



تاثیر سطوح مختلف نانوذرات اکسید روی بر آنزیم‌های استرس اکسیداتیو در 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 پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۱۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۷/۱۹

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 هم‌وزنه کردن بافت مغز فعالیت آنزیم‌های استرس اکسیداتیو مانند سوپر اکسید دسموتاز (SOD)، گلوتاتیون S-ترانسفراز (GST)، کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون (GSH) و مالون دی آلدید (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 ($p < 0/05$). اما مقدار گلوتاتیون با افزایش دوز در معرض قرارگیری کاهش یافت. در میزان مالون دی آلدید افزایش وابسته به دوز مشاهده گردید چنانکه بیشترین مقدار آن در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از نانوذره (۰/۵۳ ± ۰/۵ نانومول بر گرم وزن تر) ثبت گردید. سمیت تحت کشنده نانوذرات منجر به القا تولید رادیکال‌های آزاد واسترس اکسیداتیو در بافت مغز ماهی کلمه گردید. که افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بیانگر فعال شدن سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی جهت مهار رادیکال‌های آزاد است.

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

مقدمه

ضدآفتاب، محصولات آرایشی از قبیل پلاستیک، روان‌کننده‌ها و همچنین عایق آتش استفاده می‌شود (۴). 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 (۱۴، ۲۳). نانوذرات قادرند پس از جذب توسط موجودات آبی مانند سخت‌پوستان،

در سال‌های اخیر گسترش 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، ۱۴). امروزه از ترکیبات نانوذره اکسید روی در تهیه انواع کرم‌های



تداخل ایجاد کرده و در نهایت منجر به تخریب ساختار پروتئین‌ها، چربی‌ها، اسیدهای نوکلئیک 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 می‌شوند. 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 (۴، 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 (۱۶).

اثرات نانوذرات اکسید روی بر روی آنزیم‌های استرس اکسیداتیو و نیز پراکسیداسیون لیپیدها در برخی گونه‌های ماهیان آب شیرین مانند گونه‌های *Oreochromis niloticus* *Tilapia zillii* و *Ciprinus carpio* مطالعه شده است (۱۱، ۱۶، ۲۶). در این مطالعات، مواجهه با نانوذره روی منجر به مهار آنزیم‌های استرس اکسیداتیو بویژه سوپر اکسید دسموتاز و کاتالاز افزایش مقادیر پراکسیداسیون لیپیدها گردیده است (۲۶). ماهیان کلمه (*Rutilus 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 موثر در 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

نرمتنان و ماهیان اختلالات 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 (۴). 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 (۶). 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 و استرس اکسیداتیو ناشی از مواجهه با نانوذره اکسید روی در بافت‌های کبد، آبشش و مغز ماهیان تیلاپیا گونه‌های *Tilapia Oreochromis niloticus zillii* گزارش نمودند (۲۶، ۵).

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

مدت ۷ روز در معرض غلظت‌های متفاوت نانو اکسید روی (۰، ۰/۰۲، ۰/۰۵، و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر) قرار گرفتند. غلظت‌های انتخابی زیر حد کشندگی بوده (0.909 ± 0.17 ppm) و با توجه به تحقیقات صورت گرفته قبلی انتخاب گردید (۱، ۶). پس از پایان دوره بررسی، ماهیان در معرض ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تری-کابین متان سولفانات (MS222) قرار گرفتند، بیهوش شده و بافت مغز خارج گردید و به نیتروژن مایع انتقال داده شد (۲۶). در روز آزمایش بافت‌های منجمد شده به دقت توزین و با نسبت ۱ به ۶ در بافر فسفات سالین یکنواخت شدند (۶). سپس سوسپانسیون‌های تهیه شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ گردید. از مایع 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 (Perkelmer, PinAacle 500 Flam) در طول موج ۲۱۴ نانومتر در حضور استاندارد روی اندازه‌گیری گردیده و مقدار روی بر حسب میکروگرم بر گرم گزارش گردید (۴). جهت اندازه‌گیری پروتئین از روش برادفورد با استفاده از استاندارد آلومین 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 پتانسیم ۰/۱ مولار با $\text{pH} = 7.4$ افزوده گردید. سپس پس از افزودن ۱۰۰ میکرولیتر پر اکسید هیدروژن، جذب در طول موج ۲۴۰nm 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 اکسیداز در بافر پتانسیم فسفات و نیتروبلو

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 نانو اکسید 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.

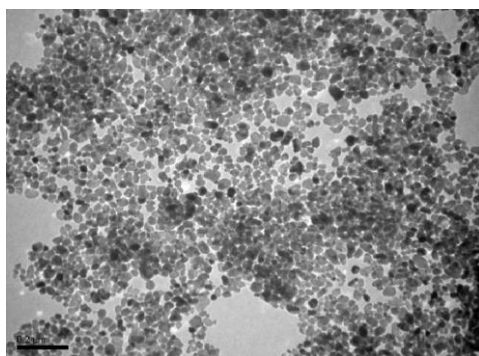
مواد و روش کار

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 برابر ۷/۱ میلی گرم بر میلی‌لیتر، میانگین دما ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH برابر ۷/۸ بود. سازگاری بچه ماهیان به مدت دو هفته در این شرایط انجام پذیرفت. سپس ۱۲۰ قطعه بچه ماهی کلمه با میانگین طولی 5.65 ± 0.14 سانتی‌متر و میانگین وزن 4.72 ± 0.28 گرم انتخاب شدند. این آزمایش با چهار تیمارد 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 ۲۴ 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

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 ۴۰ درصد در سبترات سدیم ۰/۱ درصد واکنش شروع گردید. تغییرات جذب در ۲۱۴ نانومتر در طی ۵ دقیقه قرائت شد. با استفاده از محلول گلوکاتایون ۱ میلی گرم بر میلی لیتر منحنی استاندارد رسم و غلظت گلوکاتایون نمونه‌ها محاسبه گردید. جهت سنجش مالون دی آلدئید (MDA)، به نمونه ۲۵ میکرولیتر سدیم دو سیل سولفات ۸/۱ درصد و ۱۸۷ میکرولیتر تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد با $\text{pH}=3/5$ همراه با ۱۸۷ میکرولیتر اسید تیوبار بیتوریک (TBARS) اضافه گردید. مخلوط واکنش در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ دقیقه در انکوباتور قرار گرفت. پس از خنک شدن، سانتریفیوژ نمونه‌ها در دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد انجام گرفت و میزان جذب در طول موج ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری گردید. منحنی استاندارد 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.

تترازولیوم (NBT) استفاده شد، جذب نوری هر نمونه در طول مع 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 میلی گرم پروتین گزارش شد (۳۳). جهت اندازه‌گیری گلوکاتایون S-ترانسفراز از روش Habig و همکاران (۱۲) با اصلاحات کمی (۲۹) استفاده شد. در یک پلیت ۹۶ خانه 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،۴-دینیتروبنزن (CDNB) ۱ میلی مولار همراه گلوکاتایون احیا (GSH) (۱۰ میلی مولار) در فسفات بافر پتاسیم ۰/۱ مولار با pH برابر ۶/۵ می باشد. جذب مخلوط واکنش در طول موج ۳۴۰ 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 میلی گرم 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 ۴ درجه به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۲۰۰۰ سانتریفیوژ



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

نتایج

نسبت به غلظت‌های ۰/۰۲ و ۰/۰۵ میلی‌گرم مشاهده گردید ($p < 0/05$). مقدار GSH در ماهیان با افزایش غلظت نانوذره افزایش یافت، چنانکه در غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر به بیشترین مقدار رسید ($65/8 \pm 0/4$) میکرومول بر گرم وزن تر). اما در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر میزان آن کاهش چشمگیری نشان داد و به کمترین مقدار در مقایسه با سایر تیمارها و کنترل رسید ($p < 0/05$). 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 میلی‌لیتر نسبت به غلظت‌های ۰/۰۲ و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر معنی دار بود ($p < 0/05$).

فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و گلوکاتایون S-ترانسفراز به طور معنی‌داری در غلظت‌های ۰/۰۲ و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از نانوذره اکسید روی در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت ($p < 0/05$). برعکس مواجهه ماهیان با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از نانو اکسید روی منجر به کاهش معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های استرس اکسیداتیو گردید (جدول ۳)

نتایج سنجش غلظت واقعی نانو اکسید روی در آکواریوم‌ها در جدول ۱ آورده شده است. غلظت واقعی نانوذرات در آب در زمان‌های صفر، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از مواجهه مورد مطالعه قرار گرفت. افزایش زمان تأثیر معنی‌داری بر روی غلظت نانو ذره اکسید روی نشان نداد.

مقدار نانوذره روی اندازه‌گیری شده در بافت مغز ماهیانی کلمه در تیمارهای مختلف در جدول ۱ 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 میلی‌لیتر نانوذره روی قرار داشتند به طور معنی‌داری نسبت به سایر غلظت‌ها (۰/۰۲ و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و نیز نمونه کنترل بیشتر بود. ($p < 0/05$).

قرار گرفتن ماهیان در مواجهه با غلظت ۰/۰۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نانوذره اکسید روی منجر به به افزایش در میزان مالون دی‌آلدید (MDA) در بافت مغز بچه ماهیان کلمه نسبت به گروه کنترل گردید (جدول ۱). این افزایش معنی‌دار در میزان مالون دی‌آلدید در بافت مغز این ماهیان، زمانی که در معرض نانوذره با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر قرار داشتند

جدول ۱ - غلظت واقعی نانو اکسید روی در آب آکواریوم با استفاده از دستگاه جذب اتمی در زمان‌های مختلف

غلظت نانوذره روی (میلی‌گرم در لیتر)	زمان (ساعت)		
	صفر	۱۲	۲۴
صفر (کنترل)	-	-	-
۰/۰۲	$20 \pm 0/2^a$	$20/9 \pm 0/12^a$	$20/86 \pm 0/1^a$
۰/۰۵	$50/05 \pm 1/34^a$	$51/17 \pm 0/87^a$	$50/76 \pm 0/43^a$
۱	$100/33 \pm 0/21^a$	$98/62 \pm 0/35^a$	$98/10 \pm 0/16^a$

حروف غیرهمنام نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است ($p < 0/05$).



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)	مقدار MDA در بافت مغز (نانومول بر گرم بر وزن تر)	مقدار GSH در بافت مغز (میکرومول بر گرم وزن تر)
صفر (کنترل)	۵۴/۵±۰/۱ ^a	۱/۰۷±۰/۳ ^a	۴۱/۶±۱/۲ ^a
۰/۰۲	۶۴/۳±۰/۲۱ ^b	۱/۶۵±۰/۶ ^b	۶۲/۵۱±۰/۳ ^c
۰/۰۵	۷۲/۸±۰/۳۲ ^c	۱/۸۴±۰/۳ ^b	۶۵/۸±۰/۴ ^c
۰/۱	۹۸/۲±۱/۴ ^d	۴/۵±۰/۵۳ ^c	۲۰/۳±۰/۳۷ ^b

حروف غیرهمنام نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار است (p<۰/۰۵).

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

غلظت نانوذره روی (میلی گرم بر لیتر)	فعالیت آنزیم CAT میکرومول پراکسید هیدروژن بر گرم بافت	فعالیت آنزیم SOD یونیت بر میلی گرم پروتئین	فعالیت آنزیم GST نانو مول بر میلی گرم پروتئین بر دقیقه
کنترل	۲۶/۸±۳/۱ ^b	۲۲±۴/۳ ^b	۲۴۰±۲۳/۲ ^b
۰/۰۲	۳۵±۵/۷ ^c	۳۰±۳/۱ ^c	۳۰۲±۱۷/۸ ^c
۰/۰۵	۳۷/۱±۱/۳ ^c	۲۹/۲±۲/۷ ^c	۳۰۵/۶±۱۴/۱ ^c
۰/۱	۲۳/۱±۴/۲ ^a	۱۱/۸±۲/۷ ^a	۹۶±۸/۱ ^a

حروف غیرهمنام نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار است (p<۰/۰۵).

بحث

قرار داشتند مطابقت دارد، چنانکه میزان روی در بافت مغز این دو گونه با افزایش دوز در معرض قرارگیری افزایش یافت (۴، ۶). 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 نانوآکسید 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

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 تیلپیا دو گونه *O.niloticus* و *T.zillii* که در معرض غلظت‌های ۰/۵ و ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر

است (۶). 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 (۴). 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 (۳۴، ۵). گلوپاتیون ترکیبی می‌باشد که می‌تواند هم به طور مستقیم و هم به عنوان سوپراترای آنزیم‌های گلوپاتیون S-ترانسفراز و یا گلوپاتیون پراکسیداز در سم‌زدایی شرکت نماید. کاهش در مقدار گلوپاتیون، 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 گلوپاتیون در بافت مغز گردید. مواجهه ماهی *O. niloticus* با نانوذره اکسید روی به مدت هفت روز باعث کاهش گلوپاتیون در بافت کبد و آیشش شده است (۵).

آنزیم گلوپاتیون S-ترانسفراز با مصرف گلوپاتیون (GSH) باعث افزایش حلالیت نانوذره و دفع آن از بدن می‌گردد. بنابر این نقش مهمی در محافظت بافت‌ها علیه آسیب‌های اکسیداتیو دارد (۲۴). 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

به پراکسید هیدروژن توسط آنزیم SOD صورت می‌گیرد. 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 می‌گردد. افزایش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دسموتاز منجر به کاهش رادیکال سوپر اکسید 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، ۱۴). اما در برخی از مطالعات دیگر کاهش در مقادیر این آنزیم‌ها گزارش شده است (۱۴). این اختلاف در نتایج مختلف ناشی از نوع گونه، مدت زمان در معرض قرارگیری، غلظت و نوع ماده آلاینده دارد (۱۴). در مطالعه حاضر، سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز، سوپر اکسید دسموتاز و گلوپاتیون S-ترانسفراز در بافت مغز ماهیان کلمه پس از هفت روز مواجهه با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کاهش یافت. نتایج مشابهی توسط Saddick و همکاران (۲۶) و Alkaladi و همکاران (۵، ۶) 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 اکسیداتیو SOD، GST، CAT و گلوپاتیون پراکسیداز (GPX) مشاهده شده



توانایی سم‌زدایی بافت مغز است. کاهش در مقدار گلوتاتیون نیز می‌تواند بیانگر عدم کارایی مناسب سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در بافت مغز می‌باشد.

منابع

۱. هدایتی، ع.ا.، جهانبخشی، ع.، مرادزاده، م.، جوادی موسوی، م.، ۱۳۹۳. تأثیر سمیت تحت‌کشنده 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 Environmental Science*, 7 (1): 431-439.

میلی‌لیتر منجر به افزایش فعالیت آنزیم گلوتاتیون-S-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 دی‌آلدهید (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.

در این مطالعه، در معرض قرارگیری ماهیان با غلظت بالای نانوذره روی (۱/۰ میلی‌گرم بر لیتر) منجر به افزایش سطح مالون دی‌آلدهید در بافت مغز گردید. که این افزایش در گونه‌های *C. carpio* و *O. niloticus* مواجهه شده با نانوذره روی نیز، قبلاً 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).

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که در معرض قرارگیری ماهی کلمه با نانوذره اکسید روی به صورت تحت‌کشنده موجب افزایش مقدار MDA و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیم‌های CAT، SOD و GST گردید در حالیکه میزان گلوتاتیون بافت مغز کاهش پیدا نمود. افزایش مشاهده شده در فعالیت آنزیم‌های استرس‌اکسیداتیو بیانگر



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 mammalian thioredoxin 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., Mader 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 and methylmercury toxicity in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Environmental Research*, 90(3): 217-225.
23. Pandey S., Parvez S., Sayeed 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.
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) Toxicology 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 Biochemistry*, 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., Hohlfield 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.



- 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 and 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 Medicine*, 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 Chimica 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