



Available online: <http://ijhe.tums.ac.ir>

مقاله پژوهشی



## اثرات نانوذرات نقره تولید شده با روش احیاء زیستی بر پاسخ سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی بافت آبشش ماهی کپور معمولی

سراج بیتا<sup>۱\*</sup>، مهرزاد مصباح<sup>۲</sup>، علی شهریاری<sup>۳</sup>، مسعود قربان پور نجف‌آبادی<sup>۴</sup>

۱- گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران

۲- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳- گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۴- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

### اطلاعات مقاله: چکیده

زمینه و هدف: نانوذرات بطور گسترده‌ای در تکنولوژی، پزشکی و تولیدات مصرفی مورد استفاده قرار می‌گیرند ولی اطلاعات محدودی در رابطه با تأثیرشان بر روی محیط‌های آبی وجود دارد. هدف از مطالعه حاضر بررسی پاسخ سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی آبشش ماهی کپور معمولی در مواجهه با نانوذرات نقره تولید شده با روش احیاء زیستی است.

روش بررسی: ماهیان کپور معمولی به مدت ۱۴ روز در معرض غلظت‌های ۰/۱۱، ۱/۱۳ و ۵/۶۷ mg/L نانوذرات نقره تولید شده با روش احیاء زیستی قرار گرفتند. یک تیمار نیز به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. بعد از هر بار نمونه‌برداری، جهت تهیه عصاره بافت ماهی ۱ g از بافت آبشش وزن شده و با ۵ mL بافر فسفات مخلوط گردید. نمونه‌های هم‌وزن شده جهت سنجش فعالیت کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و مالون دی‌آلدئید مورد آنالیز قرار گرفتند.

یافته‌ها: فعالیت کاتالاز بافت آبشش در غلظت‌های ۵/۶۷ و ۱/۱۳ mg/L نسبت به تیمار شاهد کاهش معنی‌داری داشت ( $p < 0/05$ ). فعالیت گلوتاتیون و میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در تیمارهای مختلف با تیمار شاهد از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نداشتند ( $p > 0/05$ ). فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و مالون دی‌آلدئید در روزهای مختلف نمونه‌برداری در تمام تیمارها دارای نوسانات افزایشی و کاهشی بوده است، البته فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در مواجهه با غلظت‌های ۵/۶۷ و ۱/۱۳ mg/L نسبت به تیمار شاهد معنی‌دار بوده است ( $p < 0/05$ ).

نتیجه‌گیری: طبق نتایج می‌توان گفت که آبشش ماهی به‌عنوان یکی از اندام‌های مستعد آسیب اکسیداتیو در مواجهه با نانوذرات نقره است، که این امر می‌تواند بر روی سلامت ماهی کپور معمولی و در نتیجه احتمال ابتلاء به بیماری در این ماهی را افزایش دهد.

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۵/۱۸  
تاریخ ویرایش: ۹۶/۰۸/۰۸  
تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۸/۱۳  
تاریخ انتشار: ۹۶/۰۹/۲۱

واژگان کلیدی: نانوذرات نقره، احیاء زیستی، آبشش، کپور معمولی

پست الکترونیکی نویسنده مسئول:  
serajbita@yahoo.com

## مقدمه

نانوذرات با توجه به خواص منحصر بفرد فیزیکی و شیمیایی که دارند می‌توانند در بسیاری از مطالعات بیولوژیکی و زیست‌محیطی مورد استفاده قرار گیرند و از این رو توجه زیاد دانشمندان و محققان را به خود جلب کرده‌اند، نانوذرات نقره با توجه به اندازه کوچک و سطح فعال بالا، در کنار سایر ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی مانند آلاینده‌های فلزی و بار سطحی، ممکن است اثرات سمی غیرقابل پیش‌بینی بر آبزیان داشته باشند. آنها ممکن است باعث صدمه به DNA به‌طور غیرمستقیم با افزایش استرس اکسیداتیو و تاثیر بر وضعیت اکسیدان/آنتی‌اکسیدان یا پاسخ‌های التهابی شوند (۱). نانوذرات نقره وارد شده به محیط‌های آبی ممکن است بر روی آبزیان و محیط زیست اثرات منفی داشته باشند، گزارش شده که نانوذرات با پروتئین‌ها و آنزیم‌های سلول‌های پستانداران فعل و انفعال نشان داده و تولید رادیکال آزاد می‌کنند. زمانی که کاهش مکانیسم دفاعی آنتی‌اکسیدانی و تولید رادیکال‌های آزاد اتفاق می‌افتد، پاسخ التهابی ایجاد شده می‌تواند منجر به اختلال و تخریب میتوکندری‌ها و در نتیجه مرگ برنامه‌ریزی شده سلول شود. سایر سطوح سلولی که در ارتباط با این نوع مکانیسم سمیت تغییر می‌کنند شامل میزان گلوکوتاتیون (GSH)، استرس اکسیداتیو و ژن‌های التهابی هستند. مکانیسم اصلی سمیت نانوذرات نقره ناشی از آزادسازی یون‌های نقره از نانوذرات است که منجر به استرس اکسیداتیو (تاثیر بر وضعیت اکسیدان/آنتی‌اکسیدان)، آسیب چربی‌ها، کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و DNA می‌شود (۲). در حال حاضر استفاده از روش‌های زیستی در تولید نانوذرات فلزی که در پروتکل سنتز آنها از ترکیبات شیمیایی سمی استفاده نمی‌شود، در این روش بحث نانوتکنولوژی مورد توجه قرار گرفته است. در این روش میکروارگانیسم مورد نظر با استفاده از احیای زیستی یون‌های نقره سبب تولید نانوذرات نقره خواهد شد (۳). مشخص شده که بیومولکول‌هایی مانند پروتئین‌ها، فنول‌ها، فلاونوئیدها و برخی از ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در جلبک سارگاسوم قادر به احیاء زیستی یون‌های فلزی به فرم نانو است (۴).

آبشش به‌عنوان یکی از بافت‌های اصلی برای تماس با سموم خارجی در محیط‌های آبی است (۵). نانوذرات می‌توانند با پروتئین‌ها و آنزیم‌های سلول‌های موجودات زنده فعل و انفعال داشته و با ممانعت از مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی سبب تولید اکسیژن واکنش گونه‌ای، شروع پاسخ التهابی و اختلال و تخریب میتوکندری و در نتیجه سبب آپوپتوزیس و نکروز شوند (۶). اثرات نانوذرات فلزی تولید شده با روش احیاء شیمیایی بر پاسخ سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی ماهیان توسط محققین مختلف گزارش شده است (۵، ۷-۱۳) که طبق نتایج این محققین نانوذرات فلزی تولید شده با روش احیاء شیمیایی حتی در غلظت‌های بسیار پایین اثرات بسیار مضر بر روی اندام‌های مختلف ماهی به‌ویژه کبد و آبشش دارند، بیشتر این مطالعات در رابطه با نانوذرات نقره، سمیت آنها از طریق مسیر استرس اکسیداتیو و تولید رادیکال‌های آزاد نسبت داده‌اند، بنابراین شناخت اثرات نانوذرات نقره تولید شده با روش احیاء زیستی بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو ماهی کپور نیز از این جهت دارای اهمیت است. با توجه به این‌که نانوذرات مورد استفاده در این مطالعه با روش احیاء زیستی تولید شده است انتظار می‌رود که در مقایسه با نانوذرات تولید شده با روش شیمیایی اثرات مضر کمتری بر روی محیط زیست و سلامت ماهی داشته باشد، بنابراین هدف از این بررسی تاثیر نانوذره نقره تولید شده با استفاده از جلبک سارگاسوم بر روی برخی شاخص‌های استرس اکسیداتیو بافت آبشش ماهی کپور و شناسایی غلظت مناسب این ماده جهت استفاده از آن به‌عنوان یک ترکیب طبیعی در مقایسه با مواد شیمیایی در مراکز تکثیر و پرورش ماهی کپور معمولی به‌عنوان یک ماده باکتری‌کش و ضد عفونی‌کننده سطح است.

## مواد و روش‌ها

برای انجام این تحقیق تعداد ۳۰۰ قطعه بچه ماهی کپور معمولی با میانگین وزنی  $16/45 \pm 78/99$  g به‌طور کاملاً تصادفی در آکواریوم‌های ۱۰۰ L با تراکم ۲۵ قطعه ماهی در هر آکواریوم ذخیره‌سازی شدند. همه آکواریوم‌ها به‌طور مداوم هوادهی شده

که با گروه‌های سولفیدیل احیاء واکنش داده و تولید کمپلکس رنگی می‌کند (۱۵)، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل با استفاده از تری‌پیریدیل تری‌آزین (TPTZ) و براساس روش Benzie و همکاران در سال ۱۹۹۶ (۱۶) و تعیین میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و مالون دی‌آلدئید به ترتیب با استفاده از کیت‌های تجاری شرکت راندوکس (انگلستان) و آنزیم شیمی (ایران) صورت گرفت. برای پردازش آماری از نرم افزار SPSS, 21 استفاده شد (داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شده‌اند). برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون آماری آنالیز واریانس دو طرفه (Two-way ANOVA) و تست توکی (Tukey) در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ درصد استفاده شد.

### یافته‌ها

طبق آزمون آماری واریانس دو طرفه، میانگین فعالیت کاتالاز بافت آبشش در غلظت‌های ۱/۱۳ mg/L و ۵/۶۷ نانوذرات نقره نسبت به تیمار شاهد کاهش معنی‌داری داشت ( $p < 0/05$ ). در غلظت ۰/۱۱ mg/L فعالیت کاتالاز در بافت آبشش نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نشان نداد ( $p > 0/05$ )، اما در مقایسه با تمام تیمارها از روند کاهشی یکنواختی برخوردار بود به طوری که میزان آن از ۳۷/۴۰ در روز اول نمونه‌برداری به ۲۹/۰۲ U/g tissue در روز چهاردهم رسید (جدول ۱). کمترین میزان فعالیت کاتالاز بافت آبشش در روز چهاردهم نمونه‌برداری مشاهده شد ( $1/07 \pm 0/41$ ). در تیمار شاهد بالاترین سطح فعالیت کاتالاز مربوط به روز هفتم به میزان  $40/68 \pm 4/50$  و پایین‌ترین مربوط به روز چهاردهم به میزان  $29/02 \pm 6/30$  بود که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری در روزهای مختلف مشاهده نشد ( $p > 0/05$ ).

سطوح فعالیت گلوکوتایون در تمام تیمارهای مواجهه با نانوذرات نقره با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نشان نداد ( $p > 0/05$ ). کمترین و بیشترین سطح فعالیت گلوکوتایون به ترتیب در مواجهه با غلظت‌های ۱/۱۳ mg/L و ۵/۶۷ و در روز ۱۴ نمونه‌برداری بوده است (جدول ۲). در تیمار شاهد کمترین سطح فعالیت گلوکوتایون در روز هفتم ( $0/89 \pm 0/95$ ) و

و آب آکواریوم‌ها هر ۲ روز یک بار به میزان ۲۰ درصد تعویض شدند. برای سنتز نانوذرات نقره از عصاره جلبک سارگاسوم به‌عنوان عامل احیاء کننده و محلول نیترات نقره استفاده شد. به‌منظور احیاء یون‌های  $Ag^+$ ، ۱۰ mL عصاره جلبک سارگاسوم به ۹۰ mL محلول نیترات نقره ۱ mM اضافه شد. به منظور انتخاب غلظت نانوذرات نقره در تیمارهای مختلف پس از انجام آزمایشات مقدماتی و تعیین  $LC_{50}$  (متوسط غلظت کشندگی)، مشخص شد که میزان  $LC_{50}$  ۹۶ ساعت این نانوذره در ماهی کپور معمولی ۱۱/۳۴ mg/L است، بنابراین ماهیان در ۳ غلظت مختلف نانوذرات نقره سنتز شده، شامل  $LC_{50}$  ۱ درصد ( $0/11$  mg/L)،  $LC_{50}$  ۱۰ درصد ( $1/13$  mg/L) و  $LC_{50}$  ۵۰ درصد ( $5/67$  mg/L)، مواجهه شدند. آزمایشات شامل ۴ تیمار آزمایشی و هر کدام از تیمارها در ۳ تکرار بود که این تیمارها شامل تیمار فاقد نانوذرات نقره به‌عنوان تیمار شاهد و تیمارهای مواجهه با غلظت‌های ۰/۱۱ mg/L، ۱/۱۳ و ۵/۶۷ نانوذرات نقره تولید شده با روش احیاء زیستی از جلبک سارگاسوم بود (۴). مدت زمان مواجهه با نانوذرات مذکور ۱۴ روز بود. نمونه‌برداری از ماهیان در بازه زمانی ۱، ۳، ۷ و ۱۴ روز پس از آغاز آزمایش بود. در هر بار نمونه‌برداری تعداد ۹ قطعه ماهی از هر تیمار از آکواریوم‌ها به‌طور تصادفی با ساچوک صید شده و پس از بیهوشی ماهیان در محلول پودر گل میخک (۳۰۰ ppm)، بافت آبشش خارج گردیده و نمونه‌های جداسازی شده در دمای  $80^{\circ}C$  - تا زمان آنالیز نگهداری شدند. برای آنالیز نمونه‌ها، ۱ g از بافت آبشش وزن شد و با ۵ mL بافر فسفات سرد ۱۰ mM با  $pH=7/4$  با دستگاه هموژنایزر با دور ۱۴۰۰۰ rpm به مدت ۲ min کاملاً یکنواخت گردید. در مرحله بعد بافت یکنواخت‌شده با سرعت ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ min سانتریفیوژ شد و مایع‌رویی به‌عنوان عصاره بافتی جهت سنجش فاکتورهای سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گلوکوتایون، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و مالون دی‌آلدئید (MDA))، مورد استفاده قرار گرفت. سنجش فعالیت کاتالاز براساس کاهش جذب نوری آب اکسیژنه (۱۴)، گلوکوتایون با استفاده از معرف المن

جدول ۱- اثرات نانوذرات نقره بر سطح فعالیت کاتالاز (U/g tissue) آبشش ماهی کپور معمولی

غلظت نانوذرات نقره				روزهای نمونه برداری
۵/۶۷mg/L	۱/۱۳mg/L	۰/۱۱mg/L	۰ mg/L (شاهد)	
b ۱۵/۲۶ ± ۰/۶۷	b ۱۸/۸۳ ± ۷/۵۹	a ۳۷/۴۰ ± ۲/۴۰	a ۳۴/۴۰ ± ۵/۸۷	۱
b ۲۰/۹۵ ± ۴/۱۶	b ۱۰/۴۹ ± ۱/۳۹	a ۳۴/۷۱ ± ۱/۵۹	a ۳۸/۹۸ ± ۳/۸۴	۳
b ۱۷/۸۲ ± ۴/۳۲	b ۱۵/۹۹ ± ۳/۳۸	a ۳۲/۶۱ ± ۳/۷۱	a ۴۰/۶۸ ± ۴/۵۰	۷
b ۴/۴۱ ± ۱/۵۷	b ۲۴/۶۹ ± ۵/۸۶	a ۲۹/۰۲ ± ۳/۰۷	a ۲۹/۰۲ ± ۶/۳۰	۱۴

- حروف یکسان نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح فعالیت کاتالاز هستند.

جدول ۲- اثرات نانوذرات نقره بر سطح فعالیت گلوکوتایون (μmol/g tissue) آبشش ماهی کپور معمولی

غلظت نانوذرات نقره				روزهای نمونه برداری
۵/۶۷ mg/L	۱/۱۳ mg/L	۰/۱۱ mg/L	۰ mg/L (شاهد)	
a ۶/۰۵ ± ۱/۵۱	a ۷/۸۷ ± ۲/۵۷	a ۷/۴۱ ± ۲/۰۹	a ۶/۸۰ ± ۱/۵۸	۱
a ۴/۶۷ ± ۱/۸۳	a ۶/۵۴ ± ۱/۷۸	a ۷/۱۹ ± ۳/۱۴	a ۹/۱۵ ± ۲/۷۳	۳
a ۶/۳۷ ± ۳/۱۹	a ۵/۱۹ ± ۱/۶۹	a ۷/۰۱ ± ۱/۸۹	a ۵/۹۵ ± ۰/۸۹	۷
a ۱۴/۹۰ ± ۵/۲۸	a ۲/۷۵ ± ۰/۸۲	a ۶/۷۲ ± ۲/۵۲	a ۷/۲۴ ± ۱/۱۵	۱۴

- حروف یکسان نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح فعالیت گلوکوتایون هستند.

سوپراکسید دیسموتاز به ترتیب مربوط به روز سوم و هفتم نمونه‌برداری بود (جدول ۳).

طبق آزمون آماری واریانس دو طرفه و آزمون توکی، بین میانگین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در تیمارهای مختلف با تیمار شاهد از نظر آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ( $p > 0.05$ )، اما در مواجهه با غلظت ۵/۶۷ mg/L نانوذرات نقره با گذشت زمان روند کاهشی یکنواختی نشان داد (جدول ۴). طبق جدول ۴، در تیمار شاهد ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل هر چند که تغییرات نامنظمی داشت و کمترین میزان آن در

بیشترین در روز سوم ( $9/15 \pm 2/73$ ) مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری در بین روزهای مختلف وجود نداشت ( $p > 0.05$ ). میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در مواجهه با غلظت ۱/۱۳ mg/L نانوذرات نقره در مقایسه با تیمار شاهد کاهش معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) و در غلظت ۵/۶۷ mg/L با تیمار شاهد افزایش معنی‌دار داشت ( $p < 0.05$ ). در غلظت ۱/۱۳ mg/L در روز هفتم نمونه‌برداری در مقایسه با بقیه تیمارها کمترین میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز ( $0/78 \pm 0/46$ ) مشاهده گردید (جدول ۳). در تیمار شاهد کمترین و بیشترین سطح فعالیت

جدول ۳- اثرات نانوذرات نقره بر سطح فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز (U/g tissue) آبشش ماهی کپور معمولی

غلظت نانوذرات نقره				روزهای نمونه برداری
۵/۶۷ mg/L	۱/۱۳ mg/L	۰/۱۱ mg/L	(شاهد) ۰ mg/L	
c	b	a	a	۱
۳/۴۵ ± ۰/۲۱	۱/۲۶ ± ۰/۲۸	۱/۸۷ ± ۰/۲۸	۱/۸۸ ± ۰/۲۰	
c	b	a	a	۳
۳/۳۳ ± ۰/۲۸	۱/۱۴ ± ۰/۴۶	۱/۶۳ ± ۰/۶۴	۱/۶۵ ± ۰/۳۱	
c	b	a	a	۷
۳/۳۳ ± ۰/۴۲	۰/۷۸ ± ۰/۴۶	۱/۷۵ ± ۰/۳۲	۱/۸۹ ± ۰/۳۳	
c	b	a	a	۱۴
۳/۳۹ ± ۰/۱۸	۰/۸۴ ± ۰/۴۸	۱/۸۱ ± ۰/۳۸	۱/۷۹ ± ۰/۳۲	

- حروف یکسان نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح فعالیت سوپراکسید دیسموتاز هستند.

تیمار ۱/۱۳ mg/L (۶۹/۶۱±۱۳/۴۷) و تیمار ۰/۱۱ mg/L نانوذرات نقره (۲۰/۲۸±۵/۵۱) است (جدول ۵). در تیمار شاهد بیشترین و کمترین میزان فعالیت مالون دی‌آلدئید به ترتیب مربوط به روز اول (۳۴/۵۰±۵/۶۷) و چهاردهم (۲۶/۶۷±۲/۳۴) بود اما اختلاف معنی‌داری بین روزهای مختلف در تیمار شاهد وجود نداشت ( $p > ۰/۰۵$ ).

روز سوم به میزان  $۳/۹۹ \pm ۱/۱۲$  مشاهده شد، اما از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین روزهای مختلف مشاهده نشد. سطح فعالیت مالون دی‌آلدئید بافت آبشش در غلظت ۱/۱۳ mg/L نانوذرات نقره علیرغم این‌که با گذشت زمان کاهش یافت، اما نسبت به تیمار شاهد و بقیه تیمارها از نظر آماری افزایش معنی‌داری داشت ( $p < ۰/۰۵$ ). بیشترین و کمترین میزان فعالیت مالون دی‌آلدئید به ترتیب مربوط به

جدول ۴- اثرات نانوذرات نقره بر سطح فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل ( $\mu\text{mol/g tissue}$ ) آبشش ماهی کپور معمولی

غلظت نانوذرات نقره				روزهای نمونه برداری
۵/۶۷ mg/L	۱/۱۳ mg/L	۰/۱۱ mg/L	(شاهد) ۰ mg/L	
a	a	a	a	۱
۳/۶۶ ± ۱/۸۹	۴/۸۳ ± ۰/۹۸	۲/۹۹ ± ۱/۱۲	۲/۲۷ ± ۰/۳۳	
a	a	a	a	۳
۳/۳۰ ± ۱/۲۳	۳/۱۰ ± ۰/۴۴	۲/۶۰ ± ۰/۴۴	۳/۹۹ ± ۱/۱۲	
a	a	a	a	۷
۳/۲۶ ± ۰/۲۴	۲/۸۴ ± ۰/۴۵	۲/۶۹ ± ۰/۵۶	۲/۶۷ ± ۰/۴۷	
a	a	a	a	۱۴
۴/۶۰ ± ۰/۶۴	۲/۲۳ ± ۰/۵۱	۳/۱۰ ± ۱/۲۶	۲/۵۳ ± ۰/۴۲	

- حروف یکسان نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل هستند.

جدول ۵- اثرات نانوذرات نقره بر سطح فعالیت مالون دی آلدئید (nmol/g tissue) آبشش ماهی کپور معمولی

غلظت نانوذرات نقره				روزهای نمونه برداری
۵/۶۷mg/L	۱/۱۳mg/L	۰/۱۱mg/L	۰ mg/L (شاهد)	
a ۳۸/۳۷ ± ۲/۳۹	b ۵۷/۰۲ ± ۹/۴۹	a ۳۴/۲۹ ± ۸/۶۴	a ۳۴/۵۰ ± ۵/۶۷	۱
a ۳۵/۱۰ ± ۴/۸۹	b ۶۹/۶۱ ± ۱۳/۴۷	a ۳۲/۴۱ ± ۴/۴۱	a ۳۲/۷۱ ± ۵/۰۸	۳
a ۴۰/۶۷ ± ۳/۹۲	b ۴۱/۶۵ ± ۱۴/۲۲	a ۳۹/۷۱ ± ۴/۶۶	a ۲۹/۲۰ ± ۲/۵۹	۷
a ۳۵/۷۴ ± ۴/۳۶	b ۳۸/۰۶ ± ۱۱/۱۸	a ۲۰/۲۸ ± ۵/۵۱	a ۲۶/۶۷ ± ۲/۳۴	۱۴

- حروف یکسان نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار در میزان فعالیت مالون دی آلدئید هستند.

## بحث

آبشش ماهی یکی اندام های اصلی و اولین اندام برای مواجهه با مواد شیمیایی و سموم است. فعال شدن سیستم دفاعی آنتی اکسیدان آبریان و سایر موجودات زنده یکی از واکنش های مهم در پاسخ به سمیت ایجاد شده با استفاده از نانوذرات نقره است (۱۷). کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز از آنزیم های کلیدی سیستم دفاعی آنتی اکسیدان هستند و گلوکوتایون به عنوان فراوانترین آنتی اکسیدان غیر آنزیمی داخل سلول، در پاک سازی رادیکال های آزاد نقش مهمی دارد (۱۸، ۱۹). سطح فعالیت کاتالاز در مواجهه با غلظت های ۱/۱۳ mg/L و ۵/۶۷ نانوذرات نقره در مقایسه با تیمار شاهد کاهش معنی داری نشان داد ( $p < 0/05$ )، که با افزایش غلظت نانوذرات نقره این کاهش بیشتر بوده است به طوری که در غلظت ۵/۶۷ mg/L نانوذرات نقره در روز چهاردهم نمونه برداری به کمترین میزان خود رسید، که این نشان می دهد تاثیر نانوذرات نقره سنتز شده از جلبک سارگاسوم بر فعالیت کاتالاز بافت آبشش به صورت وابسته به دوز است. تمایل به کاهش بیشتر در میزان کاتالاز آبشش نشان دهنده این است که یا سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی آبشش متحمل استرس بیشتری شده است و آنزیم کاتالاز توانایی مقابله با رادیکال های آزاد تولید شده از نانوذرات نقره

ندارد و یا اینکه کاهش نیاز به آنزیم فوق جهت دفاع آنتی اکسیدانی و فعال شدن سایر مسیره های آنتی اکسیدانی است (۲۰). هرچند که فعالیت کاتالاز پاسخ متفاوتی را در مطالعات مختلف در مواجهه با آلاینده ها نشان داده است به طوری که در برخی مطالعات کاهش و برخی دیگر فعالیت افزایشی نشان داده است که فعالیت افزایشی آن نشان دهنده پاسخ آنتی اکسیدانی آن در مقابله با آسیب استرس اکسیداتیو است (۲۱). در مطالعه ای در سال ۲۰۱۱ توسط Xiong و همکاران تغییرات فعالیت کاتالاز بافت آبشش در بیشتر تیمارها محسوس نبوده هرچند که در غلظت ۵ mg/L نانواکسید روی سبب افزایش اندک در فعالیت کاتالاز گردید (۲۲). سطح فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در مواجهه با غلظت ۱/۱۳ mg/L نانوذرات نقره نسبت به گروه شاهد کاهش معنی دار ( $p < 0/05$ ) و در غلظت ۵/۶۷ mg/L نانوذرات نقره در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی دار نشان داد ( $p < 0/05$ ). فعالیت این آنزیم حتی در بین غلظت های مختلف نانوذرات نقره با یکدیگر نیز از نظر آماری معنی دار بود ( $p < 0/05$ ). کاهش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز ناشی از تشکیل رادیکال های فعال اکسیژن است اما افزایش در فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان در مواجهه با یک آلاینده، بیانگر تطابق سلول یا بافت با استرس ایجاد شده است (۲۳).



بهرتر باشد، زیرا در محیط زنده فعل و انفعالات پیچیده‌ای بین نیروهای آنتی‌اکسیدانی و اکسیدان‌ها روی می‌دهد و آنچه توسط این شاخص برآورد می‌شود نتیجه خالص این فعل و انفعالات است. نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بافت آبشش در غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره با گروه شاهد است. عدم اختلاف معنی‌داری نشان‌دهنده اثر تطابقی دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن و یا کاهش تولید رادیکال‌های آزاد است. در مطالعه انجام شده در سال ۲۰۱۲ توسط Govindasamy و همکار، فعالیت کاهشی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و مقدار پایین ظرفیت آنتی‌اکسیدان تام در آبشش و کبد ماهی تیلاپیا در مواجهه با نانوذرات نقره مشاهده شد، که این کاهش به دلیل تجمع سنگین رادیکال‌های آزاد ایجاد شده در اثر نانوذرات نقره است (۲۸). در سال ۲۰۰۴ در مطالعه‌ای توسط Morgan و همکار مشخص شد که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام در بافت آبشش ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در مواجهه با نانوذرات نقره نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشت (۲۹)، که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت ندارد، زیرا ماهی قزل‌آلا در مقایسه با کپور معمولی دارای قدرت تحمل کمتری در برابر آلاینده‌ها است. مالون دی‌آلدئید به‌عنوان آخرین محصول تجزیه لیپیدها است که افزایش سطح آن نشان‌دهنده اختلال در مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی است (۳۰). سطح فعالیت مالون دی‌آلدئید بافت آبشش در تیمار  $mg/L$  ۱/۱۳ نانوذرات نقره با گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت که نشان می‌دهد در مواجهه با این غلظت بافت آبشش دچار آسیب اکسیداتیو شده است. مشخص شده که، نانوذرات نقره می‌توانند از طریق کاهش مقدار گلوکاتایون و فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و افزایش سطوح مالون دی‌آلدئید سبب استرس اکسیداتیو شوند (۳۱). مشابه نتایج این مطالعه، در سال ۲۰۰۷ در مطالعه Federici و همکاران نیز در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان، آسیب پراکسیداسیون لیپیدی در آبشش مشاهده شد (۷). در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۱ توسط Xiong و همکاران در ماهی زبرا در مواجهه با نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم، میزان

مواجهه ماهی زبرا (Zebra) با دوز  $50 mg/L$  نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم تغییرات معنی‌داری در فعالیت سوپراکسید دیسموتاز بافت آبشش ایجاد نکرد. همچنین در سال ۲۰۰۸، Zhu و همکاران گزارش کردند که فعالیت SOD در آبشش و مغز ماهی حوض‌طلایی (*Carassius auratus*) در مواجهه با غلظت‌های  $0.04 mg/L$  و ۱ نانوذرات  $C_{60}$  اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نداشت (۲۴)، که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت ندارد، که به دلیل تفاوت در گونه ماهی، نوع نانوذرات و روش سنتز نانوذره است. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۲ توسط Lee و همکاران انجام شد، هیچ اختلاف معنی‌داری در سطوح سوپراکسید دیسموتاز در غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره مشاهده نشد (۵)، که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت ندارد، این محققین عدم اختلاف معنی‌داری در میزان سوپراکسید دیسموتاز را ناشی از فعال شدن سایر مسیرهای آنتی‌اکسیدانی و غلبه شدن بر رادیکال‌های آزاد شده ذکر کردند. در مطالعه حاضر سطوح گلوکاتایون در تمام تیمارهای مواجهه با نانوذرات نقره با تیمار شاهد از نظر آماری معنی‌دار نبود ( $p > 0.05$ )، اما در تیمار  $1/13 mg/L$  نانوذرات نقره، میزان گلوکاتایون بافت آبشش با گذشت زمان روند کاهشی یکنواختی را نشان داد. در سال ۲۰۰۴، Oberdorster با بررسی تاثیر نانوذرات فلورن بر فاکتورهای استرس اکسیداتیو در ماهی باس دهان بزرگ دریافت که در مقدار گلوکاتایون آبشش روند کاهشی قابل مشاهده است (۲۵)، وی بیان کرد که تمایل به کاهش در میزان گلوکاتایون آبشش نشان‌دهنده این است که سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی آبشش متحمل استرس شده است که با مطالعه حاضر مطابقت دارد. در سال ۲۰۱۲ در مطالعه Shaw و همکاران در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان، افزایش اندکی در میزان گلوکاتایون آبشش در روز دهم مشاهده شد (۲۶). در سال ۲۰۰۸ در مطالعه Sanders و همکاران مواجهه ماهی سه‌خاره با نانوسولفید کادمیوم سبب افزایش در میزان گلوکاتایون بافت آبشش گردید (۲۷). به نظر می‌رسد اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل نسبت به شاخص‌های انفرادی وضعیت آنتی‌اکسیدانی مثل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان،

نانوذرات تولید شده با روش احیاء شیمیایی استفاده نموده‌اند بیانگر اثرات مضر کمتر نانوذرات نقره تولید شده با روش احیاء زیستی بر سلامت ماهی است. هر چند که اثرات مشاهده شده نانوذرات نقره بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون و نیز مالون دی‌آلدئید آبشش ماهی کپور معمولی برای درک تا حدودی مشکل است، به طوری که هم افزایش و هم کاهش در میزان آنها با غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره مشاهده گردید. اما مواجهه ماهیان کپور معمولی با غلظت  $1/13 \text{ mg/L}$  سبب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و کاهش فعالیت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی و در نتیجه افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و ایجاد استرس اکسیداتیو بیشتری در مقایسه با بقیه تیمارها شده است. بنابراین در مراکز تکثیر و پرورش ماهی کپور جهت استفاده از این ماده به‌عنوان ضد عفونی کردن سطوح با غلظت‌های بیشتر از  $0/11 \text{ mg/L}$  می‌بایست احتیاط نمود.

#### منابع

- Liu WT. Nanoparticles and their biological and environmental applications. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2006;102(1):1-7.
- Choi JE, Kim S, Ahn JH, Youn P, Kang JS, Park K, et al. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebra fish. *Aquatic Toxicology*. 2010;100(2):151-59.
- Singaravelu G, Arockiamary J, Kumar VG, Govindaraju K. A novel extracellular synthesis of monodisperse gold nanoparticles using marine alga, *Sargassum wightii* Greville. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2007;57:97-101.
- Bitra S, Mesbah M, Shahryari A, Ghorbanpour M. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Sargassum angustifolium* seaweed. *Journal of Marine Sciences and Technology*. 2015;14(1):81-90.
- Lee BC, Kim KT, Cho JG, Lee JW, Ryu TK, Yoon JH, et al. Oxidative stress in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to  $\text{TiO}_2$  nanoparticles. *Molecular Cell Toxicology*. 2012;8:357-66.
- Schrand AM, Rahman MF, Hussain SM, Schlager JJ, Smith DA, Syed AF. Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. *Wiley Interdisciplin-*

مالون دی‌آلدئید در بافت آبشش نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نشان داد (۲۲). همچنین برخلاف نتایج این مطالعه، در مواجهه ماهی باس دهان‌بزرگ با نانوذرات فلورن، میزان پراکسیداسیون لیپیدی در آبشش و کبد افزایش پیدا نکرد، اما در بافت مغز افزایش چشمگیری داشت، که دلیل این امر دفاع آنتی‌اکسیدانی بهتر این اندام‌ها در مقایسه با مغز ذکر شد (۲۵). با توجه به مطالعه حاضر نیاز هست که اثرات این نانوذرات بر سیستم ایمنی ماهی و بیان ژن‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو و ایمنی مورد مطالعه قرار گیرد، همچنین مقایسه اثرات دو نوع نانوذره تولید شده با روش شیمیایی و زیستی نیز بر روی محیط زیست و اکوسیستم‌های آبی و دیگر آبریان در ایران مورد بررسی قرار گیرد تا مشخص شود که کدام نوع نانوذرات تولید شده اثرات مضر بیشتری دارند.

#### نتیجه‌گیری

مقایسه نتایج مطالعه حاضر با نتایج سایر محققین که از

- ary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology. 2010;2(5):544-68.
- Federici G, Shaw BJ, Handy RD. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology*. 2007;84:415-30.
  - Hongcheng L, Qunfang Z, Yuan W, Jianjie F, Thanh W, Guibin J. Effects of waterborne nano-iron on medaka (*Oryzias latipes*): Antioxidant enzymatic activity, lipid peroxidation and histopathology. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2009;72:684-92.
  - Linhua H, Zhenyu W, Baoshan X. Effect of subacute exposure to  $\text{TiO}_2$  nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Environmental Sciences*. 2009;21:1459-66.
  - Ahamed M, Posgai R, Geory TJ, Nielsen M, Hussain SM, Rowe JJ. Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2010;242(3):263-69.
  - Farkasa J, Christianc P, Gallegourread JA, Roose



- N, Hassellövd M, Tollefsena KE. Uptake and effects of manufactured silver nanoparticles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill cells. *Aquatic Toxicology*. 2011;101:117-25.
12. Ramesh R, Kavitha P, Kanipandian N, Arun S, Thirumurugan S, Subramanian P. Alteration of antioxidant enzymes and impairment of DNA in the SiO<sub>2</sub> nanoparticles exposed zebra fish (*Danio rerio*). *Environmental Monitoring and Assessment*. 2013;185:5873-81.
  13. Abdel-Khalek A, Kadry M, Hamed A, Marie M. Ecotoxicological impacts of zinc metal in comparison to its nanoparticles in Nile tilapia; *Oreochromis niloticus*. *The Journal of Basic and Applied Zoology*. 2015;72:113-25.
  14. Koroluk MA, Ivanova LI, Maiorova IG, Tokarev VE. A method for measuring catalase activity. *Laboratornoe Delo Journal*. 1988;1:16-19.
  15. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Archive of Biochemistry and Biophysics*. 1959;82:70-77.
  16. Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 1996;239:70-76.
  17. Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*. 2006;311:622-27.
  18. Limon-Pacheco J, Gonsebatt ME. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research*. 2009;674(2):137-47.
  19. Slevin H, Gibbs JE, Heales S, Thom M, Cock HR. Depletion of reduced glutathione precedes inactivation of mitochondrial enzymes following limbic status epilepticus in the rat hippocampus. *Neurochemistry International*. 2006;48(2):75-82.
  20. Ruas CBG, dos Santos Carvalho C, de Araújo HSS, Espíndola ELG, Fernandes MN. Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metal-contaminated river. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2008;71(1):86-93.
  21. Cao L, Huang W, Liu J, Yin X, Dou SH. Accumulation and oxidative stress biomarkers in Japanese flounder larvae and juveniles under chronic cadmium exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2010;151:386-92.
  22. Xiong D, Fang T, Yu L, Sima X, Zhu W. Effects of nano-scale TiO<sub>2</sub>, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: Acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. *Science of the Total Environment*. 2011;409:1444-52.
  23. John S, Kale M, Rathore N, Bhatnagar D. Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. *Journal of Nutrition Biochemistry*. 2001;12:500-504.
  24. Zhu XS, Zhu L, Lang YP, Chen YS. Oxidative stress and growth inhibition in the freshwater fish *Carassius auratus* induced by chronic exposure to sublethal fullerene aggregates. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2008;27(9):1979-85.
  25. Oberdorster E. Manufactured nanomaterials (fullerenes, C<sub>60</sub>) induce oxidative stress in the brain of juvenile Largemouth Bass. *Environmental Health Perspectives*. 2004;112:1058-62.
  26. Shaw BJ, Al-Bairuty G, Handy RD. Effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): Physiology and accumulation. *Aquatic Toxicology*. 2012;116:90-101.
  27. Sanders MB, Sebire M, Sturve J, Christian P, Katsiadaki I, Lyons BP. Exposure of sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) to cadmium sulphide nanoparticles: biological effects and the importance of experimental design. *Marine Environmental Research*. 2008;66:161-4.
  28. Govindasamy R, Rahuman AA. Histopathological studies and oxidative stress of synthesized silver nanoparticles in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Journal of Environmental Sciences*. 2012;24(6):1091-98.
  29. Morgan TP, Wood CM. A relationship between gill silver accumulation and acute silver toxicity in the freshwater rainbow trout: support for the acute silver biotic ligand model. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2004;23(5):1261-67.
  30. Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullou M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2006;64:178-89.
  31. Arora S, Jain J, Rajwade J, Paknikar K. Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. *Toxicology Letters*. 2008;179(2):93-100.



Available online: <http://ijhe.tums.ac.ir>

Original Article



## Effects of silver nanoparticles synthesized by bioreduction method on gill antioxidant defense system response of common carp, *Cyprinus carpio*

S Bita<sup>1,\*</sup>, M Mesbah<sup>2</sup>, A Shahryari<sup>3</sup>, M Ghorbanpoor Najafabadi<sup>4</sup>

1- Department of Fisheries, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran

2- Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

3- Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

4- Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

### ARTICLE INFORMATION:

**Received:** 9 August 2017

**Revised:** 30 October 2017

**Accepted:** 4 November 2017

**Published:** 12 December 2017

### ABSTRACT

**Background and Objective:** Nanoparticles are already widely used in technology, medicine and consumer products, but there are limited data on their effects on the aquatic environments. The aim of this study was to evaluate the response of antioxidant defense system in common carp gills exposed to silver nanoparticles, which are produced by bioreduction method.

**Materials and Methods:** Common carp fish were exposed to the silver nanoparticles at concentrations of 0.11, 1.13 and 5.67 mg/L for 14 days. A treatment without silver was considered as a control. After sampling, 1 g of gill was weighed and homogenized in 5 mL phosphate buffer. The homogenized samples were analyzed for measuring the activity of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH), total antioxidant capacity (TAC) and malondialdehyde (MDA).

**Results:** CAT activity in gill at the concentrations of 1.13 and 5.67 mg/L AgNPs was significantly reduced compared to that of the control ( $p < 0.05$ ). When the activities of GSH and TAC of different treatments and the control were compared, no significant difference ( $p > 0.05$ ) was observed. Activity of SOD and MDA of all treatments sampled at different days was fluctuated, that is, it was either increased or decreased. However, superoxide dismutase activity was significantly higher in exposure to concentrations of 5.67 mg/L and 1.13 mg/L.

**Conclusion:** According to the results, fish gills are one of the most susceptible organs of oxidative damage in exposure to silver nanoparticles. This can affect the health of common carp and thus increase the risk of disease in the fish.

**Key words:** Silver nanoparticles, Bioreduction, Gill, *Cyprinus carpio*

**\*Corresponding Author:**

serajbita@yahoo.com