عملکرد سطوح مختلف نانو ذرات اکسیدروی (ZnO NPs) بر میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کبد در ماهی کوی

- **محمد کاظمیان***: گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- **مرجان بخشی**: گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۷

چکیده

کاربردهای صنعتی پیشرفته نانوذرات (NPs) موجب افزایش احتمال انحلال آن‌ها در اکوسیستم‌های آبی شده و از سویی مصرف آن‌ها توسط موجودات آبزی، قبل ازبین رفتن این ذرات، باعث تهدید زندگی آبزیان شده است. از آن‌جا که نانوذرات‌ها پس از ورورد باعث تغییر مکانیسم‌های طبیعی فیزیولوژیک ماهیان می‌شود، لذا هدف این تحقیق، تاثیر نانوذرات اکسیدروی (۰، ۱، ۲، ٤ و ۸ میلی‌گرم بر لیتر) به‌روش ساکن بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کبد در ماهی کوی (*Cyprinus Carpio*) در یک دوره ۲ و ۱۰ روزه بود. ذرات نانواکسید روی موجب تغییرات معنی‌دار قابل توجهی در آنزیم‌های کبدی شدند ($p<0/05$). این تغییرات آنزیم‌های کبدی در پایان روز دهم شامل کاهش سطوح سوپراکسید دسموتاز (SOD) ۰/۱۳±۹۲، گلوتاتیون پراکسیداز (GSH-Px) ۰/۲۷±۱۹/۱٤، کاتالاز (CAT) ۰/۲۳±۳٦/۲۱ (نانومول برمیلی‌گرم پروتئین) و افزایش سطح مالون دی‌آلدئید (MDA) ۰/۹۷±۵۰/۱۸ (نانومول برمیلی‌گرم پروتئین) نسبت به گروه شاهد بود که این تغییرات وابسته به‌میزان دوز و مدت زمان در معرض قرار گرفتن ماهیان به نانوذرات بود. این نتایج حاکی از آن است که نانوذرات روی در محیط‌های آبی با غلظت‌های مورد مطالعه باعث افزایش استرس اکسیداتیو و اثرات نامناسبی بر آنزیم‌های کبدی داشته و این پارامترها را دچار تغییرات شدید می‌نماید.

کلمات کلیدی: نانوذرات اکسید روی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کبد، ماهی کوی

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Aquaculture@Live.com

مقدمه

مقدار بیش از حد فلزات که امروزه به اکوسیستم‌های آبی وارد می‌شود، ممکن است زنجیره غذایی را تحت تأثیر قرار دهد و در نهایت سلامتی انسان را به‌ویژه برای کسانی که به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم با این زیستگاه در ارتباط هستند، به مخاطره بیاندازد (Weldegebriel و همکاران، ۲۰۱۲). فناوری نانو، یک صنعت به سرعت در حال رشد با اهمیت اقتصادی جهانی بوده که با تکنولوژی‌های جدید، نانوذرات (NPs) را تولید می‌کند. این ذرات دارای ابعاد کم‌تر از ۱۰۰ نانومتر با ویژگی‌های متفاوتی می‌باشند. اندازه منحصر به‌فرد NPs منجر به ایجاد بسیاری از خصوصیات فیزیکی شیمیایی خاص برای این‌گونه ذرات و در ادامه خطرات جدی برای سلامت انسان و محیط زیست شده است (Nowack و Bucheli، ۲۰۰۷). نانوذرات فلزی امروزه در بسیاری از مواد، لوازم آرایشی و وسایل کاربردی دیگر استفاده می‌شوند (Brun و همکاران، ۲۰۱۴). اکسیدروی باخواص فیزیکی و شیمیایی منحصر به فرد مانند ضریب اتصال الکتروشیمیایی بالا، پایداری شیمیایی بالا، پایداری در برابر نور و جذب طیف وسیعی از تابش نور، یک ماده پرمصرف چندمنظوره است (Segets و همکاران، ۲۰۰۹). البته روی یک عنصر ضروری برای موجودات زنده است اما باعث ایجاد مسمومیت به‌ویژه به‌صورت نانوذرات می‌شود (Fernandez و همکاران، ۲۰۱۳). لذا نانوذرات (NPs) از جمله نانوذرات روی، خطر زیست محیطی داشته و محققان تلاش کردند تا نتیجه نانو ذرات را در مدل‌های حیوانی بررسی کنند مانند Khan و همکاران (۲۰۱۵) به‌طور اجمالی به مسمومیت ناشی از نانوذرات نقره در ماهیان پرداختند. هرچند که فناوری نانوفلزها به‌طور فزاینده‌ای در فرایندهای صنعتی استفاده می‌شوند، ولی تاثیر آن‌ها در رفتار، فیزیولوژی و زیست‌سازگاری ارگانیسم‌های آبی به‌دلیل کمبود اطلاعات، در هاله‌ای از ابهام است و درک کاملی از آن‌ها وجود ندارد (Chen و همکاران، ۲۰۱۲). البته مطالعاتی نیز صورت گرفته نظیر، اثر نانوذرات موجود در جیره غذایی که باعث پراکسیداسیون لیپیدی در کبد و قلب گربه‌ماهی آفریقایی شده است (Baker و همکاران، ۱۹۹۷). در دهه‌های اخیر سنجش آنتی‌اکسیدان‌های موجود در آبزیان به‌عنوان نشانگرهای زیستی در زمان قرارگیری در معرض انواع آلاینده‌ها، طیف وسیعی از مطالعات سم‌شناسی را به‌خود اختصاص داده است. در واقع تاکید بسیاری از این مطالعات بر روی اندازه‌گیری انواع آنتی اکسیدان‌ها و آنزیم‌های اکسیداز در اندام‌های مختلف، به‌دلیل پتانسیل بالای واکنش‌دهی آنتی‌اکسیدان‌ها به‌عنوان بخشی از سیستم دفاعی بدن در برابر انواع آلاینده‌ها و سموم می‌باشد و مهم‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دسموتاز و گلوتاتیون می‌باشند (Almeida و همکاران، ۲۰۰۷). در تحقیقی که اثرات ZnO-NPs بر ماهی مدوکا (*Oryzias latipe*) صورت گرفت، نشان داد که سمیت این ذرات، وابسته به دوز می‌باشد. فعالیت SOD و GSH به‌طور قابل توجهی در نمونه‌های کبد و مغز کاهش یافته است، اما در زمان مواجهه با افزایش دوز نانوذرات، به‌نظر می‌رسد با تنظیم سطوح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی اثرات آن کاهش یافته است (Li و همکاران، ۲۰۰۹). از آن‌جاکه کبد، بیش‌ترین ارتباط را با سم زدایی و فرایندهای تغییرشکل زیستی دارد لذا، بیش‌ترین تاثیر را از آلاینده‌های موجود در آب می‌پذیرد (Topham و همکاران، ۲۰۰۱). بنابراین بیش‌ترین فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در آن مشاهده می‌شود که می‌تواند به‌دلیل واکنش‌های اکسیداسیونی چندگانه تولید رادیکال‌های آزاد باشد (Gule و همکاران، ۱۹۹). استرس اکسیداتیو (OXS) یکی از مهم‌ترین مکانیزم‌های گزارش شده در مورد سمیت NPs است (Mocan و همکاران، ۲۰۱۰). از این‌رو با توجه به اهمیت و جایگاه کبد در فرایندهای تاثیر و پالایش سموم، هدف از پژوهش حاضر، تاکید بر اثرات سمیت Zn NPs (کم‌تر از ۴۰ نانومتر) با استفاده از چندین بیومارکرهای بیوشیمیایی و اکسیداتیو در ماهی کوی، به‌عنوان یک گونه با اهمیت آزمایشگاهی و تغذیه‌ای از لحاظ قرابت نزدیک با کپورماهیان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر، در خرداد ماه سال ۱۳۹۶ در یک کارگاه خصوصی در تهران انجام شده است. نانو ذرات سلنیوم استفاده شده دارای غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر (۱۰۰۰ppm) بوده و از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان (مشهد، ایران) خریداری شد. این نانو ذرات ساخت کشور اسپانیا بوده و اندازه ذرات آن بین ۳۵ تا ۴۵ نانومتر می‌باشد. هم‌چنین درصد خلوص این محصول ۹۹/۹۵ درصد بود. تعدادی ماهی کوی (*Cyprinus carpio*) به‌مدت ۱۰روز با جیره غذایی پایه تغذیه و با سیستم پرورشی سازگار شدند. پس از اتمام دوره سازگاری، ۱۵۰ قطعه ماهی با ظاهر سالم (عدم وجود بدشکلی و خوردگی باله) و با میانگین طولی ۱/۲۷±۹/۵۸ سانتی‌متر و میانگین وزنی ۵/۶±۲۰/۱۲ گرم انتخاب شدند. این آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با پنج تیمار در سه تکرار که در مجموع شامل ۱۵ واحد مخزن شیشه‌ای ۱۰۰ لیتری، هر واحد شامل ۱۰ قطعه ماهی کوی، در مدت ۱۰روز انجام گرفت. میانگین دمای آب طی دوره آزمایش ۰/۲±۲۷ درجه سانتی‌گراد بود. تقسیم‌بندی تیمارها به‌صورت: شاهد (صفر میلی‌گرم در لیتر نانواکسید روی)، تیمار یک (۱ میلی‌گرم درلیتر نانواکسید روی)، تیمار دو (۲ میلی‌گرم در لیتر نانواکسید روی) و تیمار سه (۴ میلی‌گرم در لیتر نانواکسید روی) تیمار چهار (۸ میلی‌گرم در لیتر نانواکسید روی) انجام شد. دوزهای انتخابی زیر حد کشندگی بوده و با توجه به تحقیقات صورت گرفته و روش سایر تحقیقات بوده است (شکوری و همکاران، ۱۳۹۱؛ Hao و همکاران، ۲۰۱۳ ؛ Subashkumar و Selvanayagam، ۲۰۱۴).

سنجش شاخص‌های استرس اکسیداتیو: برای اندازه‌گیری این شاخص‌ها، پس از توزین کبد با محلول فیزیولوژیک ۶۵٪ شست و شو داده و سپس با نسبت به ۵ با سرم فیزیولوژیک ۹۵٪ هموژن شده و در داخل یخ نگه‌داری شدند. محلول هموژن شده با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در پایان، محلول رویی جداسازی و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگه‌داری شد و طی مدت ۲۴ ساعت شاخص‌های مورد نظر سنجیده شدند (Han و همکاران، ۲۰۱۱).

سنجش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD): سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز براساس درگیری رادیکال سوپراکسید در اکسیداسیون خودبه‌خودی پیروگالول و مطابق با روش Marklund و Marklund (۱۹۷۴) صورت گرفت. در این روش پس از مخلوط کردن بافر Tris–HCl ۵۰ میلی‌مولار با پلاسما، پیروگالول به آن اضافه گردید، سپس اکسیداسیون خودبه‌خودی پیروگالول در طول موج ۴۲۰ نانومتر قرائت شد. هر واحد فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به‌صورت مقدار آنزیم مورد نیاز برای ممانعت از اکسیداسیون پیروگالول تا ۵۰ درصد در یک دقیقه تعیین گردید.

سنجش فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز (GSH-Px): فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز با استفاده از روش ارائه شده توسط Marklund و Marklund (۱۹۷۴) اندازه‌گیری شد. اساس این روش سنجش سرعت اکسیداسیون گلوتاتیون توسط هیدروژن پراکساید است. برای اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم پس از مخلوط کردن NADPH هشت میلی‌مولار و گلوتاتیون احیاء شده ۱۵۰ میلی‌مولار با پلاسما، سدیم آزید ۰/۱۲ مولار، گلوتاتیون ردوکتاز و بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار به آن اضافه شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه گردید. سپس محلول ۲ میلی‌مولار هیدروژن پراکساید به مخلوط حاصله اضافه و میزان جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر قرائت گردید. سپس فعالیت آنزیم با کاهش جذب نوری محلول در دومین و چهارمین دقیقه اندازه‌گیری شد.

سنجش فعالیت کاتالاز (CAT): برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز از روش Goth (۱۹۹۱) استفاده شد. براساس این روش بافر فسفات با پلاسما مخلوط و به‌مدت یک دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. سپس فعالیت آنزیم با کاهش جذب نوری محلول در طول موج ۲۴۰ نانومتر قرائت گردید. هر واحد فعالیت آنزیم به‌صورت ۰/۰۵ کاهش در جذب نوری محلول تعیین گردید.

سنجش مالون‌دی آلدئید (MDA): غلظت مالون‌دی‌آلدئید سرم طبق روش استاندارد Buege و Aust (۱۹۷۸) با استفاده از تیوباربیتوریک اسید به‌صورت اسپکتروفتومتریک اندازه‌گیری و ثبت گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: در تجزیه و تحلیل آماری قبل از آنالیز، داده‌ها نرمال‌سازی شدند و با توجه به توزیع نرمال داده‌ها، از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد و سپس مقایسه داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ با سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام شد.

نتایج

تمام آنزیم‌های اکسیداتیو کبدی یعنی GSH-Px، CAT و SOD تغییرات وابسته به زمان را نشان دادند (جداول ۱ و ۲). سنجش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کبد حاکی از آن بود که فعالیت آنزیم‌های SOD، GSH-Px و CAT در ماهیان کوی که در معرض ۸ میلی‌گرم بر لیتر نانواکسید روی قرار داشتند به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها کاهش یافته است و کم‌ترین مقدار هر سه آنزیم در دوز ۸ میلی‌گرم بر لیتر نانواکسید روی در روز دهم ثبت گردید (جداول ۱ و ۲). هم‌چنین با توجه به مقادیر سطح آنزیم MDA در کبد ماهیان هر دو گروه ۲ و ۱۰ روز در غلظت ۸ میلی‌گرم بر لیتر نانواکسید روی به‌طور معنی‌داری در مقایسه با سایر تیمارهای آزمایشی افزایش یافته است (جداول ۱ و ۲).

جدول ۱: نتایج حاصل از سطوح مختلف نانو ذرات سلنیوم بر فعالیت آنزیم‌های SOD، GSH-Px و CAT و غلظت MDA در کبد ماهیان کوی بعد از ۲ روز (انحراف معیار ± میانگین، n=۹)

میزان نانو ذرات اضافه شده به آب (میلی‌گرم بر لیتر)	آنزیم های کبدی			
	MDA (نانومول بر میلی‌گرم پروتئین)	GSH-Px (میکرو نانومول بر میلی‌گرم پروتئین)	SOD (واحد بر میلی‌گرم پروتئین)	CAT (واحد بر میلی‌گرم پروتئین)
۰	۳۰±۰/۵۰^{a}	۲۵±۰/۲۷^{e}	۱۶۲±۰/۱۶^{e}	۴۶±۰/۱۱^{e}
۱	۳۲±۰/۶۳^{b}	۲۴±۰/۱۷^{d}	۱۶۱±۰/۱۳^{d}	۴۵/۵۲±۰/۳۲^{d}
۲	۳۲/۵۱±۰/۳۴^{c}	۲۳/۵۵±۰/۳۵^{c}	۱۶۰±۰/۱۳^{c}	۴۵±۰/۱۰^{c}
۴	۳۴±۰/۴۳^{d}	۲۳±۰/۱۴^{b}	۱۵۹ ±۰/۰۸^{b}	۴۴±۰/۱۷^{b}
۸	۳۶/۶±۰/۳۶^{e}	۲۰/۷۸±۰/۲۵^{a}	۱۳۶±۰/۱۰^{a}	۳۹±۰/۳۵^{a}

وجود حروف مشابه در هر ردیف بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P>۰/۰۵).

جدول ۲: نتایج حاصل از سطوح مختلف نانو ذرات سلنیوم بر فعالیت آنزیم‌های SOD ، GSH-Px و CAT و غلظت MDA در کبد ماهیان کوی بعد از ۱۰ روز (انحراف معیار ± میانگین، n=۹)

میزان نانو ذرات اضافه شده به آب (میلی گرم بر لیتر)	آنزیم‌های کبدی			
	MDA (نانومول بر میلی‌گرم پروتئین)	GSH-Px) (میکرو نانومول بر میلی‌گرم پروتئین)	SOD (واحد بر میلی‌گرم پروتئین)	CAT (واحد بر میلی‌گرم پروتئین)
۰	۳۰±۰/۴۰^{a}	۲۶±۰/۲۵^{e}	۱۶۲/۰۶±۰/۲۵^{e}	۴۶/۰۳±۰/۱۴^{e}
۱	۳۱/۱۲±۰/۶۹^{b}	۲۴/۶ ±۰/۳۳^{d}	۱۵۹/۱۱±۰/۴۸^{d}	۴۴/۵۵±۰/۲۴^{d}
۲	۳۳±۰/۳۵^{c}	۲۴/۰۵±۰/۳۰^{c}	۱۵۷/۳۳±۰/۷۹^{c}	۴۶/۵۵±۰/۳۵^{c}
۴	۳۳/۶۴±۰/۴۱^{d}	۲۲/۲۳/±۰/۳۲^{b}	۱۵۵ ±۰/۱۵^{b}	۴۱±۰/۱۸^{b}
۸	۵۰/۱۸ ±۰/۹۷^{e}	۱۹/۱۴±۰/۲۷^{a}	۹۲±۰/۱۳^{a}	۳۶/۲۱±۰/۲۳^{a}

وجود حروف مشابه در هر ردیف بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P>۰/۰۵).

بحث

آلودگی از مهم‌ترین مسائل زیست‌محیطی بوده و تهدیدی جدی برای سلامتی میلیون‌ها نفر انسان و اکوسیستم‌های جهانی به‌شمار می‌رود (Brand، ۲۰۰۱). ماهیان نقش اصلی اکولوژیکی در زنجیره غذایی آبزیان را ایفا می‌کنند و به‌عنوان یک عامل کلیدی باعث انتقال انرژی از سطوح پایین‌تر به سطوح بالاتر می‌باشند. به‌دلیل توانایی ماهیان در متابولیسم، تمرکز و تجمع فلزات، به‌عنوان شاخص زیست‌محیطی وضعیت اکوسیستم آبی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Monteiro و همکاران، ۲۰۱۰). بسیاری از اکسیدان‌ها به‌عنوان نشانگرهای زیست محیطی آلاینده‌ها در انواع گیاهان دریایی و آب‌شیرین معرفی شده‌اند، زیرا تغییرات آن‌ها در پاسخ به آلاینده‌ها بروز می‌کند (Borkovic و همکاران، ۲۰۰۵) از آن‌جاکه اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها به‌عنوان شاخص‌های بیوشیمی حساس به‌شمار می‌آیند، قبل از آن‌که اثرات خطرناک زیست‌محیطی رخ دهند، لذا نقش مهمی درنظارت بر آلودگی آب دارند (Gule و همکاران، ۱۹۹۷). هم‌چنین استرس اکسیداتیو یک راه معمول مسمومیت می‌باشد و مشخص شده که گونه‌های اکسیژن فعال (ROS: Reactive oxygen species) فیزیولوژی، رشد و بقاء ارگانیسم‌های آبزی را تحت تاثیر قرار می‌دهند. ماهیان، مانند پستانداران، دارای سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی مناسبی برای خنثی‌سازی اثرات سمی ROS هستند (Pandey و همکاران، ۲۰۰۳). در بررسی حاضر نیز مشخص شد که نانو ذرات روی بر فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی یعنی SOD, CAT,GSH و MDA در ماهیان کوی تاثیر دارند. نتایج به‌دست آمده از بررسی تاثیر سطوح مختلف نانواکسیدروی برآنزیم‌های کبدی ماهی کوی نشان داد که هیچ مرگ و میری در این ماهیان در غلظت‌های ۱ تا ۸ میلی‌گرم بر لیتر از نانواکسید روی در طی ۱۰ روز مشاهده نشد و این امر حاکی از آن است که این غلظت‌ها سمیت کشنده بر روی این ماهیان را ندارد که نتیجه حاصله با مطالعات Hao و همکاران (۲۰۱۳) نیز منطبق است. در تحقیقی مشابه، اثرات نانواکسید روی بر تیلاپیا، غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر تنها باعث مرگ یک ماهی شده است ولی تنظیمات اسمزی-یونی در این ماهی دچار اختلال شده است (Kaya و همکاران، ۲۰۱۵). فعالیت SOD تحت تاثیر نانوذرات اکسید روی از غلظت ۱ تا ۸ میلی‌گرم در لیتر در مقایسه با گروه شاهد در هر دو تیمار روزهای دوم و دهم به‌تدریج در کبد کاهش یافته و تغییر معنی‌داری داشته است (جداول ۱ و ۲). البته انتظار می‌رود به‌دلیل ماهیت سمی بودن نانوذرات کاربردی در تحقیق در هر دو سری از تیمارهای روز دوم و دهم، از بدو ورود نانوذرات به بدن واکنش سمیت زدایی SOD آغاز شده است و با افزایش دوز ZnOPs از توانایی کبد در تولید آنزیم SOD به‌دلیل تغییرات بافت کبدی، کاسته شده است. در تحقیقی که بر تاثیر نانوذرات اکسیدروی بر ماهی تیلاپیا (*Oreochromis mossabicus*) انجام شد، سطح آنزیم SOD در کبد، نسبت به آبشش و عضلات بیش‌تر بوده و مشخص شد که کبد اندام حساس‌تری نسبت به ZnOPs می‌باشد و کاهش تدریجی آنزیم سوپراکسید دسموتاز نسبت به گروه شاهد مشاهده شد (Vijayakumar و همکاران، ۲۰۱۶) که مطابق نتایج حاصله از این تحقیق نیز می‌باشد. در واقع آنزیم SOD با کاتالیز کردن واکنش ناگهانی یون منفی رادیکال سوپراکسید (-O2)، فعالیت مجدد اکسیژن را کاهش می‌دهد. کاتالاز نقش مهمی در حفاظت آنتی‌اکسیدانی بی‌مهرگان ایفا می‌کند (Livingstone، ۲۰۰۳). این آنزیم با تبدیل پراکسید اکسیژن به آب و اکسیژن، نقش مهمی در جلوگیری از استرس اکسیداتیو و هموستازی سلول ایفا می‌کند (Kappus، ۱۹۸۵). فعالیت کاتالاز به‌طور معنی‌داری در تمامی غلظت‌های مورد آزمایش در روزهای دوم و دهم، به‌جز تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر، در روز دهم نسبت به گروه شاهد کاهش یافت. این یافته برخلاف یافته‌های مورد آزمایش در تیلاپیا (*Oreochromis mossabicus*) بوده چراکه کاتالاز در غلظت‌های زیر حد کشندگی، در کبد افزایش یافته است و میزان این آنزیم در آبشش‌ها کم‌تر از کبد بوده است (Vijayakumar و همکاران، ۲۰۱۶). البته این اختلاف می‌تواند به‌دلیل فیزیولوژی متفاوت در ماهیان مختلف بوده و هم‌چنین عکس‌العمل متفاوت کبد

نسبت به آبشش‌ها در دوزهای مختلف از سمیت مواد باشد و از سویی از آن‌جاکه کاتالاز تکمیل کننده اثرات آنزیم SOD در کبد است، انتظار می‌رود با افزایش غلظت ZnOPs، بافت کبد تخریب شده و ترشح هر دوآنزیم تحت‌تاثیر سمیت‌حاصله از نانوذرات‌روی قرار گیرد. گلوتاتیون پراکسیداز یک تری‌پپتید بوده که به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند و ۹۰٪ از تیول‌های (انواع ترکیبات آلی که از سولفید هیدروژن به‌دست می‌آید: Thiol غیرپروتئینی داخل سلولی را تشکیل می‌دهد (Sen و همکاران، ۱۹۹۴) و رادیکال‌های اکسیژن، پراکسید هیدروژن و هیدرو پراکسیدهای لیپیدها را به‌واسطه گروه عاملی SH– (در شیمی آلی تیول ترکیبی است که دارای یک گروه عاملی به شکل SH- باشد) از بین می‌برد (Reed و همکاران، ۱۹۸۰). در تحقیق حاضر با افزایش دوز ذرات نانواکسیدروی،فعالیت گلوتاتیون در ماهیان کوی در روزهای دوم و دهم در تمامی غلظت‌ها، نسبت به گروه شاهد کاهش یافت و تغییرات معنی‌دار این آنزیم در کبد می‌تواند به جهت پاسخ به تغییرات اکسیداتیو ناشی از وجود ZnOPs باشد و احتمال می‌رود باعث از بین رفتن بافت طبیعی کبد و در نهایت کاهش مقدار GSH شده است. در تحقیقی که بر ماهی تیلاپیا انجام شد مشخص شد که با افزایش دوز اکسیدنانوذرات‌روی به‌میزان ۵۰۰ppm، باعث افزایش مایع ادم، التهاب دیواره عروق، تخریب رگ‌های خونی و ایجاد نقاط نکروز در بافت کبد شده‌است(Vijayakumar و همکاران، ۲۰۱۶)وافزایش‌سطح گلوتاتیون در اندام‌ها، نقش سازگاری و حفاظت این بیومولکول را در برابر استرس اکسیداتیو ناشی‌از ZnOPs نشان می‌دهد(Pandey و همکاران، ۲۰۰۳). لیپیدپراکسیداز(LPO)پیامدتولید اکسی‌رادیکال (گروهی از رادیکال‌ها که شامل اتم اکسیژن فعال شده هستند) بوده که خود باعث پراکسیداسیون چربی‌های سلولی می‌شوند (Winston و Di Giulio، ۱۹۹۱)و مالاتیون به‌عنوان شاخص‌تولید لیپیدپراکسیدازمورد سنجش قرار می‌گیرد (Bhattacharya و همکاران، ۲۰۰۷). فعالیت مالاتیون در بافت کبد ماهیان کوی در غلظت ۱ تا ۸ میلی‌گرم در لیتر از نانوذرات اکسید روی در مقایسه با گروه شاهد از افزایش تدریجی در روز دوم و افزایش معنی‌دار در دوز ۸ میلی‌گرم در لیتر ZnOPs در روز دهم ثبت شد. دستاوردهای مشابهی نیز بر روی کبد و آبشش ماهی *fathead minnow* نیز به‌دست آمده است (Zhu و همکاران، ۲۰۰۶). در تحقیق دیگری که بر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان صورت گرفت، نانوذرات را باعث افزایش لیپیدپراکسیداز در بافت آبشش و روده دانسته که درنتیجه استرس اکسیداتیو این بافت‌هامی‌باشد و هم‌چنین افزایش میزان LPO در کبد بیش‌تر از سایر بافت‌ها بوده و سنجش آن در این بافت جهت ردیابی نانوذرات موثرتر می‌باشد (Federici و همکاران، ۲۰۰۷). اگرچه بافت کبدی ماهی یک عضو مهم متابولیسم فعال و سم‌زدایی است بلکه نسبت به آلاینده‌ها نیز بسیار حساس می‌باشد. تحقیقات‌حاکی از آن است‌که زنوبیوتیک‌ها یا ترکیبات موادی که با غلظت‌های بالاتر از حد نرمال در بدن وارد می‌شوند در کبد متابولیز می‌شوند (Smith همکاران، ۲۰۰۷؛ Federici و همکاران، ۲۰۰۷). پژوهش حاضر افزایش غلظت نانوذرات اکسید روی (تا غلظت ۸ میلی‌گرم در لیتر) را در ماهیان کوی، سمی تشخیص داده که به دلیل اثرات پاتوفیزیولوژی نظیر آسیب اکسیداتیو کبدی می‌باشد. ورود مواد سمی اثرات بسیار مهمی را در ماهیان ایجاد می‌کند که اختلالات فیزیولوژی ازجمله آن‌ها می‌باشد (Omoregie و همکاران، ۱۹۹۰). نتایج نشان داد که غلظت زیر حدکشنده نانوذرات اکسید روی در این تحقیق دارای ویژگی خطرناک برای ماهیان کوی می‌باشد و ممکن است به‌عنوان یک آلودگی مهم در محیط آبی شناخته شود. از این‌رو، باتوجه به افزایش کاربردروزافزون نانوذرات‌ها،نیاز به‌مطالعات بیش‌تری جهت ارزیابی خطرات زیست‌محیطی آن‌ها در جانداران آبزی و محیط زیست آبی وجود خواهد داشت.

منابع

۱. **شکوری، م.؛ ابدالی، س. و نگارستان، ح.؛ ۱۳۹۱.** بررسی اثر سمیت روی بر برخی از پارامترهای بیوشیمیایی خون بچه‌ماهی فیتوفاگ. مجله‌پژوهش-های‌علوم و فنون‌دریایی. سال ۹، شماره ۳، صفحات ۳۱ تا ۳۹.

۲. **Abdel-Khalek, A.; Badran, S. and Marie, M., 2016**. Toxicity evaluation of copper oxide bulk and nanoparticles in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, using hematological, bioaccumulation and histological biomarkers. Fish Physiology and Biochemistry. Vol. 42, No. 4, pp: 1225-1236.

۳. **Almeida, E.A.; Loureiro, G.R.; Marrtinez, S. and Miyamoto, J., 2007.** Oxidative stress in ***Perna perna*** and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. Vol. 146, pp: 588-600.

۴. **Bhattacharya, S.; Bhattacharya, A. and Roy, S., 2007.** Arsenic-induced responses in freshwater teleost. Fish Physiology and Biochemistry. Vol. 33, pp: 463-473.

۵. **Baker, RTM.; Martin, P. and Davis, S.J., 1997**. Ingestion of sub-lethal levels of iron sulphate by African catfish affects growth and tissue lipid peroxidation. Aquatic Toxicology. Vol. 40, pp: 51-61.

۶. **Borkovic, S.S.; Saponjic, J.S.; Pavlovic, S.Z.; Blagojevic, D.P. and Milos evic, S.M., 2005**. The activity of antioxidant defense enzymes in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic Sea. Comp. Biochemistry Physiology. Vol.8, pp: 413-428.

۷. **Brand, M.E., 2001**. Bioaccumulation of Metals in *Labeo Congoro* from the Olifants River (Mpumalanga) and the Effect of Nickel on the Hematology of Fish (M.Sc. thesis). Rand Afrikaans Univ.

۸. **Brun, NR.; Lenz, M.; Wehrli, B. and Fent, K., 2014**. Comparative effects of zinc oxide nanoparticles and dissolved zinc on zebrafish embryos and eleuthero-embryos: Importance of zinc ions. Science of the Total Environment. Vol. 476-477, pp: 657-666.

۹. **Buege, J.A. and Aust, S.D., 1978**. Microsomal lipid peroxidation. Methods in enzymology. Vol. 52, pp: 302-310.

۱۰. **Chen, P.J.; Tan, S.W. and Wu, W.L., 2012**. Stabilization or oxidation of nanoscale zero valent iron at environmentally relevant exposure changes bioavailability and toxicity in medaka fish. Environmental Science Technology. Vol. 46, pp: 8431-8439.

۱۱. **Federici, G.; Shaw, B.J. and Handy, R.D., 2007**. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout: Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. Aquatic Toxicology. Vol, 84, pp: 415-430.

۱۲. **Fernandez, D.; Garcia-Gomez, C. and Babin, M., 2013**. In vitro evaluation of cellular responses induced by ZnO nanoparticles, zinc ions and bulk ZnO in fish cells. Science Total Environment. Vol. 452-453, pp: 262-274.

۱۳. **Goth, L., 1991**. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. International journal of clinical chemistry. Vol. 196, pp: 143-51.

۱۴. **Gule, I.; Leonard, B. and Holdway, D.A., 1997**. Oil and dispersed oil toxicity to amphipods and snails. Spill sciences technology bulletin. Vol. 4, pp: 1-6.

۱۵. **Gu, l.S.; Belge-Kurutas, E.; Yldz, E.; Sahan, A. and Doran, F., 2004**. Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake, Turkey. Environment. International. Vol. 30, pp: 605-609.

۱۶. **Han, D.; Xie, S.; Liu, M.; Xiao, X.; Liu, H.; Zhu, X. and Yang, Y., 2011**. The effects of dietary selenium on growth performances, oxidative stress and tissue selenium concentration of gibel carp **(***Carassius auratus gibelio***).** Aquaculture nutrition. Vo. 17, No. 3, pp: 741-749.

۱۷. H**ao, L.; Chen, L.; Hao, J. and Zhong, N., 2013**. Bioaccumulation and sub-acute toxicity of Zinc Oxide nanoparticles in juvenile Carp (*Cyprinus Carpio*). Ecotoxicology and environmental safety. Vol. 91, pp: 52-60.

۱۸. **Khan, M.S.; Jabeen, F.; Qureshi, N.A.; Asghar, M.S.; Shakeel, M. and Noureen, A., 2015**. Toxicity of silver nanoparticles in fish: a critical review. J of Biodiversity and Environmental Sciences. Vol. 6, No. 5, pp: 211-227.

۱۹. **Kappus, H., 1985.** Lipid peroxidation: mechanisms, enzymology, and biological relevance in Oxidative Stress, American Press, New York. pp: 273-310.

۲۰. **Kaya, H.; Aydın, F.; Gurkan, M.; Yılmaz, S.; Mehmet Ates, M.; Demir, V. and Arslan, Z., 2015**. Effects of zinc oxide nanoparticles on bioaccumulation and oxidative stress in different organs of tilapia. Environmental Toxicology and Pharmacology. Vol. 40, pp: 936-947.

۲۱. **Li, H.; Zhou, Q.; Wu, YFJ.; Wang, T. and Jiang, G., 2009**. Effects of waterborne nano-iron on medaka antioxidant enzymatic activity, lipid peroxidation and histopathology. Ecotoxicology & Environmental Safety. Vol. 72, pp: 684-692.

۲۲. **Livingstone, D.R., 2003.** Oxidative stress in aquatic organism in relation to pollution and aquaculture. Revue de medecine veterinaire. Vol. 154, No. 6, pp: 427-430.

۲۳. **Marklund, S.L. and Marklund, G., 1974**. Involvement of the superoxide anion radical in the auto oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. European Journal Biochemistry. Vol. 47, pp: 469-474.

۲۴. **Mocan, T.; Clichici, S.; Agoston-Coldea, L.; Mocan, L.; Simon, S. and Ilie, I.R., 2010.** Implications of oxidative stress mechanisms in toxicity of nanoparticles (review). Acta Physiologica Hungarica. Vol. 97, pp: 247-255.

۲۵. **Monteiro, D.; Rantin, F. and Kalinin, A., 2010.** Inorganic mercury exposure: toxicological effects, oxidative stress biomarkers and bioaccumulation in the tropical freshwater fish matrinxa, *Brycon amazonicus* Ecotoxicology. Vol. 19, pp: 105-123.

۲۶. **Nowack, B. and Bucheli, T.D., 2007**. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. Environment Pollution. Vol. 150, pp: 5-22.

۲۷. **Omoregie, E.; Ufodike, E.B. and Keke, I.R., 1990**. Tissue chemistry of *O. niloticus* exposed to sublethal concentrations of Gammalin 20 and Actellic 25EC. Journal of Aquatic Science. Vol. 5, pp: 33-36.

۲۸. **Pandey, S.; Parvez, S.; Sayeed, I.; Haque, R.; Bin-Hafeez, B. and Raisuddin, S., 2003**. Biomarkers of oxidative stress: A comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu*. Journal Science Total Environment. Vol. 309, pp: 105-115.

۲۹. **Reed, D.J.; Babson, J.R.; Beatty, P.W.; Brodie, A.E.; Ellis, W.W. and Potter, D.W., 1980**. High-performance liquid chromatography analysis of Nano mole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides. Analytical Biochemistry. Vol. 106, pp: 55-62.

۳۰. **Segets, D.; Gradl, J.; Taylor, R.K.; Vassilev, V. and Peukert, W., 2009**. Analysis of optical absorbance spectra for the determination of ZnO nanoparticle size distribution, solubility & surface energy. ACS Nano. Vol. 3, pp: 1703-1710.

۳۱. **Smith, C.J.; Shaw, B.J. and Handy, R.D., 2007**. Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. Aquatic toxicology. Vol. 82, pp: 94-109.

۳۲. **Vijayakumar, T.; Siva, N.D. and Kirubakaran, S.A., 2016.** Fate and upshots of Zinc oxide Nano phase as a pollutant in a fresh water fish Tilapia (*Oreochromis mossabicus*) and its Physiological alterations in Hematology, Antioxidant level and Histology. International Journal Res. Vol. 3, pp: 634-653

۳۳. **Sen, C.K.; Atalay, M. and Hanninen, O., 1994**. Exercise-induced oxidative stress: glutathione supplementation and deficiency. J Apply Physiology. Vol. 77, pp: 2177-2187.

۳۴. **Subashkumar, S. and Selvanayagam M., 2014**. First report on: Acute toxicity and gill histopathology of fresh water fish *Cyprinus carpio* exposed to Zinc oxide (ZnO) nanoparticles. International Journal of Scientific and Research Publications. Vol. 4, pp: 1-4.

۳۵. **Topham, M.K. and Prescott, S.M., 2001**. Diacylglycerol kinase zeta regulates Ras activation by a novel mechanism. Journal Cell Biology. Vol. 152, No. 6, pp:1135-1143.

۳۶. **Weldegebriel, Y.; Chandravanshi, B.S. and Wondimu, T., 2012.** Concentration levels of metals in vegetables grown in soils irrigated with river water in Addis Abada, Ethiopia. Ecotoxicology Environment. Vol. 77, pp: 57-63.

۳۷. **Winston, G.W. and Di Giulio, R.T., 1991**. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. Aquatic Toxicology. Vol. 19, pp: 137-161.

۳۸. **Zhu, S.Q.; Oberdorster, E. and Haasch, M.L., 2006.** Toxicity of an engineered nanoparticle (fullerene, C60) in two aquatic species, Daphnia and fathead minnow. Marine Environment. Vol. 62, pp: S5-S9.