Spring (2023) 11(4): 1-14
DOI: 10.30473/EAB.2023.63451.1879
Received: 16 Apr 2022 Accepted: 8 Jun 2023

Experimental Animal Biology Open Access

ORIGINAL ARTICLE

Investigating the effect of nickel oxide nanoparticles on cellular oxidative stress in Carassius auratus

Mojtaba Ghorbanpour, Shayan Ghobadi*, Saber Vatandoust, Hamed Manouchehri, Reza Changizi

Department of aquaculture, Babol branch, Islamic Azad University, Babol, Iran.

Correspondence
Shayan Ghobadi
Email: shgh_science@yahoo.com

How to cite
Ghorbanpour, M., Ghobadi, S., Vatandoust, S., Manouchehri, H. & Changizi, R. (2023). Strategies and action plan to reduce the threats to the population and habitat of the Iranian Salamander *Paradactylodon persicus*. Experimental Animal Biology, 12(4), 1-14.

ABSTRACT
Metal oxide nanoparticles are one of the most widely used compounds among nanoparticles that have wide applications in various fields and thus increase their release into the environment and their potential impact on various organisms, especially aquatic organisms in the aquatic ecosystem. Nanoparticles have high chemical and biological reactivity by increasing their surface to volume ratio, which leads to increased production of free radicals. The produced free radicals disrupt the oxidation and natural regeneration of the body's cells and cause oxidative damage in organisms and many diseases. The aim of this study was to investigate the oxidative effect of nickel nanoparticles in Carassius auratus that could open a new horizon in relation to the challenges in aquatic environments. The study groups include the control group and the treatment group with nickel nanoparticles. Each treatment with three replications each included 12 fish per replication. At the end of the period, liver samples were isolated and collected for oxidative damage. Total antioxidant levels, MDA, glutathione and the antioxidant enzymes catalase, glutathione S-transferase and superoxide dismutase were measured in all groups. The results showed that treatment with nickel oxide nanoparticles decreased the level of total anti oxidants and increased the level of MDA in the group treated with nickel oxide nanoparticles. These results showed strong evidence of inducted of cellular oxidative stress induced by exposure to nickel oxide nanoparticles. Also, by comparing the control treatments and the treatment of nickel oxide nanoparticles, it can be concluded that long-term exposure to nickel oxide nanoparticles can aggravate oxidative damage to fish liver tissue.

KEYWORDS
Glutathione, Catalase, Oxidative stress, Nickel oxide nanoparticles, *Carassius auratus*.

© 2023, by the author(s). Published by Payame Noor University, Tehran, Iran.
This is an open access article under the CC BY 4.0 license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

سال یازدهم، شماره چهارم، پیاپی چهل‌وچهارم، بهار ۱۴۰۲ (۱۴-۱)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۱۸

DOI: 10.30473/EAB.2023.63451.1879

نشریه علمی

زیست‌شناسی جانوری تجربی

«مقاله پژوهشی»

بررسی تاثیر نانوذرات اکسید نیکل بر استرس اکسیداتیو سلولی در ماهی *Carassius auratus*

مجتبی قربان‌پور دلاور، شایان قبادی*، صابر وطن‌دوست، حامد منوچهری، رضا چنگیزی

گروه شیلات، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران.

نویسنده مسئول:
شایان قبادی
رایانامه: shgh_science@yahoo.com

چکیده

پرکاربردترین نانوذرات، نانوذرات اکسیدفلزی هستند که باتوجه به کاربرد گسترده در حیطه‌های مختلف و افزایش انتشار آنها، تاثیر بالقوه‌ای بر محیط زیست و موجودات آبزی دارد. این تاثیر به‌واسطه افزایش نسبت سطح به حجم آنها، افزایش واکنش‌پذیری شیمیایی و زیستی می‌گردد که منجر به افزایش تولید رادیکال‌های آزاد، اختلال در اکسیداسیون و احیاء و بروز آسیب اکسیداتیو و بیماری می‌گردد. این پژوهش با هدف بررسی اثر اکسیدانی نانوذره اکسیدنیکل در ماهی *Carassius auratus* می‌باشد که می‌تواند افق جدیدی را در رابطه با چالش‌های موجود در محیط‌های آبی باز نماید. گروه‌های مورد مطالعه شامل گروه شاهد، گروه تیمار با نانوذره اکسیدنیکل (۳۰میلی‌گرم) می‌باشد. هر تیمار با سه تکرار هرکدام شامل ۱۲ماهی در هر تکرار بودند. پس از پایان دوره نمونه‌های کبد جدا و جهت بررسی آسیب‌های اکسیداتیو جمع‌آوری شدند. سطح تام آنتی‌اکسیدان، MDA، گلوتاتیون و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز، گلوتاتیون S-ترانسفراز و سوپراکسیددیسموتاز در تمام گروه‌ها اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که تیمار با نانوذره اکسید نیکل سبب کاهش سطح آنتی‌اکسیدان تام و افزایش سطح MDA در گروه تیمار با نانوذره اکسید نیکل شد. این نتایج شواهد محکمی از القای استرس اکسیداتیو سلولی ناشی از قرار گرفتن در معرض نانوذره اکسید نیکل را نشان داد. همچنین با مقایسه تیمارهای کنترل و تیمار نانوذره اکسیدنیکل می‌توان چنین نتیجه گرفت که رویارویی بلندمدت با نانوذره اکسید نیکل می‌تواند موجب تشدید آسیب‌های اکسیداتیو واردشده به بافت کبد ماهیان گردد.

واژه‌های کلیدی

گلوتاتیون، کاتالاز، استرس اکسیداتیو، نانوذره نیکل اکسید، ماهی *Carassius auratus*.

استناد به این مقاله:

قربان‌پور دلاور، مجتبی، قبادی، شایان، وطن‌دوست، صابر، منوچهری، حامد و چنگیزی، رضا (۱۴۰۲). بررسی تاثیر نانوذرات اکسید نیکل بر استرس اکسیداتیو سلولی در ماهی *Carassius auratus*. فصلنامه زیست‌شناسی جانوری تجربی، ۱۱(۴)، ۱۴-۱.

۱- مقدمه

نوآوری‌های جدید علمی در زمینه نانوذرات مهندسی شده موجب ایجاد برنامه‌های کاربردی گسترده‌ای گردیده است (چادهوری و همکاران، ۲۰۰۸). در فناوری نانو با بهره‌گیری از ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی مواد در اندازه‌های کمتر از ۱۰۰ نانومتر در علوم و صنایع مختلف کاربرد دارد. در نانوذرات کاهش اندازه ذرات، باعث افزایش نسبت سطح به حجم ذرات می‌گردد که مهم‌ترین اثر این پدیده، افزایش شدید خواص کاتالیستی نانوذرات فلزی می‌باشد. با کاهش اندازه ذرات و افزایش نسبت سطح به حجم آنها، واکنش‌پذیری شیمیایی و زیستی آنها افزایش می‌یابد. این ویژگی منجر به افزایش تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود(ولز و همکاران، ۲۰۰۰). اثرات سمی نانوذرات فلزی ازجمله نگرانی‌های بزرگی است که مصرف این نانوذرات را با چالش‌های زیادی مواجه کرده‌است. عوارض جانبی و احتمالی نانوذرات فلزی که در برخی از صنایع استفاده می‌شود باعث تردید در مصرف آن شده‌است. ازجمله این تاثیرات می‌توان به افزایش استرس اکسیداتیو اشاره کرد. در واقع استرس اکسیداتیو عدم تعادل بین تولید و حذف رادیکال‌های واکنش‌گر اکسیژن(*ROS*) در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها می‌باشد که درنتیجه آن آسیب اکسیداتیو در بافت سلولی ایجاد می‌شود (لوپز و همکاران، ۲۰۰۱). استرس اکسیداتیو همچنین می‌تواند توسط مهار مسیرهای آنتی‌اکسیدانی موجود برای محافظت دربرابر آسیب ناشی از *ROS* توسط فلز ایجاد شود (لوش‌چاک،۲۰۱۱). نانوذرات اکسیدفلزی اثرات زیادی در موجودات زنده دارند. از جمله تاثیرات عمده ناشی از افزایش مصرف نانوذرات فلزی و تجمع آن‌ها در اندام جانوران، تاثیر آن بر کبد و متابولیسم آن می‌باشد (انوشا و همکاران، ۲۰۲۰). کبد عضو مهمی در بدن جانوران است که در آن مواد شیمیایی اگزوژن متابولیزه و درنهایت دفع می‌شود. هرگاه سلول‌های کبدی در معرض غلظت قابل‌توجهی از مواد شیمیایی قرار گیرند، نتیجه آن می‌تواند اختلال در عملکرد کبد، آسیب سلولی و حتی نارسایی ارگان‌ها باشد (ساینی و همکاران، ۲۰۱۳). یکی از مواد شیمیایی مضر بر روی کبد و متابولیسم آن تجمع پراکسیدهدروژن (H_2O_2) می‌باشد. تاثیرات مضر اشکال فعال اکسیژن و نیتروژن به‌واسطه عملکرد آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی و آنزیمی متعادل می‌گردد. چنین سیستم‌های دفاعی اهمیت زیادی دارند زیرا در حذف مستقیم رادیکال‌های آزاد نقش داشته و بنابراین حداکثر حفاظت را فراهم می‌کند. کاتالاز در تجزیه پراکسیدهیدروژن تولیدشده، توسط سوپراکسیددیسموتاز را به آب و اکسیژن کمک می‌کند. موثرترین آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی شامل سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز است (ماتز و همکاران، ۱۹۹۹). سوپراکسید دیسموتاز (*SOD*) یک آنزیم متشکل از دو زیرواحد یکسان (هومودیمر) می‌باشد. سوپراکسیددیسموتاز مس-روی به صورت اختصاصی دیسموتاسیون آنیون سوپراکسید را به اکسیژن و آب کاتالیز می‌کند. کاتالاز یک آنزیم موجود در سلول‌های گیاهی، حیوانی و باکتری‌های هوازی می‌باشد. کاتالاز در اندامک سلولی به‌نام پراکسی‌زوم قرار دارد. این آنزیم تبدیل پراکسیدهیدروژن به مولکول‌های اکسیژن و آب را به‌طور بسیار موثر کاتالیز می‌کند. به‌طور خاص، باقیمانده‌های هیستیدین موجود در جایگاه فعال، سبب حساسیت کاتالاز به نیکل می‌شود. نیکل دارای میل ترکیبی زیادی به هیستیدین است بنابراین در صورت اتصال به آن می‌تواند اثرات نامطلوبی بر عملکرد کاتالاز داشته باشد (بله‌وت و همکاران، ۲۰۱۵). گلوتاتیون‌پراکسیداز این آنزیم به دلیل چندژنی بودن خانواده بزرگی را تشکیل می‌دهد. این آنزیم با جفت‌کردن گلوتاتیون از طریق گروه سولفیدریل به مراکز الکترون‌خواه (الکتروفیل) مواد، آنها را کاتالیز می‌کند. این عمل ترکیبات درون‌زا مثل لیپیدهای اکسیدشده را سم‌زدایی می‌کند (ماتز و همکاران، ۱۹۹۹). نیکل و ترکیبات آن به‌ویژه نانوذره اکسیدنیکل به عنوان یک ضدسایش و ضداصطکاک در روغن‌های روان‌کننده و همچنین به عنوان کاتالیزورهای صنعتی، در فرآیندهای هیدروژناسیون، هیدرو دی‌کلراسیون و تصفیه هیدروژنی، به‌طور گسترده‌ای استفاده می‌شوند. با این وجود اطلاعات کمی در ارتباط با سمیت نیکل و آسیب ناشی از نانوذرات آن در آبزیان وجود دارد. در اثر جذب نیکل و ترکیبات آن و تجمع آن‌ها در اندام‌های مختلف، متابولیسم تغییر یافته و محتوای فلزی بافت و پراکسیداسیون چربی‌ها دچار اختلال می‌شود (دورس‌وامی و همکاران، ۲۰۰۴). استرس اکسیداتیو ناشی از نیکل یک مکانیسم شناخته شده سمی است که به‌طور مفصل و مختص به هر بافت در مطالعاتی در ماهی قرمز (*Carassius auratus*) مورد بررسی قرار گرفته است (کوبراک و همکاران، ۲۰۱۲). در زمینه تاثیر نانوذرات فلزی و ترکیبات آن‌ها بر ماهیان تحقیقات مختلفی صورت گرفته است. آقامیری و همکاران (۲۰۱۸)، در بررسی تاثیر نانوذرات مس بر تغییرات آنتی‌اکسیدان‌ها و آسیب بافت کبدی به این نتیجه رسیدند که نانوذرات مس با کاهش فعالیت‌های آنزیمی در سرم خون و آسیب سلول‌های کبدی باعث آسیب زیستی و تاثیرات کشنده بر روی ماهی کلمه (*Rutilus rutilus*) دریای

خزر می‌گردد. بررسی کریم‌زاده و همکاران (۲۰۱۸) نشان داد سمیت کشنده نانوذرات اکسید روی منجر به القای تولید رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو در بافت مغز ماهی کلمه (*Rutilus rutilus*) گردیده است و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بیانگر فعال‌شدن سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی جهت مهار رادیکال‌های آزاد بود. نتایج تحقیقات بیتا و همکاران (۲۰۱۷)، حاکی از آن است که فعالیت کاتالاز در بالاترین غلظت نانوذرات نقره به‌طور چشم‌گیری کاهش و فعالیت گلوتاتیون و سوپراکسیددیسموتاز افزایش داشته است. فتحی و همکاران (۲۰۱۷)، تاثیر همزمان جیوه و نانوذرات نقره را بر شاخص‌های استرس ماهی گلدفیش موردبررسی قرار دادند. براساس نتایج این مطالعه، در کوتاه‌مدت حضور همزمان جیوه و نانوذرات نقره در محیط‌های آبی می‌تواند اثر تشدیدکنندگی بر میزان شاخص کاتالاز در بافت آبشش داشته باشد. بلهوت و همکاران (۲۰۱۵)، برکه‌ماهی (*Aplocheilidae*) سازگاریافته با آب‌شیرین را در معرض نیکل همانند ماهیان نوتروپیک (*Prochilodus lineatus*) قرار دادند. نتایج حاصل از این مطالعه افزایش استرس اکسیداتیو را نشان دادند. گوین داسامی و همکاران (۲۰۱۲)، در بررسی اثر آسیب‌شناسی و استرس اکسیداتیو نانوذرات سنتزشده نقره در تیلاپیا موزامبیک (*Oreochromis mossambicus*) دریافتند فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و محتوای آنتی‌اکسیدان در آبشش و کبد ماهیان تحت تیمار با *Ag-NP* کاهش یافته است و این کاهش‌های رخداده در فعالیت آنزیم‌ها و محتوای آنتی‌اکسیدان منجر به تجمع شدید رادیکال‌های آزاد گردیده است. همچنین نتایج بافت‌شناسی نشان می‌دهد که تعادل بین سیستم اکسیداتیو و آنتی‌اکسیدانی در ماهی در مدت‌زمان گرفتن در معرض *Ag-NPs* از بین رفته است. چوی و همکاران (۲۰۱۰) با بررسی اثر القای استرس اکسیداتیو و آپوپتوزی توسط نانوذرات نقره در ماهی گورخری بالغ (*Archocentrus nigrofasciatus*) مشاهده کردند که سطح ملون دی‌آلدئید و گلوتاتیون در کبد ماهی افزایش یافته و سطح آنزیم‌های کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در بافت‌ها کاهش یافته است. این پژوهش با هدف بررسی اثر اکسیدانی نانوذره اکسیدنیکل در ماهی *Carassius auratus* می‌باشد که می‌تواند افق جدیدی را در رابطه با چالش‌های موجود در محیط‌های آبی باز نماید.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱ تهیه نانوذره اکسید فلز نیکل

نانوذره اکسید فلزنیکل با نام تجاری *ARMINANO* از شرکت مهندسی پایدار ابتکار آرمینا تهران تهیه گردید و به هر جیره غذایی به میزان ۳۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم غذا اضافه گردید. مشخصات طبق شکل (۱) می‌باشد.

شناسه محصول:	**NOP1201**
فرمول شیمیایی:	**NiO**
شکل ظاهری:	**پودری**
رنگ:	**سیاه**
شکل ذرات:	**تقریبا کروی**
اندازه ذرات:	**۲۰-۵۰ nm**

شکل ۱. نانوذره اکسید فلز نیکل (NiO) شرکت مهندسی پایدار آرمینا

۲-۲ تطبیق ماهی با رژیم غذایی

ماهی *Carassiuus auratus* از مرکز پرورش ماهی سیمرغ واقع در بابلسر تهیه گردید. میانگین وزن ۰/۴۵±۸/۶۵ گرم و میانگین طول آنها ۰/۳۳± ۵/۵۸ سانتیمتر بوده‌اند.

شکل ۲. ماهی *Carassiuus auratus* از خانواده گلدفیش (*goldfish*)

دوره سازش‌پذیری ماهیان به شرایط آزمایشگاه، ۱۴ روز بود. طی یک دوره ۳۰روزه، ماهی‌ها دوبار در روز به میزان ۴٪ وزن بدن و به روش دستی تغذیه شدند. از غذای تجاری موجود بیومار برای ماهی *Carassiuus auratus* به مدت ۲ هفته قبل از شروع آزمایش به منظور تطابق به رژیم غذایی و آزمایشگاه مورد استفاده قرارگرفت. پس از این دوره تطابق، برای انجام آزمایشات از دو آکواریوم با هوادهی پیوسته استفاده شد که در هرکدام از آنها تعداد ۱۲عدد از *goldfish* قرار گرفت. دمای آب و *pH* در این آزمایش به‌ترتیب ۰/۵±۲۰/۲ و ۰/۴±۸/۲ بود و طی دوره آزمایش به‌طور کامل ثابت نگه داشته شد. دسته اول گروه شاهد می‌باشند که تحت هیچ تیماری قرار نمی‌گیرند و در شرایط محیطی یکسان با گروه‌های تیمار نگهداری شدند. گروه دوم ماهیانی هستند که ۴ هفته تحت تیمار با نانوذره نیکل (۳۰میلی‌گرم در هرکیلوگرم غذا) قرار خواهند گرفت.

۲-۳ هموژن‌سازی بافت

برای تهیه نمونه بافتی، ماهی‌ها پس از صید شدن با استفاده از گل میخک بیهوش و سپس با ضربه به سر کشته شدند و پس از کالبدشکافی، کبد جدا شد و هر نمونه جداگانه در میکروتیوب نشان‌دار حاوی محلول فرمالین ۱۰ درصد فیکس شد.

در این تحقیق به‌منظور هموژن کردن بافت کبد ماهی از دستگاه هموژنایزر استفاده شد. سپس بعد از اندازه‌گیری وزن بافت‌های کبدی، آنها را به لوله فالکون انتقال دادیم و به ازای هر ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت به مقدار ۱ میلی‌لیتر بافر *Tris-HCl* با *pH* برابر با ۷/۴ به آن اضافه شد و پس از انجام عمل هموژن‌سازی، در داخل سانتریفیوژ با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه و با دمای ۴+ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت، سپس مایع شفاف بالایی جدا شد و برای آنالیز آنتی‌اکسیدانی تا زمان انجام آزمایش در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

۲-٤ اندازه‌گیری‌ها

۲-٤-۱ سنجش آنتی‌اکسیدان تام

در این تحقیق سطح آنتی‌اکسیدان تام تحت عنوان *FRAP* (*Ferric reducing ability of plasma*) در گروه‌های موردبررسی با استفاده از روش Benzie & Strain (1996) مورد سنجش قرار گرفت. در این روش، سطح آنتی‌اکسیدان‌های نمونه براساس قدرت آنها در اثر احیاء یون فریک به یون فرو اندازه‌گیری می‌شود. ماده اصلی مورد استفاده در اندازه‌گیری میزان *FRAP* به نام *TPTZ* می‌باشد. این ترکیب میل زیادی جهت اتصال با یون فریک دارد و بنابراین با آن کمپلکس *Fe3+-TPTZ* تشکیل می‌دهد. این کمپلکس در حالت طبیعی بدون رنگ است، اما چنانچه یون فریک موجود در محلول توسط آنتی‌اکسیدان‌ها به یون فرو احیاء گردد، این کمپلکس سریعاً ایجاد رنگ آبی می‌کند. با اندازه‌گیری شدت این رنگ توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۳ نانومتر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های تام برآورد می‌شود.

۲-٤-۲ سنجش مالون دی‌آلدهید[1] (MDA)

اندازه‌گیری سطح مالون‌دی‌آلدهید به عنوان یک شاخص مناسب جهت بررسی وضعیت اکسیداتیوی مورد استفاده قرار می‌گیرد. محصولات اولیه حاصل از پراکسیداسیون لیپیدها نظیر LOOH ترکیبات ناپایداری هستند که طی چندمرحله‌ای از واکنش‌های شیمیایی به ترکیبات ثانویه دیگری نظیر آلدئیدها و کتون‌ها شکسته می‌شوند. ازآنجاکه MDA در مقایسه با دیگر ترکیبات آلدهیدی پایدارتر است، به عنوان یک ابزار تشخیصی مناسب جهت اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپید به‌کار می‌رود (مانیش و جایالاکشمی، ۲۰۰۶). روش تیوباربیتوریک اسید رایج‌ترین و ساده‌ترین روش مورداستفاده برای اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدهید تحت شرایط دمایی بالا (حدود ۱۰۰ درجه سانتیگراد) و محیط اسیدی می‌باشد. سطح MDA در گروه‌های مورد بررسی با استفاده از روش اسپکتوفتومتری و براساس روش Buege and Aust (1978) اندازه‌گیری شد. معرف MDA شامل تیوباربیتوریک اسید (TBA)، تری کلرواستیک (TCA)، هیدروکلریک اسید (HCL) در آب مقطر می‌باشد.

۲-٤-۳ سنجش آنزیم کاتالاز[2] (CAT)

سنجش آنزیم کاتالاز مطابق با روش *Aebi H (1984)*، با روش اسپکتروفوتومتری با استفاده از سوبسترای پراکسید هیدروژن انجام شد. بافر مورداستفاده در این آزمایش فسفات‌پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار می‌باشد. واکنش با افزودن سوبسترا شروع و تغییرات جذب به مدت ۱ دقیقه در طول موج ۲۴۰ *nm* و دمای ۲۵ درجه اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم در واحد زمان در میلی‌لیتر نمونه طبق فرمول زیر محاسبه شد. برطبق تعریف، یک واحد کاتالاز مقدار آنزیمی است که موجب تجزیه یک میکرومول آب‌اکسیژنه در مدت یک دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد شود.

$$U/g\ Hb = \frac{\Delta OD \times Vt}{\varepsilon \times Vs \times C}$$

Vt = حجم کل واکنش ΔOD = تغییرات ضریب جذب در دقیقه Vs = مقدار نمونه ε = ضریب جذب C= غلظت پروتئین (*mg/ml*) است.

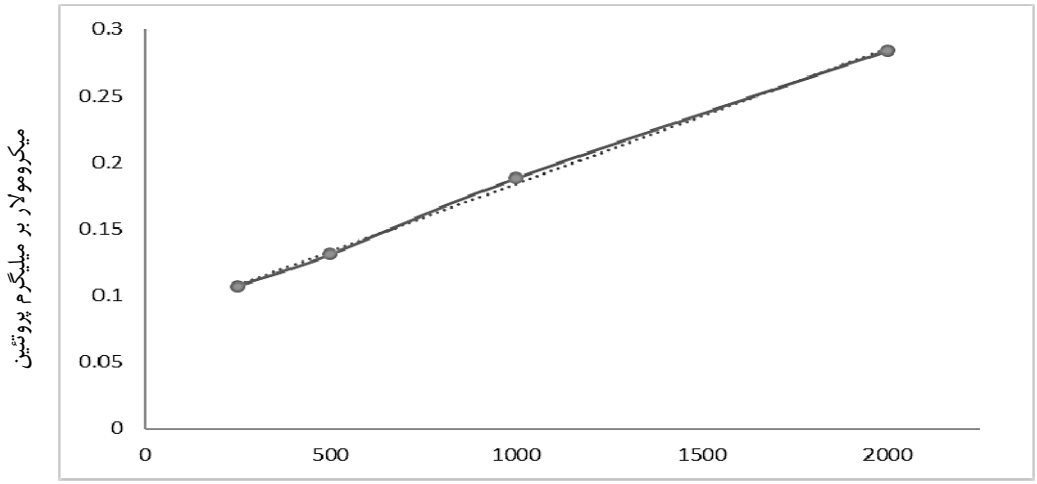
۲-٤-٤ سنجش آنزیم گلوتاتیون S-ترانسفراز[3] (GST)

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوتاتیون S-ترانسفراز با استفاده از روش *William H.Habi et al(1974)* انجام شد. در این روش از بافر فسفات پتاسیم با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار با pH= ۶/۵ استفاده شد. محلول نهایی جهت قرائت جذب در اسپکتروفتومتر حاوی ۲۸۵۰ میلی‌لیتر از بافر فسفات پتاسیم، ۵۰ میکرولیتر نمونه هموژن شده و ۵۰ میکرولیتر *GSH* می‌باشد که بعد از بلانک کردن محلول ۵۰ میکرولیتر *CDNB* به کوت حاوی نمونه‌ها اضافه شد. تغییرات جذب نمونه در ۳۴۰ نانومتر و دمای ۲۵°C به مدت ۳ دقیقه اندازه گیری و سپس تغییرات جذب در دقیقه محاسبه شد. محاسبه فعالیت ویژه آنزیم با استفاده از ضریب جذب مولی ۱-کلرو۲و۴ دی نیتروبنزن در pH=۶/۵ براساس طول موج مورد استفاده که معادل ۹/۶ *mM-1cm-1* است انجام و به صورت *U/ml* بیان شد. میزان فعالیت آنزیم طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$U/ml = \frac{\Delta OD \times Vt}{\varepsilon \times Vs}$$

1. MalonDialdehyde

2. Catalase
3. Glutathione S-transferase



شکل ۳. منحنی استاندارد گلوتاتیون (منحنی استاندارد می‌تواند برای پیش‌بینی غلظت یک نمونه ناشناخته استفاده شود). هنگامی که منحنی استاندارد خطی است، شیب اندازه‌گیری دارای حساسیت بوده و میزان سیگنال برای تعیین غلظت تغییر می‌کند. یک خط بلندتر با شیب بیشتر نشان‌دهنده اندازه‌گیری حساس‌تر است.

۲-٤-۵ سنجش آنزیم میلوپراکسیداز[1] (MPO)

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز در گروه‌های مورد بررسی از روش *Bradley et al (1982)* استفاده شد. میزان فعالیت آنزیم طبق فرمول زیر محاسبه شد. محلول نهایی جهت قرائت جذب در اسپکتروفتومتر حاوی ۲۸۵۰ میلی‌لیتر از بافر فسفات پتاسیم، ۵۰ میکرولیتر نمونه هموژن شده و ۵۰ میکرولیتر *GSH* می‌باشد که بعد از بلانک کردن محلول ۵۰ میکرولیتر *CDNB* به کوت حاوی نمونه‌ها اضافه شد. تغییرات جذب نمونه در ۳۴۰ نانومتر و دمای ۲۵°C به مدت ۳ دقیقه اندازه گیری و سپس تغییرات جذب در دقیقه محاسبه شد. محاسبه فعالیت ویژه آنزیم با استفاده از ضریب جذب مولی ۱-کلرو۲و۴ دی نیتروبنزن در *pH* =۶/۵ براساس طول موج مورد استفاده که معادل *mM-1cm-1* ۹/۶ است انجام و به صورت *U/ml* بیان شد. میزان فعالیت آنزیم طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$U/L = \frac{\Delta OD \times Vt}{\varepsilon \times Vs}$$

۲-٤-٦ سنجش سطح گلوتاتیون[2] (GSH)

برای سنجش میزان گلوتاتیون، از روش *Tietz* استفاده شد. جهت انجام این آزمایش از بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار استفاده شد. محلول استاندارد گلوتاتیون در غلظت‌ها ۱۲/۵ الی ۲۰۰ میکرومولار تهیه شد و برای رسم منحنی استاندارد گلوتاتیون استفاده گردید. غلظت گلوتاتیون برحسب میکرومولار میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

۲-٤-۷ سنجش سوپراکسیددیسموتاز[3] (SOD)

سنجش سوپراکسیددیسموتاز مطابق با روش Sun et al (2007) انجام شد. حجم نهایی مخلوط واکنش ml ۳ است. غلظت نهایی مواد مورد استفاده در واکنش شامل mM ۰/۱ گزانتین، mM ۰/۱ *EDTA*، *mg/L* ۵۰ آلبومین سرم گاوی، *µM* ۲۵ NBT، nM ۹/۹ گزانتین اکسیداز و mM ۴۰ Na2CO3 (pH =۱۰/۲) می‌باشد. در هر لوله *ml* ۲/۴۵ معرف سنجش *SOD* (تهیه شده در فوق) و ml ۰/۵ نمونه کبدی و یا آب به عنوان بلانک و محلول استاندارد *Cu-ZnSOD* با غلظت ng ۲۵ اضافه شد. واکنش با افزودن µl ۵۰ محلول گزانتین اکسیداز به لوله‌های قرار داده شده در حمام آب گرم ۲۵°C شروع شد. پس از ۲۰ دقیقه با افزودن ۱ میلی‌لیتر از محلول *mmol/L CuCl2* ۰/۸ به هر لوله واکنش متوقف و تغییرات جذب فورمازان تشکیل شده در nm ۵۶۰ قرائت و درصد مهار به صورت زیر محاسبه شد:

$$\frac{A_{Blank} - A_{sample}}{A_{Blank}} \times 100\% = \%\ \text{مهار}$$

۲-۵ تجزیه و تحلیل داده‌ها

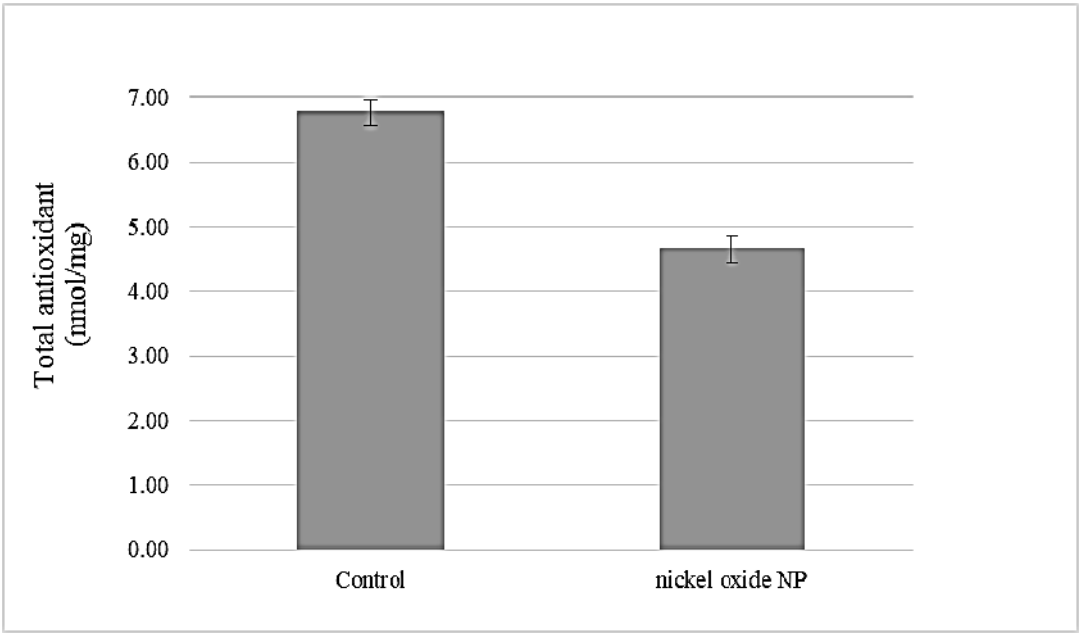
نتایج آزمایشات با استفاده از برنامه SPSS 24 موردتجزیه و تحلیل قرارگرفت. از آزمون ANOVA برای بررسی تفاوت میانگین نتایج کمی بین گروه‌های مربوطه مورد استفاده قرار گرفت. نمودار فعالیت هر آنزیم توسط نرم‌افزار Excel رسم شد. از آزمون تعقیبی توکی برای مقایسه گروه‌های مورد مطالعه استفاده گردید.

1. Myloperoxidase
2. Glutathione
3. Superoxide Dismutase

۳- نتایج

۳-۱ تاثیر نانوذرات اکسید نیکل بر سطح تام آنتی‌اکسیدان

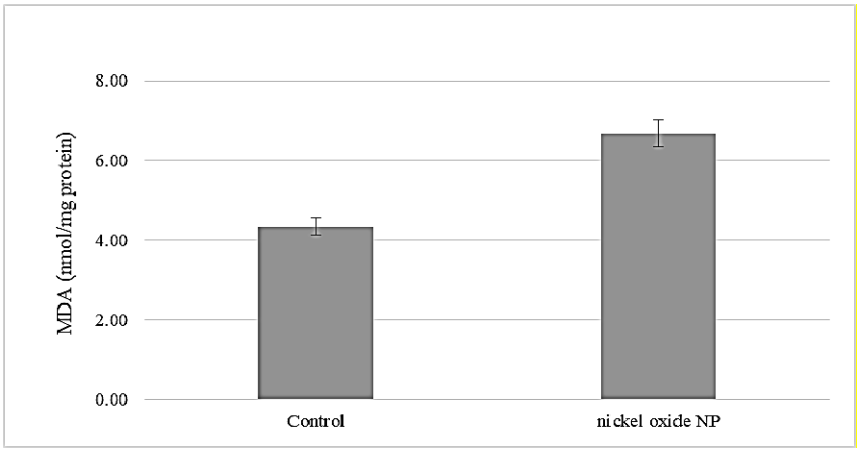
سطح آنتی‌اکسیدان تام در گروه‌های مورد مطالعه با استفاده از روش FRAP اندازه‌گیری گردید و نتایج آن در شکل (۴) نشان داده شد. این مقدار در گروه کنترل ۵/۷۶±۰/۷۱، گروه تیمار شده با نانوذره اکسید نیکل(۳۰ml/kg) ۳/۰±۷۰/۵۹ بود. براساس آزمون ANOVA مشخص شد که تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مورد مطالعه در سطح کمتر از ۰/۰۰۱ وجود دارد. براساس تست تعقیبی توکی مشخص شد که سطح آنتی‌اکسیدان تام در گروه تیمار شده با نانوذره اکسیدنیکل (۳۰ml/kg) کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل دارد ($p<0.05$).



شکل ٤. میانگین سطح آنتی‌اکسیدان تام علامت * نشان‌دهنده معنی‌دار بودن می‌باشد
سطح آنتی‌اکسیدان تام در گروه تیمار شده با نانوذره اکسید نیکل کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل دارد ($p<0.05$)

۳-۲ تأثیر نانوذرات اکسید نیکل بر سطح مالون دی‌آلدهید (MDA)

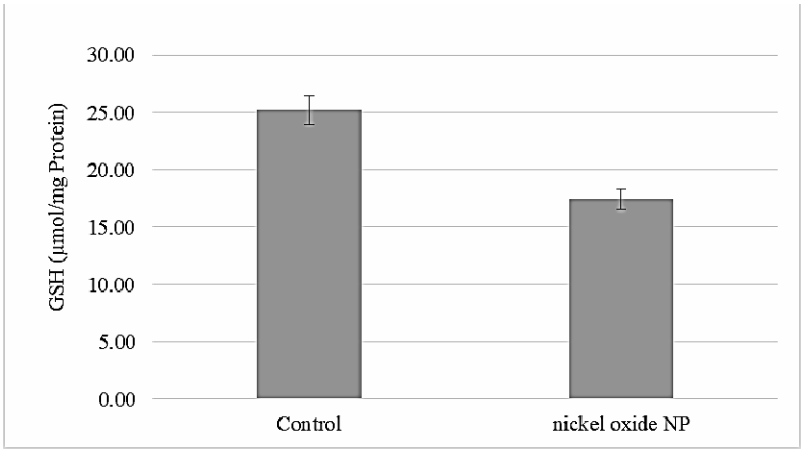
سطح MDA در گروه کنترل ۳/۳۶±۰/۵۹، گروه تیمارشده با نانوذره اکسید نیکل(۳۰ml/kg) ۵/۹۱±۰/۴۰ اندازه‌گیری شد و نتایج آن در شکل(۵) نشان داده شد. براساس آزمون ANOVA مشخص شد که تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل و گروه تیمار شده با نانوذرات اکسید نیکل در سطح کمتر از ۰/۰۰۱ وجود دارد. براساس تست تعقیبی توکی نیز مشخص شد که سطح MDA در گروه تیمار شده با نانوذره اکسید نیکل(۳۰ml/kg) افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل دارد ($p<0.05$).



شکل ۵. سطح مالون دی آلدهید (MDA). علامت * نشان‌دهنده معنی‌دار بودن می‌باشد.
سطح MDA در گروه تیمار شده با نانوذره اکسید نیکل افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل دارد ($p<0.05$)

۳-۳ تأثیر نانوذرات اکسید نیکل بر سطح گلوتاتیون (GSH)

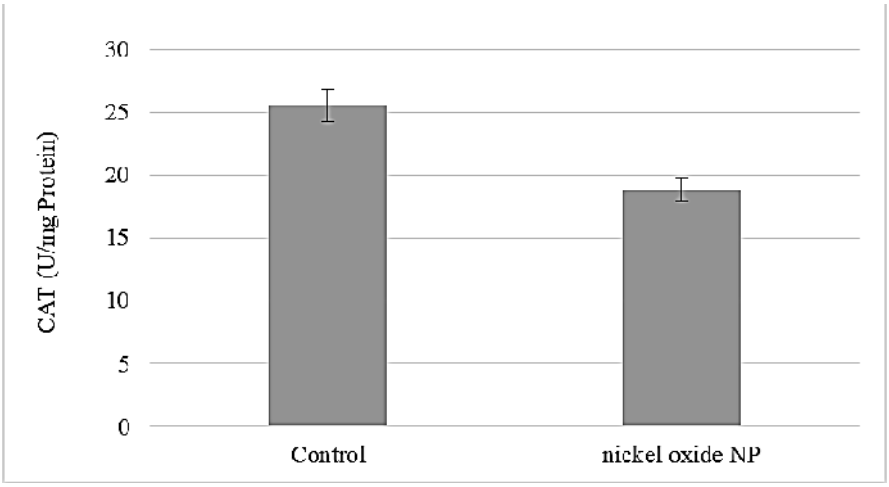
سطح GSH در گروه‌های مورد مطالعه موردبررسی قرار گرفت و نتایج آن در شکل (۶) نشان داده شد. مقدار GSH در گروه کنترل ۱/۳۵±۲۳/۳۸، گروه تیمار شده با نانوذره اکسید نیکل (۳۰ml/kg) ۱/۱۵±۱۵/۴۵بود. براساس آزمون ANOVA مشخص شد که تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مورد مطالعه در سطح کمتر از ۰/۰۰۱ وجود دارد. براساس تست تعقیبی توکی مشخص شد که سطح GSH در گروه تیمار شده با نانوذره اکسید نیکل (۳۰ml/kg) کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل دارد ($p<0.05$).



شکل ٦. سطح گلوتاتیون (GSH) (علامت * نشان‌دهنده معنی‌دار بودن می‌باشد)
سطح GSH در گروه تیمار شده با نانوذره اکسید نیکل کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل دارد ($p<0.05$).

۴-۳ تأثیر نانو ذرات اکسید نیکل بر فعالیت کاتالاز (CAT)

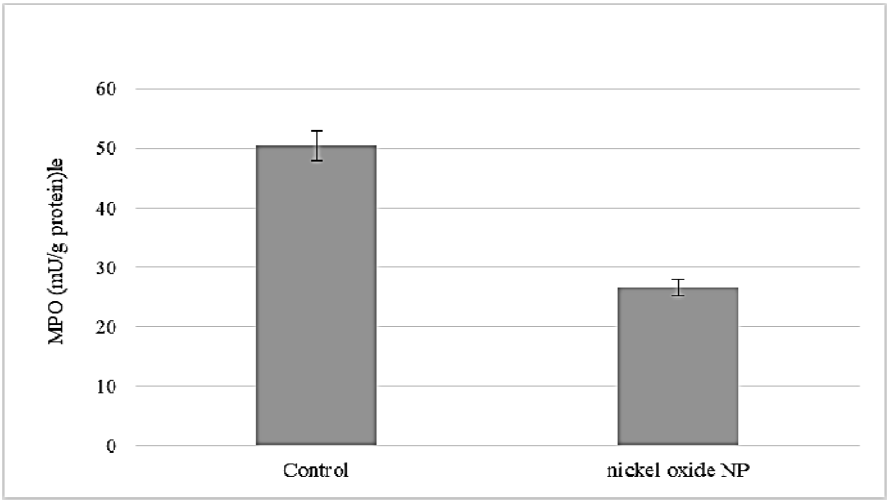
فعالیت کاتالاز در گروه‌های کنترل و گروه تیمار شده با نانوذرات اکسید نیکل اندازه‌گیری شد و نتایج آن در شکل (۷) نشان داده شد. این مقدار در گروه کنترل ۱/۸۰±۲۳/۰۳، گروه تیمار شده با نانوذره اکسید نیکل(۳۰ml/kg) ۱/۴۲±۱۶/۲۲بود. براساس آزمون ANOVA مشخص شد که تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مورد مطالعه در سطح کمتر از ۰/۰۰۱ وجود دارد. براساس تست تعقیبی توکی مشخص شد که فعالیت کاتالاز در گروه تیمار شده با نانوذره اکسید نیکل(۳۰ml/kg) کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل دارد ($p<0.05$).



شکل ۷. سطح آنزیم کاتالاز (CAT) (علامت * نشان‌دهنده معنی‌دار بودن می‌باشد)
فعالیت کاتالاز در گروه تیمار شده با نانوذره اکسید نیکل کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل دارد ($p<0.05$).

۳-۵ تأثیر نانو ذرات اکسید نیکل بر فعالیت میلوپراکسیداز (MPO)

فعالیت میلوپراکسیداز در تیمار شاهد و تیمار نانوذره اکسیدنیکل اندازه‌گیری شد و نتایج آن در شکل (۸) نشان داده شد. این مقدار در گروه کنترل ۳/۲۳±۴۶/۸۷، گروه تیمار شده با نانوذره اکسیدنیکل (۳۰ml/kg) ۲/۷۵±۲۲/۷۱بود. براساس آزمون ANOVA مشخص شد که تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مورد مطالعه در سطح کمتر از ۰/۰۰۱ وجود دارد. براساس تست تعقیبی توکی نیز فعالیت میلوپراکسیداز در گروه تیمار شده با نانوذره اکسید نیکل (۳۰ml/kg) کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل نشان داد ($p<0.05$).

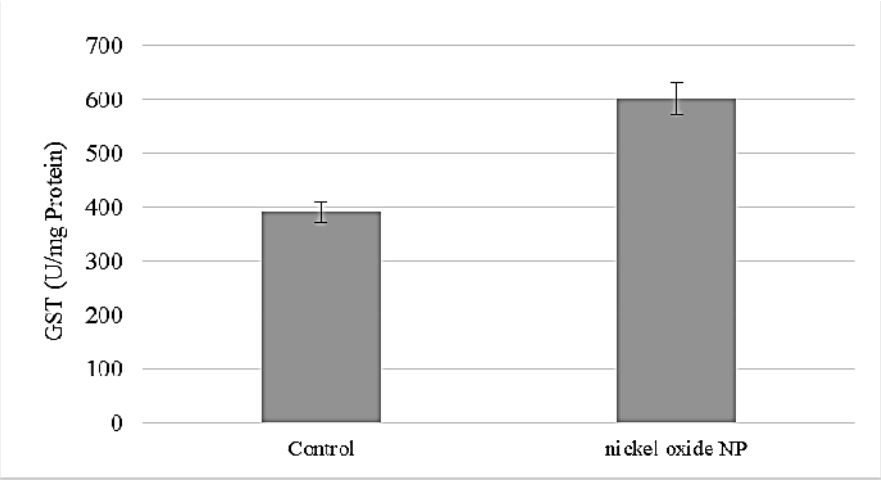


شکل ۸. سطح میلوپراکسیداز (MPO) (علامت * نشان‌دهنده معنی‌دار بودن می‌باشد)
فعالیت میلوپراکسیداز در گروه تیمار شده با نانوذره اکسید نیکل کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل نشان داد ($p<0.05$).

۳-۶ تأثیر نانوذرات اکسید نیکل بر فعالیت گلوتاتیون سوپرترانسفراز (GST)

فعالیت GST در گروه‌های کنترل و تیمار نانوذره نیکل اندازه‌گیری شد و نتایج آن در شکل(۹) نشان داده شد. مقدار GST در گروه کنترل ۳۰/۸۰±۳۲۹/۶۳، گروه تیمارشده با نانوذره اکسیدنیکل (۳۰ml/kg) ۳۱/۹۵±۵۶۱/۳۰، بود. بر اساس آزمون ANOVA مشخص شد که تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مورد مطالعه در سطح کمتر از ۰/۰۰۱ وجود دارد. بر اساس تست

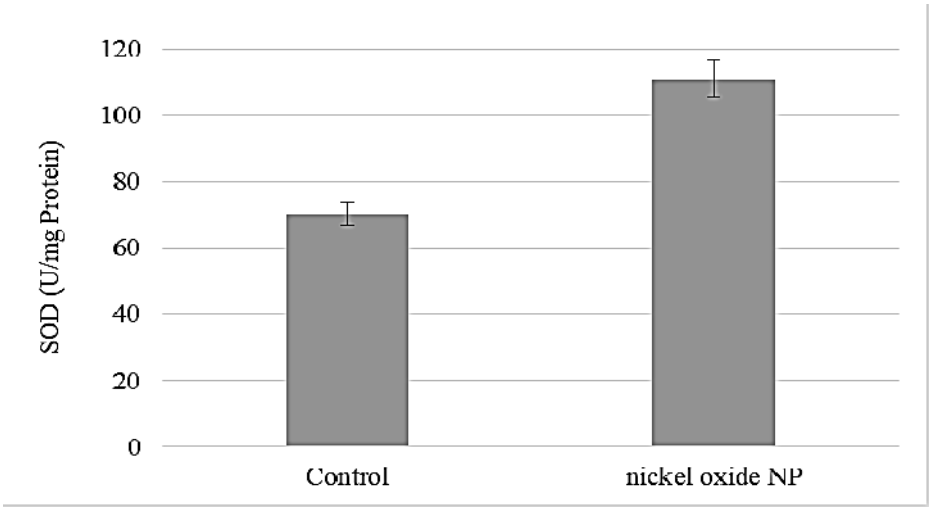
تعقیبی توکی مشخص شد که سطح GST در گروه تیمار شده با نانوذره اکسید نیکل (۳۰ml/kg) افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل دارد ($p<0.05$).



شکل ۹. سطح گلوتاتیون سوپرترانسفراز (GST) (علامت * نشان‌دهنده معنی‌دار بودن می‌باشد
سطح GST در گروه تیمار شده با نانوذره اکسید نیکل افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل دارد ($p<0.05$).

۳-۷ تأثیر نانوذرات اکسید نیکل بر فعالیت سوپراکسیددیسموتاز (SOD)

فعالیت SOD در گروه‌های مورد مطالعه اندازه‌گیری شد و نتایج آن در شکل (۱۰) نشان داده شد. مقدار SOD در گروه کنترل ۳/۲۷±۶۵/۸۱، گروه تیمار شده با نانوذره اکسیدنیکل(۳۰ml/kg) ۸/۱۸±۱۰۰/۳۸ بود. براساس آزمون ANOVA مشخص شد که تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مورد مطالعه در سطح کمتر از ۰/۰۰۱ وجود دارد. براساس تست تعقیبی توکی مشخص شد که فعالیت SOD در گروه تیمار شده با نانوذره اکسید نیکل (۳۰ml/kg) افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل نشان داد ($p<0.05$).



شکل ۱۰. سطح سوپراکسیددیسموتاز (SOD) (علامت * نشان‌دهنده معنی‌دار بودن می‌باشد)
فعالیت SOD در گروه تیمار شده با نانوذره اکسید نیکل افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل نشان داد ($p<0.05$).

٤- بحث و نتیجه‌گیری

فلزات عامل مهمی از استرس اکسیداتیو موجودات آبزی هستند و از طریق دو مکانیسم تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر را تحریک می‌کنند. فلزات فعال ردوکس از طریق چرخه‌های احیایی باعث تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر می‌شوند، درحالی‌که فلزات فاقد پتانسیل احیایی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی را مختل می‌کنند. فلزات فاقد پتانسیل احیایی مانند جیوه، نیکل، سرب و کادمیوم، باعث ایجاد اختلال در دفاع آنتی‌اکسیدانی، به ویژه آن دسته از آنتی‌اکسیدان‌ها و آنزیم‌هایی می‌شوند که حاوی تیول هستند(سوسیکووا و همکاران، ۲۰۱۱). ویژگی فلزات، حلالیت و ترکیب آنها از عوامل مهمی هستند که در سمیت فلزات در محیط آبی تأثیر می‌گذارند. مقدار فلز حل‌شده به شدت به pH آب بستگی دارد. برهمکنش فلزات می‌تواند اثرات سمی آنها روی موجودات آبزی را هم در جهت مثبت و هم منفی تغییر دهد(جیزرسکا و ویتسکا، ۲۰۰۱). مدل‌های مختلف قرار گرفتن در معرض فلزات نیز در سمیت فلزها نقش دارند. ماهیان فلزات را از طریق آبشش‌ها، دستگاه گوارش و سطح بدن جذب می‌کنند(کامونده و همکاران، ۲۰۰۲). استرس اکسیداتیو جنبه غیرقابل اجتناب از زندگی هوازی است. این وضعیت نتیجه عدم تعادل بین تولید گونه‌های فعال اکسیژن و دفاع آنتی‌اکسیدانی در موجودات زنده است. گونه‌های فعال اکسیژن توسط موادی مانند یون‌های فلزات واسطه، سموم دفع آفات و آلاینده‌های نفتی القا می‌شوند(لوش‌چاک، ۲۰۱۱). رادیکال‌های آزاد همچنین در طی سوخت و ساز طبیعی سلول توسط منابع درون سلولی تولید می‌شوند. تنفس میتوکندریایی منبع اصلی درون‌زا ROS است. تولید زیاد ROS می‌تواند باعث اکسیداسیون پروتئین‌ها و لیپیدها، تغییر در بیان ژن و تغییر در وضعیت احیایی سلول شود. مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی موجود در ماهی شامل سیستم آنزیمی و آنتی‌اکسیدان‌های با وزن مولکولی کم است که مشابه با پستانداران است، اگرچه ایزوفرم‌های خاص آنزیم‌ها در گونه‌های مختلف ماهی به خوبی مشخص نشده‌اند(جیالیو و میبر، ۲۰۰۸). سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPO) و گلوتاتیون-ترانسفراز (GST) آنزیم‌های اصلی آنتی‌اکسیدان و شاخص‌های مهم استرس اکسیداتیو هستند. گلوتاتیون احیاء (GSH) و گلوتاتیون اکسید شده (GSSG) نقش کلیدی در دفاع آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی ایفا می‌کنند. در شرایط عادی، آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی مانند SOD، CAT و GPO سلول‌ها را از آسیب اکسیداتیو حاصل از تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن محافظت می‌کنند. تعادل بین اکسیدان و آنتی‌اکسیدان برای عملکرد سلول‌های ایمنی اساسی است زیرا باعث حفظ تمامیت و عملکرد غشای سلولی، پروتئین‌های سلولی و اسیدهای نوکلئیک می شود. مکانیسم سمیت نانوذرات همچنان ناشناخته است. با این‌حال، سمیت آنها می‌تواند به ترکیب شیمیایی، ساختار شیمیایی، اندازه ذرات و مساحت نانوذرات مرتبط باشد. سمیت نانوذرات ممکن است به دو فاکتور متفاوت نسبت داده شود: (۱) سمیت شیمیایی مبتنی بر ترکیب شیمیایی، به عنوان مثال آزادسازی یون‌های (سمی) و (۲) استرس یا محرک های ناشی از ویژگی سطحی نانوذره، اندازه و یا شکل نانوذرات. مطالعات نشان داده است که حلالیت نانوذرات اکسید بر پاسخ کشت سلولی بسیار تاثیرگذار است (برانر و همکاران، ۲۰۰۶).در این مطالعه سطح آنتی‌اکسیدان تام و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مختلف در بافت کبدی ماهی‌های تیمارشده با نانوذره اکسیدنیکل (۳۰میلی‌گرم) و همچنین نقش محافظتی نانوذره کورکومین موردبررسی قرار گرفت. اثرات کورکومین دربرابر سمیت کبدی ناشی از سموم محیطی یا شغلی مورد تأیید می‌باشد که به ویژگی آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضدکلستاتیک، ضدفیبروژنیک و ضدسرطان‌زایی ذاتی آن نسبت داده شده‌است. بنابراین، کورکومین با سرکوب التهاب کبدی، کاهش استرس اکسیداتیو کبدی و افزایش بیان آنزیم‌های سیمیت‌زدای گزنوبیوتیک‌ها، از کبد دربرابر آسیب و فیبروژنز محافظت می‌کند.

ازآنجایی‌که در مطالعه حاضر نانوذره اکسید نیکل از طریق جیره غذایی در اختیار ماهی قرار گرفته است، این‌طور به نظر می‌رسد که آلاینده مذکور از روده جذب‌شده و از طریق جریان خون به اندام‌های مختلف بدن و همچنین کبد رسیده است. حضور این ترکیبات در سلول‌ها می‌تواند موجب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و سرانجام تخریب سلولی و از دست رفتن کارکرد طبیعی بافت یا اندام موردنظر شود. کبد یک اندام مهم در سم‌زدایی ترکیبات وارد شده به بدن می‌باشد، از این‌رو کبد یک بافت مستعد آسیب اکسیداتیو القا شده از فلزات موجود در محیط‌های آبی می‌باشد. زمانی که سطح گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن از سطح آنتی‌اکسیدانی بدن بیشتر شود تعادل سیستم اکسیدانی/ آنتی‌اکسیدانی به نفع اکسیدان منحرف می‌شود که نتیجه آن وقوع آسیب‌های اکسیداتیو به بافت‌ها و در نهایت ماکرومولکول‌ها خواهد شد. گلوتاتیون با برهم‌کنش مستقیم گروه تیول (SH) خود با ROS می‌تواند به عنوان یک آنتی‌اکسیدان غیرآنزیمی عمل کند، یا می‌تواند در واکنش سم‌زدایی آنزیمی

برای گونه‌های اکسیژن فعال به عنوان یک کوفاکتور یا کوآنزیم عمل کند زیرا این یک تری‌پپتید حاوی سیستئین است که SH واکنش‌پذیر با توانایی احیایی دارد. بنابراین گلوتاتیون می‌تواند به عنوان یکی دیگر از مارکرهای استرس اکسیداتیو در نظر گرفته شود. بر این اساس، نتایج نیز نشان داد که بافت کبد در ماهیان تیمار شده با نانوذره اکسید نیکل(۳۰میلی‌گرم) کاهش معنی‌داری در سطح گلوتاتیون داشتند. این کاهش معنی‌دار در سطح گلوتاتیون می‌تواند به دلیل توانایی نانوذره اکسیدنیکل در اتصال با گروه تیول موجود در گلوتاتیون و افزایش تولید ROS توسط این نانوذره باشد (داس و همکاران، ۲۰۰۸). سوپراکسیددیسموتاز (SOD) آنزیم مرتبط با اکسی‌رادیکال‌ها است و مسئول دیسموته‌کردن رادیکال سوپراکسید به O_2 و H_2O_2 می‌باشد. این آنزیم به استرس ناشی از آلاینده‌ها بسیار حساس است و می‌تواند به‌عنوان سیگنال استرس اکسیداتیو برای هشدار زودهنگام آلودگی محیط‌زیست مورد استفاده قرار گیرد (جیانوپلیتیس و ریس، ۱۹۷۷). ازآنجایی‌که نانوذره اکسیدنیکل سبب تولید ROS در کبد می‌شود لذا تغییر در فعالیت SOD می‌تواند حاکی از استرس اکسیداتیو و آسیب بافتی باشد. کاتالاز و پراکسیداز آنزیم‌های کلیدی در سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی برای تبدیل رادیکال‌های آزاد H_2O_2 به آب و اکسیژن هستند. سیستم کاتالاز، پراکسیداز و SOD اولین دفاع دربرابر سمیت اکسیداتیو را در سطح سلولی فراهم می‌کنند. بسیاری از مطالعات تأیید کردند که سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی می‌تواند به میزان قابل توجهی تحت فشار خاصی از استرس در زمان معین ایجاد شود. بنابراین با افزایش زمان قرار گرفتن در معرض نانوذره اکسید نیکل (۳۰میلی‌گرم) تاثیرات مخرب بیشتری رخ خواهد داد. همچنین با مقایسه تیمارهای کنترل و تیمار نانوذره اکسید نیکل (۳۰میلی‌گرم) می‌توان چنین نتیجه گرفت که رویارویی بلندمدت با نانوذره اکسید نیکل موجب تشدید آسیب‌های اکسیداتیو وارد شده به بافت کبد ماهیان گردیده است. نتایج تحقیقات حاکی از آن است که نانوذره اکسیدهای فلزی در محیط‌های آبی با غلظت‌های بالا و افزایش مدت‌زمان رویارویی با این نانوذره، باعث افزایش استرس اکسیداتیو و اثرات نامناسبی بر آنزیم‌های کبدی داشته و این پارامترها را دچار تغییرات شدید می‌نماید(کاظمیان و بخشی، ۲۰۲۰). در این تحقیق سمیت نانوذره اکسید نیکل (۳۰ میلی‌گرم) و تاثیر آن بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ماهی (*Carassius auratus*) موردبررسی قرار گرفت. نتایج اولیه حاکی از آن است که نانوذره اکسید نیکل می‌تواند استرس اکسیداتیو ایجاد کند و منجر به کاهش شدید در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گردد. بنابراین پایش شاخص‌های زیستی مانند آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و سطح مالون‌دی‌آلدهید می‌تواند به‌عنوان شاخص مناسب برای سنجش استرس اکسیداتیو وارد شده باشد (محمدی و همکاران، ۲۰۱۸). در نتیجه استفاده از نانوذرات محافظتی در برابر سمیت ناشی از نانوذره نیکل در رژیم غذایی می‌تواند تأثیر مثبت در تقویت سطح آنتی‌اکسیدنی ماهی و مقابله با استرس اکسیداتیو داشته باشد.

References

Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, *105*, 121-126.

Aghamirkarimi, S., Mashinchian Moradi, A., Sharifpour, I., Jamili, S., & Ghavam Mostafavi, P. (2018). Effect of copper nanoparticles in the Caspian Roach (Rutillus rutillus caspicus), *changing antioxidant activities and liver histopathology*.

Anoosha, F., Seyedalipour, B., & Hoseini, S. (2020). Toxicity of Nickel Nanoparticles and Nickel Chloride on Activity of Antioxidant Enzymes and Level of Lipid Peroxidation in Liver and Serum of Rats. *ISMJ*, *23*(1), 14-26.

Baek, Y. W., & An, Y. J. (2011). Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb2O3) to Escherichia coli, Bacillus subtilis, and Streptococcus aureus. *Science of the total environment*, *409*(8), 1603-1608.

Bita, S., Mesbah, M., Shahryari, A., & Najafabadi, M. G. (2017). Effects of silver nanoparticles synthesized by bioreduction method on gill antioxidant defense system response of common carp, Cyprinus carpio. *Iranian Journal of Health and Environment*, *10*(3), 339-348.

Blewett, T. A., & Wood, C. M. (2015). Salinity-dependent nickel accumulation and oxidative stress responses in the euryhaline killifish (Fundulus heteroclitus). *Archives of environmental contamination and toxicology*, *68*(2), 382-394.

Bradley, P. P., Priebat, D. A., Christensen, R. D., & Rothstein, G. (1982). Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *Journal of Investigative Dermatology*, *78*(3), 206-209.

Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. In *Methods in enzymology* (Vol. 52, pp. 302-310). Academic press.

Choi, J. E., Kim, S., Ahn, J. H., Youn, P., Kang, J. S., Park, K. & Ryu, D. Y. (2010). Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. *Aquatic Toxicology*, *100*(2), 151-159.

Chowdhury, M. J., Bucking, C., & Wood, C. M. (2008). Pre-exposure to waterborne nickel downregulates gastrointestinal nickel uptake in rainbow trout: indirect evidence for nickel essentiality. *Environmental science & technology*, *42*(4), 1359-1364.

Das, K. K., Das, S. N., & Dhundasi, S. A. (2008). Nickel, its adverse health effects & oxidative stress.*Indian journal of medical research*, *128*(4), 412.

Di Giulio RT, Meyer JN. (2008)Reactive oxygen species and oxidative stress. The toxicology of fishes: 273-324.

Doreswamy, K., Shrilatha, B., & Rajeshkumar, T. (2004). Nickel-induced oxidative stress in testis of mice: evidence of DNA damage and genotoxic effects. *Journal of andrology*, *25*(6), 996-1003.

Fathi, M., Mansouri, B., Azadi, N., Davari, B., & Maleki, A. (2017). Effect of silver nanoparticles and mercury on stress index of laboratoryfish.

Giannopolitis, C. N., & Ries, S. K. (1977). Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant physiology*, *59*(2), 309-314.

Govindasamy, R., & Rahuman, A. A. (2012). Histopathological studies and oxidative stress of synthesized silver nanoparticles in Mozambique tilapia (Oreochromis mossambicus). *Journal of Environmental Sciences*, *24*(6), 1091-1098.

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.

Jezierska B, Witeska M. (2001) Summary of metal-induced disturbances in fish organism. Metal Toxicity to Fish Wydawnictvo Akademii Podlaskej, Siedlce. 243-214.

Joly-Pottuz, L., Vacher, B., Le Mogne, T., Martin, J. M., Mieno, T., He, C. N., & Zhao, N. Q. (2008). The role of nickel in Ni-containing nanotubes and onions as lubricant additives. *Tribology Letters*, *29*(3), 213-219.

Karimzadeh, K., Zahmatkesh, A., & Sharifi, E. (2018). Effect of Subacute Toxicity Nano Zinc Oxide (ZnO NPs) on Oxidative Stress Enzymes of Roach (Rutilus rutilus caspicus).

Kazemian, M., & Bakhshi, M. (2019). Performance of different levels of ZnO nanoparticles on the amount of antioxidant enzymes in the liver of Koi fish (Cyprinus carpio). *Journal of Animal Environment*, *11*(4), 243-248.

Kubrak, O. I., Husak, V. V., Rovenko, B. M., Poigner, H., Kriews, M., Abele, D., & Lushchak, V. I. (2013). Antioxidant system efficiently protects goldfish gills from Ni2+-induced oxidative stress. *Chemosphere*, *90*(3), 971-976.

Kubrak, O. I., Rovenko, B. M., Husak, V. V., Storey, J. M., Storey, K. B., & Lushchak, V. I. (2012). Nickel induces hyperglycemia and glycogenolysis and affects the antioxidant system in liver and white muscle of goldfish Carassius auratus L. *Ecotoxicology and environmental safety*, *80*, 231-237.

Lopes, P. A., Pinheiro, T., Santos, M. C., da Luz Mathias, M., Collares-Pereira, M. J., & Viegas-Crespo, A. M. (2001). Response of antioxidant enzymes in freshwater fish populations (Leuciscus alburnoides complex) to inorganic pollutants exposure. *Science of the total environment*, *280*(1-3), 153-163.

Lushchak VI. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. Aquatic Toxicology, 101(1): 13-30.

Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic toxicology*, *101*(1), 13-30.

Matés, J. M., Pérez-Gómez, C., & De Castro, I. N. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical biochemistry*, *32*(8), 595-603.

Mohammadi, M., sattari, M., Babakhani, A., Johari, S., Ghafoori, H. (2018). Effects of iron oxide nanoparticles on the antioxidant defense system and lipid peroxidation of liver in common carp (Cyprinus carpio). *Journal of Animal Environment*, 10(4), 325-330.

Saini, S., Nair, N., & Saini, M. R. (2013). Embryotoxic and teratogenic effects of nickel in Swiss albino mice during organogenetic period. *BioMed research international*, *2013*.

Sevcikova M, Modrá H, Slaninova A ,Svobodova Z. (2011) Metals as a cause of oxidative stress in fish: A review. Veterinarni Medicina, 56(537-546).

Sun, Y. P., Li, X. Q., Zhang, W. X., & Wang, H. P. (2007). A method for the preparation of stable dispersion of zero-valent iron nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *308*(1-3), 60-66.

Wells, M. L., Smith, G. J., & Bruland, K. W. (2000). The distribution of colloidal and particulate bioactive metals in Narragansett Bay, RI. *Marine Chemistry*, *71*(1-2), 143-163.