

القای آسیب ژنتیکی در ماسل آب شیرین *Anodonta cygnea* تحت مواجهه با نانو اکسید روی

- **حدیثه کشیری***: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۸۷-۴۹۱۷۵
- **سارا جعفری کناری**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۸۷-۴۹۱۷۵
- **امیر قادر مرزی**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۸۷-۴۹۱۷۵

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۷

چکیده

با توجه به کاربردهای زیستی گسترده نانوذرات روی طی سال‌های اخیر، نگرانی‌های جدی در خصوص اثرات این مواد بر سلامت محیط زیست ایجاد گشته است. در پژوهش حاضر، به ارزیابی پتانسیل ژنوتوکسیک نانوذرات اکسید روی در ماسل *Anodonta cygnea* به‌عنوان گونه‌ای با اهمیت اکولوژیکی بالا پرداخته شد. بدین منظور، ماسل‌ها به مدت ۱۴ روز در معرض غلظت‌های ۰ (شاهد)، ۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو اکسید روی قرار گرفتند. جهت ارزیابی آسیب DNA از طریق الکتروفورز ژل سلول منفرد، از بافت‌های آبشش و هپاتوپانکراس طی روزهای ۷ و ۱۴ مواجهه نمونه‌برداری به‌عمل آمد. هم‌چنین آزمون ریزهسته‌ها با استفاده از بافت آبشش ماسل‌ها طی روزهای ۷ و ۱۴ انجام و فراوانی ریزهسته‌ها تعیین گردید. با توجه به نتایج، مواجهه با نانوذرات اکسید روی منجر به القای بروز ریزهسته‌ها و آسیب DNA در *A. cygnea* گردید به‌نحوی که فراوانی ریزهسته‌ها و مقادیر پارامترهای طول، مونتوم و درصد DNA دنباله و هم‌چنین شاخص آسیب ژنتیکی در تمامی تیمارهای مواجهه یافته با نانوذرات اکسید روی در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت. هم‌چنین با افزایش غلظت و زمان مواجهه با نانوذرات اکسید روی، روند افزایشی در میزان آسیب وارد شده مشاهده شد. در مقایسه بین بافت‌های مورد بررسی نیز، بافت هپاتوپانکراس حساسیت بالاتری نسبت به سمیت ژنتیکی نانو اکسید روی نشان داد. با توجه به نتایج حاصل از پژوهش حاضر می‌توان بیان داشت که نانو اکسید روی دارای اثرات ژنوتوکسیک بالقوه بر ماسل *A. cygnea* می‌باشد.

کلمات کلیدی: سیب DNA، ریزهسته، ماسل، نانو اکسید روی



مقدمه

(Daughton, 2004). در این راستا ابهامات زیادی درباره سرنوشت و سمیت نانوذرات در محیط زیست وجود دارد (Royal Commission on Environmental Pollution, 2008). در بین گروه‌های مختلف آبزیان، ماسل‌ها به‌طور ویژه در معرض خطرات ناشی از آلودگی‌های مرتبط با نانوذرات می‌باشند (Canesi و همکاران، 2012). در واقع، این موجودات به‌دلیل ویژگی‌هایی هم‌چون ساکن بودن، زندگی در دوره‌های زمانی طولانی، تغذیه روی ذرات معلق و تجمع مقادیر بالایی از ذرات، از حساسیت بالاتری نسبت به نانوذرات برخوردارند (Gagnon و همکاران، 2016). در مطالعه صورت گرفته روی ماسل *Elliptio complanata* مشخص گردید که مواجهه با نانوذرات اکسیدروی می‌تواند باعث افزایش سطح متالوتیونین و القای پراکسیداسیون چربی در سیستم گوارشی موجود گردد (Gagne و همکاران، 2013). هم‌چنین Falfushynska و همکاران (2015) بیان داشتند که نانوذرات اکسید روی می‌توانند منجر به بروز پاسخ‌های استرس اکسیداتیو در ماسل *Unio tumidus* گردند. به‌منظور بررسی اثرات ناشی از مواجهه با آلاینده‌های محیطی بر آبزیان، روش‌ها و نشانگرهای مختلفی مورد ارزیابی قرار می‌گیرند. در این میان، بررسی تغییرات DNA در موجودات آبی روشی بسیار سودمند جهت ارزیابی اثرات ژنوتوکسیک آلاینده‌ها می‌باشد (Scalon و همکاران، 2010). در این راستا، الکتروفورز سلول‌های منفرد (آزمون کامت) به‌عنوان روشی حساس و ساده، کاربرد گسترده‌ای در ارزیابی آسیب‌های وارد شده به DNA یافته است (Dhawan و همکاران، 2009). در واقع، آزمون کامت روشی قابل اعتماد و سریع بوده که حتی قادر به شناسایی سطوح پایین تخریب DNA نیز می‌باشد (Ullah و همکاران، 2016). در این روش، شناسایی آسیب وارده به DNA مبتنی بر مهاجرت قطعات آسیب دیده از هسته سلول می‌باشد (Mizuno و همکاران، 2015). ارزیابی ریزهسته‌ها نیز به‌عنوان یکی از روش‌های شناسایی آسیب‌های سیتوژنتیک مطرح می‌باشد. ریزهسته‌ها قطعات کروموزومی هستند که طی مرحله آنافاز تقسیم سلولی به سلول‌های دختر منتقل نشده و در سیتوپلاسم مادر باقی می‌مانند (Siu و همکاران، 2004). ارزیابی این ریزهسته‌ها به عنوان روشی کارآمد در تعیین اثرات ژنوتوکسیک ترکیباتی با میزان پایین تجمع و هم‌چنین به‌عنوان شاخصی برای آسیب‌های ژنتیکی وارده به سلول‌ها قلمداد می‌گردد (Santos و Gravato, 2003).

در پژوهش حاضر با توجه به تولید و کاربرد گسترده نانوذرات روی در صنایع مختلف و هم‌چنین عدم وجود اطلاعات کافی در خصوص پیامدهای حضور این مواد در طبیعت، اثرات ژنوتوکسیک نانوذرات اکسید روی بر ماسل *A. cygnea* به‌عنوان یک معرف زیستی مطرح در آلودگی‌های زیست محیطی، با استفاده از الکتروفورز ژل سلول منفرد و آزمون ریزهسته‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

ماسل‌های خانواده Unionidae از پراکنش بالایی در محیط‌های آب شیرین و لب‌شور دنیا برخوردار بوده و دارای نقش اکولوژیکی مهمی در عملکرد اکوسیستم‌های آبی می‌باشند که از آن جمله می‌توان به کاهش کدورت آب، کنترل مقدار و ترکیب ذرات معلق، انتقال بایومس از ستون آب به بنتوز و چرخش عناصر غذایی اشاره داشت (Vaughn, 2010; Sousa و همکاران، 2012). در حال حاضر ماسل‌های Unionid جزو گروه‌های جانوری در معرض تهدید در سراسر دنیا محسوب می‌گردند (Lydeard و همکاران، 2004; Simberloff, 2012). در بین اعضای خانواده Unionidae، گونه *Anodonta cygnea* به‌عنوان یکی از بزرگ‌ترین ماسل‌های آب شیرین مطرح می‌باشد (Chojnacki و همکاران، 2011). این گونه در برخی منابع آبی شمال ایران نیز یافت می‌شود (Pourang و همکاران، 2009). *A. cygnea* عمدتاً پیکره‌های آبی عاری از مواد شیمیایی (Chojnacki و همکاران، 2009) با مقادیر بالای اکسیژن، بستر حاصل خیز و هم‌چنین عاری از گیاه را ترجیح داده و از مقاومت پایینی در برابر شرایط محیطی نامساعد برخوردار می‌باشد به‌نحوی که به‌عنوان یک معرف زیستی مناسب برای آب‌های سالم و پاکیزه قلمداد می‌گردد (Rosinska و همکاران، 2008). در حال حاضر، آلودگی آب‌ها و افت کیفی زیستگاه‌ها به‌عنوان عوامل تهدیدکننده این گونه قلمداد می‌گردد (Kopij, 2011). امروزه هزاران ماده شیمیایی وارد اکوسیستم‌های آبی می‌گردد که با آلوده ساختن آب‌ها می‌توانند اثرات منفی بر حیات موجودات آب شیرین و دریایی داشته باشند (Eskandari و همکاران، 2012). در این راستا، یکی از دغدغه‌های اساسی مربوط به رشد روزافزون صنعت نانو فناوری می‌باشد (Dumont و همکاران، 2015). طی سال‌های اخیر، نانوذرات فلزی به دلیل ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی منحصر به فردی هم‌چون اندازه کوچک و نسبت سطح به حجم بالا کاربرد گسترده‌ای در صنایع مختلف یافته‌اند (Oberdorster و همکاران، 2005). در بین نانوذرات فلزی مختلف، نانوذرات اکسید روی با داشتن ویژگی‌های خاص به‌طور قابل توجهی در زمینه‌های مختلف مانند کشاورزی (Sabir و همکاران، 2014)، داروسازی و پزشکی (Bogutska و همکاران، 2013) و هم‌چنین محصولات آرایشی و بهداشتی (به‌ویژه کرم‌های ضدآفتاب) (VROM, 2008; Lanzano و همکاران، 2006) مورد استفاده قرار می‌گیرند. با توجه به کاربرد گسترده نانوذرات روی در محصولات مصرف‌کنندگان و هم‌چنین احتمال بالای وجود این مواد در پساب‌های حاصله، نگرانی‌هایی در خصوص اثرات بالقوه این مواد بر سلامت اکوسیستم‌های آبی ایجاد شده (Handy و همکاران، 2008) چراکه بخش عمده این مواد هم‌چون سایر پساب‌های صنعتی به اکوسیستم‌های آبی منتهی می‌گردد



مواد و روش‌ها

تهیه و نگهداری ماسل‌ها: ماسل‌ها (*Anodonta cygnea*) از مصب رودخانه تجن (سمسکنده، استان مازندران) جمع‌آوری و به سالن آبی‌پروری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انتقال داده شدند. ماسل‌ها به منظور سازگاری با شرایط جدید، به مدت دو هفته در آکواریوم‌های شیشه‌ای (حجم ۶۰ لیتر) حاوی آب شهری کلرزدایی شده نگهداری شدند. متوسط وزن و طول ماسل‌ها به ترتیب 7 ± 80 گرم و 10 ± 8 سانتی‌متر بود. تغذیه ماسل‌ها به صورت روزانه با استفاده از جلبک *Chlorella vulgaris* (3×10^{-6} سلول بر لیتر) صورت پذیرفت. ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آب نیز طی مدت نگهداری بدین شرح بود: دما 22 ± 1 درجه سانتی‌گراد، pH $7.0 \pm 4/24$ ، اکسیژن محلول $7/6 \pm 0/31$ و سختی آب $257 \pm 5/1$.

تهیه نانوذرات اکسید روی: نانوذرات اکسید روی (US Reasearch Nanomaterials, Inc., Zinc Oxide Nanopowder, ZnO, ۹۹٪، ۲۰ نانومتر، آمریکا) از شرکت پیشگامان نانومواد ایرانیان تهیه گردید. نانوذرات از طریق اولتراسونیک در ۴۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در آب مقطر (۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) پخش و همگن شدند. از آنجایی که نانوذرات پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت در محلول‌های آبی رسوب می‌یابند، تعلیق مجدد محلول ذخیره به‌طور روزانه از طریق هموژنایزر (۱۴۰۰ دور بر دقیقه، ۱۵ دقیقه) صورت گرفت. پتانسیل زتای نانو ذرات اکسید روی نیز از طریق پراکندگی نور دینامیکی (Dynamic Light Scattering=DLS) تعیین شد.

طراحی آزمایش: پس از پایان دوره سازگاری، ماسل‌ها به‌طور تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند: یک گروه به‌عنوان شاهد (بدون نانوذرات اکسیدروی) در نظر گرفته شد و سه گروه در معرض غلظت‌های تحت‌کشنده نانوذرات اکسید روی (۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) قرار گرفتند. برای هر یک از تیمارهای مواجهه یافته با نانوذرات اکسید روی و هم‌چنین گروه شاهد، سه تکرار در نظر گرفته شد (۷ نمونه برای هر تکرار). طول مدت مواجهه ۱۴ روز بود و نمونه‌برداری طی روزهای ۷ و ۱۴ انجام پذیرفت. بدین‌منظور، ماسل‌ها با استفاده از پودر گل میخک (۱ گرم بر لیتر) بی‌هوش شدند.

الکتروفورز ژل سلول منفرد: الکتروفورز ژل سلول منفرد (SCGE) براساس روش Singh و همکاران (۱۹۸۸) و Tice و همکاران (۲۰۰۰) با اندکی تغییر انجام پذیرفت. بدین‌منظور به‌طور خلاصه، پس از جداسازی و شستشوی بافت‌های هیپاتوپانکراس و آبشش هر ماسل با محلول بافر نمکی فسفات (PBS)، سوسپانسیون سلولی با استفاده از قیچی و بافر PBS تهیه شد. پس از افزودن تریپسین-اتیلن دی‌آمین تتراسدیک اسید (۰/۲۵٪) و مخلوط نمودن محتویات، سرم

گاوی جنینی جهت جلوگیری از هضم آنزیمی اضافه شد. پس از سانتریفیوژ نمونه‌ها (درجه سانتی‌گراد، ۱۰ دقیقه، ۱۱۷۰ دور بر دقیقه)، ۱۰۰ میکرولیتر بافر هموژنایزر شامل ۰/۸ گرم کلرید سدیم، ۰/۰۲ گرم کلرید پتاسیم، ۰/۱۴۴ گرم دی‌سدیم‌هیدروژن فسفات و ۰/۰۲۴ گرم دی‌هیدروژن پتاسیم فسفات اضافه و مجدداً سانتریفیوژ (۴ درجه سانتی‌گراد، ۷ دقیقه، ۱۱۳۰ دور بر دقیقه) انجام گرفت. پس از آن، ۱۰ میکرولیتر هموژنایزر و ۱۰۰ میکرولیتر آگارز نقطه ذوب پایین (ذوب شده) با دمای ۴۰-۳۷ درجه سانتی‌گراد اضافه و محتویات به دست آمده بر روی لام‌های پوشیده شده با آگارز نرمال (۰/۱۲٪) بارگذاری شدند. لام‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از تیمار لام‌ها با بافر لایزیز (۱۴/۱) گرم کلرید سدیم، ۳/۷۲۲ گرم اتیلن‌دی‌آمین تتراسدیک اسید، ۰/۱۲ گرم تریس و ۰/۸ گرم هیدروکسید سدیم) به مدت ۱ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و شستشو با آب مقطر، الکتروفورز با جریان ۲۱ ولت به مدت ۲۰ دقیقه انجام گرفت. بافر الکترولیت جهت الکتروفورز شامل ۱۲ گرم هیدروکسید سدیم و ۰/۳۷۲ گرم اتیلن‌دی‌آمین تتراسدیک اسید بود. پس از اتمام الکتروفورز، لام‌ها به مدت ۲ دقیقه با بافر خنثی (۴/۸ گرم تریس، pH: ۷/۵) تیمار و به‌آرامی با آب مقطر شستشو داده شدند. در نهایت، لام‌ها با استفاده از سایبرگرین رنگ‌آمیزی و ۱۰۰ سلول برای هر نمونه مورد بررسی قرار گرفت. پارامترهای آسیب DNA شامل طول، مومنتوم و درصد DNA دنباله با استفاده از نرم‌افزار CASP نسخه ۲،۲۰۱ مورد ارزیابی قرار گرفت (Konca و همکاران، ۲۰۰۳). هم‌چنین شاخص آسیب ژنتیکی (GDI) طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$GDI = \text{TypeI} + 2(\text{TypeII}) + 3(\text{TypeIII}) + 4(\text{TypeIV}) / \text{Type0} + \text{TypeI} + \text{TypeII} + \text{TypeIII} + \text{TypeI}$$

در این فرمول، Type0: انواع بدون آسیب و بدون دنباله، TypeI: دنباله تا ۱/۵ برابر قطر هسته، TypeII: دنباله ۱/۵ تا ۲ برابر قطر هسته، TypeIII: ۲ تا ۲/۵ برابر قطر هسته و TypeIV: حداکثر آسیب می‌باشد.

آزمون ریزهسته‌ها: به‌منظور انجام آزمون ریزهسته‌ها، به‌طور خلاصه، رشته‌های آبششی هر ماسل به‌طور جداگانه در یک قطره بزرگ از محلول اتانول استیک اسید (۳:۱) بر روی اسلایدهای میکروسکوپی قرار داده شد و سپس به‌آرامی به مدت دو تا سه دقیقه با استفاده از قیچی خردگردید تا سلول‌ها در قطره پخش شوند. پس از آن، گسترشی از سوسپانسیون سلولی به‌آرامی بر روی سطح اسلاید تهیه شد. سپس اسلایدها طی شب در معرض هوا خشک و با استفاده از متانول مطلق به مدت ۱۰ دقیقه فیکس شدند. اسلایدها با استفاده از محلول گیمسا (۰/۵٪) رنگ‌آمیزی شدند. در نهایت، نمونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ (Nikon, TS100-F، ژاپن) بررسی و فراوانی ریزهسته‌ها در هزار اریتروسیت به‌ازای هر نمونه ثبت گردید (Eskandari و همکاران، ۲۰۱۲).

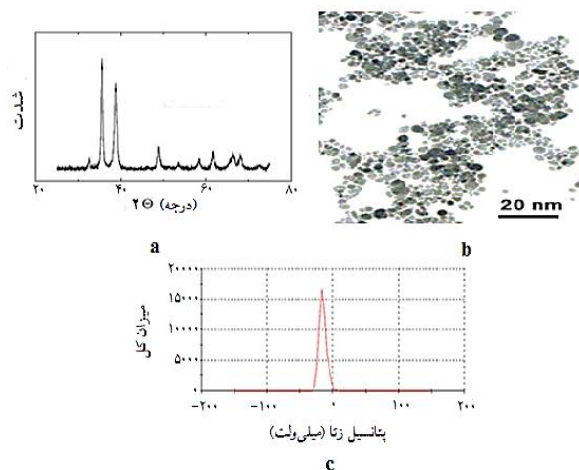


یافته با نانو اکسید روی نسبت به گروه شاهد به طور معنی داری افزایش یافت ($P < 0/05$). تغییرات مشاهده در پارامترهای آسیب DNA وابسته به غلظت نانوذرات روی بود. در این راستا، با افزایش غلظت نانو اکسید روی افزایش معنی داری در طول و درصد DNA دنباله در هر دو زمان نمونه برداری مشاهده شد ($P < 0/05$). مومنتوم دنباله نیز روند افزایشی مشابهی با افزایش غلظت نانوذرات روی نشان دادند که این افزایش بین تمامی تیمارها (به استثناء تیمارهای ۲۵ و ۵۰ میلی گرم بر لیتر در روز چهاردهم) معنی دار بود ($P < 0/05$). میزان شاخص آسیب ژنتیکی نیز با افزایش غلظت مواجهه افزایش یافت که البته افزایش مشاهده شده تنها بین تیمارهای ۵/۲ و ۵۰ میلی گرم بر لیتر در روز چهاردهم مواجهه معنی دار بود ($P < 0/05$). در این خصوص، بالاترین سطح شاخص GDI، $84/11 \pm 0/0$ بود که در تیمار ۵۰ میلی گرم بر لیتر نانو روی در روز چهاردهم مشاهده شد. در بررسی اثر زمان بر میزان آسیب وارد شده به DNA سلول های بافت آبشش، روند افزایشی در پارامترهای آسیب با گذشت زمان از ۷ تا ۱۴ روز مشاهده شد طوری که بالاترین سطح آسیب در روز چهاردهم ثبت گردید (طول دنباله: $27/91 \pm 19/3$ ، مومنتوم دنباله: $43/12 \pm 37/1$ و درصد DNA دنباله: $91/46 \pm 07/3$). با این وجود، اثر زمان بر میزان آسیب القا شده تنها در پارامتر درصد DNA دنباله در تیمار ۲۵ میلی گرم بر لیتر معنی دار بود ($P < 0/05$). تغییرات مشاهده شده در میزان شاخص آسیب ژنتیکی از روز هفتم تا روز چهاردهم نیز معنی دار نبود ($P > 0/05$). تغییرات پارامترهای آسیب DNA در سلول های بافت هیپاتوپانکراس ماسل *A. cygnea* تحت مواجهه با نانوذرات اکسید روی در جدول ۴ نشان داده شده است. جدول های ۵ و ۶ نیز نمایانگر کلاس های کامت و تغییرات شاخص آسیب ژنتیکی در بافت هیپاتوپانکراس می باشد. با توجه به نتایج، نانو ذرات اکسید روی موجب القای آسیب DNA در سلول های بافت هیپاتوپانکراس شدند. بافت هیپاتوپانکراس در مقایسه با بافت آبشش حساسیت بالاتری نسبت به سمی ژنتیکی نانو ذرات روی نشان داد به نحوی که سطح آسیب مشاهده شده در هیپاتوپانکراس بالاتر از آبشش بود. هم چنین میزان آسیب وارده به DNA سلول های هیپاتوپانکراس کاملاً وابسته به غلظت و مدت زمان مواجهه بود که از این نظر روند تغییرات مشاهده شده مشابه با بافت آبشش بود. بالاترین مقادیر پارامترهای آسیب در هیپاتوپانکراس در تیمار ۵۰ میلی گرم بر لیتر نانوذرات روی در روز چهاردهم ثبت گردید. در این راستا، طول، مومنتوم و درصد DNA دنباله به ترتیب $81/08 \pm 115/3$ ، $29/65 \pm 66/2$ و $48/62 \pm 19/1$ ثبت گردید. در مقایسه بین غلظت های مختلف مواجهه، تفاوت مشاهده شده از نظر پارامترهای آسیب DNA بین تیمارهای مختلف از نظر آماری معنی دار بود ($P < 0/05$).

آنالیز آماری: داده های به دست آمده از آزمون کامت و تست میکرونوکلوئوس از طریق آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA)، با استفاده از نرم افزار SPSS ۱۹ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای مقایسات میانگین نیز از آزمون توکی در سطح خطای ۵٪ استفاده شد.

نتایج

نانوذرات اکسید روی: شکل (a-c) نشان دهنده تصاویر TEM، X-Ray و پتانسیل زتای نانوذرات اکسید روی می باشد. تصویر TEM حاکی از کروی بودن نانوذرات مورد استفاده می باشد. هم چنین با توجه به تصویر X-Ray، بیشترین تراکم در نزدیکی ۴۰ درجه مشاهده شد که موید نانو بودن اندازه ذرات مورد استفاده می باشد. با توجه به دامنه پتانسیل زتای مشاهده شده نیز می توان بیان داشت که نانوذرات اکسید روی به طور یکسان در محیط سیال پخش و هموزن شده اند.



شکل ۱: ویژگی های نانوذرات اکسید روی مورد استفاده در تحقیق حاضر؛ a، b و c به ترتیب نشان دهنده تصاویر X-Ray، TEM و پتانسیل زتای نانوذرات اکسید روی می باشد.

آسیب DNA در آبشش و هیپاتوپانکراس *A. cygnea*: سمیت ژنتیکی نانوذرات اکسید روی در ماسل *A. cygnea* با استفاده از الکتروفورز ژل سلول منفرد مورد ارزیابی قرار گرفت. مقادیر پارامترهای آسیب DNA شامل طول و مومنتوم و درصد DNA دنباله برای بافت آبشش در جدول ۱ نشان داده شده است. هم چنین کلاس های کامت شامل نوع ۰ تا ۴ شاخص آسیب ژنتیکی (GDI) برای بافت آبشش در جدول های ۲ و ۳ آورده شده است. نتایج حاکی از آن بود که نانوذرات اکسید روی منجر به القای آسیب DNA در سلول های آبشش *A. cygnea* گردید به نحوی که مقادیر پارامترهای طول، مومنتوم و درصد DNA دنباله و هم چنین شاخص GDI در تیمارهای مواجهه

زمان بر تغییرات پارامترهای آسیب (به استثناء پارامتر درصد DNA دنباله در تیمار ۲/۵ میلی گرم بر لیتر) از نظر آماری معنی دار نبود ($P > 0.05$).

بالاترین میزان شاخص آسیب ژنتیکی نیز $21/1 \pm 38/0$ به دست آمد که مربوط به تیمار ۵۰ میلی گرم بر لیتر در روز چهاردهم بود. با وجود افزایش مشاهده شده در میزان آسیب وارد شده با گذشت زمان، اثر

جدول ۱: پارامترهای آسیب DNA در آبشش ماسل *A. cygnea* تحت مواجهه با نانوذرات اکسید روی

طول دنباله	مومنتوم دنباله		درصد DNA دنباله		شاهد
	روز ۷	روز ۱۴	روز ۷	روز ۱۴	
$4/67 \pm 1/57^d$	$0/45 \pm 0/09^d$	$0/52 \pm 0/04^c$	$8/18 \pm 2/42^d$	$9/16 \pm 1/40^d$	شاهد
$5/129 \pm 2/64^c$	$6/21 \pm 2/15^c$	$15/09 \pm 3/29^b$	$14/97 \pm 2/18^c$	$27/53 \pm 4/27^c$	۲/۵
$66/41 \pm 2/08^b$	$20/47 \pm 2/00^b$	$37/82 \pm 3/55^a$	$30/65 \pm 2/65^b$	$41/12 \pm 2/45^b$	۲۵
$79/34 \pm 2/15^a$	$31/74 \pm 1/12^a$	$43/12 \pm 1/37^a$	$35/47 \pm 0/95^a$	$46/91 \pm 3/07^a$	۵۰

مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده است. حروف بالانویس متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارها در یک زمان می باشد ($P < 0.05$).

جدول ۲: کلاسه‌های کامت و شاخص آسیب ژنتیکی در آبشش ماسل *A. cygnea* پس از ۷ روز مواجهه با نانوذرات اکسید روی

شاخص آسیب ژنتیکی	Type 4	Type 3	Type 2	Type 1	Type 0	شاهد
$0/0 \pm 1/02^b$	۰	۰	۲/۹۷	۵/۲	۹۱/۸۳	شاهد
$0/48 \pm 0/11^a$	۰/۹۳	۶/۷۲	۸/۲۷	۷/۶۳	۷۶/۴۵	۲/۵
$0/61 \pm 0/21^a$	۲/۱۶	۸/۵۶	۸/۴۸	۱۰/۴۱	۷۰/۳۹	۲۵
$0/72 \pm 0/19^a$	۴/۲۲	۶/۱۰	۱۲/۳۹	۱۲/۰۵	۶۵/۲۴	۵۰

جدول ۳: کلاسه‌های کامت و شاخص آسیب ژنتیکی در آبشش ماسل *A. cygnea* پس از ۱۴ روز مواجهه با نانوذرات اکسید روی

شاخص آسیب ژنتیکی	Type 4	Type 3	Type 2	Type 1	Type 0	شاهد
$0/10 \pm 0/05^c$	۰	۰/۳۱	۲/۹۳	۳/۲۴	۹۳/۵۲	شاهد
$0/56 \pm 0/10^b$	۱/۳۹	۷/۴۳	۱۰/۵۷	۷/۵۱	۷۳/۱۰	۲/۵
$0/78 \pm 0/22^{ab}$	۴/۳۶	۱۱/۱۲	۸/۲۳	۱۱/۳۴	۶۴/۹۵	۲۵
$0/84 \pm 0/11^a$	۵/۸۵	۷/۸۰	۱۱/۴۳	۱۴/۷۴	۶۰/۱۸	۵۰

جدول ۴: پارامترهای آسیب DNA در هیپاتوپانکراس ماسل *A. cygnea* تحت مواجهه با نانوذرات اکسید روی

طول دنباله	مومنتوم دنباله		درصد DNA دنباله		شاهد
	روز ۷	روز ۱۴	روز ۷	روز ۱۴	
$5/74 \pm 0/92^d$	$0/57 \pm 0/11^d$	$0/61 \pm 0/13^d$	$9/09 \pm 1/75^d$	$9/2 \pm 52/42^d$	شاهد
$56/46 \pm 1/09^c$	$12/35 \pm 2/27^c$	$24/60 \pm 3/45^c$	$19/08 \pm 1/48^c$	$33/2 \pm 56/34^c$	۲/۵
$79/83 \pm 2/25^b$	$10/10 \pm 3/31^b$	$53/97 \pm 5/13^b$	$37/20 \pm 1/96^b$	$55/3 \pm 74/55^b$	۲۵
$96/28 \pm 3/23^a$	$48/00 \pm 2/00^a$	$66/29 \pm 2/65^a$	$50/71 \pm 3/00^a$	$62/48 \pm 1/19^a$	۵۰

مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده است. حروف بالانویس متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارها در یک زمان می باشد ($P < 0.05$).

جدول ۵: کلاسه‌های کامت و شاخص آسیب ژنتیکی در هیپاتوپانکراس ماسل *A. cygnea* پس از ۷ روز مواجهه با نانوذرات اکسید روی

شاخص آسیب ژنتیکی	Type 4	Type 3	Type 2	Type 1	Type 0	شاهد
$0/09 \pm 0/02^c$	۰	۰	۱/۶۸	۵/۹۵	۹۲/۳۷	شاهد
$0/53 \pm 0/11^b$	۰/۸۵	۶/۹۲	۱۲/۵۳	۴/۰۹	۷۵/۶۱	۲/۵
$0/72 \pm 0/13^a$	۲/۱۵	۵/۲۶	۱۵/۶۸	۱۶/۵۷	۶۰/۳۴	۲۵
$0/87 \pm 1^a$	۴/۱	۶/۳۲	۱۷/۴۸	۱۶/۸۲	۵۵/۲۸	۵۰

جدول ۶: کلاسه‌های کامت و شاخص آسیب ژنتیکی در هیپاتوپانکراس ماسل *A. cygnea* پس از ۱۴ روز مواجهه با نانوذرات اکسید روی

شاخص آسیب ژنتیکی	Type 4	Type 3	Type 2	Type 1	Type 0	شاهد
$0/13 \pm 0/04^c$	۰	۰	۳/۹۷	۵/۲	۹۰/۸۳	شاهد
$0/66 \pm 0/88^b$	۳/۵۴	۶/۴۱	۹/۶	۱۳/۲۶	۶۷/۱۹	۲/۵
$1/00 \pm 0/21^{ab}$	۵/۶۲	۱۳/۵۷	۱۲/۴۷	۱۲/۱۱	۵۶/۲۳	۲۵
$1/21 \pm 0/38^a$	۵/۸۵	۲۰/۲۷	۱۳/۸۷	۸/۶۱	۵۱/۴۰	۵۰



فراوانی ریزهسته‌ها: فراوانی ریزهسته‌ها و تغییرات آن‌ها در تیمارهای مختلف طی زمان‌های مورد بررسی در جدول ۷ آورده شده است. مواجهه با غلظت‌های تحت کشنده نانوذرات اکسید روی منجر به القای بروز ریزهسته‌ها در سلول‌های آبششی *A. cygnea* گردید به نحوی که فراوانی ریزهسته‌ها در تیمارهای مواجهه یافته با نانو اکسید روی افزایش معنی‌داری در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد ($P < 0/05$). همچنین، بروز ریزهسته‌ها با افزایش غلظت نانوذرات روی روند افزایشی در هر دو زمان مورد بررسی نشان داد. در این خصوص،

بالاترین میزان فراوانی $3/91 \pm 1/64$ به دست آمد که در تیمار ۵۰ میلی گرم بر لیتر در روز چهاردهم مشاهده شد. تغییرات مشاهده شده با افزایش غلظت تنها بین تیمارهای ۲/۵ و ۵۰ میلی گرم بر لیتر معنی‌دار بود ($P < 0/05$). مقایسه تیمارها در دو زمان مورد بررسی نیز حاکی از تغییرات وابسته به زمان در فراوانی ریزهسته‌ها در سلول‌های آبششی *A. cygnea* بود به نحوی که با افزایش مدت زمان مواجهه از ۷ تا ۱۴ روز، فراوانی ریزهسته‌ها نیز افزایش یافت ($P > 0/05$).

جدول ۷: فراوانی ریزهسته‌ها در سلول‌های آبششی ماسل *A. cygnea* تحت مواجهه با نانو ذرات اکسید روی

۱۴	۷	
$0/21 \pm 0/07^c$	$0/16 \pm 0/03^c$	شاهد
$2/50 \pm 0/81^b$	$1/93 \pm 0/39^b$	۲/۵
$3/82 \pm 2/06^{ab}$	$3/06 \pm 1/73^{ab}$	۲۵
$3/91 \pm 1/64^a$	$3/48 \pm 1/43^a$	۵۰

مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده است. حروف بالانویس متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در یک زمان می‌باشد ($P < 0/05$).

بحث

رشد کشاورزی، صنعت و استفاده از مواد شیمیایی تجاری طی سال‌های گذشته منجر به افزایش بروز بیماری‌ها، اختلالات ژنتیکی و حتی مرگ و میر در موجودات مختلف گشته است. در سراسر جهان، هزاران آلاینده مختلف وارد محیط‌های آبی می‌گردد (Ullah و همکاران، ۲۰۱۷). در این میان، نانوذرات فلزی به دلیل ویژگی‌های خاص خود طی سال‌های اخیر به طور گسترده‌ای تولید و در صنایع مختلف استفاده شده‌اند، که این امر احتمال مواجهه بشر و محیط زیست با این مواد را افزایش داده است (Ramadan و Mohamed، ۲۰۱۶). برخی مطالعات آزمایشگاهی نشان داده که نانوذرات می‌توانند با القای پاسخ‌های سلولی، تحریک سلول‌های هدف و در نتیجه ایجاد ترکیباتی با ظرفیت ژنوتوکسیک یا اکسیدانی باعث بروز فرایندهای التهابی و اکسیداتیو گردند. علاوه بر این، نانوذرات ممکن است طی میتوز و یا از طریق واکنش با DNA داخل هسته باعث آسیب ژنتیکی در موجودات زنده گردند (Karlsson، ۲۰۱۰؛ Bhatt و Tripathi، ۲۰۱۱). نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که مواجهه با نانوذرات اکسید روی منجر به القای آسیب DNA در ماسل *A. cygnea* گردید به نحوی که مقادیر پارامترهای طول، مومنتوم و درصد DNA دنباله و همچنین شاخص آسیب ژنتیکی در تیمارهای مواجهه شده با نانوذرات روی نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری افزایش نشان داد. در این میان، بافت هیپاتوپانکراس در مقایسه با بافت آبشش حساسیت بالاتری نسبت به سمیت نانو اکسیدروی نشان داد که این امر می‌تواند مرتبط با تفاوت در مکانیسم‌های دفاعی و ترمیمی DNA در بافت‌های مختلف باشد. نتایج حاصل از پژوهش

حاضر مبنی بر القای آسیب DNA تحت مواجهه با نانوذرات روی در تطابق با یافته‌های حاصل از مطالعات پیشین روی ماهی *Danio rerio* (Zhao و همکاران، ۲۰۱۳)، ماسل *Elliptio complanata* (Gagne و همکاران، ۲۰۱۶؛ Gagnon و همکاران، ۲۰۱۶) و *Mytilus galloprovincialis* (Li، ۲۰۱۶) می‌باشد. در خصوص مکانیسم ژنوتوکسیسیته نانوذرات روی در آبریان اطلاعات چندانی وجود ندارد، این در حالیست که برخی مدل‌های بالقوه برای پستانداران شناسایی شده است. بر این اساس، مکانیسم احتمالی سمیت ژنتیکی نانوذرات روی را می‌توان به دو صورت مستقیم (اثر مستقیم بر ساختار DNA یا سیستم ترمیمی آن) و غیر مستقیم (القای واسطه‌ها) در نظر گرفت. نانوذرات ممکن است به طور مستقیم با DNA هسته باند شده و موجب القای آسیب به آن گردند (Li و همکاران، ۲۰۱۳؛ Ma و همکاران، ۲۰۱۶). این در حالیست که Xia و همکاران (۲۰۰۶) بیان داشتند که با وجود توانایی نانوذرات در واکنش مستقیم با برخی پروتئین‌های سلولی هم‌چون پروتئین‌های تقسیم سلولی، قادر به واکنش فیزیکی با مولکول DNA نمی‌باشند. لذا، تاثیرپذیری مستقیم DNA ناشی از اتصال نانوذرات روی با آن را می‌توان تنها در حد یک فرضیه در نظر گرفت که نیازمند تحقیقات بیش‌تر در این راستا می‌باشد. القای آسیب DNA ناشی از مواجهه با نانوذرات ممکن است به دلیل تاثیرپذیری سیستم ترمیمی DNA نیز باشد (Jaiswal و همکاران، ۲۰۰۰؛ Saliani و همکاران، ۲۰۱۶؛ Singh و همکاران، ۲۰۱۷). متأسفانه اطلاعات خاصی در خصوص امکان تاثیرپذیری مستقیم سیستم ترمیمی DNA در آبریان وجود ندارد اما با توجه به مطالعات صورت گرفته روی مدل‌های پستاندار

در پژوهش حاضر، علاوه بر SCGE فراوانی ریزهسته‌ها نیز جهت ارزیابی پتانسیل ژنوتوکسیک نانوذرات روی تعیین گردید. ریزهسته‌ها تحت آسیب DNA و سیستم ترمیمی آن، از قطعات کروموزومی نامتقارن یا کل کروموزوم منشا می‌گیرند که به دلیل ناهنجاری طی مرحله جداسدن در میتوز، وارد سلول‌های دختری نمی‌شوند (Fenech, 2006). در پژوهش حاضر، مواجهه با نانوذرات روی منجر به القای بروز ریزهسته‌ها در ماسل *A. cygnea* گردید. Pati و همکاران (2016) نیز در مطالعه خود بر روی موش‌های بالغ، بیان نمودند که مواجهه با نانوذرات اکسید روی منجر به القای بروز ریزهسته‌ها گردید. هم‌چنین، Asghar و همکاران (2016) افزایش وابسته به غلظت در بروز ریزهسته‌ها در ماهی *Catla catla* تحت مواجهه با نانوذرات روی را گزارش نمودند. نتایج Asghar و همکاران (2016) در تطابق با نتایج پژوهش حاضر می‌باشد که با افزایش غلظت نانوذرات، فراوانی ریزهسته‌ها نیز روند افزایشی نشان داد. بروز ریزهسته‌ها را می‌توان نشانه‌ای از القای آسیب ژنومی در سطح کروموزوم و یا آسیب DNA در نظر گرفت (Saleh و Sarhan, 2007). در مجموع، نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد قرار دادن ماسل *A. cygnea* در مواجهه با نانوذرات روی منجر به بروز ریزهسته‌ها و القای آسیب DNA گردید. هم‌چنین سطح آسیب ژنتیکی مشاهده شده در ماسل‌ها به غلظت و زمان مواجهه با نانوذرات وابسته بود. لذا با توجه به نتایج حاضر، می‌توان بیان داشت که نانو اکسید روی دارای اثرات ژنوتوکسیک بالقوه بر ماسل *A. cygnea* می‌باشد. در این راستا، با در نظر گرفتن عدم وجود اطلاعات کافی، تحقیقات بیشتر جهت نمایان ساختن مکانیسم‌های دقیق ژنوتوکسیسیته نانوذرات روی در آبریان مهم به نظر می‌رسد.

منابع

1. **Ahamed, M.; Siddiqui, M.A.; Akhtar, M.J.; Ahmad, I.; Pant, A.B. and Alhadiq, H.A., 2010.** Genotoxic potential of copper oxide nanoparticles in human lung epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 396, pp: 578-583.
2. **Asghar, M.S.; Qureshi, N.A.; Jabeen, F. and Khan, S., 2016.** Genotoxicity and oxidative stress analysis in the *Catla catla* treated with ZnO NPs. *JBES.* Vol. 8, pp: 91-101.
3. **Baker, T.J.; Tyler, C.R. and Galloway, T.S., 2014.** Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms. *Environ. Pollut.* Vol. 186, pp: 257-271.
4. **Bhatt, I. and Tripathi, B.N., 2011.** Interaction of engineered nanoparticles with various components of the environment and possible strategies for their risk assessment. *Chemosphere.* Vol. 82, pp: 308-317.
5. **Bogutska, K.I.; Sklyarov, Y.P. and Prylutsky, Y.I., 2013.** Zinc and zinc nanoparticles: biological role and application in biomedicine. *Ukr. Bioorg. Acta.* Vol. 1, pp: 9-16.
6. **Canesi, L.; Ciacci, C.; Fabbri, R.; Marcomini, A.; Pojana, G. and Gallo, G., 2012.** Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity. *Mar. Environ. Res.* Vol. 76, pp: 16-21.
7. **Chojnacki, J.C.; Grzeszczyk-Kowalska, A. and Buczek, W., 2009.** Biometrics of the swan mussels *Anodonta cygnea* in the southwest part of the Szczecin Lagoon in 2007. *EJPAU.* Vol. 12, No. 4, pp: #02.
8. **Chojnacki, J.C.; Rosinska, B.; Rudkiewicz, J. and Smola, M., 2011.** Biometrics of the Swan Mussel *Anodonta cygnea*. *Polish J. of Environ. Stud.* Vol. 20, No. 1, pp: 225-230.

مبنی بر توانایی نفوذ نانوذرات به درون هسته سلول این فرضیه را نادیده نیز نمی‌توان گرفت. در این راستا، Pati و همکاران (2016) در مطالعه خود بر روی موش‌های بالغ، جلوگیری از مکانیسم تعمیر DNA ناشی از کاهش سطح بیان پروتئین‌های Fen-1 و PolB تحت مواجهه با نانوذرات روی را گزارش نمودند. به‌هرحال، تاثیرپذیری مستقیم سیستم ترمیمی DNA در اثر مواجهه با نانوذرات مس را می‌توان به‌عنوان یک فرضیه مطرح نمود که نیازمند تحقیقات بیشتر در این زمینه می‌باشد. علاوه بر روش مستقیم، نانوذرات مس ممکن است به‌صورت غیرمستقیم از طریق القای واسطه‌ها نیز باعث آسیب DNA شوند. در این خصوص، القای استرس اکسیداتیو به‌عنوان یک مکانیسم بالقوه برای آسیب‌های ناشی از مواجهه با نانوذرات در نظر گرفته می‌شود (Saliani و همکاران، 2016). مطالعات صورت گرفته روی سلول‌های انسانی حاکی از آن بوده که احتمالاً آسیب وارد شده ناشی از نانوذرات به DNA بیش‌تر از طریق آسیب اکسیداتیو صورت می‌گیرد تا واکنش مستقیم با آن (Miander و همکاران، 2009; Ahmed و همکاران، 2010). در واقع، براساس اطلاعات موجود، استرس اکسیداتیو را می‌توان به‌عنوان عامل عمده در بروز سمیت ژنتیکی نانوذرات در نظر گرفت (Baker و همکاران، 2014). در این راستا، Gagnon و همکاران (2016) در ارزیابی اثر نانوذرات اکسیدروی بر ماسل *Elliptio complanata*، القای استرس اکسیداتیو و آسیب DNA را گزارش نمودند. هم‌چنین Fahmy و Sayed (2017) نیز القای استرس اکسیداتیو و ژنوتوکسیسیته ناشی از مواجهه با نانوذرات اکسیدروی را در دوکفه‌ای *Coelatura aegyptiaca* گزارش نمودند. تحت شرایط استرس اکسیداتیو، نانوذرات قادر به تولید گونه اکسیژن فعال (ROS) می‌باشند (Park و همکاران، 2011). ROS نیز می‌تواند از طریق واکنش با DNA موجب آسیب به بازها و پیکره DNA گردد (Martinez و همکاران، 2003). در واقع، ROS مولکول بسیار فعالی بوده که با ماکرومولکول‌های سلولی هم‌چون DNA، چربی‌ها و پروتئین‌ها واکنش داده و هموستازی محیط درون سلولی را برهم می‌زند (Toyokuni و همکاران، 1998). شکل‌گیری ROS تحت مواجهه با نانوذرات روی در مطالعات قبلی صورت گرفته روی مدل‌های پستاندار توسط Pati و همکاران (2014 و 2016) گزارش شده است. بنابراین، با توجه به مطالعات صورت گرفته به‌ویژه روی مدل‌های پستاندار، استرس اکسیداتیو را می‌توان به‌عنوان یک عامل مهم احتمالی در بروز آسیب DNA در نظر گرفت. به‌هرحال، با توجه به این‌که اطلاعات واضحی در خصوص مکانیسم دقیق شکست DNA ناشی از مواجهه با نانوذرات اکسید مس در آبریان وجود ندارد، مطالعات بیشتر جهت نمایان ساختن مکانیسم‌های دقیق دخیل در بروز شکست DNA در آبریان مهم به نظر می‌رسد.



- micrometer-sized copper and copper (II) oxide particles: a cross-disciplinary study. *Small*. Vol. 5, No. 3, pp: 389-399.
۳۲. Oberdorster, G.; Oberdorster, E. and Oberdorster, J., 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* Vol. 113, No. 7, pp: 823-39.
۳۳. Park, S.J.; Park, Y.C.; Lee, S.W.; Jeong, M.S.; Yu, K.N. and Jung, H., 2011. Comparing the toxic mechanism of synthesized zinc oxide nanoparticles by physicochemical characterization and reactive oxygen species properties. *Toxicol. Lett.* Vol. 207, No. 3, pp: 197-203.
۳۴. Pati, R.; Mehta, R.K.; Mohanty, S.; Padhi, A.; Sengupta, M.; Vaseeharan, B.; Goswami, C. and Sonawane, A., 2014. Topical application of zinc oxide nanoparticles reduces bacterial skin infection in mice and exhibits antibacterial activity by inducing oxidative stress response and cell membrane disintegration in macrophages. *Nanomedicine*. Vol. 10, pp: 1195-1208.
۳۵. Pati, R.; Das, I.; Mehta, R.K.; Sahu, R. and Sonawane, A., 2016. Zinc-oxide nanoparticles exhibit genotoxic, clastogenic, cytotoxic and actin depolymerization effects by inducing oxidative stress responses in macrophages and adult mice. *Toxicol. Sci.* Vol. 150, No. 2, pp: 454-472.
۳۶. Pourang, N.; Richardson, C.A. and Mortazavi, M.S., 2009. Heavy metal concentrations in the soft tissues of swan mussel (*Anodonta cygnea*) and surficial sediments from Anzali wetland, Iran. *Environ. Monit. Assess.* Vol. 163, No. 1-4, pp: 195-213.
۳۷. Ramadan, H. and Mohamed, H., 2016. Studies on the genotoxicity behavior of silver nanoparticles in the presence of heavy metal cadmium chloride in mice. *J. Nanomater.* Vol. 2016, pp: 1-12.
۳۸. Rosinska, B.; Chojnacki, J.C.; Lewandowska, A.; Matiejczuk, A. and Samiczak, A., 2008. Biometrics of swan mussels (*Anodonta cygnea*) from chosen lakes in Pomeranian Region. *Limnol. Rev.* Vol. 8, No. 1-2, pp: 79-84.
۳۹. Royal Commission on Environmental Pollution. 2008. Novel Materials in the Environment: The case of nanotechnology. London UK: Royal Commission.
۴۰. Sabir, S.; Arshad, M. and Chaudhari, S.K., 2014. Zinc oxide nanoparticles for revolutionizing agriculture: synthesis and applications. *Sci. World J.* Vol. 2014, pp: 1-8.
۴۱. Saleh, K. and Sarhan, M.A.A., 2007. Clastogenic analysis of chicken forms using micronucleus test in peripheral blood. *J. Appl. Sci. res.* Vol. 3, No. 12, pp: 1646-1649.
۴۲. Saliiani, M.; Jalal, R. and Goharshadi, E.K., 2016. Mechanism of oxidative stress involved in the toxicity of ZnO nanoparticles against eukaryotic cells. *Nanomed. J.* Vol. 3, No. 1, pp: 1-14.
۴۳. Simberloff, D., 2012. Sustainability of biodiversity under global changes, with particular reference to biological invasions. In: Weinstein MP, Turner RE, editors. *Sustainability science: The emerging paradigm and the urban environment*. New York: Springer. pp: 139-157.
۴۴. Singh, N.; Nelson, B.C.; Scanlan, L.D.; Coskun, E.; Jaruga, P. and Doak, S.H., 2017. Exposure to Engineered Nanomaterials: Impact on DNA Repair Pathways. *Int. J. Mol. Sci.* Vol. 18, pp: 1-15.
۴۵. Siu, W.H.L.; Caob, J.; Jack, R.W.; Wu, R.S.S.; Richardson, B.J.; Xu, L. and Lam, P.K.S., 2004. Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B[a]P genotoxicity in haemocytes of the green lipped mussel. *Aquat. Toxicol.* Vol. 66, pp: 381-392.
۴۶. Sousa, R.; Varandas, S.; Cortes, R.; Teixeira, A.; Lopes Lima, M.; Machado J. and Guilhermino, L., 2012. Massive die-offs of freshwater bivalves as resource pulses. *Int. J. Limnol.* Vol. 48, pp: 105-112.
۴۷. Tice, R.R.; Agurell, E.; Anderson, D.; Burlinson, B.; Hartmann, A.; Kobayashi, H.; Miyamae, Y.; Rojas, E.; Ryu, J.C. and Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Envi. Mol. Mutagen.* Vol. 35, pp: 206-221.
۴۸. Toyokuni, S., 1998. Oxidative stress and cancer: the role of redox regulation. *Biotherapy.* Vol. 11, No. 2-3, pp: 147-154.
۴۹. Ullah, S.; Begum, M.; Ahmad, S. and Dhama, K., 2016. Genotoxic effect of Endosulfan at sublethal concentrations in Mori (*Cirrhinus mrigala*) fish using single cell gel electrophoresis assay. *Int. J. Pharm.* Vol. 12, pp: 169-176.
۵۰. Ullah, S.; Hasan, Z.; Zorriehzahra, M.J. and Ahmad, S., ۲۰۱۷. Diagnosis of endosulfan induced DNA damage in rohu using comet assay. *IJFS.* Vol. 16, No. 1, pp: 138-149.
۵۱. Vaghun, C.C., 2010. Biodiversity Losses and Ecosystem Function in Freshwaters: Emerging Conclusions and Research Directions. *BioScience.* Vol. 60, pp: 25-35.
۵۲. VROM (Ministry of Housing Spatial Planning and the Environment). 2008. Risk Assessment - Zinc Oxide Part 1: Environment. Bilthoven, Netherlands.
۵۳. Zhao, X.; Wang, S.; Wu, Y.; You, H. and Lv, L., 2013. Acute ZnO nanoparticles exposure induces developmental toxicity, oxidative stress and DNA damage in embryo-larval zebrafish. *Aquat. Toxicol.* Vol. 136, pp: 49-59.
۹. Daughton, C.G., 2004. Non-regulated water contaminants: emerging research. *Environ. Impact Assess. Rev.* Vol. 24, pp: 711-732.
۱۰. Dhawan, A.; Bajpayee, M. and Parmar, D., 2009. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell. Biol. Toxicol.* Vol. 9, pp: 5-32.
۱۱. Dumont, E.; Johnson, A.C.; Keller, V.D.J. and Williams, R.J., 2015. Nano silver and nano zinc-oxide in surface waters - Exposure estimation for Europe at high spatial and temporal resolution. *Environ. Pollut.* Vol. 196, pp: 341-349.
۱۲. Eskandari, S.; Mozdarani, H.; Mashinchian, A.; Moradi, M. and Shahhosseiny, H., 2012. Cytogenetic damage induced by crude oil in *Anodonta cygnea* (mollusca, bivalvia) assessed by the comet assay and micronucleus test. *IJMS.* Vol. 2, No. 4, pp: 215-224.
۱۳. Fahmy, S. and Sayed, D. E., 2017. Toxicological perturbations of zinc oxide nanoparticles in the *Coelatura aegyptiaca* mussel. *Toxico. Ind. Heal.* Vol. 33, pp: 564-575.
۱۴. Falfushynska, H.; Gnatyshyna, L.; Yurchak, I.; Sokolova, I. and Stoliar, O., 2015. The effects of zinc nanooxide on cellular stress responses of the freshwater mussels *Unio tumidus* are modulated by elevated temperature and organic pollutants. *Aquat. Toxicol.* Vol. 162, pp: 82-93.
۱۵. Fenech, M., 2006. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a cytome assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat. Res.* Vol. 600, pp: 58-66.
۱۶. Gagne, F.; Turcotte, P.; Auclair, J. and Gagnon, C., 2013. The effects of zinc oxide nanoparticles on the metalloome in freshwater mussels. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 158, pp: 22-28.
۱۷. Gagne, F.; Auclair, J.; Trepanier, S.; Turcotte, P.; Pilote, M. and Gagnon, C., 2016. The impact of zinc oxide nanoparticles in freshwater mussels exposed to municipal effluents. *ISJ.* Vol. 13, pp: 281-290.
۱۸. Gagnon, C.; Pilote, M.; Turcotte, P.; Andre, C. and Gagne, F., 2016. Effects of exposure to zinc oxide nanoparticles in freshwater mussels in the presence of municipal effluents. *ISJ.* Vol. 13, pp: 140-152.
۱۹. Handy, R.; Owen, R. and Valsami-Jones, E., 2008. The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology.* Vol. 17, pp: 315-325.
۲۰. Gravato, C. and Santos, M.A., 2003. Genotoxicity biomarkers' association with B(a)P biotransformation in *Dicentrarchus labrax* L. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* Vol. 55, pp: 352-358.
۲۱. Jaiswal, M.; LaRusso, N.F.; Burgart, L.J. and Gores, G.J., 2000. Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangio carcinoma cells by a nitric oxide dependent mechanism. *Canc Res.* Vol. 60, pp: 184-190.
۲۲. Karlsson, H.L., 2010. The comet assay in nanotoxicology research. *Anal. Bioanal. Chem.* Vol. 398, pp: 651-666.
۲۳. Konca, K.; Lankoff, A.; Banasik, A.; Lisowska, H.; Kuszewski, T.; Gozdz, S.; Koza, Z. and Wojcik, A.A., 2003. Cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. *Mut. Res.* Vol. 534, pp: 15-20.
۲۴. Kopji, G., 2011. The endangered swan mussel *Anodonta cygnea* (Linnaeus, 1758) is threatened by the common oter *Lutra lutra*. *Folia Malacol.* Vol. 19, No. 3, pp: 191-192.
۲۵. Lanzano, T.; Bertram, M.; de Palo, M.; Wagner, C.; Zyla, K. and Graedel, T.E., 2006. The contemporary European silver cycle. *Resour. Conserv. Recy.* Vol. 46, pp: 27-43.
۲۶. Li, K.; Zhao, X.; Hammaer, B.K.; Du, S. and Chen, Y., 2013. Nanoparticles Inhibit DNA Replication by Binding to DNA: Modeling and Experimental Validation. *ACS Nano.* Vol. 7, No. 11, pp: 9664-9674.
۲۷. Li, J., 2016. Comparative behavior of nano ZnO, bulk ZnO and ionic zinc in marine environment and effect upon biological target organisms such as primary producers (marine algae *Tetraselmis suecica* and *Phaeodactylum tricoratum*) and filter feeder (Mediterranean mussels *Mytilus galloprovincialis*) chronically exposed. Ph.D. Thesis, University of Degli Studi Napoli. 119 P.
۲۸. Lydeard, C.; Cowie, R.H.; Ponder, W.F.; Bogan, A.E.; Bouchet, P.; Clark, S.A.; Cummings, K.S.; Frest, T.J.; Gargominy, O.; Herbert, D.G.; Hershler, R.; Perez, K.E.; Roth, B.; Seddom, M.; Strong, E.E. and Thompson, F.G., 2004. The Global decline of nonmarine mollusks. *Bioscience.* Vol. 54, No. 4, pp: 321-328.
۲۹. Ma, L.; Liu, B.; Huang, P.; Zhang, X. and Liu, J.L., 2016. DNA Adsorption by ZnO Nanoparticles near Its Solubility Limit: Implications for DNA Fluorescence Quenching and DNAzyme Activity Assays. *Langmuir.* Vol. 32, pp: 5672-5680.
۳۰. Martinez, G.R.; Loureiro, A.P.M.; Marques, S.A.; Miyamoto, S.; Yamaguchi, L.F. and Onuki, J., 2003. Oxidative and alkylating damage in DNA. *Mutat. Res.* Vol. 544, No. 2, pp: 115-127.
۳۱. Midander, K.; Cronholm, P.; Karlsson, H.L.; Elihn, K.; Moller, L.; Leygraf, C. and Wallinder, I.O., 2009. Surface characteristics, copper release, and toxicity of nano-and