



Investigating the histopathology and ultrastructural changes of gill tissue of common carp (*Cyprinus carpio*) in separate and Co-exposure to silica nanoparticles (SiO₂) and zinc oxide nanoparticles (ZnO)

Samira Mirmohammadvali¹ | Eisa Solgi^{2✉} | Borhan Mansori³

1. Department of Environment, Faculty of Natural Resources and Environment, Malayer University, Malayer, Iran. E-mail: s.mirmohammadvali@gmail.com
2. Corresponding Author, Department of Environment, Faculty of Natural Resources and Environment, Malayer University, Malayer, Iran. E-mail: e.solgi@malayeru.ac.ir
3. Drug Abuse Prevention Research Center, Health Research Institute, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran. E-mail: borhanmansouri@gmail.com

Article Info	ABSTRACT
Article type: Research Article	Co- exposure to nanoparticles can cause serious damage to aquatic organisms, including fish. The aim of this study was to investigate the toxic effects of simultaneous exposure to silica and zinc oxide nanoparticles on changes in the gill tissue of common carp (<i>Cyprinus carpio</i>). In this study, common carp were exposed to different concentrations of zinc oxide nanoparticles, silica dioxide, and a combination of these nanoparticles. After 28 days of exposure, the samples were prepared for gill histology. Devices such as XRD, FTIR, and SEM were used in this study. The present study showed that the exposure of common carp to nanoparticles caused various tissue damage, including capillary telangiectasia, hyperplasia, increased mucus secretion, clubbing of the apex of the secondary lamellae, and fusion. Also, the simultaneous exposure of two nanoparticles has more destructive effects than the separate state of nanoparticles, which can be concluded that the presence of silica nanoparticles increases the toxicity of zinc nanoparticles. In addition, different nanoparticles show different effects in different environments. Therefore, it should be noted that the use of different nanoparticles in different amounts requires more detailed and comprehensive studies on the effects of these nanoparticles on living organisms.
Article history: Received 17 June 2024 Received in revised form 19 September 2024 Accepted 29 November 2024 Published online 01 July 2025	
Keywords: Co- exposure, Common carp, Nanoparticles, SiO2 NPs, Tissue pathology.	
Cite this article: Mirmohammadvali, S., Solgi, E., & Mansori, B. (2025). Investigating the histopathology and ultrastructural changes of gill tissue of common carp (<i>Cyprinus carpio</i>) in separate and Co- exposure to silica nanoparticles (SiO2) and zinc oxide nanoparticles (ZnO). <i>Journal of Natural Environment</i> , 78 (Monitoring and Management of Natural Environmental Pollutants), 141-151. DOI: http://doi.org/10.22059/jne.2024.377728.2682	
© The Author(s). Publisher: University of Tehran Press. DOI: http://doi.org/10.22059/jne.2024.377728.2682	

بررسی آسیب شناسی و تغییرات فراساختاری بافت آبشش بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در مواجهه جداگانه و همزمان نانوذرات دی اکسید سیلیس (SiO_2) و نانو ذرات اکسید روی (ZnO)

سمیرا میرمحمد ولی^۱ | عیسی سلگی^۲ | برهان منصوری^۳

۱. گروه علوم و مهندسی محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران. رایانامه: s.mirmohammadvali@gmail.com
۲. نویسنده مسئول، گروه علوم و مهندسی محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران. رایانامه: e.solgi@malayeru.ac.ir
۳. مرکز تحقیقات پیشگیری از سوء مصرف مواد، پژوهشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران. رایانامه: borhanmansouri@gmail.com

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله پژوهشی	مواجهه همزمان نانوذرات می تواند آسیب های جدی به جانداران آبی از جمله ماهی ها به دنبال داشته باشد. هدف از این مطالعه بررسی اثرات سمی رویارویی همزمان با نانوذرات دی اکسید سیلیس و اکسید روی بر تغییرات بافت آبشش ماهی کپور معمولی (<i>Cyprinus carpio</i>) بود. در این مطالعه، ۳۰۰ قطعه ماهی کپور معمولی با میانگین وزن 8 ± 1 گرم در مواجهه با غلظت های مختلف نانوذرات اکسید روی، دی اکسید سیلیس و ترکیب این نانوذرات قرار گرفتند و پس از ۲۸ روز نمونه برداری به منظور بررسی آسیب های بافت شناسی آبشش انجام شد. در این مطالعه دستگاه هایی مانند FTIR+XRD و SEM مورد استفاده قرار گرفتند. مطالعه حاضر نشان داد که در معرض قرارگیری ماهی کپور معمولی با نانوذرات باعث آسیب های بافتی مختلفی شامل تالانژیکتازی مویرگی، هایپرپلازی، افزایش ترشح موکوس، چماقی شدن رأس لاملای ثانویه و فیوژن بوده است. همچنین مواجهه همزمان با دو نانو ذره مورد بررسی اثرات مخرب بیشتری نسبت به حالت انفرادی این نانوذرات دارد که می توان نتیجه گرفت حضور نانوذرات دی اکسید سیلیس باعث افزایش سمیت نانوذرات روی می شود. به علاوه، نانو ذرات مختلف در محیط های مختلف اثرات متفاوتی از خود نشان می دهند. بنابراین لازم است که همزمان با افزایش بکارگیری نانو مواد مختلف در کاربردهای گوناگون، مطالعات دقیق و جامع تری پیرامون تأثیرات این مواد بر موجودات زنده انجام شود.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۲۸	
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۶/۲۹	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۰۹	
تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۰۴/۱۰	
کلیدواژه ها: آسیب شناسی بافتی، دی اکسید سیلیس، کپور معمولی، نانو ذرات، مواجهه همزمان.	

استناد: میرمحمد ولی، سمیرا؛ سلگی، عیسی؛ و منصوری، برهان (۱۴۰۴). بررسی آسیب شناسی و تغییرات فراساختاری بافت آبشش بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در مواجهه جداگانه و همزمان نانوذرات دی اکسید سیلیس (SiO_2) و نانو ذرات اکسید روی (ZnO). محیط زیست طبیعی، ۷۸ (ویژه نامه پایش و مدیریت آلاینده های محیط زیست طبیعی)، ۱۵۱-۱۴۱.

DOI: <http://doi.org/10.22059/jne.2024.377728.26826>



© نویسندگان.

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

مقدمه

در چند دهه اخیر، تحقیقات در زمینه کاربرد نانو مواد در زمینه‌های زیست‌پزشکی، صنعتی و کشاورزی به سرعت در حال رشد است. بنابراین، درک تأثیر این مواد بر سلامت انسان و محیط‌زیست امری ضروری می‌باشد، زیرا انتظار می‌رود به دلیل بهره‌برداری و دفع نادرست، تهدیدی در محیط‌زیست ایجاد کنند (Grasso et al., 2022). فناوری نانو معمولاً به عنوان درک، کنترل و کاربرد ماده در مقیاس نانو، تقریباً بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر تعریف می‌شود. نانو سم‌شناسی آبریان یک حوزه تحقیقاتی نسبتاً نوظهور است که توجهات را به خود جلب کرده است (Vali et al., 2020). در میان اکسیدهای فلزی در مقیاس نانو، نانوذرات اکسید روی دومین نانو ماده‌ای هست که پس از نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بیشترین استفاده را در زمینه‌های خاص دارند، نانوذرات اکسید روی به طور گسترده برای تولید رنگدانه‌ها، نیمه‌هادی‌ها، سلول‌های خورشیدی لاستیکی، الیاف شیمیایی، کرم‌های ضد آفتاب و افزودنی‌های غذایی استفاده می‌شود (Bathi et al., 2022). از طرفی، نانوذرات دی‌اکسید سیلیس به طور گسترده در محصولات مصرفی، از سرامیک و شیشه گرفته تا دارو، لوازم آرایشی و افزودنی‌های غذایی استفاده می‌شود (Bathi et al., 2022). کاربرد آنها در حوزه پزشکی نیز گسترش یافته است و بیش از ۱ میلیون تن در سال تنها در اروپا تولید می‌شود و سالانه بیش از ۴ میلیون تن در سطح جهان مصرف می‌شود، که می‌تواند به دلیل مزایای آن، سمیت پایین و هزینه کم و سهولت تولید باشد. با پتانسیل جدید و رو به رشد نانوذرات دی‌اکسید سیلیس، به ویژه در کاربردهای پزشکی که این نانوذرات به بدن انسان وارد می‌شود، نگرانی‌هایی را در مورد ایمنی و اثرات نامطلوب سلامتی ایجاد کرده است (Yang et al., 2019; Selvarajan et al., 2020). از این رو، با افزایش تعداد و تنوع نانوذرات ساخته شده در محصولات صنعتی و مصرفی، خطر در معرض قرار گرفتن انسان و همچنین بوم‌سازگان‌های آبی افزایش می‌یابد، که ممکن است به یک تهدید جدی برای سلامت انسان و محیط‌زیست تبدیل شود.

در طی سال‌های اخیر پژوهشگران بیشتر تمرکز خود را بر روی مواجهه همزمان نانو مواد با یکدیگر در محیط‌های آبی معطوف کرده‌اند و مطالعاتی در این زمینه به چاپ رسانده‌اند (Pirsaeheb et al., 2019; Sayadi et al., 2020, 2021, 2022). از آنجا که نانوذرات در هر دو فاز آب و رسوبات، در نهایت با دیگر آلاینده‌های موجود در محیط‌زیست نظیر آلاینده‌های آلی و فلزات واکنش خواهند داشت و از راه‌های مختلف (اثر کاهشی، همبستگی و اثر خنثی کنندگی) بر قسمت‌های مختلف موجودات زنده اثر خواهند گذاشت، بررسی اثرات همزمان نانوذرات با دیگر آلاینده‌ها دارای اهمیت می‌باشد.

با توجه به اینکه در ماهیان آبشش به عنوان اولین مکان بعد از پوست در مقابل آلاینده‌ها و سموم در مواجهه مستقیم قرار دارد، بررسی تغییرات ایجاد شده در بافت آبشش به عنوان یک شاخص مناسب برای بررسی اثرات این آلاینده‌ها تحت شرایط استرس شناخته شده است. آبشش ماهی‌ها در کنار نقش‌های مهمی که دارد در فعالیت تنفس، تنظیم اسمزی و فعالیت‌های مربوط به دفع مواد زائد نقش اساسی دارد (Rezaian et al., 2023). در مطالعه ارزیابی اثرات مواجهه همزمان نانوذرات اکسید روی و گرافن‌های چند لایه (MLGs) نتایج آن نشان داد که گرافن‌های چند لایه، سمیت حاد نانوذرات اکسید روی را افزایش دادند (Sayadi et al., 2021). در مطالعه دیگر، جذب و حذف مس در کپور معمولی به دنبال مواجهه همزمان با نانوذرات TiO_2 و نانوذرات CuO به طور قابل توجهی در تمام بافت‌ها افزایش یافت (Mansouri et al., 2016). مطالعه Rezaian و همکاران (۲۰۲۳) نشان داد نمونه‌هایی که به طور همزمان در مواجهه با نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و اکسید روی قرار گرفتند تغییراتی از جمله پرخونی، هایپرپلازی، جوش خوردگی رشته‌های آبششی، خمیدگی رشته آبششی، برآمده شدن لایه اپیتلیال، از هم گسیختگی لایه اپیتلیال، کوتاه شدن رشته‌های آبششی ثانویه و ازدیاد سلول‌های اپیتلیال را نشان دادند. برخی از مطالعات ادم و ضخیم شدن لاملاهای اولیه آبشش قزل‌آلای رنگین کمان و کپور معمولی جوان را پس از مواجهه با نانوذرات TiO_2 گزارش کرده‌اند (Lee et al., 2012; Bath et al., 2012). Mansouri و همکاران (۲۰۱۵) ترشح مخاطی، ادم، هایپرپلازی اپیتلیال و همجوشی لایه‌ای آبشش را پس از قرار گرفتن در معرض نانوذرات Co در طول سمیت حاد گزارش کردند.

کاربرد هیستوپاتولوژی ماهی، بخش اصلی شاخص زیستی مورد استفاده در برنامه‌های پایش بوم‌سازگان آبی است. این روش وسیله‌ای برای شناسایی اثرات حاد و مزمن آلاینده‌های گوناگون در مواجهه با بافت و اندام‌های خاص است. مطالعات آسیب‌شناسی بافتی به عنوان ابزاری حساس برای تشخیص اثرات مستقیم مواد شیمیایی بر اندام‌های هدف ماهیان در شرایط آزمایشگاهی محسوب می‌شود (Sahraei et al., 2017). همچنین مطالعات هیستوپاتولوژیک نشانگرهای زیستی خوبی برای نظارت بر تغییرات تحت

انواع استرس های محیطی هستند. این مطالعات می توانند سلامت یک موجود زنده را بهتر از هر ابزار ارزیابی بیوشیمیایی دیگری ارزیابی کنند، به علاوه روش پاتولوژی و فراساختاری روش های مناسبی برای نشان دادن آسیب های وارد شده به بافت های مختلف ماهی می باشند که می توان این آسیب ها را به صورت کمی برآورد کرده و مانع از آسیب های بیشتر به آبزیان شد (Fathi et al., 2017). از این رو، هدف از این مطالعه جهت بررسی اثرات جداگانه و همزمان نانوذرات دی اکسید سیلیس (SiO_2) و نانوذرات اکسید روی (ZnO) بر آسیب شناسی بافت های آبشش ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) و تغییرات فراساختاری به اجرا درآمد.

روش شناسی پژوهش

تهیه و آماده سازی ماهی ها: در این پژوهش تعداد ۳۰۰ قطعه ماهی کپور معمولی با میانگین طول کل 9 ± 1 سانتی متر و وزن 8 ± 1 گرم از مزارع پرورش ماهی شهر رشت خریداری شد. سپس ماهی ها به آزمایشگاه شیلات دانشگاه ملایر منتقل شدند. در ابتدا آب حوضچه نگهداری ماهی حداقل به مدت ۴۸ ساعت هوادهی شده بود. در ادامه ماهیان حداقل دو هفته قبل از آزمایش ها با شرایط آزمایشگاهی در حوضچه نگهداری سازگار شدند. سپس به ۷ گروه (با دو تکرار) با تراکم ۱۰ قطعه در هر آکواریوم به حجم ۳۰ لیتر منتقل شدند. در این مدت ماهی ها دو بار در روز با غذای مخصوص ماهی های آکواریومی (غذای پولکی ماهی با ترکیباتی از جمله پودر ماهی و پودر میگو) به میزان ۲ در صد وزن بدنشان تغذیه می شدند. دمای آب ۲۵-۲۳ درجه سانتی گراد، میزان اکسیژن محلول ۶/۵ میلی گرم در لیتر و pH برابر ۸/۳۷ بود. آبی که برای نگهداری ماهی ها در دوره سازگاری و همچنین انجام آزمایش های سم شناسی استفاده شد، آب آشامیدنی شهرستان ملایر بوده است. هیچ مرگ و میر یا علائم بالینی بیماری در طول دوره سازگاری مشاهده نشد.

ویژگی نانوذرات: پودر نانوذرات دی اکسید سیلیس (SiO_2) و نانوذرات اکسید روی (ZnO) تولیدی شرکت US Research Nanomaterials با میانگین قطر ۲۷ و ۲۰ نانومتر (به ترتیب)، از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان مشهد تهیه گردید. جهت بررسی حالت بلوری، تعیین فاز و همچنین میزان ناخالصی موجود در نانوذرات الگوی از اشعه ایکس استفاده شد. الگوی پراش اشعه ایکس به وسیله آنالیز X-ray مدل (XMD-300) انجام گردید. برای بررسی شکل و اندازه نانوذرات از میکروسکوپ الکترونی FESEM مدل VEGA3-MIRA II-MIRA III استفاده شد. همچنین از آنالیز پراکندگی نور دینامیکی (DLS) و پتانسیل زتا برای تعیین اندازه ذرات در آب و تمایل ذرات درون مایع برای اتصال به یکدیگر از دستگاه SZ100 استفاده گردید. برای تهیه محلول نانوذرات، از پودرهای تهیه شده مقدار ۱ گرم از نانوذرات دی اکسید سیلیس و اکسید روی توسط ترازوی دیجیتال KERN وزن شده و به آن قطره قطره آب مقطر اضافه کرده و همزمان تکان داده تا ته نشین نگردد. سپس به حجم ۳۰ میلی لیتر رسانده و در دستگاه حمام اولتراسونیک (مدل) به مدت ۳۰ دقیقه در هر نوبت (۳ نوبت) قرار داده شد. سپس حجم محلول به ۱۰۰۰ میلی لیتر رسانده شد و در ظروف شیشه ای تیره به دور از تابش نور نگهداری شد.

آزمایش سمیت مزمن: بعد از انجام آزمایش های سمیت حاد براساس استاندارد OECD 203 مقدار سمیت کشنده (LC_{50}) برای هر دو نانوذرات دی اکسید سیلیس و اکسید روی و حالت ترکیب دو نانوذرات به ترتیب ۴۴/۶۶، ۱۰۰، ۲۶/۳۰ میلی گرم در لیتر به دست آمد. براساس غلظت های سمیت حاد، مقادیر غلظت های به دست آمده تهیه و برای سمیت مزمن در نظر گرفته شد. انجام بخش سمیت مزمن نیز براساس استاندارد OECD 305 صورت گرفت. برای این منظور نمونه های ماهی به ۱۴ آکواریوم (برای هر نانوذره در غلظت های ذکر شده با دو تکرار و همچنین نمونه های شاهد) تقسیم شدند. نمونه گیری از ماهی ها در روز ۲۸ (دوره جذب) به طور تصادفی انجام شد. پس از بیهوش کردن آنها توسط عصا گل میخک، بافت های آبشش و عضله جدا شده و بلافاصله در فرمالین ۱۰ درصد برای انجام کارهای بافت شناسی نگهداری شدند (Mansouri et al., 2013).

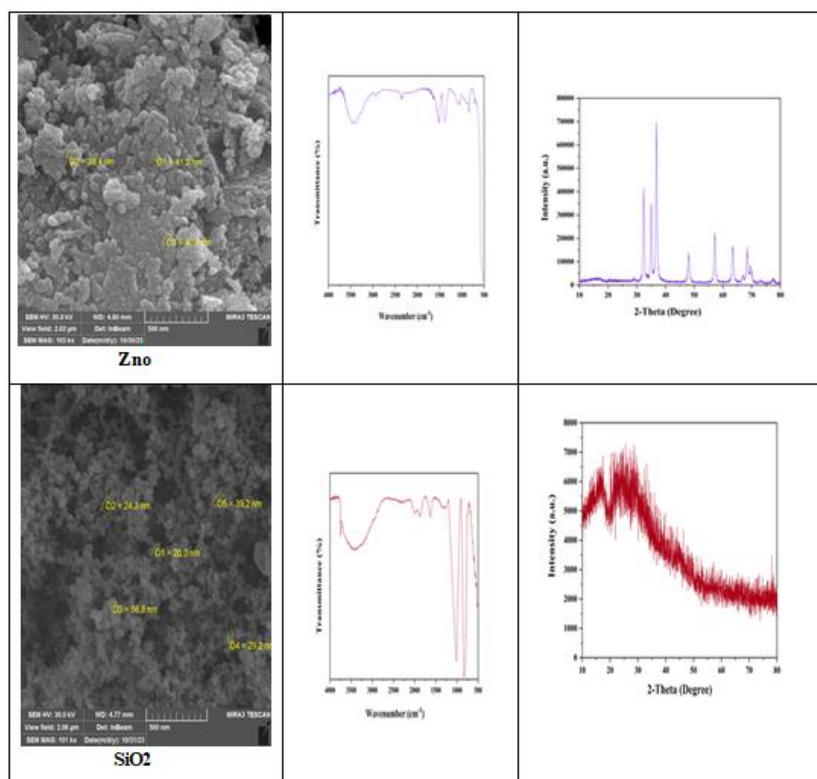
بافت شناسی: به منظور انجام مطالعات بافت شناسی، ابتدا بافت های آبشش و عضله به مدت ۲۴ ساعت در محلول بوئن تثبیت شده و سپس در الکل ۷۰ درصد نگهداری گردید. پس از طی مراحل آبگیری، شفاف سازی و پارافینه کردن بافت ها در دستگاه خودکار (Duplex processor, Shandon Elliott)، نمونه ها قالب گیری شده و توسط دستگاه میکروتوم (MicroTec, Rotary microtome, DS-8402) برش هایی به ضخامت ۵ میکرومتر از آنها تهیه شد و برش ها روی لام چسبانده شدند. رنگ آمیزی

لام‌های حاصل به روش رایج هماتوکسیلین-ئوزین صورت گرفت. از نمونه‌ها لام‌های با کیفیت مناسب تهیه و لام‌ها توسط میکروسکوپ نوری KRUSS بررسی شدند (Osborne et al., 2013). تغییرات بافتی ماهی کپور معمولی در تصاویر بافتی تهیه شده، به‌وسیله روش نیمه‌کمی در چهار سطح بدون تغییر (-)، تغییر ملایم (+)، تغییر متوسط (++) و تغییر شدید (+++) و با گروه شاهد مقایسه گردید (Bernet et al., 1999).

تغییرات فراساختاری: برای مطالعات فراساختاری نمونه‌های بافتی (آبخش) تهیه شده در دوره جذب پس از تثبیت در فرمالین ۱۰ درصد، بعد از کدگذاری به مدت ۲ ساعت در گلوئتارالدئید ۲/۵ درصد و به مدت ۲۴ ساعت در گلوئتارالدئید ۱۲/۵ درصد قرار داده شد و بعد از آن به مدت ۱ ساعت در بافر فسفات نگهداری شد. سپس به صورت صعودی در درصدهای متفاوتی از الکل به ترتیب ۹۶-۹۰-۸۰-۷۰ هر کدام ۲ دقیقه قرار داده شد. در ادامه بعد از ۵ دقیقه غوطه‌ور بودن در استون، نمونه‌ها خارج شده و در هوای آزاد قرار داد شد تا خشک شود. در نهایت نمونه‌های آماده شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مدل MIRA3-LMU مورد بررسی قرار گرفت. همچنین ملاحظات اخلاقی و حقوق حیوانات در این مقاله مورد توجه قرار گرفت (Mansouri et al., 2018).

یافته‌های پژوهش

ویژگی‌های نانوذرات: نتایج XRD، FTIR و تصاویر SEM نانوذرات اکسید روی و دی‌اکسید سیلیس در شکل ۱ ارائه شده است. با توجه به نتایج پراش اشعه ایکس نانوذرات اکسید روی، پیک‌های نشان داده شده در زوایای 2θ برابر 33° ، 35° ، 37° ، 48° ، 58° و 68° برای نانوذرات دی‌اکسید سیلیس این پیک‌ها برابر 18° ، 24° ، 28° و 30° بود. اندازه ذرات در جدول ۱ ارائه شده است. با توجه به نتایج، اندازه نانوذرات دی‌اکسید سیلیس و اکسید روی به ترتیب 33 ± 9 و 40 ± 13 نانومتر به دست آمد. همچنین نتایج آنالیز (پتانسیل زتا و DLS)، اندازه قطر هیدرودینامیکی نانوذرات دی‌اکسید سیلیس، اکسید روی و ترکیب دو نانوذره به ترتیب $274/3$ ، $258/9$ و $288/6$ نانومتر بود. همچنین آنالیز مربوط به شاخص دیسپرسی همگن بودن نانوذرات ($PDI < 20$) را نشان داد.

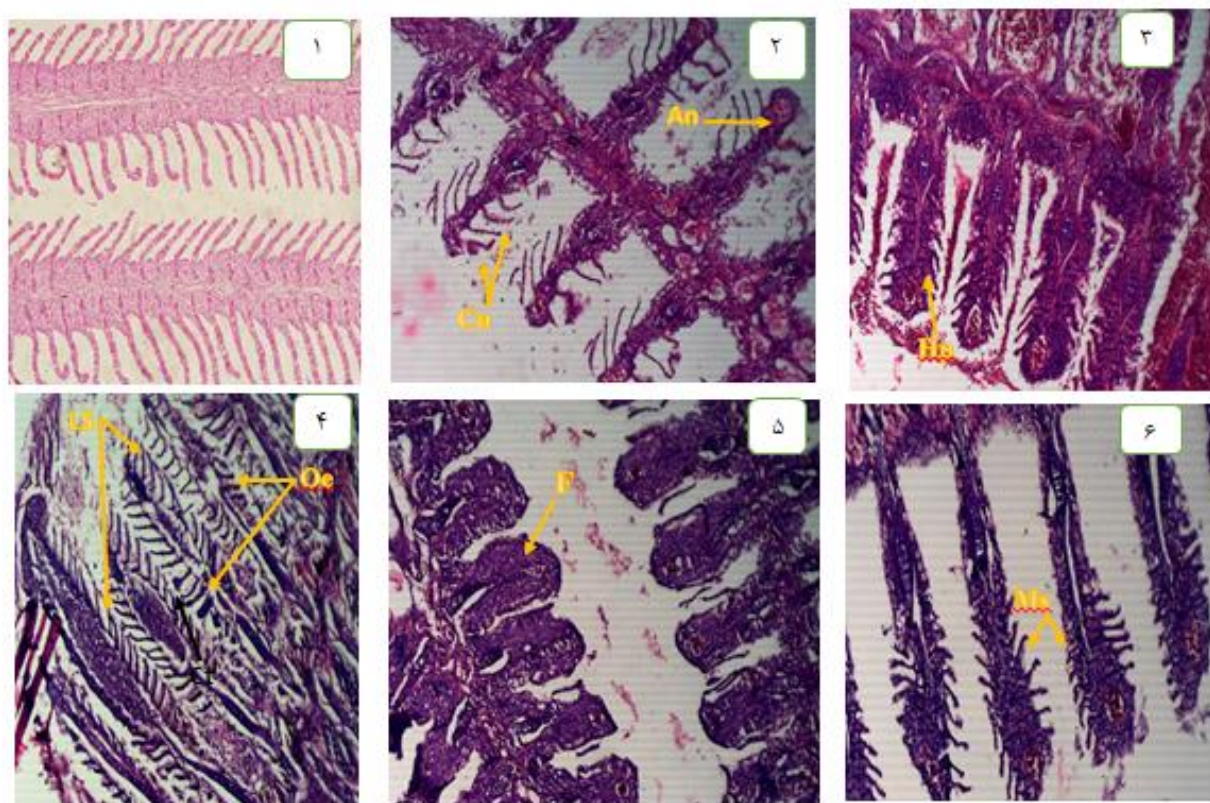


شکل ۱- عکس X-ray (سمت راست)، FTIR (وسط) و SEM (سمت چپ) به ترتیب برای نانوذرات اکسید روی و نانوذرات دی‌اکسید سیلیس

جدول ۱- ویژگی نانو ذرات مورد استفاده در این مطالعه

پتانسیل زتا (mV)	سایز هیدرودینامیکی (DLS,) (nm)	اندازه ذرات (SEM,) (nm)	شاخص پلی دیسپرسی (PDI)	نانوذرات
-۳۴/۶	۲۷۴/۳	۹±۳۳	۰/۱۶	دی اکسید سیلیس
-۳۰/۱	۲۵۸/۹	۱۳±۴۰	۰/۱۲	اکسید روی
-۳۵/۷	۲۸۸/۶	-	۰/۲۲	دی اکسید سیلیس+اکسیدروی

آسیب شناسی بافت آبشش: تصاویر بافت شناسی آبشش ماهی کپور معمولی در گروه های مواجهه (۲۸ روزه) با نانوذرات دی اکسید سیلیس و نانوذرات اکسید روی در شکل ۲ ارائه شده است. براساس نتایج شکل ۲، آسیب های بافتی در بافت آبشش ماهی کپور معمولی ایجاد شده است، که مهمترین آسیب ها شامل تالانژیکتازی مویرگی (An)، چماقی شدن رأس لاملای ثانویه (Ct)، هایپرپلازی (Hp)، آماس و تورم (Oe)، خمیدگی تیغه های ثانویه (Cu)، جوش خوردگی لاملای ثانویه (LS)، چسپندگی لاملاها (F) و افزایش ترشح موکوس (Ms) می باشد. به علاوه، در حالت ترکیب نانوذرات آسیب های بافت آبشش نسبت به حالت مجزا نانو ذرات و همچنین نمونه شاهد بیشتر بوده است همچنین مطابق جدول ۲، آسیب های شدید بافتی در حالت ترکیب نانو ذرات مشاهده شده است. تصاویر فراساختاری در شکل ۳ نشان می دهد که تغییرات فیوژن و هایپر پلازی در بافت آبشش ایجاد شده است، که نشان دهنده آسیب های شدید بافتی در این مطالعه می باشد.

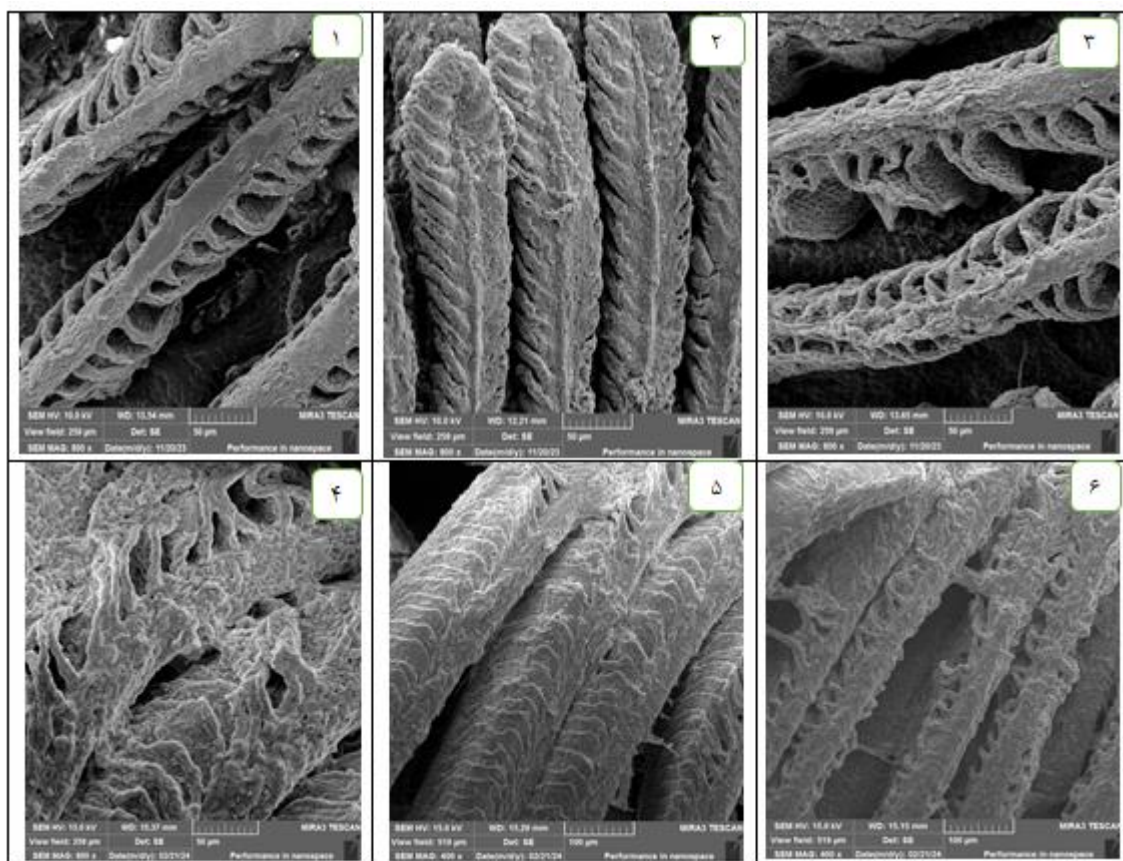


شکل ۲- آسیب شناسی بافت آبشش ماهی کپور معمولی پس از ۲۸ روز مواجهه با نانوذرات دی اکسید سیلیس و نانوذرات اکسید روی در نمونه (۱) شاهد؛ (۲) دی اکسید سیلیس؛ (۳) اکسید روی؛ (۴) ترکیب دی اکسید سیلیس و اکسید روی؛ (۵) ترکیب دی اکسید سیلیس و اکسید روی؛ (۶) ترکیب دی اکسید سیلیس و اکسید روی. علائم اختصاری: تالانژیکتازی مویرگی (An)، چماقی شدن رأس لاملای ثانویه (Ct)، هایپرپلازی (Hp)، آماس و تورم (Oe)، خمیدگی تیغه های ثانویه (Cu)، جوش خوردگی لاملای ثانویه (LS)، چسپندگی لاملاها (F) و افزایش ترشح موکوس (Ms)

جدول ۲- امتیازدهی نیمه کمی ساختار بافت آبشش ماهی کپور معمولی در مواجهه با گروه‌های مختلف نانو ذرات دی‌اکسید سیلیس و نانو ذرات اکسید روی

آسیب بافتی								گروه‌های مختلف
LS	N	ES	Ct	Cu	F	Hp	* An	
-	-	-	-	+	-	-	-**	شاهد
++	+	+	+	+	++	++	+	نانوذرات دی‌اکسید سیلیس
+	+	+	+	+	+	++	+	نانوذرات اکسید روی
++	+	+	++	++	+++	+++	++	نانوذرات دی‌اکسید سیلیس + نانو ذرات اکسید روی

* تالانژیکتازی مویرگی (An)، چماقی شدن رأس لاملای ثانویه (Ct)، هایپرپلازی (Hp)، کوتاه‌شدن لاملای ثانویه (ES)، خمیدگی تیغه‌های ثانویه (Cu)، جوش خوردگی لاملای ثانویه (LS)، چسبندگی لاملاها (F) و نکروز (N)؛
** (-) بدون تغییر، (+) تغییر خفیف، (++) تغییر متوسط و (+++) تغییر شدید



شکل ۳- فراساختار بافت آبشش ماهی کپور معمولی پس از ۲۸ روز مواجهه با نانو ذرات دی‌اکسید سیلیس و نانو ذرات اکسید روی در نمونه‌های (۱) شاهد؛ (۲) دی‌اکسید سیلیس؛ (۳) اکسید روی؛ (۴) ترکیب دی‌اکسید سیلیس و اکسید روی؛ (۵) ترکیب دی‌اکسید سیلیس و اکسید روی و (۶) ترکیب دی‌اکسید سیلیس و اکسید روی

بحث و نتیجه‌گیری

نانوذرات در مواجهه همزمان در محیط‌های آبی رفتارهای سمیت متفاوتی از خود نشان می‌دهند و اثرات سمیت آنها غیرقابل پیش‌بینی می‌باشد. نتایج این مطالعه نشان داد که نانو ذرات دی‌اکسید سیلیس اثر سمیت نانو ذرات اکسید روی را در بافت آبشش

ماهی کپور معمولی افزایش داده، و در مقایسه با نانوذرات دی اکسید سیلیس و اکسید روی به تنهایی باعث افزایش شدت آسیب های بافتی آبشش می شود. مهمترین آسیب های ایجاد شده در بافت آبشش ماهی کپور معمولی شامل تلانژیکتازی مویرگی (An)، چماقی شدن رأس لاملای ثانویه (Ct)، هایپرپلازی (Hp)، آماس و تورم (Oe)، خمیدگی تیغه های ثانویه (Cu)، جوش خوردگی لاملای ثانویه (LS)، چسپندگی لاملاها (F) و افزایش ترشح موکوس (Ms) می باشد که تمام این علائم مکانیسم های دفاعی هستند که ماهی در هر مرحله از خود نشان می دهد. علاوه بر این، سطوح بالای روی موجود در آبشش ها را می توان با نقش مهم این بافت به عنوان مسیری برای جذب روی، به دلیل سطح وسیع آنها در تماس با محیط های آبی و سد بسیار نازک جداکننده محیط خارجی و داخلی توضیح داد (Sayadi et al., 2022). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مواجهه همزمان نانوذرات اثرات آسیب شناسی بافتی بیشتری در مقایسه با حالت مجزای هر یک از دو نانوذره دارد. این نوع حالت افزایش سمیت به فاکتورهای مختلفی از جمله نوع نانوذره، اندازه نانوذره، گونه آبی، بافت مورد مواجهه و شرایط محیطی وابسته می باشد، هرچند که در برخی مطالعات مواجهه همزمان کاهش سمیت ترکیب دو ماده بر روی آبیان را به دنبال داشته است. به طور مثال، یافته های Sayadi و همکاران (۲۰۲۲) نشان داد که مواجهه همزمان نانوذرات گرافن با نانوذرات اکسید روی اثرات کاهش آسیب شناسی بافتی بر روی بافت های آبشش و روده سیاه ماهی قنات (*Capoeta fusca*) داشته است. در حالی که یافته های Pirsahab و همکاران (۲۰۱۹) و Fathi و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که به ترتیب مواجهه همزمان نانوذرات دوپ شده تیتانیوم با گروه های فلزی و نانوذرات نقره با کلراید جیوه دارای اثرات پاتولوژیک شدیدتری نسبت به گروه های مجزای نانوذرات بر روی ماهی طلایی (*Carassius auratus*) دارد که مشابه یافته های مطالعه حاضر می باشد. Mansouri و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که جذب و حذف مس در کپور معمولی به دنبال مواجهه همزمان با نانوذرات TiO_2 و نانوذرات CuO به طور قابل توجهی در تمام بافت ها افزایش یافت. Ye و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که اثرات سمیت ترکیبی نانوذرات (ZnO) و نانوذرات اکسید گرافن (GO) در جلبک های آب شیرین (*Scenedesmus obliquus*) و دافنی افزوده می شود. قرار گرفتن در معرض AgNPs باعث آسیب به لاملاهای آبشش و همچنین رشته های آبششی گورخرماهی (*Danio rerio*) شد (Mansouri and Johari, 2016).

آبشش ها به عنوان اندام های شاخص برای تخمین آلودگی و سمیت یون های فلزی در محیط آبی در نظر گرفته می شوند. به دلیل خواص منحصر به فرد آبشش که شامل ساختار بافت شناسی خاص با سطح وسیع و تماس مستقیم با محیط آبی و همچنین ایفای نقش های اساسی در تنظیم اسمزی و تعادل اسید و باز می باشد، به همین دلیل، اندام هدف اصلی سموم آبی محسوب می شود. نانوذرات از طریق بلع یا با نفوذ در غشای آبشش یا جذب مستقیم روی سطح آبشش وارد بدن می شوند (Shahbaa et al., 2020). در مطالعه حاضر، تغییرات آسیب شناسی بافتی وسیعی در بافت آبشش رخ داد که مهم ترین آنها تلانژیکتازی مویرگی، چماقی شدن رأس لاملای ثانویه، هایپرپلازی، آماس و تورم و خمیدگی تیغه های ثانویه اشاره کرد. یکی از دلایل تجمع روی در آبشش ماهی می تواند ترشح موکوپروتئین روی ایتلیوم باشد. اگرچه ترشح مخاطی بالا ممکن است به عنوان یک مکانیسم دفاعی برای جلوگیری از تماس مستقیم بین سطح آبشش و آب آلوده عمل کند، اما می تواند باعث اختلال در عملکرد آبشش مانند تنفس و تنظیم یون شود. این ناهنجاری های هیستوپاتولوژیک مکانیسم های دفاعی در برابر مواد سمی برای محافظت از آسیب های بیشتر بودند (Mansouri et al., 2018).

در بررسی فراساختار با میکروسکوپ SEM مهم ترین آسیب های مشاهده شده در بافت آبشش کپور معمولی می توان به فیوژن و هایپرپلازی اشاره کرد.

مطالعه Shahbaa و همکاران (۲۰۲۰) نشان داد که نانوذرات اکسید روی پس از ۲۸ روز مواجهه باعث آسیب های بافتی آبشش مانند هایپرپلازی، هایپرتروفی و ضخیم شدن رشته های ثانویه در ماهی کپور معمولی شده است. Pirsahab و همکاران (۲۰۱۹) به بررسی اثرات سمی دی اکسید تیتانیوم دوپ شده با فلزات واسطه روی ماهی قرمز (*Carassius auratus*) و کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) پرداختند، تحلیل هیستوپاتولوژیک هایپرپلازی، فیوژن و آنورسم در آبشش ها و همچنین دژنراسیون، ادغام پرزها، نکروز و فرسایش روده را نشان داد. قرار گرفتن در معرض $NPs Fe_3O_4$ و نمک های آهن باعث ایجاد ناهنجاری های هیستوپاتولوژی در آبشش ها و روده می شود که شامل آنورسم، هایپرپلازی، ادم، همجوشی تیغه ها، و علائم واضح نکروز در آبشش ها

بوده است (Sayadi et al., 2021). اثرات مواجهه همزمان نانوذرات اکسید روی و گرافن‌های چند لایه در آبشش سیاه‌ماهی (*Capoeta fusca*) شامل هیپرپلازی، آنوریسم، و همجوشی لاملاها بوده است (Shaw, Sayadi et al., 2022) و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که قرار گرفتن در معرض نانوذرات مس منجر به ادم، همجوشی لایه‌ای، و هیپرپلازی، آنوریسم و نکروز در تیغه‌های ثانویه رشته‌های آبشش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌شود. در مطالعه دیگری، قرار گرفتن در معرض سوسپانسیون نانوذرات مس باعث آسیب به لاملاهای آبشش شد که با تکثیر سلول‌های اپیتلیال و همچنین ادم رشته‌های اولیه و ثانویه آبشش گورخرماهی (*Danio rerio*) مشخص می‌شود (Griffitt et al., 2007). به نظر می‌رسد هیپرپلازی آبشش و همجوشی تیغه‌های ثانویه یک مکانیسم حفاظتی برای محدود کردن سطح تنفسی در تماس با آلاینده‌ها و کاهش نرخ جذب آلاینده باشد با این حال، این اثرات ممکن است منجر به اختلالات تنفسی شود (Capaldo et al., 2019; Beegam et al., 2019). ترشح موکوس یکی از اولین تغییرات مشاهده شده در ماهی است و این مکانیسم حفاظتی اپیتلیوم بازویی است که یک سد خونی آب در برابر نفوذ مواد سمی به بدن ایجاد می‌کند (Kaur and Dua, 2015; Campos-Garcia et al., 2016). هنگامی که هیپرپلازی سلول‌های اپیتلیال اتفاق می‌افتد، تکثیر سلول‌های مجاور به تدریج فضای بین لاملا را کاهش می‌دهد. این حالت منجر به همجوشی لایه‌ای و در نهایت خفگی ماهی می‌شود (Mansouri et al., 2015). به منظور کاهش سطح آسیب‌پذیر آبشش، همجوشی لایه‌ای به عنوان یک مانع انتشار برای محافظت از ماهی در برابر نانوذرات عمل می‌کند (Barbieri et al., 2016). آنوریسم ناشی از تورم رگ‌های خونی بر عملکرد سیستم گردش خون آبشش‌ها تأثیر می‌گذارد (Correia et al., 2017). یکی از تغییرات رایج در آبشش ماهی کپور معمولی در معرض گروه‌های مختلف نانوذرات اکسید روی و دی‌اکسید سیلیس، هیپرپلازی و لاملاهای همجوشی بود. در این شرایط، تکثیر سلولی لاملا باعث کاهش فضای بین لاملا می‌شود که منجر به همجوشی تیغه‌های ثانویه می‌شود (Banerjee, 2007). هیپرپلازی و همجوشی لاملاها در گروه ترکیب بیشتر مشاهده شد. این ضایعه یک مکانیسم دفاعی بود که منجر به کاهش سطح تنفسی و افزایش فاصله انتشار سم-خون شد (Jaya and Shettu, 2015). شدت ضایعات و گسترش آنوریسم لایه‌ای و نکروز در بافت آبشش ماهی کپور معمولی در گروه‌های مختلف بیشتر از آنچه در گروه نانوذرات اکسید روی و دی‌اکسید سیلیس مشاهده شد، بود. تشکیل آنوریسم با تخلیه خون در داخل لاملاها و پارگی سیستم سلولی ستونی، در نتیجه گشاد شدن عروق خونی و یا حتی تأثیر مستقیم آلاینده‌ها بر روی این سلول‌ها مشخص می‌شود. در مطالعه مشابهی، ضایعات آنوریسم لایه‌ای و نکروز را در آبشش گورخرماهی پس از قرار گرفتن در معرض حاد در ترکیب نانوذرات نقره و جیوه گزارش شده است (Mansouri et al., 2016).

مطالعه حاضر نشان داد که در معرض قرارگیری ماهی کپور معمولی با نانوذرات باعث آسیب‌های بافتی مختلفی از جمله تالانژیکتازی مویرگی، هایپرپلازی، افزایش ترشح موکوس، چماقی‌شدن رأس لاملاهای ثانویه و فیوژن شده است. به علاوه، مواجهه همزمان دو نانوذره اثرات مخرب بیشتری نسبت به حالت مجزای نانوذرات دارد. همچنین نانوذرات مختلف در محیط‌های مختلف اثرات متفاوتی از خود نشان می‌دهند. بنابراین لازم به ذکر است که کاربرد نانوذرات مختلف در مقادیر گوناگون مطالعات دقیق و جامع‌تری را پیرامون تأثیرات این نانوذرات بر موجودات زنده می‌طلبد.

سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می‌دانیم از حمایت مالی دانشگاه ملایر و همچنین تمام کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نماییم.

References

- Banerjee, T.K., 2007. Histopathology of respiratory organs of certain airbreathing fishes of India. *Fish Physiology and Biochemistry* 33, 441-454.
- Barbieri, E., Campos-Garcia, J., Martinez, D.S.T., da Silva, J.R.M.C., Alves, O.L., Rezende, K.F.O., 2016. Histopathological effects on gills of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758) exposed to Pb and carbon nanotubes. *Microscopy and Microanalysis* 22(6), 1162-1169.

- Bathi, J.R., Wright, L., Khan, E., 2022. Critical review of engineered nanoparticles: environmental concentrations and toxicity. *Current Pollution Reports* 8(4), 498-518.
- Beegam, A., Lopes, M., Fernandes, T., Jose, J., Barreto, A., Oliveira, M., Soares, A.M.V.M., Trindade, T., Thomas, S., and Pereira, M.L. 2019. Multiorgan histopathological changes in the juvenile seabream *Sparus aurata* as a biomarker for zinc oxide particles toxicity. *Environmental Science and Pollution Research* 27, 30907-30917
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., BurkhardtHolm, P., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of fish diseases* 22(1), 25-34.
- Bhat, I.D., Bhat, B.A., Vishwakarma, S., Verma, A., Saxena, G., 2012. Acute toxicity and behavioural responses of *Labeo rohita* (Hamilton) to a biopesticide" NEEM-OM, *Current World Environment* 7 (1), 175-178.
- Campos-Garcia, J., Martinez, D. S. T., Rezende, K. F. O., da Silva, J. R. M. C., Alves, O. L., Barbieri, E., 2016. Histopathological alterations in the gills of Nile tilapia exposed to carbofuran and multiwalled carbon nanotubes. *Ecotoxicology and environmental safety* 133, 481-488.
- Capaldo, A., Gay, F., and Laforgia, V., 2019. Changes in the gills of the European eel (*Anguilla anguilla*) after chronic exposure to environmental cocaine concentration. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 169, 112-119.
- Correia, J.E., Christofoletti, C.A., Marcato, A.C.C., Marinho, J.F.U., Fontanetti, C.S., 2017. Histopathological analysis of tilapia gills (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) exposed to sugarcane vinasse. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 135, 319-326.
- Eom, I.C., Kim, P.J., and Choi, K.H., 2012. Oxidative stress in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to TiO₂ nanoparticles. *Molecular & cellular toxicology* 8, 357-366.
- Fathi, M., Binkowski, L.J., Azadi, N.A., Hamesadeghi, U., Mansouri, B., 2018. Co-exposure effects of mercury chloride (HgCl₂) and silver nanoparticles (Ag-NPs) on goldfish (*Carassius auratus*): Histopathological changes, oxidative stress response, and bioaccumulation. *Desalination and Water Treatment* 105, 264-272.
- Fathi, M., Mansouri, B., Azadi, N., Davari, B., Maleki, A., 2017. The effect of silver and mercury nanoparticles on laboratory fish stress index. *Zanco Journal of Medical Sciences* 18(56), 70-77. In Persian.
- Grasso, A., Ferrante, M., Moreda-Pineiro, A., Arena, G., Magarini, R., Conti, G. O., and Copat, C. 2022. Dietary exposure of zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) from canned seafood by single particle ICP-MS: Balancing of risks and benefits for human health. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 231, 113217.
- Griffitt, R. J., Weil, R., Hyndman, K. A., Denslow, N. D., Powers, K., Taylor, D., Barber, D. S., 2007. Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental science & technology* 41(23), 8178-8186.
- Jaya, K., Shettu, N., 2015. Transmission electron microscopic study of gills of freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) exposed to the toxicity of cypermethrin. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 7, 698-701.
- Kaur, R., Dua, A., 2015. 96 h LC₅₀, behavioural alterations and histopathological effects due 540 to wastewater toxicity in a freshwater fish *Channa punctatus*. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 5100-5110.
- Lee, B.C., Kim, K.T., Cho, J.G., Lee, J.W., Ryu, T.K., Yoon, J.H., Lee, S.H., Duong, C.N., Mansouri, B., Baramaki, .R, Pourkhabbaz, A., Zareh, M., Hamidian, A.H., 2013. Bioaccumulation and depuration of copper in the kidney and liver of freshwater fish *Capoeta fusca*. *Iranian Journal of Toxicology* 7, 808-814. in Persian.
- Mansouri, B., Johari, S. 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. in Persian.
- Mansouri, B., Johari, S. A., Azadi, N. A., Sarkheil, M., 2018. Effects of waterborne ZnO nanoparticles and Zn²⁺ ions on the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): bioaccumulation, histopathological and ultrastructural changes. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 18(5), 739-746. In Persian.

- Mansouri, B., Maleki, A., Davari, B., Johari, S. A., Shahmoradi, B., Mohammadi, E., 2016. Effect of subchronic exposure of CuO NPs in presence of TiO₂ NPs on fish model. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences 26(142), 138-127. in Persian.
- Mansouri, B., Maleki, A., Johari, S. A., Reshahmanish, N., 2015. Effects of cobalt oxide nanoparticles and cobalt ions on gill histopathology of zebrafish (*Danio rerio*). Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation 8(3), 438-444. In Persian.
- Osborne, O.J., Johnston, B.D., Moger, J., Balousha, M., Lead, J.R., Kudoh, T., Tyler, C.R., 2013. Effects of particle size and coating on nanoscale Ag and TiO₂ exposure in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Nanotoxicology 7(8), 1315-1324.
- Pirsaheb, M., Azadi, N. A., Miglietta, M. L., Sayadi, M. H., Blahova, J., Fathi, M., Mansouri, B., 2019. Toxicological effects of transition metal-doped titanium dioxide nanoparticles on goldfish (*Carassius auratus*) and common carp (*Cyprinus carpio*). Chemosphere 215, 904-915. in Persian.
- Pirsaheb, M., Azadi, N.A., Miglietta, M.L., Sayadi, M.H., Blahova, J., Fathi, M., Mansouri, B., 2019. Toxicological effects of transition metal-doped titanium dioxide nanoparticles on goldfish (*Carassius auratus*) and common carp (*Cyprinus carpio*). Chemosphere 215, 904-915.
- Rezaian, H., Rezaei Funkhes, K., Mir Waqfi, A., 2023. Investigating the separate and simultaneous effects of titanium dioxide nanoparticles (TiO₂) and zinc oxide nanoparticles (ZnO) on the gill tissue pathology of common carp (*Cyprinus carpio*). Aquaculture Science Journal 11(21), 1-13. in Persian.
- Sahraei, H., Hosseini, S.A., Hedayati, S.A., Ghorbani, R., 2017. Pathological changes in gill tissue of common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to sub-lethal concentrations of copper oxide nanoparticles. Environmental Science and Technology 20(1) 95-120. in Persian.
- Sayadi, M. H., Mansouri, B., Shahri, E., Tyler, C. R., Shekari, H., Kharkan, J., 2020. Exposure effects of iron oxide nanoparticles and iron salts in blackfish (*Capoeta fusca*): Acute toxicity, bioaccumulation, depuration, and tissue histopathology. Chemosphere, 247, 125900. in Persian.
- Sayadi, M. H., Pavlaki, M. D., Loureiro, S., Martins, R., Tyler, C. R., Mansouri, B., and Shekari, H. 2022. Co-exposure of zinc oxide nanoparticles and multi-layer graphenes in blackfish (*Capoeta fusca*): evaluation of lethal, behavioural, and histopathological effects. Ecotoxicology, 31(3), 425-439. in Persian.
- Sayadi, M.H., Mansouri, B., Shahri, E., Tyler, C.R., Shekari, H., Kharkan, J., 2020. Exposure effects of iron oxide nanoparticles and iron salts in blackfish (*Capoeta fusca*): Acute toxicity, bioaccumulation, depuration, and tissue histopathology. Chemosphere 247, 125900.
- Sayadi, M.H., Pavlaki, M.D., Loureiro, S., Martins, R., Tyler, C.R., Mansouri, B., Kharkan, J., Shekari, H., 2022. Co-exposure of zinc oxide nanoparticles and multi-layer graphenes in blackfish (*Capoeta fusca*): evaluation of lethal, behavioural, and histopathological effects. Ecotoxicology, 31(3), 425-439.
- Sayadi, M.H., Pavlaki, M.D., Martins, R., Mansouri, B., Tyler, C.R., Kharkan, J., Shekari, H., 2021. Bioaccumulation and toxicokinetics of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) co-exposed with graphene nanosheets (GNs) in the blackfish (*Capoeta fusca*). Chemosphere 269, 128689.
- Selvarajan, V., Obuobi, S., Ee, P. L. R., 2020. Silica nanoparticles—a versatile tool for the treatment of bacterial infections. Frontiers in Chemistry 8, 602.
- Vali, S., Mohammadi, G., Tavabe, K. R., Moghadas, F., Naserabad, S. S., 2020. The effects of silver nanoparticles (Ag-NPs) sublethal concentrations on common carp (*Cyprinus carpio*): Bioaccumulation, hematology, serum biochemistry and immunology, antioxidant enzymes, and skin mucosal responses. Ecotoxicology and environmental safety 194, 110353. in Persian.
- Yang, X., Liu, X., Zhang, A., Lu, D., Li, G., Zhang, Q., Jiang, G., 2019. Distinguishing the sources of silica nanoparticles by dual isotopic fingerprinting and machine learning. Nature Communications 10(1), 1620.
- Ye, N., Wang, Z., Wang, S., Peijnenburg, W. J., 2018. Toxicity of mixtures of zinc oxide and graphene oxide nanoparticles to aquatic organisms of different trophic level: Particles outperform dissolved ions. Nanotoxicology 12(5), B423-438.