



ORIGINAL RESEARCH PAPER

Interactive Toxicity of Polystyrene Nanoplastics and Zinc Oxide Nanoparticles: Biochemical and Immunological Responses in Zebrafish (*Danio rerio*; Hamilton, 1822)

Maryam Akhoundian^{1*}, Jamal Rahimi², Ghasem Rashidian³

¹ Assistant Professor of Marine Biology, Department, Department of Marine Biology, Faculty of Marine and Environmental Science, University of Mazandaran, Babolsar, Iran.

² Ph.D, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

³ Postdoctoral Researcher, University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Fisheries and Protection of Waters, South Bohemian Research Center of Aquaculture and Biodiversity of Hydrocenoses, Institute of Aquaculture and Protection of Waters, Na Sádkách 1780, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 2025/05/28

Revised: 2025/10/4

Accepted: 2025/10/4

Keywords:

Plastic

Nanoparticle

Zebrafish

Oxidative Stress

Biochemical Indicators

*Corresponding author:

✉ m.akhoundian@umz.ac.ir

Doi: [10.52547/joc.16.62.6](https://doi.org/10.52547/joc.16.62.6)

ORID: [0000-0002-9109-1141](https://orcid.org/0000-0002-9109-1141)

ABSTRACT

Background and Objectives: In recent years, growing concerns have emerged regarding the environmental impacts of nanoparticles, particularly nano plastics (PSNPs), due to their ultra-small size, high tissue penetrability, and strong potential for interacting with other contaminants, pose significant risks of inducing physiological and immunological disturbances. Likewise, zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs), as one of the most widely used industrial nanomaterials, have demonstrated notable toxic effects in aquatic species in previous studies. However, most existing investigations have focused solely on the individual toxicity of these pollutants, leaving a critical knowledge gap concerning their combined effects—especially under chronic exposure scenarios. The present study, through a prolonged exposure design and comprehensive assessment of interactions between PSNPs and ZnO-NPs across a wide range of physiological, biochemical, immunological, and oxidative stress markers in zebrafish (*Danio rerio*), provides valuable insights into the interactive toxicity of emerging contaminants in aquatic ecosystems.

Methods: In this study, 420 adult zebrafish (*Danio rerio*) were exposed to seven experimental treatments, including varying concentrations of polystyrene nanoparticles (PSNPs; 50 and 100 µg/L), zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs; 10 and 20 mg/L), and two combined treatments of these two nanoparticles. Following a 28-day exposure period, whole-body samples were collected to assess a range of physiological endpoints, including biochemical markers (lipoproteins, nitrogenous metabolites, and hepatic enzymes), non-specific immune indicators (lysozyme activity, total immunoglobulin, alkaline phosphatase [ALP], and acid phosphatase [ACP]), as well as antioxidant enzymes (superoxide dismutase [SOD] and catalase [CAT]).

Findings: The findings revealed that long-term exposure to the nanoparticles, both individually and in combination, led to significant increases in LDL, HDL, cholesterol, and triglyceride levels compared to the control group, with the most pronounced alterations observed in the ZnO-NPs@20 treatment. Moreover, total protein, albumin, immunoglobulin, lysozyme, alkaline phosphatase (ALP), and acid phosphatase (ACP) levels were significantly elevated across all exposure groups. Creatinine concentration increased in response to ZnO-NPs and the combined PSNPs/ZnO-NPs treatments, whereas urea levels showed a significant reduction in the PSNPs/100+ZnO-NPs@20 group. Hepatic enzymes ALT and AST were also markedly elevated in all nanoparticle-treated groups, particularly in the PSNPs/100+ZnO-NPs@10 combination treatment.

Conclusion: The interaction between the two nanoparticles was predominantly characterized by additive and inhibitory effects, with no evidence supporting the occurrence of synergistic or antagonistic interactions. Additionally, PSNPs played a more prominent role in triggering physiological responses. These findings underscore the importance of considering the combined effects of nanocontaminants on aquatic organisms in environmental risk assessments.



NUMBER OF TABLES

0



NUMBER OF FIGURES

4



NUMBER OF REFERENCES

41

مقاله پژوهشی

بررسی سمیت تعاملی نانوپلاستیک‌های پلی‌استایرن و نانوذرات اکسید روی بر شاخص‌های بیوشیمیایی و ایمنی در ماهی گورخری (*Danio rerio* (Hamilton, 1822)

مریم آخوندیان^{۱*}، جمال رحیمی^۲، قاسم رشیدیان^۳^۱ استادیار زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و محیطی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران^۲ دانش‌آموخته دکتری شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران^۳ پژوهشگر پسادکتری، دانشکده شیلات و حفاظت از منابع آبی، مرکز تحقیقات آبرزی پروری و تنوع زیستی، دانشگاه جنوب بوهامیا، چسکه بودیوویتسه، جمهوری چک

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۳/۷ تاریخ بازبینی: ۱۴۰۴/۷/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۷/۱۲	پیشینه و اهداف: در سال‌های اخیر، نگرانی‌ها در خصوص اثرات زیست‌محیطی نانوذرات به‌ویژه نانوپلاستیک‌ها و نانوذرات فلزی بر موجودات آبرزی به‌شدت افزایش یافته است. نانوپلاستیک‌های پلی‌استایرن (PSNPs) به‌دلیل اندازه بسیار کوچک، قابلیت نفوذ به بافت‌ها و امکان برهم‌کنش با سایر آلاینده‌ها، از پتانسیل بالایی برای ایجاد آسیب‌های فیزیولوژیکی و ایمنی برخوردارند. همچنین، نانوذرات اکسید روی (ZnO-NPs) به‌عنوان یکی از نانومواد پرکاربرد صنعتی، در مطالعات پیشین اثرات سمی قابل‌توجهی بر آبرزیان نشان داده‌اند. با وجود این، اغلب مطالعات موجود تنها به بررسی اثرات منفرد این آلاینده‌ها پرداخته‌اند و اطلاعات کافی درباره پیامدهای ناشی از مواجهه هم‌زمان آن‌ها، به‌ویژه در مواجهه‌های مزمن، در دست نیست. پژوهش حاضر با مواجهه طولانی‌مدت و بررسی جامع تعاملات بین این دو نانوذره بر طیف گسترده‌ای از شاخص‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی، ایمنی و استرس اکسیداتیو در گورخرماهی (<i>Danio rerio</i>)، گامی مؤثر در درک بهتر اثرات تعاملی آلاینده‌های نوظهور در اکوسیستم‌های آبی به‌شمار می‌رود. روش‌ها: در این مطالعه، ۴۲۰ گورخرماهی در معرض هفت تیمار مختلف شامل غلظت‌های متفاوت نانو پلی‌استایرن (۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم برلیتر) و نانو اکسیدروی (۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر) و دو تیمار ترکیبی از این دو نانوذره قرار گرفتند. پس از پایان دوره مواجهه ۲۸ روزه، نمونه‌برداری از کل بدن برای سنجش پارامترهای بیوشیمیایی (لیپوپروتئین‌ها، متابولیت‌های نیتروژنی، آنزیم‌های کبدی)، شاخص‌های ایمنی غیر اختصاصی (لیزوزیم، ایمونوگلوبولین، ALP، ACP) و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (SOD و CAT) انجام شد. یافته‌ها: نتایج نشان داد که مواجهه بلندمدت با نانوذرات، به‌صورت جداگانه و ترکیبی، سبب افزایش معنادار غلظت LDL، HDL، کلسترول و تری‌گلیسرید نسبت به گروه کنترل شد، به‌طوری‌که بیشترین تغییرات در تیمار ZnO-NPs@20 مشاهده گردید. همچنین، شاخص‌های پروتئین کل، آلبومین، ایمونوگلوبین، لیزوزیم، ALP و ACP در همه تیمارها افزایش معنادار نشان دادند. سطح کراتینین در مواجهه با ZnO-NPs و ترکیب PSNPs/ZnO-NPs افزایش یافت، در حالی که اوره در تیمار ترکیبی PSNPs/100+ZnO-NPs@20 کاهش معناداری را نشان داد. آنزیم‌های کبدی ALT و AST نیز در تیمارهای نانوذره‌ای، به‌ویژه ترکیب PSNPs/100+ZnO-NPs@10، به‌طور چشمگیری افزایش یافتند. نتیجه‌گیری: تعامل بین این دو نانوذره عمدتاً به‌صورت اثرات تجمعی و مهارتی بوده و شواهدی دال بر بروز تعاملات هم‌افزا یا آنتاگونیستی مشاهده نگردید. همچنین PSNPs نقش بارزتری در تحریک پاسخ‌های فیزیولوژیکی ایفا نمود. یافته‌های این پژوهش اهمیت توجه به اثرات توأم نانوآلاینده‌ها بر موجودات آبرزی را در ارزیابی‌های ریسک زیست‌محیطی مورد تأکید قرار می‌دهد.
واژگان کلیدی: پلاستیک نانوذره ماهی گورخری استرس اکسیداتیو شاخص‌های بیوشیمیایی	
*نویسنده مسئول ✉ m.akhondian@umz.ac.ir Doi: 10.52547/joc.16.62.6 ORID: 0000-0002-9109-1141	

مقدمه

2020; Deepa et al., 2019; Dekani et al., 2019; Hou et al., 2018; Khan et al., 2022; Mandal et al., 2024; Mawed et al., 2022; Vicario-Parés et al., 2014

با توجه به این مخاطرات، ارزیابی پیامدهای اکولوژیک ناشی از تعامل بین نانوپلاستیک‌های پلی‌استایرن و نانوذرات اکسید روی به ویژه از منظر اثرات سینرژیستیک آن‌ها بر اکوسیستم‌های آبی، از اهمیت حیاتی برخوردار است. بررسی پیشینه تحقیقاتی نشان می‌دهد که تا زمان انجام این پژوهش، تنها دو پژوهش مستقل به ارزیابی سمیت مجزا و توأم نانوذرات اکسید روی و نانوپلاستیک‌های پلی‌استایرنی بر موجودات آبی پرداخته‌اند. این تحقیقات به ترتیب بر روی *Brachionus koreanus* (Lai et al., 2022) و *Ctenopharyngodon idella* (Estrela et al., 2021) انجام شده است. در مطالعه دوم که تنها به مدت سه روز به طول انجامید، هیچ گونه اثر سینرژیستیک، آنتاگونیستی یا تجمعی بین این دو نانوذره مشاهده نگردید که به نظر می‌رسد بازه زمانی محدود این آزمایشات، برای آشکارسازی تعاملات احتمالی بین ذرات کافی نمی‌باشد. به منظور جبران این شکاف تحقیقاتی، پژوهش حاضر با طراحی دوره مواجهه ۲۸ روزه، به ارزیابی دقیق برهمکنش‌های بین نانوذرات اکسید روی و نانوپلاستیک‌های پلی‌استایرنی در گورخرماهی (*Danio rerio*) پرداخته است. این مطالعه با تمرکز ویژه بر شاخص‌های فیزیولوژیک و عملکرد تولیدمثلی، درک جامع تری از اثرات تجمعی بلندمدت این نانوذرات بر آبزیان ارائه می‌دهد.

روش پژوهش

۱. مواد شیمیایی و ویژگی‌های نانوذرات

نانوذرات پلی‌استایرن بر اساس روشهای استاندارد تهیه شدند (Shibuya et al., 2016; Tahami et al., 2014). به‌طور خلاصه، مونومر استایرن (CAS Number: 100-42-5) ابتدا با محلول ۵ درصد هیدروکسید سدیم خنثی شده و سپس تحت شرایط خلأ خالص‌سازی گردید. برای سنتز این نانوذرات، از روش پلیمریزاسیون امولسیون بدون امولسیفایر استفاده شد؛ بدین صورت که استایرن و پلی‌وینیل‌پیرولیدون (PVP) در آب دی‌یونیزه و به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۸۰۰ دور در دقیقه مخلوط شده و سپس تا دمای ۸۰ درجه سلسیوس گرم شدند. آغاز واکنش پلیمریزاسیون با افزودن پرسولفات پتاسیم (Merck) ۹۹٪، انجام شد، که منجر به تشکیل نانوذرات پلی‌استایرن گردید.

برای بررسی مورفولوژی و اندازه ذرات سنتز شده، از میکروسکوپ الکترونی روبشی (TESCAN MIRA SEM، جمهوری چک) استفاده شد (شکل ۱-۱).

ذرات پلاستیک به دلیل تجزیه‌ناپذیری در طبیعت، برای دوره‌های طولانی در محیط‌های آبی حضور داشته و این امر تماس آبزیان با آنها را به میزان قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌دهد (Andrady, 2015; Brandts et al., 2022; Chang et al., 2023). فرآیندهای تخریب طبیعی، موجب کاهش تدریجی ابعاد ذرات پلاستیکی می‌گردد، در این میان نانوذرات پلاستیکی (با قطر کمتر از ۱۰۰ نانومتر) به دلیل قابلیت‌های ویژه در ایجاد ارتباط با ساختارهای زیستی، از اهمیت تحقیقاتی بالایی برخوردار هستند (Li et al., 2023; Wang et al., 2022).

نانوپلاستیک‌ها در سال‌های اخیر به عنوان یکی از نگرانی‌های اصلی محققان محیط زیست و سم‌شناسی مطرح شده‌اند (Brandts et al., 2022; Cai et al., 2021; Estahbanati et al., 2023). تحلیل یافته‌های پژوهشی نشان می‌دهد که نانوپلاستیک‌ها می‌توانند در آبزیان منجر به مجموعه‌ای از عوارض مشترک شامل استرس اکسیداتیو، اختلال در محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد، تغییر در مسیرهای تولید ATP، نقص در پاسخ‌های ایمنی و دگرگونی رفتارهای طبیعی شود. نکته حائز اهمیت در مطالعات پیشین، وجود رابطه معنادار بین کاهش ابعاد ذرات و افزایش پتانسیل سمیت آنها می‌باشد (Barría et al., 2020; Brandts et al., 2022; Jacob et al., 2020).

ویژگی‌های فیزیکی منحصر به فرد نانوپلاستیک‌ها مانند توانایی عبور از موانع زیستی، استقرار در محیط درون سلولی و حتی دسترسی به ساختارهای هسته‌ای، قابلیت‌هایی هستند که نگرانی فزاینده‌ای را درباره خطرات بالقوه آن‌ها در سطوح مختلف سیستم‌های حیاتی را مطرح می‌نماید (Brandts et al., 2022). علاوه بر این، نانوپلاستیک‌ها در زیست‌بوم‌های آبی دارای ویژگی‌های منحصربه‌فردی نظیر اندازه کوچک، توزیع اندازه متنوع، بار سطحی متفاوت و شکل غیرمنظم هستند، که آن‌ها را به حاملانی بالقوه برای انواع آلاینده‌های محیطی از جمله سایر ذرات معلق تبدیل می‌کند.

نانوپلاستیک‌ها در طبیعت تمایل بالایی به برهمکنش با سایر آلاینده‌ها از جمله نانو مواد سنتزی نشان می‌دهند، که این ویژگی، پیامدهای زیست‌محیطی پیچیده‌تری را موجب شده است. در این میان، نانوذرات اکسید روی به دلیل مصارف گسترده در صنایع مختلف، با پیش‌بینی تولید جهانی حدود ۱/۲ میلیون تن، از اهمیت خاصی برخوردارند (Mandal et al., 2024).

انتشار نانوذرات اکسید روی در منابع آبی به دلیل استفاده گسترده از آنها در کاربردهای مختلف، احتمال بروز اثرات سمی مهمی برای موجودات آبی را افزایش می‌دهد (Gomez-Gonzalez et al., 2023). یافته‌های پژوهشی متعدد حاکی از آن است که نانوذرات اکسید روی می‌توانند از طریق مواجهه مستقیم آبی یا زنجیره غذایی، سمیت شدیدی در آبزیان ایجاد کنند. این تأثیرات سمی، در سطوح مختلفی از جمله تغییرات ساختاری، عملکردی، تکاملی و بیوشیمیایی در ماهی‌ها و سایر موجودات آبی اعم از میکروارگانیسم‌ها و ماکروارگانیسم‌ها مشاهده شده است (Dai et al., 2023).

اولتراسونیک با توان ۶۰ وات بر لیتر و فرکانس ۳۰ کیلوهرتز قرار گرفتند. غلظت‌های انتخاب‌شده برای ZnO-NPs بر اساس غلظت کشنده میانه ($19/2 \text{ mg/l}$) برای گورخر ماهی، طبق گزارش Hua و همکاران (۲۰۱۴) تعیین شدند.

این آزمایش با استفاده از سیستم «ایستا-با تجدید دوره‌ای» و بر پایه دستورالعمل OECD 230 با اصلاحات جزئی اجرا شد. هر تیمار به صورت سه تکرار ($n=20$) برای هر تکرار اجرا گردید. در طول دوره ۲۸ روزه آزمایش، ماهیان در آکواریوم‌هایی با حجم ۱۲ لیتر آب بدون کلر و در دمای $1 \text{ }^\circ\text{C} \pm 25$ نگهداری شدند و هوادهی مستمر با استفاده از پمپ هوا انجام گرفت. تعویض کامل آب (۱۰۰٪) هر ۴۸ ساعت یکبار انجام شد و محلول‌های شیمیایی در هر نوبت به صورت تازه آماده‌سازی و جایگزین گردیدند. در تیمارهای منفرد، محلول‌های تازه مستقیماً به مخازن افزوده شد، در حالی که در تیمارهای ترکیبی، مخلوط PSNP و ZnO-NP پیش از مصرف به مدت ۲۴ ساعت در غلظت موردنظر مخلوط، هم‌دمای و ور تکس شده و سپس به مخازن اضافه شدند.

در طول آزمایش، ماهیان دو بار در روز با غذای پلت تجاری و به میزان حدود ۳ درصد از وزن بدنشان تغذیه شدند تا وضعیت فیزیولوژیک آن‌ها حفظ شود. هر صبح، ضایعات، از جمله مدفوع از مخازن جمع‌آوری و وضعیت سلامت ماهیان بررسی و موارد مرگ‌ومیر ثبت و از محیط حذف شد. شرایط کیفی آب در طول آزمایش شامل دمای $1 \text{ }^\circ\text{C} \pm 25$ ، pH در محدوده ۶/۸ تا ۷، اکسیژن محلول $5/6 \text{ mg/l}$ و چرخه نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بود.

۳. نمونه‌برداری

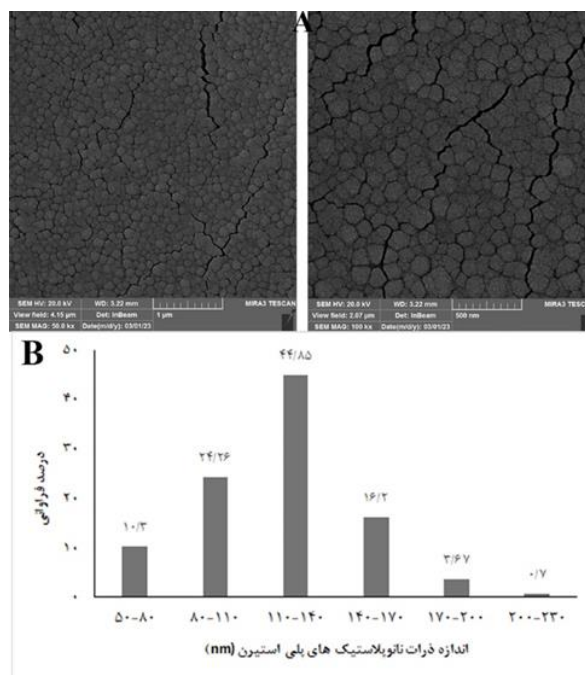
در پایان دوره آزمایش، تغذیه ماهیان به مدت ۲۴ ساعت پیش از نمونه‌برداری زیستی متوقف شد. از هر تکرار آزمایشی، تعداد ۹ ماهی به طور تصادفی انتخاب شده، با استفاده از روش مناسب بی‌هوش شده و برای تحلیل‌های بیشتر تقسیم‌بندی شدند. این تحلیل‌ها شامل ارزیابی‌های بیوشیمیایی و ایمنی‌شناسی با استفاده از نمونه‌های کل بدن، و تحلیل‌های مولکولی بر روی بافت عضله بودند.

۴. آزمایشات بیوشیمیایی و ایمنی‌شناسی

برای ارزیابی شاخص‌های بیوشیمیایی، ایمنی‌شناسی و آنتی‌اکسیدانی، از هر گروه تیماری تعداد ۹ ماهی (سه ماهی از هر تکرار) نمونه‌برداری شد. آماده‌سازی نمونه‌ها مطابق روش توصیف‌شده در مطالعات پیشین (Bartoskova et al., 2013; Blahová et al., 2013) با اندکی تغییرات انجام شد. به طور خلاصه، کل بدن ماهی‌ها در بافر فسفات سرد ($1/9 \text{ } \text{w/v}$; 0.1 M ; $\text{pH } 7.4$) هموژنیزه شد و سپس در دمای $4 \text{ }^\circ\text{C}$ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. فاز مایع بالایی حاصل از سانتریفیوژ، بلافاصله فریز و برای تحلیل‌های بعدی ذخیره شد.

پارامترهای بیوشیمیایی اندازه‌گیری شده شامل: لیپوپروتئین‌ها (کلسترول تام، لیپوپروتئین با چگالی بالا (HDL) و با چگالی پایین (LDL))، تری‌گلیسرید، متابولیت‌های نیتروژنی (کراتینین و اوره)، آنزیم‌های

(A)، و توزیع اندازه ذرات در محدوده ۵۰ تا ۲۳۰ نانومتر با استفاده از نرم‌افزار ImageJ 1.52av تحلیل گردید (شکل ۱-B).



شکل ۱: تصویر SEM از نانوپلاستیک پلی استایرن (A) و توزیع اندازه ذرات (B)

نانوذرات اکسید روی با ساختار کروی و اندازه ذرات بین ۱۰ تا ۳۰ نانومتر (درجه خلوص ۹۹٪) از شرکت نانوسانی ایران (کد محصول US3580) تهیه گردید. ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی این نانوذرات در تحقیقات پیشین ما به تفصیل مورد بررسی قرار گرفته است (Rashidian et al., 2022).

۲. طراحی آزمایش سمیت‌زایی

به منظور ارزیابی اثرات سمی منفرد و ترکیبی نانوذرات اکسید روی و نانوذرات پلی‌استایرن، تعداد ۴۲۰ ماهی گورخری (Danio rerio) بالغ، با میانگین وزنی 0.1 ± 0.38 گرم، از یک تأمین‌کننده محلی تهیه و به آزمایشگاه منتقل شدند. پیش از شروع آزمایش، ماهیان به مدت ۱۰ روز تحت شرایط آزمایشگاهی جهت سازگاری نگهداری شدند. پس از دوره تطابق، ماهیان به صورت تصادفی به هفت گروه آزمایشی ($n=60$ در هر گروه) تقسیم و در معرض تیمارهای مختلف قرار گرفتند. تیمارها شامل گروه شاهد (نگهداری در آب تمیز)، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر PSNPs، ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر ZnO-NPs، ترکیب ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر PSNPs با ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر ZnO-NPs بودند. این گروه‌ها از این پس به ترتیب با عناوین Control, PSNPs@50, PSNPs@100, PSNPs@10+ZnO-NPs@20 و PSNPs@100+ZnO-NPs@20 نام برده می‌شوند.

ZnO-NPs و PSNPs ترکیب آن‌ها، پیش از افزودن به آکواریوم‌ها، به آب مقطر اضافه شده و برای تهیه محلول‌های تازه مورد استفاده قرار گرفتند. برای پراکنش یکنواخت، این سوسپانسیون‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در حمام

سرم در بافر فسفات سدیم ۰/۰۵ مولار (PH=۶/۲) با سوسپانسیون *Micrococcus luteus* (غلظت ۶/۰ mg/ml) انکوبه شدند و میزان جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر در بازه‌های ۳ دقیقه‌ای، به مدت ۱۵ دقیقه با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. یک واحد فعالیت لیزوزیم به صورت کاهش جذب نوری به میزان ۰/۰۰۱ در دقیقه تعریف شد. تمامی اندازه‌گیری‌ها به صورت سه تکرار انجام شدند.

۵. تحلیل‌های آماری

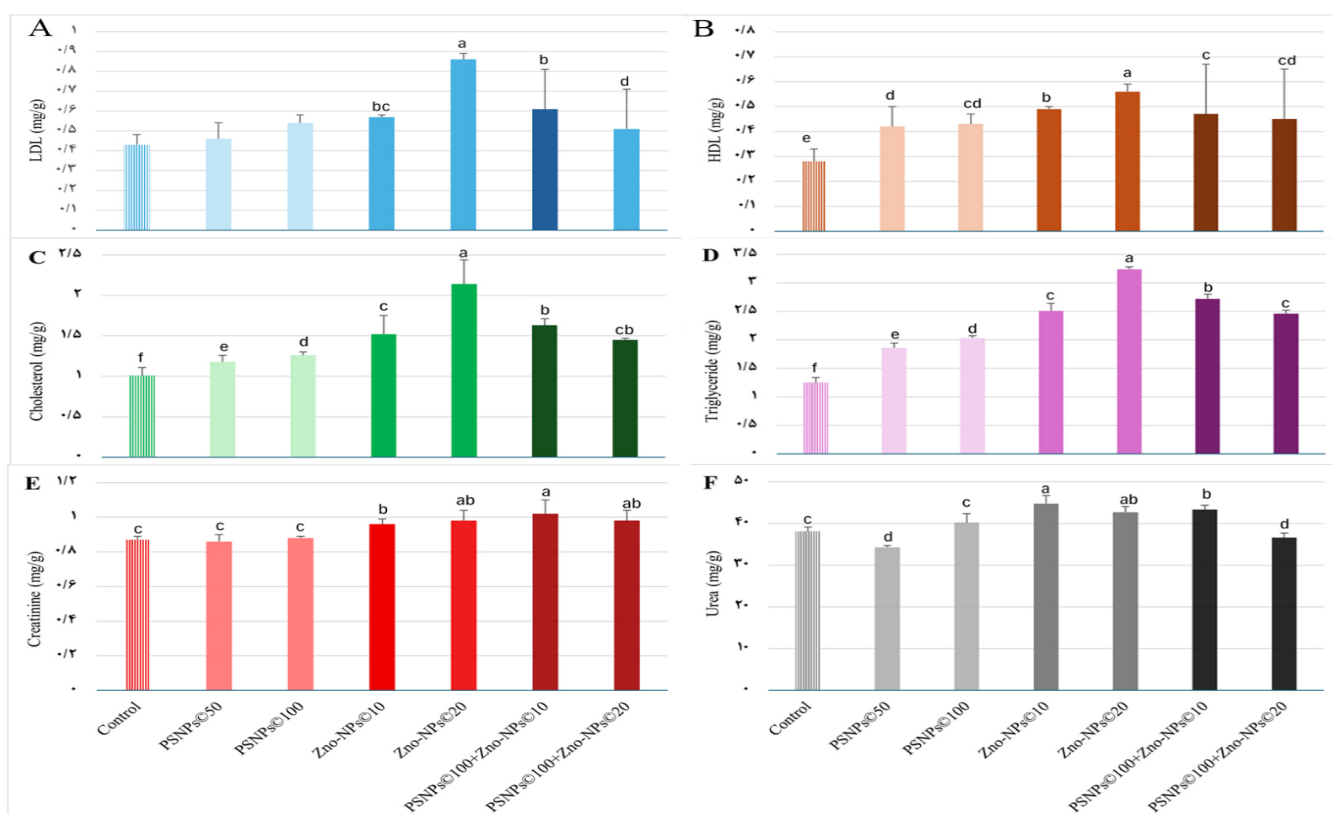
با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام شد. برای بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف اسمیرنوف و برای ارزیابی همگنی واریانس‌ها از آزمون لوین (Levene) استفاده گردید. به منظور بررسی تفاوت معنادار بین گروه‌های آزمایشی، تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) به کار گرفته شد و در صورت وجود تفاوت معنادار، آزمون‌های تعقیبی دانکن (Duncan) و دانت (Dunnett) برای مقایسه میان گروه‌ها اعمال شدند. همچنین برای مقایسه‌های دوگروهی، از آزمون تی تست (t-test) استفاده شد. سطح معنی‌داری آماری در تمامی آزمون‌ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد و نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شده‌اند.

ترانس آمیناز (آلانین ترانس آمیناز ALT و آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST)، پروتئین‌های پلاسما (پروتئین تام و آلبومین)، شاخص‌های استرس (گلوکز و کورتیزول) و آنزیم‌های ایمنی غیر اختصاصی (آلکالین فسفاتاز (ALP) و اسید فسفاتاز (ACP) بودند. این نشانگرها با استفاده از کیت‌های تجاری شرکت پارس‌آزمون (تهران، ایران) اندازه‌گیری شدند.

وضعیت آنتی‌اکسیدانی با اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی کاتالاز (CAT) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) با استفاده از کیت‌های تجاری شرکت ZellBio GmbH (Lonsee, Germany) و مطابق دستورالعمل سازنده مورد ارزیابی قرار گرفت.

علاوه بر این، پارامترهای ایمنی مرتبط نظیر ایمونوگلوبولین تام (Ig) و فعالیت لیزوزیم (LYZ) نیز اندازه‌گیری شدند. مقدار ایمونوگلوبولین تام بر اساس روش گزارش شده قبلی (Siwicki, 1993)، با اندک تغییری، تعیین شد. برای این منظور، غلظت پروتئین‌های پلاسما پیش و پس از رسوب‌دهی با پلی‌اتیلن گلیکول ۱۲٪ (PEG, 10,000 MW, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) اندازه‌گیری شد.

فعالیت لیزوزیم با استفاده از آزمون توربیدیمتری و بر اساس منحنی استاندارد حاصل از لیزوزیم سفیده تخم مرغ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) اندازه‌گیری شد. برای این منظور، نمونه‌های رقیق شده



شکل ۲. شاخص‌های بیوشیمیایی پلاسما در گورخرماهی (*Danio rerio*) پس از ۲۸ روز قرارگیری در معرض تیمارهای انفرادی ۵۰ میکروگرم بر لیتر نانوذره پلی استایرن (PSNP@50)، ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر نانوذره پلی استایرن (PSNP@100)، ۱۰ میلی گرم بر لیتر نانوذره اکسیدروی (ZnO-NPs@10)، ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره اکسیدروی (ZnO-NPs@20) و تیمارهای ترکیبی ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر نانوذره پلی استایرن+۱۰ میلی گرم نانوذره اکسیدروی (PSNP@100+ ZnO-NPs@10)، ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر نانوذره پلی استایرن+۲۰ میلی گرم بر لیتر نانوذره اکسیدروی (PSNP@100+ ZnO-NPs@20). حروف متفاوت روی ستون‌ها نشان دهنده وجود اختلاف معنادار بین تیمارها می باشد ($P < 0.05$).

نتایج و بحث

تغییرات بیوشیمیایی پلاسما

قرار گرفتن ماهی‌ها در معرض ذرات نانوپلاستیک پلی‌استایرن (PSNPs) و نانوذرات اکسید روی (ZnO-NPs) به صورت منفرد و ترکیبی، موجب تغییرات معنی‌داری در بیوشیمی پلاسما شد (شکل ۲). در ماهیان گروه شاهد، مقادیر اندازه‌گیری‌شده‌ی HDL، کلاسترول و تری‌گلیسرید به ترتیب برابر با 0.43 ± 0.12 ، 0.28 ± 0.10 و 1.01 ± 0.09 و 1.25 ± 0.09 میلی‌گرم بر گرم بود (شکل‌های ۲-A تا ۲-D). به‌طور کلی، لیپوپروتئین‌ها واکنش بسیار مشابهی در بین گروه‌های آزمایشی نشان دادند. تماس با نانوذرات به‌طور انفرادی، بدون توجه به غلظت، باعث افزایش معنی‌دار غلظت این پارامترهای بیوشیمیایی پلاسما در مقایسه با گروه شاهد شد ($p < 0.05$) و بیشترین غلظت‌ها: $LDL: 86/0 \pm 03/0$ ، $HDL: 56/0 \pm$ ، کلاسترول: 0.30 ± 0.14 و تری‌گلیسرید: 0.4 ± 0.24 میلی‌گرم بر گرم (در گروه ZnO-NPs@20 مشاهده گردید).

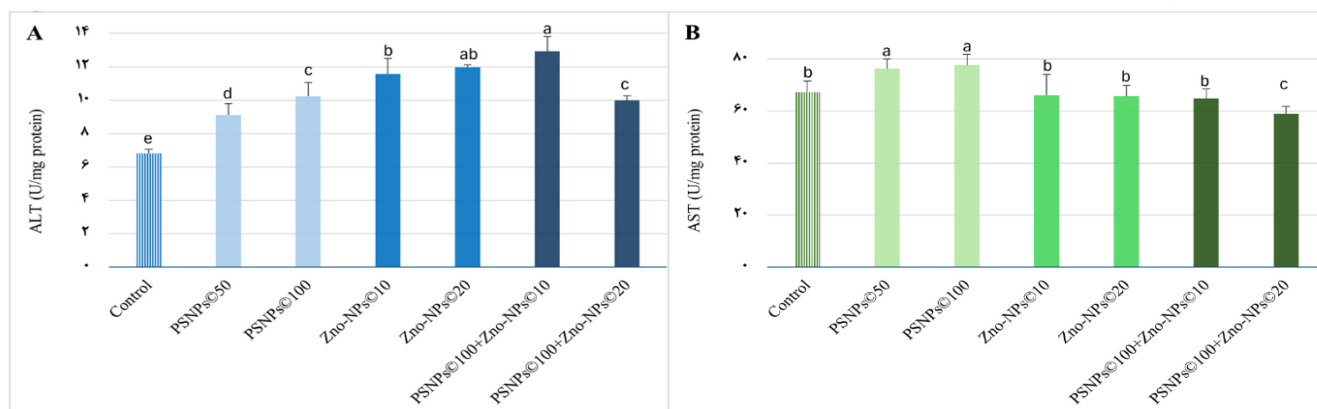
با این حال، در ماهیانی که در معرض تیمارهای ترکیبی PSNPs/100+ZnO-NPs@20 و PSNPs/100+ZnO-NPs@20 قرار گرفتند، سطوح این نشانگرهای زیستی در مقایسه با گروه ZnO-NPs@20 به‌طور معناداری پایین‌تر باقی ماند ($p < 0.05$). این موضوع نشان می‌دهد که PSNPs اثر آنتاگونیستی در برابر ZnO-NPs دارد، هرچند که تماس تنها با PSNPs نیز باعث افزایش لیپوپروتئین‌ها گردید. همچنین، HDL و تری‌گلیسرید، بیشترین میزان تغییرات را در تمام گروه‌های تیمار شده نشان دادند؛ و نسبت به LDL و کلاسترول در تیمارهای مختلف، به ترتیب با افزایش $53\%-103\%$ و $52\%-173\%$ همراه بودند.

در معرض قرارگیری با PSNPs و ZnO-NPs به صورت منفرد و ترکیبی باعث تغییرات معناداری در غلظت کراتینین و اوره نیز گردید. در گروه شاهد،

غلظت کراتینین و اوره به ترتیب 0.02 ± 0.07 و 1.05 ± 0.10 میلی‌گرم بر گرم گزارش شد (شکل‌های ۲-E و ۲-F). این متابولیت‌های نیتروژن‌دار در اغلب گروه‌های تیمار شده تغییر یافتند. هرچند در گروه‌هایی که تنها در معرض نانوپلاستیک‌ها قرار گرفته بودند (PSNPs@50 و PSNPs@100)، تغییر معناداری در میزان کراتینین مشاهده نشد (به ترتیب 0.43 ± 0.27 و 0.12 ± 0.23 میلی‌گرم بر گرم)، اما غلظت این ترکیب در ماهیانی که به‌طور منفرد یا ترکیبی در معرض ZnO-NPs قرار گرفتند، در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معناداری افزایش یافت ($p < 0.05$). همچنین، هر دو گروه تیمار شده با ZnO-NPs در مقایسه با گروه شاهد، به‌طور قابل توجهی سطوح بالاتری از اوره تولید کردند. با این حال، تولید اوره در گروهی که تحت تیمار ترکیبی PSNPs/100+ZnO-NPs@20 قرار گرفت، به‌طور معناداری کاهش یافت و به 1.16 ± 0.58 میلی‌گرم بر گرم رسید.

آنزیم‌های ترانس آمیناز

فعالیت آنزیم‌های شاخص آسیب بافتی شامل ALT (آلانین آمینوترانسفراز) و AST (آسپارات آمینوترانسفراز) در گروه‌های مختلف ماهیان تیمار شده در شکل ۳ ارائه شده است و تفاوت‌های معناداری را بین تیمارها نشان می‌دهد. در گروه شاهد، میانگین فعالیت ALT و AST به ترتیب $25/4 \pm 26/67$ و $25/0 \pm 81/6$ U/mg protein اندازه‌گیری شد. با این حال، در تمامی گروه‌های در معرض، به‌ویژه تیمار ترکیبی PSNPs/100+ ZnO-NPs@10، فعالیت ALT به‌طور معناداری افزایش یافت ($p < 0.05$). فعالیت ALT در تیمار PSNPs/100+ ZnO-NPs@10 نسبت به گروه کنترل، تقریباً دو برابر شد که نشان‌دهنده بروز آسیب سلولی بیشتر در این تیمار است. با این حال، افزایش غلظت ZnO-NPs در ترکیب با PSNPs، از شدت این اثر تجمعی کاست و فعالیت ALT در تیمار PSNPs/100+ ZnO-NPs@10، نسبت به ترکیب با غلظت پایین‌تر کمتر بود (شکل ۳-A).



شکل ۳. آنزیم‌های ترانس آمیناز پلاسما در گورخرماهی (Danio rerio) پس از ۲۸ روز قرارگیری در معرض تیمارهای انفرادی ۵۰ میکروگرم بر لیتر نانوذره پلی‌استایرن (PSNPs@50)، ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر نانوذره پلی‌استایرن (PSNPs@100)، ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره اکسیدروی (ZnO-NPs@10)، ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره اکسیدروی (ZnO-NPs@20) و تیمارهای ترکیبی ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر نانوذره پلی‌استایرن + ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره اکسیدروی (PSNPs/100+ ZnO-NPs@10)، ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر نانوذره پلی‌استایرن + ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره اکسیدروی (PSNPs/100+ ZnO-NPs@20). حروف متفاوت روی ستون‌ها نشان‌دهنده وجود اختلاف معنادار بین تیمارها می‌باشد ($P < 0.05$).

۴-B). با این حال، در تیمارهای ترکیبی، حضور PSNPs این افزایش را مهار کرد؛ به گونه‌ای که اثر افزایشی ZnO-NPs بر آلبومین توسط PSNPs کاهش معناداری نشان داد ($p < 0.05$).

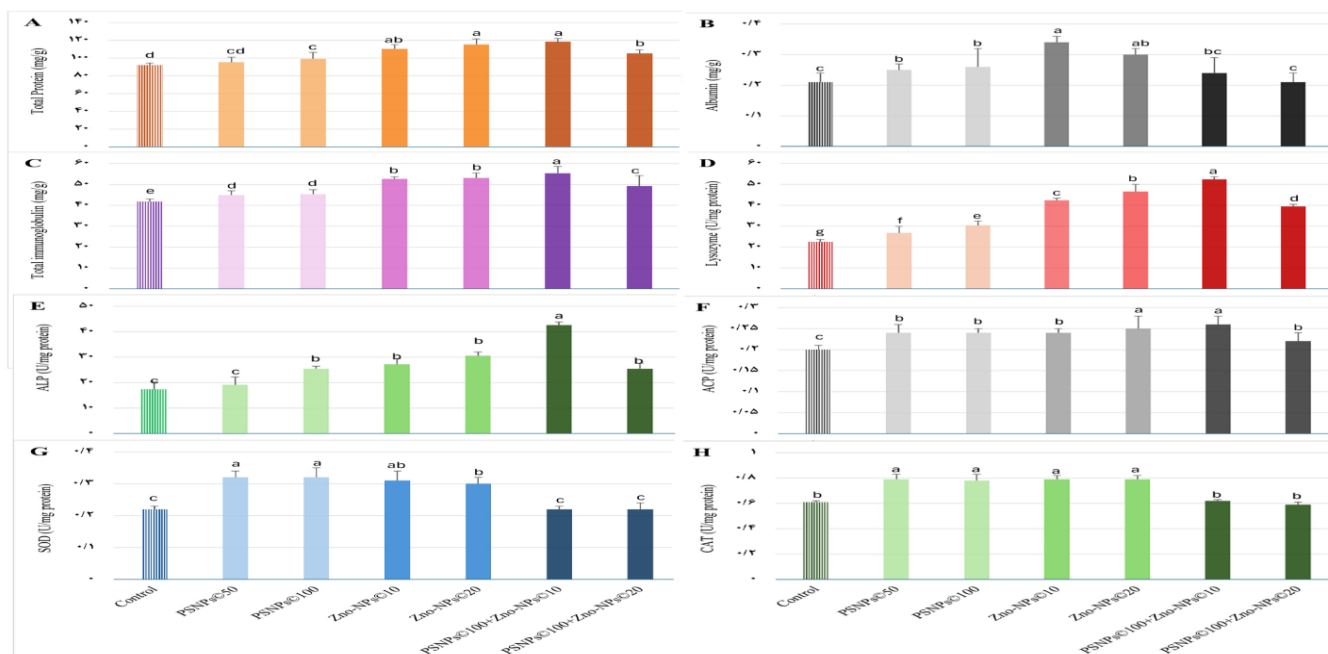
سطح کلی ایمونوگلوبولین پلاسما و به ویژه فعالیت لیوزیم، در تمام گروه‌های تیمار شده در مقایسه با گروه شاهد ($23/1 \pm$ U/mg protein) $83/41$ و $1/23 \pm 22/45$ به طور معناداری افزایش یافتند ($p < 0.05$) (شکل های ۴-C و ۴-D). کمترین تغییرات در گروه‌هایی مشاهده شد که فقط در معرض PSNPs بودند، در حالی که بیشترین افزایش این دو شاخص ایمنی در گروه PSNPs/100+ZnO-NPs@10 مشاهده شد (به ترتیب U/mg protein $25/3 \pm 36/55$ و $1/25 \pm 52/36$). شکل های ۴-E و ۴-F به ترتیب افزایش معنادار فعالیت آنزیم‌های ALP و ACP را در تقریباً تمام گروه‌های ماهی تیمار شده در مقایسه با گروه شاهد (به ترتیب U/mg protein $87/2 \pm 35/17$ و $0/20 \pm 0/01$) نشان می‌دهند. به عنوان مثال، فعالیت ALP در گروه PSNPs/100+ZnO-NPs@10 حدود سه برابر بیشتر از گروه شاهد بود ($p < 0.05$).

در مورد استرس اکسیداتیو، فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT در بدن ماهیان در شکل های ۴-G و ۴-H نشان داده شده است. مواجهه به طور انفرادی با PSNPs و ZnO-NPs باعث افزایش معنادار فعالیت آنزیم SOD (حدود ۵۰٪) و CAT (حدود ۲۵٪) در مقایسه با گروه شاهد گردید؛ با این حال، در تیمارهای ترکیبی PSNPs/100+ZnO-NPs@10 و PSNPs/100+ZnO-NPs@20 تغییرات معناداری در فعالیت این آنزیم‌ها مشاهده نشد ($p < 0.05$).

از سوی دیگر، بیشترین فعالیت AST در تیمارهای مواجهه منفرد با نانوپلاستیک‌ها مشاهده شد که در محدوده 63/77-32/76 U/mg protein قرار داشت. با این حال، تیمار ترکیبی PSNPs/100+ZnO-NPs@20 موجب کاهش معنادار فعالیت AST تا سطح $82/2 \pm 92/58$ U/mg protein گردید ($p < 0.05$)، که می‌تواند بیانگر بروز اثر متقابل یا مهار احتمالی بر فعالیت این آنزیم در حضور هم‌زمان این دو نوع نانوذره باشد.

شاخص‌های ایمنی غیر اختصاصی و وضعیت اکسیداتیو

مواجهه منفرد و ترکیبی با نانوذرات منجر به تغییرات معناداری در غلظت‌های برخی از پارامترهای ایمنی غیر اختصاصی و استرس اکسیداتیو در ماهیان گردید (شکل ۴). میزان پروتئین کل پلاسما در گروه شاهد $25/2 \pm 13/92$ mg/g اندازه‌گیری شد و در تمامی گروه‌های آزمایش (به استثنای PSNPs@50)، به طور معناداری ($p < 0.05$)، افزایش یافت (شکل ۴-A). یافته‌ها نشان دادند که تیمارهای منفرد و ترکیبی با نانوذرات ZnO، نسبت به تیمارهای منفرد PSNPs، افزایش بیشتری (۱۶٪ تا ۲۷٪) در ترشح پروتئین به پلاسما، ایجاد کردند؛ با این حال، در تیمار ترکیبی PSNPs/100+ZnO-NPs@20 ($mg/g 82/3 \pm 22/105$) نسبت به تیمار PSNPs/100+ZnO-NPs@10 ($mg/g 88/3 \pm 34/118$) این افزایش کمتر بود ($p < 0.05$). (شکل ۴-A). در معرض قرار گیری ماهیان در تیمارهای منفرد PSNPs و ZnO-NPs باعث افزایش قابل توجه سطح آلبومین در بیشتر گروه‌ها شدند، به طوری که افزایش حدود ۴۰٪ تا ۶۰٪ در گروه‌هایی که تنها در معرض ZnO-NPs قرار گرفتند، مشاهده شد (شکل



شکل ۴. پارامترهای ایمنی غیر اختصاصی و استرس اکسیداتیو در گورخرماهی (Danio rerio) پس از ۲۸ روز قرارگیری در معرض تیمارهای انفرادی ۵۰ میکروگرم بر لیتر نانوذره پلی استایرن (PSNPs@50)، ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر نانوذره پلی استایرن (PSNPs@100)، ۱۰ میلی گرم بر لیتر نانوذره اکسیدروی (ZnO-NPs@10)، ۲۰ میلیگرم بر لیتر نانوذره اکسیدروی (ZnO-NPs@20) و تیمارهای ترکیبی ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر نانوذره پلی استایرن + ۱۰ میلی گرم بر لیتر نانوذره اکسیدروی (PSNPs/100+ ZnO-NPs@10)، ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر نانوذره پلی استایرن + ۲۰ میلی گرم بر لیتر نانوذره اکسیدروی (PSNPs/100+ ZnO-NPs@20). حروف متفاوت روی ستون‌ها نشان دهنده وجود اختلاف معنادار بین تیمارها می‌باشد ($p < 0.05$).

IGM، لیوزیم، کلسترول، کراتینین، HDL و تری‌گلیسرید گردید؛ این در حالی بود که چنین تغییراتی در مواجهه‌ی انفرادی با نانوذرات پلاستیک (فارغ از غلظت آن‌ها) مشاهده نشد. این تغییرات احتمالاً به غلظت بالاتر نانوذرات اکسید روی و سمی‌تر بودن آن در مقایسه با نانوپلاستیک‌ها مربوط می‌شود. تنها شاخصی که در آن مواجهه‌ی با نانوذرات پلاستیک اثرگذاری چشمگیرتری نسبت به نانوذرات اکسید روی داشت، میزان AST در کل بدن بود؛ به‌طوری‌که این آنزیم معمولاً حدود ۱۰ درصد بالاتر اندازه‌گیری شد. این تغییرات زیرحدک‌کننده، در شاخص‌های اکسیداتیو با گزارش‌های پیشین همخوانی دارد؛ گزارش‌هایی که نشان می‌دهند مواجهه با غلظت‌های ۰/۳۳ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر از نانوذرات اکسید روی، موجب بروز استرس اکسیداتیو در عملکرد مغزی مرتبط با حس بویایی در گورخرماهیان در حال رشد می‌شود (Takesono et al., 2023). با آن‌که غلظت‌های استفاده‌شده در این مطالعه بالاتر از مقادیر برآوردشده برای محیط‌زیست هستند (Gottschalk et al., 2015; Hong et al., 2021). اما تغییرات مشاهده‌شده در پاسخ‌های فیزیولوژیکی ماهیان در مواجهه‌های مجزای هر آلاینده، امکان ارزیابی اثرات هم‌افزایی بین نانوذرات اکسید روی و نانوپلاستیک‌های پلی‌استایرن را فراهم کرده است. به عبارت دیگر، این مواجهه‌های کنترل‌شده به عنوان مدلی آزمایشگاهی کمک می‌کنند تا بفهمیم ترکیب این دو آلاینده چگونه می‌تواند اثراتی شدیدتر یا متفاوت از اثرات هر کدام به‌تنهایی ایجاد کند.

در مطالعه حاضر، حضور نوع دوم ذرات آلاینده، تأثیر سمی ذرات نوع دیگر را تغییر داد. برای مثال، مواجهه با نانوپلاستیک باعث افزایش غلظت‌های AST در کل بدن شد، در حالی که در مواجهه با اکسید روی هیچ تغییری نسبت به گروه شاهد مشاهده نشد؛ اما زمانی که ماهی‌ها در معرض هر دو ذره آلاینده به طور همزمان قرار گرفتند، هیچ تغییری نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد (شکل B-۳). همچنین در مورد فعالیت آنزیم‌های CAT و SOD، مواجهه‌ی انفرادی با نانوپلاستیک و نانوذرات اکسید روی باعث افزایش فعالیت این آنزیم‌ها در کل بدن شد، اما در مواجهه ترکیبی با این ذرات، این آنزیم‌ها هیچ تغییری نسبت به گروه شاهد نشان ندادند. این نتایج نشان‌دهنده‌ی این است که این پارامترها تحت تأثیر تعاملات میان نانوپلاستیک و نانوذرات اکسید روی قرار دارند، که باعث کاهش تأثیر این آلاینده‌ها روی آنزیم‌ها، چه به‌طور مستقیم و چه به‌طور غیرمستقیم می‌شود. اگرچه واضح است که، تعاملات میان نانوپلاستیک و نانوذرات اکسید روی پیچیده است و نیاز به تحقیقات بیشتری دارد، تا مشخص شود که آیا این اثرات در طول مواجهه (به‌عنوان مثال، تغییرات در دسترس‌پذیری زیستی ذرات) یا پس از مواجهه (تغییرات در نحوه‌ی پردازش این ذرات توسط بافت‌ها) رخ می‌دهد. عدم پاسخ واضح در این زمینه مشابه گزارشات دیگر است. به‌عنوان مثال، مواجهه با میکروپلاستیک‌ها و اکسید روی در بافت‌های لارو باعث افزایش آپوپتوز سلولی در مقایسه با مواجهه با هر یک از این دو ماده به طور جداگانه شد (Zheng et al., 2022). اما اثر ترکیبی مواجهه با نانوپلاستیک (۲۳ نانومتر) و اکسید روی (۱۷۶۰ µg/l) از هر کدام، هیچ تغییری در سمیت این دو آلاینده در *Ctenopharyngodon Idella* ایجاد نکرد (Estrela et al., 2021). لازم به ذکر است که این ممکن است به‌دلیل تفاوت اندازه ذرات پلاستیکی باشد؛ زیرا در مطالعه قبلی از میکروپلاستیک‌ها

ارتباط واضحی بین قرارگیری در معرض نانوپلاستیک‌ها و اثرات منفی فیزیولوژیکی در مطالعات آزمایشگاهی وجود دارد (Kögel et al., 2020). در ماهی‌ها، قرارگیری در معرض نانوپلاستیک‌ها با اثرات مضر، به‌ویژه تأثیر بر فعالیت و غلظت آنزیم‌های بافتی، ارتباط داشته است. در مطالعه حاضر، در معرض قرارگیری ماهیان با هر دو غلظت مختلف نانوپلاستیک، سبب ایجاد تغییراتی در فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD) کل بدن گردید (حدود ۵۰ درصد افزایش نسبت به گروه شاهد داشت (شکل G-۴)، در حالیکه تفاوت معناداری بین تغییرات این فاکتور بین دو غلظت آلاینده مشاهده نشد. تغییرات مشابهی نیز در سطوح سایر آنزیم‌ها نسبت به گروه‌های شاهد مشاهده شد، از جمله افزایش حدود ۲۵ درصد در فعالیت کاتالاز (CAT) (شکل H-۴)، افزایش حدود ۲۰ درصد در فعالیت اسیدفسفاتاز (ACP) (شکل G-۴) و افزایش حدود ۵۰ درصد در فعالیت آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز ALT و آسپارات آمینوترانسفراز AST (شکل‌های A-۳ و B-۳). تنها آنزیمی که به‌صورت وابسته به دوز تحت تأثیر قرار گرفت، آلکالین فسفاتاز (ALP) بود، که تنها در بالاترین غلظت نانوپلاستیک به‌طور معناداری افزایش یافت. این مشاهدات با گزارشات قبلی که در آنها از غلظت‌های بالاتر نانوپلاستیک و زمان‌های در معرض قرارگیری کوتاه‌تری استفاده شده است، هم‌همخوانی دارد. به‌عنوان مثال، قرارگیری گورخرماهی در معرض نانوذرات پلی‌استایرن (۵۰۰ نانومتر) با غلظت ۱ mg/l به مدت ۴۸ ساعت، باعث افزایش قابل‌توجهی در سوپراکسید دیسموتاز (SOD) (به‌ترتیب $6/6 \pm 3/13$ U/mgprotein و $1/8/3 \pm 2/1$) و کاهش قابل‌توجهی در فعالیت سیکلوکسیژناز (به‌ترتیب $1/0 \pm 2/1$ U/mgprotein و $0/6 \pm 0/1$) گردید (Parenti et al., 2019). علاوه بر این، گزارش شده است که در ماهی‌های بالغ، مواجهه‌ی آبی با نانوپلاستیک (۱۰۰ نانومتر با غلظت ۱۰۰۰ µg/ml) در مدت ۱۴ روز باعث افزایش معنادار (حدود ۱/۳ برابر نسبت به گروه شاهد) در فعالیت آنزیم کاتالاز کبدی شد (Pei et al., 2022). از آنجا که مطالعه حاضر تغییرات را در کل بدن ماهیان اندازه‌گیری کرد، هنوز مشخص نیست که آیا این تغییرات در فعالیت آنزیم‌ها محدود به یک‌اندام خاص بوده یا خیر. به‌عنوان مثال، افزایش AST و ALT در پلاسما می‌تواند نشان‌دهنده آسیب به کبد باشد، اما از اندازه‌گیری‌های کل بدن نمی‌توان تشخیص داد که آیا این آنزیم‌ها تنها در کبد وجود داشته‌اند یا خیر. در کپور (*Cyprinus carpio*)، قرارگیری در معرض انگل‌های *Dactylogyrus spp.* و *Gyrodactylus spp.* باعث افزایش غلظت‌های سرمی این آنزیم‌ها می‌شود (Pei et al., 2022; Rastiannasab et al., 2016)، و این احتمال وجود دارد که قرارگیری در معرض نانوپلاستیک‌ها نیز ممکن است مسیری مشابه را فعال کرده باشد.

مواجهه ارگانسیم‌ها با نانوذرات اکسید روی به صورت انفرادی، باعث التهاب حاد یا مزمن، آسیب به ماکرومولکول‌ها (پروتئین‌ها، لیپیدها، DNA) و آپوپتوز از طریق تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌شود و LC50 حدود ۶۰ mg/l گزارش شده است (Takesono et al., 2023). یافته‌های مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که، حتی مواجهه‌ی طولانی‌مدت نیز می‌تواند متابولیسم طبیعی گورخرماهی بالغ را مختل کند. مواجهه‌ی انفرادی با نانوذرات اکسید روی منجر به افزایش معنادار در برخی شاخص‌ها مانند

شدت اثرات در تیم‌های ترکیبی، نسبت به مواجهه‌های منفرد، بیانگر وجود تعاملات هم‌افزایانه (سینرژیک) بین این دو آلاینده است. افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شرایط مواجهه ترکیبی، گواه روشنی بر تشدید استرس اکسیداتیو است. همچنین، افت معنی‌دار شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی بیانگر تضعیف سیستم ایمنی تحت تأثیر تعامل آلاینده‌هاست. این یافته‌ها لزوم درک عمیق‌تر از اثرات تعاملی آلاینده‌های نوظهور و توجه به آن‌ها در پایش و مدیریت اکوسیستم‌های آبی را برجسته می‌سازند

مشارکت نویسندگان

در این پژوهش، انجام آزمایش‌های زیستی و جمع‌آوری داده‌ها به عهده نویسنده دوم (جمال رحیمی) بود. نویسنده سوم (قاسم رشیدیان) در تحلیل آماری داده‌ها و طراحی آزمایشات مربوط به شاخص‌های زیستی مشارکت داشت. طراحی مطالعه و فرضیه‌سازی، بررسی شاخص‌ها و تحلیل نتایج و نگارش مقاله توسط نویسنده اول (مریم آخوندیان) انجام شد که نظارت بر انطباق مقاله با فرمت مجله، ویراستاری و هماهنگی محتوایی مقاله را نیز بر عهده داشته است.

تعارض منافع

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه مازندران در سال ۱۴۰۳ با کد ۳۳/۱۲۸۴۹ است که با استفاده از اعتبار پژوهشی دانشگاه مازندران اجرا شده است. نویسنده اول مجری طرح تحقیقاتی و نویسنده مسئول مقاله است. «هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.»

منابع

- [1] Alsop, D., Wood, C.M., (2011). Metal uptake and acute toxicity in zebrafish: common mechanisms across multiple metals. *Aquatic Toxicol.*, 105(3-4): 385–393 (9 pages). <https://www.zoology.ubc.ca/~woodcm/Woodblog/wp-content/uploads/2016/07/Alsop-Wood.2011.Aquat-Tox.pdf>
- [2] Andrady, A.L., (2015). Persistence of plastic litter in the oceans. *Marine Anthropogenic Litter*, 57–72 (16 pages). <https://library.oapen.org/bitstream/handle/20.500.12657/28030/1001966.pdf#page=72>
- [3] Bartoskova, M., Dobsikova, R., Stancova, V., Zivna, D., Blahova, J., Marsalek, P., et al., (2013). Evaluation of ibuprofen toxicity for zebrafish (*Danio rerio*) targeting on selected biomarkers of oxidative stress. *Neuro Endocrinol Lett.*, 34(2): 102–108 (7 pages). <https://www.academia.edu/download/32720269/ibuprofen2013.pdf>
- [4] Blahová, J., Plhalová, L., Hostovský, M., Divišová, L., Dobšíková, R., Mikulíková, I., et al., (2013). Oxidative stress

استفاده شده بود که اثرات هم‌افزایی در آن مشاهده شد، در حالی که در مطالعه حاضر و مطالعات مشابه از نانوپلاستیک‌ها استفاده شده است. میکروپلاستیک‌ها نشان داده‌اند که با اکسیدروی در محیط‌های مختلف از جمله بسترهای آب و رسوبات واکنش نشان می‌دهند (Gomez-Gonzalez et al., 2023)، که این موضوع حاکی از آن است که توانایی بسیاری از ذرات اکسید روی برای اتصال به میکروپلاستیک‌های بزرگ‌تر برای ایجاد اثرات سمی بسیار مهم است. بنابراین، دینامیک جذب و تعاملات این ذرات در محیط و بافت‌ها نیاز به بررسی بیشتر دارد. در مورد میکروپلاستیک‌ها، تعاملات با آلاینده‌های موجود در ستون آب می‌تواند مسیر مواجهه را تغییر دهد. برای مثال، حضور میکروپلاستیک‌ها باعث تغییر مسیر مواجهه با فلزات حل‌شده (مثل نقره) می‌گردد که از طریق بلع به روده وارد می‌شوند (Khan et al., 2015). اگر چنین چیزی برای نانوپلاستیک‌ها نیز اتفاق بیفتد، روده ممکن است این ذرات را به سیستم گردش خون منتقل کند، به‌طوری که حدود ۷۰۰،۰۰۰ نانوذره پلاستیکی در مدت ۴ ساعت وارد بدن می‌شود (Clark et al., 2022). پس از ورود به سیستم گردش خون، این ذرات در سراسر بدن (Clark et al., 2023) از جمله در مغز (Guimarães et al., 2021; Vagner et al., 2022) گردش می‌کنند.

این پژوهش یکی از نخستین مطالعاتی است که به‌صورت جامع، اثرات مواجهه‌ی بلندمدت با نانوذرات پلی‌استایرن و نانوذرات اکسید روی را، هم به‌صورت انفرادی و هم به‌صورت ترکیبی، بر سامانه‌های فیزیولوژیکی مختلف در ماهی‌ها مورد بررسی قرار داده است. نتایج حاصل نشان می‌دهد که هر یک از این نانوذرات به‌تنهایی توانایی ایجاد اختلال در عملکردهای زیستی و فیزیولوژیکی موجودات آبی را دارند. با این حال، در مواجهه‌ی ترکیبی، تأثیرات مشاهده‌شده عمدتاً از نوع اثرات افزایشی ساده (Additive) یا تداخل عملکردی (Hindrance) بوده‌اند و شواهد اندکی از بروز اثرات هم‌افزایی (Synergistic) یا بازدارندگی متقابل (Antagonistic) به‌دست آمد.

این یافته‌ها نشان می‌دهند که رفتار ترکیبی آلاینده‌ها در محیط‌های آبی ممکن است با رفتار آن‌ها در مواجهه‌ی انفرادی تفاوت قابل توجهی داشته باشد. بنابراین، درک دقیق‌تر از الگوهای تعامل میان نانوذرات و شناسایی سازوکارهای فیزیولوژیکی مرتبط با این تعاملات، نیازمند انجام تحقیقات بیشتری در شرایط نزدیک به واقعیت‌های زیست‌محیطی است. رفع محدودیت‌های این مطالعه در پژوهش‌های آتی، نقش مهمی در بهبود ارزیابی ریسک‌های زیست‌محیطی مرتبط با نانوالودگی در اکوسیستم‌های آبی ایفا خواهد کرد.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که مواجهه گورخرماهی با نانوپلاستیک‌های پلی‌استایرن و نانوذرات اکسید روی، به‌ویژه به‌صورت ترکیبی، موجب بروز اثرات زیان‌بار قابل توجهی در شاخص‌های استرس اکسیداتیو، عملکرد ایمنی و وضعیت بیوشیمیایی می‌شود.

and qualitative identification, characterization, and analysis of microplastics and nanoplastics in water. In: Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. Elsevier, pp. 99–123 (25 pages).

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323999083000208>

[14] Estrela, F.N., Guimarães, A.T.B., Silva, F.G., da Luz, T.M., Silva, A.M., Pereira, P.S., et al., (2021). Effects of polystyrene nanoplastics on *Ctenopharyngodon idella* (grass carp) after individual and combined exposure with zinc oxide nanoparticles. J. Hazard. Mater., 403: 123879 (14 page).

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389420318689>

[15] Gomez-Gonzalez, M.A., Da Silva-Ferreira, T., Clark, N., Clough, R., Quinn, P.D., Parker, J.E., (2023). Toward understanding the environmental risks of combined microplastics/nanomaterials exposures: Unveiling ZnO transformations after adsorption onto polystyrene microplastics in environmental solutions. Glob. Chall., 7(8): 2300036 (12 page).

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/gch2.202300036>

[16] Gottschalk, F., Lassen, C., Kjoelholt, J., Christensen, F., Nowack, B., (2015). Modeling flows and concentrations of nine engineered nanomaterials in the Danish environment. Int. J. Environ. Res. Public Health, 12(5): 5581–5602 (22 pages).

<https://www.mdpi.com/1660-4601/12/5/5581>

[17] Hong, H., Adam, V., Nowack, B., (2021). Form-specific and probabilistic environmental risk assessment of 3 engineered nanomaterials (nano-Ag, nano-TiO₂, and Nano-ZnO) in European freshwaters. Environ. Toxicol. Chem., 40(9): 2629–2639 (11 pages).

<https://academic.oup.com/etc/article-abstract/40/9/2629/7734406>

[18] Hou, J., Wu, Y., Li, X., Wei, B., Li, S., Wang, X., (2018). Toxic effects of different types of zinc oxide nanoparticles on algae, plants, invertebrates, vertebrates and microorganisms. Chemosphere, 193: 852–860 (9 pages).

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653517318544>

[19] Hua, J., Vijver, M.G., Richardson, M.K., Ahmad, F., Peijnenburg, W.J., (2014). Particle-specific toxic effects of differently shaped zinc oxide nanoparticles to zebrafish embryos (*Danio rerio*). Environ. Toxicol. Chem., 33(12): 2859–2868 (10 pages).

<https://academic.oup.com/etc/article-abstract/33/12/2859/7761430>

[20] Jacob, H., Besson, M., Swarzenski, P.W., Lecchini, D., Metian, M., (2020). Effects of virgin micro-and nanoplastics on fish: trends, meta-analysis, and perspectives. Environ. Sci. Technol., 54(8): 4733–4745 (13 pages).

<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.est.9b05995>

[21] Khan, F.R., Syberg, K., Shashoua, Y., Bury, N.R., (2015). Influence of polyethylene microplastic beads on the uptake and localization of silver in zebrafish (*Danio rerio*). Environ. Pollut., 206: 73–79 (7 pages).

responses in zebrafish *Danio rerio* after subchronic exposure to atrazine. Food Chem. Toxicol., 61: 82–85 (4 pages).

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691513001506>

[5] Brandts, I., Cánovas, M., Tvarijonaviciute, A., Llorca, M., Vega, A., Farré, M., et al., (2022). Nanoplastics are bioaccumulated in fish liver and muscle and cause DNA damage after a chronic exposure. Environ. Res., 212: 113433 (8 page).

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013935122007605>

[6] Cai, H., Xu, E.G., Du, F., Li, R., Liu, J., Shi, H., (2021). Analysis of environmental nanoplastics: Progress and challenges. Chem. Eng. J., 410: 128208 (12 page).

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1385894720343242>

[7] Chang, M., Li, M., Xu, W., Li, X., Liu, J., Stoks, R., et al., (2023). Microplastics increases the heat tolerance of *Daphnia magna* under global warming via hormetic effects. Ecotoxicol. Environ. Saf., 249: 114416 (11 page).

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651322012568>

[8] Clark, N.J., Khan, F.R., Crowther, C., Mitrano, D.M., Thompson, R.C., (2023). Uptake, distribution and elimination of palladium-doped polystyrene nanoplastics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following dietary exposure. Sci. Total Environ., 854: 158765 (16 page).

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969722058648>

[9] Clark, N.J., Khan, F.R., Mitrano, D.M., Boyle, D., Thompson, R.C., (2022). Demonstrating the translocation of nanoplastics across the fish intestine using palladium-doped polystyrene in a salmon gut-sac. Environ. Int., 159: 106994 (9 page).

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016041202100619X>

[10] Dai, H., Sun, T., Han, T., Guo, Z., Wang, X., Chen, Y., (2020). Aggregation behavior of zinc oxide nanoparticles and their biotoxicity to *Daphnia magna*: Influence of humic acid and sodium alginate. Environ. Res., 191: 110086 (14 page).

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001393512030983X>

[11] Deepa, S., Murugananthkumar, R., Raj Gupta, Y., Gowda, K.S.M., Senthilkumaran, B., (2019). Effects of zinc oxide nanoparticles and zinc sulfate on the testis of common carp, *Cyprinus carpio*. Nanotoxicology, 13(2): 240–257 (18 pages).

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/17435390.2018.1541259>

[12] Dekani, L., Johari, S.A., Joo, H.S., (2019). Comparative toxicity of organic, inorganic and nanoparticulate zinc following dietary exposure to common carp (*Cyprinus carpio*). Sci. Total Environ., 656: 1191–1198 (8 pages).

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969718348290>

[13] Estahbanati, M.K., Rostami, S., Ghasemian, M., Kiendrebeogo, M., Drogui, P., Tyagi, R., (2023). Quantitative

short-term exposure and the related biochemical and behavioural effects. *Environ. Pollut.*, 254: 112947 (11 page).

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749119315945>

[32] Rashidian, G., Mahboub, H.H., Hoseinifar, S.H., Ghafarifarsani, H., Zare, M., Punyatong, M., et al., (2022). Allium hirtifolium protects *Cyprinus carpio* against the detrimental responses mediated by foodborne zinc oxide nanoparticle. *Aquaculture*, 555: 738252 (8 page).

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848622003684>

[33] Rastiannasab, A., Afsharmanesh, S., Rahimi, R., Sharifian, I., (2016). Alterations in the liver enzymatic activity of Common carp, *Cyprinus carpio* in response to parasites, *Dactylogyrus* spp. and *Gyrodactylus* spp. *J. Parasitol. Dis.*, 40: 1146–1149 (4 pages).

<https://link.springer.com/article/10.1007/s12639-014-0638-9>

[34] Shibuya, K., Nagao, D., Ishii, H., Konno, M., (2014). Advanced soap-free emulsion polymerization for highly pure, micron-sized, monodisperse polymer particles. *Polymer*, 55(2): 535–539 (5 pages).

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032386113011397>

[35] Tahami, S.V., Pourmahdian, S., Hadavand, B.S., Azizi, Z., Tehranchi, M., (2016). Thermal tuning the reversible optical band gap of self-assembled polystyrene photonic crystals. *Photonics Nanostruct. Fundam. Appl.*, 22: 40–45 (6 pages).

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1569441016300670>

[36] Takesono, A., Dimitriadou, S., Clark, N.J., Handy, R.D., Mourabit, S., Winter, M.J., et al., (2023). Zinc oxide nanoparticles disrupt development and function of the olfactory sensory system impairing olfaction-mediated behaviour in zebrafish. *Environ. Int.*, 180: 108227 (13 page).

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412023005007>

[37] Vagner, M., Boudry, G., Courcot, L., Vincent, D., Dehaut, A., Duflos, G., et al., (2022). Experimental evidence that polystyrene nanoplastics cross the intestinal barrier of European seabass. *Environ. Int.*, 166: 107340 (9 page).

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412022002677>

[38] Vicario-Parés, U., Castañaga, L., Lacave, J.M., Oron, M., Reip, P., Berhanu, D., et al., (2014). Comparative toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, ZnO and TiO₂) to developing zebrafish embryos. *J. Nanopart. Res.*, 16: 1–16 (16 pages).

<https://link.springer.com/article/10.1007/s11051-014-2550-8>

[39] Wang, H., Shi, X., Gao, Y., Zhang, X., Zhao, H., Wang, L., et al., (2022). Polystyrene nanoplastics induce profound metabolic shift in human cells as revealed by integrated proteomic and metabolomic analysis. *Environ. Int.*, 166: 107349 (11 page).

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412022002768>

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749115003024>

[22] Khan, G.B., Akhtar, N., Khan, M.F., Ullah, Z., Tabassum, S., Tedesse, Z., (2022). Toxicological impact of zinc nano particles on tilapia fish (*Oreochromis mossambicus*). *Saudi J. Biol. Sci.*, 29(2): 1221–1226 (6 pages).

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X21008457>

[23] Kögel, T., Bjørøy, Ø., Toto, B., Bienfait, A.M., Sanden, M., (2020). Micro-and nanoplastic toxicity on aquatic life: Determining factors. *Sci. Total Environ.*, 709: 136050 (9 page).

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969719360462>

[24] Lai, R.W.S., Zhou, G.-J., Kang, H.-M., Jeong, C.-B., Djurišić, A.B., Lee, J.-S., et al., (2022). Contrasting toxicity of polystyrene nanoplastics to the rotifer *Brachionus koreanus* in the presence of zinc oxide nanoparticles and zinc ions. *Aquat. Toxicol.*, 253: 106332 (11 page).

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016645X22002582>

[25] Lu, Y., Zhang, Y., Deng, Y., Jiang, W., Zhao, Y., Geng, J., et al., (2016). Uptake and accumulation of polystyrene microplastics in zebrafish (*Danio rerio*) and toxic effects in liver. *Environ. Sci. Technol.*, 50(7): 4054–4060 (7 pages).

<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.est.6b00183>

[26] Mandal, A.H., Ghosh, S., Adhurya, D., Chatterjee, P., Samajdar, I., Mukherjee, D., et al., (2024). Exploring the impact of zinc oxide nanoparticles on fish and fish-food organisms: A review. *Aquac. Rep.*, 36: 102038 (8 page).

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352513424001261>

[27] Materić, D., Peacock, M., Dean, J., Futter, M., Maximov, T., Moldan, F., et al., (2022). Presence of nanoplastics in rural and remote surface waters. *Environ. Res. Lett.*, 17(5): 054036 (10 page).

<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1748-9326/ac68f7/meta>

[28] Mawed, S.A., Marini, C., Alagawany, M., Farag, M.R., Reda, R.M., El-Saadony, M.T., et al., (2022). Zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) suppress fertility by activating autophagy, apoptosis, and oxidative stress in the developing oocytes of female zebrafish. *Antioxidants*, 11(8): 1567 (13 page).

<https://www.mdpi.com/2076-3921/11/8/1567>

[29] OECD, (2022). Global plastic Outlook: Policy Scenario to 2060.

<https://www.science.org/doi/abs/10.1126/sciadv.adu2396>

[30] Pei, X., Heng, X., Chu, W., (2022). Polystyrene nano/microplastics induce microbiota dysbiosis, oxidative damage, and innate immune disruption in zebrafish. *Microb. Pathog.*, 163: 105387 (6 page).

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401021006616>

[31] Parenti, C.C., Ghilardi, A., Della Torre, C., Magni, S., Del Giacco, L., Binelli, A., (2019). Evaluation of the infiltration of polystyrene nanobeads in zebrafish embryo tissues after

[41] Zheng, J.-L., Chen, X., Peng, L.-B., Wang, D., Zhu, Q.-L., Li, J., et al., (2022). Particles rather than released Zn²⁺ from ZnO nanoparticles aggravate microplastics toxicity in early stages of exposed zebrafish and their unexposed offspring. J. Hazard. Mater., 424: 127589 (9 page).

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389421025577>

[40] Wang, J., Li, Y., Lu, L., Zheng, M., Zhang, X., Tian, H., et al., (2019). Polystyrene microplastics cause tissue damages, sex-specific reproductive disruption and transgenerational effects in marine medaka (*Oryzias melastigma*). Environ. Pollut., 254: 113024 (12 page).

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749119311261>

در فایل بدون نام، این بخش حذف شود

AUTHOR(S) BIOSKETCHES

Akhoundian, M., Assistant Professor of Marine Biology, University of Mazandaran, Babolsar, Iran.

✉ m.akhoundian@umz.ac.ir

 0000-0002-9109-1141

Rahimi, J., Ph.D., University of Tehran, Karaj, Iran.

✉ Jamalrahimi@ut.ac.ir



Rashidian, Gh., Postdoctoral Researcher, University of South Bohemia in České Budějovice, České Budějovice, Czech Republic

✉ grashidian@frov.jcu.cz

 0000-0003-0534-9773

این قسمت توسط نشریه تکمیل می گردد:



HOW TO CITE THIS ARTICLE

 <http://doi.org/10.52547/joc.16.62.6>

 <http://joc.inio.ac.ir/article-1-1861-fa.html>

 <https://orcid.org/0000-0002-9109-1141>

COPYRIGHTS

©2021 The author(s). This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY 4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, as long as the original authors and source are cited. No permission is required from the authors or the publishers.

