تاثیر سطوح مختلف نانوذرات اکسید روی بر آنزیم‌های استرس اکسیداتیودر ماهی کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*)

کتایون کریم‌زاده*[۱]، عسگر زحمتکش[۲]، الهام شریفی[۱]

۱- گروه بیولوژی دریا، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

۲- بخش شیلات، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گیلان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

*مسئول مکاتبات: karimzadehkathy@yahoo.co.uk

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۳/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۱۷

چکیده

امروزه استفاده بیش از حد نانوذرات اکسید روی (ZnO NPs) موجب نگرانی‌هایی در ارتباط با خطرات احتمالی زیست محیطی ناشی از حضور این ذرات در اکوسیستم‌های آبی شده است. لذا هدف این پژوهش، مطالعه اثر سمی نانوذره اکسید روی (۰/۰۲، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر) به روش ساکن بر آنزیم‌های استرس اکسیداتیو در یک دوره ۷ روزه بود. بعد از هموژنه کردن بافت مغز فعالیت آنزیم‌های استرس اکسیداتیو مانند سوپر اکسید دسموتاز (SOD)، گلوتاتیون S-ترانسفراز (GST)، کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون (GSH) و مالون دی آلدیید (MDA) توسط روش‌های بیوشیمیایی تعیین شد. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD، CAT و GST در بافت مغز ماهی کلمه در اثر مواجهه با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نانوذره روی در مقایسه با غلظت‌های دیگر و کنترل به طور معنی‌داری افزایش نشان داد ($p<۰/۰۵$). اما مقدار گلوتاتیون با افزایش دوز در معرض قرارگیری کاهش یافت. در میزان مالون دی آلدهید افزایش وابسته به دوز مشاهده گردید چنانکه بیشترین مقدار آن در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از نانوذره (۰/۵۳ ± ٤/٥ نانومول بر گرم وزن تر) ثبت گردید. سمیت تحت کشنده نانوذرات منجر به القا تولید رادیکال-های آزاد واسترس اکسیداتیو در بافت مغز ماهی کلمه گردید. که افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بیانگر فعال شدن سیستم دفاع آنتی اکسیدانی جهت مهار رادیکال‌های آزاد است.

کلمات کلیدی: نانوذره روی، سیستم آنتی اکسیدانت، ماهی کلمه، بافت مغز.

مقدمه

در سال‌های اخیرگسترش فناوری نانو منجر به تولید نانوذرات بسیاری تا کنون گردیده است که از اهمیت فراوانی برخوردارند. این نانوذرات به طور فزاینده‌ای در بسیاری از زمینه‌های علمی و پژوهشی از جمله علوم پزشکی و دارویی، کشاورزی ،محیط زیست و صنعت مورد استفاده قرار می‌گیرند (۸، ١٤). امروزه از ترکیبات نانوذره اکسید روی در تهیه انواع کرم‌های ضدآفتاب، محصولاتی از قبیل پلاستیک، روان‌کننده‌ها و همچنین عایق آتش استفاده می‌شود (٤). محیط‌های آبی از جمله اکوسیستم‌هایی هستند که می‌تواند به طور مستقیم و یا غیرمستقیم در معرض خطرات احتمالی ناشی از ریزش و در معرض قرارگیری با نانوذرات باشند (١٤، ٢٣). نانوذرات قادرندپس از جذب توسط موجودات آبزی مانند سخت‌پوستان،

Archive of SID

www.SID.ir

نرمتنان و ماهیان اختلات متعدد در چرخه زندگی در آنها ایجاد نمایند (۱۳). نانوذره اکسید روی از جمله نانوذراتی می‌باشند که دارای کاربردهای فراوانی در تولید محصولات بهداشتی مانند کرم‌های ضد آفتاب، نیمه‌رساناها، فیبرهای شیمیایی، رنگ‌ها، کاتالیست‌ها و صنایع نساجی هستند (٤). علیرغم اینکه عنصر روی در مقادیر کم از عناصر ضروری برای سنتز آنزیم‌ها، رشد و سلامت آبزیان محسوب می‌شود (۱۹). اما اثرات نامطلوب و آسیب‌های بیوشیمیایی و پاتولوژیک آن در مقادیر بالا در ماهیان به خوبی مطالعه شده است (٦). چنانکه کاهش گلبول‌های قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت در ماهیان کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*) و ماهی کپور (*Ciprinus carpio*) مواجهه شده با نانوذره اکسید روی مشاهده شده است (۱، ۱۹). همچنین Saddick و همکاران (۲۰۱۷) تشکیل رادیکال‌های آزاد واسترس اکسیداتیو ناشی از مواجهه با نانوذره اکسید روی در بافت‌های کبد، آبشش و مغز ماهیان تیلاپیا گونه‌های *Tilapia zillii*، *Oreochromis niloticus* گزارش نمودند (۵، ۲٦).

ماهیان از جمله آبزیانی هستند که قادرند به هرگونه تغییرات فیزیکی و شیمیایی محیط زیست واکنش نشان دهند (۷، ۲۲). لذا مطالعات شاخص‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و بافتی آنها می‌تواند شاخصی از سلامت محیط زیست آنها در اختیار بگذارد. آنزیم‌های استرس اکسیداتیو از جمله نشانگرهای زیستی مهمی می‌باشند که جهت ارزیابی میزان سمیت آلاینده‌های محیطی در ماهی‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. یکی از مکانیسم‌های سمیت آلاینده‌های محیطی تولید گونه‌های فعال (ROS: Reactive Oxygen Species) می‌باشد (۱۰، ۱۵). این عوامل اکسیداتیو قادرند در متابولیسم درون سلولی به ویژه صدمه به سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی تداخل ایجاد کرده و در نهایت منجر به تخریب ساختار پروتئین‌ها، چربی‌ها، اسیدهای نوکلیئک و کربوهیدرات‌ها شوند (۵). بافت مغز به دلایل برخورداری از آناتومی و فیزیولوژیک خاص در مقابل آسیب‌های اکسیداتیو آسیب‌پذیر است. در این بافت ۲۰ درصد اکسیژنی که در بدن تولید می‌گردد ،مصرف می‌شود و میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی آن پایین است. همچنین در مغز مقادیر قابل توجهی از اسیدهای چرب غیراشباع وجود دارد که به راحتی توسط گونه‌های اکسیژنی فعال اکسید می شوند. لذا مغز می‌تواند یکی از نقاط اصلی در برابر تأثیرات مخرب آسیب‌های اکسیداتیو ناشی در مواجهه با آلاینده‌های زیست محیطی از قبیل نانوذرات بشمار رود (٤، ۵). بنابراین از تغییرات مشاهده شده در مقادیر این آنزیم‌ها در پاسخ به استرس‌های محیطی، می‌توان جهت تشخیص و تعیین کمیت تأثیرات آلاینده‌ها بر روی موجودات استفاده کرد (١٦).

اثرات نانوذرات اکسید روی بر روی آنزیم‌های استرس اکسیداتیو و نیز پراکسیداسیون لیپیدها در برخی گونه‌های ماهیان آب شیرین مانند گونه‌های *Tilapia zillii*، *Oreochromis niloticus* و *Ciprinus carpio* مطالعه شده است (۱۱، ١٦، ٢٦).در این مطالعات، مواجهه با نانوذره روی منجر به مهار آنزیم‌های استرس اکسیداتیو بویژه سوپر اکسید دسموتاز و کاتالازوافزایش مقادیر پراکسیداسیون لیپیدها گردیده است (٢٦). ماهیان کلمه (*Rutilus firisii caspicus*) از مهم‌ترین ماهیان تجاری و اقتصادی دریای خزر به شمار می‌روند، که ارزش تغذیه‌ای خوبی برای انسان دارند.اما در طی سال‌های اخیر، میزان صید آن کاهش یافته است. یکی از عوامل موثردر کاهش ذخایر این گونه با ارزش می‌تواند ورود آلاینده‌های شیمیایی به این اکوسیستم آبی باشد. لذا با توجه به تأثیر نامطلوبی که نانوذرات می‌توانند در

Archive of SID

www.SID.ir

سلامت اکوسیستم‌های آبی بویژه ماهیان داشته باشند. ارزیابی اثرات احتمالی ناشی از مواجهه ماهیان با این ترکیبات می‌تواند حائز اهمیت باشد. در این مطالعه ابتدا سمیت تحت کشنده نانواکسید روی بر روی بچه ماهیان سفید تعیین شده و سپس شاخص آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بافت مغز این گونه در مواجهه با غلظت‌های تحت کشنده نانو اکسید روی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش کار

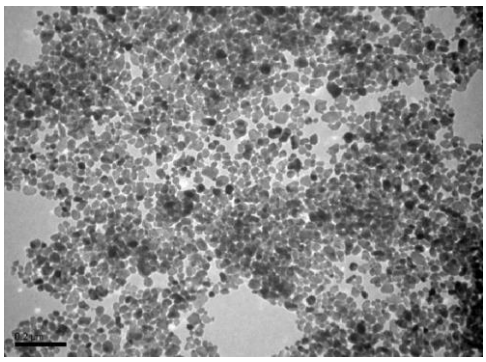
این بررسی در بهار سال ۱۳۹۵ در آزمایشگاه شیلات مرکز علوم شیلاتی میرزا کوچک خان در رشت انجام پذیرفت. ابتدا تعدادی ماهی کلمه با جیره غذایی پایه روزانه سه بار تغذیه شده و آب تانک‌ها نیز روزانه تعویض گردید. میزان سختی آب برابر۷/۱ میلی گرم بر میلی‌لیتر، میانگین دما ۲۵ درجه سانتی گراد و pH برابر۷/۸ بود. سازگاری بچه ماهیان به مدت دو هفته در این شرایط انجام پذیرفت. سپس ۱۲۰ قطعه بچه ماهی کلمه با میانگین طولی ۰/۱٤± ٥/٦٥ سانتی مترو میانگین وزن ۰/۲۸ ± ٤/۷۲ گرم انتخاب شدند. این آزمایش با چهار تیماردر سه تکرار که در مجموع شامل ۱۲ تانک و هر کدام شامل ۱۰ قطعه ماهی کلمه بود انجام گرفت. نانوذرات اکسید روی از شرکت کیمیا ایران خریداری شد نانوذرات روی دارای اندازه ۳۵ نانومتر بود (شکل ۱). سپس سوسپانسیون ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر پودر نانوذره توسط آب دیونیزه تهیه گردید و توسط رقیق‌سازی با آب دیونیزه غلظت‌های مورد نیاز در آزمایشگاه تهیه گردید. نانوذرات قبل از هر بار استفاده به مدت ۳۰ دقیقه جهت همگن‌سازی در محلول سونیکاسیون شدند. اکواریوم‌ها ٢٤ ساعت قبل از اضافه کردن ماهی به دوز مورد نظر رسیدند تا کاهش در میزان دوز نانوذرات ناشی از چسبیدن به سنگ هوا و شیشه اکواریوم به حداقل برسد. ماهیان به مدت ۷ روز در معرض غلظت‌های متفاوت نانواکسید روی (۰، ۰/۰۲، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر) قرار گرفتند. غلظت‌های انتخابی زیر حد کشندگی بوده (۰/۹۰۹ ±۰/۱۷ ppm) و با توجه به تحقیقات صورت گرفته قبلی انتخاب گردید (۱، ٦). پس از پایان دوره بررسی، ماهیان در معرض ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تری-کایین متان سولفانات (MS222) قرار گرفتند، بیهوش شده و بافت مغز خارج گردید و به نیتروژن مایع انتقال داده شد (۲٦). در روز آزمایش بافت‌های منجمد شده به دقت توزین و با نسبت ۱ به ٦ در بافر فسفات سالین یکنواخت شدند (٦). سپس سوسپانسیون‌های تهیه شده در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ گردید. ازمایع رویی جمع‌آوری شده جهت سنجش آنزیم‌های استرس اکسیداتیو استفاده گردید. مقدار روی در آب و بافت مغز ماهیان پس از آماده سازی، توسط اسپکتوفتومتر جذب اتمی مجهز به شعله (Perkeinelmer, PinAAcle 500 Flam) در طول موج ۲۱٤ نانومتر در حضور استاندارد روی اندازه-گیری گردیده و مقدار روی بر حسب میکروگرم بر گرم گزارش گردید (٤). جهت اندازه‌گیری پروتئین از روش برادفورد با استفاده از استاندارد آلبومین سرم گاوی استفاده گردید (۹). فعالیت کاتالاز با استفاده از روش Aebi (۳) سنجیده شد. ابتدا به ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌ها و شاهد، ۲/۸ میلی لیتر بافر فسفات پتانسیم۰/۱ مولار با pH= ۷.٤ افزوده گردید. سپس پس از افزودن ۱۰۰ میکرولیتر پر اکسید هیدروژن، جذب در طول موج ۲٤۰nm اندازه‌گیری گردید. اساس سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز بر مهار احیا نیتروبلو تترازولیوم توسط سیستم گزانتین-گزانتین اکسیداز به عنوان تولید کننده سوپر اکسید می‌باشد. در این آزمایش محلول کار شامل گزانتین-گزانتین اکسید از در بافر پتاسیم فسفات و نیتروبلو

Archive of SID

www.SID.ir

تترازولیوم (NBT) استفاده شد، جذب نوری هر نمونه در طول مبع ۵۵۰ نانومتر به مدت ۳۰ ثانیه یکبار تا ۵ دقیقه اندازه‌گیری شد. درصد مهار NBT توسط آنزیم سوپراکسید دسموتاز از فرمول مربوطه بر اساس دستورالعمل کیت (Zelbio، شرکت پادگین طب) استفاده شد و با استفاده از منحنی استاندارد، فعالیت آنزیم بر حسب یونیت بر میلی‌گرم پروتین گزارش شد (۳۳). جهت اندازه‌گیری گلوتاتیونSترانسفراز از روش Habig و همکاران (۱۲) با اصلاحات کمی (۲۹) استفاده شد. در یک پلیت ۹۶خانه مخلوط واکنش که حجم آن ۲۰۰ میکرولیتر بود قرار گرفت این مخلوط حاوی ۲۰ میکرولیتر از نمونه و ۱۸۰ میکرولیتر از مخلوط معرف‌های ۱-کلرو-۲،٤-دینیتروبنزن (CDNB) ۱ میلی‌مولار همراه گلوتاتیون احیا (GSH) (۱۰ میلی‌مولار) در فسفات بافر پتاسیم ۰/۱ مولار با pH برابر ٦/۵می باشد. جذب مخلوط واکنش در طول موج ۳٤۰ نانومتر توسط دستگاه قرائت‌کننده (microplate reader مدل USA, Bio Teck) اندازه‌گیری شد. تغییرات جذب در هر دقیقه برحسب نانومول‌های CDNB محاسبه و بر حسب نانومول بر میلی‌گرم در دقیقه ثبت گردید. برای تعیین میزان GSH بافت از روش تیتز (Thietz) استفاده شد (۲۷). غلظت مناسبی از نمونه یکنواخت شده با اسید سولفوسالسیلیک ۵ درصد مخلوط شد. نمونه در دمای ٤ درجه به مدت ۱۵ دقیقه با دور g ۲۰۰۰ سانتریفوژ شد. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی به ۱۸۰ میکرولیتر دی سدیم فسفات ۰/۳ مولار اضافه شد. سپس با اضافه کردن ۹۰ میکرولیتر معرف DTNB ٤۰ درصد در سیترات سدیم ۰/۱ درصد واکنش شروع گردید. تغییرات جذب در ۲۱٤ نانومتر در طی ۵ دقیقه قرائت شد. با استفاده از محلول گلوتاتیون ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر منحنی استاندارد رسم و غلظت گلوتاتیون نمونه‌ها محاسبه گردید. جهت سنجش مالون دی آلدئید (MDA)، به نمونه ۲۵ میکرولیتر سدیم دو دسیل سولفات ۸/۱ درصد و ۱۸۷ میکرولیتر تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد با pH= ۳/۵ همراه با ۱۸۷ میکرولیتر اسید تیوبار بیتوریک (TBARS) اضافه گردید. مخلوط واکنش در دمای ۱۰۰درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه در انکوباتور قرار گرفت. پس از خنک شدن، سانتریفیوژ نمونه ها در دور g ۱۰۰۰ به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی گراد انجام گرفت و میزان جذب در طول موج ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری گردید. منحنی استاندار مالون دی آلدئید با استفاده از تترا اتوکسی پروپان بدست آمد (۲۷).

آنالیز آماری: جهت آنالیز آماری از نرم افزار SPSS 19 استفاده شد و داده‌ها از طریق آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و آزمون دانکن تجزیه و تحلیل گردیدند. برای پردازش داده‌ها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.



شکل۱- تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) نانوذره روی (۱)

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج

نتایج سنجش غلظت واقعی نانواکسید روی در آکواریوم‌ها در جدول ۱ آورده شده است. غلظت واقعی نانوذرات در آب در زمان‌های صفر، ۱۲ و ۲٤ ساعت پس از مواجهه مورد مطالعه قرار گرفت. افزایش زمان تأثیر معنی داری بر روی غلظت نانو ذره اکسید روی نشان نداد.

مقدار نانوذره روی اندازه‌گیری شده در بافت مغز ماهیانی کلمه در تیمارهای مختلف در جدول۱ آورده شده است. میزان نانوذره روی در بافت مغز ماهیانی کلمه که در معرض سطوح مختلف نانوذره روی قرار داشتند افزایش یافت. بویژه این میزان افزایش در ماهیانی که در مواجهه با مقدار ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی-لیتر نانوذره روی قرار داشتند به طور معنی‌داری نسبت به سایر غلظت‌ها (۰/۰۲ و ۰/۰۵میلی گرم بر میلی‌لیتر) و نیز نمونه کنترل بیشتر بود. ($p<۰/۰۵$).

قرار گرفتن ماهیان در مواجهه با غلظت ۰/۰۲ میلی-گرم بر میلی‌لیتر نانوذره اکسید روی منجر به به افزایش در میزان مالون دی آلدهید (MDA) در بافت مغز بچه ماهیان کلمه نسبت به گروه کنترل گردید (جدول ۱). این افزایش معنی‌دار در میزان مالون دی آلدهید در بافت مغز این ماهیان، زمانی که در معرض نانوذره با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر قرار داشتند نسبت به غلظت‌های ۰/۰۲ و ۰/۰۵ میلی‌گرم مشاهده گردید ($p<۰/۰۵$). مقدار GSH در ماهیان با افزایش غلظت نانوذره افزایش یافت، چنانکه در غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر به بیشترین مقدار رسید (٦٥/٨±۰/٤ میکرومول بر گرم وزن تر). اما در غلظت ۰/۱ میلی-گرم بر لیتر میزان آن کاهش چشمگیری نشان داد و به کمترین مقدار در مقایسه با سایر تیمارها و کنترل رسید ($p<۰/۰۵$). کاهش غلظت GSH و افزایش MDA در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نانوذره در مقایسه با گروه شاهد معنی دار بود، تغییرات غلظت GSH و MDA در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم میلی لیتر نسبت به غلظت‌های ۰/۰۲ و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر معنی دار بود ($p<۰/۰۵$).

فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیونS -ترانسفراز به طور معنی‌داری در غلظت-های ۰/۰۲ و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از نانوذره اکسید روی در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت ($p<۰/۰۵$). برعکس مواجهه ماهیان با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از نانو اکسید روی منجر به کاهش معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های استرس اکسیداتیو گردید (جدول۳)

جدول۱ – غلظت واقعی نانو اکسید روی در آب آکواریوم با استفاده از دستگاه جذب اتمی در زمان‌های مختلف

غلظت نانوذره روی	زمان(ساعت)		
(میلی‌گرم در لیتر)	صفر	۱۲	۲٤
صفر (کنترل)	–	–	–
۰/۰۲	۲۰± ۰/۲[a]	۲۰/۹± ۰/۱۲ [a]	۲۰/۸٦±۰/۱ [a]
۰/۰۵	۵۰/۰۵± ۱/۳٤[a]	۵۱/۱۷± ۰/۸۷ [a]	۵۰/۷٦±۰/٤۳ [a]
۱	۱۰۰/۳± ۰/۲۱ [a]	۹۸/٦۲±۰/۳۵ [a]	۹۸/۱۰±۰/۱٦ [a]

حروف غیرهمنام نشان دهنده‌ی وجود اختلاف معنی‌دار است ($p <۰/۰۵$).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- مقادیر اندازه‌گیری شده روی (Zn)، MDA و GSH در بافت مغز ماهی کلمه در تیمارهای مختلف بعد از ۷ روز

غلظت نانوذره روی (میلی گرم بر لیتر)	مقدار Zn در بافت مغز (میکروگرم بر گرم)	مقدارMDA در بافت مغز (نانومول بر گرم بر وزن تر)	مقدار GSH در بافت مغز (میکرومول بر گرم وزن تر)
صفر (کنترل)	٥٤/٥± ٠/١ [a]	١/٠٧± ٠/٣ [a]	٤١/٦±١/٢ [a]
٠/٠٢	٦٤/٣± ٠/٢١ [b]	١/٦٥± ٠/٦ [b]	٦٢/٥١±٠/٣ [c]
٠/٠٥	٧٢/٨± ٠/٣٢ [c]	١/٨٤± ٠/٣ [b]	٦٥/٨±٠/٤ [c]
٠/١	٩٨/٢± ١/٤ [d]	٤/٥± ٠/٥٣ [c]	٢٠/٣±٠/٣٧ [b]

حروف غیرهمنام نشان دهنده‌ی وجود اختلاف معنی‌دار است (p<٠/٠٥).

جدول ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذره روی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بافت مغز بچه‌ماهی کلمه

غلظت نانوذره روی (میلی‌گرم بر لیتر)	فعالیت آنزیم CAT میکرومول پراکسید هیدروژن بر گرم بافت	فعالیت آنزیم SOD یونیت بر میلی‌گرم پروتئین	فعالیت آنزیم GST نانو مول بر میلی گرم پروتئین بر دقیقه
کنترل	٢٦/٨±٣/١ [b]	٢٢± ٤/٣ [b]	**٢٤٠±٢٣/٢ [b]**
٠/٠٢	٣٥±٥/٧ [c]	٣٠±٣/١ [c]	**٣٠٢±١٧/٨[c]**
٠/٠٥	٣٧/١±١/٣ [c]	٢٩/٢±٢/٧[c]	**٣٠٥/٦±١٤/١[c]**
٠/١	٢٣/١±٤/٢ [a]	١١/٨±٢/٧ [a]	**٩٦±٨/١[a]**

حروف غیرهمنام نشان دهنده‌ی وجود اختلاف معنی دار است (p<٠/٠٥).

بحث

با وجود اینکه نانوذرات اکسید روی از ویژگی‌های کاربردی مناسبی برخوردارند، اما از اثرات قابل توجهی بر انسان و محیط زیست برخوردارند (۲). در مطالعه حاضر میزان نانوذرات اکسید روی به طور قابل ملاحظه‌ای در بافت ماهیانی که در معرض قرارگیری با این ترکیب قرار داشتند افزایش یافت. این افزایش در میان ماهیانی که در مواجهه با غلظت‌های ۰/۰۲ و ۰/۰۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذره روی قرار داشتند تا حدی قابل توجه بود و در بین ماهیانی که در معرض قرارگیری با غلظت ۰/۱ میکروگرم نانوذره روی بودند اختلاف معنی‌داری نشان داد (p<۰/۰۵). نتایج بدست آمده با مطالعات انجام شده در ماهی تیلاپیا دو گونه *O.niloticus* و *T.zillii* که در معرض غلظت‌های ۰/۵ و ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر قرار داشتند مطابقت دارد، چنانکه میزان روی در بافت مغز این دو گونه با افزایش دوز در معرض قرارگیری افزایش یافت (٤، ٦). نانوذرات قادرند از آبشش‌ها و دستگاه گوارش وارد شده و جذب گردش خون گردند و در نهایت ورود به بافت‌ها و جذب سلولی آنها زیاد می‌گردد (۵). پس از جذب ذرات توسط سلول‌ها، و مواجهه با محیط اسیدی از ابتدا تا انتهای اندوزوم حرکت نموده و در نهایت به لیزوزوم می‌رسند و در این بخش انحلال پیدا می‌کنند (۷، ۲۱) چنین پدیده‌ای می‌تواند دلیلی بر افزایش مقدار نانواکسید روی در بافت مغز باشد (۲۱). مجموعه آنزیمی استرس اکسیداتیو، سوپراکسید دسموتاز و کاتالاز اولین خط دفاعی سلول در برابر سمیت ناشی از رادیکال‌های آزاد هستند. تبدیل رادیکال سوپراکسید

Archive of SID

www.SID.ir

به پراکسید هیدروژن توسط آنزیم SOD صورت می-گیرد. آنزیم کاتالاز نیز سبب خنثی شدن پراکسید هیدروژن به مولکول‌های آب و اکسیژن می‌گردد (۱۷، ۱۸). در این مطالعه مواجهه با مقادیر ۰/۰۲ و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نانوذره موجب افزایش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دسموتاز و کاتالاز بافت مغز می-گردد. افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز منجر به کاهش رادیکال سوپراکسید و افزایش پراکسید هیدروژن در بافت مغز می‌گردد و افزایش فعالیت کاتالاز باعث خنثی‌سازی پراکسید هیدروژن تولید شده می‌شود (۱۹). افزایش در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بیانگر تطابق بافت با استرس ناشی از مواجهه با نانوذره اکسید روی است (۱۸). مطالعات نشان داده‌اند که مواجهه ماهیان با نانوذرات اکسید روی منجر به افزایش فعالیت‌های آنزیم CAT و SOD در بافت‌های مغز، کبد و اریتروسیت‌ها می‌شود (۱۱، ۱٤). اما در برخی از مطالعات دیگر کاهش در مقادیر این آنزیم‌ها گزارش شده است (۱٤). این اختلاف در نتایج مختلف ناشی از نوع گونه، مدت زمان در معرض قرارگیری، غلظت و نوع ماده آلاینده دارد (۱٤). در مطالعه حاضر، ،سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز، سوپراکسید دسموتاز و گلوتاتیون S –ترانسفراز در بافت مغز ماهیان کلمه پس از هفت روز مواجهه با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی-لیتر کاهش یافت. نتایج مشابهی توسط Saddick و همکاران (۲٦) و Alkaladi و همکاران (۵، ٦) در خصوص مواجهه ماهیان *O.niloticus* و *T.zillii* و کپور معمولی (*C. carpio*) با نانوذره اکسید روی گزارش گردید. بطوریکه سیستم آنزیمی وابسته به استرس اکسیداتیو زمانی که در معرض غلظت پایین نانوذره قرار داشته القا شده و در غلظت‌های بالاتر، مهار آنزیم‌های استرس اکسیدایتو SOD، GST، CAT و گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) مشاهده شده است (٦). به نظر می‌رسد که القای سیستم دفاع آنتی-اکسیدانی در ماهیانی که در مواجهه با غلظت‌های پایین نانوذره اکسید روی قرار داشتند از یک مکانیسم آستانه‌ای تبعیت می‌کند (٤). در مقابل، مهار آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ماهیانی که در معرض غلظت‌های زیاد نانوذره قرار داشتند می‌تواند ناشی از تجمع بیش از حد رادیکال‌های آزاد باشد که این میزان فراتر از توانایی مهار سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی است و از طرفی نانوذرات قادرند بر روی تعادل بین سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و استرس اکسیداتیو در داخل بدن که در مواجهه با این غلظت زیاد است تأثیر بگذارد (۳٤،۵). گلوتاتیون ترکیبی می‌باشد که می‌تواند هم به طور مستقیم و هم به عنوان سوبسترای آنزیم‌های گلوتاتیون S-ترانسفراز و یا گلوتاتیون پراکسیداز در سم‌زدایی شرکت نماید. کاهش در مقدار گلوتاتیون، افزایش پراکسیداسیون لیپیدها، تخریب ساختار DNA و کاهش در برابر استرس اکسیداتیو را به همراه دارد (۲۰). مواجهه ماهی کلمه با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر منجر به کاهش میزان گلوتاتیون در بافت مغز گردید. مواجهه ماهی *O. niloticus* با نانوذره اکسید روی به مدت هفت روز باعث کاهش گلوتاتیون در بافت کبد و آبشش شده است (۵).

آنزیم گلوتاتیون S-ترانسفراز با مصرف گلوتاتیون (GSH) باعث افزایش حلالیت نانوذره و دفع آن از بدن می‌گردد. بنابر این نقش مهمی در محافظت بافت-ها علیه آسیب‌های اکسیداتیو دارد (۲٤). در این مطالعه غلظت ۰/۰۲ و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نانوذره منجر به افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بافت مغز می‌گردد. این افزایش نشان‌دهنده افزایش دفاع بدن در مقابل نانوذره و دفع آن از بدن می‌باشد. در معرض قرارگیری گونه‌های *O. niloticus* و *T. zillii* با نانو اکسید روی با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر

Archive of SID

www.SID.ir

میلی‌لیتر منجر به افزایش فعالیت آنزیم گلوتاتیونS-ترانسفراز در بافت مغز می‌گردد (۲۶).

لیپیدها به ویژه اسیدهای چرب غیر اشباع در غشای زیستی جز حساس‌ترین مولکول‌های زیستی می‌باشند که می‌توانند در معرض گونه‌های فعال اکسیژنی (ROS) قرار گیرند. این روند منجر به افزایش پراکسیداسیون آنها می‌شود. مالون دی آلدهید (MDA) از نشانگرهای زیستی مهمی می‌باشد که جهت سنجش پراکسیداسیون لیپیدها از آن استفاده می‌شود (۳۱،۲۵). افزایش آسیب غشای سلولی باعث بالا رفتن مقدار این ترکیب در بدن می‌گردد.

دراین مطالعه ،در معرض قرارگیری ماهیان با غلظت بالای نانوذره روی (۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر) منجر به افزایش سطح مالون دی آلدهید در بافت مغز گردید.که این افزایش در گونه‌های *C.carpio* و *O.niloticus* مواجهه شده با نانوذره روی نیز ، قبلا گزارش شده است (۵، ۲۵). افزایش میزان MDA می‌تواند ناشی از افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژنی توسط نانوذره روی باشد که در نهایت افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشای مغز، تخریب میتوکندری و مرگ سلولی را به دنبال دارد (۱۹). افزایش تولید ROS یکی از مکانیسم‌های سمیت کاتیون روی آزاد شده از نانوذره در آب می‌باشد که در صدف‌ها، نرم‌تنان و نیز ماهیان مشاهده شده است (۲، ۳۲).

نتیجه گیری

نتایج نشان داد که در معرض قرارگیری ماهی کلمه با نانوذره اکسید روی به صورت تحت کشنده موجب افزایش مقدار MDA و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیم-های CAT، SOD و GST گردید در حالیکه میزان گلوتاتیون بافت مغز کاهش پیدا نمود. افزایش مشاهده شده در فعالیت آنزیم‌های استرس اکسیداتیو بیانگر توانایی سم‌زدایی بافت مغز است. کاهش در مقدار گلوتاتیون نیز می‌تواتند بیانگر عدم کارایی مناسب سیستم دفاع آنتی اکسیدانی در بافت مغز می باشد.

منابع

۱. هدایتی، ع.ا.، جهانبخشی، ع.، مرادزاده، م.، جوادی موسوی، م.، ۱۳۹۳. تاثیر سمیت تحت کشنده نانواکسید روی (ZnO NPs) بر شاخص‌های خونی ماهی کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*). مجله بیوتکنولوژی و فیزیولوژی آبزیان، سال دوم،شماره اول، صفحات ۵۳-۴۱.

2. Adamcakova-Dodd A., Stebounova L.V., Kim J.S., Vorrink S.U., Ault A.P., O'Shaughnessy P.T., Grassian V.H., Thorne P.S., 2014. Toxicity assessment of zinc oxide nanoparticles using subacute and sub-chronic murine inhalation models. *Particle and Fibre Toxicology*, 11: 15–22.

3. Aebi H., 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105: 121-126.

4. Afifi M., Abdelazim A.M., 2015. Ameliorative effect of zinc oxide and silver nanoparticles on antioxidant system in the brain of diabetic rats. *Asian Pacific Journal Tropical Biomedicine*, 5 (10): 832–834.

5. Alkaladi A., Afifi M., Mosleh Y., AbuZinada O., 2014. Histopathological effects of zinc oxide nanoparticles on the liver and gills of *Oreochromis niloticus* protective effect of vitamins C and E. *Journal of Pure Applied Microbiology*, 8 (6): 4549–4558.

6. Alkaladi A., El-Deen N., Afifi M., Abu Zinadah O., 2015. Hematological and biochemical investigations on the effect of vitamin E and C on *Oreochromis niloticus* exposed to zinc oxide nanoparticles. *Saudian Journal of Biological Science*, (22): 556–563.

7. Asghar M.S., Qureshi N.A., Jabeen F., Khan M.S., Shakeel M., Noureen A., 2015. Toxicity of zinc nanoparticles in fish: a critical review. *Journal of Biology and Enviromental Science*, 7 (1): 431–439.

Archive of SID

www.SID.ir

8. Arstikaitis J., Gagne F., Cyr D.G., 2014.Exposure of fathead minnows to municipal wastewater effluent affects intracellular signaling pathways in the liver. *Comparative Biochemistry Physiology, part(C) Toxicolgy Pharmacology* 64: 1-10.

9. Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemisry*, 72: 248-54.

10. Chen Z., Meng H., Xing G., Chen C., Zhao Y., Jia G., Wan L., 2006. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. *Toxicology Letters*, 163(2): 109-120.

11. Connolly M., Fernández M., Conde E., Torren T. F., Navas J.M., Fernández-Cruz M.L., 2016. Tissue distribution of zinc and subtle oxidative stress effects after dietary administration of ZnO nanoparticles to *rainbow trout*. *Science of the Total Environment*, 551-552: 334-343.

12. Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B., 1974. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249 (22): 7130-7139.

13. Heinlaan M., Ivask A., Blinova I., Dubourguier H.C., Kahru A., 2008.Toxicity of nano sized and bulk ZnO, CuO and TiO2 to bacteria Vibrio fischeri and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*, 71(7): 1308-1316.

14. Hoet P.H.M., Hohlfeld I.B., Salata O.V., 2004. Nanoparticles known and unknown health risks. *Journal of Nanobiotechnology*, 2(12): 1-15.

15. Isani G., Andreani G., Monari M., Dalla Libera L., Carpenè E., 2000. Biochemical changes in gilthead sea bream white muscle during post-larval growth. *Basic Applied Myology*, 10 (6): 285-290.

16. Linhua H., Lei C., 2012. Oxidative stress responses in different organs of carp (*Cyprinus carpio*) with exposure to ZnO nanoparticles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 80: 103-110.

17. Limon-Pacheco J., Gonsebatt M.E., 2009. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research*, 674 (1-2): 137-147

18. Nordberg J., Arner E., 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalianthioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(11): 1287-1312

19. Ma H., Williams P.L., Diamond S.A., 2013. Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles a review. *Environmental Pollution*, 172: 76–85.

20. Masella R., Benedetto R.D., Vari R., 2005. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16 (10): 577-586.

21. Nel A.E., Ma dler L., Velegol D., Xia T., Hoek E.M., Somasundaran P., 2009. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Natural Material*, 8 (7): 543-557.

22. Oliveira Ribeiro C.A., Belger L., Pelletier E., Rouleau C., 2002. Histopathological evidence of inorganic mercury andmethylmercury toxicity in the artic charr (*Salvelinus alpinus)*. *Environmental Research*, 90(3): 217–225.

23. Pandey S., Parvez S., Sayeedl I., Haque R., Bin-Hafeez B., Raisuddin S., 2003. Biomarkers of oxidative stress: via comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). *Science Total Environment*, 309: 105-115.

24. Paresh C.R., Hongtao Y., Peter P.F., 2009. Toxicity and environmental risks of nanomaterials: challenges and future needs.

Archive of SID

www.SID.ir

uninfected Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 104: 297-305.

30. Trevisan R., Flesch S., Mattos J., Milani M.R., Bainy A.C., Dafre A.L., 2014. Zinc causes acute impairment of glutathione metabolism followed by coordinated antioxidant defenses amplification in gills of brown mussels *Perna perna*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, C 159: 22-30.

31. Van der Oost R., Beyer J., Vermeulen N.P., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environmental *Toxicology Pharmacology*, 13: 57-149.

32. Varadarajan R., Sankar H.S., Jose J., Philip B., 2014. Sublethal effects of phenolic compounds on biochemical, histological and ion regulatory parameters in a tropical teleost fish *Oreochromis mossambicus* (Peters). *International Journal of Scientific and Research Publication*, 4(3): 2250-3153.

33. Winterbourn C., Hawkins R., Brian M, Carrell R., 1975. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *Journal of Laboratory Clinical Medic*ine, 85: 337.

34. Xiong D.W., Fang T., Yu L.P., Sima X.F., Zhu W.T., 2011. Effects of nano-scale TiO2, ZnO and their bulk counter parts on zebra fish: acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. *Science of the Total Environment*, 409: 1444-1452.

Journal of Environmental Science and Health Part C Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews, 27 (1): 1-35.

25. Puerto M., Prieto A.I., Pichardo S., Moreno I., Jos A., Moyano R., Camean A.M., 2009. Effects of dietary N-acetylcysteine (NAC) on the oxidative stress induced in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to a microcystin-producing cyanobacterial water bloom. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28: 1679-1686.

26. Saddick S., Afifi M., Abu Zinada O. A., 2017. Effect of Zinc nanoparticles on oxidative stress-related genes and antioxidant enzymes activity in the brain of *Oreochromis niloticus* and *Tilapia zillii*. *Saudian Journal of. Biological Science*, 24(7): 1672-1678.

27. Satoh K., 1978. Serum lipid peroxidation in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. Clinica Chimcal Acta, 90:37–43.

28. Tietze F., 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry*, 27: 502-22.

29. Tiwari S., Pelz-Stelinskik K., Mann S.R., Stelinski L.L., 2011. Glutathione transferase and cytochrome P450 (general oxidase) activity levels in *Candidatus Liberibacter asiaticus* infected and

Archive of SID

www.SID.ir