

Genotoxicity of Magnetic Iron Oxide (Fe₃O₄) Nanoparticles in Red Blood Cells of Common Carp (*Cyprinus carpio*) Using Micronucleus Assay under Acute and Chronic treatment

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Mashjoor S.¹ PhD,
Yousefzadi M.*¹ PhD,
Zolgharnain H.² PhD,
Kamrani E.¹ PhD,
Alishahi M.³ PhD

How to cite this article

Mashjoor S, Yousefzadi M, Zolgharnain H, Kamrani E, Alishahi M. Genotoxicity of Magnetic Iron Oxide (Fe₃O₄) Nanoparticles in Red Blood Cells of Common Carp (*Cyprinus carpio*) Using Micronucleus Assay under Acute and Chronic Treatment. Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(4):537-547.

¹Marine Biology Department, Marine Science & Technology Faculty, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

²Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science & Technology, Khorramshahr University of Marine Science & Technology, Khorramshahr, Iran

³Clinical Sciences Department, Veterinary Medicine Faculty, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

*Correspondence

Address: University of Hormozgan, 9 Kilometer Minab Road, Bandar Abbas, Iran. Postal Code: 7916193145
Phone: -
Fax: -
morteza110110@gmail.com

Article History

Received: May 08, 2017

Accepted: December 31, 2017

ePublished: December 21, 2018

ABSTRACT

Aims In nanoecotoxicology science, fish erythrocyte micronucleus assay for the monitoring genotoxic potential of nanoparticles is a powerful biomarker. This study was conducted with the aim of investigating genotoxicity of magnetic iron oxide (Fe₃O₄) nanoparticles in red blood cells of common carp (*Cyprinus carpio*) using micronucleus assay under acute and chronic treatment.

Materials & Methods In the current experimental study, the genotoxicology of Fe₃O₄ nanoparticles was performed during an acute (96 hours; 5 concentrations including 0, 10, 100, 500, and 1000 mg/l) and chronic (14 days; 3 concentrations including 0, 100, and 500 mg/l) of Fe₃O₄ nanoparticles in three replications. The data were analyzed by IBM SPSS 19, using two-way ANOVA, and Duncan's new multiple range test.

Findings Acute exposure to Fe₃O₄ nanoparticles had no acute toxicity effect juvenile carp (*C. carpio*). By increasing the concentration of nanoparticles in a 96-hour interval, the frequency of micronucleus (‰) and other abnormal forms around the red blood cell nucleus of juvenile carps showed a significant increase compared to the control group (p<0.05). In the chronic treatment at concentrations of 100 and 500 mg/l of Fe₃O₄ nanoparticles, the rate of increase in the frequency of micronucleus was similar to the acute functional test of concentration.

Conclusion Although Fe₃O₄ nanoparticles do not have acute toxicity effects in common carp and are non-toxic, they tend to induce genotoxic effects by increasing the frequency of micronucleus and other abnormalities of the red blood cell core during a concentration-dependent process. So, it seems that the release of Fe₃O₄NPs into the environment, it is probable adverse effects on aquatic ecosystems.

Keywords Toxicity; *Cyprinus carpio*; Micronucleus; Magnetic Iron Oxide (Fe₃O₄) Nanoparticles

CITATION LINKS

[1] Green biosynthesis and characterization of magnetic ... [2] Surface-modified superparamagnetic nanoparticles ... [3] Long-circulating iron oxides for MR ... [4] Development and experimental use of receptor-specific ... [5] Development of superparamagnetic ... [6] Magnetically controlled targeted micro-carrier ... [7] Size-controlled synthesis of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles ... [8] Synthesis and characterization of Fe₃O₄ nanoparticles ... [9] Detection of a micron-sized magnetic ... [10] Endothelial dysfunction and ... [11] Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry ... [12] Effects of iron oxide nanoparticles: Cytotoxicity ... [13] Assessment of the piscine micronucleus test as an ... [14] Micronucleus test in fish genome: A sensitive monitor ... [15] Assays with *Daphnia magna* and ... [16] Oxidative stress responses in ... [17] Effect of sub-acute exposure ... [18] Test No. 203: Fish, acute toxicity ... [19] Study on silver nanoparticles toxicity in *Cyprinus* ... [20] Evaluation of the toxic impact of silver ... [21] Detection of cytogenetic ... [22] Fish micronuclei for assessing genotoxicity ... [23] HUMN project: Detailed description of the scoring ... [24] Induction of micronuclei and nuclear abnormalities ... [25] Micronucleus test: The effect of ascorbic ... [26] Micronucleus test in fish cells: A bioassay for ... [27] Globally Harmonized System of classification ... [28] Test No. 474: Mammalian erythrocyte micronucleus ... [29] Test No. 487: In vitro mammalian cell ... [30] The OECD's micronucleus test guideline for single ... [31] Micronucleus test, nuclear ... [32] In vitro genotoxicity testing using ... [33] Molecular mechanisms of micronucleus ... [34] Effects of aqueous suspensions of titanium ... [35] Nanoecotoxicity effects of engineered silver ... [36] Role of oxidative damage in toxicity ... [37] Nanomaterials and nanoparticles ... [38] Multifunctional superparamagnetic ... [39] The role of iron redox state ... [40] Coating-dependent induction of ... [41] Titanium dioxide nanoparticles induce ... [42] Iron oxide nanoparticle-induced ... [43] Effects of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles ... [44] Copper oxide nanoparticles are ... [45] Size-dependent toxicity of metal ... [46] Oxidative stress and nano-toxicity ... [47] Use of thyroid hormones and micronucleus as ...

بررسی اثرات ژنوتوکسیک نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی در گلبول‌های قرمز ماهی کپور معمولی به روش میکرونوکلوئوس تحت تیمار حاد و مزمن

سکینه مشجور PhD

گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

مرتضی یوسف‌زادی* PhD

گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

حسین ذوالقرنین PhD

گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران

احسان کامرانی PhD

گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

مجتبی علیشاهی PhD

گروه بهداشت آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

چکیده

اهداف: در علم نانوبوم‌سم‌شناسی، آزمون میکرونوکلوئوس گلبول‌های قرمز ماهیان در پایش پتانسیل ژنوتوکسیک نانوذرات، نشانگر زیستی قدرتمندی است. هدف پژوهش حاضر، بررسی اثرات ژنوتوکسیک نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی (Fe_3O_4) در گلبول‌های قرمز ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) به روش میکرونوکلوئوس تحت تیمار حاد و مزمن بود.

مواد و روش‌ها: در پژوهش تجربی حاضر، سمیت‌سنجی ژنوتوکسیک نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی طی یک مواجهه حاد (۹۶ ساعته؛ پنج غلظت شامل صفر، ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) و مزمن (۱۴ روزه؛ سه غلظت شامل صفر، ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) از نانوذرات اکسید آهن در سه تکرار صورت پذیرفت. داده‌ها توسط آزمون آماری آنالیز واریانس دوطرفه و آزمون چنددامنه‌ای دانکن با استفاده از نرم‌افزار IBM SPSS 19 مورد تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: مواجهه حاد با نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی روی بچه‌ماهیان کپور اثر سمیت حاد نداشت. با افزایش غلظت نانوذرات طی یک بازه زمانی ۹۶ ساعته فراوانی میکرونوکلوئوس‌ها (%) و دیگر اشکال غیرطبیعی در اطراف هسته گلبول‌های قرمز خون بچه‌ماهیان کپور معمولی در مقایسه با گروه کنترل افزایشی معنی‌دار نشان داد ($p < 0.05$). در تیمار مزمن در غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی، نرخ افزایش فراوانی میکرونوکلوئوس‌ها مشابه آزمون حاد تابعی از غلظت بود.

نتیجه‌گیری: علی‌رغم اینکه نانوذرات اکسید آهن، اثرات سمیت حاد در ماهیان کپور معمولی ندارند و جزء مواد غیرسمی هستند ولی طی یک روند وابسته به غلظت، موجب القای اثرات ژنوتوکسیک با افزایش فراوانی میکرونوکلوئوس‌ها و دیگر ناهنجاری‌های غیرطبیعی هسته گلبول‌های قرمز می‌شوند. بنابراین به نظر می‌رسد در صورت رهایش این نانوماده به محیط زیست، اثرات نامطلوب آن بر بوم‌سازگان آبی محتمل باشد.

کلیدواژه‌ها: سمیت، سمپرنیوس‌کارپیو، میکرونوکلوئوس، نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۱۰

*نویسنده مسئول: morteza110110@gmail.com

مقدمه

در سال‌های اخیر در میان نانومواد اکسید فلزی، نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی (مگنتیت یا Fe_3O_4) با یک شیمی سطحی مناسب (افزایش سطح تماس و بلندتر شدن انحنا سطحی)، خصوصیات منحصر به فرد کوانتومی، مکانیکی، فیزیکی، دمایی، الکتریکی سوپراامغناطیسی و توان کاتالیکی بالا، کانون توجهات بسیاری بوده است و برای کاربردهای بسیاری در حوزه‌های

زیست‌پزشکی، داروسازی، تصفیه محیط زیست و صنعت معرفی و هدف‌گیری شده که عمدتاً بر خصوصیات مغناطیسی ارزشمند نانوذرات مگنتیت متمرکز هستند^[1]. آنها کاربردهای بی‌شماری در شرایط "در محیط زنده" و "در شیشه" دارند که از آن جمله می‌توان به افزایش تمایز و کنتراست در تصویربرداری تشدید مغناطیسی (MRI) و بافت‌های توموری، سم‌زدایی از مایعات زیستی، جریان مغناطیسی فوق گرمایی (هایپرترمیا) در درمان سرطان، مگنتوفکشن، سلول‌درمانی و برچسب‌زدن ماکرومولکول‌ها و سلول‌ها، انتقال ژن و کاربردهای انتقال دارو به صورت میسل‌های نانوذرات اکسید آهن، سیالات آهن‌دار (فروسایالات)، ابزارهای ضبط و ذخیره‌سازی داده، بیورسانه، مواد محافظ اشعه در تلفن همراه، حسگرهای زیستی، مواد ماهواره‌های مرئی و فروسرخ، مایعات مغناطیسی (با قابلیت کاربری در آب‌بندی‌ها، ابزارآلات پزشکی ضدشوک، تنظیمات صدا و جلوه‌های نوری)، سربش‌هایی با خاصیت القای مغناطیسی، مواد رنگی، نانوجاذب‌ها (برای حذف فلزات سمی از پساب‌ها)، تصفیه و پالایش فاضلاب‌ها و پساب‌ها در محیط زیست، نانوجاذب‌ها (برای حذف فلزات سمی از پساب‌ها) و تصفیه و پالایش فاضلاب‌ها و پساب‌ها اشاره کرد^[1, 2].^[10] با این حال نظر به افزایش رو به رشد تولید و گسترش این نانومواد در علوم و فناوری، کمبود اطلاعات و داده‌ها در ارتباط با پتانسیل تأثیرات منفی احتمالی و پیش‌بینی احتمال رهایش آنها به زیست‌بوم‌های آبی، اهمیت و ضرورت طرح سئوالات جدی در ارتباط با مخاطرات زیست‌محیطی آبی آنها در بوم‌سازگان‌های دریایی را دوچندان ساخته است.

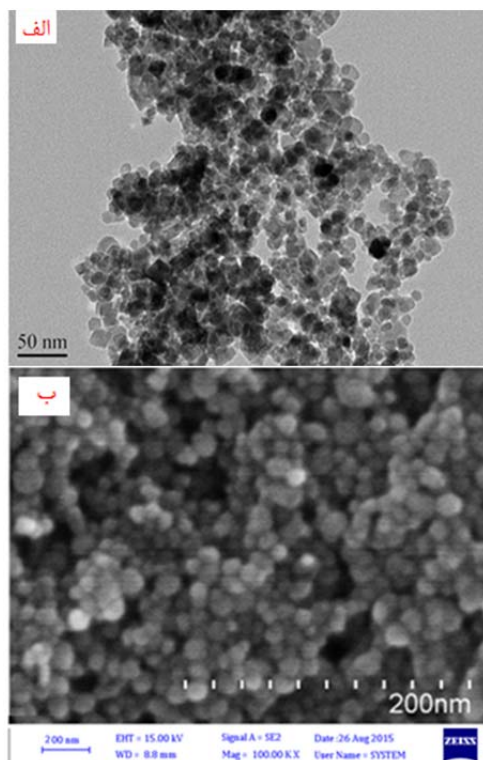
امروزه نانوذرات مهندسی‌شده (ENPs) به‌عنوان یک گروه جدید از آلاینده‌ها با درجه اهمیت بوم‌سم‌شناسی برای زیست‌بوم آبی معرفی شده‌اند، زیرا ورود آنها به خاک و نهایتاً مسیرهای آبی منتهی به دریاها و اقیانوس‌ها امری اجتناب‌ناپذیر است^[11]، بنابراین آینده رویکردهای بوم‌سم‌شناسی باید در جهت ارزیابی ترانسفورماسیون‌های زیستی و شیمیایی نانومواد و تأثیرات مضرشان بر ارگانیسم‌های هدف باشد.

تاکنون مطالعات نانوبوم‌سم‌شناسی نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی فقط بر آلودگی‌های اتمسفری، اثرات آن بر سیستم‌های تنفسی پستانداران یا ارزیابی‌های "در شیشه" در رده‌های مختلف سلول‌های پستانداران با سوگیری‌های دارویی اشاره داشته‌اند. گوپتا و ونز^[2] در مطالعه خود با بررسی سمیت‌سنجی نانوذرات اکسید آهن سوپراامغناطیسی میسل معکوس بر سلول‌های فیبروبلاست پوست انسان، عنوان داشته‌اند که این نانوذرات غیرسمی هستند و قابلیت کاربردهای زیست‌پزشکی و دارویی "در محیط زنده" و "در شیشه" را دارند. اما تمامی موارد گزارش شده به سرنوشت نهایی نانوذرات اکسید آهن به‌دنبال حضور اجتناب‌ناپذیر در محیط زیست‌های آبی توجهی نداشته است، برخلاف دیگر مواد سمی که تحقیقات بی‌شماری، آسیب‌رسانی آنها را در سطوح استرس اکسیداتیو، میتوکندری، کروموزوم، DNA، تغییرات چرخه سلولی و پروتئین به اثبات رسانده‌اند^[12]. در ارتباط با نانوذرات و به‌ویژه نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی، مکانیزم عملکرد و سمیت احتمالی آنها بر زیست‌مندان آبی کماکان نامشخص مانده است. بنابراین قبل از استفاده‌های متنوع از انواع نانوذرات اکسید آهن در سطوح وسیع، باید به این ابهامات تا حدودی پاسخ داد.

ارزیابی اثرات ژنوتوکسیک یک آلاینده مانند نانوذرات توسط شاخص‌های زیستی مختلف در هر دو شرایط "در محیط زنده" و "در شیشه" امکان‌پذیر است، از جمله مشاهده و شمارش کروموزوم‌ها

ایالات متحده)، میکروسکوپ الکترونی نگاره با قدرت تفکیک بالا (SEM؛ سیگما؛ آلمان) و آنالیز تفرق اشعه X (XRD؛ Panalytical؛ هلند) صورت پذیرفت (شکل ۱ و ۲-الف).

به‌منظور ارزیابی سمیت‌های حاد و مزمن به‌ترتیب استوک‌هایی از غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از پودر نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی حل‌شده در آب دیونیزه (بسیار خالص) تهیه و آماده‌سازی شد و برای دستیابی به یک محلول کلونیدی پایدار و نیز ممانعت از نشست نانوذرات اکسید آهن، استوک‌های تهیه‌شده به‌مدت ۴ ساعت در دستگاه اولتراسونیکاتور حمام‌دار (Elma؛ آلمان) با شرایط ۱۰۰ وات و ۴۰ کیلوهرتز و با فواصل زمانی خاموش/ روشن دستگاه (۳۰:۱۰ دقیقه) اولتراسونیکیت شدند. آنها پیش از اضافه‌نمودن به تیمارها و رقیق‌سازی برای حفظ شرایط سوسپانسیون و ثبات غلظت‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه دیگر روی همزن مغناطیسی قرار گرفتند [16]. در آزمون سمیت‌سنجی حاد، نرخ تلفات مهم‌ترین نقطه هدف است.



شکل ۱ (الف) تصویر TEM از نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی، (ب) نمایی از شکل کروی نانوذره در تصویر SEM



شکل ۲ (الف) نمایی از بسته‌بندی و پودر سیاه‌رنگ نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی، (ب) بچه‌ماهی کپور معمولی پس از تیمار با نانوذره اکسید آهن، (ج) سیستم طراحی‌شده برای بازچرخش کامل نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی در مخازن تیمار بندی بچه‌ماهیان

در مرحله متافاز که مستلزم صرف زمان و پیچیدگی‌های تکنیکی بسیاری است. اما در این میان آزمون‌هایی مانند میکرونوکلیئوس (ریزه‌سته) و ارزیابی ناهنجاری‌های غیرطبیعی هسته گلبول‌های قرمز خون محبوبیت بسیار بالایی دارند. این روش نخستین‌بار توسط کاراسکو و همکاران [13]، طی بررسی شکل‌گیری انواع ناهنجاری‌ها در ریخت‌شناسی هسته (NAS) در گلبول‌های قرمز خون ماهیان تحت تاثیر آلاینده‌هایی با عملکرد سیتوتوکسیک، ژنوتوکسیک، موتاژنیک و کارسینوژنیک شناسایی و گزارش شد. میکرونوکلیئوس یا ریزه‌سته در واقع هسته کوچک جداشده از هسته اصلی است که در خلال تقسیم سلولی تشکیل می‌شود و شامل کروموزوم‌ها یا قطعات کروموزومی ناشی از اختلال در عملکرد دوک میتوزی یا قطعات آسترینک در مرحله آنافاز است [14]. از آنجایی که این ریزه‌سته‌ها در سلول‌هایی که تقسیم آنها کامل شده است، ایجاد می‌شوند، به‌نوعی نشان‌دهنده وارد شدن سلول به فاز میتوز و دوهسته‌ای شدن طی چرخه سلولی هستند و یک نوع ناهنجاری سلولی محسوب می‌شوند، به همین دلیل ارزیابی ریزه‌سته در ماهیان به‌واسطه یک شاخص ساده و حساس از آسیب‌ها و شکست کروموزومی است که اطلاعاتی راجع به روند پیشرفت چرخه سلولی و سمیت سلولی تحت اثر عامل القاگر خارجی را نشان می‌دهد.

زیست‌آزمون روشی است که عکس‌العمل‌های موجودات آبی را به‌واسطه در معرض قرارگیری با غلظت‌های مختلف ماده آلوده‌کننده ارزیابی می‌کند و به‌منظور آشکارسازی، اندازه‌گیری یا تاثیر یک یا چند ماده سمی یا عوامل محیطی به‌تنهایی یا توأم با یکدیگر مورد استفاده قرار می‌گیرد [15]. ماهی کپور معمولی از خانواده کپورماهیان (سیپرینیده) است. این ماهی مقاومت بالا و رشد مناسبی در برابر استرس‌های محیطی دارد. بنابراین این گونه به‌منظور سمیت‌سنجی، پیش‌بینی و بررسی اثرات نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی بر آبزیان هدف‌گیری و گزینش شد.

هدف پژوهش حاضر، بررسی اثرات ژنوتوکسیک نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی در گلبول‌های قرمز ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) به روش میکرونوکلیئوس تحت تیمار حاد و مزمن بود.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر یک آزمایش تجربی است.

نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی، خصوصیات ذره‌ای و تعیین غلظت: پودر خالص و سیاه‌رنگ نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی مگنتیت با درجه خلوص ۹۹/۵٪ بدون پوشش با اندازه ذره ۱۵ تا ۲۰ نانومتر و شکل کروی (US NANO؛ ایالات متحده) تهیه شد و در ادامه، دیگر ویژگی‌های آن نیز مورد سنجش قرار گرفت. این نانوذرات در ایران از شرکت واسطه پیشگامان نانومواد ایرانیان خریداری شد که این شرکت برخی از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی را نیز برای این محصول ارائه نموده است. این خصوصیات شامل چگالی نانوذره ۴/۸ گرم بر سانتی‌متر مکعب و مساحت سطحی BET برابر با ۸۱/۹۸ مترمربع بر گرم و میانگین پتانسیل زتای ۷/۲±۱۷ میلی‌ولت بودند که توسط دستگاه زتاسایزر (مالورن؛ انگلستان) سنجش شدند. میانگین اندازه قطر هندسی ذره آن ۸/۰۵ نانومتر بود و توسط دستگاه پارتیکلسایزر (Scatterscope-I Qudix؛ کره) تعیین شد. سنجش ویژگی‌های دیگری مانند شکل، توزیع ذرات، اندازه و جنس نانوذره و طبیعت کریستاله آن هم با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM؛

پرورش و نگهداری ماهی: تعداد ۳۰۰ عدد بچه ماهی کپور معمولی، با وزن متوسط زیر ۲۰ گرم از یکی از کارگاه های تکثیر و پرورش ماهیان گرم آبی خریداری و به آزمایشگاه آبیان منتقل شدند. ماهیان پیش از تیمارهای سمیت سنجی، به مدت دو هفته با شرایط آزمایشگاه سازگار و با غذای خشک مصنوعی به نسبت ۲٪ وزن بدنشان، تغذیه شدند. تعویض آب آنها روزانه و نگهداری شان تحت یک شرایط نوری طبیعی و هوادهی ثابت بود و از دوره های خاص نوردهی/ تاریکی اجتناب شد، پیش از تیمار بندی با نانوذرات به مدت ۴۸ ساعت بدون غذا نگهداری شدند. ماهیان از مخازن اصلی به صورت تصادفی انتخاب و برای محاسبه غلظت کشنده ۹۷ ساعته (LC₅₀) و بررسی آزمون های نانوتوکسیسیتی مورد استفاده قرار گرفتند. در تیمار بندی ماهیان، به منظور پیشگیری از واکنش و رسوب دهی نانوذرات اکسید آهن با املاح موجود در آب، از آب شهری تصفیه، هوادهی و کلرزایی شده که خصوصیات کیفی آن شامل دمای ۱۱±۲۶°C، میزان pH برابر با ۸/۱±۰/۳۲، هدایت الکتریکی (EC) برابر با ۲۲۰ میکروزیمنس بر سانتی متر، میزان DO برابر با ۱/۸±۰/۷، میزان یون های آمونیاک کمتر از ۰/۱ بخش در میلیون (ppm)، نیتروژن دی اکسید (NO₂) و نیترات (NO₃) کمتر از ۰/۱ ppm بود، استفاده شد. به منظور تیمار ماهیان در غلظت های مختلف نانوذره و ممانعت از رسوب دهی نانوذرات اکسید آهن به علت جرم مولی بالا (اکسید آهن=۲۳۱/۵۳۲۶ گرم بر مول)، سیستمی با جریان هوادهی تحت فشار از پایین و بالای مخزن آبی به گونه ای طراحی شد که طی چرخش کامل آب درون مخزن، نانوذره نیز در محیط آبی در گردش بوده و از نشست آن جلوگیری به عمل آید، تا بدین شکل نرخ دسترسی زیستی نانوذرات اکسید آهن برای ماهیان تحت تیمارها ثابت باشد (شکل ۲-ب و ج). به منظور حفظ فاز آبی نسبتاً محلول از اکسید آهن، غلظت های تعیین شده از نانوذرات برای یک مواجهه حاد و مزمن ماهیان به صورت روزانه تهیه شده و درون مخازن تمدید می شد. برای نمونه های شاهد نیز تعویض آب به صورت روزانه بود. زیرا نرخ رسوب گذاری نانوذرات در آب سریع است و حتی با وجود هوادهی مستمر باز هم غلظت واقعی آنها در عرض ۳ روز تا ۵۰٪ اولیه کاهش پیدا می کند، بنابراین باید هر روز غلظت ها تمدید می شد تا ۱۰۰٪ حالت تعلیق حفظ شود [17]. در طول دوره در معرض قرارگیری با نانوذرات، ماهیان غذادهی نشدند تا احتمال جذب نانوذرات به غذا یا مواد دفعی به حداقل برسد و این گونه به حفظ سلامت و کیفیت آب کمک شد [16].

زیست آزمون حاد و مزمن نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی و نمونه گیری: ابتدا یک آزمون سمیت حاد، طراحی و انجام شد تا غلظت های وابسته به منحنی پاسخ های مرگ و میر تعیین شود. برای این منظور از دستورالعمل آزمون های سمیت حاد ماهیان (با توجه به رهنمود استاندارد شماره ۲۰۳ "سازمان توسعه و همکاری اقتصادی" برای ماهیان؛ OECD) استفاده شد [18]. برای آزمون سمیت حاد ۵ غلظت (صفر، ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر) متوالی از نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی با احتساب گروه کنترل (غلظت صفر میلی گرم در لیتر) در سه تکرار و در هر تکرار ۱۵ عدد ماهی در هر غلظت در نظر گرفته شد، به طوری که غلظت های ۱۰۰٪ تلفات و دوزهای غیرکشنده را نیز در بر بگیرد. ماهیان به هر غلظت اضافه شده و تلفات به صورت روزانه تا ۴ روز (۹۶ ساعت) در زمان های صفر، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت ثبت شدند. ماهیان مرده به منظور اجتناب از فساد و تغییر وضعیت کیفی آب سریعاً خارج می شدند. تمامی آزمون ها در یک زمان و در سه تکرار صورت

پذیرفت تا از اعتبار زیستی برخوردار باشد. سپس براساس تلفات ثبت شده، محاسبه LC₅₀ ۹۶ ساعته در سطح اطمینان ۹۵٪ انجام شد تا غلظت ایجادکننده ۵۰٪ تلفات و همچنین حداکثر غلظت قابل قبول نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی در ماهی کپور معمولی مشخص شود.

برای ارزیابی سمیت زیست محیطی (سمیت مزمن) تحت یک سطح پایین از مواجهه با نانوذره، بر پایه نتایج آزمون سمیت حاد دو غلظت بر حسب میلی گرم بر لیتر به عنوان دوز پایین (می بایست معادل ۰/۱ غلظت سمیت حاد باشد [19]) و دوز بالا به عنوان کمترین غلظتی که باعث از دست رفتن حیات جاندار می شود (LOEC)، انتخاب شد [20]. در این راستا پژوهش حاضر بر پایه پیش آزمون های پایلوت صورت پذیرفت. کپور ماهیان جوان به مدت ۱۴ روز تحت یک تیمار مزمن از غلظت های ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر در سه تکرار و در هر تکرار ۱۰ عدد ماهی در هر غلظت قرار گرفتند و ماهی ها از هر گروه در روزهای ۱، ۳، ۷ و ۱۴ در تیمار مزمن و در روز چهارم (۹۶ ساعت) در تیمار حاد نمونه گیری شدند. برای این منظور پس از بیهوش نمودن ماهیان با ماده بیهوشی ترکیب متان سولفانات (MS222)، خونگیری توسط سرنگ ۲/۵ سی سی هیپارینه شده از ورید ساقه دمی ماهی صورت گرفت.

آزمون میکرونوکلوئوس و دیگر ناهنجاری های هسته گلبول قرمز: برای این منظور یک قطره از نمونه های خون از هر تیمار مستقیماً روی اسلاید شیشه ای قرار گرفت و از آن گسترش خونی تهیه شد. سپس اسلایدها در معرض هوا خشک شدند. برای تثبیت سلول های خونی از چند قطره متانول استفاده شد و پس از گذشت ۱۰ دقیقه و خشک شدن مجدد اسلایدها، به وسیله محلول گیمسا ۱۰٪ به مدت ۲۰ دقیقه رنگ آمیزی شدند. در نهایت برای شمارش میکرونوکلوئوس یا ریزهسته ها اسلایدها زیر میکروسکوپ نوری (Olympus؛ ایالات متحده) با بزرگ نمایی ۱۰۰۰، با استفاده از روغن امرسیون مورد ارزیابی قرار گرفتند. فراوانی میکرونوکلوئوس ها (MN) در ۱۵۰۰ سلول گلبول قرمز از هر اسلاید تعیین شد و از هر نمونه خون ماهی کپور معمولی جوان در هر گروه تیمار از آزمون های سمیت حاد و مزمن، پنج اسلاید تهیه شد [21]. در گلبول های قرمز خون ماهیان، وجود اجسام کروموزومی غیرانکساری گرد یا بیضوی با قطری کوچک تر از یک سوم قطر هسته اصلی گلبول قرمز که معمولاً در قسمت های حاشیه ای هسته اصلی است یا کمی با هسته هم پوشانی دارند و مشابه هسته و با همان الگو رنگ گرفته اند، تحت عنوان میکرونوکلوئوس (ریزهسته) شمارش می شوند [22، 23]. آسیب های غیرطبیعی هسته گلبول های قرمز خون علاوه بر میکرونوکلوئوس ها، دیگر اشکال غیرطبیعی هسته را نیز در بر می گیرند که به همراه میکرونوکلوئوس ها عموماً به ۵ گروه تقسیم می شوند که شامل موارد زیر هستند:

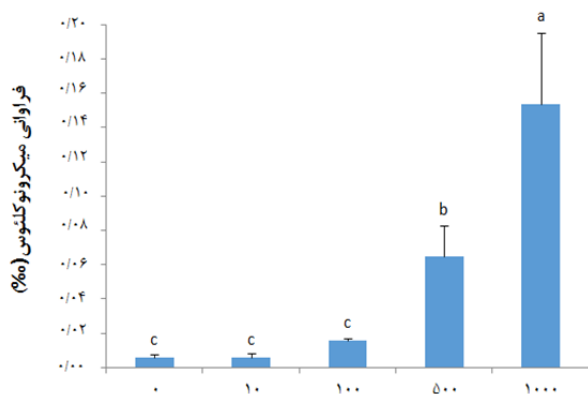
۱) میکرونوکلوئوس (MN)، ۲) دوهسته ای (BN)؛ زمانی که سلول های گلبول های قرمز دوهسته ای باشند، ۳) برآمدگی های هسته ای (BL)؛ در این حالت غشای هسته دارای برآمدگی هایی با محتوای کروماتینی است، ۴) هسته های لوب دار (چندجزئی)؛ BL؛ زمانی که برآمدگی های هسته ای بسیار بزرگ تر از حالت BL بوده و دارای چندین لوب یا بخش باشند، ۵) هسته های شکاف دار (NT)؛ وقتی هسته، واکوئل دار یا خلل و فرج دار بوده که این فضاهای خالی به طور مشخص تا عمق هسته امتداد یافته اند [21، 24، 25]. در پژوهش حاضر تعداد کل اشکال غیرطبیعی هسته مشتمل بر هر چهار نوع BN، BL، LB و NT در اسلایدهای تهیه شده از هر تیمار در آزمون های سمیت حاد و مزمن، به همراه میکرونوکلوئوس ها

علاوه بر میکرونوکلتوس‌ها، دیگر اشکال غیرطبیعی هسته گلبول‌های قرمز مشتمل بر هر ۴ نوع ناهنجاری LB، BL، BN و NT نیز در نمونه‌های خون بچه‌ماهیان کپور معمولی، تحت تیمارهای حاد و مزمن با نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی مشاهده شدند (شکل‌های ۴ تا ۶).

با افزایش غلظت نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی، طی یک مواجهه حاد ۹۶ ساعته، فراوانی کل اشکال غیرطبیعی هسته (%) در گلبول‌های قرمز خون بچه‌ماهیان کپور معمولی در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0.05$; نمودار ۲).

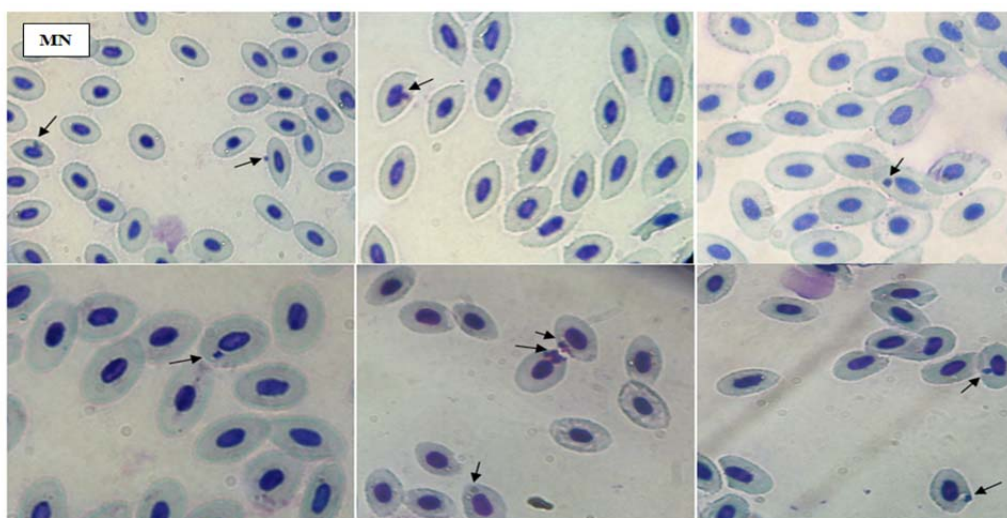
جدول ۱) نرخ تلفات بچه‌ماهیان کپور معمولی، تحت یک مواجهه حاد ۹۶ ساعته با نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی (تعداد کل=۴۵)

درصد کل تلفات	مرگ و میر				غلظت (میلی‌گرم بر لیتر)
	۹۶ ساعته	۷۲ ساعته	۴۸ ساعته	۲۴ ساعته	
۰	۰	۰	۰	۰	۰
۰	۰	۰	۰	۰	۱۰
۰	۰	۰	۰	۰	۱۰۰
۲	۱	۰	۰	۰	۵۰۰
۴	۱	۰	۱	۰	۱۰۰۰



غلظت نانوذرات Fe_3O_4 (mg/L)

نمودار ۱) فراوانی میکرونوکلتوس‌ها (%) در اطراف هسته گلبول‌های قرمز خون بچه‌ماهیان کپور معمولی تحت تیمار حاد ۹۶ ساعته با نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی غلظت صفر میلی‌گرم در لیتر مربوط به نمونه‌های شاهد است (حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف از نانوذرات اکسید آهن است؛ داده‌ها به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه شده است)



شکل ۳) تصویری از تشکیل میکرونوکلتوس‌ها در گلبول‌های قرمز بچه‌ماهیان کپور معمولی تحت یک تیمار حاد با نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی پیکان سیاه‌رنگ موقعیت آنها را در حوالی هسته نشان می‌دهد (عکس‌برداری با میکروسکوپ نوری - بزرگ‌نمایی ۱۰۰)

شمارش و تعیین شدند.

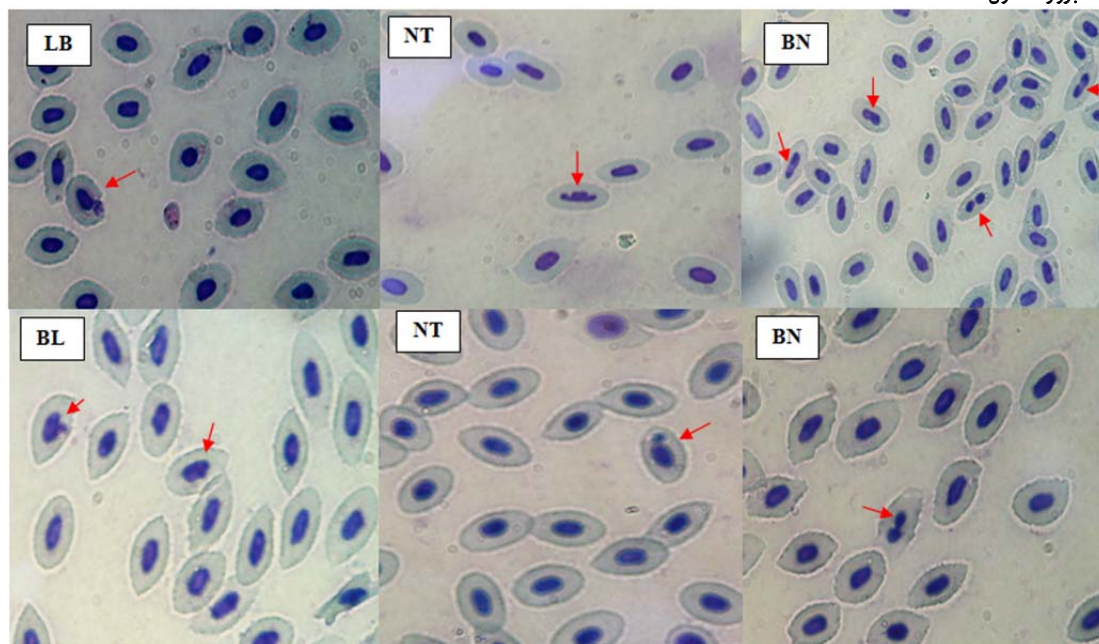
در پژوهش حاضر فراوانی ناهنجاری‌های هسته به‌صورت فراوانی کل ارایه شد، هر چند برآورد تفریقی ناهنجاری‌های هسته مبتنی بر چهار گروه ذکرشده زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ نیز انجام شد. به‌منظور تعیین غلظت‌های زیست‌آزمون مزمن، تاکید در انتخاب دوز بالا به‌عنوان سمیت تحت کشندگی یا کمترین غلظتی که باعث از دست‌رفتن حیات جاندار می‌شود و دوز پایین مبتنی بر ۰/۱ بالاترین غلظت سمیت حاد (۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) بود. بنابراین در تیمار مزمن دو غلظت ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر از نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی به‌عنوان غلظت‌های نماینده حد بالا و پایین از حداکثر غلظت مجاز این ماده طی یک مواجهه حاد بچه‌ماهیان کپور معمولی با نانوذرات اکسید آهن انتخاب شده و بروز پاسخ‌های استرس اکسیداتیو مبتنی بر سطوح مختلف ژنوتوکسیک تحت القای تیمار حاد و مزمن نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی در گلبول‌های قرمز بچه‌ماهیان کپور معمولی به روش میکرونوکلتوس ارزیابی و مقایسه شد.

نرمال‌بودن توزیع داده‌ها و همگنی واریانس‌ها توسط آزمون شاپیرو-ویلک بررسی شد. از آنالیز واریانس دوطرفه به‌منظور تعیین معنی‌داری اثر غلظت‌های مختلف، زمان و برهم‌کنش آنها استفاده شد. سپس با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن، معنی‌داری اختلاف میان تیمارهای مختلف مشخص شد. برای آنالیز آماری نرم‌افزار IBM SPSS 19 به کار رفت.

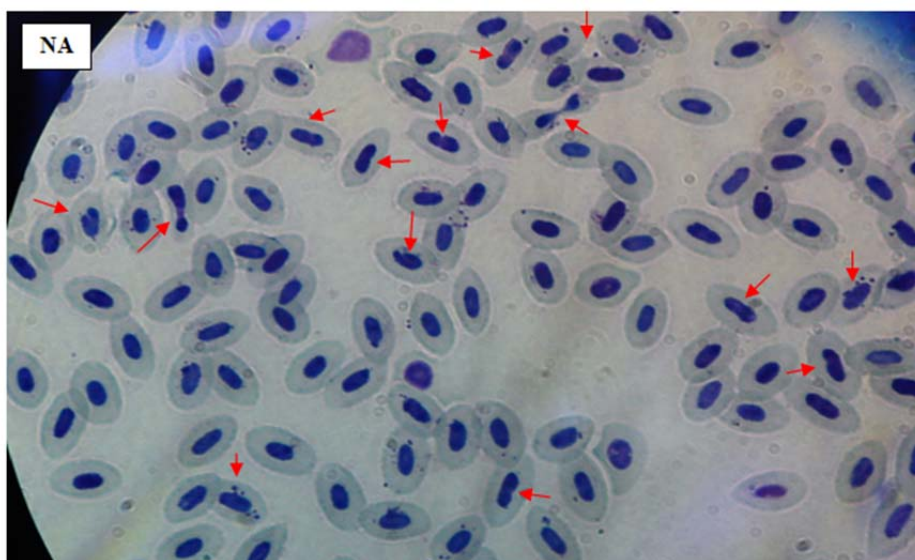
یافته‌ها

مواجهه حاد (۹۶ ساعته) با نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی روی بچه‌ماهیان کپور اثر سمیت حاد نداشت (جدول ۱)، به‌طوری که نرخ مرگ و میر در غلظت‌های پایین نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی (۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) صفر بود و در غلظت‌های بالای این نانوذره (۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) به‌ترتیب تلفاتی برابر با ۲ و ۴٪ جمعیت تحت تیمار داشت.

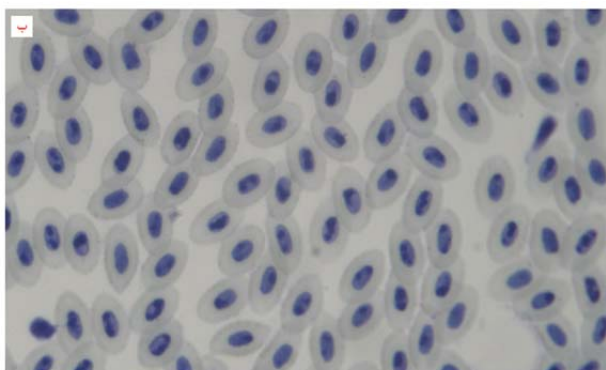
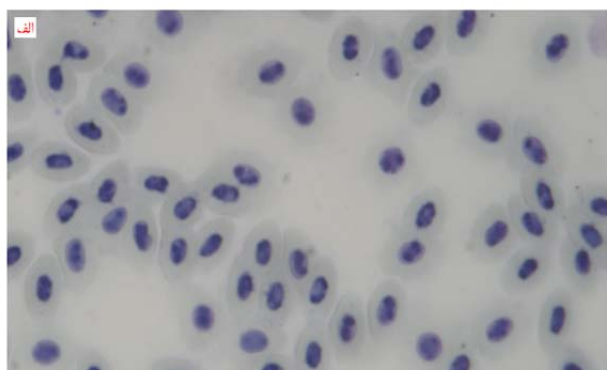
با افزایش غلظت نانوذرات اکسید آهن طی یک بازه زمانی ۹۶ ساعته مجاورت با نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی، فراوانی میکرونوکلتوس‌ها (%) در اطراف هسته گلبول‌های قرمز خون بچه‌ماهیان کپور معمولی در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد ($p < 0.05$; شکل ۳ و نمودار ۱).



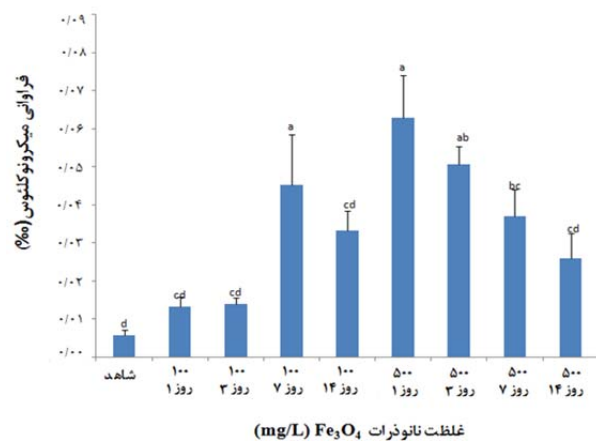
شکل ۴) تصویری از تشکیل ناهنجاری‌های غیرطبیعی هسته گلبول قرمز شامل چهار گروه: دوهسته‌ای (BN)، برآمدگی‌های هسته‌ای (BL)، هسته لوب‌دار (LB) و هسته شکاف‌دار (NT) در بچه‌ماهیان کپور معمولی تحت تیمار حاد (پیکان قرمز رنگ موقعیت آنها را در حوالی هسته نشان می‌دهد؛ عکس‌برداری با میکروسکوپ نوری - بزرگ‌نمایی ۱۰۰).



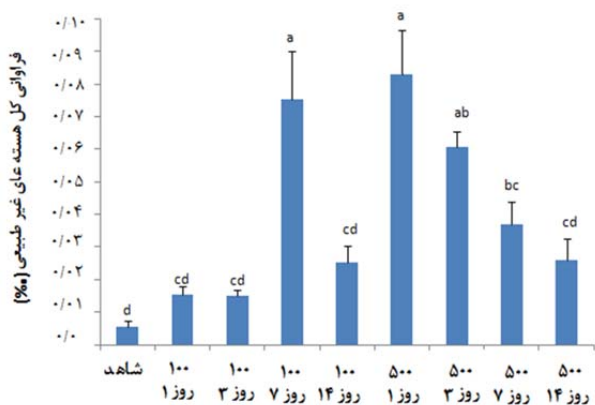
شکل ۵) نمایی از کل انواع اشکال غیرطبیعی هسته گلبول قرمز بچه‌ماهیان کپور معمولی تحت تیمار حاد (پیکان قرمز رنگ موقعیت آنها را در حوالی هسته نشان می‌دهد؛ عکس‌برداری با میکروسکوپ نوری - بزرگ‌نمایی ۱۰۰).



شکل ۶) تصاویری از توقف سلول‌ها در چرخه میتوز و بروز انواعی از ناهنجاری‌های هسته گلبول‌های قرمز خون ماهیان تحت تیمار حاد (عکس‌برداری با میکروسکوپ نوری - بزرگ‌نمایی ۱۰۰).



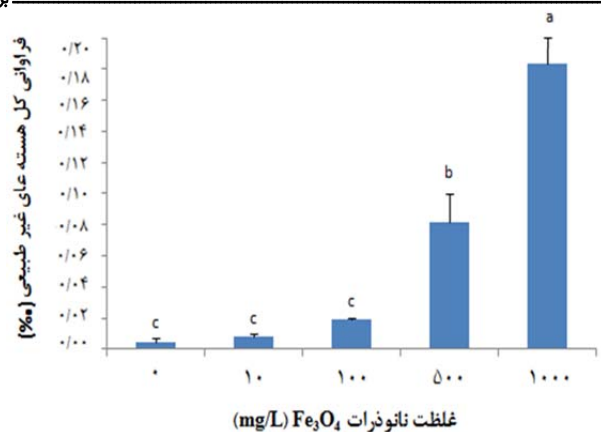
نمودار ۳) فراوانی میکرونوکلئوس‌ها (%) در اطراف هسته گلبول‌های قرمز خون بچه‌ماهیان کپور معمولی تحت تیمار مزمن ۱۴ روزه در غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر از نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی در مقایسه با شاهد (حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف از نانوذرات اکسید آهن است؛ داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است)



نمودار ۴) فراوانی کل ناهنجاری‌های غیرطبیعی هسته‌های (%) گلبول‌های قرمز خون بچه‌ماهیان کپور معمولی تحت تیمار مزمن ۱۴ روزه در غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر از نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی در مقایسه با شاهد (حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف از نانوذرات اکسید آهن است؛ داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است)

بحث

پژوهش حاضر با هدف بررسی اثرات ژنوتوکسیک نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی در گلبول‌های قرمز ماهی کپور معمولی به روش میکرونوکلئوس تحت تیمار حاد و مزمن انجام شد. امروزه در پژوهش‌های زیست‌محیطی، مطالعات ژنوتوکسیک جایگاهی بسیار ویژه و بحرانی به‌خصوص در حوزه نانواکوبوم‌سم‌شناسی دارند، زیرا پایش پتانسیل ژنوتوکسیک نانوذرات در ارگانیزم‌های آبی علی‌رغم مطالعات دهه‌های اخیر بسیار کم شناخته و بررسی شده است و باید به این مساله نیز توجه کرد که بسیاری از آلاینده‌های حال حاضر در بوم‌سازگان‌های آبی اگرچه در ظاهر خطر و تهدیدی را متوجه بقا و فیزیولوژی حیات برخی از آبزیان نداشته‌اند، اما پژوهش‌های اخیر نشان داده است که آنها بسیاری از تغییرات ژنتیکی (مشمول بر ژنتیک، اپی‌ژنتیک، کلاستوژنیک، آنیوژنیک و غیره) در ارگانیزم هدف آبی را القا می‌کنند و به انواع جهش‌ها و سرطان‌ها یا تهدیدات برای بقای نسل



نمودار ۲) فراوانی کل ناهنجاری‌های غیرطبیعی هسته‌های (%) گلبول‌های قرمز خون بچه‌ماهیان کپور معمولی تحت تیمار حاد با نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی غلظت صفر میلی‌گرم در لیتر مربوط به نمونه‌های شاهد است (حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف از نانوذرات اکسید آهن است؛ داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است)

ترتیب فراوانی LB < BL < NT < BN بود. نظر به این که اختلافات مشاهده‌شده بین فراوانی‌های آنها معنی‌دار نبود ($p > 0.05$)، فراوانی کل ناهنجاری غیرطبیعی در هسته گلبول‌های قرمز بین غلظت‌های مختلف از نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی مقایسه شد. نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی حتی تا غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نیز اثرات سمیت و مرگ‌ومیر بالا در ماهیان کپور معمولی را نداشتند.

تیمار مزمن ۱۴ روزه غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر از نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی، در بچه‌ماهیان کپور معمولی نشان داد که نرخ افزایش فراوانی میکرونوکلئوس‌ها مشابه آزمون حاد تابعی از غلظت بود، به‌طوری که در تمامی دوره‌های زمانی خونگیری از ماهیان در روزهای ۱، ۳، ۷ و ۱۴ در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر، فراوانی میکرونوکلئوس‌ها بالاتر از غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بود. بنابراین در تیمار مزمن در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر با افزایش زمان مجاورت با نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی، تا روز هفتم این روند افزایشی بود و در مقایسه با گروه شاهد اختلافی معنی‌دار نشان داد ($p < 0.05$)، اما در روز ۱۴ نرخ فراوانی میکرونوکلئوس‌ها روندی کاهشی در پیش گرفت و با روزهای یکم و سوم اختلاف معنی‌داری نداشت ($p > 0.05$).

در تیمار مزمن در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر که به‌نوعی یک سمیت‌سنجی تحت حاد نیز هست با افزایش زمان مجاورت با نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی، علی‌رغم این که در مقایسه با گروه شاهد اختلافات معنی‌دار بود ($p < 0.05$)، روند تغییر فراوانی میکرونوکلئوس‌ها کاهش نشان داد و تنها در روز اول بالاترین نرخ فراوانی میکرونوکلئوس‌ها مشاهده شد ($p < 0.05$ ؛ نمودار ۳).

نرخ افزایش فراوانی ناهنجاری غیرطبیعی هسته گلبول‌های قرمز مشابه آزمون حاد تابعی از غلظت بود و در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0.05$). بنابراین روند اختلافات مشاهده‌شده میان غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر از نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی طی افزایش زمان مجاورت با نانوذره مشابه روند مشاهده‌شده در آزمون میکرونوکلئوس‌ها طی تیمار مزمن بود (نمودار ۴).

منتهی می‌شوند. به‌علاوه برخلاف مطالعات آزمایشگاهی "در شیشه" که تنها یک شبیه‌سازی از مواجهه واقعی حیات با آلایندہ است، در آزمون‌های "در محیط زنده" و "درجا" (*in situ*) اطلاعات حاصل بسیار واقع‌گرایانه‌تر و با اهتمام به تمامی پیچیدگی‌های حیاتی جاندار خواهد بود^[26]. از این رو در پژوهش حاضر برای رسیدن به این هدف و طی اقدامی پیشگام، سمیت‌سنجی نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی "در محیط زنده" در بچه‌ماهیان کپور معمولی، طی یک مواجهه حاد و مزمن با نانوذرات اکسید آهن و القای پاسخ‌های استرس اکسیداتیو مبتنی بر ژنوتوکسیک به روش میکرونوکلوئوس ارزیابی و مقایسه شد.

طبق یافته‌های حاصل از پژوهش حاضر، نانوذرات برای بچه‌ماهیان کپور فاقد اثرات سمیت حاد بود، به‌طوری که حتی تا غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (و حتی در پیش‌آزمون‌های پیلوت تا ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) نیز اثرات سمیت و مرگ‌ومیر بالا را در ماهیان کپور معمولی بروز نداد. از این رو با توجه به دست‌بندی ارایه‌شده توسط سازمان ملل متحد^[27]، چنانچه ماده‌ای در ماهیان واجد سمیت حاد با غلظت کشنده میانی LC_{50} ۹۶ ساعته بیشتر از ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر باشد، جزء مواد غیرسمی است و نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی در گروه آلایندہ‌های غیرسمی قرار می‌گیرند. علی‌رغم این که نانوذرات اکسید آهن منجر به بروز اثرات سمیت حاد در بچه‌ماهیان کپور معمولی نشدند، اما طی روندی وابسته به غلظت، القای آسیب‌های کروموزومی، ژنوتوکسیک و افزایش معنی‌داری در فراوانی شکل‌گیری ریزهسته یا میکرونوکلوئوس و دیگر ناهنجاری‌های غیرطبیعی هسته را در گلبول‌های قرمز خون ماهی در پی داشتند. به‌علاوه مقایسه نتایج تیمار مزمن ۴ روزه ماهیان کپور معمولی با نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی نشان داد که اگرچه نرخ افزایش فراوانی MN ها و NA تابعی از غلظت و زمان مجاورت با نانوذره است، اما افزایش زمان مجاورت به‌ویژه در هفته دوم تیمار حتی در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر (حد بالای تیمار مزمن) نیز به کاهش فراوانی MN و NA منتهی شد که این امر می‌تواند ناشی از سازگاردن بدن ماهی با شرایط تیمار، فعال‌سازی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی برای مقابله با شرایط استرس‌زای مجاورت با نانوذرات اکسید آهن و عملکرد بازترمیمی آن در بهبود آسیب‌های اکسیداتیو وارده به DNA و کروموزوم‌ها تحت القای نانوذره باشد.

مطالعه حاضر، سمیت‌سنجی نانوذرات اکسید آهن در گلبول‌های قرمز خون ماهیان کپور معمولی طبق رویکرد استاندارد اعلام‌شده توسط OECD^[28] را بررسی کرد و در راستای اهداف آن بود. پژوهش حاضر نخستین گزارش از عملکرد ژنوتوکسیک این نانوذره در ماهیان است، زیرا OECD در سال ۲۰۱۶ طی بازبینی رهنمود ۴۷۴ در ارتباط با سمیت‌سنجی مواد شیمیایی با هدف تشخیص خطرات ژنوتوکسیک مواد شیمیایی، اعلام داشت که طبقه‌بندی مواد شیمیایی باید منوط به سنجش اثرات ژنوتوکسیک آن مبتنی بر آزمون میکرونوکلوئوس در اریتروسیست‌های پستانداران در شرایط "در شیشه" (بنا بر رهنمود OECD ۴۷۸)^[29] یا در سلول‌های اریتروبلاست موش در شرایط "در محیط زنده" طبق استاندارد ذکرشده باشد، به‌نحوی که بر پایه تحقیقات کینتیکی آنها، در بازه‌های زمانی ۲۵ تا ۵۰ ساعت پس از تیمار، پتانسیل القایی میکرونوکلوئوس توسط ماده شیمیایی حداکثر است^[30]. یافته‌های پژوهش حاضر نیز موید آن است.

آزمون میکرونوکلوئوس گلبول‌های قرمز ماهیان که در پژوهش حاضر بنای سمیت‌سنجی ژنتیکی نانوذرات اکسید آهن بود یک نشانگر

زیستی شناخته‌شده در بحث پایش ژنوتوکسیک است و از آنجایی که در ماهیان استخوانی، گلبول‌های قرمز هسته‌دار هستند، تشکیل میکرونوکلوئوس‌ها در سلول‌های خون ماهیان شاخص آسیب‌های کروموزومی است^[25] و شمارش میکرونوکلوئوس‌ها می‌تواند بازتابی از اثرات جهش‌زای آلایندہ تحت بررسی باشد و قابلیت آن در آشکارسازی وقایع کلاستوژنیک، آبیوژنیک و نیز برخی از تأثیرات اپی‌ژنتیک باعث‌شده در پایش آلایندہ‌های اکو-آسیب‌رسان آبی در سطح وسیعی مورد استفاده قرار گیرد^[26, 31]. بنابراین حساسیت به آشکارسازی آسیب‌های DNA و سیتوژنتیک، سهولت آزمون که با صرف زمان کوتاهی قابل اجرا است، دقت و کاربری وسیع آن در انواع مختلف سلولی بر محبوبیت آن افزوده است^[32].

میکرونوکلوئوس‌ها اجسام سیتوپلاسمی با محتوای کروماتینی هستند که شیوع آنها در سلول شاخصی از وقوع ژنوتوکسیک و بی‌ثباتی در کروموزوم‌ها است. اگرچه مکانیزم دقیق مسئول بروز این ناهنجاری‌ها هنوز کاملاً مشخص نیست^[21]. اما محققان اعتقاد دارند که شکل‌گیری ریزهسته‌ها و دیگر ناهنجاری‌های هسته مانند پل‌های نئوپلاستیک (NPBs)، جوانه‌های هسته (NBUDs) از لحاظ مکانیزم مولکولی، از مرحله آنافاز و تاخیر کروموزوم‌های آسنتریک یا قطعات کروماتینی که حاصل شکست‌های ترمیم‌نشده یا بدترمیم‌شده DNA هستند، بروز ناهنجاری‌هایی در رشته‌های دوک و نقص در تفکیک کل کروموزومی طی آنافاز و نقص در اشتراک‌گذاری صحیح کروموزوم‌ها در هسته سلول‌های دختری در طول فرآیند تقسیم سلولی منشا می‌گیرند که نتیجه آن هاپیومیتلاسیون قطعات تکرارشونده در DNA سنترومریک و پری‌سنترومریک، نقص در پروتئین‌های کینتوکور و نقص در رشته‌های دوک طی گردهمایی کروموزوم‌ها و نهایتاً نقص و عملکرد ناکارآمد ژن‌های بازرسی آنافاز است^[33]. منشا NPB‌ها نیز از کروموزوم‌های دی‌سنتریک یا اتصال انتهای تلومری شکل گرفته است یا به‌واسطه نقص در جداسازی کروماتیدهای خواهری در آنافاز تحت تأثیر نقص در ترتیب‌بندی آنها رخ می‌دهد و در این میان احتمال می‌رود جوانه‌های هسته نیز حاصل فرآیند حذف DNA همانندسازی‌شده، نقص در کمپلکس ترمیم DNA و احتمال حضور کروموزومی از سلول‌های آنیوپلوئیدی باشد^[33].

در بحث پتانسیل سمیت نانوذرات، دیدگاه‌ها متفاوت است، ولی محققان مهم‌ترین عامل موثر در سمیت نانوذرات را عمدتاً ناشی از فعالیت کاتالیکی بالا و کاهش مساحت سطحی ذره در حالت نانویی می‌دانند^[34]. با این وجود مطالعات متعدد نمایه‌های مختلفی از اثرات سمیت ژنتیکی نانوذرات مانند آسیب‌های اکسیداتیو DNA و کروموزوم، تعدیل رونویسی ژن‌ها و تغییر در تنظیمات چرخه سلولی را نشان داده‌اند. طبق دانش موجود مکانیزم عملکرد سمی نانوذرات هنوز ناشناخته است^[12]، اما یکی از اصلی‌ترین پیشنهادات مطرح‌شده در این بحث، تئوری جذب اندوسیتوزی نانوذرات در سلول، ایجاد تداخل در شیب الکتروشیمیایی غشا، تحریک تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) به‌واسطه اختلال در جریان الکترونی زنجیره تنفسی^[35] و پیشروی فرآیند استرس اکسیداتیو و به موجب آن التهاب بافتی به‌واسطه تعدیل غلظت کلسیم درون‌سلولی، آسیب به بیومولکول‌هایی مانند DNA و نهایتاً کاهش عملکرد فیزیولوژیک سلول، القای آپوپتوز و مرگ سلولی است^[36, 37].

نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن (ION) مشتمل بر انواع هماتیت (α -Fe₂O₃)، ماگنیت (γ -Fe₂O₃) و مگنتیت (Fe₃O₄) هستند. پژوهش‌های اخیر نشان داده‌اند این ION‌ها که هم نانوذرات

Wallago attu) بررسی کردند و نتایج ایشان نشان می‌دهد این نانوذرات طی یک روند وابسته به غلظت و اندازه نانوذره از قابلیت آسیب DNA، پراکسیداسیون لیپیدی و کربونیل‌اسیون پروتئینی برخوردار هستند. همچنین مطالعه‌ای دیگر برآورد فراوانی MN و NA را در گلبول‌های قرمز ماهیان نسبت به دیگر بافته‌ها به عنوان حساس‌ترین و مناسب‌ترین شاخص زیستی برای آلاینده‌ها معرفی کرد و طی بررسی اثرات آسکوربیک‌اسید بر ماهی پانتیوس *آلتوس* (*Puntius altus*) تحت مواجهه با سرب در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعته در گلبول قرمز، بافته‌های مختلف کبد، آبشش و باله، بالاترین میزان فراوانی را در بازه زمانی ۴۸ ساعته گزارش کرد. *کاواس* و *ارجن-گوزوکار* [26] نظر متفاوتی دارند و تحریک تولید میکرونوکلئوس تحت تاثیر آلاینده‌های هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای (PAHs) در سلول‌های آبشش کفال ماهی (*Mugil cephalus*) را نسبت به گلبول‌های قرمز بیشتر دانسته‌اند و بین فراوانی MN و NA رابطه مثبت و مستقیمی وابسته به دوز گزارش کردند. نتایج مشابهی نیز در تحقیق *کاواس* و *کانن* [21] در بررسی اثرات سیتوژنتیک و آسیب به DNA توسط علف‌کش گلی‌فسفات در ماهی قرمز (*Carassius auratus*) و نیز نگین‌تاجی و همکاران [47] در ارزیابی اختلالات اندوکرینی و سمیت سیتوژنتیک آلاینده بیس‌فنول آ (BPA) در ماهی شانک زرد باله (*Acanthopagrus latus*) خلیج فارس به روش میکرونوکلئوس گزارش شده است.

طبق داده‌های حاصل از پژوهش حاضر، می‌توان نتیجه گرفت که نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی جزء مواد غیرسمی طبقه‌بندی شده است، اما نظر به نتایج آزمون ژنوتوکسیک و القای شکل‌گیری ریزهسته و دیگر ناهنجاری‌های هسته در گلبول‌های قرمز خون بچه‌ماهیان کپور معمولی تحت تاثیر نانوذرات اکسید آهن، به نظر می‌رسد در صورت رهائش این نانوماده به محیط زیست، اثرات نامطلوبی روی بوم‌سازگان آبی داشته باشد، هر چند مطالعات بیشتر برای تعیین مکانیزم اختصاصی عملکرد نانوذرات در آسیب‌رسانی به DNA ماهیان ضروری است. در پژوهش حاضر محدودیتی مطرح نبوده است.

نتیجه‌گیری

علی‌رغم اینکه نانوذرات اکسید آهن، اثرات سمیت حاد در ماهیان کپور معمولی ندارند و جزء مواد غیرسمی هستند ولی طی یک روند وابسته به غلظت، موجب القای اثرات ژنوتوکسیک با افزایش فراوانی میکرونوکلئوس‌ها و دیگر ناهنجاری‌های غیرطبیعی هسته گلبول‌های قرمز می‌شوند.

تشکر و قدردانی: پژوهش حاضر در آزمایشگاه آبیان دانشکده دامپزشکی- دانشگاه شهید چمران اهواز صورت پذیرفته است و بدین‌وسیله از مسئولان محترم گروه بهداشت آبیان بیمارستان دامپزشکی به‌ویژه جناب آقایان دکتر مهرزاد مصباح، دکتر تکاور محمدیان و سرکار خانم دکتر طراوت ملایم‌رفتار تشکر و قدردانی می‌شود.

تأییدیه اخلاقی: کلیه مراحل تحقیقاتی پژوهش حاضر با حفظ اصول استاندارد اخلاقی و رعایت شرایط رفاه و آسایش ماهیان انجام شد. **تعارض منافع:** نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: سکینه مشجور (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث

اکسید آهن سوپرپارامغناطیسی (SPION) و هم‌یون‌های آهن را در بر می‌گیرند به دلیل توانایی متابولیزه شدن، رهاسازی آسان یون‌های آهن، حمل توسط شبه‌پروتئین‌هایی مانند فریتین، ترنس‌فریتین و هموسیدرین و ذخیره شدن در مخازن برون‌زاد، حایز اهمیت هستند [38]. اگرچه هنوز به‌درستی مشخص نیست که سمیت نانوذرات تا چه میزان به یون‌های آزاد شده از آنها و چه میزان به خود نانوذرات مربوط است، اما در هر حال یون‌های آهن و چندین نوع یون فلزی دیگر واجد توانایی تولید ROS و تحریک پراکسیداسیون لیپیدی غشای سلولی بوده و این امر ایمنی زیستی نانوذرات آهن را شک‌برانگیز ساخته است [39].

در بحث سمیت ژنتیکی نانوذرات ION که عمدتاً شرایط "در شیشه" را هدف ارزیابی‌ها قرار داده است، روش‌های استاندارد سنجش آسیب‌های اکسیداتیو DNA، عمدتاً شامل روش ستاره دنباله‌دار و آزمون میکرونوکلئوس (آنالیز موتاسیون‌های کروموزومی) هستند، با این وجود نتایج گزارش شده در مطالعات مختلف حتی در غلظت‌های مشابه هم تا حدودی متناقض است [12]، مانند اثبات رابطه مثبت میان درمعرض‌گذاری نانوذرات اکسید آهن و القای ژنوتوکسیسیته طی یک روند وابسته به غلظت در بسیاری از مطالعات صورت‌گرفته روی رده‌های مختلف سلول‌های انسانی مانند لنفوبلاستوئید (TK6)، فیبروبلاست ریه (IMR-90)، اپیتلیال برانشیایی انسانی (BEAS-2B)، اپیتلیال پوست (A431) و اپیتلیال ریه (A549) [40-43] که عمدتاً بر این باور بودند که اثرات سمی نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن بر بقای سلول حداقل است و فقط افزایش اندکی را در شمار سلول‌های آپتوز آن هم در دوزهای بالا نشان می‌دهند و این امر نشانی از سمیت پایین یا عدم سمیت سلولی آنها است. رابطه منفی گزارش شده در القای ژنوتوکسیسیته توسط IONها در مطالعه *کارلسون* [44، 45] و همچنین در مطالعه‌ای دیگر [39]، عدم القای آسیب DNA توسط نانوذرات مغناطیسی (Fe_3O_4 و Fe_2O_3) به روش ستاره دنباله‌دار و میکرونوکلئوس مشاهده شده است. بنابراین با وجود آن که مطالعات "در محیط زنده" عمدتاً زمان‌بر، گران و مستلزم رعایت اصول اخلاقی و برخی پیچیدگی‌ها مانند فرآیندهای توکسیکوکینتیک هستند، اما مزیت‌های آنها نسبت به آزمون‌های "در شیشه" کاملاً مشهود است و علی‌رغم مطالعات ناکافی در ارتباط با نانوذرات اکسید آهن، اکثریت موجود نیز بر پتانسیل اثرات ژنوتوکسیک IONها "در محیط زنده" اذعان داشته‌اند [12]. طبق نتایج مطالعات پیشین و پژوهش حاضر به نظر می‌رسد پتانسیل ژنوتوکسیک نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن عمدتاً ناشی از توانایی این نانوذرات در القای شکست DNA و آسیب‌های اکسیداتیو DNA بوده و این توانایی تا حد زیادی متأثر از خصوصیات مانند اندازه و طبیعت پوشش سطحی نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی است، اگرچه آزمون‌های ژنوتوکسیک قادر به پوشش‌دهی به تمامی پتانسیل ژنوتوکسیک در قالب آسیب‌های DNA نیستند و نتایج معکوس یک آزمون تضمین‌کننده عدم وجود خاصیت ژنوتوکسیک در IONها نیست. اتخاذ تاییدیه‌هایی مبنی بر اجرای استاندارد آزمون‌ها به‌ویژه در ارتباط با نانومواد برای حصول اطمینان الزامی است [12].

در ارتباط با پویش اثرات القایی ژنوتوکسیک در دیگر نانوذرات به روش میکرونوکلئوس می‌توان به پژوهش *دابی* و همکاران [46] استناد نمود که اثرات آسیب DNA و استرس اکسیداتیو تحت القای نانوذرات تیتانیوم‌دی‌اکسید (TiO_2) و زینک‌اکساید (ZnO) را در رده سلولی WAG (برگرفته از بافت آبشش گربه‌ماهی والاگو؛

Afr J Biotechnol. 2008;7(5):606-12.

15- Martins J, Oliva Teles L, Vasconcelos V. Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. *Environ Int*. 2007;33(3):414-25.

16- Hao L, Chen L. Oxidative stress responses in different organs of carp (*Cyprinus carpio*) with exposure to ZnO nanoparticles. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2012;80:103-10.

17- Hao L, Wang Z, Xing B. Effect of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*). *J Environ Sci (China)*. 2009;21(10):1459-66.

18- OECD. Test No. 203: Fish, acute toxicity test. In: OECD. OECD guidelines for the testing of chemicals, section 2: Effects on biotic systems. Paris: OECD Publishing; 1992.

19- Alishahi M, Dadar M, Mohammadian B. Study on silver nanoparticles toxicity in *Cyprinus carpio*: Effects on immunohematological and histological changes. 2nd International Congress on Fisheries and Aquaculture Science, Lahijan, Iran. Unknown publisher; 2011. p. 36-47. [Persian]

20- Chae YJ, Pham CH, Lee J, Bae E, Yi J, Gu MB. Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat Toxicol*. 2009;94(4):320-7.

21- Cavaş T, Könen S. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis*. 2007;22(4):263-8.

22- Al-Sabti K, Metcalfe CD. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat Res*. 1995;343(2-3):121-35.

23- Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E, et al. HUMN project: Detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res*. 2003;534(1-2):65-75.

24- Cavaş T, Ergene-Gözükar S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquat Toxicol*. 2005;74(3):264-71.

25- Jiraungkoorskul W, Sahaphong S, Kosai P, Kim MH. Micronucleus test: The effect of ascorbic acid on cadmium exposure in fish (*Puntius altus*). *Res J Environ Toxicol*. 2007;1(1):27-36.

26- Cavaş T, Ergene-Gözükar S. Micronucleus test in fish cells: A bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. *Environ Mol Mutagen*. 2005;46(1):64-70.

27- United Nations. Globally Harmonized System of classification and labelling of chemicals (GHS). Herndon V A: United Nations Publications; 2009. pp. 215-20.

28- OECD. Test No. 474: Mammalian erythrocyte micronucleus test. In: OECD. OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4: Health effects. Paris: OECD Publishing; 2016.

29- OECD. Test No. 487: In vitro mammalian cell micronucleus test. In: OECD. OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4: Health effects. Paris: OECD Publishing; 2014.

30- Morales-Ramírez P, Vallarino-Kelly T, Cruz-Vallejo VL. The OECD's micronucleus test guideline for single exposure to an agent and the genotox-kinetic alternative. *Mutagenesis*. 2017;32(4):411-5.

31- Güner U, Muranlı FDG. Micronucleus test, nuclear

(۴۵٪): مرتضی یوسفزادی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۲۰٪): حسین ذوالقرنین (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (۵٪): احسان کامرانی (نویسنده چهارم) پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۱۰٪): مجتبی علیشاهی (نویسنده پنجم) روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۲۰٪)

منابع مالی: پژوهش حاضر تحت حمایت مالی نبوده است.

منابع

1- Mahdavi M, Namvar F, Ahmad MB, Mohamad R. Green biosynthesis and characterization of magnetic iron oxide (Fe₃O₄) nanoparticles using seaweed (*Sargassum muticum*) aqueous extract. *Molecules*. 2013;18(5):5954-64.

2- Gupta Ak, Wells S. Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: Preparation, characterization, and cytotoxicity studies. *IEEE Trans Nanobiosci*. 2004;3(1):66-73.

3- Weissleder R, Bogdanov A, Neuwelt EA, Papisov M. Long-circulating iron oxides for MR imaging. *Adv Drug Deliv Rev*. 1995;16(2-3):321-34.

4- Reimer P, Weissleder R. Development and experimental use of receptor-specific MR contrast media. *Radiologe*. 1996;36(2):153-63. [German]

5- Chouly C, Pouliquen D, Lucet I, Jeune JJ, Jallet P. Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: Effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution. *J Microencapsul*. 1996;13(3):245-55.

6- Gupta PK, Hung CT. Magnetically controlled targeted micro-carrier systems. *Life Sci*. 1989;44(3):175-86.

7- Kalantari K, Ahmad MB, Shameli K, Mohd Zobir Bin Hussein, Khandanlou R, Khanezhai H. Size-controlled synthesis of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles in the layers of montmorillonite. *J Nanomater*. 2014;2014:739485.

8- Kulkarni SA, Sawadh PS, Kokate KK. Synthesis and characterization of Fe₃O₄ nanoparticles for engineering applications. International Conference on Benchmarks in Engineering Science and Technology (ICBEST) 2012. New York: International Journal of Computer Applications (IJCA); 2012. p. 17-8.

9- Miller MM, Prinz GA, Cheng SF, Bounnak S. Detection of a micron-sized magnetic sphere using a ring-shaped anisotropic magnetoresistance-based sensor: A model for a magnetoresistance-based biosensor. *Appl Phys Lett*. 2002;81(12):2211-3.

10- Zhu MT, Wang B, Wang Y, Yuan L, Wang HJ, Wang M, et al. Endothelial dysfunction and inflammation induced by iron oxide nanoparticle exposure: Risk factors for early atherosclerosis. *Toxicol Lett*. 2011;203(2):162-71.

11- Ju-Nam Y, Lead JR. Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Sci Total Environ*. 2008;400(1-3):396-414.

12- Valdiglesias V, Kiliç G, Costa C, Fernández-Bertólez N, Pásaro E, Teixeira JP, et al. Effects of iron oxide nanoparticles: Cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity. *Environ Mol Mutagen*. 2015;56(2):125-48.

13- Carrasco KR, Tilbury KL, Myers MS. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Can J Fish Aquat Sci*. 1990;47(11):2123-36.

14- Ali FK, El-Shehawi AM, Seehy MA. Micronucleus test in fish genome: A sensitive monitor for aquatic pollution.

- nanoparticles. *Biomaterials*. 2012;33(1):163-70.
- 40- Magdolenova Z, Drlickova M, Henjum K, Rundén-Pran E, Tulinska J, Bilanicova D, et al. Coating-dependent induction of cytotoxicity and genotoxicity of iron oxide nanoparticles. *Nanotoxicology*. 2015;9 Suppl 1:44-56.
- 41- Bhattacharya K, Davoren M, Boertz J, Schins RP, Hoffmann E, Dopp E. Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells. *Part Fibre Toxicol*. 2009;6:17.
- 42- Ahamed M, Alhadlaq HA, Alam J, Khan MA, Ali D, Alarafi S. Iron oxide nanoparticle-induced oxidative stress and genotoxicity in human skin epithelial and lung epithelial cell lines. *Curr Pharm Des*. 2013;19(37):6681-90.
- 43- Watanabe M, Yoneda M, Morohashi A, Hori Y, Okamoto D, Sato A, et al. Effects of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles on A549 Cells. *Int J Mol Sci*. 2013;14(8):15546-60.
- 44- Karlsson HL, Cronholm P, Gustafsson J, Möller L. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: A comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem Res Toxicol*. 2008;21(9):1726-32.
- 45- Karlsson HL, Gustafsson J, Cronholm P, Möller L. Size-dependent toxicity of metal oxide particles-a comparison between nano- and micrometer size. *Toxicol Lett*. 2009;188(2):112-8.
- 46- Dubey A, Goswami M, Yadav K, Chaudhary D. Oxidative stress and nano-toxicity induced by TiO₂ and ZnO on WAG cell line. *PLoS One*. 2015;10(5):e0127493.
- 47- Negin Taji A, Archangi B, Movahedinia AA, Safahieh AR, Eskandari GR. Use of thyroid hormones and micronucleus as potential early biomarkers in yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*) exposed to bisphenol A. *J Oceanogr*. 2014;4(16):23-32. [Persian]
- abnormalities and accumulation of Cu and Cd on *Gambusia affinis* (Baird & Girard, 1853). *Turk J Fish Aquat Sci*. 2011;11(4):615-22.
- 32- Kirsch-Volders M, Decordier I, Elhajouji A, Plas G, Aardema MJ, Fenech M. In vitro genotoxicity testing using the micronucleus assay in cell lines, human lymphocytes and 3D human skin models. *Mutagenesis*. 2011;26(1):177-84.
- 33- Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surrallés J, Crott JW, Parry J, et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*. 2011;26(1):125-32.
- 34- Ates M, Daniels J, Arslan Z, Farah IO. Effects of aqueous suspensions of titanium dioxide nanoparticles on *Artemia salina*: Assessment of nanoparticle aggregation, accumulation, and toxicity. *Environ Monit Assess*. 2013;185(4):3339-48.
- 35- Lapresta-Fernández A, Fernández A, Blasco J. Nanoecotoxicity effects of engineered silver and gold nanoparticles in aquatic organisms. *TrAC Trends Anal Chem*. 2012;32:40-59.
- 36- Møller P, Jacobsen NR, Folkmann JK, Danielsen PH, Mikkelsen L, Hemmingsen JG, et al. Role of oxidative damage in toxicity of particulates. *Free Radic Res*. 2010;44(1):1-46.
- 37- Buzea C, Pacheco II, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*. 2007;2(4):MR17-71.
- 38- Santhosh PB, Ulrih NP. Multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Promising tools in cancer theranostics. *Cancer Lett*. 2013;336(1):8-17.
- 39- Singh N, Jenkins GJ, Nelson BC, Marquis BJ, Maffei TG, Brown AP, et al. The role of iron redox state in the genotoxicity of ultrafine superparamagnetic iron oxide