

مطالعه آسیب‌شناسی و تجمع زیستی نانوذرات اکسید آهن (Fe_2O_3)

در بافت کبد ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

شیلا امیدظهير^{۱*}، رقيه خدابنده‌لو^۱، فاطمه کاردل^۱، فاطمه علمی^۱

چکیده

تولید روزافزون نانوذرات و کاربرد آن در صنایع مختلف، نگرانی‌هایی را در رابطه با سمیت و خطر آن‌ها در محیط زیست مطرح کرده است. اما اطلاعات کمی در مورد سمیت و میزان سطوح ایمن آن‌ها شناخته شده است. این مطالعه به بررسی میزان تجمع زیستی و آسیب‌شناسی ناشی از نانوذرات اکسید آهن (Fe_2O_3) در بافت کبد ماهی کپور معمولی پرداخته است. به این منظور ماهی‌های کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) پس از تهیه به آزمایشگاه منتقل و بعد از سازش در شرایط آزمایشگاهی به مدت یک هفته، به ۴ تیمار تقسیم شدند. تیمار اول به عنوان شاهد در نظر گرفته شد و سایر تیمارها به ترتیب مقادیر ۷۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر از نانوذرات اکسید آهن (Fe_2O_3) را دریافت کردند. نمونه‌گیری از تیمارها در روزهای ۱۴، ۲۱ و ۲۸ به صورت تصادفی صورت گرفت و بافت کبد جداسازی گردید و از نظر میزان تجمع زیستی و آسیب‌شناسی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از آزمون آماری، غلظت بالاتری از آهن در تیمار ۷۵ میلی‌گرم در لیتر در روز ۲۱ در مقایسه با سایر تیمارها نشان داد ($p < 0.05$). در بررسی آسیب‌شناسی، بیشترین جراحات در روز ۲۸ در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به صورت دژنراسانس شدید واکوتولی و نکروز شدید هپاتوسیت‌ها، نفوذ سلول‌های آماسی و پرخونی در بافت کبد مشاهده گردید. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد با افزایش غلظت و مدت زمان رویارویی ماهی‌ها با نانوذرات اکسید آهن آسیب‌های وارد شده به بافت کبد افزایش و میزان تجمع آهن در بافت کبد کاهش یافته است.

واژگان کلیدی: آسیب‌شناسی بافتی، تجمع زیستی، کبد، کپور معمولی، نانوذرات اکسید آهن (Fe_2O_3)

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۷/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۹/۲۷

مقدمه

فناوری نانو به‌عنوان یک علم نوین، به سرعت در حال گسترش است، به همین دلیل، نگرانی‌ها در مورد خطرات و عواقب این فناوری در محیط زیست به ویژه منابع آبی در حال افزایش است (۷). امروزه ساخت مواد و لوازم مختلف با استفاده از نانومواد در افزایش کارایی تجهیزات به‌ویژه در صنایع دریایی کمک شایانی نموده است، که از جمله آنها می‌توان به کار برد

نانو پوشش‌ها، نانو رنگ‌ها و نانومواد در علوم دریایی اشاره نمود (۱). شتاب روزافزون فناوری نانو و تولید مواد و وسایل نانوساختار موجب راه‌یابی و نفوذ بسیاری از نانوذرات به طبیعت گردیده است. در یک مطالعه تخمین زده شد که از ۲۶۰۰۰۰ تا ۳۰۹۰۰۰۰ تن نانومواد تولید شده در جهان در سال ۲۰۱۰، ۰/۴ تا ۷ درصد آن وارد محیط‌های آبی شده است (۲۳). محیط‌های آبی بسیار آسیب‌پذیر هستند و محل رسوب و تجمع بسیاری از نانوذرات و فاضلاب‌های شیمیایی می‌باشند، نانوذرات وارد واکنش با موجودات زنده و عوامل غیرزنده می‌شوند که نتیجه نهایی آن در بیشتر موارد، اختلالات متعدد فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در بدن موجودات زنده مقیم آن نواحی از جمله ماهی‌ها خواهد بود (۳).

نانوذرات اکسید آهن به علت برخی از ویژگی‌های منحصر به فرد فیزیکی و شیمیایی مانند اندازه و نسبت بالای سطح به جرم دارای کاربردهای فراوانی هستند. واکنش‌پذیری شیمیایی بالا و توانایی حذف و کاهش آلاینده‌های متعدد آلی و معدنی سبب شده است تا نانوذرات اکسید آهن به‌عنوان اصلاح‌کننده آلودگی محیط زیست به ویژه در محیط‌های آبی مورد استفاده قرار گیرد (۱۳). نانوذرات آهن جهت پاکسازی و از بین بردن آلودگی آب‌های زیرزمینی و حذف آرسنیک از آب آشامیدنی بسیار موثر شناخته شده است (۱۹). نانوذرات اکسید آهن به دلیل داشتن ویژگی‌های مغناطیسی دارای کاربردهای زیستی گسترده‌ای از جمله ترمیم بافت، تفکیک سلول، تصویربرداری مغناطیسی (MRI)، گرمادرمانی سلول‌های سرطانی، تشخیص و درمان سرطان می‌باشد و همچنین از نانوذرات اکسید آهن جهت نشانه‌گذاری سلول‌های بنیادی و ردیابی آنها استفاده می‌شود (۱۸). رشد چشمگیر و مزایای کاربردی که نانوذرات اکسید آهن ارائه می‌دهند، خطرات و نگرانی‌هایی را به همراه دارد (۱۲).

* ۱- دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران (sh.omidzahir@umz.ac.ir)

به مدت یک هفته در شرایط آزمایشگاهی نگهداری شدند و پس از گذشت یک هفته، در ۴ حوضچه ۳۰ لیتری به ۴ تیمار با تعداد ۱۵ قطعه ماهی در هر تیمار تقسیم شدند. تیمار اول به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. تیمار دوم غلظت ۵۰ میلی گرم در لیتر نانوذرات اکسید آهن (Fe_2O_3)، تیمار سوم غلظت ۷۵ میلی گرم در لیتر نانوذرات اکسید آهن (Fe_2O_3) و تیمار چهارم غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر نانوذرات اکسید آهن (Fe_2O_3) را دریافت کردند. تعیین غلظت‌ها در این پژوهش براساس مطالعات Remya و همکاران (۲۰۱۵) و Li و همکاران (۲۰۰۹) صورت گرفت (۲۶ و ۲۴). آب حوضچه‌ها یک روز در میان با آب فاقد کلر منبع ذخیره آب تعویض شد و غلظت مورد نظر از نانوذرات اکسید آهن به آب حوضچه‌ها اضافه گردید. ماهی‌ها یکبار در روز تغذیه شدند و در طول مدت آزمایش ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آب حوضچه‌ها اندازه‌گیری شد (۵). درجه حرارت آب 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد، pH ۷/۵-۷، اکسیژن محلول ۶-۷ میلی‌گرم بر لیتر و سختی آب ۱۸۵-۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر ثبت گردید. در روزهای ۱۴، ۲۱ و ۲۸ پژوهش، از هر تیمار ۵ عدد ماهی به صورت تصادفی انتخاب شد و پس از کالبدگشایی، بافت کبد هر ماهی برای بررسی میزان تجمع زیستی و آسیب‌شناسی مورد ارزیابی قرار گرفت.

تهیه محلول نانوذرات اکسید آهن (Fe_2O_3)

پودر نانوذرات اکسید آهن (Fe_2O_3) محصول US Research (Nanomaterials Inc, USA) از شرکت پیشگامان نانومواد ایرانیان (مشهد) خریداری شد (جدول ۱). مقدار لازم از پودر نانوذرات اکسید آهن (Fe_2O_3) توسط ترازو با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شد و غلظت‌های مختلف (۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) با آب مقطر تهیه گردید (۲۴). سپس در حمام اولتراسونیک، Elma E30H, 37 kHz Ultrasound frequency, (Germany) به مدت ۶ ساعت انحلال صورت گرفت و به منظور انحلال مداوم، از هوادهی توسط پمپ در حوضچه‌ها استفاده شد (۲۶).

با وجود اینکه آهن یک عنصر ضروری برای زندگی موجودات می‌باشد، اما اگر میزان آهن از حد مجاز فراتر رود، می‌تواند اثرات مضر بر موجودات زنده داشته باشد (۳۰). براساس استانداردهای کیفی محیطی (Environmental Quality Standards (EQS میانگین غلظت آهن در آب ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر پیشنهاد شده است (۳۲).

مقدار بیش از اندازه آهن می‌تواند بر روی بافت پوششی آبشش ماهی رسوب کرده و باعث آسیب بافتی و اختلال عملکرد تنفسی شود، تجمع رسوب آهن در بافت آبشش ماهی، فاصله انتشار گازهای تنفسی را افزایش می‌دهد و باعث کاهش دسترسی به اکسیژن و در نتیجه استرس تنفسی می‌شود (۳۰). در مطالعه Chen و همکاران (۲۰۱۳) تاثیر نانوذرات اکسید آهن بر ماهی ماکا (*Oryzias latipes*) به صورت افزایش مرگ و میر، ناهنجاری‌هایی مانند حرکات آهسته چرخشی و نقص بینایی مشاهده گردید (۱۳). در پژوهش Remya و همکاران (۲۰۱۵) اثرات نانوذرات اکسید آهن در ماهی کپور هندی (*Labeo rohita*)، بر شاخص‌های خون‌شناسی نشان‌دهنده تغییرات فیزیولوژیک به صورت افزایش میزان هموگلوبین، گلبول‌های قرمز و هماتوکریت و کاهش میزان گلبول‌های سفید در مقایسه با گروه شاهد بود (۱۵).

با وجود کاربرد گسترده نانوذرات اکسید آهن، گزارش‌های محدودی در زمینه سمیت و جنبه‌های مختلف اثرات جانبی نانوذرات اکسید آهن در ماهی، ارائه شده است (۳۴ و ۳۳، ۲۸، ۲۴، ۲۲، ۱۱). در این مطالعه میزان تجمع زیستی و آسیب‌شناسی ناشی از نانوذرات اکسید آهن (Fe_2O_3) بر بافت کبد ماهی کپور معمولی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش کار

تهیه و تیمار بندی ماهی‌ها

در این پژوهش، ماهی‌های کپور معمولی با میانگین وزنی $10/20 \pm 0/87$ گرم و میانگین طول کل $14/69 \pm 0/91$ سانتیمتر از یک مزرعه پرورش ماهی‌های گرمابی تهیه و به آزمایشگاه دانشکده علوم دریایی دانشگاه مازندران منتقل گردید. ماهی‌ها به منظور سازگاری با شرایط محیطی جدید قبل از شروع آزمایش،

جدول ۱- ویژگی‌های نانوذرات اکسید آهن (Fe_2O_3) مورد استفاده در این پژوهش

ریخت‌شناسی	رنگ	متوسط اندازه ذرات	درجه خلوص
کروی	قرمز قهوه‌ای	۴۰-۲۰ نانومتر	۹۸٪+

اندازه‌گیری میزان تجمع زیستی آهن در نمونه‌ها

در این مرحله نمونه‌های بافت کبد ماهی‌ها به‌طور کامل جداسازی گردیدند و در ظروف پلاستیکی جداگانه قرار گرفته و شماره‌گذاری شدند. سپس در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۶ ساعت قرار گرفته و خشک گردیدند. نمونه‌های خشک شده به‌صورت جداگانه در هاون چینی ساییده شدند و به صورت پودر درآمدند. برای انجام عمل هضم شیمیایی به منظور بررسی میزان تجمع زیستی بافت-های تهیه شده، مقدار ۰/۵ گرم از نمونه‌ی خشک بافت پودر شده، به دقت وزن شد و درون لوله‌های فالكون ریخته شد. به هر لوله ۵ میلی‌لیتر اسیدنیتریک ۶۹٪ (Merck, Germany) و ۲ میلی‌لیتر اسید پرکلریک ۶۰٪ (Merck, Germany) اضافه گردید و نمونه‌ها به مدت یک شبانه روز در دمای اتاق قرار گرفتند. سپس به مدت ۲ ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد در حمام بن ماری ادامه عمل هضم انجام گرفت. پس از اتمام فرآیند هضم، سوسپانسیون به دست آمده از کاغذ صافی شماره ۱۴ واتمن عبور داده شد و محلول صاف شده به لوله فالكون انتقال یافت و توسط اسیدنیتریک ۱٪ به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد (۱۴).

برای اندازه‌گیری میزان آهن در نمونه‌های بافت کبد از دستگاه جذب اتمی شعله‌ای (Analytic jenaAA-400, Germany) استفاده گردید. برای محاسبه غلظت واقعی از فرمول زیر استفاده شد (۴):

$$\text{وزن خشک نمونه (g)} / \text{حجم نهایی نمونه (ml)} \times \text{غلظت خوانده شده توسط دستگاه (}\mu\text{g/ml)} = \text{غلظت واقعی (}\mu\text{g/g)}$$

آماده سازی نمونه‌های بافت برای بررسی آسیب شناسی

نمونه‌های بافت کبد جدا سازی شده برای بررسی آسیب شناسی در ظروف پلاستیکی حاوی فرمالین بافر ۱۰ درصد نگهداری و شماره‌گذاری شدند. برای آماده‌سازی بافتی از دستگاه اتوتکنیکون (DID SABZ2080/H, Iran) استفاده شد. برش‌گیری با استفاده از دستگاه میکروتوم (Leitz, Germany, 1512) صورت گرفت و برش‌هایی با اندازه ۵ میکرومتر از بافت تهیه گردید و به روش هماتوکسیلین - اتوزین Haematoxylin & Eosin (H&E) رنگ‌آمیزی شدند (۶). سپس لام‌های تهیه شده برای بررسی آسیب شناسی توسط میکروسکوپ نوری (Olympus CX21, Japan) مورد ارزیابی قرار گرفتند و با استفاده از سیستم عکسبرداری متصل به میکروسکوپ مدل Tucsen TrueChrome Metrics، تصاویر بافتی تهیه شد و نوع و شدت آسیب‌ها مورد بررسی قرار گرفت. شدت آسیب‌ها بر اساس عدم وجود، خفیف، متوسط و شدید با علائم -، +، ++ و +++ درجه بندی شدند (۲۹).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

ابتدا نرمال بودن داده‌های تجمع زیستی مورد ارزیابی قرار گرفتند. تفاوت معنادار بین غلظت آهن در تیمارها و مدت زمان رویارویی با نانوذرات اکسید آهن (Fe_2O_3)، با استفاده از روش تجزیه و تحلیل واریانس دو طرفه (ANOVA) و روش آزمون توکی Tukey's test مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این مطالعه تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار (R 2.15.3, 2013) انجام شد.

نتایج

ميزان تجمع زيستي آهن در بافت

نتايج حاصل از آزمون آماری به طور معنی‌داری غلظت بالاتری از آهن در تیمار ۷۵ میلی‌گرم در لیتر در روز ۲۱ پژوهش در مقایسه با سایر تیمارها نشان داد ($p < 0.05$). در حالیکه در سایر روزهای پژوهش، تفاوت معناداری در هیچ یک از تیمارها مشاهده نشد. نتایج آزمون آماری حاکی از آن است که مدت

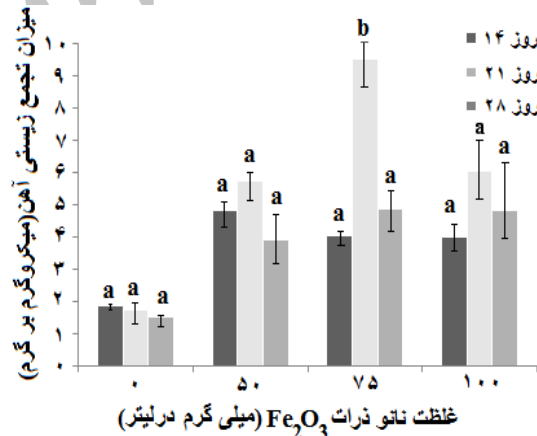
زمان رویارویی ماهی‌ها با نانوذرات اکسید آهن (Fe_2O_3)، در تجمع زیستی آهن در بافت کبد تأثیر معنی‌داری دارد. جدول ۲ و نمودار ۱ میزان غلظت آهن در نمونه‌های بافت های کبد را در مدت زمان‌های مختلف رویارویی با نانوذرات اکسید آهن در تیمارهای مختلف نشان می‌دهد.

جدول ۲- میزان تجمع زیستی آهن (میکروگرم بر گرم) (میانگین \pm انحراف معیار) در بافت کبد

زمان (روز)	غلظت نانوذرات Fe_2O_3 (میلی‌گرم در لیتر)	میانگین \pm انحراف معیار
۱۴	۰	۱/۸۵ \pm ۰/۲۸ ^a
	۵۰	۴/۸۴ \pm ۱/۰۲ ^a
	۷۵	۴/۰۴ \pm ۰/۲۷ ^a
۲۱	۰	۱/۷۴ \pm ۰/۲۹ ^a
	۵۰	۵/۷۴ \pm ۰/۸۲ ^b
	۷۵	۹/۵۱ \pm ۱/۳۸ ^c
۲۸	۰	۱/۵۴ \pm ۰/۲۷ ^a
	۵۰	۳/۹۳ \pm ۱/۴۷ ^a
	۷۵	۴/۸۷ \pm ۱/۳۲ ^a

(حروف بالای اعداد تفاوت معنی دار بین تیمارهای مختلف (۰، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) در هر یک از زمان‌های رویارویی با نانوذرات Fe_2O_3 را نشان می‌دهد)

(Hemosiderin) در نمونه‌های بافتی مشاهده گردید. در تیمارهای ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر علاوه بر تجمعات هموسیدرین، دژنراسانس خفیف واکوئولی نیز مشاهده شد. روز ۲۱ پژوهش، در تیمارهای ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم در لیتر حضور بیشتری از تجمعات هموسیدرین دیده شد و علاوه بر دژنراسانس خفیف واکوئولی، نکروز خفیف و نفوذ سلول‌های آماسی نیز مشاهده گردید. در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر در روز ۲۱، با افزایش غلظت نانوذرات اکسید آهن (Fe_2O_3) علائم آسیب بافتی شامل نکروز و دژنراسانس واکوئولی با شدت بیشتری نسبت به تیمارهای ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم در لیتر دیده شد. در روز ۲۸ پژوهش، آسیب‌های بافتی نسبت به روزهای ۱۴ و ۲۱ از شدت بیشتری برخوردار بود، به طوریکه بیشترین آسیب‌ها در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر در روز ۲۸ به صورت دژنراسانس شدید واکوئولی، نکروز شدید در سلول‌های کبدی، نفوذ سلول‌های آماسی و پرخونی مشاهده گردید (جدول ۳ و نگاره ۱).



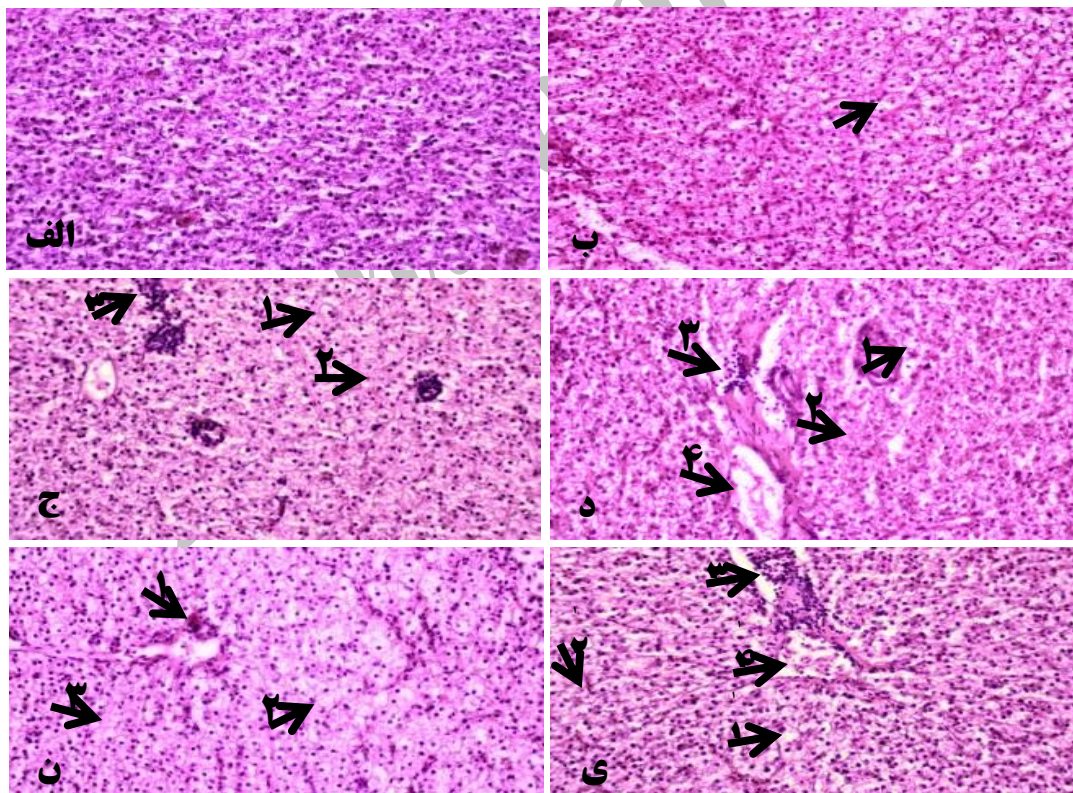
نمودار ۱- میزان تجمع زیستی آهن در بافت کبد (حروف بالای ستون تفاوت معنی دار بین زمان‌های مختلف رویارویی (۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز) در هر یک از تیمارهای دریافت کننده نانوذرات Fe_2O_3 را نشان می‌دهد).

آسیب‌شناسی بافتی

نمونه‌های بافت کبد در تیمار شاهد که نانوذرات اکسید آهن (Fe_2O_3) دریافت نکردند، در روزهای ۱۴، ۲۱ و ۲۸ پژوهش، دارای شرایط طبیعی بودند و آسیب بافتی مشاهده نشد. روز ۱۴ پژوهش، در تیمار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر تجمعات هموسیدرین

جدول ۳- شدت آسیب‌های بافتی مشاهده شده در بافت کبد در مدت زمان‌های مختلف رویارویی با غلظت‌های مختلف نانوذرات Fe_2O_3

غلظت نانوذرات Fe_2O_3 (میلی گرم در لیتر)				زمان (روز)	نوع آسیب
۱۰۰	۷۵	۵۰	۰		
-	-	-	-	۱۴	نکروز
++	+	+	-	۲۱	
+++	++	+	-	۲۸	
+	+	-	-	۱۴	دژنراسانس واکوتولی
++	+	+	-	۲۱	
+++	+++	+	-	۲۸	
-	-	-	-	۱۴	نفوذ سلول‌های آماسی
+	+	+	-	۲۱	
++	++	+	-	۲۸	
-	-	-	-	۱۴	پرخونی
+	-	-	-	۲۱	
+	+	+	-	۲۸	



نگاره ۱- آسیب‌شناسی بافت کبد، رنگ‌آمیزی H&E، بزرگنمایی 40X الف) تیمار شاهد: شرایط طبیعی بافتی، ب) تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر روز ۱۴: دژنراسانس واکوتولی، ج) تیمار ۷۵ میلی‌گرم در لیتر روز ۲۱: ۱) دژنراسانس واکوتولی (۲) نکروز (۳) نفوذ سلول‌های آماسی، د) تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر روز ۲۱: ۱) دژنراسانس واکوتولی (۲) نکروز (۳) نفوذ سلول‌های آماسی، ۴) پرخونی، ن) تیمار ۷۵ میلی‌گرم در لیتر روز ۲۸: ۱) حضور هموسیدرین (۲) دژنراسانس واکوتولی (۳) نکروز، ی) تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر روز ۲۸: ۱) دژنراسانس واکوتولی (۲) نکروز (۳) نفوذ سلول‌های آماسی، ۴) پرخونی

بحث

در ماهی‌ها، دو مکان برای ورود فلزات از جمله آهن به بدن وجود دارد: بافت پوششی روده به دنبال مصرف مواد غذایی و بافت پوششی آبشش به دنبال ورود آب. آهن با عبور از غشای بافت پوششی آبشش و روده به اندام‌های داخلی بدن راه می‌یابد (۸ و ۹). پس از اینکه آهن از آبشش و روده جذب می‌شود، وارد خون می‌شود، در پلاسمای خون به صورت ترکیب با پروتئین ترانسفرین حمل می‌شود، آهن می‌تواند با پیوند سستی با مولکول گلوبولین ترکیب شده و در هر نقطه از بدن به هر یک از بافت‌ها آزاد شود، اما میزان اضافی آهن در خون در سلول‌های بدن به خصوص در سلول‌های کبدی تجمع می‌یابد، افزایش بیش از اندازه‌ی آهن دریافت به صورت تجمع هموسیدرین با رنگدانه‌های قهوه‌ای رنگ نمایان می‌گردد (۱۵). کبد مکان مهمی برای ذخیره‌سازی آهن است و افزایش میزان آهن می‌تواند برای این بافت آسیب‌پذیر باشد، افزایش میزان تجمع و رسوب آهن سبب آسیب و اختلال عملکرد بافت کبد و نکروز هپاتوسیت‌ها می‌گردد و جراحات وارده به بافت کبد با مدت زمان رویایی و میزان آهن نسبت مستقیم دارد (۱۶).

مطالعه حاضر به بررسی همزمان میزان تجمع زیستی و اثرات آسیب شناسی ناشی از نانوذرات اکسید آهن (Fe_2O_3) در بافت کبد ماهی کپور معمولی پرداخته است. در این مطالعه، میزان تجمع آهن در بافت کبد ماهی کپور معمولی در غلظت‌های مختلف (۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) نانوذرات اکسید آهن (Fe_2O_3) و در روزهای ۱۴، ۲۱ و ۲۸ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد غلظت آهن در بافت کبد در تیمار ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر در روز ۲۱ نسبت به سایر تیمارها در روزهای مختلف (۱۴، ۲۱ و ۲۸) پژوهش بیشتر و از تفاوت معنی‌داری برخوردار بود و به تدریج میزان غلظت آهن در بافت کبد در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر در روز ۲۱ و تیمارهای مختلف دریافت کننده نانوذرات اکسید آهن در روز ۲۸ آزمایش

افزایش تولید محصولات نانو منجر به ورود بی‌رویه نانوذرات به محیط زیست می‌شود و در صورتی که میزان زیادی از نانوذرات در بدن موجودات زنده تجمع یابند، می‌توانند آسیب‌ها و مسمومیت‌هایی را به دنبال داشته باشند (۷).

Griffitt و همکاران (۲۰۰۷) تاثیر نانوذرات مس بر ماهی دانیو گورخری (*Danio rerio*) را در بافت آبشش به صورت تکثیر و تزاید سلول‌های پوششی ثانویه و ادم در سلول‌های رشته‌های آبششی و واکوئوله‌شدن سلول‌های کبدی در بافت کبد گزارش کردند (۱۷). تاثیرات منفی نانوذرات اکسید آهن بر فاکتورهای خونی و بیوشیمیایی ماهی مورد مطالعه قرار گرفته است (۲۸ و ۲۶، ۲۲). در پژوهش Karthikeyeni و همکاران (۲۰۱۳) افزایش آنزیم‌های کبدی آسپارات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) به دنبال دریافت نانوذرات اکسید آهن (Fe_2O_3) در ماهی تیلاپیا (*Oreochromis mossambicus*) مشاهده شد که نشان‌دهنده آسیب به بافت کبد بود (۲۲).

گزارشات در زمینه آسیب شناسی و تجمع زیستی ناشی از نانوذرات اکسید آهن در بافت‌های مختلف ماهی بسیار محدود است (۲۴ و ۲۰، ۱۲). در مطالعه Li و همکاران (۲۰۰۹) بر ماهی مدکا (*Oryzias latipes*)، ضایعات آسیب شناسی ناشی از نانو ذرات اکسید آهن به صورت از بین رفتن ساختار رشته‌های آبششی و تیغه‌های آبششی ثانویه، تورم سلولی بافت پوششی و رسوب ذرات سیاه رنگ در برخی از سلول‌های بافت پوششی مشاهده شد (۲۴). حاجی رحیمی و همکاران (۱۳۹۴) تاثیر نانوذرات اکسید آهن را در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به صورت آسیب در سلول‌های کبدی از جمله التهاب و از دست دادن نظم در دستجات سلول‌های کبدی و پرخونی گزارش کردند (۲).

نقره در بافت کبد نسبت به سایر بافت‌های مورد مطالعه گزارش شد (۲۱).

در مطالعه حاضر نتایج به‌دست آمده از آسیب‌شناسی بافت کبد نشان می‌دهد که با افزایش غلظت (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و افزایش مدت زمان رویایی با نانوذرات اکسید آهن (۲۸ روز)، آسیب‌های وارد شده به بافت کبد با شدت بیشتری و به صورت دژنراسانس شدید واکوئولی و نکروز شدید مشاهده گردید. بنابراین می‌توان این‌گونه نتیجه‌گیری کرد که به دلیل شدت آسیب و اختلال عملکرد بافت کبد ناشی از دژنراسانس واکوئولی سلولهای کبدی و کاهش جمعیت سلولهای طبیعی متعاقب نکروز، توانایی بافت کبد برای انجام یکی از فعالیت‌های مهم که ذخیره‌سازی آهن است کاهش یافت و در نتیجه به تدریج با افزایش مدت زمان رویایی با نانوذرات اکسید آهن، میزان تجمع کمتری از آهن در بافت کبد مشاهده گردید.

نتایج حاصل از این پژوهش بیانگر این است که ورود مقادیر بالایی از نانوذرات اکسید آهن به محیط‌های آبی می‌تواند سبب بروز آثار زیانباری روی سلامت ماهی‌ها گردد، بنابراین پیش‌بینی تمهیداتی برای کاهش و جلوگیری از ورود فاضلاب‌ها و پساب‌های صنعتی به محیط زیست آبریان و استفاده بی‌رویه از نانوذرات در صنایع مختلف دریایی و آبی‌پروری امری مهم و ضروری به نظر می‌رسد. پیشنهاد می‌گردد میزان انواع آلاینده‌های فلزی و منابع ورود آنها به محیط زیست آبریان و همچنین اثرات آنها در بافت‌های مختلف و ویژگیهای خونی و بیوشیمیایی آبریان مورد پایش مستمر قرارگیرد.

تشکر و سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی و تشکر خود را از ستاد ویژه توسعه فناوری نانو به دلیل حمایت معنوی و مادی از این پژوهش ابراز می‌دارند.

کاهش نشان داد، در حالی‌که انتظار می‌رفت با افزایش روزهای رویارویی و افزایش غلظت نانوذرات اکسید آهن (Fe_2O_3)، میزان غلظت تجمع زیستی بافت کبد نیز افزایش نشان دهد. مطالعه همزمان آسیب‌شناسی بافت کبد نشان داد که به تدریج با افزایش مدت زمان رویارویی و افزایش غلظت نانوذرات اکسید آهن (Fe_2O_3)، آسیب به سلول‌های کبدی به صورت نکروز و دژنراسانس واکوئولی اتفاق افتاد، به طوریکه بیشترین آسیب در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم برلیتر در روز ۲۸ مشاهده شد.

بافت کبد به علت عملکرد، موقعیت و جریان خونی که دریافت می‌کند، همچنین نقش مهمی که در سوخت‌وساز، پالایش و انتقال زیستی مواد در بدن دارد، تأثیر قابل توجهی از آلاینده‌های موجود در آب می‌پذیرد (۲۷ و ۲۵). کبد یک ارگان اصلی برای پاکسازی بسیاری از داروها و زئوبیوتیک‌ها (Xenobiotics) محسوب می‌شود (۳۱). کبد نسبت به انواع سموم حساس می‌باشد و یکی از وظایف مهم آن تمیز کردن مواد آلاینده از خون است (۱۰). اتصال پروتئین‌های پلاسما مثل گلوبولین و ترانسفرین به سطح نانوذرات به طور قابل توجهی سبب جذب آنها توسط سلول‌های کبدی می‌شود (۳۱). سلول‌های کوپفرکبدی (Kupffer cells) نقش اصلی در گرفتن نانوذرات از پروتئین‌های پلاسما دارند (۳۱). در آلودگی شدید و مزمن نانو ذرات در بافت کبد رسوب می‌کنند و در صورت تجمع طولانی مدت باعث ایجاد اثرات سمی قابل توجهی می‌گردند (۳۱). بر اساس مطالعه‌ی

Hao و همکاران (۲۰۱۳) بر ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) دنبال رویارویی با نانوذرات اکسید روی (ZnO) (NPs)، میزان بیشتری از تجمع زیستی روی در بافت کبد نسبت به بافت‌های آبشش و روده مشاهده شد (۲۰). در پژوهش Jung و همکاران (۲۰۱۴) که به بررسی میزان تجمع زیستی نانوذرات نقره در بافت‌های مختلف ماهی مداکا (*Oryzias latipes*) پرداختند، بیشترین میزان تجمع زیستی

فهرست منابع

- its oxidation products in medaka (*Oryzias latipes*) fish. *Marine. Pollut. Bull.* 63 (5): 339-346.
12. Chen, P. J., Wu, W. L., Wu, K. C. W. (2013): The zero valent iron nanoparticle causes higher developmental toxicity than its oxidation products in early life stages of medaka fish. *Water. Res.* 47(12): 3899-3909.
 13. Comba, S., Di Molfetta, A., & Sethi, R. (2011): A comparison between field applications of nano-, micro-, and millimetric zero-valent iron for the remediation of contaminated aquifers. *Water. Air. Soil. Pollut.* 215(4): 595-607.
 14. Food and Agricultural Organization (FAO). (1983): *Manual of Methods in Aquatic Environmental Research*, part 9. Analyses of metals and organochlorines in fish. FAO Fisheries Technical Paper. 212.
 15. Garrick, M. D., Garrick, L. M. (2009): Cellular iron transport. *Biochim. Biophys. Acta.* 1790: 309-325.
 16. Gregorovic, G., Kralj-Klobucar, N., Kopjar, N. (2008): A histological and morphometric study on the tissue and cellular distribution of iron in carp *Cyprinus carpio* L. during chronic waterborne exposure. *J. Fish. Biol.* 72(7): 1841-1846.
 17. Griffitt, R. J., Weil, R., Hyndman, K. A., Denslow, N. D., Powers, K., Taylor, D., & Barber, D. S. (2007): Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Sci. tech.* 41(23): 8178-8186.
 18. Gupta, A.K., Gupta, M. (2005): Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterial.* 26: 3995-4021.
 19. Hartley, W., Edwards, R., and Lepp, N.W. (2004): Arsenic and heavy metal mobility in iron oxide-amended contaminated soils as evaluated by short- and long-term leaching tests. *Environ. Pollut.* 131:495-504.
 20. Hao, L., Chen, L., Hao, J., & Zhong, N. (2013): Bioaccumulation and sub-acute toxicity of zinc oxide nanoparticles in juvenile carp (*Cyprinus carpio*): a comparative study with its bulk counterparts. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 91: 52-60.
۱. افتاری، م.، راد، م. (۱۳۸۸): کاربرد نانو فناوری در کاهش نیروی پسا و بهینه سازی عملکرد شناورهای دریایی با استفاده از نانو اکسید روی، فصلنامه علوم و فناوری دریا، ۵۲ (۵۲)، ۸-۱.
 ۲. حاجی رحیمی، ا.، فرخی، فرح.، توکمه چی، ا. (۱۳۹۴): بررسی تأثیر نانوذرات اکسید آهن و روی بر بافت کبد و عضله در ماهی قزل آلابی رنگین کمان (*ONCORHYNCHUS MYKISS*). مجله پژوهش‌های جانوری، ۲۸ (۳)، ۳۰۶-۲۹۳.
 ۳. هدایتی، س. ع.، خبازی، م.، هرسیج، م.، گرامی، م. ح.، غفاری فارسانی، ح. (۱۳۹۳): بررسی اثر تخریبی نانوذرات مس محلول در آب بر بافت آبشش ماهی قزل آلابی رنگین کمان (*ONCORHYNCHUS MYKISS*). فصلنامه فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان، ۲ (۱)، ۷۵-۸۸.
 4. Al-Weher, S. M. (2008): Levels of heavy metal Cd, Cu and Zn in three fish species collected from the northern Jordan valley, Jordan. *J. Biol. Sci.* 1(1): 41-46.
 5. APHA, (1998): *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 20th ed. American Public Health Association, Washington DC: 64-65.
 6. Bancroft, J. D., Gamble, M. (2008): *Theory and practice of histological techniques*. Elsevier Health Sciences: 126-127.
 7. Blaise, C., Gagné, F., Ferard, J. F., & Eullaffroy, P. (2008): Ecotoxicity of selected nano-materials to aquatic organisms. *Environ toxicol.* 23(5): 591-598.
 8. Bury, N. R., Grosell, M. 2003. Waterborne iron acquisition by a freshwater teleost fish, zebrafish *Danio rerio*. *J. Exp. Biol.* 206(19): 3529-3535.
 9. Bury, N. R., Grosell, M., Wood, C. M., Hogstrand, C., Wilson, R. W., Rankin, J. C., Jensen, F. B. (2001): Intestinal iron uptake in the European flounder (*Platichthys flesus*). *J. Exp. Biol.* 204 (21): 3779-3787.
 10. Chavan, V.R., Muley, D. V. (2014): Effect of heavy metals on liver and gill of fish *Cirrhinus mrigala*. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 3(5): 277-288.
 11. Chen, P. J., Su, C. H., Tseng, C. Y., Tan, S. W., & Cheng, C. H. (2011): Toxicity assessments of nanoscale zerovalent iron and

21. Jung, Y. J., Kim, K. T., Kim, J. Y., Yang, S. Y., Lee, B. G., & Kim, S. D. (2014): Bioconcentration and distribution of silver nanoparticles in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *J. Hazard. Mater.* 267: 206-213.
22. Karthikeyeni, S., Siva Vijayakumar, T., Vasanth, S., Arul Ganesh, M. M., Subramanian, P. (2013): Biosynthesis of iron oxide nanoparticles and its haematological effects on fresh water fish *Oreochromis mossambicus*. *J. Academ. Indust. Res.* 10: 645-649.
23. Keller, A.A., McFerran, S., Lazareva, A., Suh, S. (2013): Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *J. Nano. Res.* 15:1692.
24. Li, H., Zhou, Q., Wu, Y., Fu, J., Wang, T., Jiang, G. (2009): Effects of waterborne nano-iron on medaka (*Oryzias latipes*): antioxidant enzymatic activity, lipid peroxidation and histopathology. *Ecotoxol. Environ. Saf.* 72(3): 684-692.
25. Naeemi, A., Jamili, S., Shabanipour, N., Mashinchian, A., Shariati Feizabadi, S. (2013): Histopathological changes of gill, liver and kidney in Caspian kutum exposed to linear alkylbenzene sulfonate. *Iran J. Fish. Sci.* 12(4): 887-897.
26. Remya, A. S., Ramesh, M., Saravanan, M., Poopal, R. K., Bharathi, S., Nataraj, D. (2015): Iron oxide nanoparticles to an Indian major carp, *Labeo rohita*: impacts on hematology, iono regulation and gill Na^+/K^+ ATPase activity. *J. King. Saud. Univ. Sci.* 27(2): 151-160.
27. Sadauskas, E., Wallin, H., Stoltenberg, M., Vogel, U., Doering, P., Larsen, A., Danscher, G. (2007): Kupffer cells are central in the removal of nanoparticles from the organism. *Part Fibre Toxicol.* 4(1): 10.
28. Saravanan, M., Suganya, R., Ramesh, M., Poopal, R. K., Gopalan, N., Ponpandian, N. (2015): Iron oxide nanoparticles induced alterations in haematological, biochemical and ionoregulatory responses of an Indian major carp *Labeo rohita*. *J. Nano. Res.* 17(6): 274.
29. Thophon, S., Kruatrachue, M., Upatham, E. S., Pokethitiyook, P., Sahaphong, S., & Jaritkhuan, S. (2003): Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environ. Pollut.* 121(3): 307-320.
30. Van Anholt, R. D., Spanings, F. A. T., Knol, A. H., Van der Velden, J. A., Wendelaar Bonga, S. E. (2002): Effects of iron sulfate dosage on the water flea (*Daphnia magna* Straus) and early development of Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42(2): 182-192.
31. Wang, B., He, X., Zhang, Z., Zhao, Y., & Feng, W. (2012): Metabolism of nanomaterials in vivo: blood circulation and organ clearance. *Acc. Chem. Res.* 46(3): 761-769.
32. Water Research Council (WRc) (1998): An Update to Proposed Environmental Quality Standards for Iron in Water (eds. P. Whitehouse, E. Dixon, S. Blake and K. Bailey). Final report DETR 4471/1 to the Department of the Environment, Transport and the Regions. WRc, Medmenham, Buckinghamshire.
33. Zhang, Y., Zhu, L., Zhou, Y., & Chen, J. (2015): Accumulation and elimination of iron oxide nanomaterials in zebrafish (*Danio rerio*) upon chronic aqueous exposure. *J. Environ. Sci.* 30: 223-230.
34. Zhu, X., Tian, S., Cai, Z. (2012): Toxicity assessment of iron oxide nanoparticles in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. *PLoS One.* 7(9): e46286.