[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118088]
Downloaded from isfj.ir at 5:38 +0330 on Thursday January 17th 2019

تاثیر نانوذرات مس بر ماهی کلمه دریای خزر (*Rutillus rutillus caspicus*)، تغییرات آنزیم‌های آنتی اکسیدان و آسیب بافت کبد

شهرزاد آقامیرکریمی[۱]، علی ماشین چیان مرادی[۱*]، عیسی شریف پور[۲]، شهلا جمیلی[۲]، پرگل قوام مصطفوی[۱]

*ali2m@yahoo.com

۱- گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
۲- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۷

چکیده

امروزه نانوذرات مس، کاربرد گسترده ای درصنعت و تجارت یافته است. در این پژوهش به بررسی سمیت نانوذرات مس بروی ماهی کلمه دریای خزر (*Rutillus rutillus caspicus*) پرداختیم. بدین منظور تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی با میانگین طول ۲۰ ±۱۰۰ میلی متر و میانگین وزنی ۱۰±۳۰ گرم انتخاب شدند. ماهیها در معرض سه تیمار با غلظت تحت کشنده ۰/۱، ۰/۲و ۰/۵ میلیگرم در لیتر از نانوذرات مس به مدت ۲۱ روز قرارگرفتند و ۳۰ قطعه ماهی در تیمار شاهد نگهداری شدند. خصوصیات آب شامل میانگین دمای آب آکواریم ها ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۵/۲ میلیگرم بر لیتر، pH =۷±۰/۰۰۴، سختی آب ۲۷۰ ppm بود. در روز ۲۱-۱۴-۷ پس از مواجهه، سه ماهی از هر تیمار به صورت تصادفی انتخاب گردید و نمونه های سرم خون و بافت کبد از آنها استخراج شد. تغییرات آنزیمهای آنتی اکسیدان با بررسی آنزیمهای سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز در سرم خون ماهی کلمه انجام شد. نتایج این پژوهش حاکی از افزایش فعالیت آنزیمهای سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز در هفته اول، در سرم خون ماهیانی بود که در معرض غلظت ۰/۱ میلیگرم در لیتر از نانوذرات مس قرار گرفته بودند ($p<0/01$). ولی در غلظتهای ۰/۲ و ۰/۵روند افزایشی در فعالیت آنزیمها مشاهده نگردید. . نمونه های بافتی کبد پس از انجام مراحل آماده سازی بافتی به روش H&E رنگ آمیزی گردید و توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. بررسی های آسیب شناسی بافت کبد، حاکی از هیپرتروفی سلولی، پرخونی در ورید مرکزی، واکوئلاسیون، نکروز، پرخونی در سینوزئید ها و پیکنوزه شدن هسته بود که با افزایش غلظت نانوذرات و مدت زمان در مواجهه، افزایش یافت. بررسی این تغییرات می تواند در جهت تعیین تاثیرات منفی ناشی از نانوذرات مس موثر باشد. یافته های این پژوهش که شامل کاهش فعالیت آنزیمی در سرم خون و آسیب سلولهای کبدی می باشد، حاکی از آن است که نانوذرات مس می تواند باعث آسیب زیستی و تاثیرات کشنده بروی ماهی کلمه دریای خزر باشد.

لغات کلیدی : نانوذرات مس، آسیب شناسی بافتی، کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، *Rutillus rutillus caspicus*

*نویسنده مسئول

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118088]
Downloaded from isfj.ir at 5:38 +0330 on Thursday January 17th 2019

مقدمه

در سالهای اخیر، نانوذرات فلزی به مقدار بسیار زیادی برای مصارف خانگی و صنعتی تولید می شوند. نانوذرات مس در سنسورهای گازی، کاتالیست ها، باطریها، مواد ضد باکتریایی کاربرد گسترده ای دارند (Xu *et al*., 2012). این مواد دارای خواص جدیدی نظیر سایز کوچک، نسبت سطح به حجم زیاد و فعالیت بالا می باشند و به واسطه وجود این خواص، پتانسیل ایجاد اثرات سوء آنها بروی موجودات زنده و انسانها افزایش یافته است (Shaw *et al*., 2012; Khanna *et al*., 2015). علاوه براین سطح نانومواد، یونها و بیومولکولهای زیستی را جذب می نماید و سمیت ایجاد شده توسط این ذرات دوام بیشتری در بدن موجود زنده می یابد. نانوذرات فلزی ممکن است در طی فرآیند تولید، مصرف و یا به صورت زباله وارد محیط آبی شوند وتاثیرات مخربی بر موجودات آبزی داشته باشند. حال آنکه، اطلاعات نسبتا کمی در رابطه با اثرات سمی این مواد بروی موجودات آبزی وجود دارد (Bagherzadeh Lakani *et al*., 2016). نانوتوکسیکولوژی به پژوهش، پیرامون سمیت ناشی از نانومواد می پردازد تا شناخت بهتری از خطرات زیستی استفاده از این مواد حاصل گردد (Khanna *et al*., 2015). محققین پژوهش های گوناگونی در زمینه بررسی ایجاد استرس اکسیداتیو توسط نانوذرات در ماهیان به انجام رسانده اند، از آن جمله می توان به Karthigarani و همکاران (۲۰۱۱)، Xia و همکاران (۲۰۱۳)، Abdel-Khalek و همکاران (۲۰۱۵)، Wangو همکاران (۲۰۱۶)، Kiran Reddy و همکاران (۲۰۱۳)، Trenzado و همکاران (۲۰۰۶)، Federici و همکاران (۲۰۰۷) اشاره نمود.

ماهی کلمه از ماهیان با ارزش اقتصادی در دریای خزر می باشد. هر چند که در سالهای اخیر جمعیت این گونه با ارزش، به دلیل صید بی رویه، تخریب زیستگاه، آلودگی و ... بشدت کاهش یافته است (Hoseini *et al*., 2013). ماهی ها در میانه هرم غذایی واقع شده اند و از طریق تنفس و تغذیه و یا تماس با آب، آلاینده را دریافت می نماید و در بافت خود ذخیره می کند. یکی از روشهای تعیین شاخص زیستی، بیومارکرهای بیوشیمیایی می باشد. بیومارکرهای بیوشیمیایی مولکوهایی هستند که در بدن موجود زنده وجود دارند و در حضور آلاینده های محیطی میزان آنها در بدن موجود زنده تغییر خواهد کرد (Oliveira Batista *et al*., 2014). از مهمترین انواع بیومارکرها، آنزیمهای آنتی اکسیدان نظیر SOD[1] و CAT[2] می باشند که گونه های رادیکالی اکسیژن یا ROS[3] را تجزیه می کنند و نقش مهمی در کنترل آنها دارند. از آنجایی که اطلاعات اندکی درباره واکنشهای بیومارکری در پاسخ به حضور نانوذرات دردسترس می باشد، این پژوهش به بررسی تغییرات آنزیمهای آنتی اکسیدان ماهی کلمه در برابر نانوذرات مس می پردازد و تغییرات SOD و CAT به عنوان بیومارکری در دفاع آنتی اکسیدانی در نظر گرفته شده است. همچنین بررسی تاثیرات بافتی نانوذرات مس بر بافت کبد به عنوان یکی از اندامهای حیاتی ماهی، می‌تواند میزان سمیت این ماده پر مصرف، تعیین نماید.

مواد و روش کار

نانوذرات مس با مشخصات (Cat, no 007440-50-8, Stock , US)، سایز ذرات ۴۰ نانومتر، دانسیته g/cm^3 ۸/۹، خلوص بیش از ۹۹/۹. محلول نانوذرات مس با غلظت (mgL^{-1} ۵۰) تهیه گردید و در دستگاه Sonicator با مشخصات (250 w, 40 kHz. 25˚C. Wiseclean) به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت و نانوذرات توسط امواج صوتی در سراسر محلول پراکنده گردید.

آماده سازی و آداپتاسیون ماهی ها: ماهی کلمه (*R. rutillus caspicus*) با میانگین طول ۲۰ ±۱۰۰ میلیمتر و میانگین وزنی ۱۰±۳۰ گرم از مرکز تکثیر و پرورش ماهی سیجوال واقع در استان گلستان تهیه گردید. ماهی ها به آزمایشگاه علوم تحقیقات منتقل شد. پس از سپری شدن مدت زمان سازگاری، ماهیانی با میانگین اندازه و وزن مشابه انتخاب گردیدند. ۱۰ ماهی در هر اکواریم با

[1] Super Oxide Dismutase
[2] Catalase
[3] Reactive Oxygen Species

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118088]
Downloaded from isfj.ir at 5:38 +0330 on Thursday January 17th 2019

دانسیته gL^{-1} ۱و هوادهی ثابت به مدت ۲۱ روز نگهداری شدند. خصوصیات فیزیکوشیمیایی آب شامل، دما ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۵/۲ میلیگرم بر لیتر، pH =۷±۰/۰۰۴، سختی آب ۲۷۰ ppm بود. بر پایه یافته سایر پژوهشگران، میانگین غلظت کشنده ۹۶ ساعته نانوذرات مس ($96\ h\ LC_{50}$) در ماهی استروژن سیبریایی برابر mgL^{-1} ۱/۴۱±۰/۲۴ گزارش گردید بود (Hua *et al.*, 2014). در پژوهش حاضر، سه تیمار در غلظت زیر کشنده نانوذرات مس به همراه یک گروه شاهد (T_0=control، T_1=۰/۱ mgL^{-1}، T_2=۰/۲ mgL^{-1}، T_3=۰/۵ mgL^{-1})، در سه تکرار تعیین گردید. شرایط گروه شاهد کاملا شبیه سایر گروه‌ها بود.

نمونه برداری

در هفته اول، دوم و سوم از آزمایش سه ماهی به طور تصادفی از هر گروه انتخاب شد. ماهیان در محلول عصاره میخک بیهوش شدند و پس از قطع ساقه دمی، خون در لوله‌های آزمایش جمع آوری شد و در سانتریفیوژ با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. سرم خون از فاز لخته شده جدا شد و در دمای ۸۰- تا زمان بررسی های نهایی نگهداری شد. برای بررسی تاثیرات بافتی نانوذرات مس بر کبد ماهی کلمه، پس از بیهوش نمودن ماهی قسمتی از کبد ماهی جداشد . بافتها بلافاصله در محلول فرمالین۱۰٪ تثبیت شد و پس از طی مدت زمان ۶ ساعت ، فرمالین قبلی تخلیه و مجددا محلول فرمالین۱۰٪ جدید به بافتها اضافه گردید.

بررسی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز SOD

فعالیت سرمی سوپر اکسید دیسموتاز طبق روش Kakar (۱۹۸۴)، اندازه گیری شد. اساس این روش مهار رنگ تشکیل آبی تترازولیوم فورمازان توسط سوپر اکسید دیسموتاز در مخلوط واکنس حاوی فنازین متوسولفات– نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید احیاء– نیتروبلوتترازولیوم (Phenazine NADH Methosulphate-NBT) است. واکنش با اضافه کردن ۰/۲ میلی لیتر از محلول NADH با غلظت ۷۵۰µM در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد شروع شد. پس از ۹۰ ثانیه واکنش با اضافه کردن ۰/۱ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال متوقف شد و ۴ میلی لیتر بوتانول به مخلوط واکنش اضافه و خوب ورتکس شد. مخلوط به مدت ۵ دقیقه در ۴۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد و جذب نوری فاز رویی در ۵۶۰ نانومتر در مقابل بوتانول اندازه گیری شد. فعالیت در واحد U/ml بیان شد.

بررسی آنزیم کاتالاز

فعالیت کاتالاز در سرم طبق روش Aebi (۱۹۸۴)، اندازه گیری شد. این روش براساس تجزیه پراکسید هیدروژن توسط کاتالاز طراحی شده است. با اضافه کردن ۰/۵ میلی لیتر از H_2O_2 با غلظت ۵۰ mM به مخلوط واکنش شروع شد . کاهش جذب ناشی از تجزیه پراکسید هیدروژن در ۲۴۰ نانومتر که متناسب با فعالیت کاتالاز در فواصل ۱، ۲ و ۳ دقیقه اندازه گیری و با توجه به میانگین جذب دردقیقه فعالیت کاتالاز بر حسب U/ml اندازه گیری شد.

مراحل آماده سازی نمونه های بافتی

نمونه های بافت کبد، پس از طی مراحل آبگیری، شفاف سازی و آغشته گری با تولوئن و قالبگیری توسط پارافین به کمک دستگاه میکروتوم به برشهای ۶ میکرومتری، بریده شدند و بروی لامهای شیشه ای قرار داده شد. لامها به روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H & E) رنگ آمیزی شدند. سپس لامها بوسیله لامل و چسب انتالن مونتاژ گردیده و به کمک میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین دیجیتال مورد مطالعه و عکس برداری قرار گرفتند (Roberts, 2001).

روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

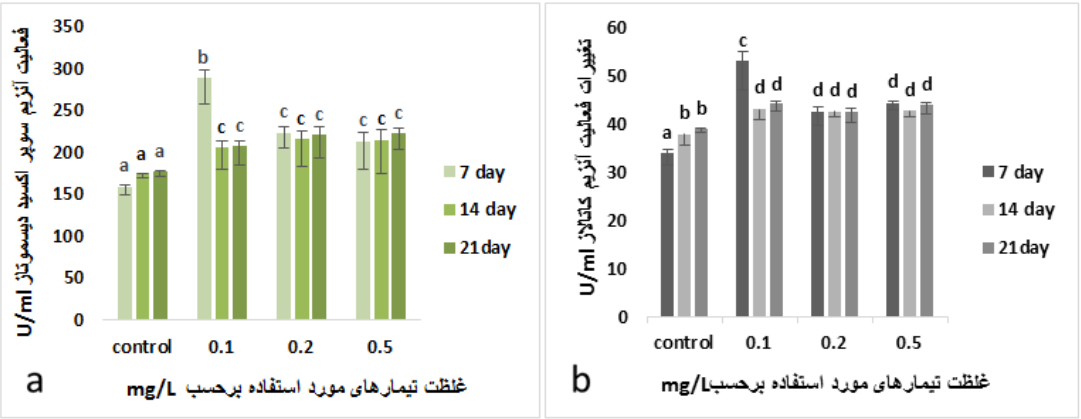
تمامی داده های به دست آمده در این تحقیق به روش آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و آزمون تعقیبی (Tukey) استفاده شد. نتایج به صورت Mean ± S.E ارائه شد و ملاک استنتاج آماری($p<۰/۰۱$) در نظر گرفته شد. برای بررسی همبستگی مابین فعالیت

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118088]
Downloaded from isfj.ir at 5:38 +0330 on Thursday January 17th 2019

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و آنزیم کاتالاز از آزمون همبستگی Spearman استفاده شد.

نتایج

تغییرات فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: در این مطالعه فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز درتیمارها به طور معنی داری بیشتر از گروه شاهد بود (p<۰/۰۱). ارتباط مثبت و معنی داری بین غلظت نانوذرات مس و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (شکل ۱) وجود داشت (r=۰/۴۲ و p<۰/۰۱). همچنین بین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز نیز ارتباط مستقیم و معنی‌دار مشاهده شد (r=۰/۶۷ و p<۰/۰۱). فعالیت آنزیم SOD در سرم خون ماهیانی که در معرض غلظت ۰/۱ mgL^{-1} از نانوذرات مس قرار گرفته بودند در هفته اول به حداکثر میزان خود رسید ولی با افزایش مدت زمان در معرض بودن (در هفته های دوم و سوم) و همچنین افزایش غظت نانوذرات مس (غلظتهای ۰/۲ و ۰/۵ میلیگرم بر لیتر) روند صعودی نداشت.



شکل ۱: نمودار تغییرات فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز(a). نمودار تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز(b). حروف بالانویس کوچک متفاوت در هر ردیف بیانگر اختلاف معنی دار بین غلظت های مختلف در زمانهای گوناگون است (p<۰/۰۱).

Figure 1: Changes in the activities of Superoxide dismutase (a). Changes in the activities of Catalase (b) The same letters are not significantly different (p<0.01).

تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز

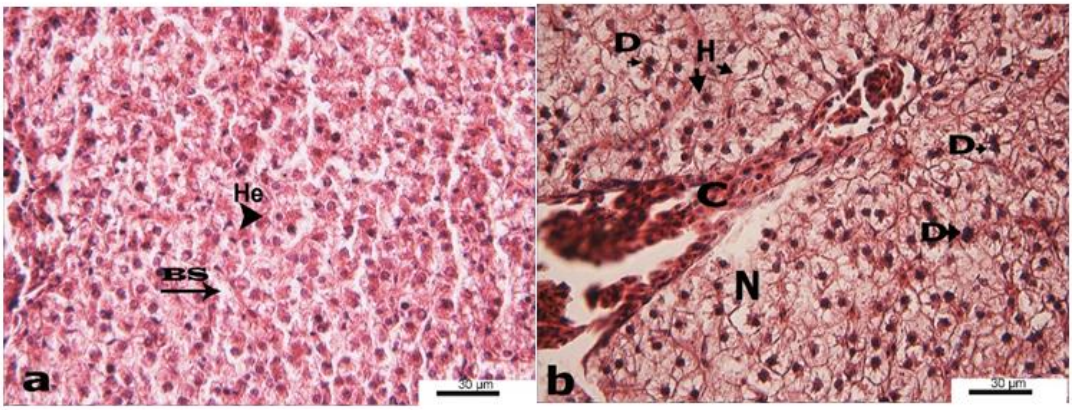
در این مطالعه فعالیت آنزیم کاتالاز درتیمارها به طور معنی داری بیشتر از گروه شاهد بود (p<۰/۰۱). حداکثر فعالیت آنزیم CAT در سرم خون ماهیانی که در معرض غلظت ۰/۱ mgL^{-1} از نانوذرات مس قرار گرفته بودند در هفته اول به حداکثر میزان خود رسید (۵۳/۰۲ U/ml) ولی با افزایش مدت زمان در معرض بودن (در هفته های دوم و سوم) و همچنین افزایش غظت نانوذرات مس (غلظتهای ۰/۲ و ۰/۵ میلیگرم بر لیتر) روند افزایشی نداشت. ارتباط مثبت و معنی داری بین غلظت نانوذرات مس و فعالیت آنزیم کاتالاز (شکل ۲) وجود داشت (r=۰/۴۸ و p<۰/۰۱). همچنین بین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز نیز ارتباط مستقیم و معنی دار مشاهده شد (r=۰/۶۷ و p<۰/۰۱).

آسیبهای بافت کبد

پس از مواجهه ماهیها با نانوذرات مس در تمام تیمارها، آسیبهای بافتی گوناگونی در بافت کبدی مشاهده شد. که از آن دسته می توان به هیپرتروفی سلولی، پرخونی در ورید مرکزی، واکوئلاسیون، نکروز، پرخونی در سینوزئید ها و پیکنوزه شدن هسته اشاره نمود (شکل‌های ۲ و ۳). با افزایش مدت زمان مواجهه افزایش غلظت نانوذرات مس، شدت آسیب های بافتی مذکور افزایش پیدا کرد (جدول ۱).

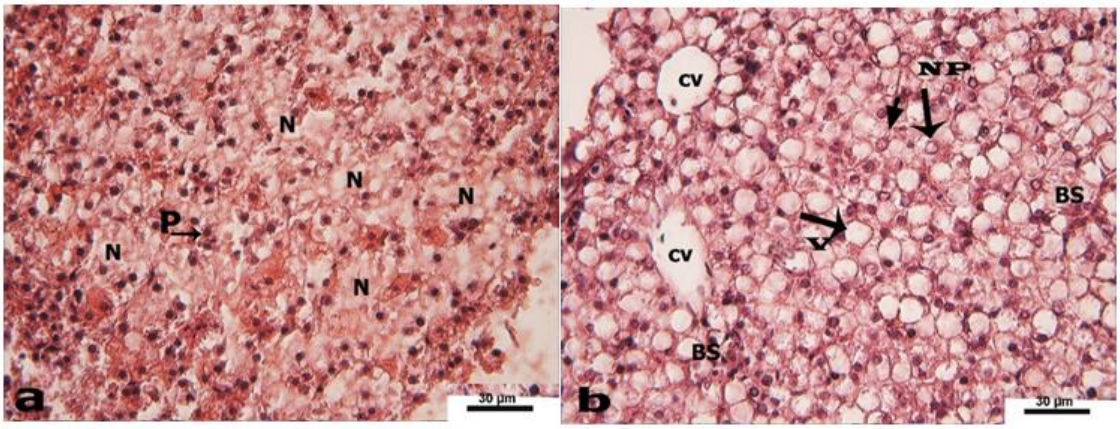
[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118088]

Downloaded from isfj.ir at 5:38 +0330 on Thursday January 17th 2019



شکل۲ : a) بافت نرمال کبد شاهد فاقد هر گونه آسیب بافتی بود، (He) هپاتوسیتهای کبد – (BS) سینوزویید های کبد b) کبد ماهیان پس از مواجهه با غلظت ۰/۱ میلیگرم بر لیتر از نانوذرات مس، (H) هیپرتروفی – (c) پرخونی در ورید مرکزی- (D) مرزنشینی هسته ها- (N) نکروز

Figure 2: a) Normal liver tissue without any abnormality. (He) hepatocytes- (Bs) sinusoids. b) liver exposed to 0.1 mg/L CuNPs, Hypertrophy (H)- Blood congestion (C)- Nucleus boundary(D)- Necrosis (N) .



شکل۳: a) کبد ماهیان پس از مواجهه با غلظت ۰/۲ میلیگرم بر لیتر از نانوذرات مس. (N) نکروز شدید بافتی -(P) پیکنوزه شدن هسته. b) کبد ماهیان پس از مواجهه با غلظت ۰/۲ میلیگرم بر لیتر از نانوذرات مس. (CV) ورید مرکزی – (BS) پرخونی سینوزوئیدها- (V) واکوئلاسیون شدید- (NP) پیکنوزه شدن هسته

Figure 3: a) liver exposed to 0.2 mg/L CuNPs, sever necrosis (N) pyknosis (P). b) liver exposed to 0.5 mg/L CuNPs, central vein (CV) - Blood congestion (BC)- severe vacuolation (v)- pyknosis (NP).

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118088]
Downloaded from isfj.ir at 5:38 +0330 on Thursday January 17th 2019

جدول ۱: آسیبهای بافتی کبد ماهی کلمه پس از مواجهه با نانو ذرات مس

Table 1: Histopathological scores of Caspian roach liver exposed to continuous exposure of Cu–NPs .

مدت زمان / نوع آسیب	هفته اول			هفته دوم			هفته سوم		
	mgL^{-1}۰/۱	mgL^{-1}۰/۲	mgL^{-1}۰/۵	mgL^{-1}۰/۱	mgL^{-1}۰/۲	mgL^{-1}۰/۵	mgL^{-1}۰/۱	mgL^{-1}۰/۲	mgL^{-1}۰/۵
پرخونی در ورید مرکزی	++	++	++	++	++	++	+	+	-
واکوئلاسیون	-	-	-	-	-	++	+	++	+++
هیپرتروفی	++	+	++	+++	++	+++	+++	+	-
نکروز	_	_	+	+	+	++	+	+	+++
پرخونی در سینوزوئید ها	++	++	+++	++	++	++	+	+	+
پیکنوز هسته ها	-	-	+	-	+	++	-	+	++

- به معنای عدم مشاهده آسیب بافتی مشخص در لامهای زیر میکروسکوپ

+ به معنای آسیب بافتی کم بود و حدودا ۱۰٪ از محدوده بافتی در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰ را شامل می شد.

++ به معنای آسیب بافتی متوسط بود و حدودا ۲۰٪ از محدوده بافتی در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰ را شامل می شد.

+++ به معنای آسیب بافتی شدید بود و بیش از ۲۰٪ از محدوده بافتی در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰ را شامل می شد.(Dutta *et al.*, 1996)

بحث

اکسیژن برای فرآیندهای حیاتی سلول ضروری می باشد ولی متابولیسم اکسیژن ممکن است مواد فعالی را به وجود آورد که ROS نامیده می شود. ROS شامل رادیکالهای آزاد مشتق از اکسیژن مانند اکسید نیتریک، رادیکالهای هیدروکسیل، سوپر اکسید و مشتقات غیر رادیکالی بسیار فعال اکسیژن نظیر هیدروژن پراکسید، پراکسی نیتریت هیپوکلیریت می باشند (شریف پور و همکاران، ۱۳۸۹؛ اسمعیل کاویانی و همکاران، ۱۳۹۶). این مواد شیمیایی ناپایدار حامل الکترونهای آزاد هستند و برای جبران ناپایداری با مولکولهای سایر مواد واکنشهای زنجیره ای به وجود می آورند. به این ترتیب رادیکالهای آزاد به DNA، پروتئینهای ضروری سلول و لیپیدهای غشایی و میتوکندری، آسیب می زنند و ممکن است منجر به مرگ سلولی گردند (Joanny Menvielle-Bourg, 2005). هرگونه تغییرات محیطی که منجر به استرس اکسیداتیو گردد، باعث به وجود آمدن ROS می شود (Oliveira Batista, *et al.*, 2014). اولین مکانیسم سمیت نانو ذرات، تولید ROS می باشد که باعث برهم خوردن وضعیت تعادل سلول و ایجاد استرس اکسیداتیو می گردد. حضور گروههای کاربردی پرواکسیدانت بروی سطح فعال نانوذرات می تواند عاملی در ایجاد ROS باشد و یا تاثیرات متقابل سلول–نانوذره، منجر به تولید ROS می شود (Khanna, *et al.*, 2015). آنتی اکسیدانها مولکولهایی هستند که از اکسیداسیون این ترکیبات جلوگیری می نمایند؛ به این ترتیب که با رادیکالهای آزاد ترکیب می شوند و سیستم ایمنی بدن را تقویت می نمایند و از آسیبهای سلولی می کاهند (Kohen *et al.*, 2002). در سلولها استرس اکسیداتیو زمانی رخ می دهد که نیروهای اکسید کننده بر عوامل دفاعی آنتی اکسیدانی چیره شود. این دفاع آنتی اکسیدانی شامل مکانیسم دفاع آنزیمی و مکانسیم غیر آنزیمی می باشد (Xia *et al.*, 2013).

SOD یکی از آنزیمهای مهم کاتالیز کننده یونهای سوپر اکسید می باشد و با حذف و یا اضافه کردن الکترون ، آنرا به هیدروژن پراکسید و اکسیژن تبدیل می کند (فرمول ۱) (Xia *et al.*, 2013). به این ترتیب یک آنزیم کلیدی درمکانیسم دفاعی بدن در برابر رادیکالهای آزاد می باشد (Joanny Menvielle-Bourg, 2005). CAT به شدت در اندامهای موجودات نوسان دارد و هیدروژن پرکسید را که توسط SOD تولید شده است، به اکسیژن و آب تبدیل می نماید (Oliveira Batista, *et al.*, 2014). سیستم CAT-SOD اولین خط دفاعی بدن در برابر

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118088]
Downloaded from isfj.ir at 5:38 +0330 on Thursday January 17th 2019

استرس اکسیداتیو می باشد و به عنوان بیومارکر تولید ROS بحساب می آید.

$$O_2^- \xrightarrow{(SOD)} H_2O_2 \xrightarrow{(CAT)} H_2O + \frac{1}{2}O_2 \quad \text{(فرمول ۱)}$$

نتایج پژوهش حاضر حاکی از آنست که نانوذرات مس در غلظتهای mgL^{-1} ۰/۱ باعث افزایش فعالیت SOD می گردند و در غلظتهای mgL^{-1} ۰/۵ و ۰/۲ روند افزایشی مشاهده نگردید. یافته های این پژوهش همسو با یافته های Wang و همکاران در سال ۲۰۱۶ می باشد. این محققین تاثیر نانوذرات اکسید مس و سولفات مس را بروی سلولهای کبدی ماهی گروپر *Epinephelus coioides* بررسی نمودند و سلولهای کبدی کشت شده به مدت ۲۴ ساعت در معرض غلظت mgL^{-1} ۲/۴ از نانوذرات اکسید مس قرار گرفتند و فعالیت آنزیمهای کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون مهار گردید. نانوذرات توانایی ساختن ROS را در سلولهای کبدی دارند .آلاینده ها اندامهای گوناگون را تحت تاثیر قرار می دهند. بیشتر آلاینده ها از طریق خون وارد کبد می شوند . کبد اندام اصلی سم زدایی می باشد.به این ترتیب بافت کبدی مکانی برای انباشته شدن آلاینده ها می باشد و اثرات دراز مدت آلاینده باعث آسیب بافت کبد می شود (Oliveira Batista *et al*., 2014) و عدم تغییرات SOD در غلظتهای بالا حاکی از آسیب بافتی ناشی از ایجاد ROS در کبد ماهی می باشد در نتیجه قابلیت ترشح آنزیمهای اکسیداتیو در غلظتهای بالای نانوذارت ازمیان می رود. در مجموع کاهش SOD ممکن است به دلیل سازگاری بدن و یا از دست رفتن مکانیسم های بازسازی باشد (Xia *et al*., 2013). CAT یکی از فعال ترین آنزیمها می باشد و فعالیت آن، وابسته به حضور پراکسید هیدروژن می باشد (Abdel-Khalek *et al*., 2015). یک مولکول از CAT می تواند میلیونها مولکول از پراکسید هیدروژن را در مدت یک ثانیه به آب و اکسیژن تبدیل کند (An *et al*., 2008). در این پژوهش با افزایش غلظت نانوذرات مس فعالیت CAT مهار می شود که می تواند نشانه آسیب بافت کبدی باشد بالاترین میزان فعالیت در غلظت mgL^{-1} ۰/۱ مشاهده شد و در غلظتهای mgL^{-1} ۰/۵ و ۰/۲ افزایش فعالیت به چشم نخورد. بررسی های بافت کبدی در غلظتهای مختلف نانوذرات مس آسیبهای گوناگون بافتی نظیر هیپرتروفی سلولی، پرخونی در ورید مرکزی، واکوئلاسیون، نکروز، پرخونی در سینوزئید ها و پیکنوزه شدن هسته را نشان داد که حاکی از تاثیرات سمی نانوذرات در بافت کبد می باشد و با افزایش غلظت، شدت آسیبها افزایش یافت. . چنین تغیرات مشابهی توسط AlBairuty و همکاران (۲۰۱۳)، کبد ماهی قزل آلای رنگین کمان که درمعرض نانوذرات مس و توسط Ostaszewska و همکاران (۲۰۱۶)، کبد ماهی استروژن سیبریایی که در معرض نانوذرات نقره و مس قرار گرفته بودند، گزارش گردید.

در پژوهش مشابهی که توسط Karthigarani و همکاران (۲۰۱۱)، صورت گرفت تاثیر سمیت نانوذرات اکسید تیتانیوم بروی ماهی *Oreochromis Mossambicus* بررسی گردید. ماهیها در معرض غلظتهای صعودی تحت کشنده نانوذرات اکسید تیتانیوم قرار گرفتند و فعالیت آنزیمهای سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز در غلظتهای بیشتر مهار گردیده بود. از سوی دیگر یافته های Kiran Reddy و همکاران (۲۰۱۴)، Xia و همکاران (۲۰۱۳)، Abdel-Khalek و همکاران (۲۰۱۵) همسو با یافته های تحقیق حاضر می باشد. برخی از متابولیتهای ثانویه حاصل از سیستمهای آنتی اکسیدانی، تولید ROS را تقویت می نماید و از اینرو به بافت آسیب می زنند (Xia *et al*., 2013; Saglam *et al*., 2014). در نتیجه بافت توانایی ترشح آنزیم را از دست میدهد و در میزان آن اختلال به وجود می آید. سمیت نانوذرات ناشی از فعالیت بالا، نسبت سطح به حجم زیاد، اندازه کوچک آنها می باشد و به واسطه این خصوصیات قادرند به غشاء سلول، سیتوپلاسم و هسته سلول نفوذ نمایند و به طور مستقیم یا غیر مستقیم تاثیرات مخرب خود را القا کنند. نانوذرات می توانند با ماکرومولکولهایی نظیر پروتئین، چربی، DNA ترکیب شوند و متابولیسم این مواد را تحت تاثیر قرار دهند و باعث جهش ژنی در بسیاری از آنزیمهای حیاتی شوند (Noureen *et al*., 2015). نانو ذرات مس باعث

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118088]
Downloaded from isfj.ir at 5:38 +0330 on Thursday January 17th 2019

بروز استرس اکسیداتیو می گردد که میزان ترشح آنزیمهای اکسیداتیو کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز را تحت تاثیر قرار می دهد و باعث آسیب شدید بافت کبدی می شود که می تواند تاثیرات سمی برسلامت ماهی کلمه داشته باشند و حتی منجر به مرگ این ماهی گردد. یافته های پژوهش حاضر، اطلاعات جدیدی در زمینه سمیت نانوذرات مس در دسترس محققین قرار می دهد و می تواند در راستای تعیین معیارهای کیفیتی آب در رابطه با حضور نانوذرات موثر باشد . همچنین باید در زمینه رهاسازی این مواد در محیط زیست دریایی تمهیدات خاص و ممنوعیت در نظر گرفته شود. به این ترتیب گامی در جهت حفظ گونه های ارزشمند زیستی مانند ماهی کلمه دریای خزر و سایر موجودات دریایی برداشته می شود.

منابع

اسمعیل کاویانی، ف.، نعیمی، ا.، صالح زاده، ع.، ۱۳۹۶. اثرات کوتاه مدت نانوذرات اکسید روی بر شاخصهای خونی و آنزیمهای متابولیک بچه ماهی آزاد خزر (*Salmo trutta caspius*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۶(۵): ۵۱-۴۳.

شریف پور، ع.، ابطحی، ب.، حیدری جامع بزرگی، ف.، سیف آبادی، ج.، تقی زاده رحمت آبادی، ز.، ۱۳۸۹. آسیب شناسی اثرات فاز محلول نفت خام بر بافت آبشش بچه ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*) در شرایط آزمایشگاهی. مجله علمی ایران شیلات، ۱(۲۰): ۱۰۰-۸۹. DOI: 10.12692/ijb/6.2.147-156

Abdel-Khalek, A., Kadry, M., Hamed, A. and Marie, M.A., 2015. Ecotoxicological impacts of zinc metal in comparison to its nanoparticles in Nile tilapia; *Oreochromis niloticus*. The Journal of Basic & Applied Zoology, 72: 113–125 . DOI:10.1016/ j.jobaz.2015.08.003.

Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. Methods Enzymol, 105:121-126. DOI: 10.1016/S0076-6879 (84)05016-3.

Al-Bairuty, G.A., Shaw, B.J., Handy, R.D. and Henry, T.B., 2013. Histopathological effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on the organs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic Toxicology, 126: 104 –115. DOI:10.1016/j.aquatox.2012.10.005

An, R., Li, Y., Niu, X. and Yu, H., 2008. Responses of Antioxidant Enzymes in Catfish Exposed to Liquid Crystals from E-Waste. International Journal Of Environmental Research And Public Health, 5(2): 99-103.

Bagherzadeh Lakani, F., Meshkini, s., Yazdani Sadati M.A. and Falahatkar B., 2016. Bioaccumulation of copper nanoparticle in gill, liver, intestine and muscle of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) juvenile. Caspian Journal Environmental Sciences, 14 (2): 105-115.

Dutta, H.M., Munshi, J.S.D., Roy, P.K., Singh, N.K., Adhikari, S. and Killius J., 1996. Ultrastructural changes in the respiratory lamellae of the catfish, *Heteropneustes fossilis*, after sublethal exposure to malathion. Environmental Pollution, 92: 329 – 341. DOI:10.1016/0269-7491 (95)00101-8.

Federici, G., Shaw, B.J. and Handy, R.D., 2007. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): gill injury, oxidative stress, and other

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118088]
Downloaded from isfj.ir at 5:38 +0330 on Thursday January 17th 2019

physiological effects. Aquatic Toxicology, 84: 415–30. DOI: 10.1016/ j.aquatox.2007.07.009

Hoseini, S. M. and Nodeh, A. J., 2013. Toxicity of copper and mercury to Caspian Roach *Rutilus rutilus caspicus*. Journal of the Persian Gulf, 3 (9): 9 – 14.

Hua, J., Vijver, M.G., Ahmad, F., Richardson, M.K. and Peijnenburg, W.J.G.M., 2014. Toxicity of different-sized copper nano- and submicron particles and their shed copper ions to zebrafish embryos. Environmental Toxicology and Chemistry, 33: 1774–1782. DOI: 10.1002/etc.2615.

Joanny Menvielle-Bourg, F., 2005. Superoxide Dismutase (SOD), a Powerful Antioxidant, is now available orally. Phytotherapy, 3: 1-4. DOI: 10.1007/s10298-005-

Karthigarani, M. and Navaraj, P.S., 2011. Impact of Nanoparticle On Enzymes Activity In *Oreochromis Mossambicus.* International Journal Science and Technology Research, 1(10): 13-17

Khanna, P., Ong, C., Bay, B.H. and Baeg, G.H., 2015. Nanotoxicity: An Interplay of Oxidative Stress, Inflammation and Cell Death. Nanomaterials, 5: 1163-1180. DOI: 10.3390/nano5031163.

Kiran Reddy, T., Prasad, T.N.V.K.V. and Janardana Reddy, S., 2013. Studies on combined effect of *Aeromonas hydrophila* and cadmium on lipid peroxidation and antioxidant status in selected tissues of Indian freshwater major carp, *Catla catla*: role of silver nanoparticles. IOSR Journal of Pharmacy, 4(10): 1-7. DOI: 10.9790/ 3013-040100107

Kohen, R. and Nyska, A., 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress and antioxidants. Toxicology Pathology, 30: 620–630. DOI:10.1080/ 01926230290166724

Noureen, A. and Jabeen, F., 2015. The toxicity, ways of exposure and effects of Cu nanoparticles and Cu bulk salts on different organisms**.** International Journal of Biological Sciences,

Oliveira Batista, M.T., Rodrigues Junior, E., Feijó-Oliveira, M., Caroline Ribeiro, A., Rodrigues, E., Kawagoe Suda, C.N. and Sree Vani, G., 2014. Tissue levels of the antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase in fish *Astyanax bimaculatus* from the Una River Basin. Ambiente & Água, 9(4): 621-631. DOI: 10.4136/ambi-agua.1473

Ostaszewska, T., Chojnacki, M., Kamaszewski, M. and Sawosz-Chwalibóg, E., 2016. Histopathological effects of silver and copper nanoparticles on the epidermis, gills, and liver of Siberian sturgeon. Environmental Science Pollution Research, 23: 1621–1633. DOI: 10.1007/ s11356-015-5391-9.

Roberts, R.J., 2001. Fish Pathology, 3rd edn. W.B. Saunders publishing, London, UK. DOI:10.1046/j.1467-2979.2002.00072.x

Saglam, D., Atli, G., Dogan, Z., Baysoy, E., Gurler, C., Eroglu, A. and Canli, M., 2014. Response of the Antioxidant System

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118088]
Downloaded from isfj.ir at 5:38 +0330 on Thursday January 17th 2019

of Freshwater Fish *(Oreochromis niloticus)* Exposed to Metals (Cd, Cu) in Differing Hardness. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 14: 43-52. DOI: 10.4194/1303-2712-v14_1_06

Shaw, B.J. and Handy, R.D., 2011. Physiological effects of nanoparticles on fish: a comparison of nanometals versus metal ions. Environment International, 37(6): 1083–1097. DOI: 10.1016/j.envint.2011.03.009.

Shaw, B.J., Al-Bairuty, G. and Handy, R.D., 2012. Effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): physiology and accumulation. Aquatic Toxicology, 116: 90–101. DOI:10.1016/j.aquatox.2012.02.032

Trenzado, C., Carmen Hidalgo, M., García-Gallego, M., Morales, A.E., Furné, M., Domezain, A., Domezain, J. and Sanz, A., 2006. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in sturgeon *Acipenser naccarii* and trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. Aquaculture, 254: 758–767. DOI:10.1016/j.aquaculture.2005.11.020

Wang, T., Chen, X., Long, X., Liu, Z. and Yan, S., 2016. Copper Nanoparticles and Copper Sulphate Induced Cytotoxicity in Hepatocyte Primary Cultures of Epinephelus coioides. Plos One, 11(2): e0149484. DOI:10.1371/journal.pone .0149484

Xia, J., Zhao, H.Z. and Lu, G.H., 2013. Effects of Selected Metal Oxide Nanoparticles on Multiple Biomarkers in *Carassius auratus. Biomedical and Environment Sciences,* 26(9): 742-749. DOI: 10.3967/0895-3988.2013.09.005.

Xu, P., Xu, J., Liu, S. and Yaug, Z., 2012. Nano copper induced apoptosis via increasing oxidative stress. Journal of Hazardous Materials, 241-242: 279-286. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2012.09.041.

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118088]
Downloaded from isfj.ir at 5:38 +0330 on Thursday January 17th 2019

Effect of copper nanoparticles in the Caspian Roach (*Rutillus rutillus caspicus*), changing antioxidant activities and liver histopathology

Aghamirkarimi, Sh.[1], Mashinchian Moradi, A.[1*], Sharifpour, I.[2], Jamili, Sh.[2], Ghavam Mostafavi, P.[1]

[*]ali2m@yahoo.com

1-Department of Marine Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2-Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Tehran, Iran

Abstract:

The current study has determined the toxicity effects of copper nanoparticles (CuNPs) on the some vital organs such as gill, liver and kidney of Caspian Roach; *Rutillus rutillus caspicus*. For this purpose, 120 fishes were used as experimental fishes and exposed to 0.1, 0.2 and 0.5 mg/L of Cu nanoparticles for 21 days, and 30 fishes as control. The mean water temperature of the aquaria was 22±2 ºC, dissolved oxygen 5.2 mg/L, pH at 7±0.004 and the concentration of Calcium Carbonate was 270 ppm. On the 7, 14 and 21 days after exposing the fishes to CuNPs, three fish were randomly selected from each aquaria, sacrificed and samples from their liver and blood were taken. Changing in antioxidant enzymes level were determined by evaluation of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities in the blood of fish. In first week, the samples that exposed to 0/1 mg/L of CuNPs concentration had more activities in SOD and CAT levels ($p<0.01$) but other treatments (0.2 & 0.5 mg/L) didn't have any increase in enzyme activities. The liver microscopic sections were prepared and stained by H&E method and examined by light microscope which showed histological alternations in the liver tissues. Histological changes in liver included blood congestion in the central veins, cytoplasmic vacuolation of the hepatocytes, cellular hypertrophy, congestion in the blood sinusoids and necrosis of the hepatocytes and nuclear pyknosis. The degree of damages was more intensive at higher CuNPs concentrations. Evaluation of these changes could be useful in estimating the harmful effects of CuNPs. The result of the study showed that CuNPs could cause decrease in antioxidant enzyme activities and severe damages in the liver tissues of Caspian roach; *Rutillus rutillus caspicus* and have lethal effects for fish.

Keywords: Copper nanoparticle, Histopathology, Superoxide dismutase, Catalase, *Rutillus rutillus caspicus*

[*]Corresponding author