



Original Research Paper

The effect of naproxen and titanium dioxide on zebrafish immunity level as a laboratory model

Marzieh Binaei ¹, Najmeh Hadizadeh Shirazi ^{2*}, Firouz Faedmaleki ³, Amir Eghbal Khajehrahimi ⁴,
Reza Kazempoor ²

¹ Department of Pharmacology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Department of Biology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran

³ Department of Pharmacology, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran

⁴ Department of Aquatic Health and Disease, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Key Words

Naproxen
Titanium oxide
Zebrafish
Immunity
Enzyme changes

Abstract

Introduction: The objective of this study was to examine how titanium dioxide and naproxen drugs impact the immune system level of zebrafish larvae, particularly focusing on changes in enzymes.

Materials & Methods: Seven groups including groups of titanium dioxide, naproxen and a combination of both were studied for 8 days on zebrafish larvae. Approximately 5,250 zebrafish larvae were transported to the laboratory and housed in pre-filled Petri dishes containing clean water at a temperature range of 24-26°C.

Results: The lowest amount of glutathione was in the 2T50N group (0.02 mmol/liter) and then the lowest values in the 2T and 4T groups were the same amount of 0.057 mmol/liter without any significant difference. ($P>0.05$) The highest amount of glutathione was found in the 100N group (0.118 mmol/liter) without significant difference ($P>0.05$). The superoxide dismutase gradually increased from the groups with titanium dioxide 2T and 4T (about 24 mmol/liter sample) to its highest value in the 2T50N group at the rate of 31.5 mmol/liter sample. The amount of malondialdehyde in groups with titanium dioxide including 2T and 2T50N groups reached its lowest value (0.1 mmol/liter sample). The amount of serotonin decreased significantly in the 50N, 100N and 4T groups.

Conclusion: The results of the research confirmed that high concentrations of titanium dioxide and naproxen caused the production of higher amounts of ROS, which was able to affect the antioxidant system by reducing the content of SOD and GSH, which even in high amounts, oxidative stress overcame the defense system. Oxidative damage occurred that could increase lipid peroxidation (measured as MDA) and dysfunction of the serotonin system in groups 50N, 100N and 4T led to the intensification of abnormal movements in zebrafish larvae.

* Corresponding Author's email: nhadizade@riau.ac.ir

Received: 25 July 2023; Reviewed: 3 September 2023; Revised: 13 November 2023; Accepted: 12 December 2023

(DOI):10.70102/AEJ.2025.16.4.13

مقاله پژوهشی

تأثیر ناپروکسن و تیتانیوم دی اکسید بر سطح ایمنی لارو گورخرماهی به عنوان مدل آزمایشگاهی

مرضیه بنیایی^۱، نجمه هادیزاده شیرازی^{۲*}، فیروز فائدملکی^۳، امیراقبال خواجه رحیمی^۴، رضا کاظم پور^۲^۱ گروه فارماکولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران^۲ گروه زیست شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران^۳ گروه فارماکولوژی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران^۴ گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

کلمات کلیدی

چکیده

ناپروکسن
تیتانیوم دی اکسید
گورخرماهی
ایمنی
تغییرات آنزیمی

مقدمه: هدف از انجام این تحقیق، بررسی تأثیر داروهای تیتانیوم دی اکسید و ناپروکسن بر سطح ایمنی گورخرماهی در مرحله لاروی با تأکید بر تغییرات آنزیمی بوده است.

مواد و روش‌ها: ۷ گروه مشتمل بر گروه‌های تیتانیوم دی اکسید، ناپروکسن و ترکیبی از هر دو به مدت ۸ روز بر روی لارو گورخرماهی مورد مطالعه قرار گرفت. تقریباً ۵۲۵۰ لارو گورخرماهی به آزمایشگاه منتقل و در ظروف پتری‌دیش که از قبل با آب تمیز در دمای ۲۶-۲۴ درجه سانتی‌گراد پر شده بود، قرار داده شدند.

نتایج: کم‌ترین مقدار گلوکاتایون در گروه 2T50N (۰/۰۲ میلی‌مول در لیتر) بوده و پس از آن کم‌ترین مقادیر در گروه‌های 2T و 4T به مقدار مشابه ۰/۰۵۷ میلی‌مول در لیتر بدون هر گونه اختلاف معنی‌داری بوده است ($P>0/05$). بیش‌ترین مقدار گلوکاتایون در گروه 100 N (۰/۱۱۸ میلی‌مول در لیتر) بدون اختلاف معنی‌دار ($P>0/05$) اندازه‌گیری گردید. سوپراکسید دیسموتاز به تدریج از گروه‌های دارای تیتانیوم دی اکسید 2T و 4T (حدود ۲۴ میلی‌مول در لیتر نمونه) به بیش‌ترین مقدار خود در گروه 2T50N، به میزان ۳۱/۵ میلی‌مول در لیتر نمونه رسید. مقدار مالون دی‌آلدئید در گروه‌های دارای تیتانیوم دی اکسید مشتمل بر گروه‌های 2T و 2T50N به کم‌ترین مقدار خود (۰/۱ میلی‌مول در لیتر نمونه) رسید. مقدار سروتونین در گروه‌های ۵۰N، ۱۰۰N و 4T به‌طور معنی‌داری کاهش یافت.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق موید این نکته بود که غلظت‌های بالای تیتانیوم دی اکسید و ناپروکسن موجب تولید مقادیر بالاتری از مواد واکنش‌پذیر با اکسیژن (ROS) شده که توانسته بر سیستم آنتی‌اکسیدانی با کاهش محتوای سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و گلوکاتایون احیا (GSH) تأثیر بگذارد که حتی در مقادیر بالا، استرس اکسیداتیو توانسته بر سیستم دفاعی غلبه کرده، آسیب اکسیداتیو رخ دهد که به نوبه خود توانسته باعث افزایش شاخص پراکسیداسیون لیپیدی (MDA) گردد و اختلال در عملکرد سیستم سروتونین در گروه‌های ۵۰N، 100N و 4T منجر به تشدید حرکات غیرطبیعی در لارو گورخرماهی گردید.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: nhadizade@riau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۳ مرداد ۱۴۰۲؛ تاریخ داوری: ۱۲ شهریور ۱۴۰۲؛ تاریخ اصلاح: ۲۲ آبان ۱۴۰۲؛ تاریخ پذیرش: ۲۱ آذر ۱۴۰۲

(DOI): 10.70102/AEJ.2025.16.4.13

مقدمه

در طول چند سال گذشته، داروها به یک گروه آلاینده منحصر به فرد از چالش‌های نوظهور تبدیل شده‌اند. در سال‌های اخیر، حضور داروها در محیط زیست به دلیل تخلیه مداوم و سمیت بالقوه آن‌ها به یک نگرانی گسترده تبدیل شده است. افزایش مصرف دارو به علاوه حذف ناقص در تصفیه‌خانه‌های فاضلاب منجر به انتشار مداوم مواد دارویی به آب‌های سطحی شده است (۱۱). نانوذرات ممکن است در نتیجه استفاده از آن‌ها در فناوری حسگرها و پاکسازی محیطی زباله در صنعت و پزشکی به سیستم‌های آب‌شیرین‌رها شوند (۲۰). به دنبال انتشار محیطی، احتمالاً نانومواد مهندسی شده در سیستم‌های آبی رسوب می‌کنند و خطر احتمالی برای زندگی آبزیان را رقم می‌زنند (۲۲). نانوتکنولوژی خواص و رفتار منحصر به فرد ماده در مقیاس نانو است. هنگامی که ذرات در مقیاس نانو سنتز می‌شوند، خواص آن‌ها تغییر می‌کند. نانوذرات در مقایسه با وزن خود سطح بسیار بیشتری نسبت به ذرات بزرگ‌تر دارند. به طور کلی تصور می‌شد که هرچه یک ذره کوچک‌تر باشد، سمیت آن بیش‌تر است (۱۸). این اثرات ممکن است مربوط به اندازه کوچک‌تر ذرات، افزایش واکنش پذیری آن‌ها در نتیجه سطح بیش‌تر در هر ذره یا تعداد بیش‌تر ذرات در یک دز باشد. بنابراین، موانع محافظتی بدن مانند سد خونی-مغزی، سد خونی-چشمی نمی‌توانند مانع از ورود بیگانه‌بیوتیک‌ها به مغز و جریان خون شوند. سپس نانوذرات به احتمال زیاد در این بافت‌ها رسوب کرده و منجر به جراحات و آسیب می‌شوند (۸). تا به امروز، بیش‌تر تحقیقات در مورد سمیت نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید بر روی خطرات ریوی (۱۶)، دستگاه گوارش (۹)، یا مواجهه پوستی (۳۰) در پستانداران متمرکز شده است. اما مطالعات کمی وجود دارد که اثرات سمی را بر روی موجودات آبی، به ویژه برای سمیت مزمن طولانی مدت، بررسی کرده باشد. بسیاری از تحقیقات سمیت حاد نشان داد که نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید سمیت کم یا ایمن برای موجودات آبی هستند. اما یک مطالعه اخیر نشان داد که قرار گرفتن در معرض نانو تیتانیوم دی‌اکسید بیان تعدادی از ژن‌های دخیل در عملکرد ریبوزومی در گورخرماهی را تغییر می‌دهد (۲). این مشاهدات این احتمال را افزایش می‌دهد که اگرچه در بازه زمانی مورد مطالعه تیتانیوم دی‌اکسید به طور آشکار سمی نیست، ولی قرار گرفتن در معرض نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید ممکن است اثراتی بر روی آبشش‌های گورخرماهی داشته باشد که تا زمانی در معرض مواجهه طولانی‌تر قرار نگیرد، آشکار نمی‌گردد (۲۶). بررسی نشان داد که قرار گرفتن قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در معرض نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید به مدت ۱۴ روز، تیتانیوم دی‌اکسید باعث آسیب بافتی آبشش و کاهش

قابل توجهی در فعالیت $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ در آبشش‌ها و روده و روند کاهشی در فعالیت آنزیم می‌شود (۱۴). این یافته هم چنین نشان می‌دهد که مواجهه طولانی مدت برای ارزیابی خطر نانومواد در موجودات آبی ضروری است (۳، ۲۱). اگرچه این مطالعات نگرانی‌هایی را در مورد سمیت مزمن نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید برای آبزیان افزایش داده است، اما داده‌های بسیار محدودی در مورد سمیت زیست محیطی بلندمدت برای موجودات آبی وجود دارد. در مطالعه Fu و همکاران، مشخص گردید نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم (n-TiO_2) می‌توانند فراهمی زیستی و سمیت سموم آلی موجود در فاز آبی را افزایش دهد. مواجهه هم‌زمان مولدین نر و ماده گورخرماهی در برابر نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید و بیسفنول آ (BPA) می‌تواند باعث ایجاد سمیت عصبی رشدی در لارو گورخرماهی شود (۱۵). داروهای ضد التهاب غیراستروئیدی (NSAID) مانند ایبوپروفن، ناپروکسن و ... مسکن‌هایی هستند که به طور گسترده‌ای در طب انسانی و دامپزشکی استفاده می‌شوند. ایبوپروفن در نمونه‌های آب محیط‌های متعددی از جمله آب رودخانه‌ها و نه‌رها و پساب تصفیه‌خانه‌های فاضلاب در غلظت‌های 0.1 نانوگرم در لیتر تا 16 میکروگرم در لیتر شناسایی شده است که نیاز به اطلاعات بیش‌تر در مورد متابولیسم زنبوبیوتیک‌ها در ماهی را تأکید می‌کند (۷، ۲۴). گورخرماهی (*Danio rerio*) متعلق به خانواده کپور ماهیان (Cyprinidae) است. این ماهی متعلق به آب‌های شیرین مناطق گرمسیری بوده و محدوده دمایی و PH مناسب رشد آن به ترتیب 7 الی 22 درجه سانتی‌گراد و 6.8 الی 7.5 می‌باشد. نکته مهم در رابطه با نگهداری این ماهی توانایی تطبیق پذیری بالای آن است (۲۷). طول عمر گورخرماهی به طور معمول بین 2 تا 3 سال می‌باشد که در شرایط ایده‌آل طول عمر این ماهی در اسارت تا 5 سال هم گزارش شده است. سن بلوغ ماهی در طبیعت 4 تا 5 ماه و در اسارت حدود 2 ماه است که در این سن ماهیان ماده قادر به تخم‌ریزی می‌باشند. هرچند چرخه طبیعی روشنایی و تاریکی بر زمان تخم‌گذاری تأثیر زیادی داشته و با شروع زمان روشنایی تخم‌گذاری آغاز می‌شود (۱۳). با شروع دوره تخم‌ریزی، ماهیان ماده هر 2 تا 3 روز یک‌بار قادر به تخم‌ریزی بوده و توانایی تولید حدود 200 تخم در هفته را دارا می‌باشند. تخم‌ها پس از لقاح بلافاصله شفاف شده و رشد و نمو جنین آغاز می‌گردد. تخم‌های لقاح یافته در عرض چهار ساعت از یک سلول به 100 سلول تبدیل خواهند شد (۱). هدف از انجام این تحقیق، بررسی تأثیر داروهای تیتانیوم دی‌اکسید و ناپروکسن بر سیستم ایمنی مرحله لاروی گورخرماهی با تأکید بر تغییرات آنزیمی بوده است. 7 گروه مشتمل بر گروه‌های تیتانیوم دی‌اکسید، ناپروکسن و ترکیبی از هر دو به مدت 8 روز در گورخرماهی مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

ماهی: در چندین نوبت مولدین گورخرماهی از دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه گردید. این مولدها در شرایط ایده‌آل فیزیکی و شیمیایی تخم‌ریزی نمودند. این ماهی‌ها به‌عنوان مدل حیوانی برای این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند. تقریباً ۵۲۵۰ لارو گورخرماهی به آزمایشگاه منتقل و در ظروف پتری دیش که از قبل با آب تمیز در دمای ۲۴-۲۶ درجه سانتی‌گراد پر شده بود قرار داده شدند. ظروف پتری دیش در اتاقی با شرایط نوری کنترل‌شده ۱۴ ساعت نور و ۱۰ ساعت تاریکی قرار گرفتند (۲۸).

تهیه محلول استوک ناپروکسن: ناپروکسن مورد نیاز برای استفاده در این آزمایش به‌صورت تجاری خریداری شد (Zhejiang charioteer Pharmaceutical Co., Ltd, BTCH No. 226022101, inspection basis BP2022). محلولی با حل کردن ۲۰۰۰۰ میکروگرم در لیتر ناپروکسن در استون تهیه شد و در تاریکی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در نهایت با رقیق کردن محلول ذخیره شده با آب فیلترشده، غلظت‌های مورد نظر (جدول ۱) به‌دست آمد (۱۹).

تهیه محلول استوک تیتانیوم دی اکسید: نانوذرات ۲۵ نانومتری دی اکسید تیتانیوم خریداری شده تجاری (۸۰٪ روتایل و ۲۰٪ آاناتاز، US1020F) با استفاده از میکروسکوپ الکترونی براساس روش Ramsden و همکاران، برای اندازه ذرات مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند (۲۵). برای تهیه محلول استوک با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نانو ذره تیتانیوم اکسید، نانوذرات به آب فوق‌العاده خالص اضافه و تحت فراصوت (۲ وات در لیتر، ۵۰ کیلوهرتز، ۴۰ دقیقه) قرار گرفتند. محلول‌های آزمایشی حاوی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم با رقیق کردن محلول استوک با آب فیلترشده با استفاده از کاغذ صافی با اندازه منافذ ۳ میکرومتر و فراصوت (۴ وات در لیتر، ۵۰ کیلوهرتز، ۲۰ دقیقه) بلافاصله قبل از استفاده تهیه شد (۱۲).

طراحی تحقیق: گروه‌های مورد استفاده در این تحقیق به شرح جدول ۱ تعیین گردیدند. برای این آزمایش، تخم‌های حاصل از مولدین تهیه شده به‌طور تصادفی بین هفت گروه، هر کدام با سه تکرار ۲۵۰ لاروی، توزیع شدند و در معرض محلول‌هایی حاوی ناپروکسن، نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم به تنهایی یا ترکیبی از این دو قرار گرفتند. هر کدام از گروه‌ها حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر محلول مربوطه متناسب با غلظت‌ها و گروه‌های آورده شده در جدول ۱ بود. لاروها به مدت ۸ روز در معرض این محلول‌ها قرار گرفتند. در طول دوره آزمایش، لاروها تغذیه نشدند و تعداد تلفات هر گروه به همراه شاخص‌های مورفولوژیک و پاتولوژیک مشاهده و ثبت شدند.

جدول ۱: تعیین گروه‌ها و دزهای ناپروکسن و تیتانیوم دی اکسید مورد استفاده در مطالعه با لارو گورخرماهی

گروه‌ها	توضیحات
کنترل	بدون حضور ناپروکسن یا دی اکسیدتیتانیوم در آب حاوی لارو
۲T	۲ میلی‌گرم در لیتر دی اکسید تیتانیوم در آب همراه با لارو
۲T50N	۲ میلی‌گرم در لیتر دی اکسید تیتانیوم و ۵۰ میکروگرم در لیتر ناپروکسن در آب همراه با لارو
۴T	۴ میلی‌گرم در لیتر دی اکسید تیتانیوم در آب همراه با لارو
۴T100N	۴ میلی‌گرم در لیتر دی اکسید تیتانیوم و ۱۰۰ میکروگرم در لیتر ناپروکسن موجود در آب همراه با لارو (این گروه در همان ساعات اولیه با تلفات روبرو شدند و مورد آزمون آنژیومی و محصولات اکسیداتیو قرار نگرفتند)
۵۰N	۵۰ میکروگرم در لیتر ناپروکسن در آب همراه با لارو
۱۰۰N	۱۰۰ میکروگرم در لیتر ناپروکسن در آب همراه با لارو

تست ارزیابی پراکسیداسیون لیپیدی: در این آزمون برای ارزیابی میزان پراکسیداسیون لیپیدی، سطح مالون دی‌آلدئید سنجیده شده است. در اثر واکنش بین سطح مالون دی‌آلدئید و تیوباربیتوریک اسید (TBA) در دمای بالا، یک کمپلکس رنگی مالون دی‌آلدئید-اسید تیوباربیتوریک تولید شد. میزان تولید مالون دی‌آلدئید به‌عنوان شاخصی از پراکسیداسیون لیپیدی در طول موج ۵۳۵ نانومتر و با دستگاه اسپکترومتری سنجیده شد که محتویات کیت در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲: محتویات کیت تشخیصی میزان پراکسیداسیون لیپیدی با شاخص سطح مالون دی‌آلدئید

محتویات کیت	۴۸ تست
معرف ۱	پودر
معرف ۲ (۵x)	۶ میلی‌لیتر
معرف ۳ (10x)	۳ میلی‌لیتر
معرف ۴	۳ میلی‌لیتر
استاندارد ۵۰۰۰ میکرومول (۲۰- درجه سانتی‌گراد)	۷۰ میکرولیتر
میکروپلیت	۱ عدد

آماده‌سازی نمونه برای تست تشخیصی میزان پراکسیداسیون

لیپیدی: ۵۰ میلی‌گرم از بافت، درون ۵۰۰ میکرولیتر از بافر فسفات سالین (PBS) با میزان pH ۷/۴، توسط هموژنایزر هموژن گردید. سپس میکروتیوب‌ها در ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شدند و در ادامه محلول رویی (سوپرناتانت) با دقت برداشته شد و تا زمان انجام واکنش در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

سنجش سروتونین: سروتونین (۵-هیدروکسی تریپتامین) یکی از محصولات مسیر متابولیسمی تریپتوفان می باشد و عمدتاً در سلول های انتروکروکافینی (EC-Cells) روده، نورون های سروتونرژیک مغز و پلاکت های خون قرار گرفته است و به عنوان یک نوروترنسمیتر شناخته شده در سیستم اعصاب مرکزی عمل می کند. سلول های انتروکروکافینی حدود ۸۰٪ از سروتونین بدن را می سازند. سروتونین به ۵-هیدروکسی ایندول استیک اسید متابولیزه شده و از طریق ادرار دفع می شود. تقریباً تمامی سروتونین در گردش خون، در پلاکت ها حضور دارد و تغییر در سطح سروتونین بدن با بسیاری از بیماری ها مانند سردردهای مزمن، اسکیزوفرنی، فشارخون، بیماری هانتینگتون و... در ارتباط است.

آماده سازی نمونه تست سروتونین: ۵۰ میلی گرم از بافت، درون ۵۰۰ میکرولیتر از بافر فسفات سالین با میزان PH ۷/۴، توسط هموژنایزر هموژن گردید. سپس میکروتیوب ها در ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شدند و در ادامه محلول رویی (سوپرناتانت) با دقت برداشته شد و تا زمان انجام واکنش در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS26 انجام شد. تفاوت بین تیمارها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و به دنبال آن آزمون چند دامنه ای دانکن برای مقایسه تفاوت های معنی دار بین گروه ها مورد ارزیابی قرار گرفت. داده ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار (SD) ارائه شد و معنی داری آماری در حد $p < 0.05$ تنظیم شد.

نتایج

مقدار آنزیم گلوکاتایون احیا، سوپراکسید دیسموتاز که نقش موثری در کاهش استرس ناشی از مواد اکسیداتیو در بدن دارد و نیز مقدار مالون دی آلدئید که یکی از رایج ترین محصولات جانبی پراکسیداسیون لیپیدی در بافت ها است و اغلب به عنوان یک نشانگر زیستی موثر برای ارزیابی پراکسیداسیون لیپیدی در مواجهه گونه های آبی با آلاینده ها و سموم استفاده می شود. با اندازه گیری میزان مالون دی آلدئید در نمونه های بیولوژیک می توان به میزان پراکسیداسیون چربی ها پی برد و از آن به عنوان یک نشانگر برای اندازه گیری سطح استرس اکسیداتیو در یک موجود زنده استفاده نمود که در شکل ۱ نشان داده شده است. بر همین اساس مقدار گلوکاتایون در گروه های دارای تیتانیوم دی اکسید مقدار کم تری را نشان می دهد که نشان دهنده مصرف این آنزیم در جهت مقابله با مواد اکسیداتیو است. کم ترین مقدار گلوکاتایون در گروه 2T50N (۰/۰۲ میلی مول در لیتر) بوده و پس از آن کم ترین مقادیر در گروه های 2T و 4T به مقدار مشابه

تست سوپراکسید دیسموتاز: سوپراکسید دیسموتاز یکی از آنزیم های آنتی اکسیدانت می باشد. این آنزیم رادیکال آزاد سوپراکسید را به هیدروژن پراکسید و اکسیژن تبدیل می کند. در اثر این واکنش رنگی تولید می شود که می توان میزان جذب آن را در طول موج ۴۲۰ نانومتر اندازه گیری نمود. محتویات کیت در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول ۳: محتویات کیت تشخیصی سوپراکسید دیسموتاز	
محتویات کیت	۴۸ تست
معرف ۱ (2x)	بافر غلیظ شده ۱۳ میلی لیتر (۱ ویال)
معرف ۲ آماده برای استفاده	۱/۲ میلی لیتر
معرف ۳	پودر
معرف ۴ رقیق کننده کروموزن	۱/۲ میلی لیتر
میکروپلیت	۱ عدد

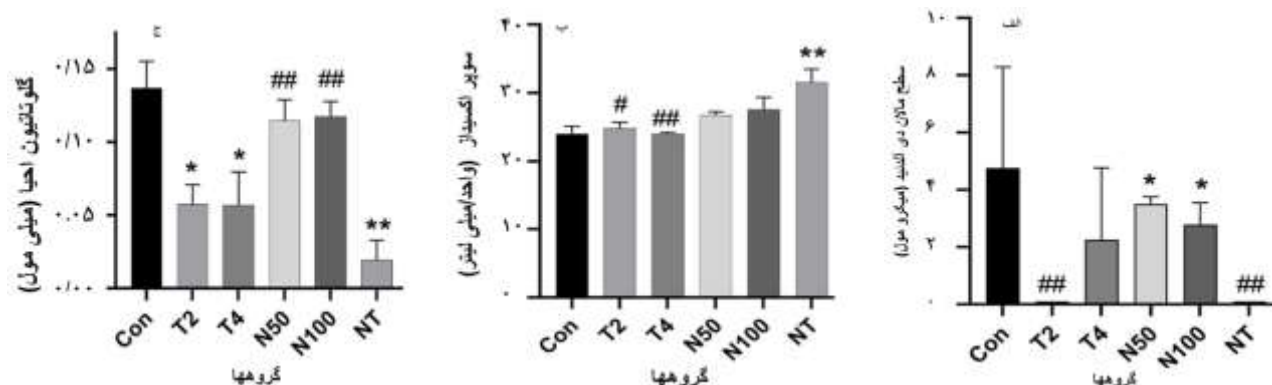
آماده سازی نمونه برای تست سوپراکسید دیسموتاز: پنجاه میلی گرم از بافت، درون ۵۰۰ میکرولیتر از بافر فسفات سالین با میزان PH ۷/۴، توسط هموژنایزر هموژن گردید. سپس میکروتیوب ها در ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شدند و در ادامه محلول رویی (سوپرناتانت) با دقت برداشته شد و تا زمان انجام واکنش در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

تست گلوکاتایون احیا: گلوکاتایون یکی از عمده ترین ترکیب آنتی اکسیدانت داخل سلولی است. این تست بر اساس واکنش بین 2-نیتروبنزوئیک اسید (DNTB) و گلوکاتایون می باشد. در اثر این واکنش ترکیب ۲-نیترو ۵-تیوبنزوئیک اسید تولید می شود که زرد رنگ می باشد. بنابراین می توان غلظت گلوکاتایون را در طول موج ۴۱۲ نانومتر اندازه گیری نمود. محتویات کیت در جدول ۴ نشان داده شده است.

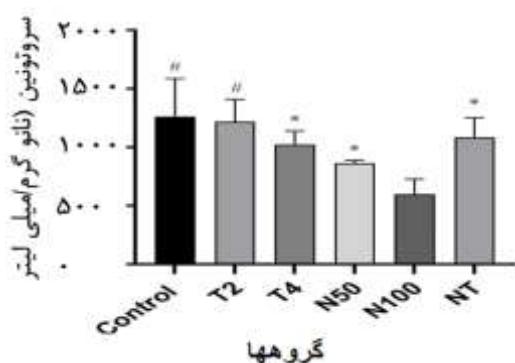
جدول ۴: محتویات کیت تشخیصی تست گلوکاتایون	
محتویات کیت	۴۸ تست
معرف ۱ (بافر سنجش)	۲ میلی لیتر (۱۰ x)
معرف ۲ (عامل رسوب دهنده)	۱/۲ میلی لیتر
معرف ۳ (کروموزن)	پودر
استاندارد (۱ میلی مول)	پودر
میکروپلیت	۱ عدد

آماده سازی نمونه تست گلوکاتایون: پنجاه میلی گرم از بافت، درون ۵۰۰ میکرولیتر از بافر فسفات سالین با میزان PH ۷/۴، توسط هموژنایزر هموژن گردید. سپس میکروتیوب ها در ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شدند و در ادامه محلول رویی (سوپرناتانت) با دقت برداشته شد و تا زمان انجام واکنش در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

توسط سم) القا به بازتولید آن نموده اند. مجدداً مقدار مالون دی آلدئید در گروه های دارای تیتانیوم دی اکسید مشتمل بر گروه های 2T و 2T50N به کم ترین مقدار خود (۰/۱ میلی مول در لیتر نمونه) رسید. از آن جایی که آسیب بافتی دو گروه یاد شده در کم ترین میزان خود در مقایسه با سایر گروه های تیمار بوده است، به تبع تولید اکسیداتیو مالون دی آلدئید در دو گروه یاد شده از حجم کمتری برخوردار است. هرچند مقادیر تغییرات روزها و ساعات اولیه در دسترس نیست، اما به نظر می رسد تغییرات مالون دی آلدئید با مقدار گلوکاتاتیون تولیدی در همه تیمارها وابستگی زیادی داشته و تولید بالای گلوکاتاتیون توانسته در زمان واکنش جبرانی (زمانی پس از تحریک سم) در کاهش و اصلاح مالون دی آلدئید و بهبود بافتی نقش بسیار موثری ایفا نموده که این میزان در اندازه گیری شاخص مورد نظر، از مقادیر کمی برخوردار گردیده است. در هر حال این نتیجه بیانگر بهبود شرایط اکسیداتیو بافتی در دو گروه یاد شده می باشد. البته نظر به این که بررسی مقادیر آزمیمی صرفاً پس از یک هفته پس از تغریخ تخم ها انجام شده، تغییرات کمی در فواصل زمانی مورد نظر ثبت نگردیده و قدرت تجزیه و تحلیل دقیق تر را از محقق گرفته است.



شکل ۱: مقدار محصول مالون دی آلدئید (الف)، آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (ب) و مقدار آنزیم گلوکاتاتیون (ج) با بدن کامل حدوداً ۳۰-۵۰ لارو ماهی در ۱۶۸ ساعت پس از لقاح



شکل ۲: مقدار هورمون سروتونین با بدن کامل لارو ماهی حدوداً ۳۰-۵۰ (۱۶۸ ساعت پس از لقاح)

۰/۰۵۷ میلی مول در لیتر بدون هر گونه اختلاف معنی داری بوده است ($p < 0/05$). بیشترین مقدار گلوکاتاتیون در گروه ۱۰۰N (۰/۱۱۸ میلی مول در لیتر) بدون اختلاف معنی دار ($p < 0/05$) مشخص گردید. با توجه به این که این آنزیم علاوه بر تعادل بخشی به تولید آب اکسیژنه، نقش محرز در حفاظت از بافت ها در تخریب اکسیداتیو دارد، کاهش آن در موارد مسمومیت قابل توجه است. به نظر می رسد در زمان جبران پس از تحریک سم، مقدار بیان ژن گلوکاتاتیون در گروه های کم آسیب پذیر، توسط محرک دارویی القای مناسبی نداشته و مقدار آن در گروه های با تحریک بیش تر از سطح بیان بیش تری برخوردار بوده است. سوپراکسید دیسموتاز به تدریج از گروه های دارای تیتانیوم دی اکسید 2T و 4T (حدود ۲۴ میلی مول در لیتر نمونه) مشاهده شده در شکل ۱ به بیشترین مقدار خود در گروه 2T50N به میزان ۳۱/۵ میلی مول در لیتر نمونه رسید. درخصوص سوپر اکسید دیسموتاز در شکل ۱ نیز به نظر می رسد در واکنش جبرانی به دلیل مصرف کم تر این آنزیم (در مقایسه با گلوکاتاتیون) در آسیب اکسیداتیو ناشی از سم، از سطح بالاتری برخوردار بوده و تمامی گروه ها تقریباً به یک اندازه در واکنش جبرانی (مدت زمانی پس از تحریک بافتی

مقدار هورمون سروتونین به جز گروه های 2T، 4T و 2T50N به طور معنی داری کاهش یافته است (شکل ۲). کمترین مقدار سروتونین در گروه ۱۰۰N (۶۰۰ نانوگرم در میلی لیتر) مشاهده گردید (شکل ۲). اختلال در عملکرد سیستم سروتونین در گروه های ۵۰N، ۱۰۰N و 4T منجر به تشدید حرکت غیرطبیعی در لارو گورخرماهی می شود. مقادیر سروتونین گروه های 2T (۱۲۰۰ نانوگرم در میلی لیتر) و 2T50N (۱۱۰۰ نانوگرم در میلی لیتر) با مقدار کنترل (۱۲۵۰ نانوگرم در میلی لیتر) تفاوت معنی داری را نشان نداد ($P > 0/05$).

بحث

پذیراکسیژنی، اکسیژن ناپایداری هستند که می‌توانند از طریق رادیکال‌های آزاد به بافت‌ها آسیب برسانند و آن‌ها را از بین ببرند که اثر سمیت اکسیژن نامیده می‌شود (۸). هنگامی که میزان این رادیکال‌های آزاد از ظرفیت مهار سیستم دفاعی فراتر رود، منجر به عدم تعادل سیستم اکسیداسیون/آنتی‌اکسیدان و آسیب اکسیداتیو بافت موجود زنده مانند پراکسیداسیون لیپیدی، غیرفعال شدن آنزیم، شکستن دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید (DNA) و غیره می‌شود. سوپر اکسیداز و گلوکاتایون اس ترانسفراز (GST) دو آنزیم مهم درگیر در استرس اکسیداتیو در موجودات هستند. تغییر در فعالیت و محتوای آن‌ها منعکس کننده تعادل سیستم اکسیداسیون/آنتی‌اکسیدانی در موجودات است (۳۱). سوپر اکسیداز یک آنزیم خاص برای از بین بردن آنیون سوپر اکسید (O_2^-) است که می‌تواند با O_2 نامتناسب باشد و آن را به H_2 و O_2 تجزیه کند. این آنزیم نقش مهمی در تعادل اکسیداسیون و آنتی‌اکسیداسیون دارد و یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی است. گلوکاتایون اس ترانسفراز آنزیم‌های متابولیکی مهمی هستند که در ماهی‌ها تبدیل می‌شوند و سیستم اصلی سم‌زدایی برای آسیب آنتی‌اکسیدانی سلولی و ضد سرطان هستند. بافت آبشش اندامی است که گورخرماهی مستقیماً با محلول در معرض نانو ذرات تیتانیوم دی اکسید تماس می‌گیرد، در حالی که کبد محل اصلی تنظیم متابولیسم اکسیداسیون و کاهش اثر است. بنابراین، ما بر روی فعالیت آنزیم‌های مربوط به اکسیداسیون/آنتی‌اکسیداسیون و بیان ژن‌های مربوطه تمرکز کردیم. در گورخرماهی، گلوکاتایون پر اکسیداز (GPX)، سوپر اکسیداز و کاتالاز (CAT) از مهم‌ترین گروه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی هستند. سوپر اکسیداز یک آنزیم میتوکندری بوده و در برابر استرس اکسیداتیو سلول را محافظت می‌کند و باعث تبدیل سوپر اکسید به پراکسید هیدروژن شده و این ماده توسط کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز به اکسیژن مولکولی و آب متابولیزه می‌شود (۵). در مطالعه‌ای مشخص شد که مواجهه گورخرماهی با نانو ذرات تیتانیوم دی اکسید باعث افزایش سطح گلوکاتایون احیا کل در آبشش‌های می‌شود، اما کاهش گلوکاتایون احیا کبدی را باعث می‌گردد (۱۴). بنابراین بعید است که سمیت مشاهده شده در این موجودات به دلیل مصرف نانو تیتانیوم دی اکسید باشد. پیشنهاد شده است که این سمیت می‌تواند به دلیل تنگی نفس و هیپوکسی ناشی از جذب نانو ذره تیتانیوم دی اکسید بر روی سطوح اندام‌های تنفسی و متعاقب آن آسیب به بافت‌ها باشد که به نوعی آسیب غیرمستقیم است (۴). از طرفی این اعتقاد است که افزایش زیاد میزان استرس و مواد واکنش‌پذیر اکسیژنی نهایتاً منجر به کاهش میزان گلوکاتایون احیا در

گورخرماهی می‌گردد ولی تا میزان ۱۰ میلی گرم در لیتر تیتانیوم دی اکسید، را باعث افزایش سطح آن دانستند (۱۰) که با نتایج برخی محققین دیگر که بر روی دافنی و دوکفه‌ای‌ها انجام داده‌اند در یک راستا بود (۶، ۱۷). لذا به نظر می‌رسد زمان نمونه برداری در نشان دادن مقدار این آنزیم‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. فعالیت‌های سوپر اکسیداز، گلوکاتایون پراکسیداز و بیان ژن آن‌ها در کبد با افزایش کوئرستین تا ۱ میکروگرم در لیتر افزایش و پس از آن کاهش یافت. سطح مالون دی آلدئید تحت تأثیر کوئرستین قرار گرفت که در آن مقادیر آن در گروه‌های با کوئرستین ۱ و ۱۰ میکروگرم در لیتر به طور قابل توجهی کم‌تر از گروه کنترل بود. این نتیجه با نتایج این تحقیق کاملاً مشابه بود که نشان داد مقدار مالون دی آلدئید، در تمامی تیمارها به خصوص گروه‌های ۲T و 2T50N کم‌تر از گروه کنترل بود ولی در گروه‌های مخرب هم چون 100-50 N و 4T علی‌رغم اصلاحات اولیه (احتمالاً ساعات و روز های اول پس از مواجهه) مجدداً افزایش یافته ولیکن هم چنان از گروه کنترل کم‌تر بوده است. نتایج سوپر اکسیداز این تحقیق موید این نکته است که افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپر اکسیداز ناشی از افزایش ظرفیت سم‌زدایی بافت است. در سوپر اکسیداز گروه 2T50N بیش‌ترین مقدار را دارد، و در این خصوص نیز به نظر می‌رسد به دلیل مصرف کم‌تر این آنزیم (در مقایسه با گلوکاتایون احیا) در آسیب اکسیداتیو ناشی از سم، از سطح بالاتر برخوردار و تمامی گروه‌ها تقریباً به یک اندازه در واکنش جبرانی (مدت زمان پس از تحریک بافتی توسط سم) القاء و باز تولید شده‌اند. ذرات اکسید نانو فلز می‌توانند مواد واکنش‌پذیر اکسیژنی بیش از حد را تحت نور یا برخی شرایط دیگر تولید کنند. مواد واکنش‌پذیر اکسیژنی فراوان می‌توانند مکانیسم آنتی‌اکسیدانی بدن را با تأثیر بر ارتباطات سلولی و تداخل در متابولیسم سلولی از بین ببرند و در نتیجه اثرات سمی روی ارگان‌های ایجاد کند (۲۳). علاوه بر این، مشخص گردید که نانو ذرات تیتانیوم دی اکسید می‌تواند باعث آسیب پراکسیداسیون لیپیدی در آبشش ماهی قزل‌آلای رنگین کمان و افزایش مقدار ملان دی آلدئید گردد (۱۴). در تحقیقی که توسط Fang و همکاران، انجام شد مشخص گردید که تیتانیوم اکسید باعث افزایش تأثیر پنتاکلروفنل بر مقدار ملان دی آلدئید در گورخرماهی گردیده است که نشان از افزایش تولید پراکسیداسیون لیپیدی در بافت ماهی می‌باشد (۱۲). از طرفی مقدار گلوکاتایون احیا و مقدار سوپر اکسیداز کاهش یافته است. این تغییرات قابل توجه این نشانگرهای زیستی می‌تواند نشانه افزایش تولید مواد واکنش‌پذیر اکسیژنی و در نتیجه استرس اکسیداتیو ناشی از قرار گرفتن در معرض هم‌زمان پنتاکلروفنل با n تیتانیوم دی اکسید باشد. این مطالعه هم چنین مشخص نمود که استرس اکسیداتیو ناشی از مواد واکنش‌پذیر اکسیژنی

8. **Chen, J., Dong, X., Xin, Y. and Zhao, M., 2011.** Effects of titanium dioxide nano-particles on growth and some histological parameters of zebrafish (*Danio rerio*) after a long-term exposure. *Aquat Toxicol.* 101(3-4): 493-499.
9. **Chen, Z., Meng, H., Xing, G., Chen, C., Zhao, Y. and Jia, G., 2006.** Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. *Toxicol Lett.* 163(2): 109-120.
10. **Clemente, Z., Castro, V., Moura, M., Jonsson, C. and Fraceto, L., 2014.** Toxicity assessment of TiO₂ nanoparticles in zebrafish embryos under different exposure conditions. 147: 129-139.
11. **Comber, S., Gardner, M., Sörme, P., Leverett, D. and Ellor, B., 2018.** Active pharmaceutical ingredients entering the aquatic environment from wastewater treatment works: a cause for concern? *Sci Total Environ.* 613: 538-547.
12. **Fang, Q., Shi, X., Zhang, L., Wang, Q., Wang, X. and Guo, Y., 2015.** Effect of titanium dioxide nanoparticles on the bioavailability, metabolism, and toxicity of pentachlorophenol in zebrafish larvae. *J Hazard Mater.* 283: 897-904.
13. **Farrell, A.P., 2011.** Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment. Academic press.
14. **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 physiological effects. *Aqua toxicol.* 84(4): 415-430.
15. **Fu, J., Guo, Y., Yang, L., Han, J. and Zhou, B., 2020.** Nano-TiO₂ enhanced bioaccumulation and developmental neurotoxicity of bisphenol a in zebrafish larvae. *Environ Res.* 187: 109682.
16. **Handy, R.D., Owen, R. and Valsami-Jones, E., 2008.** The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology.* 17(5): 315-325.
17. **Kim, K.T., Klaine, S.J., Cho, J., Kim, S.H. and Kim, S.D., 2010.** Oxidative stress responses of *Daphnia magna* exposed to TiO₂ nanoparticles according to size fraction. *Sci Total Environ.* 408(10): 2268-2272.
18. **Kipen, H.M. and Laskin, D.L., 2005.** Smaller is not always better: nanotechnology yields nanotoxicology. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol.* 289(5): L696-L697.
19. **Li, Q., Wang, P., Chen, L., Gao, H. and Wu, L., 2016.** Acute toxicity and histopathological effects of naproxen in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. *Environ Sci Pollut Res.* 23: 18832-18841.
20. **Lovern, S.B. and Klaper, R., 2006.** *Daphnia magna* mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C60) nanoparticles. *Environ Toxicol Chem Environ Toxicol Chem.* 25(4): 1132-1137.
21. **Moghadam, H., Sourinejad, I., Kalbassi, Mohammad Reza, Johari, S.A. and Ghasemi, Z., 2023.** Use of monohydrate dextrose in zebrafish (*Danio rerio*) as a model to induce hyperglycemia. *J Anim Sci.* 14(4): 187-192 (In Persian).
22. **Moore, M., 2006.** Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environ Int.* 32(8): 967-976.
23. **Nel, A., Xia, T., Madler, L. and Li, N., 2006.** Toxic potential of materials at the nanolevel. *Toxic Potent Mater Nanolev.* 311(5761): 622-627.
24. **Palmer, P.M., Wilson, L.R., O'Keefe, P., Sheridan, R., King, T. and Chen, C.-Y., 2008.** Sources of

به رشد غیرطبیعی در طول جنین زایی کمک می کند. تولید مواد واکنش پذیر اکسیژنی بر سیستم آنتی اکسیدانی تأثیر می گذارد (به عنوان مثال، با کاهش محتوای سوپراکسیداز و گلوکاتیون احیا) و اگر استرس اکسیداتیو بر سیستم دفاعی غلبه کند، آسیب اکسیداتیو رخ می دهد که می تواند باعث پراکسیداسیون لیپیدی (سطح مالان دی آلدئید) و سمیت ژنی (آسیب دئوکسی نوکلئوتیک اسید، اندازه گیری شده به عنوان OHdG-8) گردد (۲۹). نتایج تحقیق موید این نکته است که غلظت های بالای تیتانیوم دی اکسید و ناپروکسن می تواند موجب تولید مقادیر بالاتری از مواد واکنش پذیر اکسیژنی شود که در این تحقیق توانسته بر سیستم آنتی اکسیدانی با کاهش محتوای سوپراکسیداز و گلوکاتیون احیا تأثیر بگذارد که حتی در مقادیر بالا، استرس اکسیداتیو بر سیستم دفاعی غلبه کرده، آسیب اکسیداتیو رخ دهد که در ادامه باعث افزایش سطح پراکسیداسیون لیپیدی (مالان دی آلدئید) گردد. لذا چنین به نظر می رسد استفاده غیرمعارف از این داروها می تواند بر سیستم ایمنی اثر منفی بگذارد.

منابع

1. **Arias, A.M., 2002.** Developmental biology comes of age: Principles of Development, 2nd edn. *J. Cell Sci.* 115(13): 2623-2624.
2. **Bermudez, E., Mangum, J.B., Asgharian, B., Wong, B.A., Reverdy, E.E., Janszen, D.B., et al., 2002.** Long-term pulmonary responses of three laboratory rodent species to subchronic inhalation of pigmentary titanium dioxide particles. *Toxicol Sci.* 70(1): 86-97.
3. **Bigdeli, M., Shahriari, A., Payghan, R. and Mohammadian, T., 2023.** Investigation of interactive effect of salinity and ammonia poisoning on some hematology factors and enzymes in oxidative stress reactions of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and common carp (*Cyprinus carpio*) liver. *J Anim Environ.* 14(4): 211-220 (In Persian).
4. **Boyle, D., Al-Bairuty, G.A., Henry, T.B. and Handy, R.D., 2013.** Critical comparison of intravenous injection of TiO₂ nanoparticles with waterborne and dietary exposures concludes minimal environmentally-relevant toxicity in juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Environ Pollut.* 182: 70-79.
5. **Brammell, B.F. and Wigginton, A.J., 2010.** Differential Gene Expression in Zebrafish (*Danio rerio*) Following Exposure to Gaseous Diffusion Plant Effluent and Effluent Receiving Stream Water. *Am J Environ Sci.* 6(3).
6. **Canesi, L., Fabbri, R., Gallo, G., Vallotto, D., Marcomini, A. and Pojana, G., 2010.** Biomarkers in *Mytilus galloprovincialis* exposed to suspensions of selected nanoparticles (Nano carbon black, C60 fullerene, Nano-TiO₂, Nano-SiO₂). *Aqua Toxicol.* 100(2): 168-177.
7. **Chen, H.C., Wang, P.L. and Ding, W.H., 2008.** Using liquid chromatography-ion trap mass spectrometry to determine pharmaceutical residues in Taiwanese rivers and wastewaters. *Chemosphere.* 72(6): 863-869.

- pharmaceutical pollution in the New York City Watershed. *Scie Total environ.* 394(1): 90-102.
25. **Ramsden, C., Henry, T. and Handy, R., 2013.** Sub-lethal effects of titanium dioxide nanoparticles on the physiology and reproduction of zebrafish. *Aqua Toxicol.* 126: 404-413.
 26. **Sahu, S.C. and Casciano, D.A., 2009.** Nanotoxicity, from in vitro models to health risks (Chichester: John Wiley & Sons.
 27. **Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C. and Smith, C., 2008.** The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol Rev.* 83(1): 13-34.
 28. **Truong, L., Harper, S.L. and Tanguay, R.L., 2011.** Evaluation of embryotoxicity using the zebrafish model. *Drug Saf Eval : Meth Protoc.* 691: 271-279.
 29. **Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M. and Scoullou, M., 2006.** Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol Environ Saf.* 64(2): 178-189.
 30. **Wang, B., Feng, W.Y., Wang, T.C., Jia, G., Wang, M., and Shi, J.W., 2006.** Acute toxicity of nano-and micro scale zinc powder in healthy adult mice. *Toxicol lett.* 161(2): 115-123.
 31. **Winston, G.W., 1991.** Oxidants and antioxidants in aquatic animals. *Comp Biochem Physiol Part C: Toxicol Pharmacol.* 100(1-2): 173-176.