



۲۴۰ مترمربع در گرم، رنگ سفید، دانسیته توده ۰/۲۴ گرم در سانتی متر مکعب و دانسیته واقعی ۳/۹ گرم در سانتی متر مکعب.

### بررسی اثر سمیت حاد نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم گونه ماهی: بچه ماهیان آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*) برای این

آزمایش با میانگین وزن  $27/46 \pm 4/3$  گرم از مرکز بازسازی ذخایر آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت تهیه شدند.

### شرایط اجرای آزمایش: بچه ماهیان در دانشکده علوم دریایی

دانشگاه تربیت مدرس به مدت یک هفته با شرایط آزمایشگاهی در مخازن آب شیرین (تانک‌های ۳۰۰ لیتر) سازگار و با غذای تجاری (بیومار) تغذیه شدند (۱ درصد وزن بدن). سپس، به منظور جلوگیری از جذب نانوذرات به وسیله مدفوع، ۲۴ ساعت قبل از شروع آزمایش، غذاهای به ماهی‌ها قطع شد (۱۳). در طول دوره سازگاری تلفاتی در بین ماهیان مشاهده نشد. بعد از این مدت ماهی‌ها به طور تصادفی به تانک‌های آزمایش (۱۰۰ لیتر) انتقال داده شدند. میزان تراکم ماهی‌ها در هر تانک ۱۰۰ لیتری حدود ۲/۷ گرم در لیتر بود (در هر تانک ۷ ماهی). شاخص‌های کیفی آب مانند PH، اکسیژن محلول، دما، سختی کل در طول آزمایش با استفاده از دستگاه دیجیتال (Lovibond water testing) اندازه‌گیری شد. میانگین دما (درجه سانتی‌گراد)، PH، سختی (میلی‌گرم کربنات کلسیم) و اکسیژن محلول (درصد اشباع) به ترتیب  $18/62 \pm 0/26$ ،  $0/08 \pm 8/25$ ،  $246 \pm 6/34$ ،  $90/6 \pm 2/04$  بود. آزمایش تحت شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی انجام شد. برای آزمایش از آب شهری کلرزدایی و هوادهی شده استفاده شد.

غلظت‌های ۰، ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر انتخاب و برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. آزمایش به مدت ۴ روز (۹۶ ساعت) تحت شرایط ساکن با تعویض آب و تجدید غلظت‌ها انجام شد و آب مخازن مورد آزمایش هر ۲۴ ساعت یکبار تعویض و غلظت‌های نانوذرات مورد مطالعه مجدداً در مخازن اضافه شد. در طول آزمایش برای جلوگیری از جذب نانوذرات به غذا و مدفوع ماهی‌ها، غذاهای انجام نشد. ماهی‌های گروه شاهد تحت شرایط یکسان با گروه‌های آزمایشی قرار داشتند.

برای آزمایش هیستوپاتولوژی، در پایان دوره از هر تیمار ۶ ماهی به طور تصادفی برای نمونه‌برداری از بافت آبشش، کبد و روده انتخاب شدند. ماهی‌ها در پودر گل میخک (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بی‌هوش شدند. به منظور تثبیت نمونه‌ها، بافت‌ها بلافاصله به محلول بوئن انتقال داده شدند. برای انجام مطالعات بافت‌شناسی ابتدا نمونه‌های بافتی از محلول بوئن خارج و به الکل ۷۰ درصد

حال حاضر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم در انواع محصولات مانند کرم‌های ضد آفتاب و دیگر لوازم آرایشی، پوشش و رنگ‌های ویژه (۲۷) و در فرآیندهای فتوکاتالیستی صنعتی و تولید شیشه‌های خود تمیز شونده (۲۳) استفاده می‌شود.

رشد سریع تعداد مطالعه‌ها در این زمینه تأیید می‌کند که نگرانی زیادی در زمینه ایمنی و بی‌خطری نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم وجود دارد. در این زمینه، حیوانات مدل گوناگونی با روش‌های مختلف مواجهه مورد آزمایش قرار گرفته‌اند (۹). همه این مطالعه‌ها نشان داده‌اند که نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم از دی‌اکسید تیتانیوم میکرونی سمی‌ترند (۱۷، ۲۵). استفاده وسیع از نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم احتمال قرار گرفتن انسان‌ها در معرض این نانومواد و رهایش آن‌ها به محیط زیست را افزایش داده است که می‌تواند خطر بالقوه برای سلامتی انسان‌ها، حیوانات و اکوسیستم باشد (۲۵). بسیاری از مطالعه‌ها در زمینه سمیت حاد نشان داده‌اند که نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم سمیت کمی برای موجودات زنده آبی دارند یا برای آن‌ها بی‌خطرند (۷)، اما مطالعه‌های اخیر بیانگر آن است که نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم می‌تواند اثر نامطلوبی بر موجودات آبی داشته باشد. برای مثال، این یافته‌ها نشان می‌دهند که مواجهه با نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم سبب تغییر در بیان برخی از ژن‌های ماهی گورخری (۵)، مرگ دافنی ماگنا (۱۸)، نارسایی تنفسی و سایش اپیتلیوم روده و تنش اکسیداتیو در قزل‌آلای رنگین‌کمان (۱۰) شده است. بنابراین، افزایش استفاده از نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم در کالاهای مختلف و استفاده احتمالی آن‌ها در صنایع شیلاتی، بررسی آثار این نانوذرات بر آبزیان را ضروری کرده است. از این رو، در این پژوهش با استفاده از نشانگرهای زیستی هیستوپاتولوژیکی آثار نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم در سمیت حاد بر بافت‌های آبشش، کبد و روده ماهی آزاد دریای خزر به عنوان گونه در معرض خطر و یکی از گزینه‌های اصلی برای تنوع‌بخشی به ماهیان سردابی پرورشی کشور، مورد بررسی قرار گرفته است.

## مواد و روش کار

**ویژگی‌های نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم آاناتاز:** نانوذرات پودری دی‌اکسید تیتانیوم آاناتاز (CAS number= 13463-67-7) محصول شرکت Us-nano آمریکا از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان خریداری شد. بنا بر اطلاعات شرکت سازنده، مشخصات نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم آاناتاز به این شرح می‌باشد: خلوص ۹۹ درصد، متوسط اندازه ۱۰-۱۵ نانومتر، مساحت سطح ویژه ۲۰۰-

تیمار ۵۰۰ تیغه ثانویه شمارش شد و تعداد تیغه ثانویه‌ای که دچار آسیب شده بودند نسبت به تعداد کل تیغه ثانویه سنجیده شد. شدت تغییرات کمتر از ۱۰ درصد، "بدون تغییر (-)"; شدت تغییرات بین ۱۰ تا ۳۰ درصد "تغییر ملایم (+)"; شدت تغییرات بین ۳۱ تا ۶۰ درصد "تغییر متوسط (++)" و شدت تغییرات بین ۶۰ تا ۱۰۰ درصد "تغییر شدید (+++)" در نظر گرفته شد. همچنین، برای تعیین آسیب‌دیدگی روده و کبد در تیمارهای آزمایشی حالت‌های غیرطبیعی ساختمان این دو اندام به‌صورت کیفی در چهار سطح بدون تغییر (-)، تغییر ملایم (+)، تغییر متوسط (++) و تغییر شدید (+++) مورد بررسی قرار گرفتند (۶،۲۶).

انتقال داده شدند. سپس نمونه‌های بافتی در دستگاه خودکار آماده‌سازی بافت (Tissue processor, DID SABZ DS 2080/H) آگیری، شفاف‌سازی و پارافینه شدند. در ادامه نمونه‌های قالب‌گیری‌شده با دستگاه میکروتوم (Accu-Cut SRM 200 Rotary Microtome) با ضخامت ۵ میکرومتر برش داده شدند. از هر نمونه ۳ لام سریالی با کیفیت مناسب تهیه شد و رنگ‌آمیزی لام‌های حاصله به روش رایج هماتوکسیلین و ائوزین انجام گرفت. برش‌های ایجادشده با چسب انتالان روی لام چسبانده شدند، سپس لام‌های تهیه‌شده با میکروسکوپ نوری (OPTIKA) مجهز به دوربین در بزرگ‌نمایی‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفتند. برای مطالعه آسیب‌شناسی بافت آبشش در هر

**جدول ۱.** یافته‌های هیستوپاتولوژیکی آبشش، کبد و روده ماهی آزاد دریای خزر بعد از مواجهه حاد (۴ روزه) با غلظت‌های مختلف نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم. \* بدون تغییر (-)، تغییر ملایم (+)، تغییر متوسط (++) و تغییر شدید (+++).

ضایعات بافتی*										
آبشش	خمیدگی	ادم	هایپرپلازی	هایپرتروفی	رأس چماقی	جوش خوردگی تیغه آبششی	کوتاهی تیغه ثانویه	جداشدگی اپیتلیالی	آنورسم	نکروز
۰	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
۱	++	-	-	-	+	-	-	-	-	-
۱۰	+	-	++	++	++	+	+	-	-	-
۱۰۰	-	+	+++	+++	++	++	++	+	+	+
کبد	دژنراسیون سیتوپلاسمی	نواحی کانونی	اتساع	احتقان (پرخونی)	نکروز	تجمع سلول‌های خونی	هسته پیکنوتیک	واکونلاسیون	نکروز	
۰	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
۱	+	+	++	+	-	+	+	+	-	-
۱۰	+	++	++	+	+	+	++	++	+	+
۱۰۰	++	++	+++	++	++	++	++	+++	++	++
روده	فیبروزی	واکونلاسیون	فرسایش پرزهای روده	جوش خوردگی پرزها	ضخیم‌شدگی لامینا پروپریا	نکروز	جداشدگی اپیتلیالی			
۰	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
۱	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
۱۰	-	++	++	+	++	+	++	++	++	++
۱۰۰	۰	++	+++	++	++	+	++	++	++	++

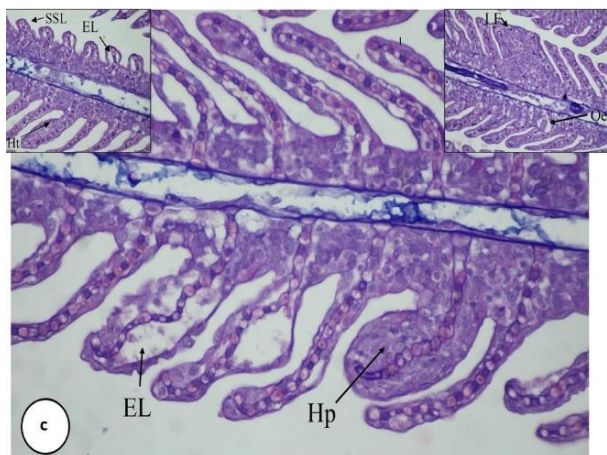
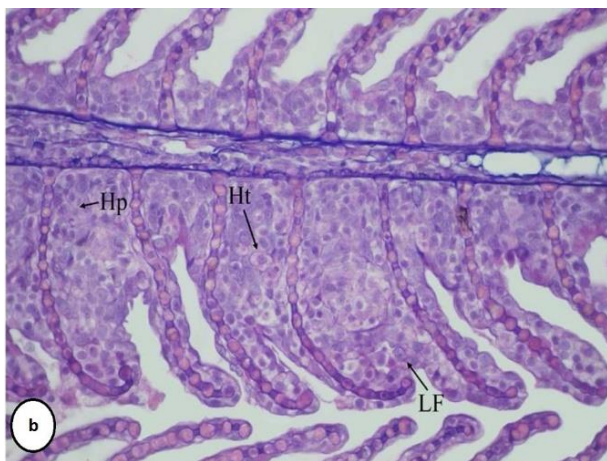
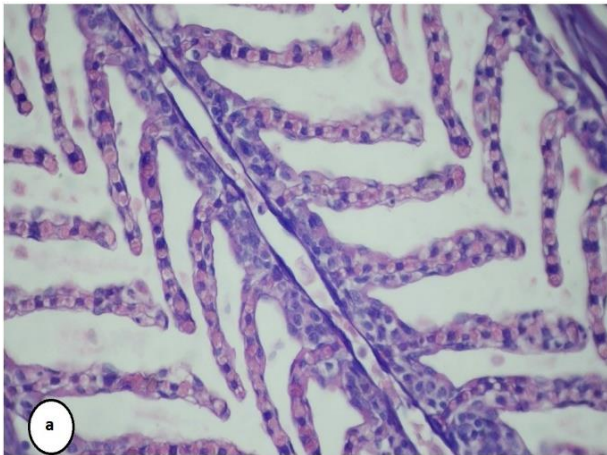
## نتایج

در آزمایش سمیت حاد نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم در مدت ۹۶ ساعت، هیچ گونه تلفاتی در غلظت‌های مورد مطالعه مشاهده نشد. بر اساس دستورالعمل آزمون سمیت حاد ماهی‌ها (۲۰)، اگر در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر در حداقل ۷ ماهی، مرگ‌ومیری مشاهده نشود با حدود اطمینان ۹۹ درصد می‌توان گفت که  $LC_{50}$  آن ماده بیشتر از ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر است. بنابراین، در مطالعه حاضر  $LC_{50}$  نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بیشتر از ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر خواهد بود.

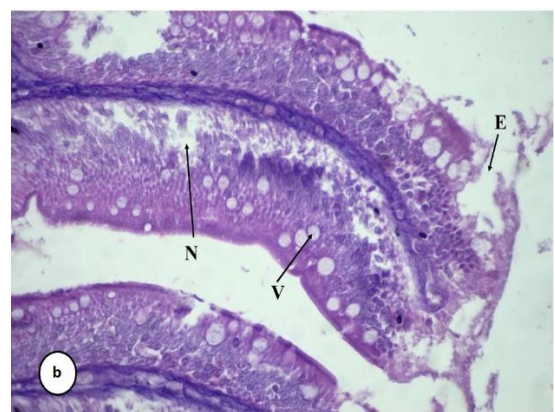
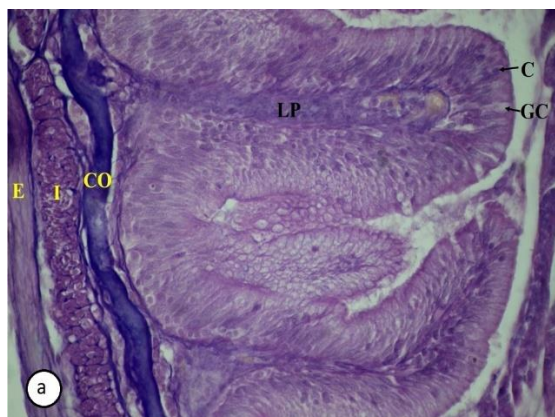
تغییرات بافت‌شناختی در بافت‌های مورد آزمایش (آبشش، کبد و روده) ماهی آزاد دریای خزر در طول دوره سمیت حاد در جدول ۱ خلاصه شده و این تغییرات در تصاویر ۱ تا ۳ نشان داده شده است.

بافت‌شناسی طبیعی آبشش در ماهیان گروه شاهد در تصویر ۱a نشان داده شده است که به خوبی سلول‌های کلراید، سلول ستونی (پیلار)، رشته‌های آبششی و سلول‌های اپیتلیالی با ساختار طبیعی قابل مشاهده‌اند. آبشش ماهیانی که در معرض دی‌اکسید تیتانیوم قرار گرفته بودند به طور وابسته به دوز دچار تغییرات بافت‌شناختی شد. در بالاترین دوز نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، تغییرات هیستوپاتولوژیکی آبشش شامل چماقی شدن رأس تیغه آبششی، هایپرپلازی، کوتاهی تیغه ثانویه، هایپرتروفی، جوش خوردگی تیغه آبششی، ادم (خیز) و جداسازی اپیتلیالی بود (تصویر ۱b,c).

کبد گروه شاهد ساختار بافتی طبیعی را نشان داد (تصویر ۲a). مواجهه ماهیان با نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم به میزان ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر به تجمع ملانوماکروفاژها، احتقان سینوزوئید و هسته پیکنوتیک پراکنده در سلول‌های کبدی منجر شد. تجمع ملانوماکروفاژها، سلول‌های کبدی با هسته پیکنوتیک و واکوئلاسیون در کبد ماهی آزاد دریای خزر قرار گرفته در معرض ۱ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم مشاهده شد. تغییرات بافت‌شناختی در ماهیان قرار گرفته در معرض ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم آشکارتر بود. این ضایعات شامل افزایش تجمع ملانوماکروفاژها، اتساع سینوزوئیدها و تجمع سلول‌های خونی، سلول‌های کبدی با هسته پیکنوتیک، واکوئلاسیون و کانون‌های نکروزه بود (تصویر ۲b,c).

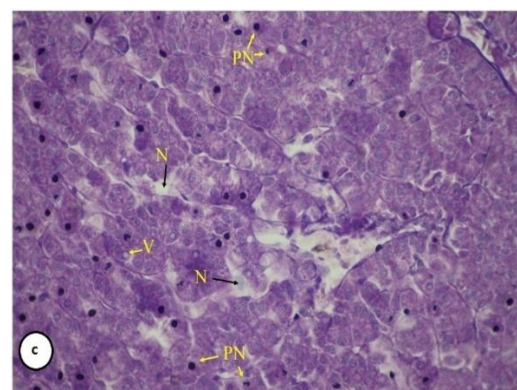
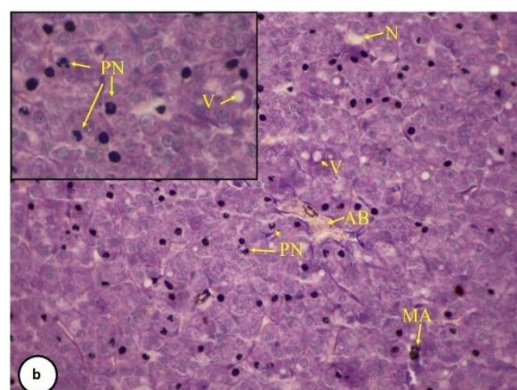
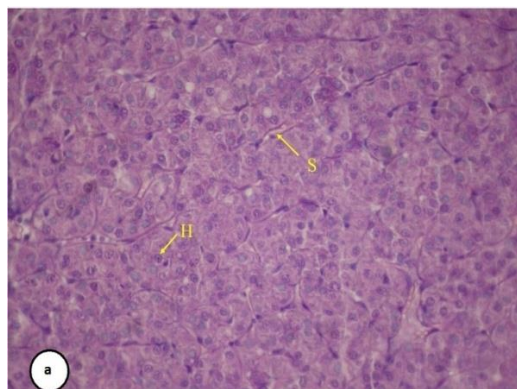


**تصویر ۱.** تغییرات بافت‌شناختی مشاهده شده در آبشش‌های ماهی آزاد دریای خزر بعد از ۴ روز مواجهه با نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم. (a) گروه شاهد، (b) ۱۰ میلی‌گرم در لیتر، (c) ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر. هایپرپلازی (Hp)، کوتاهی تیغه ثانویه (SSL)، هایپرتروفی (Ht)، جوش خوردگی تیغه آبششی (LF)، جداسازی اپیتلیالی (EL)، هماتوکیسین و اوئزین، بزرگنمایی ۴۰۰×.



**تصویر ۱.** مورفولوژی روده در ماهی آزاد دریای خزر بعد از مواجهه با نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم به مدت ۴ روز. (a) گروه شاهد، (b) ۱۰۰ میلی گرم در لیتر. سلول‌های ستونی (C)، سلول‌های جامی (GC)، لامینا پروپریا (LP)، لایه فشرده (CO)، لایه عضلاتی داخلی (I) و لایه عضلاتی خارجی (E، تصویر a)، واکوتلاسیون (V)، جداسازی اپیتلیال (EL)، فرسایش پرزهای روده (E) و نکروز (N) (هماتوکسیلین و ائوزین، بزرگنمایی ۴۰۰×).

روده ماهیان در گروه شاهد بافت‌شناسی طبیعی را نشان داد (تصویر ۳a). تغییرات بافتی، مانند ضخیم شدن لامینا پروپریا، واکوتلاسیون، جداسازی اپیتلیال، فرسایش پرزهای روده و نکروز در روده ماهیانی که در معرض نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم قرار گرفته بودند، مشاهده شد (تصویر ۳b).



**تصویر ۲.** هیستوپاتولوژی کبد ماهی آزاد دریای خزر بعد از قرار گرفتن در معرض نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم به مدت ۴ روز. (a) گروه شاهد، (b) ۱۰ میلی گرم در لیتر، (c) ۱۰۰ میلی گرم در لیتر. فضای سینوزوئید (S)، تجمع سلول‌های خونی (AB)، کلون‌هایی از مراکز ملانوماکروفاژ (MA)، هسته پیکنوتیک (PN)، واکوتلاسیون (V) و نکروز (N)، (هماتوکسیلین و ائوزین، بزرگنمایی ۴۰۰×).

## بحث

در پژوهش حاضر، نتایج آزمون سمیت حاد نشان داد که نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم منتقل‌شونده از آب به مدت ۴ روز اثری بر بقای بچه‌ماهی آزاد دریای خزر مورد مطالعه نداشت. با در نظر گرفتن سطوح سمیت (۱۲، ۱۳)، طبق نتایج پژوهش حاضر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم "نسبتاً غیر سمی" ( $>100$ ) محسوب می‌شود. آبشش ماهیان جزء اندام‌های مهم محسوب می‌شود که وظایف مهمی، از جمله تبادل گازهای تنفسی، دفع مواد زائد نیتروژنی، تنظیم اسید-باز و تنظیم فشار اسمزی بر عهده دارد (۸) و در عین حال مکانی است که در معرض مستقیم آلودگی‌های محیطی، از جمله نانوذرات قرار دارد. بنابراین، آسیب جدی به آبشش می‌تواند اختلال در وظایف این اندام حیاتی، از جمله تبادل اکسیژن و دی‌اکسید کربن و تنظیم اسمزی ایجاد کند و در نتیجه به مرگ

نشان داده شده که گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) ناشی از نانوذرات نقش مهمی در ایجاد نکروز/ آپوپتوز سلول‌ها دارند (برای مثال، ۲۰۱۴). Mansouri و همکاران در سال ۲۰۱۶ (۱۹) نشان دادند که قرار گرفتن کپور معمولی در معرض هم‌زمان نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و نانو اکسید مس باعث ناهنجاری‌های بافتی در کبد از جمله واکوئلاسیون، نکروز سلول‌های کبدی، تجزیه هسته، اتساع و تجمع خون در سینوزوئید، پیگمنتاسیون و اجتماعات ملانوماکروفاژ شده است. واکوئلاسیون کبد نشان‌دهنده عدم تعادل بین نرخ سنتز مواد در سلول‌های پارانشیمی و نرخ آزادسازی این مواد به گردش خون سیستمیک است (۲۱). اتساع سینوزوئیدهای کبدی احتمالاً برای حمل بیشتر مواد برای سم‌زدایی و نشان دهنده افزایش جریان خون در بافت کبدی است و به‌عنوان سازوکار کمکی برای سم‌زدایی عمل می‌کند. بنابراین، سینوزوئیدها به‌منظور تسهیل این جریان خون متسع می‌شوند (۲۱). احتقان (تجمع خون) می‌تواند مسئول دژنراسیون سلولی و نکروز کبد ماهی باشد. به‌طور کلی، ضایعات کبدی ممکن است ناشی از اثرات تجمع نانوذرات و آسیب اکسیداتیو باشد (۳۰).

روده در تماس مستقیم با آلاینده‌های موجود در آب بوده و مسیر احتمالی برای ورود بسیاری از نانومواد است (۴). در پژوهش حاضر، تغییرات هیستوپاتولوژیکی روده در بچه ماهیان آزاد دریای خزر تیمار شده با نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم شامل ضخیم شدن لامینا پروپریا، واکوئلاسیون، ساییدگی و نکروز پرزهای روده بود. لامینا پروپریا بافت همبند عروقی حاوی اعصاب و لکوسیت‌هاست که زیر اپیتلیوم قرار دارد و همراه با لایه اپیتلیوم مخاط (مکوزا) را تشکیل می‌دهد (۲۹) و افزایش ضخامت لامینا پروپریا ممکن است ناشی از اختلال در گردش خون (۳) و / یا پاسخ التهابی (۱۵) باشد. مشابه نتایج پژوهش حاضر، نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم باعث ساییدگی و جوش خوردگی پرزهای روده و واکوئلاسیون سلول‌های اپیتلیالی روده قزل‌آلای رنگین‌کمان شده است (۱۰). در پژوهش مشابه‌ای کپور معمولی با نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و نانو اکسید مس مواجهه هم‌زمان داده شدند که افزایش سلول‌های خونی، انبساط ساختار پرز، نکروز و ساییدگی پرز روده مشاهده شد (۱۹). مشخص شده که تنش، از جمله آلاینده‌های موجود در آب می‌تواند موجب افزایش نوشیدن آب محتوی نانوذرات شود (۱۳، ۲۸)، بنابراین، در این شرایط دستگاه گوارش بیشتر در معرض نانوذرات

ماهیان منجر شود. نتایج مطالعه بافت‌شناسی اثر کوتاه‌مدت (حاد) نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر آبشش بچه ماهیان آزاد دریای خزر نشان داد که اگرچه در آزمون تلفات حاد مرگ‌ومیری مشاهده نشد ولی در دوزهای متوسط و بالا تغییرات هیستوپاتولوژیکی آبشش شامل چماقی شکل شدن رأس تیغه آبششی، هایپرپلازی، کوتاهی تیغه ثانویه، هایپرتروفی، جوش‌خوردگی تیغه آبششی، ادم و جداشدگی اپیتلیالی مشاهده شد. ضایعات دیده‌شده در پژوهش حاضر، مشابه ضایعاتی بود که در پژوهش‌های معدود دیگر در زمینه اثر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر ماهیان، گزارش شده است. هایپرپلازی، آماس، چماقی شدن رأس تیغه ثانویه، تلانژکتازی مویرگی، خوردگی و چسبندگی (جوش‌خوردگی) تیغه ثانویه و کوتاه‌شدن تیغه آبششی در کپور (۱۹)، هایپرتروفی سلول‌های کلراید و دژنره شدن سلول‌های موکوسی (۱۶) و خیز و ضخیم شدن تیغه‌ها و رشته‌های آبششی در کپور معمولی (۱۲) بعد از مواجهه ماهیان مورد مطالعه با نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم مشاهده شده است. هایپرپلازی و هایپرتروفی اپیتلیالی تیغه آبششی واکنش جبرانی برای کاهش ورود و جذب مواد سمی است (۱۱). با وجود افزایش فاصله بین آب و خون در اثر این واکنش جبرانی و کاهش جذب مواد سمی، کاهش سطح تنفسی و در نتیجه اختلالات تنفسی ایجاد می‌شود (۲۲). با کوتاهی تیغه آبششی، تماس آبشش‌ها با آب کاهش یافته و در نتیجه در میزان تبادل گازها و یونها اختلال ایجاد می‌شود (۲۲). عدم تعادل اسمزی ناشی از نانوذرات احتمالاً موجب ادم و جداشدگی اپیتلیالی در تیغه ثانویه شده است (۱۹).

کبد یکی از مهم‌ترین اندام‌های بدن ماهی است که در فرایندهای سم‌زدایی نقش دارد. هیستوپاتولوژی کبد ماهیان راهی سودمند برای مطالعه اثرات مواجهه حیوانات آبری با سموم موجود در محیط آبی است (۱۱). تغییرات بافتی مشاهده شده در بچه ماهیان آزاد دریای خزر قرار گرفته در معرض نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم در آزمایش‌های حاد شامل افزایش تجمع ملانوماکروفاژها، اتساع سینوزوئیدها و تجمع سلول‌های خونی، سلول‌های کبدی با هسته پیکنوتیک، واکوئلاسیون و کانون‌های نکروزه بود. این ضایعات در دوزهای بالاتر مشهودتر بود. نقش مهم ماکروفاژها می‌تواند جارو کردن نانوذرات باشد (۲۲، ۲۴). در پژوهش حاضر، واکوئلاسیون و هسته پیکنوتیک مهم‌ترین تغییر هیستوپاتولوژیکی کبد بچه ماهیان آزاد دریای خزر تیمار شده با نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بود. بروز هسته پیکنوتیک نشان‌دهنده مراحل اولیه نکروز است (۱). در پژوهش‌های متعددی

## سپاسگزاری

نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از همکاری کلیه عزیزانی که در اجرای این پژوهش فعالیت مؤثری داشته‌اند، تشکر و قدردانی نمایند.

## تعارض منافع

بین نویسندگان هیچ گونه تعارض منافع گزارش نشده است.

قرار می‌گیرد. از این رو، آسیب‌های بافتی مشاهده شده در پژوهش حاضر می‌تواند ناشی از بلعیدن نانوذرات نقره و دی‌اکسید تیتانیوم توسط ماهی آزاد دریای خزر باشد.

نتایج این پژوهش نشان داد که اگرچه نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم در آزمون سم‌شناسی حاد (کوتاه مدت) مرگومیری ایجاد نکرد و از این نظر ماده نسبتاً غیر سمی محسوب می‌شود، با توجه به آسیب بافتی مشاهده شده در آزمون سمیت حاد نشان می‌دهد که این نانوذرات قابلیت آسیب‌زایی در این ماهی را دارد.

## References

- Al-Bairuty, G.A., Shaw, B.J., Handy, R.D., Henry, T.B. (2013). Histopathological effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on the organs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol*, 126, 104-115. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.10.005>
- Asharani, P.V., Wu, Y.L., Gong, Z., Valiyaveetil, S. (2008). Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *J Nanotechnol*, 19(25), 255102. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/19/25/255102>
- Baeza-Ariño, R., Martínez-Llorens, S., Nogales-Mérida, S., Jover-Cerda, M., Tomás- Vidal, A. (2016). Study of liver and gut alterations in sea bream, *Sparus aurata* L., fed a mixture of vegetable protein concentrates. *Aquac Res*, 47(2), 460-471. <https://doi.org/10.1111/are.12507>
- Bergin, I.L., Witzmann, F.A. (2013). Nanoparticle toxicity by the gastrointestinal route: evidence and knowledge gaps. *Int J Biomed Nanosci Nanotechnol*, 3(1-2), 163-210. <https://doi.org/10.1504/ijbnn.2013.054515>
- Bermudez, E., Mangum, J.B., Asgharian, B., Wong, B.A., Reverdy, E.E., Janszen, D.B., Hext, P.M., Warheit, D.B., Everitt, J.I. (2002). Long-term pulmonary responses of three laboratory rodent species to subchronic inhalation of pigmentary titanium dioxide particles. *J Toxicol Sci*, 70(1), 86-97. <https://doi.org/10.1093/toxsci/70.1.86>
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt- Holm, P., Wahli, T. (1999). Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J Fish Dis*, 22(1), 25-34. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x>
- Chen, J., Dong, X., Xin, Y., Zhao, M. (2011). Effects of titanium dioxide nano-particles on growth and some histological parameters of zebrafish (*Danio rerio*) after a long-term exposure. *Aquat Toxicol*, 101(3), 493-499. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.12.004>
- Evans, D.H. (1987). The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. *Environ Health Perspect*, 71, 47. <https://doi.org/10.1289/ehp.877147>
- Fabian, E., Landsiedel, R., Ma-Hock, L., Wiench, K., Wohlleben, W., Van Ravenzwaay, B. (2008). Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. *Arch Toxicol*, 82(3), 151-157. <https://doi.org/10.1007/s00204-007-0253-y>
- Federici G., Shaw B. J., Handy R. D. (2007). Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquat Toxicol*, 84, 415-430. <https://doi.org/10.1007/s00204-007-0253-y>
- Fernandes, C., Fontáinhas-Fernandes, A., Rocha, E., Salgado, M.A. (2008). Monitoring pollution in Esmoriz-Paramos lagoon, Portugal: Liver histological and biochemical effects in *Liza saliens*. *Environ Monit Assess*, 145(1), 315-322. <https://doi.org/10.1007/s10661-007-0041-4>
- Hao L., Wang Z., Xing B. (2009). Effect of sub-acute exposure to TiO<sub>2</sub> nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in juvenile carp (*Cyprinus carpio*). *J Environ Sci*, 21, 1459-1466. [https://doi.org/10.1016/s1001-0742\(08\)62440-7](https://doi.org/10.1016/s1001-0742(08)62440-7)
- Johari, S.A., Kalbassi, M.R., Yu, I.J., Lee, J.H. (2015). Chronic effect of waterborne silver nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): histopathology and bioaccumulation. *Comp Clin Path*, 24, 995-1007. <https://doi.org/10.12980/jclm.4.2016j6-11>
- Kim, S., Choi, J.E., Choi, J., Chung, K.H., Park, K., Yi, J., Ryu, D.Y. (2009). Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicol In Vitro*, 23(6), 1076-1084. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.06.001>
- Kogut, M.H., McGruder, E.D., Hargis, B.M., Corrier, D.E., DeLoach, J.R. (1994). Dynamics of avian inflammatory response to Salmonella-immune lymphokines. *Inflamm*, 18(4), 373-388. <https://doi.org/10.1007/BF01534435>
- Lee, B.C., Kim, K.T., Cho, J.G., Lee, J.W., Ryu, T.K., Yoon, J.H., Lee, S.H., Duong, C.N., Eom, I.C., Kim, P.J., Choi, K.H. (2012). Oxidative stress in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Mol Cell Toxicol*, 8(4), 357-366. <https://doi.org/10.1007/s13273-012-0044-2>
- López-Serrano Oliver, A., Munoz-Olivas, R., Sanz Landaluz, J., Rainieri, S., Cámara, C. (2015). Bioaccumulation of ionic titanium and titanium dioxide nanoparticles in zebrafish eleutheroembryos. *J Nanotechnol*, 9(7), 835-842. <https://doi.org/10.3109/17435390.2014.980758>
- Lovern, S.B., Klaper, R. (2006). Daphnia magna mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C-60) nanoparticles. *Environ Toxicol Chem*, 25, 1132-1137. <https://doi.org/10.1897/05-278R.1>
- Mansouri, B., Maleki, A., Davari, B., Johari, S.A., Shahmoradi, B., Mohammadi, E., Shahsavari, S., (2016). Histopathological effects following short-term coexposure of *Cyprinus carpio* to nanoparticles of TiO<sub>2</sub> and CuO. *Environ Monit Assess*, 188(10), 575. <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5579-6>
- Nam, S. H., Shin, Y. J., Lee, W. M., Kim, S. W., Kwak, J. I., Yoon, S. J., An, Y. J. (2015). Conducting a battery of bioassays for gold nanoparticles to derive guideline value for the protection of aquatic ecosystems. *Nanotoxicology*, 9(3), 326-335. <https://doi.org/10.3109/17435390.2014.930531>
- Olurin, K.B., Olojo, E.A.A., Mbaka, G.O., Akindele, A.T. (2006). Histopathological responses of the gill and liver

- tissues of *Clarias gariepinus* fingerlings to herbicide, glyphosate. *Afr J Biotechnol*, 5(24), 2480.
22. Ostaszewska, T., Chojnacki, M., Kamaszewski, M., Sawosz-Chwalibog, E. (2016). Histopathological effects of silver and copper nanoparticles on the epidermis, gills, and liver of Siberian sturgeon. *Environ Sci Pollut Res Int*, 23, 1621-1633. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5391-9>
  23. Pini, M., Rosa, R., Neri, P., Bondioli, F., Ferrari, A. M. (2015). Environmental assessment of a bottom-up hydrolytic synthesis of TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Green Chemistry*, 17(1), 518-531. <https://doi.org/10.1039/C4GC00919C>
  24. Priprem, A., Mahakunakorn, P., Thomas, C., Thomas, I. (2010). Cytotoxicity studies of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in macrophage and liver cells. *Am J Nanotechnol* 1, 78-85. <https://doi.org/10.3844/ajns.2010.78.85>
  25. Shi, H., Magaye, R., Castranova, V., Zhao, J. (2013). Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part Fibre Toxicol*, 10(1), 15. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-15>
  26. Shirdel, I., Kalbassi, M.R. (2016). Effects of nonylphenol on key hormonal balances and histopathology of the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 183, 28-35.
  27. Skocaj, M., Filipic, M., Petkovic, J., Novak, S. (2011). Titanium dioxide in our everyday life; is it safe?. *Radiol Oncol*, 45(4), 227-247. <https://doi.org/10.2478/v10019-011-0037-0>
  28. Smith, C.J., Shaw, B.J., Handy, R.D. (2007). Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. *Aquat Toxicol*, 82(2), 94-109. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.02.003>
  29. Wilson, J. M., Castro, L. F. C. (2011). Morphological diversity of the gastrointestinal tract in fishes. In: *The Multifunctional Gut of Fish*. Fish Physiology. Grosell, M., Farrell, A. P. Brauner, C. J. (eds.). (1<sup>st</sup> ed.). Netherland, Amsterdam. Academic Press, p. 136-164. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(10\)03001-3](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(10)03001-3)
  30. Wu, Y., Zhou, Q. (2013). Silver nanoparticles cause oxidative damage and histological changes in medaka (*Oryzias latipes*) after 14 days of exposure. *Environ Toxicol Chem*, 32, 165-173. <https://doi.org/10.1002/etc.2038>





## Histopathological Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles on Gill, Liver and Intestinal Tissues of Caspian Trout (*Salmo caspius*) in Acute Toxicity

Seyyed Morteza Ebrahimzadeh<sup>1</sup>, Mohammad Reza Kalbassi<sup>1</sup>, Mahdi Habibi Anbouhi<sup>2</sup>, Parvaneh Farzaneh<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Aquaculture, Faculty of Marine Sciences University of Tarbiat Modares, Noor, Iran

<sup>2</sup>National Cell Bank of Iran, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

<sup>3</sup>Human and Animal Cell Bank, Iranian Biological Resource Center, ACECR, Tehran, Iran



10.22059/jvr.2018.259667.2806

Received 17 September 2019, Accepted 23 November 2019

### Abstract

**BACKGROUND:** Titanium dioxide nanoparticles (TiO<sub>2</sub>NPs) are used in many commercial products, including paints, sunscreens and edible products, and can be used directly and indirectly in aquaculture. Due to the widespread application of these nanoparticles, the investigation of their possible effects on aquatic organisms is necessary.

**OBJECTIVES:** The purpose of this study was to investigate the histopathological effects of waterborne TiO<sub>2</sub>NPs on the gills, liver and intestine of Caspian trout.

**METHODS:** In this study, 126 fish (27.46±4.3 g) were tested in six concentrations of TiO<sub>2</sub>NPs (0, 0.01, 0.1, 1, 10 and 100 mg/L) for 4 days. At the end of the experiment, tissues were evaluated to determine the effects of tissue damage caused by TiO<sub>2</sub>NPs.

**RESULTS:** The 96-h exposure to TiO<sub>2</sub>NPs did not cause fish mortality. Accordingly, investigated TiO<sub>2</sub>NPs are classified as "relatively non-toxic". The most important tissue changes caused by short-term exposure to TiO<sub>2</sub>NPs were hyperplasia and hypertrophy, lamellar fusion, necrosis in gills; foci of melanomacrophage deposits, aggregation of blood cell, hepatocytes with pycnotic nuclei, vacuolation, necrosis in liver; thickening of lamina propria, erosion of villi and necrosis in intestine.

**CONCLUSIONS:** Although TiO<sub>2</sub>NPs are relatively non-toxic, due to the tissue damage observed, these nanoparticles can be harmful to Caspian trout.

**Keywords:** Titanium dioxide nanoparticles, Toxicology, Histopathology, Acute toxicity, Caspian trout

Copyright © 2020. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author's email: kalbassi\_m@modares.ac.ir Tel/Fax: 011-44553101

### How to cite this article:

Ebrahimzadeh, S., Kalbassi, M., Habibi Anbouhi, M., Farzaneh, P. (2020). Histopathological Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles on Gill, Liver and Intestinal Tissues of Caspian Trout (*Salmo caspius*) in Acute Toxicity, J Vet Res, 75(1), 65-73.

<https://doi.org/10.22059/jvr.2018.259667.2806>

### Figure Legends and Table Captions

**Table 1.** Histopathological findings in Caspian trout gills, liver and intestine after acute exposure to TiO<sub>2</sub>NPs and the control group. \* No change (-), mild change (+), moderate change (++) and severe change (+++).

**Figure 1.** Histological changes observed in gills of Caspian trout after 4 d of exposure to TiO<sub>2</sub>NPs. (a) control, (b) 10 mg/L, (c) 100 mg/L. hypertrophy (Ht), hyperplasia (Hp), shortening of second lamellae (SSL), epithelial lifting (EL) and lamellar fusion (LF) (H&E; ×400).

**Figure 2.** The histopathology of the Caspian trout Liver after exposure to TiO<sub>2</sub>NPs for 4 days. (a) control, (b) 10 mg/L, (c) 100 mg/L. hepatocyte (H), sinusoids (S), melanomacrophage aggregates (MA), aggregation of blood cell (AB), pycnotic nuclei (PN), vacuolation (V) and necrosis (N) (H&E; ×400).

**Figure 3.** Intestine morphology in Caspian trout following waterborne exposure to TiO<sub>2</sub>NPs for 4 days. (a) control, (b) 100 mg/L. vacuolation (V), erosion of villi (E) and necrosis (N). (H&E; 400).