

اثر نانولوله‌های کربنی اصلاح شده با دندریمر بر آسیب شناسی بافت آبشش ماهی زبرا (Danio rerio)

برهان منصوری^{۱،۲}، نمامعلی آزادی^۳، سید علی جوهری^۴، رئوف رحمانی^۱، یونس حمه صادقی^۱

۱- کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

ایمیل: sadeghiunes@gmail.com؛ موبایل: ۰۹۱۴۷۲۸۰۳۰۶

۲- دانشجوی دکتری سم شناسی محیط، مرکز تحقیقات بهداشت محیط، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

۳- استادیار آمار زیستی، مرکز تحقیقات عوامل اجتماعی موثر بر سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

۴- استادیار گروه شایات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

چکیده

زمینه و هدف: افزایش استفاده از نانو مواد در بخش‌های مختلف، نگرانی‌های زیست‌محیطی را به همراه داشته است. کامپوزیت نانولوله‌های کربنی- دندریمر یکی از موادی است که به‌تازگی به‌منظور زدایش آلاینده‌های زیست محیطی تولید و به کار رفته است. با توجه به احتمال ورود باقیمانده جاذب‌ها به محیط‌های آبی، هدف این پژوهش بررسی تاثیر کامپوزیت نانولوله‌های کربنی- دندریمر بر آسیب‌شناسی بافت آبشش ماهی زبرا در شرایط آزمایشگاهی بود.

روش بررسی: در این مطالعه ابتدا کامپوزیت نانو لوله‌های کربنی- دندریمر سنتز و ویژگی‌های شیمیایی آن توسط تبدیل فوریه مادون قرمز ارزیابی گردید. جهت بررسی اثر سمیت کامپوزیت سنتز شده، از چهار غلظت غیرکشند که عبارت بودند از ۱، ۱۰، ۳۲ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر به همراه گروه شاهد (فاقد هرگونه ماده شیمیایی) استفاده شد. نمونه‌برداری از بافت آبشش ماهیان پس از ۴ روز رویارویی با کامپوزیت نانولوله‌های کربنی - دندریمر انجام شد. برای انجام مطالعه بافت‌شناسی کلاسیک، پس از آماده سازی، رنگ آمیزی نمونه‌ها به روش هماتوکسیلین - اتوزین انجام و به‌وسیله میکروسکوپ نوری عکس برداری از لام‌ها صورت گرفت.

یافته‌ها: یافته‌های این مطالعه نشان داد که کامپوزیت نانولوله‌های کربنی- دندریمر موجب آسیب‌هایی نظیر چماقی شدن رأس رشته‌ها، ادم، هیپرپلازی، جوش خوردگی، آنیورسم، ترشح موکوس و نکروز در بافت آبشش ماهی زبرا شده است. همچنین میزان آسیب‌ها در بافت آبشش به غلظت وابسته بوده است.

نتیجه‌گیری: مطابق با یافته‌های این پژوهش، میزان آسیب‌های بافت آبشش در مواجهه با کامپوزیت نانولوله‌های کربنی- دندریمر در غلظت‌های بالا، شدیدتر بوده است. آسیب‌های بافتی این ماده بر بافت آبشش بیانگر سمیت این ماده بر ماهی زبرا بوده و پیشنهاد می‌گردد که خروج این ماده به محیط‌های آبی به صورت کنترل شده باشد.

واژه‌های کلیدی: ماهی زبرا، سم شناسی محیطی، آسیب بافتی، نانو لوله‌های کربنی

مقدمه

با گسترش روز افزون صنایع و تولید پساب‌های آلوده از آن‌ها، محافظت از منابع آبی در برابر آلاینده‌های محیطی و نیز حفظ حیات آبریان به دغدغه‌های زیست محیطی جهان امروز اضافه شده است (۱). روش‌های زیادی به منظور زدایش آلاینده‌های محیطی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این میان فرایند جذب سطحی یکی از پر کاربردترین روش‌ها است (۵-۲). در این روش تمرکز اصلی بر مقرون به صرفه بودن نوع جاذب و میزان بهره‌وری جاذب است (۶). در پژوهش‌های به عمل آمده آنچه به آن کمتر توجه شده است این واقعیت است که پس از استفاده از مواد جاذب مقداری از آن‌ها در نهایت از راه‌های مختلف وارد محیط شده و می‌توانند اثراتی در محیط‌های آبی برجای بگذارند که از آن جمله بحث سمیت و تحت تاثیر قرار دادن حیات آبریان است (۷-۹). به هر حال شایسته است اثرات باقی مانده‌های این مواد جهت استفاده صحیح‌تر و واقع‌بینانه‌تر آن‌ها مورد بررسی قرار گیرد (۱۰).

نانولوله‌های کربنی که از صفحات کربن به ضخامت یک اتم و به شکل استوانه‌ای توخالی ساخته شده‌اند. در نانولوله‌های کربنی، اتم‌های کربن در ساختاری استوانه‌ای آرایش یافته‌اند، یعنی یک لوله توخالی که جنس دیواره آن از اتم‌های کربن است (۱۱). در سالهای اخیر نانولوله‌های کربنی به عنوان یک جاذب به منظور زدایش آلاینده‌ها از محیط‌های آبی مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند (۱۲). نانولوله‌های کربنی به دلیل دارا بودن خواص منحصر به فردی چون داشتن ساختاری توخالی و پر منفذ، سطح ویژه بالا، چگالی پایین، رسانایی الکتریکی و گرمایی بالا، استحکام بالا و توانایی برهم‌کنش قوی با مولکول‌های آلاینده از پتانسیل بالایی جهت کاربردهای زیست محیطی برخوردار هستند (۱۳-۱۵). گزارش‌های مستند

تعدادی از پژوهشگران، کاربرد این نانو مواد را برای حذف و پاک‌سازی آلاینده‌هایی چون رنگزها، ریزآلاینده‌ها، فلزات سنگین، رادیونوکلئوتیدها، ترکیبات آلی شیمیایی و مواد خطرناک، مثبت ارزیابی کرده‌اند (۱۶-۲۰).

دندریمرها پلیمرهایی با ساختار سه بعدی، منظم و پرشاخه هستند. دندریمرها در موارد مختلف مانند استخراج مایع-مایع، صنعت کاغذ، علوم پزشکی-بهداشتی، پتروشیمی، جوهرهای چاپ لیزری، کروماتوگرافی، سنسورهای نوری، کاتالیزهای مؤثر، عوامل تشخیص تصویری مثل MRI و صنایع نساجی بکار گرفته می‌شوند (۲۱-۲۴). با توجه به ویژگیهای منحصر به فرد دندریمرها اخیراً انواعی از آن‌ها را به عنوان یک سوپر جاذب جهت حذف آلاینده‌ها از محیط‌های آبی استفاده کرده‌اند که این ویژگی‌ها شامل دارا بودن شکل فشرده و تعداد زیادی گروه‌های انتهایی فعال و فضای خالی آزاد به منظور جذب مولکول‌های میزبان بین شاخه‌ها می‌شود (۲۵-۲۷).

متخصصین در امر حذف آلاینده‌های محیطی به دنبال استفاده از روشهایی هستند که کارایی مواد را به منظور برهم‌کنش و جذب مواد آلاینده بالا ببرند. اصلاح سطحی و شیمیایی مواد و نیز ساخت کامپوزیت‌های مختلف از جمله این مواردند (۲۸-۳۰). کامپوزیت نانولوله‌های کربنی - دندریمر اخیراً به عنوان یک جاذب با ظرفیت جذب بسیار بالا جهت حذف رنگزهای آلی از محیط‌های آبی بکار رفته است. با توجه به ظرفیت جذب بالای این مواد به نظر می‌رسد در آینده‌ای نه چندان دور استفاده از این مواد در مقیاس صنعتی گسترش یابد (۳۱ و ۳۲).

در رابطه با اثرات زیست محیطی نانولوله‌های کربنی بر روی آبریان مطالعاتی انجام شده است. از جمله این مطالعات، نتایج بدست آمده از مطالعه

که برای کلرزدایی از آن به مدت حداقل ۲۴ ساعت هوادهی گردیده بود.

سنتز کامپوزیت نانولوله‌های کربنی - دندریمر مطابق روش بکار رفته در مطالعه حمه‌صادقی و همکاران صورت گرفت (۳۲). در این مطالعه از ۲۰۰ عدد ماهی استفاده شد. در این پژوهش از چهار غلظت کامپوزیت سنتز شده شامل ۱، ۱۰، ۳۲ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر به همراه یک گروه شاهد استفاده گردید. در هر تیمار ۱۵ عدد ماهی استفاده گردید. ماهی‌ها در هر یک از تیمارها به مدت ۴ روز در مواجهه با کامپوزیت سنتز شده قرار گرفتند. در پایان روز چهارم، از هر تیمار ۶ قطعه ماهی به صورت کاملاً تصادفی صید شده، بافت آبشش آن‌ها خارج شد. به منظور انجام مطالعات بافت‌شناسی کلاسیک، ۲۴ ساعت از پس از تثبیت بافت آبشش در محلول بوئن، نمونه‌ها به الکل اتانول ۷۰ درصد منتقل شده و پس از طی مراحل آب‌گیری، شفاف‌سازی، پارافینه کردن و قالب‌گیری، از نمونه‌ها توسط دستگاه میکروتوم برش‌هایی به ضخامت ۵-۴ میکرومتر تهیه و پس از باز کردن چین وچروک برش‌ها روی صفحه گرم، برش‌ها روی لام چسبانده شدند. رنگ‌آمیزی لام‌های حاصله به روش رایج هماتوکسیلین - اتوزین صورت گرفت (۱۹). رنگ‌آمیزی لام‌های حاصله به روش رایج هماتوکسیلین - اتوزین صورت گرفت و از هر نمونه ۳ لام سریالی با کیفیت مناسب تهیه و لام‌ها توسط میکروسکوپ نوری (Nikon (eclipse- E200 در بزرگنمایی ۴۰ بررسی گردیدند از هر نمونه ۳ لام با کیفیت مناسب تهیه و لام‌ها توسط میکروسکوپ نوری (Nikon (eclipse- E200 در بزرگنمایی ۴۰ بررسی - گردیدند.

تغییرات قطر لاملای اولیه، قطر لاملای ثانویه و طول لاملای ثانویه در تصاویر بافتی تهیه شده، بوسیله نرم افزار Axio Vision Real 4.8 اندازه‌گیری و با گروه

Mouchet و همکاران بوده که نشان داد نانولوله کربنی موجب انسداد فیزیکی بافت آبشش و دستگاه گوارشی در لارو قورباغه (*Xenopus laevis*) می‌شود (۳۳). همچنین Martinez و همکاران در طی مطالعه‌ای نشان دادند که نانولوله‌های کربنی در محیط‌های آبی سمیت فلز سرب را بر روی گونه ماهی تیلپیا افزایش داده و خاصیت سینرژیسم داشته است (۳۴). در طی مطالعه‌ی دیگری Smith و همکاران بیان داشتند که نانولوله کربنی موجب آسیب‌های ادم، هایپرپلازی لاملای ثانویه و ترشح موکوس در بافت آبشش شده است (۳۵). از اینرو برای درک بیشتر اثرات این نانوماده بر روی موجودات زنده یکسری تحقیقات بر روی بافتهای مختلف و گونه‌های مختلف آبزیان ضروری به نظر می‌رسد. از آنجا که تا به امروز مطالعه‌ای در مورد اثرات کامپوزیت نانولوله‌های کربنی با دندریمر بر آسیب شناسی بافت آبشش ماهیان گزارش نگردیده است، هدف از مطالعه پیش روی، بررسی اثر کامپوزیت نانولوله‌های کربنی با دندریمر بر آسیب شناسی بافت آبشش ماهی زبرا (*Danio rerio*) می‌باشد. کمی هم توضیح دهید که چرا این گونه را انتخاب کرده‌اید؟

روش بررسی

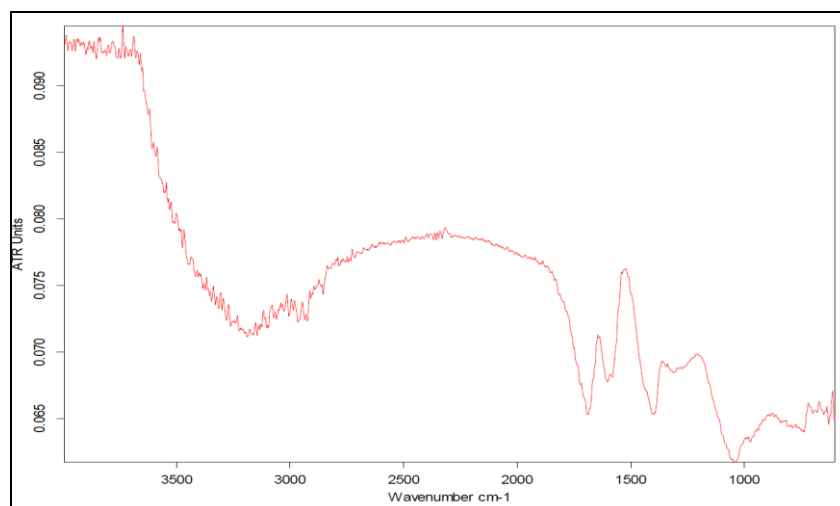
پس از خرید ماهیان زبرا و انتقال به آزمایشگاه، ماهیان به مدت ۱۰ روز در یک آکواریوم ۵۰ لیتری همراه با هوادهی و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی جهت سازگاری با شرایط آزمایشگاهی نگهداری شدند. در طول این مدت میانگین دمای آب ثابت نگه داشته شد و ماهیان روزانه ۲ بار و هر بار به میزان ۱ درصد وزن بدن با غذای مخصوص ماهیان آکواریومی تغذیه گردیدند. آب مورد استفاده برای نگهداری ماهیان در طی دوره سازگاری و همچنین انجام آزمایشات سم‌شناسی، آب شرب شهر سنج بود

شاهد مقایسه گردید. برای مقایسه میانگین قطر لاملای اولیه، قطر لاملای ثانویه و طول لاملای ثانویه ماهی زبرا در غلظت‌های مختلف از آنالیز واریانس دو طرفه استفاده گردید. آنالیز داده‌ها با استفاده نرم افزار آماری R صورت گرفت.

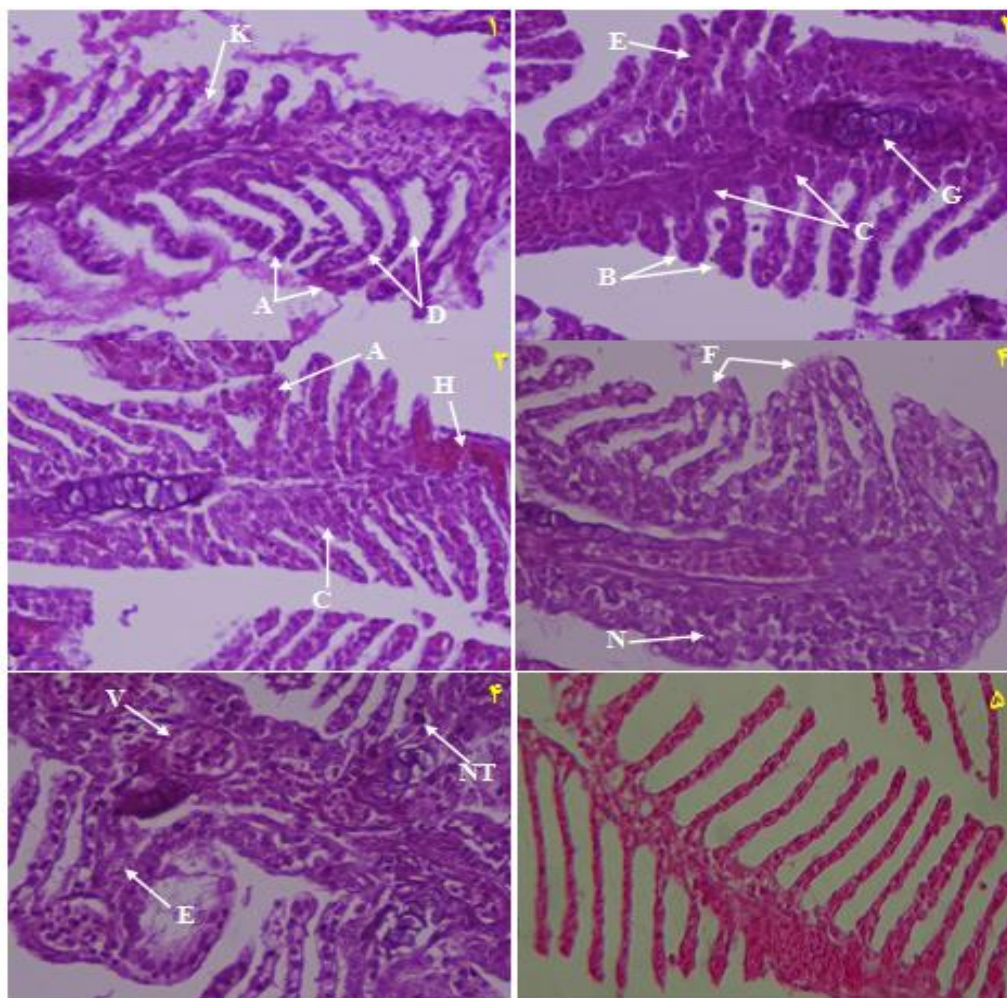
یافته‌ها

طیف تبدیل فوریه مادون قرمز (FT-IR) کامپوزیت نانولوله‌های کربنی- دندریمر در شکل ۱ نشان داده شده است و با توجه به این شکل، قرارگیری دندریمر به روی سطح نانولوله‌های کربنی تایید گردید. پیک‌های cm^{-1} ۳۲۰۰-۳۳۰۰، cm^{-1} ۲۸۰۰-۲۹۰۰، cm^{-1} ۱۵۶۰ و cm^{-1} ۱۱۰۰ به ترتیب مربوط به گروه‌های N-H کششی در دندریمر و C-H گروه‌های کششی واحدهای اتیلینی در دندریمر، ارتعاش خمشی N-H و C-N کششی می‌باشد. آسیب‌های ایجاد شده در بافت آبشش ماهی زبرا در مواجهه با کامپوزیت سنتز شده در شکل ۲ ارائه شده است. در گروه شاهد، رشته‌های بافت آبشش بطور

منظم و با حداقل تغییراتی نظیر متسع شدن راس لاملای ثانویه می‌باشد. مطابق نتایج بدست آمده از این پژوهش، کامپوزیت سنتز شده موجب آسیب‌هایی نظیر متسع شدن و چماقی شدن رأس رشته‌های ثانویه، ادم لاملها، هیپرپلازی، انحناء، جوش خوردگی، افزایش ترشح مخاطی، ظاهر شدن واکوئول در لابه‌لای لاملهای ثانویه، بزرگ شدن گلبول‌های قرمز و ایجاد پرخونی یا آنوریسم در رشته‌های آبشش ماهی زبرا شده است (شکل ۲). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که میزان آسیب‌های وارد به بافت آبشش در مواجهه با کامپوزیت سنتز شده وابسته به غلظت بوده است، بطوریکه با افزایش میزان غلظت ماده شیمیایی در محیط، میزان آسیب‌ها بیشتر بوده است. نتایج بررسی قطر لاملای اولیه و طول لاملای ثانویه (جدول ۱) نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های مورد آزمایش با گروه شاهد در این زمینه وجود دارد ($p < 0/05$).



شکل ۱: طیف تبدیل فوریه مادون قرمز (FT-IR) کامپوزیت نانولوله‌های کربنی- دندریمر



شکل ۲: بافت آبشش ماهی زیراً در مواجهه با کامپوزیت سنتز شده در طی ۴ روز در غلظت‌های ۱ (۱)، ۱۰ (۲)، ۳۲ (۳)، ۱۰۰ (۴) میلی-گرم بر لیتر به همراه گروه شاهد (۵). A: متسع شدن و چماقی شدن رأس رشته‌ها، B: ادم، C: هیپرپلازی، D: انحناء، E: چسبیدگی لامل‌ها، F: جوش خوردگی، G: افزایش اندازه سلول‌های بافت غضروفی، H: آنیورسم، K: ترشح موکوس، V: تشکیل واکوئل، N: نکروز؛

دهند. با افزایش غلظت، روند افزایش در قطر اولیه آبشش چشمگیرتر است. نکته مهم دیگر کاهش طول لاملای ثانویه نسبت به طول لاملای ماهیان گروه کنترل در تمام غلظت‌هاست.

میانگین و انحراف استاندارد اندازه قطر اولیه، قطر ثانویه و همچنین طول ثانویه ماهیان مواجهه یافته با کامپوزیت نانولوله‌های کربنی-دندریمر در جدول ۱ آورده شده‌اند. یافته‌های این جدول، افزایش در قطر لاملای اولیه و ثانویه ماهیان را نسبت به گروه کنترل نشان می‌-

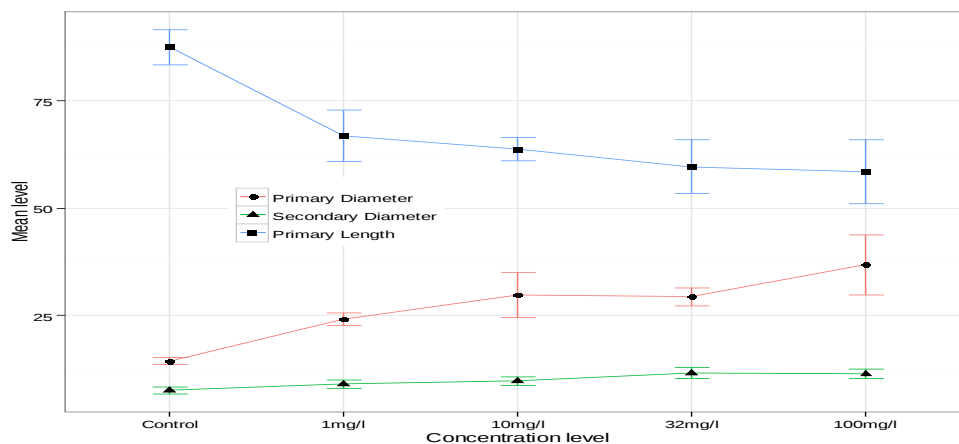
جدول ۱: میانگین (انحراف استاندارد) قطر اولیه، قطر ثانویه و طول ثانویه ماهی زیراً در مواجهه با کامپوزیت نانولوله‌های کربنی - دندریمر

پارامتر آبشش			
غلظت	قطر اولیه	قطر ثانویه	طول ثانویه
کنترل	$14/41 \pm 1/67$	$7/5 \pm 1/7$	$87/5 \pm 9/05$
۱	$24/09 \pm 3/3$	$8/9 \pm 2/2$	$66/8 \pm 13/4$
۱۰	$29/8 \pm 11/6$	$9/7 \pm 2/1$	$63/7 \pm 6/04$

۵۹/۴ ± ۱۳/۸	۱۱/۵ ± ۲/۷	۲۹/۳ ± ۴/۶	۳۲
۵۸/۴ ± ۱۶/۶	۱۱/۳ ± ۲/۴	۳۶/۸ ± ۱۵/۶	۱۰۰

لاملای ثانویه در غلظت‌های مختلف روندی کاهش داشته است، اما این کاهش در غلظت‌های مختلف معنی‌داری نبوده است (نوار خطا در دوز ۱ میلی گرم در لیتر با ۱۰۰ میلی گرم در لیتر همپوشانی دارند). با این حال کاهش طول ثانویه آبشش نسبت به متوسط آن در ماهیان زبرا در گروه کنترل معنی‌دار بوده است. قطر اولیه و ثانویه آبشش در غلظت‌های مختلف نسبت به قطر وان در ماهیان گروه کنترل افزایش داشته است. این افزایش به ویژه در قطر اولیه چشمگیرتر بوده است. به نظر می‌رسد که افزایش غلظت آبشش معنی‌دار قطر آبشش را موجب شده باشد.

به منظور درک بهتر تغییرات پارامترهای آبشش ماهیان در غلظت‌های مختلف، روند تغییر در پارامترهای آبشش ماهیان زبرا قبل و بعد از مواجهه با کامپوزیت نانولوله‌های کربنی - دندریمر در شکل ۳ رسم شده است. در این نمودار محور افقی بیانگر دوزهای مختلف از نانو کامپوزیت نانولوله‌های کربنی - دندریمر و محور عمودی میانگین پارامتر را نشان می‌دهد. برای هر پارامتر در هر غلظت نوار خطا که فاصله اطمینان ۹۵ درصد میانگین در آن نقطه است نیز رسم شده است. نوار خطا این امکان را فراهم می‌کند که بتوان سطح میانگین هر پارامتر را در غلظت‌های مختلف با هم مقایسه نمود. این نمودار نشان می‌دهد که هر چند طول



شکل ۳: روند تغییر در پارامترهای آبشش ماهیان زبرا قبل و بعد از مواجهه با کامپوزیت نانولوله‌های کربنی - دندریمر

نانولوله‌های کربنی - دندریمر حادث شده است یا خیر از آزمون تحلیل واریانس دوطرفه استفاده گردید. نتایج این آزمون در جدول ۲ آمده است.

به منظور بررسی اینکه آیا از نظر آماری در غلظت‌های مختلف تفاوت معنی‌داری در پارامترهای آبشش ماهیان زبرا در مواجهه یافته با کامپوزیت

جدول ۲: آنالیز تحلیل واریانس دو طرفه در پارامترهای آبخش ماهیان زبرا
در مواجهه یافته با کامپوزیت نانولوله‌های کربنی - دندریمر

منبع تغییرات	مجموع مربعات	درجه آزادی	اماره F	مقدار احتمال
پارامتر آبخش	۱۲۱۶۶۱	۲	۷۵۵/۳۱	< ۰,۰۰۱
غلظت	۳۰۹	۴	۰/۹۵۸	۰/۴۳۲
غلظت × پارامتر	۱۱۵۴۱	۸	۱۷/۹۱	< ۰,۰۰۱
باقیمانده	۱۵۷۰۵	۱۹۵		

نکته قابل توجه در این جدول، معنی‌دار نبودن تاثیر کامپوزیت نانولوله‌های کربنی - دندریمر در غلظت-های مختلف است. با این وجود به نظر می‌رسد که تاثیر غلظت دندریمر به پارامتر مورد بررسی بستگی داشته باشد به طوری که تاثیر آن به شدت بازی از پارامترهای آبخش ماهی زبرا را تحت تاثیر قرار می‌دهد (اثر متقابل شدیداً معنی‌دار است). به همین دلیل برای آنکه کدام یک از پارامترهای آبخش تحت تاثیر غلظت دندریمر

قرار دارند، برای هر پارامتر به تنهایی آنالیز واریانس یک طرفه انجام شد. نتایج این آزمون در جدول ۳ آمده است. نتایج این آزمون نشان می‌دهد که سطح غلظت کامپوزیت نانولوله‌های کربنی - دندریمر بطور معنی‌داری تمام پارامترهای آبخش ماهیان را تحت تاثیر قرار می‌دهد. از نمودار ۱ می‌دانیم که افزایش غلظت موجب کاهش طول لاملای ثانویه و افزایش قطر لاملای اولیه و ثانویه آبخش ماهیان را در پی دارد.

جدول ۳: آنالیز واریانس یک طرفه در پارامترهای آبخش ماهی زبرا
در مواجهه یافته با کامپوزیت نانولوله‌های کربنی - دندریمر

پارامتر	منبع تغییرات	مجموع مربعات	درجه آزادی	اماره F	مقدار احتمال
قطر اولیه	غلظت	۳۸۷۴	۴	۱۱,۶۸	< ۰,۰۰۱
	باقیمانده	۵۳۹۲	۶۵		
قطر ثانویه	غلظت	۱۵۷,۳	۴	۷,۴۹	< ۰,۰۰۱
	باقیمانده	۳۴۱,۴	۶۵		
طول ثانویه	غلظت	۷۸۱۸	۴	۱۲,۷۴	< ۰,۰۰۱
	باقیمانده	۹۹۷۲	۶۵		

بحث و نتیجه‌گیری

آسیب‌شناسی بافتی روشی بوده که می‌تواند نوع و شدت آسیب به بافت آبزیان را پس از رویارویی با آلاینده‌های محیط‌زیست از جمله نانوذرات را مشخص نماید (۳۶). همچنین از جمله ابزارهای مفید برای بدست آوردن میزان اثرات سمی نانو مواد بر آبزیان در محیط-های آبی، بررسی میزان آسیب‌شناسی بافتهای مختلف از جمله آبخش در مواجهه با نانو مواد می‌باشد (۳۷). در این راستا، از اندام‌های مهم در ماهیان بافت آبخش بوده

که به عنوان شاخص آلودگی در محیط آبی می‌باشد، زیرا این بافت در معرض مستقیم آلاینده‌ها قرار دارد و می‌تواند به عنوان اندیکاتور زیستی میزان آلاینده‌ها را در محیط بازگو نماید (۳۸). مطالعات متعددی بیان داشتند که میزان تغییرات بافتی ماهی ابرازی مفید و سودمندی در پایش زیست محیطی اکوسیستم‌های آبی آلوده شده توسط فعالیتهای انسانی و همچنین قابلیت پیش‌بینی

ارزیابی ریسک محیطی ناشی از آلاینده‌ها را دارا می‌باشد (۳۹-۴۲).

متسع شدن و چماقی شدن رأس رشته‌های آبشش از اولین آسیب‌های بافتی در ماهیان می‌باشد، در این حالت لایه‌ی اپیتلیوم لاملای ثانویه به صورت ادم درمی‌آید و حضور مواد شیمیایی موجب کاهش سطح مفید آبشش و در نتیجه کاهش تبادل گازی آبشش می‌شوند (۴۳). در هایپرپلازی بافت آبشش، تکثیر سلول‌های مجاور لاملا، کاهش فضای بین لاملاها را به دنبال دارد که با افزایش این روند حالت جوش‌خوردگی در بافت آبشش بوجود می‌آید (۴۴، ۴۵). نتایج بدست آمده از این مطالعه نیز نشان داده است که در غلظت‌های اولیه (۱ و ۱۰ میلی گرم در لیتر) حالت متسع شدن و چماقی شدن رأس لاملاهای ثانویه قابل مشاهده می‌باشد. به دنبال متسع شدن، حالت هایپرپلازی بین لاملاهای ثانویه آبشش نیز ظاهر شده و مطابق نتایج این مطالعه حالت هایپرپلازی با افزایش غلظت از ۱ به ۱۰ و ۳۲ میلی گرم در لیتر این حالت افزایش نشان داده است و در غلظت بالاتر یعنی ۱۰۰ میلی گرم در لیتر به صورت حالت جوش‌خوردگی ظاهر شده است. در طی مطالعه‌ای مشابه، Santos و همکاران (۴۶) نشان دادند که افزایش غلظت آلاینده‌ها در آب موجب حالت جوش‌خوردگی در بافت آبشش ماهیان شده است. همچنین نتایج تحقیقات منصوری و جوهری (۴۷) نیز مؤید این بود که غلظت‌های بالای نانوذرات نقره باعث ایجاد حالت جوش‌خوردگی در بافت آبشش ماهی زبرا می‌شود. در پژوهش مشابهی دیگری، منصوری و همکاران (۴۸) بیان داشتند که حالت هایپرپلازی به دنبال حالت متسع شدن و چماقی شدن رأس لاملاهای ثانویه آبشش ماهی زبرا در مواجهه با نانوذرات کبالت و یون کبالت ظاهر گردیده است.

از دیگر آسیب‌های ایجاد شده بر بافت آبشش ادم و فیوژن (جوش خوردگی) لاملاهای ثانویه می‌باشد. ادم و آماس لاملاهای ثانویه موجب کاهش فضای بین لاملاها شده و به دنبال آن حالت فیوژن و چسبندگی لاملاهای ثانویه رخ خواهد داد. حالت فیوژن لاملاهای ثانویه موجب کاهش تبادلات گازی بین لاملاها شده و بر سلامتی ماهی تاثیرگذار خواهد بود (۴۹، ۵۰). باتوجه به نتایج این مطالعه، حالت فیوژن لاملای ثانویه بافت آبشش در غلظت‌های بالا در ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر رخ دادند. مطالعات مشابهی در این زمینه نشان دادند که آلاینده‌های محیطی و نانوذرات موجب آسیب‌هایی همچون ادم، فیوژن و آنیورسم در بافت آبشش ماهیان شده‌اند (۴۶-۴۸، ۵۱). آنیورسم موجب تجمع خون در قسمتی از بافت شده و این حالت سبب اختلال در جریان خون می‌شود و خطر ترکیدگی رگ، خونریزی و حتی موجب مرگ موجود زنده شود (۵۲).

جمع بندی

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله، از خانم اسم کوچک تقدیمی و آقای اسم کوچک رزاق طلب کارکنان بخش پاتولوژی بیمارستان بعثت سنج به خاطر همکاری در انجام این پروژه سپاسگزاری می‌نمایند. همچنین از کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی کردستان به خاطر همکاری در تأمین هزینه این پژوهش در قالب طرح پژوهشی دانشجویی تشکر می‌گردد. هزینه اجرای این پژوهش در تاریخ ۱۳۹۴/۳/۲۵ توسط معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی کردستان [شماره گرنت: ۱۴/۶۱۸۶۳] تأمین گردیده است.

References:

- 1- Royer B, Cardoso NF. Applications of Brazilian-pine fruit shell in natural and carbonized forms as adsorbents to removal of methylene blue from aqueous solutions – kinetic and equilibrium study. *J Hazard Mater*. 2012; 164:1213–1222.
- 2-Bina B, Asgari G. Survey of dye removal by mixed magnesium chloride and alum in textile industry wastewater. *J Water Wastewater*. 2009; 20: 39-41.
- 3- Parvinzadeh M. Improving colorant absorption from pistachio hulls on wool fiber using protease enzyme. *Prog Color Colorants Coat* 2009; 2: 1-6.
- 4- Mahvi AH, Maleki A. Photosonochemical degradation of phenol in water. *Desalination Water Treat* 2010; 20: 197-202.
- 5- Derbyshire F, Jagtoyen M, Andrews R, Rao A, Martin-Gullon I, Grulke E. Carbon materials in environmental applications. New York: Marcel Decker, 2001: 1-66.
- 6- Deng J, Shao Y, Gao N, Deng Y, Tan C, Zhou S, et al. Multiwalled carbon nanotubes as adsorbents for removal of herbicide diuron from aqueous solution. *Chem Eng J* 2012; 193: 339-47.
- 7-Simate GS, Iyuke SE, Ndlovu S, Heydenrych M, Walubita LF. Human health effects of residual carbon nanotubes and traditional water treatment chemicals in drinking water. *Environ Int* 2012; 39(1): 38-49.
- 8- Upadhyayula VK, Deng S, Mitchell MC, Smith GB. Application of carbon nanotube technology for removal of contaminants in drinking water: a review. *Sci Total Environ* 2009; 408(1): 1-13.
- 9- Savolainen K, Alenius H, Norppa H, Pylkkanen L, Tuomi T, Kasper G. Risk assessment of engineered nanomaterials and nanotechnologies--a review. *Toxicology* 2010; 269(2-3): 92-104.
- 10- Richardson S,. Water analysis emerging contaminants and current issues. *Anal. Chem*, 2003. 75(12), 2831–2857.
- 11- Vairavapandian D, Vichchulada P, Marcus D. Preparation and modification of carbon nanotubes: Review of recent advances and applications in catalysis and sensing. *Journal Analyti Chimica Acta*. 2008; 6 2 6:119–129.
- 12- Goran D, Vukovi C, Aleksandar D, Marinkovi C. Removal of cadmium from aqueous solutions by oxidized and ethylenediamine-functionalized multi-walled carbon nanotubes. *Chemical Engineering Journal*. 2010; 157: 238–248.
- 13-Agnihotri S, Mota J.P.B, Rostam-Abadi ,M, Rood M.J. Theoretical and experimental investigation of morphology and temperature effects on adsorption of organic vapors in single-walled carbon nanotubes, *J. Phys. Chem*. 2006; 110: 7640–7647.
- 14- Gatica S.M, Bojan M.J, Stan G, Cole M.W, Quasi-one- and two-dimensional transitions of gases adsorbed on nanotube bundles, *J. Chem. Phys*. 2001;114: 3765–3769.
- 15- Agnihotri S, Mota J.P.B, Rostam-Abadi , Rood M.J. Structural characterization of single-walled carbon nanotube bundles by experiment and molecular simulation, *Langmuir* 2005; 21: 896–904.
- 16-Li Y.H, Wang S.G, Wei J.Q, Zhang X.F, Xu C.L, Luan Z.K, Wu D.H, Wei B.Q, Lead adsorption on carbon nanotubes, *Chem. Phys. Lett*. 2002; 357: 263–266.
- 17- Li Y.H, Wang S.G, Wei J.Q, Zhang X.F, Xu C.L, Luan Z.K, Wu D.H, Wei B.Q, Competitive adsorption of Pb²⁺, Cu²⁺ and Cd²⁺ ions from aqueous solutions by multiwalled carbon nanotubes, *Carbon*. 2003; 41: 2787–2792.
- 18- Chen C.L, Wang X.K. Adsorption of Ni(II) from aqueous solution using oxidized multiwall carbon nanotubes, *Ind. Eng. Chem. Res*. 2006;45: 9144–9149.
- 19- Chen C.L, Wang X.K, Nagatsu M, Europium adsorption on multiwall carbon nanotube/iron oxide magnetic composite in the presence of polyacrylic acid, *Environ. Sci. Technol*. 2009; 43: 2362–2367.

- 20- Hyung H, Kim J.H. Natural organic matter (NOM) adsorption to multi-walled carbon nanotubes: effect of NOM characteristics and water quality parameters, *Environ. Sci. Technol.* 2008;42: 4416–4421.
- 21-Burkinshaw S, Froehling P, Mignanelli M. The effect of hyperbranched polymers on the dyeing of polypropylene fibres. *Dyes Pigments* 2002; 53: 229-35.
- 22- Khatibzadeh M, Mohseni M, Moradian S. Compounding fibre grade polyethylene terephthalate with a hyperbranched additive and studying its dyeability with a disperse dye. 2010; 126: 269-274.
- 23- Arunkumar E, Forbes CC, Smith BD. Improving the properties of organic dyes by molecular encapsulation. *European journal of organic chemistry* 2005; 19: 4051-9.
- 24-Burkinshaw S, Mignanelli M, Froehling P, Bide M. The use of dendrimers to modify the dyeing behaviour of reactive dyes on cotton. *Dyes Pigments* 2000; 47: 259-67.
- 25-Mahmoodi NM, Hayati B, Arami M, Mazaheri F. Single and binary system dye removal from colored textile wastewater by a dendrimer as a polymeric nanoarchitecture: equilibrium and kinetics. *J Chem Eng Data* 2010; 55: 4660-8.
- 26- Bagher Hayati • Niyaz Mohammad Mahmoodi • Afshin Maleki Dendrimer–titania nanocomposite: synthesis and dye-removal capacity. *Research on Chemical Intermediates*. DOI 10.1007/s11164-013-1486-4
- 27-Bagher Hayati, Mokhtar Aramib, Afshin Maleki, Elmira Pajootan. Thermodynamic properties of dye removal from colored textile wastewater by poly (propylene imine)dendrimer. 2014;12: 1–10
- 28- Goran D, Vukovi C, Aleksandar D, Marinkovi C. Removal of cadmium from aqueous solutions by oxidized and ethylenediamine-functionalized multi-walled carbon nanotubes. *Chemical Engineering Journal*. 2010; 157: 238–248.
- 29- Chungsyng L, Huantsung Ch. Chemical modification of multiwalled carbon nanotubes for sorption of Zn²⁺ from aqueous solution. *Chemical Engineering Journal*. 2008; 139: 462–46.
- 30- Nuruzatulifah B, Tessonnier J, Kutty M, Abd Hamid S. B. Chemically Modified Carbon Nanotubes (CNTs) with Oxygen and Sulfur Containing Functional Groups for Adsorption of Mercury. 3rd International Conference on Chemical, Biological and Environmental Engineering. 2011; 20:66-70.
- 31- Ladan Eskandarian, Mokhtar Arami, and Elmira Pajootan. Evaluation of Adsorption Characteristics of Multiwalled Carbon Nanotubes Modified by a Poly(propylene imine) Dendrimer in Single and Multiple Dye Solutions: Isotherms, Kinetics, and Thermodynamics. *Chem. Eng. Data* 2014; 59:444–454
- 32- Hamesadeghi U, Najafi F, Daraei H, GHahremani S, Rahmani R, GHaribr F, Maleki A, Removal of AB1 by CNT-PAMAM: parameters, isotherm and kinetic, *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences*, 2014;19: 141-152
- 33- Mouchet F, Landois P, Sarremejean E, Bernard G, Puech P, Pinelli E, et al. Characterisation and in vivo ecotoxicity evaluation of double-wall carbon nanotubes in larvae of the amphibian *Xenopus laevis*. *Aquatic Toxicology*. 2008; 87: 127–137
- 34- Martinez DST, Alves OL, Barbieri E. Carbon nanotubes enhanced the lead toxicity on the freshwater fish. *Journal of Physics: Conference Series*. 2013; 429: 12-43
- 35- Smith CJ, Shaw BJ, Handy RD. Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): Respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology* 2007; 82: 94–109
- 36- Govindasamy R, Rahuman AA. Histopathological studies and oxidative stress of synthesized silver nanoparticles in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *J Environ Sci* 2014; in press
- 37- Mansouri B, Johari S. The effect of colloidal silver nanoparticles on histopathology of zebra fish (*Danio rerio*) gill. *Zanko J Med Sci*. 2014; 15 (45) :1-8

- 38- Majnoni F, Mansouri B, Rezaei MR, Hamidian AH Contaminations of metals in tissues of Common carp, *Cyprinus carpio* and Silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix* from Zarivar wetland, western Iran. Archives of Polish Fisheries. 2013; 21: 11-18.
39. Farombi, E.O.; Adelowo, O.A.; Ajimoko, Y.R. Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African cat fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. Int. J. Environ. Res. Public Health 2007; 4:158–165.
40. Flores-Lopes, F.; Thomaz, AT. Histopathologic alterations observed in fish gills as a tool in environmental monitoring. Braz. J. Biol. 2011; 71: 179–188.
41. Paulo, D.V.; Fontes, F.M.; Flores-Lopes, F. Histopathological alterations observed in the liver of *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) as a tool for the environmental quality assessment of the Cachoeira River, BA. Braz. J. Biol. 2012; 72:131–140.
- 42- Adams, S.M.; Greeley, M.S.; Ryon, M.G. Evaluating effects of contaminants in fish health at multiple levels of biological organization: Extrapolating from lower to higher levels. Hum. Ecol. Risk Assess. 2000;6: 15–27.
- 43- Winkaler EU, Silva AG, Galindo HC, Martinez CBR. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. Acta Scient Biol Sci 2001; 23: 507–514.
- 44- Fracário R, Verani NF, Espíndola ELG, Rocha O, Rigolin-Sá O, Andrade CA. Alterations on growth and gill morphology of danio rerio (pisces, ciprinidae) exposed to the toxic sediments. Brazil Arc Biol Technol 2003; 46: 685–695.
- 45- Depledge MH. Conceptual paradigms in marine ecotoxicology. In Proceedings of the 12 TH Baltic Marine Biologists Symposium; Bjornstad, E., Hagerman, L., Jensen, K., Eds.; Fredensborg, Olsen & Olsen: Helsingor, Denmark, 1992; pp. 47–52
- 46- Santos DMS, Melo MRS, Mendes DCS, Rocha IKBS, Silva JPL, Cantanhêde SM. et al. Histological Changes in Gills of Two Fish Species as Indicators of Water Quality in Jansen Lagoon (São Luís, Maranhão State, Brazil). Int J Environ Res Public Health 2014; 11: 12927-12937
- 47- Mansouri B, Johari SA. Effects of short term exposure to sublethal concentrations of silver nanoparticles on histopathology and ultrastructure of zebrafish (*Danio rerio*) gill. Iran J Toxicol 2015; In press.
- 49- Jiraungkoorskul, W., Upathama, E. S., Kruatrachuea, M., Sahaphongse, S., Vichasri-Gamsa, S., & Pokethitiyooka, P.. Histopathological effects of roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Science Asia, 2002;28: 121–127
- 50- Skidmore, J. F., & Tovell, P. W. A Toxic effect of zinc sulphate on the gill of rainbow trout. Water Research, . 1972; 6: 271–230
- 51- Koca, S., Koca, Y. B., Yildiz, S., & Gürcü, B. Genotoxic and histopathological effects of water pollution on two fish species, *Barbus capito pectoralis* and *Chonrostoma nasus* in Büyük Menderes River, Turkey. Biological Trace Element Research, . (2008);122: 276–291.
- 52- Rajkumar K. S., Kanipandian N., Thirumurugan R., Toxicity assessment on haematology, biochemical and histopathological alterations of silver nanoparticles exposed freshwater fish *Labeo rohita*. Applied Nanosciences. 2015;doi: 10.1007/s13204-015-0417-7

Original paper

Effect of carbon nanotubes-dendrimer composite on the gill histopathology of Zebrafish (*Danio rerio*)

Borhan Mansouri^{1, 2}, Namamali Azadi³, Seyed Ali Johari⁴, Raouf Rahmani¹, Unes Hame Sadeghi¹

1- Student Research Committee, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran.

E-mail: sadeghiunes@gmail.com; Mobile: 09147280306

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

3- Social Determinants of Health Research Center, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran.

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

Abstract

Background and Aim: Increasing use of nanomaterials in various sectors cause environmental concerns for humans and other organisms. Therefore, the purpose of this research was the effect of modified carbon nanotubes by dendrimer on the gill histopathology of Zebrafish (*Danio rerio*) under laboratory condition.

Material and Method: In this research, four concentration of carbon nanotubes non-lethal were used that the including 1, 10, 32, and 100 mg/l with the control group (no chemical). After 4 days exposure to carbon nanotubes, the samples of fish gill were taken. To study classical histology, after preparation of the samples with haematoxylin - eosin staining, the slides were photographed by an optical microscope.

Results: The results of this research indicated that the carbon nanotubes caused damages such as clubbing the head string, edema, hyperplasia, fusion, aneurysms, mucous, and necrosis in gills of zebra fish. Moreover, levels of tissue damages in gill on the carbon nanotubes were dose-dependent.

Conclusion: According to results of this study, the damage levels of gill histopathology exposure to carbon nanotubes – dendrimer composite was more serious in high concentrations and there was no possibility of tissue recovery. The damages of this composite on gill tissue show the toxicity of this substance on zebrafish and recommended the release of this substance into the aquatic environment to be controlled.

Keywords: Zebrafish, ecotoxicology, tissue damages, carbon nanotubes