آسیب شناسی اثرات سطوح مختلف نانوذره مس در آب بر آبشش بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) پیش و پس از یک دوره بازیابی

احمد ایمانی [۱*]، کوروش سروی مغانلو[۲]، سیران خانی[۳]

تاریخ دریافت :۹٤/۰۸/۲۳
تاریخ تصویب :۹۵/۰۳/۰۹

چکیده

مطالعه حاضر به منظور بررسی آسیب های نانو ذره مس بر ساختار بافت آبشش بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان در پیش و پس از یک دوره بازیابی طرح ریزی شد. برای این منظور مجموعا ۱۳۵ قطعه بچه ماهی با وزن متوسط ۳۰ گرم به صورت تصادفی در مخازن۹۰ لیتری توزیع گردیدند. بچه ماهیان به مدت ۲۱ روز تحت سه تیمار مختلف نانو ذره شامل ۰، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم در لیتر نانوذره مس قرار گرفتند و همچنین با هدف بررسی امکان ترمیم آسیب ها پس از حذف نانو ذره از محیط، بچه ماهیان به مدت ۲۱ روز دیگر نیز پرورش یافتند. نمونه برداری از بافت آبشش در انتهای دو دوره صورت پذیرفت و بافت ها با روش هماتوکسیلن-ائوزین (H&E) رنگ آمیزی شدند. نتایج مرحله اول بافت شناسی آبشش نشان داد که هر دو غلظت ۲۵ و ۵۰ میکروگرم در لیتر نانو ذره مس باعث ایجاد آسیب هایی همچون کاهش طول رشته های آبششی و هایپرپلازی اپتلیال گردید. همچنین تلانژکتازی و تجمع خون در تیمار ۲۵ میکروگرم در لیتر قابل

*۱- استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
(نویسنده مسئول: a.imani@urmia.ac.ir)
۲- استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۳- کارشناس ارشد شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

مشاهده بود. تجمع خون شدید در قسمت ابتدایی رشته های آبششی، افزایش فضای بین تیغه های آبششی و تخریب اپیتلیال در برخی نقاط تیغه های ثانویه آبششی در تیمار ۵۰ میکروگرم در لیتر مشاهده شد. در مرحله دوم مطالعه نیز آسیب های بافتی البته با شدت کمتری وجود داشت. جمع بندی نتایج نشان می دهد نانو ذره مس سبب آسیب به بافت آبشش بچه ماهیان می گردد بنحوی که در غلظت های بالا، شدت این آسیب ها افزایش می یابد، و همچنین برخی از این آسیب ها حتی پس از اتمام

مقدمه

فناوری نانو به انقلاب فناوری در هزاره جدید منجر شده است و کاربردهای آن پتانسیل عظیمی برای تاثیرگذاری بر جهان دارد. نانوذرات رایج ترین عناصر در علم و فناوری نانو هستند که کاربردهای بسیار متنوعی در علوم و صنایع مختلف از جمله در الکترونیک، پزشکی، داروسازی، لوازم آرایشی و بهداشتی، محیط زیست، تولید انرژی، کاتالیزورها و غیره دارند (Agarwal et., al 2012). با توجه به خواص منحصر به فرد فیزیکی و شیمیایی نانوذرات از جمله اندازه کوچک، سطح وسیع تر، ویژگی های نوری خاص و پوشش سطحی ویژه، این مواد می توانند در بسیاری از مطالعات زیستی و زیست محیطی مورد استفاده قرار بگیرند و به همین دلیل، توجه زیاد دانشمندان و پژوهشگران را به خود جلب نموده اند (Yah et al ., 2011; Chan, 2006). با توجه به گسترش سریع صنایع مرتبط به نانو ذرات احتمال ورود این مواد به منابع آبی و ایجاد اثرات سمی بر محیط زیست و موجودات به ویژه آبزیان وجود دارد (Kagan et al., 2005; Zhou et al., 2016). مهمترین فلزات در سم شناسی ماهیان شامل آلومینیوم، کروم، آهن، نیکل، مس، روی، آرسنیک، کادمیوم، جیوه و سرب می باشند. در این بین مس جزو فلزات کمیاب بوده و یک عنصر ضروری برای همه موجودات زنده است و حدود ۳۰ آنزیم از مس به عنوان کوفاکتور استفاده می کنند، اما به طور بالقوه برای بسیاری از موجودات سمی تلقی می گردد (Viarengo, 1989; Grosell et al., 1998; Grosell et al., 2007) و آسیب های مختلف بافتی شامل جداشدن پایه و خونریزی در تیغه آبششی ثانویه، هیپرپلازی در لاملای اولیه و ثانویه آبششی، هیپرتروفی سلولی، آسیب به سلول های اندوتلیال مویرگ ها و افزایش ضخامت اپی تلیوم رشته های آبششی در *Solea senegalensis*، *Prochilodus scrofa* و قزل آلای رنگین کمان (Arellano et al.,

1999, Mazon et al., 2002, Heerden et al., 2004) همچنین دژنرسانس چربی، پرخونی، خونریزی و در غلظت های بالاتر نکروز کبدی، هجوم لنفوسیت ها و کاهش تعداد هپاتوسیت ها در بافت کبد ماهی *Oreochromis niloticus* گزارش شده است (Figueiredo-Fernandes et al., 2007). مطالعه خباری و همکاران (۱۳۹٤) نشان داد که سولفات مس (۰/۱۵-۰ mg/l) بر میزان گلبول‌های قرمز، گلبول سفید، هموگلوبین، هماتوکریت، MCV، MCH، MCHC، نوتروفیل و لنفوسیت تأثیر معنی داری داشت. در سال های اخیر، شکل جدیدی از فلز مس طراحی شده است که نوعی نانو ماده حاوی فلز متشکل از نانوذرات مس می باشد و به شکل وسیعی در صنایع مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد (Alishahi (2011). Shaw and Handy, Mesbah (2010) وسمیت نانوذرات نقره را در چهار گونه مختلف از ماهیان شامل کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*)، شیربت (*Barbus grypus*)، اسکار (*Astronorus ocellatus*) و سوروم (*Cichlosoma severums*) مورد بررسی قرار دادند. آن ها به این نتیجه رسیدند که دو گونه اخیر در برابر نانوذرات نقره مقاومت بیشتری نسبت به دو گونه دیگر دارند. همچنین شیربت (*B. grypus*) به عنوان یک گونه وحشی حساسیت بیشتری نسبت به نانوذره نقره دارد. مطالعات اولیه نشان می‌دهد که بخشی از نانوذرات می‌تواند در ستون آب بصورت معلق باقی مانده و توسط موجودات آبزی جذب شوند (Zhu et al., 2010). اثرات سمی نانوذرات در موجودات آبزی مانند گونه‌های مختلف جلبک ها، زئوپلانکتون ها و ماهی ها قابل مشاهده است (Perello, 2013). به طور مثال اثرات نانوذره مس و سولفات مس بر بافت های ماهی قزل آلای رنگین کمان مورد بررسی قرار گرفته است و آسیب هایی از قبیل هیپرپلازی، انوریسم و نکروز تیغه های ثانویه در آبشش و صدماتی شبیه هپاتیت در کبد گزارش شده است (Al-Bairuty et al., 2013). تولید ROS در انواع مختلفی از نانو مواد از جمله نانو ذرات اکسید فلزی مشاهده شده است (Elsaesser and Howard, 2012; Tee et al., 2015). رادیکال های آزاد با پراکسیداسیون چربی ها و واسرشتی پروتئین های ساختاری سلول ها منجر به از دست رفتن کارکردهای حیاتی یک بافت اندام می‌شوند (صبوری و عطری، ۱۳۹۰). امروزه نقش تخریب اکسیداتیو پروتئین‌ها بوسیله رادیکال های آزاد در فرآیند پیری و آسیب شناسی بیماری ها مورد توجه قرار گرفته است (Nakamura et al., 2007). با وجود اطلاعات قابل توجه در ارتباط با آثار پاتولوژیک عنصر مس در گونه های مختلف آبزیان، نگرانی ها در مورد آثار احتمالی نانوذرات فلزی رو به گسترش

است، چرا که افزایش اطلاعات علمی در زمینه سم شناسی نانوذرات جهت مدیریت و بهینه نمودن استفاده از این مواد بسیار اهمیت دارد. در همین راستا مطالعه حاضر با هدف بررسی آسیب های احتمالی ناشی از غلظت های مختلف نانو ذره مس بر بافت آبشش و همچنین بررسی امکان ترمیم آسیب ها پس از حذف نانو ذره از محیط آب صورت گرفت.

مواد و روش کار

طرز تهیه نانوذرات مس

نانوذرات مس با استفاده از کاهش شیمیایی نمک فلزی CuCl2 در آب با L – اسید اسکوربیک به عنوان عامل احیا کننده و تثبیت کننده تهیه شد؛ به طور خلاصه، ۰/۳۴۰۹ گرم CuCl2,2H2O و ۷/۰۴۵ گرم L– اسکوربیک اسید به طور جداگانه در ۱۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه حل شده و به مدت ۳۰ دقیقه با دستگاه اولتراسونیک پخش شد. ظرف حاوی محلول آبیCuCl2.2H2O با کمک همزن مغناطیسی تا دمای ۸۰ درجه سانتیگراد در حمام روغن حرارت داده شد و همزمان با افزودن قطره قطره محلول L– اسید اسکوربیک، نانوذرات مس تهیه گردید. این مخلوط در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد تا زمان به دست آمدن یک محلول تیره، نگهداری شد. واکنش پس از ۱۶ ساعت به پایان رسید و نانوذراتی به اندازه ۶–۲ نانومتر ساخته شد (Xiong et al., 2011).

تیمارهای آزمایشی

ابتدا ۱۳۵ قطعه بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان با میانگین وزنی ۳۰ گرم از یکی از مراکز تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی استان تهیه و به سالن تکثیر و پرورش آبزیان دانشگاه ارومیه منتقل شد. پس از گذراندن یک هفته دوره قرنطینه و سازش با شرایط جدید، بچه ماهیان با محلول نمک ۳% ضد عفونی (ستاری، ۱۳۹۱) و در قالب سه تیمار (هر تیمار دارای سه تکرار) در ۹ مخزن ۹۰ لیتری (که قبلا با مواد ضد عفونی کننده نظیر هیپوکلریت سدیم کاملا ضدعفونی شده بودند) حاوی ۴۵ لیتر آب با تراکم ۱۵ قطعه در هر مخزن ذخیره سازی شدند. جهت بررسی تاثیر غلظت های مختلف نانو ذره مس بر بافت آبشش، تحقیق حاضر در قالب سه تیمار به شرح زیر طراحی گردید (Shaw et al., 2012)؛ تیمار ۱– فاقد نانو ذره مس (گروه شاهد)، تیمار ۲– µg/l ۲۵ نانوذره مس و تیمار ۳– µg/l ۵۰ نانو ذره مس.

تحقیق حاضر طی ۴۲ روز و در دو دوره ۲۱ روزه انجام گرفت. طی دوره اول تعویض آب به میزان ۸۰% در دو نوبت صبح و عصر انجام شد. در این مدت تغذیه ماهیان به صورت یک درصد وزن بدن بعد از تعویض آب صورت گرفت. بعد از پایان این دوره از مجموع ۱۵ قطعه ماهی موجود در هر تانک تعداد ۶ قطعه در پایان روز ۲۱ نمونه برداری صورت گرفت و

مابقی ماهیان به مدت ۲۱ روز دیگر در آب فاقد نانو ذره مس نگهداری شدند و در پایان دوره، نمونه برداری از آبشش ماهیان مشابه مرحله اول صورت گرفت. شایان ذکر است که ویژگی های فیزیکوشیمیایی آب مورد استفاده شامل دما (۱۷ °C)، اکسیژن محلول (۸/۵ l/gm)، پی اچ (۷/۸) و سختی (۲۷۵ l/gm 3OCaC) برای پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان مناسب بود (Roque d'orbcastel et al., 2009).

بررسی های بافت شناسی

به منظور مطالعات بافت شناسی ٦ قطعه از بچه ماهیان به صورت تصادفی انتخاب و از بافت آبشش آن ها نمونه برداری صورت گرفت (Song et al., 2015). نمونه های فوق ابتدا به مدت ۷۲-٤۸ ساعت در محلول بوئن تثبیت و سپس به الکل اتانول ۷۰% منتقل و تا زمان انجام مطالعات بافت شناسی در محلول مزبور نگهداری گردیدند. سپس ادامه آماده سازی بافت طبق روش پوستی (۱۳٦۸) صورت گرفت و لام های آماده شده بعد از رنگ آمیزی به روش هماتوکسیلن- ائوزین (H&E) تهیه و آسیب های احتمالی با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت (Rajkumar et al., 2016).

نتایج

تصاویر برش های بافتی آبشش ماهیان تیمارهای مختلف در مرحله اول آزمایش، که با حضور نانو ذره مس انجام شد، در شکل ۱ آمده است. آبشش ماهیان تیمار ۱ (شاهد) دارای ساختار طبیعی بود. در ماهیان تیمار ۲ (۲۵ l/gμ) کاهش طول رشته های آبششی، هایپرپلازی و تلانژکتازی به همراه تجمع خون مشاهده گردید و با افزایش غلظت نانو ذره مس در تیمار ۳ (۵۰ l/gμ) آسیب های بافتی شدیدتری مشاهده شد که مهمترین آنها شامل هیپرپلازی اپیتلیال همراه با کاهش طول رشته های آبششی اولیه و تجمع شدید خون، افزایش فضای بین لاملاها و تخریب اپیتلیال رشته های آبششی ثانویه بود.

نتایج مربوط به مرحله دوم مطالعه که مرحله بدون حضور نانو ذره مس بود در شکل ۲ نشان داده شده است. در تیمار ۱ (شاهد)، تیغه-های آبششی، کمان آبششی، رشته های آبشش و آبشش طبیعی بودند. در تیمار ۲ (۲۵ l/gμ) کاهش طول رشته های آبششی همراه با هایپرپلازی اپیتلیوم و تجمع خون به صورت خفیف قابل مشاهده بود، با این وجود اثرات مواجهه با نانو ذره هنوز به طور کامل از بین نرفته بود. در تیمار ۳ (۵۰ l/gμ) همچنان هایپرپلازی اپیتلیوم به همراه تجمع خون و خون ریزی در رشته های آبششی مشهود بود قرار بگیرند و به همین دلیل، توجه زیاد دانشمندان و پژوهشگران را به خود جلب نموده اند (Yah., 2011 ;Chan, 2006 et al). با توجه به گسترش سریع صنایع

مرتبط به نانو ذرات احتمال ورود این مواد به منابع آبی و ایجاد اثرات سمی بر محیط زیست و موجودات به ویژه آبزیان وجود دارد (Zhou et al., 2016 ; Kagan et al, 2005). مهمترین فلزات در سم شناسی ماهیان شامل آلومینیوم، کروم، آهن، نیکل، مس، روی، آرسنیک، کادمیوم، جیوه و سرب می باشند. در این بین مس جزو فلزات کمیاب بوده و یک عنصر ضروری برای همه موجودات زنده است و حدود ۳۰ آنزیم از مس به عنوان کوفاکتور استفاده می کنند، اما به طور بالقوه برای بسیاری از موجودات سمی تلقی می گردد (Viarengo, 1989; Grosell et al., 1998; Grosell et al., 2007) و آسیب های مختلف بافتی شامل جداشدن پایه و خونریزی در تیغه آبششی ثانویه، هیپرپلازی در لاملای اولیه و ثانویه آبششی، هیپرتروفی سلولی، آسیب به سلول های اندوتلیال مویرگ ها و افزایش ضخامت اپی تلیوم رشته های آبششی در *Solea senegalensis*، *Prochilodus scrofa* و قزل آلای رنگین کمان (Arellano et al., 1999, Mazon et al., 2002, Heerden et al., 2004) همچنین دژنرسانس چربی، پرخونی، خونریزی و در غلظت های بالاتر نکروز کبدی، هجوم لنفوسیت ها و کاهش تعداد هپاتوسیت ها در بافت کبد ماهی Oreochromis niloticus گزارش شده است (Figueiredo-Fernandes et al., 2007). مطالعه خباری و همکاران (۱۳۹٤) نشان داد که سولفات مس (0-0/15 mg/l) بر میزان گلبول‌های قرمز، گلبول سفید، هموگلوبین، هماتوکریت، MCV، MCH، MCHC، نوتروفیل و لنفوسیت تأثیر معنی داری داشت. در سال های اخیر، شکل جدیدی از فلز مس طراحی شده است که نوعی نانو ماده حاوی فلز متشکل از نانوذرات مس می باشد و به شکل وسیعی در صنایع مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد (Shaw and Handy, 2011).

Alishahi و Mesbah (2010) سمیت نانوذرات نقره را در چهار گونه مختلف از ماهیان شامل کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*)، شیربت (*Barbus grypus*)، اسکار (*Astronorus ocellatus*) و سوروم (*Cichlosoma severums*) مورد بررسی قرار دادند. آن ها به این نتیجه رسیدند که دو گونه اخیر در برابر نانوذرات نقره مقاومت بیشتری نسبت به دو گونه دیگر دارند. همچنین شیربت (*B. grypus*) به عنوان یک گونه وحشی حساسیت بیشتری نسبت به نانوذره نقره دارد. مطالعات اولیه نشان می‌دهد که بخشی از نانوذرات می‌توانند در ستون آب بصورت معلق باقی مانده و توسط موجودات آبزی جذب شوند (Zhu et al., 2010). اثرات سمی نانوذرات در موجودات آبزی مانند گونه‌های مختلف جلبک ها، زئوپلانکتون ها و ماهی ها قابل مشاهده است (Perello, 2013). به طور

مثال اثرات نانوذره مس و سولفات مس بر بافت های ماهی قزل آلای رنگین کمان مورد بررسی قرار گرفته است و آسیب هایی از قبیل هیپرپلازی، انوریسم و نکروز تیغه های ثانویه در آبشش و صدماتی شبیه هپاتیت در کبد گزارش شده است (Al-Bairuty et al., 2013). تولید ROS در انواع مختلفی از نانو مواد از جمله نانو ذرات اکسید فلزی مشاهده شده است (Elsaesser and Howard, 2012; Tee et al., 2015). رادیکال های آزاد با پراکسیداسیون چربی ها و واسرشتی پروتئین های ساختاری سلول ها منجر به از دست رفتن کارکردهای حیاتی یک بافت اندام می‌شوند (صبوری و عطری، ۱۳۹۰). امروزه نقش تخریب اکسیداتیو پروتئین‌ها بوسیله رادیکال های آزاد در فرآیند پیری و آسیب شناسی بیماری ها مورد توجه قرار گرفته است (Nakamura et al., 2007). با وجود اطلاعات قابل توجه در ارتباط با آثار پاتولوژیک عنصر مس در گونه های مختلف آبزیان، نگرانی ها در مورد آثار احتمالی نانوذرات فلزی رو به گسترش است، چرا که افزایش اطلاعات علمی در زمینه سم شناسی نانوذرات جهت مدیریت و بهینه نمودن استفاده از این مواد بسیار اهمیت دارد. در همین راستا مطالعه حاضر با هدف بررسی آسیب های احتمالی ناشی از غلظت های مختلف نانو ذره مس بر بافت آبشش و همچنین بررسی امکان ترمیم آسیب ها پس از حذف نانو ذره از محیط آب صورت گرفت.

طرز تهیه نانوذرات مس

نانوذرات مس با استفاده از کاهش شیمیایی نمک فلزی CuCl2 در آب با L – اسید اسکوربیک به عنوان عامل احیا کننده و تثبیت کننده تهیه شد؛ به طور خلاصه، ۰/۳۴۰۹ گرم CuCl2.2H2O و ۷/۰۴۵ گرم L- اسکوربیک اسید به طور جداگانه در ۱۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه حل شده و به مدت ۳۰ دقیقه با دستگاه اولتراسونیک پخش شد. ظرف حاوی محلول آبی CuCl2.2H2O با کمک همزن مغناطیسی تا دمای ۸۰ درجه سانتیگراد در حمام روغن حرارت داده شد و همزمان با افزودن قطره قطره محلول L– اسید اسکوربیک، نانوذرات مس تهیه گردید. این مخلوط در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد تا زمان به دست آمدن یک محلول تیره، نگهداری شد. واکنش پس از ۱۶ ساعت به پایان رسید و نانوذراتی به اندازه ۶-۲ نانومتر ساخته شد (Xiong et al., 2011).

تیمارهای آزمایشی

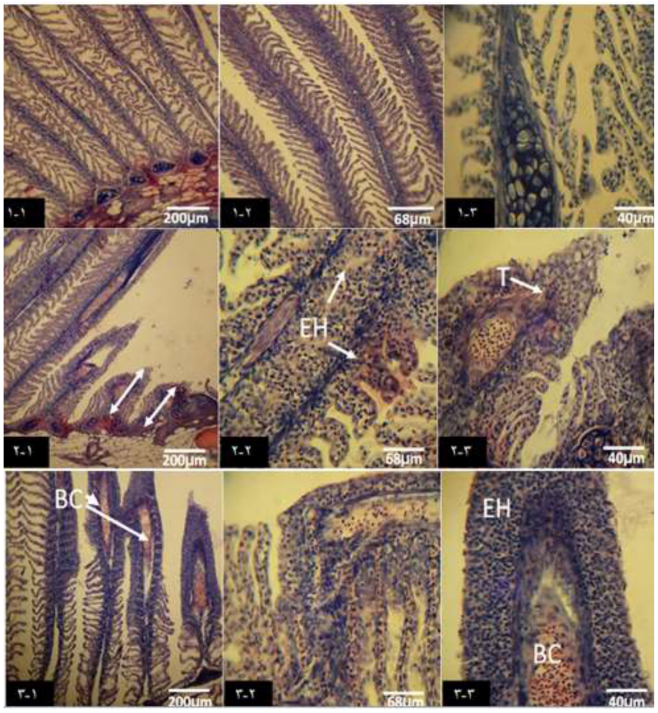
ابتدا ۱۳۵ قطعه بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان با میانگین وزنی ۳۰ گرم از یکی از مراکز تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی استان تهیه و به سالن تکثیر و پرورش آبزیان دانشگاه ارومیه منتقل شد. پس از گذراندن یک هفته دوره قرنطینه و سازش با شرایط جدید، بچه ماهیان با محلول

نمک ۳% ضد عفونی (ستاری، ۱۳۹۱) و در قالب سه تیمار (هر تیمار دارای سه تکرار) در ۹ مخزن ۹۰ لیتری (که قبلا با مواد ضد عفونی کننده نظیر هیپوکلریت سدیم کاملا ضدعفونی شده بودند) حاوی ٤٥ لیتر آب با تراکم ۱۵ قطعه در هر مخزن ذخیره سازی شدند. جهت بررسی تاثیر غلظت های مختلف نانو ذره مس بر بافت آبشش، تحقیق حاضر در قالب سه تیمار به شرح زیر طراحی گردید (Shaw., 2012 et al)؛ تیمار *1*- فاقد نانو ذره مس (گروه شاهد)، تیمار 2- 25 µg/l نانوذره مس و تیمار 3- 50 µg/l نانو ذره مس.

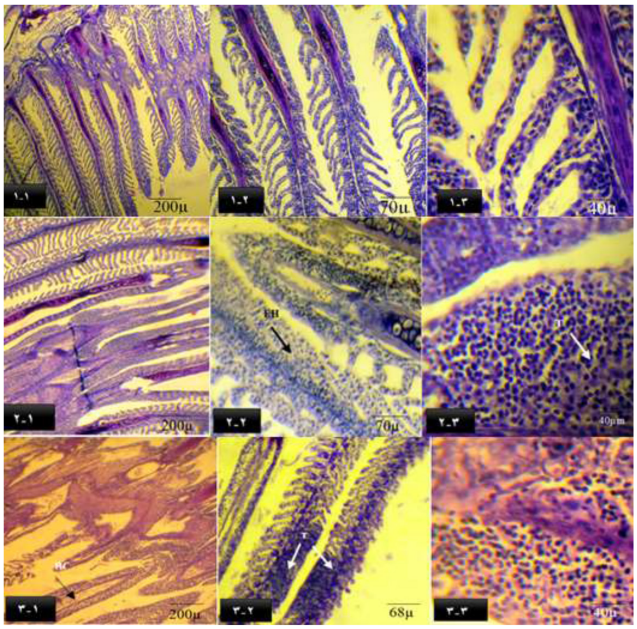
تحقیق حاضر طی ٤٢ روز و در دو دوره ۲۱ روزه انجام گرفت. طی دوره اول تعویض آب به میزان ۸۰% در دو نوبت صبح و عصر انجام شد. در این مدت تغذیه ماهیان به صورت یک درصد وزن بدن بعد از تعویض آب صورت گرفت. بعد از پایان این دوره از مجموع ۱۵ قطعه ماهی موجود در هر تانک تعداد ٦ قطعه در پایان روز ۲۱ نمونه برداری صورت گرفت و مابقی ماهیان به مدت ۲۱ روز دیگر در آب فاقد نانو ذره مس نگهداری شدند و در پایان دوره، نمونه برداری از آبشش ماهیان مشابه مرحله اول صورت گرفت. شایان ذکر است که ویژگی های فیزیکوشیمیایی آب مورد استفاده شامل دما (17 °C)، اکسیژن محلول (۸/٥ mg/l)، پی اچ (۷/۸) و سختی (275 mg/l CaCO3) برای پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان مناسب بود (Roque d'orbcastel et al., 2009).

بررسی های بافت شناسی

به منظور مطالعات بافت شناسی ٦ قطعه از بچه ماهیان به صورت تصادفی انتخاب و از بافت آبشش آن ها نمونه برداری صورت گرفت (Song et al., 2015). نمونه های فوق ابتدا به مدت ۷۲-٤۸ ساعت در محلول بوئن تثبیت و سپس به الکل اتانول ۷۰% منتقل و تا زمان انجام مطالعات بافت شناسی در محلول مزبور نگهداری گردیدند. سپس ادامه آماده سازی بافت طبق روش پوستی (۱۳٦۸) صورت گرفت و لام های آماده شده بعد از رنگ آمیزی به روش هماتوکسیلن- ائوزین (H&E) تهیه و آسیب های احتمالی با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت (Rajkumar et al., 2016).



شکل ۱: نتایج بافت شناسی آبشش مرحله اول مطالعه: ۱-۱، ۱-۲، ۱-۳ تیمار ۱ (گروه شاهد): آبشش طبیعی، ۲-۱، ۲-۲، ۲-۳ تیمار ۲ (۲۵ µg/l): کاهش طول رشته های آبششی، هایپرپلازی، تجمع خون و تلانژکتازی، ۳-۱،۳-۲،۳-۳ تیمار ۳ (۵۰µg/l): تجمع خون، هایپر پلازی اپیتلیال، افزایش فضا بین لاملاها و کاهش طول رشته های آبششی.(Telangiectasias)T: تلانژکتازی،(EH: Epitellial Hyperpellasia) هایپر پلازی اپی تلیال و(Blood Congestion) BC: تجمع خون.



شکل ۲: نتایج بافت شناسی آبشش مرحله دوم مطالعه: ۱-۱، ۱-۲، ۱-۳ تیمار ۲ (گروه شاهد): آبشش طبیعی، ۲-۱، ۲-۲، ۲-۳ تیمار ۲ (۲۵µg/l): کاهش طول رشته های آبششی همراه با هایپرپلازی اپی تلیوم و تجمع خون به صورت خفیف، ۳-۱،۳-۲،۳-۳ تیمار ۳ (۵۰µg/l): هایپرپلازی اپیتلیوم همراه با تجمع خون و خون ریزی در رشته های آبششی.

بحث و نتیجه گیری

فلزات، به خصوص فلزات سنگین، از جمله آلاینده های مهم محیط های آبی در مقیاس جهانی به شمار می روند. فلزات می توانند در موجودات آبزی (برای مثال انواع گونه های ماهیان)، آب و رسوبات تجمع یافته و سرانجام سبب ایجاد آسیب های بافتی، تغییر رفتار، رشد، تغییر در میزان بیان ژن ها و فعالیت آنزیم ها گردند(Luoma and Rainbow, 2008). محیط داخلی بدن ماهی به وسیله اپی تلیوم آبشش از محیط خارجی آن جدا می شود. آبشش ماهی در تماس مستقیم با محیط بوده و عموما به عنوان شاخص زیستی مناسب جهت مطالعه کیفیت آب مد نظر بوده و الگویی برای مطالعه اثرات زیست محیطی محسوب می شود(Velmurugan et al., 2007). مس می تواند در کارکردهای تنفسی و تنظیم یونی آبشش ماهیان اختلال ایجاد نماید. شواهد حاکی از آنست که رویارویی ماهی با نانو ذرات منجر به آسیب های مختلف بافتی در آبشش ها می شود (Griffitt et al., 2007; Al-Bairuty et al., 2013). در رویارویی ماهی قزل آلای رنگین کمان با سولفات مس با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در لیتر به مدت یک هفته، تغییر شکل سلول های کلراید، جداشدن لایه پایه اپی تلیوم تیغه های ثانویه آبششی گزارش شده است (Arellano et al,.1999). همچنین مس موجود در آب، بعد از ۲۱ روز موجب اتساع شدید عروق در محور لاملاهای آبششی ماهی قزل آلای رنگین کمان شده است (Handy,2003). تأثیر سمیت حاد سولفات مس بر آبشش و کبد بچه تاسماهیان ایرانی *(Acipenser persicus)* نیز مورد مطالعه قرار گرفته است و هایپرپلازی و چسبندگی لاملای ثانویه، حجیم شدن غضروف های پشتیبان، ترشحات موکوسی، هایپرتروفی و پرخونی لاملاها مشاهده شده است (مشتاقی،۱۳۹۱). در مطالعه ای دیگر Shaw و Handy (2006) اثر نانو ذره مس و سولفات مس را بر بافت آبشش ماهی تیلاپیای نیل بررسی کردند که در هر دو گروه هایپرپلازی، انوریسم و نکروز در تیغه های ثانویه قابل مشاهده بود. باقرزاده لاکانی و همکاران (۱۳۹۳) نیز در پژوهشی آسیب شناسی نانو ذره مس بر بافت آبشش بچه ماهیان قزل آلای رنگین کمان را به مدت ۱۰ روز بررسی نمودند و هایپرپلازی، کوتاه شدن رشته اولیه و خونریزی نکروز، دژنرسانس آبکی و به هم چسبیدن رشته های ثانویه، تورم اپی تلیوم لایه پایه رشته های ثانویه آبششی، کوتاه شدن رشته ثانویه و از بین رفتن رشته ثانویه را گزارش کردند. نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داد در تیمار شاهد که فاقد نانو ذره بود آبشش دارای ساختار طبیعی می-باشد و

با افزایش غلظت نانو ذره مس آسیب های بافتی وارده بر آن افزایش یافت. در تیمار ۲۵ میکرو گرم در لیتر کاهش طول رشته های آبششی، هایپر پلازی، تلانژکتازی و در تیمار ۵۰ میکرو گرم در لیتر هایپرپلازی اپی تلیال همراه با کاهش طول رشته های آبششی و خونریزی شدید، افزایش فضای بین لاملاها، تخریب اپیتلیال در رشته های آبششی ثانویه مشاهده شد. نتایج پژوهش حاضر در مقایسه با مطالعاتی که در بالا به آنها اشاره شد دارای تفاوت ها و شباهت هایی می باشد که ممکن است تفاوت ها به دلیل تفاوت در غلظت نانو ذره، مدت زمان در معرض قرار گیری، گونه و یا سن ماهی مورد آزمایش باشد. در اکثر مطالعات از جمله در مطالعه حاضر، هایپرپلازی، اتساع و خونریزی عروقی و کاهش طول رشته های آبششی به عنوان مهمترین آسیب های بافتی در آبشش گزارش شده است. هایپرپلازی رشته های آبششی بیشتر یک پاسخ بلند مدت در سلول های آبششی است که اغلب در غلظت های کم آلاینده ها همچون فلزات سنگین مشاهده می شود. به نظر می رسد این موضوع ناشی از عدم توانایی سلول ها در پوسته پوسته و تفکیک شدن -باشد که به افزایش تقسیم سلولی یا میتوزی می انجامد(Schreck and,1990 Moyle). فرآیند اتساع و پرخونی عروق در آبشش، پاسخ حاد و سریع نسبت به حضور آلاینده ها در محیط آبی تلقی می شود که در نتیجه تخریب سلول های پیلار آبشش پدید می آید. تخریب سلول های پیلار ناشی از جریان شدید خون به درون تیغه های آبششی و یا در اثر تماس مستقیم آلاینده ها با این سلول ها می باشد (Roberts, 2001).

یکی دیگر از اهداف تحقیق حاضر بررسی امکان ترمیم آسیب ها پس از حذف نانو ذره از محیط آب بود. بدین منظور آسیب های بافتی در آبشش بچه ماهیان، بعد از ۲۱ روز دوره بهبودی مورد بررسی قرار گرفت. در این مرحله آسیب های مشاهده در مرحله قبل به صورت خفیف مشاهده شد، با این وجود اثرات مواجهه با نانو ذره هنوز به طور کامل از بین نرفت. مطالعات محدودی اثر دوره بهبودی را مورد بررسی قرار داده اند. Arellano و همکاران (1999) ماهی کفشک سنگالی *(Solea senegalensis)* را به مدت ۷ روز در معرض مس با دوز ۱۰۰ میکروگرم در لیتر قرار داده و تغییرات بافتی آبشش را بعد از ٤ روز دوره بهبودی مورد مطالعه قرار دادند. طی این ٤ روز آسیب های بافت آبشش با تغییراتی همراه بود، به این ترتیب که تعداد سلول های کلراید پایه تیغه های ثانویه آبشش از گروه شاهد و گروه های آلوده بیشتر بود و طی این مدت همچنین از میزان تجمع مس در آبشش ها به مقدار جزئی کاسته شد. در بررسی حاضر نیز

پس از دوره بهبودی شدت آسیب های بافت آبشش کاهش یافت اما نوع آسیب ها مشترک بود. با توجه به نتایج حاصل می توان بیان نمود که دو غلظت نانو ذره مورد استفاده در مرحله اول مطالعه اثرات مخربی در بافت آبشش داشته است، اما در مرحله دوم مطالعه علیرغم بهبود شرایط محیطی اثرات مخرب نانو ذره همچنان قابل مشاهده بود. به نظر می رسد اثرات نانو ذره مس بر آبشش های ماهی قزل آلای رنگین کمان حداقل در غلظت های مورد مطالعه و شرایط به کار رفته در این بررسی، به سادگی توسط ماهی حتی پس از بهبود شرایط محیطی ماهی قابل ترمیم نیست. این نتایج می تواند نشان دهنده لزوم توجه به کاربرد نانوذرات و مدیریت استفاده از آن ها جهت حفظ بوم سازگان های آبی و ذخایر آبزیان بویژه گونه های در معرض خطر باشد. نتایج مطالعه حاضر و مطالعات پیشین نشان می دهد که بافت شناسی ابزار موفقی برای آشکار نمودن صدمات حاصل از فلزات سنگین در محیط زیست و موجودات زنده آبزی است. مطالعات آسیب شناسی بافت آبشش می تواند به عنوان ابزار ساده و مناسبی جهت ارزیابی تأثیر سموم در ماهیان به کار رود. به هر حال پیشنهاد می شود تحقیقات جامع در مورد تاثیر طولانی مدت نانوذرات بر انسان و محیط زیست مدنظر قرار گیرد تا بستر مناسبی برای کاربرد عاقلانه فناوری نانو پدید آید. پژوهشگران حوزه نانوفناوری و زیستی جهت کاربردهای پزشکی و دارویی، تصمیم گیران تجاری، متخصصان محیط زیست و قانون گذاران بایستی با تشکیل گروه های پژوهشی میان رشته ای در صدد پیش بینی اثرات نانوذرات و مدیریت جنبه های جهانی افزایش ورود نانوذرات به محیط زیست بر آیند.

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه به دلیل حمایت مالی این طرح تشکر و قدردانی به عمل می آید.

منابع

باقرزاده لاکانی، ف.، مشکینی، س.، حب نقی، ر. مولایی، ر. (۱۳۹۳) آسیب شناسی اثرات سطوح مختلف نانوذره مس بر بافت آبشش بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). دومین کنفرانس ملی ماهی شناسی ایران، تهران. ۲۲۶-۲۲۵.

پوستی، ا. (۱۳٦۸) بافت شناسی مقایسه ایی و هیستوتکنیک. چاپ اول. انتشارات دانشگاه تهران. ۵۱۹ صفحه.

خبازی، م. هرسیج، م.، هدایتی، ع. ا.، گرامی، م. ح.، غفاری فارسانی، ح. (۱۳۹٤) تأثیر غلظت‌های تحت کشنده‌ی فلز مس (*CuSO*٤) در پارامترهای هماتولوژیک خون قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله بوم شناسی آبزیان ٤ (٤) :۱-۷.

ستاری، م. (۱۳۹۱) بهداشت و بیماری های آبزیان. انتشارات حق شناس، ۷۳٦ صفحه.

صبوری، ع.ا. عطری، م. (۱۳۹۰) اکسیژن و تکامل حیات. انتشارات دانشگاه تهران، ۲٤٤ صفحه.

مشتاقی، ع.ا. (۱۳۹۱) مروری بر تحقیقات انجام شده در ارتباط با اهمیت روی در سیستم های بیولوژیکی. دو ماهنامه علمی-پژوهشی فیض ۷ (۱٦): ۷۳۳-۷۳٤.

Agarwal, M., Murugan, M.S., Sharma, A., Rai, R., Kamboj, A., Sharma, H. and Roy, S.K. (2013) Nanoparticles and its toxic effects: A review. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 2(10): 76-82.

Arellano, J.M., Sarasquete, C. and Storch, V. (1999) Histological Changes and Copper Accumulation in Liver and Gills of the Senegales Sole, (*Solea senegalensis*). Ecotoxicology and Environmental Safety 44(3): 62-72.

Al-Bairuty, G.A., Shaw, B.J., Handy, R.D. and Henry, T.B. (2013) Histopathological effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on the organs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic Toxicology 126(20): 104–115.

Chan, W.C.W. (2006) Biotechnology progress and advances. Biology of Blood and Marrow Transplantation 12(5): 87-91.

Chen, X. and Schluesener, H.J. (2008) A nanoproduct in medical application. Microchimica Acta 176(1): 1-12.

Elsaesser, A. and Howard, C. V. (2012) Toxicology of nanoparticles. Advanced Drug Delivery Reviews 64(2):129-137.

Ferraris, R.P., Tan, J.D. and Delacruz, M.C. (1987) Development of the digestive tract of Milkfish, (*Chanos chanos*). Aquaculture 61(5): 241-257.

Figueiredo-Fernandes, A., Fernandes, A., Carrola, J., Ferreira-Cardoso, J.V., Fontaínhas- Fernandes, A., Garcia-Santos, S., Matos, P. and Monteiro, S.M. (2007)Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. Pesticide Biochemistry and Physiology 27(3): 103-109.

Griffitt, R. J., Weil, R., Hyndman, K. A., Denslow, N. D. Powers, K., Taylor, D. and Barber, D. S.

(2007) Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in zebrafish (*Danio rerio*). Environmental Science & Technology 41(23), 8178-8186.

Grosell, M.H., Hogstrand, C.M. and Wood, C.M. (1998) Renal Cu and Na excretion and hepatic Cu metabolism in both Cu acclimated and non acclimated rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Aquatic Toxicology 40(1): 275-291.

Grosell, M., Blanchard, J., Brix, K.V. and Gerdes, R. (2007) Physiology is pivotal for interactions between salinity and acute copper toxicity to fish and invertebrates. Aquatic Toxicology 84(3): 162–172.

Handy, R.D. (2003) Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological process? Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular Marine Biology and Biotechnology 135(4): 25–38.

Heerden, D.V., Andre Vosloo, A. and Nikinmaa, M. (2004) Effects of short-term copper exposure on gill structure, metallothionein and hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α) levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic Toxicology 69(3): 271-280.

Kagan, V.E., Bayir, H. and Shvedova, A.A. (2005) Nanomedicine and nanotoxicology: two sides of the same coin. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine 1(1): 313.

Luoma, S.N. and Rainbow, P.S. (2008) Sources and cycles of trace metals. In: Metal Contamination in Aquatic Environments. Science and Lateral Management 573P.

Mazon, A.F. Cerqueira, C.C.C. and Fernandes, M.N. (2002) Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical freshwater fish (*Prochilodus scrofa*). Environmental ResearchSection J with Mailing Instructions 88(3): 52-63.

Nakamura, S., Li, H., Adijiang, A. Pischetsrieder, and Niwa, T. (2007) Pyridoxal phosphate prevents progression of diabetic nephropathy. Nephrology Dialysis Transplantation 22: 2165-2174.

Perello, M. (2013) Effects of direct and dietary exposure to silver nanoparticles on a tritrophic system. Proceedings of the National Conference on Undergraduate Research (NCUR), University of Wisconsin La Crosse 117-124.

Rajkumar, K. S., Kanipandian, N. and Thirumurugan, R. (2016) Toxicity assessment on haemotology, biochemical and histopathological alterations of silver nanoparticles-exposed freshwater fish *Labeo rohita*. Applied Nanoscience 6(1): 19-29.

Roberts, R.J. (2001) Fish Pathology. London, Saunders 472p.

Roque d'orbcastel, E., Blancheton, J. P. and Belaud, A. (2009) Water quality and rainbow trout performance in a Danish Model Farm recirculating system: Comparison with a flow through system. Aquacultural Engineering 40(3): 135-143.

Schreck, C.B. and Moyle, P.B. (1990) Methods for Fish Biology. Maryland: American Fisheries

Society 491-525.

Shaw, B.J. and Handy, R.D. (2006) Dietary copper exposure and recovery in Nile tilapia, (*Oreochromis niloticus*). Aquatic Toxicology 76(6): 111–121.

Shaw, B.J. and Handy, R.D. (2011) Physiological effects of nanoparticles on fish: a comparison of nanometals versus metal ions. Environment International 37(2): 1083–1097.

Shaw, B.J., Al-Bairuty, G. and Handy, R. D. (2012) Effects waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): Physiology and accumulation. Aquatic Toxicology 116: 90– 101.

Song, L., Vijver, M. G., Peijnenburg, W. J., Galloway, T. S. and Tyler, C. R. (2015) A comparative analysis on the in vivo toxicity of copper nanoparticles in three species of freshwater fish. Chemosphere 139, 181-189.

Tee, J. K., Ong, C. N., Bay, B. H., Ho, H. K. and Leong, D. T. (2015) Oxidative stress by inorganic nanoparticles. WIREs Nanomed Nanobiotechnol. doi: 10.1002/wnan.1374.

Velmurugan, B., Selvanayagama, M., Cengiz, E.I. and Unlu, E. (2007) Histopathology of lambdacyhalothrin on tissues(gill, kidney, liver and intestine) of (*Cirrhinus mrigala*). Environmental Toxicology and Pharmacology 24(3): 286–291.

Viarengo, A. (1989) Heavy metals in marine invertebrates: Mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. Aquaculture Science 40(1): 295-317.

Xiong, J., Wang, Y., Xue, Q. and Wu, X. (2011) Synthesis of highly stable dispersions of nano-sized copper particles using L-ascorbic acid. Green Chemistry 13(4): 900–904.

Yah, C. S., Iyuke, S. E. and Simate, G. S. (2011) A Review of Nanoparticles Toxicity and Their Routes of Exposures. Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences 8(1): 299-314.

Zhou, C., Vitiello, V., Casals, E., Puntes, V.F., Iamunno, F., Pellegrini, D., Changwen, W., Benvenuto, G. and Buttino, I. (2016) Toxicity of nickel in the marine calanoid copepod *Acartia tonsa*: Nickel chloride versus nanoparticles. Aquatic Toxicology 1701-12.