

مطالعه پیامدهای اثرات بافتی و فراساختاری اندام‌های آبشش و مانتل در گونه‌ی دوکفه‌ای آب

شیرین *Anodonta cygnea* در مواجهه با نانوذرات اکسید مس

امیر قادرمرزی M.Sc.^{۱*}، سید علی اکبر هدایتی Ph.D.^۲، فاتح معزی M.Sc.^۳، سید عباس حسینی Ph.D.^۴، سید حامد موسوی ثابت^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی منابع طبیعی گرایش بوم‌شناسی آبریزان، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۲- دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، دانشکده شیلات و محیط زیست، گروه شیلات، گرگان، ایران

۳- دانش آموخته مهندسی منابع طبیعی گرایش بوم‌شناسی آبریزان، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۴- دانشگاه گیلان، گروه شیلات، رشت، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: a.qadermarzi@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۶/۲۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۲۶

چکیده

هدف: در این مطالعه تغییرات هیستوپاتولوژیکی و فراساختاری اندام‌های آبشش و مانتل گونه‌ای دوکفه‌ای آب شیرین با نام علمی *Anodonta cygnea* و متعلق به خانواده Unionidae در مواجهه با سطوح تحت‌کشنده نانو ذرات اکسید مس به مدت ۱۴ روز بررسی شد. **مواد و روش‌ها:** تعداد ۴۰ عدد دوکفه‌ای *A. cygnea* با دامنه طولی $0/9 \pm 11/5$ سانتی‌متر و وزن $6 \pm 84/5$ گرم از مصب رودخانه تجن واقع در شهرستان ساری در استان مازندران جمع‌آوری و پس از انتقال به آزمایشگاه به دو گروه شاهد و تیمار تقسیم شدند. گروه تیمار به مدت ۱۴ روز در مواجهه با غلظت ۲۵ ppm از نانو ذرات اکسیدمس قرار گرفتند. در روزهای ۴، ۹ و ۱۴ برش‌های بافتی آبشش و مانتل از نمونه‌های شاهد و تحت تیمار تهیه شده و جهت بررسی با میکروسکوپ نوری به روش هماتوکسیلین-ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. پس از انجام مراحل تثبیت، خشک کردن و آماده‌سازی، نمونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) مورد بررسی قرار گرفتند. **نتایج:** نتایج میکروسکوپی نوری نشان‌دهنده بروز عوارض هیستولوژیکی قابل توجه در کل اندام‌های مورد مطالعه دو کفه‌ای‌های تحت تیمار در مقایسه با نمونه‌های شاهد بود. تغییرات در آبشش‌ها شامل: هیپرپلازی، هیپوپلازی، تغییرات شکلی و اندازه‌ای تیغه‌های آبششی و تورم کانال‌های همولنفی بودند. همچنین در مانتل افزایش تعداد سلول‌های موکوزی و هیپرپلازی اپی‌تلیوم بیرونی مشاهده شد. تصاویر فراساختاری (میکروسکوپ الکترونی نگاره) تخریب گسترده در تیغه‌های آبششی و مسدود شدن مسیر کانال‌های آب در آبشش و نکروز و تورفتگی در مانتل را نشان داد. **نتیجه‌گیری:** بر اساس نتایج به‌دست آمده مواجهه با نانوذرات اکسیدمس در کوتاه مدت منجر به بروز تغییرات قابل توجه و مشهود هیستولوژیکی و فراساختاری در اندام‌های داخلی دوکفه‌ای آب شیرین *A. cygnea* می‌شود. **واژگان کلیدی:** هیستوپاتولوژی، *Anodonta cygnea*، نانو ذرات اکسید مس، دو کفه‌ای آب شیرین

مقدمه

نانوتوکسیکولوژی به‌عنوان یک زیرشاخه از نانو تکنولوژی به مطالعه برهم‌کنش نانومواد با موجودات زنده می‌پردازد (۱). از آنجایی که صنعت تولید نانو ذرات و استفاده از آن‌ها روز به‌روز در حال توسعه می‌باشد، نگرانی در رابطه با اثرات محیط زیستی این مواد سبب شده تا محققان تحقیقات گسترده‌ای در زمینه خطرات بالقوه نانو مواد بر محیط زیست و موجودات زنده انجام دهند (۲). با توجه به استفاده رو به گسترش از نانو مواد و متعاقباً مخاطرات بالقوه محیط زیستی و سلامت انسانی، نیاز به بهبود اطلاعات در رابطه با مخاطرات ناشی از حضور این مواد در محیط‌های آبی و به‌طور خاص درک ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، پروسه‌های جذب زیستی و سمیت آن‌ها در موجودات زنده وجود دارد (۳).

در دهه‌های اخیر گروه‌های مختلف موجودات زنده به‌طور گسترده جهت بررسی وقوع آلودگی‌های شیمیایی در محیط‌های طبیعی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. دوکفه‌ای‌ها یکی از گروه‌های بسیار مهم در این رابطه به‌شمار می‌روند. این موجودات گروهی از نرم‌تنان می‌باشند که مطلوبیت بالایی جهت استفاده به‌عنوان بیواندیکاتورهای آلودگی در محیط‌های آبی دارند (۴). این گروه از نرم‌تنان به‌دلیل آن که از فراوانی بالایی در محیط‌های آبی شیرین، مصبی و دریایی برخوردارند، به‌عنوان یک موجود مدل مناسب در مطالعه اثرات بالقوه نانو ذرات بر موجودات آبی مطرح شده‌اند (۵). Wang و همکاران (۴) اولین بار پیشنهادی را مطرح نمود مبنی بر این که بی‌مهرگان تغذیه‌کننده از مواد معلق در آب، به‌خصوص نرم‌تنان دوکفه‌ای به‌عنوان گروه هدف منحصر به‌فرد برای مطالعات سم‌شناسی نانو ذرات در نظر گرفته شوند. زیرا این موجودات با توجه به این که در تماس مستقیم با بخش‌های آلوده شده زیستگاه‌های آبی (رسوبات و آب) قرار دارند و می‌توانند سطوح بالایی از فلزات را در بافت‌های خود ذخیره سازند، شواهد مناسبی در رابطه با وقوع آلودگی‌های محیطی با مقیاس زمانی از طریق بررسی پاسخ‌های سلولی و فیزیولوژیکی فراهم می‌سازند (۶).

تغییرات هیستوپاتولوژیکی شاخص‌های زیستی مناسبی در پایش اثرات آلاینده‌ها به‌حساب می‌آیند (۷)، دوکفه‌ای‌ها دارای فرآیندهای توسعه یافته‌ای جهت درونی‌سازی سلولی ذرات با اندازه نانو و میکرو (به‌ترتیب اندوسیتوز و فاگوسیتوز) دارند که

در عملکرد و وظایف فیزیولوژیکی آن‌ها نظیر هضم درون‌سلولی و ایمنی‌سلولی اهمیت فراوانی دارند (۸). بررسی‌های هیستوپاتولوژیکی، بخش مهمی از برنامه‌های مطالعاتی مورد استفاده در پایش اثرات آلاینده‌ها به‌حساب می‌آیند. این بررسی‌ها، راهی جهت شناسایی اثرات حاد و مزمن ناشی از مواجهه با آلاینده‌های گوناگون در بافت‌ها و اندام‌های خاص موجودات به‌حساب می‌آیند (۹). تعیین پاسخ‌های هیستوسیتولوژیکی نسبتاً آسان بوده و می‌توان آن‌ها را به سلامت و شایستگی افراد در جوامع اکولوژیک نسبت داد (۱۰). نفوذ نانو ذرات دارای تحرک و فعالیت بالا در بافت‌های هدف، وقوع تغییرات هیستوپاتولوژیکی در اندام‌ها را سبب می‌شود (۱۱). در مطالعه حاضر در مهر ماه ۱۳۹۳ انجام شد، تغییرات هیستولوژیکی و فراساختاری اندام‌های آبش، مانند، در ماسل آب شیرین *Anodonta cygnea* در نتیجه مواجهه با سطوح مختلف نانوذرات اکسیدمس مورد بررسی قرار گرفت. هدف از انجام این تحقیق معرفی نانو ذرات اکسید مس به‌عنوان آلاینده پیکره‌های آبی و اثرات سوء آن بر روی موجودات آبی بوده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های دوکفه‌ای

تعداد مورد نیاز از دوکفه‌ای *A. cygnea* با دامنه طولی $0.9 \pm$ سانتی‌متر و وزن $6 \pm 84/5$ گرم در مهر ماه ۱۳۹۳ از مصب رودخانه تجن در شهرستان ساری در استان مازندران جمع‌آوری شده (36°48 46 N, 53°6 57 E) و به آزمایشگاه آبی پروری گروه شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انتقال داده شد. دوکفه‌ای‌ها به‌منظور سازگاری و رفع استرس ناشی از حمل و نقل به‌مدت دو هفته در مخازن فایبرگلاس ۶۰ لیتری نگهداری شدند.

مواجهه دوکفه‌ای‌ها با نانوذرات اکسید مس

جهت تهیه محلول نانوذره مس از محصولات نانوذره تجاری شرکت نانو پیشگامان ایرانیان استفاده شد. به‌منظور مواجهه دوکفه‌ای‌ها با نانو ذرات بر اساس سطوح 50 lethal (LC) concentration (نانو ذرات اکسید مس گزارش شده در مطالعات پیشین (۱۳)، غلظت ۲۵ ppm در نظر گرفته شد. نانوذرات در ابتدا با استفاده از دستگاه اولتراسوند با تعداد دور

گذراندن از سری الکل اتانول (۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۷۰ درصد و در نهایت اتانول ۱۰۰ درصد). پس از انجام مراحل فوق، آماده‌سازی برای تهیه تصاویر صورت گرفت بدین ترتیب که در ابتدا نمونه‌های بافتی از اتانول ۱۰۰ درصد خارج شده و در داخل پلیت قرار داده شد. سپس برای مدت ۲ ساعت در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و به دنبال آن به دستگاه Freeze dryer منتقل شدند. در این دستگاه دما در ابتدا تا ۵۰- درجه سانتی‌گراد کاهش یافته و نمونه‌ها در همین دما برای مدت ۵۰ دقیقه نگهداری شدند. سپس دما تا ۲۵- درجه سانتی‌گراد افزایش یافت و در نهایت به دمای صفر درجه سانتی‌گراد تغییر یافت تا به دمای محیط رسانده شد. نمونه‌های بافتی خشک شده با کمک کیت‌های طلا کد شده و تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره در بزرگنمایی ۱۰۰ و ۱۰۰۰ برابر تهیه شد. مطالعه حاضر جنبه آزمایشگاهی داشته و همچنین نیاز به محاسبات آماری در انجام این مطالعه نبوده است.

نتایج

وضعیت فراساختاری اندام‌های شاهد و مواجهه یافته

شکل ۱ نشان‌دهنده تصاویر میکروسکوپ الکترونی نمونه‌های مربوط به اندام‌های مورد بررسی در دوکفه‌ای‌های شاهد و مواجهه یافته است. وضعیت فراساختاری نمونه‌های آبخش به‌وضوح نشان‌دهنده ساختار مشخص تیغه‌های آبخشی و کانال‌های آب و برخی ذرات و مواد چسبیده به سطح آبخش بود (شکل ۱- A, C). نمای سطحی آبخش نمونه‌های مواجهه یافته وضعیت کاملاً متفاوتی را در مقایسه با نمونه‌های شاهد در این اندام نشان داد (شکل ۱- B, D). سطح آبخش به‌وضوح نشان‌دهنده تخریب گسترده این اندام بود به‌طوری‌که تیغه‌های آبخشی و ساختار مشخص و چیدمان منظم کانال‌های آبی آبخشی به‌ندرت قابل تشخیص بود و ضایعات نکرور شده بافتی تا حد زیادی سطح این اندام را پوشانده بود.

وضعیت سطحی نمونه‌های شاهد مانند نشان‌دهنده وجود چین‌خوردگی‌ها و برآمدگی‌های ملایم و ظریفی و در عین حال تقریباً منظمی در سطح بیرونی این اندام بود (شکل ۱- A, C)، اما در نمونه‌های مواجهه یافته حالت به‌شدت تخریب یافته و نکرور شده‌ای مشاهده شد (شکل ۱- B, D).

۴۰۰ دور در دقیقه در حجم مشخص آب مقطر به مدت ۲۰ دقیقه پخش شد تا به‌صورت همگن درآید. به دلیل اینکه نانو ذرات مس پس از ۲۴ ساعت در توده آبی ترسیب پیدا می‌کنند، جهت اختلاط مجدد محلول نانو ذره در هر ۲۴ ساعت از دستگاه هموژنایزر با تعداد دور ۱۴۰۰۰ در دقیقه استفاده شد. هر ۲۴ ساعت یک‌بار تعویض آب مخازن دوکفه‌ای‌ها جهت اطمینان یافتن از حصول غلظت همگن مورد نظر از نانو ذرات صورت گرفت. همچنین جهت دست یابی به نحوه پخش شدن نانو ذرات در محیط آبی، نمونه آب با دستگاه تست Dynamic light scattering (DLS) شد پس از اتمام دوره تطابق دوکفه-ای‌ها با شرایط آزمایشگاهی، مواجهه دوکفه‌ای‌ها با غلظت انتخابی از نانو ذرات در طول مدت دو هفته انجام گرفت. مواجهه دوکفه‌ای‌ها با نانو ذرات در مخازن شیشه‌ای حاوی سه لیتر آب صورت گرفت. پس از اتمام دوره مواجهه دوکفه‌ای‌ها با نانو ذرات اکسید مس، نمونه‌هایی از بافت‌های اندام‌های آبخش و مانتل، از محل‌هایی معین برداشت شد.

آماده سازی و رنگ‌آمیزی مقاطع بافتی جهت تهیه

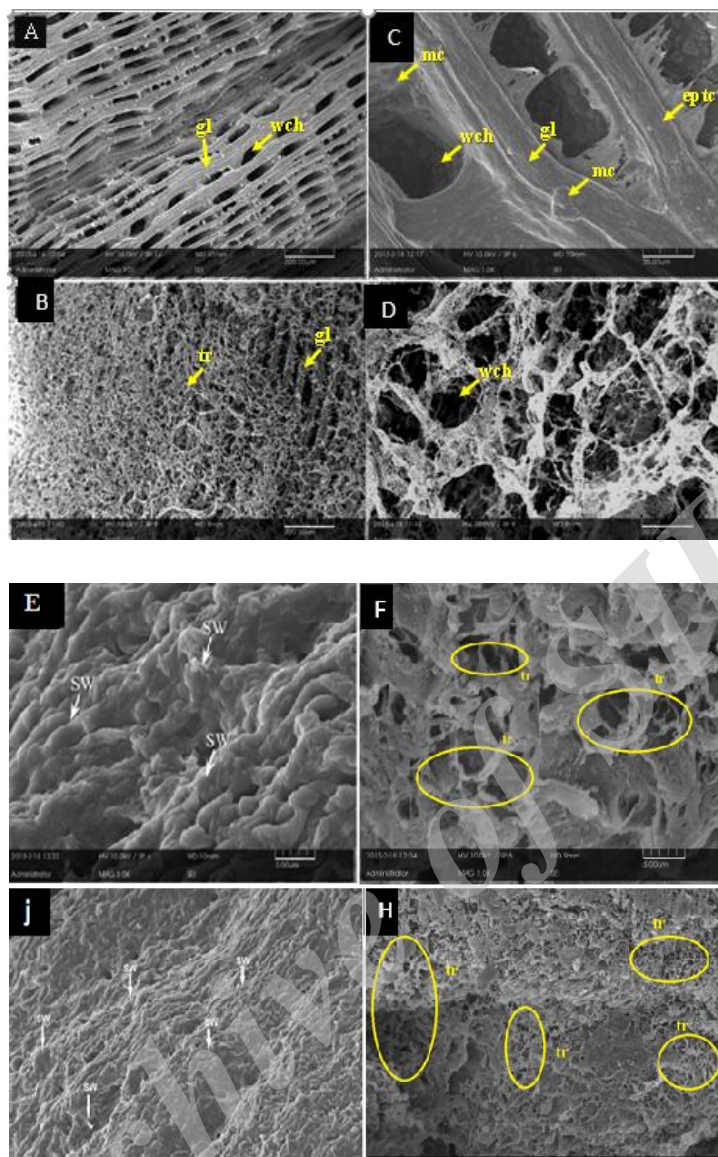
تصاویر با استفاده از میکروسکوپ نوری

نمونه‌های بافتی برداشت شده از اندام‌های مورد مطالعه به‌منظور انجام آماده‌سازی برای رنگ‌آمیزی، ابتدا به مدت ۴۸ ساعت در محلول بوئن (۷۵ قسمت اسید پیکریک، ۲۵ قسمت فرمالین، ۵ قسمت اسید استیک گلاسیال) قرار داده شدند. مراحل آماده‌سازی نمونه‌های بافتی فیکس شده جهت برش و رنگ‌آمیزی بر اساس پروتکل (2010) Hewitson & Darby (۱۵) انجام گرفت. در نهایت نمونه‌های بافتی برش داده شده و با روش هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. تهیه تصاویر از مقاطع بافتی آماده‌شده با استفاده از میکروسکوپ نوری Leica-MS5 در بزرگنمایی‌های ۴۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ صورت گرفت.

آماده‌سازی نمونه‌های بافتی جهت تهیه تصاویر با استفاده

از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM)

قطعاتی با ضخامت ۲ تا ۵ میلی‌متر و طول ۵ تا ۱۰ میلی‌متر از بافت‌های مورد بررسی تهیه شده و به مدت ۲ ساعت در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شدند. مراحل بعدی آماده‌سازی این نمونه‌ها عبارت بودند از: قرار دادن نمونه‌های بافتی به مدت ۲۴ ساعت در فرمالین ۵ درصد، مدت ۳۰ دقیقه در محلول بافر فسفات،

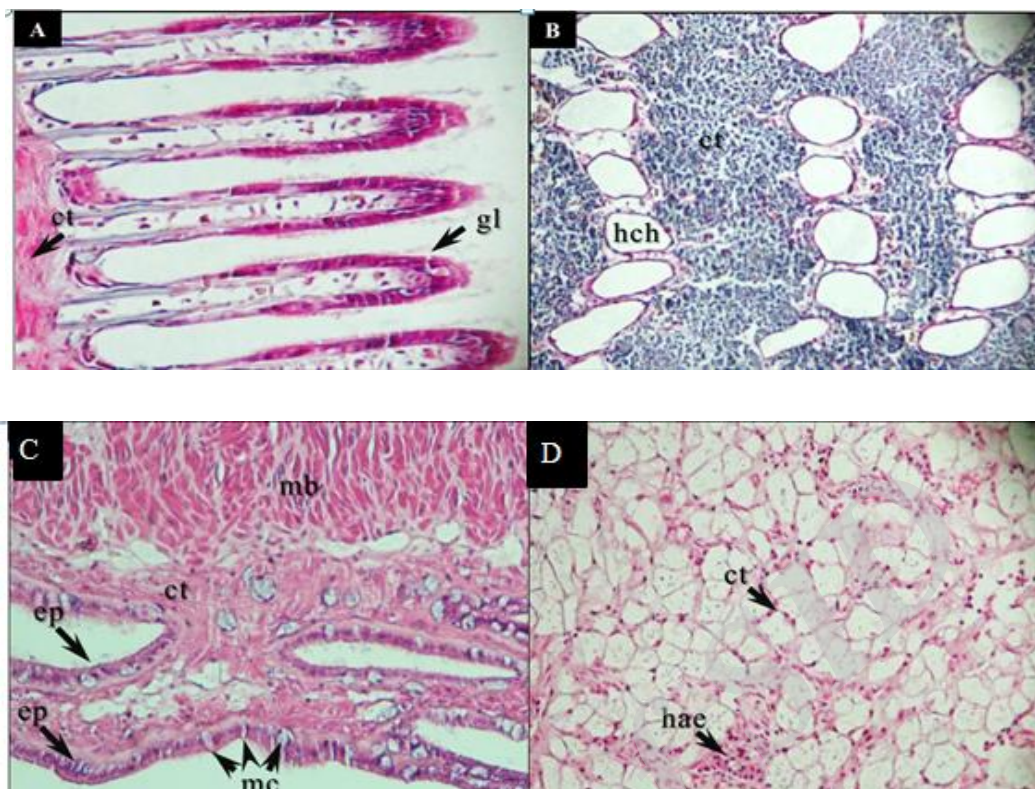


شکل ۱: تصاویر فراساختاری به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی. (A,C) آبشش نمونه‌های شاهد (GF: تیغه‌های آبششی، wch: کانال آب؛ فلش زرد رنگ: gl: لاملای آبششی mc: سلول‌های موکوسی، eptc: سلول‌های اپیتلیال و ذرات خارجی چسبیده به آبشش)، (D,B) آبشش نمونه‌های مواجهه یافته (GF: تیغه‌های آبششی، WC: کانال آب، فلش قرمز رنگ: نواحی تخریب شده سطحی)، (E,I) مانند نمونه‌های شاهد (SW: چین‌های سطحی)، (H,F) مانند نمونه‌های مواجهه یافته (Tr: نواحی تخریب شده سطحی)

اشغال کرده بود (شکل ۲- B). در مقاطع مربوط به مانند (شکل ۲- D و E) بافت پوششی بخش خارجی این اندام که در واقع احاطه‌کننده فضای مانند است، قابل تشخیص بود به‌صورتی که در لابه‌لای سلول‌های اپیتلیال، سلول‌های ترشح‌کننده موکوس نیز وجود داشتند. در قسمت‌های داخلی تر بافت عضلانی وجود داشت (شکل ۲- E) که تراکم تارهای ماهیچه‌ای آن در مقایسه با بخش‌های عضلانی پا، کمتر بود و نواحی بینابینی آن‌ها توسط بافت پیوندی پر شده بود. همچنین در بخش‌های بینابینی بافت پیوندی تجمعاتی از هموسیت‌ها وجود داشتند (شکل ۲- D).

وضعیت هیستولوژیک نمونه‌های بافتی متعلق به دوکفه‌ای‌های شاهد

شکل ۲ نشان‌دهنده ویژگی‌های هیستولوژیکی در نمونه‌های شاهد است. تیغه‌های آبشش سالم با اندازه تقریباً یکسان و فواصل بینابینی مشخص قابل مشاهده بود (شکل ۲- A). اپیتلیوم تیغه‌های آبششی به‌صورت سالم و یکپارچه قابل رویت بود. مقاطع کانال‌های همولنفی در فضای داخلی تیغه‌های آبششی در ساختاری تقریباً منظم با دیواره نازک و یکنواخت وجود داشتند به‌طوری‌که بافت پیوندی فضای پیرامونی آن را

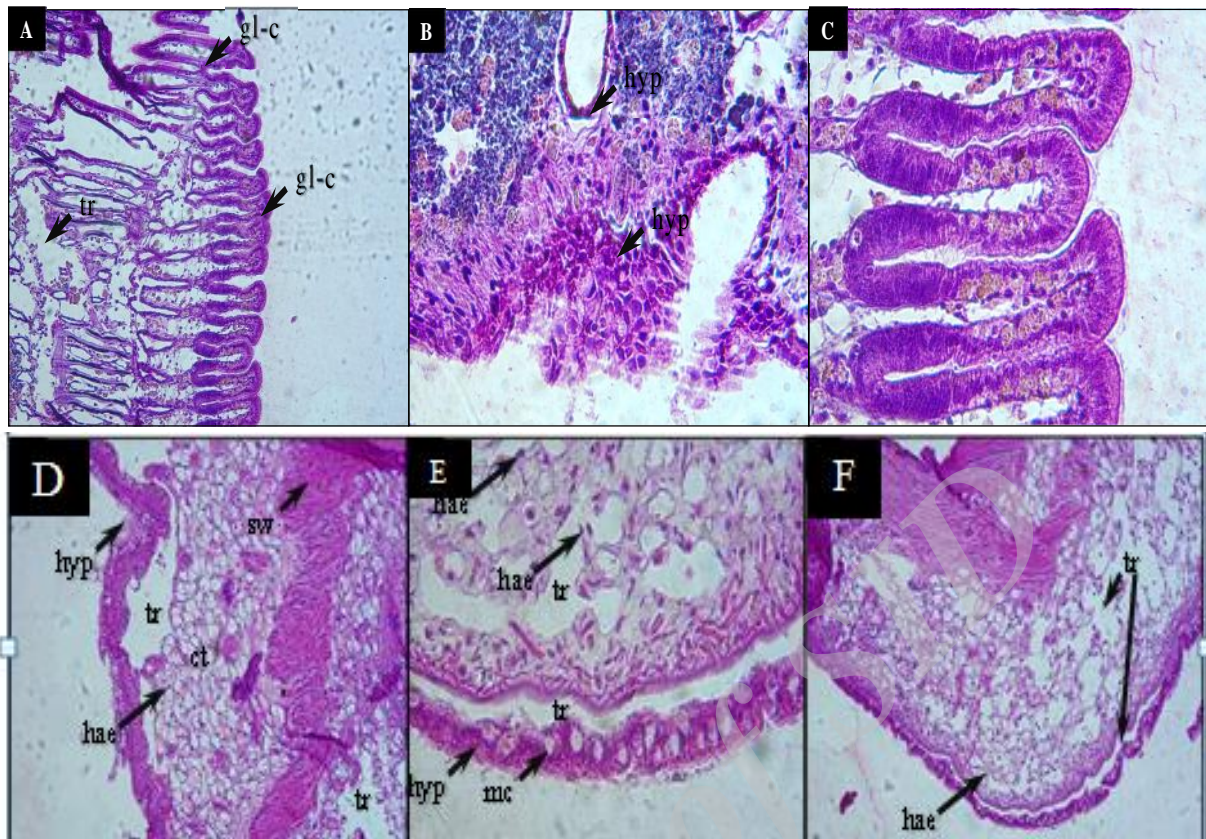


شکل ۲: مقاطع بافتی نمونه‌های شاهد (با ضخامت ۵ تا ۷ میکرومتر، رنگ‌آمیزی H&E): آبشش (A و B)، جبه (C و D). *ct*: بافت پیوندی؛ *hch*: کانال همولنفی؛ *gl*: تیغه آبششی؛ *mc*: سلول موکوسی؛ *ep*: اپیتلیوم؛ *mb*: دسته‌تارهای عضلانی؛ *hae*: هموسیت.

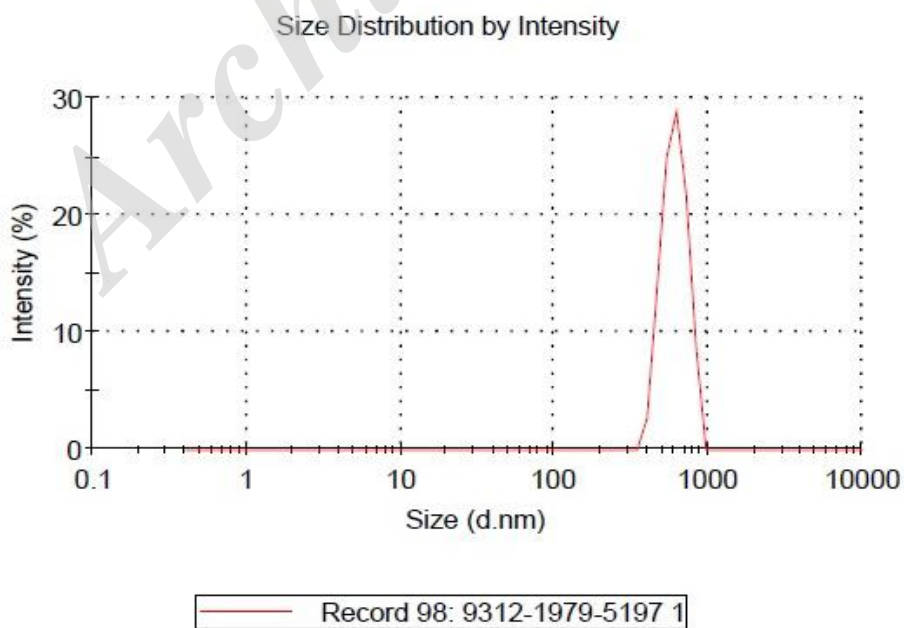
در بخش‌های درونی‌تر مشاهده شد (شکل ۳-A). افزایش ضخامت سلول‌های اپیتلیال دیواره کانال‌های همولنفی نیز رخ داده بود (شکل ۳-B). در اندام ماننل هیپرپلازی اپیتلیوم بیرونی این اندام به همراه گسستگی بافتی گسترده در بافت پیوندی بخش‌های درونی‌تر مشاهده شد (شکل ۳-D و F). افزایش تعداد سلول‌های موکوزی در بافت اپیتلیال نواحی با شدت آسیب دیدگی کمتر همراه با هیپرپلازی اپیتلیوم رویت گردید (شکل ۳-E). تخریب بافت پیوندی ذخیره‌ای و گسستگی بافتی در آن نیز دیده شد (شکل ۳-E و F). مواردی از ابری شدن و تورم در سلول‌های عضلانی اتفاق افتاده بود (شکل ۳-D). افزایش غیر متمرکز و پراکنده تعداد هموسیت‌ها نیز در مقایسه با نمونه‌های بافتی شاهد در نواحی دچار گسستگی در بافت پیوندی ذخیره‌ای دیده شد (شکل ۳-D و E).

وضعیت هیستولوژیک نمونه‌های بافتی متعلق به دوکفه‌ای‌های مواجهه‌یافته با نانوذرات

وضعیت هیستولوژیکی اندام‌های مورد مطالعه در بافت‌های به‌دست آمده از نمونه‌های مواجهه‌یافته در شکل ۳ نشان داده شده است. در آبشش تغییر شکل و اندازه تیغه‌های آبششی به‌وضوح مشاهده شد (شکل ۳-A و C). افزایش ضخامت اپیتلیوم در نتیجه هیپرتروفی سلول‌های اپیتلیال، کاهش فضای بینابینی تیغه‌ها، کوتاه‌شدگی تیغه‌های آبششی و گریز-شکل شدن آن‌ها و همچنین اتصال تیغه‌های مجاور دیده شد (شکل ۳-A و C). هیپرپلازی یا افزایش تعداد سلول‌های اپیتلیال تیغه‌ها در موارد متعدد مشاهده شد (شکل ۳-B). از بین رفتن کانال‌های همولنفی و به هم خوردن ساختار منظم آن‌ها در قسمت‌های درونی آبشش وقوع یافته بود (شکل ۳-A). گسستگی بافتی در ساختار تیغه‌ها و همچنین بافت‌های پیوندی



شکل ۳: تصاویر مقاطع بافتی نمونه‌های شاهد (با ضخامت ۵ تا ۷ میکرومتر، رنگ‌آمیزی H&E): آبشش (A و B و C)، مانند (D و E و F): *tr* گسستگی بافتی، *gl-c* اتصال تیغه‌های آبششی مجاور، *hyp* هیپرپلازی، *sw* تورم، ابری شدن یا پنیری شدن، *hyp* هیپرپلازی، *ct* بافت پیوندی، *hae* هموسیت، *mc* سلول موکوسی.



شکل ۴: توزیع اندازه‌های نانو ذرات اکسید مس در آب مخازن حاوی دوکفه‌ای‌ها

مشابهی را در نتیجه مواجهه ۱۱ روزه با Hg و Cd گزارش دادند. هیپرپلازی سلول‌های اپی‌تلیال در تیغه‌های آبششی که توسط Watermann و همکاران (۱۷) گزارش شده بود و همچنین فیبروز (پوسته پوسته شدن) و التهاب یا تورم تیغه-های آبششی که توسط Al-Subia و همکاران (۱۸) گزارش شده است، در مطالعه حاضر نیز اتفاق افتاد. افزایش اندازه میوسیت‌ها (تورم) و حذف ساختارهای یکپارچه دسته تارهای عضلانی در نتیجه مواجهه با فلز مس در بافت ماهیچه جمع-کننده خلفی ذکر شده است (۱۸) که در مطالعه حاضر نیز چنین وضعیتی در ساختارهای عضلانی اندام‌های مختلف مشاهده شد. مطالعه بیومارکرهای هیستوپاتولوژیکی اندام‌های آبشش، غدد هاضمه و پا در معرض غلظت تحت‌کشنده فلز کروم در دوکفه‌ای آب شیرین *A. cygnea* که توسط Moezzi و همکاران (۱۹) نتایج مشابهی را در رابطه با اثرات این عنصر در اندام مانتل نشان داده است. در مطالعه Tripp & Feris (۲۰) شکل‌گیری سلول‌های هایپرکروماتیک آناپلاستیک در کانال‌های آب درون رشته‌های آبششی در مواجهه با عنصر آرسنیک گزارش شده است در حالی‌که چنین موردی در مطالعه حاضر دیده نشد.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج به‌دست آمده در این مطالعه می‌توان گفت که مواجهه با سطوح تحت‌کشنده نانو ذرات اکسید مس می‌تواند سبب بروز عوارض هیستولوژیک و فراساختاری در دوکفه‌ای آب‌شیرین *Anodonta cygnea* در طول یک دوره دو هفته‌ای شود. این نوع تغییرات شاخص‌هایی مناسب از مواجهه این موجودات با آلاینده‌هایی از این دست بوده و در نهایت می‌تواند نشان‌دهنده ارزش اندیکاتوری دوکفه‌ای مذکور در پایش اثرات آلاینده‌ها و اهمیت حفظ آن باشد و همچنین نشان دهنده‌ی مضر بودن نانوذرات برای موجودات آبی باشد.

تشکر و قدر دانی

بدین وسیله از آقایان دکتر علی جافر، دکتر هادی مشکور، دکتر حسین یوسفی، مهندس کشیری و سرکار خانم مهندس مهری که ما را در انجام هرچه بهتر این تحقیق یاری کردند کمال تشکر را داریم.

اندازه ذرات در نمونه محلول نانو اکسید مس در شکل شماره ۴ نشان داده شده. با توجه به شکل ۹۵ درصد حجمی ذرات در محلول کلوییدی دارای قطر ۸۵۰ نانومتر می‌باشند. بر این اساس، نحوه پراکنش نانو ذرات اکسید مس در آب مخازن حاوی دوکفه‌ای‌ها یکسان بوده است و تمامی دوکفه‌ای‌ها به‌طور یکنواخت در مواجهه با نانو ذرات مس قرار گرفته‌اند. شکل ۴ نشان می‌دهد ذرات مورد استفاده با توجه به اندازه پراکنش، در مخازن به‌طور یکسانی با دوکفه‌ای‌ها مواجهه داده شده است.

بحث

نتایج به‌دست آمده در این مطالعه نشان داد که مواجهه با نانو ذرات اکسید مس برای مدت ۱۴ روز می‌تواند تغییراتی را در وضعیت فراساختاری و هیستولوژیکی در اندام‌های داخلی دوکفه‌ای آب شیرین *A. cygnea* به‌همراه داشته باشد. مطالعات متعدد صورت گرفته تغییرات هیستوپاتولوژیکی ناشی از مواجهه با ذرات فلزی را به‌عنوان شاخص‌هایی مناسب جهت پایش اثرات آلودگی این ذرات بر موجودات زنده پیشنهاد کرده‌اند (۱۲)، اما تاکنون مطالعه مشخصی که تغییرات ویژگی‌های فراساختاری در اندام‌های دوکفه‌ای‌ها در مواجهه با آلاینده‌ها مورد بررسی قرار داده باشد، انجام نشده است.

ویژگی‌های مشاهده شده در تصاویر به‌دست آمده از میکروسکوپ الکترونی در اندام‌های مورد مطالعه به‌خوبی نشان‌دهنده تاثیر نامطلوب مواجهه با نانو ذرات اکسیدمس بر خصوصیات سطحی اندام‌ها است. در تمامی اندام‌های مورد مطالعه شامل آبشش، پا، مانتل و سیفون بروز نکروز بافتی و از هم‌گسستگی در ساختارهای بافتی این اندام‌ها به‌خصوص در آبشش‌ها به‌وضوح قابل مشاهده بود. این تغییرات در سطوح بیرونی اندام‌ها احتمالاً به نوعی در ادامه بروز آسیب‌های هیستولوژیکی درونی در اندام‌ها اتفاق افتاده است که در سطح کلی‌تری نشان دهنده اثرات سمی این مواد در موجودات آبی است.

نتایج مطالعات هیستوپاتولوژیکی پیشین انجام شده در موارد زیادی با نتایج به‌دست آمده در تحقیق حاضر در رابطه با عوارض بافتی مواجهه دوکفه‌ای‌ها با نانوذرات اکسیدمس همسو است. نفوذ کانونی هموسیت‌ها و اتساع انتهای تیغه‌های آبششی ثانویه در سطح پایه آبششی توسط Witmann و Forstner (۱۴) گزارش شده است. Zorita و همکاران (۱۶) اثرات

منابع

- Poole Ch P, Owens FJ. Introduction to nanobiotechnology. John Wiley. 2003. p371.
- Khayyam-Nekouei M, Biazar A, Salehi Jozani Gh. Nanobiotechnology in agricultural sciences. ABRII. 2009; P241.
- Moore MN. Nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment International. 2006; 32: 967-976.
- Wang J, Zhang X, Chen, Y, Sommerfeld M. Toxicity assessment of manufactured nanomaterials using the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, Chemosphere. 2008; 73(7): 1121-1128.
- Perreault F, Bogdan N, Morin M, Claverie J, et al. Interaction of gold nanoglycodendrimers with algal cells (*Chlamydomonas reinhardtii*) and their effect on physiological processes, Nanotoxicol. 2013; 6(2): 109-120.
- Santos AR, Miguel AS, Tomaz L, Malho R, et al. The impact of CdSe/ZnS quantum dots in cells of *Medicago sativa* in suspension culture, J. Nanobiotechnol. 2010; 8: 24-37.
- Andujar P, Simon-Deckers A, Galateau-Sallé F, Fayard B, et al. Role of metal oxide nanoparticles in histopathological changes observed in the lung of welders. Particle and Fiber Toxicology. 2014; 11(1): 1-13.
- Livingstone DR, Chipman Jk, Lowe DM, Minier C, et al. Development of biomarkers to detect the effects of organic pollution on aquatic invertebrates: recent immunological studies on the common mussel *Mytilus edulis* and other mytiliids. Lnt.J. Environ. pollut. 2000; 13: 1-6.
- MUSSELp 2004. Mussel of the month. Retrieved from of the MUSSEL Project Web Site, the National Science Foundation. <http://clade.acnatsci.org/mussel/m/mom/archive/2004/04-12.html>.
- Viarengo V. Biochemical effects of trace metal. Marine pollution bulletin. 1985; 16(4): 153-158.
- Au DWT. The application of histocytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. Marine pollution bulletin. 2004; 48(2): 817-834.
- Fabrega L, Luoma SN, Tyler CR, Galloway TS, et al. Silver nanoparticles. Behavior and effects in the aquatic environment. Environment international. 2011; 37(2): 517-531.
- Forstner U, Wittmann GT. Marine pollution in the aquatic environment. Springer. 1983; p.376.
- Zorita I, Ortiz-Zarragoitia M, Soto M, Cajaraville MP. Biomarkers in mussels from a copper site gradient: An integrated biochemical, histochemical and histological study. Aquat. Toxicol. 2006; 78: 109-116.
- Watermann B, Thomsen A, Kolodzey H, Daehne B, et al. Histopathological lesions of molluscs in the harbor of Norderney, Lower Saxony, North Sea (Germany). Helgoland marine research. 2008; 62(2): 167-175.
- Al-Subia SN, Moody AJ, Mustafa SA, Jha AN. A multiple biomarker approach to investigate the effects of copper on the marine bivalve mollusc *Mytilus edulis*. Ecotoxicology and environment safety. 2011; 74(7):1913-1920.
- Moezzi F, Javanshir A, Eagderi S, Pourbagher H, et al. Evaluation of bivalve clearance (CR) as a physiological indicator of heavy metal toxicity in freshwater mussel, *Anodonta cygnea* (Linea, 1876). Scientific journal of animal sciences. 2013; 2(4), 89-94.
- Tripp M.R, Fries C.R. Histopathology and Histochemistry. In: Giam, C.S., Ray, L.E., (eds). Pollutant studies in marine animals. CRC Press, Inc. Boca Raton; 1987; pp. 237-324.

Effects of exposure to copper oxide nanoparticles on histopathological and ultrastructural lesions of gills and mantle organs in freshwater bivalve *Anodonta cygnea*

Qadermarzi A, M.Sc. student,^{1*}, Hedayati SA, Ph.D.², Moëzzi F, M.Sc. student³, Hosseini SA, Ph.D.², Mosavi Sabet SH, Ph.D.⁴

1. Fisheries department, Gorgan University of Agriculture and Natural Resources, Gorgan, Iran
 2. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources Fisheries ,Faculty of Fisheries and Environmen, Gorgan, Iran
 3. M.Sc. student, Fisheries department, Tehran University, Tehran, Iran
 4. Fisheries department, Guilan University, Rasht, Iran
- * Email corresponding author: a.qadermarzi@gmail.com

Received: 15 Feb. 2016

Accepted: 11 Sep. 2016

Abstract

Aim: In this study gill and mantle histopathological and ultrastructural changes of freshwater bivalve, *Anodonta cygnea* from Unionidae in exposure to sub-lethal concentrations of copper oxide nanoparticles for 14 days were investigated.

Materials and Methods: Forty numbers of *A. cygnea* (length: 11.5 ± 0.9 cm; weight: 84.5 ± 6 g) were collected from Tajan River estuary, Sari, Mazandaran Province and after transferring to the laboratory were divided into two control and treated groups. Treated group were exposed to 25 ppm CuO nanoparticles for 14 days. Gill and mantle tissue sections of control and treated samples were taken in days 4, 9 and 14, and then prepared for light microscopy using hematoxylin and eosin (H & E) staining method. Samples were studied by scanning electron microscopy (SEM) after fixation, drying and preparation.

Results: Light microscopy results showed significant histological alterations in all of studied organs of exposed bivalves compared to the controls. Changes were hyperplasia, hypoplasia, gill filaments shape and dimension changes and also haemolymph channels adema. Also increasing mucous cells number and external epithelium hyperplasia in mantle were observed. SEM analyses showed adverse destruction of gill filaments and blocking water channels in gill specimens, as well as, mantel necrosis and indentation.

Conclusion: according to obtained results, it can be concluded that short time exposure to nanoparticles may lead to noticeable changes evident in histological and ultrastructural internal organs of freshwater bivalve *Anodonta cygnea*.

Key words: histopathology, *Anodonta cygnea*, copper nanoparticles, freshwater bivalve