

# بررسی اثرات جداگانه و همزمان نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم (TiO<sub>2</sub>) و نانو ذرات اکسید روی (ZnO) بر آسیب شناسی بافت آبشش ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

حنانه رضائیان، کامران رضایی توابع\*، علیرضا میرواقفی

گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۰۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۲۴

## چکیده

اخیراً، با افزایش استفاده از نانو ذرات، نگرانی‌هایی در ارتباط با اثرات آن‌ها بر محیط زیست خصوصاً اکوسیستم‌های آبی ایجاد کرده است. از آن‌جا که آبشش ماهیان دارای موقعیت خارجی و دارای سطح تماس وسیع با آب است در نتیجه به‌طور مستقیم با آلاینده‌ها و سموم در تماس است. بدین‌منظور بررسی تغییرات ایجاد شده روی بافت آبشش شاخص مناسبی برای ارزیابی اثرات آلاینده‌ها به‌شمار می‌آید. در این پژوهش به‌منظور مطالعه اثرات مجزا و متقابل نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم (TiO<sub>2</sub>) و اکسید روی (ZnO) بر روی آسیب‌شناسی بافتی آبشش ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) به‌اجرا درآمد. برای این تحقیق، ماهیان کپور معمولی انگشت قد با میانگین وزن  $15 \pm 3$  گرم به ۹ گروه (با سه تکرار) با تراکم ده قطعه در هر مخزن ۳۰۰ لیتری تقسیم شدند. براساس غلظت‌های تحت‌کشنده، تیمارها به‌صورت ۰ (تیمار شاهد)، ۰/۵، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات اکسید روی ۳، ۶ و ۹ میلی‌گرم در لیتر دی‌اکسید تیتانیوم و غلظت‌های ترکیبی، غلظت‌های نانو ذرات اکسید روی و دی‌اکسید تیتانیوم به‌ترتیب ۰/۵ و ۱/۵، ۳ و ۶، ۲ و ۹ میلی‌گرم از هر یک از این نانو ذرات در نظر گرفته شد. نمونه‌های بافت آبشش کپور ماهیان بعد از چهارده روز قرارگیری به‌صورت جداگانه و همزمان در معرض نانو ذرات اکسید روی، دی‌اکسید تیتانیوم برداشت شد. تغییرات بافت‌شناسی در بافت آبشش نمونه‌ها در مواجهه به‌طور جداگانه و همزمان نانو ذرات اکسید روی، دی‌اکسید تیتانیوم مشهود بود. در صورتی که تغییری در نمونه‌های شاهد مشاهده نشد. تغییرات مشاهده شده در نمونه‌های مواجه یافته با نانو ذرات اکسید روی شامل هایپرپلازی، جوش خوردگی رشته‌های آبششی، خمیدگی رشته‌های آبششی، برآمدگی و پیچ خوردگی لایه اپیتلیال، ازهم‌گسیختگی لایه اپیتلیال، کوتاه‌شدگی رشته‌های آبششی ثانویه و همچنین تخریب رشته‌های آبششی ثانویه بود که با افزایش غلظت مصرفی این تغییرات بیشتر مشاهده شد. نمونه‌های مواجه شده با نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم پرخونی، ازدیاد سلول‌های اپیتلیال و تخریب رشته‌های آبششی ثانویه نشان داد. بافت آبشش در معرض نانو ذرات اکسید روی، آسیب بیشتری نسبت به نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم نشان داد. همچنین نمونه‌های که به‌طور همزمان در مواجهه با نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم و اکسید روی قرار گرفتند تغییراتی از جمله پرخونی، هایپرپلازی، جوش خوردگی رشته‌های آبششی، خمیدگی رشته آبششی، برآمده شدن لایه اپیتلیال، ازهم‌گسیختگی لایه اپیتلیال، کوتاه‌شدگی رشته‌های آبششی ثانویه و ازدیاد سلول‌های اپیتلیال را نشان دادند. با توجه به نتایج مشاهده شد که نانو ذرات اکسید روی دارای اثرات مخرب‌تری نسبت به نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم بوده است. در حالی که این آسیب‌های ایجاد شده به بافت آبشش در هنگام مواجه همزمان نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم و اکسید روی شدت بیشتری پیدا می‌کند و دارای اثر متقابل هستند.

**کلید واژگان:** کپور معمولی، بافت‌شناسی، نانو ذرات، دی‌اکسید تیتانیوم

## مقدمه

در سال‌های اخیر، نانو فناوری، به‌عنوان یکی از جدیدترین فناوری‌های بشری، از ادغام علوم مختلفی مانند شیمی، زیست‌شناسی و فیزیک به‌وجود آمده است. این فناوری دارای خصوصیات از جمله انحلال‌پذیری، تحرک بسیار زیاد در بدن انسان و توانایی نفوذ به غشای سلولی است که باعث شده است مقیاس نانو، بیش از مقیاس‌های دیگر، مورد توجه قرار گیرد. با در نظر گرفتن خصوصیات خاص این گروه از مواد، این ذرات دارای توانایی برهم‌کنش با اجزایی زیستی را دارا بوده و اثرات زیادی بر سلول‌ها و بدن موجودات زنده بر جای خواهند گذاشت (Revell, 2006). این فناوری در گستره وسیعی از علوم و صنایع مختلف مانند الکترونیک، پزشکی، داروسازی، لوازم آرایشی و بهداشتی، تولید انرژی، محیط زیست، کاتالیزورها و غیره مورد استفاده قرار می‌گیرد (Chaudhry et al., 2006; Heinlaan et al., 2008; Klaine, Alvarez et al., 2008; Song, Hwang et al., 2010). استفاده از نانو ذرات به‌علت داشتن ویژگی‌های خاص خود (نفوذ در غشای سلولی و حلالیت بالا)، می‌تواند اثرات زیان‌باری روی محیط و سلامت انسان داشته باشد (Shaw and Handy, 2011). به‌عنوان مثال، از آنجا که آبزیان از طریق آب و غذا ممکن است در معرض نانو ذرات قرار گیرند، هر آلاینده‌ای که در محیط آبی، فیزیولوژی، توسعه و تکامل، رشد و بقای موجود آبی را تحت تأثیر قرار دهد، به‌تبع آن انسان را (رأس زنجیره غذایی قرار دارد) تحت تأثیر قرار خواهد داد. علاوه بر این، نانو ذرات اکسیدهای فلز به‌دلیل داشتن کاربردهای بالقوه‌ای از جمله استفاده در تصفیه فاضلاب‌ها و استفاده در صنایع آرایشی و بهداشتی که دارند مورد توجه قرار می‌گیرند (Heinlaan et al., 2008).

با توجه به اینکه در ماهیان آبشش به‌عنوان اولین مکان بعد از پوست در مقابل آلاینده‌ها و سموم در مواجهه مستقیم قرار دارد، بررسی تغییرات ایجاد شده در بافت آبشش به‌عنوان یک شاخص مناسب برای بررسی اثرات این آلاینده‌ها تحت شرایط استرس شناخته شده است (Bello and Isaacs, 2010). آبشش ماهی‌ها در کنار نقش‌های مهمی که دارد در فعالیت تنفس، تنظیم اسمزی و فعالیت‌های مربوط به دفع مواد زاید نقش اساسی دارد (Bais and Lokhande, 2012). به‌همین دلیل دارای سطح وسیع و لایه اپیتالی نازک است و یکی از مسیرهای اولیه برای ورود و جذب آلاینده‌ها

و موادی نظیر نانو ذرات به بدن ماهی هستند، که به‌عنوان مدل‌هایی برای انجام مطالعات اثرات زیست‌محیطی بکار می‌روند (Mallatt, 1985; Martinez et al., 2004, Ogueji et al., 2013). بنابراین یکی از روش‌های مفید برای ارزیابی چگونگی اثرگذاری آلاینده‌ها، بررسی تغییرات بافت آبشش است. با توجه به کاربردهای فناوری نانو در صنایع مختلف، نیاز به مطالعات بیشتر در زمینه تأثیرات این روش بر سلامت انسان و محیط‌زیست احساس می‌شود. بنابراین مطالعه حاضر به‌منظور بررسی آسیب‌شناسی بافت آبشش ماهی کپور معمولی در مواجهه همزمان و جداگانه نانو ذرات اکسید روی و اکسید تیتانیوم در غلظت‌های مختلف به‌اجرا درآمد.

## مواد و روش‌ها

**تهیه و گروه‌بندی ماهی‌ها:** در این پژوهش ابتدا تعداد ۳۰۰ قطعه ماهی کپور معمولی انگشت‌قد با وزن میانگین وزنی  $15 \pm 3$  گرم از مراکز تکثیر و پرورش بخش خصوصی از یک مزرعه خصوصی ماهیان گرمابی در اشتهارد کرج خریداری شد و به آزمایشگاه تکثیر و پرورش دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران منتقل گردید. ماهیان پس از انتقال، به‌منظور سازگاری با شرایط آزمایشگاهی به‌مدت دو هفته در آب مخازن سازگاری هوادهی و نگهداری شدند. پس از اتمام دوره سازگاری ماهی‌ها به ۹ گروه (با سه تکرار) با تراکم ده قطعه در هر مخزن تقسیم شده و به مخازن ۳۰۰ لیتری منتقل شدند. طی دوره تطابق، در روز دو بار تغذیه ماهیان با جیره تجاری کپور (شرکت فرادانه شهرکرد) در حد سیری صورت گرفت. غذاهای مصرف نشده طی ۴۵ دقیقه پس از غذادهی با سیفون کردن از کف تانک‌ها حذف شدند تا از آلودگی آب تانک جلوگیری شود.

**تهیه و آماده‌سازی موادشیمیایی:** از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان، نانو ذرات اکسید روی و دی‌اکسید تیتانیوم تهیه شد. به‌منظور تهیه محلول مادر، از پودرهای تهیه شده، سوسپانسیونی ۱ گرم در لیتر نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم و اکسید روی وزن شده و به آن آب مقطر (قطره قطره) اضافه شد تا در نهایت یک خمیر یک‌دست به‌دست آید. بعد آب را آرامی به خمیر اضافه کرده تا به حجم ۲۰ میلی‌لیتر برسد. سپس در دستگاه حمام اولتراسونیک به‌مدت ۳۰ دقیقه در هر نوبت (درکل سه نوبت قرار) داده شد. سپس حجم

سوسپانسیون به‌دست آمده به ۱۰۰۰ سی‌سی رسانده شد و نمونه‌ها را در شیشه‌های تیره به دور از نور به‌دلیل حساسیت به تابش نور در دمای اتاق نگهداری شد.

**آزمایش سمیت تحت کشنده:** بعد از انجام آزمایش‌های اولیه، مقدار سمیت کشنده برای دی‌اکسید تیتانیوم و اکسید روی به‌ترتیب ۱۲/۸۹ و ۳/۱۶ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد. براساس غلظت‌های تحت کشنده، غلظت‌ها به‌صورت صفر (گروه شاهد)، ۰/۵، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر برای نانو ذرات اکسید روی ۳، ۶ و ۹ میلی‌گرم در لیتر برای دی‌اکسید تیتانیوم و غلظت‌های ترکیبی، غلظت‌های نانو ذرات اکسید روی و دی‌اکسید تیتانیوم به‌ترتیب ۰/۵ و ۳، ۱/۵ و ۶ و ۲ و ۹ میلی‌گرم هر یک از این نانو ذرات در نظر گرفته شد. نمونه‌های بافت آبشش کپور ماهیان بعد از چهارده روز قرارگیری در معرض نانو ذرات و ماهیانی که در معرض قرار نگرفتند به‌صورت تصادفی به‌وسیله ساچوک جمع‌آوری شد. سپس به‌منظور تهیه بافت آبشش از نمونه‌ها، در داخل مخازن پلاستیکی حاوی آب همسان با مخزن‌ها که دارای ماده بیهوش کننده گل میخک بود، قرار داده شد و بیهوش شدند. پس از آن، بافت آبشش نمونه‌برداری شد و نمونه‌ها در محلول فرمالین ۱۰ درصد تثبیت گردید. نمونه‌های برداشت شده به‌منظور تهیه مقطع بافتی به‌منظور آسیب‌شناسی بافتی به آزمایشگاه پاتوبیولوژی بیمارستان امام خمینی منتقل شد و بعد از آماده‌سازی بافت‌ها و تهیه بلوک‌های پارافینی، برش‌های بافتی به ضخامت ۵ میکرون تهیه شد سپس با روش هماتوکسیلین ائوزین رنگ‌آمیزی صورت گرفت، لام تهیه و سپس به‌وسیله میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت.

## نتایج

نتایج نشان داد که تغییرات بافت‌شناسی در بافت آبشش ماهیان در مواجهه به‌طور جداگانه و همزمان دی‌اکسید تیتانیوم و نانو ذرات اکسید روی، مشهود بود، در صورتی که تغییری در نمونه‌های شاهد مشاهده نشد و دارای سلول‌های پوششی طبیعی بودند و تغییرات قابل توجه مشاهده نشد (شکل ۱).

**آسیب‌شناسی بافت آبشش در مواجهه با نانو ذرات اکسید روی:** تغییرات مشاهده شده در نمونه‌های در معرض نانو ذرات اکسید روی شامل هایپرپلازی، جوش خوردگی رشته‌های آبششی، خمیدگی رشته آبششی، برآمدگی و پیچ

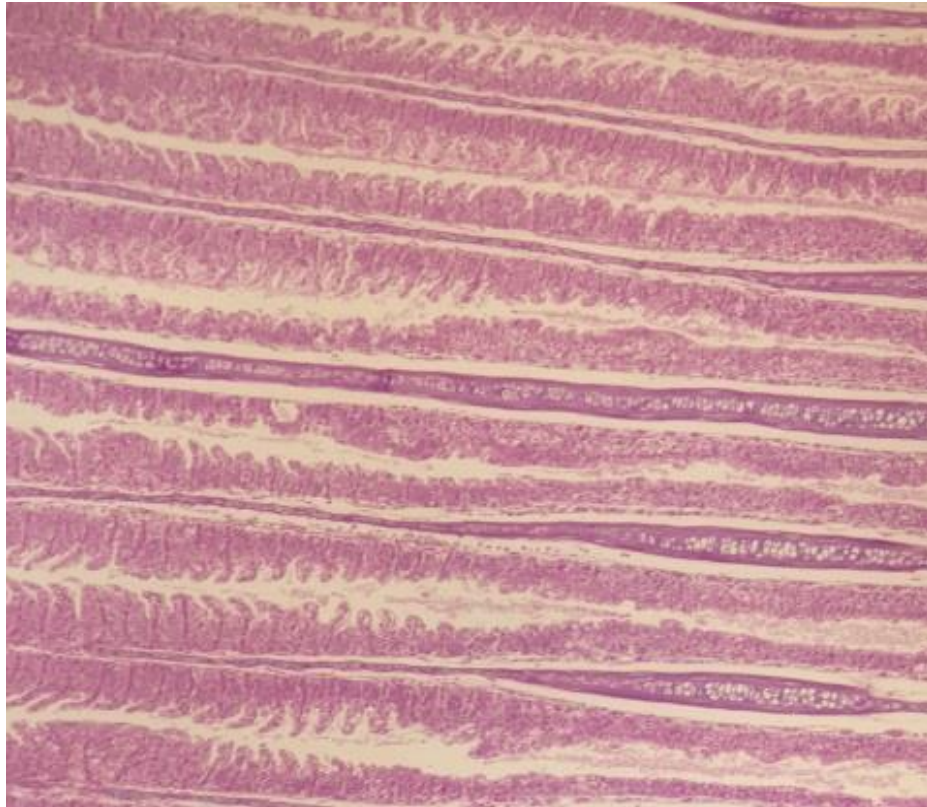
خوردگی و از هم‌گسیختگی لایه اپیتلیال، کوتاه شدگی و تخریب رشته‌های آبششی ثانویه بود که با افزایش غلظت مصرفی این تغییرات بیشتر مشاهده شد (شکل‌های ۴-۲). بیشترین عارضه شامل هایپرپلازی، جوش خوردگی و خمیدگی رشته‌های آبششی که در غلظت مصرفی ۲ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات اکسید روی قابل مشاهده بود.

**آسیب‌شناسی بافت آبشش در مواجهه با نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم:** در ارتباط با نمونه‌های مواجه شده با نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم پرخونی، ازدیاد سلول‌های اپیتلیال و تخریب رشته‌های آبششی ثانویه مشاهده شد (شکل ۷-۵). بافت آبشش در معرض نانو ذرات اکسید روی آسیب بیشتری نسبت به نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم نشان داد. پرخونی، ازدیاد سلول‌های اپیتلیال و تخریب رشته‌های آبششی ثانویه به‌صورت خفیف در نمونه‌های دی‌اکسید تیتانیوم با غلظت مصرفی ۳ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد.

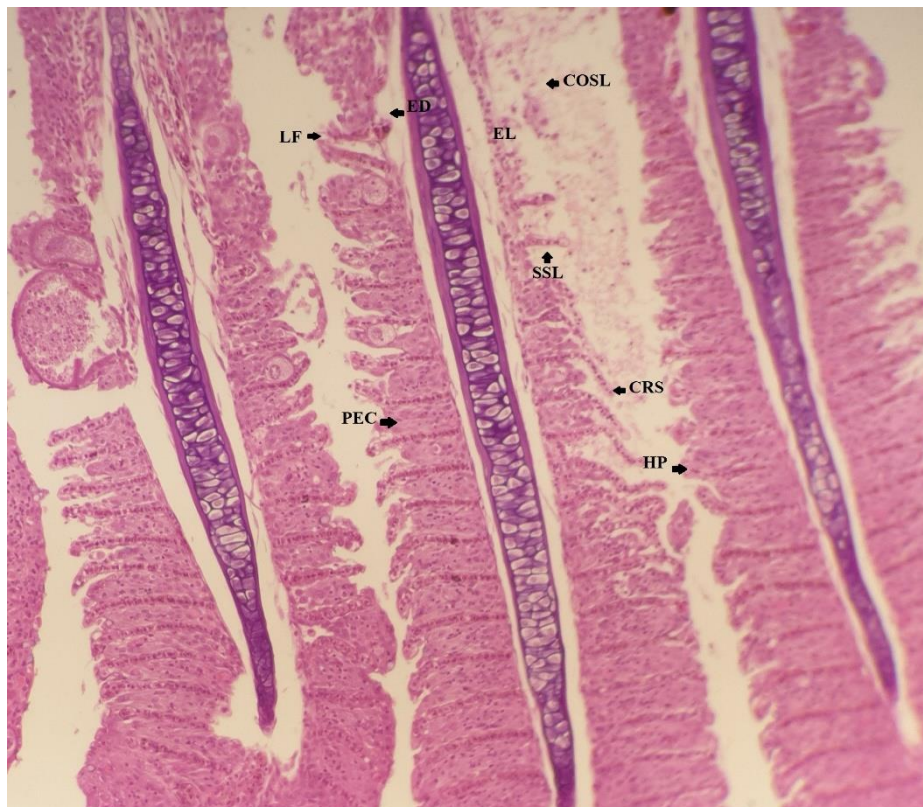
**آسیب‌شناسی بافت آبشش در مواجهه همزمان با نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم و نانو ذرات اکسید روی:** نمونه‌های که به‌طور همزمان در مواجهه با نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم و اکسید روی قرار گرفتند، پرخونی، هایپرپلازی، جوش خوردگی رشته‌های آبششی، خمیدگی رشته آبششی، برآمده شدن و از هم‌گسیختگی لایه اپیتلیال، کوتاه شدگی رشته‌های آبششی ثانویه و ازدیاد سلول‌های اپیتلیال را نشان دادند که با افزایش غلظت‌های مصرفی، بروز تغییرات و آسیب‌های بیشتر در بافت آبشش مشهودتر بود (شکل‌های ۱۰-۸). بیشترین آسیب مشاهده شده بروز پرخونی در بافت آبشش بود (جدول ۱ و شکل ۱۰) که در غلظت مصرفی ۲ میلی‌گرم در لیتر نانو ذره اکسید روی به‌همراه غلظت ۹ میلی‌گرم در لیتر دی‌اکسید تیتانیوم بود. با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان نتیجه گرفت نانو ذرات اکسید روی دارای اثرات مخرب‌تری نسبت به نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم است. در حالی که این آسیب‌ها در هنگام مواجهه همزمان نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم و اکسید روی شدت بیشتری پیدا می‌کنند و این نانو ذرات دارای هم‌افزایی هستند.

## بحث و نتیجه‌گیری

هدف از تحقیق حاضر، مطالعه اثرات مجزا و متقابل نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم و اکسید روی بر روی آسیب‌شناسی بافتی آبشش ماهی کپور معمولی می‌باشد.

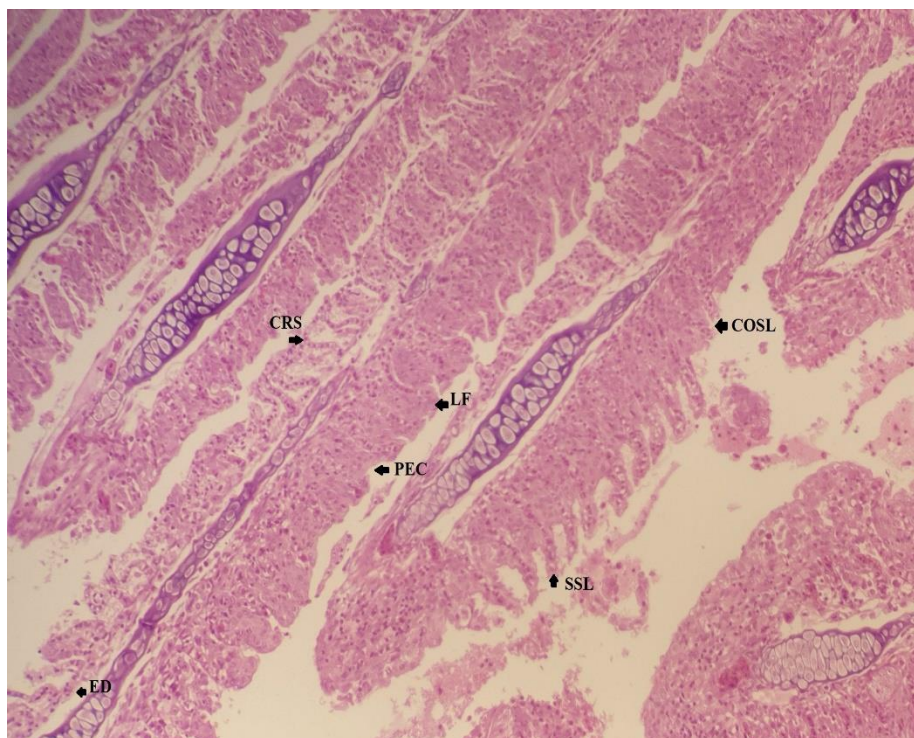


شکل ۱- بافت آبشش نمونه شاهد ماهی کپور معمولی (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اُئوزین)



شکل ۲- جراحات بافت آبشش ماهی کپور معمولی در مواجهه با نانو ذرات اکسید روی (غلظت مصرفی ۵/۰ میلی گرم در لیتر) (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اُئوزین)، جوش خوردگی رشته‌های آبششی (LF) و خمیدگی رشته آبششی (CRS)، برآمده شدن لایه اپیتلیال (EL)، از هم‌گسیختگی لایه اپیتلیال (ED)، کوتاه شدگی رشته‌های آبششی ثانویه (SSL)، ازدیاد سلول‌های اپیتلیال (PEC)، تخریب رشته‌های آبششی ثانویه (COSL) و هایپرپلازی (HP)



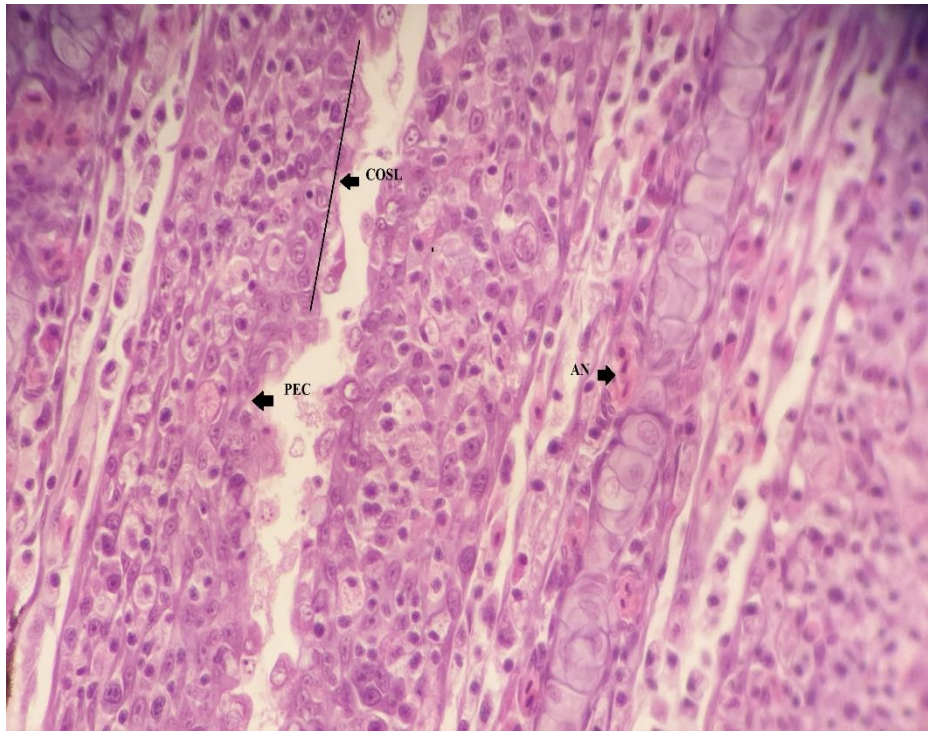


شکل ۳- جراحات بافت آبشش ماهی کپور معمولی در مواجهه با نانو ذرات اکسید روی غلظت مصرفی ۱/۵ میلی گرم در لیتر (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین). جوش خوردگی رشته‌های آبششی (LF)، خمیدگی رشته آبششی (CRS)، از هم گسیختگی لایه اپیتلیال (ED)، کوتاه شدگی رشته‌های آبششی ثانویه (SSL)، ازدیاد سلول‌های اپیتلیال (PEC) و تخریب رشته‌های آبششی ثانویه (COSL) (COSL)

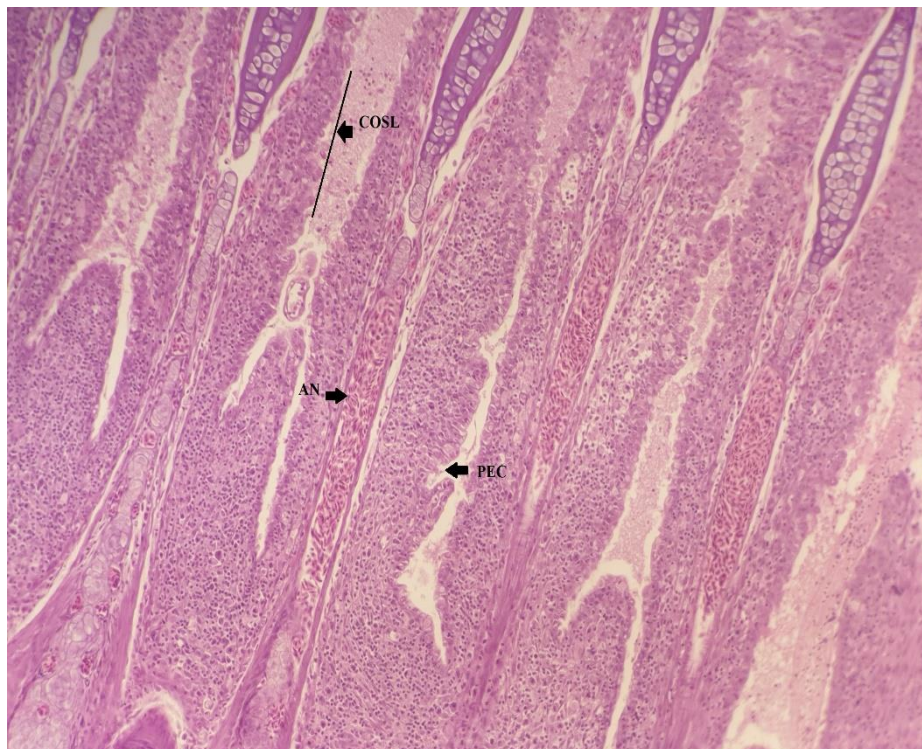


شکل ۴- جراحات بافت آبشش ماهی کپور معمولی در مواجهه با نانو ذرات اکسید روی غلظت مصرفی ۲ میلی گرم در لیتر (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین). هایپرپلازی (HP)، جوش خوردگی رشته‌های آبششی (LF)، خمیدگی رشته آبششی (CRS)، از هم گسیختگی لایه اپیتلیال (ED)، کوتاه شدگی رشته‌های آبششی ثانویه (SSL)، ازدیاد سلول‌های اپیتلیال (PEC) و تخریب رشته‌های آبششی ثانویه (COSL) (COSL)



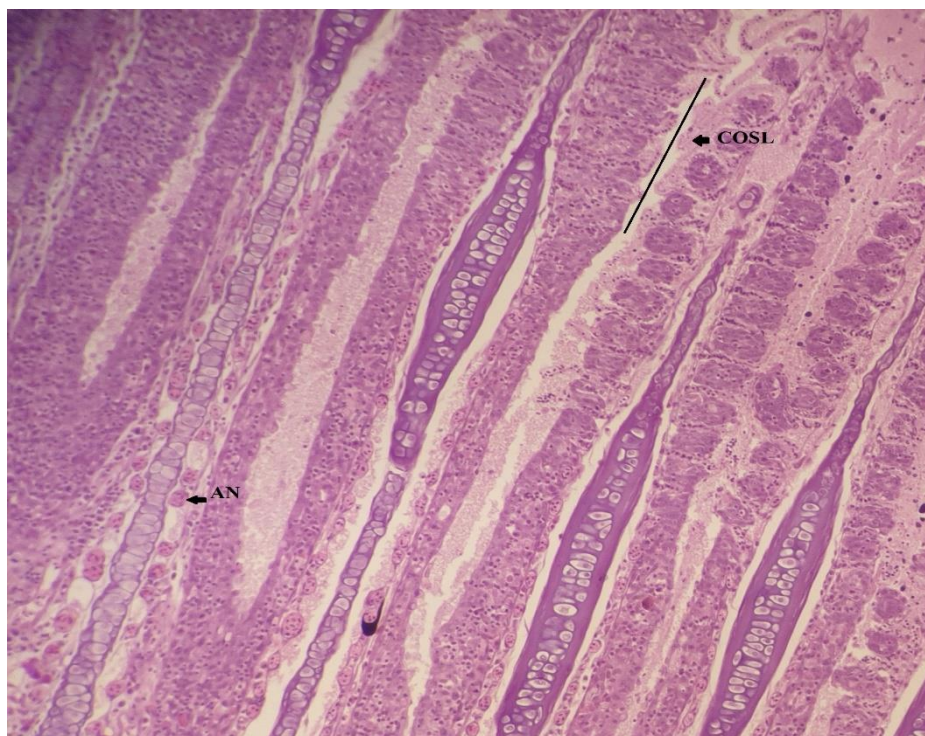


شکل ۵- جراحات بافت آبشش ماهی کپور معمولی در مواجهه با نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم غلظت مصرفی ۳ میلی‌گرم در لیتر (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-آنوزین). پرخونی (AN)، ازدیاد سلول‌های اپیتلیال (PEC) و تخریب رشته‌های آبششی ثانویه (COSL)

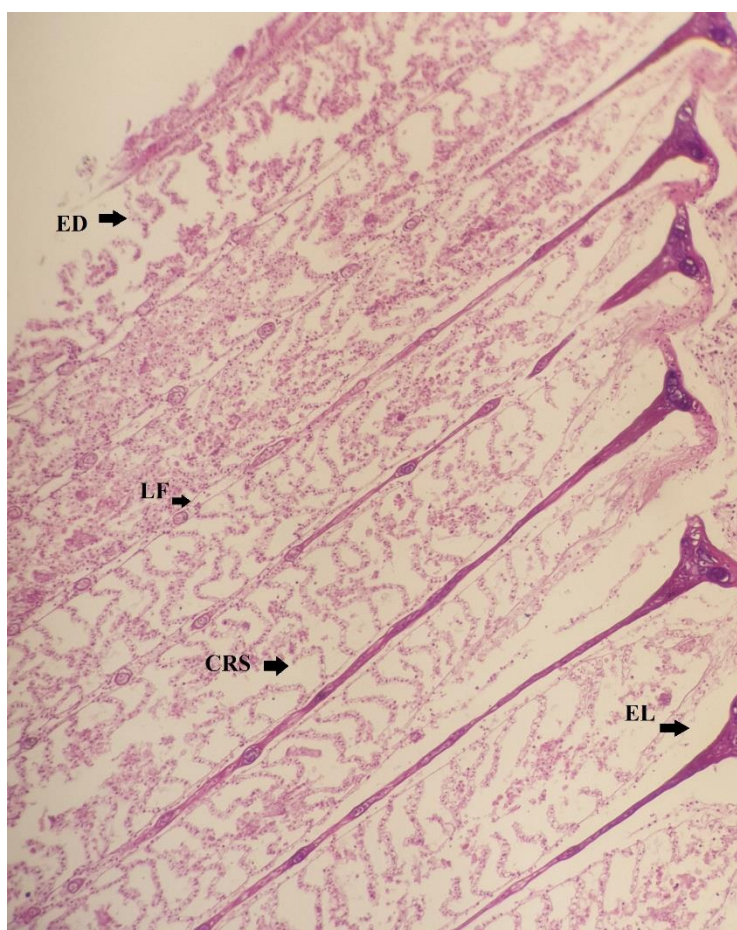


شکل ۶- جراحات بافت آبشش ماهی کپور معمولی در مواجهه با نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم غلظت مصرفی ۶ میلی‌گرم در لیتر (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-آنوزین). پرخونی (AN)، ازدیاد سلول‌های اپیتلیال (PEC) و تخریب رشته‌های آبششی ثانویه (COSL)





شکل ۷- جراحات بافت آبشش ماهی کپور معمولی در مواجهه با نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم (غلظت مصرفی ۹ میلی گرم در لیتر (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین) پرخونی (ANCOSL)

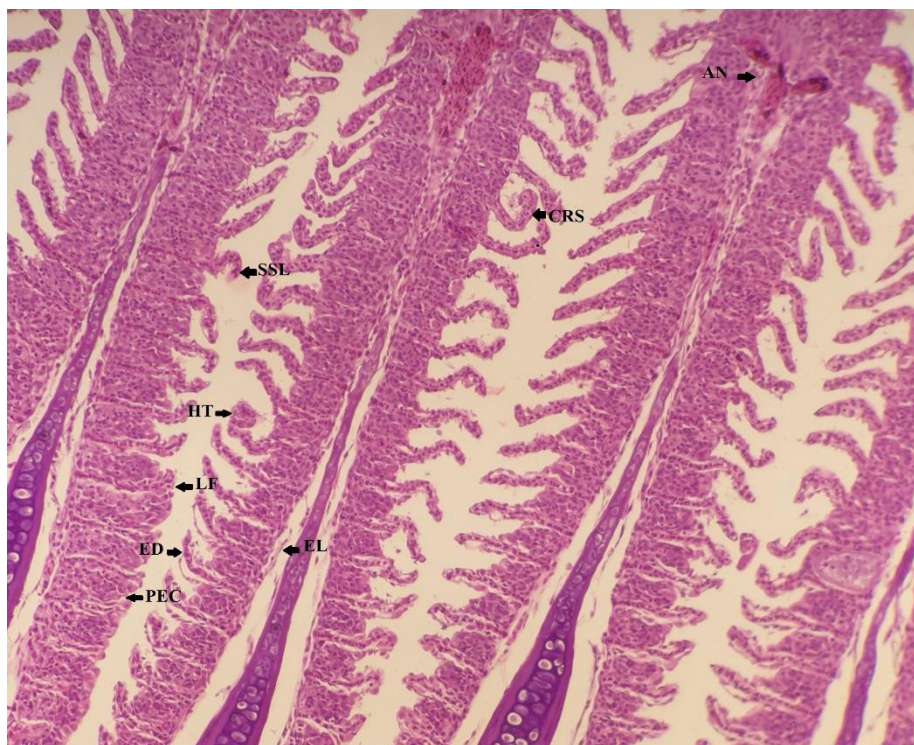


شکل ۸- جراحات بافت آبشش ماهی کپور معمولی در مواجهه همزمان با نانو ذرات اکسید روی غلظت مصرفی ۰/۵ میلی گرم در لیتر و دی‌اکسید تیتانیوم غلظت مصرفی ۳ میلی گرم در لیتر (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- انوزین). جوش خوردگی رشته‌های آبششی (LF)، خمیدگی رشته آبششی (CRS)، برآمده شدن لایه اپیتلیال (EL) و از هم گسیختگی لایه اپیتلیال (ED)





شکل ۹- جراحات بافت آبشش ماهی کپور معمولی در مواجهه همزمان با نانو ذرات اکسید روی غلظت مصرفی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر و دی‌اکسید تیتانیوم غلظت مصرفی ۶ میلی‌گرم در لیتر (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین). جوش خوردگی رشته‌های آبششی (LF)، خمیدگی رشته آبششی (CRS)، از هم‌گسیختگی لایه اپیتلیال (ED) و ازدیاد سلول‌های اپیتلیال (PEC)



شکل ۱۰- جراحات بافت آبشش ماهی کپور معمولی در مواجهه همزمان با نانو ذرات اکسید روی غلظت مصرفی ۲ میلی‌گرم در لیتر و دی‌اکسید تیتانیوم غلظت مصرفی ۹ میلی‌گرم در لیتر (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین). پرخونی (AN)، هایپرپلازی (HP)، جوش خوردگی رشته‌های آبششی (LF)، خمیدگی رشته آبششی (CRS)، برآمده شدن لایه اپیتلیال (EL)، از هم‌گسیختگی لایه اپیتلیال (ED)، کوتاه شدگی رشته‌های آبششی ثانویه (SSL) و ازدیاد سلول‌های اپیتلیال (PEC)



جدول ۱- آسیب‌های بافت آبشش ماهیان کپور معمولی در معرض غلظت ۳، ۶ و ۹ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم، غلظت ۰/۵، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات اکسید روی و غلظت‌های ترکیبی، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات کسید روی و ۳ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم، ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات اکسید روی و ۶ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم، ۲ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات اکسید روی و ۹ میلی‌گرم در لیتر دی‌اکسید تیتانیوم

	کنترل	۳ میلی‌گرم در لیتر $TiO_2$	۶ میلی‌گرم در لیتر $TiO_2$	۹ میلی‌گرم در لیتر $TiO_2$	۰/۵ میلی‌گرم در لیتر $ZnO$	۱/۵ میلی‌گرم در لیتر $ZnO$	۲ میلی‌گرم در لیتر $ZnO$	۰/۵ میلی‌گرم در لیتر $ZnO$ و ۳ میلی‌گرم در لیتر $TiO_2$	۱/۵ میلی‌گرم در لیتر $ZnO$ و ۶ میلی‌گرم در لیتر $TiO_2$	۲ میلی‌گرم در لیتر $ZnO$ و ۹ میلی‌گرم در لیتر $TiO_2$
پرخونی	-	+	-	-	-	-	-	-	-	++++
هایپرپلازی	-	-	-	-	+	++	+++	+	-	+
جوش خوردگی رشته‌های آبششی	-	-	-	-	+	++	+++	+	++	++
خمیدگی رشته آبششی	-	-	-	-	+	++	+++	+	++	++
برآمده شدن لایه اپیتلیال از هم گسیختگی لایه اپیتلیال کوتاه	-	-	-	-	+	+	-	+	-	++
شدگی رشته‌های آبششی ثانویه	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
تخریب رشته‌های آبششی ثانویه	-	+	-	-	+	++	++	-	++	++
تخریب رشته‌های آبششی ثانویه	-	+	++	++	+	++	++	-	-	-

است و دارای سطح تماس وسیعی با آب می‌باشد. بافت آبشش محافظت کمتری نسبت به سایر بافت‌ها دارد بنابراین نسبت به حضور مواد شیمیایی و آلاینده‌ها در محیط بسیار حساس است (Wilson and Laurent 2002). مطالعات مختلفی بیان داشته‌اند که مواد آلاینده می‌توانند اثرات

بررسی نتایج آسیب‌شناسی بافتی می‌توانند اطلاعات مفیدی در مورد تأثیرات مستقیم مواد شیمیایی بر روی اندام‌های مختلف ماهیان در شرایط آزمایشگاهی ارائه دهد. آبشش ماهیان اندامی با عملکردهای متفاوت از جمله تنفس، تنظیم اسمزی، تنظیم تعادل اسید-بازی و دفع ترکیبات نیتروژنی

پژوهش‌های مشابه انجام شده بر روی بافت آبشش در مواجهه با نانو ذرات نقره (Wu *et al.*, 2013)، نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم (Boyle *et al.*, 2013)، نانو ذرات اکسید روی (Linhuo *et al.*, 2009) همخوانی دارد. در مطالعه مشابه دیگری Razmara و همکاران (۲۰۱۴) آسیب‌های بافتی آبشش نظیر آنوریسم لاملایی، پر خونی، به هم چسبیدن تیغه‌های ثانویه آبشش و افزایش موکوس را در مواجهه با نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم را در گونه گربه ماهی (*Ictalurus punctatus*) گزارش کردند (Razmara *et al.*, 2014). این ذرات می‌توانند تعداد سلول‌های پوششی در آبشش ماهیان را افزایش دهند در نتیجه باعث افزایش ترشح موکوس بیشتر بر روی آبشش می‌شوند. در تحقیق دیگری Hoe و همکاران در (۲۰۰۹) که آسیب‌های بافتی مشابهی را در ماهی کپور در مواجهه با نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم گزارش کردند (Hao *et al.*, 2012). همچنین این نتایج با مطالعه انجام شده بر روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مواجهه با نانو ذرات مس نتایج مشابهی عنوان شد (Al-Bairuty *et al.*, 2013). Kanthom و همکاران در (۱۹۹۵) بیان کردند که وجود سموم در محیط، هیپرپلازی و به هم چسبیدگی در آبشش‌ها را باعث می‌شود که باعث تغییر در ترکیب گلیکوپروتئین موجود در سلول‌های موکوسی آبشش می‌شود و بعد از آن نیز به هم چسبیدگی لاملاها اتفاق می‌افتد (Ferguson *et al.*, 1992, Kantham and Richards, 1995). علاوه بر این، زمانی که ماهیان در شرایط استرس‌زا قرار می‌گیرند، در رگ‌های خونی نیز تغییراتی رخ می‌دهد. که با توجه به مطالعات انجام شده این تغییرات ناشی از آسیب‌های وارده به اپیتلیال و رگ‌های خونی می‌باشد و در نتیجه باعث افزایش جریان خون در لاملا، اتساع کانال‌های حاشیه‌ای، خون‌ریزی و حتی در موارد شدید تر آنوریسم شود (McKim and Erickson, 1991; Takashima and Hibiya, 1995). به‌طور کلی تغییرات ایجاد شده در اثر مواجهه با نانو ذرات، در آبشش ماهی به صورت مکانیسم دفاعی برای ممانعت از ورود مواد آلاینده به درون بدن از طریق آبشش به‌منظور جلوگیری از صدمات بیشتر است. پژوهش‌های انجام شده بیان داشته‌اند که نانو ذرات توانایی نفوذ به اندام‌های هدف را دارند و از این طریق در عملکرد اندام‌ها اختلال ایجاد می‌کنند (Revell, 2006). با توجه به نتایج به دست آمده، نانو ذرات اکسید روی دارای

مستقیمی بر روی آبشش ایجاد کنند. آسیب‌های ایجاد شده یک پاسخ دفاعی مستقیم در مواجهه با نانو ذرات می‌باشد. علاوه بر این، کوتاه شدن لامل‌ها و در هم پیچیدگی آن‌ها به‌همراه هیپرپلازی اپیتلیوم ارتباط بین آب و آبشش را کاهش می‌دهد و دارای اثرات مستقیم در فرآیند تنفس و تبادل گازها است (Roberts, 1989). نتیجه چنین شرایطی در حالت شدیدتر و مواجهه طولانی مدت با نانو ذرات، افزایش غیر طبیعی سلول‌ها و در نهایت افزایش ضخامت لایه‌های اپیتلیومی می‌باشد که باعث افزایش ضخامت اپیدرم و پهن شدن تیغه‌ها شده که در نتیجه آن اتصال تیغه‌های آبششی مجاور بروز می‌کند. همچنین کاهش فیلتراسیون و تبادل گازها از جمله اثرات ناشی از آسیب‌های وارده به اپیتلیوم در تیغه‌های آبششی است که با ایجاد فاصله در تیغه‌ها، انتشار گازها و جذب گازها از طریق تیغه‌ها و لامل‌ها مختل می‌شود. به‌عبارتی، هایپرپلازی ایجاد شده در آبشش به‌عنوان یک مکانیسم دفاعی باعث کاهش جذب آلاینده‌ها از طریق آبشش می‌شود (Arellano *et al.*, 1999; Cengiz and Unlu, 2006). در مطالعه حاضر، غلظت‌های مختلف نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم و اکسید روی به‌صورت همزمان در محیط آبشش ماهیان کپور معمولی اثرات مختلفی را ایجاد کردند. در حالی که در غلظت‌های پایین اثراتی یا مشاهده نشد یا خیلی ضعیف بود، غلظت‌های بالا بافت آبشش را تحت تأثیر قرار می‌دهند و علایمی از جمله پرخونی، هایپرپلازی، جوش‌خوردگی رشته‌های آبششی و خمیدگی رشته آبششی را بروز می‌دهند. علاوه بر این، بافت آبشش نسبت به نانو ذرات اکسید روی حساس‌تر بود. همچنین در مواجهه همزمان ماهی با نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم و اکسید روی این آسیب‌ها نسبت به مواجهه به‌صورت مجزا شدیدتر مشاهده شد و همزمانی حضور نانو ذرات آسیب‌های شدیدتری را بر بافت آبشش باعث شده است. علاوه بر این با افزایش غلظت مصرفی نانو ذرات این آسیب‌ها بر روی آبشش نسبت به غلظت‌های پایین‌تر افزایش می‌یابد. اکسید روی با غلظت مصرفی ۲ میلی‌گرم در لیتر و دی‌اکسید تیتانیوم با غلظت مصرفی ۹ میلی‌گرم در لیتر به‌طور همزمان، باعث بروز تمامی آسیب‌های بافتی با شدت بیشتری نسبت به باقی تیمارها شده است و علایمی مانند پرخونی، هایپرپلازی، جوش‌خوردگی رشته‌های آبششی و خمیدگی رشته آبششی را ایجاد می‌کنند. نتایج این مطالعه با



تأثیرات مخرب بافتی و فیزیولوژیک گسترده‌ای بر آبزیان دارد.

### تشکر و قدردانی

این مطالعه بخشی از رساله دکتری نویسنده اول است. بدینوسیله صمیمانه از پرسنل گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی در فراهم کردن تجهیزات تیمارهای آزمایشی و همچنین همکاران آزمایشگاهها جهت همکاری در آنالیزهای آزمایشگاهی و بافت‌شناسی تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

اثرات مخربتری نسبت به نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم بوده است. در حالی که این آسیبهایی ایجاد شده به بافت آبشش در هنگام مواجه همزمان نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم و اکسید روی شدت بیشتری پیدا میکنند و دارای اثر متقابل هستند. بنابراین، پایش مداوم غلظت این دو ماده در طبیعت و به‌خصوص غلظت توأم این مواد در منابع آبی اهمیت زیادی داشته و باید در یک برنامه زمانی مشخصی در منابع آبی مهم و حفاظت‌شده پایش شود، زیرا اثرات متقابل آن‌ها،

### منابع

- Aitken R.J., Chaudhry M.Q., Boxall A.B.A., Hull, M. 2006.** Manufacture and use of nanomaterials: current status in the UK and global trends. *Occupational Medicine* 56(5), 300-306.
- Al-Bairuty G.A., Shaw B.J., Handy R.D., Henry T.B. 2013.** Histopathological effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on the organs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 126, 104-115.
- Arellano J.M., Storch V., Sarasquete C.J.E., Safety E. 1999.** Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the Senegales sole, *Solea senegalensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44(1), 62-72.
- Bais U.E., Lokhande M.V. 2012.** Effect of cadmium chloride on histopathological changes in the freshwater fish *Ophiocephalus striatus* (*Channa*). *International Journal of Zoological Research* 8(1), 23.
- Bello D., Isaacs J.A. 2010.** Safety assessment of nanotechnology products. *Comprehensive Toxicology* (Second Edition). Elsevier Publishing, USA, pp. 53-64.
- Boyle D., Al-Bairuty G.A., Henry T.B., Handy R.D. 2013.** Critical comparison of intravenous injection of TiO<sub>2</sub> nanoparticles with waterborne and dietary exposures concludes minimal environmentally-relevant toxicity in juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Environmental Pollution* 182, 70-79.
- Cengiz E.I., Unlu E. 2006.** Sublethal effects of commercial deltamethrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosquitofish, *Gambusia affinis*: a microscopic study. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 21(3), 246-253.
- Ferguson H.W., Morrison D., Ostland V.E., Lumsden J., Byrne P. 1992.** Responses of mucus-producing cells in gill disease of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Comparative Pathology* 106(3), 255-265.
- Hao L., Chen L. 2012.** Oxidative stress responses in different organs of carp (*Cyprinus carpio*) with exposure to ZnO nanoparticles. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80, 103-110.
- Heinlaan M., Ivask A., Blinova I., Dubourguier H.C., Kahru A. 2008.** Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO<sub>2</sub> to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere* 71(7), 1308-1316.
- Kantham K.P.L., Richards R.H. 1995.** Effect of buffers on the gill structure of common carp, *Cyprinus carpio* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 18(5), 411-423.
- Klaine S.J., Alvarez P.J., Batley G.E., Fernandes T.F., Handy R.D., Lyon D.Y., Lead J.R. 2008.** Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 27(9), 1825-1851.
- Linhua H.A.O., Zhenyu W.A.N.G., Baoshan, X.I.N.G. 2009.** Effect of sub-acute exposure to TiO<sub>2</sub> nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Environmental Sciences* 21(10), 1459-1466.
- Mallatt, J. 1985.** Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical

- review. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 42(4), 630-648.
- Martinez C.B.R., Nagaie M.Y., Zaia C.T.B.V., Zaia D.A.M. 2004.** Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Brazilian Journal of Biology* 64, 797-807.
- McKim J.M., Erickson R.J. 1991.** Environmental impacts on the physiological mechanisms controlling xenobiotic transfer across fish gills. *Physiological Zoology* 64(1), 39-67.
- Ogueji E.O., Usman I.B., Auta J. 2013.** Histopathology of liver and gill of *C. gariepinus*-(Burchell 1822) with swollen abdomen following exposure to acute and sublethal concentrations of chlorpyrifos-ethyl. *International Journal of Basic and Applied Sciences* 2(3), 223.
- Razmara P., Dorafshan S., Peykan Heyrati F., Talebi M., Ranjbar M. 2014.** Effect of water-born colloidal silver nanoparticles and silver nitrate on gill histopathology of Rainbow catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*. *Journal of Aquatic Ecology* 3(3), 18-10.
- Revell P.A. 2006.** The biological effects of nanoparticles. Collegium, 283 p.
- Roberts R.J. 1989.** Fish Pathology, Bailliere Tindall. London, UK.
- Shaw B.J., Handy R.D. 2011.** Physiological effects of nanoparticles on fish: a comparison of nanometals versus metal ions. *Environment International* 37(6), 1083-1097.
- Song M.J., Hwang S.W., Whang D. 2010.** Non-enzymatic electrochemical CuO nanoflowers sensor for hydrogen peroxide detection. *Talanta* 80(5), 1648-1652.
- Takashima F., Hibiya T. 1995.** An atlas of fish histology: normal and pathological features.
- Wilson J.M., Laurent P. 2002.** Fish gill morphology: inside out. *Journal of Experimental Zoology* 293(3), 192-213.
- Wu Y., Zhou Q. 2013.** Silver nanoparticles cause oxidative damage and histological changes in medaka (*Oryzias latipes*) after 14 days of exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32(1), 165-173.



## Investigation of the effects of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) and zinc oxide (ZnO) nanoparticles separately and in combination with histological indices of gill on the Common carp (*Cyprinus carpio*)

Hannaneh Rezaeian, Kamran Rezaei Tavabeh\*, Alireza Mirvaghfi

Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

\*Corresponding author: krtavabe@ut.ac.ir

Received: 14.Jun.2023

Accepted: 26.Aug.2023

### Abstract

In the past years due to increasing use of nanoparticles, concerns have been raised worldwide regarding their environmental impacts. In aquatic animals, the gill has an external position and a wide contact surface with water, it directly comes into contact with pollutants. Therefore, examining the changes occurring in the gill tissue is an appropriate indicator for assessing the effects of pollutants. For this research, the common carp fingerling fish with  $15 \pm 3$  g weight were divided into 9 treatments (with three replicates) with a density of ten fish per 300-liter tank. Based on lethal concentrations, the concentrations were considered as 0 (control treatment), 0.5, 1.5, and 2 ppm for ZnO nanoparticles, and 3, 6, and 9 ppm for TiO<sub>2</sub> nanoparticles, as well as combined concentrations. The concentrations of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles were 0.5 and 3, 1.5 and 6, and 2 and 9 ppm, respectively. Gill tissue samples of the examined carp were separately and simultaneously exposed to zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles after 14 days. Histological changes in the gill tissues were evident in samples exposed to ZnO and TiO<sub>2</sub> nanoparticles separately, while no changes were observed in the control samples. The observed changes in samples exposed to ZnO nanoparticles included hyperplasia, fusion of gill filaments, bending of gill filaments, protrusion and twisting of the epithelial layer, disintegration of the epithelial layer, shortening of secondary gill filaments, and destruction of secondary gill filaments, which were more pronounced with increasing concentrations. Samples exposed to TiO<sub>2</sub> nanoparticles showed hemorrhage, increased epithelial cells, and destruction of secondary gill filaments. Gill tissue exposed to ZnO nanoparticles showed more damage compared to titanium dioxide nanoparticles. Furthermore, samples simultaneously exposed to TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles exhibited changes such as hemorrhage, hyperplasia, fusion of gill filaments, bending of gill filaments, protrusion of the epithelial layer, disintegration of the epithelial layer, shortening of secondary gill filaments, and increased epithelial cells. According to the results obtained, it was observed that ZnO nanoparticles had more harmful effects compared to TiO<sub>2</sub> nanoparticles. Moreover, these damages to the gill tissue intensify and have mutual effects when simultaneously exposed to TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles.

**Keywords:** Common carp, Histology, Nanoparticles, Titanium dioxide