

اثر ترکیبی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و فلز نیکل بر بافت آبشش ماهی گورخری (*Danio rerio*)

نمامعلی آزادی^۱، برهان منصوری^{۲،۳*}، سید علی جوهری^۴، افشین ملکی^۵، بهروز داوری^۶،
محمد امین پردل^۷

تاریخ دریافت: فروردین ۹۴

تاریخ پذیرش: خرداد ۹۴

چکیده

مطالعه حاضر با هدف بررسی آسیب‌شناسی بافت آبشش ماهی گورخری (*Danio rerio*) متعاقب رویارویی با نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم ترکیب شده با فلز نیکل انجام شده است. بدین منظور از ۲۰۰ قطعه ماهی با متوسط وزن ۱/۵ گرم و طول ۲ سانتی‌متر استفاده شد. ماهیان به مدت ۹۶ ساعت در معرض چهار غلظت غیرکشنده نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم ترکیب شده با نیکل (شامل ۱، ۱۰، ۳۲ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) به همراه گروه شاهد (فاقد هرگونه ماده شیمیایی) قرار گرفتند. نتایج نشان داد که پس از مواجهه با نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم ترکیب شده با نیکل عوارضی همچون خمیدگی تیغه‌های ثانویه، هیپرتروفی تیغه‌های ثانویه، افزایش ترشح موکوس، افزایش به هم‌چسبیدگی لاملاهای ثانویه، هیپرپلازی و در نهایت افزایش نکرور رخ داد. اگرچه تغییرات آسیب‌شناسی بافتی مشاهده شده در تمامی گروه‌ها وجود داشت، اما شدت این تغییرات با افزایش غلظت نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم ترکیب شده با نیکل افزایش یافت. همچنین نتایج آنالیز آماری نیز نشان داد که میزان تغییرات در قطر لاملای اولیه، طول لاملای ثانویه و قطر لاملای ثانویه در مقایسه با گروه شاهد، اختلاف معنی‌دار داشت ($P < 0/05$). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که این نانوماده می‌تواند اثرات قابل توجهی بر بافت آبشش ماهی داشته باشد.

واژگان کلیدی: نانوذرات، تیتانیوم، نیکل، آبشش، ماهی گورخری.

- ۱- استادیار گروه آمار زیستی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
 - ۲- دانشجوی دکتری سم‌شناسی محیط، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.
 - ۳- دانشجوی دکتری سم‌شناسی محیط، مرکز تحقیقات بهداشت محیط، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.
 - ۴- استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.
 - ۵- استاد تمام بهداشت محیط، مرکز تحقیقات بهداشت محیط، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.
 - ۶- دانشیار گروه حشره‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.
 - ۷- دانشجوی کارشناسی ارشد بهداشت محیط، گروه بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.
- * نویسنده مسئول: borhanmansouri@yahoo.com

مقدمه

درصد آن وارد اتمسفر شده است (Keller et al., 2013). در این راستا، میزان رهایش سالیانه نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم به بوم‌سازگان‌های آبی برابر با ۱۵۶۰۰ تن برآورد شده است (Keller and Lazareva, 2013). اگرچه تولید و استفاده از نانومواد مختلف در سطح جهان پیوسته در حال افزایش است و مطالعاتی نیز در رابطه با تاثیرات زیست‌محیطی نانومواد به ویژه اثرات آن‌ها بر موجودات آبی صورت گرفته است، ولی به دست آوردن اطلاعات جامع به پژوهش‌های پیش‌تری در این زمینه نیاز دارد.

نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم ($n\text{TiO}_2$) از جمله نانوذراتی است که به طور گسترده در تولید مواد آرایشی همچون ضدآفتاب‌ها، خمیردندان‌ها، محصولات صنعتی مانند رنگ، جلا دهنده و کاغذ، در فعالیت‌های کاتالیستی، به عنوان ماده افزودنی با کاربردهای پزشکی و زیستی مانند ارتودنسی، کاشت دندان و سیستم‌های دریافت دارو مورد استفاده قرار می‌گیرد (Aitken et al., 2006; Heinlaan et al., 2007). این نانوماده به علت کارایی بالای کاتالیزوری، ثبات شیمیایی بالا و هزینه کم در برنامه‌های شیمی تجزیه و فوتوکاتالیستی

نانو فن‌آوری از جمله فن‌آوری‌های جدید بوده که در دهه اخیر در بسیاری از زمینه‌های علمی و صنعتی رشد چشمگیری داشته است، به طوری که نانومواد در طیف وسیعی از تولیدات و کاربردهای خانگی، کارخانجات نساجی، صنایع الکترونیک، تولیدات پزشکی و فن‌آوری‌های حذف زیستی آلاینده‌ها به کار برده می‌شوند (Ates et al., 2013). بر اساس آمار به دست آمده از مطالعات در ۳۰ کشور جهان، تعداد محصولات مصرفی انسان که در آن‌ها از نانو مواد استفاده شده است، از ۵۴ عدد در سال ۲۰۰۵، به ۱۸۱۴ عدد در سال ۲۰۱۴ افزایش یافته است و پیش‌بینی می‌شود که این تعداد در سال‌های آینده نیز با روند سریعی افزایش یابد (Vance et al., 2015). بر اساس پیش‌بینی‌ها، بازار محصولات محتوی نانومواد تا سال ۲۰۱۵، از ارزشی معادل یک تریلیون دلار برخوردار خواهد بود (Laban et al., 2010). در مطالعه‌ای تخمین زده شده است که ۶۳ تا ۹۱ درصد از ۲۶۰۰۰۰ تا ۳۰۹۰۰۰ تن نانومواد تولید شده در جهان در سال ۲۰۱۰ در مکان‌های دفن زباله، دفن شده است و از این مقدار ۰/۴ تا ۷ درصد آن وارد محیط‌های آبی، ۸ تا ۲۸ درصد وارد خاک و ۰/۱ تا ۱/۵

به تغییر باند انرژی^۲ می‌شود و با انجام عملیات دقیق و افزودن اکسیدهای فلزی، می‌توان گپ انرژی را کاهش داده، انرژی فعال‌سازی را از محدوده فرابنفش به سمت نور مرئی تغییر داد که در این صورت کارایی فوتوکاتالیستی نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم در طیف نور مرئی افزایش می‌یابد (Subramanian et al., 2001; Zhang et al., 2003; Bhushan, 2010).

در رابطه با اثرات زیست‌محیطی نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم بر ماهیان و آسیب‌شناسی بافتی آن‌ها مطالعاتی انجام شده است. Federici و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم موجب ضخیم شدن لاملای ثانویه، هیپرپلازی و چسبندگی لاملای ثانویه در بافت آبشش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان شده است. همچنین Chen و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که بافت آبشش ماهی گورخری در مواجهه با نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم دچار آسیب‌های بافتی مانند متسع شدن لاملای ثانویه، هیپرپلازی، آماس و چسبندگی لاملای ثانویه شده است. در رابطه با اثرات سمی و آسیب‌شناسی بافتی ماهیان در مواجهه با نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم ترکیب

برای کاهش آلاینده‌های آلی در فرآیند تصفیه آب نیز به کار می‌رود (Park and Yeo, 2013). در چند سال اخیر استفاده از نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم برای اکسید کردن آلاینده‌های سمی در محیط روند رو به افزایشی دارد که با استفاده از این نانوذره در فرایند فوتوکاتالیستی بسیاری از ترکیبات سمی به ترکیبات ساده‌تر تبدیل می‌شوند و موجب تخریب ساختار ترکیبات شیمیایی خطرناک مانند پلی‌کلر بی‌فنیل^۱ (PCB)، آفت‌کش‌ها و دیگر ترکیبات آلی پیچیده می‌شود (Kaida et al., 2004; Chen et al., 2011). همچنین دلایلی وجود دارد که باعث شده امروزه علاوه بر استفاده از نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم به عنوان یک فوتوکاتالیست، از نانوذره دی‌اکسیدتیتانیوم ترکیب شده با فلزات نیز استفاده شود؛ سنتز نانوذرات با فلزات و اکسیدهای فلزی یکی از روش‌هایی است که کارایی نانوذرات را در فرآیندهای فوتوکاتالیستی افزایش می‌دهد و بر عملکرد تجزیه آلاینده‌های آلی مختلف اثرگذار است (Zhang et al., 2003; Bhushan, 2010). همچنین سنتز نانوذرات به کمک فلزات منجر

2- Energy Gap or Band Gap

1- Polychlorinated Biphenyl

ریخته شد و نهایتاً ظروف آماده در اتوکلاو قرار گرفتند. پس از اطمینان از اندود بودن کامل، طبق روش هیدروترمال نمونه‌ها در آن در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ ساعت قرار داده شد تا واکنش‌های شیمیایی مورد نظر (یا همان عمل ترکیب شدن) انجام شود (Shahmoradi et al., 2012). پس از طی شدن زمان واکنش نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم با نیکل، ترکیب حاصل با آب دو بار تقطیر چندین بار شستشو داده شد تا آلودگی‌های احتمالی و سورفکتانت برطرف شود. پس از سانتریفیوژ کردن نانوذرات ترکیب شده در دمای ۴۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد، مواد ترکیب شده در دمای اتاق خشک شد (Shahmoradi et al., 2010). در نهایت تصاویر SEM و EDAX نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم ترکیب شده با نیکل توسط میکروسکوپ الکترونی تهیه شد.

نمونه‌های ماهی

تعداد ۲۰۰ قطعه ماهی گورخری به مدت ۱۰ روز در یک آکواریوم ۵۰ لیتری همراه با هوادهی و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی جهت سازگاری با شرایط آزمایشگاهی نگهداری شدند. متوسط وزن و طول ماهیان به ترتیب

شده با فلزات اطلاعات کافی در دسترس نیست و تا به امروز مطالعه‌ای در مورد اثرات نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم ترکیب شده با فلزات بر آسیب‌شناسی بافت آبشش ماهی گورخری گزارش نشده است. از این رو مطالعه حاضر به بررسی اثر نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم ترکیب شده با فلز نیکل بر آسیب‌شناسی بافت آبشش ماهی گورخری (*Danio rerio*) می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع مقطعی (توصیفی-تحلیل) است که در تابستان ۱۳۹۴ در دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان انجام شد.

ساخت نانوذره

به منظور ترکیب کردن نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم با فلز نیکل، ۲ مول نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم، ۱ درصد وزنی فلز نیکل و ۱ مول هیدروکسیدسدیم به عنوان حلال با یکدیگر مخلوط شده و به منظور همگن‌سازی به مدت ۵ دقیقه هم زده شدند. سپس مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر آن- بوتیل‌آمین به آرامی به مخلوط حاصل اضافه شد و پس از تعیین pH، ۱۰ مول از این ترکیب به داخل ظروف تفلونی

بوئن، نمونه‌ها به الکل اتانول ۷۰ درصد منتقل شدند و پس از طی مراحل آب‌گیری، شفاف‌سازی، پارافینه کردن و قالب‌گیری، توسط دستگاه میکروتوم برش‌هایی به ضخامت ۴-۵ میکرومتر از آن‌ها تهیه شد. سپس برش‌ها روی لام چسبانده شدند. رنگ‌آمیزی لام‌ها به روش هماتوکسیلین-ائوزین صورت گرفت. از هر نمونه ۳ لام با کیفیت مناسب تهیه و لام‌ها توسط میکروسکوپ نوری (Nikon Eclipse-E200) در بزرگنمایی ۴۰۰ بررسی شدند. تغییرات قطر لاملای اولیه، قطر لاملای ثانویه و طول لاملای ثانویه در تصاویر بافتی تهیه شده، به وسیله نرم‌افزار Axio Vision Real 4.8 اندازه‌گیری و با گروه شاهد مقایسه شد. برای مقایسه میانگین قطر لاملای اولیه، قطر لاملای ثانویه و طول لاملای ثانویه ماهی گورخری در غلظت‌های مختلف از آنالیز واریانس یک‌طرفه استفاده شد. در صورت وجود اختلاف معنی‌دار، برای انجام مقایسه‌های دو به دو از پس‌آزمون توکی (Tukey HSD) استفاده شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ صورت گرفت.

۱/۵ گرم و ۲ سانتی‌متر بود. در طول این مدت میانگین دمای آب ثابت نگه داشته شد و ماهیان روزانه ۲ بار و هر بار به میزان ۱ درصد وزن بدن با غذای مخصوص ماهیان آکواریومی تغذیه شدند. آب مورد استفاده برای نگهداری ماهیان در طی دوره سازگاری و همچنین انجام آزمایشات سم‌شناسی، آب شرب بود که برای کلرزدایی آن به مدت حداقل ۲۴ ساعت هوادهی شد.

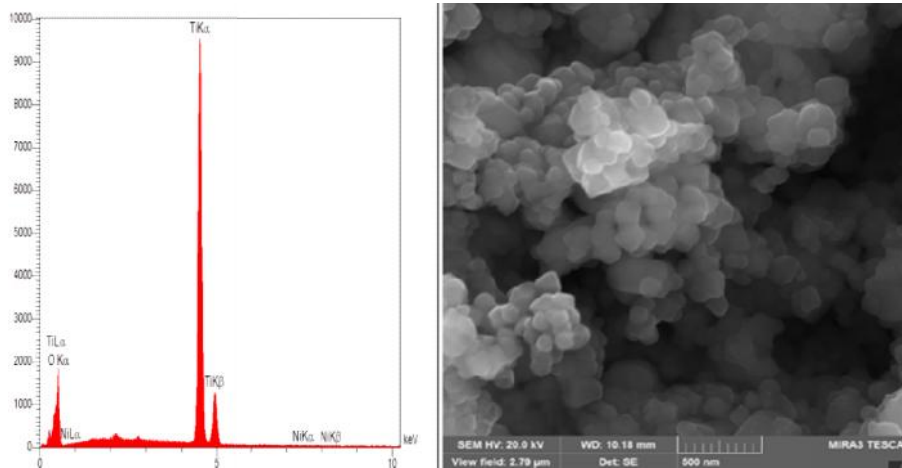
تیمار ماهی با نانوذره

در این مطالعه، تیمارها شامل چهار غلظت نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم ترکیب شده با فلز نیکل با غلظت‌های ۱، ۱۰، ۳۲ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر به همراه یک گروه شاهد بودند. این غلظت‌ها بر اساس پیش‌آزمون انجام شده انتخاب شدند. در هر تیمار ۱۵ قطعه ماهی استفاده شد. ماهی‌ها در هر یک از تیمارها به مدت ۴ روز در مواجهه با نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم ترکیب شده با نیکل قرار گرفتند. در پایان روز چهارم، از هر تیمار ۶ عدد ماهی به صورت کاملاً تصادفی صید شد و پس از بیهوش کردن، بافت آبشش آن‌ها خارج شد. به منظور انجام مطالعات بافت‌شناسی کلاسیک، ۲۴ ساعت پس از تثبیت بافت‌ها در محلول

نتایج

توسط میکروسکوپ الکترونی تهیه شد در شکل ۱ ارائه شده است.

تصاویر SEM و EDAX نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم ترکیب شده با نیکل که

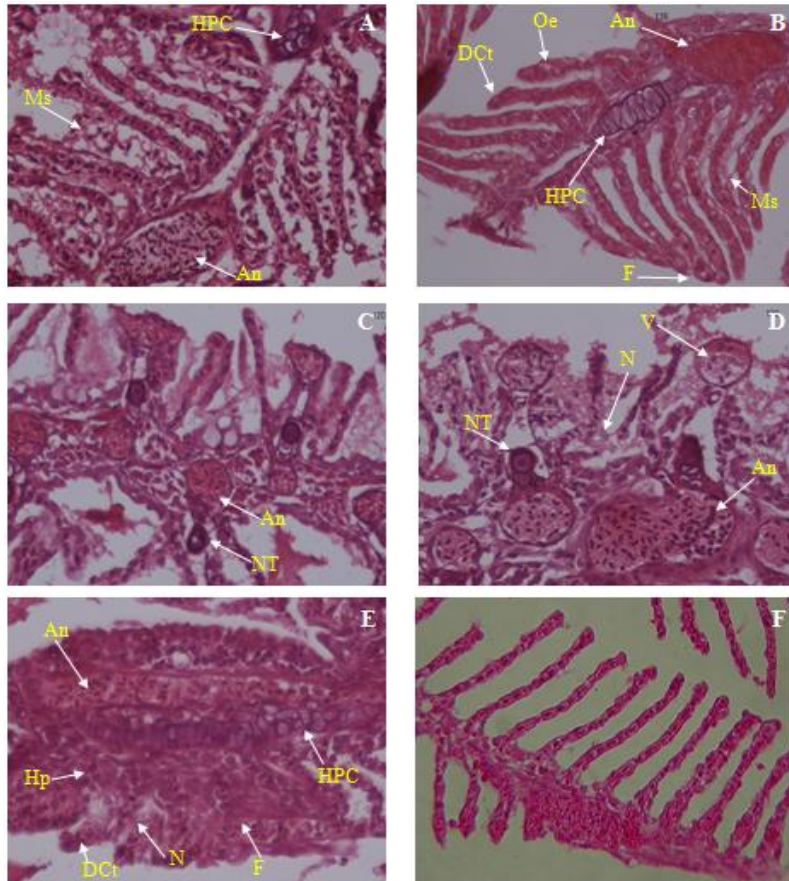


شکل ۱: SEM (سمت راست) و EDAX (سمت چپ) نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم ترکیب شده با فلز نیکل با روش هیدروترمال

رشته‌های ثانویه، آماس لاملاها، هیپرپلازی، انحناء، چسبیدگی رشته‌ها، افزایش ترشح مخاطی، ظاهر شدن واکنش در لابه‌لای لاملاهای ثانویه، افزایش حجم سلول‌های غضروفی مرکز رشته اولیه و ایجاد پرخونی یا آنوریسم در رشته‌های آبشش ماهی گورخری شده است (شکل ۲). نتایج این مطالعه نشان داد که میزان آسیب‌های وارد به بافت آبشش در مواجهه با نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم ترکیب شده با نیکل وابسته به غلظت بود، به

آسیب‌های ایجاد شده در بافت آبشش ماهی گورخری در مواجهه با نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم ترکیب شده با فلز نیکل در شکل ۲ نشان داده شده است. در گروه شاهد، رشته‌های بافت آبشش تا حدودی به طور منظم و با حداقل تغییرات مانند متسع شدن راس لاملاهای ثانویه، ایجاد شده است. بر اساس نتایج به دست آمده در این مطالعه، نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم ترکیب شده با نیکل موجب آسیب‌هایی مانند خمیدگی و متسع شدن رأس

طوری که با افزایش میزان غلظت ماده شد. شیمیایی در محیط، میزان آسیب‌ها بیش‌تر



شکل ۲: ساختار بافت آبشش ماهی گورخری پس از ۴ روز مواجهه با نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم ترکیب شده با فلز نیکل (بزرگنمایی ۴۰۰). A: ۱ میلی‌گرم در لیتر، B: ۱۰ میلی‌گرم در لیتر، C: ۳۲ میلی‌گرم در لیتر، D و E: ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر و F: گروه شاهد؛ آبشش گروه شاهد تقریباً سالم است، در حالی که در آبشش گروه‌های قرار گرفته در معرض نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم ترکیب شده با نیکل آسیب‌هایی مانند تشکیل واکوئل (V)، آنوریسم (An)، انحناء در لاملای ثانویه (DCt)، هیپرپلازی (Hp)، آماس (Oe)، خمیدگی تیغه-های ثانویه (Cu)، چسبیدگی لاملاها (F)، افزایش ترشح موکوس (Ms)، هیپرتروفی و آماس سلول‌های غضروفی مرکز رشته اولیه (HPC) و نکروز (N) مشاهده شد.

نتایج بررسی قطر رشته‌های اولیه و ثانویه و در تمام غلظت‌ها نسبت به گروه شاهد (غلظت همچنین طول رشته‌های ثانویه ماهیان مواجه شده با نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم ترکیب شده با نیکل در جدول ۱ آورده شده است. همان طور که از داده‌های این جدول مشخص است،

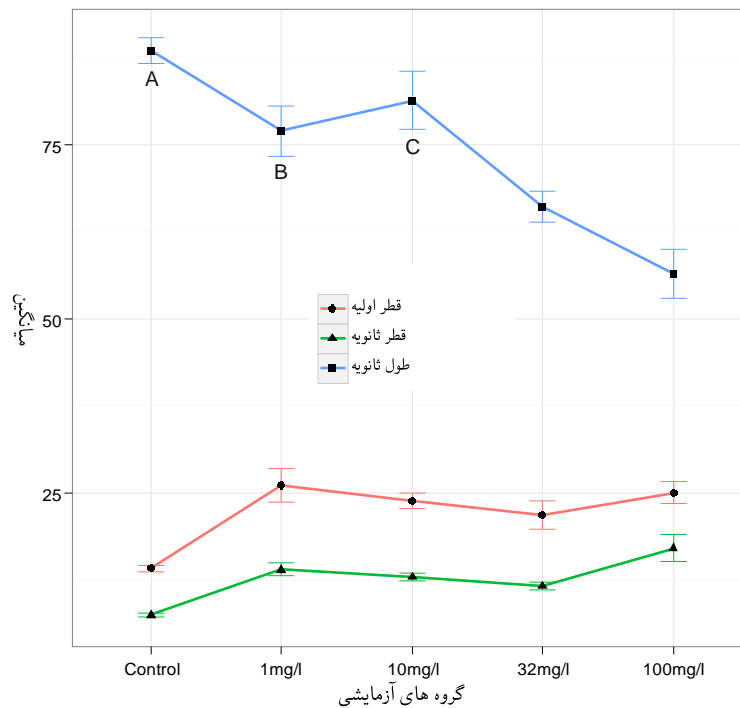
اما طول لاملای ثانویه کاهش پیدا کرد. این کاهش در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر از نانوذرات بیش‌تر قابل توجه بود.

جدول ۱: قطر لاملای اولیه و ثانویه و طول لاملای ثانویه (میکرومتر) در ماهی گورخری در مواجهه با نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم ترکیب شده با نیکل (میانگین \pm انحراف معیار)

ویژگی آبشش			
غلظت (میلی‌گرم بر لیتر)	قطر اولیه	قطر ثانویه	طول ثانویه
۰	$14/13 \pm 1/79$	$7/45 \pm 1/56$	$88/42 \pm 8/01$
۱	$25/97 \pm 10/49$	$13/96 \pm 4/04$	$76/93 \pm 15/77$
۱۰	$23/81 \pm 4/9$	$12/88 \pm 2/54$	$81/25 \pm 18/31$
۳۲	$21/77 \pm 8/9$	$11/61 \pm 2/06$	$66/09 \pm 9/78$
۱۰۰	$25/01 \pm 7$	$17/06 \pm 8/18$	$56/45 \pm 15/41$

به منظور درک بهتر تغییرات ویژگی‌های آبشش ماهیان در غلظت‌های مختلف، روند تغییرات این ویژگی‌ها در شکل ۳ رسم شده است. برای هر ویژگی در هر غلظت نوار خطی که فاصله اطمینان ۹۵ درصد میانگین در آن نقطه است نیز رسم شده است. نوار خطی امکان مقایسه بین غلظت‌های مختلف را فراهم می‌کند. در مورد طول لاملای ثانویه مشاهده می‌شود که با افزایش غلظت نانوذره ترکیب شده، طول لاملای ثانویه در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر کاهش معنی‌داری داشته است (نوار خطی در غلظت صفر (نقطه A) و غلظت یک (نقطه B) همپوشانی ندارند). افزایش غلظت به ۱۰ میلی‌گرم در لیتر تفاوت چندانی در طول لاملای ثانویه ایجاد نکرده است (بین نقطه B و نقطه C همپوشانی وجود

دارد)، اما افزایش آن به ۳۲ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کاهش شدید و معنی‌داری را موجب شده است. تغییرات در قطر لاملای ثانویه تنها در غلظت ۱ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر محسوس است، به طوری که بیش‌ترین افزایش در قطر لاملای ثانویه در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم ترکیب شده با نیکل دیده می‌شود. همچنین شکل ۳ نشان می‌دهد که در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر قطر لاملای اولیه نسبت به گروه شاهد بیش‌تر شده است، اما افزایش غلظت نانوذرات به بیش از این مقدار، تغییر محسوسی را در قطر لاملای اولیه ایجاد نکرده است.



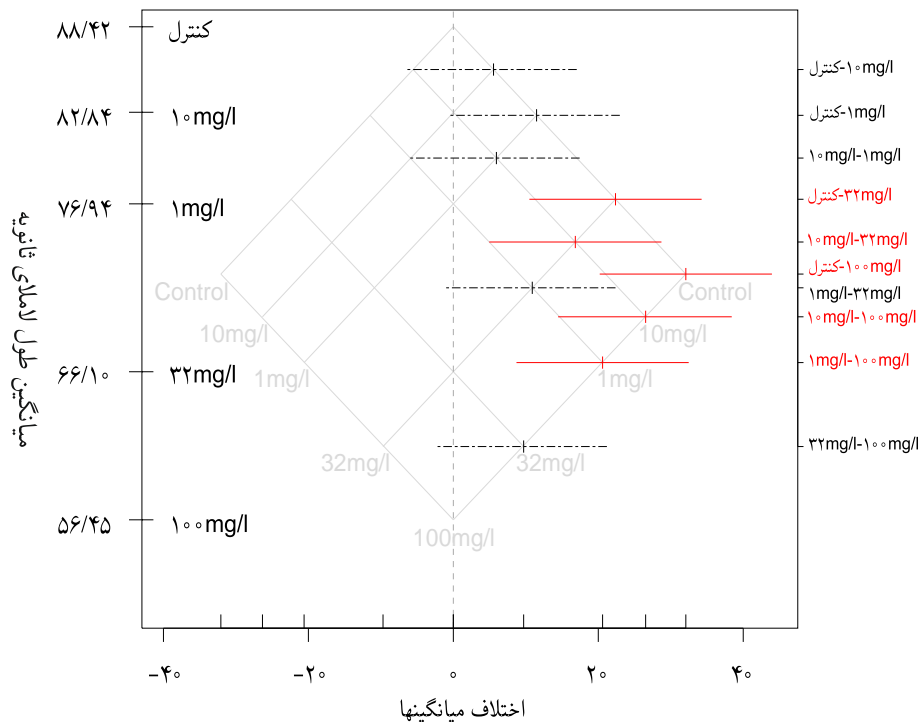
شکل ۳: روند تغییرات بافت آبشش ماهی گورخری در غلظت‌های مختلف؛ در این نمودار محور افقی بیانگر غلظت‌های مختلف از نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم ترکیب شده با فلز نیکل و محور عمودی میانگین ویژگی مورد نظر در آن غلظت را نشان می‌دهد. حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است.

به منظور بررسی این که آیا در غلظت‌های مختلف تفاوت معنی‌داری در ویژگی‌های آبشش ماهیان گورخری مواجه شده با نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم ترکیب شده با نیکل ایجاد شده است یا خیر، از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و پس آزمون توکی استفاده شد. نتایج این آزمون در جدول ۲ آمده است. در مورد هر سه ویژگی، نتایج تفاوت معنی‌داری را بین غلظت‌های مختلف نشان می‌دهد.

جدول ۲: آنالیز واریانس یک‌طرفه در تغییرات بافت آبشش ماهی گورخری

پارامتر	منبع تغییرات	مجموع مربعات	درجه آزادی	آماره F	مقدار احتمال
قطر اولیه	غلظت	۱۷۱۰	۴	۸/۰۵	$P < ۰/۰۰۱$
	باقیمانده	۴۷۷۹	۹۰		
قطر ثانویه	غلظت	۶/۰۱	۴	۱۶/۹۳	$P < ۰/۰۰۱$
	باقیمانده	۷/۹۸	۹۰		
طول ثانویه	غلظت	۱۲۱۴۹	۴	۱۵/۴۶	$P < ۰/۰۰۱$
	باقیمانده	۱۷۶۷۵	۹۰		

شکل ۴ فواصل اطمینان را برای تمام مقایسه‌های دو به دو بین غلظت‌های مختلف برای طول لاملای ثانویه در سطح اطمینان ۹۵ درصد نشان می‌دهد.



شکل ۴: تغییرات بافت آبشش ماهی گورخری در مواجهه با نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم ترکیب شده با نیکل با استفاده از پس‌آزمون توکی.

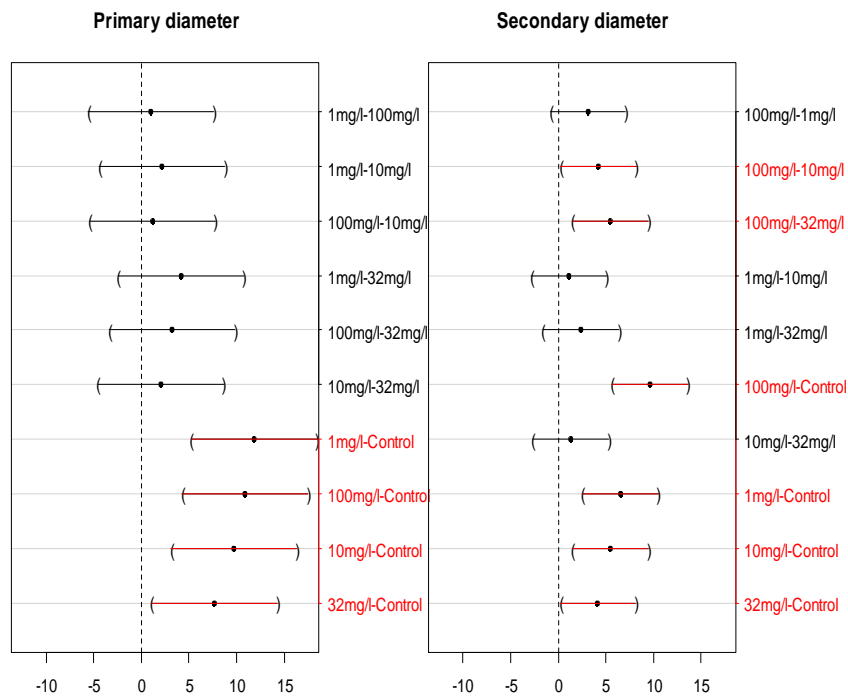
گروه این خط چین را قطع کند، آن دو گروه با هم تفاوت معنی‌داری ندارند. شکل ۴ نشان می‌دهد که میانگین طول لاملای آبشش ماهی گورخری در گروه شاهد با غلظت‌های ۱ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر تفاوت معنی‌داری ندارد، اما در غلظت ۳۲ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر این اختلاف معنی‌دار است، به طوری که اختلاف میانگین طول لاملای آبشش ماهی گورخری در گروه شاهد با گروه ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر،

در شکل ۴ در محور افقی اختلاف میانگین گروه‌ها و محور عمودی سمت چپ میانگین طول لاملای ثانویه دیده می‌شوند که به ترتیب صعودی مرتب شده‌اند. در سمت راست نیز محور عمودی مقایسه‌های مختلف را نشان می‌دهد. مقایسه‌هایی که معنی‌دار هستند با خطوط صاف (بدون خطوط منقطع) متمایز شده‌اند. خط چین وسط شکل ۴ اختلاف صفر را نشان می‌دهد. چنانچه فاصله اطمینان دو

داده شده است. این شکل نشان می‌دهد که میانگین قطر لاملای اولیه در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر تنها با گروه شاهد اختلاف دارد، اما با سایر غلظت‌ها تفاوت معنی‌داری ایجاد نشده است. این در حالی است که در مورد قطر لاملای ثانویه نتیجه‌گیری کاملاً متفاوت است و علاوه بر گروه شاهد، غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نیز تفاوت معنی‌داری با سایر غلظت‌ها دارد.

بین ۲۰ تا تقریباً ۴۲ واحد است که بیانگر کاهش شدید طول لاملای ثانویه در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر است. همچنین شکل ۴ نشان می‌دهد که اختلاف میانگین طول لاملای ثانویه ماهیان در غلظت ۱۰۰ با طول لاملای ثانویه ماهیان در غلظت ۱، ۱۰ و ۳۲ میلی‌گرم در لیتر نیز معنی‌دار است.

در شکل ۵ مقایسه‌های دو به دو برای قطر لاملای اولیه و همچنین لاملای ثانویه نشان



شکل ۵: مقایسه‌های دو به دو برای قطر لاملای اولیه و ثانویه ماهی گورخری

بحث

آلاینده‌ها را در محیط بازگو کند (Yasser and Naser, 2011; Mansouri and Johari, 2015).

نتایج بررسی قطر لاملای اولیه و ثانویه به همراه طول لاملای ثانویه نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های مورد آزمایش با گروه شاهد در این زمینه وجود دارد ($P < 0.05$). به نظر می‌رسد که دلیل معنی‌دار شدن متغیر غلظت در آنالیز واریانس قطر لاملای اولیه که در جدول ۲ آمده است، وجود اختلاف گروه شاهد با سایر گروه‌ها باشد. ترکیب کردن نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم با فلز از جمله روش‌هایی است که میزان کارایی نانومواد را در بخش‌های مختلف از جمله تصفیه آلاینده‌های محیطی افزایش می‌دهد (Subramanian et al., 2001)، اما در مقابل می‌تواند آسیب‌هایی جدی به موجودات آبی همچون ماهیان وارد کند. بر اساس نتایج این مطالعه، میزان اختلاف آسیب‌های وارده به بافت آبشش ماهی گورخری در مواجهه با نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم ترکیب شده با نیکل در مقایسه با گروه شاهد شدید بود و با افزایش غلظت آسیب‌هایی مانند آنیورسم و در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر چسبندگی کامل لاملاهای ثانویه را موجب شد.

تغییرات بافت‌هایی مانند آبشش در ماهیان به عنوان نشانگر زیستی مناسب برای آلودگی محیط‌های آبی به کار می‌روند، که میزان آسیب‌های وارده به بافت در نتیجه استرس‌های محیطی را نشان می‌دهد و این آسیب‌ها، به وسیله تغییرات رفتاری، سلولی، بیوشیمیایی و آسیب‌شناسی بافتی تعیین می‌شوند (Depledge, 1992). آسیب‌شناسی بافتی روشی است که می‌تواند نوع و شدت آسیب وارده به بافت آبزیان را پس از رویارویی با آلاینده‌های محیط زیست از جمله نانوذرات مشخص نماید (Govindasamy and Rahuman, 2014)، چرا که تغییرات ایجاد شده در ساختار بافت از اولین علائم مواجهه با مواد سمی است (Yasser and Naser, 2011). این تغییرات در بافت‌های هدف به خوبی میزان آلودگی محیط را نشان می‌دهد. بافت آبشش ماهی یکی از مهم‌ترین اندام‌های هدف به عنوان شاخص آلودگی در محیط آبی است، زیرا این بافت در معرض مستقیم آلاینده‌ها قرار دارد و دارای سطح وسیعی از سلول‌های اپیتلیوم تنفسی بوده که تبادلات گازی با محیط آبی را انجام می‌دهند، از این رو می‌تواند به عنوان شاخص زیستی میزان

بافت آبشش ماهیان می‌شود. همچنین نتایج مطالعات Mansouri و Johari (۲۰۱۵) نیز مؤید این بود که غلظت‌های بالای نانوذرات نقره باعث ایجاد حالت چسبیدگی در بافت آبشش ماهی گورخری می‌شود. در پژوهش مشابه دیگری، Mansouri و همکاران (۲۰۱۵) بیان داشتند که حالت هیپرپلازی به دنبال حالت چماقی شدن رأس لاملاهای ثانویه آبشش ماهی گورخری در مواجهه با نانوذرات کبالت و یون کبالت ظاهر شده است.

از دیگر آسیب‌های ایجاد شده در بافت آبشش، آماس و چسبیدگی لاملاهای ثانویه است. آماس لاملاهای ثانویه موجب کاهش فضای بین لاملاها شده و به دنبال آن حالت چسبیدگی لاملاهای ثانویه رخ می‌دهد. حالت چسبیدگی لاملاهای ثانویه موجب کاهش تبادلات گازی بین لاملاها شده و بر سلامتی ماهی تاثیرگذار است (Skidmore and Tovell, 1972; Jiraungkoorskul et al., 2002). با توجه به نتایج این مطالعه، حالت چسبیدگی لاملاهای ثانویه بافت آبشش در غلظت‌های بالا یعنی در ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر رخ داده است. مطالعات مشابهی در این زمینه نشان دادند که آلاینده‌های محیطی همچون نانوذرات موجب آسیب‌هایی همچون

خمیدگی رأس رشته‌های آبشش از اولین آسیب‌های بافتی در ماهیان است، در این حالت لایه اپیتلیوم لاملاهای ثانویه به صورت آماس درمی‌آید و حضور مواد شیمیایی موجب کاهش سطح مفید آبشش و در نتیجه کاهش تبادل گازی آبشش می‌شود (Camargo and Martinez, 2007). در هیپرپلازی بافت آبشش، تکثیر سلول‌های مجاور لاملا، کاهش فضای بین لاملاها را به دنبال دارد که با افزایش این روند حالت چسبیدگی رشته‌های آبششی به وجود می‌آید (Depledge, 1992; Fracario et al., 2003). نتایج به دست آمده از این مطالعه نیز نشان داد که در غلظت‌های اولیه (۱ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر) حالت خمیدگی رأس لاملاهای ثانویه به وضوح قابل مشاهده است. به دنبال متسع شدن، حالت هیپرپلازی در فاصله بین لاملاهای ثانویه آبشش نیز ظاهر شد و مطابق نتایج این مطالعه حالت هیپرپلازی با افزایش غلظت از ۱ به ۱۰ و ۳۲ میلی‌گرم در لیتر افزایش نشان داد و در غلظت بالاتر یعنی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر به چسبیدگی رشته‌های آبشش منجر شد. در طی مطالعه‌ای مشابه، Santos و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که افزایش غلظت آلاینده‌ها در آب موجب حالت چسبیدگی رشته‌های ثانویه در

آنوریسم در بافت آبشش با افزایش میزان غلظت نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم ترکیب شده با فلز نیکل از مهمترین آسیب‌های ظاهر شده بوده است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله، از خانم‌ها فاطمه تقدیمی و روزین کارگر، و آقای خالق رزاق طلب، کارکنان بخش آسیب‌شناسی بیمارستان توحید سنندج به خاطر همکاری در انجام این پروژه سپاسگزاری می‌نمایند. همچنین از کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی کردستان به خاطر همکاری در تأمین هزینه این پژوهش در قالب طرح پژوهشی دانشجویی تشکر و قدردانی می‌گردد. هزینه اجرای این پژوهش توسط معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی کردستان [شماره گرت: ۱۴/۱۵۷۳۳] تأمین شده است.

آماس، چسبیدگی و آنوریسم در بافت آبشش ماهیان شده‌اند (Koca et al., 2008; Mansouri et al., 2015; Mansouri and Monteiro, 2015). همچنین (Johari, 2015). همکاران (۲۰۰۸) بیان داشتند که حالت آماس در بافت آبشش می‌تواند به عنوان بیومارکر حساس^۱ حالت سمیت حاد مواد آلاینده باشد، به طوری که در این مطالعه نیز آسیب آماس در بافت آبشش ماهی گورخری رخ داد. آنوریسم موجب تجمع خون در قسمتی از بافت شده که این حالت سبب اختلال در جریان خون می‌شود و ممکن است پارگی مویرگ، خونریزی و حتی مرگ موجود زنده را به همراه داشته باشد (Rajkumar et al., 2016). Stentiford و همکاران (۲۰۰۳) افزایش فراوانی آسیب آنوریسم در ماهی در محیط‌های آلوده را مشاهده کردند و تأکید داشتند که این حالت در حضور محرک‌های محیطی موجود در آب ایجاد می‌شود. همچنین Monteiro و همکاران (۲۰۰۸) بیان داشتند که در گونه‌های مشابه، آسیب آنوریسم باید به عنوان شاخص زیستی در مواجهه با یک آلاینده در سمیت حاد مورد استفاده قرار گیرد. براساس نتایج به دست آمده در این مطالعه ایجاد عارضه

منابع

- Aitken R.J., Chaudhry M.Q., Boxall A.B.A. and Hull M. 2006.** Manufacture and use of nanomaterials: current status in the UK and global trends. *Occupational Medicine*, 56: 300–306.
- Ates M., Demir V., Adiguzel R. and Arslan Z. 2013.** Bioaccumulation, subacute toxicity, and tissue distribution of engineered titanium dioxide nanoparticles in goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of Nanomaterials*, 9: 1–6.
- Bhushan B. 2010.** Springer handbook of nanotechnology. Springer. 50P.
- Camargo M.M.P. and Martinez C.B.R. 2007.** Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotropical Ichthyology*, 5: 327–336.
- Chen J., Dong X., Xin Y. and Zhao M. 2011.** Effects of titanium dioxide nano-particles on growth and some histological parameters of zebrafish (*Danio rerio*) after a long-term exposure. *Aquatic Toxicology*, 101: 493–499.
- Depledge M.H. 1992.** Conceptual paradigms in marine ecotoxicology. P: 52. In: Bjornstad E., Hagerman L. and Jensen K. (Eds.). *Proceedings of the 12th Baltic Marine Biologists Symposium*. Fredensborg, Olsen and Olsen, Helsingor, Denmark.
- Federici G., Shaw B.J. and Handy R.D. 2007.** Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout: Gill injury, oxidative stress and other physiological effects. *Aquatic Toxicology*, 84: 415–530.
- Fracario R., Verani N.F., Espindola E.L.G., Rocha O., Rigolin-Sa O. and Andrade C.A. 2003.** Alterations on growth and gill morphology of *Danio rerio* (Pisces, Ciprinidae) exposed to the toxic sediments. *Brazilian Arctic Biology Technology*, 46: 685–695.
- Govindasamy R. and Rahuman A.A. 2014.** Histopathological studies and oxidative stress of synthesized silver nanoparticles in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Journal of Environmental Sciences*, 24: 1091–1098.
- Heinlaan M., Ivask A., Blinova I., Dubourguier and H.C., Kahru A. 2007.** Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*, 22: 1308–1316.
- Jiraungkoorskul W., Upathama E.S., Kruatrachuea M., Sahaphong S., Vichasri-Gramsa S. and Pokethitiyooka P. 2002.** Histopathological effects

- of roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Science Asia*, 28: 121–127.
- Kaida T., Kobayashi K., Adachi M. and Suzuki F. 2004.** Optical characteristics of titanium oxide interference film and the film laminated with oxides and their applications for cosmetics. *Journal of Cosmetic Sciences*, 55: 219–220.
- Keller A.A. and Lazareva A. 2013.** Predicted releases of engineered nanomaterials: From global to regional to local. *Environmental Sciences and Technology Letter*, 1: 65–70.
- Keller A.A., McFerran S., Lazareva A. and Suh S. 2013.** Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *Journal of Nanoparticle Research*, 15: 1–17.
- Koca S., Koca Y. B., Yildiz S. and Gurcu B. 2008.** Genotoxic and histopathological effects of water pollution on two fish species, *Barbus capito pectoralis* and *Chonrostoma nasus* in Buyuk Menderes River, Turkey. *Biological Trace Element Research*, 122: 276–291.
- Laban G., Nies L.F., Turco R.F., Bickham J.W. and Sepulveda M.S. 2010.** The effects of silver nanoparticles on fathead minnow (*Pimephales promelas*) embryos. *Ecotoxicology*, 19: 185–195.
- Mansouri B. and Johari S.A. 2015.** Effects of short term exposure to sublethal concentrations of silver nanoparticles on histopathology and ultrastructure of zebrafish (*Danio rerio*) gill. *Iranian Journal of Toxicology*, 10: 15–20.
- Mansouri B., Maleki A., Johari S.A. and Reshahmanish N. 2015.** Effects of cobalt oxide nanoparticles and cobalt ions on gill histopathology of zebra fish (*Danio rerio*). *Aquaculture, Aquarium, Conservation and Legislation Bioflux*, 8(3): 438–444.
- Monteiro S.M., Rocha E., Fontamhas-Fernandes A. and Sousa M. 2008.** Quantitative histopathology of *Oreochromis niloticus* gills after copper exposure. *Journal of Fish Biology*, 73: 1376–1392.
- Park H.G. and Yeo M.K. 2013.** Comparison of gene expression changes induced by exposure to Ag, Cu-TiO₂, and TiO₂ nanoparticles in zebrafish embryos. *Molecular Cell Toxicology*, 9: 129–139.
- Rajkumar K.S., Kanipandian N. and Thirumurugan R. 2016.** Toxicity assessment on haematology, biochemical and histopathological alterations of silver nanoparticles exposed freshwater fish *Labeo rohita*. *Applied Nanosciences*, 6: 19–29.

- Santos D.M.S., Melo M.R.S., Mendes D.C.S., Rocha I.K.B.S., Silva J.P.L., Cantanhede S.M. and Meletti P.C. 2014.** Histological changes in gills of two fish species as indicators of water quality in Jansen Lagoon (Sao Luis, Maranhao State, Brazil). *International Journal of Environmental Research Public Health*, 11: 12927–12937.
- Shahmoradi B., Ibrahim I.A., Sakamoto N., Ananda S., Somoshekar R., Guru Row T.N. and Byrappa K. 2010.** Photocatalytic treatment of municipal wastewater using modified neodymium doped TiO₂ hybrid nanoparticles. *Environmental Sciences and Health A*, 45: 1248–1255.
- Shahmoradi B., Negahdary M. and Maleki A. 2012.** Photodegradation of methylene blue using surface modified manganese doped TiO₂ nanoparticles. *Environmental Engineering Science*, 29: 1032–1037.
- Skidmore J.F. and Tovell P.W. 1972.** A toxic effect of zinc sulphate on the gill of rainbow trout. *Water Research*, 6: 271–230.
- Stentiford G., Longshaw M., Lyons B., Jones G., Green M. and Feist S. 2003.** Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. *Marine Environmental Research*, 55: 137–159.
- Subramanian V., Wolf E. and Kamat P.V. 2001.** Semiconductor-metal composite nanostructures. To what extent do metal nanoparticles improve the photocatalytic activity of TiO₂ films? *The Journal of Physical Chemistry B*, 5(46): 11439–11446.
- Vance M.E., Kuiken T., Vejerano E.P., McGinnis S.P., Hochella M.F., Rejeski D. and Hull M.S. 2015.** Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 6: 1769–1780.
- Yasser A.G. and Naser M.D. 2011.** Impact of pollutants on fish collected from different parts of Shatt Al-Arab River: A histopathological study. *Environmental Monitoring and Assessment*, 181: 175–182.
- Zhang L., Yu J.C., Yip H.Y., Li Q., Kwong K.W., Xu A.W., and Wong P.K. 2003.** Ambient light reduction strategy to synthesize silver nanoparticles and silver-coated TiO₂ with enhanced photocatalytic and bactericidal activities. *Langmuir*, 15: 1692–1709.



The combined effect of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles and nickel on the gill tissue of zebrafish (*Danio rerio*)

Nemamali Azadi¹, Borhan Mansouri^{2,3,*}, Seyed Ali Johari⁴, Afshin Maleki⁵, Behrouz Davari⁶, Mohammad Amin Pordel⁷

Received: March 2015

Accepted: June 2015

Abstract

The purpose of this study was to determine the effect of nickel (Ni) doped TiO₂ NPs on gill histopathology of zebrafish (*Danio rerio*). In this study, a total number of 200 zebrafish (*Danio rerio*) with average weight of 3g and length body of 4cm were used. In this study, four non-lethal concentrations of Ni doped TiO₂ NPs were used that included 1, 10, 30, 100 mg/L; also control group was considered. The results showed that the Ni doped TiO₂ NPs on gill tissue cause some impacts such as secondary bending blades, blades secondary hypertrophy, increased mucus secretion, fusion in the secondary lamellae, hyperplasia and eventually necrosis increases. Although histological changes in gill tissue were observed in all groups, but the severity of these changes increased with increasing concentration of Ni doped TiO₂ NPs. Moreover, changes were significant between exposure group and control group in parameters of diameter of gill filaments, diameter of secondary lamellae, and length of secondary lamellae (P<0.05). In conclusion, the present study indicated that Ni doped TiO₂ NPs can have considerable effects on fish gill tissue.

Key words: *Nanoparticles, Titanium, Nickel, Gill, Danio.*

1- Assistant Professor in Department of Biostatistics, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2- PhD Student of Ecotoxicology, Student Research Committee, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran.

3- PhD Student of Ecotoxicology, Environmental Health Research Center, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran.

4- Assistant Professor in Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.

5- Professor of Environmental Health, Environmental Health Research Center, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran.

6- Associate Professor in Department of Medical Entomology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.

7- MSc. Student of Environmental Health, Department of Health, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran.

*Corresponding Author: borhanmansouri@yahoo.com

