ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(4):537-547

Genotoxicity of Magnetic Iron Oxide (Fe3O4) Nanoparticles in Red Blood Cells of Common Carp (*Cyprinus carpio*) Using Micronucleus Assay under Acute and Chronic reatment

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Mashjoor S.[1] *PhD*,
Yousefzadi M.*[1] *PhD*,
Zolgharnain H.[2] *PhD*,
Kamrani E.[1] *PhD*,
Alishahi M.[3] *PhD*

How to cite this article
Mashjoor S, Yousefzadi M, Zolgharnain H, Kamrani E, Alishahi M. Genotoxicity of Magnetic Iron Oxide (Fe3O4) Nanoparticles in Red Blood Cells of Common Carp (*Cyprinus carpio*) Using Micronucleus Assay under Acute and Chronic Treatment. Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(4):537-547.

ABSTRACT

Aims In nanoecotoxicology science, fish erythrocyte micronucleus assay for the monitoring genotoxic potential of nanoparticles is a powerful biomarker. This study was conducted with the aim of investigating genotoxicity of magnetic iron oxide (Fe3O4) nanoparticles in red blood cells of common carp (*Cyprinus carpio*) using micronucleus assay under acute and chronic treatment.

Materials & Methods In the current experimental study, the genotoxit toxicology of Fe3O4 nanoparticles was performed during an acute (96 hours; 5 concentrations including 0, 10, 100, 500, and 1000 mg/l) and chronic (14 days; 3 concentrations including 0, 100, and 500 mg/l) of Fe_3O_4 nanoparticles in three replications. The data were analyzed by IBM SPSS 19, using two-way ANOVA, and Duncan's new multiple range test.

Findings Acute exposure to Fe3O4 nanoparticles had no acute toxicity effect juvenile carp (*C. carpio*). By increasing the concentration of nanoparticles in a 96-hour interval, the frequency of micronucleus (‰) and other abnormal forms around the red blood cell nucleus of juvenile carps showed a significant increase compared to the control group ($p<0.05$). In the chronic treatment at concentrations of 100 and 500 mg/l of Fe_3O_4 nanoparticles, the rate of increase in the frequency of micronucleus was similar to the acute functional test of concentration.

Conclusion Although Fe_3O_4 nanoparticles do not have acute toxicity effects in common carp and are non-toxic, they tend to induce genotoxic effects by increasing the frequency of micronucleus and other abnormalities of the red blood cell core during a concentration-dependent process. So, it seems that the release of FeO_4NPs into the environment, it is probable adverse effects on aquatic ecosystems.

Keywords Toxicity; *Cyprinus carpio*; Micronucleus; Magnetic Iron Oxide (Fe_3O_4) Nanoparticles

CITATION LINKS

[1] Green biosynthesis and characterization of magnetic ... [2] Surface-modified superparamagnetic nanoparticles ... [3] Long-circulating iron oxides for MR ... [4] Development and experimental use of receptor-specific ... [5] Development of superparamagnetic ... [6] Magnetically controlled targeted micro-carrier ... [7] Size-controlled synthesis of Fe_3O_4 magnetic nanoparticles ... [8] Synthesis and characterization of Fe_3O_4 nanoparticles ... [9] Detection of a micron-sized magnetic ... [10] Endothelial dysfunction and ... [11] Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry ... [12] Effects of iron oxide nanoparticles: Cytotoxicity ... [13] Assessment of the piscine micronucleus test as an ... [14] Micronucleus test in fish genome: A sensitive monitor ... [15] Assays with Daphnia magna and ... [16] Oxidative stress responses in ... [17] Effect of sub-acute exposure ... [18] Test No. 203: Fish, acute toxicity ... [19] Study on silver nanoparticles toxicity in Cyprinus ... [20] Evaluation of the toxic impact of silver ... [21] Detection of cytogenetic ... [22] Fish micronuclei for assessing genotoxicity ... [23] HUMN project: Detailed description of the scoring ... [24] Induction of micronuclei and nuclear abnormalities ... [25] Micronucleus test: The effect of ascorbic ... [26] Micronucleus test in fish cells: A bioassay for ... [27] Globally Harmonized System of classification ... [28] Test No. 474: Mammalian erythrocyte micronucleus ... [29] Test No. 487: In vitro mammalian cell ... [30] The OECD's micronucleus test guideline for single ... [31] Micronucleus test, nuclear ... [32] In vitro genotoxicity testing using ... [33] Molecular mechanisms of micronucleus ... [34] Effects of aqueous suspensions of titanium ... [35] Nanoecotoxicity effects of engineered silver ... [36] Role of oxidative damage in toxicity ... [37] Nanomaterials and nanoparticles ... [38] Multifunctional superparamagnetic ... [39] The role of iron redox state ... [40] Coating-dependent induction of ... [41] Titanium dioxide nanoparticles induce ... [42] Iron oxide nanoparticle-induced ... [43] Effects of Fe3O4 magnetic nanoparticles ... [44] Copper oxide nanoparticles are ... [45] Size-dependent toxicity of metal ... [46] Oxidative stress and nano-toxicity ... [47] Use of thyroid hormones and micronucleus as ...

[1]Marine Biology Department, Marine Science & Technology Faculty, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran
[2]Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science & Technology, Khorramshahr University of Marine Science & Technology, Khorramshahr, Iran
[3]Clinical Sciences Department, Veterinary Medicine Faculty, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

***Correspondence**
Address: University of Hormozgan, 9 Kilometer Minab Road, Bandar Abbas, Iran. Postal Code: 7916193145
Phone: -
Fax: -
morteza110110@gmail.com

Article History
Received: May 08, 2017
Accepted: December 31, 2017
ePublished: December 21, 2018

Copyright© 2018, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

بررسی اثرات ژنوتوکسیک نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی در گلبول‌های قرمز ماهی کپور معمولی به روش میکرونوکلئوس تحت تیمار حاد و مزمن

سکینه مشجور PhD
گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
مرتضی یوسف‌زادی* PhD
گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
حسین ذوالقرنین PhD
گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران
احسان کامرانی PhD
گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
مجتبی علیشاهی PhD
گروه بهداشت آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

چکیده
اهداف: در علم نانوبوم‌سم‌شناسی، آزمون میکرونوکلئوس گلبول‌های قرمز ماهیان در پایش پتانسیل ژنوتوکسیک نانوذرات، نشانگر زیستی قدرتمندی است. هدف پژوهش حاضر، بررسی اثرات ژنوتوکسیک نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی (Fe_3O_4) در گلبول‌های قرمز ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) به روش میکرونوکلئوس تحت تیمار حاد و مزمن بود.
مواد و روش‌ها: در پژوهش تجربی حاضر، سمیت‌سنجی ژنوتوکسیک نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی طی یک مواجهه حاد (۹۶ساعته؛ پنج غلظت شامل صفر، ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰میلی‌گرم بر لیتر) و مزمن (۱۴روزه؛ سه غلظت شامل صفر، ۱۰۰ و ۵۰۰میلی‌گرم بر لیتر) از نانوذرات اکسیدآهن در سه تکرار صورت پذیرفت. داده‌ها توسط آزمون آماری آنالیز واریانس دوطرفه و آزمون چنددامنه‌ای دانکن با استفاده از نرم‌افزار IBM SPSS 19 مورد تحلیل قرار گرفتند.
یافته‌ها: مواجهه حاد با نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی روی بچه‌ماهیان کپور اثر سمیت حاد نداشت. با افزایش غلظت نانوذرات طی یک بازه زمانی ۹۶ساعته فراوانی میکرونوکلئوس‌ها (‰) و دیگر اشکال غیرطبیعی در اطراف هسته گلبول‌های قرمز خون بچه‌ماهیان کپور معمولی در مقایسه با گروه کنترل افزایشی معنی‌دار نشان داد ($p<0/05$). در تیمار مزمن در غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰میلی‌گرم بر لیتر از نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی، نرخ افزایش فراوانی میکرونوکلئوس‌ها مشابه آزمون حاد تابعی از غلظت بود.
نتیجه‌گیری: علی‌رغم اینکه نانوذرات اکسیدآهن، اثرات سمیت حاد در ماهیان کپور معمولی ندارند و جزء مواد غیرسمی هستند ولی طی یک روند وابسته به غلظت، موجب القای اثرات ژنوتوکسیک با افزایش فراوانی میکرونوکلئوس‌ها و دیگر ناهنجاری‌های غیرطبیعی هسته گلبول‌های قرمز می‌شوند، بنابراین به نظر می‌رسد در صورت رهایش این نانوماده به محیط زیست، اثرات نامطلوب آن بر بوم‌سازگان آبی محتمل باشد.
کلیدواژه‌ها: سمیت، *سیپرینوس کارپیو*، میکرونوکلئوس، نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۱۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۱۰
*نویسنده مسئول: morteza110110@gmail.com

مقدمه

در سال‌های اخیر در میان نانومواد اکسید فلزی، نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی (مگنتیت یا Fe_3O_4) با یک شیمی سطحی مناسب (افزایش سطح تماس و بلندترشدن انحنای سطحی)، خصوصیات منحصربه‌فرد کوانتومی، مکانیکی، فیزیکی، دمایی، الکتریکی سوپرپارامغناطیسی و توان کاتالیکی بالا، کانون توجهات بسیاری بوده است و برای کاربردهای بسیاری در حوزه‌های زیست‌پزشکی، داروسازی، تصفیه محیط زیست و صنعت معرفی و هدف‌گیری شده که عمدتاً بر خصوصیات مغناطیسی ارزشمند نانوذرات مگنتیت متمرکز هستند[1]. آنها کاربردهای بی‌شماری در شرایط "*در محیط زنده*" و "*در شیشه*" دارند که از آن جمله می‌توان به افزایش تمایز و کنتراست در تصویربرداری تشدید مغناطیسی (MRI) و بافت‌های توموری، سم‌زدایی از مایعات زیستی، جریان مغناطیسی فوق گرمایی (هایپرترمیا) در درمان سرطان، مگنتوفکشن، سلول‌درمانی و برچسب‌زدن ماکرومولکول‌ها و سلول‌ها، انتقال ژن و کاربردهای انتقال دارو به‌صورت میسل‌های نانوذرات اکسیدآهن، سیالات آهن‌دار (فروسیالات)، ابزارهای ضبط و ذخیره‌سازی داده، بیورسانه، مواد محافظ اشعه در تلفن همراه، حسگرهای زیستی، مواد ماهواره‌های مرئی و فروسرخ، مایعات مغناطیسی (با قابلیت کاربری در آب‌بندی‌ها، ابزارآلات پزشکی ضدشوک، تنظیمات صدا و جلوه‌های نوری)، سریش‌هایی با خاصیت القای مغناطیسی، مواد رنگی، نانوجاذب‌ها (برای حذف فلزات سمی از پساب‌ها)، تصفیه و پالایش فاضلاب‌ها و پساب‌ها در محیط زیست، نانوجاذب‌ها (برای حذف فلزات سمی از پساب‌ها) و تصفیه و پالایش فاضلاب‌ها و پساب‌ها اشاره کرد[1, 2-10]. با این حال نظر به افزایش رو به رشد تولید و گسترش این نانومواد در علوم و فناوری، کمبود اطلاعات و داده‌ها در ارتباط با پتانسیل تاثیرات منفی احتمالی و پیش‌بینی احتمال رهایش آنها به زیست‌بوم‌های آبی، اهمیت و ضرورت طرح سئوالات جدی در ارتباط با مخاطرات زیست‌محیطی آتی آنها در بوم‌سازگان‌های دریایی را دوچندان ساخته است.

امروزه نانوذرات مهندسی‌شده (ENPs) به‌عنوان یک گروه جدید از آلاینده‌ها با درجه اهمیت بوم‌سم‌شناسی برای زیست‌بوم آبی معرفی شده‌اند، زیرا ورود آنها به خاک و نهایتاً مسیرهای آبی منتهی به دریاها و اقیانوس‌ها امری اجتناب‌ناپذیر است[11]، بنابراین آینده رویکردهای بوم‌سم‌شناسی باید در جهت ارزیابی ترانسفورماسیون‌های زیستی و شیمیایی نانومواد و تاثیرات مضرشان بر ارگانیزم‌های هدف باشد.

تاکنون مطالعات نانوبوم‌سم‌شناسی نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی فقط بر آلودگی‌های اتمسفری، اثرات آن بر سیستم‌های تنفسی پستانداران یا ارزیابی‌های "*در شیشه*" در رده‌های مختلف سلول‌های پستانداران با سوگیری‌های دارویی اشاره داشته‌اند. *گوپتا* و *ولز*[2] در مطالعه خود با بررسی سمیت‌سنجی نانوذرات اکسیدآهن سوپرپارامغناطیسی میسل معکوس بر سلول‌های فیبروبلاست پوست انسان، عنوان داشته‌اند که این نانوذرات غیرسمی هستند و قابلیت کاربردهای زیست‌پزشکی و دارویی "*در محیط زنده*" و "*در شیشه*" را دارند. اما تمامی موارد گزارش‌شده به سرنوشت نهایی نانوذرات اکسیدآهن به‌دنبال حضور اجتناب‌ناپذیر در محیط زیست‌های آبی توجهی نداشته است، برخلاف دیگر مواد سمی که تحقیقات بی‌شماری، آسیب‌رسانی آنها را در سطوح استرس اکسیداتیو، میتوکندری، کروموزوم، DNA، تغییرات چرخه سلولی و پروتئین به اثبات رسانده‌اند[12]. در ارتباط با نانوذرات و به‌ویژه نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی، مکانیزم عملکرد و سمیت احتمالی آنها بر زیست‌مندان آبزی کماکان نامشخص مانده است. بنابراین قبل از استفاده‌های متنوع از انواع نانوذرات اکسیدآهن در سطوح وسیع، باید به این ابهامات تا حدودی پاسخ داد.

ارزیابی اثرات ژنوتوکسیک یک آلاینده مانند نانوذرات توسط شاخص‌های زیستی مختلف در هر دو شرایط "*در محیط زنده*" و "*در شیشه*" امکان‌پذیر است، از جمله مشاهده و شمارش کروموزوم‌ها

Archive of SID
www.SID.ir

در مرحله متافاز که مستلزم صرف زمان و پیچیدگی‌های تکنیکی بسیاری است. اما در این میان آزمون‌هایی مانند میکرونوکلئوس (ریزهسته) و ارزیابی ناهنجاری‌های غیرطبیعی هسته گلبول‌های قرمز خون محبوبیت بسیار بالایی دارند. این روش نخستین‌بار توسط *کاراسکو* و همکاران[13]، طی بررسی شکل‌گیری انواع ناهنجاری‌ها در ریخت‌شناسی هسته (NAs) در گلبول‌های قرمز خون ماهیان تحت تاثیر آلاینده‌هایی با عملکرد سیتوتوکسیک، ژنوتوکسیک، موتاژنیک و کارسینوژنیک شناسایی و گزارش شد. میکرونوکلئوس یا ریزهسته در واقع هسته کوچک جداشده از هسته اصلی است که در خلال تقسیم سلولی تشکیل می‌شود و شامل کروموزوم‌ها یا قطعات کروموزومی ناشی از اختلال در عملکرد دوک میتوزی یا قطعات آسنتریک در مرحله آنافاز است[14]. از آنجایی که این ریزهسته‌ها در سلول‌هایی که تقسیم آنها کامل شده است، ایجاد می‌شوند، به‌نوعی نشان‌دهنده واردشدن سلول به فاز میتوز و دوهسته‌ای‌شدن طی چرخه سلولی هستند و یک نوع ناهنجاری سلولی محسوب می‌شوند، به همین دلیل ارزیابی ریزهسته در ماهیان به‌واسطه یک شاخص ساده و حساس از آسیب‌ها و شکست کروموزمی است که اطلاعاتی راجع به روند پیشرفت چرخه سلولی و سمیت سلولی تحت اثر عامل القاگر خارجی را نشان می‌دهد.

زیست‌آزمون روشی است که عکس‌العمل‌های موجودات آبزی را به‌واسطه در معرض قرارگیری با غلظت‌های مختلف ماده آلوده‌کننده ارزیابی می‌کند و به‌منظور آشکارسازی، اندازه‌گیری یا تاثیر یک یا چند ماده سمی یا عوامل محیطی به‌تنهایی یا توام با یکدیگر مورد استفاده قرار می‌گیرد[15]. ماهی کپور معمولی از خانواده کپورماهیان (سیپرینیده) است. این ماهی مقاومت بالا و رشد مناسبی در برابر استرس‌های محیطی دارد. بنابراین این گونه به‌منظور سمیت‌سنجی، پیش‌بینی و بررسی اثرات نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی بر آبزیان هدف‌گیری و گزینش شد.

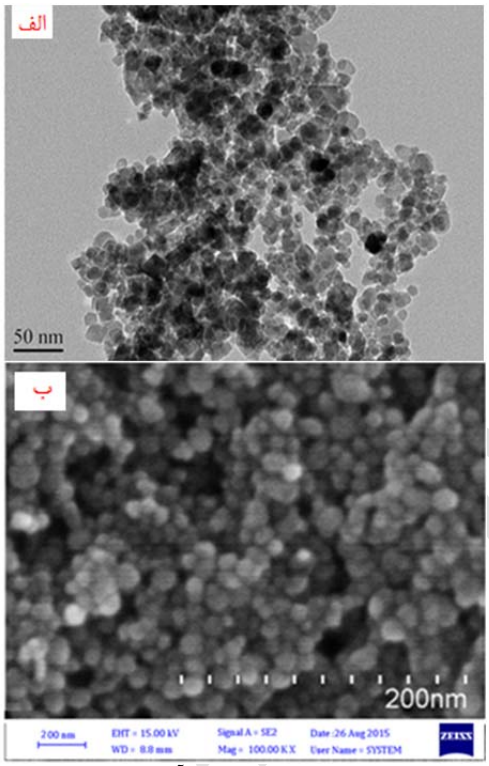
هدف پژوهش حاضر، بررسی اثرات ژنوتوکسیک نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی در گلبول‌های قرمز ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) به روش میکرونوکلئوس تحت تیمار حاد و مزمن بود.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر یک آزمایش تجربی است.

نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی، خصوصیات ذره‌ای و تعیین غلظت: پودر خالص و سیاه‌رنگ نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی مگنتیت با درجه خلوص ۹۹/۵% بدون پوشش با اندازه ذره ۱۵ تا ۲۰نانومتر و شکل کروی (US NANO؛ ایالات متحده) تهیه شد و در ادامه، دیگر ویژگی‌های آن نیز مورد سنجش قرار گرفت. این نانوذرات در ایران از شرکت واسطه پیشگامان نانومواد ایرانیان خریداری شد که این شرکت برخی از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی را نیز برای این محصول ارایه نموده است. این خصوصیات شامل چگالی نانوذره ۴/۸گرم بر سانتی‌متر مکعب و مساحت سطحی BET برابر با ۸۱/۹۸مترمربع بر گرم و میانگین پتانسیل زتای ۶/۰۷±۱۷/۲میلی‌ولت بودند که توسط دستگاه زتاسایزر (مالورن؛ انگلستان) سنجش شدند. میانگین اندازه قطر هندسی ذره آن ۸/۰۵نانومتر بود و توسط دستگاه پارتیکل‌سایزر (Scatterscope-I Qudix؛ کره) تعیین شد. سنجش ویژگی‌های دیگری مانند شکل، توزیع ذرات، اندازه و جنس نانوذره و طبیعت کریستاله آن هم با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM؛ FEI؛ ایالات متحده)، میکروسکوپ الکترونی نگاره با قدرت تفکیک بالا (SEM؛ سیگما؛ آلمان) و آنالیز تفرق اشعه X (XRD؛ Panalytical؛ هلند) صورت پذیرفت (شکل ۱ و ۲-الف).

به‌منظور ارزیابی سمیت‌های حاد و مزمن به‌ترتیب استوک‌هایی از غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰میلی‌گرم بر لیتر و ۱۰۰ و ۵۰۰میلی‌گرم بر لیتر از پودر نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی حل‌شده در آب دیونیزه (بسیار خالص) تهیه و آماده‌سازی شد و برای دستیابی به یک محلول کلوئیدی پایدار و نیز ممانعت از نشست نانوذرات اکسیدآهن، استوک‌های تهیه‌شده به‌مدت ۴ساعت در دستگاه اولتراسونیکانتور حمام‌دار (Elma؛ آلمان) با شرایط ۱۰۰وات و ۴۰کیلوهرتز و با فواصل زمانی خاموش/ روشن دستگاه (۱۰:۳۰دقیقه) اولتراسونیکیت شدند. آنها پیش از اضافه‌نمودن به تیمارها و رقیق‌سازی برای حفظ شرایط سوسپانسیون و ثبات غلظت‌ها به‌مدت ۳۰دقیقه دیگر روی همزن مغناطیسی قرار گرفتند[16]. در آزمون سمیت‌سنجی حاد، نرخ تلفات مهم‌ترین نقطه هدف است.



شکل ۱) الف) تصویر TEM از نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی، ب) نمایی از شکل کروی نانوذره در تصویر SEM

شکل ۲) الف) نمایی از بسته‌بندی و پودر سیاه‌رنگ نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی، ب) بچه‌ماهی کپور معمولی پس از تیمار با نانوذره اکسیدآهن، ج) سیستم طراحی‌شده برای بازچرخش کامل نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی در مخازن تیماربندی بچه‌ماهیان

Archive of SID
www.SID.ir

پرورش و نگه‌داری ماهی: تعداد ۳۰۰ عدد بچه‌ماهی کپور معمولی، با وزن متوسط زیر ۲۰گرم از یکی از کارگاه‌های تکثیر و پرورش ماهیان گرم آبی خریداری و به آزمایشگاه آبزیان منتقل شدند. ماهیان پیش از تیمارهای سمیت‌سنجی، به‌مدت دو هفته با شرایط آزمایشگاه سازگار و با غذای خشک مصنوعی به نسبت ۲% وزن بدنشان، تغذیه شدند. تعویض آب آنها روزانه و نگه‌داری‌شان تحت یک شرایط نوری طبیعی و هوادهی ثابت بود و از دوره‌های خاص نوردهی/ تاریکی اجتناب شد، پیش از تیماربندی با نانوذرات به‌مدت ٤٨ساعت بدون غذا نگه‌داری شدند. ماهیان از مخازن اصلی به‌صورت تصادفی انتخاب و برای محاسبه غلظت کشنده *۹۶ساعته* (LC_{50} ۹٦ساعته) و بررسی آزمون‌های نانوتوکسیسیتی مورد استفاده قرار گرفتند. در تیماربندی ماهیان، به‌منظور پیشگیری از واکنش و رسوب‌دهی نانوذرات اکسیدآهن با املاح موجود در آب، از آب شهری تصفیه، هوادهی و کلرزدایی‌شده که خصوصیات کیفی آن شامل دمای ۲٦±۱°C، میزان pH برابر با ۸/۱±۰/۳۲، هدایت الکتریکی (EC) برابر با ۲۲۰میکروزیمنس بر سانتی‌متر، میزان DO برابر با ۷/۸±۱/۱، میزان یون‌های آمونیاک کمتر از ۰/۰۱ بخش در میلیون (ppm)، نیتروژن‌دی‌اکسید (NO_2) و نیترات (NO_3) کمتر از ۰/۱ppm بود، استفاده شد. به‌منظور تیمار ماهیان در غلظت‌های مختلف نانوذره و ممانعت از رسوب‌دهی نانوذرات اکسیدآهن به‌علت جرم مولی بالا (اکسیدآهن=۲۳۱/۵۳۲٦گرم بر مول)، سیستمی با جریان هوادهی تحت فشار از پایین و بالای مخزن آبی به‌گونه‌ای طراحی شد که طی چرخش کامل آب درون مخزن، نانوذره نیز در محیط آبی در گردش بوده و از نشست آن جلوگیری به عمل آید، تا بدین شکل نرخ دسترسی زیستی نانوذرات اکسیدآهن برای ماهیان تحت تیمارها ثابت باشد (شکل ۲-ب و ج). به‌منظور حفظ فاز آبی نسبتاً محلول از اکسیدآهن، غلظت‌های تعیین‌شده از نانوذرات برای یک مواجهه حاد و مزمن ماهیان به‌صورت روزانه تهیه شده و درون مخازن تمدید می‌شد. برای نمونه‌های شاهد نیز تعویض آب به‌صورت روزانه بود. زیرا نرخ رسوب‌گذاری نانوذرات در آب سریع است و حتی با وجود هوادهی مستمر باز هم غلظت واقعی آنها در عرض ۳ روز تا ۵۰% اولیه کاهش پیدا می‌کند، بنابراین باید هر روز غلظت‌ها تمدید می‌شد تا ۱۰۰% حالت تعلیق حفظ شود[17]. در طول دوره در معرض قرارگیری با نانوذرات، ماهیان غذادهی نشدند تا احتمال جذب نانوذرات به غذا یا مواد دفعی به حداقل برسد و این گونه به حفظ سلامت و کیفیت آب کمک شد[16].

زیست‌آزمون حاد و مزمن نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی و نمونه‌گیری: ابتدا یک آزمون سمیت حاد، طراحی و انجام شد تا غلظت‌های وابسته به منحنی پاسخ‌های مرگ‌ومیر تعیین شود. برای این منظور از دستورالعمل آزمون‌های سمیت حاد ماهیان (با توجه به رهنمود استاندارد شماره ۲۰۳ "سازمان توسعه و همکاری اقتصادی" برای ماهیان؛ OECD) استفاده شد[18]. برای آزمون سمیت حاد ۵ غلظت (صفر، ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰میلی‌گرم بر لیتر) متوالی از نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی با احتساب گروه کنترل (غلظت صفر میلی‌گرم در لیتر) در سه تکرار و در هر تکرار ۱۵ عدد ماهی در هر غلظت در نظر گرفته شد، به‌طوری که غلظت‌های ۱۰۰% تلفات و دوزهای غیرکشنده را نیز در بر بگیرد. ماهیان به هر غلظت اضافه شده و تلفات به‌صورت روزانه تا ٤ روز (۹٦ساعت) در زمان‌های صفر، ۲٤، ٤٨، ۷۲ و ۹٦ ساعت ثبت شدند. ماهیان مرده به‌منظور اجتناب از فساد و تغییر وضعیت کیفی آب سریعاً خارج می‌شدند. تمامی آزمون‌ها در یک زمان و در سه تکرار صورت پذیرفت تا از اعتبار زیستی برخوردار باشد. سپس براساس تلفات ثبت‌شده، محاسبه LC_{50} ۹٦ساعته در سطح اطمینان ۹۵% انجام شد تا غلظت ایجادکننده ۵۰% تلفات و همچنین حداکثر غلظت قابل قبول نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی در ماهی کپور معمولی مشخص شود.

برای ارزیابی سمیت زیست‌محیطی (سمیت مزمن) تحت یک سطح پایین از مواجهه با نانوذره، بر پایه نتایج آزمون سمیت حاد دو غلظت بر حسب میلی‌گرم بر لیتر به‌عنوان دوز پایین (می‌بایست معادل ۰/۱ غلظت سمیت حاد باشد[19]) و دوز بالا به‌عنوان کمترین غلظتی که باعث ازدست‌رفتن حیات جاندار می‌شود (LOEC)، انتخاب شد[20]. در این راستا پژوهش حاضر بر پایه پیش‌آزمون‌های پایلوت صورت پذیرفت. کپورماهیان جوان به‌مدت ١٤ روز تحت یک تیمار مزمن از غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰میلی‌گرم بر لیتر در سه تکرار و در هر تکرار ۱۰ عدد ماهی در هر غلظت قرار گرفتند و ماهی‌ها از هر گروه در روزهای ۱، ۳، ۷ و ١٤ در تیمار مزمن و در روز چهارم (۹٦ساعت) در تیمار حاد نمونه‌گیری شدند. برای این منظور پس از بیهوش‌نمودن ماهیان با ماده بیهوشی ترکائین‌متان‌سولفانات (MS222)، خونگیری توسط سرنگ ۲/۵سی‌سی هپارینه‌شده از ورید ساقه دمی ماهی صورت گرفت.

آزمون میکرونوکلئوس و دیگر ناهنجاری‌های هسته گلبول قرمز: برای این منظور یک قطره از نمونه‌های خون از هر تیمار مستقیماً روی اسلاید شیشه‌ای قرار گرفت و از آن گسترش خونی تهیه شد. سپس اسلایدها در معرض هوا خشک شدند. برای تثبیت سلول‌های خونی از چند قطره متانول استفاده شد و پس از گذشت ۱۰دقیقه و خشک‌شدن مجدد اسلایدها، به‌وسیله محلول گیمسا ۱۰% به‌مدت ۲۰دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. در نهایت برای شمارش میکرونوکلئوس یا ریزهسته‌ها اسلایدها زیر میکروسکوپ نوری (Olempios؛ ایالات متحده) با بزرگ‌نمایی ۱۰۰، با استفاده از روغن امرسیون مورد ارزیابی قرار گرفتند. فراوانی میکرونوکلئوس‌ها (MN) در ۱۵۰۰ سلول گلبول قرمز از هر اسلاید تعیین شد و از هر نمونه خون ماهی کپور معمولی جوان در هر گروه تیمار از آزمون‌های سمیت حاد و مزمن، پنج اسلاید تهیه شد[21]. در گلبول‌های قرمز خون ماهیان، وجود اجسام کروموزومی غیرانکساری گرد یا بیضوی با قطری کوچک‌تر از یک‌سوم قطر هسته اصلی گلبول قرمز که معمولاً در قسمت‌های حاشیه‌ای هسته اصلی است یا کمی با هسته هم‌پوشانی دارند و مشابه هسته و با همان الگو رنگ گرفته‌اند، تحت عنوان میکرونوکلئوس (ریزهسته) شمارش می‌شوند[22, 23]. آسیب‌های غیرطبیعی هسته گلبول‌های قرمز خون علاوه بر میکرونوکلئوس‌ها، دیگر اشکال غیرطبیعی هسته را نیز در بر می‌گیرند که به‌همراه میکرونوکلئوس‌ها عموماً به ۵ گروه تقسیم می‌شوند که شامل موارد زیر هستند:

۱) میکرونوکلئوس (MN)، ۲) دوهسته‌ای (BN): زمانی که سلول‌های گلبول‌های قرمز دوهسته‌ای باشند، ۳) برآمدگی‌های هسته‌ای (BL): در این حالت غشای هسته دارای برآمدگی‌هایی با محتوای کروماتینی است، ٤) هسته‌های لوب‌دار (چندجزئی؛ LB): زمانی که برآمدگی‌های هسته‌ای بسیار بزرگ‌تر از حالت BL بوده و دارای چندین لوب یا بخش باشند، ۵) هسته‌های شکاف‌دار (NT): وقتی هسته، واکوئل‌دار یا خلل و فرج‌دار بوده که این فضاهای خالی به‌طور مشخص تا عمق هسته امتداد یافته‌اند[21, 24, 25]. در پژوهش حاضر تعداد کل اشکال غیرطبیعی هسته مشتمل بر هر چهار نوع BN، BL، LB و NT در اسلایدهای تهیه‌شده از هر تیمار در آزمون‌های سمیت حاد و مزمن، به‌همراه میکرونوکلئوس‌ها

Archive of SID
www.SID.ir

شمارش و تعیین شدند.

در پژوهش حاضر فراوانی ناهنجاری‌های هسته به‌صورت فراوانی کل ارایه شد، هر چند برآورد تفریقی ناهنجاری‌های هسته مبتنی بر چهار گروه ذکرشده زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ نیز انجام شد. به‌منظور تعیین غلظت‌های زیست‌آزمون مزمن، تاکید در انتخاب دوز بالا به‌عنوان سمیت تحت کشندگی یا کمترین غلظتی که باعث از دست‌رفتن حیات جاندار می‌شود و دوز پایین مبتنی بر ۰/۱ بالاترین غلظت سمیت حاد (۱۰۰۰میلی‌گرم بر لیتر) بود. بنابراین در تیمار مزمن دو غلظت ۱۰۰ و ۵۰۰میلی‌گرم در لیتر از نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی به‌عنوان غلظت‌های نماینده حد بالا و پایین از حداکثر غلظت مجاز این ماده طی یک مواجهه حاد بچه‌ماهیان کپور معمولی با نانوذرات اکسیدآهن انتخاب شده و بروز پاسخ‌های استرس اکسیداتیو مبتنی بر سطوح مختلف ژنوتوکسیک تحت القای تیمار حاد و مزمن نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی در گلبول‌های قرمز بچه‌ماهیان کپور معمولی به روش میکرونوکلئوس ارزیابی و مقایسه شد.

نرمال‌بودن توزیع داده‌ها و همگنی واریانس‌ها توسط آزمون شاپیرو- ویلک بررسی شد. از آنالیز واریانس دوطرفه به‌منظور تعیین معنی‌داری اثر غلظت‌های مختلف، زمان و برهم‌کنش آنها استفاده شد. سپس با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن، معنی‌داری اختلاف میان تیمارهای مختلف مشخص شد. برای آنالیز آماری نرم‌افزار IBM SPSS 19 به کار رفت.

یافته‌ها

مواجهه حاد (۹۶ساعته) با نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی روی بچه‌ماهیان کپور اثر سمیت حاد نداشت (جدول ۱)، به‌طوری که نرخ مرگ‌ومیر در غلظت‌های پایین نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی (۱۰ و ۱۰۰میلی‌گرم بر لیتر) صفر بود و در غلظت‌های بالای این نانوذره (۵۰۰ و ۱۰۰۰میلی‌گرم بر لیتر) به‌ترتیب تلفاتی برابر با ۲ و ۴% جمعیت تحت تیمار داشت.

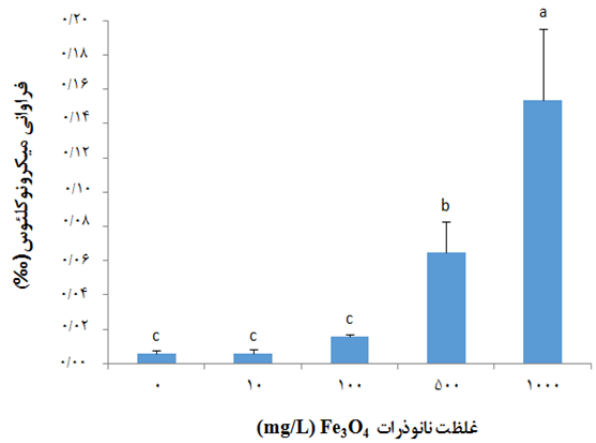
با افزایش غلظت نانوذرات اکسیدآهن طی یک بازه زمانی ۹۶ساعته مجاورت با نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی، فراوانی میکرونوکلئوس‌ها (‰) در اطراف هسته گلبول‌های قرمز خون بچه‌ماهیان کپور معمولی در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد ($p<0/05$؛ شکل ۳ و نمودار ۱).

علاوه بر میکرونوکلئوس‌ها، دیگر اشکال غیرطبیعی هسته گلبول‌های قرمز مشتمل بر هر ۴ نوع ناهنجاری BN، BL، LB و NT نیز در نمونه‌های خون بچه‌ماهیان کپور معمولی، تحت تیمارهای حاد و مزمن با نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی مشاهده شدند (شکل‌های ۴ تا ۶).

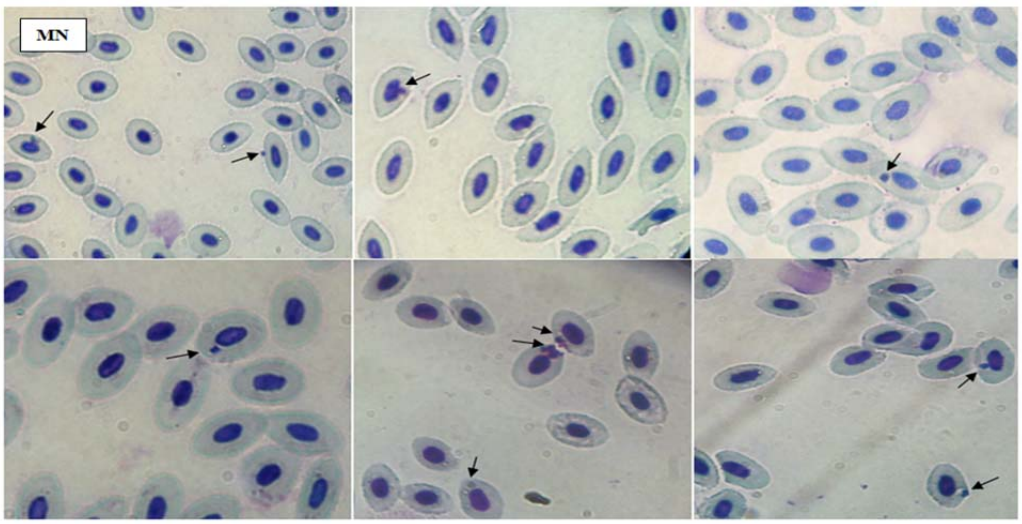
با افزایش غلظت نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی، طی یک مواجهه حاد ۹۶ساعته، فراوانی کل اشکال غیرطبیعی هسته (‰) در گلبول‌های قرمز خون بچه‌ماهیان کپور معمولی در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p<0/05$؛ نمودار ۲).

جدول ۱) نرخ تلفات بچه‌ماهیان کپور معمولی، تحت یک مواجهه حاد ۹۶ساعته با نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی (تعداد کل=۴۵)

درصد کل تلفات	مرگ‌ومیر				غلظت (میلی‌گرم بر لیتر)
	۹۶ساعته	۷۲ساعته	۴۸ساعته	۲۴ساعته	
۰	۰	۰	۰	۰	۰
۰	۰	۰	۰	۰	۱۰
۰	۰	۰	۰	۰	۱۰۰
۲	۱	۰	۰	۰	۵۰۰
۴	۱	۰	۱	۰	۱۰۰۰

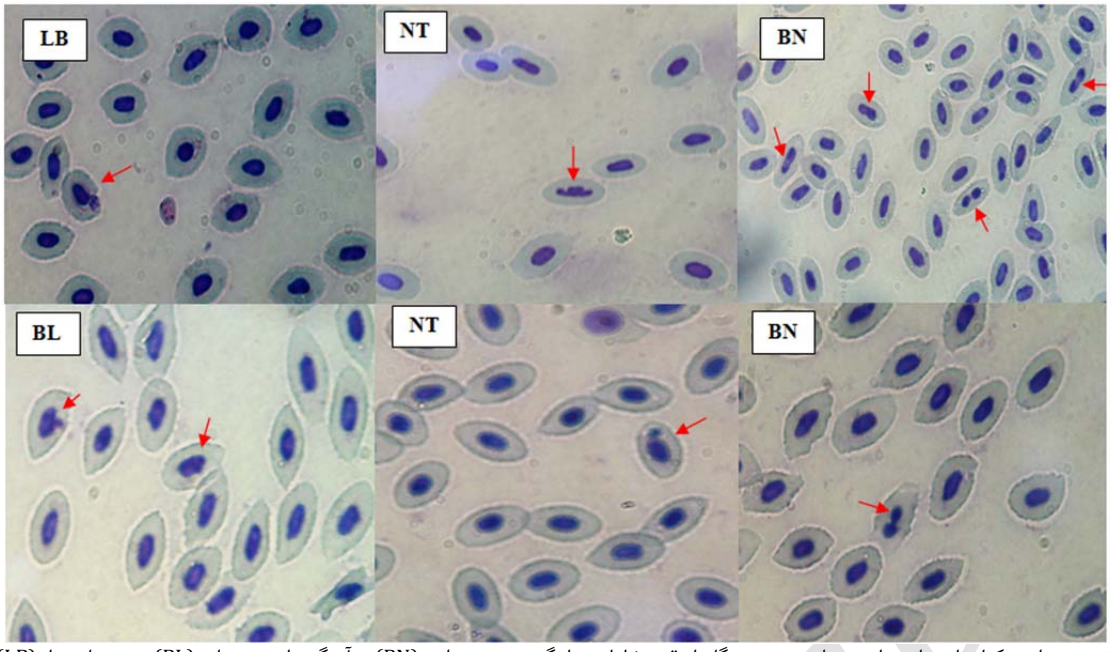


نمودار ۱) فراوانی میکرونوکلئوس‌ها (‰) در اطراف هسته گلبول‌های قرمز خون بچه‌ماهیان کپور معمولی تحت تیمار حاد ۹۶ساعته با نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی غلظت صفرمیلی‌گرم در لیتر مربوط به نمونه‌های شاهد است (حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف از نانوذرات اکسیدآهن است؛ داده‌ها به‌صورت میانگین±انحراف‌معیار ارایه شده است)

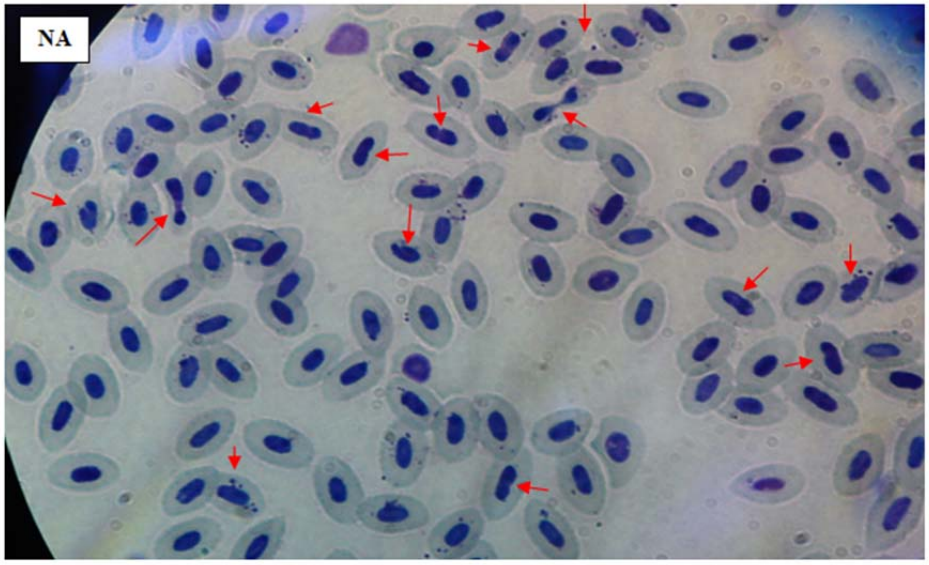


شکل ۳) تصویری از تشکیل میکرونوکلئوس‌ها در گلبول‌های قرمز بچه‌ماهیان کپور معمولی تحت یک تیمار حاد با نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی پیکان سیاه‌رنگ موقعیت آنها را در حوالی هسته نشان می‌دهد (عکس‌برداری با میکروسکوپ نوری- بزرگ‌نمایی ۱۰۰)

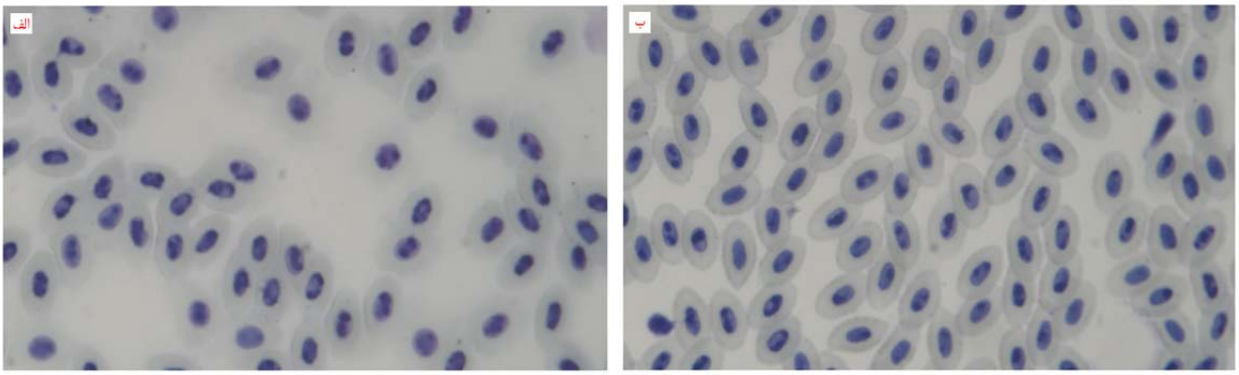
www.SID.ir



شکل ۴) تصویری از تشکیل ناهنجاری‌های غیرطبیعی هسته گلبول قرمز شامل چهار گروه: دوهسته‌ایی (BN)، برآمدگی‌های هسته‌ای (BL)، هسته لوب‌دار (LB) و هسته شکاف‌دار (NT) در بچه‌ماهیان کپور معمولی تحت تیمار حاد (پیکان قرمزرنگ موقعیت آنها را در حوالی هسته نشان می‌دهد؛ عکس‌برداری با میکروسکوپ نوری- بزرگ‌نمایی ۱۰۰).

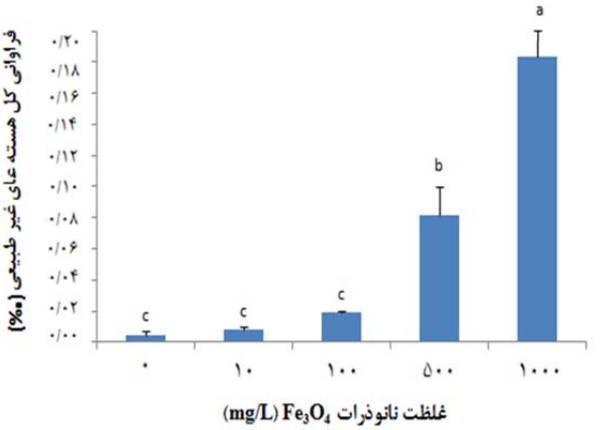


شکل ۵) نمایی از کل انواع اشکال غیرطبیعی هسته گلبول قرمز بچه‌ماهیان کپور معمولی تحت تیمار حاد (پیکان قرمزرنگ موقعیت آنها را در حوالی هسته نشان می‌دهد؛ عکس‌برداری با میکروسکوپ نوری- بزرگ‌نمایی ۱۰۰)

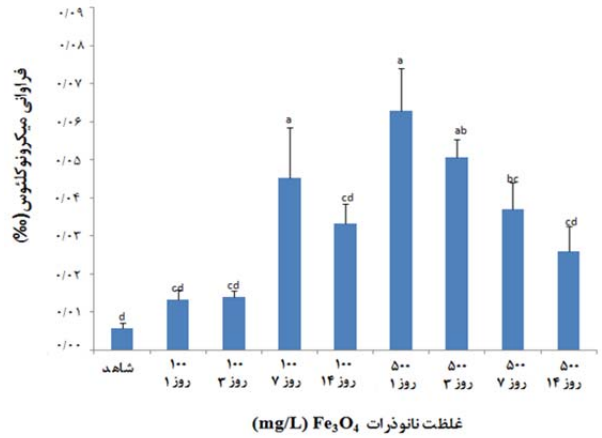


شکل ٦) تصاویری از توقف سلول‌ها در چرخه میتوز و بروز انواعی از ناهنجاری‌های هسته گلبول‌های قرمز خون ماهیان تحت تیمار حاد (عکس‌برداری با میکروسکوپ نوری- بزرگ‌نمایی ۱۰۰)

www.SID.ir



نمودار ۲) فراوانی کل ناهنجاری‌های غیرطبیعی هسته‌های (‰) گلبول‌های قرمز خون بچه‌ماهیان کپور معمولی تحت تیمار حاد با نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی غلظت صفرمیلی‌گرم در لیتر مربوط به نمونه‌های شاهد است (حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف از نانوذرات اکسیدآهن است؛ داده‌ها به‌صورت میانگین±انحراف‌معیار ارایه شده است)



نمودار ۳) فراوانی میکرونوکلئوس‌ها (‰) در اطراف هسته گلبول‌های قرمز خون بچه‌ماهیان کپور معمولی تحت تیمار مزمن ۱۴روزه در غلظت های ۱۰۰ و ۵۰۰میلی‌گرم در لیتر از نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی در مقایسه با شاهد (حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف از نانوذرات اکسیدآهن است؛ داده‌ها به‌صورت میانگین±انحراف‌معیار ارایه شده است)

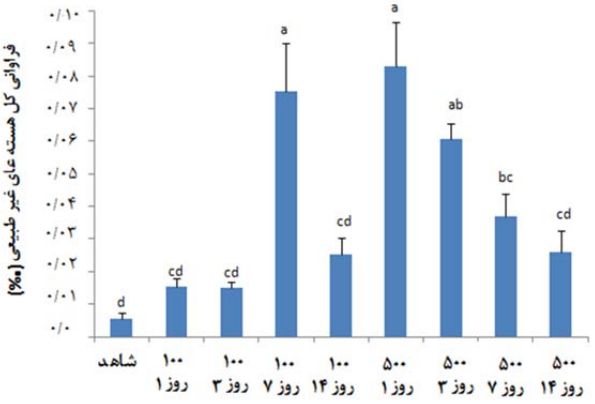
ترتیب فراوانی LB<BL<NT<BN بود. نظر به این که اختلافات مشاهده‌شده بین فراوانی‌های آنها معنی‌دار نبود ($p>0.05$)، فراوانی کل ناهنجاری غیرطبیعی در هسته گلبول‌های قرمز بین غلظت‌های مختلف از نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی مقایسه شد.

نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی حتی تا غلظت ۱۰۰۰میلی‌گرم بر لیتر نیز اثرات سمیت و مرگ‌ومیر بالا در ماهیان کپور معمولی را نداشتند.

تیمار مزمن ۱۴روزه غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰میلی‌گرم در لیتر از نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی، در بچه‌ماهیان کپور معمولی نشان داد که نرخ افزایش فراوانی میکرونوکلئوس‌ها مشابه آزمون حاد تابعی از غلظت بود، به‌طوری که در تمامی دوره‌های زمانی خونگیری از ماهیان در روزهای ۱، ۳، ۷ و ۱۴ در غلظت ۵۰۰میلی‌گرم در لیتر، فراوانی میکرونوکلئوس‌ها بالاتر از غلظت ۱۰۰میلی‌گرم در لیتر بود. بنابراین در تیمار مزمن در غلظت ۱۰۰میلی‌گرم در لیتر با افزایش زمان مجاورت با نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی، تا روز هفتم این روند افزایشی بود و در مقایسه با گروه شاهد اختلافی معنی‌دار نشان داد ($p<0.05$)، اما در روز ۱۴ نرخ فراوانی میکرونوکلئوس‌ها روندی کاهشی در پیش گرفت و با روزهای یکم و سوم اختلاف معنی‌داری نداشت ($p>0.05$).

در تیمار مزمن در غلظت ۵۰۰میلی‌گرم در لیتر که به‌نوعی یک سمیت‌سنجی تحت حاد نیز هست با افزایش زمان مجاورت با نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی، علی‌رغم این که در مقایسه با گروه شاهد اختلافات معنی‌دار بود ($p<0.05$)، روند تغییر فراوانی میکرونوکلئوس‌ها کاهش نشان داد و تنها در روز اول بالاترین نرخ فراوانی میکرونوکلئوس‌ها مشاهده شد ($p<0.05$؛ نمودار ۳).

نرخ افزایش فراوانی ناهنجاری غیرطبیعی هسته گلبول‌های قرمز مشابه آزمون حاد تابعی از غلظت بود و در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p<0.05$). بنابراین روند اختلافات مشاهده‌شده میان غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰میلی‌گرم در لیتر از نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی طی افزایش زمان مجاورت با نانوذره مشابه روند مشاهده‌شده در آزمون میکرونوکلئوس‌ها طی تیمار مزمن بود (نمودار ٤).



نمودار ٤) فراوانی کل ناهنجاری‌های غیرطبیعی هسته‌های (‰) گلبول‌های قرمز خون بچه‌ماهیان کپور معمولی تحت تیمار مزمن ۱۴روزه در غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰میلی‌گرم در لیتر از نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی در مقایسه با شاهد (حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف از نانوذرات اکسیدآهن است؛ داده‌ها به‌صورت میانگین±انحراف‌معیار ارایه شده است)

بحث

پژوهش حاضر با هدف بررسی اثرات ژنوتوکسیک نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی در گلبول‌های قرمز ماهی کپور معمولی به روش میکرونوکلئوس تحت تیمار حاد و مزمن انجام شد.

امروزه در پژوهش‌های زیست‌محیطی، مطالعات ژنوتوکسیک جایگاهی بسیار ویژه و بحرانی به‌خصوص در حوزه نانواکوبوم‌سم‌شناسی دارند، زیرا پایش پتانسیل ژنوتوکسیک نانوذرات در ارگانیزم‌های آبزی علی‌رغم مطالعات دهه‌های اخیر بسیار کم شناخته و بررسی شده است و باید به این مساله نیز توجه کرد که بسیاری از آلاینده‌های حال حاضر در بوم‌سازگان‌های آبی اگرچه در ظاهر خطر و تهدیدی را متوجه بقا و فیزیولوژی حیات برخی از آبزیان نداشته‌اند، اما پژوهش‌های اخیر نشان داده است که آنها بسیاری از تغییرات ژنتیکی (مشتمل بر ژنتیک، اپی‌ژنتیک، کلاستوژنیک، آنیوژنیک و غیره) در ارگانیزم هدف آبزی را القا می‌کنند و به انواع جهش‌ها و سرطان‌ها یا تهدیدات برای بقای نسل

Archive of SID
www.SID.ir

منتهی می‌شوند. به‌علاوه برخلاف مطالعات آزمایشگاهی "*در شیشه*" که تنها یک شبیه‌سازی از مواجهه واقعی حیات با آلاینده است، در آزمون‌های "*در محیط زنده*" و "*درجا*" (*in situ*) اطلاعات حاصل بسیار واقع‌گرایانه‌تر و با اهتمام به تمامی پیچیدگی‌های حیاتی جاندار خواهد بود[26]. از این رو در پژوهش حاضر برای رسیدن به این هدف و طی اقدامی پیشگام، سمیت‌سنجی نانوژنوتوکسیک نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی "*در محیط زنده*" در بچه‌ماهیان کپور معمولی، طی یک مواجهه حاد و مزمن با نانوذرات اکسیدآهن و القای پاسخ‌های استرس اکسیداتیو مبتنی بر ژنوتوکسیک به روش میکرونوکلئوس ارزیابی و مقایسه شد.

طبق یافته‌های حاصل از پژوهش حاضر، نانوذرات برای بچه‌ماهیان کپور فاقد اثرات سمیت حاد بود، به‌طوری که حتی تا غلظت ۱۰۰۰میلی‌گرم بر لیتر (و حتی در پیش‌آزمون‌های پایلوت تا ۲۰۰۰میلی‌گرم در لیتر) نیز اثرات سمیت و مرگ‌ومیر بالا را در ماهیان کپور معمولی بروز نداد. از این رو با توجه به دسته‌بندی ارایه‌شده توسط سازمان ملل متحد[27]، چنانچه ماده‌ای در ماهیان واجد سمیت حاد با غلظت کشنده میانی LC_{50} ۹۶ساعته بیشتر از ۱۰۰میلی‌گرم بر لیتر باشد، جزء مواد غیرسمی است و نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی در گروه آلاینده‌های غیرسمی قرار می‌گیرند. علی‌رغم این که نانوذرات اکسیدآهن منجر به بروز اثرات سمیت حاد در بچه‌ماهیان کپور معمولی نشدند، اما طی روندی وابسته به غلظت، القای آسیب‌های کروموزومی، ژنوتوکسیک و افزایش معنی‌داری در فراوانی شکل‌گیری ریزهسته یا میکرونوکلئوس و دیگر ناهنجاری‌های غیرطبیعی هسته را در گلبول‌های قرمز خون ماهی در پی داشتند. به‌علاوه مقایسه نتایج تیمار مزمن ۱۴روزه ماهیان کپور معمولی با نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی نشان داد که اگرچه نرخ افزایش فراوانی MNها و NA تابعی از غلظت و زمان مجاورت با نانوذره است، اما افزایش زمان مجاورت به‌ویژه در هفته دوم تیمار حتی در غلظت ۵۰۰میلی گرم در لیتر (حد بالای تیمار مزمن) نیز به کاهش فراوانی MN و NA منتهی شد که این امر می‌تواند ناشی از سازگارشدن بدن ماهی با شرایط تیمار، فعال‌سازی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی برای مقابله با شرایط استرس‌زای مجاورت با نانوذرات اکسیدآهن و عملکرد بازترمیمی آن در بهبود آسیب‌های اکسیداتیو وارده به DNA و کروموزوم‌ها تحت القای نانوذره باشد.

مطالعه حاضر، سمیت‌سنجی نانوذرات اکسیدآهن در گلبول‌های قرمز خون ماهیان کپور معمولی طبق رویکرد استاندارد اعلام‌شده توسط OECD [28] را بررسی کرد و در راستای اهداف آن بود. پژوهش حاضر نخستین گزارش از عملکرد ژنوتوکسیک این نانوذره در ماهیان است، زیرا OECD در سال ۲۰۱۶ طی بازبینی رهنمود ۴۷۴ در ارتباط با سمیت‌سنجی مواد شیمیایی با هدف تشخیص خطرات ژنوتوکسیک مواد شیمیایی، اعلام داشت که طبقه‌بندی مواد شیمیایی باید منوط به سنجش اثرات ژنوتوکسیک آن مبتنی بر آزمون میکرونوکلئوس در اریتروسیست‌های پستانداران در شرایط "*در شیشه*" (بنا بر رهنمود OECD ۴۷۸) [29] یا در سلول‌های اریتروبلاست موش در شرایط "*در محیط زنده*" طبق استاندارد ذکرشده باشد، به‌نحوی که بر پایه تحقیقات کینتیکی آنها، در بازه‌های زمانی ۲۵ تا ۵۰ساعت پس از تیمار، پتانسیل القایی میکرونوکلئوس توسط ماده شیمیایی حداکثر است[30]. یافته‌های پژوهش حاضر نیز موید آن است.

آزمون میکرونوکلئوس گلبول‌های قرمز ماهیان که در پژوهش حاضر بنای سمیت‌سنجی ژنتیکی نانوذرات اکسیدآهن بود یک نشانگر زیستی شناخته‌شده در بحث پایش ژنوتوکسیک است و از آنجایی که در ماهیان استخوانی، گلبول‌های قرمز هسته‌دار هستند، تشکیل میکرونوکلئوس‌ها در سلول‌های خون ماهیان شاخص آسیب‌های کروموزومی است[25] و شمارش میکرونوکلئوس‌ها می‌تواند بازتابی از اثرات جهش‌زای آلاینده تحت بررسی باشد و قابلیت آن در آشکارسازی وقایع کلاستوژنیک، آنیوژنیک و نیز برخی از تاثیرات اپی‌ژنتیک باعث‌شده در پایش آلاینده‌های اکو- آسیب‌رسان آبی در سطح وسیعی مورد استفاده قرار گیرد[26, 31]. بنابراین حساسیت به آشکارسازی آسیب‌های DNA و سیتوژنتیک، سهولت آزمون که با صرف زمان کوتاهی قابل اجرا است، دقت و کاربری وسیع آن در انواع مختلف سلولی بر محبوبیت آن افزوده است[32].

میکرونوکلئوس‌ها اجسام سیتوپلاسمی با محتوای کروماتینی هستند که شیوع آنها در سلول شاخصی از وقوع ژنوتوکسیک و بی‌ثباتی در کروموزوم‌ها است. اگرچه مکانیزم دقیق مسئول بروز این ناهنجاری‌ها هنوز کاملاً مشخص نیست[21]. اما محققان اعتقاد دارند که شکل‌گیری ریزهسته‌ها و دیگر ناهنجاری‌های هسته مانند پل‌های نئوپلاستیک (NPBs)، جوانه‌های هسته (NBUDs) از لحاظ مکانیزم مولکولی، از مرحله آنافاز و تاخیر کروموزوم‌های آسنتریک یا قطعات کروماتینی که حاصل شکست‌های ترمیم‌نشده یا بدترمیم‌شده DNA هستند، بروز ناهنجاری‌هایی در رشته‌های دوک و نقص در تفکیک کل کروموزومی طی آنافاز و نقص در اشتراک‌گذاری صحیح کروموزوم‌ها در هسته سلول‌های دختری در طول فرآیند تقسیم سلولی منشا می‌گیرند که نتیجه آن هایپومتیلاسیون قطعات تکرارشونده در DNA سنترومریک و پری‌سنترومریک، نقص در پروتئین‌های کینتوکور و نقص در رشته‌های دوک طی گردهمایی کروموزوم‌ها و نهایتاً نقص و عملکرد ناکارآمد ژن‌های بازرسی آنافاز است[33]. منشا NPBها نیز از کروموزوم‌های دی‌سنتریک یا اتصال انتهاهای تلومری شکل گرفته است یا به‌واسطه نقص در جداسازی کروماتیدهای خواهری در آنافاز تحت تاثیر نقص در ترتیب‌بندی آنها رخ می‌دهد و در این میان احتمال می‌رود جوانه‌های هسته نیز حاصل فرآیند حذف DNA همانندسازی‌شده، نقص در کمپلکس ترمیم DNA و احتمال حضور کروموزومی از سلول‌های آنیوپلوئیدی باشد[33].

در بحث پتانسیل سمیت نانوذرات، دیدگاه‌ها متفاوت است، ولی محققان مهم‌ترین عامل موثر در سمیت نانوذرات را عمدتاً ناشی از فعالیت کاتالیکی بالا و کاهش مساحت سطحی ذره در حالت نانویی می‌دانند[34]. با این وجود مطالعات متعدد نمایه‌های مختلفی از اثرات سمیت ژنتیکی نانوذرات مانند آسیب‌های اکسیداتیو DNA و کروموزوم، تعدیل رونویسی ژن‌ها و تغییر در تنظیمات چرخه سلولی را نشان داده‌اند. طبق دانش موجود مکانیزم عملکرد سمی نانوذرات هنوز ناشناخته است[12]، اما یکی از اصلی‌ترین پیشنهادات مطرح‌شده در این بحث، تئوری جذب اندوسیتوزی نانوذرات در سلول، ایجاد تداخل در شیب الکتروشیمیایی غشا، تحریک تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) به‌واسطه اختلال در جریان الکترونی زنجیره تنفسی[35] و پیشروی فرآیند استرس اکسیداتیو و به موجب آن التهاب بافتی به‌واسطه تعدیل غلظت کلسیم درون‌سلولی، آسیب به بیومولکول‌هایی مانند DNA و نهایتاً کاهش عملکرد فیزیولوژیک سلول، القای آپوپتوز و مرگ سلولی است[36, 37].

نانوذرات مغناطیسی اکسیدآهن (ION) مشتمل بر انواع هماتیت (α-Fe_2O_3)، ماگمیت (γ-Fe_2O_3) و مگنتیت (Fe_3O_4) هستند. پژوهش‌های اخیر نشان داده‌اند این IONها که هم نانوذرات

Archive of SID
www.SID.ir

اکسیدآهن سوپرپارامغناطیسی (SPION) و هم یون‌های آهن را در بر می‌گیرند به‌دلیل توانایی متابولیزه‌شدن، رهاسازی آسان یون‌های آهن، حمل توسط شبه‌پروتئین‌هایی مانند فریتین، ترنس‌فریتین و هموسیدرین و ذخیره‌شدن در مخازن برون‌زاد، حایز اهمیت هستند[38]. اگرچه هنوز به‌درستی مشخص نیست که سمیت نانوذرات تا چه میزان به یون‌های آزادشده از آنها و چه میزان به خود نانوذرات مربوط است، اما در هر حال یون‌های آهن و چندین نوع یون فلزی دیگر واجد توانایی تولید ROS و تحریک پراکسیداسیون لیپیدی غشای سلولی بوده و این امر ایمنی زیستی نانوذرات آهن را شک‌برانگیز ساخته است[39].

در بحث سمیت ژنتیکی نانوذرات ION که عمدتاً شرایط "*در شیشه*" را هدف ارزیابی‌ها قرار داده است، روش‌های استاندارد سنجش آسیب‌های اکسیداتیو DNA، عمدتاً شامل روش ستاره دنباله‌دار و آزمون میکرونوکلئوس (آنالیز موتاسیون‌های کروموزومی) هستند، با این وجود نتایج گزارش‌شده در مطالعات مختلف حتی در غلظت‌های مشابه هم تا حدودی متناقض است[12]، مانند اثبات رابطه مثبت میان درمعرض‌گذاری نانوذرات اکسیدآهن و القای ژنوتوکسیسیته طی یک روند وابسته به غلظت در بسیاری از مطالعات صورت‌گرفته روی رده‌های مختلف سلول‌های انسانی مانند لنفوبلاستوئید (TK6)، فیبروبلاست ریه (IMR-90)، اپیتلیال برانشیایی انسانی (BEAS-2B)، اپیتلیال پوست (A431) و اپیتلیال ریه (A549) [40-43] که عمدتاً بر این باور بودند که اثرات سمی نانوذرات مغناطیسی اکسیدآهن بر بقای سلول حداقل است و فقط افزایش اندکی را در شمار سلول‌های آپپتوز آن هم در دوزهای بالا نشان می‌دهند و این امر نشانی از سمیت پایین یا عدم سمیت سلولی آنها است. رابطه منفی گزارش‌شده در القای ژنوتوکسیسیتی توسط IONها در مطالعه *کارلسون*[44, 45] و همچنین در مطالعه‌ای دیگر[39]، عدم القای آسیب DNA توسط نانوذرات مغناطیسی (Fe_2O_3 و Fe_3O_4) به روش ستاره دنباله‌دار و میکرونوکلئوس مشاهده شده است. بنابراین با وجود آن که مطالعات "*در محیط زنده*" عمدتاً زمان‌بر، گران و مستلزم رعایت اصول اخلاقی و برخی پیچیدگی‌ها مانند فرآیندهای توکسیکوکینتیکی هستند، اما مزیت‌های آنها نسبت به آزمون‌های "*در شیشه*" کاملاً مشهود است و علی‌رغم مطالعات ناکافی در ارتباط با نانوذرات اکسیدآهن، اکثریت موجود نیز بر پتانسیل اثرات ژنوتوکسیک IONها "*در محیط زنده*" اذعان داشته‌اند[12]. طبق نتایج مطالعات پیشین و پژوهش حاضر به نظر می‌رسد پتانسیل ژنوتوکسیک نانوذرات مغناطیسی اکسیدآهن عمدتاً ناشی از توانایی این نانوذرات در القای شکست DNA و آسیب‌های اکسیداتیو DNA بوده و این توانایی تا حد زیادی متاثر از خصوصیاتی مانند اندازه و طبیعت پوشش سطحی نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی است، اگرچه آزمون‌های ژنوتوکسیک قادر به پوشش‌دهی به تمامی پتانسیل ژنوتوکسیک در قالب آسیب‌های DNA نیستند و نتایج معکوس یک آزمون تضمین‌کننده عدم وجود خاصیت ژنوتوکسیک در IONها نیست. اتخاذ تاییدیه‌هایی مبنی بر اجرای استاندارد آزمون‌ها به‌ویژه در ارتباط با نانومواد برای حصول اطمینان الزامی است[12].

در ارتباط با پویش اثرات القایی ژنوتوکسیک در دیگر نانوذرات به روش میکرونوکلئوس می‌توان به پژوهش *دابی* و همکاران[46] استناد نمود که اثرات آسیب DNA و استرس اکسیداتیو تحت القای نانوذرات تیتانیوم‌دی‌اکسید (TiO_2) و زینک‌اکساید (ZnO) را در رده سلولی WAG (برگرفته از بافت آبشش گربه‌ماهی والاگو؛ *Wallago attu*) بررسی کردند و نتایج ایشان نشان می‌دهد این نانوذرات طی یک روند وابسته به غلظت و اندازه نانوذره از قابلیت آسیب DNA، پراکسیداسیون لیپیدی و کربونیلاسیون پروتئینی برخوردار هستند. همچنین مطالعه‌ای دیگر برآورد فراوانی MN و NA را در گلبول‌های قرمز ماهیان نسبت به دیگر بافت‌ها به‌عنوان حساس‌ترین و مناسب‌ترین شاخص زیستی برای آلاینده‌ها معرفی کرد و طی بررسی اثرات آسکوربیک‌اسید بر ماهی *پانتیوس آلتوس* (*Puntius altus*) تحت مواجهه با سرب در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ساعته در گلبول قرمز، بافت‌های مختلف کبد، آبشش و باله، بالاترین میزان فراوانی را در بازه زمانی ۴۸ساعته گزارش کرد. *کاواس* و *ارجن-گوزوکارا*[26] نظر متفاوتی دارند و تحریک تولید میکرونوکلئوس تحت تاثیر آلاینده‌های هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای (PAHs) در سلول‌های آبشش کفال ماهی (*Mugil cephalus*) را نسبت به گلبول‌های قرمز بیشتر دانسته‌اند و بین فراوانی MN و NA رابطه مثبت و مستقیمی وابسته به دوز گزارش کردند. نتایج مشابهی نیز در تحقیق *کاواس* و *کانن*[21] در بررسی اثرات سیتوژنتیک و آسیب به DNA توسط علف‌کش گلی‌فسفات در ماهی قرمز (*Carassius auratus*) و نیز *نگین‌تاجی* و همکاران[47] در ارزیابی اختلالات اندوکرینی و سمیت سیتوژنتیک آلاینده بیس‌فنول آ (BPA) در ماهی شانک زرد باله (*Acanthopagrus latus*) خلیج فارس به روش میکرونوکلئوس گزارش شده است.

طبق داده‌های حاصل از پژوهش حاضر، می‌توان نتیجه گرفت که نانوذرات اکسیدآهن مغناطیسی جزء مواد غیرسمی طبقه‌بندی شده است، اما نظر به نتایج آزمون ژنوتوکسیک و القای شکل‌گیری ریزهسته و دیگر ناهنجاری‌های هسته در گلبول‌های قرمز خون بچه‌ماهیان کپور معمولی تحت تاثیر نانوذرات اکسیدآهن، به نظر می‌رسد در صورت رهایش این نانوماده به محیط زیست، اثرات نامطلوبی روی بوم‌سازگان آبی داشته باشد، هر چند مطالعات بیشتر برای تعیین مکانیزم اختصاصی عملکرد نانوذرات در آسیب‌رسانی به DNA ماهیان ضروری است.

در پژوهش حاضر محدودیتی مطرح نبوده است.

نتیجه‌گیری

علی‌رغم اینکه نانوذرات اکسیدآهن، اثرات سمیت حاد در ماهیان کپور معمولی ندارند و جزء مواد غیرسمی هستند ولی طی یک روند وابسته به غلظت، موجب القای اثرات ژنوتوکسیک با افزایش فراوانی میکرونوکلئوس‌ها و دیگر ناهنجاری‌های غیرطبیعی هسته گلبول‌های قرمز می‌شوند.

تشکر و قدردانی: پژوهش حاضر در آزمایشگاه آبزیان دانشکده دامپزشکی- دانشگاه شهید چمران اهواز صورت پذیرفته است و بدین‌وسیله از مسئولان محترم گروه بهداشت آبزیان بیمارستان دامپزشکی به‌ویژه جناب آقایان دکتر *مهرزاد مصباح*، دکتر *تکاور محمدیان* و سرکار خانم دکتر *طراوت ملایم‌رفتار* تشکر و قدردانی می‌شود.

تاییدیه‌اخلاقی: کلیه مراحل تحقیقاتی پژوهش حاضر با حفظ اصول استاندارد اخلاقی و رعایت شرایط رفاه و آسایش ماهیان انجام شد.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: سکینه مشجور (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث

Archive of SID
www.SID.ir

(٤٥%)؛ مرتضی یوسف‌زادی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۲۰%)؛ حسین ذوالقرنین (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (۵%)؛ احسان کامرانی (نویسنده چهارم) پژوهشگر اصلی /تحلیلگر آماری (۱۰%)؛ مجتبی علیشاهی (نویسنده پنجم) روش‌شناس/پژوهشگر اصلی /تحلیلگر آماری (۲۰%)

منابع مالی: پژوهش حاضر تحت حمایت مالی نبوده است.

منابع

1- Mahdavi M, Namvar F, Ahmad MB, Mohamad R. Green biosynthesis and characterization of magnetic iron oxide (Fe_3O_4) nanoparticles using seaweed (Sargassum muticum) aqueous extract. Molecules. 2013;18(5):5954-64.

2- Gupta Ak, Wells S. Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: Preparation, characterization, and cytotoxicity studies. IEEE Trans Nanobiosci. 2004;3(1):66-73.

3- Weissleder R, Bogdanov A, Neuwelt EA, Papisov M. Long-circulating iron oxides for MR imaging. Adv Drug Deliv Rev. 1995;16(2-3):321-34.

4- Reimer P, Weissleder R. Development and experimental use of receptor-specific MR contrast media. Radiologe. 1996;36(2):153-63. [German]

5- Chouly C, Pouliquen D, Lucet I, Jeune JJ, Jallet P. Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: Effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution. J Microencapsul. 1996;13(3):245-55.

6- Gupta PK, Hung CT. Magnetically controlled targeted micro-carrier systems. Life Sci. 1989;44(3):175-86.

7- Kalantari K, Ahmad MB, Shameli K, Mohd Zobir Bin Hussein, Khandanlou R, Khanehzaei H. Size-controlled synthesis of Fe_3O_4 magnetic nanoparticles in the layers of montmorillonite. J Nanomater. 2014;2014:739485.

8- Kulkarni SA, Sawadh PS, Kokate KK. Synthesis and characterization of Fe_3O_4 nanoparticles for engineering applications. International Conference on Benchmarks in Engineering Science and Technology (ICBEST) 2012. New York: International Journal of Computer Applications (IJCA); 2012. p. 17-8.

9- Miller MM, Prinz GA, Cheng SF, Bounnak S. Detection of a micron-sized magnetic sphere using a ring-shaped anisotropic magnetoresistance-based sensor: A model for a magnetoresistance-based biosensor. Appl Phys Lett. 2002;81(12):2211-3.

10- Zhu MT, Wang B, Wang Y, Yuan L, Wang HJ, Wang M, et al. Endothelial dysfunction and inflammation induced by iron oxide nanoparticle exposure: Risk factors for early atherosclerosis. Toxicol Lett. 2011;203(2):162-71.

11- Ju-Nam Y, Lead JR. Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. Sci Total Environ. 2008;400(1-3):396-414.

12- Valdiglesias V, Kiliç G, Costa C, Fernández-Bertólez N, Pásaro E, Teixeira JP, et al. Effects of iron oxide nanoparticles: Cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity. Environ Mol Mutagen. 2015;56(2):125-48.

13- Carrasco KR, Tilbury KL, Myers MS. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. Can J Fish Aquat Sci. 1990;47(11):2123-36.

14- Ali FK, El-Shehawi AM, Seehy MA. Micronucleus test in fish genome: A sensitive monitor for aquatic pollution. Afr J Biotechnol. 2008;7(5):606-12.

15- Martins J, Oliva Teles L, Vasconcelos V. Assays with Daphnia magna and Danio rerio as alert systems in aquatic toxicology. Environ Int. 2007;33(3):414-25.

16- Hao L, Chen L. Oxidative stress responses in different organs of carp (Cyprinus carpio) with exposure to ZnO nanoparticles. Ecotoxicol Environ Saf. 2012;80:103-10.

17- Hao L, Wang Z, Xing B. Effect of sub-acute exposure to TiO_2 nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Juvenile Carp (Cyprinus carpio). J Environ Sci (China). 2009;21(10):1459-66.

18- OECD. Test No. 203: Fish, acute toxicity test. In: OECD. OECD guidelines for the testing of chemicals, section 2: Effects on biotic systems. Paris: OECD Publishing; 1992.

19- Alishahi M, Dadar M, Mohammadian B. Study on silver nanoparticles toxicity in Cyprinus carpio: Effects on immunohematological and histological changes. 2nd International Congress on Fisheries and Aquaculture Science, Lahijan, Iran. Unknown publisher; 2011. p. 36-47. [Persian]

20- Chae YJ, Pham CH, Lee J, Bae E, Yi J, Gu MB. Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (Oryzias latipes). Aquat Toxicol. 2009;94(4):320-7.

21- Cavaş T, Könen S. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (Carassius auratus) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. Mutagenesis. 2007;22(4):263-8.

22- Al-Sabti K, Metcalfe CD. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. Mutat Res. 1995;343(2-3):121-35.

23- Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E, et al. HUMN project: Detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. Mutat Res. 2003;534(1-2):65-75.

24- Cavaş T, Ergene-Gözükara S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in Oreochromis niloticus following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. Aquat Toxicol. 2005;74(3):264-71.

25- Jiraungkoorskul W, Sahaphong S, Kosai P, Kim MH. Micronucleus test: The effect of ascorbic acid on cadmium exposure in fish (Puntius altus). Res J Environ Toxicol. 2007;1(1):27-36.

26- Cavaş T, Ergene-Gözükara S. Micronucleus test in fish cells: A bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. Environ Mol Mutagen. 2005;46(1):64-70.

27- United Nations. Globally Harmonized System of classification and labelling of chemicals (GHS). Herndon V A: United Nations Publications; 2009. pp. 215-20.

28- OECD. Test No. 474: Mammalian erythrocyte micronucleus test. In: OECD. OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4: Health effects. Paris: OECD Publishing; 2016.

29- OECD. Test No. 487: In vitro mammalian cell micronucleus test. In: OECD. OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4: Health effects. Paris: OECD Publishing; 2014.

30- Morales-Ramírez P, Vallarino-Kelly T, Cruz-Vallejo VL. The OECD's micronucleus test guideline for single exposure to an agent and the genotox-kinetic alternative. Mutagenesis. 2017;32(4):411-5.

31- Güner U, Muranlı FDG. Micronucleus test, nuclear

Archive of SID

www.SID.ir

nanoparticles. Biomaterials. 2012;33(1):163-70.
40- Magdolenova Z, Drlickova M, Henjum K, Rundén-Pran E, Tulinska J, Bilanicova D, et al. Coating-dependent induction of cytotoxicity and genotoxicity of iron oxide nanoparticles. Nanotoxicology. 2015;9 Suppl 1:44-56.
41- Bhattacharya K, Davoren M, Boertz J, Schins RP, Hoffmann E, Dopp E. Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells. Part Fibre Toxicol. 2009;6:17.
42- Ahamed M, Alhadlaq HA, Alam J, Khan MA, Ali D, Alarafi S. Iron oxide nanoparticle-induced oxidative stress and genotoxicity in human skin epithelial and lung epithelial cell lines. Curr Pharm Des. 2013;19(37):6681-90.
43- Watanabe M, Yoneda M, Morohashi A, Hori Y, Okamoto D, Sato A, et al. Effects of Fe_3O_4 magnetic nanoparticles on A549 Cells. Int J Mol Sci. 2013;14(8):15546-60.
44- Karlsson HL, Cronholm P, Gustafsson J, Möller L. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: A comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. Chem Res Toxicol. 2008;21(9):1726-32.
45- Karlsson HL, Gustafsson J, Cronholm P, Möller L. Size-dependent toxicity of metal oxide particles--a comparison between nano- and micrometer size. Toxicol Lett. 2009;188(2):112-8.
46- Dubey A, Goswami M, Yadav K, Chaudhary D. Oxidative stress and nano-toxicity induced by TiO_2 and ZnO on WAG cell line. PLoS One. 2015;10(5):e0127493.
47- Negin Taji A, Archangi B, Movahedinia AA, Safahieh AR, Eskandari GR. Use of thyroid hormones and micronucleus as potential early biomarkers in yellowfin seabream (Acanthopagrus latus) exposed to bisphenol A. J Oceanogr. 2014;4(16):23-32. [Persian]
abnormalities and accumulation of Cu and Cd on Gambusia affinis (Baird & Girard, 1853). Turk J Fish Aquat Sci. 2011;11(4):615-22.
32- Kirsch-Volders M, Decordier I, Elhajouji A, Plas G, Aardema MJ, Fenech M. In vitro genotoxicity testing using the micronucleus assay in cell lines, human lymphocytes and 3D human skin models. Mutagenesis. 2011;26(1):177-84.
33- Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surralles J, Crott JW, Parry J, et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. Mutagenesis. 2011;26(1):125-32.
34- Ates M, Daniels J, Arslan Z, Farah IO. Effects of aqueous suspensions of titanium dioxide nanoparticles on Artemia salina: Assessment of nanoparticle aggregation, accumulation, and toxicity. Environ Monit Assess. 2013;185(4):3339-48.
35- Lapresta-Fernández A, Fernández A, Blasco J. Nanoecotoxicity effects of engineered silver and gold nanoparticles in aquatic organisms. TrAC Trends Anal Chem. 2012;32:40-59.
36- Møller P, Jacobsen NR, Folkmann JK, Danielsen PH, Mikkelsen L, Hemmingsen JG, et al. Role of oxidative damage in toxicity of particulates. Free Radic Res. 2010;44(1):1-46.
37- Buzea C, Pacheco II, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. Biointerphases. 2007;2(4):MR17-71.
38- Santhosh PB, Ulrih NP. Multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Promising tools in cancer theranostics. Cancer Lett. 2013;336(1):8-17.
39- Singh N, Jenkins GJ, Nelson BC, Marquis BJ, Maffeis TG, Brown AP, et al. The role of iron redox state in the genotoxicity of ultrafine superparamagnetic iron oxide

Archive of SID

www.SID.ir