DOI: 10.22034/vj.2017.109039.1254
شماره ۱۱۷ زمستان ۱۳۹۶
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

شاخص‌های پاداکسندگی و بافت‌شناسی کبد ماهیان قزل آلای رنگین کمان *(Oncorhynchus mykiss)* تغذیه شده با جیره‌های غذایی حاوی نانوذره اکسید نیکل و سیلیمارین

• **احمد ایمانی (نویسنده مسئول)**
استادیار گروه شیلات و آبزیان دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه
• **مزدک رازی**
استادیار گروه علوم پایه دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه
• **نینا نازدار**
دانش آموخته کارشناسی ارشد تکثیر و پرورش آبزیان،
دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه
• **شتاو حبیبی**
دانش آموخته کارشناسی ارشد تکثیر و پرورش آبزیان،
دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه
• **اصغر زمانی**
استادیار گروه فناوری نانو دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه
ریخ دریافت: ۱۳۹۵-۱۰-۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶-۰۱-۲۷
Email: a.imani@urmia.ac.ir

چکیده

پیشرفت‌های نانو فناورانه سال های اخیر از یک سو موجب تحولات صنعتی چشمگیری شده و از سوی دیگر نگرانی‌هایی را در ارتباط با احتمال ورود این مواد به محیط‌های آبی و بروز مسمومیت در آبزیان موجب گردیده است. هدف مطالعه حاضر، بررسی شاخص‌های پاداکسندگی کبد و تغییرات بافت کبد در ماهی قزل آلای رنگین کمان تغذیه شده با نانوذره اکسید نیکل و سیلیمارین می‌باشد. برای این منظور تعداد ۱۲۰۰ قطعه ماهی (۰/۰۱±۳/۸۳ گرم) در هشت تیمار آزمایشی شامل گروه اول به عنوان تیمار شاهد و هفت تیمار دیگر به صورت ترکیبی از مقادیر مخلف نانوذره اکسید نیکل (۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم غذا) و سیلیمارین (صفر و یک گرم در هر کیلوگرم غذا) در زمان‌های مختلف تقسیم گردیدند. هر تیمار در سه تکرار انجام شد و آزمایش به مدت ۶۰ روز ادامه یافت. نتایج نشان داد که شاخص ظرفیت پاداکسندگی کل در گروه‌های مختلف تفاوت آماری نداشتند ($P>0/05$)، درحالیکه فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه‌های مختلف از نظر آماری تفاوت قابل توجهی داشت ($P\leq 0/05$). با این وجود، فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز گروه‌های مختلف تفاوتی با یکدیگر نداشت، اما فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز از نظر آماری میان گروه‌های مختلف آزمایشی تفاوت معنی‌داری نشان داد ($P\leq 0/05$). در بررسی‌های بافت‌شناسی مشخص گردیدکه تجویز پیشگیرانه عصاره سیلیمارین و همچنین تجویز سیلیمارین همراه با نانوذره اکسید نیکل به عنوان ترکیب محافظتی قادر به مهار آسیب‌های بافتی نانوذره نمی‌باشد. البته برای نتیجه‌گیری بهتر مطالعات بیشتری بویژه از نظر مقدار سیلیمارین مورد استفاده و مدت زمان آزمایش باید صورت پذیرد.

کلمات کلیدی: نانوذره اکسید نیکل، گیاه دارویی، تنش اکسیداتیو، آنزیم‌های پاداکسایشی، *Oncorhynchus mykiss*

● Veterinary Researches & Biological Products No 117 pp: 248-259

Antioxidative indices and liver histology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing nickel oxide nanoparticles and silymarin

By: Imani, A., (Corresponding Author) Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University, I.R. of Iran. Razi, M., Department of Comparative Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, I.R. of Iran. Nazdar, N., Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University, I.R. of Iran. Habibi, Sh., Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University, I.R. of Iran. Zamani, A., Department of Nanotechnology, Faculty of Science, Urmia University, I.R. of Iran.

Email: : a.imani@urmia.ac.ir

Received: 2017-01-04 Accepted: 2017-04-16

Recent nano-technological developments have resulted in outstanding industrial developments in one hand and aroused concerns regarding their discharge into water bodies and subsequent toxicity to aquatic lives in the other hand. This study evaluated the antioxidative indices and liver histology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing nickel oxide nanoparticles and silymarin. Therefore, 1200 fish (3.83±0.01g) were randomly allotted into 8 distinct treatments including control group and seven other experimental groups receiving various levels of dietary nickel oxide nanoparticles (0, 100 and 500 mg/kg feed) and silymarin (0 and 1 g/kg feed). The experiment lasted for 60 days with 3 respective replicates. Results showed that the total antioxidative capacity of various experimental groups did not significantly differ (P>0.05), whilst catalase showed significantly different levels of activity amongst various treatments (P≤0.05). Glutathione peroxidase did not show considerable differences among experimental groups, on the contrary superoxide dismutase had significantly different activities among treatments (P≤0.05). Histological examinations revealed that preventive and curative administration of nickel oxide nanoparticles did not have considerable positive effects on curbing pathological outcomes of nanoparticles on the tissue. However, to elucidate a comprehensive conclusion in this regard, further studies concerning various silymarin inclusion levels and exposure time are required.

Key words: Nickel oxide nanoparticles, medicinal plants, oxidative stress, antioxidative enzymes, *Oncorhynchus mykiss*

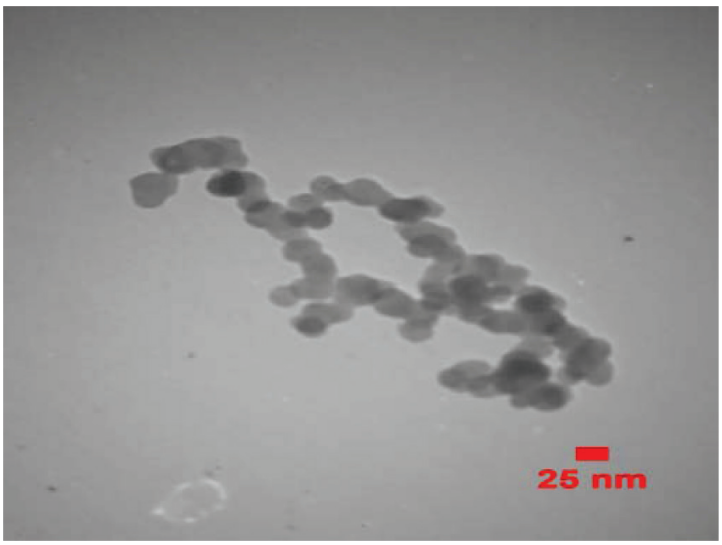
مقدمه

در سال‌های اخیر با توجه به برنامه‌های کاربردی مانند ساخت فروکاوهای صنعتی، حسگرهای گازی و ... توجه زیادی به نانوساختارهایی مانند نانوذرات اکسید نیکل متمرکز شده است (۲۴). در ترکیب شیمیایی پساب‌های حاصل، فلزات سنگین، شاخص‌ترین و خطرناک‌ترین اجزا هستند که با افزایش میزان آن‌ها زیان غیرقابل جبراني به محیط زیست آبزیان وارد می‌شود (۲۱). در بوم‌سازگان‌های آبی، ترکیبات نیکل ممکن است وارد زنجیره غذایی گردند (۵). با افزایش تعداد نانو ذرات ساخته‌شده و کاربرد آن‌ها در محصولات صنعتی و مصرفی، خطر در معرض قرار گرفتن انسان و همچنین بوم سازگان‌های آبی در حال افزایش بوده و ممکن است سلامت انسان و محیط زیست را تهدید نماید (۱۴). نانو مواد ممکن است از طریق دستگاه تنفسی، پوست (تماس پوستی)، دستگاه گوارش (روده) خواسته یا ناخواسته وارد بدن شوند (۴). مهم‌ترین مشکل نانومواد تشدید ایجاد بنیان (رادیکال)های آزاد فراتر از قابلیت یک سازگان زیستی در حذف و یاکاهش اثرات تخریبی آن‌ها است. افزایش میزان بنیان‌های آزاد، با ایجاد تنش اکسایشی، واکنش‌های بافت مردگی (نکروز) و خزان یاختگی (آپوپتوز) را فعال کرده و در نهایت منجر به مرگ یاخته می‌شود.تحت شرایط طبیعی تعادلی بین فعالیت سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی و میزان بنیان‌های آزاد در یاخته برقرار است و این تعادل برای رشد، تکثیر و زندگی موجود زنده ضروری است (۳۲). ساده‌ترین بنیان آزاد عنصر هیدروژن با یک پروتون و یک الکترون است. تولید بنیان‌های سوپراکسید بیشتر در میتوکندری یاخته‌ها رخ می‌دهد. زنجیره انتقال الکترون میتوکندری به عنوان منبع اصلی تولید ATP در یاخته به شمار می‌روند. در خلال انتقال انرژی در میتوکندری، تعداد کمی از الکترون‌ها از زنجیره نشت کرده و در ترکیب با اکسیژن مولکولی موجب تولید بنیان سوپراکسید می‌شوند که در آسیب‌شناسی بسیاری از بیماری‌ها دخالت دارد(۹). گونه‌های فعال اکسیژن به طرق مختلفی نظیرآسیب‌رساندن به DNA، تداخل با مسیرهای پیام‌رسانی یاخته‌ای و ...

می‌توانند به یاخته‌ها آسیب وارد کنند (۱۱،۳۲).

سمیت نانوذرات با تنش اکسیداتیو، تغییر هموستازی کلسیم، پاسخ التهابی و مشکلات یاخته‌ای همراه است. قرار گرفتن ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در معرض نانوذرات دی اکسید تیتانیوم نشان از بروز استرس اکسیداتیو داشت (۶). در ارزیابی سمیت نانوذرات دی اکسید تیتانیوم (۰/۰۱- ۸۰۰ mg/l) در دو گونه ماهی آب شیرین *Carassius auratus* و *Corbicula fluminea* مشخص شد که این نانوذرات موجب افزایش پراکسیداسیون چربی و تغییرات قابل توجه فعالیت پاداکسندگی در ماهیان می‌گردند، همچنین آسیب بافت کبد در *C. auratus* قابل مشاهده بود (۱۸). نانوذرات آهن منجر به افزایش معنی‌دار میزان پراکسیداسیون چربی و تغییر فعالیت آنزیم‌های پاداکسندگیبچه ماهیان کپور معمولی شد (۲۰). در بررسی آسیب‌شناسی نانوذره مس بر بافت کبد بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان، مواجهه با ppb ۲۵ و ۵۰ موجب استحاله سیتوپلاسمی و واکوئلی یاخته‌های کبدی نزدیک به سینوزوئیدها در تیمار ppb ۲۵ وبافت مردگی کبدی، التهاب، تورم شدید در ناحیه مجاری صفراوی، پوشش ها و ترشحات ناشی از التهاب در تیمار حاوی ppb ۵۰ نانوذره مس گزارش گردید (۱۳). محمدی فرد و همکاران (۱۳۹۴) اثرات نانوذرات اکسید مس و عصاره هیدروالکلی زرشک، خاکشی و سیلیمارین را بر آنزیم‌های کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز و همچنین محتوای مالون دی آلدئید کبد موش‌های نر دیابتی بررسی کردند. آن‌ها دریافتند که در گروه‌های دیابتی (دریافت‌کننده mg/kg ۱۲۰ آلوکسان) که با نانوذرات مس تیمار شده بودند غلظت مالون دی آلدئید افزایش و میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز کاهش یافت. تزریق روزانه درون صفاقی سیلیمارین با دوز mg/kg BW ۲۰۰ در کاهش اثرات نانوذرات نسبت به زرشک و خاکشی مؤثرتر بود (۲۲). در بررسی سمیت و استرس اکسیداتیو نانوذرات دی اکسید تیتانیوم در صدف آبالون دریایی (*Haliotis diversicolor supertexta*)، مشخص شد که فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) در آبالون‌های مواجه شده با mg/l ۱ نانوذرات دی اکسید تیتانیوم افزایش یافت و محتوای گلوتاتیون احیا بافتی(GSH) در گروه‌های با غلظت‌های بیشتر mg/l ۱ دی اکسید تیتانیوم کاهش یافت (۳۴).

به منظور تقویت سامانه پاداکسندگی یاخته و همچنین کاهش اثرات بنیان‌های آزاد از موادی با خاصیت پاداکسندگی استفاده می‌شود. ماهی‌ها نیز دارای سازوکارهای پاداکسندگی می‌باشند که از جمله آن‌ها می‌توان به آنزیم‌های اختصاصی دفاع پاداکسندگی شامل سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) اشاره کرد که به همراه تعداد دیگری از آنزیم‌ها مجموعه‌ای از دفاع پاداکسندگی یاخته‌ای را تشکیل می‌دهند و نقش حذف بنیان‌های آزاد را بر عهده دارند (۱). ماری‌تیغال یا خار مریم (*Silybum marianum*) گیاهی خودرو، دوساله، بدون کرک و متعلق به تیره کاسنی (Asteraceae) است که در بیشتر کشورهای اروپایی، آسیایی و آمریکایی پراکنش دارد (۸). این گیاه بیش از ۲۰۰ سال است که به عنوان گیاه دارویی در درمان بیماری‌های کبدی در بسیاری از کشورهای جهان مورد استفاده قرار می‌گیرد. سیلیمارین، عصاره تخلیص شده بذر گیاه دارویی خار مریم است. امروزه از سیلیمارین در پیشگیری



شکل۱- تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) از نانوذرات اکسید نیکل مورد استفاده در این مطالعه (ارائه شده توسط شرکت فروشنده).

و درمان اختلالات کبدی استفاده می‌شود. اثرات دارویی سیلیمارین به ویژگی‌های پاداکسندگی، ضد التهابی، ضد سرطانی، ضد فیبروزی آن و نیز افزایش ظرفیت گلوتاتیون احیای یاخته‌ای (GSH)، افزایش ظرفیت زیست‌آمایی پروتئین و افزایش توان بازسازی کبد و حفظ پایداری غشای یاخته‌ای باز می‌گردد(۲۸). کبد یکی از اندام‌های هدف اصلی است که بسیاری از عملکردهای زیستی از جمله سوخت وساز داروها، اسیدهای آمینه، چربی و کربوهیدارت‌ها را تنظیم می‌کند. مطالعات آسیب‌شناسی بافتی می‌تواند شیوهای مؤثر و سریع برای تشخیص تأثیر دیرپای آلاینده‌ها و سموم بر سلامت و سوخت و ساز جاندار باشد (۱۶). هدف مطالعه حاضر بررسی میزان فعالیت آنزیم‌های پاداکسندگی کبد شامل سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) به همراه آسیب‌شناسی بافت کبد ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان تغذیه‌شده با جیره‌های غذایی حاوی نانوذره اکسید نیکل و سیلیمارین می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه و پرورش بچه ماهیان

تعداد ۱۲۰۰ قطعه قزل‌آلای رنگین کمان با میانگین وزني حدود ۳/۸۳±۰/۰۱ گرم پس از یک هفته سازگاری به شرایط آزمایشی، توزین و در مخازن ۹۰ لیتری توزیع شدند. این مطالعه به صورت یک طرح تصادفي ساده شامل ۸ تیمار، هر کدام با سه تکرار، به مدت هشت هفته بطول انجامید (جدول۱). دبی متوسط آب برای هر مخزن پرورشي ۱/۵ لیتر در دقیقه تنظیم گردید. در طول دوره پرورش، سنجه‌های فیزیکوشیمیایی

جدول ۱ - تیمارهای آزمایشی

تیمار	مرحله اول (چهار هفته نخست)	(مرحله دوم (چهار هفته دوم
۱	جیره غذایی فاقد نانوذره و سیلیمارین	جیره غذایی فاقد نانوذره و سیلیمارین
۲	جیره غذایی حاوی ۰ میلی‌گرم نانوذره اکسید نیکل و یک گرم سیلیمارین در کیلوگرم غذا	جیره غذایی حاوی ۰ میلی‌گرم نانوذره اکسید نیکل و یک گرم سیلیمارین در کیلوگرم غذا
۳	جیره غذایی حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم نانوذره اکسید نیکل و یک گرم سیلیمارین در کیلوگرم غذا	جیره غذایی فاقد نانوذره اکسید نیکل و حاوی یک گرم سیلیمارین در کیلوگرم غذا
۴	جیره غذایی حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم نانوذره اکسید نیکل و یک گرم سیلیمارین در کیلوگرم غذا	جیره غذایی فاقد نانوذره اکسید نیکل و حاوی یک گرم سیلیمارین در کیلوگرم غذا
۵	جیره غذایی فاقد نانوذره اکسید نیکل و حاوی یک گرم سیلیمارین در کیلوگرم غذا	جیره غذایی حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم نانوذره اکسید نیکل و یک گرم سیلیمارین در کیلوگرم غذا
۶	جیره غذایی فاقد نانوذره اکسید نیکل و حاوی یک گرم سیلیمارین در کیلوگرم غذا	جیره غذایی حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم نانوذره اکسید نیکل و یک گرم سیلیمارین در کیلوگرم غذا
۷	جیره غذایی حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم نانوذره اکسید نیکل در کیلوگرم غذا و فاقد سیلیمارین	جیره غذایی حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم نانوذره اکسید نیکل در کیلوگرم غذا و فاقد سیلیمارین
۸	جیره غذایی حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم نانوذره اکسید نیکل در کیلوگرم غذا و فاقد سیلیمارین	جیره غذایی حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم نانوذره اکسید نیکل در کیلوگرم غذا و فاقد سیلیمارین

آب شامل دما و میزان اکسیژن محلول به طور مرتب به صورت هفتگي اندازه‌گیری و ثبت شد (درجه حرارت آب ۰/۵±۱۴ درجه سانتي‌گراد، اکسیژن محلول ۰/۲±۸/۲ میلي‌گرم در لیتر)، این مقادیر در محدوده مناسب برای پرورش ماهي قزل‌آلای رنگین کمان بود.

ساخت جیره‌های آزمایشی

برای این منظور غذاي تجاری ماهي قزل آلاي رنگین کمان تهیه (به ترتیب حاوی ۴۶، ۱۴، ۱۰ و ۱۱ درصد پروتئین، چربي، خاکستر و رطوبت) و آسیاب گردید. سپس با توجه به تیمارهای غذایی مورد نظر، مقادیر مختلف نانوذره اکسید نیکل شامل ۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ ميلي گرم در کیلوگرم و سیلیمارین شامل صفر و یک میلي‌گرم در کیلوگرم (جدول ۱) به جیره غذایی اضافه گردید(۲۵). نانوذرات اکسید نیکل مورد استفاده در این پژوهش در ابعاد ۲۵ نانومتر از شرکت پیشگامان نانومواد ایرانیان تهیه شد (شکل ۱، US Research Nanomaterials, Inc.). همچنین سیلیمارین مورد استفاده از شرکت سیگما (S0292) تهیه گردید. با افزودن رطوبت به میزان مورد نیاز، خمیر حاصل به کمک چرخ گوشت صنعتي به صورت رشته‌های نازک در آمد. در نهایت رشته‌های خشک شده به قطعات کوچکتري شکسته و برای زدودن خاکه‌ها از الک با اندازه چشمه ریز استفاده گردید. سرانجام حبه(پلت)های تهیه شده در کیسه‌های پلاستیکي یک کیلوگرمي به همراه مقداري ژل نم‌گیر با ثبت تاریخ ساخت، میزان نانوذره و سیلیمارین تا زمان مصرف در دمای ۴ درجه سانتي‌گراد نگهداری شدند.

نمونه‌برداری جهت سنجش فعالیت‌های آنزیمی و مطالعات بافت‌شناسی

در شروع و پایان آزمایش و با رعایت تمام موازین اخلاقي برخورد با حیوانات آزمایشگاهي، پیش از نمونه‌برداری ماهیان به کمک پودرگل میخک بیهوش شدند. از هر تیمار ۶ قطعه (۲ قطعه برای هر تکرار) ماهی جهت تهیه نمونه‌های بافت کبد برای مطالعات آنزیمی و بافت‌شناسي به صورت تصادفی انتخاب شدند. نمونه‌های کبد لازم برای مطالعات آنزیمی بلافاصله پس از شستشو با سرم فیزیولوژی در میکرو تیوپ‌های که از قبل رمزگذاری شده بودند قرار گرفت و در نهایت کلیه نمونه‌ها بلافاصله به فریز ۸۰- سانتی‌گراد منتقل شدند.

سنجش شاخص‌های پاداکسندگی کبد برای سنجش ظرفیت پاداکسندگی کل (TAC) از معرف فرب (۲۰میلی‌لیتر $FeCl_3$، ۲۴ میلی‌لیتر TpTz، ۲۰ میلی‌لیتر بافر استات به نسبت ۱:۱:۱۰) استفاده شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۹۳ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر (DANAmodel) اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم SOD از طریق سنجش میزان تولید رنگ آبی فورمازان در طول موج ۵۶۰ انجام شد. یک واحد فعالیت آنزیمی به عنوان مقدار آنزیمی است که باعث مهار ۵۰ درصدی احیای NBT به ازای هر میلی گرم پروتئین از بافت همگن می‌شود. برای سنجش فعالیت کاتالاز (CAT)، به ۱/۹۹ میلی‌لیتر بافر فسفات و ۱۰۰۰ ماکرولیتر آب اکسیژنه ۳۰،۱۰ µM ماکرولیتر از سوپرناتانت هموژنه‌های کبدی اضافه وجذب نمونه در موج ۲۴۰ نانومتر و در فواصل زمانی ۱۵ ثانیه و به مدت ۶۰ ثانیه قرائت شد(۲۷). مخلوط واکنش سنجش گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) شامل ۸۹۰ میکرولیتر از بافرفسفات پتاسیم (pH=7،EDTA (mM 1)،NaN3 (mM 1)،NADPH (mM 2/0 و mM 100)، گلوتاتیون ردوکتاز (U/ml۱) وگلوتاتیون احیاء (mM ۱) و۱۰میکرولیتر عصاره کبدی بود. واکنش با اضافه شدن ۱۰۰ میکرولیتر از پراکسید هیدروژن (mM ۲/۵) شروع شد. تبدیل NADPH به $NADP^+$ درطول موج ۳۴۰ نانومتر به مدت سه دقیقه توسط دستگاه طیف نورسنج (اسپکتروفتومتر) تعیین شد. فعالیت آنزیم براساس نانو مولاز NADPH اکسید شده به NADP+ یک دقیقه به ازاء هر میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

بررسی‌های بافت شناسی

نمونه بافت کبد ماهیان پرورشی در شرایط آزمایشگاهی به صورت تصادفی تهیه گردید. نمونه‌های فوق ابتدا در محلول بوئن تثبیت شدند وپس از ۷۲ ساعت فرایند پاساژ بافتی با استفاده از الکل‌های صعودی (۷۰، ۸۰، ۹۰ درصد، و دو تعویض ۱۰۰ درصد) به منظور آب‌گیری صورت پذیرفت. پس از فرآوری نمونه‌ها، قالب گیری و تهیه برش‌های بافتی به ضخامت ۵ میکرون، اسلایدها طبق روش H&E رنگ‌آمیزی شده و مورد بررسی قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA)، نرم افزار SPSS) و آزمون مقایسه میانگین توکی (آزمون اختلاف حقیقی که به طور مخفف HSD نامیده می‌شود) استفاده شد. قبل از انجام تحلیل پراش،بهنجار بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف- اسمیرنوف بررسی شد. سطح معنی‌دار بودن آزمون‌ها کمتر از ۵ درصد بود. نتایج حاصل به صورت میانگین ± خطای استاندارد ارائه شدند.

نتایج

شاخص‌های پاداکسندگی

در انتهای آزمایش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز بافت کبد گروه‌های مختلف آزمایشی ارزیابی شد(شکل ۲). نتایج نشان داد که بین تیمارهای سه و هفت با تیمارهای چهار، پنج و شش اختلاف معنی‌داری وجود دارد و کمترین میزان فعالیت این آنزیم در تیمار دو و بیشترین میزان آن مربوط به تیمار سه بود ($p \leq ۰/۰۵$).

میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز بافت کبد گروه‌های مختلف آزمایشی در پایان آزمایش در شکل ۳ آمده است. نتایج نشان داد که گروه‌های سه و هفت دارای بیشترین میزان فعالیت آنزیمی بودند ($p \leq ۰/۰۵$).

میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بافت کبد گروه‌های مختلف آزمایشی در پایان آزمایش در شکل ۴ ارئه شده است است. همانطور که مشاهده می‌شود بین تیمار هفت و تیمارهای دو و سه اختلاف معنی داری وجود دارد. کمترین میزان فعالیت این آنزیم در تیمار سه و بیشترین میزان فعالیت آن مربوط به تیمار هفت بود ($p \leq ۰/۰۵$).

نتایج شاخص آنتی اکسیدانی کل کبد تیمارهای مختلف آزمایشی در

انتهای دوره پرورش در شکل ۵ قابل مشاهده است. نتایج نشان داد که کمترین و بیشترین میزان این شاخص به ترتیب متعلق به تیمارهای دو و پنج می‌باشد و بین تیمار دو با تیمارهای پنج و هشت اختلاف معنی داری وجود دارد ($p \leq ۰/۰۵$).

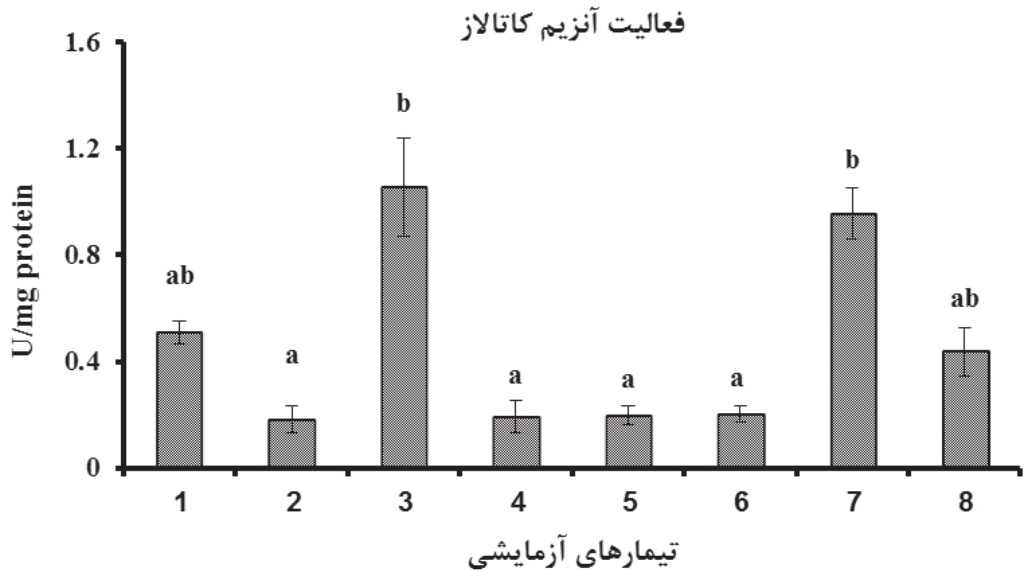
بافت‌شناسی کبد

نتایج اثر تغذیه با مقادیر مختلف نانوذره اکسید نیکل و سیلیمارین بر بافت کبد ماهیان تیمارهای مختلف در پایان آزمایش در شکل ۶ آمده است. مطالعه ریزبینی بافت کبد گروه‌های آزمایشی نشان داد که در گروهیک (A) ساختار کبد به طور کامل طبیعی است و یاخته‌های کبدی و مویرگ‌های خونی به شکل طبیعی دیده می‌شوند. در گروه دو (B) پیکنوز هسته‌ای یاخته‌های کبدی قابل مشاهده بود. در گروه سه (C) نیز ستبراکی (پیکنوز) هسته‌ای یاخته های کبدی بیشتری قابل مشاهده بود. در گروه چهار (D) ستبراکی هسته‌ای یاخته های کبدی به همراه واکوئله شدن سیتوپلاسمی (CV) مشاهده گردید. در تیمارهای پنج، شش و هفت (E، F و G) پیکنوز هسته‌ای یاخته های کبدی و نفوذ یاخته‌های ایمنی (IMi) مشاهده شد. در این سه تیمار ساختار کبدی بهم ریخته بود و در مقاطع بافتی گروه هشت (H) پیکنوز هسته‌ای یاخته‌های کبدی، واکوئله شدن سیتوپلاسمی، افزایش قطر عروقی (VD)، نفوذ یاخته‌های ایمنی و بافت مردگی قابل‌ملاحظه ناحیه‌ای (N) دیده شد. همچنین نتایج نشان داد که میزان ستبراکی هسته‌ای یاخته‌های کبدی و افزایش قطر عروق در تیمارها چهار، پنج، شش، هفت و هشت تشدید شد و افزایش میزان واکوئله شدن سیتوپلاسمی نیز در تیمارهای چهار، پنج و شش مشاهده گردید. بافت مردگی ناحیه‌ای قابل ملاحظه‌ای در تیمارهای چهار، هفت، هشت نسبت به سایر تیمارها وجود داشت. از نتایج حاصل می‌توان چنین برداشت نمود که شدت آسیب‌های کبدی چه در حالت تجویز پیشگیرانه سیلیمارین و یا تجویز هم‌زمان آن با نانوذره اکسید نیکل، قابل توجه بود و با میزان نانوذره اکسید نیکل در جیره غذایی نیز ارتباط مستقیمی نشان داد.

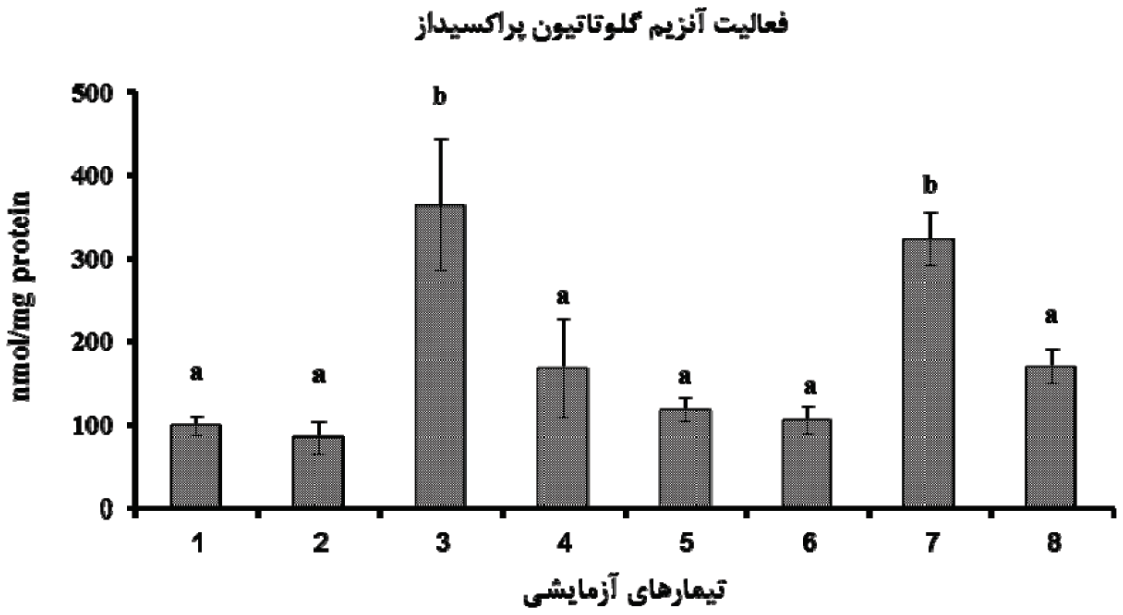
بحث و نتیجه‌گیری

امروزه آلودگی محیط زیست آبزیان به یک مسئله مهم تبدیل شده است. آسیب به ماهیان نشانگر زیستی مهمی در بررسی آلودگی‌های محیط زیست محسوب می‌شود.با توجه به استفاده روز افزودن از نیکل و بویژه نانوذرات اکسید نیکل در صنعت، تحقیقات بیشتری در ارتباط با رویارویی ماهیان با جیره (زنجیره)های غذایی آلوده با نیکل نیاز است (۲۳).

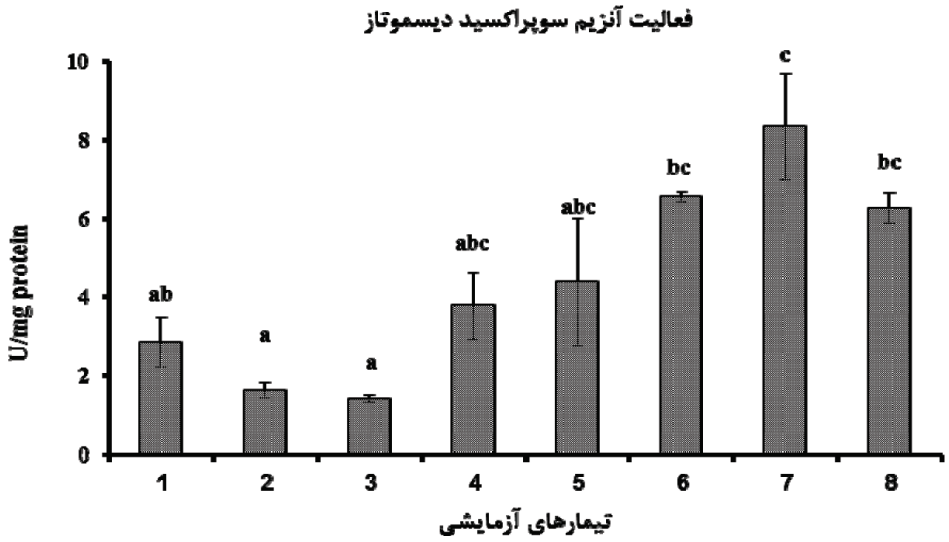
آنزیم‌های SOD و CAT اولین خط دفاعی در برابر تنش اکسیداتیو هستند و به طور معمول به عنوان نشانگر زیستی تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۷). در مواجهه تیلاپیای موزامبیک (*Oreochromis mossambicus*) با نانوذرات دی اکسید تیتانیوم کاهش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز گزارش گردید که ممکن است ناشی از کاهش قابلیت دفاعی به دلیل تولید بیش از حد ROS و مهار فعالیت سوپراکسید دیسموتاز باشد. همچنین مشاهده‌ی آسیب‌های بیشتر در بافت کبد در مقایسه با آبشش و مغز در پی رویارویی غلظت‌های مشابه از نانوذره دی اکسید تیتانیوم (ppm ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰)، این نکته را آشکار می‌سازد که بافت کبد حساس‌ترین اندام در مواجهه با نانوذرات دی اکسید تیتانیوم است (۱۵). در مطالعه حاضر، در گروه‌های شاهد و تیمار دو به دلیل عدم وجود یا کم بودن تنش اکسیداتیو فعالیت آنزیم کاتالاز کمینه است. این در حالی است که با بروز تنش اکسیداتیو به عنوان مثال در گروه‌هایی که آسیب‌های بافتی کمتر بوده (و در عمل بافت کبد فعالیت حیاتی خود را حفظ نموده)، آنزیم کاتالاز ساخته شده است. این امر در مورد تیمار۳ صادق است زیرا که میزان کمتری از نانوذره‌ی نیکل را دریافت نموده و بدنبال آن به مدت چهار هفته نیز در معرض نانوذره نبوده است. بنابراین زمان کافی برای ترمیم بافتی فراهم شده است. این در حالی است که در تیمار چهار ماهی‌ها با مقادیر بسیار بالایی از نانوذره مواجه شده‌اند و آسیب‌های بافتی نشان دهنده آسیب قابل توجه در پایان آزمایش و سنجش فعالیت‌های آنزیمی می‌باشد. بنابراین با در نظر گرفتن مقدار بالای نانوذره در جیره غذایی و آسیب‌های بافتی شدیدتر در مقایسه با تیمار۳، فعالیت آنزیم کاتالاز کمتری قابل مشاهده است. این درحالی است که در تیمارهای ۵ و ۶ هیچ‌گونه دوره استراحت نداشته‌اند و مقادیر بالای (۵۰۰ میلی‌گرم) نانوذره را دریافت نموده‌اند، مقادیر آنزیم کاتالاز در این گروه‌ها در مقایسه با گروه‌هایی که دوره استراحت داشته‌اند و یا با مقادیر کمتری از نانوذره نیکل مواجه شده‌اند، کمتر می‌باشد. البته این نکته قابل توجه است که با وجود کاهش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز، همچنان در مقایسه با گروه‌های شاهد و تیمار ۲ فاقد اختلاف فاحش می‌باشد. البته این نتیجه می‌تواند نشان دهنده اثر حفاظتی سیلیمارین در چنین شرایطی باشد. اما نکته‌ای که بسیار قابل توجه است، در تیمارهای ۷ و ۸ پدیدار می‌شود و آن افزایش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در این گروه‌ها است. به خوبی روشن است که مقادیر قابل تحملی از سیلیمارین می‌تواند اثرات پاداکسندگی بسیار خوبی را در بافت‌های مختلف ایجاد نماید. بنابراین در مواقعی که از سیلیمارین به عنوان پاداکسند استفاده می‌شود، می‌تواند تا حدودی نیاز به ساخت آنزیم‌های پاداکسنده را کاهش دهد. در چنین شرایطی میزان آنزیم‌های فوق در سرم و یا بافت‌ها کمتر ارزیابی می‌شود. این در حالی است که در صورت عدم حضور سیلیمارین شاید سلول‌ها نیاز دارند تا مقادیر بالاتری از آنزیم‌های پاداکسنده تولید نمایند. البته بالا بودن میزان فعالیت این آنزیم‌ها، به طور حتم به مفهوم سلامت بافت نبوده و مؤید نیاز بیشتر بافت‌ها برای تولید چنین آنزیم‌هایی است. در مسمومیت‌های مزمن، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی به طور معمول دارای روند افزایشی است، نکته‌ای که با مد نظر قرار دادن تیمارهای ۱، ۷و ۸ پژوهش حاضر قابل درک است. در مواجهه ماهی *Gastreosteus aculeatus* با مس، پس از گذشت یک هفته فعالیت آنزیم‌های CAT، SOD و GPx افزایش یافت. علت این اتفاق می‌تواند به افزایش غلظت یاخته‌ای فلزات سنگین در بافت‌ها و افزایش میزان تولید بنیان‌های آزاد و در نتیجه افزایش نیاز یاخته به مقابله با این عوامل برهم زننده تعادل اکسیداسیون- احیاء سلولی باشد (۲۶). در بررسی اثر سمی نانو- ذرات اکسیدنیکل برسامانه پاد تنش اکسیداتیو و اثر مخرب آن بر سامانه ایمنی بدن با تجویز این نانوذره به صورت خوراکی در دوز ۲۵ ppm به موش صحرایی به مدت ۷ روز مشخص گردید که فعالیت GPx و CAT در گروه



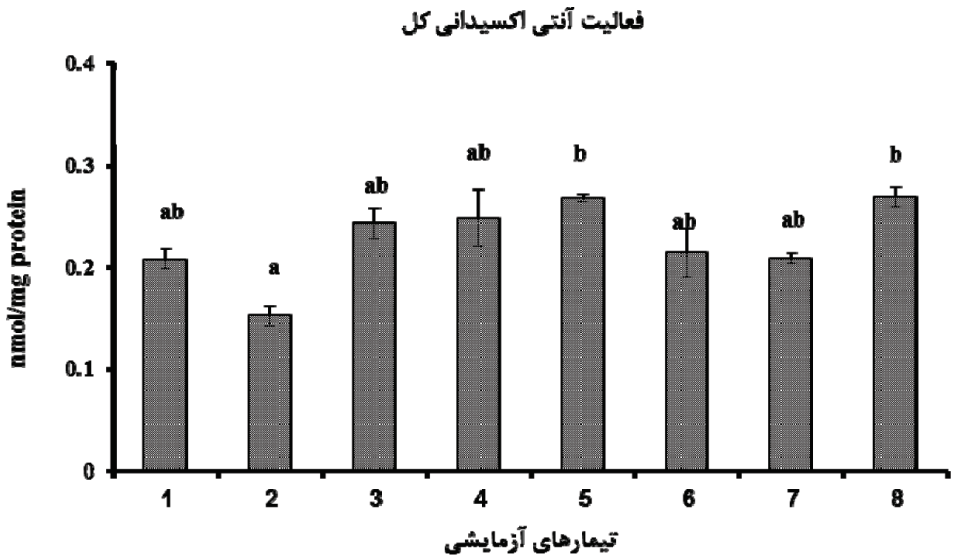
شکل ۲- میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در انتهای آزمایش. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار آماری است.



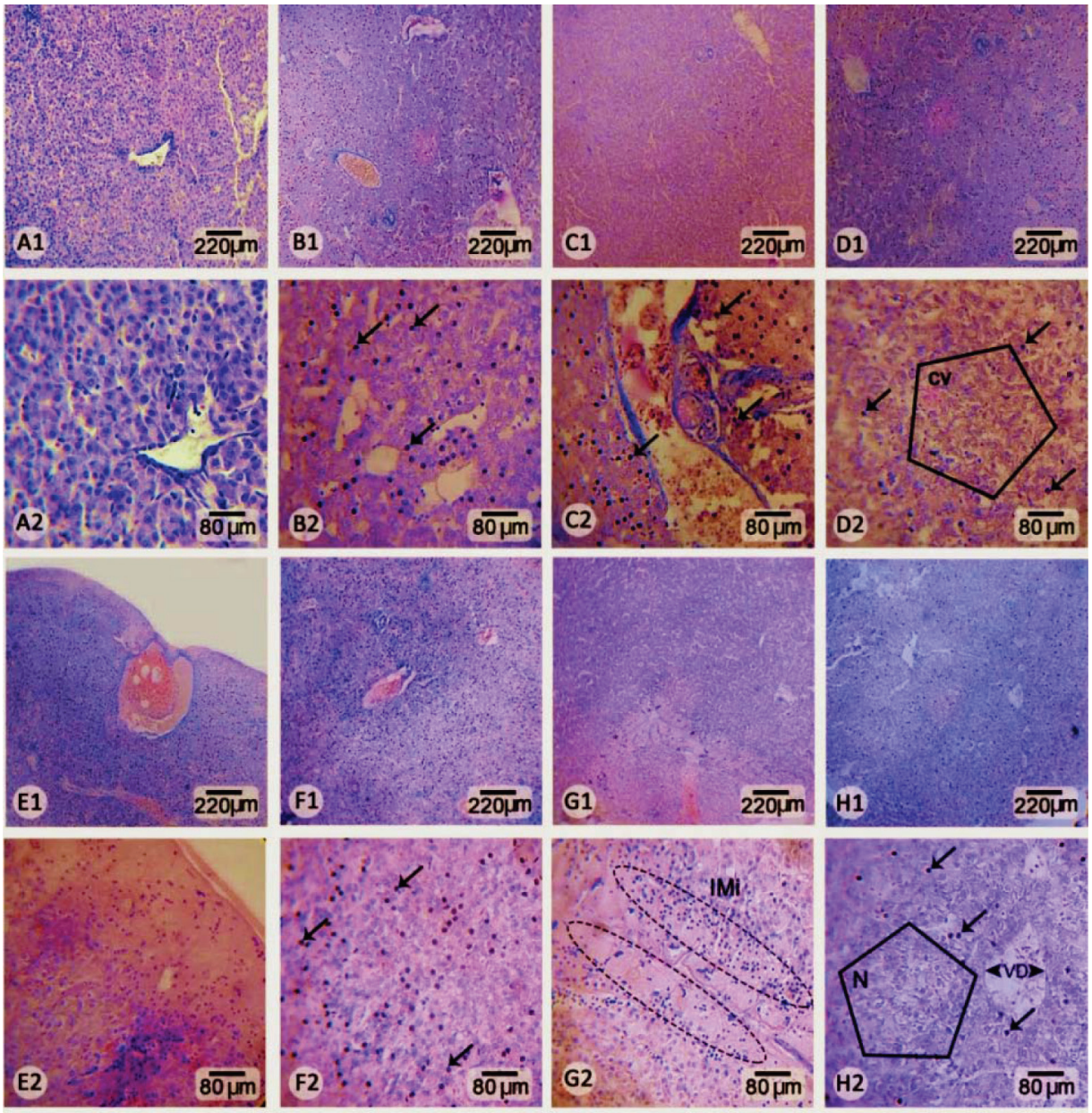
شکل ۳- میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در انتهای آزمایش. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار آماری است.



شکل ۴- میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در انتهای آزمایش. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار آماری است.



شکل ۵- ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بافت کبد در انتهای آزمایش. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار آماری است.



شکل۶- مقاطع بافتی کبد ماهیان قزل آلای رنگین کمان در پایان دوره تیمار با نانوذرات اکسید نیکل و سیلیمارین، بزرگنمایی ۱۰× و ۴۰× (به ترتیب تصاویر A۱ تا D۲ و E۱ تا H۲)، رنگ آمیزی H&E A: تیماریک، B: تیمار دو، C: تیمار سه، D: تیمار چهار، E: تیمار پنج، F: تیمار شش، G: تیمار هفت و H: تیمار هشت. برای مشاهده جزئیات تیمارها به جدول ۱ مراجعه نمایید.

آزمایشی در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافته و نانوذرات اکسیدنیکل منجر به ایجاد بنیان‌های آزاد و افزایش تنش اکسیداتیو و التهاب گشتند (۲۵). عقیده بر این است که ممکن است برخی آنزیم‌های پاداکسندگی دارای عملکردی مشترک باشند، برای مثال GPx همانند CAT در از بین بردن پراکسیدهیدروژن ناشی از تنش های اکسیداتیو نقش داشته باشد. بنابراین ممکن است در حضور این آنزیم از میزان فعالیت آنزیمCAT کاسته شود، نکته‌ای که در پژوهش حاضر مشاهده نگردید و در عملروند تغییرات فعالیت آنزیم GPx مشابه CAT بود. البته عوامل مختلفی مانند نوع گونه، مدت زمان مواجهه، سن ماهی، شرایط مختلف محیطی، نوع آلاینده، وضعیت فیزیولوژیک و .. کم اثر نیستند (۳۳).

تغییر فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز گروه‌های مختلف آزمایشی مانند آنزیم کاتالاز بود. بدین ترتیب که افزایش ملایمی در تیمار ۳ قابل مشاهده بود. این در حالی است که میزان فعالیت آن در گروه‌های دریافت‌کننده نانوذره نیکل کاهش یافت. این نکته از این لحاظ اهمیت دارد که به نظر می‌رسد در چنین شرایطی الگوی رفتاری یاخته‌های کبد در ارتباط با آنزیم‌های کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز مشابه می‌باشد. این نکته به خوبی مشخص گردیده است که سیلیمارین با حمایت ظرفیت گلوتاتیونی یاخته‌ها به مسمومیت‌زدایی و حذف بنیان‌های آزاد بدن کمک می‌کند و از پراکسیداسیون چربی‌ها که باعث آسیب غشای یاخته‌ها می‌شود، جلوگیری می‌نماید (۷). این نکته در مطالعه حاضر در گروه‌های آزمایشی۴، ۵ و ۶ نشان داده شد. با وجود کاهش میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز گروه‌های مذکور، تفاوتی با با گروه شاهد و تیمار ۲ نداشتند. بخشی از اثرات سودمند سیلیمارین را می‌توان به اثرات کاهش دهندگی تنش اکسیداتیو آن به علت دارا بودن خاصیت پاداکسندگی و تقویت‌کنندگی سامانه روبش بنیان‌های آزاد اکسیژن نسبت داد که از این نظر مشابه ویتامین E عمل می‌نماید (۳۰). در تیمارهای دریافت‌کننده میزان بالای نانوذره نیکل و سیلیمارین (تیمارهای ۴ و ۶) الگوی فعالیتی آنزیم‌ها نسبت به مقدار پایین نانوذره (تیمار ۳) متفاوت بود. بنابراین میزان فعالیت کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز پایین بوده و نحوه عملکرد سیلیمارین و فیزیولوژی دفاعی بافت کبد وابسته به میزان نانوذره دریافتی متفاوت است. در بررسی میزان فعالیت شاخص آنتی‌اکسیدانی کل (TAC)، بالابودن این شاخص در تیمار ۳ نسبت به تیمار ۲ به دلیل بالا بودن میزان فعالیت پاداکسندگی آنزیم SOD می‌باشد. در مقایسه تیمارهای ۳ و ۷ از نظر شاخص‌های مورد مطالعه GPx، CAT و TAC می‌توان نتیجه گرفت که سیلیمارین در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم نانو ذره نیکل در حالت پیشگیری و چه در حالت عدم تجویز، تأثیری بر اثرات استرس اکسیداتیو نانوذره ندارد.در بررسی پاسخ های تنش اکسیداتیو ناشی از مواجهه ماهی کپور معمولی با نانوذرات اکسید روی با غلظت های (۰/۵، ۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) در بافت‌های مختلف مشخص شد که ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره اکسید روی باعث کاهش قابل توجه فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان از جمله GPx، CAT و SOD گشته و همچنین سطوح پراکسیداسیون چربی را افزایش داد (۱۰). در بررسی شاخص‌های بیوشیمیایی پلاسمای خون بعد از تجویز درون صفاقی نیکل با غلظت‌های ۱۵، ۲۵ و ۳۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن و یک گروه با ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر نیکل در آب آشامیدنی در موش‌ها، افزایش فعالیت آنزیم‌هایAST، ALT و ALP در سرم موش‌ها گزارش شده است. نیکل ممکن است اثرات منفی بر سوخت و ساز بدن داشته باشدو تأثیر پذیری فعالیت آنزیم‌ها نشانه آسیب سلولی و اختلالات عملکردی در کبد است (۳۱). در مطالعه اثرات نانوذرات اکسید نیکل از حیث سمیت یاخته‌ای، القاءکنندگی تنش اکسیداتیو، و خزان یاختگی در سلول‌های کشت شده انسانی و اثرحفاظت‌کنندگی و پاد اکسندگی کورکومین جیره غذایی مشخص شد که میزان حیات یاخته‌ها به صورت وابسته به غلظت تحت تأثیرنانوذرات اکسید نیکل کاهش یافت. تنش اکسیداتیو و خزان‌یاختگی ناشی از نانوذره نیکل در ۲-HEP و V-MCF به وسیله کورکومین تعدیل شد. عملکرد نانوذرات اکسید نیکل در القاء تنش اکسیداتیو به وسیله کاهش گلوتاتیون، القاء گونه‌های فعال اکسیژن و پراکسیداسیون چربی بود، اما کورکومین به طور قابل توجهی سمیت یاخته‌ای و تنش اکسیداتیو القاء شده به وسیله نانوذرات اکسید نیکل را در هر دو نوع یاخته کاهش داد (۲۹). در مطالعه حاضر نیز متعاقب افزودن نانوذره اکسید نیکل به جیره غذایی ماهیان میزان آسیب‌های بافت کبد به صورت وابسته به غلظت در ماهیان افزایش یافت. بنابراین می‌توان این گونه نتیجه‌گیری کرد که نانوذره اکسید نیکل همانند یاخته‌های بافتی انسانی در شرایط برون تنی، برای یاخته‌های کبد ماهی‌ها سمی می‌باشد. در بررسی تأثیر تجویز خوراکی سیلیمارین بر روی فاکتورهای بیوشیمیایی خون ماهی قزل‌آلای رنگین کمان به عنوان یک مدل آزمایشگاهی مشخص شد که سیلیمارین با تثبیت ساختار غشای یاخته‌ای سطح فعالیت آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آلکالین فسفاتاز (ALP)، کراتنین فسفاتاز (CK) و لاکتات دهیدروژناز (LDH) را تنظیم نمود (۲).در بررسی اثرات محافظتی عصاره سیلیمارین برابرسمیت مالاتیون در ماهی سیچلاید گورخری (*Cichlasoma nigrofasciatum*) مشخص گردید که قرار گرفتن در معرض مالاتیون باعث افزایش قابل توجه مالون دی آلدئید (نشانگر پراکسیداسیون چربی) شد و ظرفیت پاداکسندگی کبد به طور قابل توجهی در ماهیان تیمار شده با مالاتیون در مقایسه با گروه شاهد پایین بود و تیمار با سیلیمارین به طور قابل توجهی تغییرات مشاهده شده درگروه‌های در معرض مالاتیون را بهبود بخشید (۳).

تغییرات بافتی ناشی از آشفتگی در سطح مولکولی یک سامانه زیستی است. بافت شناسی ارزیابی کاملی از سلامتی موجود زنده را فراهم می‌کند و به طور مؤثری اثرات مواجهه با آلاینده‌های محیطی را انعکاس می‌دهد. تأثیرفلزات سنگین می‌تواند به صورت افزایش یا کاهش فعالیت آنزیم‌های کبدي و تغییرات آسیب‌شناختی کبدي (تحت حاد) بروزنماید. مواجهه‌ی موجود زنده با نانوذرات نیکل باعث بروز دژنراسیون کبدی می‌گردد (۲۹). نانوذرات در درجه اول به مقدار زیادی روی کبد و طحال اثر می‌گذارند و پس از آن به مقدار کمی بر بافت‌های کلیه، قلب و مغز مؤثر هستند (۱۲). نتایج بافت شناسی مطالعه حاضر نشان داد که مواجهه با نانوذره نیکل به طور قابل ملاحظه‌ای پیکنوز هسته‌ای، واکوئله شدن سیتوپلاسم، نفوذ یاخته‌های ایمنی و بافت مردگی را افزایش داد که می‌تواند موجب اختلال در عملکرد بافت کبد و سرانجام بدن گردد، چرا که کبد به همراه طحال در تصفیه خون و متابولیزه کردن مواد خارجی نقش دارند (۱۲). تنش اکسیداتیو، پاسخ پاد اکسندگی و

تغییرات بافت‌شناسی ماهی تیلاپیای موزامبیک پس از ۱۴ روز مواجهه با نانو ذره نیکل نشان از تجمع قابل توجه نیکل در بافت‌های آبشش، پوست با بالاترین سطح تجمع آن در کبد داشت. در بافت کبد هیپرتروفی و بافت مردگی قابل تشخیص بود (۵) که در مطالعه حاضر نیز این علایم در تیمار هشت مشاهده گردید. مواجهه با نیکل موجب بزرگ شدن کبد و تغییرات ریخت‌سنجي و پارامترهای بافتي در موش نر شد (۲۵). پس از تزریق داخل صفاقی سولفات نیکل به موش‌ها حالت طبیعی کبد تا حد زیادی تغییر یافت و واکوئله شدن سیتوپلاسم (کبدچرب)، هسته غیرعادی و هیپرتروفی قابل مشاهده بود (۲۵). این نکته در مورد نانوذرات نیکل در مطالعه حاضر (تیمارهای هفت و هشت) نیز صادق بود که به صورت وابسته به غلظت تشدید شدند.

بررسی اثرات سمی آهن، مس، نیکل و روی بر بافت کبد ماهی سفید نشان از دژنرسانس چربی، خونریزی و خزان‌یاختگی داشت. میزان واکوئله شدن یاخته‌های کبدی در روزهای پایانی بیشترین مقدار بود و تأثیر آسیب‌شناختی فلز نیکل نسبت به فلزات دیگر در بافت‌های کبد شدیدتر بود (۱۲). در مطالعه دیگری، ۱۴ روز پس از تزریق داخل وریدی نانو-ذرات نیکل (با قطر ۵۰ نانومتروسه دوز ۱، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم / کیلوگرم) درموش، آسیب‌های کبد، طحال،ریه و همچنین التهاب و سمیت سلولی ناشی از سمیت حاد نانو ذرات نیکل قابل مشاهده بود (۱۹). نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم (۸۰۰- ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر) موجب آسیب بافت کبد *Carassius auratus* شد (۱۸). در مواجهه بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان با ۲۵ و ۵۰ ppb نانوذره مس استحاله سیتوپلاسمی و واکوئلی یاخته های کبدی نزدیک به سینوزوئیدها در تیمار ۲۵ ppb و بافت مردگی کبدی، التهاب، تورم شدید در ناحیه مجاری صفراوی، پوشش ها و ترشحات ناشی از التهاب در تیمار حاوی ۵۰ ppb دیده شد(۱۳).این نکته در مورد نانوذرات نیکل به تنهایی در خصوص تیمارهای ۷ و ۸ مطالعه حاضر نیز صادق بود. بدین ترتیب که با افزایش میزان نانوذره دریافتی آسیب‌های بافت شناختی کبدی در این ماهیان افزایش یافت. مطالعه نقش حفاظتی سیلیمارین برابر دی متیل بنز آنتراسن (DMBA)، القاء کننده سمیت کبدی در موش‌ها، نشان داد که دی متیل بنز آنتراسن فعالیت آنزیم‌های سرم کبد و برخی از شاخص‌های بیوشیمیایی را افزایش داد اما این اثرات در گروه دریافت کننده سیلیمارین متوقف شد. بافت‌مردگی و خزان یاختگی، تخریب میتوکندری و/ یا تراکم کروماتین هسته‌ای در گروه DMBA مشاهده شد، که در گروه دریافت‌کننده سیلیمارین آسیب‌های بافتی کاهش یافت که برخی از یافت‌های پژوهش حاضر در خصوص بافت‌شناسی همخوانی نداشت، که می‌تواند ناشی از نوع آلاینده، مدت زمان رویارویی با آلاینده، موجود زنده و ... باشد(۳۰).

امروزه آلودگی‌های ناشي از نانوذرات به عنوان مسألهای جدي مطرح است. ماندگاري نانوذرات اکسیدفلزي در محیط و زنجیره غذایی از مخاطرات جدی محیط زیست بویژه بوم‌سازگان‌های آبی است. باتوجه به نتایج بدست آمده می‌توان گفت که نانوذره اکسید نیکل باعث تغییر نامناسب شاخص‌های پاد اکسایشی و موجب تخریب بافت کبد شده و در واقع سیلیمارین در غلظت مورد استفاده (چه به عنوان یک عامل پیشگیری کننده و چه به عنوان ترکیب درمان‌کننده) از کارایی مناسبی برخودار نبود که ممکن است به دلیل کم‌بودن میزان سطح ترکیب محافظت کننده، سن ماهیان، مدت زمان آزمایش و ... باشد. همچنین پیشنهاد می‌شود در مطالعه‌های بعدی از سطوح مختلف نانوذره اکسید نیکل (کمتر از مقادیر حاضر) به همراه سطوح مختلفی از ترکیب سیلیمارین جهت مشاهده بهتر اثر حفاظتی سیلیمارین مورد استفاده قرار گیرد.

منابع مورد استفاده

1. Ali, M., Mirvaghefi, A., Poorbagher, H., Asadi, F. 2014. Studying the effect of vitamin E selenium and C supplement on antioxidant defense activity and lipid peroxidation index of rainbow trout (*Oncorohynchus mykiss*) in exposure to sub-acute Diazinon. *Journal of Applied Ichthyological Research*, 2 (1) :75-92.

2. Banaee, M., Mirvagefei, A. R., Rafei, G. R., Sureda Gomila, A. 2011. Effects of oral administration of silymarin on biochemical parameters of blood in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of fisheries, *Iranian Journal of Natural Resources*, 63(4): 271-286.

3. Banaee, M., Sureda, A., Shahaf, S., Fazilat, N. 2015. Protective Effects of Silymarin Extract on Malthion-Induced Zebra Cichlid (*Cichlasoma nigrofasciatum*) Hepatotoxicity. *Iranian Journal of Toxicology,* 9(28): 1239-1246.

4. David, B. 2008. How meaningful are the results of nanotoxicity studies in the absence of adequate material characterilaztion.*Toxicol Sciences,* 101:183-185.

5. Eisler, R. 1998. Nickel hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. Biological Science Report USGS/BRD/BSR-1998-0001.

6. 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(4): 415-430.

7. Gazak, R., Walterova, D., & Kren, V. 2007. Silybin and silymarin-new and emerging applications in medicine. *Current Medicinal Chemistry*, 14(3): 315-338.

8. Golban, A., Akbarian, A., Saleh, H. 2011.plytogenics in animal nutrition: (Natural concepts to optimize gut health and performance). Mashhad Ferdowsi University.

9. Halliwell, B. 2001. Free Radicals and other reactive species in Disease. Encyclopedia of Life Sciences.

10. Hao, L., Chen, L. 2012. Oxidative stress responses in different organs of carp (*Cyprinus carpio*) with exposure to ZnO nanoparticles. *Ecotoxicology and Environmental safety,* 80: 103-110.

11. Hosseini, N., Malekirad, A., Changizi Ashtiani, S., Nazemi, M. 2011. Free radicals scavenging activity of essential oils and different fractions of methanol extract of zataria multiflora, *Salvia offici-*

nalis, Rosmarinus officinalis, *Mentha pulegium* and *Cinnamomum zeylanicum. Journal Shahid Sadoughi Univ Med Sci*, 20(1): 28-38.
12. Imanpour, m., MehdiPour, N. 2012. Toxic effects of iron, copper, nickel and zinc on morphological changes of the liver tissue White fish (*Rutilus frissi kutum*). The National Conference of Gorgan University of fishery resources in the Caspian Sea.
13. Imani, A., Sarvi Moghanlo, K., Khani, S. 2016. Pathology of copper nanoparticles on liver histoarchitecture and haematobiochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings before and after a recovery period. *Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi)*, 29(113): 110-118.
14. Johari, S. A., Sourinejad, I., Barsch, N., Saed Moocheshi, S., Kaseb, A., Nazdar, N. 2014. Dose physical production of nanoparticles reduce their ecotoxicity? A case of lower toxicity of AgNPs produced by laser ablation to Zebrafish *(Danio rerio). International Journal of Aquatic Biology*, 2(4):188-192.
15. Karthigarani, M., Navaraj, P. 2012. Impact of nanoparticle on enzymes activity in *Oreochromis mossambicus*. *IJSTR*, 1, 13-17.
16. Kunjiappan, S., Bhattacharjee, C., Chowdhury, R. 2015. Hepatoprotective and antioxidant effects of *Azolla microphylla* based gold nanoparticles against acetaminophen induced toxicity in a fresh water common carp fish (*Cyprinus carpio* L). *Nanomedicine Journal*, 2(2): 88-110.
17. Li, Z. H., Zlabek,V., Velisek, J., Grabic, R., Machova, J., Kolarova, J., Li, P. 2011. Acute toxicity of carb amazepine to juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects on antioxidant responses, hematological parameters and hepatic, *Ecotoxicology and Environmental Safety,*74:319–327.
18. Lourenco, J. F. C. 2012. Toxicological effects of TiO2 nanoparticles in two freshwater species: *Carassius auratus* and *Corbicula fluminea* (Doctoral dissertation, Universidade Da Beira Interior).
19. Magaye, R. R., Yue, X., Zou, B., Shi, H., Yu, H., Liu, K., Lin, X., Xu, J., Yang, C., Wu, A., Zhao, J. 2014. Acute toxicity of nickel nanoparticles in rats after intravenous injection, International *Journal of Nanomedicine,* 9: 1393–1402 .
20. Mohammadi Movahed, M. 2015. Effect of Iron oxide nanoparticles on antioxidant defense system and lipid peroxidation in carp (*Cyprinus carpio*). University of Guilan.
21. Mortazavy, S., Esmaili, A. S., Riyahi Bakhtiari, A. R. 2005. Determination and ratio nikel to vanadium from oil pollution in *Pinctada radiate* and *Saccosterea cucullata* in Coastal of Hormozgan Province. *Iranian Journal of Natural Resources*, 58(1): 1-14.
22. Mohamadifard, M., Nazem, H., Mottaghipisheh, J. 2016.The Effects of Copper Oxide Nanoparticles and Hydroalcoholic Extracts of *Berberis vulgaris, Descurainia sophia* and *Silybum marianum*on Catalase, Glutathione Peroxidase, and Malondialdehyde Concentration in Male Diabetic Rats. *Journal Babol Univ Med Sci*, 18(3): 54-61.
23. Ptashynski, M. D., Klaverkamp, J. F. 2002. Accumulation and distribution of dietary nickel in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis). Aquatic Toxicology*, 58: 249- 264.
24. Rahdar, A., Aliahmad, M., Azizi, Y. 2015. NiO Nanoparticles: Synthesis and Characterization. *Journal of Nanostructures,* 5(2): 145-151.
25. Razavipour, S. T., Behnammorshedi, M. R., Razavipour, R., Ajdary, M. 2015. The toxic effect of nickel nanoparticles on oxidative stress and inflammatory markers. *Biomedical Research*, 26(2): 370-374.
26. Sanchez, W., Palluel, O., Meunier, L., Coquery, M., Porcher, J. M., Ait-Aissa, S. 2005. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. *Environmental toxicology and pharmacology,* 19(1): 177-183.
27. Salmanian, Sh., Sadeghi Mahoonak, A. R., Alami, M., Ghorbani, M. 2013. Determination of antiradical and antioxidant activities and flavonoid content in hawthorn fruit *(Crataegus elbursensis).Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 8(1): 177-185.
28. Sersen, F., Vencel, T., Annus, J. 2006. Silymarin and its components scavenge phenylglyoxylic ketyl radicals. *Fitoterapia*, 77: 525- 529.
29. Siddiqui, M. A., Ahamed, M., Ahmad, J., Majeedkhan, M. A., Musarrat, J., AL- Khedhairy, A. A., Alrokayan, S. A. 2012. Nickel oxide nanoparticles induce cytotoxicity, oxidative stress and apoptosis in cultured human cells that is abrogated by the dietary antioxidant curcumin. *Food and Chemical Toxicology*, 50: 641- 647.
30. Soto, C., Mena, R., Luna, J., Cerbón, M., Larrieta, E., Vital, P. 2004. Silymarin induces recovery of pancreatic function after alloxan damage in rats. *Life Science.* Sep,75(18): 2167-80.
31. Toman, R., Lukac, N., Massanyi, P., Hajkova, Z. 2013. Changes of blood parameters associated with nickel administration in rats. Animal Welfare, Ethology and Housing Systems, 9(3): 604-611.
32. Wang, J., Sun, P., Bao, Y., Liu, J., An, A. 2011. Cytotoxicity of single-walled carbon nanotube on pc12 cells. *Toxicology in Vitro*, 25: 242–250.
33. Zhang, J.F., Wang, X.R., Guo, H.Y., Wu, J.C., Xue, Y.Q. 2004. Effects of water-soluble fractions of diesel oil on the antioxidant defenses of the goldfish, *Carassius auratus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 58(1): 110-116.
34. Zhu, X., Zhou, J., Cai, Z. 2011. The toxicity and oxidative stress of TiO2 nanoparticles in marine abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*). *Marine pollution bulletin*, 63(5): 334-338.