antioxidant status, stress response and expression of related genes in gilthead seabream (*Sparus aurata*). Aquaculture 507: 251-259.

- Paris-Palacios S., Biagianti-Risbourg, S., Vernet, G. 2000. Biochemical and (ultra) structural hepatic perturbation of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulphate. *Aquatic Toxicology* 50: 109-124.
- Ramsden, S.R., Smith, T.J., Shaw, B.J., Handy R.D. 2009. Dietary exposure to titanium dioxide nanoparticles in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): No effect on growth, but subtle biochemical disturbances in the brain. *Ecotoxicology* 18: 939-951.
- Roberts, R.J. 2001. *Fish Pathology* (3rd ed.). W.B. Saunders. Harcourt Publishers Co. LTD. London, England, 472 p.
- Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G., Hoekstra, W. 1973. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179: 588-590.
- Varanka, Z., Rojik, I., Varankam I., Nemcsók, J., Abrahám, M. 2001. Biochemical and morphological changes in carp (*Cyprinus carpio* L.) liver following exposure to copper sulfate and tannic acid. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 128: 467-78.
- Visoottiviseth, P., Thamamaruitkun, T., Sahaphong, S., Riengrojpitak, S., Kruatrachue, M. 1999. Histopathological effects of triphenyltin hydroxide on liver, kidney and gill of Nile tilapia (*Oreochromis nilotica*). *Applied Organometallic Chemistry* 13: 749-763.
- Wang, Y., Yan, X., Fu, I. 2013. Effect of selenium nanoparticles with different sizes in primary cultured intestinal epithelial cells of crucian carp, *Carassius auratus gibelio*. *International Journal of Nano Medicine* 8: 4007-4013.
- Watanabe, T., Kiron, V., Satoh, S. 1997. Trace mineral in fish nutrition. *Aquaculture* 151: 185-207.