



اثرات انفرادی و ترکیبی تغذیه با نانوذرات آهن و مس و مقایسه با اشکال معدنی آن بر ویژگی‌های بیوشیمیایی خون، وضعیت آنتی‌اکسیدانی و پاسخ ایمنی بچه ماهی سفیدک سیستان *Schizothorax zarudnyi* Nikolskii, 1897

علیرضا افشاری^۱، ایمان سوری‌نژاد^{*}، احمد قرایی^۲، سید علی جوهری^۳، زهرا قاسمی^۱

^۱ گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان

^۲ گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل

^۳ گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه کردستان

نوع مقاله:	چکیده
پژوهشی	اثر افزودن فرم‌های معدنی و نانویی دو عنصر ضروری آهن و مس به جیره غذایی بر ویژگی‌های بیوشیمیایی خون و عملکرد آنتی‌اکسیدانی و ایمنی ماهی سفیدک سیستان با میانگین وزن $±0.45$ گرم $23/97$ گرم بررسی شد. ماهیان با جیره غذایی (۱) پایه فاقد هرگونه مکمل مس و آهن، (۲) حاوی 150 mg/kg مکمل آهن معدنی، (۳) حاوی 3 mg/kg مکمل مس معدنی، (۴) حاوی 150 و 3 mg/kg مکمل آهن و مس معدنی، (۵) حاوی 150 mg/kg مکمل نانوذرات آهن، (۶) حاوی 3 mg/kg مکمل نانوذرات مس و (۷) حاوی 150 و 3 mg/kg مکمل نانوذرات آهن و مس، به مدت ۶۰ روز تغذیه شدند. افزودن آهن و مس در هردو فرم باعث بهبود ویژگی‌های بیوشیمیایی خون و عملکرد آنتی‌اکسیدانی و ایمنی در مقایسه با شاهد گردید. افزودن فرم نانویی این عناصر منجر به بهبود معنی‌دار سنج‌های خونی، دفاع آنتی‌اکسیدانی و فعالیت باکتری‌کشی سرم نسبت به فرم معدنی شد. استفاده هم‌زمان فرم نانویی این دو عنصر مؤثرتر از دیگر تیمارها باعث بهبود سنج‌های پروتئین کل سرم، آلبومین، گلوبولین، HDL، کلسترول و تری‌گلیسرید، MDA، GPx، SOD، CAT، C3 و ACH50 و فعالیت باکتری‌کشی سرم گردید. در جمع‌بندی، استفاده از دو عنصر آهن و مس به ترتیب به میزان 150 و 3 mg/kg جیره در فرم نانو و به‌صورت هم‌زمان مؤثرتر از فرم معدنی و نانویی انفرادی آن‌ها در بهبود عملکرد ماهی سفیدک سیستان عمل می‌نماید.
تاریخچه مقاله: دریافت: ۹۸/۰۹/۲۰ اصلاح: ۹۸/۱۰/۲۶ پذیرش: ۹۸/۱۲/۰۴	کلمات کلیدی: آنتی‌اکسیدان جیره غذایی عناصر ضروری نانوذرات <i>Schizothorax</i>

مقدمه

جیره‌های غذایی از نهاده‌های اولیه‌ی ضروری در پرورش ماهی می‌باشند که باید رشد، ایمنی و سلامت ماهی‌ها را برای دستیابی به حداکثر سود سیستم پرورش تضمین کنند. نامطلوب بودن کیفیت جیره‌های غذایی می‌تواند باعث تضعیف عملکرد پرورشی و افزایش هزینه تولید گردد (Akter et al., 2018). در کنار اجزای اصلی جیره‌های غذایی (پروتئین‌ها، چربی‌ها و کربوهیدرات‌ها)، مکمل‌های ویتامینی و معدنی نیز در مقادیر کمتر مورد نیاز می‌باشند (Amar et al., 2004). آهن یکی از این عناصر معدنی کم‌نیاز ضروری است که دارای نقشی حیاتی در فرآیندهای فیزیولوژیکی مانند انتقال اکسیژن، واکنش‌های

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: Sourinejad@hormozgan.ac.ir

تنفس سلولی و اکسیداسیون چربی‌ها می‌باشد و برای عملکرد مطلوب اندام‌ها و بافت‌های حیوانات از جمله ماهی‌ها لازم است. همچنین این عنصر به علت تأثیری که بر بهبود عملکرد سیستم ایمنی بدن و دفاع علیه عفونت‌های مختلف ایفا می‌کند از ضروری‌ترین ریزمغذی‌ها محسوب می‌شود (Hilty *et al.*, 2011). کمبود آهن باعث کاهش رشد، افزایش ضریب تبدیل غذایی، کاهش تخم‌گذاری، تغییرات در سنجه‌های خونی، کم‌خونی میکروسیتیک، سرکوب سیستم ایمنی، حساسیت به بیماری‌ها، بروز انواعی از سندرم‌های نقص ایمنی همچون اختلال عملکرد سلول‌های T، آتروفی در اندام‌های لنفاوی در انسان و حیوان، کاهش فعالیت myeloperoxidase، کاهش فعالیت باکتری‌کشی سرم خون و عملکردهای نوتروفیل می‌گردد (Watanabe *et al.*, 2013; Behera *et al.*, 2007; Chu *et al.*, 1992; Tacon, 1992; *al.*, 1997). مس نیز یکی دیگر از عناصر کمیاب ضروری برای همه حیوانات از جمله ماهی‌ها می‌باشد که در بسیاری از فرآیندهای زیستی شامل سنتز هموگلوبین، تشکیل استخوان و نگهداری میلین در سیستم عصبی نقش دارد. مس بخشی حیاتی برای چندین آنزیم دخیل در واکنش‌های اکسیداسیون و احیا می‌باشد و متالوآنزیم‌های مس در تولید انرژی سلولی (سیتوکروم اکسیداز c)، نوروترنسمیترهای مغزی (دوپامین هیدروکسیلاز و peptidyl α -amidating monooxygenase)، سنتز کلاژن (lysyl oxidase)، تولید ملانین و محافظت از سلول‌ها در برابر آسیب رادیکال‌های آزاد نقش دارند. مس در ساختار برخی پروتئین‌ها مانند Ceruloplasmin نقشی اساسی دارد که این پروتئین نیز در انتقال آهن از طریق آزادسازی آن از سلول‌ها و انتقال آن به داخل پلاسما مؤثر است (Haver and Hardy, 2002; Ranganathan *et al.*, 2011; Mohseni *et al.*, 2014). کمبود مس می‌تواند باعث کاهش فعالیت‌های سیتوکروم اکسیداز C قلبی، سوپراکساید دیسموتاز مس-روی، کاهش رشد، شکل‌گیری آب مروارید، کم‌خونی، ناهنجاری‌های استخوانی، آسیب‌های نخائی، آسیب‌های قلبی (فیروز میوکاردی)، اختلالات گوارشی (Haver and Hardy, 2002) و اختلال در سوخت و ساز گلوکز و فعال‌سازی سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی گردد (El-Basuini *et al.*, 2016). همچنین گزارش شده است که کمبود مس باعث تأخیر در رشد و کاهش کارایی غذا (FE)¹ در کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، هامور (*Epinephelus malabaricus*) و گربه‌ماهی زرد (*Pelteobagrus fulvidraco*) می‌شود (Tang *et al.*, 2013). لازم به ذکر است که دانستن حداقل نیازمندی این عناصر در جیره‌های غذایی، به تنهایی کافی نیست بلکه زیست‌فراهمی² یا نسبتی از ماده مغذی که جذب، متابولیز و تبدیل به فرم‌های فعال زیستی یا ذخیره‌ای می‌شود باید مورد توجه قرار گیرد (Haver and Hardy, 2002). از این‌رو تنها فرم‌هایی از این عناصر که زیست‌فراهمی مطلوبی داشته باشند می‌توانند کیفیت غذاهای مورد استفاده در آبی‌پروری تجاری را بهبود بخشند (Hilty *et al.*, 2011). ماهی‌ها می‌توانند این عناصر را هم از طریق آبشش و هم از طریق غذا دریافت نمایند؛ البته به علت غلظت کم، شکل محلول این عناصر در آب و جذب محدود آن‌ها از طریق آبشش‌ها، دریافت از طریق غذا منبع اصلی تأمین آن‌ها برای ماهی در نظر گرفته می‌شود (Haver and Hardy, 2002). در سال‌های اخیر در کنار استفاده از ترکیبات معدنی، فرم‌های نانویی عناصر نیز با توجه به اثرات متعدد همچون افزایش رشد و بهبود ایمنی توجه زیادی را به عنوان مکمل خوراکی به خود جلب نموده است. مواد در ابعاد نانو با محدوده سطح انرژی وسیع‌تر و اندازه کوچک‌تر توانایی بیشتری برای عبور از سد‌های فیزیولوژیکی دارند و در نتیجه زیست‌فراهمی بالاتری را نشان می‌دهند (Aker *et al.*, 2018).

ماهی سفیدک سیستان *Schizothorax zarudnyi* از زیرخانواده Barbinae، بومی آب‌های شرق کشور و بارزترین گونه منطقه سیستان محسوب می‌شود. این ماهی محبوب‌ترین و اقتصادی‌ترین گونه ماهیان بومی دریاچه هامون و مخازن آبی چاه-نیمه‌های منطقه سیستان می‌باشد که علاقه رو به رشدی برای پرورش آن در استخرها وجود دارد. در سال‌های اخیر، بقای این گونه تحت تأثیر شرایط نامساعد محیطی، خشک‌سالی، ورود گونه‌های غیربومی و صید بی‌رویه در دریاچه هامون و چاه-نیمه‌های سیستان، در خطر نابودی قرار گرفته است (Arabnejad *et al.*, 2014). تا کنون مطالعه‌ای در خصوص تأثیر فرم‌های نانویی و حتی معدنی آهن و مس و اثرات سینرژیک (هم‌افزایی) آن‌ها بر ویژگی‌های بیوشیمیایی خون، وضعیت آنتی‌اکسیدانی و پاسخ ایمنی ماهی سفیدک سیستان صورت پذیرفته است. از این‌رو، این مطالعه تلاش نموده است تا با افزودن فرم‌های نانو

¹ Feed efficiency

² Bioavailability

و معدنی این دو عنصر به جیره غذایی ماهی سفیدک سیستان، اثرات آن‌ها را بر ویژگی‌های بیوشیمیایی خون، وضعیت آنتی‌اکسیدانی و پاسخ ایمنی این‌گونه ارزشمند بومی بررسی نماید.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد و شرایط پرورش

نانوذرات آهن با درجه خلوص ۹۹/۵ درصد و اندازه ۳۵-۴۵ نانومتر و نانوذرات مس با درجه خلوص ۹۹/۹ درصد و اندازه ۴۰ نانومتر (US Research Nanomaterials, Inc) و سولفات آهن ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) و سولفات مس ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) به عنوان منابع معدنی آهن و مس (Merck, Germany) تهیه گردید. تعداد ۲۱۰ قطعه بچه ماهی سفیدک سیستان با میانگین وزنی $23/97 \pm 0/45$ گرم از استخرهای پرورشی مرکز تکثیر ماهیان بومی و گرمابی زهک وابسته به اداره کل شیلات آب‌های داخلی استان سیستان و بلوچستان صید شد. سپس بچه ماهیان به حوضچه‌های داخل سالن پرورش، منتقل و به منظور سازگاری با شرایط پرورشی، به مدت دو هفته نگهداری و طی این مدت با جیره پایه تهیه شده، به میزان ۳٪ وزن بدن تغذیه شدند. جهت انجام آزمایش‌ها، کلیه حوضچه‌ها (با حجم ۳۰۰ لیتر) با استفاده از مواد شوینده کاملاً شستشو، ضدعفونی و پس از خشک‌کردن، به میزان ۲۵۰ لیتر آبگیری شدند. ماهیان در قالب ۷ تیمار و هر تیمار با ۳ تکرار در ۲۱ حوضچه فایبرگلاس به تعداد ۱۰ ماهی در هر حوضچه به طور تصادفی توزیع شدند. در طول مدت آزمایش، جریان ورود و خروج آب و هوادهی مداوم در هر کدام از حوضچه‌ها برقرار بود. سنج‌های کیفیت آب، طی دوره پرورش ماهیان به صورت منظم ثبت گردید. در طول دوره، دمای آب $19/6 \pm 1$ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول $7/5 \pm 0/17$ میلی‌گرم در لیتر و pH برابر با $7/8 \pm 0/2$ بود. سپس آزمایش‌ها به مدت ۶۰ روز و غذادهی روزانه به میزان ۳٪ وزن بدن در دو نوبت، طی ساعات ۸:۰۰ و ۱۶:۰۰ انجام گرفت (Ashouri et al., 2015). غذاهای خورده نشده، ۳۰ دقیقه پس از هر غذادهی (Tang et al., 2013)، با دقت سیفون و پس از خشک‌کردن در دمای اتاق، توزین شدند و در نهایت از کل مقادیر مصرف‌شده جیره مربوطه کسر گردید تا مقدار دقیق غذای خورده شده برای هر جیره به دست آید (Behera et al., 2013).

تیمار بندی و تهیه جیره‌های غذایی

تیمار ۱ (Control): ماهیانی که با جیره پایه، فاقد هرگونه مکمل مس و آهن تغذیه شدند.
 تیمار ۲ (FeM): ماهیانی که با جیره حاوی ۱۵۰ میلی‌گرم آهن معدنی (سولفات آهن) در هر کیلوگرم جیره، بدون هرگونه مکمل مس تغذیه شدند.
 تیمار ۳ (CuM): ماهیانی که با جیره حاوی ۳ میلی‌گرم مس معدنی (سولفات مس) در هر کیلوگرم جیره، بدون هرگونه مکمل آهن تغذیه شدند.
 تیمار ۴ (FeCuM): ماهیانی که با جیره حاوی ۱۵۰ میلی‌گرم آهن معدنی و ۳ میلی‌گرم مس معدنی در هر کیلوگرم جیره تغذیه شدند.
 تیمار ۵ (FeNPs): ماهیانی که با جیره حاوی ۱۵۰ میلی‌گرم نانوذره آهن در هر کیلوگرم جیره، بدون هرگونه مکمل مس تغذیه شدند.
 تیمار ۶ (CuNPs): ماهیانی که با جیره حاوی ۳ میلی‌گرم نانوذره مس در هر کیلوگرم جیره، بدون هرگونه مکمل آهن تغذیه شدند.
 تیمار ۷ (CuNPs): ماهیانی که با جیره حاوی ۱۵۰ میلی‌گرم نانوذره آهن و ۳ میلی‌گرم نانوذره مس در هر کیلوگرم جیره تغذیه شدند.

فرمول جیره مورد استفاده در این آزمایش بر اساس جدول ۱ تنظیم شد. در مرکز تکثیر ماهیان بومی و گرمابی زهک از غذای بچه ماهی کپور معمولی برای تغذیه بچه ماهیان سفیدک سیستان استفاده می‌شود و از آنجاکه میزان نیاز بچه ماهی کپور

معمولی به آهن و مس به ترتیب به میزان ۱۵۰ و ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم جیره می‌باشد (Ogino and Yang, 1980; Wang and Xu, 2006). بر اساس محاسبه مقادیر این دو عنصر در جیره پایه (جیره فاقد هرگونه مکمل آهن و مس)، مقادیر مورد نیاز تا رسیدن به سطوح مورد اشاره (به میزان ۱۵۰ و ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم جیره، به ترتیب برای دو عنصر آهن و مس) در دو فرم نانویی و معدنی به جیره پایه اضافه شد (Saffari et al., 2016). به منظور تهیه جیره‌های غذایی، از روش شرح داده شده توسط El-Basuni و همکاران (2016) استفاده شد و اجزای جیره و مکمل‌های نانویی و معدنی بر اساس گروه‌های آزمایشی، با هم مخلوط گردید. برای پلت کردن جیره‌ها از چرخ‌گوشت دستی با خروجی یک میلی‌متر استفاده شد. پلت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق خشک و سپس در پلاستیک‌های دربسته، در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان مصرف نگهداری شد.

جدول ۱. اجزای تشکیل‌دهنده و آنالیز تقریبی جیره تهیه‌شده در پژوهش حاضر (Ashouri et al., 2015)

تیمار ۷ FeCuNPs	تیمار ۶ CuNPs	تیمار ۵ FeNPs	تیمار ۴ FeCuM	تیمار ۳ CuM	تیمار ۲ FeM	تیمار ۱ Control	اجزای جیره (گرم بر کیلوگرم)	
۳۰۰	۳۰۰	۳۰۰	۳۰۰	۳۰۰	۳۰۰	۳۰۰	آرد ماهی	
۱۶۰	۱۶۰	۱۶۰	۱۶۰	۱۶۰	۱۶۰	۱۶۰	آرد سویا	
۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	پودر ذرت	
۱۸۰	۱۸۰	۱۸۰	۱۸۰	۱۸۰	۱۸۰	۱۸۰	آرد گندم	
۸۰	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰	سبوس برنج	
۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	روغن ماهی	
۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	روغن سویا	
حاوی نانو ذرات مس و آهن							حاوی نانو ذرات آهن و مس معدنی	پر میکس آهن و مس
اجزای پر میکس استفاده‌شده: در هر کیلوگرم به نسبت ۱ درصد جیره (Ogino and Yang, 1980; Wang and Xu, 2006)								
تیمار ۷	تیمار ۶	تیمار ۵	تیمار ۴	تیمار ۳	تیمار ۲	تیمار ۱	واحد	اجزای مکمل معدنی ویتامینی
۵۰۰۰۰	۵۰۰۰۰	۵۰۰۰۰	۵۰۰۰۰	۵۰۰۰۰	۵۰۰۰۰	۵۰۰۰۰	IU	ویتامین A
۱۰۰۰۰	۱۰۰۰۰	۱۰۰۰۰	۱۰۰۰۰	۱۰۰۰۰	۱۰۰۰۰	۱۰۰۰۰	IU	ویتامین D ₃
۳۰	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰	میلی‌گرم	ویتامین E
۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	میلی‌گرم	ویتامین B ₁
۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	میلی‌گرم	ویتامین B ₂
۳	۳	۳	۳	۳	۳	۳	میلی‌گرم	ویتامین B ₆
۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	میلی‌گرم	ویتامین K ₃
۱۵۰	۱۵۰	۱۵۰	۱۵۰	۱۵۰	۱۵۰	۱۵۰	میلی‌گرم	نیکوتینامید
۴۰	۴۰	۴۰	۴۰	۴۰	۴۰	۴۰	میلی‌گرم	کلسیم پانتوتینیت
۱۵۰	۱۵۰	۱۵۰	۱۵۰	۱۵۰	۱۵۰	۱۵۰	میلی‌گرم	روی (Zn ⁺⁺)
۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	میلی‌گرم	منگنز (Mn ⁺⁺)
-	-	-	۱۵۰	-	۱۵۰	-	میلی‌گرم	آهن معدنی (Fe ⁺⁺)
-	-	-	۳	۳	-	-	میلی‌گرم	مس معدنی (Cu ⁺⁺)
۱۵۰	-	۱۵۰	-	-	-	-	میلی‌گرم	نانو آهن
۳	۳	-	-	-	-	-	میلی‌گرم	نانو مس

آنالیز غذا

غلظت آهن و مس در جیره پایه مطابق روش (Abdel-Tawwab *et al.*, 2007) با استفاده از دستگاه طیف‌سنجی جذب اتمی (nov AA300, Germany) به میزان ۰/۳۴ و ۰/۰۶ میلی‌گرم در کیلوگرم آهن و مس محاسبه شد. سپس مطابق تیمارها، مقدار آهن و مس لازم برای رسیدن به غلظت‌های مورد نظر محاسبه و بر اساس فرم هر تیمار (نانوئی و معدنی) اضافه گردید. غلظت نهایی آهن و مس در جیره‌ها به شرح جدول ۲ می‌باشد.

جدول ۲. غلظت اندازه‌گیری شده آهن و مس در جیره‌های غذایی تیمارهای مختلف

تیمار	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴	تیمار ۵	تیمار ۶	تیمار ۷
	غلظت نهایی (mg/Kg)						
آهن	۰/۳۴۱۷ ± ۰/۰۰۴۸	۱۵۰/۰۰۲۵ ± ۰/۰۴۲۷	۰/۳۴۱۷ ± ۰/۰۰۴۸	۱۵۰/۰۰۰۲ ± ۰/۰۸۳۲	۱۴۹/۹۷۲۴ ± ۰/۰۵۲۷	۰/۳۴۱۷ ± ۰/۰۰۴۸	± ۰/۰۳۰۵ ۱۴۹/۹۸۳۶
مس	۰/۰۶۰۶ ± ۰/۰۰۰۲۸	۰/۰۶۰۶ ± ۰/۰۰۰۲۸	۲/۹۹۹۳ ± ۰/۰۱۴۹	۲/۹۹۹۵ ± ۰/۱۱۲۸	۰/۰۶۰۶ ± ۰/۰۰۰۲۸	۳/۰۰۴ ± ۰/۰۰۶۳	± ۰/۰۰۱ ۲/۹۹۹۸

سنجه‌های بیوشیمیایی خون

برای اندازه‌گیری سنجه‌های خونی، خون‌گیری پس از بیهوشی ماهیان با اسانس گل میخک (۱۵۰ ppm) از طریق سرخرگ دمی انجام شد. پس از سانتریفیوژ نمونه‌های خون به میزان ۳۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه، از سرم به دست آمده برای اندازه‌گیری فاکتورهای موجود در مایع خون استفاده شد (Ashouri *et al.*, 2015). مقدار پروتئین کل سرم، به روش بیوره و مقدار آل‌بومین سرم، به روش بروموکرزل سبز و با استفاده از کیت تشخیصی شرکت پارس آزمون مورد سنجش گرفت. از کسر پروتئین تام از آل‌بومین میزان گلوبولین محاسبه گردید (Izquierdo *et al.*, 2016).

گلوکز (Glu)، کلسترول (CHOL)، تری‌گلیسیرید (TG)، آلکالین فسفاتاز (ALP)، لاکتات دهیدروژناز (HDL)، اسپاراتات ترنس‌میناز (AST)^۳ و آلانین ترنس‌میناز (ALT) به روش‌های استاندارد و با دستگاه اتوآنالایزر (کیت پارس آزمون) اندازه‌گیری شد. فعالیت گلوکاتایون پراکساید (GPx) با استفاده از روش شرح داده شده توسط Noguchi *et al.* (Noguchi *et al.*, 1973)، فعالیت سوپراکساید دیسمیوتاز (SOD) طبق روش McCord *et al.* (McCord *et al.*, 1969) و فعالیت کاتالاز (CAT) با استفاده از روش Abei (1984) و غلظت مالون دی‌آلدهید به روش Buege و Aust (1978) انجام شد.

محاسبه سنجه‌های ایمنی

برای اندازه‌گیری میزان فعالیت لیزوزیم سرم از روش ارائه شده توسط Ellis (1990) و برای اندازه‌گیری قدرت باکتری‌کشی سرم از روش توصیه‌شده توسط Kajita و همکاران (۱۹۹۰) استفاده گردید. فعالیت سیستم کمپلمان^۴ (ACH50) و C₃ نیز بر اساس همولیز گلبول‌های قرمز خرگوش با روش Waley و North و North اندازه‌گیری گردید (Waley & North, 1997).

آنالیز آماری

جمع‌آوری و پردازش اطلاعات میدانی و آزمایشگاهی با استفاده از نرم‌افزار Excel و تجزیه و تحلیل آماری نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام گرفت. نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از هر مرحله پژوهش و آزمایش‌های مختلف با استفاده از برنامه آماری SPSS، آنالیز واریانس یک‌طرفه one way ANOVA بررسی و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون آماری Duncan در سطح اعتماد ۹۵ درصد استفاده شد.

^۳ Aspartate transaminase^۴ Alternative complement activity (ACH50)

نتایج

سنجه‌های بیوشیمیایی خون

نتایج سنجه‌های بیوشیمیایی خون در جدول شماره ۳ ارائه شده است. کمترین مقدار پروتئین کل و آلبومین سرم در تیمار شاهد (تیمار ۱) ($P < 0/05$) و بالاترین مقدار آن در تیمار تغذیه‌شده با جیره محتوی هر دو نوع نانوذره آهن و مس (تیمار ۷) مشاهده شد ($P < 0/05$). مقدار پروتئین و آلبومین سرم در تیمارهای تغذیه‌شده با جیره‌های محتوی نانوذرات (تیمار ۵، ۶ و ۷) بالاتر از تیمارهای تغذیه‌شده با جیره‌های محتوی فرم‌های معدنی آهن و مس (تیمار ۲، ۳ و ۴) به دست آمد ($P < 0/05$). کمترین مقدار گلوبولین در تیمار شاهد (تیمار ۱) مشاهده گردید و بالاترین مقدار به دست آمده برای گلوبولین در تیمار تغذیه‌شده با هر دو نوع نانوذره آهن و مس (تیمار ۷) مشاهده گردید ($P < 0/05$) در بین سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

میزان گلوکز در تیمارهای محتوی مکمل‌های معدنی و نانوذره نسبت به شاهد کاهش یافت. میزان گلوکز با افزودن مکمل‌های معدنی و تغییر نوع آن‌ها از معدنی به نانویی روندی کاهشی را نشان داد؛ به طوری که بیشترین مقدار آن در تیمار شاهد (تیمار ۱) و کمترین مقدار آن در تیمار تغذیه‌شده با هر دو نوع نانوذره آهن و مس (تیمار ۷) مشاهده گردید ($P < 0/05$). کمترین مقدار HDL در تیمار شاهد و بالاترین مقدار آن در تیمار تغذیه‌شده با جیره محتوی هر دو نوع نانوذره آهن و مس (تیمار ۷) مشاهده شد ($P < 0/05$). مقادیر به دست آمده برای تیمارهای تغذیه‌شده با جیره‌های محتوی نانوذرات (تیمار ۵، ۶ و ۷) به طور معنی‌داری بالاتر از تیمارهای تغذیه‌شده با جیره‌های محتوی فرم‌های معدنی دو عنصر آهن و مس (تیمار ۲، ۳ و ۴) بود ($P < 0/05$). بالاترین مقدار کلسترول در تیمار تغذیه‌شده با جیره محتوی هر دو نوع نانوذره آهن و مس (تیمار ۷) ($P < 0/05$) و کمترین مقدار آن در تیمار شاهد به دست آمد. بین مقادیر کلسترول در تیمار شاهد و تیمارهای تغذیه‌شده با جیره‌های محتوی آهن معدنی (تیمار ۲) و مس معدنی (تیمار ۳) تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد. در بین تیمارهای تغذیه‌شده با جیره محتوی فرم‌های معدنی نیز بالاترین مقدار در تیمار محتوی هر دو نوع عنصر معدنی آهن و مس (تیمار ۴) مشاهده شد. بالاترین مقدار تری‌گلیسرید در تیمار تغذیه‌شده با جیره محتوی هر دو نوع نانوذره آهن و مس (تیمار ۷) و کمترین مقدار در تیمار شاهد مشاهده شد ($P < 0/05$).

جدول ۳. مقایسه میانگین سنجه‌های بیوشیمیایی خونی ماهی سفیدک سیستان در تیمارهای مختلف

سنجه‌ها	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴	تیمار ۵	تیمار ۶	تیمار ۷
TSP	۲/۶۹ ± ۰/۱۰ ^d	۳/۱۲ ± ۰/۱۸ ^c	۳/۱۴ ± ۰/۱۵ ^c	۳/۲۳ ± ۰/۰۸ ^c	۳/۶۶ ± ۰/۱۵ ^b	۳/۷۲ ± ۰/۲۱ ^b	۴/۲۴ ± ۰/۰۷ ^a
Alb	۱/۲۶ ± ۰/۰۴ ^d	۱/۵۳ ± ۰/۰۴ ^c	۱/۵۱ ± ۰/۱۴ ^c	۱/۵۵ ± ۰/۰۲ ^c	۱/۷۴ ± ۰/۰۵ ^b	۱/۷۷ ± ۰/۰۳ ^b	۱/۹۶ ± ۰/۰۱ ^a
Glob	۱/۴۳ ± ۰/۰۷ ^c	۱/۵۹ ± ۰/۱۶ ^{bc}	۱/۶۳ ± ۰/۱۵ ^{bc}	۱/۶۷ ± ۰/۰۵ ^{bc}	۱/۹۱ ± ۰/۱۴ ^b	۱/۹۵ ± ۰/۲۵ ^b	۲/۲۸ ± ۰/۰۶ ^a
Glu	± ۳/۲۱ ^a	± ۵/۵۰ ^a	± ۲/۶۴ ^a	± ۴/۳۵ ^b	± ۳/۰۰ ^b	± ۳/۶۰ ^b	± ۴/۰۰ ^b
HDL	± ۲۹/۵۹ ^d	± ۳۴/۰۴ ^c	± ۱۱/۵۳ ^c	± ۴۰/۰۰ ^c	± ۳۸/۲۷ ^b	± ۸۷/۶۴ ^b	± ۲۳/۲۵ ^a
CHOL	± ۱/۰۰ ^d	± ۵/۰۰ ^d	± ۹۴/۶۶ ± ۳/۵۱ ^d	± ۷/۵۰ ^c	± ۲۷/۶۷ ± ۲/۵۱ ^b	± ۲۴/۶۷ ± ۳/۵۱ ^b	± ۵/۵۶ ^a
TRIG	± ۲/۰۰ ^d	± ۱/۵۰ ^{bc}	± ۲/۶۴ ^c	± ۵/۶۸ ^{bc}	± ۱۱۵/۳۳ ± ۲/۵۱ ^b	± ۳۷/۷۸ ^{bc}	± ۱۴۳/۳۳ ± ۲/۵۱ ^a

حروف غیر همسان نشانه اختلاف معنی‌دار است ($P < 0/05$).

آنزیم‌های کبدی

روند مشابهی بین مقادیر سه آنزیم AST، ALP و ALT مشاهده گردید، به طوری که بیشترین مقدار این آنزیم‌ها در تیمار شاهد و کمترین مقدار آن در تیمار تغذیه‌شده با هر دو نوع نانوذره آهن و مس (تیمار ۷) به دست آمد؛ اگرچه این اختلاف معنی‌دار نبود. مقادیر به دست آمده برای تیمارهای تغذیه‌شده با جیره‌های محتوی نانوذرات (تیمارهای ۵، ۶ و ۷) نیز به‌طور غیرمعنی‌داری کمتر از مقادیر به دست آمده برای تیمارهای تغذیه‌شده با فرم‌های معدنی این دو عنصر (تیمارهای ۲، ۳ و ۴) بود (جدول ۴).

بیشترین مقدار مالون دی‌آلدهید در تیمار شاهد و کمترین مقدار آن در تیمار تغذیه‌شده با جیره محتوی هر دو نوع نانوذره آهن و مس مشاهده گردید ($P < 0.05$) (جدول ۴).

جدول ۴. مقایسه میانگین آنزیم‌های کبدی ماهی سفیدک سیستان در تیمارهای مختلف

سنجه‌ها	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴	تیمار ۵	تیمار ۶	تیمار ۷
AST	۳۱۵/۶۶ ± ۸/۶۳ ^a	۳۰۹/۰۰ ± ۸/۵۴ ^a	۳۱۱/۰۰ ± ۱۰/۰۰ ^a	۲۹۷/۵۰ ± ۴/۹۴ ^a	۲۹۴/۰۰ ± ۹/۸۴ ^a	۲۹۱/۵۰ ± ۱۴/۸۴ ^a	۲۸۹/۰۰ ± ۷/۲۱ ^a
ALT	۸/۰۰ ± ۱/۰۰ ^a	۷/۰۰ ± ۱/۰۰ ^a	۷/۶۶ ± ۱/۵۲ ^a	۶/۰۰ ± ۱/۰۰ ^a	۵/۵۰ ± ۰/۷۰ ^a	۵/۳۳ ± ۱/۵۲ ^a	۵/۰۰ ± ۱/۰۰ ^a
ALP	۸۳/۰۰ ± ۴/۰۰ ^a	۸۱/۰۰ ± ۳/۰۰ ^a	۷۹/۸۳ ± ۴/۸۰ ^a	۷۷/۰۰ ± ۲/۰۰ ^a	۷۴/۳۳ ± ۳/۰۵ ^a	۷۵/۶۶ ± ۴/۱۶ ^a	۷۳/۵۰ ± ۴/۵۰ ^a
MDA	۶۴/۳۳ ± ۲/۳۰ ^a	۵۹/۰۰ ± ۲/۰۰ ^{bc}	۶۰/۳۳ ± ۲/۰۰ ^{ab}	۵۵/۰۰ ± ۲/۰۰ ^{cd}	۵۳/۳۳ ± ۱/۵۲ ^d	۵۴/۱۶ ± ۱/۲۵ ^{cd}	۴۸/۰۰ ± ۳/۰۰ ^e

حروف غیر همسان نشانه اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$).

سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی

تغییرات در مقادیر سه آنزیم SOD، GPx و CAT نیز روند مشابهی را نشان داد به طوری که کمترین مقدار در تیمار شاهد و بالاترین مقدار در تیمار تغذیه‌شده با جیره محتوی هر دو نوع نانوذره آهن و مس (تیمار ۷) مشاهده گردید ($P < 0.05$). نتایج به‌دست‌آمده در تیمارهای تغذیه‌شده با جیره‌های محتوی نانو ذرات نیز به‌طور معنی‌داری از تیمارهای تغذیه‌شده با جیره‌های محتوی فرم‌های معدنی بالاتر بود ($P < 0.05$) (جدول ۵ و تصویر ۱).

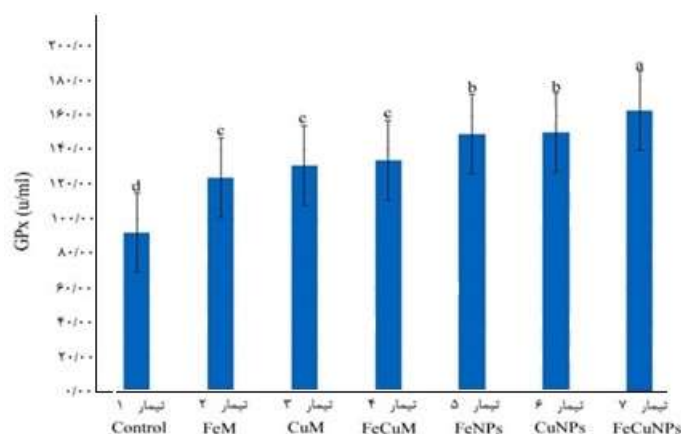
بالاترین مقدار لیزوزیم در تیمار تغذیه‌شده با جیره محتوی هر دو نوع نانوذره آهن و مس (تیمار ۷) و کمترین مقدار در تیمار شاهد (تیمار ۱) مشاهده شد ($P < 0.05$). بین سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد اگرچه مقادیر به‌دست‌آمده در تیمارهای تغذیه‌شده با نانوذره آهن (تیمار ۵) و نانوذره مس (تیمار ۶) نیز به‌طور غیرمعنی‌داری از مقادیر مربوط به تیمارهای تغذیه‌شده با جیره محتوی آهن و مس معدنی (تیمار ۲، ۳ و ۴) بالاتر بود (تصویر ۲).

در خصوص فعالیت سیستم کمپلمان، میزان ACH50 در تیمار تغذیه‌شده با جیره محتوی هر دو نوع نانوذره آهن و مس (تیمار ۷) به‌صورت معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود ($P < 0.05$). کمترین مقدار نیز در تیمار شاهد مشاهده شد که با سایر تیمارها (تیمار ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶) اختلاف معنی‌دار نداشت (جدول ۶). بالاترین مقدار C3 در تیمار تغذیه‌شده با جیره محتوی نانوذرات آهن و مس (تیمار ۷) و کمترین مقدار در تیمار شاهد مشاهده گردید ($P < 0.05$). بین دیگر تیمارها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد؛ هرچند مقادیر به‌دست‌آمده برای تیمارهای تغذیه‌شده با جیره‌های محتوی نانوذرات بالاتر از تیمارهای تغذیه‌شده با جیره‌های محتوی عناصر معدنی بود (جدول ۶).

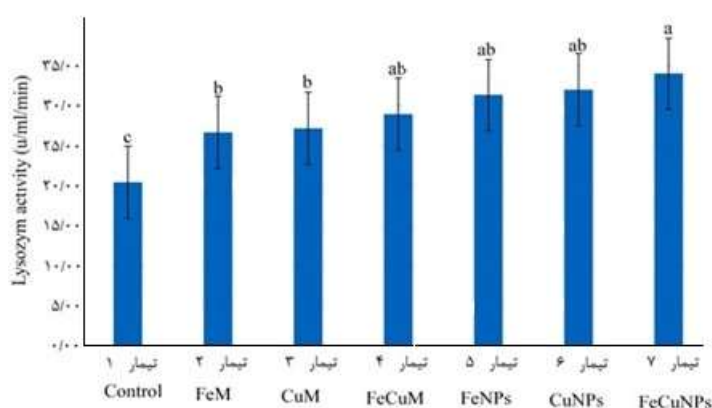
جدول ۵. مقایسه میانگین سنجه‌های سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی (SOD و CAT) ماهی سفیدک سیستان در تیمارهای مختلف

سنجه‌ها	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴	تیمار ۵	تیمار ۶	تیمار ۷
SOD	۴۵/۳۳ ± ۲/۵۱ ^d	۵۲/۳۳ ± ۲/۰۸ ^c	۵۳/۶۷ ± ۰/۵۷ ^c	۵۴/۶۷ ± ۲/۵۱ ^c	۶۰/۶۷ ± ۲/۰۸ ^b	۶۱/۰۰ ± ۱/۰۰ ^b	۶۷/۰۰ ± ۲/۶۴ ^a
CAT	۶۵/۵۰ ± ۳/۵۰ ^d	۷۷/۳۳ ± ۲/۵۱ ^c	۷۶/۰۰ ± ۳/۶۰ ^c	۷۸/۰۰ ± ۲/۶۴ ^c	۸۵/۸۳ ± ۲/۰۲ ^b	۸۵/۵۰ ± ۰/۵۰ ^b	۹۳/۳۳ ± ۱/۵۲ ^a

حروف غیر همسان نشانه اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$).



شکل ۱. مقایسه میانگین سنج‌های سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی (GPx) ماهی سفیدک سیستان در تیمارهای غذایی (تیمار ۱: شاهد، تیمار ۲: محتوی آهن معدنی، تیمار ۳: محتوی مس معدنی، تیمار ۴: محتوی آهن و مس معدنی، تیمار ۵: محتوی آهن نانویی، تیمار ۶: محتوی مس نانویی، تیمار ۷: محتوی آهن و مس نانویی)



شکل ۲. مقایسه میانگین سنج‌های سیستم ایمنی (Lysozym) ماهی سفیدک سیستان در تیمارهای غذایی (تیمار ۱: شاهد، تیمار ۲: محتوی آهن معدنی، تیمار ۳: محتوی مس معدنی، تیمار ۴: محتوی آهن و مس معدنی، تیمار ۵: محتوی آهن نانویی، تیمار ۶: محتوی مس معدنی، تیمار ۷: محتوی آهن و مس نانویی)

فعالیت ضد باکتریایی سرم

بهترین نتیجه در تیمار تغذیه‌شده با هر دو نوع نانوذره آهن و مس (تیمار ۷) به دست آمد که مقادیر آن به صورت معنی‌داری کمتر از سایر تیمارها بود ($P < 0.05$). پس از آن، نتایج به دست آمده برای تیمار تغذیه‌شده با جیره محتوی نانوذره آهن (تیمار ۵) به صورت معنی‌داری ($P < 0.05$) بهتر از مقادیر به دست آمده برای تیمارهای نانوذره مس (تیمار ۶) و آهن و مس معدنی (تیمار ۴) بود. مقادیر به دست آمده برای تیمار شاهد و تیمارهای تغذیه‌شده با جیره محتوی آهن معدنی (تیمار ۲) و مس معدنی (تیمار ۳) بسیار بالا (> 100000) بود و بین آن‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. بنابراین در جدول ذکر نشده‌اند. (جدول ۶).

جدول ۶. مقایسه میانگین سنج‌های سیستم ایمنی (C3 و ACH50) ماهی سفیدک سیستان در تیمارهای مختلف

سنج‌ها	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴	تیمار ۵	تیمار ۶	تیمار ۷
ACH50	$28/33 \pm 1/52^b$	$30/00 \pm 3/00^b$	$30/00 \pm 2/64^b$	$31/67 \pm 1/52^b$	$32/33 \pm 2/51^b$	$32/66 \pm 2/08^b$	$39/00 \pm 3/00^a$
C3	$144/67 \pm 1/52^c$	$152/33 \pm 4/58^{bc}$	$150/00 \pm 2/51^{bc}$	$154/00 \pm 3/60^b$	$155/00 \pm 3/00^b$	$155/67 \pm 3/78^b$	$165/00 \pm 2/64^a$
Anti B	-	-	-	$215/67 \pm 6/65^a$	$120/67 \pm 7/06^b$	$201/67 \pm 7/76^a$	$10/33 \pm 2/08^c$

حروف غیرهمسان نشانه اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$).

بحث

سنجه‌های خونی فاکتورهای مهمی برای پایش وضعیت سلامت فیزیولوژیکی و آسیب‌شناختی ماهی می‌باشند (Dawood *et al.*, 2015). پروتئین کل سرم یکی از این سنجه‌های خونی است که معیاری برای وضعیت سلامت و ایمنی، استرس و شرایط تغذیه‌ای در ماهی می‌باشد (Akter *et al.*, 2018). به طور معمول پروتئین کل سرم، همراه با رشد ماهی افزایش می‌یابد و این افزایش منظم نشان‌دهنده شرایط مطلوب ماهی خواهد بود (Coeurdacier *et al.*, 2011). آلبومین، پروتئین اصلی خون است که وظیفه آن حفظ فشار اسمزی خون می‌باشد. کاهش میزان آلبومین می‌تواند به علت نقص و ناتوانی کبد در سنتز آن و نشان‌دهنده بیماری‌های کبدی باشد. گلوبولین نیز از جمله پروتئین‌های اصلی خون می‌باشد که اندازه‌گیری میزان آن دارای ارزش تشخیصی قابل توجهی در حیوانات آزمایشگاهی است. افزایش میزان گلوبولین سرم و میزان سطوح آلبومین/گلوبولین کاهش‌یافته نشان‌دهنده وضعیت مطلوب ایمنی است (Bunglavan *et al.*, 2014). به‌طور کلی مواد معدنی در تنظیم مقادیر سنتز پروتئین‌های خون در حیوانات مؤثر هستند. مواد معدنی مکمل جیره‌های غذایی مانند Zn, Cu, Fe, Ca, Mg, Na و K می‌توانند سنتز پروتئین را در ماهی‌ها بهبود بخشند (El-Shenawy *et al.*, 2019) که این امر مطابق با نتیجه به‌دست‌آمده در این مطالعه می‌باشد به‌طوری‌که کمترین مقدار مشاهده شده پروتئین کل سرم، آلبومین و گلوبولین مربوط به تیمار شاهد بود که نشان‌دهنده نیاز ضروری ماهی سفیدک سیستان به دریافت آهن و مس از طریق جیره می‌باشد. از طرف دیگر بالاتر بودن نتایج ارزیابی این سه سنجه، در تیمارهای تغذیه‌شده با جیره‌های محتوی نانوذرات، نشان‌دهنده تأثیر بیشتر فرم‌های نانویی این دو عنصر، به‌ویژه استفاده هم‌زمان آن‌ها در جیره، نسبت به فرم‌های معدنی می‌باشد. نتایج مطالعه انجام‌شده در خصوص بررسی اثر جایگزین نمودن آهن معدنی رژیم غذایی با سطوح مختلف Fe-NPS بر روی کارایی رشد، ترکیب بدن و وضعیت سلامت ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) قبل و بعد از آلودگی با *A. hydrophila* نشان داد که افزودن مقادیر مطلوب آهن معدنی و نانویی به جیره این ماهی، غلظت‌های پروتئین کل سرم و گلوبولین را در مقایسه با جیره فاقد آهن بهبود می‌بخشد (El-Shenawy *et al.*, 2019).

مس نیز عنصری ارزشمند برای برخی از عملکردهای سیستم ایمنی است (Sun *et al.*, 2013). افزودن مقادیر مطلوب Cu-NPs و سولفات مس به جیره ماهی سیم دریایی قرمز (*Pagrus major*) منجر به افزایش معنی‌دار پروتئین کل سرم گردید که این افزایش احتمالاً با نقش مس در بیوسنتز پروتئین مرتبط است (Minganti *et al.*, 2010). Wang و همکاران (۲۰۱۵) نیز تأیید کردند که پروتئین کل سرم در ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) به‌طور معنی‌داری با مس جیره مرتبط است (Wang *et al.*, 2015). نتایج مطالعه صورت گرفته در گربه ماهی (*Clarias batrachus*) تغذیه‌شده با جیره محتوی نانوذره آهن نشان داد که سطوح کلسترول، تری‌گلیسیرید و پروتئین کل سرم به‌صورت وابسته به دوز افزایش می‌یابد ($P < 0.05$) که این امر منجر به ایجاد وضعیت سلامتی بهتری برای گروه ماهیان تغذیه‌شده با نانوذرات آهن (جیره محتوی ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذره آهن) گردید (Akter *et al.*, 2018).

بروز کم‌خونی حاصل از کمبود آهن در ماهیان و درمان آن به وسیله افزودن آهن به جیره‌های غذایی ثابت شده است (Behera *et al.*, 2013). لذا از آنجا که کم‌خونی می‌تواند با تمام زیرمجموعه‌های^۵ لیپوپروتئین‌ها، از جمله تری‌گلیسیرید و کلسترول مرتبط باشد (Chowta *et al.*, 2017)، می‌توان از این طریق نیز، تأثیر آهن جیره بر محتوای لیپوپروتئین‌های خون را نتیجه‌گیری نمود. افزایش سطح HDL که در تمامی تیمارهای مطالعه حاضر، به‌ویژه در تیمارهای تغذیه‌شده با فرم‌های نانویی آهن و مس مشاهده شد، مشابه نتایج به دست آمده در خصوص تغذیه ماهی تیلاپیای نیل (El-Shenawy *et al.*, 2019) و Bagridae catfish (Akter *et al.*, 2018) با جیره محتوی نانوذره آهن می‌باشد.

افزایش گلوکز خون در ماهیان، به‌صورت معمول تحت شرایط نامطلوب دیده می‌شود. این امر به حیوان کمک می‌کند تا از طریق تأمین انرژی پایه برای اندام‌های حیاتی، از عهده نیازهای افزایش‌یافته انرژی برآید (Saravanan *et al.*, 2011). بر اساس نتایج برخی مطالعات، مانند بررسی اثر مس معدنی بر کارایی رشد و پاسخ ایمنی فیل‌ماهی (*Huso huso*) (Mohseni *et al.*, 2014)، اثر سطوح مختلف نانوذره مس و سولفات مس بر روی کارایی رشد، ویژگی‌های بیوشیمیایی خون، وضعیت آنتی‌اکسیدانی و ایمنی ماهی سیم دریایی قرمز (El-Basuini *et al.*, 2016) و بررسی پتانسیل اثرات مضر نانوذرات Fe_2O_3 در

⁵ subfractions

غلظت‌های ۱ و ۲۵ میلی‌گرم در لیتر بر روی پاسخ‌های خونی، بیوشیمیایی و تنظیم یونی در کپور هندی (*Labeo rohita*) (Saravanan *et al.*, 2015)، افزایش سطح گلوکز به عنوان نشانه استرس و در پاسخ به مقادیر کمتر و یا بیشتر از میزان مطلوب برای گونه تحت آزمایش مشاهده می‌شود، لازم به ذکر است که بیشترین کاهش گلوکز در سطوح مطلوب عنصر مکمل شده برای گونه مورد نظر، به دست آمده است. در این مطالعه نیز کاهش معنی‌دار سطوح گلوکز خون در کلیه تیمارهای تغذیه شده با جیره‌های محتوی فرم‌های نانوی عناصر آهن و مس نسبت به شاهد و تیمارهای تغذیه شده با جیره‌های محتوی فرم‌های معدنی مشاهده شد.

افزایش فعالیت آنزیم‌های سرمی کبد شامل ALP، AST و ALT به عنوان پاسخ جاندار به عوامل استرس‌زا مورد توجه می‌باشد. بنابراین سطوح افزایش‌یافته این آنزیم‌ها ممکن است نشانه اثر سمی حاصل از مقادیر بیشتر از حد مجاز عنصر افزوده‌شده به جیره باشد که از طریق تخریب بافت کبدی باعث رها شدن این آنزیم‌ها می‌گردد (Bitiren *et al.*, 2004). نتایج مطالعه در ماهی تیلاپپای نیل نشان داد که سطوح آزمایش شده و به‌ویژه بهینه نانوذرات آهن در جیره‌های غذایی، فعالیت آنزیم‌های کبدی (ALT و AST) را نسبت به شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش می‌دهد (El-Shenawy *et al.*, 2019). تغذیه ماهی سیم دریایی قرمز با جیره محتوی سطوح مطلوب سولفات و نانوذره مس منجر به کاهش AST نسبت به تیمار شاهد گردید. اگرچه مقدار ALT تنها در تیمارهای تغذیه‌شده با فرم معدنی مس (سولفات مس) کاهش یافت. عدم تغییرات قابل‌توجه در فعالیت‌های آنزیم‌های متابولیکی (AST & ALT) نشان‌دهنده عدم وجود علائم سمی در سطوح مس رژیم غذایی مورد استفاده می‌باشد (El-Basuini *et al.*, 2016). در این مطالعه میزان این سه آنزیم در تیمارهای تغذیه‌شده با جیره‌های محتوی فرم‌های معدنی و نانویی دو عنصر آهن و مس، خصوصاً تیمار تغذیه‌شده با جیره محتوی هر دو نوع نانوذره آهن و مس نسبت به شاهد به‌طور غیرمعنی‌داری کاهش یافت که با مطالعات مورد اشاره همخوانی دارد.

سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی به‌شدت با وضعیت سلامت و ایمنی ماهی در ارتباط است (Tang *et al.*, 2013) و آنزیم‌های اصلی آن (SOD، CAT و GPx) گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن (ROS) را به فرم‌های کمتر واکنشی^۶ تجزیه می‌کنند (Atencio *et al.*, 2018; Dekani *et al.*, 2009). نقش آنزیم SOD تحریک اکسیداسیون و کاهش آنیون سوپراکساید به هیدروژن پراکساید است که سپس توسط آنزیم‌های CAT و GPx به عنوان سوپسترا استفاده می‌شود (Saffari *et al.*, 2016). آهن جیره، سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی همچون گلوکاتایون پراکساید (GSH) و سوپراکساید دیسمیوتاز (SOD) را به وسیله جلوگیری از تولید رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون چربی (MDA) تنظیم می‌کند. بررسی تأثیر افزودن نانوذره اکسید آهن و سولفات آهن (II) به جیره ماهی کپور هندی نشان داد که آهن افزوده‌شده به جیره پایه می‌تواند فعالیت GSH و SOD را بدون توجه به منابع مختلف آهن (nano-Fe و سولفات آهن (II)) بهبود بخشد (Behera *et al.*, 2013).

مطالعات نشان داد که جیره محتوی مس نیز فعالیت‌های آنزیم Cu,Zn-SOD در هیپاتوپانکراس آبالون (*Haliotis discus hannai*) (Osredkar and Sustar, 2011) و ماهی کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*) (Tang *et al.*, 2013) و گلوکاتایون پراکساید (GPx) در پلاسمای ماهی کاراس (*Carassius auratus gibelio*) (Shao *et al.*, 2010) را افزایش می‌دهد. در واقع مس به‌طور مثبتی با سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی مرتبط است (Fang *et al.*, 2013) و اثر مس جیره بر روی توقف آسیب اکسیداتیو ممکن است به واکنش با ROS همچون سوپراکسید آنیون و رادیکال هیدروکسیل مرتبط باشد (Tang *et al.*, 2013). از طرف دیگر سروپلاسمین یک پروتئین حاوی مس است که فعالیت آن با سطوح مناسب مس جیره افزایش می‌یابد (Shaiu and Ning, 2003). این پروتئین حاوی مس توانایی توقف تولید رادیکال سوپراکساید^۸ (Valko *et al.*, 2007) و شکل‌گیری رادیکال هیدروکسیل را دارد (Zhang *et al.*, 2013). نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که افزودن آهن و مس به‌ویژه در فرم نانویی می‌تواند سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی را نسبت به سایر تیمارها بهبود دهد و بهترین نتیجه در تیمار تغذیه شده با جیره محتوی هر دو نوع نانوذره آهن و مس به دست آمد.

⁶ reactive oxygen species

⁷ less reactive species

⁸ superoxide radical generation

مالون دی‌آلدئید (MDA) به‌طور وسیعی به‌عنوان سنجه مناسب، برای تعیین میزان آسیب اکسیداتیو چربی‌ها استفاده می‌شود (Jiang *et al.*, 2010). Tang و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که جیره حاوی مس می‌تواند محتوای MDA هیپاتوپانکراس، روده و کبد را کاهش دهد. آن‌ها نتیجه گرفتند که جیره حاوی مس در مقادیر مطلوب می‌تواند MDA را تا حدی به‌وسیله افزایش معنی‌دار فعالیت‌های سوپراکساید دیسمیوتاز، کاتالاز، گلوکاتایون پراکسیداز، گلوکاتایون رداکتاز، گلوکاتایون S ترنسفراز و محتوای گلوکاتایون در هیپاتوپانکراس و روده کاهش دهد (Tang *et al.*, 2013). مقایسه اثرات نانوذرات اکسید آهن و سولفات آهن دو ظرفیتی^۹ بر روی ماهی کپور هندی نشان داد که افزودن نانوذره اکسید آهن و سولفات آهن، منجر به افزایش غیر معنی‌دار سطوح MDA در تیمارهای تغذیه‌شده با نانوذره اکسید آهن و سولفات آهن می‌گردد. آن‌ها نتیجه گرفتند که جیره حاوی آهن، سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی همچون گلوکاتایون پراکساید (GSH) و سوپراکساید دیسمیوتاز (SOD) را به‌وسیله جلوگیری از تولید رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون چربی (MDA) تنظیم می‌کند (Behera *et al.*, 2013; El-Shenawy *et al.*, 2019) که نتایج این مطالعات با داده‌های مطالعه حاضر در خصوص کاهش میزان MDA در تیمارهای تغذیه‌شده با جیره‌های حاوی فرم‌های معدنی و به‌ویژه نانویی آهن و مس نسبت به شاهد همخوانی دارد.

Behera و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که جیره‌های محتوی سولفات و نانوذره آهن منجر به بهبود سنجه‌های ایمنی ذاتی در ماهی کپور هندی می‌شوند و نانوذرات آهن مؤثرتر از فرم معدنی آن عمل می‌کنند؛ هرچند که افزودن نانوذرات آهن به جیره غذایی این ماهی تأثیر معنی‌داری بر فعالیت سیستم کمپلمان نشان نداد (Behera *et al.*, 2013)؛ اما با توجه به اینکه نانوذرات آهن در فعال‌سازی سلول‌های دندریتیک (Goya *et al.*, 2008) و افزایش تولید اینترلوکین‌ها و سیتوکین‌ها، از طریق تزریق داخل وریدی در موش (Chen *et al.*, 2011)، مؤثر می‌باشند از این‌رو می‌بایست منجر به بهبود فاکتورهای ایمنی ذاتی همچون لیزوزیم، سیستم کمپلمان و فعالیت ضد باکتریایی سرم گردند، به‌ویژه که کمبود آهن باعث کاهش فعالیت میلوپراکسیداز، فعالیت باکتری کشی، عملکردهای نوتروفیل و کاهش NBT می‌شود (Scrimshaw and San Giovanni, 1997).

لیزوزیم به علت داشتن عملکرد ضد باکتریایی به‌عنوان یک خط دفاعی مهم در سیستم ایمنی طبیعی ماهی مطرح است (Saurabh and Sahoo, 2008). مطالعه صورت گرفته در سیم دریایی قرمز تغذیه‌شده با سطوح مختلف نانوذرات و سولفات مس نشان داد که مس می‌تواند فعالیت لیزوزیم را نسبت به ماهیان تغذیه‌شده با جیره شاهد (فاقد مس افزودنی) بهبود بخشد. بعلاوه نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذره مس مؤثرتر از سولفات مس عمل می‌کنند (El-Basuini *et al.*, 2016). در مطالعه‌ای بر روی فیل ماهی در سال ۲۰۱۴، پایین‌ترین مقدار فعالیت لیزوزیم در فیل ماهی تغذیه‌شده با جیره فاقد مس گزارش شد (Mohseni *et al.*, 2014).

Andersen و همکاران در سال ۱۹۹۷ نشان دادند که در ماهی *Salmo salar* فعالیت لیزوزیم سرم به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر آهن جیره قرار نمی‌گیرد (Andersen *et al.*, 1997). افزودن فرم معدنی و نانوی آهن به جیره ماهی تیل‌پای نیل نیز نتوانست میزان تولید لکوسیت‌ها را که از منابع ترشح‌کننده لیزوزیم می‌باشند نسبت به تیمار شاهد که شامل ماهیان تغذیه‌شده با جیره فاقد مکمل آهن بود قبل و بعد از آلودگی با *A. hydrophila* به‌طور معنی‌داری افزایش دهد (El-Shenawy *et al.*, 2019). نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه نشان داد که افزودن آهن و مس به جیره غذایی، منجر به بهبود عملکرد لیزوزیم نسبت به شاهد می‌گردد. همچنین نتایج حاصل با جیره‌های حاوی فرم معدنی و نانویی مس بهتر از جیره‌هایی حاوی فرم معدنی و نانویی آهن بود؛ اگرچه تفاوت بین آن‌ها معنی‌دار نبود. بالاترین میزان فعالیت لیزوزیم نیز در تیمار تغذیه‌شده با جیره حاوی هر دو نوع نانوذره آهن و مس به دست آمد.

فعالیت باکتری کشی سرم، فاکتور حیاتی میزبان برای مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا است. مطالعات نشان داده است که مس و به‌ویژه نانوذرات مس دارای خواص ضد باکتریایی می‌باشند (Gomes *et al.*, 2011). برای مثال افزودن مقادیر مطلوب نانوذرات مس و سولفات مس به جیره ماهی سیم دریایی قرمز منجر به بهبود فعالیت باکتری کشی سرم در این ماهی گردید (El-Basuini *et al.*, 2016). به‌طور مشابه Sun و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که مس توانایی مقاومت در برابر عفونت

⁹ ferrous sulfate

باکتریایی را در خرچنگ‌های جوان (*Eriocheir sinensis*) افزایش می‌دهد (Sun et al., 2013). آهن نیز نقش مهمی در پاسخ ایمنی ماهی ایفا می‌کند به طوری که گزارش شد تمایل برای افزایش فعالیت باکتری کشی در ماهی کپور هندی تغذیه شده با جیره محتوی نانوذرات آهن افزایش می‌یابد و نتیجه گرفتند که نانوذرات آهن، محرک‌های ایمنی بهتری نسبت به فرم معدنی آن می‌باشند (Behera et al., 2013). در مطالعه حاضر نیز کمترین فعالیت باکتری کشی سرم در تیمار شاهد و بالاترین مقدار در تیمار تغذیه شده با جیره محتوی هر دو نوع نانوذره آهن و مس به دست آمد ($P < 0.05$). همچنین نتایج به دست آمده در تیمارهای تغذیه شده با نانوذرات به طور معنی داری بالاتر از نتایج تیمارهای تغذیه شده با فرم معدنی بود ($P < 0.05$). کمپلمان‌ها بخشی اساسی از سیستم ایمنی ذاتی می‌باشند که از حدود ۳۵ پروتئین محلول و متصل به غشاء تشکیل شده‌اند. سیستم کمپلمان، کارکردهای بی‌شماری دارد که مشخص‌ترین آن، توانایی کشتن عوامل بیماری‌زا از طریق ایجاد منافذ در غشاهای سلولی می‌باشد. فعالیت ضد باکتریایی سیستم کمپلمان که در بسیاری از ماهی‌ها گزارش شده است به عنوان یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های کشتن و پاک‌سازی باکتری‌ها در ماهیان مطرح است که می‌تواند توسط محرک‌های ایمنی مختلف فعال گردند (Srivastava and Pandey, 2015). یکی از محرک‌های فعال‌سازی سیستم کمپلمان، سیتوکین‌های می‌باشند که برخی از انواع آن‌ها در تنظیم پروتئین‌های درگیر در سوخت و ساز آهن مانند سرولوپلاسمین مؤثر می‌باشند (Di Bella et al., 2017).

آهن و مس، کوفاکتورهای بسیاری از آنزیم‌ها و عناصر ضروری در همه یوکاریوت‌ها می‌باشند. پروتئین محتوی مس، سرولوپلاسمین، نقشی ضروری در هوموستازی آهن دارد (Di Bella et al., 2017). اهمیت سرولوپلاسمین در سوخت و ساز آهن، به وسیله این حقیقت که کاهش در فعالیت سرولوپلاسمین منجر به انباشت شدید آهن در کبد، طحال و مغز می‌شود مشخص می‌گردد (Harris et al., 1999). هوموستازی سیستماتیک آهن که بر غلظت و تجمع آهن در سرم و اندام‌های مختلف مؤثر می‌باشد توسط محرک‌های مختلفی از جمله سیتوکین‌های التهابی تنظیم می‌گردد. از جمله این سیتوکین‌ها proinflammatory cytokines می‌باشد که می‌تواند بیان تعدادی از پروتئین‌های درگیر در متابولیسم آهن، از جمله سرولوپلاسمین را تنظیم کند. از طرفی کمبود مس، منجر به نقص در فعالیت آنزیمی سرولوپلاسمین می‌شود و این امر اثر قدرتمندی بر روی هوموستازی آهن داشته و منجر به احتباس آهن سلولی و تجمع آن در کبد و سایر اندام‌ها می‌گردد (Di Bella et al., 2017). لازم به ذکر است که لیگاند‌های مس نه تنها بر سرولوپلاسمین، بلکه همچنین بر دیگر پروتئین‌های درگیر در سوخت و ساز آهن نیز مؤثر می‌باشند (Kono et al., 2010). El-Shenawy و همکاران که بررسی تأثیر جایگزینی آهن معدنی با نانوذره آهن در جیره غذایی ماهی تیلاپپای نیل را مطالعه نمودند نیز نتیجه گرفتند که نانوذرات فلزی پس از ورود به بدن، با سلول‌های ایمنی تعامل برقرار می‌کنند و باعث آغاز پاسخ‌های التهابی همراه با ترشح مولکول‌های سیگنالینگ (سیتوکین‌ها) می‌گردند این امر ارتباط بین سلول‌های ایمنی و هماهنگ شدن رویدادهای مولکولی را ممکن می‌سازد (El-Shenawy et al., 2019).

از این رو بر اساس نتایج این مطالعه و واکنش‌های مؤثر فیزیولوژیک دو عنصر مس و آهن می‌توان نتیجه گرفت که دریافت دو عنصر مذکور از طریق جیره غذایی منجر به بهبود سنج‌های خونی، آنتی اکسیدانی و ایمنی ماهی سفیدک سیستان می‌گردد. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از فرم‌های نانویی این دو عنصر به ویژه استفاده هم‌زمان آن‌ها در جیره‌های غذایی، مؤثرتر از فرم‌های معدنی آن‌ها عمل می‌نماید.

منابع

- Abdel-Tawwab, M., Mousa, M.A.A., Abbas, F.E. 2007. Growth performance and physiological response of African catfish, *Clarias gariepinus* fed organic selenium prior to the exposure to environmental copper toxicity. *Aquaculture*. 272: 335-345.
- Abei, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. 272: 121-126.
- Akter, N., Alam, J., Jewel, A.S., Haque, A., Khatun, S., Akter, S. 2018. Evaluation of dietary metallic iron nanoparticles as feed additive for growth and physiology of Bagridae catfish *Clarias*

- batrachus* (Linnaeus, 1758). International Journal of Fisheries and Aquatic Studies. 6(3): 371-377.
- Amar, E.C., Kiron, V., Satoh, S., Watanabe, T. 2004. Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. Fish & Shellfish Immunology. 16(4): 527-537.
- Andersen, F., Lorentzen, M., Waagbo, R., Maage, A. 1997. Bioavailability and interactions with other micronutrients of three dietary iron sources in Atlantic salmon, *Salmo salar*, smolts. Aquaculture Nutrition. 3: 239-246.
- Arabnejad, S., Gharaei, A., Ghaffari, M., Rahdari, A. 2014. Investigation of sperm quality fluctuation of Snow trout (*Schizothorax zarudnyi* Nikolskii, 1897) in response to hormonal inducing. Journal of Cellular and Molecular Researches. 27(4): 611-617.
- Ashouri, S., Keyvanshokoh, S., Salati, A.P., Johari, S.A., Pasha-Zanoosi H. 2015. Effects of different levels of dietary selenium nanoparticles on growth performance, muscle composition, blood biochemical profiles and antioxidant status of common carp (*Cyprinus carpio*). Aquaculture. 446: 25-29.
- Atencio, L., Moreno, I., Jos, A., Prieto, A.I., Moyano, R., Blanco, A., Camean, A.M. 2009. Effects of dietary selenium on the oxidative stress and pathological changes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to a microcystin-producing cyanobacterial water bloom. Toxicol. 53: 269-282.
- Behera, T., Swain, P., Rangacharulu, P.V., Samanta, M. 2013. Nano-Fe as feed additive improves the hematological and immunological parameters of fish, *Labeo rohita* H. Applied Nanoscience. 4: 687-694.
- Bitiren, M., Karakilcik, A.Z., Zerim, M., Aksoy, N., Musa, D. 2004. Effects of selenium on histopathological and enzymatic changes in experimental liver injury of rats. Experimental and Toxicologic Pathology. 56(1): 59-64.
- Buege, J.A., Aust, S.D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. Methods in Enzymology. 52: 302-310.
- Bunglavan, S.J., Garg, A.K., Dass, R.S., Shrivastava, S. 2014. Effect of supplementation of different levels of selenium as nanoparticles/sodium selenite on blood biochemical profile and humoral immunity in male Wistar rats. Veterinary World. 7: 1075-1081.
- Chen, P.J., Chih-Hsiang, S., Chi-Yen, T., Shih-Wei, T., Chiung-Hsiang, C. 2011. Toxicity assessments of nanoscale zerovalent iron and its oxidation products in medaka (*Oryzias latipes*) fish. Marine Pollution Bulletin. 63: 339-346
- Chowta, K.N., Reddy, B.S., Chowta, N.M., Shet, A., Achappa, B., Madi, R.D. 2017. Lipid profile in anemia: Is there any correlation? Annals of Tropical Medicine and Public Health. 10(4): 837-840.
- Chu, J.H., Chen, S.M., Huang, C.H. 2007. Effect of dietary iron concentrations on growth, hematological parameters, and lipid peroxidation of soft-shelled turtles, *Pelodiscus sinensis*. Aquaculture. 269: 532-537.
- Coourdacier, J.L., Dutto, G., Gasset, E., Blancheton, J.P. 2011. Is total serum protein a good indicator for welfare in reared sea bass (*Dicentrarchus labrax*)?. Aquatic Living Resources. 24: 121-127.
- Dawood, M.A.O., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S. 2015. Interaction effects of dietary supplementation of heat-killed *Lactobacillus plantarum* and β -glucan on growth performance, digestibility and immune response of juvenile red sea bream, *Pagrus major*. Fish & Shellfish Immunology. 2015: 45:33-42.
- Dekani, L., Johari, S.A., Salari Joo, H. 2018. Comparative toxicity of organic, inorganic and nanoparticulate zinc following dietary exposure to common carp (*Cyprinus carpio*). Science of the Total Environment. 656: 1191-1198.
- Di Bella, L.M., Alampi, R., Biundo, F., Toscano, G., Felice, M.R. 2017. Copper chelation and interleukin-6 proinflammatory cytokine effects on expression of different proteins involved in iron metabolism in HepG2 cell line. BioMed Central Biochemistry. 18:1.
- El-Basuini, M.F.E., El-Hais, A.M., Dawood, M.A.O., Abou-Zied, A.E., El-Damrawy, S.Z., Khalafalla, M.M.E., Ellis, A.E. 1990. Lysozyme assay. Techniques in Fish Immunology. Fair Haven, USA. 1(101): 103p.

- El-Shenawy, A.M., Gad, D.M., Yassin, A.S. 2019. Effect of iron nanoparticles on the development of fish farm feeds. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*. 60(1): 102-115.
- Fang, K.M., Cheng, F.C., Huang, Y.L., Chung, S.Y., Jian, Z.Y., Lin, M.C. 2013. Trace element, antioxidant activity, and lipid peroxidation levels in brain cortex of gerbils after cerebral ischemic injury. *Biological Trace Element Research*. 152: 66-74.
- Gomes, T., Pinheiro, J.P., Cancio, I., Pereira, C.G., Cardoso, C., Bebianno, M.J. 2011. Effects of copper nanoparticles exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental Science and Technology*. 45(21): 9356-9362.
- Goya, G.F., Marcos-Campos, I., Fernandez-Pacheco, R., Saez, B., Godino, J., As, L., Lambea, J., Tabuenca, P., Mayordomo, J.I., Larrad, L., Ibarra, M.R., Tres, A. 2008. Dendritic cell uptake of iron-based magnetic nanoparticles. *Cell Biology International*. 32: 1001-1005.
- Harris, Z.L., Durley, A.P., Man, T.K., Gitlin, J.D. 1999. Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. 96: 10812-10817.
- Haver, J.E., Hardy, R.W. 2002. *Fish Nutrition* 3 edition. Academic Press. 260-308.
- Hilty, F.M., Knijnenburg, J.T.N., Teleki, K.F., Hurrell, R.F., Pratsinis, S.E., Zimmermann, M.B. 2011. Incorporation of Mg and Ca into nanostructured Fe₂O₃ improves Fe solubility in dilute acid and sensory characteristics in foods. *Journal of Food Science*. 76: 1-10.
- Izquierdo, M.S., Ghrab, W., Roo, J., Hamre, K., Hernandez-Cruz, C.M., Bernardini, G., Terova G., Saleh, R. 2016. Organic, inorganic and nanoparticles of Se, Zn and Mn in early weaning diets for gilthead seabream, *Sparus aurata*; Linnaeus, 1758. *Aquaculture Research*. 48(6): 2852-2867.
- Jiang, W.D., Feng, L., Liu, Y., Jiang, J., Hu, K., Li, S.H., Zhou, X.Q. 2010. Lipid peroxidation, protein oxidant and antioxidant status of muscle, intestine and hepatopancreas for juvenile Jian carp, *Cyprinus carpio* var. Jian fed graded levels of myo-inositol. *Food Chemistry*. 120(3): 692-697.
- Kajita, Y., Sakai, M., Atsuta, S., Kobayash, M. 1990. The immunomodulatory effects of levamisole on Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Pathology*. 25: 93-98.
- Kono, S., Yoshida, K., Tomosagi, N., Terada, T., Hamaya, Y., Kanaoka, S., Miyajima, H. 2010. Biological effects of mutant ceruloplasmin on hepcidin mediated internalization of ferroportin. *Biochimica and Biophysica Acts*. 11: 968-975.
- McCord, J.M., Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*. 244: 6049-6055.
- Minganti, V., Drava, G., Pellegrini, R., Siccardi, C. 2010. Trace elements in farmed and wild gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Marine Pollution Bulletin*. 60: 2022-2025.
- Mohseni, M., Pourkazemi, M., Baim, S.C. 2014. Effects of dietary inorganic copper on growth performance and immune response of juvenile beluga, *Huso huso*. *Aquaculture Nutrition*. 20: 547-556.
- Noguchi, T., Cantor, A.H., Scott, M.L. 1973. Mode of action of selenium and vitamin E in prevention of exudative diathesis in chicks. *Journal of Nutrition*. 103: 1502-1511.
- Ogino, C., Yang, G.Y. 1980. Requirements of carp and rainbow trout for dietary manganese and copper. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 46(4): 455-458.
- Osredkar, J., Sustar, N. 2011. Copper and zinc, biological role and significance of copper/zinc imbalance. *Journal of Clinical Toxicology*. 3: 2161-0495.
- Ranganathan, P.N., Lu, Y., Jiang, L., Kim, C., Collins, J.F. 2011. Serum ceruloplasmin protein expression and activity increases in iron-deficient rats and is further enhanced by higher dietary copper intake. *Blood*. 118(11): 3146-3153.
- Saffari, S., Keyvanshokoh, S., Zakeri, M., Johari, S.A., Pasha-Zanoosi, H. 2016. Effects of different dietary selenium sources (sodium selenite, selenomethionine and nanoselenium) on growth performance, muscle composition, blood enzymes and antioxidant status of common carp (*cyprinus carpio*). *Aquaculture Nutrition*. 23(3): 611-617.
- Saravanan, M., Suganya, R., Ramesh, M., Poopal, R.K., Gopalan, N., Ponpandian, N. 2015. Iron oxide nanoparticles induced alterations in haematological, biochemical and ionoregulatory responses of Indian major carp *labeo rohita*. *Journal of Nanoparticle Research*. 17: 274.

- Saravanan, M., Karthika, S., Malarvizhi, A., Ramesh, M. 2011. Ecotoxicological impacts of clofibrac acid and diclofenac in common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings: hematological, biochemical, ionoregulatory and enzymological responses. *Journal of Hazardous Materials*. 195: 188-194.
- Saurabh, S., Sahoo, P.K. 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research*. 39: 223-239.
- Scrimshaw, N.S., San Giovanni, J.P. 1997. Synergism of nutrition, infection, and immunity: an overview. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 66: 464S-477S.
- Shaiu, S., Ning, Y. 2003. Non-ruminant nutrition, behaviour and production, estimation of dietary copper requirements of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Journal of Animal Science*. 77: 287-292.
- Shao, X.P., Liu, W.B., Xu, W.N., Lu, K.L., Xia, W., Jiang, Y.Y. 2010. Effects of dietary copper sources and levels on performance, copper status, plasma antioxidant activities and relative copper bioavailability in *Carassius auratus gibelio*. *Aquaculture*. 308: 60-65.
- Srivastava, P.K., Pandey, A.K. 2015. Role of Immunostimulants in immune responses of fish and shellfish. *Biochemical and Cellular Archives*. 15(1): 47-73.
- Sun, S., Qin, J., Yu, N., Ge, X., Jiang, H., Chen, L. 2013. Effect of dietary copper on the growth performance, non specific immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* of juvenile Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Fish and Shellfish Immunology*. 34(5): 1195-1201.
- Tacon, A.J. 1992. Nutritional fish pathology Morphological signs of nutrient deficiency and toxicity in farmed fish. *FAO Fish Technical Paper*. No. 330. P: 75.
- Tang, Q.Q., Feng, L., Jiang, W.D., Liu, Y., Jiang, J., Li, S.H., Kuang, S.Y., Tang, L., Zhou, X.Q. 2013. Effects of dietary copper on growth, digestive, and brush border enzyme activities and antioxidant defense of hepatopancreas and intestine for young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Biological Trace Element Research*. 155: 370-380.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 39: 44-84.
- Wang, T., Long, X., Cheng, Y., Liu, Z., Yan, S. 2015. A comparison effect of copper nanoparticles versus copper sulphate on juvenile *Epinephelus coioides* growth parameters, digestive enzymes, body composition, and histology as biomarker. *International Journal of Genomics*. 2015: 783021.
- Wang, Y., Xu, Z. 2006. Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. *Animal Feed Science and Technology*. 127: 283-292.
- Watanabe, T., Kiron, V., Satoh, S. 1997. Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture*. 151(1-4): 185-207.
- Zhang, J.X., Guo, L.Y., Feng, L., Jiang, W.D., Kuang, S.Y., Liu, Y., Hu, K., Jiang, J., Li, S.H., Tang, L., Zhou, X.Q. 2013. Soybean β -conglycinin induces inflammation and oxidation and causes dysfunction of intestinal digestion and absorption in fish. *Plos One*. 8(3): e58115.