مقاله پژوهشی

علوم و تکنولوژی محیط زیست، دوره بیست و چهارم، شماره دو، اردیبهشت ماه ۱۴۰۱(۱۳۹-۱۱۹)

بررسی اثرات بافتی تغذیه با منابع مختلف آهن و روی (نانو ذره و شکل معدنی) در ماهی کپور معمولی *(Cyprinus carpio)*

حسن صحرایی [1*]

Hasansahraei22@gmail.com

سیدعلی اکبر هدایتی [2]

ثارالله یار محمدی بربرستانی [3]

محمد فخریان [4]

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۲۷ **تاریخ پذیرش: ۹۵/۲/۱۵**

چکیده

زمینه و هدف: با گسترش نانو تکنولوژی و مهندسی مواد، نانو ذرات مختلفی با خصوصیات تازه و نو ظهور ساخته شده و علی رغم این‌که پتانسیل اثرات سمی آن‌ها در بسیاری از مواد ناشناخته است، این مواد کاربرد های روز افزون نیز یافته اند. از این‌رو در تحقیق حاضر به بررسی اثرات بافتی تغذیه با منابع مختلف آهن و روی در ماهی کپور معمولی *(Cyprinus carpio)* پرداخته شد.

روش بررسی: برای این منظور ابتدا تعداد ۴۲۰ قطعه ماهی کپور معمولی (با میانگین وزن اولیه ۴/۷±۴۵ گرم) تهیه گردید، سپس ماهیان ضدعفونی و به مدت ۱۰ روز با شرایط آزمایش‌گاهی سازش یافتند. پس از آن ماهیان به صورت تصادفی به هفت گروه تقسیم شدند، گروه اول به عنوان شاهد در نظر گرفته شد و سایر گروه ها به ترتیب مقادیر ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرو گرم از نانوذرات آهن و روی را در هر گرم غذا به مدت ۶۰ روز دریافت کردند.

یافته‌ها: مطالعات میکروسکوپی اندام‌های مورد مطالعه (کبد، کلیه) نشان داد که با افزایش میزان نانوذرات، آسیب‌های هیستوپاتولوژیک در کبد بیش‌تر می‌شود، اما سلول‌های بافتی در مقادیر متوسط و کم هر دو نانوذره و در مقدار بالای نانوذره آهن با برداشتن عامل القایی می-توانند دوباره فعالیت فیزیولوژیک خود را از سر بگیرند اما در مقدار بالا روی این ترمیم بافتی بر خلاف نانو ذرات آهن به‌صورت برگشت‌پذیر نبود.

۱- دکترای گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس،گنبد کاووس، ایران. *(مسوول مکاتبات)

۲- دانشیار گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

۳- گروه فیزیولوژی دام و طیور، دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

۴- دکترای شیلات، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، تهران

بحث و نتیجه‌گیری: از نتایج فوق چنین می‌توان استنباط کرد که افزایش مقدار نانو ذرات مورد نظر می‌تواند از عوامل موثر در افزایش آسیب های بافتی بر بافت اندام های مورد مطالعه باشد.

واژه های کلیدی: نانو تکنولوژی، کپور معمولی، آسیب‌های هیستوپاتولوژیک، نانوذره آهن و روی.

J. Env. Sci. Tech., Vol 24, No. 2, May, 2022

Histological effects of feeding with different sources of zinc and iron (nano-particles and mineral form) in common carp (*Cyprinus carpio*)

Hassan Sahraei [1*]
Hasansahraei22@gmail.com
Seyyed Aliakbar Hedayati [2]
Sarallah Yarmohammadi Barbarestani [3]
Mohammad Fakhrian[4]

Admission Date:May 4, 2016 Date Received: March 17, 2016

Abstract

Background and Objective: With the development of nanotechnology and materials science, however, these materials also have been used increasingly with the potential toxic effects of many unknown substances and many nano-particles were built with new properties and new despite. Therefore, in this study the effects of feeding with different sources of iron and zinc in the tissue of common carp (*Cyprinus carpio*) were measured.

Material and Methodology: For this purpose, 420 common carp (with an average initial weight 45±4.7 g) was prepared, the fish sterilization and adapted to the laboratory conditions for 10 days. Then fish were randomly divided into seven groups, the first group was considered as control groups respectively and other fish received values of 10, 50 and 100 micrograms of iron and zinc nano-particles per gram of food for 60 days.

Findings: Microscopic studies of organs (liver, kidney) study showed that increasing the concentration of nano-materials could have more evenly histopathological lesions in the liver tissue and cells. In the medium and low concentrations of both nano-particle and in high doses of iron nano-particles, by removing the inducer tissues could again resume their physiological activity, but in high doses, unlike the iron nano-particles, the repair tissue was not resumable.

Discussion and Conclusion: From the above results it can be concluded that increasing the concentration of the nano-particles could increase tissue damage and can be considerable factors.

Key words: Nanotechnology, Common Carp, Histopathological Damages, Iron Nano-Particles.

1- Ph.D., Dept. of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran. *(*Corresponding Author*)
2- Associate Prof., Dept. of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
3- Department of Animal and Poultry Physiology, Faculty of Animal Science, Gorgan University of Agricultural.
4- Ph.D., of Fisheries, Faculty of Natural Resources and Environment, Science and Reasearch Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

مقدمه

نانو ذرات به ذراتی اطلاق می شود که اندازه آن ها در محدوده ۱ تا ۱۰۰ نانو متر قرار دارد (۱). به همان اندازه که ترکیب شیمیایی یک ماده در تعیین سمیت آن حایز اهمیت است، اندازه کوچک نیز می تواند معیار مهمی برای بروز اثرات سمی باشد. تفاوت رفتار زیستی و خصوصیات حرکتی ذرات بسیار ریز نسبت به ذرات بزرگ‌تر باعث می شود این ذرات بسیار ریز از سدهای زیستی عبور کرده و وارد سلول شوند (۲). نفوذ این ذرات در موجودات زنده موجب ورود آن‌ها به زنجیره غذایی نیز می شود (۳,۴). از این‌رو در حال حاضر نگرانی هایی در مورد خطرات احتمالی نانو ذرات و نانو لوله ها برای سلامت انسان و محیط زیست در جهان به وجود آمده است (۵). علاوه بر تولید طبیعی نانو ذرات در محیط زیست، با افزایش کاربرد های فناوری نانو در سطح جهان، انتظار می رود نانو ذرات انسان ساز به اجزای محیط زیست یعنی آب، هوا و خاک در آینده افزایش می‌یابد (۳). با این حال تاکنون بیش‌تر پژوهش‌هایی که بر روی جنبه های بهداشتی و ایمنی این ذرات صورت گرفته قطعی نیست و نیاز به مطالعات بیشتر در این زمینه احساس می شود (۶). با افزایش کاربرد و استفاده از نانو ذرات مصنوعی، ورود این قبیل ذرات به اجزای محیط زیست یعنی آب، خاک و هوا در آینده افزایش خواهد یافت.

نانو ذرات اکسید آهن برای برنامه های کاربردی مهمی از جمله پزشکی، محیط زیست و کاربردهای مختلف صنعتی استفاده می شود(۷). نانو ساختارهای اکسید آهن با توجه به تحقیقات گسترده در زمینه کاربردهای وسیع نظیر درمان تومورها (MRI) (Magnetic resonance image) گزارش‌های کمی در زمینه سمیت یا اثرات جانبی آن‌ها بر سلول و جانداران خصوصا در شرایط Invivo ارایه شده است. از طرفی تحقیقات محدود انجام شده در این زمینه، نتایج نسبتا متضادی را به همراه داشته است. مثلا برخی غیر سمی بودن نانو ذرات اکسید آهن در شرایط و برخی سمیت ناچیز و یا ایجاد پاسخ های شدید التهابی و مرگ سلول را گزارش کرده اند(۸).

عنصر روی (Zn) یکی از مواد معدنی است که در بسیاری از اعمال حیاتی بدن از قبیل رشد، ساخت DNA، ساختمان هورمون‌ها و آنزیم‌ها نقش دارد و به همین دلیل وجود این ماده در جیره حیوانات ضروری است(۹). این عنصر یکی از محدود کننده‌ترین عناصر در تغذیه حیوانات محلی است و از آن‌جا که بدن نمی‌تواند مقدار زیادی از این عنصر را در خود ذخیره کند، لذا باید به صورت روزانه در جیره دام‌ها فراهم شود(۱۰و۱۱). هر گونه افزایش یا کمبود این عنصر سبب اثرات سوء و کاهش عمل‌کرد حیوانات می شود(۱۲). به طور معمول نمک‌های معدنی روی مانند اکسید و سولفات روی به عنوان منابع اصلی در صنعت خوراک دام و طیور استفاده گسترده‌ای دارند(۱۳). اخیرا نانو اکسید روی با استفاده از روش های بسیار متنوعی تولید می‌شود. شناخته‌ترین این روش‌ها شامل میکرو امولیسیون، سنتز کلوییدی، رسوب‌دهی، روش‌های سل ژل و سنتز حرارتی با اسپری است(۱۴). به خاطر خصوصیات منحصر به فرد نانو اکسید روی، از این ماده در صنایع مختلف اعم از غذایی، دارویی، لاستیک سازی، الکترونیکی و حتی به عنوان افزودنی خوراکی استفاده می شود(۱۵). کاهش اندازه ذرات در مقیاس نانو و افزایش نسبت سطح به حجم در ترکیبات نانو سبب شده است تا تماس این ترکیبات با سایر بیومولکول‌ها افزایش یافته و فعل و انفعالات شیمیایی این مواد با مولکول های آلی و غیر آلی در بدن بطور متفاوتی صورت گیرد که در بسیاری از مواد هنوز ناشناخته است(۱۶). در رابطه با اثر نانو اکسید روی بر سیستم های بیولوژیکی و به خصوص باکتری ها تحقیقات زیادی صورت گرفته است. این تحقیقات اثر ضد میکروبی این ماده را بر روی باکتری سودوموناس آیروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیس تایید کرده است(۱۷). در رابطه با اثر نانو اکسید روی بر عمل‌کرد دام و طیور و همچنین آبزیان تحقیقات بسیار اندکی صورت گرفته است.

با توجه به توسعه استفاده از این ترکیبات نانو در صنایع مختلف و از آن‌جا که اثر این گونه مواد در بسیاری از ابعاد بر بدن آب-زیان ناشناخته است، لذا ضروریست که در کنار توسعه این فن-آوری و به کارگیری آن در صنایع مختلف، از این ترکیبات به عنوان مکمل خوراکی در جیره آب‌زیان استفاده شده و اثرات

احتمالی آن‌ها بر این حیوانات نیز بررسی شود. لذا در این آزمایش به منظور بررسی اثرات بافتی تغذیه با منابع مختلف آهن و روی (نانو ذره و شکل معدنی) در ماهی کپور معمولی *(Cyprinus carpio)* که یکی از گونه های مهم پرورشی کشور میباشد پرداختیم.

مواد و روش ها

برای این منظور تعداد ۴۲۰ قطعه ماهی کپور معمولی با میانگین وزنی ۴/۷± ۴۵ گرم از یکی از مزارع پرورش استان گلستان تهیه شد. سپس ماهیان به کمک تانکر مجهز به کپسول اکسیژن به سالن تکثیر و پرورش آب‌زیان شهید ناصر فضل آبادی دانش‌گاه گرگان منتقل شدند. بلافاصله پس از انتقال ماهیان با آب نمک (۳ گرم در لیتر) ضدعفونی شده و به مدت یک هفته جهت سازگاری با شرایط آزمایش‌گاهی و هر گونه آلودگی انگلی خارجی، در حوضچه‌های ۱۰۰۰ لیتری مستطیل شکل و سفید پلی ونیل کلراید (PVC) نگهداری شدند. در ضمن برای تغذیه ماهیان در دوره سازش فقط از غذای تجاری پلت (فرادانه، ایران) استفاده شد.

پس از اتمام دوره سازش، ماهیان به صورت تصادفی به هفت گروه تقسیم شدند و هر گروه دارای سه تکرار بوده و پرورش در ونیروهای۵۰۰ لیتری که تا دو سوم حجم آن‌ها آب‌گیری شدند، با تراکم ۲۰ قطعه در هرونیرو صورت گرفت. گروه اول به عنوان شاهد در نظر گرفته شد و با غذای تجاری بدون افزودن هر گونه نانوذره تغذیه شدند. سایر گروه‌ها به ترتیب با غذای تجاری حاوی غلظت‌های مختلف نانوذرات مورد تغذیه قرار گرفتند. در بررسی حاضر، نانوذرات مورد استفاده توسط آزمایش‌گاه تغذیه دانش‌کده علوم دامی دانش‌گاه علوم کشاورزی گرگان تهیه و در غلظت‌های مختلف بر حسب میکروگرم در هر گرم غذا مورد استفاده قرار گرفتند. طول دوره آزمایش ۶۰ روز بود و سپس ۱۵ روز دیگر مطالعه ادامه یافت و در این مدت، ماهیان فقط با غذای گروه شاهد بدون افزودن نانوذرات تغذیه شدند.

در طول دوره مطالعه برای بررسی پارامترهای فیزیکوشیمیایی دما، pH، میزان اکسیژن محلول توسط دماسنج و pH متر (HANNA instrument, USA) و اکسیژن متر دیجیتالی (HANNA instrument, USA) اندازه گیری و ثبت شد.

تهیه غذا و نحوه غذادهی ماهیان

جهت افزودن نانوذرات به غذای تجاری، ابتدا مقدار غذای روزانه هر گروه محاسبه و سپس مقدار مورد نیاز از نانوذره توسط ترازوی دیجیتالی وزن و در آب دیونیزه سوسپانسیون شده و برای اطمینان از اتصال نانوذره به غذا میزان ۰/۵ درصد ژلاتین به تمام قسمت‌های غذا اضافه شده و به مدت ۲ ساعت در داخل انکوباتور خشک گردید (تصویر۱-۱).

شکل ۱- مراحل افزودن نانوذرات به غذا

Figure 1. Add Nanoparticles in Food Ration

در طول مطالعه جهت تغذیه ماهیان از غذاهای تجاری بیومار(فرادانه، ایران) استفاده گردید (جدول۱-۱). گروه اول به عنوان شاهد انتخاب و در طول مطالعه با غذای تجاری بیومار و بدون افزودن هیچ نانوذره‌ای تغذیه شدند و برای یکسان کردن شرایط همه تیمارها، به آن‌ها ژلاتین اضافه گردید. ماهیان گروه ۲ تا ۴ به ترتیب مقادیر ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در یک گرم غذا نانوذره آهن و ماهیان گروه ۵ تا ۷ به ترتیب مقادیر ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در یک گرم غذا نانوذره روی را به مدت ۶۰

روز از طریق جیره غذایی دریافت کردند. از آن‌جایی که جهت تعیین غلظت نانوذرات مورد استفاده در این مطالعه منبع معتبری یافت نشد، برای تعیین مقادیری از نانوذرات که فاقد تاثیرات سوء بر ماهی کپور معمولی باشند، یک کار آزمایشی ۸ روزه انجام گردید. در این آزمایش نانوذرات روی در غلظت‌های صفر (گروه شاهد)، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و۶۰ میکروگرم در هر گرم غذا و نانوذرات اکسید آهن در غلظت‌های صفر(گروه شاهد)، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میکروگرم در هر گرم غذا به مدت ۹۶ ساعت به صورت خوراکی به ماهیان داده شدند. نانو ذره روی در مقادیر بررسی شده فاقد هرگونه اثرات جانبی بود، .مطالعات بافتی مربوط به مصرف نانوذره آهن نشان دادکه میزان تجمع آهن در بافت‌های کبد و کلیه ماهی ارتباط مستقیمی با غلظت نانوذرات مصرفی در غذا داشت. هیچ کدام از این نانوذرات در غلظت‌های مصرفی برای ماهیان کشنده نبودند. میزان غذادهی بر اساس جداول (۱-۱) بر حسب درصد وزن بدن ماهیان و درجه حرارت آب پرورشی در سه نوبت صبح، ظهر و شب (بین ۸ صبح تا ۸ شب) انجام می‌گرفت.

جدول ۱- آنالیز شیمیایی (درصد) غذای تجاری مورد استفاده در این مطالعه

Table 1. Chemical analysis (percentage) commercial diet used in the study

نوع ترکیب	درصد٪
پروتیین خام	۵۸
چربی خام	۱۵
فیبر خام	۰/۵
رطوبت	۱۱/۵
خاکستر	۱/۶
نیتروژن	۹/۲
فسفر	۴/۲

نمونه‌برداری بافتی

در مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثرات بافتی منابع مختلف آهن و روی نمونه‌برداری در روزهای صفر، ۳۰، ۶۰ و ۷۵ انجام شد. برای این منظور در هر نوبت خون‌گیری از هر تیمار ۶ قطعه ماهی انتخاب و پس از بیهوشی و خون‌گیری ماهیان از سطح شکمی تشریح شدند و بافت‌های کبد و کلیه برداشته شد و بلافاصله در محلول فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفتند. بعد از کامل شدن تثبیت، بافت‌ها از محلول فرمالین خارج و پس از رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین و ائوزین و تهیه لام از بافتT اندام های مورد نظر با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA؛ نرم افزار SPSS نسخه ۱۷) و آزمون توکی (آزمون اختلاف حقیقی که به طور مخفف HSD نامیده می-شود) استفاده گردید. قبل از انجام آزمون آنالیز واریانس، نرمال بودن داده‌های به‌دست آمده با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. برای آنالیز واریانس داده‌های نرمال از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه و برای داده‌های غیرنرمال از آزمون کروسکال- والیس استفاده گردید. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌دار آزمون‌ها $p<۰/۰۵$در نظر گرفته شد، هم‌چنین ترسیم نمودارها در فضای نرم‌افزار Excel (نسخه ۲۰۰۷) انجام گرفت.

نتایج

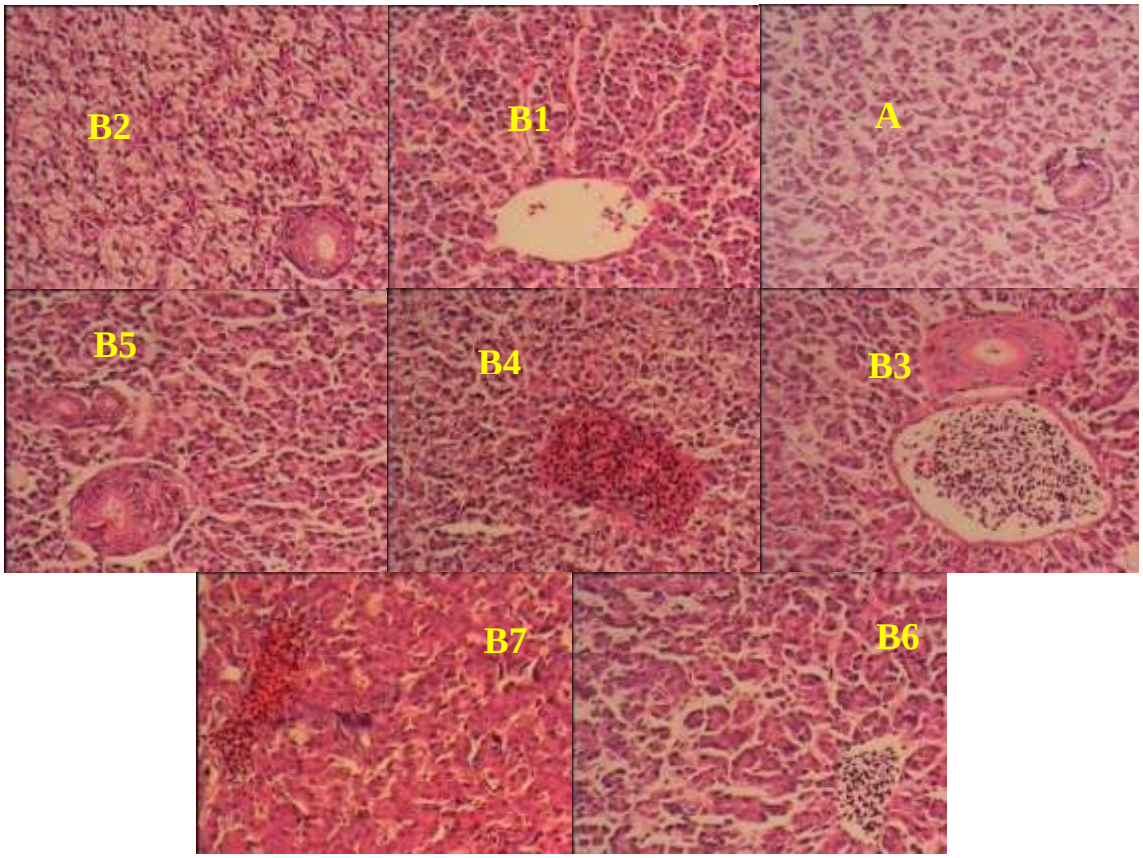
در پژوهش حاضر تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذره آهن و روی بر مورفولوژی و بافت‌شناسی کبد و کلیه ماهی کپور معمولی مطالعه شد که نتایج به‌دست آمده شامل موارد زیر می‌باشد. جهت سهولت در نام‌گذاری تیمارهای مختلف از حروف لاتین استفاده شد.

جدول۱- نام‌گذاری تصاویر بافتی

Table 1. Naming Pictures tissues

	روز صفر	روز۳۰	روز۶۰	روز۷۵
شاهد	A	B1	C1	D1
تیمار۲	A	B2	C2	D2
تیمار۳	A	B3	C3	D3
تیمار۴	A	B4	C4	D4
تیمار۵	A	B5	C5	D5
تیمار۶	A	B6	C6	D6
تیمار۷	A	B7	C7	D7

نتایج مربوط به بافت کبد

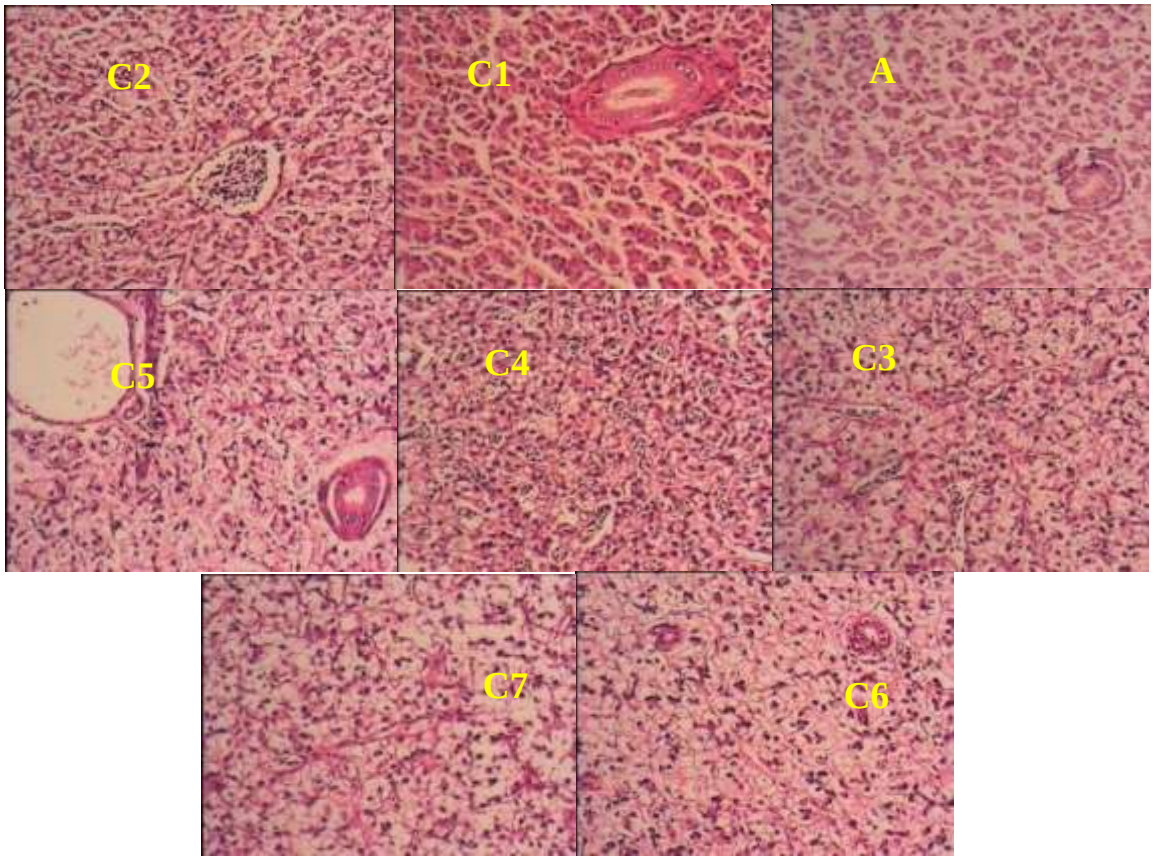


شکل ۲- مقطع عرضی از بافت کبد ماهی کپور معمولی در روز صفر و روز ۳۰، تیمار با نانوذرات آهن و روی، بزرگ‌نمایی ۱۰×، رنگ آمیزی H&E

Figure 2. The cross-section of liver tissue of common carp on day zero and day 30, treatment with iron and zinc nanoparticles, magnification 10 ×, stained H & E

مطالعات میکروسکوپی بافت کبد در تیمارهای روزصفر و ۳۰ نشان داد:

در کبد نمونه‌های روز صفر دستجات سلولی کوچک و سینوزوییدها بزرگ بودند اما در کبد نمونه‌های روز ۳۰ دستجات سلولی بزرگتر شده و سازمان یافتند. در نمونه‌های B1 ساختار کبد کاملاً طبیعی است. در نمونه‌های B2 در هپاتوسیت‌های اطراف فضای پورت و ناحیه بینابینی لیپیدوز کبدی مشاهده گردید. در نمونه‌های B3 دستجات سلولی مرتب بودند، در تعدادی از هپاتوسیت‌ها لیپیدوز کبدی دیده شد، در فضای پورت اتصاع عروقی و در کبد پرخونی مشاهده گردید. در نمونه‌های B4 در تعدادی از هپاتوسیت‌ها لیپیدوز کبدی دیده شد. پرخونی در کبد افزایش یافته و سینوزوییدها متسع شدند. در نمونه‌های B5 و B6 ساختار کبد کاملاً طبیعی است. در نمونه‌های B7 هایپرتروفی سلول‌های کبدی مشاهده شد. هم‌چنین تعدادی از کوپفرسل‌ها بزرگ شدند. مطالعه میکروسکوپی اندام‌های مورد مطالعه و مقایسه گروه‌های تحت تیمار با نانو-ذرات با گروه شاهد نشان داد که با افزایش مقدار نانوذره در غذای ماهیان آسیب‌های بافتی اندکی در بافت کبد مشاهده شد.

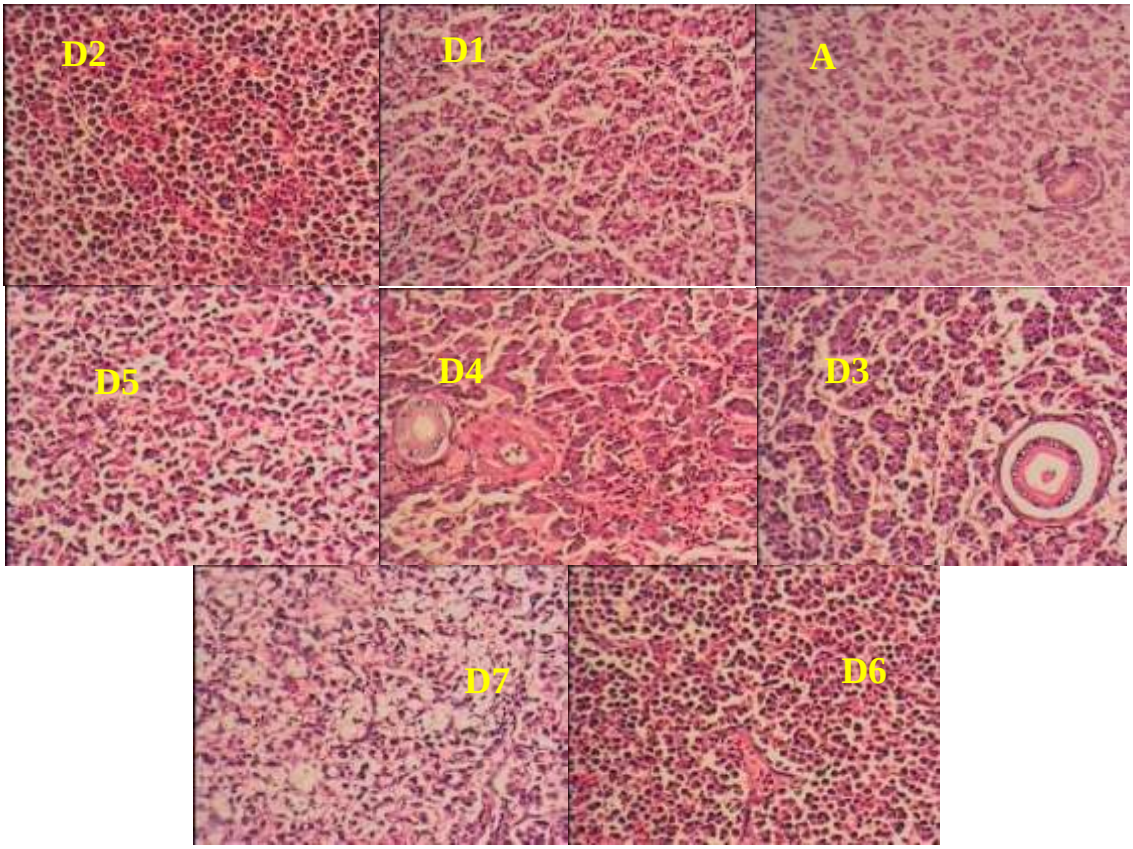


شکل ۳- مقطع عرضی از بافت کبد ماهی کپور معمولی در روز ۶۰، تیمار با نانوذرات آهن و روی، بزرگ‌نمایی ۱۰×، رنگ آمیزی H&E

Figure 3. The cross-section of liver tissue of common carp on day 60, treatment with iron and zinc nanoparticles, magnification 10 ×, stained H & E

مطالعات میکروسکوپی بافت کبد در تیمارهای روز ۶۰ نشان داد:

در نمونه های C1 ساختار کبد طبیعی است. در نمونه‌های C2 سینوزوییدها خالی از خون و هپاتوسیت‌ها واکوئل‌دار شدند و ساختار کبد اندکی به‌هم ریخت. در نمونه‌های C3 سینوزوییدها خالی از خون و هپاتوسیت‌ها واکوئل‌دار شدند و به هم ریختگی ساختار کبد بیش‌تر شده است. در نمونه‌های C4 باز هم واکوئل‌دار شدن هپاتوسیت‌ها را مشاهده کردیم. در این مقطع هم‌چنین محبوس شدن سلول‌های خونی در فضای سینوزوییدها مشاهده شد. در نمونه‌های C5، C6 و C7 نیز واکوئل‌دار شدن هپاتوسیت‌ها مشاهده شد با این تفاوت که واکوئل‌دار شدن سلول‌ها با افزایش مقدار نانو ذره افزایش یافت و تقریباً در این سه تیمار ساختار کبدی به هم ریخته بود. مطالعه میکروسکوپی اندام‌های مورد مطالعه و مقایسه گروه‌های تحت تیمار با نانوذرات با گروه شاهد نشان داد که نانوذرات باعث آسیب‌های بافتی به کبد می‌شوند که این آسیب‌ها با افزایش مقدار ارتباط مستقیمی دارد.



تصویر ۴- مقطع عرضی از بافت کبد ماهی کپور معمولی در روز ۷۵ (۱۴ روز پس از قطع تیمار با نانوذرات آهن و روی)، بزرگنمایی ۱۰×، رنگ آمیزی H&E

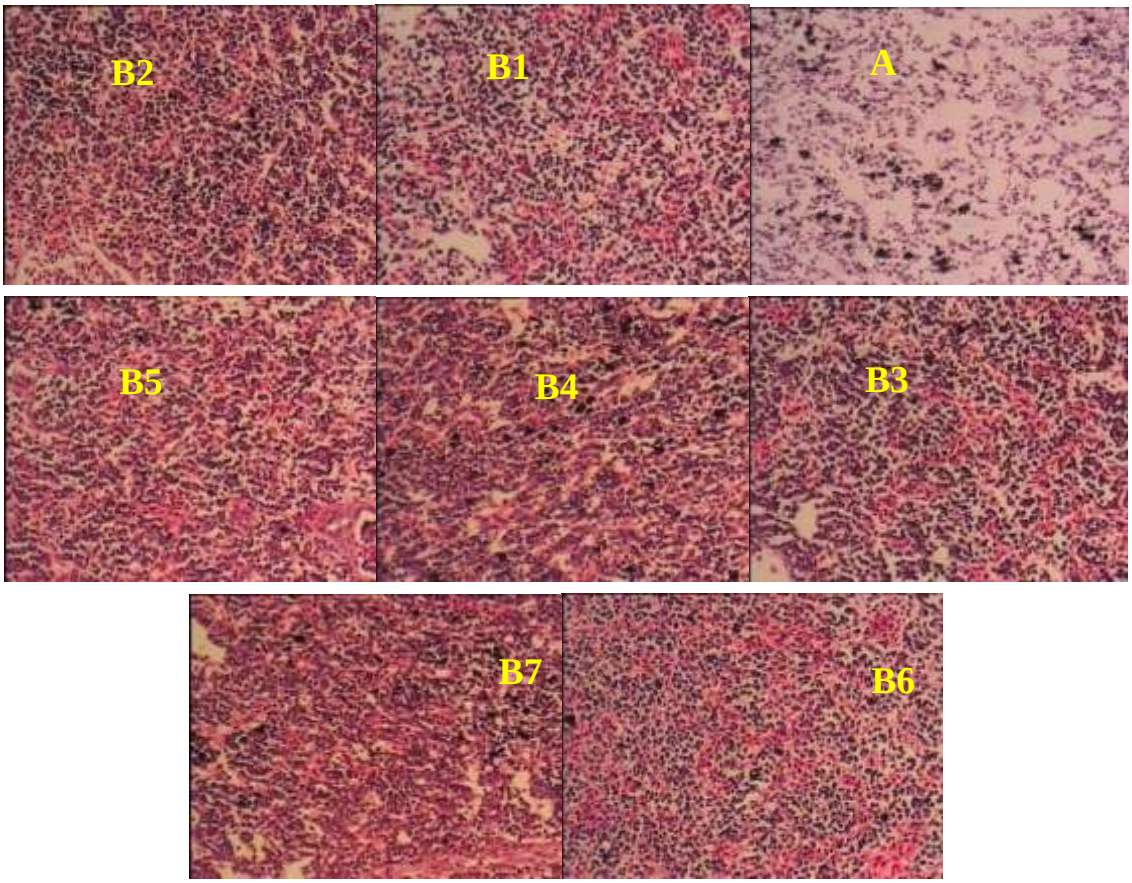
Figure 4. The cross-section of liver tissue of common carp in day 75 (14 days after discontinuation of treatment with nanoparticles of iron and zinc), magnification 10 ×, stained H & E

مطالعات میکروسکوپی بافت کبد در تیمارهای روز ۷۵ نشان داد:

۱۴ روز پس از قطع تغذیه ماهیان توسط نانوذرات در نمونه‌های D1، D2، D3، D4، D5 و D6 ترمیم بافت کبد به طور قابل ملاحظه‌ای مشاهده شد اما آسیب بافتی نمونه‌های D7 ترمیم نشد. مطالعه میکروسکوپی اندام‌های مورد مطالعه و مقایسه گروه‌های که قبلاً توسط نانوذرات تغذیه شده بودند با گروه شاهد و گروه‌های روز ۶۰ نشان داد که با قطع نانوذرات آسیب-های ایجاد شده در کبد به غیر از تیمار D7 در تمام غلظت‌های نانوذرات قابل ترمیم بود.

مطالعات میکروسکوپی اندام‌های مورد مطالعه نشان داد که با افزایش دوز نانوذرات، آسیب‌های هیستوپاتولوژیک در کبد بیش‌تر می‌شود اما سلول‌های بافتی در دوزهای متوسط و کم هر دو نانوذره و در دوز بالای نانوذره آهن با برداشتن عامل القایی می‌توانند دوباره فعالیت فیزیولوژیک خود را از سر بگیرند اما در دوز بالای روی این ترمیم بافتی برگشت‌پذیر نبود.

نتایج مربوط به بافت کلیه قدامی



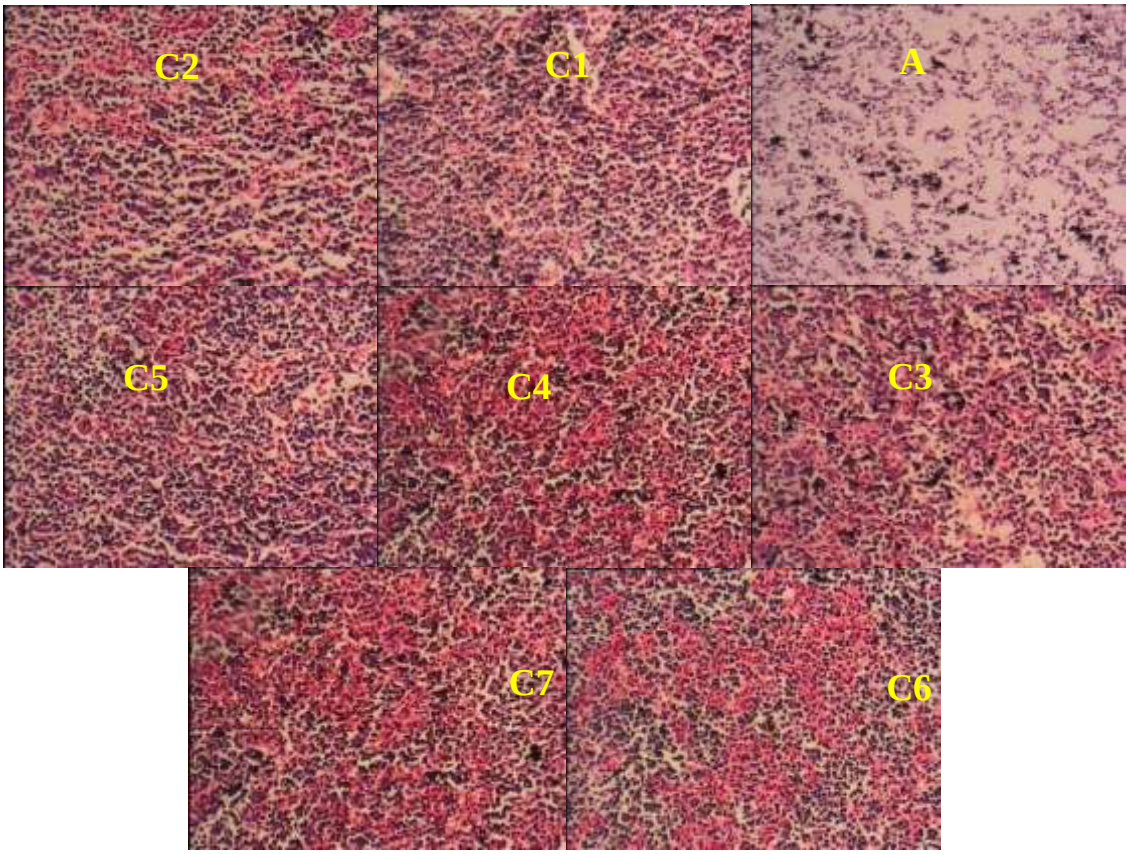
شکل ۵- مقطع عرضی از بافت کلیه قدامی ماهی کپور معمولی در روز صفر و روز ۳۰ تیمار با نانوذرات آهن و روی، بزرگ-نمایی ۱۰×، رنگ آمیزی H&E

Figure 5. The cross-section of the anterior kidney tissue of common carp on day zero and day 30 of treatment with iron and zinc nanoparticles, magnification 10 ×, stained H & E

مطالعات میکروسکوپی بافت کلیه قدامی در تیمارهای روزصفر و ۳۰ نشان داد در نمونه‌های روز صفر جزایر خون‌ساز کم، ملانوماکروفاژها بزرگ ولی به تعداد اندک و پراکنده در بافت کلیه مشاهده شدند اما در نمونه‌های روز ۳۰ بافت کلیه سازمان یافته‌تر و منسجم‌تر از روز صفر بود.

در مقایسه کلیه گروه‌های تغذیه شده با نانوذرات با گروه کنترل، نتایج زیر حاصل شد:

در ساختار سلول‌های کلیوی تغییری مشاهده نشد، تعداد ملانوماکروفاژها در تمام گروه‌ها تقریباً برابر بود وتنها تفاوت مشاهده شده در این گروه‌ها با گروه کنترل تعداد جزایر خون-ساز بود که در گروه‌های تغذیه شده با نانوذرات نسبت به گروه شاهد افزایش یافته بود.

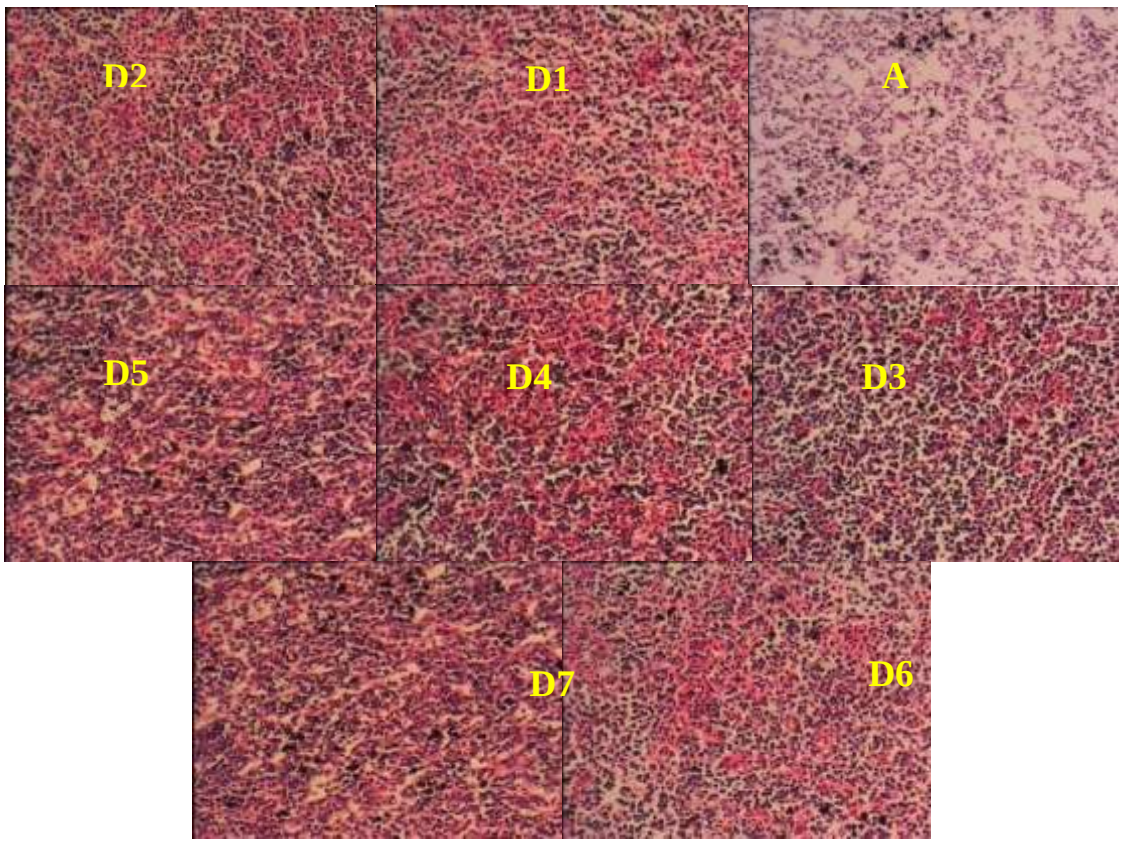


شکل ۶- مقطع عرضی از بافت کلیه قدامی ماهی کپور معمولی در روز ۶۰ تیمار با نانوذرات آهن و روی، بزرگ‌نمایی ۱۰×، رنگ آمیزی H&E

Figure 6. The cross-section of the anterior kidney tissue of common carp on day 60 of treatment with iron and zinc nanoparticles, magnification 10 ×, stained H & E

مطالعات میکروسکوپی بافت کلیه قدامی در تیمارهای روز ۶۰ نشان داد:

در بافت نمونه‌های تغذیه شده با نانوذرات نسبت به بافت گروه شاهد، تعداد ملانوماکروفاژها و سلول‌های خون‌ساز افزایش یافت. تنها تفاوت موجود این بود که تعداد وپراکندگی ملانوماکروفاژها و نیز تعداد جزایر خون‌ساز در گروه‌های تحت تیمار با غلظت بالای نانوذرات بیش‌تر از سایر گروه‌ها بود.



شکل ۷- مقطع عرضی از بافت کلیه قدامی کپور معمولی در روز ۷۵(۱۴ روز پس از قطعتیمار با نانوذرات آهن و روی)، بزرگ-نمایی ۱۰×، رنگ آمیزی H&E

Figure 7. Transverse section of normal carp anterior kidney tissue on day 75 (14 days after treatment with iron and zinc nanoparticles), 10% magnification, H&E staining

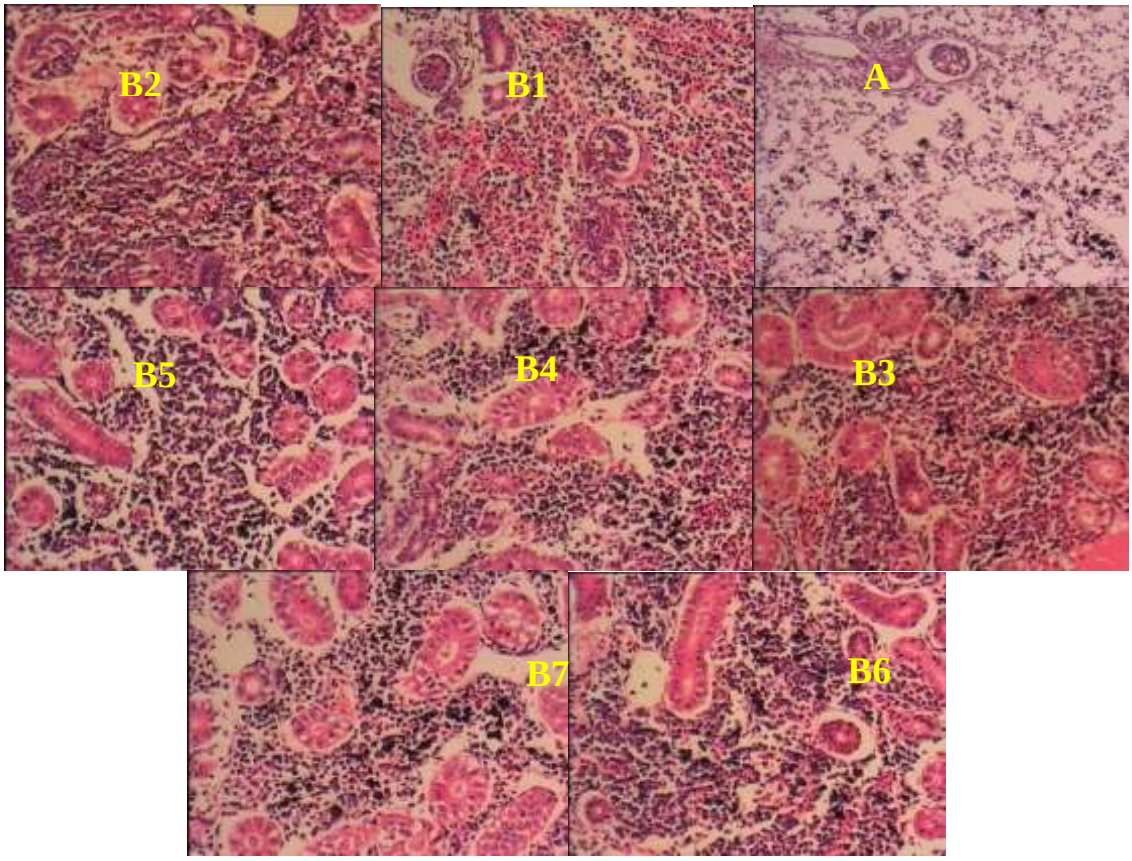
مطالعات میکروسکوپی بافت کلیه قدامی در تیمارهای روز ۷۵ نشان داد:

۱۴ روز پس از قطع تغذیه ماهیان توسط نانوذرات در مطالعه میکروسکوپی نمونه‌های روز ۷۵، تغییر قابل ملاحظه‌ای در بافت کلیه مشاهده نشد.

نتیجه گیری کلی

مطالعه میکروسکوپی اندام های مورد مطالعه و مقایسه گروه-هایی که قبلاً توسط نانوذرات تغذیه شده بودند با گروه شاهد و گروه های روز ۶۰ نشان داد که در کل دوره تیمار هیچ اختلال قابل ملاحظه‌ای در بافت کلیه قدامی مشاهده نشد، اما با افزایش مقدار نانوذرات بر تعداد جزایر خون‌ساز و تعداد ملانوماکروفاژهای بافت کلیه افزوده شد.

نتایج مربوط به کلیه میانی



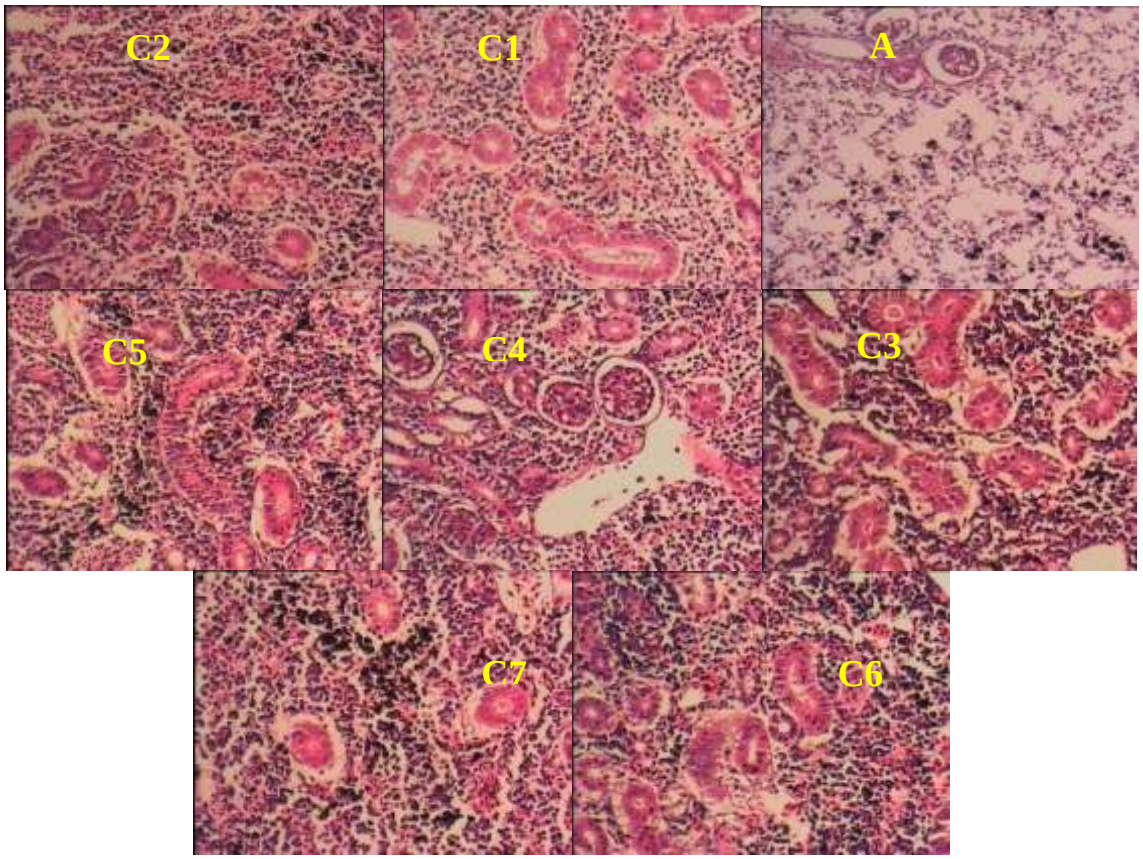
شکل ۸- مقطع عرضی از بافت کلیه میانی ماهی کپور معمولی در روز صفر و روز ۳۰ تیمار با نانوذرات آهن و روی، بزرگ-نمایی ۱۰×، رنگ آمیزی H&E

Figure 8. Transverse section of normal kidney carp tissue on day 0 and day 30, treatment with iron and zinc nanoparticles, 10% magnification, H&E staining

مطالعات میکروسکوپی بافت کلیه میانی در تیمارهای روز صفر و ۳۰ نشان داد:

بافت کلیه میانی در ماهیان روز ۳۰ سازمان یافته‌تر و منسجم-تر از بافت کلیه میانی در ماهیان روز صفر می‌باشد.

در ماهیان روز ۳۰ در گروه‌های تغذیه شده با نانوذرات، تعداد ملانوماکروفاژها و سلول‌های خونی افزوده شده که این افزایش با افزایش مقدار نانوذرات ارتباط مستقیمی داشت.

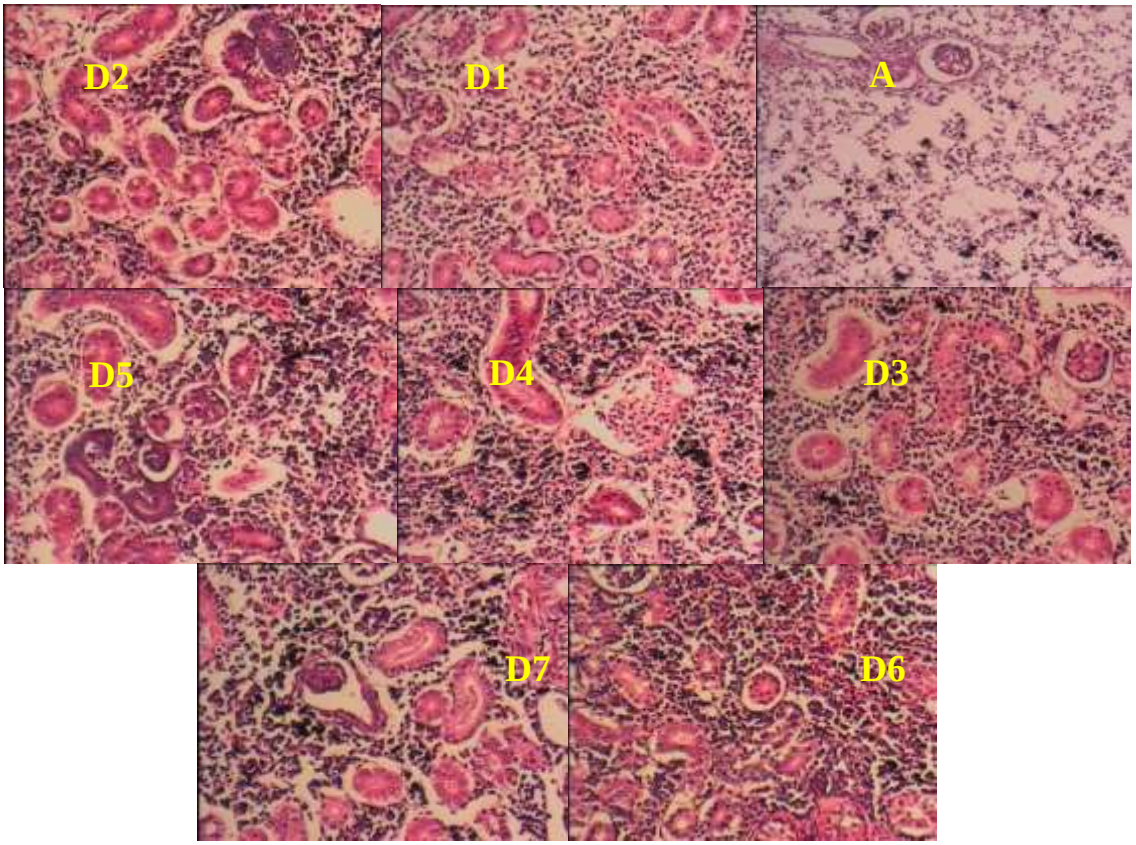


شکل ۹- مقطع عرضی از بافت کلیه میانی ماهی کپور معمولی در روز ۶۰ تیمار با نانوذرات آهن و روی، بزرگ‌نمایی ۱۰×، رنگ آمیزی H&E

Figure 9. Transverse section of normal kidney carp tissue on day 60 treatment with iron and zinc nanoparticles, 10% magnification, H&E staining

مطالعات میکروسکوپی بافت کلیه میانی در تیمارهای روز ۶۰ نشان داد:

تغییرات بافتی در نمونه‌های روز ۶۰ مشابه تغییرات ایجاد شده در نمونه‌های روز ۳۰ بود. تعداد ملانوماکروفاژها و سلول‌های خونی در کلیه میانی با افزایش مقدار نانوذرات افزایش یافت.



شکل ۱۰- مقطع عرضی از بافت کلیه میانی ماهی کپور معمولی در روز ۷۵ (۱۴ روز پس از قطع تیمار با نانوذرات آهن و روی)، بزرگ‌نمایی ۱۰×، رنگ آمیزی H&E

Figure 10. Transverse cross section of normal carp kidney tissue on day 75 (14 days after cessation of treatment with iron and zinc nanoparticles), 10% magnification, H&E staining

مطالعات میکروسکوپی بافت کلیه میانی در تیمارهای روز ۷۵ نشان داد:

۱۴ روز پس از قطع نانوذرات تغییرات ایجاد شده در کلیه میانی باقی ماند.

نتیجه‌گیری کلی

مطالعه میکروسکوپی اندام‌های مورد مطالعه و مقایسه گروه‌هایی که قبلاً توسط نانوذرات تغذیه شده بودند با گروه شاهد و گروه-های روز ۶۰ نشان داد که با مصرف نانوذرات و گذشت زمان تعداد ملانوماکروفاژها در کبد افزایش یافته است.

بحث و نتیجه گیری

تغییرات بافت‌شناسی در اثر محرک‌های داخلی و خارجی ایجاد می‌شود که در هر صورت در نتیجه آشفتگی در سطح مولکولی سازمان‌دهی زیستی رخ می‌دهد. بنابراین بررسی بافت‌شناسی یک شاخص جامع بوده که می‌تواند به صورت دقیق وضعیت سلامت ماهی و تجمع مواد آلاینده را بیش از حد نرمال در محیط زیست دریایی مشخص نماید (۱۸). فلزات روی و مس بر اساس مقدارشان در فرآیندهای زیستی ایفای نقش می‌کنند (محرک یا بازدارنده) (۱۹) هم‌چنین زمانی که مقادیر فلزات ضروری افزایش یابد می‌توانند اثرات سمی داشته باشند (۲۰). این فلزات از جمله عناصر ضروری واکنش‌های بیولوژیک می-باشند و به صورت هوموستاتیک تنظیم می‌شوند. غلظت‌های این عناصر در بافت‌های یکسان از گونه‌های متفاوت می‌تواند تغییرات زیادی داشته باشد (۲۱). Wekell و همکاران (۱۹۸۳) اظهار داشتند که میزان روی تا چند صد میلی گرم در هر کیلو غذا اثرات سویی را در ماهی قزل آلای رنگین کمان به دنبال ندارد (۲۲). Satoh و همکاران (۱۹۸۷) بیان کردند که افزودن ۴۰ میلی گرم روی در غذا به همراه پودر ماهی در جیره

باعث بهبود عمل‌کرد رشد ماهیان قزل آلا و کپور می‌شود (۲۳). Kiron و همکاران (۱۹۹۳) اظهار داشتند که کمبود روی باعث آسیب به عملکرد سیستم ایمنی در ماهی قزل آلای رنگین کمان می‌شود (۲۴). روی یک عنصر آنتی اکسیدانی است و نقش مهم و محافظت کننده‌ای در برابر رادیکال‌های آزاد دارد (۲۵). براساس یافته‌های Agah و همکاران (۲۰۰۹) در پنج گونه از ماهیان خلیج فارس مشخص شد که تجمع زیستی فلزات در کبد بیش‌تر از عضله می‌باشد(۲۶). عسکری ساری و ولایت زاده (۱۳۹۰) به بررسی غلظت سرب و روی در بافت‌های کبد و عضله دو گونه ماهی پرورشی کپور معمولی و قزل آلای رنگین کمان پرداختند. در این تحقیق مشاهده گردید که میزان روی در کبد بیش‌تر از عضله است(۲۷). نانوذره اکسید روی به طور عمده در استخوان و پوست تجمع می‌یابد، گرچه کبد، آبشش و کلیه نیز میزان قابل توجهی از این عنصر را جمع می کنند (۲۸).

اطلاعات نسبتاً کمی در مورد جذب و متابولیسم آهن در ماهی و سایر موجودات آب‌زی وجود دارد، به نظر می‌رسد که مکانیسم جذب آهن از لوله گوارش و ذخیره و ترشح آن مشابه سایر مهره‌داران باشد. اگر چه قسمت اعظم جذب آهن در موکوس روده صورت می‌پذیرد، بخشی نیز از طریق غشای آبشش‌ها جذب می‌شود، اما غذا منبع اصلی تأمین آهن برای متابولیسم است.در ماهی قزل آلای رنگین کمان، آهن از حفره صفاقی جذب شده و در غلظت‌های بالاتر در کبد، طحال و قسمت قدامی کلیه ذخیره می‌شود(۲۹). نتایج حاصل از این تحقیق نیز حاکی از تغییرات قابل ملاحظه در کبد و تغییرات اندکی در قسمت قدامی کلیه بود. این تغییرات کبدی شامل تخریب هپاتوسیت‌های کبد بود که با افزایش مقدار نانوذرات این آسیب بافتی افزایش یافت. تغییراتی که با افزایش مقدار نانوذرات در قسمت قدامی کلیه مشاهده شد شامل افزایش سلول‌های خونی بود.

کبد ماهی در سیستم دفاعی نقش کمی دارد، ولی به هر حال کبد وظیفه پاک‌سازی را در سیستم رتیکولوآندوتلیال ماهی به عهده دارد. در مطالعه‌ای مشخص شد که بعد از تزریق گلیکوپروتیین‌های حاوی قندهای گالاکتوز و مانوز به قزل آلای رنگین کمان، این مواد به روش آندوسیتوز و به وسیله سلول‌های کبدی برداشت و تجزیه شدند(۳۰). از آن‌جا که کبد ارگانی است که متابولیسم اولیه مواد غیر زیستی را انجام می‌دهد، با تغییر در ساختار مورفولوژیک این مواد در برخی موارد سم زدایی می‌نماید (۳۱). تأثیر آلایندگی فلزات به صورت افزایش یا کاهش فعالیت آنزیم‌های کبدی و ایجاد تغییرات هیستو-پاتولوژیک کبدی بروز می‌کند (۳۲). به همین دلیل بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیک کبد، شیوه‌ای دقیق و مطمئن جهت ارزیابی تأثیر فلزات در محیط و شرایط آزمایش‌گاهی می‌باشد. مقایسه بافت آبشش و کبد ماهی کپور می‌تواند به عنوان بک بیومارکر مناسب جهت سنجش آلودگی در استخرهای پرورش ماهی و یا محیط‌های طبیعی مانند رودخانه‌ها به کار رود که با هزینه کمی می‌توان آلودگی محیط و هم‌چنین میزان تأثیر آلودگی را بر روی ماهیان مشخص نمود (۳۳).

مکانیسم اصلی نکروز بدین صورت است که در ابتدا pH به دلیل گلیکولیز کاهش می‌یابد. در نتیجه آن تجمع لاکتات‌ها و تجزیه استرهای فسفات به همراه تغییرات عمومی در سلول صدمه دیده رخ داده و منجر به صدمه لیزوزیم‌ها و نشت آنزیم-های هیدرولاز به داخل سیتوپلاسم می‌گردد. در نتیجه آنزیم-های هیدرولیز کننده سلول از بین رفته و شاهد افزایش ائوزینوفیلی در سیتوپلاسم خواهیم بود که به علت از بین رفتن بازوفیلی طبیعی سیتوپلاسم وRNAها می‌باشد که در اثر فعال شدن آنزیم‌های آزاد شده از لیزوزیم رخ می‌دهد و در نتیجه این عمل ارگانل‌های پروتیینی داخل سیتوپلاسمی تجزیه و هیدرولیز می‌گردد. با از بین رفتن ذرات گلیکوژن، جای آن‌ها سیتوپلاسم واکوئل‌دار ایجاد می‌شود، با یکی شدن واکوئل‌ها، هسته به یک طرف سلول رانده شده و به دنبال آن و در مراحل حادتر کاریوکسی، کاریولیز و محو هسته رخ می‌دهد.

در تورم ابری سلول، به علت آسیب وارده به سلول، ارگانل‌های داخل آن مثل توری اندوپلاسمیک متورم می‌شود. بازتاب این تورم ارگان‌ها در میکروسکوپ نوری به صورت کدر شدن سیتوپلاسم سلول است. این بزرگ شدن ارگانل‌ها باعث می‌شود که سیتوپلاسم به صورت کف آلود دیده شود (۳۴). رضایی رنجبر سرداری (۱۳۸۹) سمیت نانوذره نقره را در رت‌ها مورد

بررسی قرار داد. نتایج این پژوهش‌گر نشان داد که با افزایش غلظت، اثرات سمیت بیش‌تری در حیوان ایجاد می‌شود. بررسی‌های آسیب‌شناسی نشان داد که طحال و کبد اندام‌های هدف برای نانوذرات نقره هستند. تغییرات پاتولوژیک و ضایعات بزرگ در کبد و طحال موش‌هایی که در معرض غلظت بالاتر قرار گرفته بودند دیده شد. طحال کاهش وزن قابل توجهی ناشی از کاهش حجم خون و افزایش پالپ‌های سفید داشت و در کبد آتروفی سلولی، خونریزی و چربی در اطراف مراکز وریدی بافت کبد دیده شد. آسیب‌های ایجاد شده به اندازه، غلظت و نحوه ورود نانوذره بستگی دارد. در آزمایش‌های انجام شده در سه سایز مختلف نانوذره به صورت خوراکی در رت‌ها، پس از کالبد شکافی و بررسی بافت‌ها گروه شاهد همراه با گروه دریافت کننده نقره با سایز ۳۲۳ نانومتر هیچ تفاوتی مشاهده نشد و در هیچ بافت کبد، کلیه و ریه از این دو گروه نقره مشاهده نگردید. در حالی که در دو سایز دیگر ۲۲ و ۷۱ نانومتر، سایز کوچک‌تر نانو نقره بیش‌ترین جذب را از سطح معدی-روده ای داشتند. کلیه در ماهیان یک اندام هدف خوب برای به دام انداختن ذرات آنتی ژنی در گردش خون می‌باشد و این عمل عمدتاً توسط تعداد زیادی از فاگوسیت‌هایی که سینوزوییدهای کلیوی و مویرگی دور توبوله‌ها در بخش قدامی و خلفی کلیه را مفروش کرده‌اند، انجام می‌شود(۳۵). بافت-شناسی تنه اصلی کلیه از توبول‌های کلیوی و کپسول بومن با گلومرول‌ها و شبکه‌ای از مراکز خون‌ساز تشکیل شده است. مراکز ملانوماکروفاژ نیز به وضوح در بافت بینابینی آن دیده می‌شود. به تازگی با استفاده از روش‌هایی بر پایه روش‌های ایمونوآنزیم سلول‌های تولید کننده آنتی بادی، هم در بخش قدامی و هم در بدنه کلیه انواع ماهیان شناسایی شده است. تحقیقات نشان می‌دهد که کلیه، یک اندام مهم در تولید آنتی بادی در ماهیان استخوانی است. سلول‌های ملانوماکروفاژ در بخش خون‌ساز کلیه ماهیان استخوانی اغلب به صورت توده‌هایی سازمان یافته، مراکز ملانوماکروفاژی را تشکیل می‌دهند. تعداد این سلول‌های ملانوماکروفاژی در کلیه و طحال ماهیان و پس از واکسیناسیون در این ماهیان افزایش پیدا می‌کند. این سلول-ها در مناطقی که لنفوسیت‌ها و سلول‌های حاوی آنتی بادی نیز در آن‌جا باشند، به صورت مجتمع در آمده و مراکز ملانوماکروفاژ را به وجود می‌آورند. اغلب رنگ‌دانه ملانوماکروفاژ-ها از نوع ملانین است، اما مقادیر متغیری لیپوفوشین و همو-سیدرین نیز وجود دارد. ملانوماکروفاژها دارای اعمال متعددی به عنوان یک نظافت‌چی مواد ناخواسته و یا محل ذخیره مواد حاصل از متابولیسم (مانند آهن) هستند. به علاوه امکان دارد ملانین نقش مهمی برای حفاظت در برابر آسیب حاصل از رادیکال‌های آزاد و آنزیم‌های باکتریایی داشته باشد. با این حال عمل‌کرد دقیق فاگوسیت‌های حاوی رنگ‌دانه یا مراکز ملانوماکروفاژ در سیستم دفاعی ماهیان استخوانی، هنوز به طور کامل شناخته نشده است (۳۶).

جلیلیان و همکاران (۱۳۸۸) تهیه و بررسی زیستی نانوذرات ابر پارامغناطیسی اکسید آهن نشان‌دار شده با گالیم-۶۷ در موش صحرایی سالم را مورد مطالعه قرار دادند. این نانوذره به موش صحرایی سالم نر تجویز و پراکنش زیستی رادیو آن در زمان‌های ۱ و ۲۴ ساعت پس از تزریق بررسی شد. نانوذره نشان‌دار شده با گالیم-۶۷ به طور قابل ملاحظه‌ای در اعضای سیستم ایمنی بدن (رتیکولواندوتلیال) و به خصوص در کبد، ریه و طحال جذب شد. اتصال رادیوایزوتوپ‌های درمانی به این نانوذرات می‌تواند به منظور هدف قرار دادن سیستم رتیکولواندوتلیال، به خصوص برای گرمادرمانی، به کار رود. با اندازه‌گیری‌های مغناطیسی مشخص گردید که این نانوذرات با دانه‌بندی بسیار کوچکشان (۵nm) به خوبی رفتار ابرپارامغناطیسی از خود نشان می-دهند(۳۷).

در مطالعه حاضر نیز تغییرات بافتی که در اثر استفاده از نانو-ذرات آهن و روی در بافت کبد(به صورت تخریب بافت کبد) و کلیه (به صورت ترمیم و افزایش کارایی کلیه) ماهیان رخ داده بود، با قطع نانوذرات و گذشت ۱۴ روز به همین طریقه برگشت‌پذیر بودند. تنها مقداری که با قطع نانوذره تغییرات بافتی آن برگشت‌پذیر نبود تغییرات ایجاد شده در بافت کبد ماهیان تغذیه شده با غلظت بالای روی بود.

Choi (۲۰۱۰) القای مرگ برنامه ریزی شده سلولیو استرس اکسیداتیو به وسیله نانوذرات نقره در کبد ماهی zebrafish بالغ را مورد بررسی قرار داد. این محقق نتیجه گرفت که استرس اکسیداتیو و آپوپتوز ناشی از نانوذره نقره باعث ایجاد سمیت در کبد این ماهی بالغ می‌شوند(۳۸). سهرابی و غلامی (۱۳۸۸)به بررسی اثرات مزمن فلز روی (کلرید روی) بر بافت-های کبد، کلیه و طحال در موش صحرایی نر پرداختند. مطالعات میکروسکوپی اندام‌های مورد مطالعه نشان داد که آسیب‌های هیستوپاتولوژیک در کبد بیش‌تر است. تغییرات بافتی و سلولی بیش‌تر از نوع آزار سلولی و برگشت‌پذیر بودند. از جمله این تغییرات می‌توان به پیکنوزه شدن هسته سلول‌ها و افزایش سلول‌های التهابی (که با برداشتن عامل پاتولوژیک سلول‌ها می‌توانند دوباره فعالیت فیزیولوژیک خود را از سر بگیرند) اشاره کرد. البته در طولانی مدت ممکن است تغییرات برگشت‌پذیر نباشند و سلول از بین برود. همچنین مطالعات نشان می‌دهد در اثر تزریق سولفات روی در موش صحرایی اختلالاتی در ترشح آنزیم‌های آلکالین‌فسفاتاز و آسپارتات آمینو-ترانسفراز و آلانین‌ترانسفراز دیده می شود، که این حاکی از آسیب سلول‌های کبدی است. در این مطالعه اثرات روی بر بافت کلیه بسیار ناچیز بود(۳۹). مطالعات دیگر نیز نشان می‌دهد که روی آسیب‌های جدی به کلیه وارد نمی‌کند. فعالیت آلکالین فسفاتاز در بافت‌های مختلف و از جمله سرم مشاهده می‌شود. فعالیت آلکالین فسفاتازی سرم یکی از نشان‌گرهای اختلالات کبدی است که در بیماری‌های مختلف دچار تغییر می‌شود. مواردی که کاهش فعالیت گزارش شده باشد شامل آنمی و سوء تغذیه به ویژه کمبود روی است (۴۰). تغییر دیگر نانوذرات در کلیه قدامی مشاهده شد. این تغییرات شامل افزایش تعداد ملانوماکروفاژها به نسبت افزایش نانوذرات بودند. علاوه بر این تغییرات در بعضی تیمارها، واکوئل‌دار شدن لوله‌های ادراری نیز مشاهده شد. تأثیر نانوذرات بر روی سیستم عصبی قوی‌تر و عمیق‌تر از سایر ارگان‌های بدن است، چون بعد از قطع نانوذرات تأثیرات برگشت پذیر نبودند. براساس یافته‌های به دست آمده از این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که جذب زیستی نانوذرات آهن و روی به شدت تحت تاثیر مقادیر این عناصر در جیره قرار دارد، به طوری که با افزایش میزان نانو ذرات روی و آهن به جیره غذایی کپور ماهیان در طی دوره ۷۵ روزه، میزان تغییرات متفاوتی در مقادیر و بافت های مورد مطالعه مشاهده گردید.

تشکر و قدردانی

نگارندگان این تحقیق از مسئول سالن تکثیر و پرورش آبزیان شهید ناصر فضل آبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان آقای دکتر علی جافر نوده و مهندس نعیمی کمال تشکر و قدردانی را دارند.

References

1. Srivastava, L. 2005. Ubiquitous network societies: ITU new initiatives programme, background paper. Document: UNS/03. Internation Telecommunication Union (ITU) New Initiatives Workshop on Ubiquitous Network Societies.
2. De Jong, W.H., B. Roszek and R.E. Geertsma. 2005. Nanotechnology in medical applications: possible risks for human health. RIVM rapport 265001002. R. v. V. e. M. RIVM.
3. Hannah, W. and P.B. Thompson. 2008. Nanotechnology, risk and the environment: a review. Journal of environmental monitoring. 10:291-300.
4. Shatkin, J.A. 2012. Nanotechnology: health and environmental risks. CRC PressI Llc 385 pp.
5. Schuler, E. 2004. Perception of risks and nanotechnology. Discovering the nanoscale. 11:279-284.
6. Gwinn, M.R. and V. Vallyathan. 2006. Nanoparticle: health effects pros and cons. Environmental health perspectives. 114:1818-1825.
7. Xiaoshan, Z.; Shengyan, T. and Zhonghua, C., 2008. Toxicity Assessment of Iron Oxide

Nanoparticles in Zebrafish *(Danio rerio)* Early Life Stages. J. Environ. Sci. Health. Vol. 43, pp: 278–284.

8. Kim, J.S.; Yoon, T.J.; Yu, K.N.; Kim, B.G.; Park, S.J. and Kim, H.W., 2006. Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice. Toxicol Sci. Vol. 89, No. 1, pp: 338-347.
9. Suttle, N. 2010. Mineral nutrition of livestock, 4th Edition. Pp: 426-458, Midlothian EH26 OPZ, UK. Animal Science, 73: 1227-1238.
10. Pal, D. T., Gowda N. K. S., Prasad C. S., Amarnath R., Bharadwaj U., SureshBabu G. and Sampath, K. T. 2010. Effect of copper and zinc-methionine supplementation on bioavailability, mineral status and tissue concentrations of copper and zinc in ewes. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 24: 89-94.
11. Zalewski, P. D., Ai, Q. T., Dion G., Lata, J., Chiara, M. and Richard, E. R. 2005. Zinc metabolism in airway epithelium and airway inflammation: basic mechanisms and clinical targets: A review. Pharmacology & Therapeutics, 105: 127-149.
12. Formigari, A., Irato P. and Santon, A. 2007. Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediatedapoptosis: biochemical and cytochemical aspects. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 146: 443-459.
13. Wedekind, K. J. and Baker, D. H. 1990. Zinc bioavailability in feed-grade sources of zinc. Journal of Animal Science, 68: 684-689.
14. Shulin, J. I., Changhui, Y. E. 2008. Synthesis, growth mechanism and applications of zinc oxide nanomaterials. Journal of Materials Science and Technology, 24: 457-472.
15. Song, W., Zhang, J., Guo, J., Zhang, J., Ding, F., Li, L. and Sun, Z. 2010. Role of the dissolved zinc ion and reactive oxygen species in cytotoxicity of ZnO nanoparticles. Toxicology Letters, 199: 389-397.
16. Francisco, H. S. J., Facundo, R., Diana, C. C. C. P., Fidel, M. G., Alberto, E. M., Amaury, D. J. P. G., Humberto, T. P. and Gabriel, M. C. 2008 The antimicrobial sensitivity of Streptococcus mutans to nanoparticles of silver, zinc oxide and gold. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 4: 237-240.
17. Hosseinzadeh, A., Samarghandi, M.R., Alikhai, M. Y., Roshenaei, Q., A.Q. 2012. Antimicrobial efficacy of zinc oxide nanoparticle suspension against gram-positive and gram-negative bacteria. Journal of Health and Environment, Scientific and Research Quarterly of Iranian Scientific Association of Environmental Health, 5 (4): 463-474.
18. Van der Oost, R.J., Beber, N.P.E., Vermeulen, P. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13: 57-149.
19. Anderson, D.M., Morel, F.M. 1978. Copper sensitivity of Gonyaulax tamarensis. *Limnology and Oceanography*, 23: 283-295.
20. Turkmen, M., Turkmen, A., Tepe, Y., Ates, A., Gokkus, K.2008. Determination of metal contaminations

in sea foods from Marmara, Aegean and Mediterranean seas: Twelve fish species, Food Chemistry, 108:794-800.

21. Wagermann, R., Muir, D.C.G. 1984. Concentration of heavy metals and organochlorine in marine mammals of northern waters overview and evaluation. *Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Sciences, No* 1279.
22. Wekell, J.C., Shearer, K.D., Houle, C.R. 1983. High zinc supplementation of rainbow trout diets. Progresive in Fish Culture, 45: 144-147.
23. Satoh, S., Takeuchi, T., Watanabe, T. 1987. Availability to Rainbow Trout of Zinc in White Fish Meal and of VariousZinc Compounds. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53: 595-599.
24. Kiron, V., Gunji, A., Okamoto, N., Satoh, S., Ikeda, Y., Watanabe, T. 1993. Dietary nutrient dependentvariations on natural-killer activity of the leucocytes of rainbow trout. *Fish Pathology*, 28: 71-76.
25. Roussel, A.M., Facn, A.K., Zouari, N., Mahjoub, S., Matheau, J.M., Anderson, R.A. 2003. Antioxidant Effects of Zinc Supplementation in Tunisians with Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of the American College of Nutrition*, 22:316-321.
26. Agah, H., Leermakers, M., Elskens, M., Fatemi, S.M.R., Baeyens, W. 2009. Accumulation of trace metals in the muscle and liver tissues of five species from the Persian Gulf. *Journal of Environmental Monitoring and Assessment*, 157:499-514.
27. Askari sari, A., Velayatzadeh, M.2011. Investigation of lead and zinc concentrations in liver and muscle tissues of two species of farmed carp and rainbow trout. Iranian Journal of Veterinary Medicine, 7(1): 30-35.
28. Jalali, J.B., Aghazadeh M.M. 2007. Fish poisoning by heavy metals in water and its importance in public health. Man Book Publishing, p 134.
29. Bury, N.R., Grosell, M. 2003. Mechanistic study of waterborne iron acquisition by a freshwater teleost fish, zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Experimental Biology*, 260: 3529-3535.
30. Karimi rad, F. 2001. Evaluation of the effects of propolis alcoholic extract on histopathology of liver and kidney and humoral immunity in rainbow trout. Master of Histology and Embryology. Urmia University. Issue: 1037-2. P 56-29.
31. Rocha, E., Monteiro, R.A.F. 1999. Histology and cytology of fish liver: A review, p.321-344. In: Saksena, D.N. (ed.) Ichthyology: Recent research advances. Science Publishers, Enfield, New Hampshire.
32. Paris-Palacios, S., Biagianti-Risbourg, S., Vernet, G. 2000. Biochemical and (ultra) structural hepatic perturbation of Brachydanio rerio *(Teleostei, Cyprinidae)* exposed to two sublethal concentrations of copper sulphate. *AquacultureToxicology*, 50:109-124.
33. Atbani, A,. Keykhosravi, A,. Vatandoost, J. 2008. Toxic effects of different concentrations of zinc and copper metals on liver tissue and gills of common carp *(Cyprinus carpio)*. Twelfth National Conference on Environmental Health of Iran, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Faculty of Health.
34. Roberts, R.J. 2001. The Immunology of teleost. In: Roberts, R.J. (Ed), Fish

Pathology, Sunders, London, England, pp: 133-150.

35. Rezaei ranjbar, R. 2010. Toxic effects of silver nanoparticles on liver and spleen tissues in rats. The first conference on nanoscience and nanotechnology, Payame Noor University of Yazd Province. PP: 42-52. (In Persian)
36. Haghighi, kh. A. 2007. Pathology of fish and shrimp. Islamic Azad University, Science and Research Branch of Tehran. 401p. (In Persian)
37. Jaliliyan, A., Panahifar, A., Mahmoudi, M., Akhlaghi, M., Simchi, A. 2009. Preparation and bioassay of gallium-67-labeled iron oxide superparamagnetic nanoparticles in healthy rats. Journal of Nuclear Science and Technology. No. 50, pp. 36-29. (In Persian)
38. Choi, J.E. 2010. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. Journal of Aquatic Toxicology, 100: 151-159.
39. Sohrabi, D,. Golami, M. 2009. Evaluation of chronic effects of zinc metal (zinc chloride) on liver, kidney and spleen tissues in male rats (RAT). Quarterly Journal of Developmental Biology.1(2):9-14. (In Persian)
40. Chernecky, C.C., Berger, B.J. 1997. Laboratory tests and diagnostic procedures. Saunders Company, phyladelphia, USA, pp: 170-173.