



Investigating the individual and combined effects of Fluoxetine and Polystyrene micro/nanoplastics on hematological parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Hamid Reza Ranjbar¹, Kamran Rezaei Tavabe^{2✉}, Amin Gholamhosseini³, Sajjad Abbasi⁴, Behzad Shirkavand Hedavand⁵

1. Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. ranjbar.shilat88@gmail.com
2. Corresponding author, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. Email: krtavabe@ut.ac.ir
3. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran. Email: dra.gholamhosseini@yahoo.com
4. Department of Earth Sciences, Faculty of Geology, Shiraz University, Shiraz, Iran. Email: sajjad.abbasi.h@gmail.com
5. Department of Resin and Additives, Color and Polymer Research Center, Tehran, Iran. Email: shirkavand@icrc.ac.ir

Article Info

ABSTRACT

Article type:
Research Article

Article history:
Received 15 August 2025
Received 7 September 2025
Accepted 1 October 2025

Keywords:
Rainbow trout,
Pharmaceutical residue,
Nanoplastic,
Microplastic,
Hematology,
Synergistic toxicity.

Aquatic environments are increasingly affected by emerging contaminants, including pharmaceutical residues and plastic waste. Fluoxetine (FLX), a widely prescribed antidepressant, and polystyrene (PS-MNPs), among the most abundant persistent pollutants, pose significant threats to aquatic health due to their high stability and potential detrimental effects. Given that organisms in natural environments are rarely exposed to a single contaminant, this study was designed to evaluate the individual and combined toxicological effects of polystyrene nanoplastics (PS-NPs), microplastics (PS-MPs), and fluoxetine on hematological indices in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). For 28 days, juvenile trout were fed diets containing fluoxetine (6.7 mg/kg), PS-NPs (100 nm; at 500 and 1000 mg/kg), PS-MPs (7 µm; at 500 and 1000 mg/kg), and their combinations. Following the exposure period, blood samples were collected, and parameters including red blood cell (RBC), white blood cell (WBC), hematocrit (Hct), hemoglobin (Hb), and differential leukocyte count were measured. Results indicated that exposure to the contaminants, particularly in combined treatments, induced significant adverse effects on the hematological profile. RBC, Hb, and Hct showed significant decreases across most treatment groups compared with the control ($P < 0.05$). WBC increased significantly in the FLX and combined treatment groups, but no significant change was observed in the plastic-only groups ($P > 0.05$). Significant alterations in differential leukocyte counts were also recorded, including increased neutrophils and decreased lymphocytes, especially at the highest combined exposure dose ($P < 0.05$). This study demonstrates that FLX and PS-MNPs, both individually and in combination, disrupt the hematological health of fish. The observed changes indicate systemic physiological stress, impaired oxygen-carrying capacity, and immunomodulatory effects. These findings underscore the necessity for comprehensive ecological risk assessments that account for the complex interactions among emerging contaminants in aquatic ecosystems.

Cite this article: Ranjbar, H.R., Rezaei Tavabe, K., Gholamhosseini, A., Abbasi, S., & Shirkavand Hedavand, B. (2026). Investigating the individual and combined effects of Fluoxetine and Polystyrene micro/nanoplastics on hematological parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Aquaculture Sciences*, 14(1), 1-19.



EXTENDED ABSTRACT

Introduction

Aquatic ecosystems are increasingly exposed to emerging contaminants originating from anthropogenic activities, with pharmaceutical residues and plastic-derived particles considered major environmental threats. Fluoxetine (FLX), a widely prescribed selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) used as an antidepressant, is frequently detected in aquatic environments due to its extensive consumption and incomplete removal during wastewater treatment processes. Simultaneously, microplastics (MPs) and nanoplastics (NPs), particularly polystyrene (PS)-based particles, have become ubiquitous contaminants in freshwater and marine ecosystems. Their persistence, high bioavailability, and ability to interact with coexisting pollutants raise serious concerns about the health of aquatic organisms. While the independent toxicological profiles of these contaminants have been increasingly documented, aquatic organisms in their natural habitats are rarely exposed to single pollutants. This complex reality necessitates rigorous research into their combined synergistic or antagonistic effects for realistic environmental risk assessment. Hematological parameters are highly sensitive physiological biomarkers that provide invaluable data for evaluating animal welfare, identifying systemic stress, and monitoring immune system activation. Consequently, this study was designed to rigorously evaluate the independent and combined toxicological effects of dietary FLX and polystyrene micro- and nanoplastics on the systemic hematological indices of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

Material and Methods

Polystyrene particles with sizes of 100 nm (nanoplastics) and 7 μm (microplastics) were carefully characterized using scanning electron microscopy (SEM) and Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), confirming their spherical morphology, smooth surface structure, and chemical identity. The *in vivo* experimental trial utilized healthy juvenile rainbow trout with an average weight of 25.15 ± 0.51 g and length of 13.18 ± 0.83 cm. Following a standard 14-day acclimation period, the fish were randomly distributed across 36 fiberglass tanks (500 L capacity, maintaining 10 fish per tank), representing 12 distinct experimental groups in triplicate. Fish were exposed for 28 days to experimental diets uniformly supplemented with fluoxetine (6.7 mg kg^{-1} feed), polystyrene nanoplastics at concentrations of 500 and 1000 mg kg^{-1} feed, and polystyrene microplastics at 500 and 1000 mg kg^{-1} feed. Combined exposure groups included specific combinations of FLX with varying plastic sizes and concentrations. The fish were fed the experimental diets at 3% of their body weight twice daily. At the conclusion of the trial, blood samples were collected from the caudal vein following anesthesia with clove extract, utilizing lithium heparin as an anticoagulant. Hematological analyses included red blood cell count (RBC), white blood cell count (WBC), hematocrit percentage (Hct), hemoglobin concentration (Hb), and differential leukocyte counts (neutrophils, lymphocytes, monocytes, and eosinophils). Statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test at a significance level of $P < 0.05$.

Results

The comprehensive hematological analysis revealed that exposure to fluoxetine and polystyrene particles induced significant physiological disruptions, particularly under combined exposure conditions.

- **Erythrocytic Parameters:** Exposure to FLX and polystyrene particles resulted in a significant reduction in RBC counts across most treatment groups when compared to the control group, with the exception of the low-dose microplastic treatment ($P < 0.05$).
- Hematocrit percentages and hemoglobin concentrations similarly declined across all single and combined treatments containing the contaminants ($P < 0.05$).
- Crucially, the most severe and statistically significant reductions in RBC, Hct, and Hb were consistently observed in the combined treatment groups, particularly at higher plastic

concentrations combined with FLX. This indicates severe impairment of erythrocyte homeostasis and the induction of anemia-like conditions.

- **Leukocytic Parameters:** The total WBC counts indicated a pronounced immune response. While exposure to plastic particles alone did not induce marked leukocytosis, treatments containing FLX—both individually and in combinations—led to a significant elevation in total WBC counts ($P < 0.05$). The highest WBC levels were observed in fish receiving the combined low-dose nanoplastic and microplastic treatment together with fluoxetine.
- **Differential Leukocyte Count:** Combined exposures induced significant immunological alterations characterized by neutrophilia and lymphopenia. Specifically, the highest combined-exposure dose resulted in a significant increase in the percentage of neutrophils and a concurrent significant decrease in lymphocytes and monocytes compared with the control group ($P < 0.05$). Eosinophil percentages remained largely unaffected.

Discussion

The observed hematological alterations highlight profound systemic stress and physiological impairment. The uniform reduction in erythrocytic indices strongly suggests a compromised oxygen-carrying capacity, likely driven by contaminant-induced oxidative stress. Increased reactive oxygen species (ROS) production can disrupt the delicate balance between free radicals and the antioxidant defense system of red blood cells, culminating in severe cellular damage, eryptosis, and impaired hematopoiesis. Additionally, polystyrene microplastics have been implicated in physically damaging RBC membranes, precipitating hemolysis. The leukocytic response further underscores the immunotoxic nature of these agents. The distinct pattern of neutrophilia paired with lymphopenia is a classic biomarker of systemic physiological stress and acute inflammation, indicating activation of innate immune responses accompanied by suppression of adaptive components. Physiologically, Fluoxetine is known to modulate serotonergic pathways, which can actively inhibit lymphocyte proliferation and alter immune signaling. Simultaneously, the small size of micro- and nanoplastics enables penetration across biological barriers; their phagocytosis serves as a primary uptake pathway, activating the innate immune system and contributing to elevated neutrophil counts. Notably, the exacerbated toxicity observed in combined exposures points to additive or synergistic interactions. Micro- and nanoplastics may enhance the tissue distribution and bioavailability of Fluoxetine by acting as pollutant carriers, thereby intensifying toxic effects. Furthermore, simultaneous exposure to dual stressors may overwhelm antioxidant defense systems, resulting in cumulative homeostatic failure.

Conclusion

This research provides compelling evidence that Fluoxetine and polystyrene micro- and nanoplastics significantly compromise the hematological health of rainbow trout, acting as both individual toxicants and synergistic environmental stressors. The profound disruptions in oxygen transport capacity and the marked dysregulation of innate and adaptive immune responses highlight the sublethal, yet highly damaging, physiological effects of these emerging contaminants. Importantly, combined exposure led to the most severe physiological disturbances, underscoring the critical need to move beyond single-contaminant studies. Chronic exposure to such contaminant mixtures threatens to reduce disease resistance, impair metabolic performance, and compromise growth and reproductive success, posing substantial risks to aquaculture productivity and the sustainability of natural fish populations. To accurately safeguard commercially important aquatic species, future ecological risk assessments must incorporate the complex, multi-contaminant realities of natural environments and further investigate the underlying molecular mechanisms of these interactions.

بررسی اثرات مجزا و ترکیبی فلوکستین و ریزپلاستیک‌های پلی‌استایرن بر پارامترهای خون‌شناسی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

حمیدرضا رنجبر^۱، کامران رضایی توابع^۲✉، امین غلامحسینی^۳، سجاد عباسی^۴، بهزاد شیرکوند هداوند^۵

۱. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: ranjbar.shilat88@gmail.com

۲. نویسنده مسئول، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: krtavabe@ut.ac.ir

۳. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران. رایانامه: dra.gholamhosseini@yahoo.com

۴. گروه علوم زمین، دانشکده زمین‌شناسی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران. رایانامه: sajjad.abbasi.h@gmail.com

۵. گروه رزین و مواد افزودنی، پژوهشکده علوم رنگ و تکنولوژی، تهران، ایران. رایانامه: shirkavand@icrc.ac.ir

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:

مقاله پژوهشی،

تاریخچه مقاله:

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۵/۲۴

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۶/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۷/۰۹

کلیدواژه‌ها:

قزل‌آلای رنگین‌کمان،

پسماند دارویی،

نانوپلاستیک،

میکروپلاستیک،

هماتولوژی،

سمیت سینترژیستی.

محیط‌های آبی به‌طور فزاینده‌ای تحت تأثیر آلاینده‌های نوظهور نظیر پسماندهای پلاستیکی و دارویی قرار دارند. فلوکستین (FLX)، یک داروی ضدافسردگی پرمصرف، و ریزپلاستیک‌های پلی‌استایرن (PS)، از فراوان‌ترین آلاینده‌های پایدار، به‌دلیل پایداری بالا و اثرات بالقوه مخرب، تهدیدی جدی برای سلامت آبزیان محسوب می‌شوند. با توجه به اینکه ارگانسیم‌ها در محیط طبیعی به‌ندرت در معرض یک آلاینده منفرد قرار می‌گیرند، این مطالعه با هدف ارزیابی اثرات سم‌شناختی مجزا و ترکیبی نانوپلاستیک و میکروپلاستیک پلی‌استایرن و داروی فلوکستین بر شاخص‌های خون‌شناختی بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) طراحی گردید. بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌مدت ۲۸ روز با جیره‌های غذایی حاوی فلوکستین (۶/۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، نانوپلاستیک پلی‌استایرن (۱۰۰ نانومتر؛ در دو غلظت ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، میکروپلاستیک پلی‌استایرن (۷ میکرومتر؛ در دو غلظت ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و ترکیبات آنها تغذیه شدند. در پایان دوره، نمونه‌های خون جمع‌آوری و پارامترهایی شامل تعداد گلبول‌های قرمز (RBC)، تعداد گلبول‌های سفید (WBC)، درصد هماتوکریت (Hct)، غلظت هموگلوبین (Hb) و درصد افتراقی لکوسیت‌ها اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد که مواجهه با آلاینده‌ها، به‌ویژه در تیمارهای ترکیبی، اثرات نامطلوب معنی‌داری بر پروفایل خونی ماهیان داشت. تعداد گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت در بیشتر گروه‌های تیماری نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری یافتند ($P < 0.05$). تعداد گلبول‌های سفید در گروه فلوکستین و گروه‌های ترکیبی افزایش معنی‌داری نشان داد، اما در گروه‌های پلاستیک تغییر معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$). همچنین، تغییرات معنی‌داری در درصد افتراقی لکوسیت‌ها، شامل افزایش نوتروفیل‌ها و کاهش لنفوسیت‌ها، به‌ویژه در بالاترین دوز مواجهه ترکیبی، ثبت گردید ($P < 0.05$). این مطالعه نشان داد که فلوکستین و پلاستیک‌های پلی‌استایرن، هم به‌صورت مجزا و هم ترکیبی، سلامت خون‌شناختی ماهی را مختل می‌کنند. تغییرات مشاهده‌شده بیانگر بروز استرس فیزیولوژیک سیستمیک، اختلال در ظرفیت حمل اکسیژن و تعدیل پاسخ‌های ایمنی است. این یافته‌ها بر ضرورت ارزیابی جامع خطرات زیست‌محیطی با در نظر گرفتن تعاملات پیچیده میان آلاینده‌های نوظهور در اکوسیستم‌های آبی تأکید دارد.

استاد: رنجبر، حمیدرضا؛ رضایی توابع، کامران؛ غلامحسینی، امین؛ عباسی، سجاد؛ و شیرکوند هداوند، بهزاد (۱۴۰۵). بررسی اثرات مجزا و ترکیبی فلوکستین و ریزپلاستیک‌های پلی‌استایرن بر پارامترهای خون‌شناسی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). *علوم آبی‌پروری*، ۱۴(۱)، ۱-۱۹.



مقدمه

با پیشرفت روز افزون فناوری و توسعه شهرنشینی محیط‌های آبی به‌طور فزاینده‌ای تحت تأثیر آلاینده‌های نوظهور قرار گرفته‌اند که از جمله مهم‌ترین آنها می‌توان به پسماندهای پلاستیکی و دارویی اشاره کرد (Santos *et al.*, 2021). این آلاینده‌ها به‌دلیل حضور همزمان، استفاده گسترده، پایداری بالا و اثرات بالقوه مخرب بر اکوسیستم‌های آبی و سلامت آبزیان، مورد توجه قرار گرفته‌اند (Puckowski *et al.*, 2021). مطالعه همزمان این دو گروه از آلاینده‌ها در آبزیان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، زیرا آثار سینرژیستی (Synergistic) یا آنتاگونیستی (Antagonistic) بین آنها در مطالعات مجزا قابل تشخیص نیست.

امروزه ریزپلاستیک‌ها به‌عنوان یکی از فراوان‌ترین آلاینده‌های پایدار در کره زمین شناخته می‌شوند و افزایش حضور گسترده پسماندهای پلاستیکی در محیط‌های آبی نگرانی‌های قابل‌توجهی به‌دلیل تأثیرات مخرب آن بر اکوسیستم‌ها برانگیخته است (Hamed *et al.*, 2019). به‌دلیل اندازه کوچک، میکرو و نانوپلاستیک‌ها می‌توانند به‌صورت مستقیم یا از طریق زنجیره غذایی توسط ماهی‌ها بلعیده شوند (Gheorghie *et al.*, 2025). این بلعیدن می‌تواند نه تنها از نظر فیزیکی باعث انسداد دستگاه گوارش و آسیب‌های مکانیکی ناشی از تجمع شود (Jovanović, 2017)، بلکه از نظر رفتاری نیز بر الگوهای شنا، عادات تغذیه، توانایی‌های تولیدمثلی و فرآیندهای رشد تأثیر بگذارد (Wang *et al.*, 2020). علاوه بر این، ریزپلاستیک‌ها می‌توانند بر فیزیولوژی ماهیان تأثیر بگذارند و با افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، پاسخ استرس اکسیداتیو را تشدید کنند و همچنین پاسخ‌های ایمنی را به‌دلیل توانایی جذب آلاینده‌های محیطی اضافی که تجمع زیستی دارند، مختل کنند (Puckowski *et al.*, 2021; Ghosh, 2025).

پلی‌استایرن (Polystyrene) که از نظر شیمیایی در دسته ترکیبات پلاستیکی آروماتیک طبقه‌بندی و از طریق پلیمریزاسیون تولید می‌گردد؛ به‌دلیل هزینه کم، دوام و تنوع کاربردها، به‌طور گسترده در صنایع مختلفی از جمله عایق‌های حرارتی و صوتی، لوازم خانگی، قطعات خودرو، الکترونیک و اسباب‌بازی استفاده می‌شود (Arfin *et al.*, 2015). مشکل اصلی پلی‌استایرن در پایداری آن است، زیرا در محیط‌های طبیعی تجزیه فیزیکی و زیستی می‌شود، اما این فرآیند آنقدر کند است که به‌طور کلی غیرقابل تجزیه در نظر گرفته می‌شود (Ho *et al.*, 2018). Hollerova و همکاران (۲۰۲۳) نشان دادند که ریزپلاستیک‌های پلی‌استایرن می‌توانند سلامت ماهیان آب شیرین را تحت تأثیر قرار دهند و باعث آسیب‌های شدید در کبد و آبشش‌ها و همچنین تغییر رفتار ماهی شوند. تجمع پلی‌استایرن در بافت‌های ماهیان نظیر تیلاپپای نیل و مداکای ژاپنی می‌تواند منجر به اختلالات متابولیک و آسیب اکسیداتیو در اندام‌های هدف مانند روده، آبشش، کبد یا مغز شود (Ding *et al.*, 2018). یک مرور جامع از خطرات مرتبط با مواجهه با پلی‌استایرن در موجودات آبی نشان می‌دهد که ذرات پلی‌استایرن چه به‌صورت میکروپلاستیک (PS-MP) یا نانوپلاستیک (PS-NP) می‌توانند طیفی از اثرات سم‌شناسی را ایجاد کنند (Ding *et al.*, 2020). در سطح فردی، مواجهه با پلی‌استایرن می‌تواند رشد طبیعی بدن و عملکردهای تولیدمثلی را مختل کند (Assas *et al.*, 2020). در سطح سلولی، این مواجهه باعث تغییرات آسیب‌شناختی بافتی، آسیب DNA و آپوپتوز می‌شود و در سطح مولکولی، مواجهه با PS استرس اکسیداتیو، نوروٹوکسیسیته و ژنوتوکسیسیته را ایجاد می‌کند (Qiao *et al.*, 2022). از طرف دیگر، رشد سریع جمعیت، تشدید استرس، فشارهای روحی و افزایش اختلالات روانپزشکی منجر به تولید انبوه انواع ترکیبات دارویی ضد افسردگی شده است که به‌دلیل مدیریت نامناسب پسماند دارویی و کارایی محدود تصفیه‌خانه‌های فاضلاب در حذف متابولیت‌های فعال آنها به محیط‌زیست آبزیان راه پیدا می‌کنند (Montes-Grajales *et al.*, 2017; Visanji *et al.*, 2018). برخی از این آلاینده‌های دارویی، اگرچه در محیط با غلظت‌های پایین شناسایی می‌شوند، اما نشان داده شده است که حتی پس از قرار گرفتن کوتاه‌مدت، می‌توانند در ارگان‌های غیرهدف تأثیر بگذارند (Visanji *et al.*, 2018). فلوکستین که از اعضای مهارکننده‌های بازجذب انتخابی سروتونین (Selective serotonin reuptake inhibitor) است، امروزه یکی از داروهای ضد افسردگی پرکاربرد در جهان محسوب می‌شود (Kendrick, 2021). طبق گزارش‌های وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی ایران، میزان تجویز فلوکستین در ایران، با افزایشی خیره‌کننده، از ۴۵/۵

میلیون قرص در سال ۲۰۱۳ به حدود ۲۱۴ میلیون قرص در سال ۲۰۱۹ رسیده است که این رشد فزاینده در مصرف، به‌طور مستقیم به افزایش غلظت این دارو در محیط‌های آبی کشور منجر شده است (Golbaz *et al.*, 2023). مطالعات متعدد نشان می‌دهند مواجهه با فلوکستین می‌تواند موجب تغییر در سطوح مختلف زیستی از جمله رونویسی ژن، مارکرهای انتقال‌دهنده عصبی، فعالیت‌های آنزیمی (نظیر استرس اکسیداتیو و متابولیسم)، سطوح هورمونی، فرآیند تولیدمثل و تجمع در بافت‌های بدن که در نتیجه موجب تغییرات شدید در هیستولوژی اندام‌ها می‌شود، می‌گردد (Wong *et al.*, 2013; Theodoridi *et al.*, 2017; Mishra *et al.*, 2017; Pan *et al.*, 2018; Cunha *et al.*, 2018; de Farias *et al.*, 2019; Dorelle *et al.*, 2020). در حالی که تحقیقات موجود در مورد اثرات سم‌شناختی مجزای نانو/میکروپلاستیک‌ها و داروها رو به افزایش است، محیط‌های آبی به‌ندرت سناریوهای تک‌آلاینده‌ای را ارائه می‌دهند و ارگانیس‌ها معمولاً در معرض ترکیب پیچیده‌ای از آلاینده‌ها قرار می‌گیرند. بررسی شاخص‌های خونی اطلاعات ارزشمندی در مورد جنبه‌های فیزیولوژیک ارزیابی رفاه حیوانات، از جمله وضعیت فعال‌سازی سیستم‌های ایمنی و اثرات کوتاه‌مدت و بلندمدت شرایط نامساعد محیطی را ارائه می‌دهد (Seibel *et al.*, 2021). هموستاز ماهی‌ها در مواجهه با آلاینده‌های نوظهور دچار اختلال می‌شود و این امر باعث ایجاد یک سری مکانیسم‌های محافظتی مانند تغییر در پارامترهای خونی می‌گردد (Guerrera *et al.*, 2021). بنابراین، استفاده از شاخص‌های هماتولوژیک به‌عنوان نشانگرهای زیستی آزمایشگاهی می‌تواند در ارزیابی آثار آلاینده‌های پلاستیکی و دارویی در آبزیان مفید واقع گردد. این مطالعه با بررسی اثرات مجزا و ترکیبی این آلاینده‌های فراگیر بر خون‌شناسی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، داده‌های حیاتی را برای ارزیابی واقع‌بینانه‌تر خطرات زیست‌محیطی ارائه می‌دهد.

مواد و روش‌ها

تهیه ریزپلاستیک‌های پلی‌استایرن و مشخصه‌یابی: در این مطالعه از سوسپانسیون پلی‌استایرن با اندازه‌های ۱۰۰ نانومتر و ۷ میکرومتر (محصول موسسه تحقیقات رنگ، تهران، ایران) استفاده شد. سوسپانسیون در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری شد. قبل از هر بار استفاده، سوسپانسیون‌های میکرو/نانو پلی‌استایرن با دستگاه اولتراسونیک MSE PRO 3L CNC (فرکانس ۲۰ کیلوهرتز، توان ۱۳۰ وات، به‌مدت ۱۰ دقیقه؛ توسان، آریزونا، ایالات متحده) تیمار شد (Koelmans *et al.*, 2015). تا یکنواختی آن حفظ شده و توده‌های ذرات که ممکن است در طول نگهداری تشکیل شده باشند، از هم جدا شوند. اندازه و مورفولوژی پلاستیک با میکروسکوپ الکترونی روبشی PHILIPS-XL30 (Montgomeryville، پنسیلوانیا، ایالات متحده) تأیید شد. ماهیت شیمیایی ریزذرات پلاستیکی با استفاده از روش μ -FT-IR با دستگاه LabRAM Aramis IR2 (Horiba Scientific، کیوتو، ژاپن) تعیین شد.

ماهی و شرایط نگهداری: بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزن $25/15 \pm 0/51$ گرم و طول $13/18 \pm 0/83$ سانتی‌متر از یک مرکز معتبر تکثیر ماهیان سردآبی (سپیدان، فارس) خریداری و به آزمایشگاه تکثیر و پرورش آبزیان گروه بهداشت آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز انتقال داده شدند. پس از یک دوره سازگاری ۱۴ روزه، ماهی‌ها به‌صورت تصادفی بین ۳۶ تانک فایبرگلاس (۵۰۰ لیتر؛ ۱۰ ماهی در هر تانک)، شامل ۱۲ گروه آزمایشی در ۳ تکرار توزیع شدند (جدول ۱). شرایط کیفی آب شامل دمای 15 ± 1 درجه سلسیوس، اکسیژن محلول $6/5 \pm 0/5$ pH و TDS به‌ترتیب $7/2 \pm 0/2$ و $385/82 \pm 15/1$ میلی‌گرم بر لیتر بود. هر گروه دو بار در روز (ساعت ۸ صبح و ۵ بعدازظهر) به‌مدت ۲۸ روز با جیره‌های آزمایشی و به‌میزان ۳٪ وزن بدن تغذیه شدند. **آماده‌سازی جیره‌های آزمایشی:** خوراک پایه مورد استفاده در این پژوهش، جیره تجاری اکسترود قزل‌آلا بتا (مرحله رشد ۲، محصول شرکت بهسان تغذیه آریان، تهران) بود. برای آماده‌سازی سوسپانسیون‌های آزمایشی، نانوپلاستیک و میکروپلاستیک در آب دیونیزه به‌مدت ۱۲ دقیقه در حمام فراصوت سونیکه شدند تا پراکندگی یکنواختی حاصل شود.

جدول ۱- تیمار بندی گروه های آزمایشی مبتنی بر بکارگیری غلظت های مختلف فلوکستین، نانوپلاستیک و میکروپلاستیک

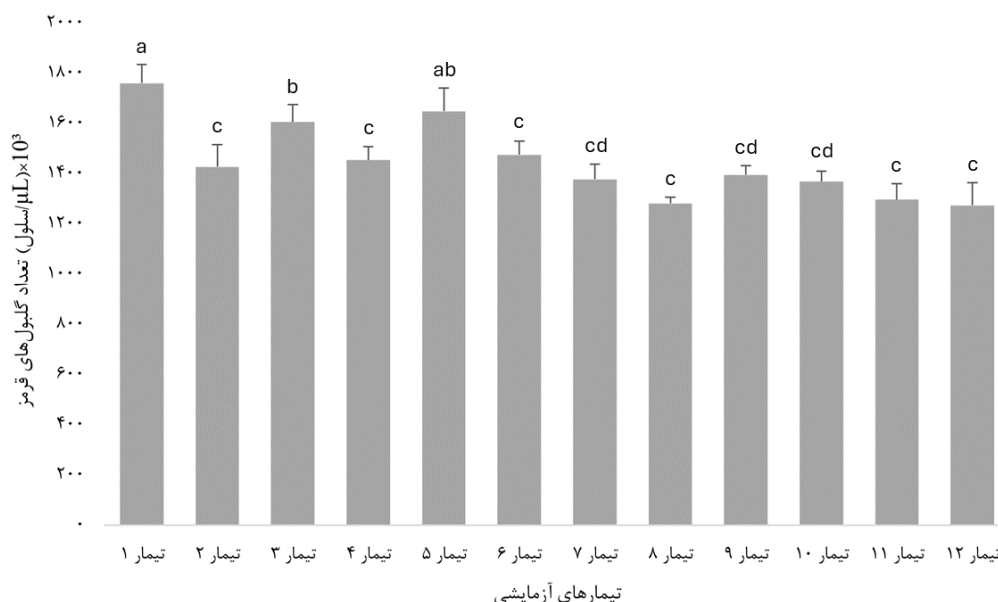
شرح تیمار	کد تیمار	غلظت (میلی گرم بر کیلوگرم)	زیرگروه	دسته اصلی
خوراک پایه	تیمار ۱	-	شاهد	گروه های کنترل
خوراک+فلوکستین	تیمار ۲	۶/۷	فلوکستین	
خوراک+نانو	تیمار ۳	۵۰۰	نانوپلاستیک	پلی استایرن (بدون فلوکستین)
	تیمار ۴	۱۰۰۰		
خوراک+میکرو	تیمار ۵	۵۰۰	میکروپلاستیک	
	تیمار ۶	۱۰۰۰		
خوراک+نانو+فلوکستین	تیمار ۷	۵۰۰	نانوپلاستیک	پلی استایرن (همراه با فلوکستین)
	تیمار ۸	۱۰۰۰		
خوراک+میکرو+فلوکستین	تیمار ۹	۵۰۰	میکروپلاستیک	
	تیمار ۱۰	۱۰۰۰		
خوراک+(میکرو+نانو)+فلوکستین	تیمار ۱۱	۵۰۰+۵۰۰	ترکیبی (میکرو+نانو)	
	تیمار ۱۲	۱۰۰۰+۱۰۰۰		

دوزهای پلی استایرن (۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم خوراک) به نحوی انتخاب شدند که مرگومیر ایجاد نکنند اما برای آشکارسازی پاسخ های فیزیولوژیک کافی باشند، این رویکرد با گزارش های عدم مرگومیر در مواجهه های آبی حاد با غلظت های بسیار بالاتر همخوان است (Ahmadifar et al., 2024; Mirzaei Nashtoroudi et al., 2023). فلوکستین هیدروکلراید (خلوص ۹۹/۳ درصد، محصول شرکت داروسازی جالینوس، تهران) تهیه و غلظت نهایی آن در جیره غذایی براساس مطالعه Vaclávik و همکاران (۲۰۲۲)، به میزان ۶/۷ میلی گرم بر کیلوگرم خوراک تعیین گردید. این غلظت خاص برای ایجاد و توصیف واضح اثرات سم شناختی و بررسی مکانیسم های تأثیر فلوکستین بر قزل آلائی رنگین کمان انتخاب شد.

برای افزودن ترکیبات به خوراک، ابتدا محلول استوک فلوکستین و سوسپانسیون های پلاستیک تهیه و سپس حجم مشخصی از آنها بر روی ۱ کیلوگرم از خوراک پایه اسپری و به طور کامل مخلوط گردید. به منظور پایداری تیمارها و ممانعت از آب شویی ریزپلاستیک و فلوکستین به محیط آبی، سطح تمام جیره ها با لایه ای از محلول ۱۲ درصد ژلاتین گاوی (Merck, Germany) پوشش داده شد (Mirzaei Nashtoroudi et al., 2023). جهت یکسان سازی کامل شرایط آزمایش، جیره گروه شاهد نیز با همین روش، تنها با آب دیونیزه و محلول ژلاتین تیمار گردید. سپس رژیم های غذایی در آن با دمای ۴۵ درجه سانتی گراد به مدت یک شب خشک شدند (Azarm-Karnagh et al., 2025).

فرآیند خونگیری، پردازش اولیه و آنالیزهای خون شناسی: در پایان دوره آزمایش، به منظور جمع آوری نمونه های خون، ۳ عدد بچه ماهی به صورت کاملاً تصادفی از هر تانک انتخاب شدند. تمامی مراحل کار با حیوانات آزمایشگاهی مطابق با اصول اخلاقی و استانداردهای تعیین شده انجام شد. جهت کاهش استرس ناشی از نمونه برداری، ماهیان در محلول بی حسی حاوی عصاره گل میخک با غلظت ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر قرار گرفتند. خونگیری از ورید ساقه دمی با استفاده از سرنگ های معمولی انجام شد. نمونه های خون به سرعت در ویال های حاوی ماده ضد انعقاد هپارین لیتيوم ریخته و به ملایمت مخلوط شد، سپس این نمونه ها بلافاصله برای انجام آنالیزهای خون شناختی مورد استفاده قرار گرفتند. پارامترهای خون شناختی شامل تعداد گلبول های قرمز (RBC)، تعداد گلبول های سفید (WBC)، درصد هماتوکریت (Hct)، غلظت هموگلوبین (Hb) و درصد افتراقی لکوسیت ها (مونوسیت ها، ائوزینوفیل ها، لنفوسیت ها و نوتروفیل ها) مطابق با دستورالعمل های استاندارد Feldman و همکاران (۲۰۰۰) اندازه گیری شدند.

براساس نتایج، مواجهه با فلوکستین و پلاستیک‌های پلی‌استایرن به‌طور کلی منجر به کاهش تعداد گلبول‌های قرمز شد (شکل ۳). تحلیل‌ها نشان داد که به‌جز تیمار میکروپلاستیک با غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم (تیمار ۵)، سایر تیمارها کاهش معنی‌داری در تعداد گلبول‌های قرمز در مقایسه با گروه شاهد ایجاد کردند ($P < 0.05$). شدیدترین کاهش در تیمارهای ترکیبی مشاهده شد؛ به‌طوری که کمترین میزان RBC در تیمار ترکیبی نانوپلاستیک ۱۰۰۰ به‌همراه فلوکستین (تیمار ۸) ثبت گردید.



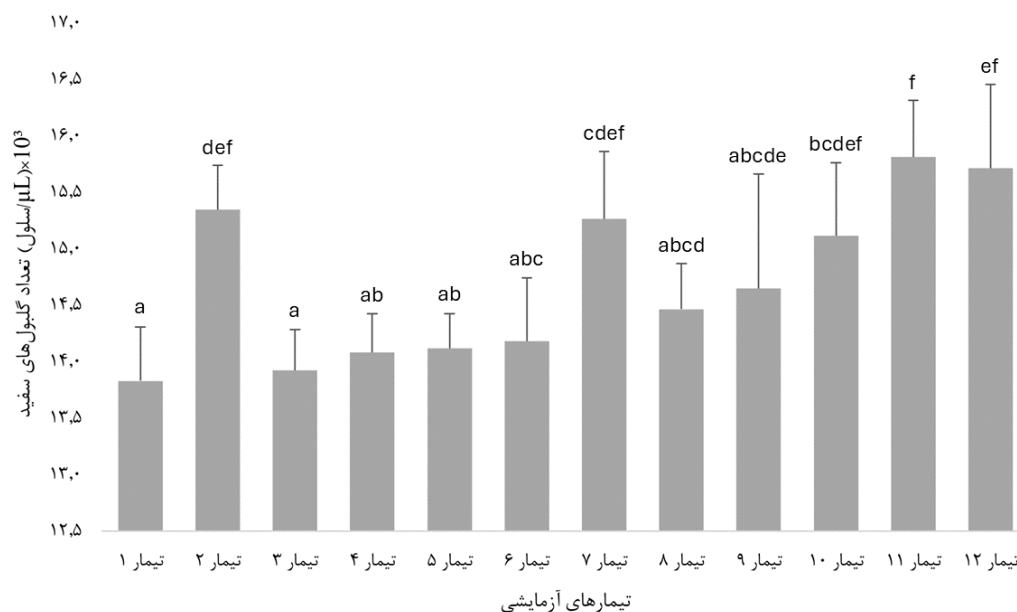
شکل ۳- میانگین تعداد گلبول‌های قرمز (RBC) ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بعد از مواجهه مجزا و ترکیبی با فلوکستین و میکروپلاستیک و نانوپلاستیک پلی‌استایرن (اعداد به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده است)

حروف متفاوت روی شکل نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار و حروف مشابه بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$)

تیمار ۱: خوراک پایه، تیمار ۲: فلوکستین، تیمار ۳: نانوپلاستیک ۵۰۰، تیمار ۴: نانوپلاستیک ۱۰۰۰، تیمار ۵: میکروپلاستیک ۵۰۰، تیمار ۶: میکروپلاستیک ۱۰۰۰، تیمار ۷: نانوپلاستیک ۵۰۰+فلوکستین، تیمار ۸: نانوپلاستیک ۱۰۰۰+فلوکستین، تیمار ۹: میکروپلاستیک ۵۰۰+فلوکستین، تیمار ۱۰: میکروپلاستیک ۱۰۰۰+فلوکستین، تیمار ۱۱: نانوپلاستیک ۵۰۰+میکروپلاستیک ۵۰۰+فلوکستین، تیمار ۱۲: نانوپلاستیک ۱۰۰۰+میکروپلاستیک ۱۰۰۰+فلوکستین

نتایج شمارش گلبول‌های سفید، بیانگر یک پاسخ ایمنی در ماهیان مواجهه یافته با فلوکستین بود (شکل ۴). براساس تحلیل‌ها، تیمارهای نانوپلاستیک و میکروپلاستیک فاقد فلوکستین در هر دو غلظت (تیمارهای ۳، ۴، ۵ و ۶) تفاوت آماری معنی‌داری با گروه شاهد نشان ندادند ($P > 0.05$). در مقابل، تیمار فلوکستین (تیمار ۲) و همچنین برخی تیمارهای ترکیبی (تیمارهای ۷، ۱۰ و ۱۱) منجر به افزایش معنی‌دار تعداد گلبول‌های سفید در مقایسه با گروه شاهد شدند ($P < 0.05$). بیشترین میزان افزایش WBC در تیمار ترکیبی نانو و میکروپلاستیک ۵۰۰ با فلوکستین (تیمار ۱۱) مشاهده شد.

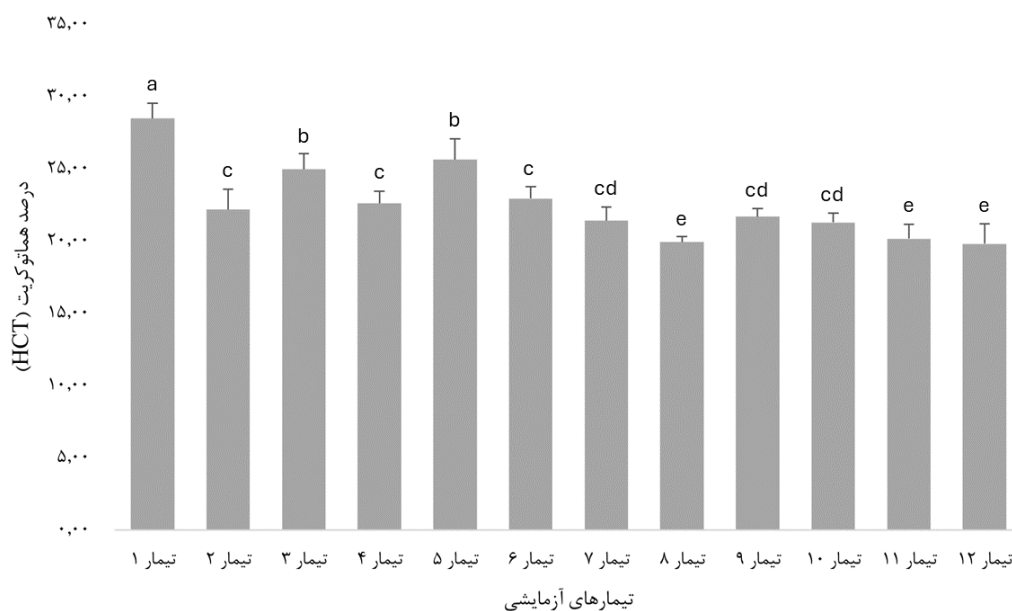
غلظت هموگلوبین (Hb) شاخصی کلیدی در بررسی وضعیت اکسیژن‌رسانی و متابولیک ماهی است (شکل ۶). نتایج نشان داد که تمامی تیمارهای دارای فلوکستین، منجر به کاهش معنی‌دار این شاخص در مقایسه با گروه شاهد شدند ($P < 0.05$). شدت کاهش Hb در تیمارهای ترکیبی به‌مراتب بیشتر بود. کمترین مقادیر همگلوبین در تیمار ترکیبی نانو و میکروپلاستیک ۱۰۰۰ با فلوکستین (تیمار ۱۲) مشاهده گردید. درصد هماتوکریت، به‌عنوان شاخصی از حجم گلبول‌های قرمز خون، در تمامی تیمارها کاهش یافت (شکل ۵). نتایج به‌وضوح نشان داد که تمامی تیمارها، اعم از فلوکستین، نانوپلاستیک‌ها، میکروپلاستیک‌ها و کلیه ترکیبات آنها، منجر به کاهش معنی‌دار این شاخص در مقایسه با گروه شاهد شدند ($P < 0.05$). شدت کاهش Hct در تیمارهای ترکیبی به‌مراتب بیشتر بود. کمترین مقادیر هماتوکریت در تیمار ترکیبی نانوپلاستیک ۱۰۰۰ به‌همراه فلوکستین (تیمار ۸) و تیمار ترکیبی نانو و میکروپلاستیک ۱۰۰۰ با فلوکستین (تیمار ۱۲) مشاهده گردید.



شکل ۴- میانگین تعداد گلبول‌های سفید (WBC) ماهی قزل‌آلای رنگین کمان بعد از مواجهه مجزا و ترکیبی با فلوکستین و میکروپلاستیک و نانوپلاستیک پلی‌استایرن (اعداد به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده است)

حروف متفاوت روی شکل نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار و حروف مشابه بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$)

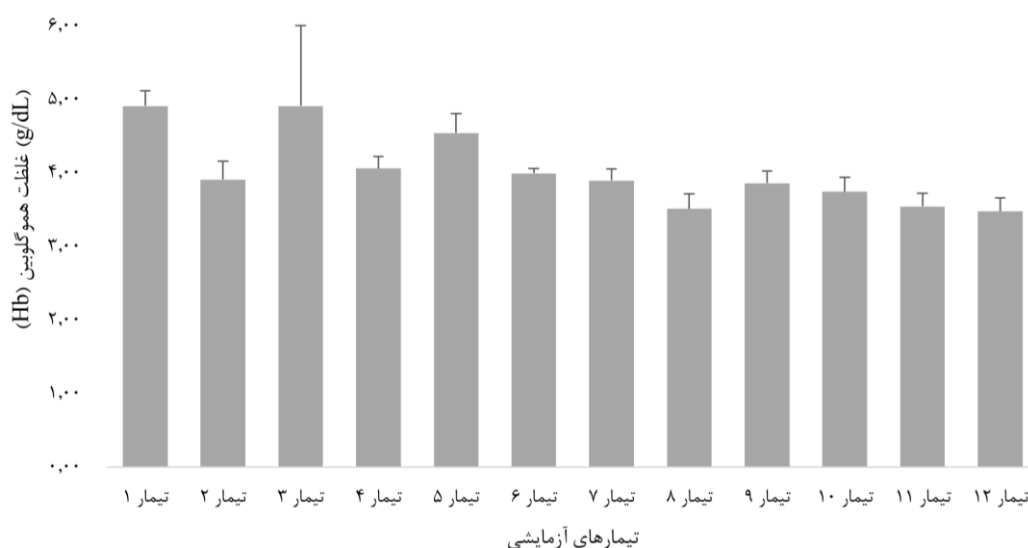
تیمار ۱: خوراک پایه، تیمار ۲: فلوکستین، تیمار ۳: نانوپلاستیک ۵۰۰، تیمار ۴: نانوپلاستیک ۱۰۰۰، تیمار ۵: میکروپلاستیک ۵۰۰، تیمار ۶: میکروپلاستیک ۱۰۰۰، تیمار ۷: نانوپلاستیک ۵۰۰+فلوکستین، تیمار ۸: نانوپلاستیک ۱۰۰۰+فلوکستین، تیمار ۹: میکروپلاستیک ۵۰۰+فلوکستین، تیمار ۱۰: میکروپلاستیک ۱۰۰۰+فلوکستین، تیمار ۱۱: نانوپلاستیک ۵۰۰+میکروپلاستیک ۵۰۰+فلوکستین، تیمار ۱۲: نانوپلاستیک ۱۰۰۰+میکروپلاستیک ۱۰۰۰+فلوکستین



شکل ۵- میانگین درصد هماتوکریت (Hct) ماهی قزل‌آلای رنگین کمان بعد از مواجهه مجزا و ترکیبی با فلوکستین و میکروپلاستیک و نانوپلاستیک پلی‌استایرن (اعداد به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده است)

حروف متفاوت روی شکل نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار و حروف مشابه بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$)

تیمار ۱: خوراک پایه، تیمار ۲: فلوکستین، تیمار ۳: نانوپلاستیک ۵۰۰، تیمار ۴: نانوپلاستیک ۱۰۰۰، تیمار ۵: میکروپلاستیک ۵۰۰، تیمار ۶: میکروپلاستیک ۱۰۰۰، تیمار ۷: نانوپلاستیک ۵۰۰+فلوکستین، تیمار ۸: نانوپلاستیک ۱۰۰۰+فلوکستین، تیمار ۹: میکروپلاستیک ۵۰۰+فلوکستین، تیمار ۱۰: میکروپلاستیک ۱۰۰۰+فلوکستین، تیمار ۱۱: نانوپلاستیک ۵۰۰+میکروپلاستیک ۵۰۰+فلوکستین، تیمار ۱۲: نانوپلاستیک ۱۰۰۰+میکروپلاستیک ۱۰۰۰+فلوکستین



شکل ۶- میانگین غلظت هموگلوبین (Hb) ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بعد از مواجهه مجزا و ترکیبی با فلوکستین و میکروپلاستیک و نانوپلاستیک پلی‌استایرن (اعداد به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده است)

حروف متفاوت روی شکل نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار و حروف مشابه بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$)
 تیمار ۱: خوراک پایه، تیمار ۲: فلوکستین، تیمار ۳: نانوپلاستیک ۵۰۰، تیمار ۴: نانوپلاستیک ۱۰۰۰، تیمار ۵: میکروپلاستیک ۵۰۰، تیمار ۶: میکروپلاستیک ۱۰۰۰، تیمار ۷: نانوپلاستیک ۵۰۰+فلوکستین، تیمار ۸: نانوپلاستیک ۱۰۰۰+فلوکستین، تیمار ۹: میکروپلاستیک ۵۰۰+فلوکستین، تیمار ۱۰: میکروپلاستیک ۱۰۰۰+فلوکستین، تیمار ۱۱: نانوپلاستیک ۵۰۰+میکروپلاستیک ۵۰۰+فلوکستین، تیمار ۱۲: نانوپلاستیک ۱۰۰۰+میکروپلاستیک ۱۰۰۰+فلوکستین

نتایج حاصل از تحلیل آماری شمارش افتراقی لوکوسیت‌های خون نشان داد که مواجهه ترکیبی تأثیرات معنی‌داری بر درصد نوتروفیل‌ها، لنفوسیت‌ها و مونوسیت‌ها داشته است ($P < 0.05$). در مقابل، تغییرات در درصد ائوزینوفیل‌ها از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P > 0.05$) (جدول ۲). درصد نوتروفیل‌ها در گروه دریافت‌کننده ترکیب نانو و میکروپلاستیک ۱۰۰۰ با فلوکستین (تیمار ۱۲) به‌طور معنی‌داری از گروه کنترل و همچنین گروه‌های حاوی دوزهای پایین‌تر نانوپلاستیک بالاتر بود ($P < 0.05$). با این حال، سایر گروه‌های آزمایشی نیز در مقایسه با گروه کنترل، افزایش را در درصد نوتروفیل‌ها نشان دادند، اما این تفاوت‌ها در همه موارد معنی‌دار نبود. همچنین درصد لنفوسیت‌ها در گروه با بالاترین دوز مواجهه ترکیبی (تیمار ۱۲)، بیشترین کاهش معنی‌دار نسبت به گروه کنترل داشته است ($P < 0.05$). درصد مونوسیت‌ها در همین گروه، کمترین مقدار را در میان تمام گروه‌های آزمایشی نشان داد ($P < 0.05$).

بحث

امروزه بخش رو به رشدی از تحقیقات روی ماهیان تجاری بر رفاه حیوان متمرکز شده است که شامل بهینه‌سازی شرایط پرورشی و اجتناب از استرس می‌شود (Lugert et al., 2020). در همین راستا، مطالعات متعدد تأکید کرده‌اند که ورود آلاینده‌های نوظهور به بدن ماهی موجب اختلالات متعدد در عملکرد سیستم ایمنی بدن به‌ویژه شاخص‌های خونی می‌گردد (Impellitteri et al., 2023; Li et al., 2024). از این رو، پارامترهای هماتولوژیک می‌توانند به‌عنوان نشانگر اختلالات محیطی انسان ساخت و شرایط چالش‌برانگیز مرتبط با آبی‌پروری مورد بررسی قرار گیرند (Seibel et al., 2021). مقادیر این پارامترهای خونی اطلاعات ارزشمندی در مورد فرآیندهای مرتبط با استرس در بدن ماهی ارائه می‌دهند و در ارزیابی اثرات مضر آلودگی‌های انسانی بر محیط‌های آبی و آبی‌پروری از اهمیت بالایی برخوردارند (Bojarski et al., 2025).

جدول ۲- تغییرات درصد افتراقی لوکوسیت‌ها در قزل‌آلای رنگین کمان تیمار شده با فلوکستین، نانوپلاستیک و میکروپلاستیک پلی‌استایرن

گروه ها	میانگین \pm انحراف معیار		
	نوتروفیل ها	لنفوسیت ها	مونوسیت ها
تیمار ۱	۱۸/۰۰ \pm ۲/۶۱ ^a	۷۹/۶۷ \pm ۳/۲۷ ^a	۲/۰۰ \pm ۱/۷۹ ^a
تیمار ۲	۲۱/۸۳ \pm ۱/۷۳ ^{cd}	۷۸/۱۷ \pm ۱/۷۳ ^{ab}	۱/۵۰ \pm ۱/۶۴ ^{ab}
تیمار ۳	۲۰/۱۷ \pm ۰/۴۱ ^{abc}	۷۸/۸۳ \pm ۱/۱۷ ^{ab}	۰/۸۳ \pm ۰/۷۵ ^{ab}
تیمار ۴	۲۱/۳۳ \pm ۰/۸۳ ^{cd}	۷۷/۸۳ \pm ۰/۷۵ ^{ab}	۰/۶۷ \pm ۰/۸۲ ^{ab}
تیمار ۵	۱۸/۵۰ \pm ۱/۰۵ ^a	۷۹/۶۷ \pm ۱/۰۳ ^a	۱/۶۷ \pm ۰/۵۲ ^{ab}
تیمار ۶	۱۸/۸۳ \pm ۰/۷۵ ^{ab}	۷۹/۳۳ \pm ۱/۰۳ ^{ab}	۱/۸۳ \pm ۰/۴۱ ^{ab}
تیمار ۷	۲۱/۱۷ \pm ۰/۷۵ ^{bcd}	۷۷/۶۷ \pm ۰/۵۲ ^{ab}	۱/۰۰ \pm ۰/۶۳ ^{ab}
تیمار ۸	۲۱/۰۰ \pm ۱/۲۶ ^{bcd}	۷۷/۸۳ \pm ۱/۷۳ ^{ab}	۱/۰۰ \pm ۰/۶۳ ^{ab}
تیمار ۹	۲۰/۳۳ \pm ۱/۰۳ ^{abc}	۷۸/۸۳ \pm ۰/۹۸ ^{ab}	۰/۶۷ \pm ۰/۸۲ ^{ab}
تیمار ۱۰	۲۱/۱۷ \pm ۱/۴۷ ^{bcd}	۷۷/۸۳ \pm ۱/۴۷ ^{ab}	۱/۳۳ \pm ۰/۵۲ ^{ab}
تیمار ۱۱	۲۱/۰۰ \pm ۰/۶۳ ^{bcd}	۷۷/۱۷ \pm ۱/۱۷ ^{ab}	۱/۵۰ \pm ۰/۵۵ ^{ab}
تیمار ۱۲	۲۳/۱۷ \pm ۰/۹۸ ^d	۷۶/۵۰ \pm ۱/۲۳ ^b	۰/۱۷ \pm ۰/۴۱ ^b

مقادیر با حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری در سطح ($P < 0.05$) است.

یافته‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهد که مواجهه با فلوکستین منجر به تغییرات معنی‌داری در شاخص‌های خونی، شامل کاهش تعداد گلبول‌های قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین و در مقابل، افزایش گلبول‌های سفید و نوتروفیل‌ها می‌شود. این الگو مشاهدات پیشین در خصوص اثرات فلوکستین بر پارامترهای هماتولوژیک زبرافیش و تیلاپیا را تأیید و تقویت می‌کند (Vijitkul *et al.*, 2022; Orozco-Hernández *et al.*, 2023). به‌طور خاص، الگوی افزایش نسبت نوتروفیل به لنفوسیت، که در تحقیقی روی قزل‌آلای رنگین کمان نیز گزارش شده است (Vaclavik *et al.*, 2022)، یک نشانگر کلاسیک از پاسخ به استرس و التهاب محسوب می‌شود. مکانیسم این پدیده، از طریق تأثیر بر مسیرهای سروتونرژیک و تعدیل سطح سروتونین، تکثیر و عملکرد لنفوسیت‌ها را مهار می‌کند (Di Rosso *et al.*, 2016). و منجر به کاهش فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی (NK cells) می‌شود (Pellegrino and Bayer, 2002). در بی‌مهرگان آبی مانند کلم خونی (*Tegillarca granosa*) نیز، فلوکستین با کاهش زیست‌پذیری هموسیت‌ها و مهار مسیر سیگنالینگ NF- κ B، پاسخ ایمنی را سرکوب کرده است (Shi *et al.*, 2019). یافته‌های این مطالعات فرضیه سرکوب سیستم ایمنی ناشی از مواجهه با داروهای ضدافسردگی را، آن‌گونه که توسط Gobin و همکاران (۲۰۱۴) مطرح شده، به‌خوبی پشتیبانی می‌کند. به‌نظر می‌رسد در کاهش مشاهده‌شده در شاخص‌های اریتروسیتی (Hb، RBC) و Hct استرس اکسیداتیو القاشده توسط فلوکستین نقش محوری ایفا می‌کند. آلاینده‌ها و عوامل استرس‌زا می‌توانند تعادل میان رادیکال‌های آزاد و سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی گلبول‌های قرمز را برهم زنند (Osman *et al.*, 2018; Yazdanbakhsh *et al.*, 2024). این عدم تعادل منجر به آسیب سلولی و فعال‌سازی مرگ برنامه‌ریزی‌شده گلبول‌های قرمز یا ارپتوز (Eryptosis) می‌شود (Orozco-Hernández *et al.*, 2023). در همین راستا، مطالعات متعدد، افزایش استرس اکسیداتیو در ماهی *D. rerio* و بروز آسیب‌های ژنتیکی-سلولی مانند افزایش ریزهسته‌ها (Micronuclei) و ناهنجاری‌های هسته‌ای در گلبول‌های قرمز ماهی تیلاپیا پس از مواجهه با فلوکستین را اثبات کرده‌اند (Orozco-Hernández *et al.*, 2022; Vijitkul *et al.*, 2022). این آسیب‌ها نه‌تنها مورفولوژی سلول را تغییر می‌دهند، بلکه به کاهش جمعیت گلبول‌های قرمز بالغ نیز منجر می‌شوند. افزون بر این، ضایعات بافت‌شناسی گزارش شده در کلیه‌ها به‌عنوان یکی از ارگان‌های اصلی خونساز در ماهیان در اثر مواجهه با فلوکستین (Rezaei-pour *et al.*, 2024)، می‌تواند یکی دیگر از دلایل کاهش تولید و در نتیجه افت شاخص‌های اریتروسیتی باشد. در نتیجه، داده‌های حاصل از این تحقیق، در کنار شواهد موجود در پیشینه علمی، به‌روشنی نشان می‌دهد که فلوکستین به‌عنوان یک عامل استرس‌زای

فیزیولوژیک قدرتمند عمل کرده و از طریق دو مسیر اصلی، تضعیف پاسخ ایمنی سلولی و القای استرس اکسیداتیو منجر به تخریب اریتروسیت‌ها، سلامت هماتولوژیک آبزیان را به مخاطره می‌اندازد.

ریزپلاستیک‌ها به‌عنوان آلاینده‌هایی با پتانسیل سمی قابل توجه، توانایی تغییر پارامترهای هماتولوژیک را در ماهیان دارند (Rashid *et al.*, 2024). یافته‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهد که مواجهه با ریزپلاستیک‌های پلی‌استایرن منجر به تغییرات معنی‌داری در شاخص‌های خونی ماهیان مورد بررسی گردید. به‌طور مشخص، کاهش در تعداد گلبول‌های قرمز و هماتوکریت، همراه با کاهش نسبت لنفوسیت‌ها و مونوسیت‌ها و افزایش نوتروفیل‌ها، یک الگوی هماتولوژیک مشخص را به تصویر می‌کشد. این الگو با یافته‌های پیشین از تغییرات خون‌شناختی در گونه‌های ماهی نظیر *Labeo rohita* و *Hypophthalmichthys molitrix* (Zaman *et al.*, 2024; Rashid *et al.*, 2025) هم‌چنین Vineetha و همکاران (۲۰۲۴) گزارش کردند که مواجهه با غلظت‌های محیطی پلی‌استایرن می‌تواند به کاهش پارامترهای خون‌شناختی (WBC و RBC، Hb) و افزایش ترومبوسیت‌ها منجر شود که این تغییرات با شرایط التهابی و احتمال نارسایی اندام‌ها مرتبط است. در همین راستا، مطالعات نشان داده‌اند که نانوذرات پلی‌استایرن می‌تواند با القای استرس اکسیداتیو، افزایش ROS و تغییر در بیومارکرهای استرس مانند کورتیزول و گلوکز، تأثیرات منفی و وابسته به دوز بر سلامت عمومی ماهی اعمال کند (Hollerova *et al.*, 2023; Mirzaei Nashtoroudi *et al.*, 2025); این شواهد با تغییرات خون‌شناختی مشاهده‌شده در مطالعه حاضر هم‌سو است.

از نظر مکانیسم‌های احتمالی دخیل در تغییرات پروفایل خون، Kim و Choi (۲۰۲۳) نشان داده‌اند که میکروپلاستیک‌ها می‌توانند به‌صورت فیزیکی به غشای گلبول‌های قرمز آسیب رسانده و منجر به همولیز شوند؛ در نتیجه، تخریب سلول‌های قرمز خون ناشی از سمیت پلاستیکی می‌تواند زمینه‌ساز کم‌خونی در ماهی گردد. به‌علاوه، تغییر در جمعیت سلول‌های سفید خونی را می‌توان به پاسخ‌های ایمنی سلولی نسبت داد. در سیستم ایمنی ماهی، فاگوسیت‌های حرفه‌ای و لنفوسیت‌های B قادر به درونی‌سازی ذرات با اندازه ۰/۵ تا ۱۰ میکرومتر هستند (Wu *et al.*, 2024)، که می‌تواند توضیح‌دهنده افزایش نسبی سلول‌های فاگوسیتیک (نوتروفیل‌ها/هتروفیل‌ها) و کاهش سلول‌های تک‌هسته‌ای باشد. در این چارچوب، فاگوسیتوز به‌عنوان مسیر مهم جذب برای میکرو/نانوپلاستیک‌ها (MNPs) مطرح است و می‌تواند به فعال‌سازی سیستم ایمنی ذاتی و تغییر در توزیع لکوسیتی منجر شود (Zwollo *et al.*, 2021). با این حال، ناسازگاری‌هایی میان نتایج مطالعات مختلف وجود دارد که شایسته توجه است. برای مثال، Brandts و همکاران (۲۰۲۵) در مواجهه آبی ۹۶ ساعته با PS-NPs (100 µg/L, 44 nm) در قزل‌آلای رنگین‌کمان هیچ تغییر مشخصی در پارامترهای اصلی خون‌شناسی گزارش نکردند؛ همین‌طور Mehri و همکاران (۲۰۲۱) در ماهی کپور معمولی نیز تفاوت معنی‌داری در شاخص‌های گلبول قرمز نیافتند، اگرچه افزایش شمار گلبول‌های سفید در بالاترین غلظت (1 mL/Kg) مشاهده شد. این ناهمخوانی در نتایج، اهمیت توجه به متغیرهای آزمایشگاهی را برجسته می‌سازد. عواملی نظیر گونه، سن و جنسیت ماهی، روش تجویز آلاینده (آبی یا خوراکی)، مدت زمان مواجهه (حاد یا مزمن) و به‌ویژه اندازه، غلظت و خواص فیزیکوشیمیایی ذرات پلاستیکی، همگی بر فراهمی زیستی و سمیت آنها تأثیرگذار بوده و می‌توانند منجر به بروز نتایج متفاوت شوند.

تغییرات خون‌شناختی مشاهده‌شده در این پژوهش، زمانی که در کنار سایر شواهد مبنی بر آسیب‌های بافتی، تغییرات بیوشیمیایی، استرس اکسیداتیو و حتی آسیب DNA قرار می‌گیرند (Nugnes *et al.*, 2022; Azarm-Karnagh *et al.*, 2025; Brandts *et al.*, 2025; Gheorghe *et al.*, 2025; Ma *et al.*, 2025)، این فرضیه را تقویت می‌کند که ریزپلاستیک‌های پلی‌استایرن سمیتی سیستمیک اعمال می‌کنند که فراتر از انسداد فیزیکی صرف است. خواص نانومقیاس این ذرات به آنها اجازه می‌دهد از سدهای بیولوژیک عبور کرده، در فرآیندهای بنیادین سلولی تداخل ایجاد کنند و پاسخ‌های استرس فراگیری را القا نمایند که تغییرات پروفایل خونی، یکی از بهترین نشانگرهای این تنش سیستمیک است.

تحقیقات اخیر نشان می‌دهند که ریزپلاستیک‌ها می‌توانند سمیت ترکیبات دارویی را تغییر دهند (Almeida *et al.*, 2019) و با توجه به اینکه موجودات آبی معمولاً هم‌زمان در معرض چندین آلاینده قرار می‌گیرند، درک نقش ریزذرات در زیست‌فراهمی و

اثرات بیولوژیکی داروها از اهمیت بالایی برخوردار است (Brandts *et al.*, 2018). با این حال، پژوهش‌هایی که به‌طور مشخص مواجهه مشترک آلاینده‌های دارویی و پلاستیکی را بر شاخص‌های فیزیولوژیک کلیدی مانند پارامترهای خون‌شناسی بررسی کنند، بسیار محدود و کمیاب هستند. اگرچه برخی مطالعات به‌صورت کلی به تعاملات این مواد در زنجیره غذایی اشاره کرده‌اند (Aib *et al.*, 2025)، مطالعه حاضر، نخستین گزارشی است که به‌طور همزمان اثرات فلوکستین و پلی‌استایرن را بر شاخص‌های هماتولوژیک قزل‌آلای رنگین‌کمان بررسی می‌کند و بدین‌سان خلأ قابل توجهی در ادبیات مربوط به مواجهه ترکیبی آلاینده‌های دارویی و پلاستیکی را پر می‌سازد.

نتایج پژوهش حاضر به‌وضوح نشان می‌دهد که مواجهه‌های ترکیبی، به‌ویژه در غلظت‌های بالای ریزپلاستیک، شدیدترین کاهش‌ها را در Hct، RBC و Hb به‌همراه داشت و تغییرات برجسته‌تری را در مؤلفه‌های WBC و افتراق لکوسیته (کاهش لنفوسیت‌ها، افزایش نوتروفیل‌ها) نسبت به مواجهه‌های منفرد ایجاد کرد. یافته‌های ما در چارچوب شواهد فزاینده‌ای قرار می‌گیرند که نشان می‌دهد پلی‌استایرن می‌تواند با سایر آلاینده‌ها تعامل نموده و فرآیندهای انباشت، دگرگونی زیستی (Biotransformation) و در نهایت سمیت را در ماهیان تغییر دهد (Yan *et al.*, 2024). به‌عنوان مثال، نتایج پژوهش روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان می‌دهد که میکروپلاستیک پلی‌استایرن نه تنها به‌صورت مجزا منجر به مسمومیت می‌شوند، بلکه در مواجهه همزمان اثرات مضر آفت‌کش کلریپرفوس را نیز تشدید می‌کند (Karbalaei *et al.*, 2021). مطالعه دیگری نشان داد پلی‌استایرن به‌تنهایی و به‌ویژه در ترکیب با داروی جم‌فیروزیل باعث افزایش مرگ‌ومیر و کاهش اندازه لاروهای صدف خلیج شده؛ علاوه بر این، نقش حمل‌کنندگی میکروپلاستیک‌ها عملکرد مرگ‌ومیر را تشدید و شاخص لیبیدی لاروها را به‌طور چشمگیری کاهش داده است (Major *et al.*, 2025). در مقابل، Schmieg و همکاران (۲۰۲۰) دریافتند که میکروپلاستیک‌ها اثر داروی آمی‌تریپتیلین را بر شاخص‌های فیزیولوژیک اصلی در قزل‌آلای قهوه‌ای (*Salmo trutta f. fario*) تغییر ندادند، هرچند بر رشد و رفتار تأثیرگذار بودند. همچنین، اخیراً مطالعه‌ای دیگر نشان داد که نانوپلی‌استایرن، جذب تریکلوزان توسط گونه *Aphanius hormuzensis* را تسهیل یا مهار نمی‌کند (Saemi-Komsari *et al.*, 2023). این شواهد متناقض نشان می‌دهد ماهیت این تعاملات بسیار پیچیده است و نتایج به نوع آلاینده، نحوه تجویز، سایز ذرات و گونه هدف بستگی دارد.

از منظر مکانیسم‌های اثر سمیت آلاینده‌ها، کاهش‌های همزمان در پارامترهای هماتولوژیک و تغییر در پروفایل لکوسیته در تیمارهای ترکیبی می‌تواند ناشی از چند مسیر فیزیولوژیکی همپوشان باشد: (۱) افزایش زیست‌دسترس‌پذیری و توزیع بافتی فلوکستین در حضور ذرات پلی‌استایرن که ممکن است سمیت سیستمیک دارو را تشدید کند؛ (۲) اثرات مستقیم نانو/میکروپلاستیک‌ها بر غشاهای سلول‌های خونی که با القای استرس اکسیداتیو و همولیز همراه است؛ و (۳) بار فیزیولوژیک تجمعی حاصل از قرار گرفتن همزمان در معرض دو عامل استرس‌زای مستقل که مکانیسم‌های هموستاتیک و ایمنی را تحت‌الشعاع قرار می‌دهد (Aib *et al.*, 2025; Sun *et al.*, 2023). این سازوکارها همراستا با مشاهدات ما از لنفوپنی و نوتروفیلی در تیمارهای ترکیبی است و می‌تواند نشان‌دهنده سمیت هم‌افزایی یا اثر تجمعی این آلاینده‌ها باشد. این تشدید سمیت در شرایط مواجهه ترکیبی آلاینده‌های نوظهور یک یافته حیاتی برای ارزیابی خطر زیست‌محیطی در تأسیسات آبی پروری و اکوسیستم‌های آبی است.

نتیجه‌گیری

این مطالعه شواهدی را ارائه می‌دهد که فلوکستین و پلی‌استایرن، هم به‌صورت مجزا و هم ترکیبی، اثرات نامطلوب معنی‌داری بر سلامت خون‌شناختی بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان اعمال می‌کنند. کاهش مشاهده شده در شاخص‌های گلبول‌های قرمز (RBC، Hct و Hb) نشان‌دهنده تضعیف ظرفیت حمل اکسیژن و به‌خطر افتادن سلامت متابولیکی ماهی است. همزمان، تغییر در پروفایل لکوسیته، به‌ویژه الگوی لنفوپنی (کاهش لنفوسیت‌ها) و نوتروفیلی (افزایش نوتروفیل‌ها)، یک نشانگر کلاسیک از پاسخ استرس فیزیولوژیک و تغییر در وضعیت ایمنی ذاتی و اکتسابی ماهی محسوب می‌شود. مهم‌ترین یافته این مطالعه، تشدید قابل توجه تمام این اختلالات در گروه مواجهه ترکیبی بود که نشان‌دهنده یک اثر افزایشی یا هم‌افزایی بین این دو آلاینده نوظهور است. اهمیت

این یافته‌ها در آن است که چنین اثرات تحت بالینی (Sublethal) در محیط‌های طبیعی و تأسیسات آبی‌پروری می‌تواند به کاهش مقاومت ماهی در برابر پاتوژن‌ها، افت رشد و کاهش موفقیت تولیدمثلی منجر شود و در نهایت بقای جمعیت‌های مهم تجاری نظیر قزل‌آلا را تهدید کند. مطالعه حاضر با بررسی همزمان این دو آلاینده بر شاخص‌های خون‌شناسی، یک شکاف کلیدی را در درک ما از خطرات واقعی آلاینده‌ها در اکوسیستم‌های آبی که ماهیت چندآلاینده‌ای دارند، پر می‌کند. این نتایج بر پیچیدگی اثرات آلاینده‌های نوظهور در محیط‌های آبی تأکید می‌کنند و نیاز فوری به ارزیابی‌های جامع خطر زیست‌محیطی را که تعاملات پیچیده چندین آلاینده را در نظر می‌گیرند، برجسته می‌سازند. از این‌رو ضرورت انجام پژوهش‌های عمیق‌تر جهت بررسی مکانیسم‌های مولکولی و فیزیولوژیک زمینه‌ای این تعاملات و نیز ارزیابی پیامدهای مزمن و جمعیتی در محیط‌های طبیعی به‌وضوح احساس می‌شود.

ملاحظات اخلاقی

حامی مالی

مقاله حاضر با حمایت مالی و معنوی معاونت پژوهشی دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران انجام شد.

نویسندگان اصول اخلاقی را در انجام و انتشار این پژوهش علمی رعایت نموده‌اند و این موضوع مورد تأیید آنهاست.

بیانیه دسترسی به داده‌ها

داده‌هایی پژوهش حاضر از طریق درخواست از نویسندگان قابل دسترسی است.

سپاسگزاری

بدینوسیله از شرکت بهسان تغذیه آریان بابت تأمین خوراک ماهی و شرکت داروسازی جالینوس بابت تأمین داروی فلوکستین و همچنین از کلیه همکارانی که در اجرای این پروژه با کمک‌ها و زحمات بی‌دریغ خود پشتیبان ما بودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

- Ahmadifar E., Shohreh P., Kalhor N., Shahriari Moghadam M., Yilmaz S., Mohammadzadeh S., Khajeh M., Abarghouei S. 2024.** Assessing the impact of dietary polystyrene nanoplastics on growth performance, immunological parameters, and antioxidant defense in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the World Aquaculture Society*, 55(2), e13046 . DOI: 10.1111/jwas.13046
- Aib H., Parvez M.S., Czédli H.M. 2025.** Pharmaceuticals and Microplastics in Aquatic Environments: A Comprehensive Review of Pathways and Distribution, Toxicological and Ecological Effects. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 22(5), 799. DOI: 10.3390/ijerph22050799
- Almeida M., Martins M.A., Soares A.M., Cuesta A., Oliveira M. 2019.** Polystyrene nanoplastics alter the cytotoxicity of human pharmaceuticals on marine fish cell lines. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 69, 57-65. DOI: 10.1016/j.etap.2019.03.019
- Arfin T., Mohammad F., Yusof N.A. 2015.** Applications of polystyrene and its role as a base in industrial chemistry. *Polystyrene: synthesis, characteristics and applications*. Nova Science Publishers, New York, 269-280
- Assas M., Qiu X., Chen K., Ogawa H., Xu H., Shimasaki Y., Oshima Y. 2020.** Bioaccumulation and reproductive effects of fluorescent microplastics in medaka fish. *Marine Pollution Bulletin* 158, 111446. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2020.111446

- Azarm-Karnagh S., Sattari M., Banaee M., Shirkavand Hadavand B., Falco F. 2025.** Effects of Polystyrene Nanoplastics on Oxidative Stress, Blood Biochemistry, and Digestive Enzyme Activity in Goldfish (*Carassius auratus*). *Toxics* 13(5), 336. DOI: 10.3390/toxics13050336
- Bojarski B., Witeska M., Kondera E. 2025.** Blood Biochemical Biomarkers in Fish Toxicology—A Review. *Animals* 15(7), 965. DOI: 10.3390/ani15070965
- Brandts I., Lima J., Garcia-Meilán I., Khansari A.R., Llorca M., Farré M., Tvarijonaviciute A., Balasch J.C., Teles M. 2025.** Bioaccumulation and homeostatic alterations in trout exposed to a sublethal dose of polystyrene nanoplastics. *Journal of Hazardous Materials Advances* 100836. DOI: 10.1016/j.hazadv.2025.100836
- Brandts I., Teles M., Gonçalves A., Barreto A., Franco-Martinez L., Tvarijonaviciute A., Martins M., Soares A., Tort L., Oliveira M. 2018.** Effects of nanoplastics on *Mytilus galloprovincialis* after individual and combined exposure with carbamazepine. *Science of the Total Environment* 643, 775–784. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.06.257
- Choi J.-H., Kim J.-H. 2023.** Toxic effects of sub-acute microplastic (polyamide) exposure on the accumulation, hematological, and antioxidant responses in crucian carp, *Carassius carassius*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 102, 104199. DOI: 10.1016/j.etap.2023.104199
- Cunha V., Rodrigues P., Santos M., Moradas-Ferreira P., Ferreira M. 2018.** Fluoxetine modulates the transcription of genes involved in serotonin, dopamine and adrenergic signalling in zebrafish embryos. *Chemosphere* 191, 954-961. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.10.100
- de Farias N.O., Oliveira R., Sousa-Moura D., de Oliveira R.C.S., Rodrigues M.A.C., Andrade T.S., Domingues I., Camargo N.S., Muehlmann L.A., Grisolia C.K. 2019.** Exposure to low concentration of fluoxetine affects development, behaviour and acetylcholinesterase activity of zebrafish embryos. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 215, 1-8. DOI: 10.1016/j.cbpc.2018.08.009
- Di Rosso M.E., Palumbo, M.L., Genaro A.M. 2016.** Immunomodulatory effects of fluoxetine: A new potential pharmacological action for a classic antidepressant drug?. *Pharmacological Research* 109, 101-107. DOI: 10.1016/j.phrs.2015.11.021
- Ding J., Huang Y., Liu S., Zhang S., Zou H., Wang Z., Zhu W., Geng J. 2020.** Toxicological effects of nano- and micro-polystyrene plastics on red tilapia: are larger plastic particles more harmless? *Journal of Hazardous Materials* 396, 122693. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.122693
- Ding J., Zhang S., Razanajatovo R.M., Zou H., Zhu W. 2018.** Accumulation, tissue distribution, and biochemical effects of polystyrene microplastics in the freshwater fish red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Pollution* 238, 1-9. DOI: 10.1016/j.envpol.2018.03.001
- Dorelle L.S., Da Cuna R.H., Sganga D.E., Vázquez G.R., Greco L.L., Nostro F.L.L. 2020.** Fluoxetine exposure disrupts food intake and energy storage in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Cichliformes). *Chemosphere* 238, 124609. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.124609
- Feldman B.V., Zinkl J.G., Jain N.C., Schalm O.W. 2000.** *Schalm's veterinary hematology*. Lippincott Williams and Wilkins publication .
- Gheorghe Ș., Pătrașcu A.-M., Stoica C., Balas M., Feodorov L. 2025.** Ecotoxicological Effects of Polystyrene Particle Mix (20, 200, and 430 μm) on *Cyprinus carpio*. *Toxics* 13(4), 246. DOI: 10.3390/toxics13040246
- Ghosh T. 2025.** Microplastics bioaccumulation in fish: Its potential toxic effects on hematology, immune response, neurotoxicity, oxidative stress, growth, and reproductive dysfunction. *Toxicology Reports* 14, 101854. DOI: 10.1016/j.toxrep.2024.101854
- Gobin V., Van Steendam K., Denys D., Deforce D. 2014.** Selective serotonin reuptake inhibitors as a novel class of immunosuppressants. *International Immunopharmacology* 20(1), 148–156. DOI: 10.1016/j.intimp.2014.02.030
- Golbaz S., Zamanzadeh M., Yaghmaeian K., Nabizadeh R., Rastkari N., Esfahani H. 2023.** Occurrence and removal of psychiatric pharmaceuticals in the Tehran South Municipal Wastewater Treatment Plant. *Environmental Science and Pollution Research* 30(10), 27041-27055. DOI: 10.1007/s11356-022-23667-5

- Guerrera M.C., Aragona M., Porcino C., Fazio F., Laurà R., Levanti M., Montalbano G., Germanà G., Abbate F., Germanà A. 2021.** Micro and nano plastics distribution in fish as model organisms: histopathology, blood response and bioaccumulation in different organs. *Applied Sciences* 11(13), 5768. DOI: 10.3390/app11135768
- Hamed M., Soliman H.A., Osman A.G., Sayed A.E.-D.H. 2019.** Assessment the effect of exposure to microplastics in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) early juvenile: I. blood biomarkers. *Chemosphere* 228, 345-350. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.04.153
- Ho B.T., Roberts T.K., Lucas S. 2018.** An overview on biodegradation of polystyrene and modified polystyrene: the microbial approach. *Critical reviews in Biotechnology* 38(2), 308-320. DOI: 10.1080/07388551.2017.1355293
- Hollerova A., Hodkovicova N., Blahova J., Faldyna M., Franc A., Pavloková S., Tichy F., Postulkova E., Mares J., Medkova D. 2023.** Polystyrene microparticles can affect the health status of freshwater fish—Threat of oral microplastics intake. *Science of the Total Environment* 858, 159976. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.159976
- Impellitteri F., Multisanti C.R., Rusanova P., Piccione G., Falco F., Faggio C. 2023.** Exploring the impact of contaminants of emerging concern on fish and invertebrates physiology in the Mediterranean Sea. *Biology* 12(6), 767. DOI: 10.3390/biology12060767
- Jovanović B. 2017.** Ingestion of microplastics by fish and its potential consequences from a physical perspective. *Integrated Environmental Assessment and Management* 13(3), 510-515. DOI: 10.1002/ieam.1913
- Karbalaei S., Hanachi P., Rafiee G., Seifori P. 2021.** Toxicity of polystyrene microplastics on juvenile *Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout) after individual and combined exposure with chlorpyrifos. *Journal of Hazardous Materials* 403, 123980. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.123980
- Kendrick T. 2021.** Strategies to reduce use of antidepressants. *British Journal of Clinical Pharmacology* 87(1), 23-33. DOI: 10.1111/bcp.14475
- Koelmans A.A., Besseling E., Shim W.J. 2015.** Nanoplastics in the aquatic environment. Critical review. *Marine Anthropogenic Litter*, 325-340. DOI: 10.1007/978-3-319-16510-3_12
- Li H., Liu H., Bi L., Liu Y., Jin L., Peng R. 2024.** Immunotoxicity of microplastics in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 150, 109619. DOI: 10.1016/j.fsi.2024.109619
- Lugert V., Steinhagen D., Reiser S. 2020.** Lack of knowledge does not justify a lack of action: the case for animal welfare in farmed fish. *Journal of Sustainable and Organic Agricultural Systems* 70, 31-34. DOI: 10.3220/LBF1592499937000
- Ma F., Wang W., Dong J., Zhou X., Lin Z., Zheng P., Nian X. 2025.** Ecotoxicological impacts of polystyrene microplastics on rainbow trout: A multidisciplinary analysis of gut microbiota dysbiosis, oxidative stress, and cellular senescence for environmental risk assessment. *Process Safety and Environmental Protection* 107323. DOI: 10.1016/j.psep.2025.107323
- Major C., Poynton H., Urban-Rich J. 2025.** Polystyrene acts as a vector for the pharmaceutical, gemfibrozil, to bay scallop larvae (*Argopecten irradians*). *Marine Pollution Bulletin* 220, 118416. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2025.118416
- Mehri A., Hedayati A.A., Mohamadi Azarm H., Jafar A., Abarghuei S. 2021.** Study on hematological and biochemical indices of common carp (*Cyprinus carpio*) in exposure to different concentrations of polystyrene nanoplastic. *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics* 10(3), 97-106. (In Persian) DOI: 10.22069/japu.2021.18796.1574
- Mirzaei Nashtoroudi M., Rezaei Tavabe K., Abed Elmdoust A., Rafiee G., Rahimian H., Shirkavand Hadavand B. 2023.** Determining the effects of different levels of polystyrene nanoplastics on the expression of immune-related- genes in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Sciences*, 11(1), 105-113. (In Persian)
- Mirzaei Nashtoroudi M., Afrand M., Rezaei Tavabe K., Abed-Elmdoust A., Rafiee G., Rahimian, H. 2025.** Polystyrene Nanoplastics Induce Multi-Organ Toxicity in the Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*): An Integrated Assessment of Physiological, Immunological, and Molecular Responses. *Social Science Research Network*. (In press). DOI: 10.2139/ssrn.5214918

- Mishra P., Gong Z., Kelly B.C . 2017. Assessing biological effects of fluoxetine in developing zebrafish embryos using gas chromatography-mass spectrometry based metabolomics. *Chemosphere* 188, 157-167 . DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.08.149
- Montes-Grajales D., Fennix-Agudelo M., Miranda-Castro W. 2017. Occurrence of personal care products as emerging chemicals of concern in water resources: A review. *Science of the Total Environment* 595, 601-614 . DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.03.286
- Nugnes R., Lavorgna M., Orlo E., Russo C., Isidori M. 2022. Toxic impact of polystyrene microplastic particles in freshwater organisms. *Chemosphere* 299, 134373 . DOI: 10.1016/j.chemosphere.2022.134373
- Orozco-Hernández J.M., Elizalde-Velázquez G.A., Gómez-Oliván L.M., Santamaría-González, G.O., Rosales-Pérez K.E., García-Medina S., Galar-Martínez M., San Juan-Reyes N. 2023. Acute exposure to fluoxetine leads to oxidative stress and hematological disorder in *Danio rerio* adults. *Science of the Total Environment* 905, 167391 . DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.167391
- Orozco-Hernández J.M., Gómez-Oliván L.M., Elizalde-Velázquez G.A., Heredia-García G., Cardoso-Vera J.D., Dublán-García O., Islas-Flores H., SanJuan-Reyes N., Galar-Martínez, M. 2022. Effects of oxidative stress induced by environmental relevant concentrations of fluoxetine on the embryonic development on *Danio rerio*. *Science of the Total Environment* 807, 151048 . DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.151048
- Osman A.G., AbouelFadl K.Y., Abd-El-Reheem A., Mahmoud U.M., Kloas W., Moustafa M.A. 2018. Blood biomarkers in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* niloticus and African catfish *Clarias gariepinus* to evaluate water quality of the river Nile, 1-15. DOI: 10.5555/20183134201
- Pan C., Yang M., Xu H., Xu B., Jiang L., Wu M. 2018. Tissue bioconcentration and effects of fluoxetine in zebrafish (*Danio rerio*) and red crucian cap (*Carassius auratus*) after short-term and long-term exposure. *Chemosphere* 205, 8-14 . DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.04.082
- Pellegrino T.C., Bayer, B.M. 2002. Role of central 5-HT₂ receptors in fluoxetine-induced decreases in T lymphocyte activity. *Brain, Behavior, and Immunity* 16(2), 87-103 . DOI: 10.1006/brbi.2001.0625
- Puckowski A., Cwiąg W., Mioduszevska K., Stepnowski P., Białk-Bielińska A. 2021. Sorption of pharmaceuticals on the surface of microplastics. *Chemosphere* 263, 127976 . DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.127976
- Qiao R., Mortimer M., Richter J., Rani-Borges B., Yu Z., Heinlaan M., Lin S., Ivask A. 2022. Hazard of polystyrene micro-and nanospheres to selected aquatic and terrestrial organisms. *Science of the Total Environment* 853, 158560 . DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.158560
- Rashid E., Hussain S.M., Ali S., Kucharczyk D., Nowosad J., Al-Ghanim K.A. 2025. Polystyrene microplastics exposure in freshwater fish, *Labeo rohita*: evaluation of physiology and histopathology. *Scientific Reports* 15(1), 12888 . DOI: 10.1038/s41598-025-95811-3
- Rashid E., Hussain S.M., Sarker P.K., Ali S., Paray B.A. 2024. Assessment of polystyrene microplastics as dietary additives in aquaculture species, *Catla catla*: Alters growth, feed utilization, nutritional composition, hematology and gut histopathology. *Aquaculture Reports* 36, 102100 . DOI: 10.1016/j.aqrep.2024.102100
- Rezaei pour A., Kazempoor R., Mortazavi P., Ghorbanzadeh A. 2024. Histopathological alterations in adult zebrafish (*Danio rerio*) under acute fluoxetine exposure. *International Journal of Veterinary Research* 4(2), 21-33 . DOI: 10.22034/4.2.21
- Saemi-Komsari M., Pashaei R., Abbasi S., Esmaeili H.R., Dzingelevičienė R., Hadavand B.S., Kalako M.P., Szultka-Mlynska M., Gadzala-Kopciuch R., Buszewski, B. 2023. Accumulation of polystyrene nanoplastics and triclosan by a model tooth-carp fish, *Aphaniops hormuzensis* (Teleostei: Aphaniidae). *Environmental Pollution* 333, 121997 . DOI: 10.1016/j.envpol.2023.121997
- Santos L.H., Rodríguez-Mozaz S., Barceló D. 2021. Microplastics as vectors of pharmaceuticals in aquatic organisms—an overview of their environmental implications. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering* 3, 100079 . DOI: 10.1016/j.cscee.2021.100079

- Schmieg H., Burmester J.K., Kraiss S., Ruhl A.S., Tisler S., Zwiener C., Köhler H.-R., Triebkorn R. 2020.** Interacting effects of polystyrene microplastics and the antidepressant amitriptyline on early life stages of brown trout (*Salmo trutta f. fario*). *Water* 12(9), 2361 . DOI: 10.3390/w12092361
- Seibel H., Baßmann B., Rebl A. 2021.** Blood will tell: what hematological analyses can reveal about fish welfare. *Frontiers in Veterinary Science* 8, 616955 . DOI: 10.3389/fvets.2021.616955
- Shi W., Han Y., Guan X., Rong J., Su W., Zha S., Tang Y., Du X., Liu G. 2019.** Fluoxetine suppresses the immune responses of blood clams by reducing haemocyte viability, disturbing signal transduction and imposing physiological stress. *Science of the Total Environment* 683, 681-689 . DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.05.308
- Sun N., Shi H., Li X., Gao C., Liu R. 2023.** Combined toxicity of micro/nanoplastics loaded with environmental pollutants to organisms and cells: Role, effects, and mechanism. *Environment International* 171, 107711 . DOI: 10.1016/j.envint.2022.107711
- Theodoridi A., Tsalafouta A., Pavlidis M. 2017.** Acute exposure to fluoxetine alters aggressive behavior of zebrafish and expression of genes involved in serotonergic system regulation. *Frontiers in Neuroscience* 11, 223 . DOI: 10.3389/fnins.2017.00223
- Vaclavik J., Sehonova P., Blahova J., Medkova D., Postulkova E., Maly O., Charvatova M., Stastny K., Lenz J., Mares J. 2022.** Foodborne fluoxetine impacts the immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental toxicology and pharmacology* 90, 103818 . DOI: 10.1016/j.etap.2022.103818
- Vijitkul P., Kongsema M., Toommakorn T., Bullangpoti V. 2022.** Investigation of genotoxicity, mutagenicity, and cytotoxicity in erythrocytes of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after fluoxetine exposure. *Toxicology Reports* 9, 588-596 . DOI: 10.1016/j.toxrep.2022.03.031
- Vineetha V.P., Suresh K., Pillai D. 2024.** Impact of sub-chronic polystyrene nanoplastics exposure on hematology, histology, and endoplasmic reticulum stress-related protein expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 273, 110982 . DOI: 10.1016/j.cbpb.2024.110982
- Visanji Z., Sadr S., Johns M., Savic D., Memon F.A. 2018.** Emerging pollutants in developing countries: optimising sustainable treatment solutions . DOI: 10.29007/txmw
- Wang W., Ge J., Yu X. 2020.** Bioavailability and toxicity of microplastics to fish species: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 189, 109913 . DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.109913
- Wong R.Y., Oxendine S.E., Godwin J. 2013.** Behavioral and neurogenomic transcriptome changes in wild-derived zebrafish with fluoxetine treatment. *BMC genomics* 14(1), 348 . DOI: 10.1186/1471-2164-14-348
- Wu L., Li L., Gao A., Ye J., Li J. 2024.** Antimicrobial roles of phagocytosis in teleost fish: phagocytic B cells vs professional phagocytes. *Aquaculture and Fisheries* 9(2), 105-114 . DOI: 10.1016/j.aaf.2021.12.008
- Yan Z., Zhao H., Zhu P., Wang Y., Hou J., Lu G., He C. 2024.** Polystyrene microplastics alter the trophic transfer and biotoxicity of fluoxetine in an aquatic food chain. *Journal of Hazardous Materials* 470, 134179 . DOI: 10.1016/j.jhazmat.2024.134179
- Yazdanbakhsh M., Phan C., William N., Acker J.P. 2024.** RBC subpopulations in RCCs affected by donor factors. *Transfusion and Apheresis Science* 63(6), 104010 . DOI: 10.1016/j.jhazmat.2024.134179
- Zaman M., Khan F.U., Younas W., Noorullah M., Ullah I., Li L.A., Zuberi A., Wang Y. 2024.** Physiological and histopathological effects of polystyrene nanoparticles on the filter-feeding fish *Hypophthalmichthys molitrix*. *Science of the Total Environment* 912, 169376 . DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.169376
- Zwollo P., Quddos F., Bagdassarian C., Seeley M.E., Hale R.C., Abderhalden L. 2021.** Polystyrene microplastics reduce abundance of developing B cells in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) primary cultures. *Fish & Shellfish Immunology* 114, 102-111 . DOI: 10.1016/j.fsi.2021.04.014