مجله بوم شناسی آبزیان

Journal homepage: http://jae.hormozgan.ac.ir

تأثیر تجویز خوراکی نانو ذرات اکسید روی (ZnO-NPs) بر برخی فراسنجه‌های ایمنی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

آمل بیت‌سیاح، مهدی بنایی*، بهزاد نعمت‌دوست حقی

گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و محیط‌زیست، دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء (ص) بهبهان، ایران

نوع مقاله:
پژوهشی

تاریخچه مقاله:
دریافت: ۹۶/۰۵/۲۸
اصلاح: ۹۶/۰۷/۱۸
پذیرش: ۹۶/۰۸/۱۸

کلمات کلیدی:
اکسید روی
سیستم ایمنی
کپور معمولی
نانوذره

چکیده

افزایش استفاده از نانو ذرات اکسید روی (ZnO-NPs) در زمینه‌های مختلف سبب شده تا نگرانی‌ها درباره خطرات احتمالی زیست‌محیطی مرتبط با ورود این نانو ذرات به اکوسیستم‌های آبی افزایش یابد. هدف از این مطالعه، ارزیابی تأثیر تجویز خوراکی ZnO-NPs بر فراسنجه‌های ایمنی خونی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) است. در این مطالعه، ماهیان به مدت ۲۱ روز با دوزهای ۰/۰، ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم ZnO-NPs به ازای هر کیلوگرم غذا تغذیه شدند. در پایان دوره آزمایش، فراسنجه‌های ایمنی نظیر فعالیت لیزوزیم، ایمنوگلبولین تام، کمپلمان تام (ACH50) و کمپلمان C3 و C4 اندازه‌گیری شد. تغذیه ماهیان با جیره دارای ۱۵ میلی‌گرم ZnO-NPs سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم لیزوزیم گردید ($P < ۰/۰۵$). درحالی‌که، تغییر معنی‌داری در فعالیت ایمنوگلبولین تام و ACH50 مشاهده نشد. فعالیت کمپلمان C3 و C4 در پلاسمای ماهیان تحت تیمار ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم ZnO-NPs به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل است ($P < ۰/۰۵$). اگرچه تجویز خوراکی ZnO-NPs تأثیری در افزایش سطح ایمنوگلبولین تام و ACH50 نداشت، اما افزایش فعالیت آنزیم لیزوزیم و فراسنجه‌های نظیر کمپلمان C3 و C4 در ماهیان تحت تیمار ۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم ZnO-NPs می‌تواند نشان‌دهنده یک پاسخ فیزیولوژیکی به افزایش سطح روی در خون و همچنین افزایش عملکرد سیستم ایمنی غیراختصاصی باشد.

مقدمــه

روی (Zn) یک عنصر کمیاب و ضروری برای ماهیان است که نقش مهمی در عملکرد بیش از ۳۰۰ آنزیم مختلف و تقریباً نزدیک به ۲۰۰۰ فاکتور نسخه‌برداری و همچنین متابولیسم پروتئین و کربوهیدرات‌ها بازی می‌کند. یون‌های روی در تنظیم دریافت سیگنال سلولی، فعالیت گیرنده‌های غشای سلولی، ناقل‌ها و کانال‌های غشای سلولی، تنظیم سوخت‌وساز پیام‌رسان ثانویه، فعالیت پروتئین کینازها و فسفاتازها و همچنین تنظیم باند شدن فاکتور نسخه‌برداری به DNA نقش مهمی دارد. تری کلسیم فسفات موجود در پودر ماهی و فایتات یا اسید فایتیک در پودر سویا و دیگر دانه‌های روغنی و غلات می‌تواند با کاهش دسترسی زیستی به مواد معدنی مانند روی و منگنز برای ماهیان آب شیرین (Hossain *et al*., 2003) موجب کاهش نرخ رشد، افزایش مرگ و میر، کاتاراکت چشم، جراحت پوستی و باله‌ها، کوتاه شدن طول بدن در ماهی‌ها گردد (Wang and Wang, 2015).

از این‌رو استفاده از روی اضافی در جیره غذایی ممکن است بتواند از بروز عوارض ناشی از کمبود روی جلوگیری کند (Hossain *et al*., 2003)؛ اما افزایش دفع روی از ماهیان و افزایش غلظت آن در محیط می‌تواند موجب افزایش آلودگی‌های

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: mahdibanaee@yahoo.com

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-05-19]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.8.3.3.9]

محیطی گردد (Feng *et al*., 2009). از این‌رو پژوهشگران در تلاش‌اند تا ضمن افزایش دسترسی زیستی به روی موجود در جیره، از میزان روی در مکمل‌های غذایی بکاهند (Wang *et al*., 2018). با توجه به ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی نانو ذرات اکسید روی، استفاده از آن در جیره غذایی ممکن است یک راه‌کار مناسب برای رفع مشکل فوق ذکر باشد (Sahoo *et al*., 2014). نانو ذرات اکسید روی موجود در جیره به دلیل اندازه کوچک به راحتی توسط سیستم گوارشی جذب می‌شوند (Feng *et al*., 2009) و از طریق خون در بافت‌های مختلف بدن به ویژه کبد توزیع می‌گردد (Hao *et al*., 2013; Swain *et al*., 2016). از این‌رو این ترکیب می‌تواند به عنوان مکمل غذایی، محرک رشد، آنتی‌اکسیدان و ترکیب ضد میکروبی و عامل تعدیل کننده سیستم ایمنی در جیره غذایی گونه‌های مختلف جانوران پرورشی مورد استفاده قرار گیرد (Mishra *et al*., 2014; Sahoo *et al*., 2014).

اگرچه درباره اثرات سمی روی در مواد غذایی و جیره غذایی گونه‌های مختلف جانوری اطلاعات بسیاری موجود است (Lee *et al*., 2014; Xiong *et al*., 2011)، اما اطلاعات بسیار اندکی از اثرات نانوذرات اکسید روی بر جانوران پرورشی از جمله ماهیان در دسترس می‌باشد (Connolly *et al*., 2016). با این حال، در اغلب موارد، مبنای مطالعات سم‌شناسی نانوذرات فلزی، تماس آبزیان با فاز محلول نانوذرات است (Banaee *et al*., 2016) و دانش ما درباره خطر بالقوه دوزهای مختلف نانوذرات اکسید روی موجود در رژیم غذایی ماهیان هنوز ناشناخته است و اطلاعات سم‌شناسی در این زمینه نیز بسیار اندک است (Swain *et al*., 2016). با این حال، سمیت سلولی نانوذرات اکسید روی بسته به غلظت آن، نحوه تماس و مدت زمان تماس با آن می‌تواند به بروز استرس اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپیدی، آسیب به غشای سلولی و آسیب اکسیداتیو به DNA منجر شود (Najafzadeh *et al*., 2013; Lin *et al*., 2009). اگرچه پژوهش‌های صورت گرفته در رابطه با تجویز خوراکی دوزهای ۳۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم نانوذرات اکسید روی در کیلوگرم جیره (Connolly *et al*., 2016) و دوزهای ۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم نانوذرات اکسید روی در کیلوگرم جیره (Chupani *et al*., 2017) و حتی دوزهای پایین‌تر نانواکسید روی حاکی از بروز سمیت سلولی، استرس اکسیداتیو (Taheri, 2016)، تغییر در فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون (Vaziriyan, 2017) و آسیب‌های بافتی (Shahafve, 2016) در ماهیان است؛ اما همچنان بررسی اثرات سمیت احتمالی تجویز خوراکی نانوذرات در دوزهای پایین‌تر از حد موارد فوق الذکر ضروری به نظر می‌رسد.

از آنجایی که سیستم ایمنی ماهیان اولین سیستم دفاعی در برابر عوامل بیماری‌زا و آلاینده‌های محیطی است (Ahmadi *et al*., 2014)؛ لذا پاسخ سریع آن به استرس ناشی از پاتوژن‌های عفونت‌زا یا مواد سمی موجود در محیط و مواد غذایی را می‌توان از طریق تغییر در فعالیت یا سطح برخی پارامترهای ایمنی که ممکن است به عنوان شاخص و مارکر هشداردهنده استرس محیطی شناخته شوند، مورد بررسی قرار داد (Ahmadi *et al*., 2014). لذا برای بررسی و ارزیابی تأثیرات ایمونولوژیکی تجویز خوراکی نانواکسید روی بر ماهیان، این مطالعه انجام شده است. هدف از این مطالعه بررسی چگونگی تأثیر تجویز خوراکی نانوذرات اکسید روی به بر سیستم ایمنی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) است. از این‌رو، برای بررسی تأثیر نانوذرات اکسید روی بر سیستم ایمنی ماهیان کپور، فراسنجه‌های نظیر ایمنوگلبولین تام، فعالیت لیزوزیم، کمپلمان تام و C3 و C4 اندازه‌گیری شده است. ماهی کپور معمولی به عنوان یک گونه مدل در این مطالعه انتخاب شد ؛ زیرا ماهی کپور معمولی یکی از گونه‌های پرورشی آب شیرین است که در اغلب بوم‌سازگان‌های آبی نیز یافت می‌شود. این ماهی می‌تواند به خوبی با شرایط آزمایشگاهی سازگار شود، غالباً از آن در بسیاری از آزمایش‌های سم‌شناسی به عنوان یک مدل آزمایشگاهی می‌توان استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) بر اساس رهنمود اخلاقی پژوهش بر روی جانوران در ایران استفاده شده است (Mobasher *et al*., 2008). ماهی کپور معمولی (۲/۵±۲۰/۵ گرم) از یک مزرعه خصوصی ماهیان گرمابی در اهواز خریداری و به آزمایشگاه تکثیر و پرورش دانشکده منابع طبیعی و محیط‌زیست دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء (ص) منتقل گردید. پیش از شروع آزمایش ماهیان در حوضچه‌های ۱۰۰۰ لیتری و در آبی عاری از کلر با دمای ۲±۲۴ درجه سانتی‌گراد، pH برابر با ۰/۲±۷/۴، اکسیژن محلول ۶ میلی‌گرم در لیتر و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، با نرخ

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-05-19]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.8.3.3.9]

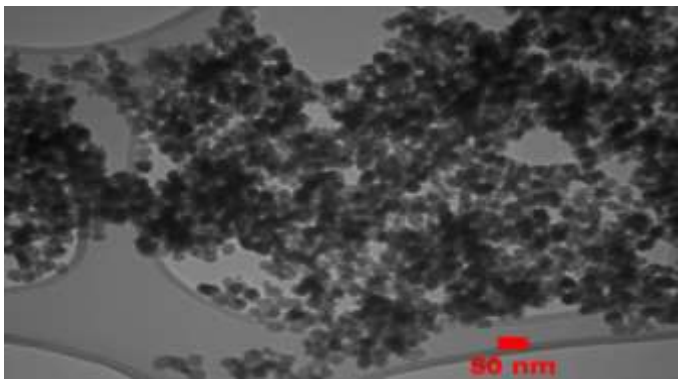
تعویض ۵۰ درصد آب در روز به مدت ۲ هفته با شرایط آزمایشگاهی سازگار شدند. در دوره سازگاری ماهیان با جیره تجاری کپور (شرکت بیضا، شیراز) تغذیه شدند.

نانوذرات اکسید روی از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان تهیه گردید. ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نانوذرات اکسید روی در جدول ۱ و تصاویر میکروسکوپی TEM و SEM به ترتیب در شکل ۱ و ۲ و منحنی افتراقی اشعه X آن نیز در شکل ۳ ارائه شده است.

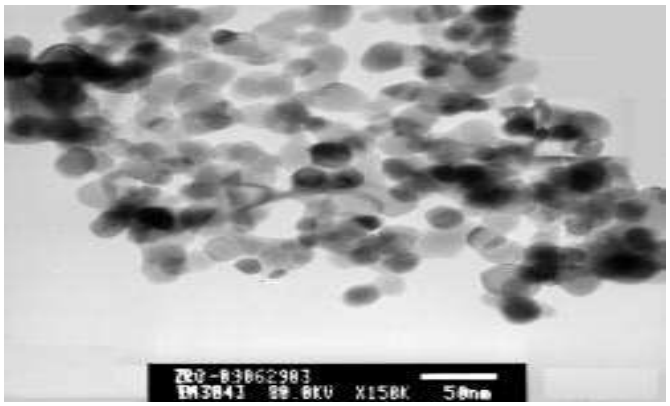
با توجه به اینکه در مطالعات صورت گرفته، تجویز خوراکی دوزهای ۵۰ تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم نانوذرات اکسید روی به ماهیان کپور معمولی و قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌تواند عوارضی در پی داشته باشد (Chupani *et al*., 2017; Connolly *et al*., 2016)؛ در این مطالعه از دوزهای ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم که ممکن است از سمیت بسیار کمتری برخوردار باشند استفاده شده است.

جدول ۱. ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نانو ذرات اکسید روی (اقتباس از بروشور شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان)

اکسید روی	ZnO
درصد خلوص	٪۹۹/۹
میانگین اندازه اولیه (D50)	۳۰-۱۰ نانومتر
سطح تماس ویژه (SSA)	۶۰-۲۰ مترمربع بر گرم
رنگ	سفید
چگالی	۵/۶۰۶ گرم بر سانتی‌متر مربع



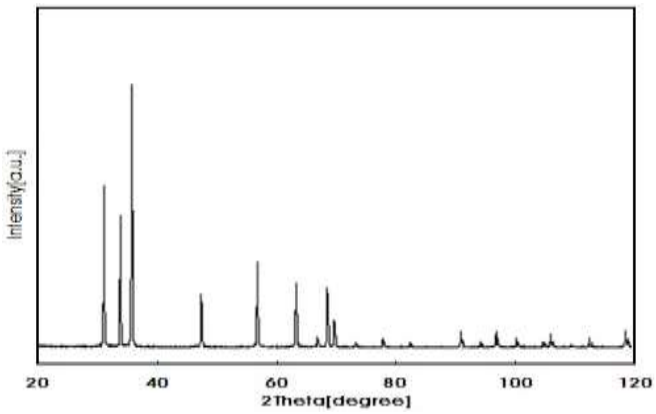
شکل ۱. تصاویر میکروسکوپی TEM پودر نانو ذرات اکسید روی (اقتباس از بروشور شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان)



شکل ۲. تصاویر میکروسکوپی SEM پودر نانو ذرات اکسید روی (اقتباس از بروشور شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان)

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-05-19]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.8.3.3.9]



شکل ۳. منحنی افتراقی اشعه X کریستال‌های نانو ذرات اکسید روی (اقتباس از بروشور شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان)

پودر نانو ذرات اکسید روی به ترتیب در دوزهای ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم نانواکسید روی ابتدا در آب مقطر حل گردید و با حمام اولتراسونیک (در طی ۱۰ دقیقه با فرکانس ۳۵ کیلو هرتز و قدرت ۴۰۰/۱۰۰ وات) به‌طور یکنواخت توزیع گردید (Banaee *et al*., 2016). سپس محلول حاصل با پودر غذا به وسیله مخلوط‌کن به مدت ۳۰ دقیقه مخلوط و پس از افزودن روغن آفتاب‌گردان و آب مقطر، کاملاً همگن شد. سپس خمیر حاصل با استفاده از چرخ گوشت به صورت رشته‌ای در آورده شد. از ژلاتین گاوی نیز به عنوان ماده پرکننده و پلت چسبان استفاده گردید. رشته‌های غذا به مدت ۱۲ ساعت در آون با دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد خشک گردید. سپس رشته‌ها به پلت‌های ۲-۳ میلی‌متری شکسته شد و تا زمان مصرف در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (Banaee *et al*., 2015). جیره غذایی گروه کنترل نیز به همین روش و بدون افزودن نانواکسید روی تهیه گردید.

۱۴۰ ماهی کپور معمولی به‌طور تصادفی در ۱۲ حوضچه ۸۰ لیتری مجهز به هواده و با نرخ تعویض روزانه ۵۰ درصد آب در قالب یک طرح کاملاً تصادفی شامل ۴ تیمار و با ۳ تکرار توزیع شدند. ماهیان به ترتیب با جیره‌های غذای دارای ۰/۰ (گروه کنترل)، ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم نانوذرات اکسیدروی به ازای هر کیلوگرم غذا به مدت ۳ هفته تغذیه شدند. در پایان دوره آزمایش، ۱۲ ماهی از هر گروه آزمایشی (۴ ماهی از هر تکرار) به‌طور تصادفی صید گردید و با پودر گل میخک (۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بیهوش گردید. خون‌گیری از ورید ساقه دمی و با استفاده از سرنگ ۲ سی‌سی هپارینه انجام شد. نمونه‌های خون به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از جداسازی پلاسما، نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش‌های خونی در دمای ۲۵- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Banaee *et al*., 2016).

سنجش ایمنوگلبولین تام با استفاده از روش Amar و همکاران (2000) انجام گرفت. در این روش ۱۰۰ میکرولیتر پلاسما به نسبت ۱ به ۱۰۰ در بافر PBS حل شد و با حجم معادل با محلول پلی‌اتیلن گلیکول ۱۲٪ مخلوط می‌شود. مخلوط حاصل به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق انکوباسیون می‌گردد. پس از سانتریفیوژ نمونه (با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد)، مولکول‌های ایمنوگلبولین از نمونه حذف می‌شوند. در این مرحله بار دیگر پروتئین تام نمونه به روش بیوره سنجش می‌شود و نتیجه از سطح پروتئین تام نمونه قبل از افزودن محلول پلی‌اتیلن گلیکول کسر می‌گردد. سطح ایمنوگلبولین کل به صورت میلی‌گرم در میلی‌لیتر بیان می‌شود.

فعالیت آلترنیتیو کمپلمانی (ACH50) به روش (Yano, 1992) و بر اساس همولیز سلول‌های قرمز گوسفندی (ShRBC) (شرکت تحقیقاتی و پژوهشی بهارافشان) انجام گردید. سلول‌های قرمز گوسفندی بایستی سه مرتبه با محلول اتیلن گلیکول تترا استیک اسید- منیزیوم - ژلاتین ورنال (۰/۰۱ مولار، ۷ pH) تا رسیدن به سطح ۲×۱۰^{۸} سلول در میلی‌لیتر شستشو داده شود. ابتدا جذب نوری همولیز ۱۰۰ درصد گلبول‌های قرمز گوسفند با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مذکور به ۳/۴ میلی‌لیتر آب مقطر تعیین شد؛ سپس رقت‌های متوالی پلاسما تهیه و با بافر فوق به حجم ۲۵۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس به آن‌ها ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون گلبول قرمز گوسفندی اضافه و در دمای اتاق به مدت ۹۰ دقیقه انکوبه شدند. در پایان به هرکدام از لوله‌های آزمایش ۳/۱۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۸۵ درصد کلرید سدیم افزوده شد. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۶۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و جذب نوری محلول رویی در طول موج ۴۱۴

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-05-19]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.8.3.3.9]

نانومتر خوانش شد. حجمی از پلاسما که سبب همولیز ۵۰ درصدی می‌شود، عبارت است از فعالیت کمپلمان نمونه که از رابطه زیر محاسبه می‌شود:

$$ACH50\ (U\ ml^{-1}) = k \times (\text{فاکتور رقت}) \times 0.5$$

در این رابطه k حجمی از پلاسما برحسب میلی‌لیتر است که موجب همولیز ۵۰ درصدی گلبول‌های قرمز گوسفند می‌شود؛ ۰/۵ عدد ثابت و فاکتور رقت نیز در این آزمون برابر ۰/۰۱ است؛ زیرا پلاسما ۱۰۰ مرتبه رقیق شده است.

سطح لیزوزیم پلاسمای خون به روش کدورت سنجی و با استفاده از باکتری *Micrococcus luteus* (*Actinobacteria: Micrococcaceae*) لیوفلایز شده اندازه‌گیری شد (Lange *et al*., 2001). در این روش ۵۰ میکرو لیتر پلاسما به ۲ میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروکوکوس لوتوس (۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در بافر فسفات سدیم (pH ۶/۲) افزوده می‌شود. واکنش در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام می‌شود. جذب نوری در ۵۷۰ نانومتر پس از ۳۰ ثانیه و ۴ دقیقه و ۳۰ ثانیه خوانش گردید. از محلول بافر PBS به عنوان بلانک و از لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ (سیگما) محلول در بافر فسفات سدیم (PBS) برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد.

اندازه‌گیری فعالیت کمپلمان‌های C3 و C4 به روش ایمونوتوربیدیمتری و با استفاده از کیت پارس‌آزمون انجام شد. کمپلمان‌های C3 و C4 در هر نمونه سرم را با آنتی‌بادی موجود در کیت مخلوط گردید، پس از آن تشکیل کمپلکس آنتی‌بادی-آنتی‌ژن، جذب نوری در طول‌موج ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت C3 و C4 بر اساس مقادیر استاندارد کیت‌ها محاسبه و به صورت میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیان گردید (Li *et al*., 2013; Emadi *et al*., 2010; Abdollahi *et al*., 2016).

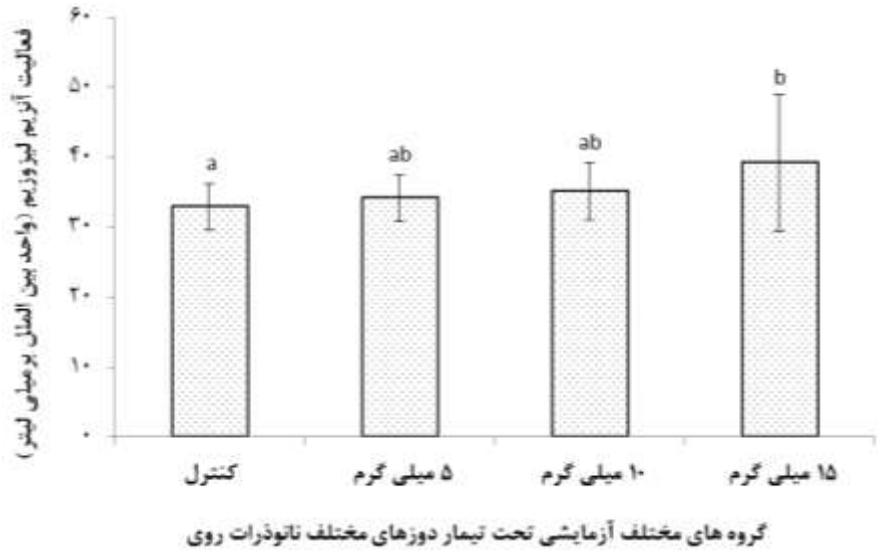
تجزیه و تحلیل داده‌ها

نرمال بودن داده‌ها نیز بر اساس آزمون شاپیرو- ویلک با استفاده از نرم‌افزار SPSS 22 انجام شد. تجزیه تحلیل داده‌ها به روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (One- way ANOVA) انجام گرفت و مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵٪ (α = ۰/۰۵) صورت گرفت.

نتایـج

در طی مدت آزمایش و نیز دوره سازگاری، هیچ مرگ و میری بین ماهیان مشاهده نشد. تغییر سطح فراسنجه‌های ایمنی خونی ماهیان کپور تحت تیمار دوزهای مختلف نانو ذرات اکسید روی در شکل ۴ تا ۸ نشان داده شده است.

در شکل ۴، تغییرات سطح فعالیت آنزیم لیزوزیم نشان می‌دهد سطح فعالیت این آنزیم در ماهیان تحت تیمار ۱۵ میلی‌گرم نانوذرات روی به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل است (P < ۰/۰۵).

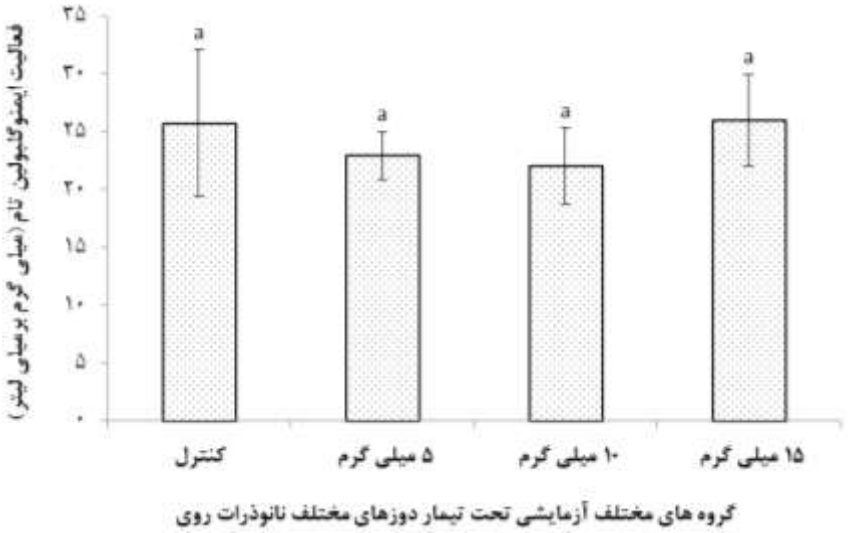


شکل ۴. سطح فعالیت آنزیم لیزوزیم در پلاسمای ماهیان کپور معمولی تحت تیمار دوزهای مختلف افزودنی خوراکی نانو ذرات اکسید روی

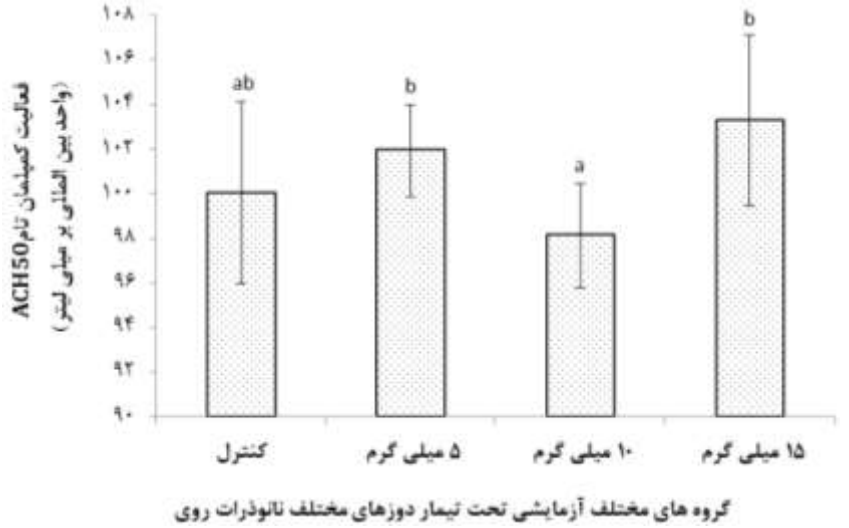
[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-05-19]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.8.3.3.9]

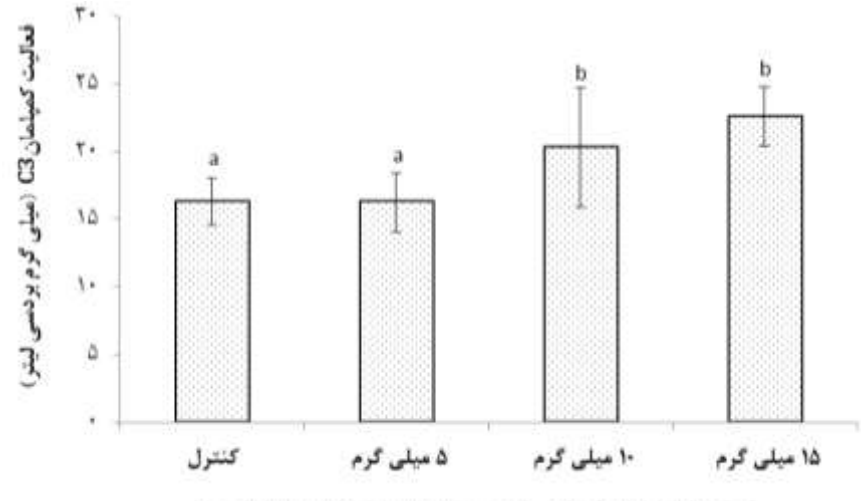
نتایج این مطالعه نشان می‌دهد (شکل ۵) که تجویز نانوذرات روی هیچ‌گونه تأثیر معنی‌داری بر فعالیت ایمنوگلبولین تام نداشت ($P > ۰/۰۵$). نتایج این مطالعه در شکل ۶ نشان می‌دهد که تجویز نانوذرات اکسید روی هیچ‌گونه تأثیر معنی‌داری بر فعالیت کمپلمان تام در گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل نداشت ($P > ۰/۰۵$).



شکل ۵. سطح فعالیت ایمنوگلبولین تام در پلاسمای ماهیان کپور معمولی تحت تیمار دوزهای مختلف افزودنی خوراکی نانوذرات اکسید روی.



شکل ۶. سطح فعالیت کمپلمان تام (ACH50) در پلاسمای ماهیان کپور معمولی تحت تیمار دوزهای مختلف افزودنی خوراکی نانوذرات اکسید روی.

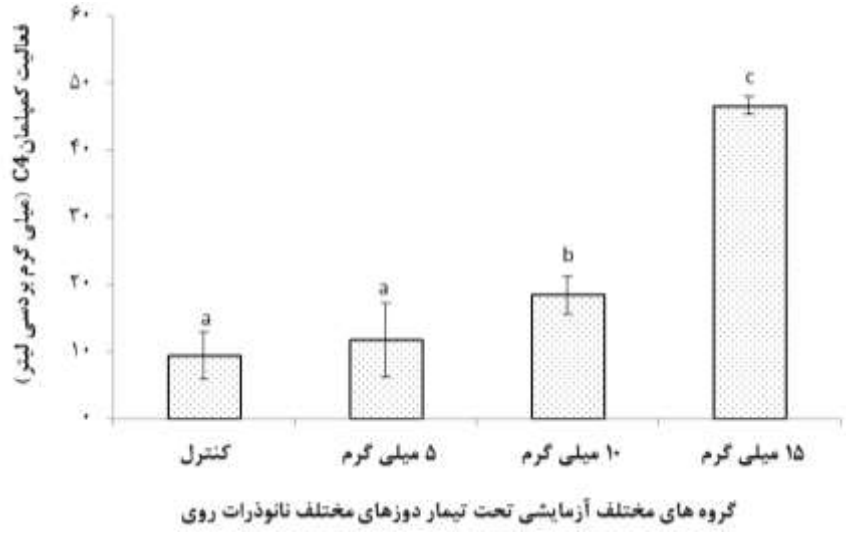


شکل ۷. سطح فعالیت کمپلمان C3 در پلاسمای ماهیان کپور معمولی تحت تیمار دوزهای مختلف افزودنی خوراکی نانوذرات اکسید روی

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-05-19]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.8.3.3.9]

نتایج ارائه شده در شکل ۷ و ۸، به ترتیب نشان می‌دهد تغذیه ماهیان با جیره غذایی دارای غلظت‌های ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم نانوذرات اکسید روی در کیلوگرم جیره موجب افزایش معنی‌دار فعالیت کمپلمان C3 و C4 شده است ($P < ۰/۰۵$).



شکل ۸. سطح فعالیت کمپلمان C4 در پلاسمای ماهیان کپور معمولی تحت تیمار دوزهای مختلف افزودنی خوراکی نانو ذرات اکسید روی.

بحث

به‌طورکلی پژوهش صورت گرفته در رابطه با تأثیر تجویز خوراکی نانوذرات اکسید روی در ماهیان بسیار نادر است (Connolly *et al*., 2016). با این وجود شواهد و مدارک موجود نشان می‌دهد که رژیم غذایی دارای نانوذرات اکسید روی می‌تواند یک مسیر احتمالی انتقال این ترکیب به سطوح بالاتر غذایی در ارگانیسم‌های آبزی نظیر ماهیان باشد. از این‌رو افزودن نانوذرات اکسید روی ممکن است در تأمین نیاز ماهیان به روی مؤثر باشد؛ اما این کار ممکن است خطرات احتمالی متعددی از جمله مسمومیت با نانوذرات اکسید روی را نیز در پی داشته باشد. لذا این مطالعه با هدف بررسی تأثیر تجویز خوراکی نانوذرات اکسید روی بر برخی از فراسنجه‌های ایمنی ماهی کپور معمولی انجام شد.

تجویز خوراکی نانوذرات روی در سطح ۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا سبب افزایش فعالیت لیزوزیم گردید. آنزیم لیزوزیم با تخریب و هیدرولیز پلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت، نقش مهمی در ایمنی ذاتی جانوران بازی می‌کند. این آنزیم همچنین می‌تواند در بهبود گردش خون و عملکرد سیستم ایمنی نیز مؤثر باشد (Merlini and Bellotti, 2005). لیزوزیم در سلول‌های خون‌ساز، گرانولوسیت‌ها، مونوسیت‌ها و ماکروفاژها به مقدار زیادی بیان می‌شود (Merlini and Bellotti, 2005) و نقش مهمی در حمل دارو دارد (Kopac *et al*., 2008). زمانی که نانوذرات روی وارد بدن جانوران می‌شود می‌تواند بر مایعات زیستی نظیر پلاسما اثر گذارد و با برهمکنش و اتصال به پروتئین‌های پلاسما، پوششی به نام هاله پروتئینی را به وجود آورند (Vörös, 2004). لذا با توجه به نقش لیزوزیم در جذب سطحی نانوذرات فلزی (Kopac *et al*., 2008) و برهمکنش نانوذرات اکسید روی با لیزوزیم (Momeni *et al*., 2016)، افزایش سطح لیزوزیم می‌تواند پاسخ فیزیولوژی مناسبی به افزایش سطح نانوذرات روی باشد. افزایش فعالیت لیزوزیم در ماهیان تحت تیمار نانوذرات اکسید روی همچنین می‌تواند نشان‌دهنده تحریک سیستم ایمنی غیراختصاصی ماهیان نیز باشد.

ایمنوگلبولین کل (Ig) مهم‌ترین جزء از ایمنی اختصاصی اکتسابی خونی در ماهیان استخوانی است. نتایج این مطالعه نشان داد که تجویز خوراکی نانوذرات روی تأثیر معنی‌داری در سطح Ig پلاسمای ماهیان ندارد. به‌طورمعمول، نانوذرات فلزی مختلف می‌توانند از طریق اتصال به پروتئین‌های پلاسما نظیر آلبومین، لیپوپروتئین‌ها، پروتئین‌های فاز حاد، ایمنوگلبولین‌ها، پروتئین‌های وابسته به مسیر کمپلمانی و فاکتورهای انعقادی، در پلاسما توزیع گردند (Shim *et al*., 2014). با این حال نتیجه پژوهش‌های مختلف نشان می‌دهد که میل ترکیبی ایمنوگلبولین‌ها و آلبومین برای اتصال به نانوذرات اکسید روی، به رغم بالا بودن سطح آن‌ها در مقایسه با دیگر پروتئین‌های پلاسما، بسیار کمتر است و در رقابت برای جذب نانوذرات اکسید روی به

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-05-19]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.8.3.3.9]

آسانی به وسیله لیپوپروتئین‌ها و پروتئین‌های فاز حاد جایگزین می‌شوند (Shim *et al*., 2014). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که تجویز نانواکسید روی تأثیری بر سطح ایمنوگلبولین نداشته است. این در حالی است که (Li *et al*., 2016) دریافتند که تجویز خوراکی نانو ذرات اکسید روی می‌تواند سطح سنتز ایمنوگلبولین‌ها را در خوکچه‌ها افزایش دهد.

سیستم کمپلمانی نقش حیاتی در سیستم ایمنی ذاتی بازی می‌کند و با ترغیب سلول‌های B به تکثیر، بر ایمنی اکتسابی نیز تأثیر می‌گذارد (Løvoll *et al*., 2007; Li *et al*., 2013). سیستم کمپلمانی اولین جزء سیستم ایمنی ذاتی در ماهیان است که تکامل می‌یابد (Pushpa *et al*., 2014). فعال شدن سلسله‌ای پی در پی از کمپلمان‌ها از سه مسیر که تا حدی نیز با هم همپوشانی دارند رخ می‌دهد (Pushpa *et al*., 2014)، که در هر سه این مسیرها، فاکتور ۳ و ۴ کمپلمانی (C3 و C4) پروتئین‌های کلیدی محسوب می‌شوند (Løvoll *et al*., 2007). لذا هرگونه تغییر در سطح فعالیت کمپلمان تام (ACH50) می‌تواند بر توان ایمنی ماهیان در حذف پاتوژن‌ها اثر گذارد (Ahmadi *et al*., 2012). نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از مکمل خوراکی نانوذرات اکسید روی تغییر معنی‌داری در سطح کمپلمان تام پلاسمای ماهیان کپور ایجاد نکرد. در همین راستا استفاده از نانوذرات اکسید روی در جیره غذایی خوکچه‌ها نیز تأثیری بر سطح کمپلمان تام سرم آن‌ها نداشت (van Heugten *et al*., 2003).

فاکتور ۳ کمپلمانی (C3) یک گلیکوپروتئین است که توسط سلول‌های کبدی و مونوسیت‌ها ساخته می‌شود، اما روش‌های جدید سلولی و مولکولی نشان داد که پروتئین‌های کمپلمانی در محل‌های مختلفی سنتز می‌شوند (Løvoll *et al*., 2007). فاکتور C3 یکی از پروتئین‌های عمده در سیستم کمپلمان در ماهی است و معمولاً به عنوان آغازگر برای مسیرهای کلاسیک و جایگزین عمل می‌کند (Pushpa *et al*., 2014). فعال‌سازی آن منجر به تشکیل یک کمپلکس نفوذکننده می‌شود که قادر است غشای سلولی عوامل بیماری‌زا را لیز نماید و همچنین از طریق ایجاد التهاب و تولید آنافیلاتوکسین و اوپسونین‌ها، عوامل بیماری‌زا را حذف نماید (Løvoll *et al*., 2007). جزء چهارم کمپلمانی (C4) یک گلیکوپروتئین است که توسط ماکروفاژها و مونوسیت‌ها ساخته می‌شود. فاکتور C4 نقش کلیدی در ایمنی و تحمل جانوران بازی می‌کند. فاکتور C4 پس از شناسایی برخی عوامل عفونت‌زا با دیگر عوامل پروتئینی مؤثر در سیستم ایمنی کمک می‌کند تا با آن‌ها برهمکنش دهند و عوامل عفونت‌زا را از بین ببرند (Mutsuro *et al*., 2005). تجویز نانوذرات مختلف، از جمله نانو ذرات اکسید روی (Shim *et al*., 2014) و نانولوله‌های کربنی (Salvador-Morales *et al*., 2006) می‌تواند سبب فعال‌سازی سیستم کمپلمانی از طریق مسیر کلاسیک و جایگزین شود (Shim *et al*., 2014). لذا افزایش سطح فاکتور C3 و C4 در پلاسمای ماهیان تحت تیمار نانوذرات اکسید روی می‌تواند ناشی از فعال‌سازی سیستم کمپلمانی ماهیان باشد. افزایش فعالیت C3 و C4 در ماهیان همچنین می‌تواند نشان‌دهنده افزایش میزان ساخت آن‌ها در کبد، ماکروفاژها و مونوسیت‌ها باشد. افزایش فعالیت کمپلمان C4 در ماهیان تحت تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذرات اکسید روی گزارش شده است (Chupani *et al*., 2017). تأثیر نانوذرات در افزایش فعالیت سیستم کمپلمانی توسط پژوهشگران دیگر نیز تأیید شده است (Szebeni *et al*., 2007; Vauthier *et al*., 2011).

اگرچه تجویز نانوذرات اکسید روی به صورت افزودنی خوراکی به ماهی کپور تأثیری بر سطح فعالیت ایمنوگلبولین تام و کمپلمان تام نداشت، اما افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم لیزوزیم و فراسنجه‌های نظیر کمپلمان C3 و C4 می‌تواند نشان‌دهنده تأثیر تجویز نانوذرات اکسید روی (به ویژه در دوز ۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم) در تحریک سیستم ایمنی غیراختصاصی ماهیان کپور باشد. نتایج این مطالعه همچنین اطلاعات پایه و اساسی پیرامون تأثیر زیستی تجویز خوراکی نانوذرات اکسید روی بر سیستم ایمنی غیراختصاصی ماهیان فراهم ساخته که ممکن است در ارتقای دانش ما برای درک بهتر تأثیر نانوذرات اکسید روی در افزایش مقاومت ماهیان در برابر عوامل بیماری‌زا مؤثر باشد. از این‌رو پیشنهاد می‌گردد تا تأثیر تجویز خوراکی نانوذرات اکسید روی بر عملکرد سیستم ایمنی ماهیان در مواجه با عوامل بیماری‌زا نیز در مطالعات آتی مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه صنعتی خاتم‌الانبیاء (ص) بهبهان انجام‌شده است. بدین‌وسیله نویسندگان این مقاله از مسئولین محترم تحصیلات تکمیلی دانشگاه، قدردانی می‌نمایند.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-05-19]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.8.3.3.9]

منابـع

Abdollahi, R., Heidari, B., Aghamaali, M. 2016. Evaluation of lysozyme, complement C3, and total protein in different developmental stages of Caspian kutum (*Rutilus frisii kutum* K.). Archives of Polish Fisheries. 24: 15-22.

Ahmadi, K., Banaee, M., Vosoghei, A.R., Mirvaghefei, A.R., Ataeimehr, B. 2012. Evaluation of the immunomodulatory effects of silymarin extract (*Silybum marianum*) on some immune parameters of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Actinopterygii: Salmoniformes: Salmonidae). Acta Ichthyologica et Piscatoria. 42(2): 113-120.

Ahmadi, K., Mirvaghefei, A.R., Banaee, M., Vosoghei, A.R. 2014. Effects of long-term diazinon exposure on some immunological and haematological parameters in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). Toxicology and Environmental Health Sciences. 6(1): 1-7.

Amar, E.C., Kiron, V., Satoh, S., Okamoto, N., Watanabe, T. 2000. Effects of dietary β-carotene on the immune response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss.* Fisheries Science. 66: 1068-1075.

Banaee, M., Mehrpak, M., Nematdoost Haghi, B., Noori, A. 2015. Amelioration of cadmium-induced changes in biochemical parameters of the muscle of Common Carp (*Cyprinus carpio*) by Vitamin C and Chitosan. International Journal of Aquatic Biology. 3(6): 362-371.

Banaee, M., Shahafve, S., Tahery, S., Nemadoost Haghi, B., Vaziriyan, M. 2016. Sublethal toxicity of TiO2 nanoparticles to common carp (*Cyprinus carpio*, Linnaeus, 1758) under visible light and dark conditions. International Journal of Aquatic Biology. 4(6): 370-377.

Chupani, L., Zusková, E., Niksirat, H., Panáček, A., Lünsmann, V., Haange, S.B., von Bergen, M., Jehmlich, N. 2017. Effects of chronic dietary exposure of zinc oxide nanoparticles on the serum protein profile of juvenile common carp (*Cyprinus carpio* L.). Ecotoxicology and Environmental Safety. 579: 1504-1511.

Connolly, M., Fernández, M., Conde, E., Torrent, F., Navas, J.M., Fernández-Cruz, M.L. 2016. Tissue distribution of zinc and subtle oxidative stress effects after dietary administration of ZnO nanoparticles to rainbow trout. Science of the Total Environment. 551: 334-343.

Emadi, H., Amaninejad, P., Emtiazjoo, M., Hosseinzadeh Sahhafi, H. 2010. Effects of Dunaliella microalgae (*Dunaliella salina*) on different levels of complement C3, C4 and antioxidant capacity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Advances in Environmental Biology. 4(3): 456-463.

Feng, M., Wang, Z.S., Zhou, A.G., Ai, D.W. 2009. The effects of different sizes of nanometer zinc oxide on the proliferation and cell integrity of mice duodenum-epithelial cells in primary culture. Pakistan Journal of Nutrition. 8: 1164-1166.

Hao, L., Chen, L., Hao, J., Zhong, N. 2013. Bioaccumulation and sub-acute toxicity of zinc oxide nanoparticles in juvenile carp (*Cyprinus carpio*): A comparative study with its bulk counterparts. Ecotoxicology and Environmental Safety. 91: 52-60.

Hossain, M.A., Matsui, S., Furuichi, M. 2003. Effect pf zinc and manganese supplementation to tricalcium phosphate rich diet for tiger puffer (*Takifugu rubripes*). Bangladesh Journal of Fisheries Research. 7(2): 189-192.

Kopac, T., Bozgeyik, K., Yener, J. 2008. Effect of pH and temperatureon the adsorption of bovine serumalbumin onto titanium dioxide. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 322: 19-28.

Lange, S., Gudmundsdottir, B.K., Magnadottir, B. 2001. Humoral immune parameters of cultured Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). Fish & Shellfish Immunology. 11: 523-535.

Lee, J.W., Kim, J.E., Shin, Y.J., Ryu, J.S., Eom, I.C., Lee, J.S., Kim, Y., Kim, P.J., Choi, K.H., Lee, B.C. 2014. Serum and ultrastructure responses of common carp (*Cyprinus carpio* L.) during long-term exposure to zinc oxide nanoparticles. Ecotoxicology and Environmental Safety. 104: 9-17.

Li, M.Z., Huang, J.T., Tsai, Y.H., Mao, S.Y., Fu, C.M., Lien, T.F. 2016. Nanosize of zinc oxide and the effects on zinc digestibility, growth performances, immune response and serum parameters of weanling piglets. Animal Science Journal. 87(11): 1379-1385.

Li, X., Liu, L., Zhang, Y., fang, Q., Li, Y., Li, Y. 2013. Toxic effects of chlorpyrifos on lysozyme activities, the contents of complement C3 and IgM, and IgM and complement C3 expressions in common carp (*Cyprinus carpio* L.). Chemosphere. 93(2): 428-433.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-05-19]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.8.3.3.9]

Lin, T., Jianyang, J., Fenghua, Z., Huiying, R., Wenli, L. 2009. Effect of nano-zinc oxide on the production and dressing performance of broiler. Chinese Agricultural Science Bulletin. 02: Category Index: S831.

Løvoll, M., Johnsen, H., Boshra, H., Bøgwald, J., Sunyer, J.O., Dalmo, R.A. 2007. The ontogeny and extrahepatic expression of complement factor C3 in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Fish & Shellfish Immunology. 23: 542-552.

Merlini, G., Bellotti, V. 2005. Lysozyme: a paradigmatic molecule for the investigation of protein structure, function and misfolding. Clinica Chimica Acta. 357: 168-172.

Mishra, A., Swain, R.K., Mishra, S.K., Panda, N., Sethy, K. 2014. Growth performance and serum biochemical parameters as affected by nano zinc supplementation in layer chicks. Indian Journal of Animal Nutrition. 31(4): 384-388.

Mobasher, M., Aramesh, K., Aldavoud, S., Ashrafganjooei, N., Divsalar, K., Phillips, C., Larijani, B. 2008. Proposing a national ethical framework for animal research in Iran. Iranian Journal of Public Health. 37(1): 39-46.

Momeni, L., Farhadian, S., Shareghi, B. 2016. Spectroscopic studies of the interaction of Lysozyme and ZnO nanoparticles. Experimental Animal Biology. 4(16): 1-9.

Mutsuro, J., Tanaka, N., Kato, Y., Dodds, A.W., Yano, T., Nakao, M. 2005. Two Divergent Isotypes of the Fourth Complement Component from a Bony Fish, the Common Carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Immunology. 175(7): 4508-4517.

Najafzadeh, H., Ghoreishi, S.M., Mohammadian, B., Rahimi, E., Afzalzadeh, M.R., Kazemivarnamkhasti, M., Ganjealidarani, H. 2013. Serum biochemical and histopathological changes in liver and kidney in lambs after zinc oxide nanoparticles administration. Veterinary World. 6: 534-537.

Pushpa, K., Gireesh-Babu, P., Rajendran, K.V., Purushothaman, C.S., Dasgupta, S., Makesh, M. 2014. Molecular cloning, sequencing and tissue-level expression of complement C3 of *Labeo Rohita* (Hamilton, 1822). Fish & Shellfish Immunology. 40(1): 319-330.

Sahoo, A., Swain, R.K., Mishra, S.K., Jena, B. 2014. Serum biochemical indices of broiler birds fed on inorganic, organic and nano zinc supplemented diets. International Journal of Recent Scientific Research. 5(11): 2078-2081.

Salvador-Morales, C., Flahaut, E., Sim, E., Sloan, J., Green, M.L., Sim, R.B. 2006. Complement activation and protein adsorption by carbon nanotubes', Molecular Immunology. 43(3): 193-201.

Shahafve, S. 2016. The effect of oral administration of ZnO-Nano particles on histopathology in various tissue of common carp *(Cyprinus carpio)* treated with aflatoxin,. MSc. Thesis. Aquaculture Department. Natural Resource and Environmental Faculty, Behbahan University of Technology, Iran.

Shim, K.H., Hulme, J., Maeng, E.H., Kim, M.K., An, S.S.A. 2014. Analysis of zinc oxide nanoparticles binding proteins in rat blood and brain homogenate'. International Journal of Nanomedicine. 9(2): 217-224.

Swain, P.S., Rao, S.B.N., Rajendran, D., Dominic, G., Selvaraju, S. 2016. Nano zinc, an alternative to conventional zinc as animal feed supplement: A review. Animal Nutrition. 2(3): 134-141.

Szebeni, J., Alving, C.R., Rosivall, L., Bünger, R., Baranyi, L., Bedöcs, P., Tóth, M., Barenholz, Y. 2007. Animal models of complement-mediated hypersensitivity reactions to liposomes and other lipid-based nanoparticles. Journal of Liposome Research. 17: 107-117.

Taheri, S. 2016. The effect of oral administration of ZnO-Nano particles on oxidative stress in common carp *(Cyprinus carpio)* treated with aflatoxin. MSc. Thesis. Aquaculture Department, Natural Resource and Environmental Faculty, Behbahan University of Technology, Iran.

van Heugten, E., Spears, J.W., Kegley, E.B., Ward, J.D., Qureshi, M.A. 2003. Effects of organic forms of zinc on growth performance, tissue zinc distribution, and immune response of weanling pigs. Journal of Animal Science. 81(8): 2063-2071.

Vauthier, C., Persson, B., Lindner, P., Cabane, B. 2011. Protein adsorption and complement activation for di-block copolymer nanoparticles. Biomaterials. 32: 1646-1656.

Vaziriyan, M. 2017. The effect of oral administration of ZnO-Nano particles on blood biochemical parameters in common carp *(Cyprinus carpio)* treated with aflatoxin. MSc. Thesis. Aquaculture

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-05-19]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.8.3.3.9]

Department, Natural Resource and Environmental Faculty, Behbahan University of Technology, Iran.

Vörös, J. 2004. The density and refractive index of adsorbing protein layers. Biophysical Journal. 87: 553-561.

Wang, K., Wang, W.X. 2015. Optimal dietary requirements of zinc in marine medaka *Oryzias melastigma*: Importance of daily net flux. Aquaculture. 448: 54-62.

Wang, C., Zhang, L., Ying, Z., He, J., Zhou, L., Zhang, L., Zhong, X., Wang, T. 2018. Effects of dietary Zinc Oxide nanoparticles on growth, diarrhea, mineral deposition, intestinal morphology, and barrier of Weaned Piglets. Biol Trace Element Research. 185(2): 364-374.

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

Yano, T. 1992. Assays of hemolytic complement activity. In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Kaattari, S.L., Rowley, A.F. (eds.). Techniques in Fish Immunology. Fai Haven: SOS Publication.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-05-19]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.8.3.3.9]