


Original Research Paper

Protective Effect of Chitosan-Alginate Nanoparticles Containing Curcumin Against Oxidative Stress Caused by Nickel Oxide Nanoparticles in *Carassius auratus*

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

Department of Fisheries, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran

Key Words

Protective effect
Chitosan-Alginate nanoparticles
Curcumin
Oxidative stress
Nickel oxide nanoparticles
Carassius auratus

Abstract

Introduction: Metal oxide nanoparticles are among the most widely used compounds among nanoparticles that have wide applications in various fields. Nanoparticles have high chemical and biological reactivity by increasing their surface to volume ratio, which leads to increased production of free radicals. The generated free radicals disrupt the oxidation state and normal regeneration of body cells and cause oxidative damage in organisms and many diseases. The aim of this study was to investigate the oxidant effect of nickel oxide nanoparticles and also the antioxidant effect of chitosan-alginate nanoparticles in the model alginate model The fish is goldfish.

Materials & Methods: Accordingly, in this study, 5 groups of fish were used for experiments with 4-week treatments. The study groups included the control group, the treatment group with nickel oxide nanoparticles and 3 groups of simultaneous treatment of nickel oxide nanoparticles and alginate-chitosan nanoparticles containing curcumin. 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.

Result: The results showed that treatment with nickel oxide nanoparticles decreased the level of total antioxidants and increased the level of MDA in the nickel oxide nanoparticle treatment group, but the groups that received curcumin-containing alginate-chitosan nanoparticles along with nickel oxide nanoparticles had anti-oxidant parameters.

Conclusion: These results showed strong evidence of induction of cellular oxidative stress due to exposure to nickel oxide nanoparticles as well as the protective effect of curcumin-containing alginate-chitosan nanoparticles.

* Corresponding Author's email: shayan.ghobadi@gmail.com

Received: 23 May 2021; Reviewed: 30 June 2021; Revised: 6 September 2021; Accepted: 11 October 2021

(DOI): [10.22034/AEJ.2021.269668.2454](https://doi.org/10.22034/AEJ.2021.269668.2454)

مقاله پژوهشی

بررسی اثر محافظتی نانوذره کیتوزان-آلژینات حاوی کورکومین در برابر استرس اکسیداتیو حاصل از نانوذره نیکل اکسید در ماهی

مجتبی قربان پوردلاور، شایان قبادی*، صابر وطن دوست، حامد منوچهری، رضا چنگیزی

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

چکیده

کلمات کلیدی

مقدمه: نانوذرات اکسید فلزی از جمله پرکاربردترین ترکیبات در بین نانوذرات هستند و افزایش استفاده از نانوذرات اکسید نیکل نیاز به درک بهتر از تأثیر بالقوه آن‌ها بر موجودات مختلف دارد. پیش‌بینی می‌شود که موجودات آبی به‌عنوان هدف‌های اصلی نانوذرات آزاد شده در محیط باشند، با این حال سمیت نیکل به‌خصوص نانوذره اکسید نیکل در آبزیان خوبی مطالعه نشده است. این پژوهش با هدف بررسی اثر اکسیداتیو نانوذره اکسید نیکل و همچنین اثر آنتی‌اکسیدانی نانوذره کیتوزان-آلژینات حاوی کورکومین در ماهی Goldfish انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه از ۵ گروه ماهی برای انجام آزمایش با تیمارهای ۴ هفته‌ای استفاده شد. گروه‌های مورد مطالعه شامل گروه شاهد، گروه تیمار با نانوذره اکسید نیکل و ۳ گروه تیمار هم‌زمان نانوذره اکسید نیکل و نانوذره آلژینات-کیتوزان حاوی کورکومین بودند.

نتایج: 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 اما گروه‌هایی که نانوذره آلژینات-کیتوزان حاوی کورکومین را در کنار نانوذره اکسید نیکل دریافت نمودند پارامترهای آنتی‌اکسیدانی بهتری را از خود نشان دادند.

نتیجه‌گیری و بحث: این نتایج شواهد محکمی از القای استرس اکسیداتیو سلولی ناشی از قرار گرفتن در معرض نانوذره اکسید نیکل و همچنین اثر محافظتی نانوذره آلژینات-کیتوزان حاوی کورکومین را نشان داد.

اثر محافظتی

نانوذره کیتوزان-آلژینات

کورکومین

استرس اکسیداتیو

نانوذره نیکل اکسید

Carassius auratus

مقدمه

نوآوری‌های جدید علمی در زمینه نانوذرات مهندسی شده (قطر کم‌تر از ۱۰۰ نانومتر حداقل در یک بعد) موجب ایجاد برنامه‌های کاربردی گسترده‌ای در مباحث الکترونیک، مواد شیمیایی، حفاظت از محیط زیست، تصویربرداری پزشکی، تشخیص بیماری، درمان سرطان، ژن درمانی و غیره شده است (۱). نانومواد ممکن است از طریق دستگاه تنفس، پوست (تماس پوستی)، دستگاه گوارش (روده) به‌طور خواسته یا ناخواسته وارد بدن موجودات زنده شوند. در سال‌های اخیر به‌منظور تأمین نیاز غذایی جوامع بشری، توجه بیشتری به منابع آبی معطوف شده است. آبزیان به‌عنوان یکی از منابع غذایی انسان، فلزات سنگین موجود در آب را در بدن خود جمع کرده (تجمع زیستی) و در جریان چرخه‌های زیستی این مواد را به سطوح بالاتر و در نهایت انسان منتقل می‌کنند. موافق‌تری در سرتاسر پوسته زمین وجود دارند و به‌علت حلالیت بالای این ترکیبات، ماهیان به‌طور مستقیم با آن‌ها در تماس هستند (۲). مهم‌ترین فلزات در سم‌شناسی ماهیان شامل آلومینیم، کروم، آهن، نیکل، مس، روی، آرسنیک، کادمیوم، جیوه و سرب می‌باشند. ترکیبات نیکل معمولاً به‌عنوان سموم ژنتیکی، ایمنی و سرطان‌زا برای موجودات زنده تلقی می‌شود. نیکل به‌طور گسترده‌ای در محیط زیست پراکنده است و غلظت آن تابعی از سوخت‌های فسیلی است. جذب نیکل و تجمع آن در اندام‌های مختلف منجر به تغییر متابولیسم، اختلال در محتوای فلزی بافت و پراکسیداسیون چربی‌ها می‌شود. نیکل و ترکیبات آن به‌عنوان کاتالیزورهای صنعتی، به‌طور گسترده‌ای استفاده می‌شوند، با این وجود اطلاعات کم‌تری در ارتباط با سمیت و آثار آسیب‌شناختی حاصل از آن به‌ویژه نانوذره اکسید نیکل در آبزیان وجود دارد. Kovriznykh و همکاران، به بررسی سمیت بلندمدت (۳۰ روزه) نانوذرات اکسید نیکل در ماهی گورخری (*Danio rerio*) بالغ پرداختند (۳). نتایج حاصل نشان داد که سمیت حاد نانوذرات اکسید نیکل پایین است اما تماس دراز مدت با این ترکیب می‌تواند منجر به تجمع آن در بافت شده و افزایش سمیت این ترکیب گردد (۳). در پلاسما، نیکل از طریق باند شدن با آلبومین، ماکروگلوبولین-آلفا ۲ و پلی پپتیدهای کوچک و آمینواسیدها انتقال می‌یابد. وزن مولکولی پایین کمپلکس نیکل و آل-هیس‌تیدین باعث می‌شود که بتواند به راحتی از غشای بیولوژیکی عبور کند (۴). این عنصر از طریق ایجاد اتصالات غیربرگشت با ماکرومولکول‌ها سبب آسیب می‌شود و به‌همین علت موجب اختلال در فعالیت بیولوژیکی سلول‌ها می‌شود. نیکل بعد از ورود به بدن می‌تواند باعث آسیب به بافت‌های مختلفی از جمله کبد، کلیه، شش و بیضه شود (۵). فناوری نانو با بهره‌گیری از ویژگی‌های فیزیکی،

شیمیایی و زیستی مواد در اندازه‌های کم‌تر از ۱۰۰ نانومتر در علوم و صنایع مختلف کاربرد دارد. نانو ذرات به‌علت اندازه فوق العاده کوچک خود به‌نظر می‌رسد با مشکل چندانی برای عبور از سد‌های فیزیولوژیکی درون بدن مواجه نیستند و بنابراین به‌طور موثر از طریق جریان سیستم عروقی در بافت‌های بدن به‌ویژه کبد توزیع می‌گردند. اندازه کوچک نانو ذرات نقش مهمی در سمیت این مواد دارد. نانو ذرات توانایی دارند که از غشای سلول عبور کرده و وارد سلول شوند و به‌طور مستقیم باعث آسیب سلولی شوند. نانوذرات به لحاظ کاربردهای فراوانی که در یک دهه گذشته پیدا کرده‌اند بسیار مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته‌اند (۶). امروزه توجه به مسئله عدم توازن در تولید و حذف رادیکال‌های آزاد و اختلال در حالت اکسیداسیون و احیاء طبیعی سلول‌های بدن که سبب ایجاد آسیب اکسیداتیو در موجودات و در بسیاری از بیماری‌ها می‌گردد، محور اصلی تحقیقات بسیاری از محققین در دنیا قرار گرفته است. به‌طور مثال تحقیقات کلینیکی نشان داده‌اند که ترکیبات دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی در کاهش عوارض ناشی از اختلال در وضعیت احیایی سلولی حاصل از بیماری‌های مختلفی از جمله دیابت نظیر نروپاتی و رتینوپاتی دارای اثرات امیدبخشی هستند. در نانوذرات کاهش اندازه ذرات، باعث افزایش نسبت سطح به حجم ذرات می‌گردد که مهم‌ترین اثر این پدیده، افزایش شدید خواص کاتالیزتی نانو ذرات فلزی می‌باشد. کاهش اندازه ذرات و افزایش نسبت سطح به حجم آن‌ها، واکنش پذیری شیمیایی و زیستی آن‌ها افزایش می‌یابد. این ویژگی منجر به افزایش تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود.

مواد و روش‌ها

سنتز نانوذره کیتوزان-آلژینات: به‌منظور تهیه محلول آلژینات، ابتدا ۰/۰۶ گرم از پودر آلژینات توسط ترازو اندازه‌گیری شد، سپس در ۲۰ میلی لیتر آب مقطر حل گردید. جهت اطمینان از حل شدن کامل پودر آلژینات، محلول آلژینات می‌بایستی چند بار با هم‌زن مغناطیسی مخلوط شود تا خوب حل گردد. سپس محلول به‌دست آمده را می‌توان با استفاده از دستگاه pH متر به pH مورد نظر رسانید بدین‌منظور به محلول آلژینات تهیه شده قطره قطره محلول‌های اسیدی (استیک اسید) یا بازی (NaOH) اضافه گردد تا این‌که دستگاه pH متر، مقدار pH مورد نظر (pH=۵/۱) را نشان دهد. برای تهیه نانو ذره کیتوزان، ابتدا ۰/۰۶۴ گرم پودر کیتوزان وزن شد و سپس در محلول استیک اسید حل گردید. برای تهیه محلول استیک اسید، حدود ۱۰۰ میکرولیتر از استیک اسید گلاسیال را به ۱۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد و حدود ۸ میلی لیتر از آن را برداشته و در پودر

دریافت نمودند (تیمار ۳). پس از پایان دوره نمونه‌های کبد به سرعت جداسازی شدند و جهت بررسی آسیب‌های اکسیداتیو جمع‌آوری و تا زمان انجام آزمایشات در فریزر نگهداری شد.

هموزن‌سازی بافت:

در این تحقیق به منظور هموزن کردن بافت کبد ماهی از دستگاه هموزنایزر استفاده شد. سپس بعد از اندازه‌گیری وزن بافت‌های کبدی، آن‌ها را به لوله فالكون انتقال دادیم و به‌ازای 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 هموزن‌سازی، 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 سانتی‌گراد نگهداری شد.

اندازه‌گیری سطح آنتی‌اکسیدان تام:

در این تحقیق سطح آنتی‌اکسیدان تام در گروه‌های مورد بررسی با استفاده از روش FRAP (قدرت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها در جهت احیاء فریک به فرو) مورد سنجش قرار گرفت. در این روش، سطح آنتی‌اکسیدان‌های نمونه بر اساس قدرت آن‌ها در اثر احیاء یون فریک به یون فرو اندازه‌گیری می‌شود. ماده اصلی مورد استفاده در روش FRAP به نام TPTZ (2,4,6-tripyrnyl-s-triazine) می‌باشد. این ترکیب میل زیادی جهت اتصال با یون فریک دارد و بنابراین با آن کمپلکس Fe^{3+} -TPTZ تشکیل می‌دهد (شکل ۱). 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. **روش اندازه‌گیری:** مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول کار FRAP برداشته و مقدار ۵۰ میکرولیتر از نمونه به آن اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری ۳۷ °C قرار گرفت. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۳ nm توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد. لازم به ذکر است که محلول بلانک نیز حاوی ۱ میلی‌لیتر از محلول آماده به کار FRAP به اضافه ۵۰ μ l از آب مقطر می‌باشد. جهت محاسبه میزان آنتی‌اکسیدان تام موجود در نمونه‌های مورد مطالعه از نمودار استاندارد $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ استفاده شد و برحسب میکرومول بر لیتر (μ mol/L) گزارش شد.

اندازه‌گیری سطح مالون‌دی‌آلدهید:

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 چند مرحله‌ای از واکنش‌های شیمیایی به ترکیبات ثانویه دیگری نظیر آلدئیدها و

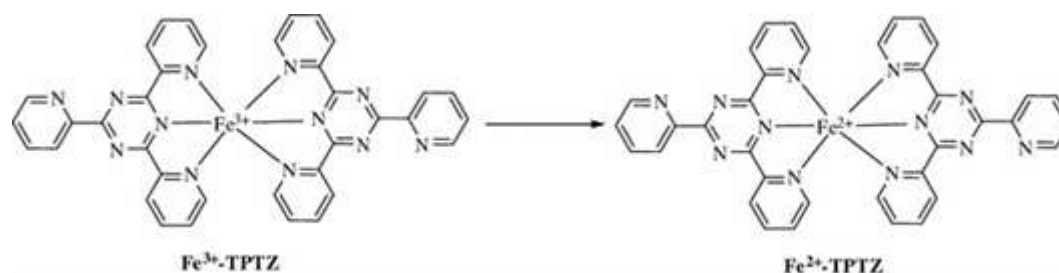
کیتوزان حل کرد. سپس محلول به دست آمده را می‌توان با دستگاه pH متر به pH مورد نظر ($pH=5/4$) رساند. به منظور تشکیل نانوکپسول آلژینات-کیتوزان حاوی کورکومین، ابتدا ۰/۰۶ گرم از آلژینات را در حدود ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید سپس توسط دستگاه pH متر به pH برابر با ۵/۱ رسانید. سپس به مقدار ۰/۰۰۶۴ گرم از پودر کیتوزان در ۸ میلی‌لیتر محلول استیک اسید ۱ درصد حل شد. هم‌چنین محلول به دست آمده را توسط دستگاه pH متر به pH برابر با ۵/۴ رسانید و هم‌مین‌طور، حدود ۰/۰۱۳۴ گرم نمک کلسیم کلرید اندازه‌گیری شد و این نمک در ۴ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید و سپس برای تهیه نانوکپسول، ابتدا محلول آلژینات را درون بشر ریخت و یک مگنت را درون بشر گذاشت و بشر را بر روی استیرر قرار داد و محلول کلسیم کلرید را قطره قطره به محلول آلژینات در حدود ۳۰ دقیقه و در دور ۵۰۰ rpm اضافه گردید و پس از آن، حدود ۵۰۰ میلی‌گرم کورکومین به محلول کیتوزان اضافه گردید و کیتوزان حاوی کورکومین در حدود یک ساعت و به صورت قطره قطره به آن‌ها اضافه شد و در نهایت یک ساعت بر روی استیرر قرار گرفت تا این‌که به خوبی انکپسوله شد. سپس محلول به دست آمده در دور ۱۲۰۰۰ در مدت زمان ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و پس از اتمام سانتریفیوژ، محلول رویی و رسوب که حالت ژله‌ای داشت به راحتی جدا شد و برای مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

گروه‌های مورد مطالعه:

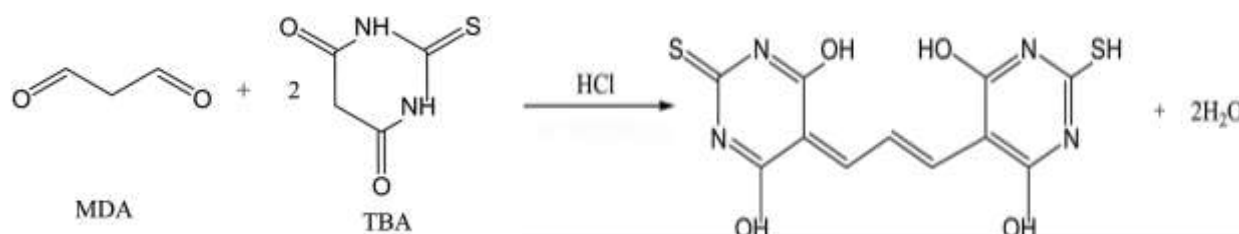
از غذای تجاری موجود برای ماهی به مدت ۲ هفته قبل از شروع آزمایش به منظور تطابق *Carassius auratus* به رژیم‌های غذایی و آزمایشگاه مورد استفاده قرار گرفت. پس از این دوره تطابق، برای انجام آزمایشات تجربی از ۵ آکواریوم با هوادهی پیوسته استفاده شد که در هر کدام از آن‌ها تعداد ۱۲ عدد از Goldfish قرار گرفت. دمای آب و pH در این آزمایش به ترتیب 20 ± 0.5 و 8 ± 0.4 بود و طی دوره آزمایش به طور کامل ثابت نگه داشته شد. تیمارهای نانوذره نیکل و کورکومین در یک دوره ۴ هفته‌ای انجام 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 قرار خواهند گرفت. گروه سوم ۴ هفته تحت تیمار هم‌زمان نانوذره نیکل و نانوذره آلژینات-کیتوزان حاوی کورکومین قرار گرفتند (تیمار ۱). گروه چهارم که دو هفته اول تنها نانوذره آلژینات-کیتوزان حاوی کورکومین را دریافت نموده و دو هفته بعد تیمار هم‌زمان نانو ذره نیکل و نانوذره آلژینات-کیتوزان حاوی کورکومین را دریافت کردند (تیمار ۲). گروه پنجم که دو هفته اول تیمار هم‌زمان نانوذره نیکل و نانوذره آلژینات-کیتوزان حاوی کورکومین را دریافت کرده و دو هفته بعد را تنها نانوذره آلژینات-کیتوزان حاوی کورکومین را

درجه سانتی گراد) و محیط اسیدی می باشد. در اثر واکنش MDA با TBA دو مول H₂O و یک مول MDA-TBA تولید می شود که در شکل ۲ مشاهده می شود (۸). کمپلکس MDA-TBA دارای رنگ صورتی کم رنگ می باشد که با چشم غیر مسلح نیز قابل مشاهده است.

کتون ها شکسته می شوند. از آن جاکه MDA در مقایسه با دیگر ترکیبات آلدهیدی پایدارتر است به عنوان یک ابزار تشخیصی مناسب جهت اندازه گیری میزان پراکسیداسیون لیپید به کار می رود (۷). روش تیو باربیتوریک اسید رایج ترین و ساده ترین روش مورد استفاده برای اندازه گیری مالون دی آلدهید تحت شرایط دمایی بالا (حدود ۱۰۰



شکل ۱: احیای یون فریک به فرو در روش FRAP (۹)



شکل ۲: واکنش مالون دی آلدهید با معرف TBA

روش اندازه گیری: واکنش در کوت ۱ میلی لیتری انجام گرفت. حجم مخلوط واکنش ۱ میلی لیتری که شامل ۳۳۲ میکرو لیتر محلول ۳۰ میلی مولار آب اکسیژنه و ۶۶۶ میکرو لیتر بافر فسفات و ۲ میکرو لیتر نمونه می باشد. واکنش با افزودن سوپسترا شروع و تغییرات جذب به مدت ۱ دقیقه در طول موج ۲۴۰ nm و دمای ۲۵ درجه اندازه گیری شد. فعالیت آنزیم در واحد زمان در میلی لیتر نمونه طبق فرمول زیر محاسبه شد. بر طبق تعریف، یک واحد کاتالاز مقدار آنزیمی است که موجب تجزیه یک میکرومول آب اکسیژنه در مدت یک دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد شود.

$$U/g \text{ Hb} = (\Delta OD \times V_t) / (\epsilon \times V_s \times C)$$

$$V_t = \text{حجم کل واکنش}$$

$$V_s = \text{مقدار نمونه}$$

$$\Delta OD = \text{تغییرات ضریب جذب در یک دقیقه}$$

$$\epsilon = \text{ضریب جذب}$$

$$C = \text{غلظت پروتئین (mg/ml)}$$

 ضریب جذب مورد استفاده در این آزمایش مربوط به H₂O₂ می باشد که مساوی با ۳۹/۴ M-1Cm-1 می باشد.

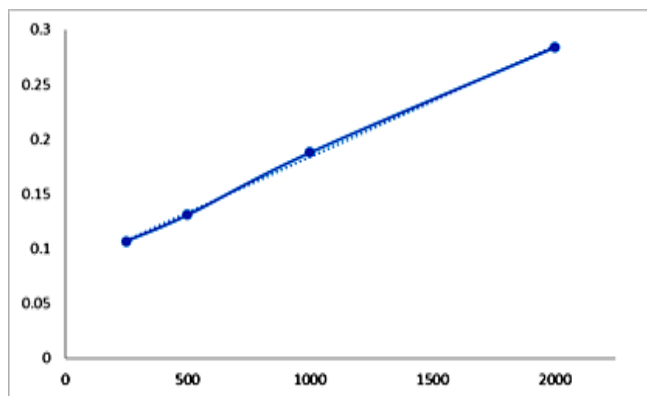
سنجش فعالیت آنزیم گلو تاتیون S-ترانسفراز: اندازه گیری فعالیت آنزیم گلو تاتیون S-ترانسفراز با استفاده از روش Habig و همکاران انجام شد (۱۲). در این روش از بافر فسفات پتاسیم با غلظت ۱۰۰ میلی مولار با pH=۶/۵ استفاده شد.

اندازه گیری سطح مالون دی آلدهید در گروه های مورد بررسی با استفاده از روش اسپکتوفوتومتری و براساس روش Aust و Buege انجام شد (۱۰). معرف MDA شامل تیو باربیتوریک اسید (TBA)، تری کلرو استیک (TCA)، هیدروکلریک اسید (HCL) در آب مقطر می باشد.

روش اندازه گیری: سپس ۵۰ میکرو لیتر از نمونه به ۱۹۵۰ میکرو لیتر معرف MDA اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در آب ۱۰۰ درجه قرار داده شد. بعد از خنک شدن محلول به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۵۰۰ g سانتریفیوژ شد. ۱ میلی لیتر از محلول رویی نمونه سانتریفیوژ شده برداشته و جذب آن در طول موج ۵۳۵ نانومتر خوانده شد. هم چنین محلول بلانک حاوی ۵۰ میکرو لیتر آب مقطر و ۱۹۵۰ میکرو لیتر از معرف MDA مخلوط و همانند بالا آزمایش انجام شد. غلظت MDA با استفاده از ضریب خاموشی ۱۵۶ mM-1Cm-1 بر اساس قانون بیر لامبرت ($A = \epsilon dc$) محاسبه و به صورت nmol/ml گزارش گردید.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز: سنجش این آنزیم مطابق با روش Aebi با روش اسپکتروفوتومتری با استفاده از سوپسترای پراکسید هیدروژن انجام شد (۱۱) بافر مورد استفاده در این آزمایش فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار می باشد.

اسپکتروفتومتر صفر گردید. جهت خواندن جذب استاندارد ۲۰۰-۱۲/۵ به هریک از لوله‌ها ۱۵۲۰ میکرولیتر محلول نهایی و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول استاندارد اضافه شده و در طول موج ۴۱۲ نانومتر جذب قرائت گردید.



شکل ۳: منحنی استاندارد گلو تاتیون

به ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه کبدی، ۱۰۰ میکرولیتر معرف TGA رقیق شده اضافه گردید و پس از ورتکس نمونه به مدت ۳ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شد. به ۱۰۰ میکرولیتر از محلول روبی، ۱۵۲۰ میکرولیتر (محلول نهایی) افزوده و در طول موج ۴۱۲ نانومتر جذب قرائت گردید.

سنجش سوپراکسید دیسموتاز: سنجش این آنزیم مطابق با روش Sun و همکاران انجام شد (۱۵).

روش اندازه‌گیری: حجم نهایی مخلوط واکنش ۳ ml است. غلظت نهایی مواد مورد استفاده در واکنش شامل ۰/۱ mM گزانتین، ۰/۱ mM EDTA، ۵۰ mg/L آلبومین سرم گاوی، ۲۵ μM NBT، ۹/۹ nM گزانتین اکسیداز و ۴۰ mM Na₂CO₃ (pH ۱۰/۲) می‌باشد. در هر لوله ۲/۴۵ ml معرف سنجش SOD (تهیه شده در فوق) و ۰/۵ ml نمونه کبدی و یا آب به عنوان بلانک و محلول استاندارد Cu-ZnSOD با غلظت ۲۵ ng اضافه شد. واکنش با افزودن ۵۰ μl 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 ۰/۸ mmol/L CuCl₂ به هر لوله واکنش متوقف و تغییرات جذب فورمازان تشکیل شده در ۵۶۰ nm قرائت و درصد مهار به صورت زیر محاسبه شد:

$$\text{مهار \%} = \frac{(A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{blank}}} \times 100\%$$

برای محاسبه از مهار استاندارد محلول SOD ۲۵ ng استفاده شد. یک واحد SOD مقدار پروتئینی است که احیاء NBT را تا ۵۰٪ مهار می‌کند.

روش اندازه‌گیری: محلول نهایی جهت قرائت جذب در اسپکتروفتومتر حاوی ۲۸۵۰ میلی‌لیتر از بافر فسفات پتاسیم، ۵۰ میکرولیتر نمونه هموزن 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 اندازه‌گیری و سپس تغییرات جذب در دقیقه محاسبه شد. محاسبه فعالیت ویژه آنزیم با استفاده از ضریب جذب مولی ۱-کلرو ۴و۲ 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:

$$U/ml = (\Delta OD \times V_t) / (\epsilon \times V_s)$$

سنجش فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز: برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز در گروه‌های مورد بررسی از روش Bradley و همکاران استفاده شد (۱۳).

روش اندازه‌گیری: معرف دیانیزیدین و پراکسید هیدروژن همراه با بافر فسفات در کوت به حجم ۳ ml رسانده شد. بعد از بلانک کردن اسپکتروفتومتر نمونه به کوت حاوی معرف سنجش اضافه شد و تغییرات جذب در طول موج ۴۶۰ نانومتر به مدت ۲ دقیقه قرائت شد و تغییر جذب جهت محاسبه فعالیت آنزیم مورد استفاده قرار گرفت. قابل ذکر است که محلول بلانک به جای نمونه حاوی بافر فسفات می‌باشد. میزان فعالیت آنزیم طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$U/L = (\Delta OD \times V_t) / (\epsilon \times V_s)$$

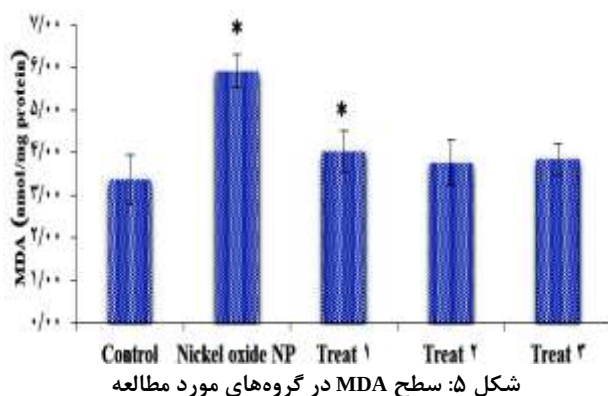
در این آزمایش از ضریب جذب دیانیزیدین برای محاسبه فعالیت آنزیم استفاده شد که مقدار آن مساوی با ۱۱/۳ mM-1cm-1 بود.

اندازه‌گیری گلو تاتیون: برای سنجش میزان گلو تاتیون، از روش Tietz استفاده شد (۱۴). جهت انجام این آزمایش از بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار استفاده شد. محلول استاندارد گلو تاتیون در غلظت‌ها ۱۲/۵ الی ۲۰۰ میکرومولار تهیه شد و برای رسم منحنی استاندارد گلو تاتیون استفاده شد. غلظت گلو تاتیون بر حسب میکرومولار میلی گرم پروتئین محاسبه شد.

محلول‌های مورد استفاده: تهیه بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار (pH: ۷/۵): ۱/۷۹ گرم سدیم دی‌هیدروژن فسفات در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. ۰/۳۸ گرم پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. دو محلول فوق را در یک بشر ریخته و به نسبتی حل کرده تا به pH=۷/۵ برسد. ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار + ۰/۲۳۴ گرم EDTA، ۰/۱۱۸۹ گرم DTNB در ۵ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد.

روش اندازه‌گیری: مخلوطی از ۱۵۲۰ میکرولیتر محلول نهایی به همراه ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر تهیه و توسط آن دستگاه

گروه تیمار شده با نانوذره اکسید نیکل $5/91 \pm 0/40$ ، گروه تیمار ۱ برابر با $4/02 \pm 0/49$ ، گروه تیمار ۲ برابر با $3/77 \pm 0/55$ و گروه تیمار ۳ برابر با $3/85 \pm 0/37$ بود. براساس آزمون آنوا مشخص شد که تفاوت معنی داری بین گروه های مورد مطالعه در سطح کمتر از $0/001$ وجود دارد. براساس تست تعقیبی توکی مشخص شد که سطح MDA در گروه تیمار شده با نانوذره اکسید نیکل افزایش معنی داری در مقایسه با گروه شاهد دارد. در گروه تیمار ۱ که به طور همزمان نانوذره اکسید نیکل و نانوذره کورکومین را دریافت کردند سطح MDA در مقایسه با گروه تیمار شده با نانوذره اکسید نیکل کاهش معنی داری نشان داد. اگرچه سطح MDA این گروه در مقایسه با گروه تیمار شده با نانوذره اکسید نیکل کاهش معنی داری نشان داد ولی در مقایسه با گروه شاهد همچنان سطح بالاتری داشت ($p < 0/001$). در گروه تیمار ۲ و ۳ که به طور همزمان نانوذره کورکومین ولی نانوذره اکسید نیکل با مدت زمان کمتر را دریافت کردند نیز مقدار MDA در مقایسه با گروه تیمار شده با نانوذره اکسید نیکل کاهش معنی داری نشان داد ولی در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی داری را نشان نداد. به عبارت دیگر در دو گروهی که در مدت زمان کمتری در مواجهه با نانوذره اکسید نیکل قرار داشتند اکسیداسیون لیپیدی به طور موثرتری توسط نانوذره کورکومین ممانعت شد.



تأثیر نانو ذرات اکسید نیکل و کورکومین بر سطح GSH:

سطح GSH در گروه های مورد مطالعه اندازه گیری شد و نتایج آن در شکل ۶ نشان داده شد. مقدار GSH در گروه شاهد $23/38 \pm 1/35$ ، گروه تیمار شده با نانوذره اکسید نیکل $15/45 \pm 1/15$ ، گروه تیمار ۱ برابر با $17/1 \pm 4/37$ ، گروه تیمار ۲ برابر با $22/02 \pm 1/51$ و گروه تیمار ۳ برابر با $21/93 \pm 1/55$ بود. براساس آزمون آنوا مشخص شد که تفاوت معنی داری بین گروه های مورد مطالعه در سطح کمتر از $0/001$ وجود دارد. براساس تست تعقیبی توکی مشخص شد که سطح GSH در گروه تیمار شده با نانوذره اکسید نیکل کاهش معنی داری

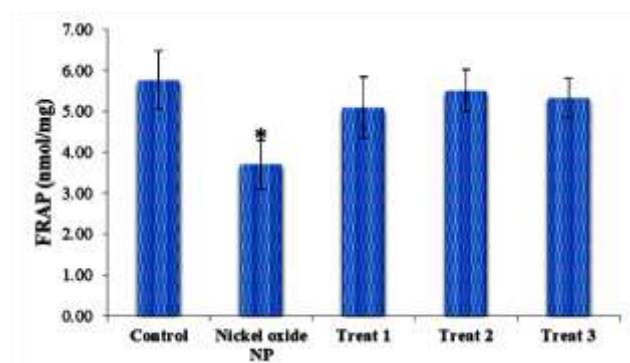
تجزیه و تحلیل داده ها: نتایج آزمایشات با استفاده از برنامه

SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. از آزمون ANOVA برای بررسی تفاوت میانگین نتایج کمی بین گروه های مربوطه مورد استفاده قرار گرفت. نمودار فعالیت هر آنزیم توسط نرم افزار Excel رسم شد. از آزمون تعقیبی توکی برای مقایسه گروه های مورد مطالعه استفاده شد.

نتایج

تأثیر نانوذرات اکسید نیکل و کورکومین بر سطح آنتی اکسیدان

تأثیر نانوذرات اکسید نیکل و کورکومین بر سطح آنتی اکسیدان: سطح آنتی اکسیدان تام در گروه های مورد مطالعه با استفاده از روش FRAP اندازه گیری شد و نتایج آن در شکل ۴ نشان داده شد. این مقدار در گروه شاهد $5/76 \pm 0/71$ ، گروه تیمار شده با نانوذره اکسید نیکل $3/0 \pm 0/59$ ، گروه تیمار ۱ برابر با $5/10 \pm 0/75$ ، گروه تیمار ۲ برابر با $5/51 \pm 0/51$ و گروه تیمار ۳ برابر با $5/03 \pm 0/50$ بود. براساس آزمون آنوا مشخص شد که تفاوت معنی داری بین گروه های مورد مطالعه در سطح کمتر از $0/001$ وجود دارد. براساس تست تعقیبی توکی مشخص شد که سطح آنتی اکسیدان تام در گروه تیمار شده با نانوذره اکسید نیکل کاهش معنی داری در مقایسه با گروه شاهد دارد. در گروه تیمار ۱ که به طور همزمان نانوذره اکسید نیکل و نانوذره کورکومین را دریافت کردند سطح آنتی اکسیدان تام در مقایسه با گروه شاهد کمتر بود ولی این کاهش معنی دار نبود. در گروه تیمار ۲ و ۳ که به طور همزمان نانوذره کورکومین ولی نانوذره اکسید نیکل با مدت زمان کمتر را دریافت کردند نیز مقدار آنتی اکسیدان تام با گروه شاهد تفاوت معنی داری نشان نداد.

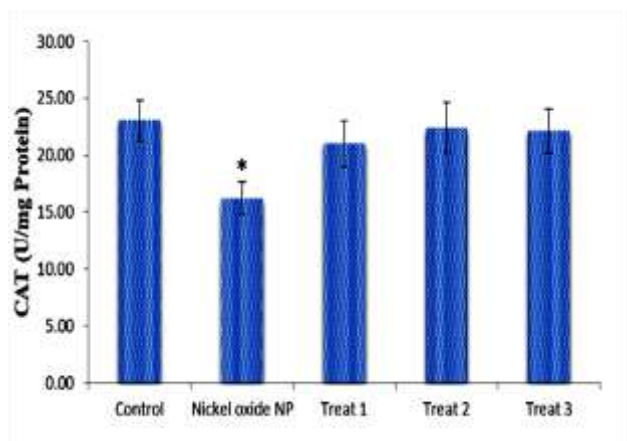


شکل ۴: نمودار میانگین سطح آنتی اکسیدان تام در گروه های مورد مطالعه

تأثیر نانو ذرات اکسید نیکل و کورکومین بر سطح MDA:

سطح MDA در گروه های مورد مطالعه اندازه گیری شد و نتایج آن در شکل ۵ نشان داده شد. مقدار MDA در گروه شاهد $3/36 \pm 0/59$ ،

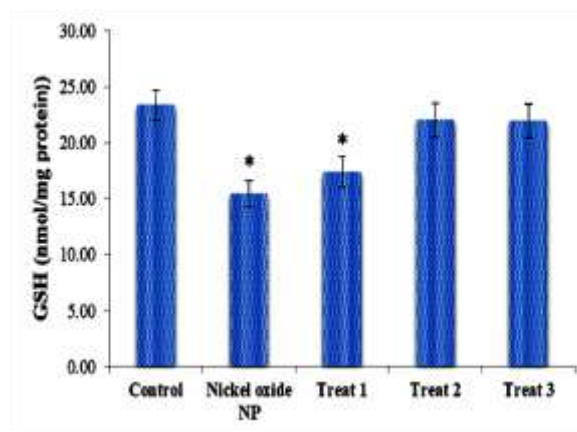
ولی نانوذره اکسید نیکل با مدت زمان کمتر را هم زمان دریافت کردند نیز فعالیت کاتالاز با گروه شاهد تفاوت معنی داری نشان نداد. در نهایت، گروه های تیمار ۱، ۲ و ۳ فعالیت کاتالاز به طور معنی داری بیش تر از ماهیانی بود که تنها نانوذره اکسید نیکل را دریافت کرده بودند.



شکل ۷: فعالیت کاتالاز در گروه های مورد مطالعه

تأثیر نانو ذرات اکسید نیکل و کورکومین بر فعالیت میلو پراکسیداز: فعالیت میلوپراکسیداز در گروه های مورد مطالعه اندازه گیری شد و نتایج آن در شکل ۸ نشان داده شد. این مقدار در گروه شاهد $46/87 \pm 3/23$ ، گروه تیمار شده با نانوذره اکسید نیکل $22/71 \pm 2/75$ ، گروه تیمار ۱ برابر با $45/31 \pm 2/71$ ، گروه تیمار ۲ برابر با $44/20 \pm 2/79$ و گروه تیمار ۳ برابر با $45/83 \pm 2/05$ بود. بر اساس آزمون آنوا مشخص شد که تفاوت معنی داری بین گروه های مورد مطالعه در سطح کمتر از ۰/۰۰۱ وجود دارد. براساس تست تعقیبی توکی مشخص شد که فعالیت میلوپراکسیداز در گروه تیمار شده با نانوذره اکسید نیکل کاهش معنی داری در مقایسه با گروه شاهد دارد. در گروه تیمار ۱ که به طور هم زمان نانوذره اکسید نیکل و نانوذره کورکومین را دریافت کردند فعالیت میلوپراکسیداز در مقایسه با گروه شاهد کمتر بود ولی این کاهش معنی دار نبود. در گروه تیمار ۲ و ۳ که به طور هم زمان نانوذره کورکومین ولی نانوذره اکسید نیکل با مدت زمان کمتر را هم زمان دریافت کردند نیز فعالیت میلوپراکسیداز با گروه شاهد تفاوت معنی داری نشان نداد. در نهایت، گروه های تیمار ۱، ۲ و ۳ فعالیت میلوپراکسیداز به طور معنی داری بیش تر از ماهیانی بود که تنها نانوذره اکسید نیکل را دریافت کرده بودند.

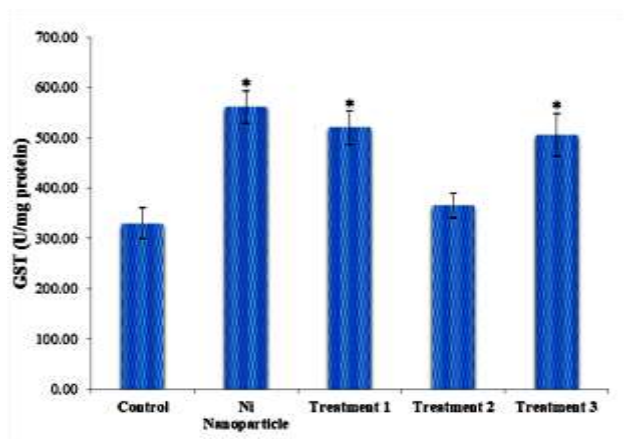
در مقایسه با گروه شاهد دارد. در گروه تیمار ۱ که به طور هم زمان نانوذره اکسید نیکل و نانوذره کورکومین را هم زمان دریافت کردند سطح GSH در مقایسه با گروه تیمار شده با نانوذره اکسید نیکل افزایش معنی داری نشان داد. اگرچه سطح GSH این گروه در مقایسه با گروه تیمار شده با نانوذره اکسید نیکل افزایش معنی داری نشان داد ولی در مقایسه با گروه تیمارهای ۲ و ۳ هم چنان سطح کمتری داشت ($p < 0/001$). در گروه تیمار ۲ و ۳ که به طور هم زمان نانوذره کورکومین ولی نانوذره اکسید نیکل با مدت زمان کمتر را دریافت کردند نیز مقدار GSH در مقایسه با گروه تیمار شده با نانوذره اکسید نیکل افزایش نشان داد ولی در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی داری را نشان نداد. به عبارت دیگر در دو گروهی که در مدت زمان کمتر در مواجهه با نانوذره اکسید نیکل قرار داشتند کاهش سطح GSH به طور موثرتری توسط نانوذره کورکومین ممانعت شد.



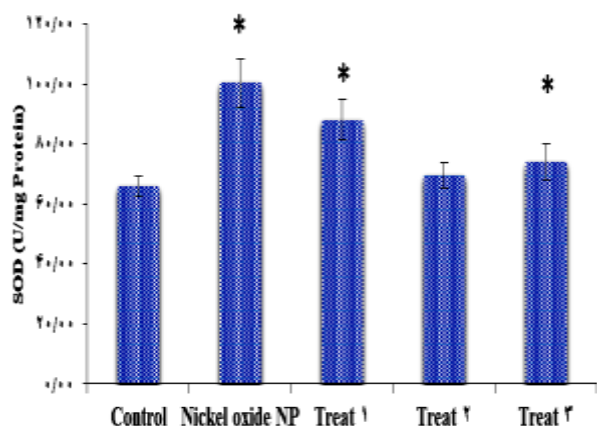
شکل ۶: سطح GSH در گروه های مورد مطالعه

تأثیر نانوذرات اکسید نیکل و کورکومین بر فعالیت کاتالاز: فعالیت کاتالاز در گروه های مورد مطالعه اندازه گیری شد و نتایج آن در شکل ۷ نشان داده شد. این مقدار در گروه شاهد $23/03 \pm 1/80$ ، گروه تیمار شده با نانوذره اکسید نیکل $16/22 \pm 1/42$ ، گروه تیمار ۱ برابر با $20/299 \pm 0/2$ ، گروه تیمار ۲ برابر با $22/43 \pm 2/20$ و گروه تیمار ۳ برابر با $22/10 \pm 1/96$ بود. بر اساس آزمون آنوا مشخص شد که تفاوت معنی داری بین گروه های 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 کاهش معنی داری در مقایسه با گروه شاهد دارد. در گروه تیمار ۱ که به طور هم زمان نانوذره اکسید نیکل و نانوذره کورکومین را دریافت کردند فعالیت کاتالاز در مقایسه با گروه شاهد کمتر بود ولی این کاهش معنی دار نبود. در گروه تیمار ۲ و ۳ که به طور هم زمان نانوذره کورکومین

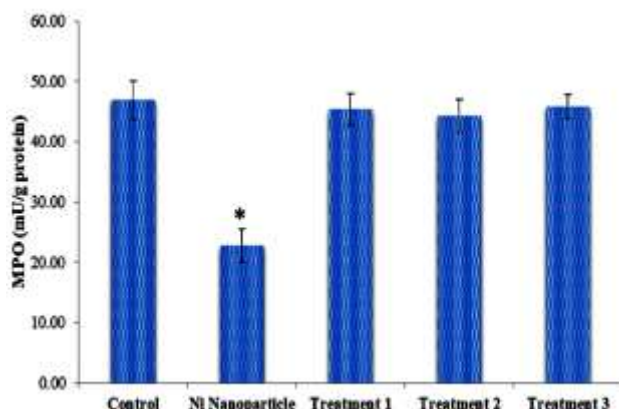
که تفاوت معنی داری بین گروه‌های مورد مطالعه در سطح کم‌تر از ۰/۰۰۱ وجود دارد. براساس تست تعقیبی توکی مشخص شد که فعالیت SOD در گروه تیمار شده با نانوذره اکسید نیکل افزایش معنی داری در مقایسه با بقیه گروه‌ها نشان داد. در گروه تیمار ۲ که به‌طور هم‌زمان نانوذره اکسید نیکل با زمان کم‌تر و نانوذره کورکومین را هم‌زمان دریافت کردند فعالیت SOD در مقایسه با گروه شاهد و تیمار ۳ تفاوت معنی داری نشان نداد ولی در مقایسه با بقیه گروه‌ها کاهش معنی داری نشان داد ($p < 0.001$). در گروه تیمار ۱ که به‌طور هم‌زمان نانوذره کورکومین ولی نانوذره اکسید نیکل با مدت زمان کم‌تر را دریافت کردند نیز فعالیت SOD در مقایسه با گروه تیمار شده با نانوذره اکسید نیکل کاهش نشان داد ولی در مقایسه با بقیه گروه‌ها افزایش معنی داری را نشان نداد. به عبارت دیگر در گروه تیمار ۲ که در مدت زمان کم‌تری در مواجهه با نانوذره اکسید نیکل قرار داشت تغییر در فعالیت SOD به‌طور موثرتری توسط نانوذره کورکومین ممانعت شد.



شکل ۹: فعالیت GST در گروه‌های مورد مطالعه



شکل ۱۰: فعالیت SOD در گروه‌های مورد مطالعه



شکل ۸: فعالیت میلوپراکسیداز در گروه‌های مورد مطالعه

تأثیر نانوذرات اکسید نیکل و کورکومین بر فعالیت GST:

فعالیت GST در گروه‌های مورد مطالعه اندازه‌گیری شد و نتایج آن در شکل ۹ نشان داده شد. مقدار GST در گروه شاهد 329.63 ± 30.80 ، گروه تیمار شده با نانوذره اکسید نیکل 561.30 ± 31.95 ، گروه تیمار ۱ برابر با 520.33 ± 33.38 ، گروه تیمار ۲ برابر با 365.88 ± 24.12 و گروه تیمار ۳ برابر با 505.43 ± 47.21 بود. براساس آزمون آنوا مشخص شد که تفاوت معنی داری بین گروه‌های مورد مطالعه در سطح کم‌تر از ۰/۰۰۱ وجود دارد. براساس تست تعقیبی توکی مشخص شد که سطح GST در گروه تیمار شده با نانوذره اکسید نیکل افزایش معنی داری در مقایسه با گروه شاهد دارد. در گروه تیمار ۱ و تیمار ۳ که به‌طور هم‌زمان نانوذره اکسید نیکل و نانوذره کورکومین را دریافت کردند سطح GST در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی داری نشان داد ولی در مقایسه با گروه تیمار شده با نانوذره اکسید نیکل کاهش معنی داری نشان داد ($p < 0.001$). در گروه تیمار ۲ که به‌طور هم‌زمان نانوذره کورکومین ولی نانوذره اکسید نیکل با مدت زمان کم‌تر را دریافت کردند نیز مقدار GST در مقایسه با گروه تیمار شده با نانوذره اکسید نیکل کاهش نشان داد ولی در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی داری را نشان نداد. به عبارت دیگر در گروه تیمار ۲ که در مدت زمان کم‌تری در مواجهه با نانوذره اکسید نیکل قرار داشت تغییر در فعالیت GST به‌طور موثرتری توسط نانوذره کورکومین ممانعت شد.

تأثیر نانوذرات اکسید نیکل و کورکومین بر فعالیت SOD:

فعالیت SOD در گروه‌های مورد مطالعه اندازه‌گیری شد و نتایج آن در شکل ۱۰ نشان داده شد. مقدار SOD در گروه شاهد 650.81 ± 37.27 ، گروه تیمار شده با نانوذره اکسید نیکل 1000.38 ± 81.18 ، گروه تیمار ۱ برابر با 880.66 ± 68.82 ، گروه تیمار ۲ برابر با 690.61 ± 42.20 و گروه تیمار ۳ برابر با 740.16 ± 61.10 بود. بر اساس آزمون آنوا مشخص شد

بحث

در این مطالعه سطح آنتی اکسیدان تام و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی مختلف در بافت کبدی ماهی های مواجهه شده با نانو ذره اکسید نیکل و هم چنین نقش محافظتی نانو ذره کورکومین مورد بررسی قرار گرفت. اثرات کورکومین در برابر سمیت کبدی ناشی از سموم محیطی یا شغلی مورد تأیید می باشد که به ویژگی آنتی اکسیدانی، ضد التهابی، ضد کلسیاتیک، ضد فیبروزیک و ضد سرطان زایی ذاتی آن نسبت داده شده است. بنابراین، کورکومین با سرکوب التهاب کبدی، کاهش استرس اکسیداتیو کبدی و افزایش بیان آنزیم های سمیت زدای گزنوبیوتیک ها، از کبد در برابر آسیب و فیبروز محافظت می کند. Bita و همکاران، در بررسی اثر نانو ذرات آلژینات-کیتوزان بر توان آنتی اکسیدانی لاکتوباسیلوس پلانترایوم در فیل ماهی جوان (*Huso huso*) به این نتیجه رسیدند ریزپوشانی باکتری با نانو ذرات کیتوزان/آلژینات کارایی پروبیوتیکی باکتری را بهبود بخشید (۱۶). از آن جاکه در مطالعه حاضر نانو ذره اکسید نیکل از طریق جیره غذایی در اختیار ماهی قرار گرفته است، این طور به نظر می رسد که آلاینده مذکور از روده جذب شده و از طریق جریان خون به قسمت های مختلف بدن و هم چنین کبد رسیده است. حضور این ترکیبات در سلول ها می تواند موجب افزایش تولید رادیکال های آزاد و سرانجام تخریب سلولی و از دست رفتن کارکرد طبیعی بافت یا اندام مورد نظر شود. کبد یک اندام مهم در سم زدایی ترکیبات وارد شده به بدن می باشد از این رو کبد یک بافت مستعد آسیب اکسیداتیو القا شده از فلزات موجود در محیط های آبی می باشد. گلو تاتیون با برهم کنش مستقیم گروه تیول (SH) خود با ROS می تواند به عنوان یک آنتی اکسیدان غیر آنزیمی عمل کند، یا می تواند در واکنش سم زدایی آنزیمی برای گونه های اکسیژن فعال به عنوان یک کو فاکتور یا کو آنزیم نقش داشته باشد زیرا این یک تری پتید حاوی سیستمین است که SH واکنش پذیر با توانایی احیایی دارد. بنابراین گلو تاتیون می تواند به عنوان یکی دیگر از مارک های استرس اکسیداتیو در نظر گرفته شود. بر این اساس، نتایج نیز نشان داد که بافت کبد در ماهیان مواجهه یافته با نانو ذره اکسید نیکل کاهش معنی داری در سطح گلو تاتیون داشتند. این کاهش معنی دار در سطح گلو تاتیون می تواند به دلیل توانایی نانو ذره اکسید نیکل به برقراری اتصال با گروه تیول موجود در گلو تاتیون و افزایش تولید ROS توسط این نانو ذره باشد (۱۷). نتایج این تحقیق نشان داد که افزودن نانو ذره کورکومین به جیره غذایی ماهیان سبب تقویت سیستم آنتی اکسیدانی بافت کبدی و ممانعت از اکسیداسیون ماکرومولکوها نظیر پروتئین ها و لیپیدها می گردد. همان طور که در این تحقیق نیز اثبات شد استفاده از نانو ذره کورکومین از افزایش سطح MDA که

در ماهیان تیمار شده با نانو ذره اکسید نیکل مشاهده شد به طور معنی داری ممانعت به عمل آورد. بنابراین افزودن کورکومین به صورت نانو کپسول به جیره غذایی آلوده به نانو ذره اکسید نیکل موجب حفاظت نسبی بافت کبدی در برابر آسیب های حاصل از نانو ذره اکسید نیکل گردید. چنین بهبود وضعیت آنتی اکسیدانی در بافت کبد ماهیان می تواند به نقش حفاظت کنندگی و ویژگی های آنتی اکسیدانی نانو ذره کورکومین اشاره داشته باشد. SOD آنزیم مرتبط با اکسی رادیکال ها است و مسئول دیسموته کردن رادیکال سوپراکسید به O_2 و H_2O_2 می باشد. این آنزیم به استرس ناشی از آلاینده ها بسیار حساس است و می تواند به عنوان سیگنال استرس اکسیداتیو برای هشدار زود هنگام آلودگی محیط زیست مورد استفاده قرار گیرد (۱۸). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که نانو ذره کورکومین به طور معنی داری از کاهش فعالیت SOD جلوگیری می کند. بیشترین اثر ممانعت در مهار فعالیت SOD در تیمار با نانو ذره اکسید نیکل در گروه هایی مشاهده می شود که نانو ذره کورکومین را به صورت پیش تیمار دریافت نمودند. از آنجائی که نانو ذره اکسید نیکل سبب تولید ROS در کبد می شود لذا تغییر در فعالیت SOD می تواند حاکی از استرس اکسیداتیو و آسیب بافتی باشد. افزایش فعالیت SOD ممکن است به دلیل سنتز آنزیم های جدید یا افزایش سطح آنزیم از قبل موجود باشد. CAT و پراکسیداز آنزیم های کلیدی در سیستم های دفاعی آنتی اکسیدانی برای تبدیل رادیکال های آزاد H_2O_2 به آب و اکسیژن هستند. سیستم کاتالاز-پراکسیداز- SOD اولین دفاع در برابر سمیت اکسیداتیو را در سطح سلولی فراهم می کنند. بسیاری از مطالعات تأیید کردند که سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی می تواند به میزان قابل توجهی تحت فشار خاصی از استرس در زمان معین ایجاد شود. در این پژوهش، محتوای آنتی اکسیدانی یک روند در حال تغییر دیده شد به نحوی که در تیمارهای ۴ هفته ای از نانو ذره اکسید نیکل اثر مهاری بیش تری در مقایسه با تیمار ۲ هفته ای با نانو ذره اکسید نیکل مشاهده شد. بنابراین با افزایش زمان قرار گرفتن در معرض نانو ذره اکسید نیکل تأثیرات مخرب بیش تری رخ خواهد داد. از سوی دیگر استفاده از نانو ذره کورکومین به نحو موثری در برابر آسیب های اکسیداتیو مقابله نمود به نحوی که فعالیت وضعیت آنتی اکسیدانی در محدوده گروه شاهد مشاهده شد. نتایج نشان داد که اثر محافظتی نانو ذره کورکومین با پیش تیمار آن تقویت می شود. پیش بینی می شود که احتمالاً نانو ذره کورکومین از دو طریق می تواند در برابر آسیب اکسیداتیو ناشی از نانو ذره اکسید نیکل مقابله نماید که شامل روبش کردن گونه های واکنشگر اکسیژن و یا شلاته کردن اکسید نیکل است. کورکومین علاوه بر فعالیت آنتی اکسیدانی مستقیم خود، با تقویت سنتز گلو تاتیون، که به عنوان یک بستر برای GPx شناخته می شود، می تواند به طور غیر مستقیم به

6. Wells, M.L., Smith, G.J. and Bruland, K.W., 2000. The distribution of colloidal and particulate bioactive metals in Narragansett Bay, RI. *Marine Chemistry*. 71(1): 143-163.
7. Maneesh, M. and Jayalekshmi, H., 2006. Role of reactive oxygen species and antioxidants on pathophysiology of male reproduction. *Indian J. Clin. Biochem*. 21(2): 80-89.
8. Zeb, A. and Ullah, F., 2016. A simple spectrophotometric method for the determination of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in fried fast foods. *Journal of analytical methods in chemistry*. 1-5.
9. Gülçin, I., 2012. Antioxidant Activity of Food Constituents: An Overview. *Archives of Toxicology*. 86: 345-391. <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-011-0774-2>.
10. Buege, J.A. and Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in enzymology*. 52: 302-310.
11. Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods in enzymology*. 105: 121-126.
12. Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biological Chem*. 249: 7130-7139.
13. Bradley, P.P., Priebe, D.A., Christensen, R.D. and Rothstein, G., 1982. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzymemarker. *J Invest Dermatol*. 78(3): 206-209.
14. Paglia, D.E. and Valentine, W.N., 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*. 70(1): 158-169.
15. Sun, Y.I., Oberley, L.W. and Li, Y., 1998. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry*. 34: 97-500.
16. Bitar, S., Mohammadian, T. and Naseri poultaklo, R., 2018. Evaluation anti oxidant potential *Lactobacillus plantarum* nano/microencapsulated by alginat/chitosan on great sturgeon (*Huso huso*). *Journal of Animal Environment*. 10(1): 249-256. (In Persian)
17. Das, K., Das, S. and Dhundasi, S., 2008. Nickel, its adverse health effects & oxidative stress. *Indian journal of medical research*. 128(4): 412.
18. Giannopolitis, C.N. and Ries, S.K., 2009. Superoxide dismutases II. Purification and quantitative relationship Hao, L., Wang, Z. and Xing, B., Effect of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*). *J Environ Sci (China)*. 21(10): 1459-1466.
19. Kazemian, M. and Bakhshi, M., 2020. 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. (In Persian)

عنوان آنتی اکسیدان عمل کند. نکته‌ای که باید به آن توجه داشت این است که همراهی نانوذره کورکومین با نانوذره اکسید نیکل در جیره غذایی موجب کاهش، شدت آسیب‌های اکسیداتیو بافتی وارد شده به کبد ماهیان گروه‌های آزمایشی مورد نظر (تیمارهای ۱، ۲ و ۳) در مقایسه با تیمار شد. هم‌چنین با مقایسه تیمارهای ۱، ۲ و ۳ می‌توان چنین نتیجه گرفت که رویارویی بلندمدت با نانوذره اکسید نیکل موجب شدیدتر شدن آسیب‌های اکسیداتیو وارد شده به بافت کبد ماهیان گردیده است. به عبارت دیگر در گروهی که پیش‌تیمار با نانوذره کورکومین داشتند و در مواجهه با مدت زمان کم‌تری با نانوذره اکسید نیکل بودند از آسیب اکسیداتیو به‌خوبی محافظت شدند. این نتایج با نتایج دیگر محققان هم‌خوانی دارد. نتایج بررسی Bakhshi و Kazemian، حاکی از آن است که نانوذرات روی (Zn) در محیط‌های آبی با غلظت‌های بالا و افزایش مدت زمان رویارویی با این نانوذره، باعث افزایش استرس اکسیداتیو و اثرات نامناسبی بر آنزیم‌های کبدی داشته و این پارامترها را دچار تغییرات شدید می‌نماید (۱۹). در این تحقیق سمیت نانوذره اکسید نیکل در ماهی بررسی و اثر محافظتی نانوذره کورکومین نیز توصیف شد. نتایج اولیه حاکی از آن است که نانوذره اکسید نیکل‌های می‌توانند استرس اکسیداتیو ایجاد کنند و منجر به کاهش زیاد آنزیم‌های آنتی اکسیدانی شود ولی پیش‌تیمار با نانوذره کورکومین سبب تقویت سیستم آنتی اکسیدانی خواهد شد. بنابراین استفاده از نانوذره کورکومین در رژیم غذایی تأثیر مثبت در تقویت سطح آنتی اکسیدانی ماهی و مقابله با استرس اکسیداتیو خواهد داشت.

منابع

1. Nazdar, N., Farhangi, M., Imani, A., Sarvi Moghanlou, K. and Razi, M., 2017. The effect of silymarin supplementation on reducing gill pathological tissue alterations of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) fed with nickel oxide nanoparticles. *Journal of Applied Ichthyological Research*. 4(4): 97-111. (In Persian)
2. Muysen, B.T.A., Brix, K.V., DeForest, D.K. and Janssen, C.R., 2004. Nickel essentiality and homeostasis in aquatic organisms. *Environ Rev*. 12(2): 113-131.
3. Kovriznyh, J.A., Sotnikova, R., Zeljenkova, D., Rollerova, E. and Szabova, E., 2014. Long-term (30 days) toxicity of NiO nanoparticles for adult zebrafish (*Danio rerio*). *Interdisciplinary Toxicology*. 7(1): 23-26.
4. Paquin, P., Santore, R., Wu, K., Kavvas, C. and Toro, D., 2000. The biotic ligand model. A model of the acute toxicity of metals to aquatic life. *Environmental Science & Policy*. 3: 175-182.
5. Ezekwe, C.I. and Edoghotu, M.I., 2015. Water quality and environmental health indicators in the Andoni River estuary, Eastern Niger Delta of Nigeria. *Environmental Earth Sciences*. 74(7): 6123-6136.