
بسم الله الرحمن الرحيم

معاونت پژوهش و فن آوری

به نام خدا

منشور اخلاق پژوهش

یاری از خداوند سبحان و اعتقاد به این که عالم محضر خداست و همواره ناظر بر اعمال انسان و به منظور پاس داشت مقام بلند دانش و پژوهش و نظر به اهمیت جایگاه دانشگاه در اعتلای فرهنگ و تمدن بشری، ما دانشجویان و اعضاء هیات علمی واحدهای دانشگاه آزاد اسلامی متعهد می گردیم اصول زیر را در انجام فعالیت های پژوهشی مد نظر قرار داده و از آن تخطی نکنیم:

۱- اصل حقیقت جویی: تلاش در راستای پی جویی حقیقت و وفاداری به آن و دوری از هرگونه پنهان سازی حقیقت.

۲- اصل رعایت حقوق: التزام به رعایت کامل حقوق پژوهشگران و پژوهیدگان (انسان، حیوان و نبات) و سایر صاحبان حق.

۳- اصل مالکیت مادی و معنوی: تعهد به رعایت کامل حقوق مادی و معنوی دانشگاه و کلیه همکاران پژوهش.

۴- اصل منافع ملی: تعهد به رعایت مصالح ملی و در نظر داشتن پیشبرد و توسعه کشور در کلیه مراحل پژوهش.

۵- اصل رعایت انصاف و امانت: تعهد به اجتناب از هرگونه جانب داری غیر علمی و حفاظت از اموال، تجهیزات و منابع در اختیار.

۶- اصل رازداری: تعهد به صیانت از اسرار و اطلاعات محرمانه افراد، سازمان ها و کشور و کلیه افراد و نهادهای مرتبط با تحقیق.

۷- اصل احترام: تعهد به رعایت حریم ها و حرمت ها در انجام تحقیقات و رعایت جانب نقد و خودداری از هرگونه حرمت شکنی.

۸- اصل ترویج: تعهد به رواج دانش و اشاعه نتایج تحقیقات و انتقال آن به همکاران علمی و دانشجویان به غیر از مواردی که منع قانونی دارد.

۹- اصل برائت: التزام به برائت جویی از هرگونه رفتار غیر حرفه ای و اعلام موضع نسبت به کسانی که حوزه علم و پژوهش را به شائبه های غیر علمی می آلایند.

دانشگاه آزاد اسلامی

واحد علوم و تحقیقات

تعهد نامه اصالت رساله یا پایان نامه

اینجانب شهرزاد آقامیرکریمی دانش آموخته مقطع دکترای تخصصی در رشته زیست شناسی دریا که در تاریخ ۹۶/۶/۲۰ از رساله خود تحت عنوان " بررسی تاثیر سمیت نیمه حاد نانوذرات مس بر بافتهای حیاتی آبشش، کبد و کلیه و تغییرات آنزیمهای اکسیداتیو و آسیب DNA در ماهی کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*)" با کسب نمره ..... و درجه..... دفاع نموده ام بدینوسیله متعهد می شوم:

۱) این رساله حاصل تحقیق و پژوهش انجام شده توسط اینجانب بوده و در مواردی که از دستاوردهای علمی و پژوهشی دیگران (اعم از پایان نامه، کتاب، مقاله و...) استفاده نموده ام، مطابق ضوابط و رویه موجود، نام منبع مورد استفاده و سایر مشخصات آن را در فهرست مربوطه ذکر و درج کرده ام.

۲) این رساله قبلا برای دریافت هیچ مدرک تحصیلی (هم سطح، پایین تر یا بالاتر) در سایر دانشگاه ها و موسسات آموزش عالی ارائه نشده است.

۳) چناچه بعد از فراغت از تحصیل، قصد استفاده و هر گونه بهره برداری اعم از چاپ کتاب، ثبت اختراع و ... از این پایان نامه داشته باشم، از حوزه معاونت پژوهشی واحد مجوزهای مربوطه را اخذ نمایم.

٤) چنانچه در هر مقطع زمانی خلاف موارد فوق ثابت شود، عواقب ناشی از آن را می پذیرم و واحد دانشگاهی مجاز است با اینجانب مطابق ضوابط و مقررات رفتار نموده و در صورت ابطال مدرک تحصیلی ام هیچ گونه ادعایی نخواهم داشت.

شهرزاد آقامیرکریمی

تاریخ و امضاء:

دانشگاه آزاد اسلامی

واحد علوم و تحقیقات تهران

دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، گروه علوم دریایی

رساله دکتری رشته زیست شناسی دریا (Ph.D)

گرایش جانوران دریایی

عنوان:

بررسی تاثیر سمیت نیمه حاد نانوذرات مس بر بافتهای حیاتی آبشش، کبد و کلیه و تغییرات آنزیمهای اکسیداتیو و آسیب DNA در ماهی کلمه (*Rutilus caspicus* Yakovlev, 1870)

استادان راهنما:

دکتر علی ماشین چیان مرادی

دکتر عیسی شریف پور

استادان مشاور:

دکتر شهلا جمیلی

دکتر پرگل قوام مصطفوی

نگارش:

شهرزاد آقامیرکریمی

تابستان ۹۶

سپاسگزاری:

خدای مهربانم را شاکرم که به من فرصت آموختن داد و در تمام لحظات، دست یاریش پشتیبان من بود.

از اساتید محترمم که در طول مدت پژوهش با صبرو بردباری من را همراهی کردند و از راهنمایی های ارزشمندشان بهره مندم ساختند، سپاسگزارم.

تقدیم به:

همسر و خانواده عزیزم که همیشه مشوق و پشتیبان من بوده اند.

عنوان | فهرست مطالب | صفحه

چکیده ۱

فصل اول: کلیات تحقیق

۱-۱ مقدمه ۳
۱-۲ اهداف ٤
۱-۳ اهمیت و ضرورت انجام تحقیق ٤
۱-٤ فرضیه ها ٥
۱-٥ کلیات ٥
۱-٥-۱ ماهی کلمه دریای خزر ٥
۱-٥-۲ نانوذرات مس ۷
۱-٥-۳ سم شناسی نانوذرات ۸
۱-٥-٤ عواملی که سمیت نانوذره را تحت تاثیر قرار می دهند ۹
۱-٥-٤-۱ سایز نانوذره ۹
۱-٥-٤-۲ شکل ذرات ۹
۱-٥-٤-۳ شارژ ذرات ۱۰
۱-٥-٤-٤ ترکیب شیمیایی ذرات ۱۰
۱-٥-٤-٥ نانوذرات فلزی و حلالیت آنها ۱۰
۱-٥-٥ تاثیرات نانوذرات بروی غشاء سلول ۱۱
۱-٥-٥-۱عبور نانوذرات از غشاء سلول ۱۱
۱-٥-٥-۲ نفوذ مستقیم به سلول ۱۱
۱-٥-٥-۳ تاثیر وجود مواد آلی طبیعی (NOM) یا بیومولکول ها در ورود نانوذرات به غشاء ۱۲
۱-٥-٥-٤ سیالیت غشاء مولکولی و القاء سمیت نانوذرات ۱۲
۱-٥-٦ مکانیسم فعالیت های مخرب نانوذرات ۱٤
۱-٥-۷ نانوذرات در محیط های آبی ۱٥
۱-٥-۸ مدلهای زیستی و علت انتخاب ماهی ۱٦
۱-٥-۹ هیستوپاتولوژی ۱٦
۱-٥-۱۰ تغییرات آنزیمهای اکسیداتیو ۲۲
۱-٥-۱۱ بررسی تخریب DNA سلولی و آزمون کامت قلیایی (آزمون ژل الکتروفورز تک سلولی) ۲۳

فصل دوم: پیشینه تحقیق

۲-۱ تحقیقات صورت گرفته در ایران ۲٦
۲-۲ تحقیقات صورت گرفته در خارج از ایران ۲۷
۲-۳ تحقیقات مرتبط با پژوهش حاضر ۲۹

فصل سوم: مواد و روشها

۳-۱ تهیه ماهی ها ۳۲

عنوان | فهرست مطالب | صفحه

۳-۲ خصوصیات نانوذرات مس ۳۳
۳-۳ تعیین غلظت نانوذرات مس ۳٤
۳-٤ نمونه برداری ۳٤
۳-٤-۱ استخراج نمونه های بافتی ۳۵
۳-٤-۱-۱ مراحل آماده سازی نمونه های بافتی ۳۵
۳-٤-۲ استخراج نمونه های خون برای سنجش آنزیمی ۳۷
۳-٤-۳ اندازه گیری فعالیت آنزیمهای کاتالازو سوپراکسید دیسموتاز ۳۷
۳-٤-٤ استخراج نمونه های خون برای آزمون کامت ۳۹
۳-٤-٤-۱ تهیه محلولهای مورد نیاز برای آزمون کامت ۳۹
۳-٤-٤-۱-۱ محلول بافر لیز کننده ۳۹
۳-٤-٤-۱-۲ تهیه محلول بافر الکتروفورزی ۳۹
۳-٤-٤-۱-۳ تهیه محلول (بافر) خنثی کننده ٤۰
۳-٤-٤-۱-٤ تهیه محلول نمک فسفات بافر(PBS) ٤۰
۳-٤-٤-۱-۵ تهیه محلول رنگ ٤۰
۳-٤-٤-۲ تهیه لام پوشش دار با ژل آگارز معمولی ۱ درصد ٤۰
۳-٤-٤-۳ تهیه ژل آگارز با نقطه ذوب پایین ۰/۷۵ درصد ٤۱
۳-٤-٤-٤ مخلوط کردن ژل آگارز با نقطه ذوب پایین و سلولهای خونی ٤۱
۳-٤-٤-۵ لیز سلولی ٤۱
۳-٤-٤-٦ خنثی سازی قبل از الکتروفورز ٤۱
۳-٤-٤-۷ الکتروفورز ٤۱
۳-٤-٤-۸ خنثی سازی بعد از الکتروفورز ٤۱
۳-٤-٤-۹ تثبیت نمونه ها ٤۲
۳-٤-٤-۱۰ رنگ آمیزی و آشکار سازی و بررسی نمونه ها ٤۲
۳-٤-٤-۱۱ ارزیابی و کمی سازی کامت ٤۲
۳-٤-٤-۱۲ نرم افزار CASP ٤۲
۳-۵ شیوه تجزیه و تحلیل آماری داده ها ٤٤

فصل چهارم: نتایج

٤-۱ بررسی اثرات نانوذرات مس بر بافتهای مختلف ماهی کلمه ٤٦
٤-۱-۱ آسیب شناسی بافت آبشش ٤٦
٤-۱-۱-۱ نتایج آسیب بافتی آبشش در تیمار ۰/۱ میلیگرم در لیتر نانوذرات مس ٤۷
٤-۱-۱-۲ نتایج آسیب بافتی آبشش در تیمار ۰/۲ میلیگرم در لیتر نانوذرات مس ٤۹
٤-۱-۱-۳ نتایج آسیب بافتی آبشش در تیمار ۰/۵ میلیگرم بر لیتر از نانوذرات مس ۵۱

عنوان | فهرست مطالب | صفحه

٤-١-١-٤ بررسی ظریب همبستگی ما بین آسیب های آبشش و زمان و غلظت ٥٥
٤-١-٢ آسیب شناسی بافت کبد ٥٥
٤-١-٢-١ نتایج آسیب بافتی کبد در تیمار ٠/١ میلیگرم در لیتر نانوذرات مس ٥٧
٤-١-٢-٢ نتایج آسیب بافتی کبد در تیمار ٠/٢ میلیگرم در لیتر از نانوذرات مس ٥٨
٤-١-٢-٣ نتایج آسیب بافتی کبد در تیمار ٠/٥ میلیگرم در لیتر از نانوذرات مس ٦١
٤-١-٢-٤ بررسی ظریب همبستگی ما بین آسیب های کبد و زمان و غلظت ٦٤
٤-١-٣ آسیب شناسی کلیه ٦٤
٤-١-٣-١ نتایج آسیب بافتی کلیه در تیمار ٠/١ میلیگرم در لیتر نانوذرات مس ٦٥
٤-١-٣-٢ نتایج آسیب بافتی کلیه در تیمار ٠/٢ میلیگرم در لیتر از نانوذرات مس ٦٧
٤-١-٣-٣ نتایج آسیب بافتی کلیه در تیمار ٠/٥ میلیگرم در لیتر از نانوذرات مس ٦٩
٤-١-٣-٤ بررسی ظریب همبستگی ما بین آسیب های کلیه و زمان و غلظت ٧٢
٤-٢ بررسی اثرات نانوذرات مس بر آنزیمهای اکسیداتیو ماهی کلمه ٧٢
٤-٢-١تغییرات فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) ٧٢
٤-٢-٢ تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) ٧٤
٤-٢-٣ بررسی همبستگی میان افزایش غلظت نانوذرات مس و زمان درمعرض قرار گیری و فعالیت آنزیم اکسیداتیو ٧٥
٤- ٣ بررسی اثرات نانوذرات مس بر آسیب DNA و آزمون کامت ٧٦
٤-٣-١ طول دنباله کامت ها ٧٧
٤-٣-١-١ طول دنباله کامت ها در هفته اول ٧٧
٤-٣-١-٢ طول دنباله کامت ها در هفته دوم ٧٨
٤-٣-١-٣ طول دنباله کامت ها در هفته سوم ٧٨
٤-٣-٢ مقدار درصد DNA در سر کامت ها ٨٠
٤-٣-٢-١ مقدار درصد DNA در سر کامت ها در هفته اول ٨٠
٤-٣-٢-٢ مقدار درصد DNA در سر کامت ها در هفته دوم ٨٠
٤-٣-٢-٣ مقدار درصد DNA در سر کامت ها در هفته سوم ٨١
٤-٣-٣ مقدار درصد DNA دردنباله کامت ها ٨٣
٤-٣-٣-١ مقدار درصد DNA دردنباله کامت ها در هفته اول ٨٣
٤-٣-٣-٢ مقدار درصد DNA دردنباله کامت ها در هفته دوم ٨٣
٤-٣-٣-٣ مقدار درصد DNA دردنباله کامت ها در هفته سوم ٨٤
٤-٣-٤ تعیین مقدار OTM ٨٥
٤-٣-٤-١ مقدار OTM در هفته اول ٨٥
٤-٣-٤-٢ مقدار OTM در هفته دوم ٨٦
٤-٣-٤-٣ مقدار OTM در هفته سوم ٨٧
٤-٣-٥ بررسی همبستگی میان افزایش غلظت نانوذرات مس و زمان درمعرض قرار گیری و آسیب DNA ٨٨

عنوان | فهرست مطالب | صفحه

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

۵-۱ بررسی اثرات نانوذرات مس بروی اندامهای حیاتی ماهی کلمه ۹۱
۵-۱-۱ اثر نانوذارت مس بر بافت آبششی ۹۱
۵-۱-۲ اثر نانوذارت مس بر بافت کبد ۹۳
۵-۱-۳ اثرات نانوذرات مس بافت کلیه ۹٤
۵-۲ اثرات نانوذرات مس برآنزیمهای اکسیداتیو ۹٦
۵-۳ اثرات نانوذرات مس بر تخریب DNA ۹۸
۵-٤ نتیجه گیری ۱۰۱
۵-۵ پیشنهادات ۱۰۱

منابع

فهرست منابع فارسی ۱۰۳
فهرست منابع انگلیسی ۱۰٤

عنوان **فهرست جداول** **صفحه**

جدول ۱-۱ رده بندی ماهی کلمه دریای خزر..... ٦
جدول ٤-۱ آسیبهای بافتی آبشش ماهی کلمه در تیمار 0.1 mg/l نانو ذرات مس..... ٤٨
جدول ٤-۲ آسیبهای بافتی آبشش ماهی کلمه در تیمار 0.2 mg/l نانو ذرات مس..... ٥٠
جدول ٤-۳ آسیبهای بافتی آبشش ماهی کلمه در تیمار 0.5 mg/l نانو ذرات مس..... ٥٣
جدول ٤-٤ بررسی ظریب همبستگی ما بین آسیب های آبشش و زمان و غلظت..... ٥٤
جدول ٤-٥ آسیبهای بافتی کبد ماهی کلمه در تیمار 0.1 mg/l نانو ذرات مس..... ٥٨
جدول ٤-٦ آسیبهای بافتی کبد ماهی کلمه در تیمار 0.2 mg/l نانو ذرات مس..... ٦٠
جدول ٤-۷ آسیبهای بافتی کبد ماهی کلمه در تیمار 0.5 mg/l نانو ذرات مس..... ٦٢
جدول ٤-۸ بررسی ضریب همبستگی ما بین آسیب های آبشش و زمان و غلظت..... ٦٣
جدول ٤-۹ آسیبهای بافتی کلیه ماهی کلمه در تیمار 0.1 mg/l نانو ذرات مس..... ٦٥
جدول ٤-۱۰ آسیبهای بافتی کلیه ماهی کلمه در تیمار 0.2 mg/l نانو ذرات مس..... ٦٧
جدول ٤-۱۱ آسیبهای بافتی کلیه ماهی کلمه در تیمار 0.5 mg/l نانو ذرات مس..... ٧٠
جدول ٤-۱۲ بررسی **ضریب همبستگی ما بین آسیب های کلیه و زمان و غلظت**..... **٧١**
جدول ٤-۱۳ بررسی ضریب همبستگی مابین فعالیت آنزیمهای اکسیداتیو و غلظت و زمان..... ٧٦
جدول ٤-١٤ بررسی ضریب همبستگی بین آسیب DNA و غظت و زمان..... ٨٨

عنوان **فهرست نمودارها** **صفحه**

نمودار ٤-١ میزان آسیب آبشش در هفته اول ٤٨
نمودار ٤-٢ میزان آسیب آبشش در هفته دوم ٥١
نمودار ٤-٣ میزان آسیب آبشش در هفته سوم ٥٢
نمودار ٤-٤ آسیب کبدی در هفته اول ٥٧
نمودار ٤-٥ آسیب کبدی در هفته دوم ٥٩
نمودار ٤-٦ آسیب کبدی در هفته سوم ٦١
نمودار ٤-٧ آسیب کلیه در هفته اول ٦٦
نمودار ٤-٨ آسیب کلیه در هفته دوم ٦٨
نمودار ٤-٩ آسیب کلیه در هفته سوم ٧٠
نمودار ٤-١٠ تغییرات فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) ٧٣
نمودار ٤-١١ تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) ٧٤
نمودار ٤-١٢ مقایسه میانگین طول دنباله کامتهای مشاهده شده در غلظتهای مختلف نانوذرات مس در خون ماهی کلمه در هفته اول ٧٧
نمودار ٤-١٣ مقایسه میانگین طول دنباله کامتهای مشاهده شده در غلظتهای مختلف نانوذرات مس در خون ماهی کلمه در هفته دوم ٧٨
نمودار ٤-١٤ مقایسه میانگین طول دنباله کامتهای مشاهده شده در غلظتهای مختلف نانوذرات مس در خون ماهی کلمه در هفته سوم ٧٩
نمودار ٤-١٥ میانگین طول دنباله کامت ها تحت بر هم کنش غلظتهای مختلف نانوذرات مس و زمان های نمونه برداری ٧٩
نمودار ٤-١٦ مقایسه میانگین درصد DNA در سر کامتها در غلظتهای مختلف نانوذرات مس در هفته اول ٨٠
نمودار ٤-١٧ مقایسه میانگین درصد DNA در سر کامتها در غلظتهای مختلف نانوذرات مس در هفته دوم ٨١
نمودار ٤-١٨ مقایسه میانگین درصد DNA در سر کامتها در غلظتهای مختلف نانوذرات مس در هفته سوم ٨٢
نمودار ٤-١٩ میانگین درصد DNA در سر کامتها تحت بر هم کنش غلظتهای مختلف نانوذرات مس و زمان های نمونه برداری ٨٢
نمودار ٤-٢٠ مقایسه میانگین درصد DNA در دنباله کامتها در غلظتهای مختلف نانوذرات مس در هفته اول ٨٣
نمودار ٤-٢١ مقایسه میانگین درصد DNA دردنباله کامتها در غلظتهای مختلف نانوذرات مس در هفته دوم ٨٤
نمودار ٤-٢٢ مقایسه میانگین درصد DNA دردنباله کامتها در غلظتهای مختلف نانوذرات مس در هفته سوم ٨٤
نمودار ٤-٢٣ میانگین درصد DNA دردنباله کامتها تحت بر هم کنش غلظتهای مختلف نانوذرات مس و زمان های نمونه برداری ٨٥
نمودار ٤-٢٤ مقدار شاخص OTM در هفته اول ٨٦
نمودار ٤-٢٥ مقدار شاخص OTM در هفته دوم ٨٦
نمودار ٤-٢٦ مقدار شاخص OTM در هفته سوم ٨٧
نمودار ٤-٢٧ میانگین شاخص OTM تحت بر هم کنش غلظتهای مختلف نانوذرات مس و زمان های نمونه برداری ٨٧

عنوان **فهرست اشکال** **صفحه**

شکل ۱-۱ ماهی کلمه دریای خزر ٦
شکل ۱-۲ مقایسه سایز برخی مواد زیستی و مواد شیمیایی در مقیاس نانو ۸
شکل ۱-۳ افزایش میزان فعالیت نانوذرات با کاهش اندازه ۹
شکل ٤-۱پتانسیل تاثیرات نانوذرات بر سلول ۱۳
شکل ۱-۵ مسیرهایی که نانوذرات پس از رهاشدن در محیط های آبی تا رسیدن به موجود زنده طی می کنند ۱۵
شکل ۱-٦ ساختار آبشش ماهی ۱۸
شکل ۱-۷ ساختار هپانوسیت های کبدی ۱۹
شکل ۱-۸ ساختار نفرون کلیوی ۲۲
شکل ۳-۱ اکواریم های حاوی ماهی کلمه ۳۲
شکل ۳-۲ خصوصیات نانوذرات مس ۳۳
شکل ۳-۳ دستگاه سونیکاتور ۳٤
شکل ۳-٤ استخراج نمونه های بافتی ماهی کلمه ۳۵
شکل ۳-۵ مراحل آماده سازی بافتی و رنگ آمیزی ۳٦
شکل ۳-٦ مراحل خون گیری وتهیه سرم خون از ماهی کلمه ۳۷
شکل ۳-۷ کیتهای شناسایی آنزیم شرکت Zellbio ۳۸
شکل ۳-۸ دستگاه الایزا ریدر ۳۸
شکل ۳-۹ شمای کلی نرم افزار CASP ٤۳
شکل ۳-۱۰ نحوه درجه بندی کامت و تصاویر نمونه ای از انواع کامت با درجات متفاوت آسیب ٤٤
شکل ٤-۱ بافت نرمال آبشش ٤٦
شکل ٤-۲ آسیبهای بافت آبششی در غلظت ۰/۱ میلیگرم در لیتر ٤۷
شکل ٤-۳ آسیبهای بافت آبششی در غلظت ۰/۲ میلیگرم در لیتر ٤۹
شکل ٤-٤ آسیبهای بافت آبششی در غلظت ۰/۵ میلیگرم در لیتر ۵۲
شکل ٤-۵ بافت نرمال کبد ۵٦
شکل ٤-٦ آسیبهای بافت کبدی در غلظت ۰/۱ میلیگرم در لیتر ۵٦
شکل ٤-۷ آسیبهای بافت کبدی در غلظت ۰/۲ میلیگرم در لیتر ۵۹
شکل ٤-۸ آسیبهای بافت کبدی در غلظت ۰/۵ میلیگرم در لیتر ٦۱
شکل ٤-۹ بافت نرمال کلیه ٦٤
شکل ٤-۱۰ آسیبهای بافت کبدی در غلظت ۰/۱ میلیگرم در لیتر ٦٦
شکل ٤-۱۱ آسیبهای بافت کبدی در غلظت ۰/۲ میلیگرم در لیتر ٦۸
شکل ٤-۱۲ آسیبهای بافت کبدی در غلظت ۰/۵ میلیگرم در لیتر ٦۹

چکیده

پژوهش حاضر به منظور بررسی تاثیرات سمی نانوذرات مس بر اندامهای حیاتی، آبشش، کبد و کلیه و تاثیر بر آنزیمهای کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و آسیب DNA در ماهی کلمه دریای خزر (*Rutilus caspicus*) صورت گرفت. به این منظور ۱۰۸ عدد بچه ماهی در معرض سه غلظت زیر کشنده ۰/۵ ، ۰/۲ و ۰/۱ میلیگرم بر لیتر از نانوذرات مس قرار گرفتند. میانگین دمای آب آکواریم ها: $22\pm2^{o}c$، اکسیژن محلول ۵/۲ میلیگرم بر لیتر، pH برابر۰/۰۰٤± ۷، سختی آب ۲۷۰ppm بود. در روز هفتم، چهاردهم و بیست و یکم پس از مواجهه، سه ماهی از هر تیمار به صورت تصادفی انتخاب گردیدند و نمونه های بافتی، سرم خون و خون از آنها استخراج شدند. نمونه های بافتی پس از طی مراحل آماده سازی در نهایت در لامهای رنگ آمیزی مورد بررسی قرار گرفتند و نمونه های سرم خون، توسط کیت های آنزیمی و روش الایزا مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور بررسی تخریب DNA، از روش الکتروفورز تک سلولی یا کامت قلیایی استفاده شد. آسیب های مشاهده شده در آبشش شامل همجوشی، پرخونی، دیتچمنت، دفرمه شدن لاملها، تلانژیکتازی بود. آسیب های مشاهده شده در بافت کبد شامل پرخونی، هایپرتروفی، نکروز، دژنره شدن و واکوئلاسیون بودند. آسیبهای مشاهده شده در بافت کلیه شامل پرخونی، افزایش سلولهای interstitial، نکروز، اتساع گلومرولی و افزایش ماکروفاژهار بودند. .بیشترین میزان آسیب بافتهای آبشش، کبد و کلیه مربوط به غلظت ۰/۵ میلیگرم بر لیتر در هفته سوم مشاهده گردید. مابین غلظت و آسیب های هیپرپلازی ($r=.815, p< 0.01$)، همجوشی ($r=.620, p<0.05$)، دیتچمنت ($r=.849, p< 0.01$)، پرخونی($r=.706, p<0.05$) و دفرمه شدن ($r=.742, p<0.01$) همبستگی مثبت و معنی دار مشاهده شد. مابین زمان و عارضه تلانژیکتازی همبستگی مثبت و معنادار مشاهده گردید ($r=.611, p<0.05$) . مابین غلظت نانو ذرات مس و آسیب های کبدی هیپرتروفی ($r=.652, p< 0.01$) و نکروز ($r=.768, p< 0.05$) همبستگی مثبت و معنا دار مشاهده شد. مابین زمان در معرض قرار گیری و آسیب واکوئلاسیون ($r=.635, p< 0.05$) همبستگی مثبت و معنا دار مشاهده شد. مابین غلظت نانوذرات مس و آسیب های اتساع گلومرولی ($r=.606, p<0.05$)، افزایش بافت interstitial ($r=.636, p<0.05$)، پرخونی ($r=.636, p<0.05$) و نکروز ($r=.636,$ $p<0.05$) همبستگی مثبت و معنا دار وجود دارد. مابین زمان در معرض بودن و آسیب های دژنره شدن ($r=.665, p<0.05$)، واکوئلاسیون ($r=.657, p<0.05$) و نکروز ($r=.629, p<0.05$) همبستگی مثبت و معنا دار وجود دارد. حداکثر فعالیت مشاهده شده از آنزیمهای سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در هفته اول در غلظت ۰/۱ میلیگرم برلیتر به چشم می خورد. اختلاف فعالیت آنزیمی مابین تیمارها و نمونه های شاهد در طول دوره آزمایش معنی دار بود ($p<0.05$). مابین زمان و فعالیت آنزیمهای اکسیداتیو و غلظت همبستگی مثبت ومعنی دار آماری مشاهده نشد. مابین فعالیت آنزیم کاتالاز و آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز($r=.677, p<.01$) و غلظت ($r=.483, p<.01$) همبستگی مثبت و معنی دار مشاهده شد. مابین فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز و غلظت ($r=.483, p<.01$) همبستگی مثبت و معنی دار مشاهده شد. نتایج بررسی های DNA نشاندهنده آسیب شدید توسط نانوذارت مس بود و حداکثر تخریب در غلظت ۰/۵ میلیگرم در لیتر در هفته سوم مشاهده گردید. اختلاف تخریب DNA مابین تیمارها و نمونه های شاهد در طول دوره آزمایش معنی دار بود ($p<0.05$). مابین غلظت نانوذرات مس و فاکتورهای دنباله DNA ($r=.837, p<0.01$)، DNA دم کامت($r=.737, p<0.01$) و شاخص OTM ($r=.824, p<0.01$) همبستگی مثبت و معنی دار و با DNA سر کامت ($r=-.722, p<0.01$) همبستگی منفی و معنی دار مشاهده شد. مابین زمان در معرض قرار گیری و هیچ کدام از فاکتورها، همبستگی معنی دار مشاهده نشد. یافته های این پژوهش حاکی از آنست که نانوذرات مس در غلظتهای یاد شده دارای تاثیرات مخرب بروی ماهی کلمه می باشد.

کلمات کلیدی: نانوذرات مس، *Rutilus caspicus*، هیستوپاتولوژی، کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز، کامت قلیایی.

فصل اول: کلیات تحقیق

۱-۱ مقدمه

در سالهای اخیر ، روشهای نوین مهندسی شیمی باعث به وجود آمدن نانو مواد گردیده است و گسترش ساخت و تولید نانوذرات و استفاده از آنها در صنایع گوناگون، افزایش چشم گیری داشته است (Shaw *et al*., 2012) از پیامدهای این گسترش، راه یافتن این مواد شیمیایی از راه رواناب های سطحی به آبهای شیرین و اکوسیستم سواحل دریاست. جایی که حتی غلظت کم این مواد بر فیزیولوژی و رشد موجودات تاثیر می گذارد. نانوتوکسیکولوژی تاثیرات مخرب نانوذارت را بروی محیط زیست را مورد تجزیه و تحلیل قرار می دهد. حضور نانوذرات در سیستم های زیستی ممکن است منجر به نتایج مخرب اکولوژیک گردد و سلامتی انسانها و موجودات زنده را تحت تاثیر قرار دهد (Ostaszewska *et al*., 2016).

نانوذرات مس یکی از پرمصرفترین نانوذارت است و کاربرد گسترده ای در صنایع پزشکی، نساجی، نگهدارنده های غذایی، الکترونیک و نظیر آن دارند. مقدار اندکی از این ماده می تواند در آب حل شود و تاثیرات سمی بروی موجودات آبزی و ماهیان داشته باشد (Noureen & Jabeen *et al*., 2015). پژوهشهای گوناگونی پیرامون تاثیرات مخرب زیستی نانوذرات مس بر موجودات آبزی صورت گرفته است (Shaw *et al*., 2012; Fan *et al*., 2012; Xu *et al*., 2012; Griffit *et al*., 2007) امروزه ماهیان مدل آزمایشی خوبی جهت ارزیابی سلامت اکوسیستم های آبی در مواجهه با آلاینده های محیطی بر اساس تغییرات بیوشیمیایی و فیزولوژیک محسوب می شوند. اثرات مواجهه کوتاه مدت و تحت کشنده (sublethal) بر عوامل زیستی ماهی می تواند رشد و نمو را تحت تاثیر قرار داده و فرآیند احیای ذخایر را مختل نماید.

ماهی کلمه (*Rutilus caspicus*) از خانواده کپور ماهیان، از جمله ماهیان استخوانی اقتصادی سواحل و رودخانه های حاشیه جنوبی دریای خزر می باشد که ذخایر آن به دلیل صید بی رویه، آلودگی، تخریب زیستگاه در معرض خطر قرار گرفته است. به منظور بازسازی ذخایر این ماهی سالانه میلیونها بچه ماهی ۰/۵ تا ۳ گرمی توسط سازمان شیلات ایران در کارگاههای تکثیر تولید و به رودخانه ها رها سازی می شود. با وجود انجام پژوهشهای گوناگون، پیرامون تاثیر آلاینده های مختلف بروی ماهی کلمه، تاکنون مطالعه ای در زمینه تاثیرات زیستی نانوذرات مس

بروی ماهی کلمه دریای خزر صورت نگرفته است. با در نظر گرفتن مقدار مصرف نانوذرات مس در صنایع گوناگون و سرنوشت نهایی آن که از طرق گوناگون وارد گستره های آبی می گردد و از آنجاییکه سالانه میلیون ها بچه ماهی کلمه در کارگاههای تکثیر و پرورش کشور تکثیر شده و به دریا رها سازی می شوند، به نظر می رسد انجام مطالعه در زمینه بررسی اثرات یکی از پرمصرف ترین مواد شیمیایی، جهت حفاظت بیشتر از این گونه ارزشمند مفید واقع گردد.

۱-۲ اهداف

انجام این تحقیق اهداف زیر را جستجو می کند:

- بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیک در بافتهای کبد،کلیه و آبشش ماهی کلمه پس از ۷، ۱٤و ۲۱ روز در معرض قرار گرفتن نانو ذرات مس و مقایسه تغییرات با بافتهای نمونه های شاهد.
- بررسی میزان القای آنزیمهای کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز در ماهیان در معرض آلودگی و مقایسه با نمونه شاهد پس از ۷، ۱٤و ۲۱ روز در معرض قرار گرفتن نانو ذرات مس.
- بررسی میزان آسیب DNA در ماهیان در معرض آلودگی در مقایسه با نمونه های شاهد پس از ۷، ۱٤و ۲۱ روز قرارگرفتن در معرض نانو ذرات مس.
- بررسی ارتباط بین تغییرات هیستوپاتولوژیکی، آنزیمی و آسیب DNA با غلظت نانوذرات مس و زمان در معرض قرارگیری و معرفی بیومارکر احتمالی.

۱-۳ اهمیت و ضرورت انجام تحقیق

نانوتکنولوژی دانش نوینی می باشد ومصرف نانوذرات، در صنایع گوناگون رو به افزایش است. این مواد در نهایت از طریق فاضلابها و رواناب ها وارد رودخانه ها و دریاها می شوند. با افزایش میزان مصرف،رهاسازی این نانوذرات در محیط زیست افزایش یافته، رفته رفته غلظت این مواد در گستره های آبی، به غلظت تحت کشنده (sublethal) برای موجودات آبزی نزدیک می شود و اثرات نامطلوب خود را بر جانداران گوناگون القاء می کند. شناخت به موقع این اثرات نامطلوب می تواند از بروز حوادث ناخوشایند بیولوژیک و زیست محیطی (مانند برهم خوردن تعادل اکوسیستم ها ، نابودی و انقراض برخی گونه ها، اثر بر انسان و...) جلوگیری نماید. نانوذرات مس در ایران نیز مانند سایر کشورهای دنیا به میزان زیاد مصرف می شود. این در حالی است که دریای خزر یک دریاچه بسته

است و حجم بالایی از آلاینده های گوناگون وارد این دریاچه می گردد. تاکنون هیچ پژوهشی در بررسی اثرات نانوذرات مس بر جانداران این اکوسیستم صورت نگرفته است. همچنین این نکته را باید در نظر داشت که اکوسیستم هایی مانند دریای خزر که از تنوع زیستی پایینی برخوردار هستند، بیشتر در معرض خطر قرار دارند چرا که به خطر افتادن یک یا چند گونه در آنها می تواند در نهایت به نابودی کل اکوسیستم منجر شود. از سوی دیگر پژوهشهایی که در سراسر دنیا بر روی اثرات ناخوشایند نانوذرات بر جانداران گوناگون صورت می گیرد، می تواند در نهایت به امر مجاز بودن یا ممنوع شدن مصرف این مواد و یا تعیین محدودیت در مصرف آنها منتهی گردد.

۱-٤ فرضیه ها

- نانو ذرات مس بر هیستوپاتولوژی بافت های کبد،کلیه و آبشش و آنزیمهای اکسیداتیو نظیر کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و آسیب DNA در ماهی کلمه موثر است.
- ارتباط معنی دار بین تغییرات پارامترهای مورد بررسی و غلظت و زمان در معرض قرارگیری با نانو ذرات مس و احتمال معرفی بیومارکر اختصاصی وجود دارد.

۱-۵ کلیات

۱-۵-۱ ماهی کلمه دریای خزر

ماهی کلمه (*Rutilus caspicus*) (شکل۱-۱) جزو ماهیان بومی دریای خزر از ماهیانی است که در آبهای لب شور و شیرین، در بسترهای گرم و کم عمق لجنی زندگی می کند. از نظر مهاجرت جزو ماهیان مهاجر و رود کوچ[1] می باشد به رودخانه های ایران مانند اترک و قره سو و گرگانرود مهاجرت می نماید. حداکثر طول این ماهی ٤٥ سانتیمتر و به وزن ۲۰۰۰ گرم می باشد. در این هنگام، سن آنها حدود ۱۰ سال است. از نظر رژیم غذایی از پلانکتونها، سخت پوستان ریز، نرمتنان، لارو حشرات یا قسمتهایی از گیاهان آبزی مانند هزار برگی، نخود آبی و جلبکها هستند. این ماهی در زمستان تغذیه نمی کنند و در این زمان به صورت دسته های چند صد تایی در منطقه ای جمع می شوند که اصطلاحا معروف به زمستان گذرانی است. زمان تخم ریزی بر حسب دمای آب از اردیبهشت تا خرداد ماه است. تخمریزی هنکگامی صورت می گیرد که درجه حرارت آب حداقل به ۱۰ درجه

[1] Anadromous

سانتیگراد رسیده باشد. تخم ریزی در نقاط کم عمق در نزدیکی سواحل انجام می گیرد. چند روز قبل از ماهیان ماده، ماهیان نر به محل تخم ریزی می رسند در این زمان روی بدن ماهیان نر دانه های مروارید شکل ظاهر می شوند . تعداد تخم ها ۱۰۰-۵۰ هزار و قطر آنها ۱میلیمتر می باشد. بر حسب درجه حرارت آب ٤ تا ۱۰ روز پس از تخم ریزی لاروها سر از تخم بیرون می آورند و در چند روز اول به کمک غدد چسبناکی که روی سر دارند، خود را به گیاهان آبزی و سنگها می چسبانند و از مواد غذای موجود در کیسه زرده خود تغذیه می کنند. پس از سپری شدن این مدت زمان بچه ماهیان، از پلانکتونها (بیشتر کلادوسرا[۲]) و موجودات کفزی کوچک تغذیه می نمایند.

این ماهی به دلیل اینکه در اوائل زنجیره غذایی قرار دارد، طمعه خوبی برای ماهیان با ارزش اقتصادی مانند سوف و اردک ماهی و ماهیان خاویاری می باشد (وثوقی و مستجیر، ۱۳۷۳) همچنین یک گونه دارای ارزش اقتصادی است که مصرف انسانی دارد.



شکل۱-۱ ماهی کلمه دریای خزر

جدول ۱-۱ رده بندی ماهی کلمه دریای خزر

راسته	Cypriniformes
خانواده	Cyprinidae
جنس	*Rutilus*
گونه	*R. caspicus*
نام انگلیسی	Caspian roach

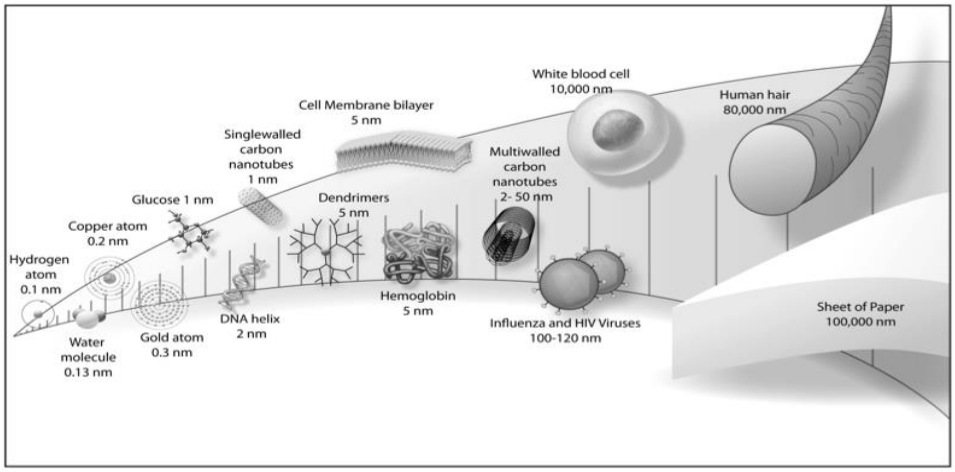
[2] Celadocra

دریای خزر به عنوان زیستگاه اصلی ماهی کلمه محسوب می شود. منابع زنده ی دریای خزر به ویژه ذخایر ماهیان اقتصادی آن در سالهای اخیر به علت بحرانهای مختلف مورد تهاجمات جدی قرار گرفته است که از آن جمله می توان به هجوم شانه دار دریای خزر (*Mnemiopsis leydi*) و لطمات آن بر چرخه غذایی دریای خزر، اثرات سوء ناشی از اکتشاف و بهره بردای منابع نفتی بر ذخایر آبزیان (خصوصا در نواحی شمال دریای خزر و همچنین جزایر آشوراده، شبه جزیره میانکاله، خلیج گرگان و تالاب گمیشان)، ایجاد سدهای عظیم بروی رودخانه های محل مهاجرت ماهیان رود کوچ، برداشت شن و ماسه از محل تخمریزی ماهیان در بستر رودخانه ها، افزایش ادواری سطح آب دریایی خزر و تغییر مسیر رودخانه ها، ورود مقادیر زیاد سموم و کودهای شیمیایی از طریق رودخانه به دریا، صید قاچاق ماهیان اقتصادی دریای خزر اشاره کرد (خشنود، ۱۳۹۲). اگر چه رها سازی میلیونها بچه ماهی کلمه گامی موثر در جهت ترمیم و بازسازی ذخایر می باشد، لیکن درصد قابل توجهی از لاروهای تکثیر یافته و نیز بچه ماهیان رها شده می توانند تحت تاثیر عوامل مختلف محیطی از جمله آلودگی آب و .... قرار گیرند.

۱-۵-۲ نانوذرات مس

نانو مواد به موادی اطلاق می شود که ذرات آنها دارای ابعادی کمتر از nm ۱۰۰ باشند. آنها می توانند به شکلهای گوناگون، با اندازه ذرات و ترکیب شیمیایی مختلف وجود داشته باشند. این اندازه کوچک باعث می شود نانوذرات در مقایسه با موادی که در طبیعت وجود دارند، خواص شیمیایی و فیزیکی متفاوتی داشته باشند (Zhao *et al.*, 2014). نانوذرات مس انواع گوناگونی دارند. برخی دارای منشا طبیعی هستند و در آب، خاک، غبارهای آتشفشانی به وفور یافت می شوند و توسط فرآیندهای زمین شناسی و زیستی به وجود می آیند. این نانوذرات طبیعی اگر که دارای خواص سمی نیز باشند، موجودات گوناگونی می توانند درمحیط غنی از این مواد رشد و نمو نمایند. فعالیت بسیار بالای نانوذرات به سبب افزایش نسبت سطح به حجم در این ذرات می باشد و به همین سبب دارای خواص سمی می باشند. در سالهای اخیر نانوذرات صنعتی مس در کارخانجات ساخته می شوند و از خواص ضد میکروبی، آنتی بیوتیکی آن استفاده می شود. همچنین در صنایع الکترونیک، پزشکی، صنایع دارویی، کاتالیستها، رنگررزی و.... استفاده می گردند (Al-Bairuty *et al.*, 2013). بازار تخمینی نانوتکنولوژی تا سال ۲۰۰۸، ۷۰۰ میلیارد دلار برآورد شده بود و تا سال ۲۰۱۵ این میزان به ۱ تریلیون دلار رسید. پیش بینی می گردد که تا سال ۲۰۲۰ تعداد محصولاتی که حاوی نانوذرات باشند، به ۳٤۰۰ محصول برسد. استفاده گسترده از نانوذرات و نانوتکنولوژی اهمیت اقتصادی این مقوله را افزایش می دهد و به این دلیل نیازمند تمهیداتی است که استفاده از این مواد بدون خطر باشد. این مواد در نهایت وارد محیط های خشکی و دریایی می گردند و توسط موجودات

زنده مصرف می شوند و قبل از اینکه توسط سیستم ایمنی موجود حذف گردند در بدن موجود زنده انباشته می شوند (Dai, 2012).



شکل ۱-۲ مقایسه سایز برخی مواد زیستی و مواد شیمیایی در مقیاس نانو
(Yokel & MacPhail, 2011)

۱-۵-۳ سم شناسی نانوذرات[3]

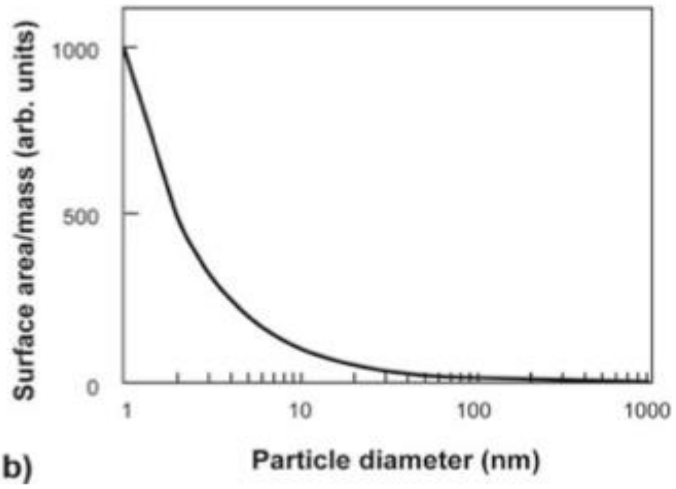
نانو تکنولوژی به فرایند طراحی، تولید، کاربرد نانو مواد می پردازد و ارتباط نزدیکی با علوم مختلف از جمله شیمی، فیزیک و زیست شناسی دارد. پژوهشگران، پتانسیل تاثیرات مخرب نانوذرات برروی موجودات زنده را مورد ارزیابی قرار داده اند. سمیت و انتشار این مواد با سایر مواد شیمیایی متفاوت است. تعیین میزان غلظت نانوذرات مشکل می باشد زیرا نانوذرات به راحتی کلوخه می گردند و پایداری آنها به شدت تحت تاثیر خواص ذاتی آنها و محیطی که در آن قرار می گیرند، می باشد. زمانی که این مواد به اکوسیستم می رسند، از آنجاییکه از نظر اندازه مشابه بسیاری از مولکولها و ساختارهای زیستی هستند (شکل ۲)، به راحتی وارد بدن موجود می گردند و سمیت خود را القاء می نمایند (Shaw *et al*., 2012).

[3] Nanotoxicology

۱-۵-٤ عواملی که سمیت نانوذره را تحت تاثیر قرار می دهند

۱-۵-٤-۱ سایز نانوذره

اندازه نانوذره پارامتر بسیار مهمی در تعیین سمیت نانوذره می باشد. از انجاییکه واکنش ما بین نانوذره و سلول زیستی در سطح آن انجام می گردد، هر چه که ذره کوچکتر باشد، نسبت سطح به حجم در آن افزایش می یابد و مولکولها و اتمهای بیشتری در سطح نانوذره قرار می گیرند (شکل ۱-۳) و در نتیجه جایگاه بیشتری برای واکنش میان ذره و سلول وجود خواهد داشت و میزان فعالیت ذره بیشتر خواهد شد. هر چه فعالیت ذره بیشتر باشد، سمیت بیشتری ایجاد خواهد کرد (Holgate, 2010).



شکل ۱-۳ افزایش میزان فعالیت نانوذرات با کاهش اندازه. محور x نمایانگر نسبت سطح به حجم ذرات و محور y نمایانگر سایز ذرات در مقیاس نانو متر می باشد. هر چه سایز ذرات بزرگتر می گردد، نسبت سطح به حجم کاهش می یابد (Buzea *et al*., 2007).

۱-۵-٤-۲ شکل ذرات

یکی دیگر از فاکتورهایی که بر میزان سمیت نانوذرات موثر می باشند، شکل ذرات است . نانوذرات صنعتی به شکلهای گوناگونی از جمله رشته ای [4]، کروی، لوله ای، حلقه ای و صفحه ای، تولید می گردند. به عنوان مثال

[4] fibers

نانوتیوبهای کربن تک دیواره [5] خواص سمی متفاوتی نسبت به نانوتیوبهای کربن چند دیواره[6] از خود نشان می دهند (Sun *et al*., 2011).

۱-۵-٤-۳ شارژ ذرات

شارژ ذرات عامل مهم دیگری در تعیین سمیت یک نانوذره می باشد. شارژ سطحی مابین نانوذره و محیط اطراف و یا موجود زنده ای که در تماس با ذره می باشد، واکنش ایجاد می نماید. دانشمندان بر این باور هستند که وجود شارژ مثبت در سطح نانوذره عاملی برای کاهش میزان سمیت این ماده می باشد (Nagy *et al*., 2012).

۱-۵-٤-٤ ترکیب شیمیایی ذرات

زمانی که نانوذره در تماس مستقیم با موجود زنده قرار می گیرد، ترکیب شیمیایی نقش به سزایی در تعیین سمیت آن دارد . در تحقیقی که توسط Griffitt و همکاران در سال ۲۰۰۸ صورت گرفت، ماهی گورخری، دافنی و جلبک در تماس مستقیم با نانوذرات نقره، نانوذرات مس و نانوذرات دی اکسید تیتانیوم با سایز مشابهی قرار گرفتند؛ ولیکن میزان سمیت نانوذرات نقره و نانوذرات مس بسیار بیشتر از نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بود (Griffitt *et al*., 2008).

۱-۵-٤-۵ نانوذرات فلزی و حلالیت آنها

یکی از عواملی که سمیت نانوذرات فلزی را کنترل می نماید، رها سازی یونهای فلزی می باشد. با مقایسه مابین نانوذرات و میکروذرات و ماکرو ذرات، به دلیل افزایش سطح در مقیاس نانو، جایگاه بیشتری برای انجام تبادلات وجود دارد در نتیجه یونهای بیشتری رها می گردند. یونهای فلزات ردوکس فعال، ممکن است عملکرد رادیکالهای آزاد و القاء استرس اکسیداتیو داخل سلولی را تشدید نمایند. تولید رادیکالهای هیدروکسیل می تواند از طریق واکنش زیر توجیح گردد:

$$Cu(I) + H_2O_2 \rightarrow Cu(II) + OH^{\circ} + OH^{-}$$

یونهای Cu(I) در حضور آنتی اکسیدانهایی نظیر اسکوربیک اسید یا گلوتاتیون (GSH) به Cu(II) تبدیل می شود. در نتیجه رادیکالهای هیدروکسیل فعال از پراکسید هیدروژن به وجود می آیند (Mortimer, 2011).

[5] Single-wall C nano-tube
[6] Multi-wall C nano-tube

۱-۵-۵ تاثیرات نانوذرات بروی غشاء سلول

۱-۵-۵-۱عبور نانوذرات از غشاء سلول

به سبب برخی از کاربردهایی که نانوذرات در صنایع دارویی و مواد ژنتیکی دارند، برای ورود به سلول طراحی می گردند. به عنوان مثال برخی از نانوذرات فلزی با موادی نظیر سورفاکتانت، پلی مرها و یا گروههای کی لیت[۷] کننده پوشش داده می شود که پراکنش مناسب پیدا کنند. یا اینکه بیومولکولهای نظیر آنتی بادی ها، پپتیدها و یا آنزیمهایی در سطح نانوذره تعبیه می گردد تا انتقال به سلول هدف تسهیل گردد. نانوذرات مختلف مکانیسمهای متفاوتی در ورود به سلول دارند. که شامل موارد ذیل می باشد:

- فاگوسیتوز
- ماکروپینوسیتوز
- اندوسیتوز

۱-۵-۵-۲ نفوذ مستقیم به سلول

ذراتی که دارای شارژ مثبت هستند توسط سلول راحتر جذب می گردند و توجیح علمی آن بدین شرح است: غشاء سلول دارای بار منفی است وبه این ترتیب واکنش الکترواستاتیک در سطح سلول اتفاق می افتد و نانوذرات به داخل سلول کشیده می شوند. ایجاد تغییر در شارژ سطحی و گروههای کاربردی مقدار جذب سلولی را به حداکثر می رساند و ممکن است در درمان بافتهای سرطانی مفید واقع گردد. ذرات کاتیونی که دارای فعالیت بالا می باشند نسبت به ذرات آنیونی سمی تر هستند (Mortimer, 2011).

نانوذرات ممکن است آسیب مستقیم بروی ترکیب غشاء سلولی داشته باشند. همچنین می توانند تعادل داخل سلولی را پس از عبور از غشاء برهم بزنند. برخی از نانوذرات کاتیونی می توانند جذب گروههای لیپیدی غشاء گردند و به داخل سلول آندوسیتوز شده و وارد یک لیزوزم اسیدی میشوند. این مواد در عملکرد لیزوزم اختلال به وجود می آورند و پمپهای پروتونی را از کار می اندازند. در نتیجه یونهای آنیون Cl^- و آب همزمان به همراه نانوذرات وارد پمپهای لیزوزوم می شوند. به دلیل آسیب لیزوزم نانوذرات به داخل سیتوپلاسم رها می شوند. یکی از راههای دفاعی سلول برای کاهش سمیت سلولی ، دفع نانوذرات از طریق اگزوسیتوز می باشد. شکل۱-٤ به شرح واکنشهای محتمل بین نانوذرات و سلول زنده می پردازد (Li *et al.*, 2015).

[7] Chelation

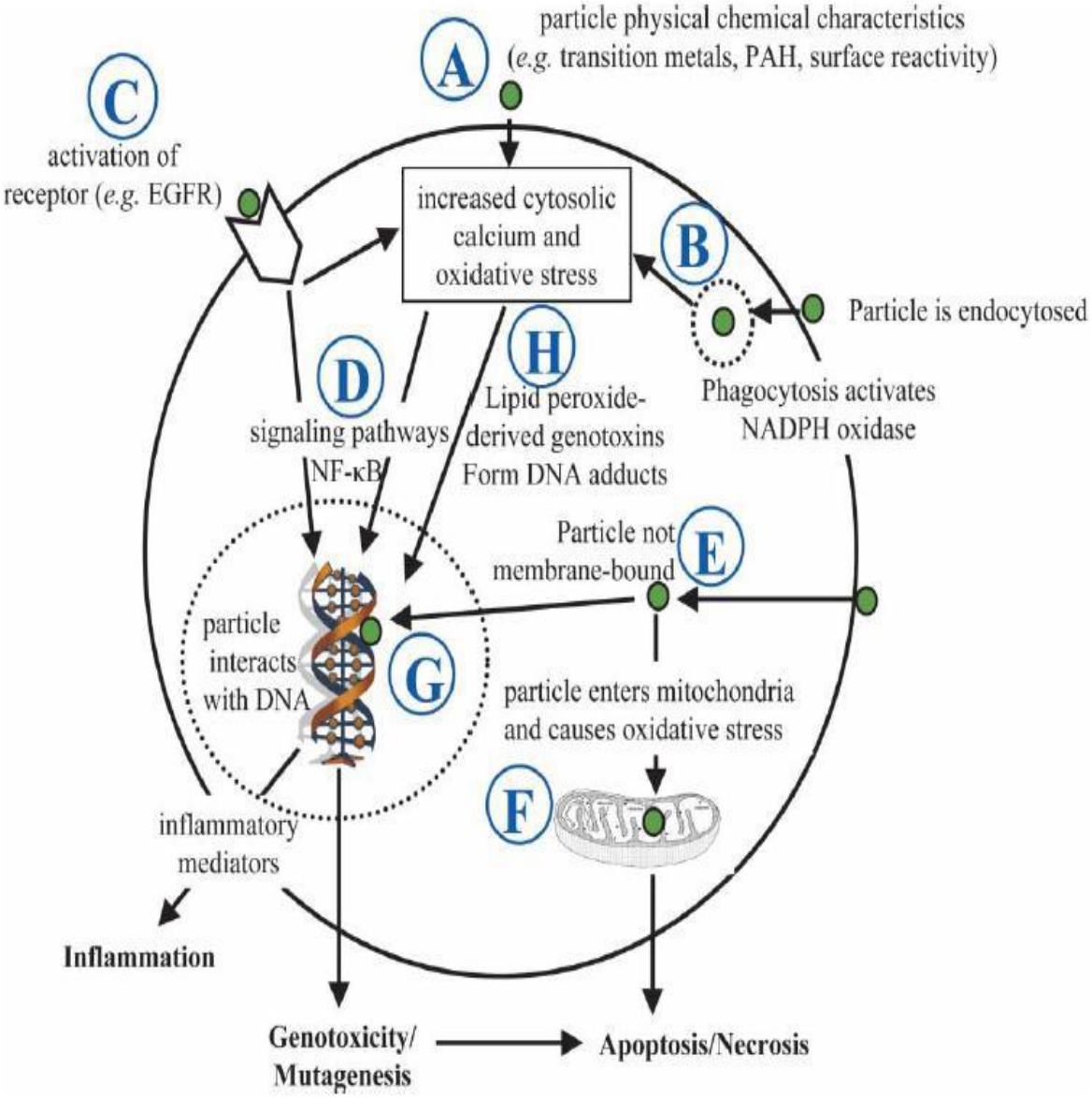
۱-۵-۵-۳ تاثیر وجود مواد آلی طبیعی (NOM[8]) یا بیومولکول ها در ورود نانوذرات به غشاء

تنوع در سایز و یا میزان آبگریزی نانوذره واکنش سلول و آسیب سلولی را تحت تاثیر قرار می دهد. اگر ترکیبات آلی طبیعی در محیط آب، فراوان باشند، با نانوذرات ترکیب میشوند از اینرو اکتیویته و انرژی سطحی نانوذره را کاهش می دهند در نتیجه ورود این مواد به سلول را کاهش می دهند و آسیب سلولی کمتر می شود (Li *et al.*, 2015)

۱-۵-۵-٤ سیالیت غشاء مولکولی و القاء سمیت نانوذرات

غشاء سلول ساختاری پویا و سیال است که از پروتئین و لیپید تشکیل شده است و بیشتر این مولکولها توانایی حرکت در چهارچوب غشایی را دارند. سیالیت باعث سهولت حرکت و نشان دهنده اهمیت ویسکوزیته غشاء است. خاصیت سیال بودن غشاء های زیستی برای بسیاری از عملکردهای سلولی ضروری می باشد. حتی تغییرات اندکی در سیالیت غشاء باعث بروز بیماری می شود. نانوذرات می توانند میزان سیالیت غشاء را تحت تاثیر قرار دهند (Mortimer, 2011).

[8] Natural Organic Matter



شکل ۱-٤ پتانسیل تاثیرات نانوذرات بر سلول را با تاکید بر استرس اکسیداتیو و اثرات نهایی آن (A) خواص ذره ای نانوذرات باعث القاء پراکسیداسیون لیپید ها، استرس اکسیداتیو داخل سلولی و افزایش غلظت یونهای کلسیم می گردد. (B) نانوذرات ممکن است به راحتی آندوسیتوز گردند. سلولهای فاگوسیتوز کننده باعث فعال شدن NDAPH اکسیداز می گردند و ROS به وجود می آورند. (C) ذرات و فلزات وابسته به آنها به سبب استرس اکسیداتیو گیرنده های EGFR را فعال می کنند. (D) در اثر استرس اکسیداتیو گیرنده های سلولی تحریک می شوند و یون کلسیم در سلول افزایش می یابد در نتیجه نسخه برداری از ژنهای پیش التهابی فعال می شود و از فاکتورهایی نظیر NF-KB نسخه برداری می شود. (E) نانوذرات ممکن است از طریق انتقال غیر فعال وارد سلول شوند و غیر متصل به غشاء بافتی باقی بمانند و ممکن است وارد میتوکندری شوند. (G) ذرات آزاد ممکن است از طریق حفرات هسته وارد هسته سلول شوند و با مواد وراثتی سلول واکنش دهند. (H) مشتقات حاصل از پراکسیداسیون لیپید ها نظیر 4-hydroxynonenal ممکن است منجر به جهش ژنتیکی و سمیت ژنی گردند (Oberdörster *et al*., 2005).

۱-۵-٦ مکانیسم فعالیت های مخرب نانوذرات

در این قسمت به توضیح پیرامون مکانیسمهای محتمل عملکرد نانوذرات در مواجهه با سیستمهای زیستی می پردازیم.

استرس اکسیداتیو یکی از مهمترین پتانسیلهای ایجاد سمیت توسط نانوذرات می باشد. سه سناریو اساسی در القاء ROS[9] در جانداران پرسلولی توسط نانوذرات طراحی شده است:

۱. استرس اکسیداتیو ممکن است به دلیل خواص ردوکس فعال[10] در سطح نانوذره به وجود آید.
۲. پایداری زیستی[11] نانوذرات در سلول باعث بروز التهاب می شود که تولید ROS را القاء می کند.
۳. زمانی که نانوذرات به داخل سلول راه پیدا می کنند، به ارگانل های زیر سلولی نظیر میتوکندری آسیب می رسانند و در زنجیره انتقال الکترون اختلال به وجود می آورند که در نهایت ROS بوجود می آورد.
٤. البته نانوذرات فلزی ممکن است به دلیل رها سازی یونهای فلزی که از سطح نانوذره جدا می شود، ROS را تولید کنند (Lee *et al*., 2007).

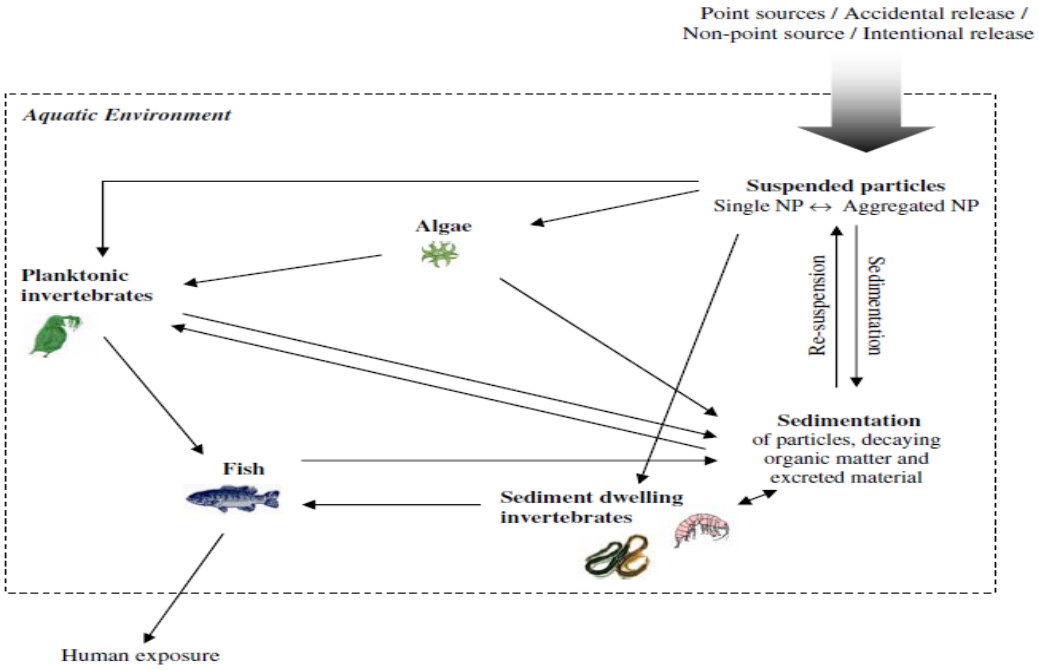
[9] Reactive Oxygen Species

[10] ردوکس توعی از ترکیب شیمیایی است که در آن بین دو ماده الکترون به اشتراک گذاشته می شود و با گرفتن و یا از دست دادن الکترون ترکیب ماده تغییر می یابد.

[11] Biopresistent

۱-۵-۷ نانوذرات در محیط های آبی

محیط های آبی روزانه مقدار متناوبی از آلاینده های محیطی دریافت می کنند. این آلاینده ها توسط رسوبات، ذرات معلق و یا منابع غذایی و بسته به اینکه نحوه تغذیه و چرخه زندگی موجود زنده به چه صورت باشد، دراختیار موجود زنده قرار می گیرند (شکل ۱- ۵). سیستم های آبی شامل مواد کلوئیدی[۱۲] پیچیده طبیعی هستند. از این دست می توان به مواد معدنی، آهن، اکسید های منگنز و مواد آلی که شامل ترکیبات هومیک، پروتئین ها و پپتیدها اشاره کرد. فعالیت بالای نانوذرات باعث می شود که این ذرات به راحتی با مواد آلی و غیر آلی ترکیب شوند و در ذرات کلوئیدی انباشته شده و از طریق آنها انتقال یابند. با توجه به خاصیت کلوخه شدن و تجمع پذیری نانوذرات به راحتی وارد رسوبات بستر می شوند. البته این فرایندها به عواملی نظیر دما، کشش یونی، pH، غلظت و اندازه ذرات بستگی دارد (**Navarro *et al.*, 2008**).



شکل ۱-۵ مسیرهایی که نانوذرات پس از رهاشدن در محیط های آبی تا رسیدن به موجود زنده طی می کنند (Baun *et al.*, 2008) .

[۱۲] کلوئید در سیستم های آبی به موادی با اندازه ما بین 1µm تا 1nm اطلاق می شود.

۱-۵-۸ مدلهای زیستی و علت انتخاب ماهی

در ارتباط با حضور و عملکرد آلاینده ها موجودات آبزی به عنوان گونه های آزمایشی مورد بررسی قرار می گیرند. زیرا نسبت به موجودات خشکزی و پستانداران نسبت به حضور آلاینده ها و سمیت آنها حساس تر می باشند. همچنین ظرفیت جداسازی و مهار کردن آنها نسبت به موجودات خشکزی بیشتر است از اینرو آنها می توانند مدلهای مناسبی برای بررسی آسیب های اکسیداتیو در شرایط حاد و یا غلظتهای تحت کشنده[۱۳] ، جهش های ژنی و سایر تاثیرات سو آلاینده ها باشند (Valavanidis *et al*., 2006). ماهی ها یکی از متنوع ترین گروههای دریایی محسوب می شوند که دارای کنج های اکولوژیک مختلف در محیطهای آبی بوده و نقش مهمی در انتقال انرژی در بین سطوح مختلف غذایی ایفا می کنند. بر این قاعده، آلاینده های محیطی در بدن ماهی ها تجمع می یابند و می توانند به کمترین غلظت از آلاینده ها و ترکیبات جهش زا پاسخ دهند. واکنش این گروه از موجودات به آلاینده ها همانند موجودات عالی تر می باشد. بنابراین آنها می توانند به عنوان یه گونه کلیدی در بررسی خطرات اکولوژیک مورد توجه قرار گرفته و نحوه اثر مواد بر روی این گروه می تواند دیدگاهی را در مودر سلامت کلی یک محیط آبی، ارائه نماید (Shaw *et al*., 2012).

۱-۵-۹ هیستوپاتولوژی

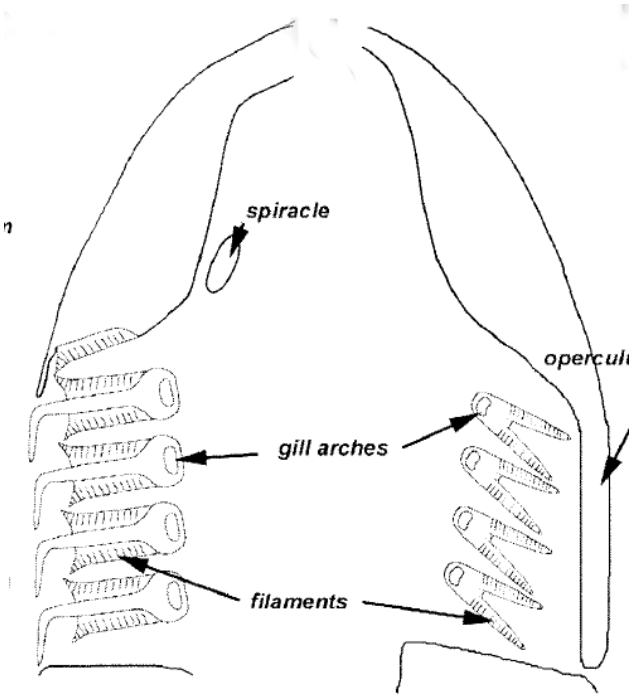
هیستوپاتولوژی علمی است که به مطالعه تغییرات میکروسکوپیک ساختاری و بافتی اندامهای مواجه شده با آلودگی ها و عوامل مختل کننده ی نظم طبیعی بدن می پردازد . هیستوپاتولوژی به دلیل هزینه های بالا عمدتا به عنوان ابزار استانداردی در پایش آلودگی های اکوسیستم های آبی استفاده نمی گردد، اما روش بسیار مناسبی برای درک اثرات آلاینده ها بر سلامت موجودات آبزی محسوب می گردد. مورفولوژی تغییر یافته اندامها و یا تغییر ساختار آنها یکی از نمودهای پروسه های بیماری است که توسط پاتولوژیستها بررسی می گردد. هیستوپاتولوژی بررسی میکروسکوپیک این روندهای بیماری است.

[13] sublethal

آبشش ها دارای سطح بسیار وسیعی هستند، گاهی این سطح حتی به ۱۰ برابر کل سطح بدن می رسد. علاوه بر این ، سطح تنفسی لاملاها توسط اپیتلیوم بسیار نازکی پوشیده شده است که به راحتی تحت تاثیر آلاینده های محیطی قرار می گیرد (Wilson & Laurent, 2002). آبشش ها اندامی چند منظوره هستند، این اندامها علاوه بر عملکرد تنفسی در بسیاری از عملکدهای تنظیمی بدن نظیر تنظیم اسمزی ، دفع مواد زاید نیتروژنی و نیز در تنظیم تعادل اسیدی – بازی بدن نقش دارند (شکل۱-٦). اپیتلیوم آبشش ها به سرعت نسبت به عوامل مختلف مختل کننده ی تعادل محیط اطرافشان پاسخ می دهند و دچار تغییرات مختلف فیزیولوژیک و یا مورفولوژیک می شوند. چنین پاسخهایی عمدتآ عملکردهایی در برابر آلودگی ها به شمار می روند. اپیتلیوم آبشش ها جایگاه تبادل گازها، تنظیم یونی، حفظ تعادل اسیدی-بازی و نیز دفع مواد زاید نیتروژنی است. سه پروسه آخر توسط انتقال فعال یا غیر فعال بسیاری از محلول ها از خلال غشای پلاسمایی کنترل می شوند. آلاینده های مختلف محیطی (مانند فلزات سنگین ، بارانهای اسیدی و..) سبب ایجاد تغییر در مورفولوژی اپیتلیوم آبششی می شوند.سیستم تنفسی سطح گسترده ای میان ماهی و آب پیرامونی ایجاد می کند که مشخصآ اولین جایی است که توسط آلاینده ها مورد تهاجم قرار می گیرد. به دلیل فعالیت های مهمی که آبششها انجام می دهند، این اندامها یکی از بهترین شاخصهای سلامت و کیفیت آب به شمار می روند. در مواجهه بافت آبششی با آلاینده های مختلف آسیبهای بافتی مانند هیپرتروفی و هیپرپلازی سلول های سنگفرشی، فیوژن و چسبندگی لاملاها، هایپرپلازی سلول های موکوسی در بافت آبشش گزارش شده است (Bahuguna *et al*., 2014) .

آبشش ها از چهار جفت کمان آبششی (Gill arch) تشکیل شده اند. هر کمان توسط اسکلتی غضروفی و استخوانی همراه با ماهیچه های مخطط نزدیک کننده و دور کننده حمایت می شود که ایجاد کننده حرکت این بخشها جهت انجام بهتر تنفس می باشند. آبششها توسط سرپوش آبشش (operculum) پوشیده و محافظت می شوند. هر کمان آبششی حاوی رشته های آبششی است که هولوبرانش (holobranch) نامیده می شوند. هر هولوبرانش از دو نیمه به نام همی برانش (hemiberanch) تشکیل می شود. هر همی بانش حاوی تعداد زیادی برجستگی های ظریف است که تیغه های آبششی یا لاملا (lamellae) نامیده می شوند. حضور این برجستگی ها موجب افزایش سطح اپیتلیموم آبششی شده و عملکرد تنفسی و ترشحی آن را گسترش می دهد. رشته های آبششی دارای یک محور مرکزی غضروفی می باشند که در کنار آن مویرگهای آوران (afferent) و وابران (efferent) قرا گرفته اند (Wilson & Laurent, 2002). سطح این بخشها از اپیتلیوم سنگفرشی نازکی پوشیده شده است که دنباله ی سطح پوشاننده ی کمان آبششی و حفره ی دهانی می باشد. سطح بیرونی تیغه های آبششی از سلول های سنگفرشی نازکی پیوشیده شده است که توسط سلولهای ستونی شکل پیلار به هم متصل شده اند.

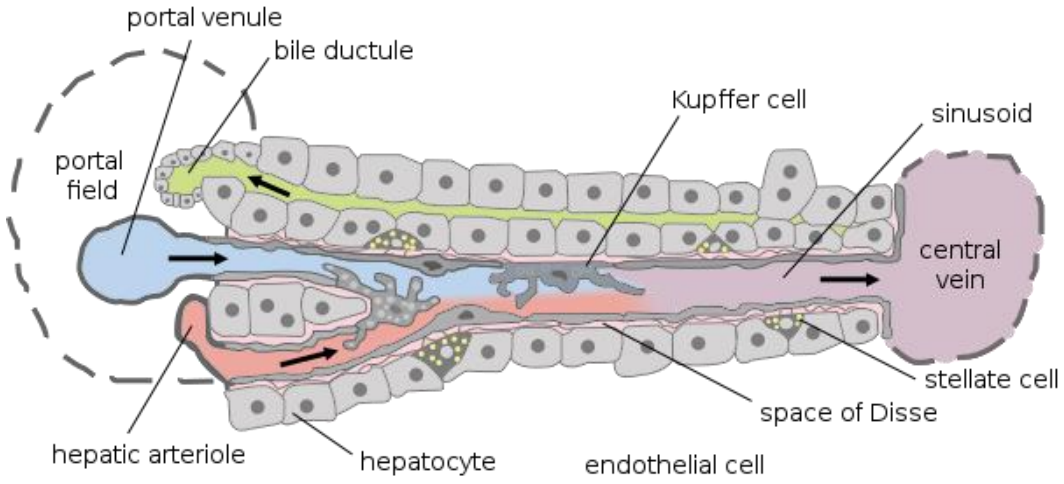
فضای بین سلول های پیلار ، لاکونا (lacunae) نامیده می شوند که محل ارتباط مویرگهای آوران و وابران می باشند. سلولهای پیلار قابل انقباض هستند و با انقباظات خود قطر فضای لاکونا را جهت تنظیم میزان خون عبوری تعدیل می کند. سلولهای کلراید که توسط سلول های سنگفرشی احاطه شده اند، به طور ویژه در پایه لاملا قابل مشاهده هستند. این سلول ها نقس اصلی را در تنظیم اسمزی و یونی توسط آبشش ایفا می کنند. سلول های موکوسی بخش جدایی ناپذیر اپی تلیوم آبششی هستند. بروی کمانهای آبششی در سطح مقابل رشته های آبششی برجستگی هایی وجود دارد که خارهای آبششی (gill racker) نامیده می شوند. این خارها جهت جلوگیری از ورود مواد غذایی از حفره ی دهانی- حلقی به محفظه ی آبششی به کار گرفته می شوند. خارهای آبششی نسبتا بلند بوده و نسبت به هم به صورت فاصله دار قرار گرفته اند. هر خار آبششی از یک تیغه ی غضروفی که توسط اپی تلیوم مطبق و بافت پیوندی محافظت می شود (Bahuguna *et al*., 2014) .



شکل ۱ – ٦ ساختار آبشش ماهی (Wilson & Laurent, 2002)

کبد بزرگترین غده ی ضمیمه دستگاه گوارش است و وظایف مختلفی بر عهده ی آن می باشد که مهمترین آنها عبارتند از سنتز و ترشح صفرا، خنثی کردن سموم، خنثی کردن فضولات باقیمانده از مواد متابولیت، برداشتن گلبولهای قرمز فرسوده از خون، سنتز برخی از پروتئینهای پلاسما.....سلولهای کبدی یا هپاتوسیت ها[14]، سلولهای درشت و چند سطحی هستند که یک یا دو هسته ی مدور واضح در وسط دارند، اندازه ی برخی از سلول های کبدی ممکن است خیلی بزرگتر از هپاتوسیتهای دیگر بوده و هسته کاملا درشتی داشته باشند (شکل۱-۷). به طور کلی با رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین سیتوپلاسم هپاتوسیت ها دانه دار است. این منظره به علت وجود میتوکندریهای زیاد و شبکه ی اندوپلاسمی می باشد. در فاصله بین صفحات سلول های کبدی ، شکافهای واضحی با منظره ی شعاعی دیده می شود که به سینوزوئید معروف اند. سینوزوئید ها مویرگ های مخصوص پیچ و خم داری هستند که از مرکز لوبولهای کبدی تا ورید مرکز لوبولی در جهت شعاعی قرار گرفته اند (Hoehne–Reitan and Kjørsvik, 2004).

.



شکل۱-۷ ساختار هپانوسیت های کبدی (Frevert & Engelmann, 2000)

[14] Hepatocyte

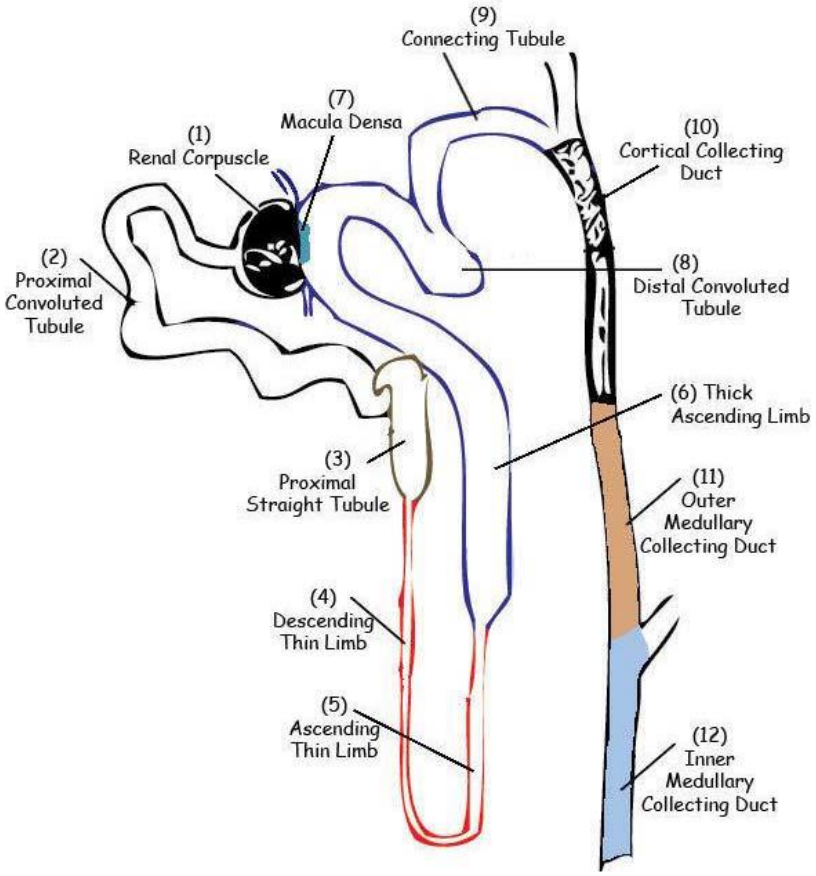
بافت کبد یکی از مهمترین بافتهای دخیل در فرآیند سمیت زدایی آلاینده های مختلف محسوب می شود. این در حالی است که بسیاری از سموم و آلاینده ها می توانند خود منجر به ایجاد آسیب بافتی در بافت کبد گردند که از این منظر آسیبهای نظیر سرکوب فعالیت آنزیمهای کبدی، کاهش ذخیره گلیکوژنی کبد، تجمع ذرات لپیدی در کبد، دژنرسانس بافت چربی، پرخونی ، خونریزی ، نکروز بافت کبدی، هجوم لنفوسیتها، تورم کپسول کبدی، ادم هپاتوسیتها، در مواجهه ماهی ها با آلاینده های گوناگون گزارش شده است (Frevert and Engelmann, 2000).

وظیفه ی این اندام شامل جذب نوترینت ها، تولید صفرا، سم زدایی، حفظ هموستاز متابولیک بدن ، شامل کنترل متابولیسم کربوهیدراتها، پروتئین ها، لیپیدها و ویتامین ها می باشد. کبد همچنین نقش مهمی در سنتز پروتئین های پلاسما مانند آلبومین، فیبرینوژن به عهده دارد. این اندام توسط کپسولی از جنس بافت پیوندی فیبری احاطه شده است. بافت پارانشیم کبد اصولا از سلولهای هپاتوسیت [15]که دارای هسته های مرکزی می باشند، تشکیل شده است. سینوزوئیدها توسط لایه ی نازکی از یک ردیف سلول اندوتلیال پوشیده شده اند. هسته های این سلول های اندوتلیال کشیده اند و به طرف فضای داخلی سینوزوئید برجسته شده اند. این اندوتلیوم توسط منافذ بسیار ریزی به شکل سوراخ درآمده است. مجاری صفراوی نیز در پارانشیم کبد دیده می شود.مجاری بزرگتر از به هم پیوستن مجاری کوچکتر شکل می گیرند. این مجاری، صفرای تشکیل شده را به کیسه ی صفرا می ریزند. که توسط اپیتلیوم سنگفرشی مطبق کاذب پوشیده شده است. در نهایت صفرای ذخیره شده در کیسه صفرا به ابتدای می ریزند. مجاری کوچک صفراوی در کبد توسط یک لایه اپیتلیوم مکعبی پوشیده شده است. اما مجاری بزرگتر ممکن است توسط بافت پیوندی و یا حتی لایه ایی از بافت عضلانی احاطه شده باشد.در کبد حالت لوبوله نظیر آنچه که به طور مشخص در پستانداران دیده می شود، وجود ندارد. در بخش انتهایی بافت کبد بافت هپاتوپانکراس وجود دارد، سلولهای اگزوکرین بافت پانکراس که در لابلای هپاتوسیتها پراکنده هستند، دارای تعداد زیادی وزیکولهای ترشحی ائوزینوفیل در سیتوپلاسم خود می باشند. این وزیکولها حاوی آنزیم هایی جهت هضم پروتئین ها، کربوهیدراتها، لیپید ها و نوکلئوتید ها می باشند (Harder, 1975).

کلیه و سیستم دفع مواد زائد نیز یکی از مهمترین بخشهای بدن در زمینه ی حفظ وضعیت هموستاتیک بدن (از نظر آب و مواد معدنی،یونها و سموم ...) به شمار می رود. کلیه در ماهیان تلئوست اندامی متشکل از بافتهای

[15] Hepatocytes

هماتوپویتیک، فاگوسیتیک، اندوکرین و عوامل ترشحی است. بخش ترشحی کلیه متشکل از لوله ها و مجاری کلیوی است. در هر بخش سلولهای مخصوصی دیده می شود که در ترشح و باز جذب مواد مختلف نقش دارند. این سلول ها تحت تاثیر سموم و آلاینده های مختلف دستخوش تغییر و آسیب می شوند، به همین دلیل مطالعه بافت کلیوی در بررسی آسیبهای ناشی از آلاینده های محیطی نقش به سزایی ایفا می کند. به بیانی دیگر این باور وجود دارد که کلیه ها اندیکاتورهای حساسی نسبت به آلاینده های محیطی به شمار می روند. زیرا به عنوان یکی از اصلی ترنی اندامهای تنظیم اسمزی و سیستم ایمنی در ماهی ها به شمار می روند. به عنوان مثال، چروکیدگی در گلومرول، افزایش فضای کپسول بومن، تخریب بافتی توبولهای پروکسیمال کلیه و.... از مواجهه ی ماهیان با آلاینده ها مختلف گزارش شده است(Harder, 1975). بافت کلیه بلافاصله پس از محفظه آبششی و از ابتدای بخش تنه آغاز می شود و زیر ستون مهره ها می باشد. در بخشهایی این بافت به دو قطعه ی مجزا تقسیم شده و در بخشهایی پیوسته می باشد. واحد عملکردی کلیه نفرون نام دارد. هر نفرون از یک بخش متسع ابتدایی به نام کپسول بومن تشکیل شده است که در بر گیرنده ی یک شبکه ی مویرگی به نام گلومرول می باشد. وظیفه ی این بخش تصفیه ی خون از مواد زائد می باشد. پس از این قسمت، مجموعه ای از توبولهای کلیوی قرار دارند که وظیفه ترشح و بازجذب مواد را به عهده دارند و در نهایت مجاری انتهایی به عنوان مجرای جمع کننده ادرار قرار گرفته است که ترکیب نهایی ادرار را تعیین می کنند (شکل۱-۸). در بافت کلیوی، توبولها توسط بافت interstitial احاطه شده اند. شبکه گلومرولی در داخل کپسولهای بومن توسعه یافته است و گلبولهای قرمز خونی و هسته های سلولهای پودوسیت در داخل آنها قابل تشخیص است. همچنین تعداد زیادی توبولهای پروکسیمال و دیستال و نیز توبول جمع کننده ، در داخل بافت کلیه مشاهده می گردد. توبولهای جمع کننده، مجاری وسیع تری نسبت به سایر توبولها داشته و اپیتلیوم آنها از سلولهای مکعبی ساده و کوچک تشکیل شده است که هسته های گرد ودرشت مرکزی دارند (Frevert & Engelmann, 2000).



شکل ۱-۸ ساختار نفرون کلیوی (Gilbert, 2012)

۱-۵-۱۰ تغییرات آنزیمهای اکسیداتیو

رادیکالهای اکسیژن یا گونه های اکسیژن فعال (ROS)[16] در بدن موجوداتی که تنفس هوازی دارند، به وجود می آیند. این مواد طی واکنشهای تنفسی و یا ترکیبات فتوشیمیایی در چرخه انتقال الکترون در میتوکندری ساخته می شوند. اما واکنشهایی آنزیمی نظیر سیتوکروم p-450، اکسیدازها، پراکسیدازها، لیپوژنازها، دی هیدروژنازها این فرآیندها را تعدیل می نمایند. کاهش متوالی اکسیژنهای مولکولی تعدادی از گونه های فعال را به وجود می آورد که شامل هیدروژن پراکسید، هیدروپرواکسید آلی (نیمه عمر آن در حد دقیقه است)، آنیونهای سوپراکسید(نیمه عمر آن یک میکروثانیه است)، رادیکالهای هیدروکسیل (نیمه عمر آن در حد نانوثانیه است) می باشد. یک محرک فیزیولوژیک عادی می تواند باعث بوجود آمدن استرس و در نهایت تولید ROS گردد.

[16] Reactive Oxsygen Species

ROSها دارای علائم داخل و خارج سلولی می باشد که واسطه مورد نیاز در فعال سازی آنزیمی می باشد. به عنوان مثال در شرایط هیپوکسی و یا هیپراکسی ناشی از حضور آلاینده های گزنوبیوتیک و یا به دلیل حضور عوامل بیماریزای مهاجم، ROS به مقدار زیادی در سلول ساخته می شود. در شرایط عادی آسیبهای ناشی از ROS توسط سیستمهای آنتی اکسیدان کنترل می گردد. سیستمهای آنتی اکسیدان شامل عوامل آنزیمی و غیر آنزیمی می باشند (Mortimer, 2011).

مهمترین آنزیمهای آنتی اکسیدان سلولی شامل:

۱. سوپراکسید دیسموتاز (SOD) که سوپراکسید را به هیدروژن پراکسید و اکسیژن کاتالیزه می کند.
۲. کاتالاز (CAT) که هیدروژن پر اکسید را به آب و هیدروژن تبدیل می نماید.
۳. گلوتاتیون پراکسیداز که هیدروپراکسیده شدن چربی ها را کاهش می دهد.

مهمترین آنتی اکسیدانهای غیر آنزیمی شامل:

۱. α – tocopherol
۲. اسکوربیک اسید (ویتامین C)
۳. گلوتاتیون

زمانی که تولید رادیکالهای اکسیژنی افزایش می یابد، مواد سمی در سلول بیشتر می شود. در نتیجه استرس اکسیداتیو رخ می دهد. به تعریف کامل تر، بر هم خوردن تعادل مابین تولید ROS و توانایی سیستمهای زیستی در سم زدایی و بازسازی نتایج آسیب، منجر به استرس اکسیداتیو می گردد (Mortimer, 2011). بررسی میزان تغییرات آنزیمهای اکسیداتیو می تواند یکی از راههای شناسایی آسیب ناشی از آلاینده های گوناگون می باشد.

۱-۵-۱۱ بررسی تخریب **DNA** سلولی و آزمون کامت قلیایی (آزمون ژل الکتروفورز تک سلولی[۱۷])

ترکیبات شیمیایی پایداری های مختلفی را در محیط دارند و می توانند خاصیت جهش زایی داشته باشند. منظور از سمیت ژنتیکی توانایی یک عامل در ایجاد آسیب به ساختارهای ژنتیکی به صورت مستقیم ویا غیر مستقیم می باشد.منظور از تخریب DNA، شکست تک رشته ای و باز شدن دو رشته آن از یکدیگر می باشد که می تواند به عنوان شاخص زیستی برای سمیت ژنتیکی به کار رود. شکست تک رشته ای DNA، معمولا با روشهایی که

[17] Single Cell Gel Electrophoresis

شرایط قلیایی با pH بالا دارند، قابل اندازه گیری بوده و چنانچه در جفت شدن بازهای DNA با قلیا، گسیختگی ایجاد شود، می توان این از هم گسیختگی را به صورت تک رشته ای آشکار سازی نمود (lee & Steiner, 2003).

آزمون کامت قلیایی، روشی سریع و ارزان برای بررسی آسیب DNA است. برخی از مهمترین مزیت های آزمون کامت جهت سنجش میزان تخریب DNA شامل:

- نشان دادن آسیب ژنتیکی در سطح سلول
- امکان ارزیابی انواع سلول های یوکاریوتی به وسیله این آزمون
- نیازمند به تعداد کمی از سلول می باشد.
- حساس، سریع و ارزان می باشد (Frenzili *et al*., 2009) .

روش کلی آزمون کامت به قرار زیر است: تعداد کمی از سلولها در مقداری آگارز مخلوط می شودو بر روی لام قرار می گیرند.در طی انجام مرحله لیز سلولی ، پروتئین ها از بین می روند و DNA از هسته سلول مهاجرت می کنند. در مرحله الکتروفورز مولکولهای DNA شکسته شده، می تواند در میدان الکتریکی نسبت به مولکول سالم مهاجرت می کنند، سپس نمونه ها بوسیله یک نوع رنگ، رنگ آمیزی می شوند که در این صورت در زیر میکروسکوپ فلورسنت قابل مشاهده می باشند. در زیر میکروسکوپ نمونه های آسیب دیده به صورت ستاره های دنباله دار(کامت) مشاهده می شوند. در قسمت قدامی DNA آسیب ندیده است و دارای یک بخش دم می باشد که شامل DNA آسیب دیده می باشد . هر چقدر اندازه دم کامت طولانی تر باشد، میزان تخریب بیشتری درDNA صورت گرفته است (Frenzili *et al*., 2009).

فصل دوم: پیشینه تحقیق

در زمینه بررسی اثرات نانوذرات بر آبزیان به ویژه ماهیان مطالعات مختلفی در ایران و نیز سایر کشورهای مختلف دنیا صورت گرفته است. اما در زمینه تاثیر نانوذرات مس بر روی ماهی کلمه در ایران هیچگونه پژوهشی صورت نگرفته است. لذا در این بخش به ذکر پژوهشهای مشابهی که در ایران صورت گرفته است می پردازیم.

۲-۱ تحقیقات صورت گرفته در ایران

Khabazi وهمکاران (۱۳۹۳)، به بررسی اثرات نانوذرات اکسید مس بروی بافت آبشش ماهی قزل آلای رنگین کمان پرداختند. به این منظور ماهیان را به مدت یک هفته در معرض غلظتهای۲۵، ۳۰، ۵۰، ۱۰۰ میلیگرم در لیتر از نانوذرات اکسید مس قرار گرفتند. در پایان این مدت آسیب های بافتی شامل هیپر پلازی، تورم، برآمدگی اپیتلیوم، آنوریسم لاملایی و نفوذ گلبول سفید مشاهده گردید.

احمدی و همکاران (۱۳۹۳)، به بررسی اثرات نانوذارت اکسید مس بر فاکتورهای خونی ماهی کپور معمولی پرداختند . بدین منظور بچه ماهی های کپور انگشت قد را در معرض غلظتهای ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ ppm به مدت ۹۶ ساعت قرار دادند. در پایان هر روز فاکتورهای خونی مورد بررسی قرار می گرفت. نتایج حاکی از آن بود که نانوذرات اکسید مس به طور معنی داری بر هموگلوبین، هماتوکریت و شاخص های خونی تاثیر گذار می باشد و باعث کم خونی وکاهش هماتوکریت می گردد.

ایمانی و همکاران (۱۳۹۵)، اثرات نانوذرات مس را بر بافت کبدی و پارامترهای بیوشیمیایی در ماهی قزل آلای رنگین کمان مورد بررسی قرار دادند. بدین منظور بچه ماهیان را به مدت ۲۱ روز در معرض غلظتهای ۲۵و ۵۰ ppb از نانوذرات مس قرار دادند. در روز ۲۱، نمونه برداری از تیمارهای مورد نظر انجام شد. نتایج حاکی از آسیب شدید سلولهای کبدی ناشی از وجود نانوذرات مس بود. همچنین افزایش میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون و کاهش حجم هماتوکریت و افزایش گلبولهای سفید و لنفوسیت ها گردید.

باقر زاده لاکانی و همکاران (۲۰۱۶)، بروی انباشتگی زیستی نانوذرات مس بر بافت آبشش، روده ، کبد و ماهیچه ماهی Siberian sturgeon تحقیق نمودند. سه غلظت ۵۰ –۱۰۰–۲۰۰ میکروگرم بر لیتر از نانوذرات مس

تهیه گردید و ماهی های جوان به مدت ۱٤ روز در معرض قرار گرفتند و ۱٤ روز نیز مدت زمان ریکاوری در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد که در بافتهای یاد شده انباشتگی زیستی وجود داشت و حتی پس از طی زمان ریکاوری انباشتگی در بافت تیمارها بیشتر از بافت شاهد نشان داده شد.

۲-۲ تحقیقات صورت گرفته در خارج از ایران

در پژوهشی که توسط Yeo و همکاران در سال ۲۰۰۸ صورت گرفت، اثرات نانوذرات مس به همراه اکسید تیتانیوم بروی لارو یک روزه ماهی گورخری مورد بررسی قرار گرفت.آسیب های شدیدی در روند رشد لاروهای یک روزه که در غلظتهای ۱۰ تا ۲۰ ppt از نانوذرات مس قرار گرفته بودند مشاهده شد. برخی از آنها فاقد روند شکل گیری سر بودند.

در پژوهش دیگری بر روی ماهی گورخری که توسط Griffit و همکاران (۲۰۰۸)، انجام شد، جهش ژنتیکی در بافت آبشش ماهی گورخری که در معرض نانوذرات مس (۰/۱ میلیگرم بر لیتر)، نانوذرات نقره (۱ میلیگرم بر لیتر) و نانوذرات اکسید تیتانیوم (۱ میلیگرم بر لیتر) گزارش گردید. نانوذرات مس و نقره قادرند مرگ و میر و آسیب بافتی در ماهی گورخری ایجاد نمایند.LC_{50} این نانوذرات برای ماهی گورخری ۱/۵ میلیگرم بر لیتر تعیین شده است.

در بررسی که توسط Zhao و همکاران (۲۰۱٤)، صورت گرفت، تاثیرات نیمه حاد نانوذرات مس بر رشد ماهی کپور در مدت ۳۰ روز مورد بررسی واقع شد. نتایج حاکی از آن بود که نانوذرات مس بروی رشد ماهی کپور تاثیر مستقیم دارند. همچنین روده و آبشش بیشترین تجمع از نانوذارت را در خود نشان دادند.

در تحقیقی که Shaw و همکاران در سال ۲۰۱۲ انجام دادند، تاثیر نانوذرات مس را با تاثیر محلول سولفات مس بروی ماهی قزل آلای رنگین کمان مورد مقایسه قرار دادند. انباشتگی مس در آبششها در تیمارهای سولفات مس از روز چهارم مشاهده گردید، در حالیکه در تیمارهای حاوی نانوذرات مس از روز دهم انباشتگی مس مشهود بود. در فاکتورهای خونی و سدیم پلاسما در هر دوگروه نسبت به گروه شاهد تفاوت مشاهده گردید. نتایج حاکی از آن بود که تاثیرات نانو ذرات مس با شدت کمتری ، مشابه تاثیرات تیمارهای سولفات مس می باشد.

در تحقیقی که در سال ۲۰۱٤ توسط Hua و همکاران، بروی جنین ماهی گورخری صورت گرفت، سه سایز از نانوذرات مس (25-50–100 nm) در معرض تخم های ماهی گورخری واقع شد. ناهنجاری های ظاهری و رفتاری در جنین های ماهی گورخری مشاهده شد و ذرات با سایز کوچک تر سمیت بیشتری نسبت به ذرات

بزرگتر از خود نشان دادند. غلظت کشنده برای ذرات 25-50-100 nm به ترتیب 0.58 mg/l، 1.65 mg/l، 1.90 mg/l گزارش گردید.

در تحقیقی که توسط Ostaszewska در سال ۲۰۱۵ صورت گرفت، تاثیرات نانوذرات مس و نقره بروی پوست، آبشش و کبد در ماهی Siberian sturgeon بررسی گردید و یافته ها بدین شرح می باشد: LC_{50} در مدت ۹۶ ساعته نانوذرات مس 0.21 ±1.41 mg/l تعیین شد. سپس ماهیها در سه غلظت ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱۵ میلیگرم بر لیتر از نانوذرات مس به مدت ۲۱ روز قرار گرفتند. نتایج حاکی از آن بود که نانوذرات مس ونقره بروی رشد، طول و توده بدن، مورفولوژی و فیزیولوژی آبشش، کبد و پوست ماهی ها تاثیر منفی می گذارند.

در پژوهشی دیگر Wang و همکاران (۲۰۱٤)، تاثیر نانوذرات مس و سولفات مس را بروی ماهی *Epinephelus coioides* مقایسه و بررسی نمودند. ماهی ها به مدت ۲۵ روز در معرض دو غلظت ۲۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر از نانوذرات مس و سولفات مس قرار گرفتند. در هر دو حالت فعالیت آنزیمهای گوارشی (آمیلاز، لیپاز و پروتئاز) مختل گردیده بود. با افزایش غلظت مقدار پروتئین و لپید کاهش و میزان خاکستر و رطوبت افزایش یافته بود. در نهایت یافته ها حاکی از آن بود که نانوذرات مس اثاری شبیه سولفات مس از خود بر جای می گذارد. ولی سمیت یونهای مس بیشتر از نانوذرات است.

در سال ۲۰۱۳، Xia و همکاران به بررسی اثرات نانوذرات گوناگون بروی ماهی طلایی پرداختند و به این منظور ماهیان انگشت قد را در معرض غلظتهای متفاوت از نانوذرات اکسید مس و نانوذرات روی قرار دادند. نتایج حاکی از آن بود که نانوذرات فعالیت Na+/K+-ATPase، آنزیمهای استیل کولین استراز و سوپراکسید دیسموتاز به شدت در غلظتهای بالا مهار می گردید. فعالیت کاتالاز نیز به طبع آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز مهار شده بود. از اینرو نانوذرات مذکور برای ماهی سمی تلقی گردید.

پژوهشی که توسط Wang و همکاران در ۲۰۱٦ انجام گرفت، تاثیر نانوذرات مس و سولفات مس را بروی سلولهای کبدی کشت شده از ماهی *Epinephelus coioides* بررسی نمودند. به این منظور ماهیان را در معرض ۲/٤ میلیگرم بر لیتر از نانوذرات مس و سولفات مس به مدت ۲٤ ساعت، قرار دادند. نتایج حاکی از آن بود که در تیمارهای هر دو ماده، قابلیت زیستی سلول را تحت تاثیر قرار می دهد. میزان کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و غلظت گلوتاتیون در سلول های کبدی تحت تاثیر غلظتهای نانوذرات تغییر می کند. همچنین آپوپتوزیز و نکروز بافتهای کبدی با افزایش غلظت نانوذرات افزایش یافت.

در پژوهشی که توسط Song و همکاران در ۲۰۱۵ صورت گرفت، غلظت کشنده نانو ذرات مس برای سه گونه ماهی قزل آلای رنگین کمان، ماهی گورخری و Fathead Minnow بررسی شد. LC_{50} ۹٦ ساعته نانوذرات

مس برای ماهی قزل آلای رنگین کمان0.15 ± 0.68، برای ماهی گورخری 0.04 ± 0.28, برای ماهی Fathead Minnow 0.22±0.08 میلیگرم بر لیتر بود. با توجه به میزان غلظت کشنده نانوذرات مس پتانسیل تاثیرات منفی بروی ماهیان با حساسیت های مختلف را دارا می باشد.

Murugananthkumar و همکاران (۲۰۱٦)، تاثیر نانوذرات مس را بروی بافت بیضه گربه ماهی مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاکی از تاثیرات منفی نانوذرات بر سلولهای اسپرماتوگونی، باسال لامینا و در نهایت تخریب اسپرماتوسیت در ماهیانی که در معرض نانوذرات قرار گرفته بودند، بود.

Liu و همکاران (۲۰۱٤)، نانوذرات اکسید مس، نانوذرات طلا، نانوذرات اکسید روی و نانوذرات اکسید تیتانیوم را در معرض جنین ماهیان گورخری و همچنین دافنی قرار دادند. نتایج نشان داد که نانوذرات باعث کاهش میزان رشد جنین و طول بدن آنها می شوند. در طی ۲۱ روز آزمایش که دافنی در معرض سمیت حاد نانوذرات قرار گرفت درصد زادآوری به میزان قابل توجهی کاهش یافت. همچنین نانوذرات فعالیت آنزیمهای کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز و گلوتاتیون را مختل می نماید.

۲-۳ تحقیقات مرتبط با پژوهش حاضر

در پژوهش Salah و همکاران (۲۰۱۳)، ماهیهای تیلاپیا در معرض سه تیمار حاوی یونهای سرب، نانوتیوپهای کربن به همراه یونهای سرب و تیمار شاهد قرار گرفتند. و آسیبهای بافتی مورد بررس قرار گرفت. نتایج نشان داد که نانوذرات سرب باعث افزایش جذب یونهای سرب و در نتیجه افزایش آسیب بافتی در بافتهای کبد، کلیه و آبشش می گردند.

در پژوهش Mansouri و همکاران (۲۰۱۵)، ماهی گورخری در معرض نانوذرات اکسید کبالت و یونهای کبالت قرار گرفت. آسیبهای بافتی نظیر پرخونی ، هم جوشی، هیپرپلازی، ادم، چماقی شدن، در آبشش ماهیان مشاهده شد.

در پژوهش Mansouri و Johari (۲۰۱٦)، ماهی گورخری در معرض غلظتهای(0.0015, 0.00375, 0.0075, 0.015 mg/l) از نانوذرات نقره به مدت ٤ روز، قرار گرفت و نتایج بررسی های بافتی آبشش و بررسیهای میکروسکوپ الکترونی، نشان دهنده آسیبهای بافتی نظیر پرخونی، هم جوشی، هیپرپلازی، ادم، چماقی شدن، نکروز، آسیب سلولهای موکوسی و خونریزی بود.

Subashkumar & Selvanayagam (۲۰۱٤)، ماهی کپور معمولی را در معرض غلظت حاد نانوذرات اکسید روی قرار دادند. LC_{50} انوذرات اکسید روی برای ماهی کپور معمولی 4.897 mg/l گزارش گردیده است و همچنین

ماهیان در به مدت ۲۱ روز در معرض غلظتهای ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد LC_{50} قرار گرفتند. پس از طی این مدت آسیبهای آبششی در ماهیان مشاهده گردید.

Johnston و همکاران (۲۰۱۰)، تاثیر قابلیت دسترسی زیستی و عملکرد نانوذرات اکسید تیتانیوم، اکسید روی و اکسید سریوم را در ستون آب بروی ماهی مورد بررسی قرار دادند. بررسی های میکروسکوپ coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscope حاکی از آن بود که نانوذرات اکسید تیتانیوم بیشترین انباشتگی را در آبشش داشتند. نانوذرات اکسید سریوم بیشترین انباشتگی را در کبد و روده نشان دادند.

Choi و همکاران (۲۰۱۰)، ماهی گورخری را در معرض غلظتهایی از نانوذرات نقره قرار دادند و سپس متالوتیونین بافت کبدی را مورد بررسی قرار دادند. افزایش میزان متالوتیونین نشان دهنده آزاد شدن یونهای Ag^{+} از سطح نانوذارت نقره میباشد. همچنین فاکتورهای آپوپتوزیس در سلولهای کبدی مشاهده گردید. میزان malondialdehyde که یکی از متابولیتهای ثانویه حاصل از پراکسیداسیون لیپید هاست، همچنین گلوتاتیون کبدی افزایش یافته بود. همچنین بررسی نشانگر γ-H2AX که تعیین کننده شکست دورشته ای DNA می باشد، نشاندهنده میزان آسیب بر DNA سلولی می باشد. درنهایت نانوذرات نقره با القائ استرس اکسیداتیو و آپوپتوز سمیت خود را القاء می نمایند.

Bar-Ilan و همکاران (۲۰۰۹)، میزان LC_{50} نانوذرات نقره با اندازه بین ۳ الی ۱۰۰ نانومتر برای ماهی گورخری تعیین نمودند. نتایج نشان داد LC_{50} ذرات با اندازه 100 nm= 93.31 mg/l و3 nm=137.26 mg/l است و ذرات با اندازه کوچکتر دارای سمیت بیشتری می باشند.

Katuli و همکاران (۲۰۱٤)، نانوذرات نقره را با غلظت 2-4 mg/l در معرض ماهی گورخری به مدت دو هفته قرار دادند، نتایج حاکی از کاهش فعالیت Na(+)/K(+)ATPase و اریتروسیت acetylcholinestrase در بافت آبشش ماهی ها بود.

Cok و همکاران (۲۰۱۱)، به بررسی آسیب DNA ماهیان کپور دریاچه موگان به روش کامت قلیایی پرداختند. نتایج نشان دهنده افزایش میزان دنباله کامت ها در سایت های آلوده در مقایسه با مناطق عاری از آلودگی بود و روش مناسبی برای تشخیص مناطق آلوده به حساب آمد.

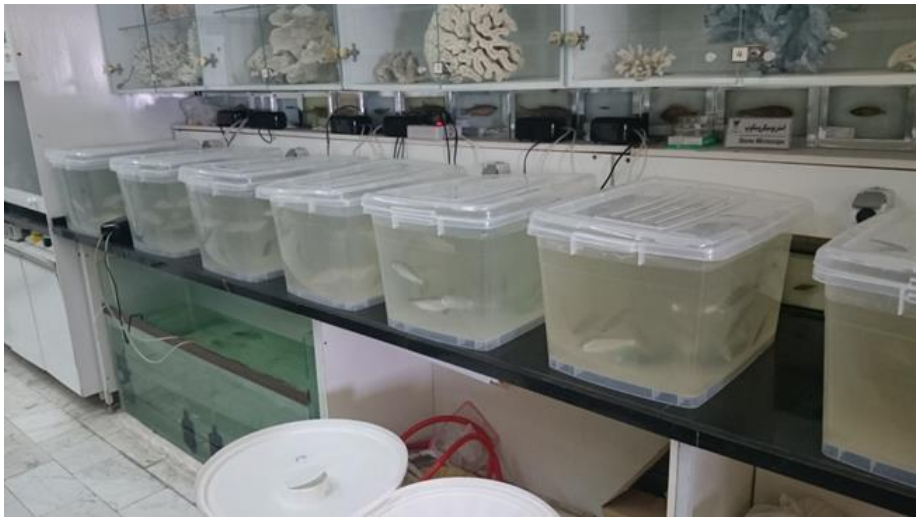
Nacci و همکاران ۱۹۹٦ به بررسی آسیب DNA اریتروسیت خون ماهی Flunder که در معرض H_2O_2 قرار گرفته بودند، پرداختند. افزایش غلظت ماده باعث افزایش طول دنباله کامت می گردد.

فصل سوم: مواد و روشها

۳-۱ تهیه ماهی ها

در تابستان ۱۳۹٤ تعداد ۱۰۸ قطعه ماهی ها کلمه با میانگین وزنی ۱۰±۳۰ گرم و میانگین طول ۲۰± ۱۰۰/۱ میلیمتر از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان استخوانی سیجوال واقع در بندر ترکمن، استان گلستان تهیه گردیدند. ماهی ها در کیسه های دو لایه هوا دهدی شده با اکسیژن به آزمایشگاه رازی واقع در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات منتقل شدند. در آزمایشگاه برای سازگاری ماهی ها با شرایط محیطی، در اکواریم های ۷۰ لیتری با هوا دهی مناسب نگهداری شدند. پس از طی مدت هفت روز ، تعداد ۱۰ ماهی با وزن مشابه انتخاب شدند و به آکواریم های چهل لیتری منتقل شدند. تعداد دوازده آکواریم که شامل ۹ آکواریم تیمار و ۳ آکواریم شاهد با شرایط ذیل تعبیه گردید. طول دوره نوری ۱۲-۱۲ ساعت بود.خواص فیزیکوشیمیایی آب شامل:

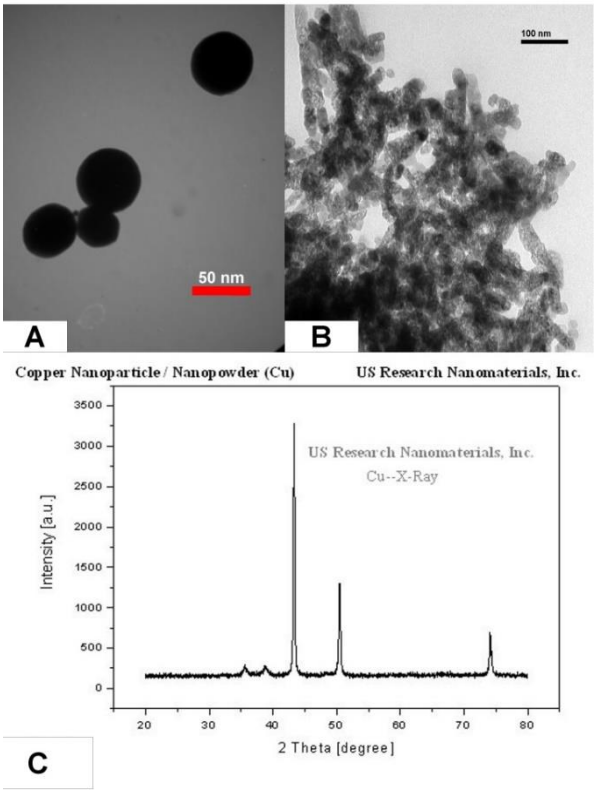
دما = ^{o}C ۲۲ ±۲ ، اکسیژن محلول =mg/L ۵/۲ ، pH=7±0.004، غلظت کربنات کلسیم = 270 ppm بود.



شکل ۳-۱ آکواریم های حاوی ماهی کلمه (عکس از نگارنده)

۳-۲ خصوصیات نانوذرات مس

نانوذرات مس با مشخصات (Cat, no 007440-50-8, Stock, US) ، سایز ذرات ۴۰ نانومتر، دانسیته $8.9\ g/Cm^3$، خلوص $99.9\% \geq$ (شکل ۳-۲) از شرکت نانومواد خراسان تهیه گردید . محلول مادر نانوذرات مس با غلظت ($50\ mgL^{-1}$) تهیه گردید و در دستگاه sonicator با مشخصات (250 w, 40 kHz. 25 ˚C. Wiseclean) به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت و توسط امواج صوتی نانوذرات در سراسر محلول پراکنده گردید.



شکل۳-۲- خصوصیات نانوذرات مس مورد استفاده در این پژوهش. (A) تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره؛ (B) تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره . (C) نمودار پراکنش محدوده سایز نانوذرات، بیشترین پراکنش در محدوده ٤٠ تا ٥٠ نانومتر می باشد.



شکل ۳-۳ دستگاه سونیکاتور(عکس از نگارنده)

۳-۳ تعیین غلظت نانوذرات مس

بر پایه یافته سایر پژوهشگران، میانگین غلظت کشنده ۹۶ ساعته نانوذرات مس ($96\ h\ LC^{50}$) در ماهی استروژن سیبریایی برابر $1.41\pm0.24\ mg\ L^{-1}$ گزارش گردیده بود (Ostaszewska *et al*., 2015). در پژوهش حاضر، سه تیمار در غلظت زیر کشنده نانوذرات مس به همراه یک گروه شاهد در سه تکرار به مدت ۲۱ روز در مواجهه با ماهیان کلمه قرار گرفت.

گروه اول T_0 = گروه شاهد

گروه دوم T_1 = غلظت 0.1 mg/l

گروه سوم T_2= غلظت 0.2 mg/l

گروه چهارم T_4 = غلظت 0.5 mg/l

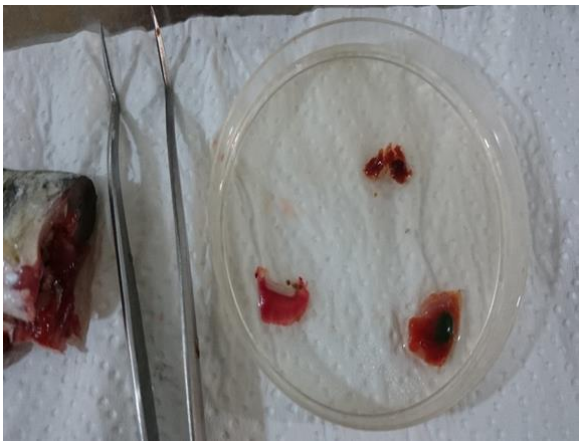
هر تیمار در شرایط نیمه پایدار نگهداری شد و ۸۰ درصد از آب آکواریم ها هر ٤٨ ساعت تعویض گردید و مجددا غلظتهای فوق الذکر از نانوذرات مس در هر تیمار جایگزین شد. شرایط گروه شاهد کاملا شبیه سایر گروهها بود.

٤-۳ نمونه برداری

در روزهای ۷، ۱٤ و ۲۱ مواجهه ، سه ماهی از هر اکواریم به صورت تصادفی انتخاب گردید. ماهیها در محلول اسانس میخک بیهوش شدند و نمونه های بافتی و خون برای بررسی های آتی استخراج شد.

۳-٤-۱ استخراج نمونه های بافتی

برای بررسی تاثیرات بافتی نانوذرات مس بروی اندامهای حیاتی ماهی کلمه پس از بیهوش نمودن ماهی قسمتی از کبد، یک کمان آبششی و کلیه ماهی جداشد. بافتها بلافاصله در محلول فرمالین ۱۰٪ تثبیت شد و پس از طی مدت زمان ٦ ساعت، فرمالین قبلی تخلیه و مجددا محلول فرمالین ۱۰٪ جدید به بافتها اضافه گردید.



شکل۳-٤ استخراج نمونه های بافتی ماهی کلمه (عکس از نگارنده)

۳-٤-۱-۱ مراحل آماده سازی نمونه های بافتی

نمونه های فیکس شده در محلول فرمالین ۱۰٪ پس از ٤۸ ساعت به محلول اتانول ۷۰ ٪ منتقل شدند و در نهایت طی روند زیر جهت انجام مطالعات بافت شناسی، توسط پارافین قالب گیری گردیدند:

۱- آبگیری با الکل های صعودی ۷۰/۸۰/۹۵/۹۵/۱۰۰/۱۰۰/۱۰۰ هرکدام ۱ ساعت

۲- شفاف سازی با تولوین ۱/۲/۳ هرکدام اساعت

۳- آغشته گری با پارافین ، ۱ دوساعت – پارافین ۲ چهار ساعت (٥٦-٦۰ درجه سانتیگراد)

٤- قالب گیری توسط پارافین

سپس قالبهای تهیه شده به کمک میکروتوم (Leica RM2255) برشهای ٦ میکرومتری تهیه و بروی لامهای شیشه ای قرار داده شد. لامها به روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H & E) به صورت زیر توسط دستگاه رنگ آمیزی (Microm) رنگ آمیزی شدند. سپس لامها بوسیله لامل و چسب انتالن مونتاژ گردیدند و به کمک میکروسکوپ نوری (Olympus DP72) مجهز به دوربین دیجیتال مودر مطالعه و عکس برداری قرار گرفتند (Roberts, 2001).



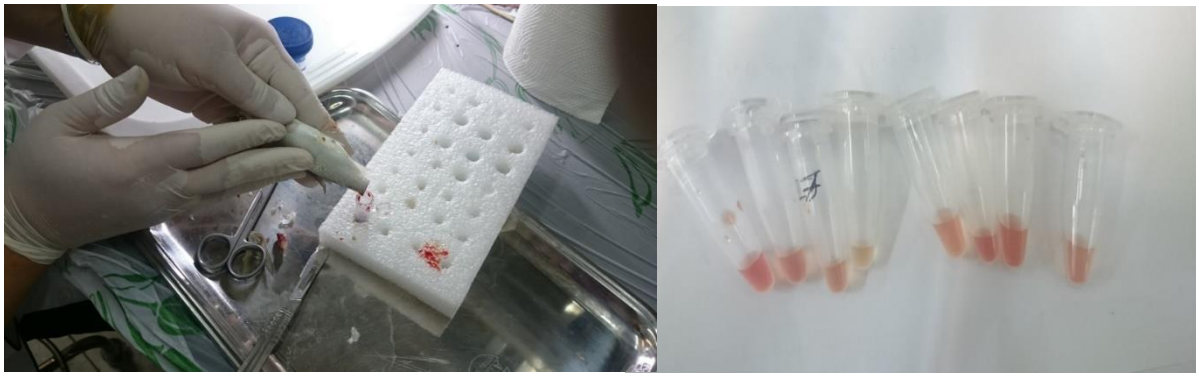
شکل ۳-۵ مراحل آماده سازی بافتی و رنگ آمیزی (عکس از نگارنده)

برای درجه بندی میزان آسیب های بافتی از روش زیر استفاده گردید .

–	به معنای عدم مشاهده آسیب بافتی مشخص در لامهای زیر میکروسکوپ
+	به معنای آسیب بافتی کم بود و حدودا ۱۰٪ از محدوده بافتی در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ٤٠ را شامل می شد.
++	به معنای آسیب بافتی متوسط بود و حدودا ۲۰٪ از محدوده بافتی در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ٤٠ را شامل می شد.
+++	به معنای آسیب بافتی شدید بود و بیش از ۲۰٪ از محدوده بافتی در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ٤٠ را شامل می شد.. (Dutta *et al.*, 1996)

۳-٤-۲ استخراج نمونه های خون برای سنجش آنزیمی

پس از بیهوش نمودن ماهی ها قطع ساقه دمی صورت گرفت. خون ماهی ها در لوله های کوچک جمع آوری شد و پس از لخته شدن در سانتریفیوژ با دور٤٥٠٠ به مدت ١٥ دقیقه قرار گرفت. فاز شفاف که شامل سرم خون بود توسط سمپلر جدا شد و تا زمان سنجش آنزیمی در فریزر با دمای 80°c- قرار گرفت (شکل۳- ٦).



شکل ۳-٦ مراحل خون گیری وتهیه سرم خون از ماهی کلمه (عکس از نگارنده)

۳-٤-۳ اندازه گیری فعالیت آنزیمهای کاتالازو سوپراکسید دیسموتاز

به منظور اندازه گیری آنزیمهای کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز از کیت حیوانی شرکت Zellbio (شکل ۳-۷) استفاده گردید. بدین منظوربرای سنجش فعالیت آنزیمهای کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز سرمهای خون بروی یخ به پژوهشکده غدد دانشگاه شهید بهشتی تهران منتقل شد. و با استفاده از دستورالعمل مندرج در کاتالوگ و به روش رنگ سنجی با استفاده از دستگاه الایزا ریدر Biotech مدل Epoch انجام گردید (شکل۳-۸). جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در طول موج ٤٢٠ لاندا به مدت ۲ دقیقه (Bolann & Ulvik, 1992) و برای سنجش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در طول موج ٤٠٥ به مدت ٦٠ ثانیه استفاده شد (Goth, 1991).



شکل ۳-۷ کیتهای شناسایی آنزیم شرکت Zellbio (عکس از نگارنده)



شکل ۳-۸ دستگاه الایزا ریدر(عکس از نگارنده)

۳-٤-٤ استخراج نمونه های خون برای آزمون کامت

برای تهیه خون برای آزمون کامت ، میکروتیوپهای کوچک حاوی هپارین آماده گردید. یک قطره هپارین بوسیله سرنگ انسولین داخل میکروتیوپ ریخته شد. سپس یک قطره نمونه خونی به میکروتیوپ اضافه گردید. خون با هپارین به خوبی مخلوط شد.

۳-٤-٤-۱ تهیه محلولهای مورد نیاز برای آزمون کامت

برای اجرای کامل آزمایش ، پنج سری محلول به شرح زیر مورد نیاز است.

۳-٤-٤-۱-۱ محلول بافر لیز کننده (۱ لیتر)

مواد لازم و میزان وزن مورد نیاز هریک به شرح زیر است .

NaCl	146.19 g (2.5 M)
EDTA	37.23 g
Trise-base	1.25 g (10mM)
Triton X 100	10 ml (1%)
DMSO (Dimethylsulfoxide)	90 ml (10%)

مواد به صورت خشک وزن شده و داخل بشر ریخته شد. سپس ۷۰۰ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید. برای تهیه یک محلول شفاف و یک دست، محلول به خوبی هم زده شد . pH محلول با اضافه کردن چند قطره NaOH(۱نرمال) روی ۱۰ کنترل گردید. ۱۰۰ میلی لیتر دیگر آب مقطر به آن اضافه گردید. در نهایت با ۱۰ میلی لیتر Triton X 100 (۱٪) و ۹۰ میلی لیتر DMSO (۱۰٪) و آب مقطر، محلول نهایی به حجم یک لیتر رسانده شد.

نکته : هدف از اضافه کردن DMSO در محلول لیز کننده این است که رادیکالهای آزاد حاصل از حضور آهن ، حذف شود . چرا که آهن آزاد شده از هموگلوبین خون یا بافت موجود زنده باعث آسیب به DNA و خطا در آزمایش می شود.

۳-٤-٤-۱-۲ تهیه محلول بافر الکتروفورزی (۱ لیتر)

مواد لازم و میزان وزن آن به ازای یک لیتر آب به صورت زیر است.

NaOH	300 mM
EDTA	1 mM

ابتدا محلول غلیظ NaOH ۱۰ نرمال (۲۰۰ گرم در ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر) و EDTA ۲۰۰ میلی مولار (۱٤/۸۹ گرم در ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر) تهیه شد. سپس برای تهیه ۱ لیتر محلول بافر الکتروفورزی، ۳۰ میلی لیترNaOH را به همراه ۵ میلی لیتر EDTA مخلوط گردید و با آب مقطر به حجم ۱ لیتر رسانده شد و pH بالای ۱۳ کنترل گردید.

۳-٤-٤-۱-۳ تهیه محلول (بافر) خنثی کننده (۱ لیتر)

مواد لازم و میزان وزن مورد نیاز هر یک به ازای یک لیتر آب به صورت زیر است:

Trise-base	48.5 g (0.4 M)

٤۸/۵ گرم تریس را در ۸۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد و سپس pH محلول را با HCl غلیظ روی ۷ تنظیم گردید و با ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر به حجم ۱ لیتر رسانده شد. این محلول باید به صورت تازه تهیه گردد.

۳-٤-٤-۱-٤ تهیه محلول نمک فسفات بافر(PBS) (۱ لیتر)

مواد لازم و میزان وزن مورد نیاز هر یک به ازای یک لیتر آب به صورت زیر است.

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na_2HPO_4	1.44 g
KH_2PO_4	0.24 g

این مواد به صورت خشک وزن گردید و به ۸۰۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد. محلول تا جایی که شفاف و یک دست شود ، مخلوط شد. با اضافه کردن چند قطره NaOH و ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر pH محلول روی ۷/۳۵ تنظیم گردید.

۳-٤-٤-۱-۵ تهیه محلول رنگ

برای تهیه محلول رنگ از ژل رد استفاده شد. ۱۰ میکرولیتر رنگ با ٤۹۰ میکرولیتر آب مقطر رقیق شد و سپس از این حجم ۱۰ میکرولیتر روی هر لام ریخته و لامل قرار داده شد.

پس از طی مراحل فوق، روش اجرای کار در ۹ مرحله به شرح زیر دنبال گردید.

۳-٤-٤-۲ تهیه لام پوشش دار با ژل آگارز معمولی ۱ درصد[18]

۰/۵ گرم آگارز معمولی در ۵۰ میلی لیتر بافرPBS بوسیله ماکروویو حرارت داده شد تا کامل حل گردد. ژل آگارز حل شده بروی هیتر با دمای ۵۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت (از ورق آلومینیوم برای جلوگیری از تبخیر استفاده شد). لام میکروسکوپی به صورت عمودی داخل بشر حاوی ژل قرار گرفت و پس از چند ثانیه بیرون آورده شد. پشت لام با دستمال تمیز و خشک شد. پس از خشک شدن لامها، دور از رطوبت و درجعبه لام در یخچال نگهداری شد. توجه شود که ژل باید کاملا حل شود و همچنین هیچگونه اثر انگشتی بروی لام نباشد. لام پوشش دار را می توان چند روز قبل از آزمایش تهیه کرد.

[18] Normal melting Agarose

۳-٤-٤-۳ تهیه ژل آگارز با نقطه ذوب پایین ۰/۷۵ درصد[19]

۰/۳۷ گرم آگارز نقطه ذوب پایین، در ۵ میلی لیتر بافر PBS به کمک حرارت ماکروویو حل شد. ژل آگارز را داخل بشر ۲۵ میلی لیتری ریخته شد و روی هیتر با دمای ۵۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت تا سفت نشود.

۳-٤-٤-٤ مخلوط کردن ژل آگارز با نقطه ذوب پایین و سلولهای خونی

۱ میکرولیتر خون با ۱٤۰ میکرولیتر آگارز به خوبی توسط سمپلر مخلوط شد. سپس ٤۰ میکرولیتر از مخلوط روی لام پوشش دار ریخته شد و روی آن لامل قرار گرفت. بعد از ۵ دقیقه لامل به آرامی برداشته شد.

۳-٤-٤-۵ لیز سلولی

لامها داخل سینی حاوی محلول لیز سرد و تازه قرار گرفت و حداقل به مدت ۱ ساعت در یخچال با دمای ٤ درجه سانتیگراد قرار داده شدند.

۳-٤-٤-٦ خنثی سازی قبل از الکتروفورز

در این مرحله هر کدام از لامها سه مرتبه و هر بار به مدت ۵ دقیقه توسط محلول خنثی شستشو داده شد.

۳-٤-٤-۷ الکتروفورز

لامها به تانک الکتروفورز انتقال داده شد و منبع تانک از بافر اکتروفورزی سرد پر شد. بافر به آرامی اضافه شد تا ایجاد حباب نکند و تمام سطح لامها را بگیرد. لامها به مدت ۲۰ تا ٦۰ دقیقه در تانک الکتروفورز افقی حاوی بافر الکتروفورزی در یخچال با دمای ٤ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. تا پیچش DNA باز شود (هر چه در این شرایط بیشتر قرار بگیرند، آسیبها بیشتر دیده می شوند. سپس در همان حالت تانک به منبع انرژی وصل شد. الکتروفورز با ولتاژ ۲۵ و جریان ۳۰۰ میلی آمپر به مدت ۱۵ الی ۲۰ دقیقه انجام شد. برای تنظیم دقیق ولتاژ و آمپر با کم و زیاد کردن سطح بافر داخل تانک مقادیر مورد نظر به دست آمد. نکته قابل توجه اینکه برای نشان دادن جهت الکتروفورز، باید به نحوه قرار دادن لامها در تانک الکتروفورز دقت شود تا تمام لامها در یک جهت داخل تانک، قرار بگیرند.

۳-٤-٤-۸ خنثی سازی بعد از الکتروفورز

دستگاه خاموش گردید و سپس لامها به آرامی از محلول برداشته شدند. هر یک از لامها ۳ بار و هر بار برای ۵ دقیقه توسط بافر خنثی شستشو داده شد. نکته قابل توجه حین انجام این کار، اینکه باید مراقب بود که نمونه ها از سطح جدا نشود.

[19] Low melting Agarose

۳-٤-٤-۹ تثبیت نمونه ها

لامها به مدت ۵ دقیقه در اتانول خالص (۱۰۰٪) سرد قرار گرفتند و پس از خشک شدن در دمای ٤ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

۳-٤-٤-۱۰ رنگ آمیزی و آشکار سازی و بررسی نمونه ها

هر یک از لامها به وسیله ی ۱۰ میکرولیتر از رنگ ژل رد، رنگ آمیزی شدند و روی آن لامل قرار گرفتند و نمونه سریعا برای شمارش کامت بررسی گردیدند و توسط میکروسکوپ فلورسنت با محدوده طول موج ٥١٦ تا ٥٤٦ با عدسی ۱۰ مشاهده شدند و در انتها میزان آسیب DNA با استفاده از درجه بندی کامت شمارش و بررسی شدند.

۳-٤-٤-۱۱ ارزیابی و کمی سازی کامت

آسیب DNA رنگ آمیزی شده با ژل رد، با میکروسکوپ فلورسنت با عدسی شیئی ۱۰ بررسی شدند. ساده ترین روش ارزیابی درجه بندی کامت ها (دنباله ها)، نمره دهی چشمی بر اساس میزان آسیب یا همان طول دنباله است. در این تحقیق به جای درجه بندی چشمی از نرم افزار CASP استفاده شد (Konca *et al*., 2003).

۳-٤-٤-۱۲ نرم افزار CASP

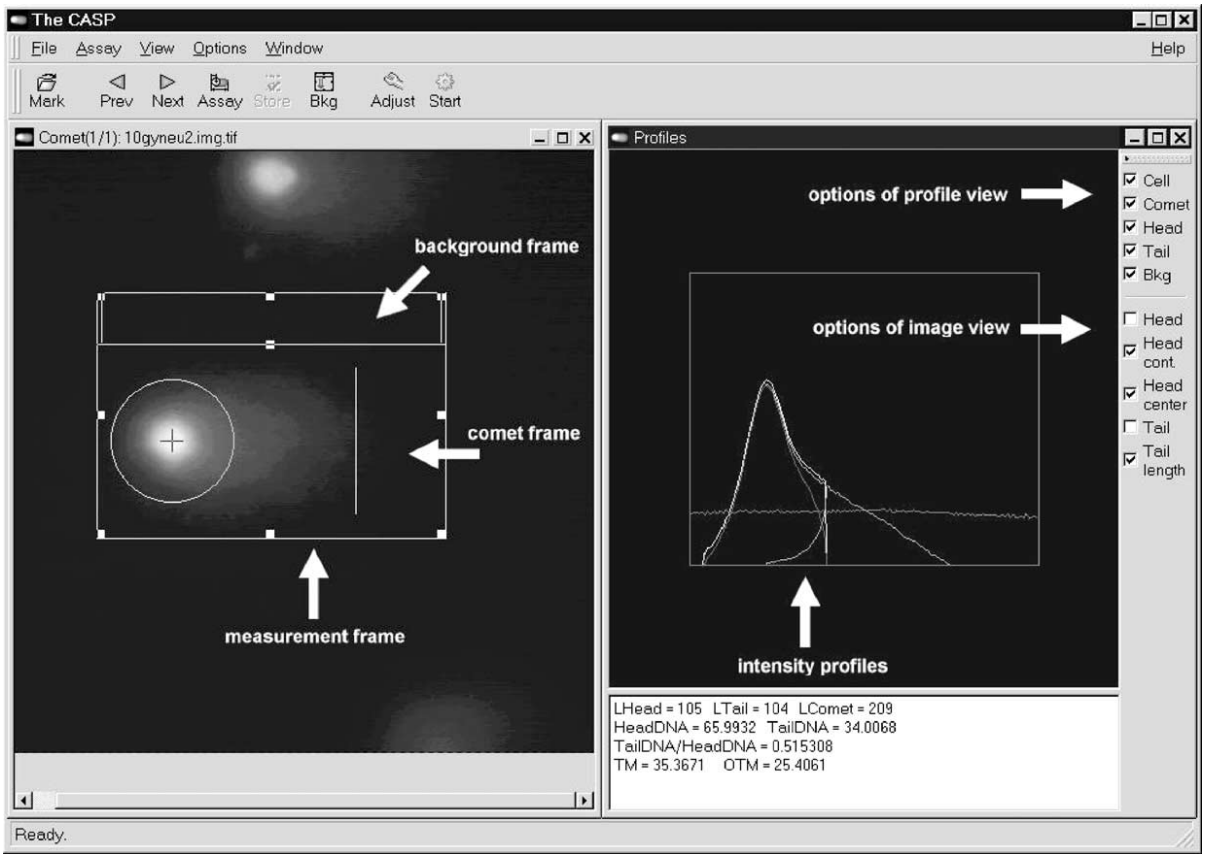
این نرم افزار قادر است با اندازه گیری خصوصیات کامت ها صفاتی از جمله طول کامت، طول سر کامت، طول دنباله کامت را محاسبه کند و به صورت کمی گزارش می نماید. شایان ذکر است که عکسهای گرفته شده را باید در جهت صحیح برای نرم افزار تعریف نمود تا از ایجاد خطا جلوگیری شود. به این توضیح که حتما باد دنباله کامت ها در سمت راست تصویر واقع گردند. در غیر این صورت نرم افزار در برآورد صفات دچار خطا می شود. در صورتیکه دنباله کامت در عکسهای گرفته شده در سمت دیکر تصویر فرارد دارد با چرخش تصویر باید این مشکل را برطرف نمود. خروجی این نرم افزار شامل طول دنباله، میزان DNA سر کامت، میزان DNA دنباله کامت و شاخص OTM[20] می باشد. داده

های حاصل از نرم افزار CASP در قالب فایلهای Excel ذخیره گردیدند و سپس برای بررسی های نهایی و تجزیه و تحلیل آماری توسط نرم افزار SPSS 22 مورد پردازش قرار گرفتند.

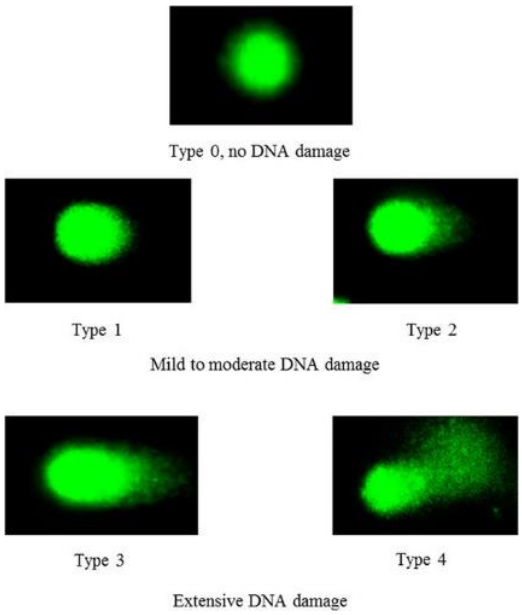
از نکاتی که روش دستیابی به داده ها و تجزیه و تحلیل تحقیق حاضر را نسبت به روش نمره گذاری چشمی کامت ها متمایز می کند، آن است که در روش نمره گذاری چشمی، کامت ها به درجات مختلف (معمولا ۰ تا ٤) درجه گذاری می شوند که علاوه بر احتمال بروز خطا، ساختار داده ها نیز گسسته و کیفی است. (شکل ۳-۱۰)

[20] Olive Tail Moment

ولی در پژوهش حاضر، از آنجاییکه داده ها با استفاده از نرم افزار CASP به دست آمده اند، ساختار داده ها از نوع کمی و پیوسته می باشند. در حقیقت نرم افزار ذکر شده قادر است خصوصیات کامت ها را به اندازه های کمی تبدیل نماید و از این نظر تجزیه واریانس و مقایسات میانگین روش مناسبی برای تجزیه و تحلیل آنها خواهد بود. خروجی این نرم افزار به گونه ای است که ویژگیهای هر کامت را به صورت یک فایل اکسل مجزا در اختیار محقق قرار می دهد.



شکل ۳-۹ شمای کلی نرم افزار CASP



شکل۳-۱۰ نحوه درجه بندی کامت و تصاویر نمونه ای از انواع کامت با درجات متفاوت آسیب

۳-۵ شیوه تجزیه و تحلیل آماری داده ها

در مقایسه داده های مربوط به میزان فعالیت آنزیم های اکسیداتیو و آسیبهای DNA، ابتدا به منظور تعیین نرمال بودن داده ها از آزمون Shapiro-Wilk استفاده شد. به منظور تعیین اختلاف کلی میان میانگین ها از آزمون طرفه (Reapeated Masure - ANOVA) استفاده شد. نتایج به صورت Mean ± S.E ارائه شد و ملاک استنتاج آماری $p<0.05$ در نظر گرفته شد. برای بررسی همبستگی مابین غلظت و زمان در معرض قرار گیری و عارضه های مختلف ایجاد شده (بافت، آنزیم، تخریب DNA) از آزمون همبستگی Spearman استفاده شد.کلیه آزمونها با استفاده از نرم افزار SPSS (22) صورت گرفت.

فصل چهارم : نتایج

به منظور مطالعه آسانتر، نتایج پژوهش حاضر به صورت زیر دسته بندی شده اند:

۱. بررسی اثرات نانوذرات مس بر بافتهای مختلف ماهی کلمه
۲. بررسی اثرات نانوذرات مس بر آنزیمهای اکسیداتیو ماهی کلمه
۳. بررسی اثرات نانوذرات مس بر آسیب DNA و آزمون کامت

٤-١ بررسی اثرات نانوذرات مس بر بافتهای مختلف ماهی کلمه

٤-١-١ آسیب شناسی بافت آبشش

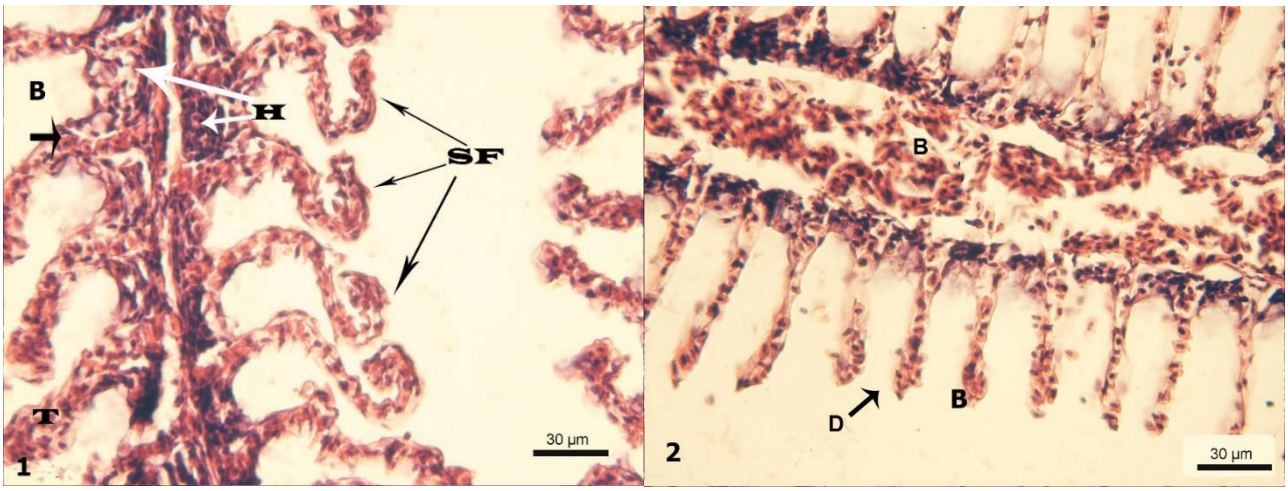
نمونه بافت آبششی ماهی های شاهد بررسی گردید و هیچگونه آسیب بافتی در آبشش ماهیان مشاهده نشد. شکل٤-١ نشان دهنده بافت طبیعی آبشش می باشد.



شکل٤-١ بافت نرمال آبشش شاهد. هیچگونه اسیب بافتی در آبشش مشاهده نشد. فیلامنت ها و مویرگهای خونی شرایط طبیعی داشتند. (L) تیغه آبششی یا لاملا؛ (F) رشته آبششی یا فیلامنت؛ (P) سلولهای پیلار؛ (R) گلبولهای قرمز خونی

٤-١-١-١ نتایج آسیب بافتی آبشش در تیمار ۰/۱ میلیگرم در لیتر نانوذرات مس

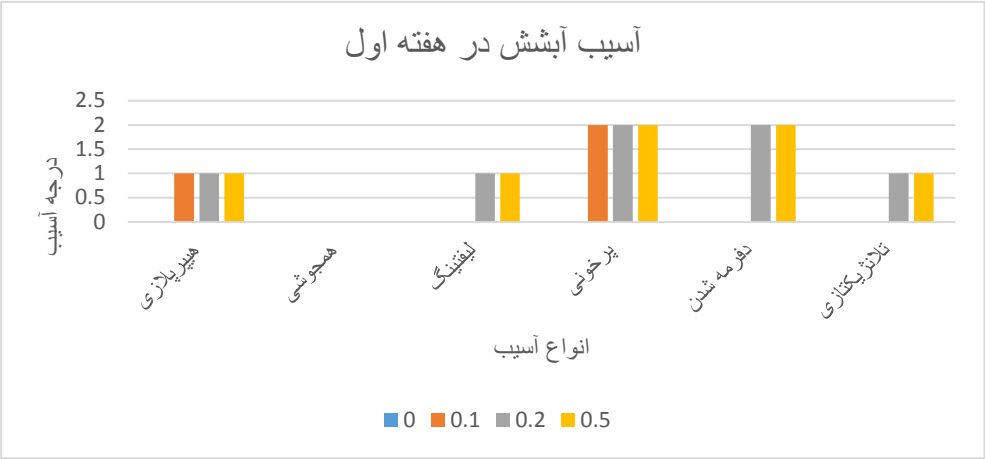
پس از مواجهه ماهیها در تیمار با غلظت، ۰/۱ میلیگرم در لیتر نانوذرات مس آسیبهای بافتی گوناگونی در آبشش ماهیان مشاهده شد که از آن دسته هیپر پلازی سلولهای رشته آبششی، پرخونی در تیغه های آبششی و رشته های آبششی، تغییر شکل رشته های آبششی، تلانژیکتازی رشته های آبششی می باشد (شکل٤-٢ و نمودار ٤-١). آسیبهای مشاهده شده با گذشت زمان از هفته اول به هفته سوم شدت بیشتری پیدا نمود (جدول٤-١).



شکل٤-٢ آسیبهای بافت آبششی در غلظت ۰/۱ میلیگرم در لیتر.

۱) (T) تلانژیکتازی رشته های آبششی؛ (B) پرخونی در رشته های آبششی؛ (H) هیپرپلازی سلولی در تیغه های آبششی؛ (SF) تغییر شکل و S شکل شدن تارهای آبششی.

۲) (B) پرخونی در تیغه های آبششی و رشته های آبششی؛ (D) تغییر اندازه و کوتاه شدن تیغه های آبششی.



نمودار٤-١ میزان آسیب آبشش در هفته اول

جدول شماره ٤-١ آسیبهای بافتی آبشش ماهی کلمه در تیمار ۰/۱ میلیگرم در لیتر نانو ذرات مس

مدت زمان / نوع آسیب	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم
هیپر پلازی	+	+	+
پرخونی در تیغه آبششی و تارهای آبششی	++	++	–
تغییر شکل در رشته های آبششی	–	+	++
تلانژیکتازی	–	++	++

– به معنای عدم مشاهده آسیب بافتی مشخص در لامهای زیر میکروسکوپ

+ به معنای آسیب بافتی کم بود و حدودا ۱۰٪ از محدوده بافتی در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ٤۰ را شامل می شد.

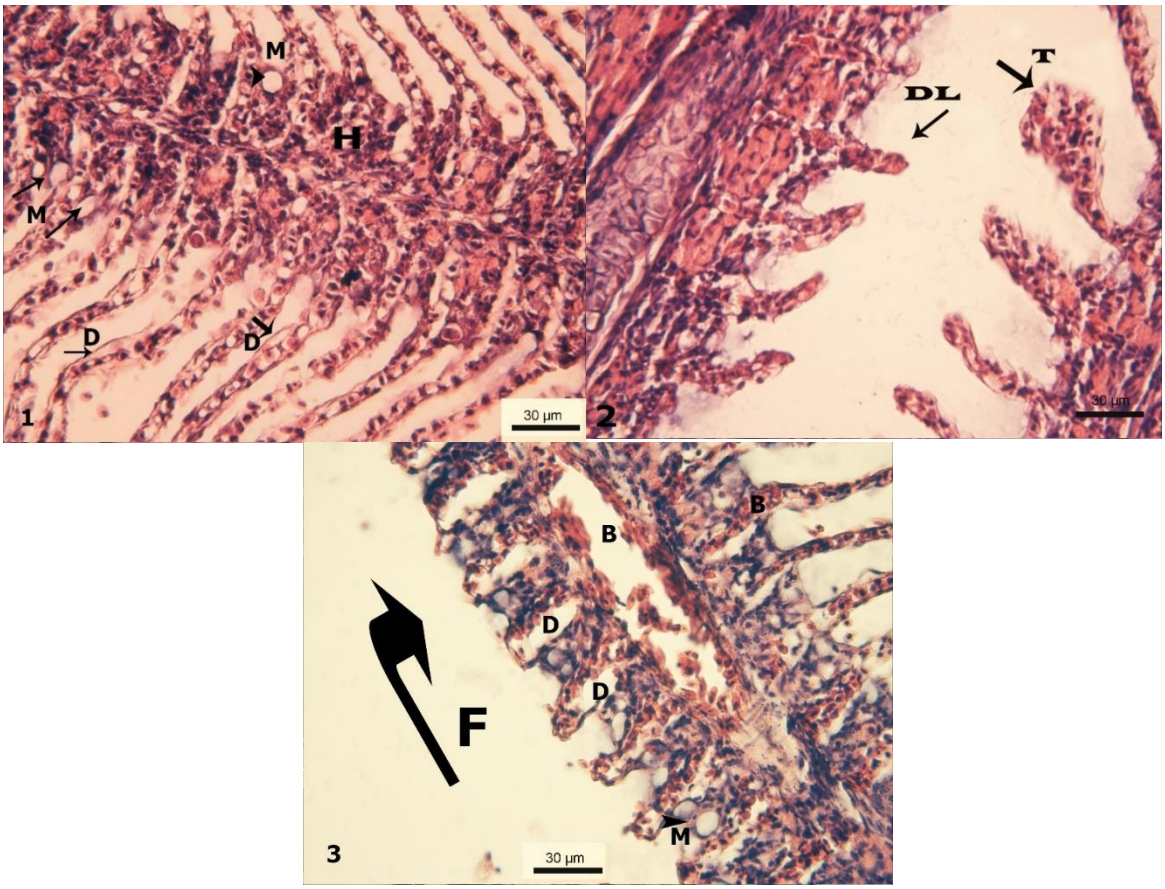
++ به معنای آسیب بافتی متوسط بود و حدودا ۲۰٪ از محدوده بافتی در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ٤۰ را شامل می شد.

+++ به معنای آسیب بافتی شدید بود و بیش از ۲۰٪ از محدوده بافتی در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ٤۰ را شامل می شد.

(Dutta *et al.*, 1996)

٤-١-١-٢ نتایج آسیب بافتی آبشش در تیمار ۰/۲ میلیگرم در لیتر نانوذرات مس

پس از مواجهه ماهیها با غلظت ۰/۲ میلیگرم در لیتر نانوذرات مس آسیبهای بافتی گوناگونی در آبشش ماهیان مشاهده شد که از آن دسته هیپر پلازی سلولهای رشته آبششی، هم جوشی (fusion)، پرخونی در تیغه های آبششی و رشته های آبششی، جداشدن اپیتلوم رشته های آبششی (Detachment)، تغییر شکل رشته های آبششی، تلانژیکتازی رشته های آبششی، افزایش سلولهای موکوسی، می باشد (شکل٤-٣ و نمودار ٤-٢). آسیبهای مشاهده شده با گذشت زمان از هفته اول به هفته سوم شدت بیشتری پیدا نمود؛ علاوه براینکه نسبت به غلظت ۰/۱ آسیبهای شدیدتری مشاهده گردید (جدول٤-٢).



شکل٤ -٣ آسیبهای بافت آبششی در غلظت ۰/۲ میلیگرم در لیتر .

۱) (H) هیپرپلازی سلولی در تیغه های آبششی؛ (M) افزایش سلولهای موکوسی؛ (D) جداشدن اپیتلیوم رشته های آبششی

۲) (T) تلانژیکتازی رشته های آبششی؛ (DL) تغییر شکل و کوتاه شدن تارهای آبششی

۳) (B) پرخونی در رشته های آبششی و تیغه آبششی؛ (M) افزایش سلولهای موکوسی؛ (F) ازبین رفتن تارهای آبششی.

جدول شماره٤-٢ آسیبهای بافتی آبشش ماهی کلمه در تیمار ۰/۲ میلیگرم در لیتر نانو ذرات مس

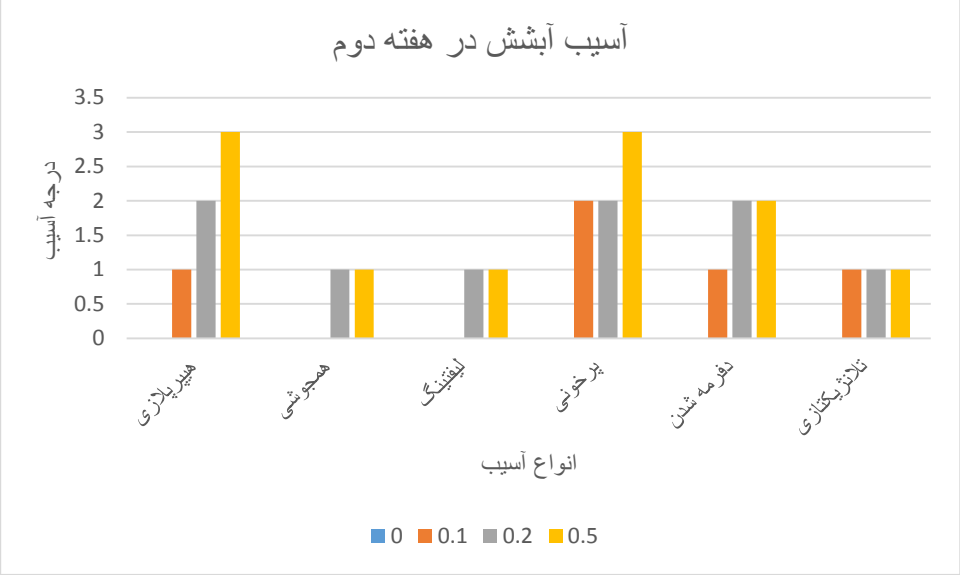
مدت زمان / نوع آسیب	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم
هیپر پلازی	+	++	+++
همجوشی	+	+	++
جداشدن اپیتلیال رشته های آبششی	–	+	++
پرخونی در تیغه آبششی و تارهای آبششی	++	++	++
تغییر شکل در رشته های آبششی	++	++	+++
تلانژیکتازی	+	+	+++
افزایش سلولهای موکوسی	+	++	++

– به معنای عدم مشاهده آسیب بافتی مشخص در لامهای زیر میکروسکوپ

+ به معنای آسیب بافتی کم بود و حدودا ۱۰٪ از محدوده بافتی در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ٤۰ را شامل می شد.

++ به معنای آسیب بافتی متوسط بود و حدودا ۲۰٪ از محدوده بافتی در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ٤۰ را شامل می شد.

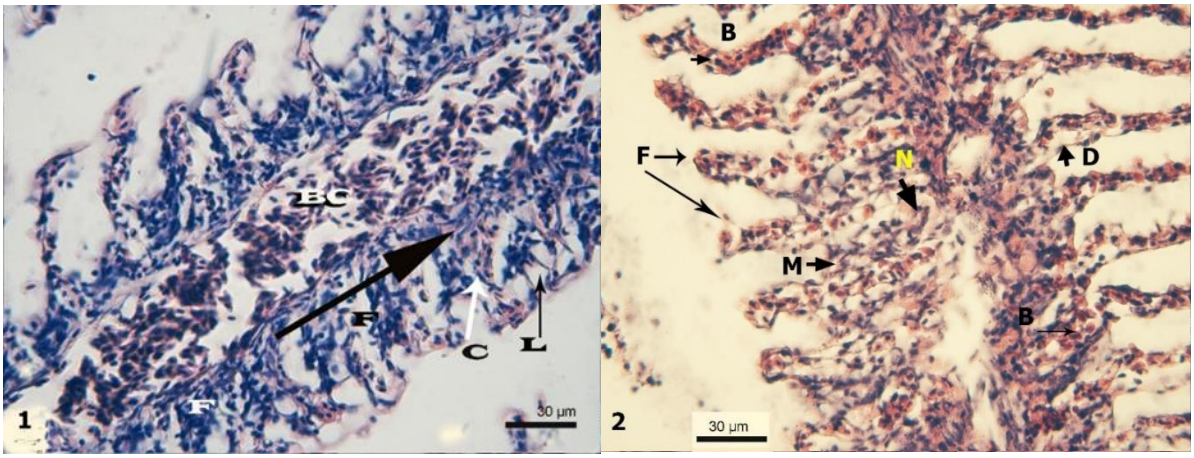
+++ به معنای آسیب بافتی شدید بود و بیش از ۲۰٪ از محدوده بافتی در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ٤۰ را شامل می شد. (Dutta et al., 1996)



نمودار٤-٢ میزان آسیب آبشش در هفته دوم

٤-١-١-٣ نتایج آسیب بافتی آبشش در تیمار ٠/٥ میلیگرم بر لیتر از نانوذرات مس

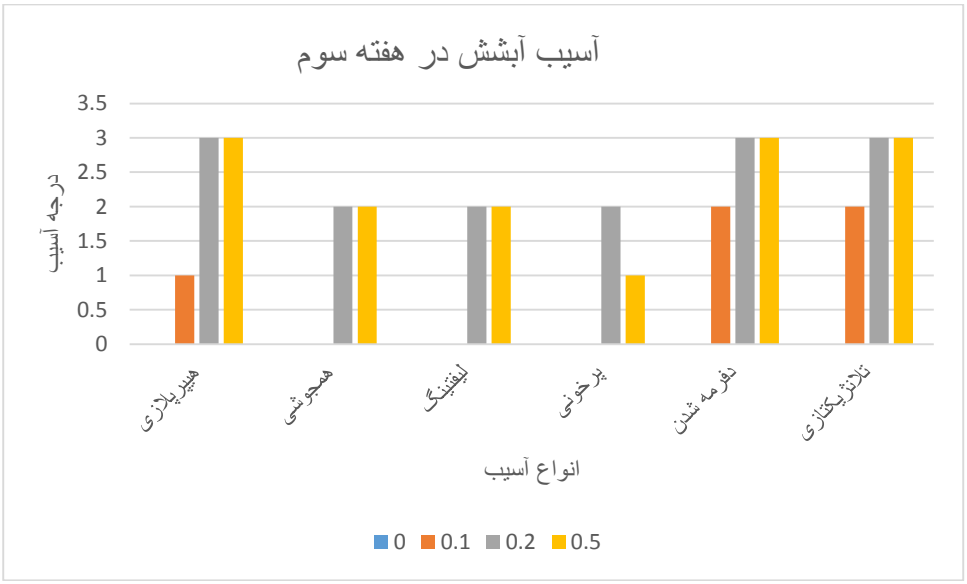
پس از مواجهه ماهیها با ٠/٥ میلیگرم بر لیتر از نانوذرات مس، آسیبهای بافتی گوناگونی در آبشش ماهیان مشاهده شد که از آن دسته هیپر پلازی سلولهای رشته آبششی، هم جوشی یا (fusion)، پرخونی در تیغه های آبششی و رشته های آبششی، جداشدن اپیتلوم رشته های آبششی (Detachment)، تغییر شکل رشته های آبششی، تلانژیکتازی رشته های آبششی، افزایش سلولهای موکوسی و نکروز می باشد (شکل٤-٤ و نمودار ٤-٣). آسیبهای مشاهده شده با گذشت زمان از هفته اول به هفته سوم شدت بیشتری پیدا نمود؛ علاوه براینکه نسبت به دو غلظت دیگر آسیبهای شدیدتری مشاهده گردید.(جدول٤-٣).



شکل ٤-٤ آسیبهای بافت آبششی در غلظت ۰/۵ میلیگرم در لیتر.

۱- (BC) پرخونی سرخرگ در تیغه های آبششی؛ (F) هم جوشی؛ (L) جداشدن اپی تلیوم رشته های آبششی؛ (C) پرخونی در رشته های آبششی.

۲- (N) نکروز بافت آبششی؛ (F) از بین رفتن رشته های آبششی؛ (M) افزایش سلولهای موکوسی؛ (B) پرخونی رشته های آبششی؛ (D) جداشدن اپیتلیوم پایه.



نمودار ٤-۳ میزان آسیب آبشش در هفته سوم

جدول شماره ٤-٣ آسیبهای بافتی آبشش ماهی کلمه در تیمار ۰/۵ میلیگرم در لیتر نانو ذرات مس

مدت زمان / نوع آسیب	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم
هیپر پلازی	+	++	+++
همجوشی	+	+	++
جداشدن اپیتلیال رشته های آبششی	–	+	++
پرخونی در تیغه آبششی و تارهای آبششی	++	++	++
تغییر شکل در رشته های آبششی	++	++	+++
تلانژیکتازی	+	+	+++
افزایش سلولهای موکوسی	+	++	++

– به معنای عدم مشاهده آسیب بافتی مشخص در لامهای زیر میکروسکوپ

+ به معنای آسیب بافتی کم بود و حدودا ۱۰٪ از محدوده بافتی در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ٤٠ را شامل می شد.

++ به معنای آسیب بافتی متوسط بود و حدودا ۲۰٪ از محدوده بافتی در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ٤٠ را شامل می شد.

+++ به معنای آسیب بافتی شدید بود و بیش از ۲۰٪ از محدوده بافتی در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ٤٠ را شامل می شد. (Dutta *et al.*, 1996)

جدول٤-٤ بررسی **ضریب همبستگی ما بین آسیب های آبشش و زمان و غلظت**

			dose	time	H	F	det	conges	def	T
Spearman's rho	dose	Correlation Coefficient	1.000	0.000	.815**	.620*	.849**	.706*	.742**	.480
		Sig. (2-tailed)		1.000	.001	.032	.000	.010	.006	.114
	time	Correlation Coefficient		1.000	.341	.495	.194	-.306	.462	.611*
		Sig. (2-tailed)			.278	.102	.546	.333	.131	.035
	H	Correlation Coefficient			1.000	.877**	.841**	.615*	.893**	.786**
		Sig. (2-tailed)				.000	.001	.033	.000	.002
	f	Correlation Coefficient				1.000	.822**	.373	.783**	.677*
		Sig. (2-tailed)					.001	.232	.003	.015
	det	Correlation Coefficient					1.000	.511	.834**	.594*
		Sig. (2-tailed)						.089	.001	.042
	conges	Correlation Coefficient						1.000	.392	.230
		Sig. (2-tailed)							.207	.472
	def	Correlation Coefficient							1.000	.925**
		Sig. (2-tailed)								.000
	T	Correlation Coefficient								1.000
		Sig. (2-tailed)								

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

H= Hyperplasia ; f = Fusion ; det= Detachment ; conges= Blood congestion ; def= deformation ; T= Telangiectasia

٤-١-١-٤ بررسی ضریب همبستگی ما بین آسیب های آبشش و زمان و غلظت

مطابق جدول٤-٤ مابین:

غلظت و آسیب های هیپرپلازی (r=.815, p< 0.01)، همجوشی (r=.620, p<0.05)، دیتچمنت (r=.849, p< 0.01)، پرخونی(r=.706, p<0.05) و دفرمه شدن (r=.742, p<0.01) همبستگی مثبت و معنی دار وجود دارد.

مابین زمان و عارضه تلانژیکتازی همبستگی مثبت و معنادار مشاهده گردید (r=.611, p<0.05).

بین آسیب هیپرپلازی و همجوشی (r=.877, p<0.01)، دیتچمنت (r=.841, p< 0.01)، پرخونی (r=.615, p<0.05) و دفرمه شدن (r=.893, p<0.01) و تلانژیکتازی (r=.786, p<0.01) همبستگی مثبت و معنی دار وجود دارد.

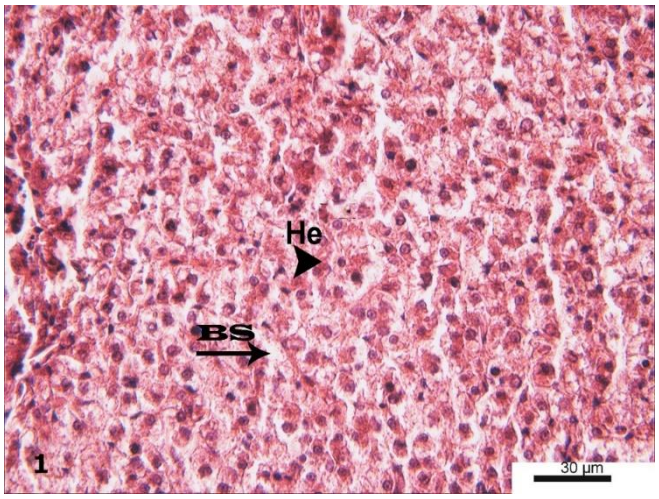
بین آسیب همجوشی و دیتچمنت (r=.822, p< 0.01)، دفرمه شدن (r=.783, p<0.01) و تلانژیکتازی (r=.677, p<0.05) همبستگی مثبت و معنی دار وجود دارد.

بین آسیب دیتچمنت و دفرمه شدن (r=.834, p<0.01) و تلانژیکتازی (r=.594, p<0.05) همبستگی مثبت و معنی دار وجود دارد.

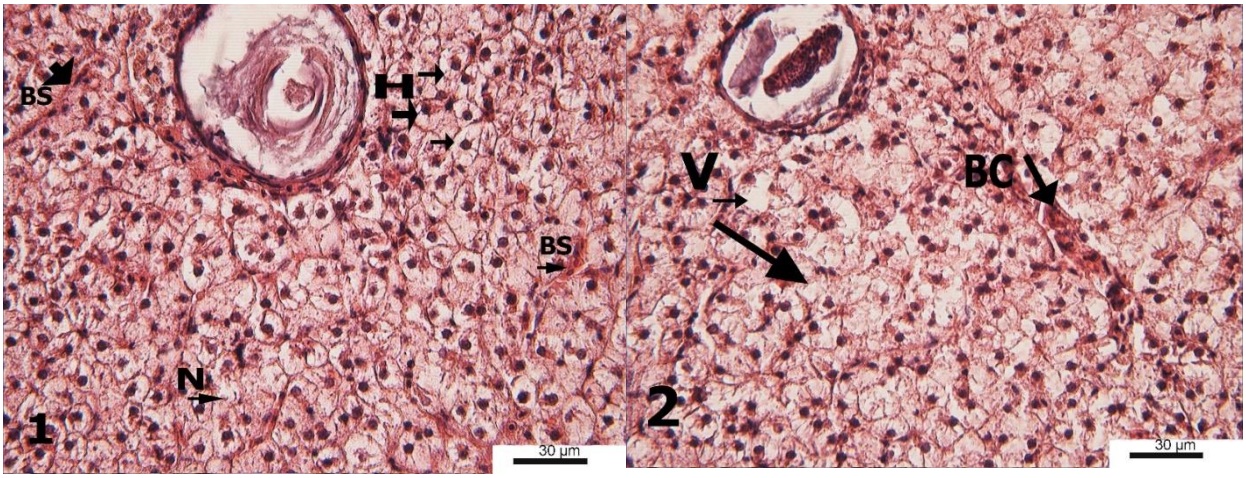
بین آسیب دفرمه شدن و تلانژیکتازی (r=.925, p<0.01) همبستگی مثبت و معنی دار وجود دارد.

٤-١-٢ آسیب شناسی بافت کبد

نمونه بافت کبد ماهی های شاهد بررسی گردید و هیچگونه آسیب بافتی درکبد ماهیان مشاهده نشد. شکل٤-٥ نشان دهنده بافت طبیعی کبد می باشد .



شکل٤ –٥ بافت نرمال کبد. کبد بافتی نسبتا یکدست داشته که بیشترین سلول های تشکیل دهنده آن هپاتوسیت های می باشند. که در لابلای آنها مویرگهای ویژه ی کبدی، که سینوزوئید نامیده می شوند، به چشم می خورد. هپاتوسیت ها دارای هسته درشتی می باشند. (He) هپاتوسیتهای کبد؛ (BS) سینوزوید های کبد؛ بافت کبدی شاهد فاقد هر گونه آسیب بافتی بود.



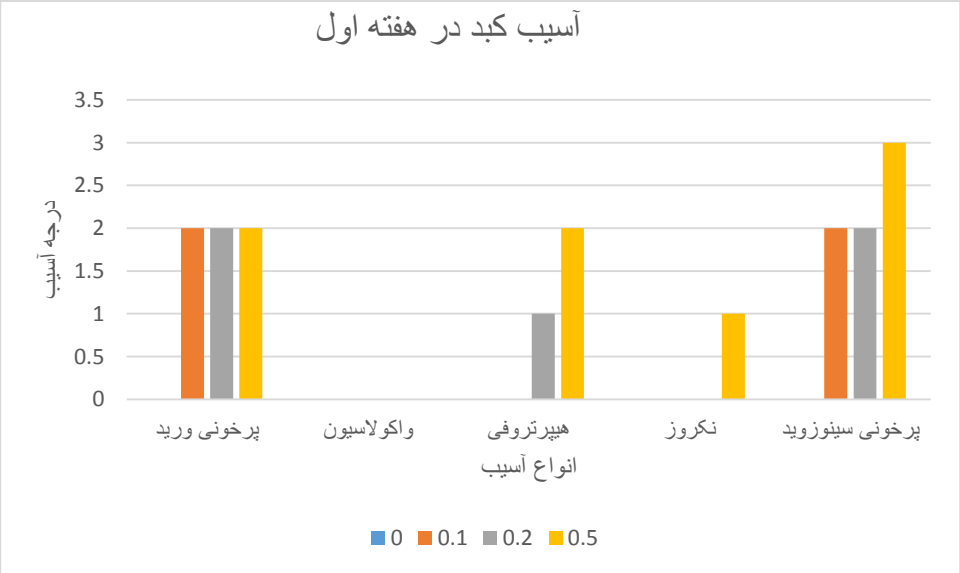
شکل٤ –٦ آسیب های کبدی در تیمار ۰/۱ میلیگرم در لیتر از نانوذرات مس

۱- (H) هیپرتروفی سلول؛ (BS) پرخونی در سینوزوئید ها؛ (N) نکروز

۲- (V) واکوئلاسیون؛ (BC) پرخونی در سینوزوئید ها

٤-١-٢-١ نتایج آسیب بافتی کبد در تیمار ۰/۱ میلیگرم در لیتر نانوذرات مس

پس از مواجهه ماهیها با نانوذرات مس در تیمار ۰/۱ میلیگرم در لیتر، آسیبهای بافتی گوناگونی در بافت کبدی مشاهده شد. که از آن دسته می توان به هیپرتروفی سلولی، پرخونی در ورید مرکزی، واکوئلاسیون، نکروز، پرخونی در سینوزئید ها اشاره نمود (جدول ٤-٥). با افزایش مدت زمان مواجهه شدت آسیب های بافتی مذکور افزایش پیدا نمود (شکل٤-٦ و نمودار ٤-٤).



نمودار ٤-٤ آسیب کبدی در هفته اول

جدول ٤– ٥ آسیبهای بافتی کبد ماهی کلمه در تیمار ۰/۱ میلیگرم در لیتر از نانو ذرات مس

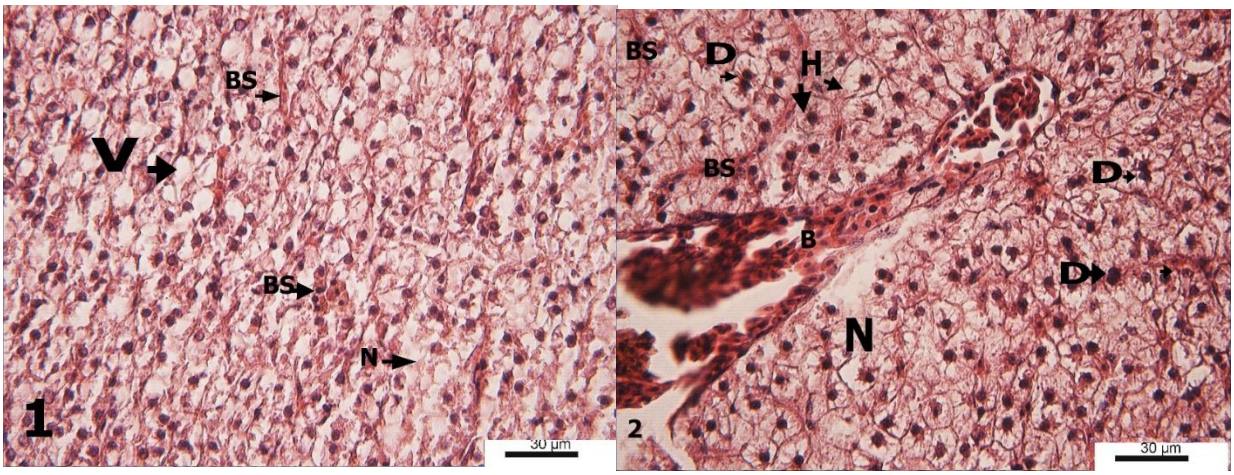
مدت زمان / نوع آسیب	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم
پرخونی در ورید مرکزی	++	++	+
واکوئلاسیون	–	–	+
هیپرتروفی	++	+++	+++
نکروز	–	+	+
پرخونی در سینوزوئید ها	++	++	+

– به معنای عدم مشاهده آسیب بافتی مشخص در لامهای زیر میکروسکوپ؛ + به معنای آسیب بافتی کم بود و حدودا ۱۰٪ از محدوده بافتی در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ٤٠ را شامل می شد؛ ++ به معنای آسیب بافتی متوسط بود و حدودا ۲۰٪ از محدوده بافتی در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ٤٠ را شامل می شد.

+++ به معنای آسیب بافتی شدید بود و بیش از ۲۰٪ از محدوده بافتی در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ٤٠ را شامل می شد. (Dutta *et al.*, 1996)

٤-١-٢-٢ نتایج آسیب بافتی کبد در تیمار ۰/۲ میلیگرم در لیتر از نانوذرات مس

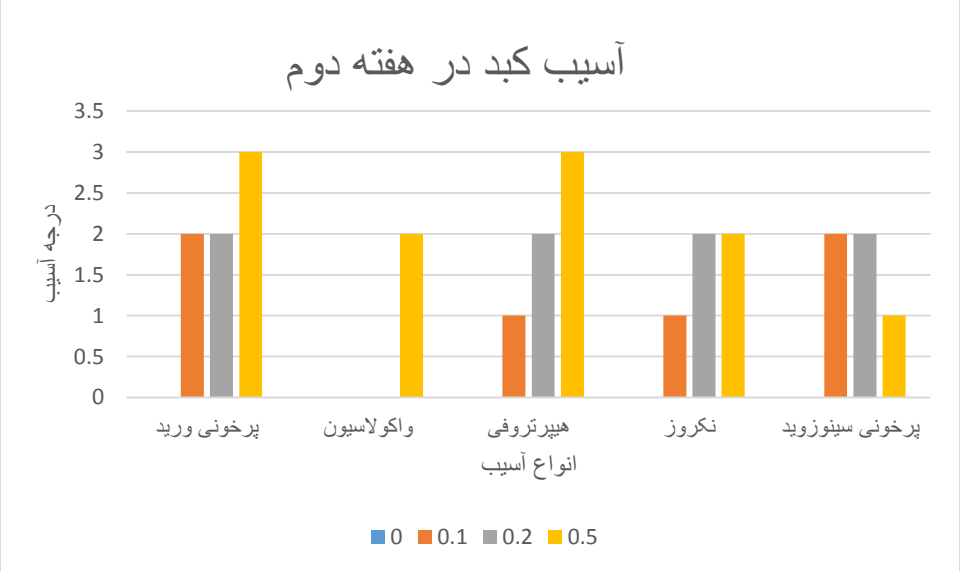
در کبد ماهیانی که در معرض غلظت ۰/۲ میلیگرم در لیتر از نانوذرات مس قرار گرفته بودند . آسیبهای بافتی، هیپرتروفی سلولی، پرخونی در ورید مرکزی، واکوئلاسیون، نکروز، پرخونی در سینوزئید ها، مرزنشینی هسته ها مشاهده گردید و شدت آسیب ها نسبت به غلظت ۰/۱ میلیگرم در لیتر شدیدتر و مخرب تر بود (شکل ٤-٧ و نمودار٤-٥). همچنین با افزایش مدت زمان در معرض بودن، تخریب بافتی بیشتری صورت گرفت (جدول٤-٦).



شکل ٤ –٧ آسیب های کبدی در تیمار ۰/۲ میلیگرم در لیتر از نانوذرات مس

۱) (BS) پرخونی سینوزوئید ها؛ (V) واکوئلاسیون؛ (N) نکروز.

۲) (H) هیپرتروفی؛ (B) پرخونی در ورید مرکزی؛ (BS) پرخونی سینوزوئید ها؛ (D) مرزنشینی هسته ها؛ (N) نکروز.



نمودار٤–٥ آسیب کبدی در هفته دوم

جدول ٤–٦ آسیبهای بافتی کبد ماهی کلمه در تیمار ۰/۲ میلیگرم در لیتر نانو ذرات مس

مدت زمان / نوع آسیب	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم
پرخونی در ورید مرکزی	++	++	+
واکوئلاسیون	–	–	++
هیپرتروفی	+	++	+
نکروز	–	+	+
پرخونی در سینوزوئید ها	++	++	+
مرز نشینی هسته ها	–	+	+

– به معنای عدم مشاهده آسیب بافتی مشخص در لامهای زیر میکروسکوپ

+ به معنای آسیب بافتی کم بود و حدودا ۱۰٪ از محدوده بافتی در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ٤٠ را شامل می شد.

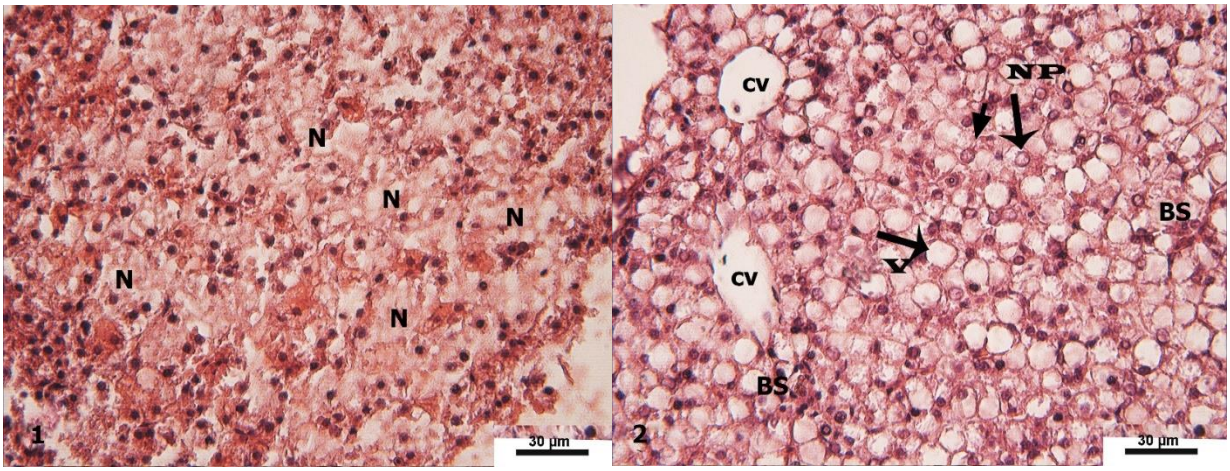
++ به معنای آسیب بافتی متوسط بود و حدودا ۲۰٪ از محدوده بافتی در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ٤٠ را شامل می شد.

+++ به معنای آسیب بافتی شدید بود و بیش از ۲۰٪ از محدوده بافتی در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ٤٠ را شامل می شد.

(Dutta *et al*., 1996)

٤-١-٢-٣ نتایج آسیب بافتی کبد در تیمار ۰/۵ میلیگرم در لیتر از نانوذرات مس

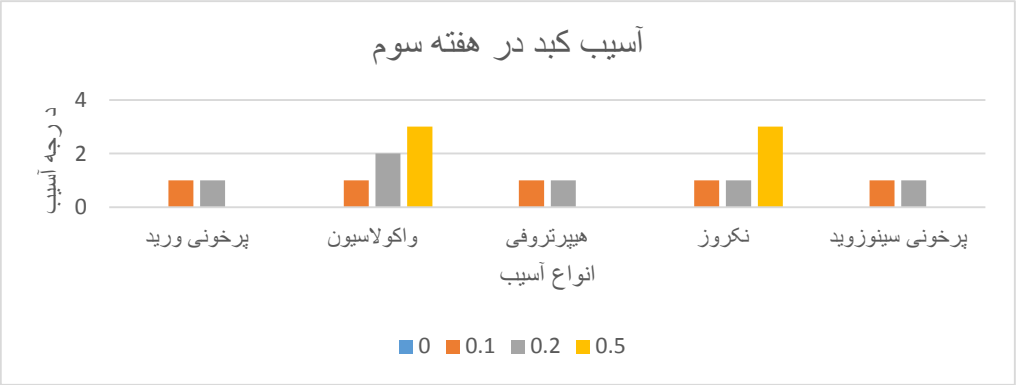
در کبد ماهیانی که در معرض ۰/۵ میلیگرم در لیتر از نانوذرات مس قرار گرفته بودند، آسیبهای بافتی هیپرتروفی سلولی، پرخونی در ورید مرکزی، واکوئلاسیون، نکروز، پرخونی در سینوزئید ها مشاهده گردید و شدت آسیب ها نسبت به غلظتهای ۰/۱ و ۰/۲ میلیگرم در لیتر شدیدتر و مخرب تر بود (شکل ٤-٨ و نمودار ٤-٦). همچنین با افزایش مدت زمان در معرض بودن، تخریب بافتی بیشتری صورت گرفت (جدول٤-٧).



شکل٤ – ٨ آسیب های کبدی در تیمار ۰/۵ میلیگرم در لیتر از نانوذرات مس

۱) (N) نکروز شدید بافتی

۲) (CV) ورید مرکزی؛ (BS) پرخونی سینوزوئیدها؛ (V) واکوئلاسیون شدید؛ (NP) پیکنوزه شدن هسته



نمودار٤-٦ آسیب کبد در هفته سوم

جدول ٤– ٧ آسیبهای بافتی کبد ماهی کلمه در تیمار ۰/۵ میلیگیرم در لیتر نانو ذرات مس

مدت زمان / نوع آسیب	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم
پرخونی در ورید مرکزی	++	++	–
واکوئلاسیون	–	++	+++
هیپرتروفی	++	+++	–
نکروز	+	++	+++
پرخونی در سینوزوئید ها	+++	++	+
پیکنوز هسته ها	+	++	++

– به معنای عدم مشاهده آسیب بافتی مشخص در لامهای زیر میکروسکوپ

+ به معنای آسیب بافتی کم بود و حدودا ۱۰٪ از محدوده بافتی در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ٤٠ را شامل می شد.

++ به معنای آسیب بافتی متوسط بود و حدودا ۲۰٪ از محدوده بافتی در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ٤٠ را شامل می شد.

+++ به معنای آسیب بافتی شدید بود و بیش از ۲۰٪ از محدوده بافتی در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ٤٠ را شامل می شد.

(Dutta et al., 1996)

جدول٤-٨ بررسی ضریب همبستگی ما بین آسیب های کبد و زمان و غلظت

			dose	time	vcon	v	hypertro	necros	scon
Spearman's rho	dose	Correlation Coefficient	1.000	0.000	.549	.541	.652*	.768**	.440
		Sig. (2-tailed)		1.000	.065	.069	.022	.004	.152
	time	Correlation Coefficient		1.000	-.423	.635*	-.094	.446	-.510
		Sig. (2-tailed)			.171	.027	.772	.146	.091
	vcon	Correlation Coefficient			1.000	-.066	.788**	.283	.820**
		Sig. (2-tailed)				.838	.002	.372	.001
	v	Correlation Coefficient				1.000	.152	.756**	-.333
		Sig. (2-tailed)					.636	.004	.290
	hypertro	Correlation Coefficient					1.000	.539	.633*
		Sig. (2-tailed)						.071	.027
	necros	Correlation Coefficient						1.000	.098
		Sig. (2-tailed)							.761
	scon	Correlation Coefficient							1.000
		Sig. (2-tailed)							

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Vcon=vein blood congestion; V=vacolation; hypertro =hypertrophy; necros= necrosis; scon= sinusoid blood congestion.

٤-١-٢-٤ بررسی ضریب همبستگی ما بین آسیب های کبد و زمان و غلظت

مطابق جدول ٤-٨ : مابین غلظت نانو ذرات مس و آسیب های کبدی هیپرتروفی (r=.652, p< 0.01) و نکروز (r=.768, p< 0.05) همبستگی مثبت و معنا دار وجود دارد.

مابین زمان در معرض قرار گیری و آسیب واکوئلاسیون (r=.635, p< 0.05) همبستگی مثبت و معنا دار وجود دارد.

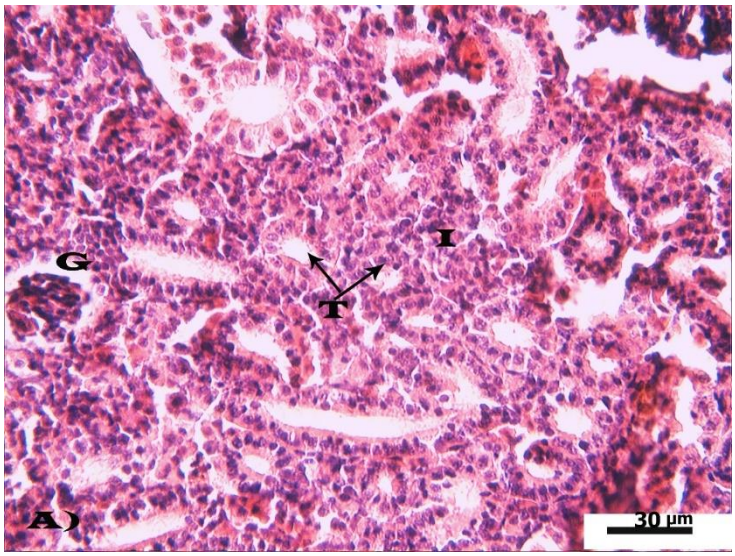
مابین آسیب پرخونی وریدهای کبدی و هیپرتروفی (r=.788, p< 0.01) و پرخونی سینوزوئید ها (r=.820, p< 0.01) همبستگی مثبت و معنادار وجود دارد.

مابین آسیب واکولاسیون و نکروز (r=.756, p< 0.01) همبستگی مثبت و معنادار وجود دارد.

مابین هیپرتروفی و پرخونی سینوزوئید ها (r=.633, p< 0.05) همبستگی مثبت و معنادار وجود دارد.

٤-١-٣ آسیب شناسی کلیه

نمونه بافت کلیه ماهی های شاهد بررسی گردید و هیچگونه آسیب بافتی درکلیه ماهیان مشاهده نشد. شکل ٤-٩ نشان دهنده بافت طبیعی کلیه می باشد.



شکل٤-٩ بافت نرمال کلیه در نمونه های شاهد. هیچگونه آسیب بافتی در نمونه های شاهد مشاهده نشد. توبولهای کلیوی دارای سلولهایی مکعبی با هسته مرکزی هستند. شبکه مویرگی گلومرول به وضوح قابل در داخل کپسول بومن قابل مشاهده می باشد و سلول های خونی در شرایط عادی قرار دارند.فضای کپسول بومن شرایط نرمال دارد. فضای بین توبولهای کلیوی را بافت interstitial پر کرده است که در نمونه های شاهد تراکم طبیعی دارند. (G) گلومرول؛ (T) توبولهای کلیوی؛ (I) interstitial tissue

٤-١-٣-١ نتایج آسیب بافتی کلیه در تیمار ۰/۱ میلیگرم در لیتر نانوذرات مس

پس از مواجهه ماهی ها با غلظت ۰/۱ میلیگرم در لیتر، آسیبهای بافتی گوناگونی در بافت کلیه مشاهده گردید که شامل انبساط گلومرولی، پرخونی، دژنره شدن سلولی، افزایش interstitial tissue، تجمع ماکروفاژها، واکوئلاسیون و نکروز بافتی بود (شکل ٤-١٠ و نمودار ٤-٧). شدت این ضایعات با افزایش مدت زمان در معرض بودن افزایش یافت ولی در مقایسه با سایر تیمارها کمتر بود (جدول٤-٩).

جدول ٤-٩ آسیبهای بافتی کلیه ماهی کلمه در تیمار ۰/۱ میلیگرم در لیتر نانو ذرات مس

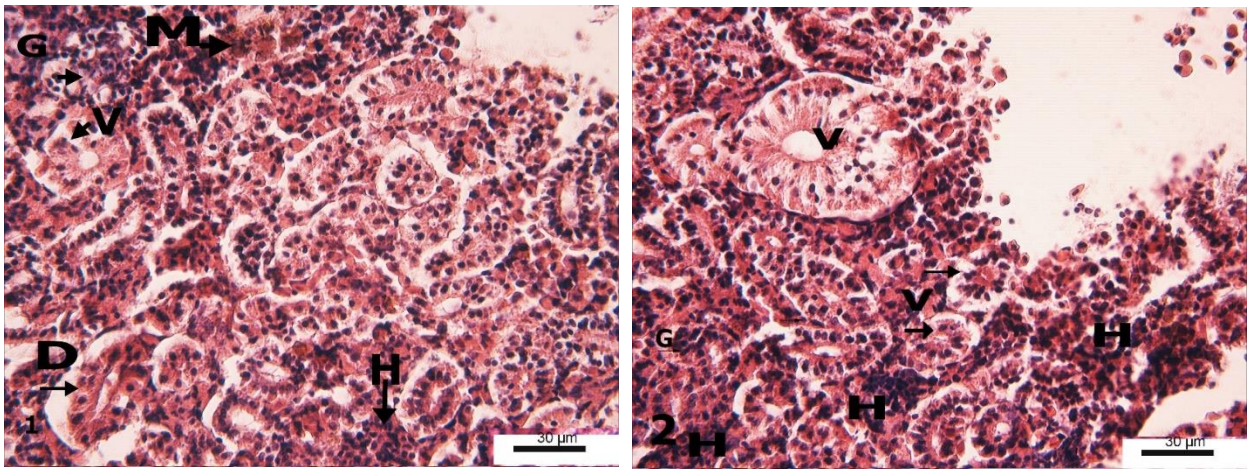
مدت زمان / نوع آسیب	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم
انبساط گلومرولی	–	+	++
دژنراسیون	–	–	+
افزایش interstitial tissue	+	+	+
افزایش ماکروفاژها	+	+	+
واکوئللاسیون	–	–	+
پرخونی	–	+	+
نکروز	–	–	+

– به معنای عدم مشاهده آسیب بافتی مشخص در لامهای زیر میکروسکوپ

+ به معنای آسیب بافتی کم بود و حدودا ۱۰٪ از محدوده بافتی در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ٤٠ را شامل می شد.

++ به معنای آسیب بافتی متوسط بود و حدودا ۲۰٪ از محدوده بافتی در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ٤٠ را شامل می شد.

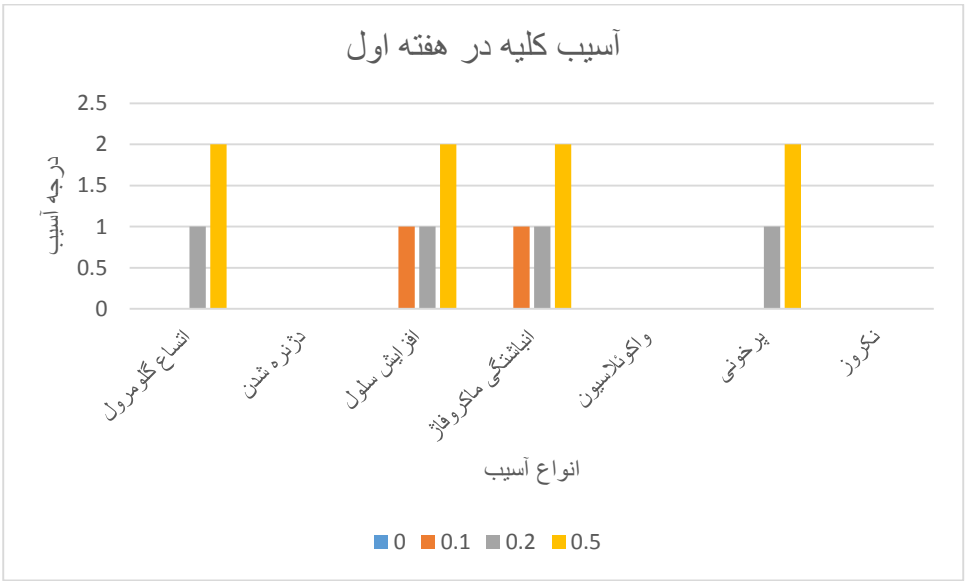
+++ به معنای آسیب بافتی شدید بود و بیش از ۲۰٪ از محدوده بافتی در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ٤٠ را شامل می شد.(Dutta et al., 1996)



شکل ٤-١٠ آسیب های کلیوی تیمار ۰/۱ میلیگرم در لیتر از نانوذرات مس

۱) (M) تجمع ملانوماکروفاژها؛ (V) واکولاسیون در سلولهای توبولها؛ (H) افزایش interstitial tissue؛ (G) انبساط گلومرولها و کاهش فضای کپسول بومن؛ (D) دژنره شدن توبول ها

۲) (V) واکولاسیون در سلولهای توبولها؛ (H) افزایش interstitial tissue ؛ (G) انبساط گلومرولها و کاهش فضای کپسول بومن



نمودار٤-٧ آسیب کلیه در هفته اول

٤-١-٣-٢ نتایج آسیب بافتی کلیه در تیمار ۰/۲ میلیگرم در لیتر از نانوذرات مس

پس از مواجهه ماهی ها با غلظت ۰/۲ میلیگرم در لیتر آسیبهای بافتی گوناگونی در بافت کلیه مشاهده گردید که شامل انبساط گلومرولی، پرخونی، دژنره شدن سلولی، افزایش interstitial tissue، تجمع ماکروفاژها، واکوئلاسیون و نکروز بافتی مشاهده شد (شکل٤-١١). شدت این ضایعات با افزایش مدت زمان در معرض بودن افزایش یافت ولی در مقایسه با سایر تیمارها، نسبت به تیمار ۰/۱ شدید تر و نسبت به تیمار ۰/۵ ضعیفتر بود (جدول٤-١٠و نمودار ٤-٨).

جدول ٤-١٠ آسیبهای بافتی کلیه ماهی کلمه در تیمار ۰/۲ میلیگرم در لیتر از نانو ذرات مس

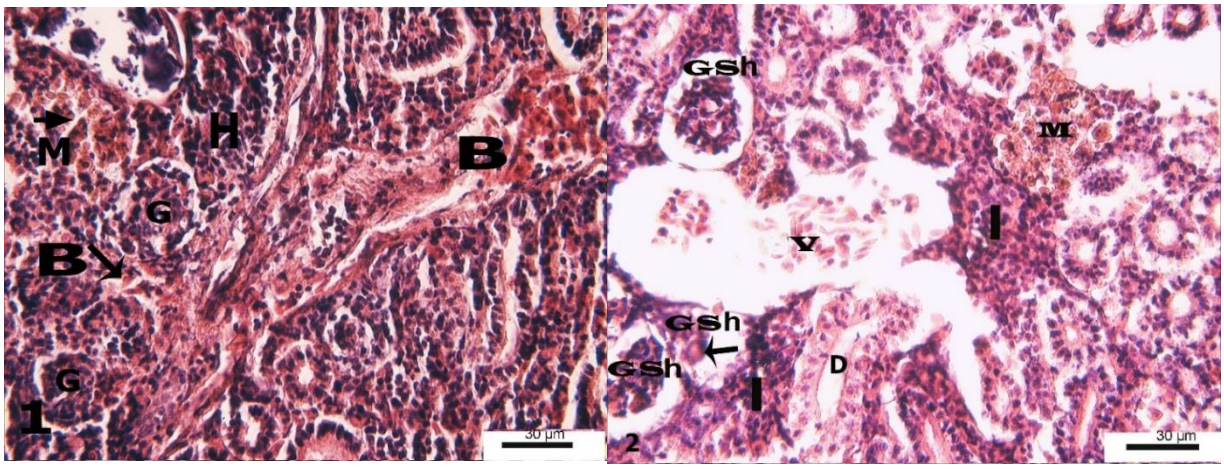
مدت زمان / نوع آسیب	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم
انقباض گلومرولی	+	++	+++
دژنراسیون	–	+	++
افزایش interstitial tissue	+	+	++
افزایش ماکروفاژها	++	++	++
واکوئللاسیون	++	++	+++
پرخونی	+	+	+++
نکروز	+	++	+++

- به معنای عدم مشاهده آسیب بافتی مشخص در لامهای زیر میکروسکوپ

\+ به معنای آسیب بافتی کم بود و حدودا ۱۰% از محدوده بافتی در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ٤٠ را شامل می شد.

++ به معنای آسیب بافتی متوسط بود و حدودا ۲۰% از محدوده بافتی در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ٤٠ را شامل می شد.

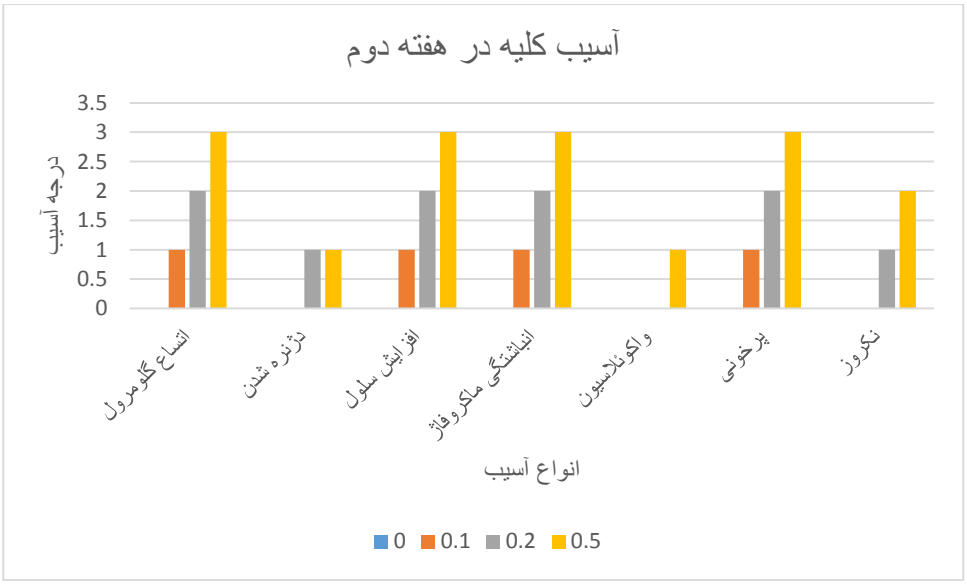
+++ به معنای آسیب بافتی شدید بود و بیش از ۲۰% از محدوده بافتی در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ٤٠ را شامل می شد.(Dutta *et al.*, 1996)



شکل ٤-١١ آسیب های کلیوی در تیمار ۰/۲ میلیگرم در لیتر از نانوذرات مس

۱) (B) پرخونی؛ (H) افزایش interstitial tissue؛ (M) تجمع ماکروفاژها؛ (G) انبساط گلومرول ها باعث کاهش فضای کپسول بومن شده است.

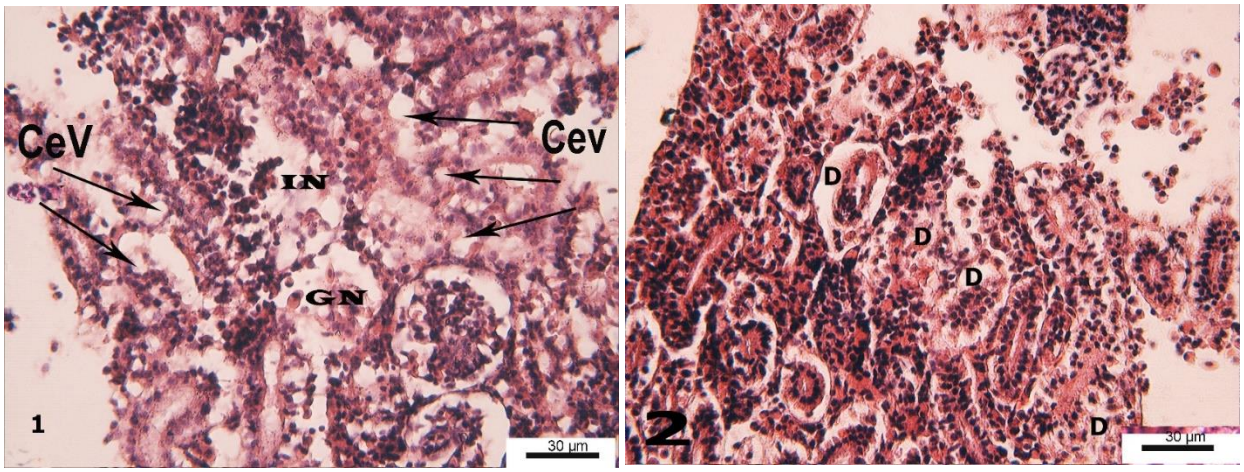
۲) (M) تجمع ماکروفاژها؛ (Gsh) انقباض گلومرولها باعث افزایش فضای کپسول بومن شده است؛ (D) دژنره شدن سلولهای توبولی؛ (V) ورید مرکزی؛ (I) افزایش interstitial tissue



نمودار٤-٨ آسیب کلیه در هفته دوم

٤-١-٣-٣ نتایج آسیب بافتی کلیه در تیمار ٠/٥ میلیگرم در لیتر از نانوذرات مس

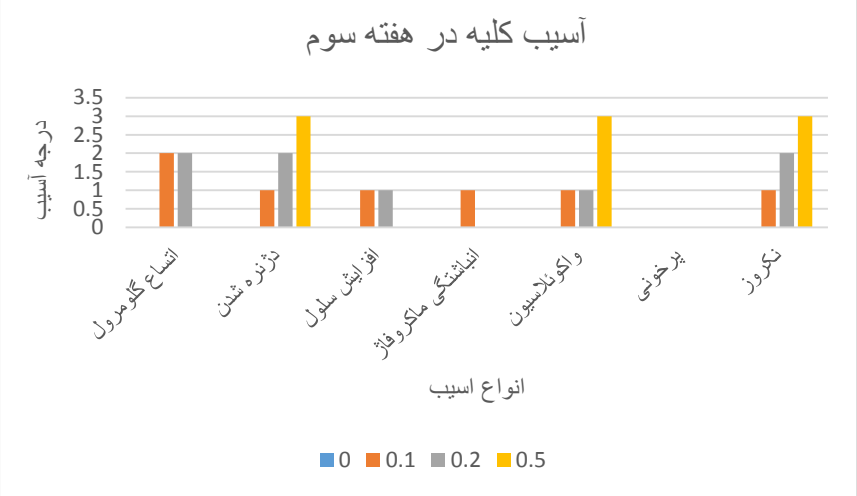
پس از مواجهه ماهی ها با غلظت ٠/٥ میلیگرم در لیتر از نانوذرات مس، آسیبهای بافتی گوناگونی در بافت کلیه مشاهده گردید که شامل انبساط و انقباض گلومرولی، پرخونی، دژنره شدن سلولی، افزایش interstitial tissue، تجمع ماکروفاژها، واکوئلاسیون و نکروز بافتی بود (شکل٤-١٢). شدت این ضایعات با افزایش مدت زمان در معرض بودن افزایش یافت ولی در مقایسه با سایر تیمارها، شدید تر بود (جدول٤-١١ و نمودار٤-٩).



شکل٤-١٢ آسیب های کلیوی تیمار ٠/٥ میلیگرم در لیتر از نانوذرات مس

١) (Cev) واکوئلاسیون شدید سلولی؛ (GN) نکروز گرومرولی؛ (IN) نکروز interstitial tissue

٢) (D) دژنره شدن توبولهای کلیوی



نمودار٤-٩ آسیب های کلیه در هفته سوم

جدول شماره ٤-١١ آسیبهای بافتی کلیه ماهی کلمه در تیمار ۰/۵ میلیگرم در لیتر از نانوذرات مس

مدت زمان / نوع آسیب	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم
انقباض گلومرولی	++	+++	–
دژنراسیون	++	+++	+++
افزایش interstitial tissue	+++	+	–
افزایش ماکروفاژها	++	+++	–
واکوئللاسیون	++	++	+++
پرخونی	+++	++	–
نکروز	+	++	+++

– به معنای عدم مشاهده آسیب بافتی مشخص در لامهای زیر میکروسکوپ

+ به معنای آسیب بافتی کم بود و حدودا ۱۰٪ از محدوده بافتی در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ٤۰ را شامل می شد.

++ به معنای آسیب بافتی متوسط بود و حدودا ۲۰٪ از محدوده بافتی در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ٤۰ را شامل می شد.

+++ به معنای آسیب بافتی شدید بود و بیش از ۲۰٪ از محدوده بافتی در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ٤۰ را شامل می شد. (Dutta *et al.*, 1996)

جدول ٤-١٢ بررسی **ضریب همبستگی ما بین آسیب های کلیه و زمان و غلظت**

			dose	time	gsh	deg	icell	m	v	con	necros
Spearman's rho	dose	Correlation Coefficient	1.000	.000	.606*	.559	.636*	.549	.506	.605*	.605*
		Sig. (2-tailed)	.	1.000	.037	.059	.026	.065	.093	.037	.037
	time	Correlation Coefficient		1.000	.094	.665*	-.290	-.376	.657*	-.364	.629*
		Sig. (2-tailed)		.	.772	.018	.360	.229	.020	.244	.028
	gsh	Correlation Coefficient			1.000	.421	.841**	.724**	.329	.688*	.450
		Sig. (2-tailed)			.	.173	.001	.008	.296	.013	.142
	deg	Correlation Coefficient				1.000	.086	.000	.884**	-.022	.987**
		Sig. (2-tailed)				.	.791	1.000	.000	.946	.000
	icell	Correlation Coefficient					1.000	.873**	.078	.752**	.137
		Sig. (2-tailed)					.	.000	.810	.005	.672
	m	Correlation Coefficient						1.000	-.087	.871**	.062
		Sig. (2-tailed)						.	.789	.000	.848
	v	Correlation Coefficient							1.000	-.151	.906**
		Sig. (2-tailed)							.	.640	.000
	con	Correlation Coefficient								1.000	.055
		Sig. (2-tailed)								.	.866
	necros	Correlation Coefficient									1.000
		Sig. (2-tailed)									.

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

gsh= Glomerular shrinkage; deg= Degeneration; icell= Increase in interstitial tissue; m= Macrophages aggregation; v=vaculation; con=congestion; necros= necrosis

٤-١-٣-٤ بررسی ضریب همبستگی ما بین آسیب های کلیه و زمان و غلظت

مطابق جدول ٤-١٢:

مابین غلظت نانوذرات مس و آسیب های اتساع گلومرولی (r=.606, p<0.05)، افزایش بافت interstitial (r=.636, p<0.05)، پرخونی (r=.636, p<0.05) و نکروز (r=.636, p<0.05) همبستگی مثبت و معنا دار وجود دارد.

مابین زمان در معرض بودن و آسیب های دژنره شدن (r=.665, p<0.05)، واکوئلاسیون (r=.657, p<0.05) و نکروز (r=.629, p<0.05) همبستگی مثبت و معنا دار وجود دارد.

مابین آسیب اتساع گلومرولی و آسیب افزایش بافت interstitial (r=.841, p<0.01)، افزایش ماکروفازها (r=.724, p<0.01) و پرخونی (r=.688, p<0.05) همبستگی مثبت و معنا دار وجود دارد.

مابین آسیب دژنره شدن و آسیب های واکوئلاسیون (r=.884, p<0.01) و نکروز (r=.987, p<0.01) همبستگی مثبت و معنا دار وجود دارد.

مابین آسیب افزایش بافت interstitial و آسیب های افزایش ماکروفاژها (r=.873, p<0.01) و پرخونی (r=.752, p<0.01) همبستگی مثبت و معنا دار وجود دارد.

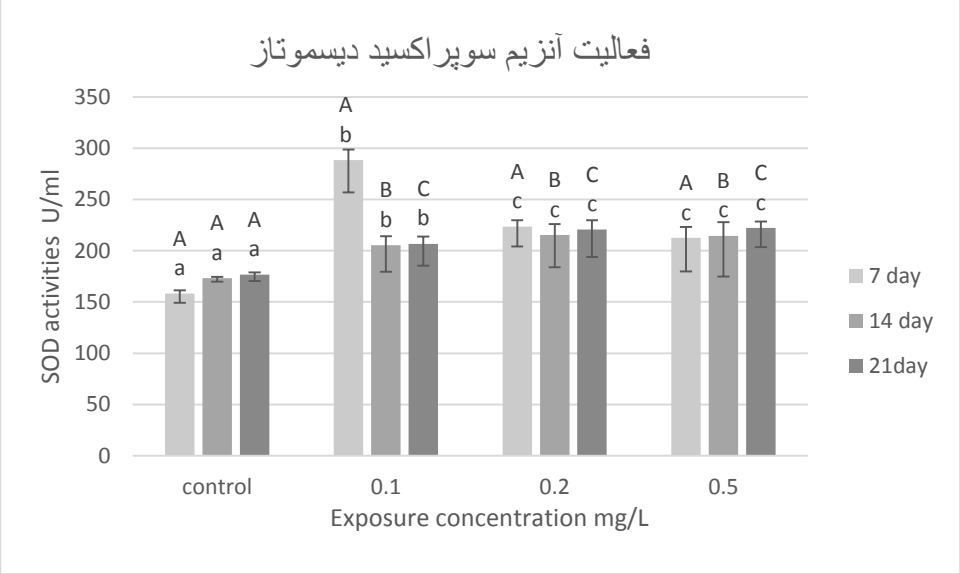
مابین آسیب افزایش ماکروفاژها و پرخونی(r=.871, p<0.01) همبستگی مثبت و معنا دار وجود دارد.

مابین آسیب واکوئلاسیون و نکروز (r=.906, p<0.01) همبستگی مثبت و معنا دار وجود دارد.

٤-٢ بررسی اثرات نانوذرات مس بر آنزیمهای اکسیداتیو ماهی کلمه

٤-٢-١تغییرات فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)

با استناد به آزمون آماری RM-ANOVA در هفته اول فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز درتیمارها به طور معنی داری بیشتر از گروه شاهد بود(p<0.05). حداکثر فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در غلظت ۰/۱ میلیگرم در لیتر در هفته اول مشاهده گردید (288.33 U/ ml). مابین فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در غلظتهای ۰/۲ و ۰/۵ میلیگرم بر لیتر اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد (نمودار ٤-١٠).



نمودار ٤-١٠ تغییرات فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) حروف برزگ نشان دهنده تفاوت معنی دار آماری در زمان ، حروف کوچک نشان دهنده تفاوت معنی دار آماری در غلظت می باشد. ($p<0.05$)

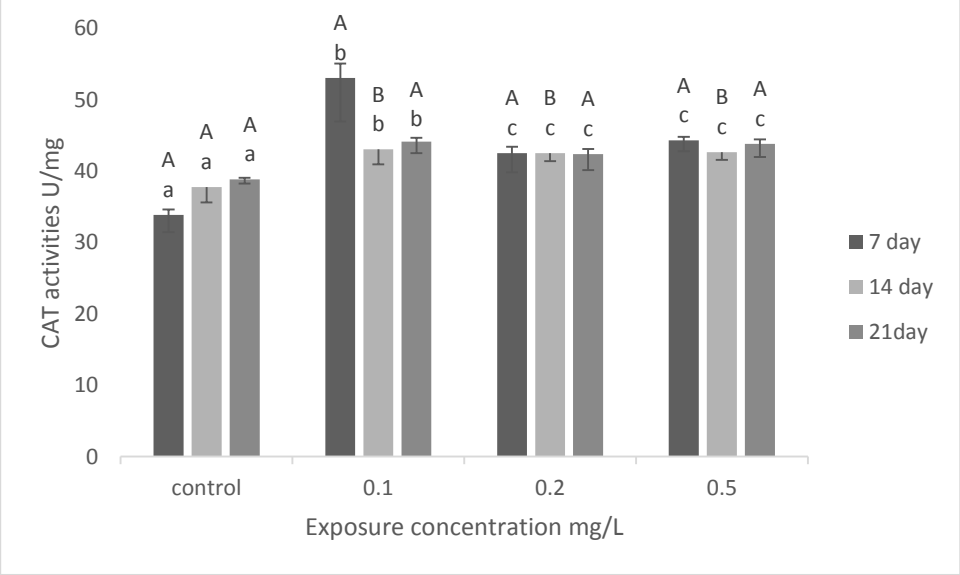
در هفته دوم فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز درتیمارها به طور معنی داری بیشتر از گروه شاهد بود ($p<0.05$). ولی مابین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز تیمارها تفاوت معنی دار آماری مشاهد نگردید. در هفته سوم فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز درتیمارها به طور معنی داری بیشتر از گروه شاهد بود ($p<0.05$). ولی مابین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز تیمارها تفاوت معنی دار آماری مشاهد نگردید.

فعالیت آنزیم SOD در سرم خون ماهیانی که در معرض غلظت 0.1 mg/l از نانوذرات مس قرار گرفته بودند در هفته اول به حداکثر میزان خود رسید ولی با افزایش مدت زمان در معرض بودن (در هفته های دوم و سوم) و همچنین افزایش غظت نانوذرات مس (غلظت ۰/۲ و۰/۵ میلیگرم بر لیتر) افزایش فعالیت مشاهده نشد.

در غلظت ثابت در تیمار شاهد، اختلاف معنی دار آماری مابین هفته اول و دوم و سوم وجود نداشت؛ اما در سایر غلظتها بین هفته اول، دوم و سوم اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد.

۴-۲-۲ تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)

با استناد به آزمون آماری RM-ANOVA در هفته اول فعالیت آنزیم کاتالاز درتیمارها به طور معنی داری بیشتر از گروه شاهد بود($p<0.05$). حداکثر فعالیت آنزیم کاتالاز در غلظت 0.1 mg/l در هفته اول مشاهده گردید (53.02 U/ ml). مابین فعالیت آنزیم کاتالاز در غلظتهای ۰/۲ و ۰/۵ میلیگرم بر لیتر اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد (نمودار٤-١١).



نمودار ٤-١١ تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) حروف بزرگ نشان دهنده تفاوت معنی دار آماری در زمان، حروف کوچک نشان دهنده تفاوت معنی دار آماری در غلظت می باشد ($p<0.05$).

در هفته دوم فعالیت آنزیم کاتالاز درتیمارها به طور معنی داری بیشتر از گروه شاهد بود ($p<0.05$). ولی مابین فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمارها اختلاف معنی دار آماری مشاهده نگردید. در هفته سوم فعالیت آنزیم کاتالاز درتیمارها به طور معنی داری بیشتر از گروه شاهد بود ($p<0.05$). ولی مابین فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمارها اختلاف معنی دار آماری مشاهده نگردید.

حداکثر فعالیت آنزیم CAT در سرم خون ماهیانی که در معرض غلظت 0.1 mg/l از نانوذرات مس قرار گرفته بودند در هفته اول به حداکثر میزان خود رسید (53.02 U/ml)، ولی با افزایش مدت زمان در معرض بودن (در هفته های دوم و سوم) و همچنین افزایش غظت نانوذرات مس (غلظتهای ۰/۲ و۰/۵ میلیگرم بر لیتر) افزایش فعالیت مشاهده نشد. . در غلظت ثابت در تیمار شاهد، اختلاف معنی دار آماری مابین هفته اول و دوم و سوم وجود نداشت؛ اما در سایر غلظتها بین هفته دوم، اول و سوم اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد؛ ولی اختلاف هفته اول و سوم معنی دار نبود.

۴-۲-۳ بررسی همبستگی میان افزایش غلظت نانوذرات مس و زمان درمعرض قرار گیری و فعالیت آنزیم اکسیداتیو

مطابق با جدول (٤-١٣):

مابین زمان و فعالیت آنزیمهای اکسیداتیو و غلظت اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد.

مابین فعالیت آنزیم کاتالاز و آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز ($r=.677, p<.01$) و غلظت ($r=.483, p<.01$) همبستگی مثبت و معنی دار مشاهده شد.

مابین فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز و غلظت ($r=.483, p<.01$) همبستگی مثبت و معنی دار مشاهده شد.

جدول٤-١٣ بررسی ضریب همبستگی مابین فعالیت آنزیمهای اکسیداتیو و غلظت و زمان

			time	cat	sod	dose
Spearman's rho	time	Correlation Coefficient	1.000	-.059	-.026	.005
		Sig. (2-tailed)		.545	.789	.958
	cat	Correlation Coefficient		1.000	.677**	.483**
		Sig. (2-tailed)			.000	.000
	sod	Correlation Coefficient			1.000	.420**
		Sig. (2-tailed)				.000
	dose	Correlation Coefficient				1.000
		Sig. (2-tailed)				
**= p<0.01						

٤- ٣ بررسی اثرات نانوذرات مس بر آسیب DNA و آزمون کامت

پس از جمع آوری داده های تحقیق، نوبت به تجزیه و تحلیل آنها با استفاده از نرم افزارهای آماری می باشد. در تحقیق حاضر بهره گیری از آمار توصیفی در قالب انواع نمودارهای تبیین کننده میانگین و فراوانی ها ارائه شده است. مهمترین متغیر های مورد تحلیل شامل چهار صفت طول دنباله کامت[۲۱]، درصد DNA سر کامت[۲۲]، درصد

[21] Comet tail length
[22] Head DNA

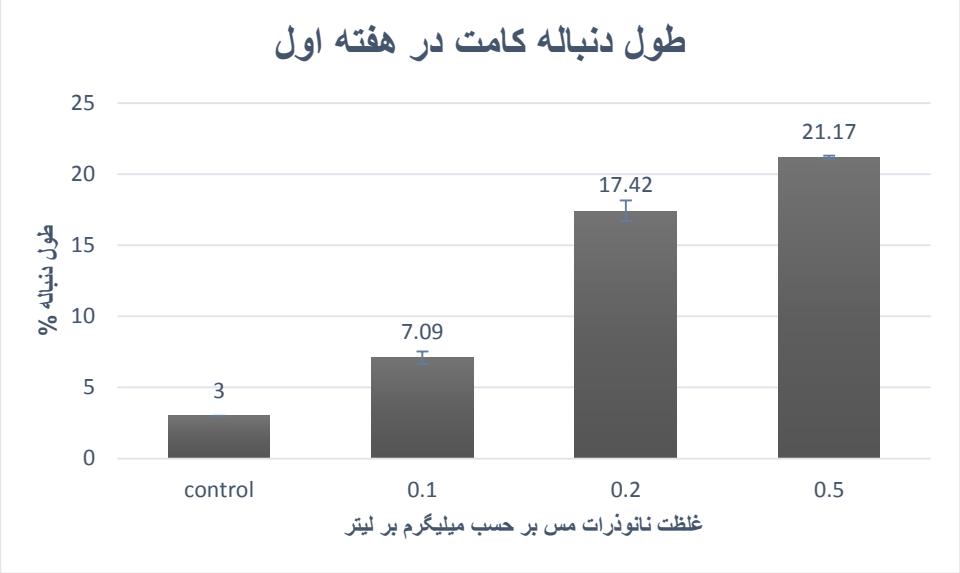
DNA در دنباله کامت ها[23] و شاخص OTM[24] می باشد . وضعیت این چهار شاخص در تحقیق حاضر به صورت زیر می باشد.

٤-٣-١ طول دنباله کامت ها

این صفت یکی از مهمترین صفات مطالعه شده بود، زیرا به عنوان شاخصی از میزان تخریب DNA می باشد.

٤-٣-١-١ طول دنباله کامت ها در هفته اول

مقایسه میانگین طول کامتهای مشاهده شده به روش آزمون RM-ANOVA نشان داد که کمترین و بیشترین طول دنباله کامت در هفته اول به ترتیب به تیمار شاهد (۰٪) و تیمار ۰/۵ میلیگرم برلیتر (۲۱/۱۷٦٪) نانوذرات مس تعلق داشت (نمودار٤-١٢). با افزایش غلظت نانوذرات مس در محیط باعث افزایش طول دنباله کامتها گردیده است ($\alpha<0.05$).

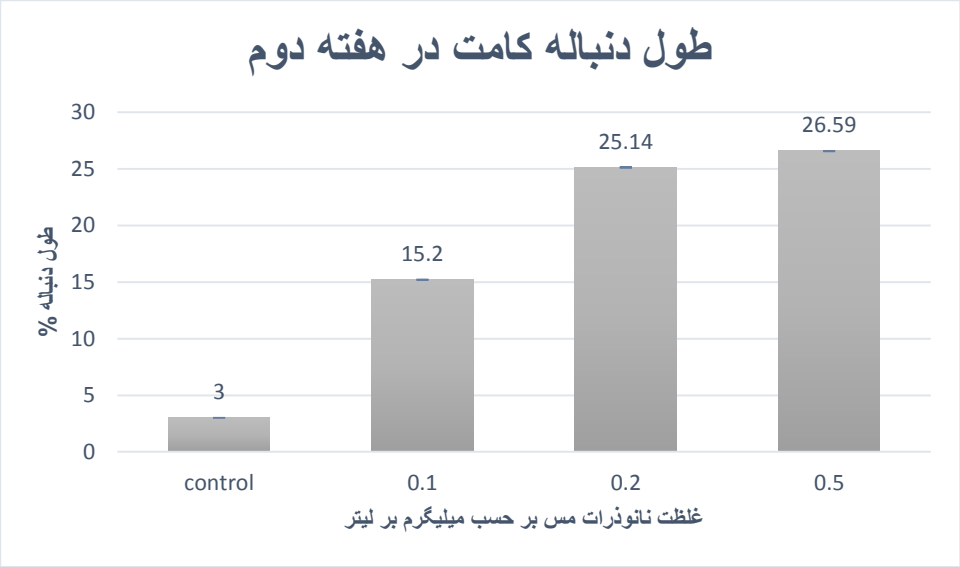


نمودار٤-١٢ مقایسه میانگین طول دنباله کامتهای مشاهده شده در غلظتهای مختلف نانوذرات مس در خون ماهی کلمه در هفته اول

[23] Tail DNA
[24] Olive Tail Moment

٤-٣-١-٢ طول دنباله کامت ها در هفته دوم

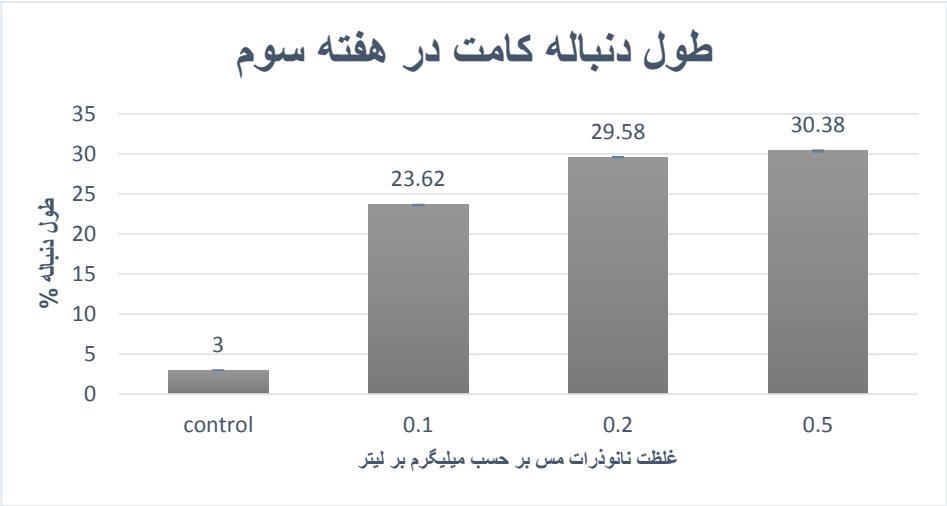
کمترین و بیشترین طول دنباله کامت در هفته دوم به ترتیب به تیمار شاهد (٣٪) و تیمار ٠/٥ میلیگرم برلیتر (٢۶/۵٩٪) نانوذرات مس تعلق داشت (نمودار٤-١٣).



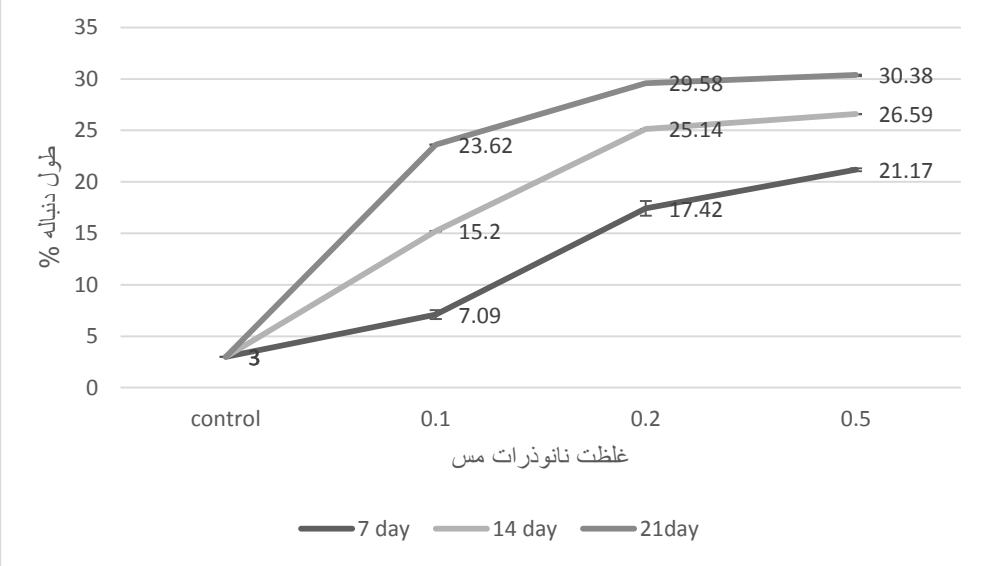
نمودار٤- ١٣ مقایسه میانگین طول دنباله کامتهای مشاهده شده در غلظتهای مختلف نانوذرات مس در خون ماهی کلمه در هفته دوم

٤-٣-١-٣ طول دنباله کامت ها در هفته سوم

کمترین و بیشترین طول دنباله کامت در هفته سوم به ترتیب به تیمار شاهد (٣٪) و تیمار ٠/٥ میلیگرم برلیتر (٣٠/٣٨٪) نانوذرات مس تعلق داشت (نمودار٤-١٤).



نمودار٤- ١٤ مقایسه میانگین طول دنباله کامتهای مشاهده شده در غلظتهای مختلف نانوذرات مس در خون ماهی کلمه در هفته سوم



نمودار٤-١٥ میانگین طول دنباله کامت ها تحت بر هم کنش غلظتهای مختلف نانوذرات مس و زمان های نمونه برداری

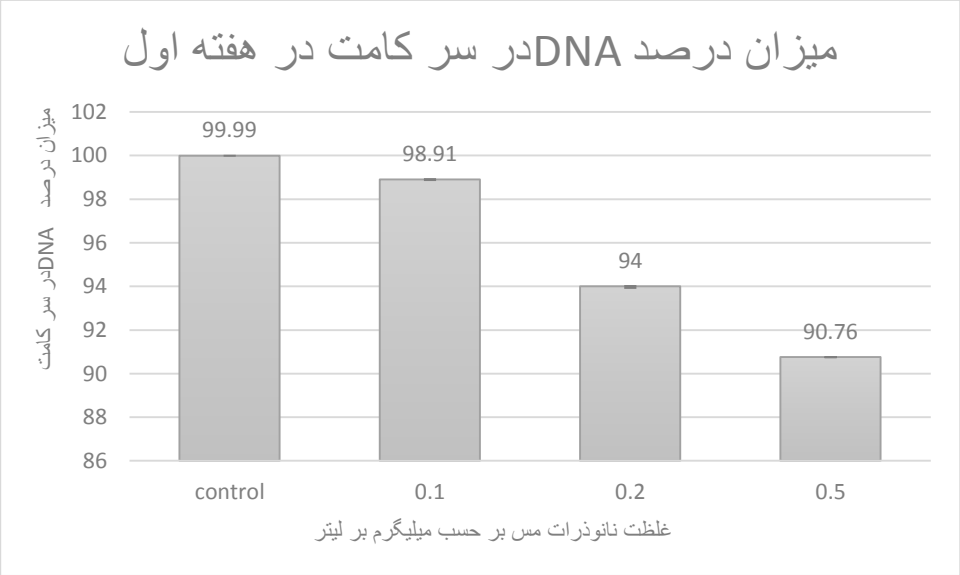
بررسی روند تغییرات طول دنباله کامت ها تحت برهم کنش تیمار غظت نانوذرات مس و زمان نمونه برداری نشان داد که طول کامت ها در تیمار شاهد یکسان بود. بیشترین نوسان طول دنباله کامت در درجه اول به زمان ٢١ روز و در درجه دوم در زمان ١٤ روز مشاهده گردید (نمودار٤-١٥). بر اساس یافته های به دست آمده می توان بیان داشت که میانگین طول دنباله کامتها در غلظتهای سه گانه نانوذرات مس با یکدیگر اختلاف معنا دار داشته اند و

هر چه به غلظت بیشتر می رویم، طول دنباله کامت افزایش پیدا کرده است و گلبول تغییر شکل داده است ($\alpha<0.05$) .

٤-٣-٢ مقدار درصد DNA در سر کامت ها

٤-٣-٢-١ مقدار درصد DNA در سر کامت ها در هفته اول

مقایسه میانگین مقدار DNA مشاهده شده در سر کامت ها به روش آزمون RM-ANOVA ($\alpha<0.05$) اختلاف معنی دار آماری مابین نمونه های شاهد و تیمارها مشاهده شد وکمترین و بیشترین درصد DNA در هفته اول به ترتیب مربوط به تیمارهای 0.5 mg/l (٩٠/٧۶٪) و تیمارشاهد (٩٩/٩٩٪) نانوذرات مس تعلق داشت (نمودار٤-١٦).

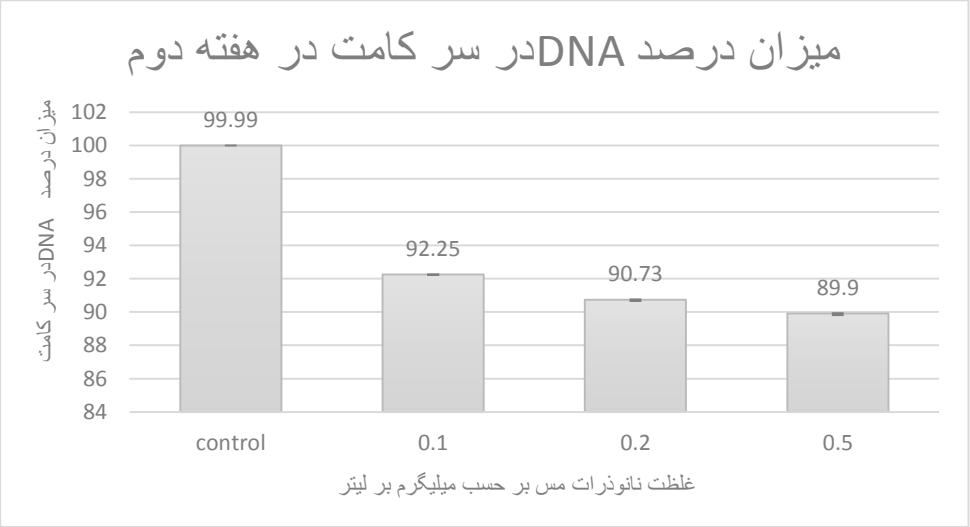


نمودار٤-١٦ مقایسه میانگین درصد DNA در سر کامتهای مشاهده شده در غلظتهای مختلف نانوذرات مس در خون ماهی کلمه در هفته اول

٤-٣-٢-٢ مقدار درصد DNA در سر کامت ها در هفته دوم

مقایسه میانگین مقدار DNA مشاهده شده در سر کامت ها به روش آزمون RM-ANOVA ($\alpha<0.05$)، اختلاف معنی دار آماری مابین نمونه های شاهد و تیمارها مشاهده شد و کمترین و بیشترین درصد DNA در هفته دوم به

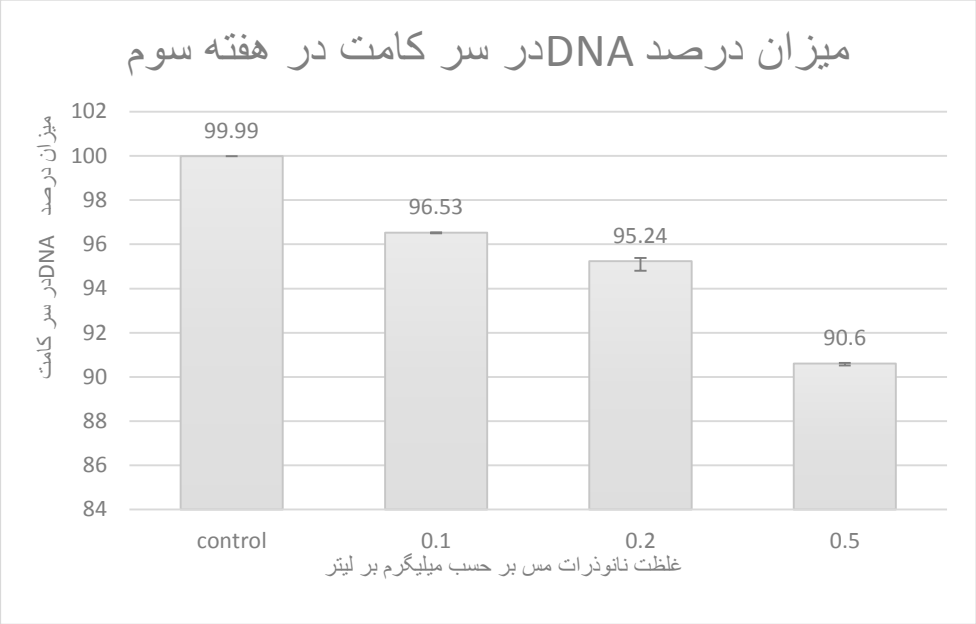
ترتیب مربوط به تیمارهای ۰/۵ mg/l (۸۹/۹٪) و تیمارشاهد (۹۹/۹۹٪) نانوذرات مس تعلق داشت (نمودار٤-۱۷).



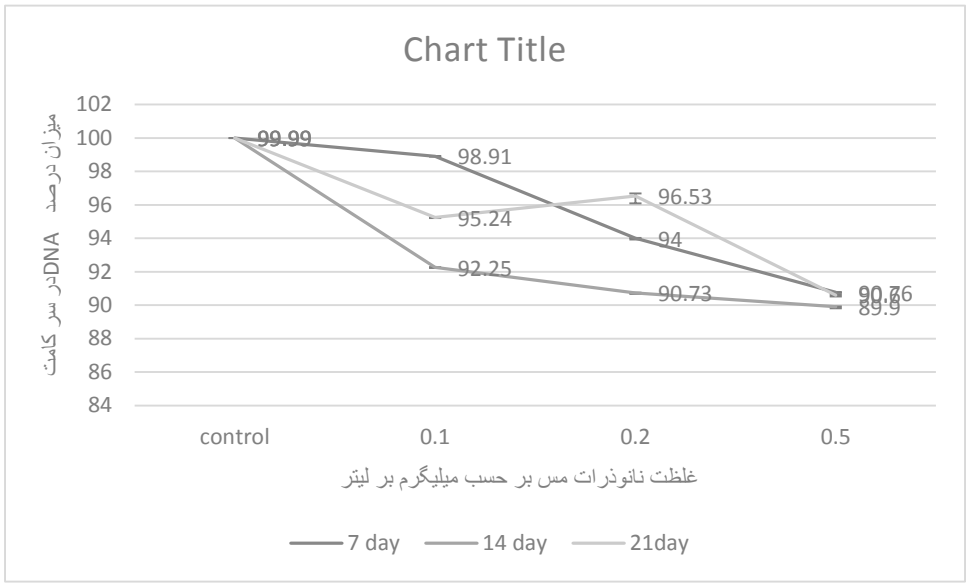
نمودار٤-۱۷ مقایسه میانگین درصد DNA در سر کامتهای مشاهده شده در غلظتهای مختلف نانوذرات مس در خون ماهی کلمه در هفته دوم

٤-۳-۲-۳ مقدار درصد DNA در سر کامت ها در هفته سوم

مقایسه میانگین مقدار DNA مشاهده شده در سر کامت ها به روش آزمون RM-ANOVA ($\alpha<0.05$)، اختلاف معنی دار آماری مابین نمونه های شاهد و تیمارها مشاهده شد و کمترین و بیشترین درصد DNA در هفته سوم به ترتیب مربوط به تیمارهای ۰/۵ mg/l (۹۰/٦۰٪) و تیمارشاهد (۹۹/۹۹٪) نانوذرات مس تعلق داشت (نمودار٤-۱۸).



نمودار٤-١٨ مقایسه میانگین درصد DNA در سر کامتهای مشاهده شده در غلظتهای مختلف نانوذرات مس در خون ماهی کلمه در هفته سوم



نمودار٤-١٩میانگین درصد DNA در سر کامتها تحت بر هم کنش غلظتهای مختلف نانوذرات مس و زمان های نمونه برداری

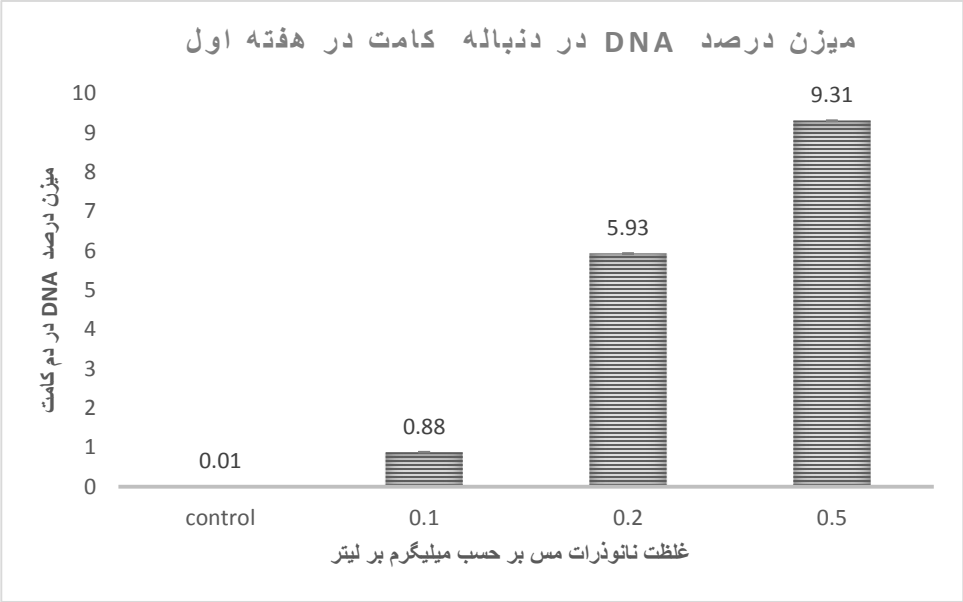
بررسی روند تغییرات مقدار DNA در سر کامت تحت برهم کنش غلظت نانوذرات مس و زمان نمونه برداری نشان داد که مقدار DNA در سر کامت ها در روزهای مختلف نمونه برداری یکسان نبود. کمترین مقدار DNA در سر کامت مربوط به غلظت ۰/۵ میلیگرم در لیتر در هفته سوم می باشد (نمودار٤-١٩).

براساس یافته های به دست آمده می توان بیان داشت که میانگین DNA سر کامت در غلظتهای سه گانه نانوذرات مس با یکدیگر اختلاف معنی دار دارد و هر چه به سمت غلظت بیشتر می رود میانگین DNA سر کامت کاهش می یابد و گلبول تغییر شکل می دهد.

٤-٣-٣ مقدار درصد DNA دردنباله کامت ها

٤-٣-٣-١ مقدار درصد DNA دردنباله کامت ها در هفته اول

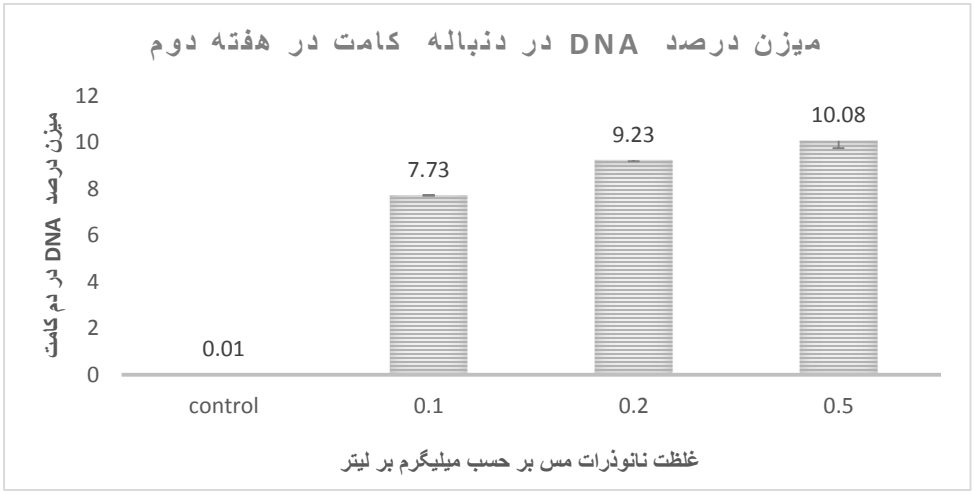
شکل زیر نشان می دهد که کمترین و بیشترین درصد DNA دردنباله کامت ها در هفته اول به ترتیب مربوط به نمونه های شاهد (۰/۰۱٪) و غلظت ۰/۵ میلیگرم در لیتر(۹/۳۱٪) می باشد (نمودار٤-۲۰).



نمودار٤-۲۰ مقایسه میانگین درصد DNA در دنباله کامتهای مشاهده شده در غلظتهای مختلف نانوذرات مس در خون ماهی کلمه در هفته اول

٤-٣-٣-٢ مقدار درصد DNA دردنباله کامت ها در هفته دوم

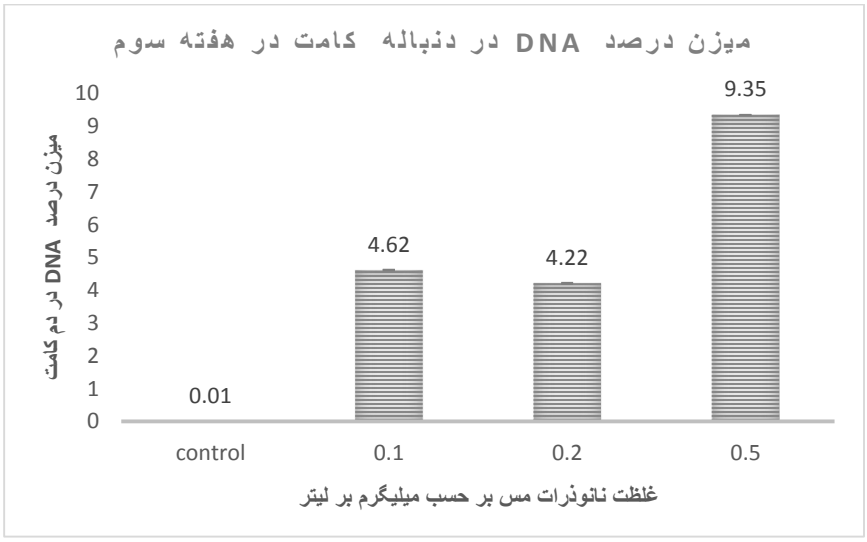
شکل زیر نشان می دهد که کمترین و بیشترین درصد DNA دردنباله کامت ها در هفته دوم به ترتیب مربوط به نمونه های شاهد (۰/۰۱٪) و غلظت ۰/۵ میلیگرم در لیتر(۱۰/۰۸٪) می باشد (نمودار٤-۲۱).



نمودار٤-٢١ مقایسه میانگین درصد DNA در دنباله کامتهای مشاهده شده در غلظتهای مختلف نانوذرات مس در خون ماهی کلمه در هفته دوم

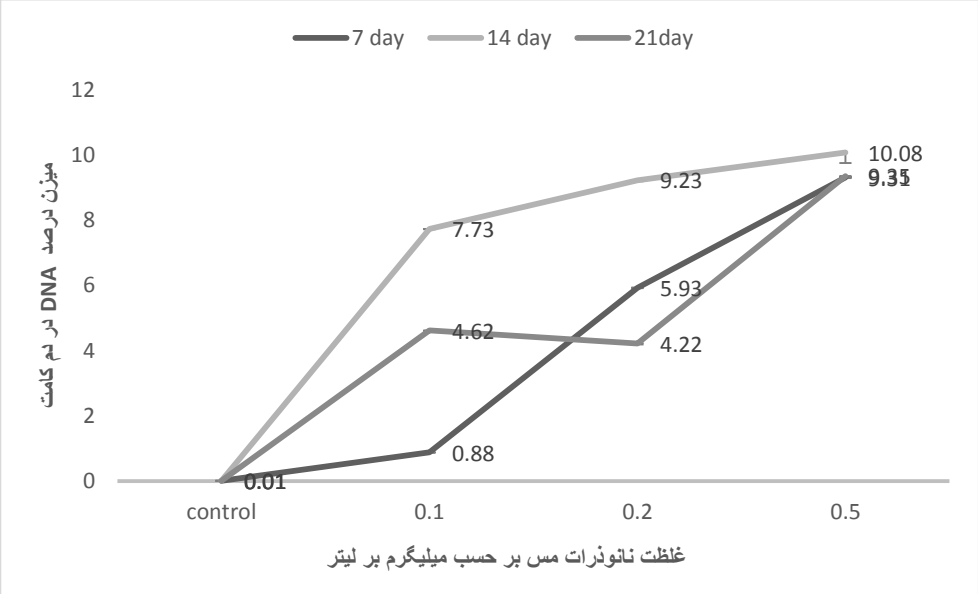
٤-٣-٣-٣ مقدار درصد DNA دردنباله کامت ها در هفته سوم

شکل زیر نشان می دهد که کمترین و بیشترین درصد DNA دردنباله کامت ها در هفته سوم به ترتیب مربوط به نمونه های شاهد (۰/۰۱٪) و غلظت ۰/۵ میلیگرم در لیتر(۹/۳۵٪) می باشد (نمودار٤-٢٢).



نمودار٤-٢٢ مقایسه میانگین درصد DNA در دنباله کامتهای مشاهده شده در غلظتهای مختلف نانوذرات مس در خون ماهی کلمه در هفته سوم

نتایج نشان داد که افزایش غلظت نانوذرات مس در محیط باعث افزایش مقدار DNA در دنباله کامتها گردیده است . همچنین درصد DNA دنباله ها در زمانهای مختلف نمونه برداری متفاوت بود. براساس یافته های به دست آمده می توان بیان داشت که میانگین DNA دنباله کامت ها در غلظتهای سه گانه با یکدیگر اختلاف معنی دار داشته و هر چه به سمت غلظت بیشتر می رود، DNA دنباله کامت بیشتر می شود و گلبول تغییر شکل بیشتری می دهد (نمودار٤-٢٣).



نمودار٤-٢٣ میانگین درصد DNA دردنباله کامتها تحت بر هم کنش غلظتهای مختلف نانوذرات مس و زمان های نمونه برداری

٤-٣-٤ تعیین مقدار OTM[٢٥]

OTM شاخصی است که توسط نرم افزار CASP محاسبه می شود و برابر است با:

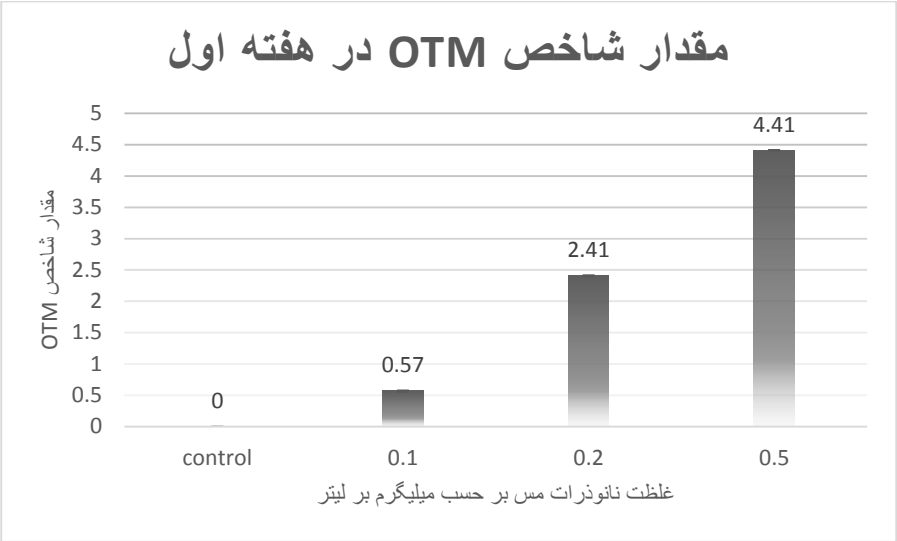
(درصد DNA دنباله کامت/فاصله بین مرکز ثقل سر کامت تا مرکز ثقل دنباله کامت در محورX ها)

این شاخص نشان دهنده میزان آسیب DNA می باشد.

٤-٣-٤-١ مقدار OTM در هفته اول

بر اساس مقایسه ما بین میانگین شاخص OTM در غلظتهای سه گانه نانوذرات مس و گروه شاهد در هفته اول بیشترین و کمترین مقدار شاخص OTM به ترتیب مربوط به غلظت ٠/٥ میلیگرم بر لیتر (٤/٤) و نمونه های شاهد (٠)، مشاهده گردید (نمودار٤-٢٤).

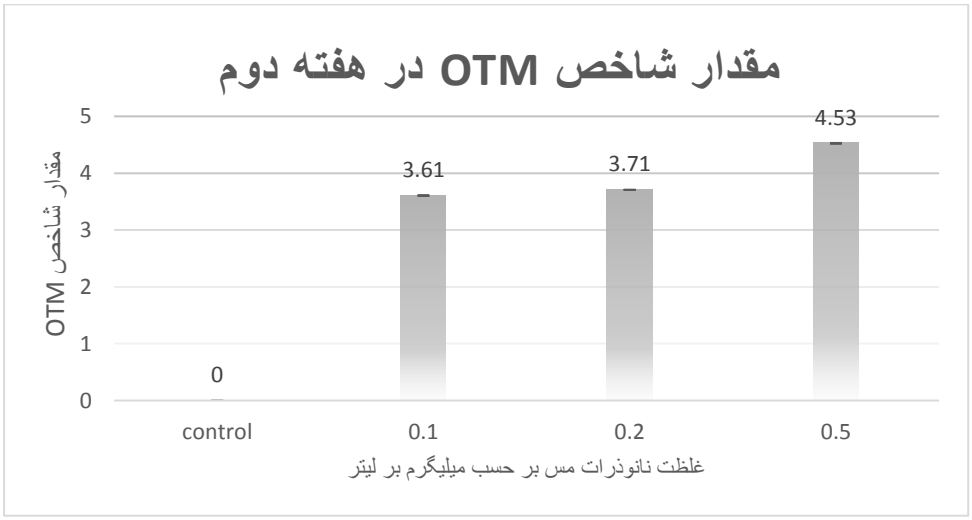
[25] Olive Tail Moment



نمودار٤-٢٤ مقدار شاخص OTM در هفته اول

٤-٣-٤-٢ مقدار OTM در هفته دوم

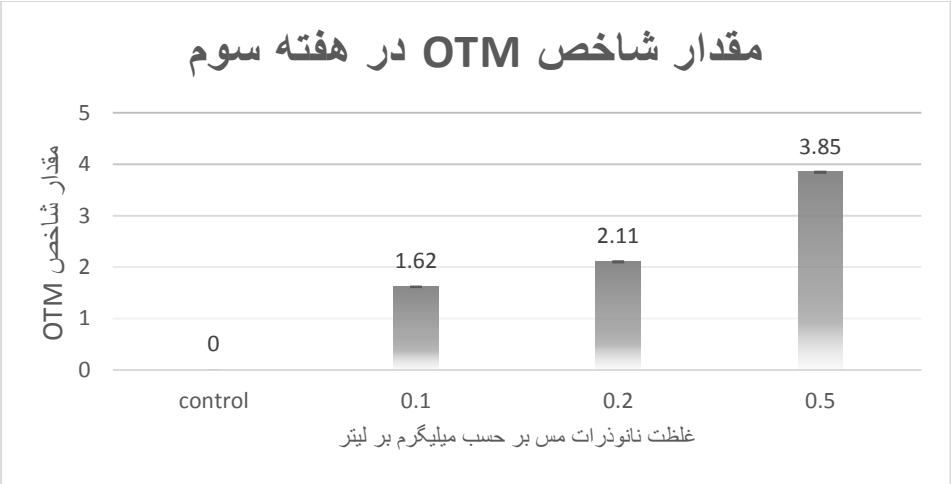
بر اساس مقایسه ما بین میانگین شاخص OTM در غلظتهای سه گانه نانوذرات مس و گروه شاهد در هفته دوم بیشترین و کمترین مقدار شاخصOTM به ترتیب مربوط به غلظت ۰/۵ میلیگرم بر لیتر (٤/٥) و نمونه های شاهد (۰)، مشاهده گردید (نمودار٤-٢٥).



نمودار٤-٢٥ مقدار شاخص OTM در هفته دوم

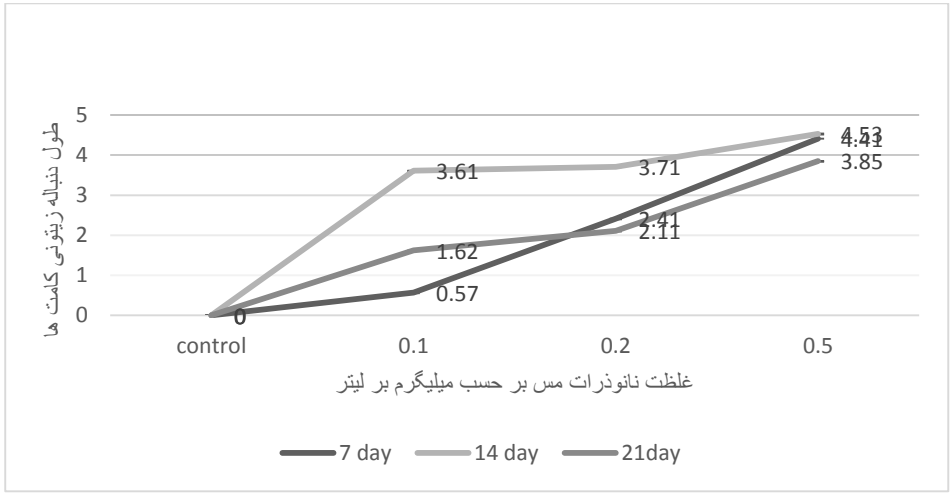
٤-٣-٤-٣ مقدار OTM در هفته سوم

بر اساس مقایسه ما بین میانگین شاخص OTM در غلظتهای سه گانه نانوذرات مس و گروه شاهد در هفته سوم بیشترین و کمترین مقدار شاخصOTM به ترتیب مربوط به غلظت ۰/۵ میلیگرم بر لیتر (۳/۸) و نمونه های شاهد (۰)، مشاهده گردید (نمودار۴-۲۶).



نمودار٤-٢٦ مقدار شاخص OTM در هفته سوم

بر اساس یافته های به دست آمده می توان بیان داشت که تحت بر هم کنش غلظتهای مختلف نانوذرات مس و زمان های نمونه برداری حداکثر مقدار شاخص OTM در هفته سوم در غلظت ۰/۵ میلیگرم در لیتر مشاهده گردید. با افزایش غلظت های میزان تخریب DNA و دفرمه شدن گلبول افزایش یافته است (نمودار٤-٢٧).



نمودار٤-٢٧ میانگین شاخص OTM تحت بر هم کنش غلظتهای مختلف نانوذرات مس و زمان های نمونه برداری

جدول ٤-١٤ بررسی ضریب همبستگی بین آسیب DNA و غظت و زمان

			dose	time	tail	hdna	tdna	otm
Spearman's rho	dose	Correlation Coeffi-cient	1.000	.000	.837**	-.722**	.737**	.824**
		Sig. (2-tailed)	.	1.000	.000	.000	.000	.000
	time	Correlation Coeffi-cient		1.000	-.017	-.046	.028	-.030
		Sig. (2-tailed)		.	.861	.634	.775	.760
	tail	Correlation Coeffi-cient			1.000	-.906**	.908**	.809**
		Sig. (2-tailed)			.	.000	.000	.000
	hdna	Correlation Coeffi-cient				1.000	-.990**	-.882**
		Sig. (2-tailed)					.000	.000
	tdna	Correlation Coeffi-cient					1.000	.895**
		Sig. (2-tailed)					.	.000
	otm	Correlation Coeffi-cient						1.000
		Sig. (2-tailed)						.

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

٤-٣-٥ بررسی همبستگی میان افزایش غلظت نانوذرات مس و زمان درمعرض قرار گیری و آسیب DNA

مطابق با جدول ٤-١٤:

مابین غلظت نانوذرات مس و فاکتورهای دنباله DNA (r=.837, p<0.01)، DNA دم کامت (r=.737, p<0.01) و شاخص OTM (r=.824, p<0.01) همبستگی مثبت و معنی دار و با DNA سر کامت (r=-.722, p<0.01) همبستگی منفی و معنی دار مشاهده شد.

مابین زمان در معرض قرار گیری و هیچ کدام از فاکتورها، ارتباط معنی دار مشاهده نشد.

مابین فاکتور دنباله DNA و DNA دنباله کامت (r=.908, p<0.01) و شاخص OTM (r=.809, p<0.01) همبستگی مثبت و معنی دار و با DNA سر کامت (r=-.906, p<0.01) همبستگی منفی و معنی دار مشاهده شد.

مابین فاکتور DNA سر کامت و فاکتورهای DNA دنباله کامت (r=-.990, p<0.01) و شاخص OTM (r=-.882, p<0.01) همبستگی منفی و معنی دار مشاهده شد.

مابین فاکتور DNA دنباله کامت و شاخص OTM (r=.895, p<0.01) همبستگی مثبت و معنی دار مشاهده شد.

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

به منظور بحث و نتیجه گیری ، به بررسی:

۱. اثرات نانوذرات مس بروی اندامهای حیاتی ماهی کلمه
۲. اثرات نانوذرات مس برآنزیمهای اکسیداتیو
۳. اثرات نانوذرات مس بر تخریب DNA در ماهی کلمه می پردازیم.

۵-۱ بررسی اثرات نانوذرات مس بروی اندامهای حیاتی ماهی کلمه

در جایگاه هدف نانوذرات می توانند با یک یا چند مکانیسم سمیت خود را القاء نمایند. واکنشهای نانوذرات با سلول، مایعات بدن، پروتئین ها نقش مهمی در تاثیرات زیستی آنها و توانایی آنها در ایجاد اختلال در بدن موجود زنده ایفا می کند. باند شدن نانوذرات با پروتئین ها ممکن است ترکیباتی را بوجود آورد که فعالیت بیشتری داشته باشند و بتوانند به راحتی وارد بافتهای بدن شوند در حالیکه در شرایط عادی قادر به آن نبودند. تغییر ساختار پروتئین ها که در اثر حضور نانوذرات رخ می دهد، ممکن است منجر به تغییرات ساختاری از جمله تغییر عملکرد آنزیمی گردد. برخی از مکانیسم ها دفاعی بدن از جمله سلولهای موکوسی، فاگوسیت بوسیله سلولهای ماکروفاژ در صدد حذف این عوامل بر می آیند (Andre *et al*., 2006).

۵-۱-۱ اثر نانوذارت مس بر بافت آبششی

آبشش ماهی اندامی چند منظوره بوده که اعمال تنفس، تنظیم اسمزی، تنظیم تعادل اسید- بازی و دفع ترکیبات نیتروژنی را به عهده دارد. این اندام دارای سطح تماس گسترده ای با آب اطراف است و به همین جهت نسبت به حضور مواد شیمیایی و آلاینده ها بسیار حساس است (Wilson & Laurent, 2002). پس از مواجهه ماهی ها با نانوذرات مس آسیب های گوناگونی در بافت آبششی مشاهده شد که از آن جمله می توان به هیپر پلازی سلولهای رشته آبششی، هم جوشی یا (fusion)، پرخونی در تیغه های آبششی و رشته های آبششی، جداشدن اپیتلوم رشته های آبششی (Detachment)، تغییر شکل رشته های آبششی، تلانژیکتازی رشته های آبششی، افزایش

سلولهای موکوسی، نکروز سلولهای آبششی، اشاره کرد. این تغییرات در هر سه گروه آزمایشی مواجه شده با نانوذرات مشاهده شد ولی به نظر می رسد که میزان اثرات در بافت آبششی متناسب با میزان غلظت نانوذرات مس بوده است و در تیماری که دارای بیشترین غلظت(0.5 mg/l) بود، شدیدترین آسیب ها مشاهده شد و با کاهش غلظت در دو گروه دیگر (0.1, 0.2 mg/l) ، اثرات خفیف تر می شود. آسیب های بافتی که ما در ماهیان مورد آزمایش مشاهده نمودیم، در سایر پژوهش ها در آبشش ماهیانی که در معرض نانوذرات نقره (Wu & Zhou, 2013)، نانوذرات مس (Al-Bairuty *et al*., 2013) و نانوذرات TiO2 (Boyle *et al*., 2013) و نانوذرات اکسید روی (Linhua & Lei, 2012) سایر آلاینده ها (Saber, 2012) قرار گرفته بودند، گزارش شده بود.

کوتاه شدن و در هم پیچیدگی لامل ها و هیپرپلازی اپیتلیالی ارتباط میان آبشش و آب را کاهش میدهد و در نتیجه از تبادلات یونی و گازی می کاهد. نتیجه چنین وضعیتی افزایش ضخامت لایه های اپیتلیومی است که می تواند منجر به افزایش ضخامت اپیدرم و پهنای تیغه های شده وبه اتصال تیغه های آبششی مجاور منتهی می گردد . Bilberg و همکاران (۲۰۱۰)، اختلالات تنفسی و کاهش مقاومت در برابر هیپوکسی را در ماهی Eurasian perch، پس از آنکه ۲٤ ساعت در معرض نانوذرات نقره بود، گزارش کردند. وضعیت هیپوکسی ناشی از آسیبهای بافتی در ماهی Japanese Medaka توسط (Wu & Zhou, 2013) نیز مشاهده شد و بر طبق یافته های این نویسندگان این آسیب ها در اثر استرسهای اکسیداتیو به وجود آمده اند. در پژوهش حاضر نانوذرات مس باعث اتساع عروق خونی لامل ها و تجمع سلولهای خونی شد. بر طبق یافته های Martinez و همکاران (۲۰۰٤)، این تغییرات حاکی از آسیب سلولهای پیلار و عروق خونی می باشد و باعث افزایش جریان خون در لامل می شود. طبق گزارشات نویسندگان متعددی detachment همیشه در نتیجه ادم در لاملهای ثانویه به وجود می آید (Fanta *et al*., 2003) و در بین ماهیانی که در معرض نانوذرات گوناگون قرار می گیرند، شایع است. این پدیده می تواند یک مکانیسم دفاعی شدید باشد چون جداشدن اپی تلیال لامل، فاصله ما بین آلودگی و جریان خون را افزایش می دهد (Arellano, 1999). تلانژیکتازی انباشتگی اریتروسیت ها درانتهای لامل ثانویه می باشد و به دلیل آسیبی که ماده آلاینده به سلولهای پیلار و مویرگها می رساند، تولید می شود (Hadi *et al*., 2012). نانوذرات انتقال یونها توسط Na^+ and k^- - ATPase را مختل می کند و متعاقب آن تعادل اسمزی بر هم می ریزد. بافت آبشش به دلیل فعالیت بالایی که در تبادل یونها با محیط دارد، هدف خوبی برای اثر گذاری آلاینده ها به شمار می رود به همین دلیل تغیراتی از قبیل نکروز و تورم سلولی در مواجهه با آلاینده ها گزارش گردیده است (Shaw

et al., 2012). مطابق با یافته های karlsson و همکاران (۱۹۸۵)، افزایش لایه های سلولی اپیتلیوم به دلیل زیاد شدن تقسیمات میتوزی در اپیتلیوم لامل ها می باشد. Kanthom و همکاران خاطر نشان کردند که هیپرپلازی و همجوشی در آبشش ها به دلیل وجود سموم ایجاد میشود و سموم ترکیب گلیکوپروتیین موجود در سلولهای موکوسی را تغییر می دهند و به این ترتیب تاثیرات منفی بر چسبندگی لاملهای مجاور دارند (Ferguson, 1989). این تغییرات نمونه هایی از مکانیسم دفاعی بدن هستند وبه این ترتیب فاصله میان خون و محیط اطراف افزایش می یابد و مانع از ورود آلاینده ها به بدن ماهی می شود (Fernandez & Mazone, 2003). تمامی آسیبهای که در مطالعه حاضر مشاهده گردیدند، می توانند موجب اختلال در تنفس، ترشح و بازجذب مواد درآبشش گردند. به نظر می رسد که پاسخ های بافت آبششی به آلاینده ها، به بیولوژی ماهی (جنسیت و سن ماهی) وابسته نیست. به طورکلی هیستوپاتولوژی بافت آبششی جهت پایش کلی محیط از نظر وجود یا نبود آلاینده ها و نیز اثرگذاری یک آلاینده بر بافت موجودات آبزی ساکن در محیط بسیار مفید است هر چند که تغییرات آن برای آلاینده خاصی اختصاصی نمی باشد (Au, 2004).

۵-۱-۲ اثر نانوذارت مس بر بافت کبد

کبد مهمترین اندام جهت تغییر زیستی آلاینده ها، دفع فلزات سنگین مضر، هضم مواد غذایی، ذخیره مواد غذایی و متابولیسم هورمونهای جنسی به شمار می رود (Frevert & Engelmann, 2000). از اینرو تغییرات بافتی سلولهای کبدی اغلب در پژوهشهای سم شناسی مورد ارزیابی قرار می گیرند و به عنوان شاخص آلودگی محیطی در نظر گرفته می شود (Abarghoei *et al.*, 2012). مطالعات متعددی در زمینه تغییرات سلولی و بافتی کبد در گونه های مختلف ماهیان مواجه شده با نانوذرات مختلف صورت گرفته است (Govindasamy & Rahuman, 2012; Al-Bairuty *et al.*, 2013; Ostaszewska *et al.*, 2016; Gonzalez *et al.*, 2006). اغلب آلاینده ها در کبد و به کمک سیستم آنزیمی خاص آن به متابولیتهای مختلفی تغییر می یابند، این فرآیند می تواند آسیبهای بافتی را در سطوح مختلف در کبد ایجاد کند (Brusle *et al.*, 1996). مهمترین تغییرات بافتی و سلولی مشاهده شده در بافت کبد ماهیان کلمه مواجه شده با نانو ذرات مس شامل موارد زیر بودند: افزایش فضای سلولی در میان هپاتوسیت ها، پرخونی، نکروز هپاتوسیتها، پرخونی سینوزوئید های کبدی، واکوئله شدن سیتوپلاسم. تمامی این تغییرات بافتی در سه گروه تیمارها مشاهده گردیدند. میزان اثرات در بافت کبدی متناسب با میزان غلظت نانوذرات مس بودند و در تیماری که دارای بیشترین غلظت (0.5 mg/l) بود، شدیدترین آسیب ها مشاهده شد و با کاهش

غلظت در دو گروه دیگر (0.1, 0.2 mg/l)، اثرات خفیف تر گردید. واکوئله شدن هپاتوسیت ها و نکروز برخی از هپاتوسیتها مهمترین تغییرات مشاهده شده در ماهیان مورد آزمایش بودند. چنین تغیرات مشابهی توسط Hao و همکاران (۲۰۰۹)، در (کبد ماهی کپور که در معرض نانوذرات TiO2)، توسط AlBairuty و همکاران (۲۰۱۳)، (کبد ماهی قزل آلای رنگین کمان که درمعرض نانوذرات مس) و توسط Ostaszewska و همکاران (۲۰۱٦)، در کبد ماهی استروژن سیبریایی که در معرض نانوذرات نقره و مس قرار گرفته بودند، گزارش گردید.

کبد نسبت به آلاینده های محیطی بسیار حساس می باشد، چرا که بسیاری از آلاینده ها این قابلیت را دارند که در بافت کبدی تجمع یابند و منجر به مواجهه سلولهای این بافت با مقادیری چند برابر آنچه در محیط وجود دارد و یا بافتهای که در معرض آن قرار گرفته اند، شوند. به طور کلی آسیب بافتی کبد برای آلاینده ی خاصی اختصاصی نمی باشند و نمی توان هر گونه آسیب را به عنوان بیومارکر به کار برد چرا که برخی از آسیب های کبدی می توانند وابسته به گونه های خاصی باشند (Frevert & Engelmann, 2000). میزان آسیب سلولهای کبدی بر اساس نوع نانوذره، غلظت آن، گونه ماهی، مدت زمان در معرض بودن و سایر موارد، متفاوت است (Shaw *et al.*, 2012). انباشتگی غیر طبیعی تری گلیسیرید ها و دیگر چربی ها ممکن است باعث به وجود آمدن واکوئل در هپاتوسیت ها شود و می تواند به همراه آسیبهای بافتی نظیر نکروز باشد (Janz & Kelly, 2009). شکل گیری واکوئل یک مکانیسم دفاعی در سلولهای کبدی می باشد (Mollendroff, 1973) و باعث جمع آوری مواد آسیب رسان و جلوگیری از ایجاد اختلال در فعالیتهای زیستی این اندام می شود (Hadi & Alwan, 2012). هیپرتروفی معمولا به معنای افزایش اندازه سلول می باشد. زمانی که سلول در معرض برخی از مواد قرار می گیرد، این مواد باعث تکثیر غشاء رتیکولوم اندوپلاسمیک شده و در نتیجه سلول بزرگتر می شود (Hinton & Laurèn, 1990). Figueiredo-Fernandes وهمکاران (۲۰۰۷)، بر این باور بودند که افزایش اندازه هپاتوسیت ها می تواند به دلیل ذخیره فراوان چربی در سلول باشد. از سوی دیگر Braunbeck و همکاران (۱۹۹۰)، گزارش دادند که تغییر در اندازه و شکل هسته سلول اغلب نشانه افزایش فعالیتهای متابولیک سلول می باشد و سلول سعی در حذف عوامل آسیب رسان از محیط بدن دارد. Sanad و همکاران (۱۹۹۷)، خاطر نشان کردند که نکروز سلولهای کبدی ممکن است به دلیل مهار سنتز DNA مورد نیاز برای رشد و بلوغ سلول توسط ماده آلاینده باشد.

۵-۱-۳ اثرات نانوذرات مس بافت کلیه

کلیه ماهیان نقش مهمی در حفظ هموستاز اسمزی بدن ایفا می کند. علاوه بر این، بافت کلیوی حجم زیادی از جریان خون را دریافت می کند و مسیر مهمی جهت دفع متابولیت های آلاینده های مختلف می باشد (Thophon *et al.*, 2003). از آنجاییکه بافت کلیوی بطور مداوم با آلاینده ها در مسیر دفع آنها در تماس می باشد، سلولهای

این بافت در معرض آسیب شدید می باشند و بافت کلیه اندیکاتور حساسی نسبت آلاینده های محیطی می باشد (Gilbert, 2012). تحقیقات نشان داده اند که سن در میزان تخریب بافت کلیوی موثر است، اما جنسیت بر آن بی اثر است . آسیبهای کلیوی مشخصا خفیف تر از آسیبهایی هستند که در کبد ماهیان مشاهده می شود (Myres, 1993). مواجهه ی ماهیان کلمه با نانوذرات مس درجاتی از آسیب های بافتی در کلیه را نشان داد. این تغییرات شامل انبساط گلومرولی، پرخونی، دژنره شدن سلولی، افزایش بافت هماتوپوئیتیک، تجمع ماکروفاژها، واکوئلاسیون و نکروز بافتی بودند. واکوئلاسیون و نکروز بافتی در روزهای پایانی آزمایش و در غلظت بالاتر (0.5 mg/l) شدیدتر از روزهای آغازین و غلظتهای کمتر بود. مطالعات اندکی در زمینه تاثیر نانوذرات مس بر بافت کلیوی ماهیان صورت گرفته است. یافته های پژوهش اخیر با یافته های Xu و همکاران (۲۰۰۷) و Shaw و همکاران (۲۰۱۱)، همسو می باشد و نشان می دهد که نانوذرات مس در مواجهه کوتاه مدت و تحت کشنده می تواند آسیبهای شدیدی در بافت کلیه ایجاد کند.

دژنره شدن لوله ها می تواند با علائمی مانند هیپرتروفی سلولی تشخیص داده شود و ظاهری تور مانند به بافت می دهد و جزو مراحل اولیه دژنره شدن است. با پیشرفت دژنراسیون گرانولهای ائوزینوفیل هیالین در داخل سلول شکل می گیرد. ممکن است دلیل بوجود آمدن این گرانول ها جذب مجدد پروتئین های پلاسمایی که در ادرار دفع شده اند، باشد و حاکی از آسیب کارپاسکل ها می باشد (Takashima & Hibiya, 1995). Xu و همکاران (۲۰۰۷)، دریافتند که نانوذرات مس باعث افزایش استرس اکسیداتیو وبرهم خوردن تعادل آکسیدان–آنتی اکسیدان در سلول می گردند که در مراحل پیشرفته باعث القاء آپوپتوزیس در سلولهای گلومرولی و سمیت سلولی می شود. این آسیب ها ممکن است منجر به دژنره شدن سلولی، پرخونی وخونریزی در کلیه گردند که پیشتر توسط abdolhamid و همکاران (۱۹۹۱)، بوسیله سایر مواد آلاینده گزارش گردیده بود.Shaw و همکاران (۲۰۱۱)، ارزیابی نمودند که نانوذرات مس نفوذپذیری غشاء سلول را تحت تاثیر قرار می دهند و انتقال یون را مهار می کنند در نتیجه در سیستم انتقال مایعات به خارج و داخل سلول، اختلال به وجود می آورند. این باور وجود دارد که نانوذرات با غشائ سلول ادغام می شوند و حجم زیادی از مایعات سلولی فیلتر می شود به عنوان مثال تجمع سلولهای خونی در بافت هماتوپوئیتیک در اثر تخریب آندوتلیوم مویرگها نیزمیتواند به همین دلیل باشد. چروکیدگی در گلومرول ها و افزایش فضای کپسول بومن نشان دهنده تغییرات در ترشح مواد از کلیه ماهیان مواجه شده با آلاینده می باشد. آلاینده ها می توانند موجب تخریب غشای پلاسمایی و زوائد سلولی سلولهای اپیتلیال توبولهای کلیوی، تغییر شکل میتوکندریها، کاهش شبکه آندوپلاسمی خشن وافزایش ویزیکولهای اتوفاژی در این سلولها گردند (Schwaiger *et al*., 2000).

از مجموع بررسی های فوق می توان به این نتیجه رسید که نانوذرات مس در غلظتهای تحت کشنده آنقدر سمی می باشد که می تواند اثرات سلولی و بافتی قابل توجهی را در اندامهای آبشش، کبد و کلیه ایجاد کند و شدت آسیب با افزایش غلظت نانوذرات مس و همچنین با افزایش زمان در معرض قرار گیری افزایش می یابد.

۵-۲ اثرات نانوذرات مس برآنزیمهای اکسیداتیو

در این مطالعه فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز در تیمارها به طور معنی داری بیشتر از گروه شاهد بود ($p<0.05$) . ارتباط مثبت و معنی داری بین غلظت نانوذرات مس و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز وجود داشت. همچنین بین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز نیز ارتباط مستقیم و معنی دار مشاهده شد ($p<0.01$) .

سمیت نانوذرات ناشی از فعالیت بالا، نسبت سطح به حجم زیاد، اندازه کوچک آنها می باشد و به واسطه این خصوصیات قادرند به غشاء سلول، سیتوپلاسم و هسته سلول نفوذ نمایند و به طور مستقیم یا غیر مستقیم تاثیرات مخرب خود را القا کنند. نانوذرات می توانند با ماکرومولکولهایی نظیر پروتئین، چربی، DNA ترکیب شوند و متابولیسم این مواد را تحت تاثیر قرار دهند و باعث جهش ژنی در بسیاری از آنزیمهای حیاتی شوند (Abdel-*et al*., 2015; Trenzado *et al*., 2006 Khalek *et al*., 2015; Khanna).

اکسیژن برای فرآیندهای حیاتی سلول ضروری می باشد ولی متابولیسم اکسیژن ممکن است مواد فعالی را به وجود آورد که ROS نامیده می شود. ROS شامل رادیکالهای آزاد مشتق از اکسیژن مانند اکسید نیتریک، رادیکالهای هیدروکسیل، سوپر اکسید و مشتقات غیر رادیکالی بسیار فعال اکسیژن مانند هیدروژن پراکسید، پراکسی نیتریت هیپوکلیریت می باشند. این مواد شیمیایی ناپایدار حامل الکترونهای آزاد هستند و برای جبران ناپایداری با مولکولهای سایر مواد واکنشهای زنجیره ای به وجود می آورند. به این ترتیب رادیکالهای آزاد به DNA، پروتئینهای ضروری سلول و لیپیدهای غشایی آسیب می زنند و ممکن است منجر به مرگ سلولی گردند (Joanny Menvielle-Bourg *et al*., 2005). اولین مکانیسم سمیت نانو ذرات، تولید ROS می باشد که باعث برهم خوردن وضعیت تعادل سلول و ایجاد استرس اکسیداتیو می گردد. حضورگروههای کاربردی پرواکسیدانت بروی سطح فعال نانوذرات می تواند عاملی در ایجاد ROS باشد و یا تاثیرات متقابل سلول– نانوذره، منجر به تولید ROS می شود (Khanna *et al*., 2015). آنتی اکسیدانها مولکولهایی هستند که از اکسیداسیون این ترکیبات جلوگیری می نمایند به این ترتیب که با رادیکالهای آزاد ترکیب می شوند و سیستم ایمنی بدن را تقویت می نمایند و از آسیبهای

سلولی می کاهند (Nyska & Kohen, 2002). استرس اکسیداتیو در سلولها زمانی رخ می دهد که نیروهای اکسید کننده بر عوامل دفاعی آنتی اکسیدانی چیره شود. این دفاع آنتی اکسیدانی شامل مکانیسم دفاع آنزیمی و مکانسیم غیر آنزیمی می باشد (Soltani & Monfared, 2013).

سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) یکی از آنزیمهای مهم کاتالیز کننده یونهای سوپر اکسید می باشد و با حذف و یا اضافه کردن الکترون، آنرا به هیدروژن پراکسید و اکسیژن تبدیل می کنند (فرمول ۱) (Monfared, 2013 & Soltani). به این ترتیب یک آنزیم کلیدی در مکانیسم دفاعی بدن در برابر رادیکالهای آزاد می باشد (Joanny Menvielle-Bourg, 2005).CAT به شدت در اندامهای موجودات نوسان دارد و هیدروژن پرکسید را که توسط SOD تولید شده است، به اکسیژن و آب تبدیل می نماید (Oliveira Batista *et al*., 2014). سیستم CAT-SOD اولین خط دفاعی بدن در برابر استرس اکسیداتیو می باشد و به عنوان بیومارکر تولید ROS به حساب می آید.

$$O_2^{\cdot -} \xrightarrow{(SOD)} H_2O_2 \xrightarrow{(CAT)} H_2O + \frac{1}{2}\,O_2 \qquad \text{(فرمول ۱)}$$

نتایج پژوهش حاضر حاکی از آنست که نانوذرات مس در غلظتهای 0.1 mg/L باعث افزایش فعالیت SOD می گردند ولی در غلظتهای 0.2, 0.5 mg/L فعالیت کمتری نسبت به غلظت 0.1 mg/L مشاهده می گردد. یافته های این پژوهش همسو با یافته های Wang و همکاران در سال ۲۰۱٦ می باشد. این محققین تاثیر نانوذرات اکسید مس و سولفات مس را بروی سلولهای کبدی ماهی گروپر *Epinephelus coioides* بررسی نمودند و سلولهای کبدی کشت شده به مدت ۲٤ ساعت در معرض غلظت ۲/٤ mg/l از نانوذرات اکسید مس قرار گرفتند و فعالیت آنزیمهای کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون مهار گردید. نانوذرات توانایی ساختن ROS را در سلولهای کبدی دارند. آلاینده ها اندامهای گوناگون را تحت تاثیر قرار می دهند. بیشتر آلاینده ها از طریق خون وارد کبد می شوند. کبد اندام اصلی سم زدایی می باشد.به این ترتیب بافت کبدی مکانی برای انباشته شدن آلاینده ها می باشد و اثرات دراز مدت آلاینده باعث آسیب بافت کبد می شود (Oliveira Batista *et al*., 2014). عدم تغییرات SOD در غلظتهای بالا حاکی از آسیب بافتی ناشی از ایجاد ROS در کبد ماهی می باشد، در نتیجه قابلیت ترشح آنزیمهای اکسیداتیو در غلظتهای بالای نانوذارت ازمیان می رود. در مجموع کاهش SOD ممکن است به دلیل سازگاری بدن و یا از دست رفتن مکانیسم های بازسازی باشد (Xia *et al*., 2014). CAT یکی از فعال ترین آنزیمها می باشد و فعالیت آن، وابسته به حضور پراکسید هیدروژن می باشد (Abdel-Khalek *et al*., 2015). یک مولکول از CAT می تواند میلیونها مولکول از پراکسید هیدروژن را در مدت یک ثانیه به آب و اکسیژن تبدیل کند. در این پژوهش با افزایش غلظت نانوذرات مس فعالیت CAT مهار می شود وکه می تواند نشانه آسیب بافت کبدی باشد.

بالاترین میزان فعالیت در غلظت mg/L 0.1 مشاهده شد و در غلظتهای 0.5 mg/l , 0.2 افزایش فعالیت به چشم نخورد. در پژوهش مشابهی که توسط Karthigarani و همکاران (۲۰۱۱)، صورت گرفت تاثیر سمیت نانوذرات اکسید تیتانیوم بروی ماهی *Oreochromis Mossambicus* بررسی گردید، ماهیها در معرض غلظتهای صعودی تحت کشنده نانوذرات اکسید تیتانیوم قرار گرفتند و فعالیت آنزیمهای سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز در غلظتهای بیشتر مهارگردیده بود. مشاهدات مشابهی توسط (Kiran Reddy *et al*., 2014; An *et al*., 2008; Saglam *et al*., 2014) با سایر آلاینده ها گزارش شده است. برخی از متابولیتهای ثانویه حاصل از سیستمهای آنتی اکسیدانی، تولید ROS را تقویت می نماید و از اینرو به بافت آسیب می زنند (Xia *et al*., 2013). در نتیجه بافت توانایی ترشح آنزیم را از دست میدهد و در میزان آن اختلال به وجود می آید. سمیت نانوذرات ناشی از فعالیت بالا، نسبت سطح به حجم زیاد، اندازه کوچک آنها می باشد و به واسطه این خصوصیات قادرند به غشاء سلول، سیتوپلاسم و هسته سلول نفوذ نمایند و به طور مستقیم یا غیر مستقیم تاثیرات مخرب خود را القا کنند. نانوذرات می توانند با ماکرومولکولهایی نظیر پروتئین، چربی، DNA ترکیب شوند و متابولیسم این مواد را تحت تاثیر قرار دهند و باعث جهش ژنی در بسیاری از آنزیمهای حیاتی شوند (Noureen and Jabeer, 2015).

۵-۳ اثرات نانوذرات مس بر تخریب DNA

در پژوهش اخیر با افزایش میزان غلظت نانوذرات مس در تیمارهای ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵ میلیگرم در لیتر، میزان تخریب DNA افزایش یافته بود و در نتیجه طول دنباله کامت و درصد DNA دنباله کامت و شاخص OTM نسبت به نمونه های شاهد افزایش یافته بود و دارای اختلاف معنادار آماری بود ($\alpha<۰/۰۵$) در حالیکه درصد DNA در سر کامت کاهش یافته بود. این روند با افزایش مدت زمان در معرض بودن نیز شدیدتر گردید. فرآیندهایی که باعث آسیب DNA می گردند، استرس اکسیداتیو ناشی از نانوذرات و ایجاد عوامل التهابی ناشی از نانوذرات، می باشد. واکنشهای بابین نانوذرات و سلول، باعث تولید ROS می گردند که در نهایت منجر به برهم خوردن تعادل وضعیت اکسیداتیو می گردد و استرس اکسیداتیو به وجود می آید که باعث قطعه قطعه شدن و آسیب DNA می شود. تولید ROS توسط نانوذرات اولین عامل سمیت سلولی آنها می باشد و دلیل ایجاد ROS حضور گروههای کاربردی پرواکسیدانت در سطح فعال نانوذره می باشد و به واکنشهای مابین سلول و نانوذره وابسته می باشد (Fahmy and Comier., 2009).میتوکندری محل تنفس سلولی وغنی از ROS می باشد که اکسیژن در آن متابولیزه می شود و بوسیله برخی زنجیره های تنفسی میتوکندریایی به $O_2^{\cdot-}$ تبدیل می گردد. در شرایط طبیعی ROS در

میتوکندری با تناوب کوتاهی تولید می شود ولیکن توسط سیستم ایمنی و سیستم دفاعی بدن خنثی می شود. در شرایطی که نانوذرات بروی میتوکندری تاثیر می گذارند، نانو ذرات می توانند در میتوکندری ذخیره شوند و منجر به تشکیل ROS بیشتری گردند که سیستم آنتی اکسیدانی قادر به دفع این مواد نمی باشد و باعث آسیب شدید به ماکرومولکولهای سلولی، پروتئینها، لیپیدها، DNA سلول می شود که تاثیرات مخرب سلولی را به همراه دارد (Sarker et al., 2014). در پژوهشی که توسط Avalos و همکاران (۲۰۱٤)، صورت گرفت، نانوذرات نقره باعث القاء تولید ROS، حذف گلوتاتیون، مهار تولید سوپراکسید دیسموتاز گردیده اند. القاء تولید ROS توسط نانوذرات، منجر به ایجاد آسیبهای پیش التهابی می گردد (Park and Park, 2009). تولید ROS پتانسیل غشائ میتوکندریایی را کاهش می دهد و در نتیجه سطح پراکسیداسیون لیپید ها افزایش می یابد و فعالیتهای آنزیمی کاهش می یابد (Wang *et al*., 2011). این استرس اکسیداتیو منجربه آسیب DNA و آپوپتوزیس می گردد و همراه با قطعه قطعه شدن کروموزومی، شکسته شدن DNA و القائ جهش ژنی می باشد (Singh *et al*., 2009). پژوهشهای مختلفی رخ داد آسیب DNA و تولید ترکیبات DNA اکسید شده را در اثر وجود نانوذرات فلزی تایید نموده اند (Bhattacharya *et al*., 2009; Lin *et al*., 2009; Karlsson *et al*., 2008). مکانیسم عمل بدن در برابر حضور نانوذرات به این شرح می باشد. سلول بدن در مراحل اولیه در پاسخ به آسیبهای ناشی از نانوذرات اقدام به مکانیسم های بازسازی DNA می نماید و از چرخه های سلولی مهارکننده یا آپوپتوزیس استفاده می نماید. یکی از اصلی ترین مولکولهایی که در پاسخ به آسیب DNA فعال می گردد، P53 می باشد. این مولکول نقش اساسی در بازسازی DNA بازی می کند و به این ترتیب از فرآیندهای جهش زایی جلوگیری می نماید (Lane, 1992). اگر که آسیب DNA گسترش یابد، سلول در ابتدا مرگ برنامه ریزی شده را به اجرا می گذارد. آپوپتوزیس یک فرایند پیچیده و بسیار قانونمند می باشد و سیگنالهای مولکولی گوناگونی دارد. نانوذرات با اندازه های گوناگون باعث القاء آپوپتوزیس می شوند (Swanson & Jeng, 2006). استرس اکسیداتیو با پاسخهای التهابی نیز همراه می باشد. التهاب یکی از مکانیسم های دفاعی بدن می باشد و برخی از مولکولهای تعدیل کننده ایمنی مسئول تولید آن هستند. این مولکولها تحت نفوذ سلولهای فاگوسیت کننده می باشند. پژوهشهای گوناگون بروی نانوذرات مختلف حاکی از القاء آسیب های التهابی توسط این مواد بروی سلولهای گوناگون می باشد (Baktur *et al*., 2011; Crouzier *et al*., 2010). مکانیسم آسیب های التهابی بدین صورت گزارش شده است. در سطح سلول گیرنده هایی به نام TLR[۲٦] وجود دارد. این گیرنده ها عوامل اگزوژن و اندوژن را شناسایی می نمایند. بسیاری از مواد آندوژن و اگزوژن که خواص سمی دارند، سیگنالهایی مبنی بر آسیب DNA ایجاد می کنند.

[26] Toll-like receptpor

نانوذرات توسط گیرنده های سلولی (TLR) به عنوان عامل پاتوژن شناسایی می شوند و بدن در پاسخ، شروع به ترشح عوامل تعدیل کننده التهابی آبشاری (Cascade) نظیر interleukins و chemokines می نماید (Turabekova *et al*., 2014). این التهاب به طور مستقیم باعث ایجاد مسمومیت سلولی می گردد و مرگ سلولی را از طریق القاء تولید محصولات جانبی مانند ROS و پروتئینهای فعال کننده گیرنده های آپوپتوزیس و نکروزیس به همراه خواهد داشت. این فرایند بخشی از سیستم دفاعی و ایمنی بدن می باشد. عوامل پیش التهابی(Cascade) که توسط سلولها ترشح می گردد شامل فاکتور هسته ای kB (NF-kB)، MAPK[۲۷] و PI3-K[۲۸] می باشد (Poljak-Blaži *et al*., 2010). در شرایط عادی NF-kB توسط مهارکننده های سلولی κB (IκB) واقع در سیتوپلاسم مهار می گردد ولی زمانی که استرس اکسیداتیو رخ می دهد، IκB تخریب می شود در نتیجه NF-kB آزادانه به داخل هسته منتقل می شود و نسخه برداری ژن را تحت تاثیر قرار می دهد. به این ترتیب گروههای OH، HOCL و ROS فعال کننده (NF-kB) می باشند (Ye *et al*., 1995). تحقیقات نشان داده اند که نانوذرات از طریق تولید ROS باعث فعال شدن (NF-kB) می گردند و عوامل پیش التهابی نظیر TNF-α, IL-8, IL-2 را بوجود می آورند که منجر به فیبروز سلولی می شوند (Monteiller *et al*., 2007). اگر بخواهیم مدل سلسله مراتبی از استرس اکسیداتیو ارائه کنیم می توانیم بگوییم زمانی که عامل استرس دهنده خفیف باشد، نسخه برداری از آنزیمهای اکسیداتیو صورت می گیرد و در نتیجه پاسخهای آنتی اکسیدانی بدن هموستازی تنفسی سلول را حفظ می نمایند. اگر عامل استرس دهنده متوسط باشد، باعث فعال شدن (MAPK) و (NF-kB) می گردد و پاسخهای پیش التهابی از سوی سلولها به وقوع می پیوندد. در حالت استرس شدید اکسیداتیو حفارت میتوکندریایی تخریب میگردد و زنجیره انتقال الکترون مختل می شود در نتیجه منجر به آپوپتوزیس و تخریب DNA و نکروز سلولی می شود (Andre *et al*., 2006).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که قرار گرفتن سلولهای بدن ماهی کلمه در برابر نانوذرات مس باعث افزایش تولید ROS می گردد در نتیجه واکنشهای آبشاری (Cascade) فعال می شود و استرس اکسیداتیو رخ می دهد. استرس اکسیداتیو باعث افزایش H_2O_2 و OH می شود، به طبع آن P53 فعال می گردد و فعال شدن این فاکتور باعث آسیب DNA، القاء آپوپتوزیس می شود.

[27] mitogen-activated protein kinase
[28] phosphoinositide 3-kinase

۵-٤ نتیجه گیری

نتایج این پژوهش بر ما آشکار کرد که بررسی های بافت شناسی روش مناسبی برای تعیین آسیب ناشی از نانوذرات مس بروی ماهی کلمه می باشد. در میان بافتها، آبشش، کبد و کلیه ممکن است از حساس ترین بافتها در برابر حضور نانوذرات باشند. همچنین نانو ذرات مس باعث بروز استرس اکسیداتیو می گردند که میزان ترشح آنزیمهای اکسیداتیو کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز را تحت تاثیر قرار می دهد. از سوی دیگر استرس اکسیداتیو در غلظتهای بالا منجر به آسیب DNA و تخریب آن می گردد. شدت آسیب های فوق با میزان غلظت نانوذرات و مدت در معرض بودن نسبت مستقیم دارد. این پژوهش می تواند به محققین در راستای تعیین معیارهای کیفیتی آب در رابطه با حضور نانوذرات کمک نماید و در زمینه رهاسازی این مواد در محیط زیست دریایی تمهیدات خاص و ممنوعیت در نظر گرفته شود. به این ترتیب گامی در جهت حفظ گونه های ارزشمند زیستی مانند ماهی کلمه دریای خزر و سایر موجودات دریایی برداشته می شود.

۵-۵ پیشنهادات

- بررسی اثر نانوذرات بر سایر اندامهای بدن ماهی کلمه
- مقایسه تاثیرات سمی نانوذرات مس در مراحل مختلف چرخه زندگی ماهی کلمه.
- مقایسه تاثیرات سمی نانوذرات مس در جنسیتهای مختلف ماهی کلمه.
- بررسی تاثیرات ژنوتوکسیک نانوذرات مس در ماهیانی که به طور طبیعی از ماهی کلمه تغذیه می نمایند.

منابع

فهرست منابع فارسی

ایمانی، ا.، سروری مقانلو، ک.، خانی، س.، ۱۳۹۵. آسیب شناسی نانوذره مس بر بافت کبد و فراسنجه های خونی وبیوشیمیایی بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان پیش و پس از یک دوره بازیابی. . نشریه دامپزشکی در پژوهش و سازندگی . شماره ۱۱۳

احمدی، ح.، نعیمی ، ا.، نظرحقیقی، ف.، خدایی، ث.، ۱۳۹۳. اثرات نانوذره ی اکسید مس بروی پارامترهای خونی ماهی کپور معمولی دومین همایش ملی، برنامه ریزی، حفاظت، حمایت از محیط زیست و توسعه پایدار.

خبازی ، م.، هرسیج ، م.، هدایتی، س.ع.ا.، گرامی، م.ح.، غفاری فارسانی، ح.، ۱۳۹۳. بررسی اثر تخریبی نانوذارت مس در آب بر بافت آبشش ماهی قزل آلای رنگین کمان فیزیولوژِی و بیوتکنولوژی آبزیان. سال دوم. شماره اول

خشنود، ز. ۱۳۹۲ . بررسی اثرات علف کش آترازین بر بیومارکر های فیزیولوژیک ، بیوشیمیایی و هیستولوژیک مراحل تکوین لارو بچه ماهی سفید دریای خزر، ***Rutilus frisii kutum***. تهران. دانشگاه آزاد اسلامی. واحد علوم و تحقیقات.

میر رحیمی ، ه.، ۱۳۹٤. تعیین اثرات ژنوتوکسیک نانوذرات تیتانیوم در تخریب DNA گلبول قرمز ماهی کلمه در سنجش کامت. تهران. دانشگاه آزاد اسلامی. واحد علوم و تحقیقات.

وثوقی، غ.، مستجیر، ب.، ۱۳۷۳. ماهیان آب شیرین. تهران: انتشارات دانشگاه تهران.

فهرست منابع انگلیسی

Abarghoei, S., Hedayati, A., Ghorbani, R., Miandareh, H. K., Bagheri, T. 2016. Histopathological effects of waterborne silver nanoparticles and silver salt on the gills and liver of goldfish *Carassius auratus*. Int. J. Environ. Sci. Tech. 13(7):1753-1760

Abdelhamid, A.M., El-Ayouty, S.A. 1991. Effect on catfish, *Clarias lazera* composition of ingestion rearing water contaminated with lead or aluminum compounds. Arch. Tierernahr., 41(7-8): 757-763.

Abdel-Khalek, A., Kadry, M., Hamed, A., Marie, M. A. 2015. Ecotoxicological impacts of zinc metal in comparison to its nanoparticles in Nile tilapia; *Oreochromis niloticus*. The Journal of Basic & Applied Zoology. 72: 113–125.

Al-Bairuty, G.A., Shaw, B.J., Handy, R.D., Henry, T.B. 2013. Histopathological effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on the organs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Toxicol. 126: 104 –115.

An, R., Li, Y., Niu, X., Yu, H. 2008. Responses of Antioxidant Enzymes in Catfish Exposed to Liquid Crystals from E-Waste. Int. J. Environ. Res. Public Health. 5(2): 99-103.

Andre, N., Tian, X., Lutz, M., Ning, L. 2006. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel**.** Science 311: 622. DOI: 10.1126/science.1114397.

Arellano, J.M., Storch, V., Sarasquete, C. 1999. Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the *Senegales sole, Solea senegalensis*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 44: 62-72.

Au, D. W. T. 2004. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. Marine Pollution Bulletin. 48: 817–834.

Avalos, A., Haza, A.I., Mateo, D., Morales, P. 2014. Cytotoxicity and ros production of manufactured silver nanoparticles of different sizes in hepatoma and leukemia cells. J. Appl. Toxicol. *34*: 413–423.

Bagherzadeh Lakani, F., Meshkini, s., Yazdani Sadati M.A., Falahatkar B. 2016. Bioaccumulation of copper nanoparticle in gill, liver, intestine and muscle of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) juvenile. Caspian J. Environ. Sci. 14 (2): 105-115.

Bahuguna, S. N., Anupama G., Urvashi, N., Upadhyay M. K. 2014. Histological study of the gill (gill filaments and gill rakers) in post flexion to finger ling stage of *schizothorax plagiostomus* (Heckel). Global Research Journal of Fishery Science and Aquaculture, 1(3): 010-016

Baktur, R., Patel, H., Kwon, S. 2011. Effect of exposure conditions on SWCNT-induced inflammatory response in human alveolar epithelial cells. Toxicol. In vitro. 25: 1153–1160.

Bar-Ilan, O., Albrecht, R.M., Fako, V.E., Furgeson, D.Y. 2009. Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in Zebrafish embryos. Small 5(16): 1897-910. DOI: 10.1002/smll.200801716.

Baun, A., Hartmann, N. B., Grieger, K., Kusk K. O. 2008. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing. Ecotoxicology 17:387–395.

Bhattacharya, K., Davoren, M., Boertz, J., Schins, R., Hoffmann, E., Dopp, E. **2009**. Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells. Part. Fibre. Toxicol. 6. doi:10.1186/1743-8977-6-17.

Bilberg, K., Malte, H., Wang, T., Baatrup, E. 2010. Silver nanoparticles and silver nitrate cause respiratory stress in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). Aquat. Toxicol. 96:159–165.

Bolann, B., Ulvik, R. 1992. Improvement of a Direct Spectrophotometric Assay for Routine Determination of Superoxide Dismutase Activity. Clin Chem 37.

Braunbeck, T., Storch, V., Bresch, H. 1990. Species-specific reaction of liver ultrastructure in zebra fish, *Brachydanio rerio* and trout, *Salmo gairdneri* after prolonged exposure to 4-chloroaniline. Arch. Environ. Contam.Toxicol. 19: 405-418

Bruslé, J., Gonzalez, I., Anadon, G. 1996. The structure and function of fish liver. In: Munshi JSD, Dutta HM (eds) Fish morphology. Science Publishers Inc., New York, 77–93.

Buzea, C., Pacheco, I., Robbie, K. 2007. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. Biointerphases; 2: MR17-MR71.

Çok, I., Ulutaş, O.K., Okuşluk, Ö., Durmaz, E. 2011. Evaluation of DNA Damage in Common Carp (Cyprinus carpio L.) by Comet Assay for Determination of Possible Pollution in Lake Mogan (Ankara). TheScientificWorldJOURNAL. 11: 1455–1461

Choi, J.E., Kim, S., Ahn, J.H., Youn, P., Kang, J.S., Park, K., Yi, J., Ryu. D. 2009. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult Zebrafish. Aquatic Toxicology. 100(2): 151-159. doi: 10.1016/j.aquatox. 2009.12.012

Crouzier, D., Follot, S., Gentilhomme, E., Flahaut, E., Arnaud, R., Dabouis, V., Castellarin, C., Debouzy, J.C. 2010. Carbon nanotubes induce inflammation but decrease the production of reactive oxygen species in lung. Toxicology. 272: 39–45.

Dai, l. 2012.Toxicity and bioaccumulation of silver and copper oxide nanoparticles in two deposit feeders, a polychaete Capitella teleta and a mollusk, Macoma balthica, compared to other metallic forms Denmark.

Dutta, H.M., Munshi, J.S.D., Roy, P.K., Singh, N.K., Adhikari, S., Killius J. 1996. Ultrastructural changes in the respiratory lamellae of the catfish, *Heteropneustes fossilis*, after sublethal exposure to Malathion. Environmental Pollution. 92: 329 – 341.

Exbrayat, J.M., Moudilou, E. N., Lapied, E. 2015. Harmful Effects of Nanoparticles on Animals. Journal of Nanotechnology 861092, 10.

Fahmy, B., Cormier, S.A. 2009. Copper oxide nanoparticles induce oxidative stress and cytotoxicity in airway epithelial cells. Toxicol. In vitro. *23*: 1365–1371.

Fan, W., Shi, Z., Yang, X., Cui, M., Wang, X., Zhang, D., Liu, H., Guo, L. 2012. Bioaccumulation and biomarker responses of cubic and octahedral Cu2O micro/nanocrystal in *Daphnia maga.* Water Research 46(18): 5981-5988.

Federici, G., Shaw, B.J., Handy, R.D. 2007. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. Aquat. Toxicol. 84: 415–30.

Fernandes, M. N., Mazon, A. F. 2003. Environmental pollution and fish gill morphology. Science Publishers. 203-231.

Figueiredo-Fernandes, A., Ferreira-Cardoso, J. V., Garcia-Santos, S., Monteiro, S. M., Carrola, J.; Matos, P., Fontaínhas-Fernandes, A. 2007. Histopathological changes in liver and

gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* exposed to waterborne copper. Pesq. Vet. Bras. 27(3): 103-109.

Frenzili, G., Nigro, M., lyons, B.P. 2009. The comet assay for the evalution of genotoxic impact in aquatic environment. Mulation research/ reviews in mutationresearch. 681: 80-92.

Frevert, U., Engelmann, S. 2000. Intravital Observation of Plasmodium berghei Sporozoite Infection of the Liver. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030192.g011

Gilbert, S. 2012. Kidney Structure and the Nephron. Tufts University School of Medicine. ocw.tufts.edu/data/33/498083

Gomes, T., Pinheiro, J. P., Cancio, I., Pereira, C. G., Cardoso, C., Bebianno, M. 2011. Effects of copper nanoparticles exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis.* Environ. Sci. Technol. 45 **(**21**):** 9356–9362.

Goth, L. 1991. A simple method for determination of serum Catalase activity and revision of reference rang. Clinica Chimica Acta. 196: 143-152.

Govindasamy, R., Rahuman, A.A. 2012. Histopathological studies and oxidative stress of synthesized silver nanoparticles in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). J. Environ. Sci. 24: 1091–1098.

Gonzalez, P., Baudrimont, M., Boudou, A., Bourdineaud, J.P. 2006. Comparative effects of direct cadmium contamination on gene expression in gills, liver, skeletal muscles and brain of the zebrafish; *Danio rerio*. Biometals. 19(3): 225–235.

Griffitt, R.J., Weil, R., Hyndman, K.A., Denslow, N.D., Powers, K., Taylor, D., Barber, D.S. 2007. Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in zebra fish (*Danio rerio*). Environ. Sci. Technol. 41: 8178-8186.

Griffitt, R.J., Luo, J., Gao, J., Bonzongo, J.C., Barber, D.S. 2008. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. Environmental Toxicology and Chemistry. 27: 1972-1978.

Hadi, A. A., Alwan, S. F. 2012. Histopathological changes in gills, liver and kidney of fresh water fish, Tilapia zillii, exposed to aluminum. Int. J. Pharm. Life Sci. 3: 2071-2081.

Handy, R. D., Henry, T. B., Scown, T. M., Johnston, B. D., Tyler, C. R. 2008. Manufactured nanoparticles: their uptake and effects on fish-amechanistic analysis. Ecotoxicology. 17(5): 396-409.

Harder, W. 1975. Anatomy of fishes. 2 vols. E. Schweizerbart, Stuttgart, Germany

Hinton, D.E., Lauren, D.J. 1990. Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes: potential biomarkers of exposure. In: Biomarkers of Environmental Contamination (Eds.) 17-52.

Hoehne-Reitan, K., and Kjørsvik, E. 2004. Functional development of the liver and exocrine pancreas in teleost fish. In: Govoni, J.J. (ed.).The Development of Form and Function in Fishes and the Question of Larval Adaptation. American Fisheries Society, Symposium 40. American Fisheries Society, Bethseda, MD. 9 – 36.

Holgate, S.T. 2010. Exposure, Uptake, Distribution and Toxicity of Nanomaterials in Humans. Journal of Biomedical Nanotechnology. 6: 1-19.

Hoseini, S. M., Nodeh, A. J. 2012. Toxicity of copper and mercury to Caspian Roach *Rutilus rutilus caspicus*. J. Persian Gulf 3 (9): 9 – 14.

Hua, J., Vijver, M.G., Ahmad, F., Richardson, M.K., Peijnenburg, W.J.G.M. 2014. Toxicity of different-sized copper nano- and submicron particles and their shed copper ions to zebrafish embryos. Environ. Toxicol. Chem. 33: 1774–1782.

Jinyuan, C., Xia, D., Yuanyuan, X., Meirong, Z. 2011. Effects of titanium dioxide nano-particles on growth and some histological parameters of zebrafish (*Danio rerio*) after a long-term exposure. Aquat. Toxicol. 101(3-4): 493–499.

Joanny Menvielle-Bourg, F. 2005. Superoxide Dismutase (SOD), a Powerful Antioxidant, is now available orally. Phytotherapy. 3: 1-4.

Johnston, B.D., Scown, T.M., Moger, J. 2010. Bioavailability of Nanoscale Metal Oxides TiO2, CeO2, and ZnO to Fish. Environmental Science and Technology 44(3), 1144–1151. http://dx.doi.org/10.1021/es901971a

Kagan, V.E., Bayir, H., Shvedova, A.A. 2005. Nanomedicine and nanotoxicology: two sides of the same coin. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine 1: 313-316.

Kantham, K.P., Richards, R.H. 1995. Effect of buffers on the gill structure of common carp, *Cyprinus carpio* and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. J. Fish Dis. 18: 411-423.

Karlsson, N.L., Runn, P., Haux, C., Forlin, L. 1985. Cadmium induced changes in gill morphology of zebra fish, *Brachydanio rerio* and rainbow trout, *Salmo gairdneri*. J. Fish Biol. 27: 81-95.

Karthigarani, M., Navaraj, P. S. 2012. Impact of Nanoparticle On Enzymes Activity In *Oreochromis Mossambicus.* Int. J. Sci & Tech. R. 1(10): 13-17.

Katuli, K.K., Massarsky, A., Hadadi, A., Pourmehran, Z. 2014. Silver nanoparticles inhibit the gill Na^+/K^+-ATPase and erythrocyte AChE activities and induce the stress response in adult zebrafish (Danio rerio). Ecotoxicology and Environmental Safety 106: 173-80 doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.04.001.

Kelly, J.M., Janz, D.M. 2009. Assessment of oxidative stress and histopathology in juvenile northern pike (*Esox lucius*) inhabiting lakes downstream of a uranium mill. Aquat. Toxicol. 92: 240–249.

Khanna, P., Ong, C., Bay, B. H., Baeg, G. H. 2015. Nanotoxicity: An Interplay of Oxidative Stress, Inflammation and Cell Death. Nanomaterials, 5; 1163-1180.

Kiran Reddy, T., Prasad, T.N.V.K.V., Janardana Reddy, S. 2014. Studies on combined effect of *Aeromonas hydrophila* and cadmium on lipid peroxidation and antioxidant status in selected tissues of Indian freshwater major carp, *Catla catla*: role of silver nanoparticles. IOSR Journal Of Pharmacy. 4(10): 1-7.

Kohen, R., Nyska, A. 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress and antioxidants. Toxicol. Pathol. 30: 620–630.

Konca, K., Lankoff, A., Banasik, A., Lisowska, H., Kuszewski, T., Gozdz, S., Koza, Z., Wojcik, A. 2003. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. Mutation Research 534: 15–20.

Korai, A.K., Lashari, KH., Sahato, G.A., Kazi, T.G. 2010. Histological lesions in gills of feral cyprinids, related to the uptake of waterborne toxicants from Keenjhar Lake. Fish Biol., 18:157-176.

Lane, D.P. 1992. Cancer. P53, guardian of the genome. Nature 358: 15–16.

Lee K.J., Nallathamby, P.D., Browning, L.M., Osgood, C.J., Xu, X-HN. 2007. In vivo imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of zebrafish embryos. ACS Nano.1:133–43.

Lee R. F., Steiner, S. 2003. Use of single cell gel electrophoresis / comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. Mutation research. 544: 43-64

Li, X., Liu, W.,Sun, L., Aifantis, K.E., Yu, B., Fan, Y., Feng, Q., Cui, F., Watari, F. 2015. Effects of physicochemical properties of nanomaterials on their toxicity. J. Biomed. Mater. Res. A, 103: 2499–2507.

Lin, W., Xu, Y., Huang, C. C., Ma, Y., Shannon, K.B., Chen, D. R., Huang, Y. W. 2009. Toxicity of nano-and micro-sized ZnO particles in human lung epithelial cells. J. Nanopart. Res. 11: 25–39.

Linhua, H., Lei, C. 2012. Oxidative stress responses in different organs of carp (*Cyprinus carpio*) with exposure to ZnO nanoparticles. Ecotoxicol. Environ. Saf. 80: 103 –110.

Liu, J., Fan, D., Wang, L., Shi, L., Ding, J., Chen, Y., Shen, S. 2014. Effects OF ZnO, CuO, Au, and TiO2 Nanoparticles on Daphnia magna and early Life stages of Zebrafish Danio rerio. Environmental Protection Engineering. 40: 140-149. http://dx.doi.org/10.5277/epe140111.

Louei Monfared, A., Bahrami, A.M., Hoseini, E., Soltani, S., Shaddel, M. 2015. Effects of nano-particles on histo-pathological changes of the fish. J. Environ. Health Sci. Eng. 13: 62-72.

Mansouri, B., Maleki, A., Johari, A., Reshahmanish, N. 2015. Effects of cobalt oxide nanoparticles and cobalt ions on gill histopathology of zebrafish (Danio rerio). AACL Bioflux. 8(3): 438-444.

Mansouri, B., Johari, A. 2016. Effects of Short-Term Exposure to Sublethal Concentrations of Silver Nanoparticles on Histopathology and Electron Microscope Ultrastructure of Zebrafish (Danio Rerio) Gills. Iranian Journal of Toxicology. 10(1):15-20.

Mehndiratta, P., Jain, A., Srivastava, S., Gupta, N. 2013. Environmental Pollution and Nanotechnology. Environment and Pollution, 2(2): 49–59.

Monfared, AL., Soltani, S. 2013. Effects of silver nanoparticles administration on the liver of rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*): histological and biochemical studies. Eur. J. Exp. Biol. 3(2): 285-289.

Monteiller, C., Tran, L., MacNee, W., Faux, S., Jones, A., Miller, B., Donaldson, K. 2007. The pro-inflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells *in vitro*: The role of surface area. Occup. Environ. Med. *64*: 609–615.

Moore, M.N. 2006. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? Environment International. 32: 967-976.

Mortimer, M. 2011. Evaluation of the Biological Effects of Engineered Nanoparticles on Unicellular Pro- and Eukaryotic Organisms.

Murugananthkumar, R., Rajesh, D., Senthilkumaran, B.,(2016) Copper Nanoparticles Differentially Target Testis of the Catfish, *Clarias batrachus* :In vivo and In vitro Study. Front. Environ. Sci. 4:67. doi: 10.3389/fenvs.2016.00067.

Myers, M. S., Stehr, C. M., Olson, O. P., Johnson, L. L., McCain, B. B., Chan, S. L., Varanasi, U. 1993. National benthic surveillance project: Pacific Coast—Fish histopathology and relationships between toxicopathic lesions and exposure to chemical contaminants for cycles I to V (1984–88). National technical information service. US. 1–147.

Nacci, D.E., Cayula, S., Jackim, E. 1996. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. Aquat Toxicol 35:197–210.

Nagy, A., Steinbruck, A., Gao, J., Doggett, N., Hollingsworth, J.A., Iyer, R. 2012. Comprehensive Analysis of the Effects of CdSe Quantum Dot Size, Surface Charge, and Functionalization on Primary Human Lung Cells. Acs. Nano. 6: 4748-4762.

Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N. B., Filser, J., Miao, A., Quigg, A., Santschi, P. H., Sigg, L. 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. Ecotoxicology 17(5):372-86.

Noureen, A., Jabeen, F. 2015. The toxicity, ways of exposure and effects of Cu nanoparticles and Cu bulk salts on different organisms. Int. J. Bio. Sci. 6(2): 147-156.

Oberdörster, G., Oberdörster, E., Oberdörster, G. 2005. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. Environmental Health Perspectives. 113:823–839.

Oliveira Batista, M. T., Rodrigues Junior, E., Feijó-Oliveira, M., Caroline Ribeiro, A., Rodrigues, E., Kawagoe Suda, C. N., Sree Vani, G. 2014. Tissue levels of the antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase in fish *Astyanax bimaculatus* from the Una River Basin. Rev. Ambient. Água 9(4): 621-631.

Ostaszewska, T., Chojnacki, M., Kamaszewski, M., Sawosz-Chwalibóg, E. 2016. Histopathological effects of silver and copper nanoparticles on the epidermis, gills, and liver of Siberian sturgeon. Environ. Sci. Pollut. Res. 23: 1621–1633.

Park, E. J., Park, K. 2009. Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles *in vitro* and *in vitro*. Toxicol. Lett. 184: 18–25.

Poljak-Blaži, M., Jaganjac, M., Žarković, N. 2010. *Cell Oxidative Stress: Risk of Metal Nanoparticles*; CRC Press Taylor: London, UK; New York, NY, USA.

Roberts, R.J. 2001. Fish Pathology, 3rd edn. W.B. Saunders publishing, London, UK.

Saber, T.H. 2011. Histological Adaptation to Thermal Changes in Gills of Common Carp Fishes Cyprinus carpio L. Rafidain J. Sci. 22(1): 46- 55.

Saglam, D., Atli, G., Dogan, Z., Baysoy, E., Gurler, C., Eroglu, A., Canli, M. 2014. Response of the Antioxidant System of Freshwater Fish *(Oreochromis niloticus)* Exposed to Metals (Cd, Cu) in Differing Hardness. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 14: 43-52.

Salah, M., Farghali, A.A., Azmy, H., Khedr, M.H. 2013. Biological compatibility of carbon nanotubes for treatment of Pollution of Nile tilapia (Oreochromis niloticus) by lead acetate. Life Science Journal. 10(2).

Sanad, S.M., El-Nahass, E.M., Abdel-Gawad, A.M., Aldeeb, M. 1997. Histochemical studies on the liver of mice following chronic administration of sodium barbitone. J. Ger. Soc. Zool. 22(C): 127-165.

Sarkar, A., Ghosh, M., Sil, P.C. 2014. Nanotoxicity: Oxidative stress mediated toxicity of metal and metal oxide nanoparticles. J. Nanosci. Nanotechnol. *14*: 730–743.

Schwaiger, J., Spieser, O. H., Bauer, C. 2000. Chronic toxicity of nonylphenol and ethinylestradiol: haematological and histopathological effects in juvenile Common carp (*Cyprinus carpio*). Aquat. Toxicol. 51: 69–78.

Shaw, B. J., Handy, R. D. 2011. Physiological effects of nanoparticles on fish: a comparison of nanometals versus metal ions. Environ. Int. 37(6): 1083–1097.

Shaw, B. J., Al-Bairuty, G., Handy, R. D. 2012. Effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): physiology and accumulation. Aquat. Toxicol. 116: 90–101.

Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G.J.S., Griffiths, S.M., Williams, P.M., Maffeis, T.G.G., Wright, C.J., Doak, S.H. 2009. Nanogenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. Biomaterials. 30: 3891–3914.

Song, L., Vijver, M.G., Peijnenburg, W.J.G.M., Galloway, T.S. Tyler, Ch.R. 2015. A comparative analysis on the in vivo toxicity of copper nanoparticles in three species of freshwater fish. Chemosphere. 139: 181-189 http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.06.0211.

Subashkumar, S., Selvanayagam, M. 2014. First report on: Acute toxicityand gill histopathology of fresh water fish Cyprinus carpio exposed to Zincoxide (ZnO) nanoparticles. International Journal of Scientific and Research Publications. 4(3): 1-4.

Sun, Y.N., Wang, C.D., Zhang, X.M., Ren, L., Tian, X.H. 2011. Shape Dependence of Gold Nanoparticles on In Vivo Acute Toxicological Effects and Biodistribution. Journal of Nanoscience and Nanotechnology. 11: 1210-1216.

Takashima, F., Hibiya, T. 1995. An atlas of fish histology. Normal and pathogical features. 2nd Ed. Tokyo, Kodansha Ltd.

Tang, S., Wang, M., Germ, K. E., Du, H.M., Sun, W. J., Gao, W. M., Mayer, G. D. 2015. Health implications of engineered nanoparticles in infants and children. World Journal of Pediatrics. 11(3): 197-206.

Thophon, S., Kruatrachue, M., Upathan, E. S., Pokethitiyook, P., Sahaphong, S., Jarikhuan, S. 2003. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer* in acute and subchronic cadmium exposure. Environ. Pollut. 121: 307-320.

Trenzado, C., Carmen Hidalgo, M., García-Gallego, M., Morales, A. E., Furné, M., Domezain, A., Domezain, J., Sanz, A. 2006. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in sturgeon *Acipenser naccarii* and trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. Aquaculture. 254: 758–767.

Turabekova, M., Rasulev, B., Theodore, M., Jackman, J., Leszczynska, D., Leszczynski, J. 2014. Immunotoxicity of nanoparticles: A computational study suggests that CNTs and C60 fullerenes might be recognized as pathogens by toll-like receptors. Nanoscale. 6; 3488–3495.

Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullos, M. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. Ecotoxicology and Environmental Safety 64:178–18.

Van Aken, B. 2015. Gene expression changes in plants and microorganisms exposed to nanomaterials.Current Opinion in Biotechnology. 33: 206–219.

Velkova-Jordanoska, L., Kostoski, G., Jordanoska, B. 2008. Antioxidative enzymes in fish as biochemical indicators of aquatic pollution. Bulg. J. Agric. Sci. 14: 235-237.

Wang, T., Long, X., Cheng, Y., Liu, Z., Yan, S. 2014. The potential toxicity of copper nanoparticles and copper sulphate on juvenile *Epinephelus coioides.* Aquat. Toxicol. 152**:** 96 -104.

Wang, T., Chen, X., Long, X., Liu, Z., Yan, S. 2016. Copper Nanoparticles and Copper Sulphate Induced Cytotoxicity in Hepatocyte Primary Cultures of Epinephelus coioides. PLoS ONE 11(2): e0149484.

Wang, J., Sun, P., Bao, Y., Liu, J., An, L. 2011. Cytotoxicity of single-walled carbon nanotubes on PC12 cells. Toxicol. In vitro. 25: 242–250.

Wilson, J.M., **Laurent, P. 2002.** Fish Gill Morphology: Inside Out. JOURNAL OF EXPERIMENTAL ZOOLOGY 293:192–213

Wu, Y., Zhou, Q. 2013. Silver nanoparticles cause oxidative damage and histological changes in medaka (Oryzias latipes) after 14 days of exposure. Environ. Toxicol. Chem. 32:165–173

Xia, J., Zhao, H. Z., Lu, G. H. 2013. Effects of Selected Metal Oxide Nanoparticles on Multiple Biomarkers in *Carassius auratus.* Biomed. Environ. Sci. 26(9): 742-749.

Xu, P., Xu, J., Liu, S., Yaug, Z. 2012. Nano copper induced apoptosis via increasing oxidative stress. J. Hazard. Mater. 241-242: 279-286.

Ye, J., Zhang, X., Young, H.A., Mao, Y., Shi, X. 1995. Chromium (VI)-induced nuclear factor-κB activation in intact cells via free radical reactions. Carcinogenesis .16: 2401–2405.

Yeo, M.K., Kang, M. 2008. Effects of CuxTiOy nanometer particles on biological toxicity during zebrafish Embryogenesis. Department of Environmental Science and Engineering, KyungHee University, Yongin, Gyeonggi 449-701, Korea Department of Chemistry, College of Science, Yeungnam University

Yokel, R., MacPhail, R. 2011. Engineered nanomaterials: exposures, hazards, and risk prevention. Journal of Occupational Medicine and Toxicology. 6: 7.

Zhao, J., Wang, Z., Liu, X., Xie, X., Zhang, K., Xing, B. 2014. Distribution of CuO nanoparticles in juvenile carp *(Cyprinus carpio)* and their potential toxicity. J. Hazard. Mater. 197: 304–310.

ABSTRACT:

The current study has determined the toxicity effects of copper nanoparticles on the some vital organs such as gill, liver and kidney of Caspian Roach; *Rutillus caspicus*. For this purpose, 120 fishes were used as experimental fishes and exposed to 0.1, 0.2 and 0.5 mg/L of Cu nanoparticles for 21 days, and 30 fishes as control. The mean water temperature of the aquaria was 22±2 ºC, dissolved oxygen 5.2 mg/L, pH at 7±0.004 and the concentration of calcium carbonate was 270 ppm. On the 7, 14 and 21 days after exposing the fishes to Cu nanoparticles, three fish were randomly selected from each aquaria, sacrificed and samples from their gill, liver and kidney were taken and fixed in cold 10 % buffered formalin. Then microscopic sections were prepared and examined by light microscope which showed histological alternations in the gill, liver and kidney tissues. Then blood samples collected for enzymatic and DNA damage evaluation. Histological alternation in gills included: hyperplasia, fusion and detachment of secondary lamellae, blood congestion in vascular axis of primary filaments, reduced secondary lamellae length and cellular degeneration. Histological changes in liver included blood congestion in the central veins, cytoplasmic vacuolation of the hepatocytes, cellular degeneration, congestion in the blood sinusoids and necrosis of the hepatocytes. Histological changes in kidneys included glomerular shrinkage, severe degeneration in the tubules cells, interstitial tissue and glomerulus, increase in interstitial tissue cells and macrophages aggregation.The most severe alternation of the gill, liver and kidney were in third weeks at 0.5 mg/l concentration. There were positive correlation between concentration and hyperplasia ($r=.815$, $p<.01$), fusion ($r=.620$, $p<.05$), detachment ($r=.849$, $p<.01$), blood congestion ($r=.706$, $p<.05$), degeneration ($r=.742$, $p<.01$). There were positive correlation between time and telangiectasia ($r=.611$, $p<.05$). There were positive correlation between concentration and hepatocytes hypertrophy ($r=.652$, $p< .01$), necrosis ($r=.768$, $p<.05$). The activity of antioxidant stress enzymes, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), were measured in the specimens. The maximum level of enzymes activities were in first week at 0.1 mg/l concentration. There were significant difference between treatments and control ($p<0.05$). We used comet assay for evaluation of DNA damage. The activity of antioxidant stress enzymes were higher in low concentration. DNA damage was significant in all treatments. The most severe DNA damage have seen in third week at 0.5 mg/l concentration. Evaluation of these changes could be useful in estimating the harmful effects of Copper nanoparticles. The degree of damages was more intensive at higher CuNP concentrations. The result of the study showed that CuNPs could cause severe damages on the Caspian roach; *Rutillus caspicus* and have lethal effects for fish.

Keywords: Cu nanoparticles, *Rutillus caspicus*, histopathology, Catalase, Super oxide dismutase, Commet assay

Islamic Azad University
Science and Research Branch

Faculty of Natural Resources and Environment- Department of Marine Science PhD Thesis in Marine Biology, Marine Animals

Title:

Effect of sub-accute exposure of Cu nanoparticles on histopatological, DNA damage and oxidative enzymes changes in (*Rutilus caspicus* Yakovlev, 1870)

Supervisors:

Dr. Ali Mashinchian Moradi

Dr. Issa Sharifpour

Advisors:

Dr. Shahla Jamili

Dr. Pargol Ghavam Mostafavi

By:

Shahrzad Aghamirkarimi

Summer 2017