DOI: 10.22092/VJ.2018.109111.1255
شماره ۱۱۹ تابستان ۱۳۹۷
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

مطالعه تغییرات آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و سطح پراکسیداسیون لیپیدی ماهی کپور معمولی در مواجهه با نانوذرات نقره سنتز شده از جلبک سارگاسوم

• سراج بیتا (نویسنده مسئول)
گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران
• مهرزاد مصباح
گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
• علی شهریاری
گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
• مسعود قربانپور نجف‌آبادی
گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
تاریخ دریافت: ۰۳-۱۱-۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: 1396-12-07
Email: serajbita@yahoo.com

چکیده

با توسعه سریع در صنعت نانوفناوری، درک امنیت نانوذرات سنتزشده و فاکتورهای مرتبط با خطرات آن‌ها ضروری است. یک حوزه مدیریتی در ارزیابی خطرات احتمالی نانوذرات بر محیط زیست آبزیان، بررسی اثرات آن بر سلامت آبزیان است. در مطالعه حاضر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و سطح پراکسیداسیون لیپیدی ماهی کپور معمولی طی مواجهه با نانوذرات نقره سنتز شده از جلبک سارگاسوم *Sargassum angustifolium* بررسی شد. بدین منظور پس از تعیین غلظت LC_{50} نانوذرات نقره در مدت ۹۶ ساعت، ماهیان در ۴ تیمار شامل ۳ تیمار آزمایشی (۱ درصد، ۱۰ درصد و ۵۰ درصد میزان LC_{50}) و یک تیمار شاهد به مدت ۱۴ روز مواجهه مورد آزمایش قرار گرفتند. نمونه‌برداری از ماهیان در فواصل زمانی ۱، ۳، ۷ و ۱۴ روز پس از آغاز آزمایش بود. در هر بار نمونه‌برداری بعد از جداسازی و هموژنه کردن بافت کبد، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، و همچنین غلظت گلوتاتیون، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و مالون دی‌آلدئید توسط روش‌های بیوشیمیایی تعیین شد. نتایج نشان داد که فعالیت کاتالاز در بالاترین غلظت نانوذرات نقره به‌طور چشم‌گیری کاهش یافت، اما فعالیت گلوتاتیون و سوپراکسید دیسموتاز افزایش داشت. بین میانگین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در تیمارهای مختلف با تیمار شاهد و همچنین در روزهای مختلف نمونه‌برداری در هر تیمار، از نظر آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد($p > ۰/۰۵$). میزان مالون دی‌آلدئید در بافت کبد فقط در تیمار LC_{50} ۱۰ درصد با تیمار شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد ($p < ۰/۰۵$). نتایج نشان داد که قرارگیری کپور معمولی در معرض LC_{50} ۱۰ درصد نانوذرات نقره اثرات شدیدتری نسبت به سایر غلظت‌ها بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و پراکسیداسیون لیپیدی بافت کبد داشته و سبب بروز استرس اکسیداتیو شده است.

کلمات کلیدی: نانوذرات نقره، جلبک سارگاسوم، استرس اکسیداتیو، کپور معمولی

● Veterinary Researches & Biological Products No No 119 pp: 150-160

Study of antioxidant enzymes and lipid peroxidation changes in common carp exposued to silver nanoparticles synthesized using Sargassum seaweed

By: Bita, S., (Corresponding Author) Department of Fisheries, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran. Mesbah, M., Department of Clinical sciences, Faculty of Veterinary, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. Shahryari, A., Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. and Najafabadi, M.GH., Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

Email: serajbita@yahoo.com

Received: 2017-01-22 **Accepted: February 2015**

In this study the activity of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in common carp during exposure to silver nanoparticles synthesized using *Sargassum angustifolium* were investigated. In order to this purpose, after determining the LC50 of silver nanoparticles during 96 h in common carp, fish were exposed to silver nanoparticles concentrations of %0LC50 (control), %1LC50, %10LC50 and 50%LC50 for 14 days. Fish were sampled at 1, 3, 7 and 14 days after exposure. At each sampling liver tissue were isolated and homogenized and then, the activity of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH), total antioxidant capacity (TAC) and malondialdehyde (MDA) were determined by biochemical methods. The results showed that levels of catalase activity in exposure to high concentrations of silver nanoparticles significantly decreased, but the activity of glutathione and superoxide dismutase increased. According to the The two-way ANOVA and Tukey test, there were no statistically significant differences between the average level of total antioxidant capacity both in liver and gill tissue of different treatments to control and also different days of sampling in each treatment ($p>0.05$). Malondialdehyde in liver tissue showed a significant increase in 10% LC50 treatment compare with control group ($p<0.05$).

Key words: Silver nanoparticles, Sargassum seaweed, Oxidative stress, Common carp

مقدمه

نانوذرات نقره به‌عنوان یکی از مهم‌ترین نانومواد سنتز شده در بین تمامی نانوذرات فلزی هستند. در حال حاضر نگرانی‌های زیادی در رابطه با اثرات مضر آن بر محیط زیست و سلامت موجودات وجود دارد (۲۷). برای سنتز انواع مختلف نانوذرات روش‌های فیزیکی، شیمیایی، زیستی و ترکیبی زیادی وجود دارد. در روش شیمیایی سنتز نانوذرات، استفاده از ترکیبات شیمیایی سمی در این روش‌ها سبب شده تا استفاده از آنها در زیست پزشکی به‌ویژه در زمینه‌های کلینیکی، کشاورزی، دامپزشکی و شیلات به دلیل ناسازگاری و آلودگی محیط زیست و اثرات منفی آن‌ها بر روی اکوسیستم‌های آبی با محدودیت مواجه شود (۲۸). بنابراین توسعه روش‌های غیرسمی، قابل اطمینان و سازگار با محیط زیست برای سنتز نانوذرات می‌تواند نقش بسیار مهمی برای توسعه کاربرد آن‌ها در زمینه‌های زیست‌پزشکی، کشاورزی، دامپزشکی و شیلات را داشته باشد. یکی از گزینه‌ها برای رسیدن به این هدف استفاده از میکروارگانیسم‌ها در سنتز نانوذرات می‌باشد (۲۸). در سنتز زیستی نانوذرات نقره با استفاده از جلبک‌های دریایی، معمولا میکروارگانیسم مورد نظر در مجاورت محلول یون نقره قرار داده می‌شود و در اثر احیاء درون سلولی یا خارج سلولی یون‌های فلزی، نانوذرات نقره در زیر سطح دیواره سلولی یا خارج از آن تشکیل می‌گردد (۲۸). کبد ماهی به‌عنوان بزرگ‌ترین اندام درونی ماهی یکی از مکان‌های مهم و اندام‌های هدف در تجمع نانوذرات فلزی می‌باشد (۲۵). مواجهه و تجمع نانوذرات فلزی در ماهی می‌تواند تولید اکسیژن واکنش گونه‌ای همانند رادیکال‌های آنیون سوپراکسیداز، پراکسیدهیدروژن، رادیکال هیدروکسیل، هیدروپراکسید لیپید، رادیکال آلکواکسیل و اکسیژن یگانه یا منفرد را تحریک کند. این رادیکال‌های آزاد با ماکرومولکول‌های زیستی حساس، واکنش داده و منجر به پراکسیداسیون لیپیدی و تغییر در سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی می‌شوند (۱۹). استرس اکسیداتیو و تغییر در سیستم‌های اکسیدانی و آنتی‌اکسیدانی آبزیان و سایر موجودات زنده یکی از فاکتورهای مهم در سمیت ایجاد شده توسط نانوذرات نقره می‌باشد (۲۲). مطالعات متعددی در زمینه تاثیر نانوذرات فلزی بر وضعیت اکسیدان/آنتی‌اکسیدان ماهیان توسط Choi و همکاران (۸) بر روی القاء استرس اکسیداتیو با نانوذرات نقره در ماهی زبرا، Hao و همکاران (۱۳) در زمینه اثرات تحت کشنده نانوذرات تیتانیوم بر

استرس اکسیداتیو ماهی کپور معمولی، Katuli و همکاران (۱۶) بررسی اثرات نانوذرات نقره بر پاسخ استرس اکسیداتیو ماهی زبرا، Linhua و Lei (۲۰) در زمینه پاسخ استرس اکسیداتیو بافت‌های مختلف ماهی کپور معمولی در مواجهه با نانوذرات روی و Xiong و همکاران (۲۹) مطالعه اثرات نانوذرات تیتانیوم و نقره بر سمیت و استرس اکسیداتیو ماهی زبرا انجام شده است. مطالعه اثرات تحت کشنده نانوذره نقره سنتز شده از جلبک دریایی سارگاسوم که برای سنتز آن از ترکیبات طبیعی و سازگار با محیط زیست از جمله عصاره جلبک استفاده شده است می‌تواند دخالت این مواد در تغییرات سطوح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و پراکسیداسیون لیپیدی در ماهی را تا حدودی مشخص نماید. بنابراین مطالعه حاضر با هدف سنجش وضعیت اکسیدان/آنتی‌اکسیدان و بررسی تغییرات آنزیم‌های دخیل در مکانیسم دفاعی آنتی‌اکسیدانی بافت کبد ماهی کپور معمولی طی مواجهه با غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره سنتز شده از جلبک سارگاسوم انجام شد.

مواد و روش کار

این مطالعه بر روی ماهیان کپور معمولی با میانگین وزنی ۱۶/۴۵± ۷۸/۹۹ گرم خریداری شده از مزارع پرورشی شوشتر انجام شد. نانوذرات نقره مورد استفاده در این تحقیق با استفاده از روش زیستی از جلبک سارگاسوم *Sargassum angustifolium* توسط بیتا و همکاران (۷) تولید شده بود که متوسط ۵۰ درصد غلظت کشندگی (LC_{50}) این نانوذرات در طی ۹۶ ساعت برای ماهی کپور معمولی ۱۱/۳۴ mg/L تعیین شده است (۶). پس از انتقال ماهیان به آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، در ابتدا به منظور سازش‌پذیری، ماهیان به مدت دو هفته در آکواریوم‌های تمیز و کاملا ضدعفونی شده با حجم ۱۵۰ لیتر آب همراه با هوادهی ملایم نگهداری شدند. در دوره سازش‌پذیری تغذیه ماهیان دو بار در روز و به میزان دو درصد وزن بدن انجام شد. پس از پایان دوره سازش‌پذیری، ماهیان به صورت کاملا تصادفی در چهار تیمار (شامل سه تیمار آزمایشی و یک تیمار شاهد) و هر کدام با سه تکرار در آکواریوم‌های ۱۰۰ لیتری به تعداد ۲۵ قطعه ماهی در هر آکواریوم با غلظت‌های ۱ LC_{50} درصد (۰/۱۱ mg/L AgNP): تیمار یک، ۱۰ LC_{50} درصد (۱/۱۳ mg/L AgNP): تیمار دوم و ۵۰ LC_{50} درصد (۵/۶۷ mg/L AgNP): تیمار سوم، نانوذرات نقره سنتز شده از جلبک سارگاسوم به مدت ۱۴ روز مجاور گردیدند. آب آکواریوم‌های پرورشی هر دو روز یک بار به میزان ۲۰ درصد تعویض می‌شد و سپس مقدار نانوذرات نقره مدنظر در هر آکواریوم مجددا تنظیم شدند (۱۴). بعد از مجاورسازی ماهیان با نانوذرات نقره، در هر بار نمونه‌برداری (روز ۱، ۳، ۷ و ۱۴) تعداد نه قطعه ماهی از هر تیمار از آکواریوم‌ها با آرامی به وسیله ساچوک صید

جدول ۱- نتایج حاصل از سطح فعالیت کاتالاز (U/ g tissue) در بافت کبد ماهی کپور معمولی در مواجهه با نانوذرات نقره سنتزشده از جلبک سارگاسوم

		غلظت نانوذرات نقره		
روزهای نمونه برداری	شاهد	٪۱ LC۵۰	٪۱۰ LC۵۰	٪۵۰ LC۵۰
۱	A,a ۶۳/۲۶ ± ۰/۹۶	A,a ۵۵/۲۴ ± ۱۱/۴۰	A,a ۵۶/۲۳ ± ۶/۲۰	B,b ۴۹/۲۳ ± ۳/۸۹
۳	A,a ۶۶/۵۶ ± ۷/۲۵	A,a ۵۲/۷۳ ± ۱۰/۹۰	A,a ۵۷/۴۱ ± ۵/۶۸	A,b ۳۸/۴۴ ± ۱۲/۰۹
۷	A,a ۶۶/۸۳ ± ۶/۶۱	B,a ۴۳/۴۸ ± ۱۰/۵۲	A,a ۴۵/۵۱ ± ۷/۲۵	A,b ۴۲/۲۳ ± ۸/۳۹
۱۴	A,a ۵۸/۸۹ ± ۷/۳۷	A,a ۵۵/۸۵ ± ۱۳/۹۸	A,a ۵۶/۶۷ ± ۳/۰۶	A,b ۴۰/۶۹ ± ۱۰/۵۴

حروف یکسان کوچک در هر سطر نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح فعالیت کاتالاز در تیمارهای مختلف هستند و حروف یکسان بزرگ در هر ستون نیز نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح کاتالاز بین روزهای مختلف نمونه‌برداری برای هر تیمار می‌باشد.

شده و پس از بیهوشی با عصاره گل میخک (۳۰۰ ppm) بافت کبد آن‌ها را خارج نموده و تا زمان انجام آزمایشات اکسیدان/آنتی‌اکسیدان در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

میزان گلوتاتیون (GSH) به روش اسپکتروفتومتری و با استفاده از دی تیو- بیس نیتروبنزوئیک اسید (DTNB) تهیه شده از شرکت سیگما آمریکا، بر اساس روش Ellman (۹)، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل با استفاده از تری پیریدیل تری‌آذین (مرک، آلمان) و بر اساس روش Benzie و همکاران (۵)، و کاتالاز (CAT) بر اساس روش Koroluk و همکاران (۱۷) و به دنبال تجزیه نمودن پراکسید هیدروژن در طول موج ۴۱۰ نانومتر، مورد سنجش قرار گرفتند. برای سنجش سوپراکسید دسموتاز (SOD) از کیت شرکت رندوکس انگلستان استفاده شد و بدین صورت است که اضافه کردن گزانتین و گزانتین اکسیداز (رندوکس، انگلستان) به عصاره بافتی ماهی، تولید رادیکال‌های سوپراکسید می‌کند، که این رادیکال‌های آزاد تشکیل رنگ قرمز فورمازان را می‌دهد، بنابراین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز از طریق مهار این واکنش و جلوگیری از تشکیل رنگ قابل اندازه‌گیری است و بنابراین میزان بازدارندگی (مهار) در طول موج ۵۰۵ نانومتر با استفاده از دستگاه میکروپلیت‌ریدر اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید (MDA) با استفاده از کیت آزمایشگاهی شرکت آنزان شیمی انجام شد. در این روش اساس واکنش تشکیل کمپلکس مالون‌دی‌آلدئید-تیوباربیتوریک اسید بین یک مولکول مالون‌دی‌آلدئید و دو مولکول تیوباربیتوریک اسید بوده، که جذب نوری کمپلکس حاصله در طول موج ۵۳۲ نانومتر قرائت شد.

اختلاف بین داده‌ها و مقایسه میانگین نمونه‌ها در تیمارهای مختلف با سنجش واریانس دو طرفه (Two-way ANOVA)، در نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام و در صورت وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها، آزمون تکمیلیTukeys HSD، برای گروه‌بندی میانگین‌های دارای اختلاف معنی‌دار استفاده شد. همچنین برای بررسی اختلاف معنی‌دار بین روزهای مختلف در هر تیمار، از آزمون واریانس یک‌طرفه (Two-way ANOVA) استفاده شد. سطح معنی‌داری آزمون‌های آماری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

فعالیت کاتالاز بافت کبد در تمام تیمارها، در روزهای مختلف نمونه‌برداری دارای نوسانات افزایشی و کاهشی بود (جدول ۱). طبق آزمون آماری واریانس دو طرفه، میانگین سطح کاتالاز در کبد ماهی در مواجهه با غلظت $LC_{۵۰}$ ۵۰ درصد نانوذرات نقره، در مقایسه با تیمار

جدول ۲- نتایج حاصل از سطح فعالیت گلوتاتیون (µmol/g tissue) در بافت کبد ماهی کپور معمولی در مواجهه با نانوذرات نقره سنتزشده از جلبک سارگاسوم

		غلظت نانوذرات نقره		
روزهای نمونه برداری	شاهد	٪۱ LC۵۰	٪۱۰ LC۵۰	٪۵۰ LC۵۰
۱	A,b ۵/۶۱ ± ۱/۳۶	A,b ۵/۴۴ ± ۱/۶۶	A,b ۵/۶۲ ± ۰/۷۱	B,a ۴/۵۳ ± ۲/۱۴
۳	A,b ۴/۴۷ ± ۱/۴۱	A,b ۶/۶۹ ± ۱/۵۴	A,b ۵/۵۲ ± ۰/۹۸	A,a ۸/۷۵ ± ۳/۷۸
۷	A,b ۶/۹۸ ± ۱/۸۹	A,b ۵/۴۱ ± ۲/۳۸	A,b ۴/۳۳ ± ۲/۷۶	A,a ۱۱/۵۰ ± ۳/۸۲
۱۴	A,b ۷/۵۲ ± ۱/۶۲	A,b ۵/۷۲ ± ۰/۸۱	B,b ۲/۱۷ ± ۰/۵۸	A,a ۱۵/۰۳ ± ۲/۷۷

حروف یکسان کوچک در هر سطر نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح فعالیت گلوتاتیون در تیمارهای مختلف هستند و حروف یکسان بزرگ در هر ستون نیز نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح گلوتاتیون بین روزهای مختلف نمونه‌برداری برای هر تیمار می‌باشد.

شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد ($p < ۰/۰۵$). کمترین میزان فعالیت کاتالاز در کبد ماهی، مربوط به روز سوم نمونه‌برداری و در تیمار $LC_{۵۰}$ ۵۰ درصد، بوده است (۳۸/۴۴±۱۲/۰۹ U/g tissue). طبق آزمون آماری واریانس یک طرفه فعالیت کاتالاز در تیمار $LC_{۵۰}$ ۱ درصد نانوذرات نقره در روز هفتم نمونه‌برداری در مقایسه با بقیه روزهای نمونه‌برداری همین تیمار کاهش معنی‌داری داشت ($p < ۰/۰۵$). همچنین در تیمار $LC_{۵۰}$ ۵۰ درصد در روز اول نمونه‌برداری افزایش معنی‌داری در مقایسه بقیه روزها در همین تیمار داشت ($p < ۰/۰۵$).

سطح فعالیت گلوتاتیون بافت کبد در ماهی کپور معمولی در تیمار $LC_{۵۰}$ ۵۰ درصد با تمام تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان داد ($p < ۰/۰۵$)، به‌طوری که در این تیمار میزان آن با گذشت زمان افزایش یافته و در آخرین روز نمونه‌برداری به مقدار ۱۵/۰۳ µmol/g tissue بافت کبد رسید (جدول ۲). طبق آزمون آماری واریانس یک طرفه فعالیت گلوتاتیون در $LC_{۵۰}$ ۵۰ درصد در روزهای سوم، هفتم و ۱۴ نمونه‌برداری با اولین روز نمونه‌برداری در همین تیمار افزایش معنی‌دار و در تیمار $LC_{۵۰}$ ۱۰ درصد در روز ۱۴ نمونه‌برداری در مقایسه با بقیه روزها در همین تیمار کاهش معنی‌دار داشت ($p < ۰/۰۵$).

میانگین سطح فعالیت سوپراکسید دیسموتاز کبد در تیمار $LC_{۵۰}$ ۱۰ درصد نسبت به تیمار شاهد کاهش معنی‌دار و در تیمار $LC_{۵۰}$ ۵۰ درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشت ($p < ۰/۰۵$)، اما تیمار $LC_{۵۰}$ ۱ درصد با تیمار شاهد از نظر آماری اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($p > ۰/۰۵$). بیشترین و کمترین میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز بافت کبد به‌ترتیب، مربوط به تیمار $LC_{۵۰}$ ۵۰ درصد و $LC_{۵۰}$ ۱۰ درصد نانوذرات نقره می‌باشد (جدول ۳). همچنین از نظر آماری در روزهای مختلف نمونه‌برداری در هر تیمار فقط در تیمار $LC_{۵۰}$ ۱۰ درصد و در روز ۱۴ نمونه‌برداری با بقیه روزهای نمونه‌برداری در همین تیمار کاهش معنی‌داری مشاهده شد ($p < ۰/۰۵$).

طبق آزمون آماری واریانس دو طرفه و آزمون توکی، بین میانگین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بافت کبد در تیمارهای مختلف با تیمار شاهد از نظر آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p > ۰/۰۵$)، اما کمترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در تیمار $LC_{۵۰}$ ۱۰ درصد و در روز چهاردهم مشاهده شد (جدول ۴). همچنین طبق آزمون آماری واریانس یک طرفه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در تیمار $LC_{۵۰}$ ۱۰ درصد در روز ۱۴ نمونه‌برداری در مقایسه با بقیه روزها برای همین تیمار کاهش معنی‌داری داشت ($p < ۰/۰۵$)، اما بین روز ۳ و ۷ این اختلاف معنی‌دار نبود ($p > ۰/۰۵$).

جدول ۳- نتایج حاصل از سطح فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (U/g tissue) در بافت کبد ماهی کپور معمولی در مواجهه با نانوذرات نقره سنتزشده از جلبک سارگاسوم

		غلظت نانوذرات نقره		
روزهای نمونه برداری	شاهد	٪۱ LC۵۰	٪۱۰ LC۵۰	٪۵۰ LC۵۰
۱	A,b ۳/۲۷ ± ۰/۵۶	A,b ۳/۶۴ ± ۰/۷۴	A,c ۲/۷۹ ± ۰/۵۶	A,a ۳/۶۴ ± ۰/۲۱
۳	A,b ۳/۰۹ ± ۰/۱۱	A,b ۳/۴۵ ± ۰/۳۸	A,c ۳/۰۹ ± ۰/۱۱	A,a ۳/۹۴ ± ۰/۰۰
۷	A,b ۳/۴۵ ± ۰/۵۳	A,b ۲/۹۱ ± ۰/۳۸	A,c ۳/۲۸ ± ۰/۴۱	A,a ۳/۹۸ ± ۰/۱۳
۱۴	A,b ۳/۴۴ ± ۰/۴۸	A,b ۳/۱۵ ± ۰/۳۸	B,c /۷۸ ± ۰/۴۶	A,a ۴/۰۶ ± ۰/۲۱

حروف یکسان کوچک در هر سطر نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در تیمارهای مختلف هستند و حروف یکسان بزرگ در هر ستون نیز نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح سوپراکسید دیسموتاز بین روزهای مختلف نمونه‌برداری برای هر تیمار می‌باشد.

سطح فعالیت مالون‌دی‌آلدئید بافت کبد در تیمار $LC_{۵۰}$ ۱۰ درصد و $LC_{۵۰}$ ۵۰ درصد نانوذرات نقره با گذشت زمان افزایش پیدا کرد، اما در تیمار $LC_{۵۰}$ ۱ درصد نانوذرات نقره با گذشت زمان کاهش یافت. طبق آزمون آماری واریانس دو طرفه میانگین سطح فعالیت MDA در تیمار $LC_{۵۰}$ ۱۰ درصد با تیمار شاهد و نیز تیمار $LC_{۵۰}$ ۱ درصد نانوذرات نقره افزایش معنی‌داری نشان داد ($p < ۰/۰۵$)، اما بین تیمار $LC_{۵۰}$ ۱۰ درصد و $LC_{۵۰}$ ۵۰ درصد این اختلاف معنی‌داری نبود ($p > ۰/۰۵$). طبق آنالیز آماری واریانس یک طرفه از نظر وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین روزهای مختلف نمونه‌برداری در هر تیمار، فقط در تیمار $LC_{۵۰}$ ۱۰ درصد در روزهای سوم، هفتم و ۱۴ در مقایسه با روز اول در همین تیمار افزایش معنی‌داری در میزان فعالیت MDA مشاهده شد ($p < ۰/۰۵$). بیشترین و کمترین میزان فعالیت MDA در بافت کبد به‌ترتیب مربوط به تیمار $LC_{۵۰}$ ۱۰ درصد (۸۹/۵۲ ± ۷/۸۰) و تیمار شاهد (۶۴/۱۹ ± ۷/۵۷) می‌باشد (جدول ۵).

نتایج حاصل از اثرات کلی نانوذرات نقره سنتز شده از جلبک سارگاسوم بر تغییرات آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و سطح پراکسیداسیون لیپیدی در جدول ۶ ارائه شده است. طبق نتایج میزان فعالیت کاتالاز در تیمارهای مختلف نانوذرات در مقایسه با تیمار شاهد کاهش معنی‌داری داشت ($p < ۰/۰۵$). فعالیت گلوتاتیون نیز در تیمار $LC_{۵۰}$ ۱۰ درصد با تیمار شاهد کاهش معنی‌دار و در تیمار $LC_{۵۰}$ ۵۰ درصد با تیمار شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد ($p < ۰/۰۵$). سطح فعالیت سوپراکسید دسموتاز، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و مالون دی‌آلدئید در تیمار $LC_{۵۰}$ ۱۰ درصد با بقیه تیمارها و نیز تیمار شاهد از نظر آماری اختلاف معنی‌داری داشت ($p < ۰/۰۵$).

بحث

شاخص‌های اکسیدانی/آنتی‌اکسیدانی می‌توانند اثرات تحت کشنده نانوذرات بر روی فاکتورهای استرس اکسیداتیو را به‌خوبی نشان دهند. نانوذرات فلزی با تولید رادیکال‌های آزاد باعث تغییر در سیستم‌های آنتی‌اکسیدان سلول و پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء موجودات زنده می‌شوند. نانوذرات فلزی با تولید رادیکال‌های آزاد باعث تغییر در سیستم‌های آنتی‌اکسیدان سلول و پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء موجودات زنده می‌شوند (۱). کبد اولین اندام مهم برای جذب و متابولیسم مواد شیمیایی و سموم است. آسیب سلولی ناشی از نانوذرات فلزی که افزایش رادیکال‌های آزاد را به دنبال دارد، سبب فعال شدن سیستم‌های دفاعی آنتی اکسیدانی می‌شود. یکی از این سیستم‌ها که قادر

جدول ۴- نتایج حاصل از سطح ظرفیت آنتی اکسیدانی کل (µmol/g tissue) در بافت کبد ماهی کپور معمولی در مواجهه با نانوذرات نقره سنتزشده از جلبک سارگاسوم

		غلظت نانوذرات نقره		
روزهای نمونه برداری	شاهد	٪۱ LC۵۰	٪۱۰ LC۵۰	٪۵۰ LC۵۰
۱	A,a ۳/۸۶ ± ۱/۳۹	A,a ۳/۳۵ ± ۱/۶۲	A,a ۴/۰۱ ± ۰/۳۶	A,a ۳/۰۷ ± ۰/۲۸
۳	A,a ۲/۸۵ ± ۰/۷۵	A,a ۳/۲۰ ± ۱/۱۷	B,a ۲/۱۹ ± ۰/۱۱	A,a ۲/۷۲ ± ۰/۲۱
۷	A,a ۲/۳۳ ± ۰/۵۸	A,a ۲/۸۱ ± ۰/۹۵	B,a ۲/۲۹ ± ۰/۶۰	A,a ۲/۶۴ ± ۰/۸۶
۱۴	A,a ۳/۱۹ ± ۱/۳۶	A,a ۳/۰۰ ± ۱/۴۲	C,a ۱/۶۳ ± ۰/۵۱	A,a ۲/۸۷ ± ۱/۷۳

حروف یکسان کوچک در هر سطر نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح فعالیت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در تیمارهای مختلف هستند و حروف یکسان بزرگ در هر ستون نیز نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بین روزهای مختلف نمونه‌برداری برای هر تیمار می‌باشد.

به پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد است، آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز می‌باشند (۱۹). در تحقیق ما در بافت کبد سطح فعالیت کاتالاز در تیمار $LC_{۵۰}$ ۵۰ درصد در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد ($p < ۰/۰۵$)، بازداشته شدن فعالیت کاتالاز به دلیل باندشدن یون‌های فلزی به گروه‌های SH– آنزیم می‌باشد، که سبب افزایش $H_۲O_۲$ و رادیکال سوپراکسید می‌شود (۲۳). Atli و همکاران (۳)، نشان دادند که فعالیت کاتالاز بوسیله نقره در کبد ماهی آب شیرین کاهش یافته است، که با نتایج تحقیق ما مطابقت دارد، آنها دلیل کاهش فعالیت کاتالاز را ناشی از تجمع سنگین رادیکال‌های آزاد در بدن در مواجهه با نانوذرات نقره ذکر کردند. در مطالعه ما نیز کاهش سطح فعالیت کاتالاز، می‌تواند یا به‌دلیل تجمع رادیکال‌های آزاد و یا اینکه به دلیل مصرف آنها در جریان فرایند استرس اکسیداتیو باشد (۱۲). همچنین دلیل نوسان کاتالاز می‌تواند ناشی از ایجاد آسیب بافت توسط نانوذرات نقره باشد که کاتالاز برای مقابله با این آسیب و غلبه بر استرس اکسیداتیو ابتدا افزایش پیدا می‌کند اما با گذشت زمان که آسیب زیاد می‌شود دیگر کاتالاز توانایی مقابله با رادیکال‌های آزاد را نداشته و میزان آن کااهش می‌یابد. در مطالعه‌ای توسط Lee و همکاران (۱۸)، در ماهی کپور معمولی در مواجهه با نانوذرات نقره، فعالیت کاتالاز کبد در غلظت‌های پایین نانونقره کاهش و در غلظت‌های بالای نانوذرات نقره افزایش داشت که با نتایج تحقیق ما همخوانی ندارد.

گلوتاتیون به عنوان آنتی‌اکسیدان غیرآنزیمی در سم‌زدایی پراکسید هیدروژن، لیپید هیدرو پراکسیدها و ترکیبات الکتروفیلیك شرکت کند (۲۱). میزان GSH بافت کبد در تیمار $LC_{۵۰}$ ۱۰ درصد نانوذرات نقره با تیمار شاهد از نظر آماری معنی‌دار نبود اما در روز چهاردهم نمونه‌برداری کاهش قابل توجهی در مقدار آن مشاهده شد (۰/۵۸ ± ۲/۱۷ µmol/g tissue)، کاهش در میزان گلوتاتیون نشان‌دهنده نارسایی سیستم دفاعی آنتی اکسیدان برای مقابله با با رادیکال‌های آزاد ناشی از اکسیژن است (۱۱). برخی مطالعات، افزایش در میزان GSH را در مواجهه با نانوذرات نقره گزارش نموده‌اند (۱۵)، که این افزایش می‌تواند نوعی از پاسخ‌های سلولی برای محافظت در برابر آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از تشکیل رادیکال‌های آزاد در مواجهه با نانوذرات نقره باشد.

سوپراکسید دیسموتاز از آنزیم‌های کلیدی سیستم دفاعی آنتی اکسیدای می‌باشد. در تیمار $LC_{۵۰}$ ۱۰ درصد نانوذرات نقره، فعالیت SOD نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌دار($p < ۰/۰۵$)، و در تیمار $LC_{۵۰}$ ۵۰ درصد نانوذرات نقره در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌دار نشان داد ($p < ۰/۰۵$). همچنین در تیمار $LC_{۵۰}$ ۱۰ درصد نانوذرات نقره، فعالیت

جدول ۵- نتایج حاصل از سطح فعالیت مالون دی‌آلدئید (tissue nmol /g) در بافت کبد ماهی کپور معمولی در مواجهه با نانوذرات نقره سنتزشده از جلبک سارگاسوم

		غلظت نانوذرات نقره		
روزهای نمونه برداری	شاهد	٪۱ LC۵۰	٪۱۰ LC۵۰	٪۵۰ LC۵۰
۱	A,a ۷۱/۴۸ ± ۶/۰۰	A,a ۷۱/۴۳ ± ۸/۹۷	B,b ۷۶/۲۵ ± ۸/۰۲	A,ab ۷۳/۱۰ ± ۱۰/۶۲
۳	A,a ۶۵/۹۸ ± ۱۰/۳۰	A,a ۶۹/۲۸ ± ۳/۴۸	A,b ۸۶/۹۲ ± ۳/۰۹	A,ab ۷۵/۶۱ ±۱۳/۰۱
۷	A,a ۶۴/۱۹ ± ۷/۵۷	A,a ۶۹/۱۱ ± ۸/۱۷	A,b ۸۹/۴۰ ± ۴/۷۴	A,ab ۷۹/۹۱ ±۹/۹۹
۱۴	A,a ۶۸/۳۰ ± ۰/۷۲	A,a ۶۵/۵۵ ± ۵/۳۱	A,b ۸۹/۵۲ ± ۷/۸۰	A,ab ۸۱/۲۷ ±۵/۴۹

حروف یکسان کوچک در هر سطر نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح فعالیت مالون دی‌آلدئید در تیمارهای مختلف هستند و حروف یکسان بزرگ در هر ستون نیز نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح مالون دی‌آلدئید بین روزهای مختلف نمونه‌برداری برای هر تیمار می‌باشد.

SOD کبد، با گذشت زمان ابتدا افزایش پیدا کرد، اما در روز چهاردهم در مقایسه با بقیه روزها کاهش معنی‌داری در میزان آن مشاهده شد (۰/۷۸ ± ۰/۴۶ U/g tissue)، با توجه به اینکه، کبد اولین اندام مهم برای جذب و متابولیسم مواد شیمیایی و سموم است، کاهش فعالیت SOD ناشی از تشکیل رادیکال-های فعال اکسیژن می‌باشد. اما افزایش یکنواخت و معنی‌دار آن در تیمار ۵۰ LC_{50} درصد نانوذرات نقره تا آخرین روز نمونه‌برداری در مقایسه با بقیه تیمارها و بقیه روزهای نمونه‌برداری در همین تیمار نشان می‌دهد که SOD ظرفیت سم‌زدایی خود را بالا برده و از این طریق رادیکال‌های سوپراکسید را به پراکسید هیدروژن که خاصیت اکسیدانتی کمتری دارد تبدیل می‌کند (۴).

ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی برآوردی از ترکیب پتانسیل آنتی اکسیدان‌های مختلف در بدن است که در تعامل با یکدیگر عمل می‌کنند. نتایج حاصل از مطالعه ما نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بافت کبد در غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره با گروه شاهد می‌باشد، که نشان دهنده اثر تطابقی دفاع آنتی اکسیدانی بدن و یا افزایش کارایی سیستم آنتی‌اکسیدانی و یا کاهش تولید رادیکال‌های آزاد می‌باشد. در مطالعه‌ای توسط Govindasamy و Rahuman (۱۲)، 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 به‌دلیل تجمع سنگین رادیکال‌های آزاد ایجاد شده در اثر نانوذرات نقره می‌باشد. همچنین در مواجهه ماهیان جوان کپور معمولی با نانوذرات تیتانیوم، غلظت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، به‌طور معنی‌داری بعد از دو روز مواجهه در دزهای ۲۰ mg/L (کبد و مغز) کاهش یافت (۱۸).

مالون دی آلدئید به عنوان یکی از مهم ترین نشانگرهای زیستی و یک شاخص کلی برای میزان پراکسیداسیون لیپیدی می‌باشد. تغییرات MDA بافت کبد در مواجهه با غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره نسبت به فاکتورهای آنتی‌اکسیدانی آنزیماتیکی (کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز) متفاوت بود، به‌طوری‌که در غلظت‌های بالا (تیمار ۱۰ LC_{50} درصد و LC_{50} ۱۰ درصد نانوذرات نقره) با گذشت زمان از افزایش یکنواخت و در غلظت

جدول ۶- نتایج حاصل از تغییرات آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و سطح پراکسیداسیون لیپیدی در بافت کبد ماهی کپور معمولی در کل دوره مواجهه با نانوذرات نقره سنتزشده از جلبک سارگاسوم

		غلظت نانوذرات نقره		
فاکتورهای مورد اندازه‌گیری	شاهد	٪۱ LC۵۰	٪۱۰ LC۵۰	٪۵۰ LC۵۰
کاتالاز	a ۶۳/۸۸ ± ۵/۵۵	b ۵۱/۸۲ ± ۱۱/۷۰	b ۵۳/۹۵ ± ۵/۵۵	b ۴۲/۶۵ ± ۸/۷۳
گلوتاتیون	b ۶/۱۴ ± ۱/۵۷	b ۵/۸۲ ± ۱/۶۰	c ۴/۴۱ ± ۱/۲۵	a ۹/۹۵ ± ۳/۱۲
سوپراکسید دیسموتاز	a ۳/۳۱ ± ۰/۴۲	a ۳/۲۹ ± ۰/۴۷	b ۲/۴۹ ± ۰/۳۹	a ۳/۹۰ ±۰/۱۴
ظرفیت آنتی اکسیدانی کل	a ۳/۰۳ ± ۱/۰۲	a ۳/۰۹ ± ۱/۲۹	b ۲/۵۳ ± ۰/۴۰	a ۲/۹۳ ±۰/۷۷
مالون دی‌آلدئید	a ۶۷/۴۹ ± ۶/۱۹	a ۶۶/۴۷ ± ۶/۴۸	b ۸۵/۵۲ ± ۵/۹۱	a ۷۷/۴۷ ±۹/۴۷

حروف یکسان کوچک در هر سطر نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدانی و پراکسیداسیون لیپیدی در تیمارهای مختلف هستند.

پایین (تیمار LC_{50} ۱ درصد نانوذرات نقره) از کاهش یکنواختی برخوردار بود. کاهش MDA نشان‌دهنده فعال شدن سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی و غلبه بر پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش سطح آن نشان‌دهنده اختلال در مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی می‌باشد (۲۶). سطح فعالیت MDA در تیمار LC_{50} ۱۰ درصد نانوذرات نقره در بافت کبد با گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت، که نشان می‌دهد در مواجهه با این غلظت بافت کبد دچار آسیب اکسیداتیو شده‌اند. مشابه نتایج بدست آمده از این تحقیق، در مطالعه Federici و همکاران (۱۰) نیز در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان، آسیب پراکسیداسیون لیپیدی در کبد مشاهده شد. نتایج مطالعه ما نشان می‌دهد، هر چند که اثرات مشاهده شده نانوذرات نقره سنتزشده از جلبک دریایی سارگاسوم بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون و نیز مالون دی‌آلدئید در بافت کبد ماهی کپور معمولی برای درک تا حدودی مشکل می‌باشد، به‌طوری که هم افزایش و کاهش در میزان آن‌ها با غلظت-های مختلف نانوذرات نقره مشاهده گردید. در مجموع نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مواجهه ماهیان کپور معمولی با غلظت ۱/۱۳ میلی‌گرم بر لیتر (تیمار LC_{50} ۱۰ درصد) نانوذرات نقره سنتزشده از جلبک سارگاسوم به‌صورت تحت کشنده، 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. همچنین تخلیه یا کاهش آنزیم‌های آنتی اکسیدانی می‌تواند ناشی از تلاش بدن، برای مواجهه با افزایش سطح پراکسیداسیون لیپیدها باشد.

پاورقی‌ها

1 - Reactive Oxygen Species

2 - Glutathione

3 - Superoxide dismutase

4 - Malondialdehyde

تشکر و قدردانی

از زحمات تمامی اساتید و افراد و کارشناسان در آزمایشگاه بخش بیوشیمی و آزمایشگاه بهداشت آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز تشکر می‌گردد.

منابع مورد استفاده

1. Afifi M., Saddick S., Abu Zinada O. (2016). Toxicity of silver nanoparticles on the brain of *Oreochromis niloticus* and *Tilapia zillii. Saudi Journal of Biological Sciences.* 23: 754–760.

2. Arora S., Jain J., Rajwade J., Paknikar K. (2009). Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicology Applied and Pharmacology*, 236 (3): 310-318.

3. Atli G., Alptekin O., Tukel S., Canli M. (2006). Response of catalase activity to Ag2+, Cd2+,Cr2+, Cu2+ and Zn2+ in five tissues of freshwater fish Oreochromis niloticus. *Comparative Biochemistry Physiology*, 143: 218–224.

4. Banaee M., Sureda A., Mirvaghefi A.R., Ahmadi K. (2013). Biochemical and histological changes in the liver tissue of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sub-lethal concentrations of diazinon. *Fish Physiology and Biochemistry*, 39: 489-501.

5. Benzie I.F.F., Strain J.J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239: 70-76.

6. Bita S., Abdollahzadeh Jamalabadi M., Mesbah M. (2015). Toxicity study of silver nanoparticles synthesized using seaweed Sargassum angustifolium in common carp, *Cyprinus carpio. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*,7(11): 91-98.

7. Bita S., Mesbah M., Shahryari A., Ghorbanpour M. (2015). Biosynthesis of silver nanoparticles using Sargassusm angustifolium seaweed. *Journal of Marine Sciences and Technology*, 14(1):81-90. (In Persian).

8. Choi J.E., Kim S., Ahn J.H., Youn P., Kang J.S., Park K., Yi J., 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.

9. Ellman G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archive of Biochemistry and Biophysics*, 82: 70–77.

10. Federici G., Shaw B.J., Handy R.D. (2007). Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout, (Oncorhynchus mykiss): gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology,* 84:415–430.

11. Foldbjerg R., Autrup H. (2013). Mechanisms of Silver Nanoparticle Toxicity. *Archives of Basic and Applied Medicine*, 1: 5 – 15.

12. 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.

13. Hao L.H., Wang Z.Y., Xing B.S. (2009). Effect of sub-acute exposure to TiO2 nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Juvenile Carp *(Cyprinus carpio). Journal of Environmental Science,* 21:1459–1466.

14. Kalbasi M.R., Abdollahzadeh E ., Salari-Joo H. (2012). Effect of colloidal silver nanoparticles on population of gut bacterial flora of rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss). Journal of Veterinary Research*, 67 (2): 181-189. (In Persian).

15. Kang S.J., Lee Y.J., Lee E.K., Kwak M.K. (2012). Silver nanoparticles-mediated G2/M cycle arrest of renal epithelial cells is associated with NRF2-GSH signaling. *Toxicology Letters*, 211(3): 334-341.

16. Katuli K.K., Massarsky A., Hadadi A., Pourmehran Z. (2014). Silver nanoparticles inhibit the gill Na-K-ATPase and erythrocyte

AChE activities and induce the stress response in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 106:173–180.

17. Koroluk M.A., Ivanova L.I., Maiorova I.G., Tokarev V.E. (1988). A method for measuring catalase activity. *Laboratornoe Delo journal,* 1:16-19.

18. Lee B., Duong C., Cho J., Lee J., Kim K., Seo Y., Kim P., Choi K., Yoon J. (2012). Toxicity of Citrate-Capped Silver Nanoparticles in Common Carp *(Cyprinus carpio). Journal of Biomedicine and Biotechnology,* 26:1-14.

19. Limon-Pacheco J., Gonsebatt M.E. (2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research*, 674 (2): 137-147.

20. Linhua H., Lei C. (2012). Oxidative stress responses in different organs of carp (*Cyprinus carpio*) with exposure to ZnO nanoparticles. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 80: 103–110.

21. Masella R., Di-Benedetto R., Vari R., Filesi C., Giovannini C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *Journal of Nutrition Biochemistry*, 16 (10): 577-586.

22. Nel A., Xia T., Mädler L., Li N. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311: 622–627.

23. Ruas C.B.G., Carvalho C.D.S., Araujo H.S.S., Espindola E.L.G., Fernandes, M.N. (2008). Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metal-contaminated river. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 71: 86–93.

24. Sleven H., Gibbs J.E., Heales S., Thom M., Cock H.R. (2006). Depletion of reduced glutathione precedes inactivation of mitochondrial enzymes following limbic status epilepticus in the rat hippocampus. *Neurochemistry International*, 48 (2): 75–82.

25. Tao S., Liu C.F., Dawson R., Long A.M., Xu F.L. (2000). Uptake of cadmium adsorbed on particulates by gills of goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 47(3): 306–313.

26. Valavanidis A., Vlahogianni T., Dassenakis M., Scoullos M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64: 178-189.

27. Wu Y., Zhou Q. (2013). Silver nanoparticles cause oxidative damage and histological changes in medaka (*Oryzias latipes*) after 14 days of exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32 (1): 165–173.

28. Xiangqian L., Huizhong X., Zhe-Sheng Chen ZSh., Chen G. (2011). Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications. *Journal of Nanomaterials*, 3:1-16.

29. Xiong D., Fang T., Yu L., Sima X., Zhu W. (2011). Effects of nano-scale TiO2, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: Acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. *Science of the Total Environment*, 409: 1444–1452.