

مقایسه اثرات مزمن نانوذرات و درشت ذرات تیتانیوم دی اکسید در بافت های آبشش، کبد و روده گورخر ماهی (*Danio rerio*)

- مریم محجوبیان لنگرودی: گروه زیست شناسی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران، صندوق پستی: ۱۳۳۵۱۹۱۴
- اکرم سادات نعیمی*: گروه زیست شناسی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران، صندوق پستی: ۱۳۳۵۱۹۱۴

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۶

چکیده

هدف این پژوهش مقایسه اثرات نانوذرات تیتانیوم دی اکسید و درشت ذرات آن بر بافت های آبشش، کبد و روده گورخر ماهی (*Danio rerio*) است. در مطالعه حاضر تعداد ۱۵۰ قطعه گورخر ماهی به مدت ۳۰ روز تحت شرایط ساکن-تجدید در معرض تیمار نانوذرات و درشت ذرات تیتانیوم دی اکسید در غلظت های ۱ و ۱۰ میلی گرم بر لیتر و ۳ تکرار در هر تیمار به همراه گروه شاهد قرار گرفتند. پس از اتمام دوره (۳۰ روز) ماهی ها در فرمالین تثبیت شده و برای انجام مطالعات بافت شناسی کلاسیک رنگ آمیزی شدند. نتایج این پژوهش نشان داد که نانوذرات تیتانیوم دی اکسید و درشت ذرات آن منجر به ناهنجاری هایی در لاملا و فیلامنت از قبیل جدا شدن اپتلیوم، ادم، انحنای به هم چسبیدگی، هایپرپلازی در لاملا و پرخونی، هایپرتروفی در فیلامنت بافت آبشش گورخر ماهی گردید. هم چنین ناهنجاری هایی نظیر واکنش شدن سیتوپلاسم، افزایش مراکز ملانوماکروفاژ، تخریب هپاتوسیت ها، پرخونی و افزایش قطر سینوزوئیدها در بافت کبد گورخر ماهی و آسیب هایی از قبیل جدا شدن اپتلیوم، افزایش تورم سلول های جامی، نکروز و پرخونی در روده گورخر ماهی مشاهده شد. براساس یافته های این پژوهش میزان ناهنجاری ها در تیمارهای نانو از درشت ذرات بیش تر بود. هم چنین، بیش تر عارضه های ایجاد شده وابسته به غلظت مواد بود، به طوری که شدت ناهنجاری ها در غلظت ۱۰ میلی گرم بر لیتر از نانوذره تیتانیوم دی اکسید در مقایسه با سایر تیمارهای مورد بررسی بیش تر بود.

کلمات کلیدی: آسیب شناسی بافتی، فیلامنت آبششی، نانومواد، تیتانیوم دی اکسید، هپاتوسیت، بافت روده



مقدمه

امروزه نانوذرات به دلیل خواص ویژه و هم‌چنین کاربردهای گوناگونی که در صنایع دارند، توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود جلب نموده‌اند. یکی از این نانوذرات تیتانیوم دی اکسید می‌باشد که به دلیل خواص فراوان بسیار مورد استفاده قرار گرفته است. کارایی تیتانیوم دی اکسید متأثر از ساختار بلوری و اندازه ذرات آن است (Gao و همکاران، ۲۰۰۴). تیتانیوم دی اکسید، در زمینه‌های گوناگونی مانند رنگ‌ها، کاغذها، جوهرها، مواد آرایشی و سنسورها کاربرد دارد (Yang و همکاران، ۲۰۰۱). این ماده خصوصیات فیزیکی-شیمیایی منحصر به فردی چون استحکام، مقاومت در برابر خوردگی، زیست‌سازگاری، سفید شوندگی و عملکرد فتوکاتالیستی خوب و هم‌چنین عملکرد اپتیکی و خصوصیات الکتریکی عالی دارد (Chen و همکاران، ۲۰۱۱). رشد تولید محصولات تجاری که در آن‌ها از مواد نانو استفاده شده میزان ورود آن‌ها را به زیست‌بوم‌های آبی بسیار افزایش داده است (مزارعی و همکاران، ۱۳۹۴). به طوری که میزان رهائش سالیانه نانوذرات تیتانیوم دی اکسید به زیست‌بوم‌های آبی ۱۵۶۰۰ تن برآورد شده است (Keller و Lazareva، ۲۰۱۳). هم‌چنین از نانوذرات تیتانیوم دی اکسید در تصفیه هوا، تصفیه آب، مواد ضدباکتریایی، مواد خود تمیزشونده و ... استفاده می‌گردد (Hashimoto و همکاران، ۲۰۰۵). نتایج تحقیقات نشان داده است که نانوذره تیتانیوم دی اکسید به دلیل انتشار به محیط‌های آبی همواره به‌عنوان یک خطر بالقوه برای موجودات زنده آبی به‌شمار می‌روند و سازوکار سمیت این نانوذره و سایر نانوذرات هم‌چنان مبهم باقی مانده است. گورخرماهی به دلیل داشتن ویژگی‌های منحصر به فرد از جمله اندازه کوچک، هزینه‌های پایین نگهداری، رشد سریع، زمان کوتاه تولید مثل یا ازدیاد نسل به‌عنوان یک گونه با ارزش در تحقیقات علمی دنیا مورد استفاده می‌گیرد (Lin و Sumanas، ۲۰۰۴). هم‌چنین گورخرماهی به‌عنوان یک گونه مدل در بسیاری از مطالعات بافتی مورد استفاده قرار گرفته است (White و همکاران، ۲۰۰۸). آسیب شناسی بافتی ماهی قسمت اصلی نشانگرهای زیستی مورد استفاده در پایش بوم‌سازگان آبی را تشکیل داده است. این روش وسیله‌ای برای شناسایی اثرات حاد و مزمن آلاینده‌های گوناگون در مواجهه با بافت‌ها و اندام‌های خاص است (Gernhöfer و همکاران، ۲۰۰۱). آبشش یکی از مهم‌ترین و اولین اندام‌هایی است که بیش‌ترین آسیب را از آلاینده‌ها می‌بیند. تحقیقاتی که در مورد اثرات پاتولوژیکی نانوذرات بر گونه‌های مختلف ماهی‌ها انجام شده است، نشان داده‌اند که نانوذرات دارای

اثرات زیان‌باری بر روی آبشش ماهی‌ها می‌باشند (راکی و همکاران، ۱۳۹۵). کبد اندامی است که متابولیسم اولیه مواد غیرزیستی را انجام می‌دهد و گاهی با تغییر در ساختار ریخت‌شناسی مواد غیرزیستی، آن‌ها را سم‌زدایی می‌نماید (Gesto و همکاران، ۲۰۰۸). از این‌رو ارزیابی آسیب‌های بافتی کبد، روشی دقیق و مطمئن جهت بررسی آلاینده‌ها در محیط و شرایط آزمایشگاهی می‌باشد و در بیش‌تر موارد ضایعات بافت‌شناسی کبد در مطالعات سم‌شناسی به‌عنوان یک نشانگر آلودگی محیط‌زیست مورد بررسی قرار می‌گیرد (Dabrowska و همکاران، ۲۰۱۲). روده نقش به‌سزایی در هضم، جذب مواد مغذی و حفظ هموستاز ایمنی بر عهده دارد (محمدی و همکاران، ۱۳۹۵). تاکنون پژوهش‌هایی در مورد اثرات نانوذرات تیتانیوم دی اکسید بر بافت‌های آبشش و کبد ماهیان صورت گرفته است و آسیب‌هایی نظیر هایپرپلازی، ادم، افزایش تعداد سلول‌های پوششی، چسبیدگی لاملا، ضخیم شدن لاملا و جدا شدن اپیتلیوم لاملا در بافت آبشش ماهیان و تغییر در سلول‌های لیپیدی کبد و پیکنوز هسته، واکوله شدن سیتوپلاسم، آپاپتوز، نکروز جسم سلولی و هسته در بافت کبد ماهیان در مواجهه با نانوذرات تیتانیوم دی اکسید گزارش شده است (Miranda و همکاران، ۲۰۱۶؛ Hao و همکاران، ۲۰۰۹؛ Perera و Pathiratne، ۲۰۱۲). برخلاف مطالعات وسیعی که در مورد اثرات آسیب‌شناسی بافتی نانوذرات مختلف بر بافت‌های آبشش و کبد ماهیان صورت گرفته است، این مطالعات در مورد بافت روده و دستگاه گوارش کم‌تر مورد توجه قرار گرفته است (Mansouri و همکاران، ۲۰۱۷). به‌علاوه، پژوهش‌های اندکی در زمینه مقایسه اثرات نانوذرات از جمله نانوذرات تیتانیوم دی اکسید با حالت درشت ذرات آن‌ها انجام شده است (Shaw، ۲۰۱۱). از آنجایی که نانوذرات مهندسی شده دارای خواص متفاوتی نسبت به هم‌تایان خود در حالت درشت ذرات هستند، به‌عنوان مثال داشتن سطح بسیار بزرگ‌تر نسبت به حجم با توجه به کاهش اندازه ذرات، سمیت بالقوه این مواد برای موجودات زنده افزایش می‌یابد (Al-Subiai و همکاران، ۲۰۱۲). بنابراین، انجام مطالعات مقایسه‌ای بین نانوذرات و درشت ذرات آن‌ها به دلیل داشتن ویژگی‌های ذاتی گوناگون بسیار حایز اهمیت می‌باشد، زیرا این ویژگی‌ها می‌توانند به‌طور مستقیم با سمیت آن‌ها مرتبط باشند (Hao و همکاران، ۲۰۱۳). از این‌رو، در پژوهش حاضر اثرات مزمن نانوذرات سنتز شده تیتانیوم دی اکسید در مقایسه با درشت ذرات آن بر بافت‌های آبشش، کبد و روده گورخر ماهی بررسی گردیده است.



مواد و روش‌ها

ماهی و تیمار ماهی: تعداد ۱۵۰ قطعه گورخرماهی بالغ با میانگین وزنی 3 ± 0.5 گرم و میانگین طولی 3 ± 0.1 سانتی‌متر از کارگاه پرورش و تکثیر ماهیان زینتی خریداری شد. ماهی‌ها جهت سازگاری با محیط حدود ۱۰ روز در مخزن فایبرگلاس ۵۰۰ لیتری با هوادهی و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی جهت سازگاری با شرایط آزمایشگاهی قرار گرفتند و تحت دمای 28 ± 2 درجه سانتی‌گراد، میانگین اکسیژن محلول ۸ میلی‌گرم در لیتر، 7.2 ± 0.4 pH و هوادهی مناسب نگهداری شدند. بعد از سازگاری، ماهی‌ها به ظروف (پلی اتیلنی) انتقال یافتند. در این پژوهش ۴ تیمار (شامل غلظت‌های ۱ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر از نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید و غلظت‌های ۱ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر از درشت ذرات تیتانیوم دی‌اکسید در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت (در مجموع ۱۲ ظرف پلی اتیلنی). هم‌چنین سه ظرف نیز به‌عنوان شاهد با شرایطی کاملاً مشابه تیمارها (اما بدون آلاینده) در نظر گرفته شد. تعویض آب ماهی‌ها در شرایط ساکن، تجدید هر ۴۸ ساعت یک‌بار انجام گردید (Schrand و همکاران، ۲۰۰۸). گورخرماهی‌ها به مدت ۳۰ روز در تیمارها قرار گرفتند و در طی این مدت با غذای زنده آرتمیا روزی یک‌بار به حد سیری تغذیه شدند. پس از پایان دوره ۳۰ روزه، از بافت‌های آبشش، کبد و روده حداقل سه ماهی به‌طور تصادفی نمونه برداری و نمونه‌ها در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شدند. سپس مراحل مختلف آنگیری با سری افزایشی اتانول (۸۰، ۹۰، ۹۷ و ۱۰۰ درصد)، شفاف‌سازی با گزلول، پارافینه کردن، قالب‌گیری و برش به‌وسیله دستگاه میکروتوم انجام شد. پس از انجام این مراحل، نمونه‌ها به‌وسیله روش رنگ‌آمیزی کلاسیک (هماتوکسیلین-ائوزین) رنگ‌آمیزی شدند (Gaber، ۲۰۰۷). از بافت آبشش و کبد هر ماهی ۳ اسلاید با ضخامت ۵ میکرون تهیه گردید و در انتها اسلایدها به‌منظور بررسی ناهنجاری‌های بافتی ایجاد شده به‌وسیله میکروسکوپ نوری Nikon مجهز به مانیتور و دوربین عکاسی براساس روش نیمه‌کمی مورد بررسی قرار داده شدند (Roy و همکاران، ۲۰۱۳).

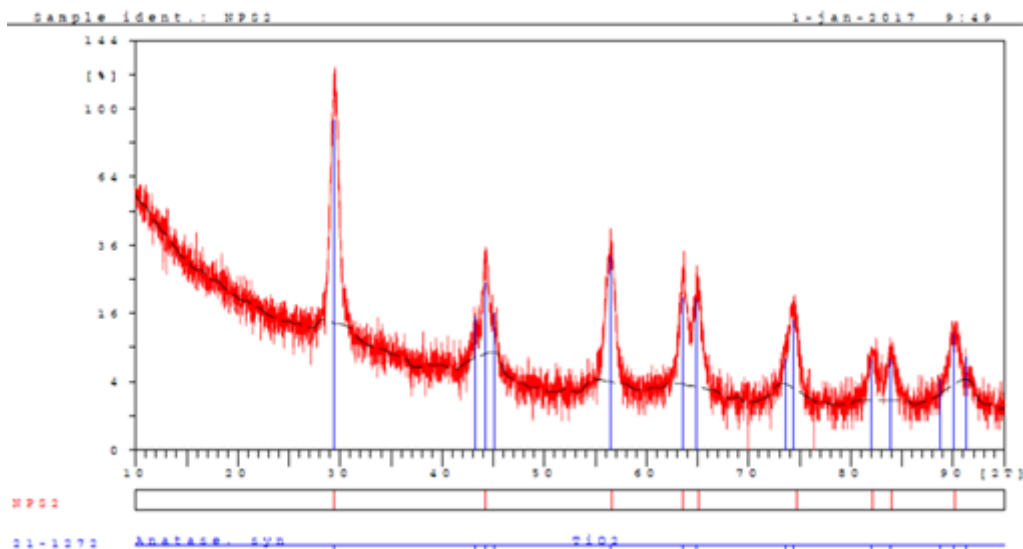
مواد شیمیایی: درشت‌ذرات تیتانیوم دی‌اکسید و هم‌چنین تیتانیوم تتراایزوپروپوکساید (Titanium tetraisopropoxide) و اسیداستیک از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. سپس نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید به‌روش سل‌وژل تولید گردیدند (Venkatachalam و همکاران، ۲۰۰۷). ابتدا مقدار ۱۸ میلی‌لیتر تیتانیوم تتراایزوپروپوکساید در داخل یک بشر

ریخته‌شد. بشر در حمام یخ قرار داده شد و به آن مقدار $35/8$ میلی‌لیتر استیک اسید بدون آب به‌صورت یک‌جا اضافه گردید. سپس ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر در طی یک‌ساعت به‌صورت قطره قطره همراه با بهم خوردن سریع محتویات بشر به آن اضافه شد و به‌مدت پنج ساعت هم زده شد. محلول شفاف حاصل به‌مدت ۱۲ ساعت در حرارت 70 درجه سانتی‌گراد و پس از آن به‌مدت ۱۲ ساعت در دمای 100 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از خشک شدن، جامد حاصله پودر شده و درون کوره با دمای 500 درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ ساعت کلسینه شد. پس از آماده‌سازی نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید آنالیز پراش اشعه ایکس با زاویه 5 تا 70 درجه به‌منظور بررسی حالت بلوری، تعیین فاز و هم‌چنین میزان ناخالصی موجود در نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید سنتز شده انجام گرفت. الگوی XRD به‌وسیله آنالیز X-ray (مدل دستگاه: X'Pert MPD، شرکت سازنده: فیلیپس) در آزمایشگاه اشعه ایکس دانشگاه تربیت مدرس انجام شد (شکل ۱) و برای بررسی مورفولوژی سطح، شکل و اندازه نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید و هم‌درشت ذرات آن تصاویر میکروسکوپ الکترونی به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) (مدل دستگاه: TESCAN Vega، شرکت سازنده: TESCAN, USA) در پژوهشگاه مهندسی شیمی ایران انجام شد (شکل ۲ و ۳). سائز ذرات با استفاده از برنامه Microstructure Mesurment محاسبه گردید. قبل از اضافه نمودن نانوذرات به ظروف تیمار، محلول استوک اولیه آن به‌مدت نیم ساعت به‌وسیله دستگاه فراصوت (مدل S300، شرکت سازنده QSonica) اولتراسونیک شد.

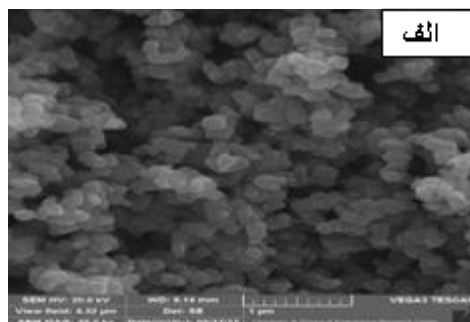
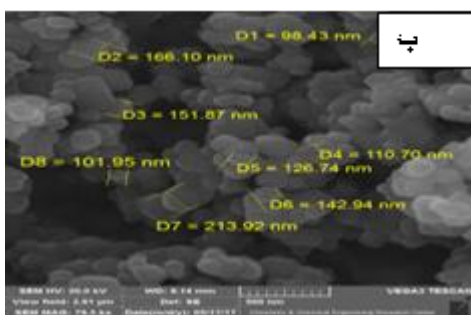
نتایج

با توجه به شکل ۱، فاز نانوذرات سنتز شده آنتاز می‌باشد. در این طیف، همان‌طور که با خطوط مرجع نشان داده شده، تمام سیگنال‌ها در هم‌خوانی با خطوط آنتاز یعنی TiO_2 می‌باشد. بنابراین چون هیچ سیگنالی در طیف نیست که با خطوط مرجع آنتاز نتوان آن را توضیح داد، می‌توان با اطمینان گفت ترکیب نانوذرات خالص است. با توجه به تصاویر مربوط به میکروسکوپ الکترونی روبشی می‌توان دریافت که ذرات کروی شکل درشت ذرات تیتانیوم دی‌اکسید با میانگین سائز ذرات 157 ± 10 نانومتر می‌باشد (شکل ۲) و با توجه به شکل ۳ میانگین ذرات کروی شکل نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید 40 ± 5 نانومتر است.

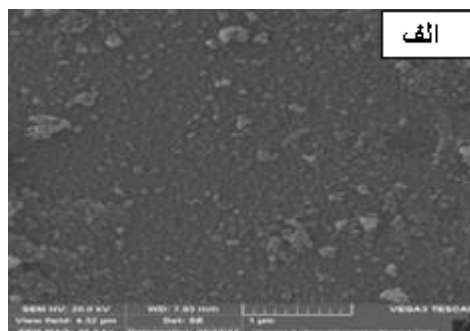
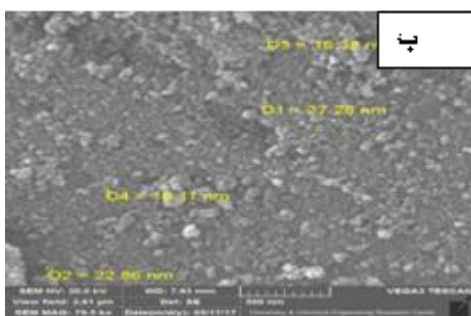




شکل ۱: آنالیز پراش اشعه ایکس نانوذرات تیتانیوم دی اکسید



شکل ۲: تصویر SEM درشت ذرات تیتانیوم دی اکسید (الف) ۱ میکرون، (ب) ۵۰۰ نانومتر



شکل ۳: تصویر SEM نانوذرات تیتانیوم دی اکسید (الف) ۱ میکرون، (ب) ۵۰۰ نانومتر

آن، ماهی ها تمایل به جمع شدن در اطراف سنگ هوا داشتند. اشکال ۱۱ و ۱۴ به ترتیب بافت های سالم آبشش، کبد و روده گورخر ماهی را نشان می دهند. انواع عارضه های مشاهده شده و شدت آن ها در

در این آزمایش ماهی ها با قرارگیری در برابر دو ماده درشت ذرات و نانوذرات تیتانیوم دی اکسید، دارای واکنش های متفاوتی نسبت به گروه شاهد بودند. در نانوذرات تیتانیوم دی اکسید و درشت ذرات



است. طبق نتایج حاصله آبخش، کبد و روده ماهی‌هایی که در معرض نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید قرار داشتند ناهنجاری‌های مختلف را به شکل شدیدتر از درشت ذرات آن نشان دادند. همچنین با افزایش غلظت در هر دو نوع ذرات آسیب‌های وارده بیش‌تر مشاهده شد.

غلظت‌های ۱ و ۱۰ میلی‌گرم برلیتر نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید و درشت ذرات تیتانیوم دی‌اکسید در بافت‌های آبخش، کبد و روده گورخر ماهی و شدت این عوارض در شکل‌های (۵-۱۰، ۱۲-۱۳ و ۱۵-۱۸) ارائه شده است و نتایج آن در جدول‌های (۳-۱) آورده شده

جدول ۱: آسیب‌های آبخش گورخر ماهی در مواجهه با نانوذرات و درشت ذرات تیتانیوم دی‌اکسید در طی ۳۰ روز (غلظت‌های ذرات برحسب میلی‌گرم برلیتر)

عوارض	گروه شاهد	درشت ذرات تیتانیوم دی‌اکسید	درشت ذرات تیتانیوم دی‌اکسید	نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید	نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید
به هم چسبیدگی لاملا	-	+	++	++	+++
هایپرپلازی	-	+	++	+++	++++
انحنای لاملا	-	+	++	+++	++++
پرخونی	-	-	+	+++	++++
جداشدن اپیتلیوم	-	++	++	+++	+++
ادم	-	+	++	+++	+++
هایپرتروفی و افزایش حجم گلبول‌های قرمز هسته غضروفی	-	+	++	+++	++++

** عدم مشاهده عارضه (-)، خفیف (+)، متوسط (++)، زیاد (+++)، شدید (++++)

جدول ۲: آسیب‌های کبد گورخر ماهی در مواجهه با نانوذرات و درشت ذرات تیتانیوم دی‌اکسید در طی ۳۰ روز (غلظت‌های ذرات برحسب میلی‌گرم برلیتر)

عوارض	گروه شاهد	درشت ذرات تیتانیوم دی‌اکسید	درشت ذرات تیتانیوم دی‌اکسید	نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید	نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید
پرخونی و افزایش قطر سینوزوئیدها	-	+	++	+++	++++
واکنش شدن سیتوپلاسم	-	+++	+++	+++	++++
افزایش مراکز ملانوماکروفاژ	-	+	++	+++	++++
تخریب هیاتوسیت‌ها	-	+	++	+++	++++

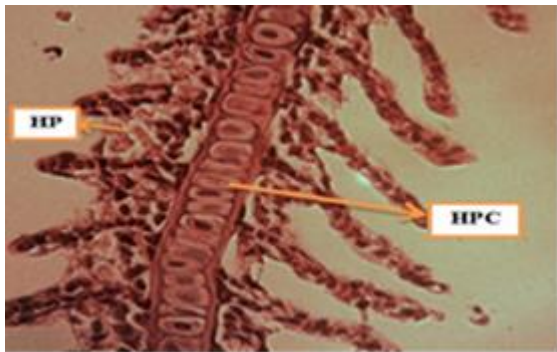
** عدم مشاهده عارضه (-)، خفیف (+)، متوسط (++)، زیاد (+++)، شدید (++++)

جدول ۳: آسیب‌های روده گورخر ماهی در مواجهه با نانوذرات و درشت ذرات تیتانیوم دی‌اکسید در طی ۳۰ روز (غلظت‌های ذرات برحسب میلی‌گرم برلیتر)

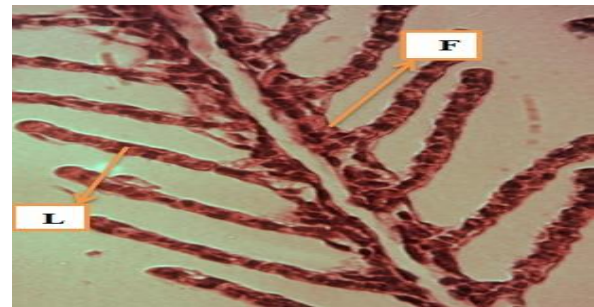
عوارض	گروه شاهد	درشت ذرات تیتانیوم دی‌اکسید	درشت ذرات تیتانیوم دی‌اکسید	نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید	نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید
جداشدن اپیتلیوم	-	+	++	++	+++
تورم سلول‌های جامی	-	+	+	+++	++++
افزایش تعداد سلول‌های جامی	-	+	+	+++	++++
پرخونی	-	-	-	++	+++
نکروز	-	-	-	+	++

** عدم مشاهده عارضه (-)، خفیف (+)، متوسط (++)، زیاد (+++)، شدید (++++)

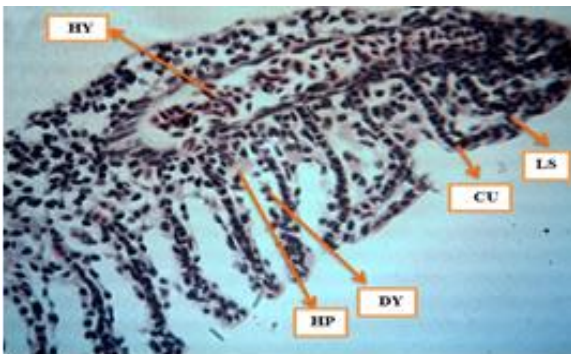




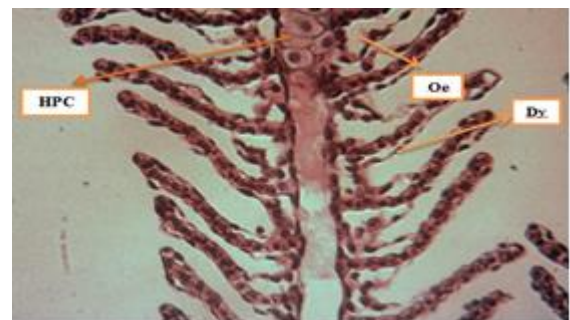
شکل ۷: بافت آبشش گورخرماهی در معرض نانوذرات تیتانیوم دی اکسید با غلظت ۱۰ میلی گرم برلیتر، HPC: هایپر تروفی و افزایش حجم گلبول‌های قرمز هسته غضروفی، HP: هایپر پلازی (×۴۰۰)



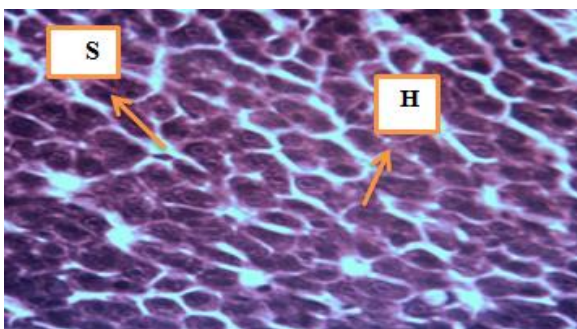
شکل ۴: بافت آبشش سالم گورخرماهی، F: فیلامنت، L: لاملا (×۴۰۰)



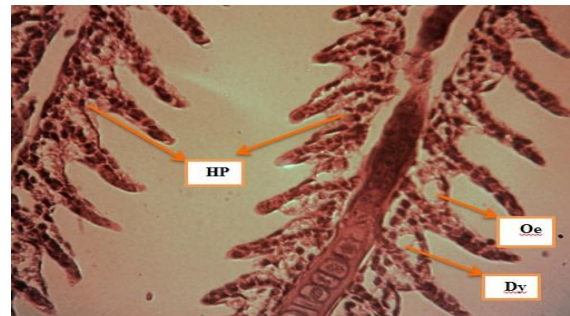
شکل ۸: بافت آبشش گورخرماهی در معرض نانوذرات تیتانیوم-دی اکسید با غلظت ۱۰ میلی گرم برلیتر، LS: به هم چسبیدگی لاملاها، DY: جدا شدن اپیتلیوم، HY: پر خونی، HP: هایپر پلازی، CU: انحنای لاملا (×۴۰۰)



شکل ۵: بافت آبشش گورخرماهی در معرض ذرات تیتانیوم دی اکسید با غلظت ۱۰ میلی گرم برلیتر، Dy: جدا شدن اپیتلیوم، Oe: ادم، HPC: هایپر تروفی و افزایش حجم گلبول‌های قرمز هسته غضروفی (×۴۰۰)

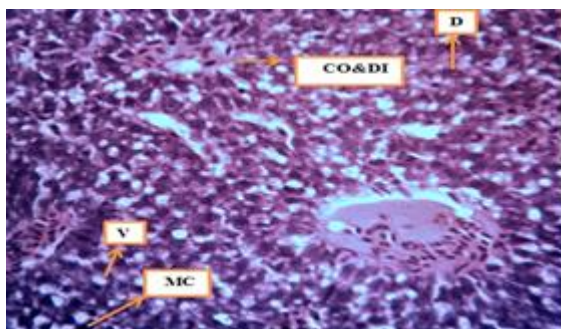


شکل ۹: بافت سالم کبد گورخرماهی، H: سلول‌های هیپاتوسیت، S: سینوزوئید (×۴۰۰)

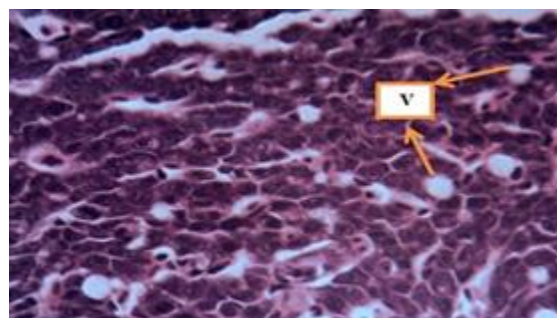


شکل ۶: بافت آبشش گورخرماهی در معرض ذرات تیتانیوم دی اکسید با غلظت ۱۰ میلی گرم برلیتر، HP: هایپر پلازی، Dy: جدا شدن اپیتلیوم، Oe: ادم (×۴۰۰)

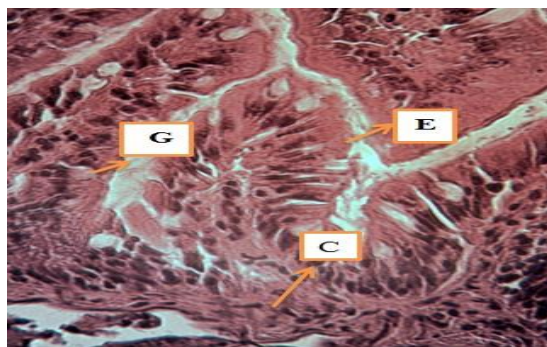




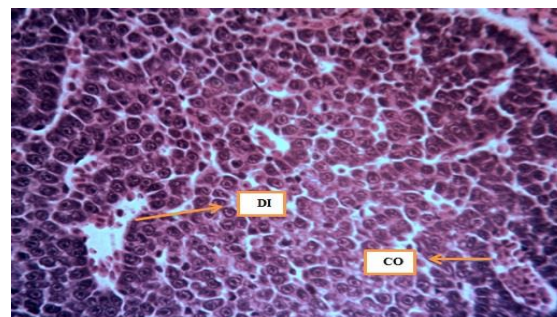
شکل ۱۳: بافت کبد گورخرماهی در معرض نانوذرات تیتانیوم دی اکسید ۱۰ میلی گرم برلیتر، V: واکنش سیتوپلاسم، D: تخریب شدن هیپاتوسیت‌ها، CO&DI: افزایش قطر سینوروئیدها و پرخونی، MC: افزایش مراکز ملانوماکروفاژ (×۴۰۰)



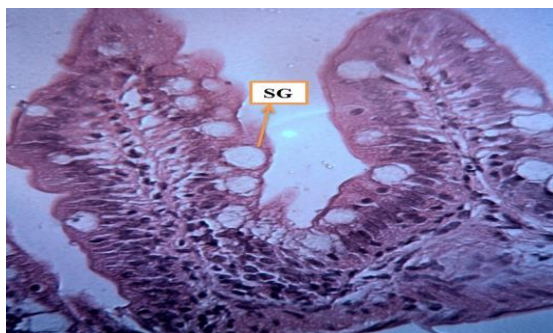
شکل ۱۰: بافت کبد گورخرماهی در معرض ذرات تیتانیوم-دی اکسید با غلظت ۱ میلی گرم برلیتر، V: واکنش سیتوپلاسم (×۴۰۰)



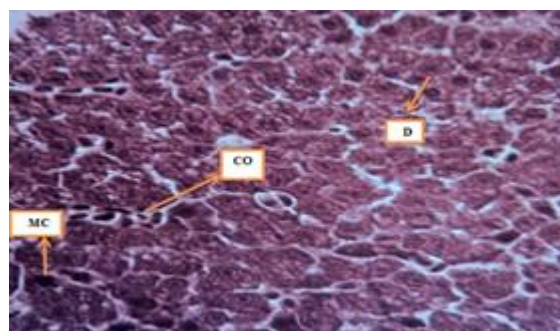
شکل ۱۴: بافت سالم روده گورخرماهی، G: سلول جامی طبیعی، E: بافت اپیتلیوم سالم، C: بافت همبند (×۴۰۰)



شکل ۱۱: بافت کبد گورخرماهی در معرض ذرات تیتانیوم-دی اکسید با غلظت ۱۰ میلی گرم برلیتر، DI: افزایش قطر سینوروئیدها، CO: پرخونی (×۴۰۰)



شکل ۱۵: بافت روده گورخرماهی در معرض ذرات تیتانیوم دی اکسید با غلظت ۱ میلی گرم برلیتر، SG: تورم سلول‌های جامی (شکل (×۴۰۰))

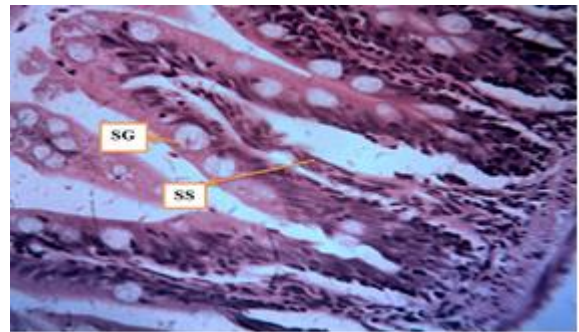


شکل ۱۲: بافت کبد گورخرماهی در معرض نانوذرات تیتانیوم دی اکسید با غلظت ۱ میلی گرم برلیتر، D: تخریب شدن هیپاتوسیت‌ها، CO: پرخونی، MC: افزایش مراکز ملانوماکروفاژ (×۴۰۰)

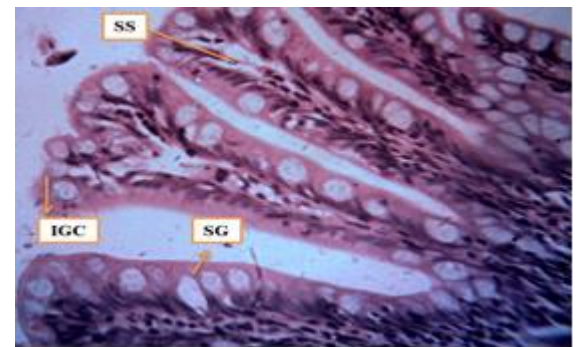
بحث

استفاده گسترده از نانوذرات در دهه اخیر، احتمال ورود این مواد را به بوم‌سازگان آبی افزایش داده است. تغییرات بافتی آبزیان یکی از بهترین روش‌هایی است که می‌توان میزان آلودگی محیط‌های آبی و اثرات خطرناک آن را بر بافت‌های مختلف بدن آن‌ها بررسی نمود (محمدزاده‌باران و همکاران، ۱۳۸۸).

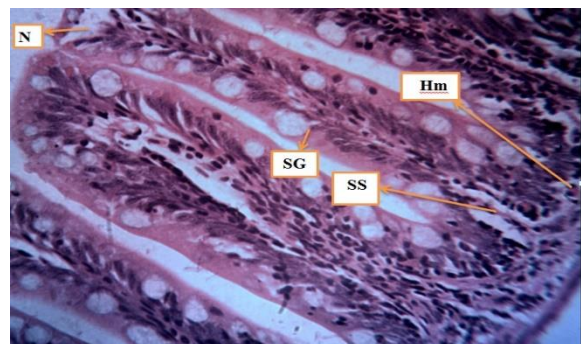
آبشش ماهی، نخستین اندام هدف آلاینده‌ها است و به دلیل داشتن ارتباط مستقیم با آلاینده‌ها می‌تواند نشانگر مناسبی برای آلودگی آب‌ها باشد (Evans و همکاران، ۲۰۰۵) و Al-Bairuty و همکاران (۲۰۱۳) بیان کردند که آبشش، حساس‌ترین نقطه در مواجهه با نانو ذرات تولید شده است. آلاینده‌های موجود در محیط قدرت ایجاد تغییر در ساختار ریخت‌شناسی و عملکردهای ضروری آبشش آبزیان را دارند. از جمله این تغییرات انحنای لاملا، به هم چسبیدگی لاملا، هایپرپلازی سلول‌های اپیتلیوم می‌باشد که در بافت آبشش ماهیان در مواجهه با نانوذرات مشاهده شده است. ایجاد چنین آسیب‌هایی فضای تماس آلاینده‌ها با سیستم عروقی بافت آبشش را افزایش می‌دهد و منجر به اختلال در تنفس و سلامت ماهی می‌گردد (Subashkumar و Selvanayagam، ۲۰۱۴). براساس نتایج به دست آمده از این پژوهش، آسیب‌هایی نظیر به هم چسبیدگی لاملا، هایپرپلازی، جدا شدن اپیتلیوم، انحنای لاملا، ادم، هایپرتروفی و افزایش حجم گلبول‌های قرمز هسته غضروفی در همه تیمارهای نانوذرات و درشت ذرات تیتانیوم دی‌اکسید دیده شد که با افزایش غلظت شدت آن‌ها افزایش یافت، اما شدت عوارضی هم‌چون جدا شدن اپیتلیوم لاملا، ادم، انحنای لاملا، هایپرتروفی و افزایش حجم گلبول‌های قرمز هسته غضروفی و هایپرپلازی در تیمارهای نانوذرات نسبت به درشت ذرات تیتانیوم دی‌اکسید بیش‌تر بود. این احتمال وجود دارد که نانوذرات به دلیل اندازه کوچک‌تر نسبت به درشت ذرات خود با سرعت بیشتری بتوانند از غشای موکوسی لایه آبشش عبور کنند (جوهری، ۱۳۹۰). در بررسی‌های پژوهشگران آمده است که تغییراتی نظیر هایپرپلازی، هایپرتروفی در سلول‌های اپیتلیوم و انحنای و چسبیدگی لاملا نوعی ساز و کار دفاعی هستند و به‌طور کلی این عوارض منجر به افزایش فاصله بین محیط خارجی و خون می‌شوند و در نتیجه به‌عنوان مانعی برای ورود آلاینده می‌باشند (Liebel و همکاران، ۲۰۱۳). پرخونی نوعی ساز و کار دفاعی است که از ایجاد عوارض در بافت آبشش در برابر ورود آلاینده‌ها جلوگیری می‌کند و یکی از علل ایجاد پرخونی



شکل ۱۶: بافت روده گورخر ماهی در معرض درشت ذرات تیتانیوم دی‌اکسید با غلظت ۱۰ میلی‌گرم برلیتر، SS: جدا شدن اپیتلیوم، SG: تورم سلول‌های جامی شکل (۴۰۰×)



شکل ۱۷: بافت روده گورخر ماهی در معرض نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید با غلظت ۱ میلی‌گرم برلیتر، IGC: افزایش تعداد سلول جامی شکل، SS: جدا شدن اپیتلیوم، SG: تورم سلول‌های جامی (۴۰۰×)



شکل ۱۸: بافت روده گورخر ماهی در معرض نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید با غلظت ۱۰ میلی‌گرم برلیتر، N: نکروز، SG: تورم سلول جامی شکل، HM: پرخونی، SS: جدا شدن اپیتلیوم (۴۰۰×)

ذرات بیش تر از درشت ذرات بود. در این مطالعه پرخونی و افزایش قطر سینوزوئیدها در هر دو تیمار نانوذرات تیتانیوم دی اکسید نسبت به تیمار درشت ذرات آن شدیدتر بود. پرخونی اغلب در سیاهرگ باب کبدی و گاهی در سیاهرگ های کوچک و سینوزوئیدی کبدی ایجاد می شود (Hinton و Di Giulio, ۲۰۰۸). افزایش قطر سینوزوئیدها در بافت کبد ناشی از قرارگیری در معرض آلاینده ها است که در این حالت فضای سینوزوئیدی عریض تر و تعداد گلبول های قرمز بیش تر می شود. این عارضه معمولاً همراه با ادم در فضای سینوزوئیدی، برای سمیت زدایی آلاینده ها ایجاد می گردد (Rodrigues و همکاران, ۲۰۱۰). از دیگر عوارض مشاهده شده در بافت کبد واکوئله شدن سیتوپلاسم بود که بیش ترین عوارض در غلظت ۱۰ میلی گرم برلیتر نانوذرات تیتانیوم دی اکسید مشاهده شد. هم چنین افزایش مراکز ملانوماکروفاژ و تخریب هپاتوسیت ها در تیمار نانوذرات با شدت بیش تری مشاهده گردید. افزایش مراکز ملانو ماکروفاژ به دلیل استرس ناشی از آلاینده ها ایجاد می شود که نوعی ایمنی غیر اختصاصی بوده و در حفاظت از بافت کبد نقش دارد (Suresh, ۲۰۰۹).

دستگاه گوارش به دلیل نقش قابل ملاحظه در هضم و جذب مواد غذایی، در مطالعات بافت شناسی دارای اهمیت می باشد (محمدی و همکاران, ۱۳۹۵). در مطالعه Mansouri و همکاران (۲۰۱۷) نشان داده شد که قرارگیری قزل آلائی رنگین کمان در معرض غلظت های ۱، ۰/۵ و ۰/۱ میلی گرم برلیتر نانوذرات تیتانیوم دی اکسید به مدت ۱۴ روز منجر به ایجاد آسیب های روده ای به ویژه در غلظت های بالا شامل تخریب پرزها، فیوژن و واکوئله شدن موکوس روده گردید. نانوذرات تیتانیوم دی اکسید می توانند باعث القا استرس شده و منجر به ته نشینی نانوذرات در لومن روده ماهیان و آسیب به آن گردند (Federici و همکاران, ۲۰۰۷). در این پژوهش افزایش تعداد سلول های جامی در تیمار نانوذرات تیتانیوم دی اکسید نسبت به درشت ذرات تیتانیوم دی اکسید با شدت بیش تری مشاهده شد. هم چنین تورم سلول های جامی در تمام تیمارهای تیتانیوم دی اکسید مشاهده گردید. این عوارض نوعی سازی و کار دفاعی سلول در برابر ورود آلاینده ها به درون سلول هستند (Suganthi و همکاران, ۲۰۱۵). به عبارت دیگر افزایش سلول های جامی منجر به حفاظت اپیتلیوم روده در برابر آلاینده ها و تسهیل انتقال مواد غذایی می شود (Carrason و همکاران, ۲۰۰۶). از دیگر آسیب های مشاهده شده در بافت روده گورخر ماهی نکرور بود که تنها در تیمار نانوذرات تیتانیوم دی اکسید و با شدت بیش تری در غلظت ۱۰ میلی گرم برلیتر نانوذرات تیتانیوم دی اکسید

گشاد شدن رگ ها و افزایش جریان خون به درون فیلامنت های آبششی است (اقدامی و همکاران, ۱۳۹۲). هم چنین هایپرپلاژی و تکثیر غیرطبیعی سلول های اطراف لاملا موجب کاهش فضای بین لاملا و در نهایت باعث ایجاد حالت چسبیدگی در بافت آبشش می گردد (Fracácio و همکاران, ۲۰۰۳). در مطالعه صورت گرفته توسط Miranda و همکاران (۲۰۱۶) در اثر مواجهه با نانوذرات تیتانیوم دی اکسید در غلظت های ۰/۱، ۱، ۱۰ میکروگرم درلیتر در بافت آبشش بچه ماهی (*Prochilodus lineatus*) آسیب هایی نظیر ادم، هایپرپلاژی و چسبیدگی لاملاها مشاهده شد که این آسیب ها همانند مطالعه حاضر، وابسته به غلظت نانوذرات بوده است. به علاوه، نتایج کارهای صورت گرفته به وسیله Hao و همکاران (۲۰۰۹) نشان داد که نانوذرات تیتانیوم دی اکسید در آبشش بچه ماهی کپور سبب ایجاد آسیب هایی از قبیل ضخیم شدن رشته و لاملا و ادم در بافت آبشش شده است. هم چنین مطالعه دیگری نشان داده است که نانوذرات تیتانیوم دی اکسید در کپور معمولی سبب تغییرات فیزیولوژیک غیرطبیعی و تغییرات رفتاری، ادم و هایپرپلاژی در لاملاهای آبششی و تغییر در ساختار و عملکرد آبشش می گردد.

کبد یکی از اندام های مهم در بدن ماهیان است که نقش اصلی آن تنظیم سوخت و ساز بدن و سم زدایی می باشد. تاکنون مطالعات بسیاری در زمینه پاسخ آسیب شناسی بافت کبد پس از برخورد با آلاینده ها انجام شده است. بررسی غلظت های ۱ و ۱۰ میلی گرم برلیتر نانوذرات تیتانیوم دی اکسید در مدت زمان (۰، ۷، ۱۴) روز بر بافت کبد تیلاپپای رود نیل (*Oreochromis niloticus*) نشان داد که نانو ذرات تیتانیوم دی اکسید باعث تغییرات آسیب شناسی بافتی در کبد نظیر پیکنوزیس هسته ای، واکوئله شدن سیتوپلاسم و آپاپتوز شامل نکرورز جسم سلولی و هسته می شود. نکرورز بسیار شدید در بافت کبد تیلاپپای رود نیل، نشان دهنده حساسیت بالای بافت کبد در برابر نانوذرات تیتانیوم دی اکسید می باشد و این نانوذرات می توانند از طریق سیستم گردش خون به بافت کبد نفوذ کنند (Pathiratne و Perera, ۲۰۱۲). هم چنین تغییرات ساختاری مانند نکرورز و آپاپتوز در بافت کبد ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) با نانوذرات تیتانیوم دی اکسید گزارش شده است (Hao و همکاران, ۲۰۰۹). در مطالعه حاضر نیز هر دو ترکیب نانوذرات و درشت ذرات منجر به بروز آسیب های بافتی در کبد گورخر ماهی شدند. شدت عوارض در بافت کبد مشابه بافت آبشش با افزایش غلظت این مواد در آب افزایش یافت. اما با توجه به نتایج به دست آمده، به نظر می رسد که تاثیر نانو



و ژنومی ماهی قزل‌آلا رنگین کمان. پایان‌نامه دکترا گروه منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس. ۱۶۰ صفحه.

۳. راکي، م.؛ پيكان حيرتي، ف. و درافشان، س.، ۱۳۹۵. تغييرات آسيب‌شناسي بافت آبشش و كبد عروس ماهي زاینده‌رود (*Petroleuciscus esfahani*) پس از مواجهه با نانوذرات نقره و نیترات نقره محلول در آب. نشریه پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی. سال ۴، شماره ۴، صفحات ۷۹ تا ۹۵.

۴. مزارعی، س.؛ سجادی، م.م.؛ سوری‌نژاد، ا.؛ جوهری، س.ع. و اسدی، م.، ۱۳۹۶. تعیین غلظت کشنده نانو نقره در ماهی گورخری معمولی (*Aphanius dispar* Rüppell). مجله بوم‌شناسی آبریان. سال ۴، شماره ۴، صفحات ۱۱۰ تا ۱۱۵.

۵. محمدزاده‌باران، س.؛ وثوقی، غ.؛ ماشینیان‌مرادی، ع.؛ عباسی، ف. و قوام‌مصطفوی، پ.، ۱۳۸۸. بررسی اثر غلظت‌های گوناگون کلرید جیوه بر بافت عضلانی ماهی کلمه دریای خزر (*Rutilus rutilus*) در شرایط آزمایشگاهی. فصلنامه علمی پژوهشی زیست‌شناسی جانوری. سال ۱، شماره ۴، صفحات ۴۱ تا ۵۰.

۶. محمدی، خ.؛ محمدی‌آذرم، ح.؛ سلاطی، ا.پ. و رجب‌زاده قطرمی، ا.، ۱۳۹۵. اثر سطوح مختلف نیاسین در جیره بر بافت شناسی کبد، روده و فعالیت برخی آنزیم‌های کبدی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). مجله منابع طبیعی ایران. دوره ۹، شماره ۲، صفحات ۲۵۳ تا ۲۶۳.

۷. Abdel-Khalek, A.A.; Kadry, M.; Hamed, A. and Marie, M.A., 2015. Ecotoxicological Impacts of Zinc Metal in Comparison to its Nanoparticles in Nile tilapia; (*Oreochromis niloticus*). The Journal of Basic and Applied Zoology. Vol.72, pp: 113-125.

۸. Al-Bairuty, G.A., 2013. Histopathological Effects of Metal and Metallic Nanoparticles on the Body Systems of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Ph. D Thesis, School of Biomedical and Biological Sciences, University of Plymouth. 319 p.

۹. Al-Subiai, S.N.; Arlt, V.M.; Frickers, P.E.; Readman, J.W.; Stolpe, B.; Lead, J.R.; Moody, A.J. and Jha, A.N., 2012. Merging nano-Genotoxicology with Eco Genotoxicology: An Integrated Approach to Determine Interactive Genotoxic and Sub-Lethal Toxic Effects of C60 Fullerenes and Fluoranthene in Marine Mussels, *Mytilus* sp. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. Vol. 745, No.1, pp: 92-103.

۱۰. Carrasson, M.; Grau, A.; Dopazo, L.R. and Crespo, S.A., 2006. Histological, Histochemical and Ultrastructural Study of the Digestive Tract of *Dentex dentex* (Pisces,

مشاهده گردید. هم‌چنین Cengiz و همکاران (۲۰۰۱) آسیب‌هایی نظیر ادم، انحطاط بافت روده، تجمع لنفوسیت در آستر روده، حالت پکتوتیک در هسته و نکروز در بافت روده ماهی (*Gambusia affinis*) را در مواجهه با اندوسولفان گزارش کردند. پرخونی بافت روده نیز تنها در تیمار نانوذرات تیتانیوم دی اکسید دیده شد که این مشاهده حاکی از سمیت بیش‌تر نانوذرات در مقایسه با درشت ذرات در بافت روده گورخر ماهی است.

طبق نتایج پژوهش حاضر، مقایسه بین تیمار نانوذرات و درشت ذرات نشان داد که علی‌رغم تفاوت نسبتاً اندک بین اندازه دو نوع ذره در این مطالعه، در تیمارهای نانوذرات تیتانیوم دی اکسید به‌خصوص تیمار با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر آسیب‌های ایجاد شده در بافت آبشش، کبد و روده گورخر ماهی نسبت به درشت ذرات تیتانیوم دی اکسید شدیدتر می‌باشد. طبق مطالعات انجام شده، نانوذرات به دلیل اندازه کوچک‌تر و واکنش سطح بیش‌تر، توانایی نفوذ و تجمع بیش‌تری به درون سلول‌های موجودات زنده را دارند (Ispas و همکاران، ۲۰۰۹). این یافته‌ها مطابق نتایج مطالعه Abdel-Khalek و همکاران (۲۰۱۵) در زمینه مقایسه بین اثرات سمی نانوذرات اکسیدروی و درشت ذرات آن در تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) می‌باشد که در آن مطالعه نشان داده شد که سمیت نانوذرات اکسیدروی نسبت به درشت ذرات آن بیش‌تر بود. به‌طور کلی با توجه به نتایج به‌دست آمده به‌نظر می‌رسد که نانوذرات نسبت به حالت درشت ذرات خود تهدید جدی‌تری برای بوم‌سازگان بوده و وجود مقدار اندک این نانوذرات در بوم‌سازگان آبی برای سلامت آبریزی چون ماهی خطرناک است. از این‌رو ایجاد روش‌های مناسب برای جلوگیری از ورود آلاینده‌ها از جمله نانوذرات به محیط‌های آبی ضروری به‌نظر می‌رسد. هم‌چنین اجرای پژوهش‌های وسیع‌تری در زمینه مقایسه اثرات سمیت سایر نانوذرات و درشت ذرات آن‌ها در آبریان پیشنهاد می‌گردد.

منابع

۱. اقدامی، م.؛ عربان، س. و نظر حقیقی، ف.، ۱۳۹۲. تغییرات در ساختار آبشش ماهی طلایی (*Carassius auratus*) در مواجهه نیمه مزمن با آلاینده‌های آلی. مجله فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبریان. سال ۱، شماره ۲، صفحات ۹۷ تا ۱۷۷.
۲. جوهری، ع.، ۱۳۹۰. کاربرد نانوذرات نقره در کاهش عفونت قارچی برانکوباسیون و قدرت آزادسازی تخم بر برخی از ویژگی‌های فیزیولوژیک



۲۱. **Hao, L.; Chen, L.; Hao, J. and Zhong, N., 2013.** Bioaccumulation and Sub acute Toxicity of Zinc Oxide Nanoparticles in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*): A Comparative Study with its Bulk Counterparts. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Vol. 91, pp: 52-60.
۲۲. **Hashimoto, K.; Irie, H. and Fujishima, A., 2005.** TiO₂ Photocatalysis a Historical Overview and Future Prospects. *Japanese Journal of Applied Physics*. Vol. 44, No. 12, pp: 8269-8285.
۲۳. **Ispas, C.; Andreescu, D.; Patel, A.; Goia, D.V.; Andreescu, S. and Wallace, K.N., 2009.** Toxicity and Developmental Defects of Different Sizes and Shape Nickel Nanoparticles in Zebrafish. *Environmental Science and Technology*. Vol. 43, No. 16, pp: 6349-6356.
۲۴. **Keller, A.A. and Lazareva, A., 2013.** Predicted Releases of Engineered Nanomaterials: From Global to Regional to Local. *Environmental Sciences and Technology Letter*. Vol. 1, pp: 65-70.
۲۵. **Liebel, S.; Tomotake, M.E.M. and Oliveira ribeiro, C.A., 2013.** Fish Histopathology as Biomarker to Evaluate Water Quality. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*. Vol. 8, pp: 9-15.
۲۶. **Mansouri, B.; Maleki, A.; Johari, S.A.; Shahmoradi, B.; Mohammadi, E. and Davari, B., 2017.** Histopathological Effects of Copper Oxide Nanoparticles on the Gill and Intestine of Common Carp (*Cyprinus carpio*) in the Presence of Titanium Dioxide Nanoparticles. *Chemistry and Ecology*. Vol. 33, No. 4, PP: 295-308.
۲۷. **Miranda, R.G.; Grötzner, S.R.; Voigt, C.L.; Campos, S.X.; Randi, M.A.F.; Oliveira ribeiro, C.A. and Filipakneto, F., 2016.** Effects of Realistic Concentrations of TiO₂ and ZnO Nanoparticles in *Prochilodus lineatus* Juvenile Fish. *Environmental Science and Pollution Research Int*. Vol. 23, pp: 5179-5188.
۲۸. **Perera, S. and Pathiratne, A., 2012.** Haemato immunological and Histological Responses in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* Exposed to Titanium Dioxide Nanoparticles. *Sri Lanka Journal of Aquatic Sciences*. Vol. 17, pp: 1-18.
۲۹. **Rodrigues, R.V.; Miranda-Filho, K.C.; Gusmao, E.P.; Moreira, C.B.; Romano, L.A. and Sampaio, L.A., 2010.** Deleterious Effects of Water-Soluble Fraction of Petroleum, Diesel and Gasoline on Marine Pejerrey *Odontesthes argentinensis* Larvae. *Science of the Total Environment*. Vol. 408, pp: 2054-2059.
۳۰. **Roy, D.; Ghosh, D. and Kumar Mandal, D., 2013.** Cadmium Induced Histopathology in the Olfactory Epithelium of a Snakehead Fish, *Punctatus* (Bloch). *Sparidae*. *Histology and Histopathology*. Vol. 21, pp: 579-593.
۱۱. **Cengiz, E.I.; Unlu, E. and Balci, K., 2001.** The Histopathological Effects of Thiodan on the Liver and Gut of Mosquitofish, *Gambusia affinis*. *Journal of Environmental Sciences Health B*. Vol. 36, No. 1, pp: 75-85.
۱۲. **Chen, J.; Dong, X.; Zhao, J. and Tang, G., 2009.** In Vivo Acute Toxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles to Mice after Intraperitoneal Injection. *Journal of Applied Toxicology*. Vol. 29, No. 4, pp: 330-337.
۱۳. **Di Giulio, R.T. and Hinton, D.E., 2008.** The Toxicology of Fishes. Taylor and Francis Group by CRC Press. New York. 1071 p.
۱۴. **Evans, D.H.; Piermarini, P.M. and Choe, K.P., 2005.** The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. *Physiological reviews*. Vol. 85, No. 1, pp: 97-177.
۱۵. **Fracácio, R.; Verani, N.F.; Espíndola, E.L.G.; Rocha, O.; Rigolin-Sá, O. and Andrade, C.A., 2003.** Alterations on Growth and Gill Morphology of *Danio rerio* (Pisces, Ciprinidae) Exposed to the Toxic Sediments. *Brazilian archives of Biology and Technology*. Vol. 46, No. 4, pp: 685-695.
۱۶. **Gaber, H.S., 2007.** Impact of Certain Heavy Metals on the Gill and Liver of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*. Vol. 11, No. 2, pp: 79-100.
۱۷. **Gao, Y.; Masuda, Y.; Seo, W.S.; Ohta, H. and Koumoto, K., 2004.** TiO₂ Nanoparticles Prepared Using an Aqueous Peroxotitanate Solution. *Ceramics International*. Vol. 30, No. ۷, pp: ۱۳۶۵-۱۳۶۸.
۱۸. **Gernhöfer, M.; Pawert, M.; Schramm, M.; Müller, E. and Triebkorn, R., 2001.** Ultrastructural Biomarkers as Tools to Characterize the Health Status of Fish in Contaminated Streams. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery Formerly Journal of Aquatic Ecosystem Health*. Vol. 8, No. 3, pp: 241-260.
۱۹. **Gesto, M.; Soengas, J.L. and Miguez, J.M., 2008.** Acute and Prolonged Stress Responses of Brain Monoaminergic Activity and Plasma Cortisol level in Rainbow trout are Modified by PAH Treatment. *Aquatic Toxicology*. Vol. 86, No. 3, pp: 341-351.
۲۰. **Hao, L.; Wang, Z. and Xing, B., 2009.** Effect of Sub acute Exposure to TiO₂ Nanoparticles on Oxidative Stress and Histopathological Changes in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Environmental Sciences*. Vol. 21, No. 10, pp: 1459-1466.



- International Journal of Aquatic Biology. Vol. 1, No. 5, pp: 221-227.
۳۱. **Schrand, A.M.; Braydich-Stolle, L.K.; Schlager, J.J.; Dai, L. and Hussain, S.M., 2008.** Can Silver Nanoparticles be Useful as Potential Biological Labels? *Nanotechnology*. Vol. 19, No. 23, pp: 45433-5707.
۳۲. **Shaw, B.J., 2011.** The Ecotoxicology of Engineered Nanoparticles to Freshwater Fish. Ph.D. Thesis, University of Plymouth. 325 p.
۳۳. **Subashkumar, S. and Selvanayagam, M., 2014.** First Report on: Acute toxicity and Gill Histopathology of Fresh Water Fish (*Cyprinus carpio*) Exposed to Zinc Oxide (ZnO) Nanoparticles. *Journal of Scientific and Research Publications*. Vol. 4, No. 3, pp: 2250-3153.
۳۴. **Suresh, N., 2009.** Effect of Benzo(Alpha)P yrene on liver, Spleen and Kidney Melanomacrophage Centers in *Tilapia mossambica*. *Journal of Environmental Biology*. Vol. 30, No. 40, pp: 505-508.
۳۵. **Sumanas, S. and Lin, S., 2004.** Zebrafish as a Model System for Drug Target Screening and Validation. *Drug Discovery Today: Targets*. Vol. 3, No. 3, pp: 89-96.
۳۶. **Suganthi, P.; Murali, M.; Sadiq Bukhari, A.; Syed Mohamed, H.E.; Basu, H. and Singhal, R.K., 2015.** Behavioural and Histological Variations in *Oreochromis mossambicus* after Exposure to ZnO Nanoparticles. *International Journal of Applied Research*. Vol. 1, pp: 524-531.
۳۷. **Venkatachalam, N.; Palanichamy, M. and Murugesan, V., 2007.** Sol gel Preparation and Characterization of Nano size TiO₂: it's Photocatalytic Performance. *Materials Chemistry and Physics*. Vol. 104, No. 2, pp: 454-459.
۳۸. **White, R.M.; Sessa, A.; Burke, C.; Bowman, T.; LeBlanc, J.; Ceol, C.; Bourque, C.; Dovey, M.; Goessling, W.; Burns, C.E. and Zon, L.I., 2008.** Transparent Adult Zebrafish as a Tool for in Vivo Transplantation Analysis. *Cell Stem Cell*. Vol. 2, No. 2, pp: 183-189.
۳۹. **Yang, J.; Mei S. and Ferreira, J.M.F., 2001.** Hydrothermal Synthesis of TiO₂ Nanopowders from Tetraalkylammonium Hydroxide Peptized Sols. *Materials Science and Engineering*. Vol. 15, pp: 183-185.

