مواجهه تیلاپیای نیل (*Oreochromis niluticus*) با نانو ذرات دی‌اکسیدتیتانیوم و ریزپلاستیک: تأثیر بر فراسنجه‌های خونی

بهزاد نعمت‌دوست حقی، علیرضا میرواقفی*، حمید فرحمند

گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

*نویسنده مسئول avaghefi@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۴/۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۴/۲۳

چکیده

قرار گرفتن موجودات در معرض چندین آلاینده محیطی می‌تواند اثرات متفاوتی نسبت به زمانی‌که تنها در معرض یک آلاینده باشند بر آن‌ها داشته باشد. هدف از این مطالعه بررسی اثرات دو آلاینده نانودی‌اکسیدتیتانیوم و ریزپلاستیک به تنهایی و به‌صورت توأم بر ماهی تیلاپیای نیل بود. ۲۷۰ قطعه ماهی (با میانگین وزنی ۰/۶±۲۳/۵ گرم) به‌مدت یک ماه در قالب طرح فاکتوریل (شامل غلظت‌های ۰، ۱ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر نانوتیتانیوم و غلظت‌های ۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر ریزپلاستیک) با ۳ تکرار تحت آزمایش قرار گرفتند. نتایج نشان داد میزان پروتئین در همه گروه‌ها نسبت به کنترل کاهش معنی‌دار نشان دادند ($P<۰/۰۵$). میزان آلبومین و گلبولین نیز در همه گروه‌ها کاهش نشان دادند که در مورد گروه‌هایی که تنها در معرض ریزپلاستیک قرارداشتند معنی‌دار نبود ($P>۰/۰۵$). فعالیت کراتیتین فسفوکیناز (CPK) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و همچنین میزان تری‌گلیسرید در تمامی گروه‌ها به‌جز گروه‌های در معرض ریزپلاستیک به تنهایی، افزایش معنی‌دار را نشان دادند($P<۰/۰۵$). افزایش معنی‌دار فعالیت گاماگلوتامیل ترانسفراز (GGT) نیز در همه گروه‌ها نسبت به کنترل مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). فعالیت لاکتات دهیدروژناز (LDH) و میزان گلوکز تنها در گروه‌های در معرض آلاینده‌ها به‌صورت توأم، افزایش معنی‌دار از خود نشان دادند ($P<۰/۰۵$) و میزان کلسترول نیز در هیچیک از گروه‌ها تغییر معنی‌داری را از خود نشان نداد ($P>۰/۰۵$). به‌طور کلی نتایج نشان داد آلاینده‌های مورد بررسی حتی در غلظت‌های پایین نیز سبب ایجاد تغییرات در فراسنجه‌های مورد بررسی شدند که میزان این تغییرات درگروه‌های در معرض مواجهه توأم آلاینده‌ها بیشتر بود که می‌تواند نشان‌دهنده هم‌افزایی آن‌ها در ایجاد این تغییرات باشد.

واژگان کلیدی: آلاینده‌های محیطی، فراسنجه¬های بیوشیمیایی، تیلاپیای نیل

مقدمه

باقیمانده‌های ترکیبات پرمصرف در اثر فعالیت‌های بشری به‌طور روزمره وارد محیط‌زیست جانداران می‌شوند که این مواد می‌توانند بر کیفیت زندگی و فعالیت‌های این موجودات اثرگذار باشند. نانو دی‌اکسیدتیتانیوم و ریزپلاستیک‌ها دو نمونه از این ترکیبات پرمصرف می‌باشند. نانواکسیدتیتانیوم از موادپرمصرف در صنایع مختلف است و ورود این ماده به محیط‌های آبی می‌تواند به‌صورت مستقیم در زمان تولید محصولات و مصرف آن‌ها و یا به‌صورت غیرمستقیم و از طریق فاضلاب و همچنین فاضلاب کارخانه‌های تصفیه فاضلاب باشد (Gottschalk *et al*, 2015). مواد با ابعاد نانو با توجه به اندازه ذرات می‌توانند از طریق آندوسیتوز و انتشار واکوئلی وارد بافت‌ها شوند (Moore, 2006) بنابراین این مواد می‌توانند از طریق آبشش، پوست، خون، روده و سایر سدهای دفاعی بدن موجودات وارد بدن آن‌ها شوند (Tedesco *et al*, 2010). ریزپلاستیک‌ها نیز باتوجه به کاربردهای متفاوت این ترکیبات در صنایع مختلف (از صنایع مرتبط با کشاورزی تا صنایع آرایشی و بهداشتی و سلامت) و همچنین گسترش روزافزون استفاده از آن‌ها، به‌صورت اجتناب‌ناپذیری وارد محیط‌های مختلف می‌شوند. ورود این مواد به طبیعت یا به‌صورت تصادفی و از طریق ورود موادی همچون میکروبیدهای موجود در مواد آرایشی به طبیعت رخ می‌دهد و یا دراثر خردشدگی و هوازدگی

موادپلاستیکی بزرگتر در طبیعت و تبدیل شدن آن‌ها به ریز پلاستیک. ریزپلاستیک‌های موجود در طبیعت می‌توانند به‌طور مستقیم در معرض موجودات قرار گیرند یا به‌طور غیرمستقیم از طریق خوردن طعمه در دسترس آن‌ها باشند. ریزپلاستیک-ها با ابعاد میکرونی می‌توانند از لوله گوارش عبور کرده و وارد اندام‌هایی همچون کبد و آبشش گردند و می‌توانند سبب بروز واکنش‌های التهابی و استرس اکسیداتیو شود. با توجه به اینکه تاثیر متقابل ریزپلاستیک‌ها وسایر آلاینده‌ها می‌توانند سبب پاسخ‌های متفاوتی در موجودات آبزی گردد (Rainieri *et al*, 2018)، بررسی تاثیر متقابل نانودی‌اکسیدتیتانیوم و ریزپلاستیک بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی ماهی تیلاپیای نیل به‌عنوان هدف این مطالعه تعیین گردید. باتوجه به اینکه این دو ترکیب از مواد پرکاربرد در صنایع مختلف می‌باشند که معمولاً به‌عنوان مواد بی‌اثر یا کم‌اثر بر موجودات شناخته می‌شوند، نشان دادن تاثیرات این دو ماده بر ماهیان می‌تواند به توجه بیشتر جهت کاهش میزان ورود این مواد به طبیعت منجر گردد.

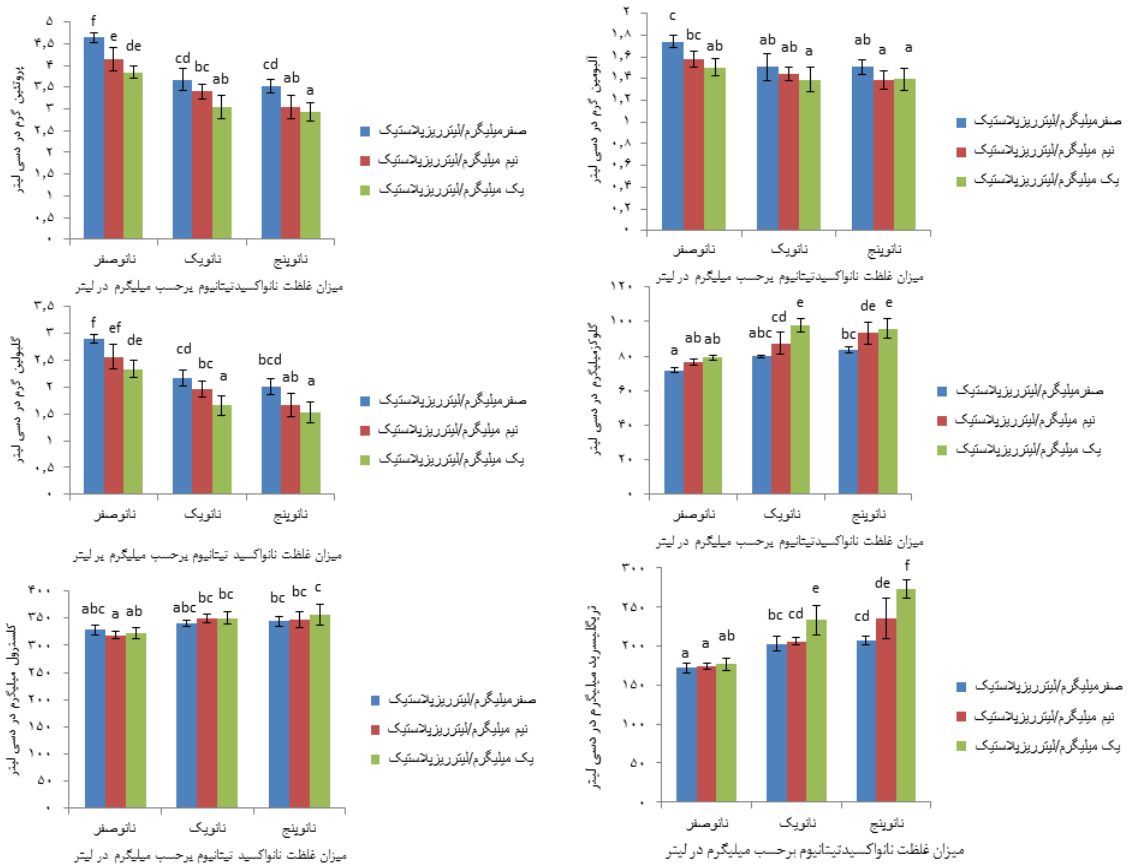
مواد و روش‌ها

طراحی آزمایش: ماهیان از یک مزرعه تکثیر ماهی تیلاپیا در قم خریداری و تا رسیدن به وزن حدود ۲۴ گرم در آزمایشگاه تکثیر دانشگاه صنعتی خاتم‌الانبیاء بهبهان نگهداری شدند. پیش از شروع آزمایش نیز دو هفته سازگاری در مورد این ماهیان صورت گرفت. تعیین غلظت‌های دو ماده آلاینده (۰، ۱ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر نانودی‌اکسیدتیتانیوم و غلظت‌های ۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر ریزپلاستیک) براساس مرور منابع انجام شده صورت گرفت (Perera and Pathirante, 2012; Canli *et al*., 2018; Zhang *et al*., 2019; Hamed *et al*., 2020; Ahmadifar *et al*., 2021). سپس ماهیان در قالب یک طرح فاکتوریل (۳x۳) در ۹ گروه به‌صورت تصادفی که هر گروه شامل ۳ تکرار ۱۰ تایی از ماهیان تیلاپیای نیل با وزن متوسط ۰/۶± ۲۳/۵ گرم بود تقسیم‌بندی شدند. ماهیان به‌مدت ۳۰ روز در معرض این تیمارها قرار گرفتند. تعویض آب روزانه ۱۰۰ درصد در مورد این تیمارها انجام شد (هر ۱۲ ساعت ۵۰ درصد). فاکتورهای شیمیایی آب شامل: دمای ۱±۲۵ سانتی‌گراد، اکسیژن ۱±۶ میلی‌گرم در لیتر، pH ۰/۲±۷/۶ و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی ۱۲ ساعت تاریکی، در طول آزمایش به‌صورت ثابت نگهداری شدند. غذادهی بمیزان دو درصد وزن بدن و دوبار در طول روز در مدت آزمایش انجام گردید.

نمونه‌برداری: در انتهای روز ۳۰ از هر تکرار مربوط به تیمارها ۶ ماهی به‌طور تصادفی صید و پس از بیهوش‌سازی با عصاره گل‌میخک به‌میزان (۱/۵۰۰۰) خون‌گیری از ساقه دمی توسط سرنگ هپارینه صورت گرفت. پلاسمای خون نمونه‌های خون پس از سانتریفیوژ جداسازی و در دمای ۲۸- تا زمان اندازه-گیری پارامترها نگهداری شدند.

سنجش فاکتورهای بیوشیمیایی: فاکتورهای بیوشیمیایی مورد بررسی شامل گلوکز مطابق روش گلوکز اکسیداز (Sacks, 1999)، پروتئین کل پلاسما مطابق واکنش بایورت و آلبومین نیز طبق واکنش بروموکروزول سبز سنجیده شد (*et al*., Johnson 1999). اندازه‌گیری میزان تری‌گلیسرید طبق روش GPO-PAP و کلسترول طبق روش CHO-PAP صورت گرفت (Rifai *et al*.,1999). کراتینین پلاسما نیز طبق روش JAFFE اندازه-گیری شد (Foster-Swanson *et al*., 1994). سنجش فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH)، آنزیم آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) و آنزیم آسپارتات آمینو ترانسفراز (AST) با استفاده از کیت بیوشیمیایی صورت گرفت (Moss *et al*., 1999). میزان فعالیت آنزیم گاماگلوتامیل‌ترانسفراز (GGT) نیز با استفاده از کیت بیوشیمیایی سنجیده شد (Moss *et al*., 1999).

آنالیز آماری: داده‌های حاصل از این مطالعه بر-



شکل ۱- مقدار فراسنجه‌های پلاسما(پروتئین، آلبومین، گلبولین، گلوکز، کلسترول و تریگلیسرید) در ماهیان تیلاپیای نیل تحت تیمار ریزپلاستیک و نانودی‌اکسید تیتانیوم (میانگین± انحراف استاندارد) (حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد($P<۰/۰۵$)).

اساس یک طرح فاکتوریل مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس دو طرفه و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی انجام گرفت. آزمون نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو-ویلک انجام گردید. سطح اطمینان مورد استفاده در این مطالعه ۹۵ درصد بود و در نهایت نتایج به‌صورت میانگین± انحراف استاندارد ارائه گردید. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام گردید.

نتایج

نتایج مربوط به فراسنجه‌های خون در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است. بررسی میزان پروتئین پلاسما (جدول ۱) نشان داد تأثیر متقابل میان ریزپلاستیک و نانوتیتانیوم بر میزان آن معنی‌دار نبود ($P>۰/۰۵$)، اما تأثیر معنی‌دار هر یک از دو عامل به‌تنهایی بر میزان پروتئین پلاسما وجود داشت ($P<۰/۰۵$). در بررسی میزان آلبومین پلاسما (جدول ۱) تأثیر متقابل معنی‌داری میان ریزپلاستیک و نانواکسیدتیتانیوم بر تغییرات آن مشخص نگشت ($P>۰/۰۵$)، اما هر یک از دو عامل به تنهایی بر میزان آلبومین تأثیر معنی‌داری داشتند ($P<۰/۰۵$). نتایج حاصل از گلبولین تأثیر متقابل معنی‌داری میان ریزپلاستیک و نانواکسیدتیتانیوم بر میزان تغییرات آن را نشان نداد ($P>۰/۰۵$). تاثیر هر یک از دو عامل نیز به‌تنهایی بر میزان گلبولین معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$).

بررسی میزان گلوکز پلاسما (جدول ۱) نشان داد اثر متقابل میان ریزپلاستیک و نانواکسیدتیتانیوم بر میزان آن معنی‌دار نبود ($P>۰/۰۵$)، از دو عامل نیز تنها تأثیر نانواکسیدتیتانیوم بر میزان گلوکز معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$). بررسی تغییرات میزان

جدول ۱- نتایج مقایسه تاثیر هر یک از عوامل اثرگذار بر فراسنجه های خونی ماهیان در تیلاپیای نیل تحت تیمار ریزپلاستیک و نانودی-اکسید تیتانیوم.

فراسنجه مورد بررسی	عامل اثرگذار	معنی‌داری تاثیر	فراسنجه مورد بررسی	عامل اثرگذار	معنی‌داری تاثیر
AST	نانودی اکسید تیتانیوم	۰/۰۰۰	پروتئین	نانودی اکسید تیتانیوم	۰/۰۰۰
	ریزپلاستیک	۰/۰۲		ریزپلاستیک	۰/۰۰۰
	اثرمتقابل	۰/۰۰۰		اثرمتقابل	۰/۵۴۵
ALT	نانودی اکسید تیتانیوم	۰/۰۰۰	آلبومین	نانودی اکسید تیتانیوم	۰/۰۰۰
	ریزپلاستیک	۰/۰۰۰		ریزپلاستیک	۰/۰۰۰
	اثرمتقابل	۰/۰۰۰		اثرمتقابل	۰/۴۰۵
CPK	نانودی اکسید تیتانیوم	۰/۰۰۰	گلبولین	نانودی اکسید تیتانیوم	۰/۰۰۰
	ریزپلاستیک	۰/۰۰۰		ریزپلاستیک	۰/۰۰۰
	اثرمتقابل	۰/۰۰۰۱		اثرمتقابل	۰/۷۹۹
LDH	نانودی اکسید تیتانیوم	۰/۰۰۰	کلسترول	نانودی اکسید تیتانیوم	۰/۰۰۰
	ریزپلاستیک	۰/۰۰۰		ریزپلاستیک	۰/۳۶۹
	اثرمتقابل	۰/۰۰۰		اثرمتقابل	۰/۲۵۶
GGT	نانودی اکسید تیتانیوم	۰/۰۰۰	تریگلیسرید	نانودی اکسید تیتانیوم	۰/۰۰۰
	ریزپلاستیک	۰/۰۰۰		ریزپلاستیک	۰/۰۰۰
	اثرمتقابل	۰/۰۰۰		اثرمتقابل	۰/۰۰۰
			گلوکز	نانودی اکسید تیتانیوم	۰/۰۰۰
				ریزپلاستیک	۰/۳۶۹
				اثرمتقابل	۰/۲۵۶

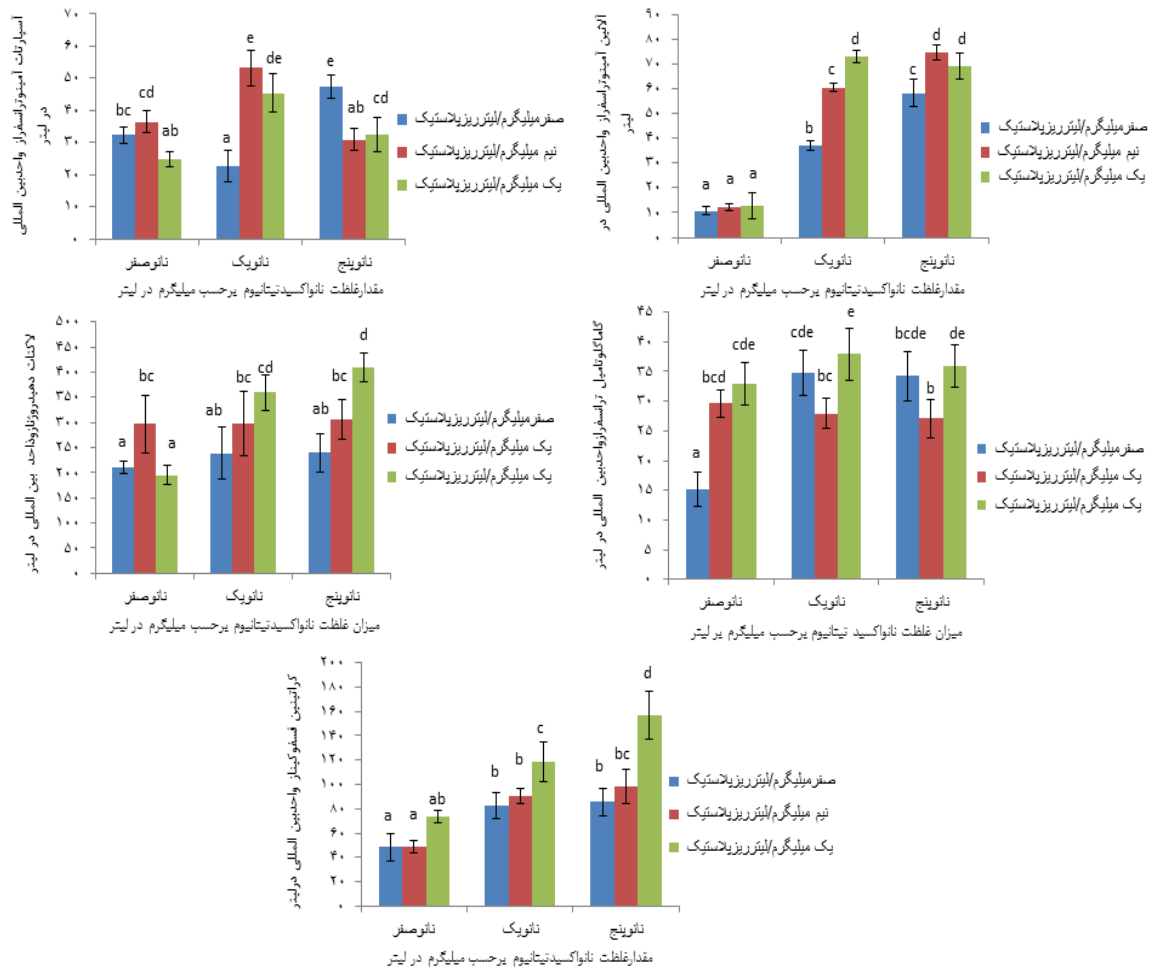
کلسترول پلاسما (جدول ۱) نشان داد اثر متقابل میان ریزپلاستیک و نانواکسیدتیتانیوم بر تغییرات آن معنی‌دار نبود($P>۰/۰۵$)، همچنین از میان دو عامل تنها تأثیر نانواکسیدتیتانیوم بر تغییر کلسترول معنی‌دار بود ($P<0.05$). در مورد تری‌گلیسرید (جدول ۱) نتایج نشان داد اثر متقابل میان ریزپلاستیک و نانواکسیدتیتانیوم بر تغییرات آن معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$)، همچنین هر دو عامل نیز دارای تأثیر معنی‌دار بر تغییرات تری‌گلیسرید بودند ($P<۰/۰۵$).

بررسی تغییرات فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز در پلاسما (جدول ۱) نشان داد اثر متقابل میان ریزپلاستیک و نانواکسیدتیتانیوم بر فعالیت AST معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$)، همچنین اثرات هر یک از دو عامل نانواکسیدتیتانیوم و ریزپلاستیک به‌تنهایی نیز بر فعالیت این آنزیم معنی‌دار بودند ($P<۰/۰۵$). در این مطالعه افزایش فعالیت آنزیم ALT نیز در تمامی تیمارهای آزمایشی مشاهده گردید (جدول ۱) همچنین اثر متقابل میان ریزپلاستیک و نانواکسیدتیتانیوم بر فعالیت ALT معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$)، اثرات هر یک از دو عامل نیز به‌تنهایی بر فعالیت این آنزیم معنی‌دار بودند ($P<۰/۰۵$).

بررسی تغییرات میزان فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در پلاسما(جدول ۱) مشخص نمود اثر متقابل میان ریزپلاستیک و نانواکسیدتیتانیوم بر فعالیت آن معنی‌دار بوده است ($P<۰/۰۵$)، اثرات انفرادی هر یک از دو عامل نیز بر فعالیت این آنزیم معنی‌دار بودند ($P<۰/۰۵$). نتایج بررسی فعالیت CPK نیزحاکی از نتایج مشابهی در مورد تأثیرات عوامل بر تغییرات فعالیت آن بود.

بحث

استفاده از فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون جهت



شکل ۲- میزان فعالیت آنزیم‌های AST، ALT، LDH، GGT و CPK پلاسما در ماهی تیلاپیای نیل تحت تیمارهای مختلف ریزپلاستیک و نانودی‌اکسیدتیتانیوم (حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P<0.05$)).

بررسی شرایط متفاوت زندگی ماهیان در مطالعات زیادی مورد توجه قرار گرفته است (Abbasi *et al.*, 2021). این شاخص‌ها در مطالعات گوناگون از بررسی نرخ تغذیه (Wang *et al.*, 2020) تا شرایط و وضعیت استرس (He *et al.*, 2015) و همچنین تأثیر شرایط محیطی و آلاینده‌های محیط (Banaee *et al.*, 2019) بر زندگی ماهیان مورد استفاده قرار گرفته‌اند. مطالعه حاضر نشان داد وجود ترکیبات و آلاینده‌هایی همچون نانودی‌اکسیدتیتانیوم و ریزپلاستیک در محیط می‌تواند سبب افزایش میزان گلوکز در پلاسمای خون ماهیانی شوند که در معرض این آلاینده‌ها قرا گرفته‌اند، که بیشترین میزان افزایش در تیمارهای توأم نانودی‌اکسید تیتانیوم و ریزپلاستیک ثبت گردید. با توجه به اینکه افزایش گلوکز خون یکی از اولین پاسخ‌ها در بدن به حضور در شرایط استرس‌زاست که وجود آلاینده‌ها در محیط از جمله آن‌ها می‌باشد، بنابراین افزایش سطح گلوکز می‌تواند منعکس‌کننده نیاز بیشتر بدن به منابع انرژی جهت حفظ هموستازی بدن باشد (Malini *et al.*, 2018). شرایط استرس‌زا همچنین می‌تواند سبب اختلال در متابولیسم طبیعی گلیکوژن در کبد گشته و با ایجاد اختلال در روند گلیکوژنز و افزایش تجزیه گلیکوژن سبب افزایش میزان گلوکز خون گردد (Banaee *et al.*, 2019). آسیب‌های کبدی ایجاد شده در اثر آلاینده‌ها نیز می‌تواند این شرایط را تشدید نماید. بنابراین بالاتر بودن میزان گلوکز در مواجهه با نانودی‌اکسیدتیتانیوم و ریزپلاستیک می‌تواند به‌دلیل ایجاد شرایط استرس‌زا

و یا نشانه‌ای از آسیب کبدی تلقی شود.

کاهش میزان پروتئین به‌دنبال مواجهه با آلاینده‌ها از جمله نتایج حاصل از این مطالعه بود. با توجه به اینکه ساخته‌شدن پروتئین‌های خون همچون آلبومین‌ها و گلبولین‌ها در کبد رخ می‌دهد بنابراین اختلال در متابولیسم پروتئین، می‌تواند به‌دلیل در بروز مشکل در فعالیت کبد رخ دهد (Kirichenko *et al*., 2021) که این امر یکی از دلایل کاهش میزان پروتئین‌ها در پلاسما می‌باشد. یکی دیگر از دلایل کاهش پروتئین می‌تواند استفاده از این ماده جهت تامین نیازهای متابولیک در زمان بروز استرس باشد (Ramesh *et al*., 2014). به کاهش میزان پروتئین پلاسما بدنبال مواجهه با عوامل استرس‌زا در مطالعه محققین دیگر نیز اشاره شده است (Banaee *et al*., 2019; Khan *et al*., 2016).

آلبومین‌ها ازجمله پروتئین‌هایی هستند که در نقل و انتقال مواد در خون نقش دارند. کاهش میزان این ترکیبات نیز هم‌راستا با پروتئین کل می‌تواند نشان‌دهنده اختلال در روند ساخته شدن پروتئین‌ها در کبد بدنبال مسمومیت سلول‌های کبدی و آسیب های کبدی باشد (Khan *et al*., 2016, Mehjbeen *et al*., 2017). گلبولین‌ها از جمله دیگر ترکیبات پروتئینی هستند که از میان آن‌ها گروه‌های آلفا و بتا در نقل و انتقال مواد در خون نقش دارند. کاهش سطح گلبولین خون نیز یکی دیگر از نشانه‌های مختل شدن فعالیت‌های طبیعی کبد در این مطالعه می‌باشد که در مطالعه محققین دیگر نیز به آن اشاره شده است (Banaee *et al*., 2019).

چربی‌ها به‌دلیل نقشی که در فعالیت‌های متابولیک موجودات به‌عنوان منبع انرژی و همچنین به‌عنوان سازنده اجزای سلولی دارند، از اهمیت زیادی برخوردارند. کلسترول و تری‌گلیسریدها از جمله چربی‌هایی هستند که در پلاسمای خون حضور دارند و افزایش آن‌ها می‌تواند ناشی از شرایط متفاوت ازجمله افزایش تولید یا کاهش کاتابولیسم آن‌ها باشد. همچنین افزایش چربی‌ها در بافت‌های ماهیان می‌تواند بدلیل ذخیره انرژی بیشتر برای مقابله با اثرات استرس باشد (Sayed *et al*., 2011). بالارفتن میزان کلسترول خون همچنین می‌تواند به‌دلیل تحرک چربی‌ها از طریق اکسیداسیون و یا یک فرآیند تدریجی احیاء مولکول‌های چربی از مناطق تولید این ترکیبات برای مصارف بعدی باشد (Javed and Usmani, 2014). نتایج این مطالعه نیز میزان کلسترول خون با افزایش مقدار ترکیبات آلاینده روند افزایشی را نشان داد. چنین افزایشی در مطالعه Banaee و همکاران (۲۰۱۹) نیز قابل مشاهده است. افزایش تری‌گلیسیرید خون نیز از نشانه‌های مسمومیت سلولی به‌شمار می‌رود. در این مطالعه نیز میزان تری‌گلیسرید خون در تیمارهای در معرض آلاینده‌ها افزایش را نسبت به گروه کنترل از خود نشان دادند. چنین افزایش در مطالعه محققین دیگر نیز مشاهده می‌شود (Banaee *et al*., 2019).

از جمله دیگر فراسنجه‌های مورد بررسی در این مطالعه آنزیم‌های موجود در پلاسما می‌باشند. آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) یکی از آنزیم های مهم می باشد که نقش مهمی در ساخت و دآمیناسیون اسیدهای آمینه در زمان مواجهه با استرس برای دستیابی به میزان بالای انرژی مورد نیاز دارد (Washington and Hoosier, 2012). به‌طور کلی افزایش میزان آنزیم آلانین آمینوترانسفراز می‌تواند به‌دلیل اختلال در فرآیندهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی همچون چرخه کربس، سیکل TCA و همچنین تراوش این آنزیم از سیتوسول‌های کبدی به درون جریان خون رخ دهد (Samanta *et a*l., 2014). افزایش میزان این آنزیم در تمامی تیمارهای آزمایشی مشاهده گردید که به‌جز تیمارهای ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر ریزپلاستیک دارای تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل بودند. آسپارتات آمینوتراسفراز (AST) یکی دیگر از

آنزیم‌های مورد مطالعه بود که این آنزیم نیز از آنزیم های موثر در متابولیسم سلول بوده و تبدیل آسپارتات و آلفا کتوگلوتارات را به اگزالواستات و گلوتامات کاتالیز می‌کند. این آنزیم پراکنش زیادی در بین بافت‌های گوناگون همچون قلب، کبد، کلیه و بافت‌های ماهیچه‌ای دارد. همچنین در تحریک فرآیند گلیکونئونز همراه با ALT نقش دارد (Washington and Hoosier, 2012) که می‌تواند در مقابله با شرایط استرس موثر باشد. بنابراین تغییر و افزایش میزان این آنزیم می تواند نشانه‌ای از واکنش بدن به شرایط استرس‌زای ایجاد شده در اثر ورود مواد آلاینده و مقابله با استرس اکسیداتیو ناشی از مواجهه با نانودی‌اکسیدتیتانیوم باشد. افزایش میزان این آنزیم در مطالعات محققان دیگر نیز گزارش شده است (Rezende *et al.*, 2016).

آنزیم لاکتات‌دهیدروژناز (LDH) از آنزیم‌های درون‌سلولی که در دسته آنزیم‌های اکسیدوردوکتاز قرار دارد. این آنزیم در بخش‌های مختلف بدن موجودات از جمله گلبول‌های قرمز خون، کبد، کلیه، ماهیچه‌های اسکلتی و غیره وجود دارد و واکنش برگشت‌پذیر تبدیل اسید پیرووبک به اسید لاکتیک را کاتالیز می‌کند. افزایش این آنزیم در خون می‌تواند نشانه‌ای از بیماریهای کبدی و عفونت‌ها باشد (Farhana and Lappin, 2022). نتایج مطالعه اخیر افزایش سطح لاکتات‌دهیدروژناز را نشان داد که این افزایش می‌تواند نشانه‌ای از تخریب غشاء سلولی و ناشی از مسمومیت سلولی ایجاد شده بوسیله عوارض آلاینده‌های مورد بررسی باشد. نتایج این مطالعه در راستای مطالعه محققان دیگری که افزایش LDH را در زمان مواجهه با آلاینده‌ها یا بروز استرس در ماهیان گزارش کرده‌اند می‌باشد (Choudhurya *et al.*, 2017).

گاماگلوتامیل ترانسفراز آنزیمی است که نقش آن در متابولیسم گلوتاتیون مشخص شده است. این آنزیم که اساسا در کبد ساخته می‌شود یک نشانگر خوب مرگ سلول‌های کبدی واسترس اکسیداتیو می باشد (Li *et al.*, 2018). عوامل افزایش‌دهنده میزان این آنزیم همچون اختلالات کبدی می‌توانند سبب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد شده و تهدید کاهش میزان گلوتاتیون را به‌دنبال دارند. بنابراین افزایش مشاهده شده در این مطالعه نیز می‌تواند دلالت بر آسیب دیدن سلول‌های کبدی در اثر مواجهه با اثرات اکسیداتیو ناشی از مواجهه با آلاینده‌های مورد بررسی در این مطالعه باشد. Mehrpak و همکاران (۲۰۱۵)، افزایش فعالیت این آنزیم در مواجهه با کادمیوم را ناشی از مکانیسم متابولیک جهت فراهم نمودن انرژی سلول‌ها جهت مقابله با سمیت کادمیوم ذکر نمودند.

کراتینین‌فسفوکیناز یا کراتینین‌کیناز آنزیمی است که واکنش کراتینین و آدنوزین‌تری‌فسفات را کاتالیز می‌کند. فسفوکراتینین تولید شده در این واکنش برای ذخیره در بافت‌ها و سلول‌هایی که نیاز به مقادیر قابل توجهی از ATP دارند همچون مغز و قلب استفاده می‌شود. عوامل متعددی سبب بهم خوردن مقادیر معمول این آنزیم می‌شوند از جمله بیماری‌ها و آسیب‌های کلیوی و بیماری‌های قلبی (Aujla and Patel, 2020) بالا بودن میزان این آنزیم در بدن ماهیان قرار گرفته در معرض ریزپلاستیک و نانوتیتانیوم می‌تواند نشانه‌ای از آسیب‌های کلیوی در این موجودات تلقی گردد که چنین نتیجه‌ای در مطالعه اخیر نیز حاصل گردید.

از جمله مکانیسم‌های اصلی اثرگذاری نانودی‌اکسیدتیتانیوم در موجودات زنده تأثیر این ماده در ایجاد استرس اکسیداتیو است که این امر می‌تواند منجر به تخریب چربی‌ها، پروتئین‌ها و آسیب به DNA شوند (Hou *et al.*, 2019). تخریب چربی‌ها و آسیب به غشاء سلولی نیز می‌تواند سبب اختلال در عملکرد صحیح سلول‌ها شود. همچنین مشخص شده که نانودی اکسید تیتانیوم می‌تواند سبب اثرات پاتولوژیک در سلول‌های کبدی کپور معمولی شوند (Linhua *et al.*, 2009). ریزپلاستیک‌ها نیز می‌توانند سبب ایجاد ناترازی در

تولید اکسیژن فعال و ظرفیت آنتی اکسیدانی شوند که می‌تواند سبب ایجاد استرس اکسیداتیو در موجود گردد (Kim *et al*., 2021).

نتایج این مطالعه که با هدف بررسی تغییرات فراسنجه‌های خونی طی مواجهه با ترکیبات آلاینده همچون نانودی‌اکسید تیتانیوم و ریزپلاستیک صورت گرفت نشان داد، قرار گرفتن در معرض نانودی‌اکسیدتیتانیوم و همچنین ریزپلاستیک سبب ایجاد اثرات مخرب در ماهیان مورد مطالعه شد که این تأثیرات در پارامترهای سنجیده شده خون قابل مشاهده بود. همچنین مواجهه توأم ریزپلاستیک و نانودی‌اکسیدتیتانیوم تغییرات شدیدتری را در فراسنجه‌های خونی ایجاد کرد که این مسأله نشان دهنده بروز اثرات تجمعی در زمان مواجهه توأم با این آلاینده‌ها در مقایسه با مواجهه با هر یک از آن‌ها به تنهایی بود. به‌طور کلی نتایج این مطالعه مشخص نمود وجود چندین آلاینده در کنار یکدیگر حتی آلاینده‌هایی همچون نانواکسیدتیتانیوم که به‌عنوان یک ماده کم تاثیر زیستی شناخته می‌شد و ریزپلاستیک حتی به‌صورت بکر نیز می‌تواند باعث ایجاد اثرات قابل توجه در موجوداتی همچون ماهیان گردد و باید تلاش مضاعفی برای کاهش ورود این مواد به محیط‌های طبیعی صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان برخود لازم می‌دانند از گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران بدلیل حمایت های مادی و معنوی در طول انجام این پایان نامه تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

Abbasi M., Falahatkar B., Bani A., Heidari B. 2021. Comparative study of plasma biochemical parameters in mature male and female goldfish, Carassius auratus. *International Journal of Aquatic Biology* 9(4), 226-233.

Ahmadifar E., Kalhor N., Dawood M.A., Ahmadifar M., Moghadam M.S., Abarghouei S.2021. Effects of polystyrene microparticles on inflammation, antioxidant enzyme activities, and related gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Science and Pollution Research* 28(12), 14909-16.

Aujla R.S., Patel R. 2020. Creatine phosphokinase. StatPearls Publishing.

Banaee M., Tahery S., Nematdoost Haghi B., Shahafve S., Vaziriyan M. 2019. Blood biochemical changes in common carp (*Cyprinus carpio*) upon co-exposure to titanium dioxide nanoparticles and paraquat. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 18(2), 242-255.

Canli E.G., Dogan A., Canli M. 2018. Serum biomarker levels alter following nanoparticle (Al2O3, CuO, TiO2) exposures in freshwater fish (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 62, 181-7.

Choudhurya N., Tarafdar J., Panigrahi AK. 2017. Assessment of antioxidant biomarkers and protein levels in tissues of *Oreochromis mossambicus* and *Channa punctatus* exposed to toxicity by fungicides. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 17(3), 487-498.

Farhana A., Lappin S.L. 2022. Biochemistry, lactate dehydrogenase. In: StatPearls. StatPearls Publishing.

Foster-Swanson A., Swartzentruber M., Roberts P., Feld R., Johnson M., Wong S. 1994. Reference interval studies on the rate-blanked creatinine/Jaffé method on BM/Hitachi systems in six US laboratories. *Clinical Chemistry* 40(6), 1057.

Gottschalk F., Lassen C., Kjoelholt J., Christensen F., Nowack B.2015. Modeling flows and concentrations of nine engineered nanomaterials in the Danish environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 12(5), 581-602.

Hamed M., Soliman H.A., Osman A.G., Sayed A. 2020. Antioxidants and molecular damage in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) after exposure to microplastics. *Environmental Science and Pollution Research* 27(13), 14581-8.

He J., Qiang J., Gabriel N.N., Xu P., Yang R.

histopathological changes in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Environmental Sciences* 21(10), 1459-66.

Malini D., Apriliandri A., Arista S. 2018. Increased blood glucose level on pelagic fish as response to environmental disturbances at east coast Pangandaran, West Java. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, IOP Publishing. 2018.

Mehjbeen J., Ahmad I., Usmani N., Ahmad M. 2017. Multiple Biomarker Responses (Serum Biochemistry, Oxidative Stress, Genotoxicity and Histopathology) in Channa Punctatus Exposed to Heavy Metal Loaded Wastewater. *Scientific Reports* 26, 15354-15372.

Mehrpak M., Banaee M., Nematdoost haghi B., Noori A. 2015. Protective effects of vitamin C and chitosan against cadmium-induced oxidative stress in the liver of common carp (*Cyprinus carpio*). *Iranian Journal of Toxicology* 9(30) 1360-1367.

Moore M. 2006. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environment international* 32(8), 967-76.

Moss D., Henderson A., Tietz T. 1999. Textbook of Clinical Enzymology, Clinical Enzymology. WB Saunders Co, Philadelphia, PA, USA. pp: 617-721.

Perera S., Pathiratne A. 2012. Haemato-immunological and histological responses in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* exposed to titanium dioxide nanoparticles. *Srilanka Journal of Aquatic Science* 17, 1-18.

Rainieri S., Conlledo N., Larsen BK., Granby K., Barranco A. 2018. Combined effects of microplastics and chemical contaminants on the organ toxicity of zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Research* 162, 135-143.

Ramesh M., Sankaran M., Veera-Gowtham V., Poopal R.K. 2014. Hematological, biochemical and enzymological responses in an Indian major carp *Labeo rohita* induced by sublethal concentration of waterborne selenite exposure. *Chemico-Biological Interactions* 207, 67-73.

Rezende K., Neto G., Pinto J., Salvo L., Severino D. 2016. Hepatic parameters of marine fish *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766) exposed to sublethal concentrations of water-soluble fraction 2015. Effect of feeding-intensity stress on biochemical and hematological indices of gift tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 15(2), 303-310.

Hou J., Wang L., Wang C., Zhang S., Liu H., Li S. 2019. Toxicity and mechanisms of action of titanium dioxide nanoparticles in living organisms. *Journal of Environmental Scien*ces 75, 40-53.

Javed M., Usmani N.2014. Stress response of biomolecules (carbohydrate, protein and lipid profiles) in fish Channa punctatus inhabiting river polluted by Thermal Power Plant effluent. *Saudi Journal of Biological Science* 22(2), 237–242.

Johnson, A.M., Rohlfs, E.M. and Silverman, L.M. 1999. Proteins, in Burtis C.A., Ashwood E.R. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd ed., Philadelphia 1917 p.

Khan A., Shah N., Muhammad M., Khan M.S., Ahmad M.S., Farooq M. 2016. Quantitative determination of lethal concentration Lc 50 of atrazine on biochemical parameters; total protein and serum albumin of freshwater fish grass carp *(Ctenopharyngodon idella*). *Polish Journal of Environmental Studies* 25(4), 1555-1561.

Kim J-H., Yu Y-B., Choi J-H. 2021. Toxic effects on bioaccumulation, hematological parameters, oxidative stress, immune responses and neurotoxicity in fish exposed to microplastics: A review. *Journal of Hazardous Materials* 413, 125423.

Kirichenko O., Bugaev L., Voykina A., Lisovskaya V., Kozhurin E. 2021. Assessment of physiological and biochemical indicators of the state of the so-iuy mullet Liza haematocheilus (Temminck & Shlegel, 1845) in the Azov-Black Sea Basin. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science IOP Publishing.2021.

Li D.D., Xu T., Cheng X.Q., Wu W., Ye Y.C., Guo X.Z. 2018. Serum gamma-glutamyltransferase levels are associated with cardiovascular risk factors in China: a nationwide population-based study. *Scientific Reports* 8(1), 1-9.

Linhua H., Zhenyu W., Baoshan X.2009. Effect of sub-acute exposure to TiO2 nanoparticles on oxidative stress and

of petroleum. *Journal of Marine Biology and Oceanography* 5(2), 1-6.

Rifai N., Bachorik P.S., Albers J.J. 1999. 'Lipids, lipoproteins and apolipoproteins', in Burtis, C.A. 781 and Ashwood, E.R. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd Ed, Philadelphia: W.B. Saunders Company. pp. 809-861.

Sacks D.B. 1999. Carbohydrates', in Burtis, C.A. and Ashwood, E.R. Tietz Textbook of Clinical 789 Chemistry. 3rd Ed, Philadelphia: W.B. Saunders Company. pp. 750–808.

Samanta P., Pal S., Mukherjee A.K., Ghosh A.R. 2014. Evaluation of metabolic enzymes in response to Excel Mera 71, a glyphosate-based herbicide, and recovery pattern in freshwater teleostean fishes. *BioMed Research International* 1-6.

Sayed A.H., Mekkawy I.A., Mahmoud U.M. 2011. Effects of 4-nonylphenol on metabolic enzymes, some ions and biochemical blood parameters of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *African Journal of Biochemistry Research* 5(9), 287-297.

Tedesco S., Doyle H., Blasco J., Redmond G., Sheehan D.2010. Exposure of the blue mussel, *Mytilus edulis*, to gold nanoparticles and the pro-oxidant menadione. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 151(2), 167-74.

Wang Y., Xu P., Nie Z., Li Q., Shao N., Gao J. 2020. Effects of Feeding Rates on Growth, Digestive Enzyme Activity, Serum Biochemical Parameters, and Body Composition of Juvenile, Genetically Improved, Farmed Nile Tilapia Reared in an In Pond Raceway Recirculating Culture System. *North American Journal of Aquaculture* 82(1), 75-83.

Washington I.M., Van Hoosier G. 2012. Clinical biochemistry and hematology. The laboratory rabbit, guinea pig, hamster, and other rodents: *Elsevier*. 57-116.

Zhang S., Ding J., Razanajatovo R.M., Jiang H., Zou H., Zhu W. 2019. Interactive effects of polystyrene microplastics and roxithromycin on bioaccumulation and biochemical status in the freshwater fish red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Science of the Total Environment* 648, 1431-9.

Exposure of Nile tilapia (*Oreochromis niluticus*) to titanium oxide nanoparticles and microplastics: Impact on blood parameters

Behzad Nematdoost Haghi, Ali Reza Mirvaghefi*, Hamid Farahmand

Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Tehran University, Karaj, Iran.
*Corresponding author: avaghefi@ut.ac.ir
Received: 2022/6/22 Accepted: 2022/7/14

Abstract
Organisms Exposure to multiple contaminants in the environment can have different effects on them than when exposed to only one pollutant. Investigation of the impacts of nano titaniumdioxide and microplastic, on Nile tilapia was the aim of this study. 270 fish (average weight of 23.5±0.6 g) in factorial design (including concentrations of 0, 1 and 5 mg/l nanotitanium and concentrations of 0.5 0 and 1mg/l microplastic) were treated for 30 days in triplicate. The results indicated that the amount of protein in all groups showed a significant decrease compare with control (P<0.05). The amount of albumin and globulin in all groups showed a decrease that was not significant in the microplastic groups alone (P>0.05). Creatinine phosphokinase (CPK) and alanine aminotransferase (ALT) activities as well as triglyceride levels showed a significant increase in all groups except the microplastic group alone (P<0.05). Gammaglutamyl transferase (GGT) activity in all groups showed a significant increase compared to controls (P<0.05). Lactate dehydrogenase (LDH) activity and glucose levels showed a significant increase only in the groups exposed to pollutants (P<0.05) and cholesterol levels did not show a significant change in any of the groups (P>0.05). In general, the results of the recent study showed that the combined groups had more effects on fish. Also, in comparison with the effects of the two pollutants, titanium dioxide had more effects than microplastics and caused more changes in blood parameters.

Keywords: Environmental contaminant, Biochemical parameters, Nile tilapia.