

Original Article



Combined and individual effects of silver and zinc oxide Nanoparticles on the expression of antioxidant genes in zebrafish (*Danio rerio*)

Maryam Mahjoubian¹ , Akram Sadat Naeemi^{1*} , Zeinab Moradi-Shoeili², Borhan Mansouri³ 

1. Department of Biology Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.
2. Department of Chemistry Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.
3. Substance Abuse Prevention Research Center, Health Institute, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.

Abstract

Article history:

Received: 1 August 2023
Revised: 4 December 2023
Accepted: 5 December 2023
ePublished: 21 April 2025

*Corresponding author: Akram Sadat Naeemi, Department of Biology Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran

E-mail: a_naeemi@guilan.ac.ir

The increase in the use of nanoparticles has caused concerns about the dangers of releasing them into the aquatic environment. When nanoparticles are discharged into environmental ecosystems, aquatic organisms may be exposed to a complex mixture of nanoparticles that can change their toxicity level for organisms. In this study combined and individual effects of non-lethal concentrations of silver nanoparticles (Ag NPs) and zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) on zebrafish was investigated. For this purpose, 180 zebrafish with an average weight of 0.07 ± 0.3 g (10 fish per treatment) were purchased in the spring 2021 from a decorative fish hatchery center, and for 56 days (28 days of exposure period and 28 days of depuration period) were exposed to a non-lethal concentration of ZnO NPs (10 mg L^{-1}), two non-lethal concentrations of Ag NPs separately (0.02 and 0.04 mg L^{-1}), two concentrations of co-exposure of the nanoparticles (10 mg L^{-1} of ZnO NPs + 0.02 or 0.04 mg L^{-1} of Ag NPs) and the control treatment were placed in three replications. After the end of different sampling times, the expression levels of antioxidant genes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) were measured in fish liver. The results of this study showed that nanoparticles increased the expression of antioxidant genes (SOD, CAT and GPx) in most treatments on days 7 and 14 of exposure (the highest increase in the expression of SOD and CAT genes was about 3 times and GPx was about 3.5 times and was observed in the high concentration of co-exposure NPs treatment); while the level of gene expression decreased on day 28 of exposure in most treatments. The most changes in gene expression levels were observed in the combined treatments compared to other treatments. After the depuration periods, in most of the treatments there was some recovery, but the amount of cleaning was higher in single treatments with low concentration. The results confirmed that the severity of damage, the duration of cleaning and the presence of zinc oxide nanoparticles were effective in improving complications.

Keywords: Catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, simultaneous effects, nanotoxicology

Please cite this article as follows: Mahjoubian M, Naeemi A; Moradi-Shoeili Z; Mansouri B. Combined and individual effects of silver and zinc oxide Nanoparticles on the expression of antioxidant genes in zebrafish (*Danio rerio*). J Marin Bio, 2025; 17(1): 1-13. DOI:



اثرات توأم و منفرد نانو ذرات نقره و اکسید روی بر بیان ژن های آنتی اکسیدانی در ماهی گورخری (*Danio rerio*)

مریم محجوبیان^۱، اکرم سادات نعیمی^{۱*}، زینب مرادی شوئیلی^۲، برهان منصوری^۳

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۲. گروه شیمی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۳. مرکز تحقیقات پیشگیری سوء مصرف مواد، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

چکیده

افزایش استفاده از نانو ذرات نگرانی‌هایی در خصوص خطرات رهايش آن‌ها به محیط آبی به وجود آورده است. زمانی که نانو ذرات در اکوسیستم‌های محیطی تخلیه شوند، موجودات آبی ممکن است در معرض مخلوط پیچیده‌ای از نانو ذرات قرار گیرند که می‌تواند میزان سمیت آن‌ها را برای موجودات تغییر دهد. در این مطالعه اثرات توأم و منفرد غلظت‌های غیر کشنده نانو ذرات نقره و اکسید روی بر ماهیان گورخری بررسی شد. برای این منظور ۱۸۰ ماهی گورخری با میانگین وزنی 0.07 ± 0.03 گرم (۱۰ ماهی در هر تیمار) در بهار سال ۱۴۰۰ از کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان زینتی در رشت خریداری گردید و به مدت ۵۶ روز (۲۸ روز دوره مواجهه و ۲۸ روز دوره پاک‌سازی) در معرض یک غلظت غیر کشنده نانو ذرات اکسید روی (۱۰ میلی گرم بر لیتر)، دو غلظت غیر کشنده از نانو ذرات نقره (۰/۰۲ و ۰/۰۴ میلی گرم بر لیتر)، دو غلظت توأم از دو نانو ذرات (۱۰ میلی گرم بر لیتر نانو ذرات اکسید روی + ۰/۰۲ و یا ۰/۰۴ میلی گرم بر لیتر نانو ذرات نقره) و تیمار شاهد در سه تکرار قرار گرفتند. پس از پایان زمان‌های مختلف نمونه‌برداری، میزان بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و گلوکاتایون پراکسیداز (GPx) در کبد ماهی اندازه‌گیری شد. نتایج این مطالعه نشان داد که نانو ذرات منجر به افزایش بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی (SOD، CAT و GPx) در بیشتر تیمارها در روزهای ۷ و ۱۴ مواجهه شدند (بیشترین میزان افزایش بیان ژن‌های SOD و CAT حدود ۳ برابر و GPx حدود ۳/۵ برابر و در غلظت بالای تیمار توأم نانو ذرات مشاهده گردید)؛ درحالی که میزان بیان ژن‌ها در روز ۲۸ مواجهه در اکثر تیمارها کاهش یافت. بیشترین تغییرات در میزان بیان ژن‌ها در تیمارهای توأم نسبت به سایر تیمارها مشاهده شد. پس از طی دوره پاک‌سازی، در اکثر تیمارها تا حدودی بازسازی صورت گرفت اما میزان پاک‌سازی در تیمارهای منفرد و با غلظت کم بیشتر بود. نتایج مؤید آن بود که شدت آسیب، مدت‌زمان پاک‌سازی و حضور نانو ذرات اکسید روی در بهبود عوارض مؤثر بود.

واژگان کلیدی: کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز، گلوکاتایون پراکسیداز، اثرات هم‌زمان، نانو سم‌شناسی.

تاریخچه مقاله

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۵/۱۰

تاریخ ویرایش مقاله: ۱۴۰۲/۹/۱۴

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۹/۱۵

تاریخ انتشار مقاله: ۱۴۰۴/۲/۱

تمامی حقوق برای دانشگاه آزاد اهواز محفوظ است.

* نویسنده مسئول: اکرم سادات نعیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

ایمیل: a_naeemi@guilan.ac.ir

استناد: محجوبیان، مریم؛ نعیمی، اکرم سادات؛ مرادی شوئیلی، زینب؛ منصوری، برهان. اثرات توأم و منفرد نانو ذرات نقره و اکسید روی بر بیان ژن های آنتی اکسیدانی در ماهی گورخری (*Danio rerio*). مجله زیست‌شناسی دریا، بهار ۱۴۰۴؛ ۱۷(۱): ۱-۱۳

مقدمه

امروزه افزایش کاربردهای نانوتکنولوژی منجر به تولید مقادیر بالایی از نانو ذرات شده است. در نتیجه، نانو ذرات و محصولات جانبی آن‌ها به‌طور مستقیم و غیرمستقیم در اکوسیستم‌های آب شیرین و دریایی آزاد می‌شوند. در میان انواع مختلف نانو ذرات، نانو ذرات نقره و نانو ذرات اکسید روی به دلیل کاربردهای بسیار گسترده، توجه زیادی را به خود جلب نموده‌اند (Lopes et al., 2016). نانو ذرات نقره به دلیل داشتن ویژگی ضد عفونی‌کنندگی قوی، مهم‌ترین نانو مواد تجاری‌سازی شده هستند، زیرا در حال حاضر در ۲۳/۵۲ درصد از نانو محصولات فهرست شده در فهرست موجودی محصولات مصرفی قرار دارد (WoodrowWilsonDatabase, 2015). نانو ذرات نقره معمولاً در تخت‌های بیمارستانی به‌عنوان پوشش، ایمپلنت‌های قلبی و عروقی، پانسمان زخم، ایمپلنت‌های ارتوپدی، کاتترها، محصولات ضد عفونی‌کننده، خمیر دندان، لوازم الکترونیکی، پارچه، رنگ، فیلترهای آب و... استفاده می‌شود (Abdi et al., 2019). غلظت نانو ذرات نقره در آب‌های سطحی هنوز مشخص نشده است، اما در برخی از مدل‌ها غلظت نانو ذرات نقره، ۰/۰۹ تا ۲/۶۳ نانوگرم بر لیتر و در برخی دیگر ۴۰ تا ۳۲۰ نانوگرم بر لیتر تخمین زده شده است (Blaser et al., 2008; 2009). نانو ذرات اکسید روی به‌طور گسترده در دستگاه‌های پنل خورشیدی، رنگ، شیشه، سیمان، لاستیک، محصولات مراقبت شخصی (ضد آفتاب)، محصولات دارویی و حتی در تصفیه فاضلاب استفاده می‌شود (Gottschalk et al., 2009). غلظت پیش‌بینی شده نانو ذرات اکسید روی در آب‌های سطحی طبیعی و فاضلاب تصفیه شده در اروپا ممکن است بین ۱۰ تا ۴۳۰ نانوگرم بر لیتر باشد و سطوح زیست‌محیطی این نانو ذره در آینده نزدیک افزایش بیشتری پیدا می‌کند (Gottschalk et al., 2009).

در یک ارگانیسم عدم تعادل سیستم آنتی‌اکسیدانی می‌تواند مرتبط با قرار گرفتن در معرض آلاینده‌هایی از قبیل نانو ذرات مرتبط باشد (Diniz et al., 2013). همان‌طور که در جانوران دیگر اتفاق می‌افتد، در ماهی‌ها از طریق آنزیم‌های مهارکننده گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، از جمله گلوکاتایون پراکسیداز (GPx)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) با سطوح بالایی از ROS مبارزه می‌کنند. اگر این آنزیم‌ها بر تولید اضافی ROS غلبه نکنند، آسیب سلولی برگشت‌ناپذیر و مرگ سلولی ممکن است به‌نوبه خود رخ دهد. تغییرات بیان ژن این گروه از آنزیم‌ها می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر زیستی حساس و نشان‌دهنده رویکرد تطبیقی ماهی به‌منظور مقابله با پیامدهای ناشی از استرس اکسیداتیو باشد. با این حال، این پاسخ‌ها در ماهیانی که در معرض نانو ذرات نقره و اکسید روی به‌صورت ترکیبی قرار گرفته‌اند مشخص نشده است. بافت کبد اندام اصلی سم‌زدایی در مواجهه با آلاینده‌ها در جانوران است با توجه به نقش اصلی این بافت در سم‌زدایی، بافت کبد به‌عنوان شاخص سلامت در بسیاری از مطالعات سم‌شناسی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Stehr et al., 2004).

ماهی گورخری (*Danio rerio*) یک ماهی آب شیرین متعلق به خانواده مینوها (Cyprinidae) از راسته Cypriniformes، جنس *Danio* و گونه‌های متعددی نظیر *reirio* می‌باشد (Whiteley et al., 2011). این ماهی به دلیل اندازه کوچک، سهولت نگهداری، رشد جنینی سریع، بدن شفاف، ویژگی‌های فیزیولوژیکی و مولکولی مشترک با انسان به‌طور گسترده در تحقیقات اکوتوکسیکولوژی برای ارزیابی سمیت مواد شیمیایی و نانو ذرات مورد استفاده قرار می‌گیرد (Hill et al., 2005; Westerfield, 2000).

مطالعات مختلف نشان داده است که مقادیر قابل توجهی از نانو ذرات نقره و نانو ذرات اکسید روی به‌طور عمدی یا سهوی در طول چرخه زندگی خود (ساخت، مصرف، حمل‌ونقل، ذخیره‌سازی، تولید، یا دفع) در اکوسیستم‌های آبی آزاد می‌شوند. در نتیجه، آبیان ممکن است به‌طور مداوم در معرض این مواد از جمله مخلوطی از آن‌ها قرار گیرند (Osmond and Mccall, 2010). تاکنون مطالعاتی درباره اثرات نانو ذرات اکسید روی یا نانو ذرات نقره به‌صورت منفرد بر بیان ژن‌های مختلف از جمله ژن‌های آنتی‌اکسیدانی صورت گرفته است. به‌عنوان مثال Johari و همکاران (۲۰۱۶) اثرات نانو ذرات نقره را در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مورد مطالعه قرار دادند و نشان دادند که نانو ذرات نقره منجر به افزایش بیان ژن‌های مختلف شد. همچنین Alkaladi و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که نانو ذرات اکسید روی منجر به مهار و کاهش فعالیت بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی در بافت‌های آب‌شش و کبد ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) شد. در مطالعه دیگری نشان دادند که نانو ذرات اکسید روی منجر به تغییرات بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی در ماهی تیلاپیا گردید (Saddick et al., 2017). به دلیل کاربردهای گسترده و اهمیت زیاد نانو ذرات نقره و نانو ذرات اکسید روی، مطالعات گسترده‌ای درباره اثرات منفرد هر یک از این نانو ذرات بر ماهیان و سایر آبیان صورت گرفته

است که اثرات سمی این آلاینده‌ها در محیط‌های آبی بررسی گردد. از آنجایی هردوی این نانو ذرات به‌صورت هم‌زمان در اکوسیستم‌های آبی حضور دارند و با توجه به برهمکنش بین آلاینده‌ها و همچنین احتمال تغییرات سمیت آن‌ها (به‌صورت کاهشی یا افزایشی) بررسی اثرات توأم آن‌ها بر آبزیان به‌ویژه از طریق شاخص‌های زیستی حساس مانند شاخص‌های مولکولی دارای اهمیت می‌باشد؛ اما تاکنون پژوهشی در مورد اثرات توأم و هم‌زمان این دو نانوذره بر میزان بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی در ماهی صورت نگرفته است. از این‌رو هدف از این تحقیق، بررسی اثرات نانو ذرات نقره و اکسید روی برای ارزیابی خطر و درک بهتر مکانیسم اثرات آن‌ها از طریق مطالعه اثرات منفرد و توأم این نانو ذرات بر روی میزان بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و گلوکاتایون پراکسیداز (GPx) در بافت کبد ماهی گورخری در مدت ۵۶ روز (۲۸ روز دوره مواجهه و ۲۸ روز پاک‌سازی) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

برای سنتز نانو ذرات نقره، ابتدا ۱۲۷/۵ میلی‌گرم نیترات نقره (AgNO_3) به ۵۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه به‌شدت هم زده شد. در مرحله بعد، ۶۰ میلی‌گرم سدیم بورهیدرید (NaBH_4) به‌طور جداگانه در ۵۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه حل شد. سپس محلول اول به‌صورت قطره‌قطره به محلول دوم اضافه گردید و به مدت ۳ ساعت روی همزن مغناطیسی هم زده شد. در نهایت رسوب حاصله چندین بار با اتانول و آب شسته و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در آون به مدت ۲۴ ساعت خشک گردید (Nidya et al., 2015).

مقدار ۰/۵ گرم روی استات دوآبه ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) در ۱۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه و ۴ گرم سود (NaOH) به‌طور جداگانه در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه حل و هم زده شد. پس‌ازاینکه محلول‌ها به‌خوبی مخلوط شدند، بورت با محلول سود پر شد و به‌صورت قطره‌قطره به محلول حاوی روی استات تحت هم زدن شدید تا رسیدن به pH مورد نیاز ۹ تیتیر شد. رسوب به‌دست‌آمده توسط کاغذ صافی واتمن جدا شد و چندین بار با آب و اتانول شسته شد. سپس به مدت ۲ ساعت در آون با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد خشک گردید (Hasnidawani et al., 2016).

ساختار کریستالی و خلوص نانو ذرات به‌وسیله اشعه ایکس (مدل دستگاه: X'Pert MPD، شرکت سازنده: فیلیپس) با زاویه ۱۰ تا ۸۰ درجه بررسی شد. جهت بررسی شکل، اندازه و مورفولوژی نانو ذرات از میکروسکوپ الکترونی روبشی (FE-SEM) (مدل دستگاه: MIRA3TESCAN، شرکت سازنده: Tescan چک) و مجهز به طیف‌سنجی پراش انرژی پرتوایکس (EDS) (FESEM)، مدل MIRA3TESCAN استفاده گردید. همچنین برای طیف‌گیری از نانو ذرات در محدوده ۲۰۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر از اسپکتروفتومتر (مدل دستگاه: Shimadzu1601، شرکت سازنده: توکیو ژاپن) استفاده شد. بررسی اندازه نانو ذرات در آب و تمایل ذرات درون مایع به اتصال به یکدیگر از آنالیز پراکندگی نور دینامیکی (DLS) و پتانسیل زتا استفاده گردید (Farag et al., 2023).

تعداد ۱۸۰ عدد ماهی گورخری (با میانگین طولی 3 ± 0.2 سانتی‌متر و میانگین وزنی 0.7 ± 0.3 گرم) در بهار سال ۱۴۰۰ از کارگاه خصوصی تکثیر و پرورش ماهیان زینتی در رشت خریداری شد و به مدت ۲ هفته قبل از شروع آزمایش با شرایط آزمایشگاهی سازگار شدند. ماهیان گورخری روزانه یک‌بار با غذای زنده آرتمیا تغذیه شدند و در دمای 25 ± 1 درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری شدند. میزان اکسیژن محلول در آب 6.3 ± 0.3 میلی‌گرم بر لیتر بود و pH آب 7.1 ± 0.3 تنظیم شد.

بر اساس آزمایش‌های اولیه و نتایج آزمایش سمیت حاد ($\text{LC}_{50-96\text{h}}$) در مطالعه قبلی، آزمایش سمیت مزمن (با غلظت‌های غیر کشنده از نانو ذرات) تنظیم و به مدت ۵۶ روز اجرا شد (Mahjoubian et al., 2023a). پس از یک دوره سازگاری (دو هفته)، ماهیان به‌طور تصادفی در ۶ گروه با پنج گروه تیمار (۱۰ ماهی در هر تیمار) نانو ذرات و یک شاهد (هرکدام با سه تکرار) قرار گرفتند. غلظت‌های دوره مزمن ماهیان شامل یک غلظت غیر کشنده (تقریباً برابر با ۱۰ درصد LC_{50}) نانو ذرات اکسید روی (۱۰ میلی‌گرم بر لیتر)، دو غلظت غیر کشنده (برابر با ۱۰ و ۲۰ درصد LC_{50}) نانو ذرات نقره (۰/۲ و ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر) به‌صورت تیمار منفرد و دو غلظت از تیمار توأم نانو ذرات (یک غلظت غیر کشنده نانو ذرات اکسید روی (۱۰ میلی‌گرم بر لیتر) + دو غلظت غیر کشنده نانو ذرات نقره (۰/۲ و ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر)) به همراه تیمار شاهد در سه تکرار بود (Mahjoubian).

(*et al.*, 2023a). آب ماهی‌ها در طول دوره آزمایش هر ۴۸ ساعت یک‌بار تعویض شد. نمونه‌برداری از ماهی‌ها در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۸ مواجهه و روزهای ۱۴ و ۲۸ پاک‌سازی انجام شد. بافت کبد ماهیان پس از بیهوشی با غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر MS-222 جدا شده و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

استخراج RNA از بافت کبد با استفاده از کیت شرکت سینا ژن طبق پروتکل این شرکت انجام شد. پس از انجام بررسی‌های کمی و کیفی RNA، ۲ میکروگرم از آن برای ساخت cDNA مورد استفاده قرار گرفت. برای ساخت cDNA از کیت فرمنتاز استفاده شد و تمام مراحل مطابق پروتکل این کیت انجام گردید (*Ibrahim et al.*, 2021). از Real time PCR برای سنجش میزان بیان ژن‌های SOD، CAT و GPx به عنوان ژن هدف استفاده گردید و بتا اکتین به عنوان ژن مرجع جهت کنترل داخلی استفاده شد و بیان نسبی برای هر تیمار و تکرار سنجش گردید (*Livak and Schmittgen*, 2001). توالی پرایمرهای ژن‌های مورد مطالعه در ماهی گورخری در جدول ۱ نشان داده شده است. برای این منظور، داده‌های خام به صورت Ct از دستگاه استخراج شد و اندازه‌گیری میزان بیان ژن با روش $\Delta\Delta Ct$ ، با استفاده از نرم‌افزار Rest انجام شد. آنالیز داده‌های Real time PCR بر اساس مقایسه چرخه آستانه انجام شد. در این مطالعه، اختلاف چرخه‌های آستانه به دست آمده از نمونه‌های مورد آزمایش (تیمار شده با نانو ذرات) و نمونه‌های کنترل (تیمار نشده با نانو ذرات) محاسبه و با استفاده از فرمول $\Delta\Delta Ct$ ، نسبت ژن هدف به ژن مرجع (β -actin) از طریق $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد؛ که فرمول محاسبه آن به شرح زیر بود:

$$\Delta Ct = Ct \text{ target} - Ct \text{ reference}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ test sample} - \Delta Ct \text{ control sample}$$

$$\text{Relative expression: } 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

جدول ۱: توالی پرایمرهای ژن‌های مورد مطالعه در ماهی گورخری (*Danio rerio*).

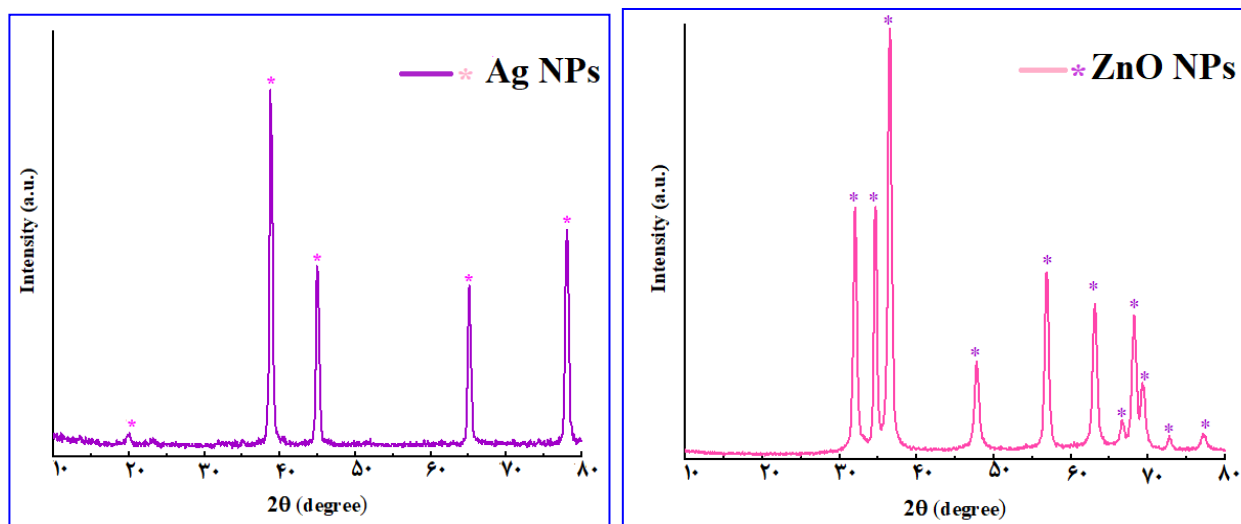
ژن	توالی پرایمر	شماره دستیابی	منابع
SOD	F: 5'-GTCGTCTGGCTTGTGGAGTG-3' R: 5'-TGTCAGCGGGCTAGTGCTT-3'	Y12236	Chai <i>et al.</i> , 2016
CAT	F: 5'-AGGGCAACTGGGATCTTACA-3' R: 5'-TTTATGGGACCAGACCTTGG-3'	AF170069	Chai <i>et al.</i> , 2016
GPx	F: 5'-AGATGTCATTCTGCACACG-3' R: 5'-AAGGAGAAGCTTCTCAGCC-3'	AW232474	Chai <i>et al.</i> , 2016
β -Actin	F: 5'-CCCCATTGAGCACGGTATT-3' R: 5'-AGCGGTTCCCATCTCCTG-3'	AF057040	Keller <i>et al.</i> , 2008

اختلاف بین داده‌ها و مقایسه میانگین نمونه‌ها در تیمارهای مختلف با آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way Anova) و با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۱ انجام شد. بدین منظور ابتدا آزمون نرمال بودن نمونه‌ها با روش متداول Kolomogrov-Smirnov (K-S) بررسی گردید. سپس آزمون آنالیز یک‌طرفه انجام شد و توسط پس‌آزمون Tukey معنی‌داری بین تیمارها برای پارامترهای گوناگون مورد بررسی قرار گرفت. نمودارها نیز توسط نرم‌افزار Excel ۲۰۱۰ رسم شدند.

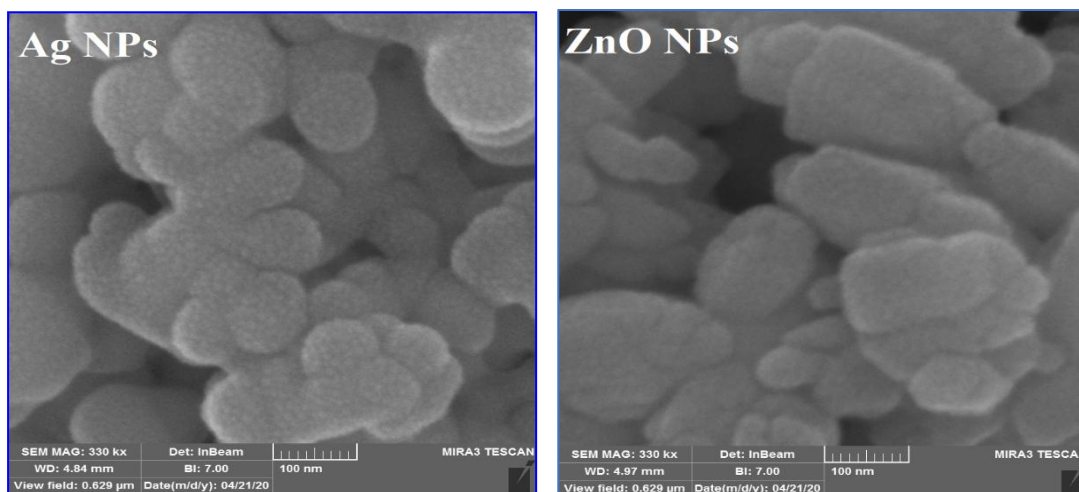
نتایج

نتایج طیف اشعه ایکس نانو ذرات نقره چهار پیک متمایز را در زوایای 38.7° ، 44.9° ، 65.0° و 77.9° نشان داد که مطابق با صفحات (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰) و (۳۱۱) نقره فلزی بود (شکل ۱). در طیف نانو ذرات اکسید روی، پیک‌های نشان داده شده در زوایای 31.9° ، 34.5° ، 36.5° ، 47.0° ، 56.8° و 63.0° به ترتیب مربوط به صفحات بلوری (۱۰۰)، (۰۰۲)، (۱۰۱)، (۱۰۲)، (۱۱۰)، (۱۰۲) و (۱۱۱) بود (شکل ۱). تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نانو ذرات نقره و اکسید روی را به ترتیب با میانگین اندازه حدود 74 ± 5 و 55 ± 5 نانومتر نشان داد (شکل ۲). نتایج آنالیز EDX حضور عناصر مورد نظر را تأیید کرد. در شکل ۳ حداکثر جذب نانو ذرات نقره در ۳ کیلوولت مشاهده شد. مقدار کمی اکسیژن به عنوان ناخالصی در

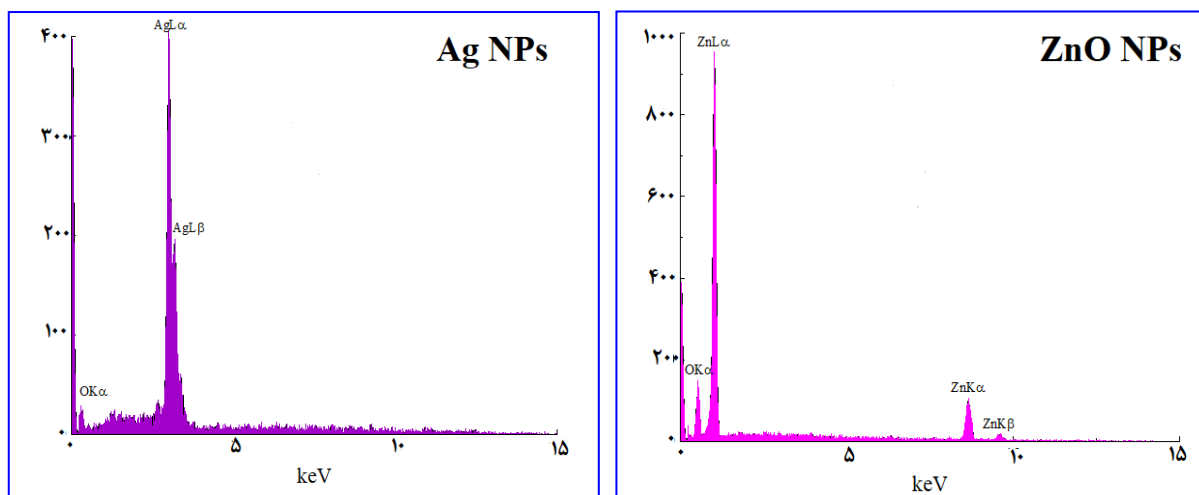
طیف دیده شد که می‌تواند مربوط به گروه‌های هیدروکسیل یا مولکول‌های آب جذب‌شده روی سطح باشد. همچنین پیک‌های نشان داده‌شده در شکل ۳ مربوط به عناصر روی و اکسیژن بود که تأیید کرد که نانو ذرات خالص بودند و اثری از ناخالصی عناصر دیگر در آن وجود نداشت. علاوه بر این پیک‌های جذبی طیف UV-vis نانو ذرات نقره و اکسید روی به ترتیب در ۴۳۴ و ۳۷۶ نانومتر مشاهده شد (شکل ۴). نتایج اندازه هیدرودینامیکی و پتانسیل زتای نانو ذرات نقره و اکسید روی و مخلوط ترکیبی این دو نانوذره به ترتیب ۱۶۸، ۳۱۸ و ۳۹۰ نانومتر و ۱۶/۸۲، ۱۷/۹۴ و ۲۹/۱۹ میلی ولت بود.



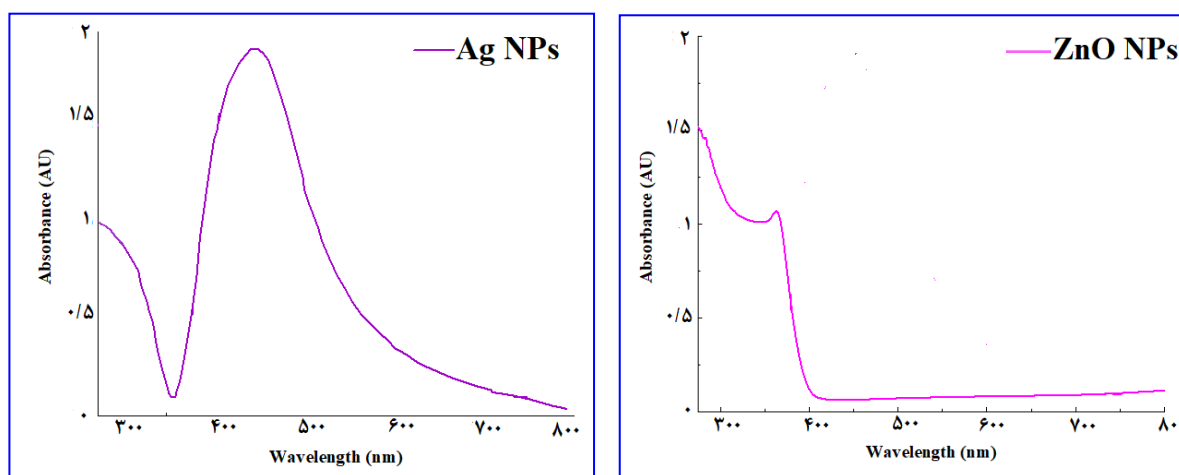
شکل ۱: آنالیز اشعه ایکس نانو ذرات نقره و اکسید روی (آزمایشگاه تابان، سال ۱۳۹۹).



شکل ۲: تصاویر FE-SEM نانو ذرات نقره و اکسید روی (آزمایشگاه تابان، سال ۱۳۹۹).



شکل ۳: آنالیز EDX نانو ذرات نقره و اکسید روی (آزمایشگاه تابان، سال ۱۳۹۹).

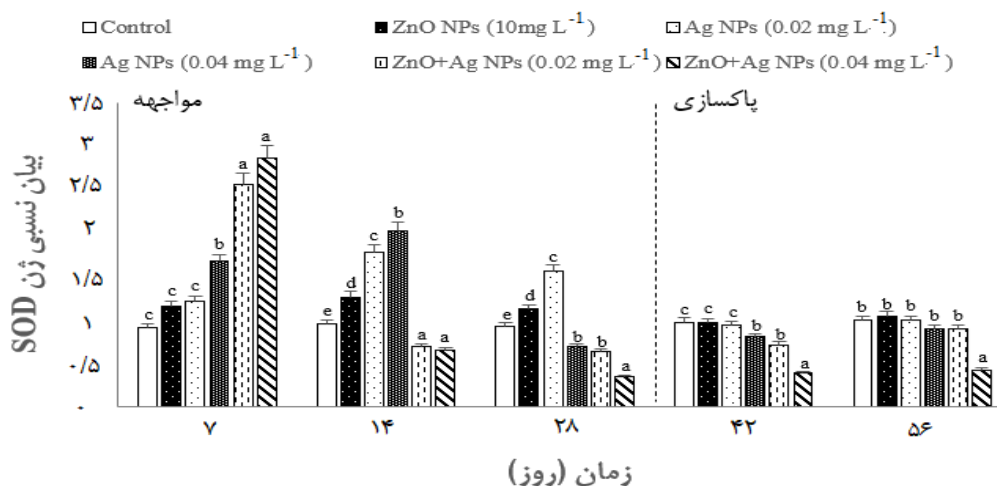


شکل ۴: طیف UV-vis نانو ذرات نقره و اکسید روی (دانشگاه آزاد رشت، سال ۱۳۹۹).

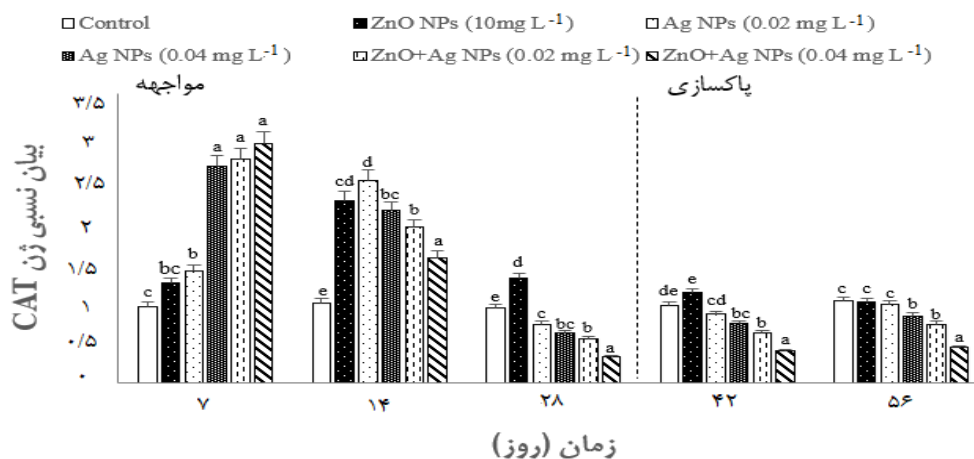
الگوی بیان ژن SOD در شکل ۵ نشان داده شده است. در روز ۷ مواجهه، افزایش معنی‌دار بیان ژن SOD در تیمارهای مواجهه توأم (افزایش ۳/۱ و ۲/۸ برابری به ترتیب در غلظت بالا و پایین تیمار توأم) و غلظت بالای نانو ذرات نقره منفرد (افزایش ۱/۸۳ برابری) در مقایسه با شاهد دیده شد ($P < 0.05$)، اما در روز ۱۴ مواجهه، افزایش قابل‌توجه در تیمارهای مواجهه منفرد و کاهش بیان ژن در تیمارهای توأم در مقایسه با شاهد مشاهده شد ($P < 0.05$). در روز ۲۸ مواجهه افزایش معنی‌دار ژن SOD در تیمارهای منفرد از نانو ذرات اکسید روی و غلظت کم نانو ذرات نقره در مقایسه با شاهد مشاهده شد ($P < 0.05$). درحالی‌که در تیمار منفرد غلظت بالای نانو ذرات نقره (کاهش ۱/۳۲ برابری) و تیمارهای توأم دو نانوذره (کاهش ۲/۷۰ و ۱/۴۶ برابری به ترتیب در غلظت بالا و پایین تیمار توأم) کاهش معنی‌داری در بیان ژن SOD نسبت به شاهد مشاهده گردید. در روز ۴۲ (روز ۱۴ پاک‌سازی)، بیان ژن نانو ذرات اکسید روی و غلظت کم تیمار نانو ذرات نقره منفرد به گروه شاهد نزدیک شد و بیان ژن SOD در این تیمارها با شاهد تفاوت معنی‌داری نشان ندادند. در روز ۵۶ (روز ۲۸ پاک‌سازی)، همه تیمارها (به‌جز غلظت بالای تیمار مواجهه توأم) در مقایسه با شاهد تفاوت معنی‌داری نداشتند.

بیان ژن CAT در شکل ۶ ارائه شده است. در روزهای ۷ و ۱۴ مواجهه افزایش معنی‌دار در ژن CAT در همه تیمارها (به جز تیمار نانو ذرات اکسید روی در روز ۷) در مقایسه با شاهد مشاهده شد (بیشترین افزایش (حدود ۳/۱ برابر) در روز ۷ و در غلظت بالای تیمار توأم مشاهده گردید) ($P < 0.05$)، اما در روز ۲۸ مواجهه، کاهش معنی‌دار در بیان ژن CAT در همه تیمارها (به استثنای تیمار نانو ذرات اکسید روی) در مقایسه با شاهد وجود داشت (کمترین کاهش (حدود ۲/۹۳ برابر) در غلظت بالای تیمار توأم مشاهده گردید). در طول دوره‌های پاک‌سازی (روزهای ۴۲ و ۵۶) همه تیمارها به شاهد نزدیک شدند و تیمار منفرد غلظت بالای نانو ذرات نقره در مقایسه با گروه شاهد همچنان کاهش معنی‌داری نشان دادند ($P < 0.05$).

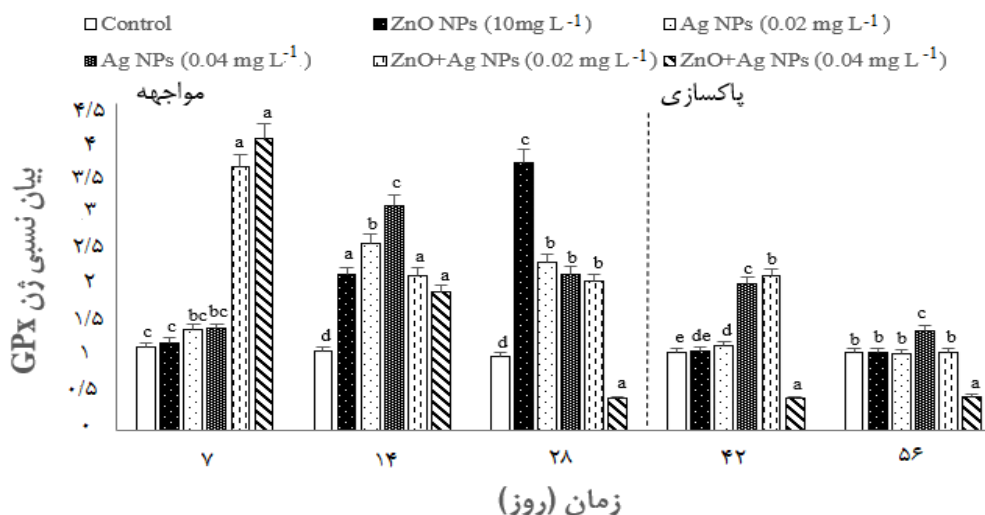
تغییرات در بیان ژن GPx در شکل ۷ نشان داده شده است. در روز ۷ مواجهه، افزایش معنی‌دار فقط در تیمارهای مواجهه توأم نانو ذرات در مقایسه با شاهد وجود داشت (به ترتیب در غلظت بالا و پایین تیمار توأم افزایش ۳/۵ و ۳/۱ برابری در بیان ژن GPx ملاحظه شد) ($P < 0.05$). در روزهای ۱۴ در تمام تیمارها افزایش معنی‌داری در بیان این ژن نسبت به شاهد ملاحظه شد و در روز ۲۸ مواجهه بیان ژن GPx در تمام تیمارها در مقایسه با شاهد (به استثنای غلظت بالای تیمار مواجهه توأم در روز ۲۸) به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0.05$). در روز ۴۲ (روز پاک‌سازی)، اگرچه همه تیمارها به بیان ژن شاهد نزدیک شدند، ولی اکثر تیمار با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری داشتند، اما در پایان دوره پاک‌سازی (روز ۵۶)، بیان ژن GPx در همه تیمارها به جز غلظت بالای تیمار توأم و منفرد نانو ذرات نقره نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری نشان ندادند ($P < 0.05$).



شکل ۵: بیان نسبی ژن SOD نسبت به β -Actin در کبد ماهی گورخری (*Danio rerio*) در مواجهه با نانو ذرات نقره و اکسید روی به صورت منفرد و توأم در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۸ (دوره مواجهه) و روزهای ۴۲ و ۵۶ (دوره پاک‌سازی) (دانشگاه گیلان، سال ۱۴۰۰).



شکل ۶: بیان نسبی ژن CAT نسبت به β -Actin در کبد ماهی گورخری (*Danio rerio*) در مواجهه با نانو ذرات نقره و اکسید روی به صورت منفرد و توأم در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۸ (دوره مواجهه) و روزهای ۴۲ و ۵۶ (دوره پاکسازی) (دانشگاه گیلان، سال ۱۴۰۰).



شکل ۷: بیان نسبی ژن GPx نسبت به β -Actin در کبد ماهی گورخری (*Danio rerio*) در مواجهه با نانو ذرات نقره و اکسید روی به صورت منفرد و توأم در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۸ (دوره مواجهه) و روزهای ۴۲ و ۵۶ (دوره پاکسازی) (دانشگاه گیلان، سال ۱۴۰۰).

بحث و نتیجه‌گیری

رفتار نانو ذرات در محیط‌های آبی به خواص شیمیایی و فیزیکی آن‌ها، از جمله پراکندگی، تحرک و اندازه بستگی دارد که به نوبه خود می‌تواند بر دسترسی زیستی نانو ذرات برای موجودات در معرض تأثیر بگذارد. در این مطالعه، اندازه هیدرودینامیکی نانو ذرات در محیط آبی بزرگتر از اندازه اولیه آن‌ها بود که نشان‌دهنده تجمع ذرات است، مشابه این حالت قبلاً در سایر مطالعات برای نانو ذرات فلزی گزارش شده است (Vale et al., 2016). افزون بر این، اندازه هیدرودینامیکی نانو ذرات نقره در حضور نانو ذرات اکسید روی در آب بیشتر افزایش یافت که ممکن است نتیجه جذب نانو ذرات نقره بر روی نانو ذرات اکسید روی باشد که قبلاً برای فلزات و برخی نانو ذرات فلزی دیده شده و به عنوان پدیده اسب تروا برای چگونگی انتقال برخی آلاینده‌ها به سلول‌ها توسط نانو ذرات توصیف شده است (Limbach et al., 2007; Baek et al., 2020).

پتانسیل زتا درجه دافعه یا جاذبه الکترواستاتیکی بین ذرات باردار مجاور را نشان می‌دهد و بهترین شاخص برای پایداری فیزیکی و پراکندگی نانو ذرات است. زمانی که مقادیر پتانسیل زتا منفی‌تر از -30 میلی ولت یا مثبت‌تر از $+30$ میلی ولت باشد، ذرات تمایل به پراکندگی دارند، زیرا نیروی دافعه الکتریکی که بر آن‌ها تأثیر می‌گذارد بزرگ‌تر از نیروی جاذب واندروالس مربوطه است (Instruments and Worcestershire, 2005). در این مطالعه، اندازه‌گیری‌های پتانسیل زتا مقادیر بار سطحی را بین -30 و $+30$ میلی ولت نشان داد که نشان می‌دهد نانو ذرات سنتز شده مستعد تجمع هستند. همان‌طور که توسط آنالیز DLS مشاهده گردید.

سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی یک سیستم دفاعی مهم در برابر تأثیر آلاینده‌های محیطی مانند نانو ذرات است. دخالت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (مانند SOD، CAT و GPx) می‌تواند از سلول‌ها در برابر آسیب اکسیدان‌ها محافظت کند (Cong et al., 2020). بسیاری از مطالعات تأیید کرده‌اند که سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌توانند به‌طور قابل‌توجهی تحت یک سطح معینی از استرس و در یک‌زمان معین القا شوند و با افزایش مدت‌زمان مواجهه و غلظت نانو ذرات، تمایل به کاهش نشان دهند (Hao and Chen, 2012). در مطالعه حاضر، فعالیت ژن‌های آنتی‌اکسیدانی روندی در حال تغییر را نشان دادند که در روزهای اول قرار گرفتن در معرض فعال شدند و با افزایش مدت‌زمان مواجهه و در غلظت‌های بالاتر مهار شدند.

SOD اولین آنزیم آنتی‌اکسیدانی است که در کاهش اکسیژن فعال نقش دارد و مسئول کاتالیز رادیکال‌های فعال سوپر اکسید (O_2^-) به O_2 و H_2O_2 است (Panda, 2012). CAT آنزیمی حاوی هماتین است که در پراکسی زوم‌ها قرار دارد و نقش مهمی در مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی سلولی ایفا می‌کند. CAT برای سم‌زدایی ضروری است و حذف پراکسید هیدروژن (H_2O_2) را که به اکسیژن مولکولی (O_2) و آب متابولیزه می‌شود، تسهیل می‌کند (Craig et al., 2007). مشابه CAT، GPx نقش مکمل در سم‌زدایی H_2O_2 دارد و با حذف H_2O_2 آسیب بافتی را کاهش می‌دهد. درواقع، CAT و GPx باهم به‌عنوان جاذب برای H_2O_2 (هر دو آنزیم) و دیگر هیدروپراکسیدها (GPx) عمل می‌کنند (Gate et al., 1999). این آنزیم‌ها همه مسئول سم‌زدایی از ROS و حفظ هموستازی طبیعی هستند. اگر سیستم آنتی‌اکسیدانی نتواند سطوح ایمن ROS را حفظ کند، استرس اکسیداتیو رخ می‌دهد و ممکن است آسیب سلولی ایجاد شود (Abo-Al-Ela and Faggio, 2021).

در این مطالعه، بیان ژن‌های SOD، CAT و GPx روند افزایشی را در اکثر تیمارها در روزهای ۷ و ۱۴ مواجهه و کاهش را در روز ۲۸ مواجهه نشان داد. افزایش بیان ژن در روزهای ۷ و ۱۴ مواجهه ممکن است به دلیل افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن باشد که منجر به افزایش بیان ژن‌های SOD، CAT و GPx تحت استرس نانو ذرات شدند. در حقیقت افزایش اولیه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی تلاشی برای جلوگیری از آسیب در موجودات زنده در پاسخ به نانو ذرات است (Souza et al., 2021) و کاهش بیان ژن در روز ۲۸ مواجهه می‌تواند به دلیل مقادیر بیش‌ازحد نانو ذرات باشد که باعث افزایش استرس و منجر به تخلیه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شدند. مکانیسم پشت این تضعیف ماهیت فلزی نانو ذرات و وجود اشکال یونی فلزات واسطه است که تولید رادیکال‌های آزاد را تشویق می‌کند و منجر به استرس اکسیداتیو می‌شود (Santos et al., 2021). Saddick و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که بیان ژن‌های SOD، CAT و GPx ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) در مواجهه با نانو ذرات اکسید روی با غلظت ۵۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم بر لیتر به ترتیب افزایش و کاهش یافت. آن‌ها بیان کردند که نانو ذرات اکسید روی در غلظت پایین منجر به القای سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و در غلظت بالا باعث مهار این سیستم شدند. این نتیجه با نتایج پژوهش حاضر مطابقت داشت. همچنین، در مطالعه Johari و همکاران، در سال ۲۰۱۶ مشاهده شد که میزان بیان ژن SOD در آب‌شش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) پس از ۲۱ روز مواجهه با غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر نانو ذرات نقره افزایش یافت. در مطالعه دیگری، ۱۵ روز مواجهه با نانو ذرات نقره، بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی را در مغز ماهی تیلاپیا کاهش داد که با نتیجه مطالعه حاضر مغایر بود (Afifi et al., 2016). مشابه با مطالعه حاضر، بیان ژن SOD و CAT در کبد ماهی تیلاپیا در مواجهه با غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره (۳/۳۱، ۶/۶۳، ۱۳/۲۵ و ۲۶/۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) پس از ۲۸ روز کاهش یافت (Mansour et al., 2021). کاهش بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی می‌تواند به دلیل مواجهه طولانی‌مدت با نانو ذرات در این مطالعه و پتانسیل کم جبران با سمیت باشد. به‌طور کلی نتایج مطالعه حاضر نشان داد که با افزایش زمان و غلظت مواجهه میزان بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی کاهش یافت که این موضوع در مطالعات پیشین نیز تأیید گردید. اگرچه برخلاف نتایج این مطالعه، Abdel-

Latif و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند که بیان ژن‌های CAT و GPx در کبد و آبشش ماهی تیلپیا (*Oreochromis niloticus*) پس از ۲۱ روز مواجهه با نانو ذرات سیلیکون‌دی اکسید تغییر نکرد.

در مطالعه حاضر، افزایش و کاهش بیان ژن در تیمارهای توأم با شدت بیشتری مشاهده شد. این نتیجه می‌تواند به دلیل استرس شدید تیمارهای مواجهه توأم باشد که می‌تواند منجر به تجمع بیشتر گونه‌های فعال اکسیژن در ماهی شود و در نهایت منجر به آسیب سلولی گردد. در مطالعه Mahjoubian و همکاران (۲۰۲۲) نشان داده شد که میزان تجمع زیستی نقره در مواجهه توأم نانو ذرات نقره و اکسید روی در بافت‌های مختلف از جمله کبد افزایش یافت. با توجه به این موضوع به نظر می‌رسد نانو ذرات اکسید روی علاوه بر تحریک تولید گونه‌های فعال اکسیژن، احتمالاً به دلیل تسهیل ورود نانوذره نقره به درون سلول باعث افزایش در القای استرس اکسیداتیو در بافت کبد ماهی گردیده است. نتایج این مطالعه با مطالعاتی که اثرات توأم نانو ذرات را بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بررسی نموده‌اند مشابه بود. به‌عنوان مثال Benavides و همکاران (۲۰۱۶) مشاهده کردند که میزان فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT در مواجهه توأم با نانو ذرات اکسید روی و نانو ذرات آلومینیوم‌دی‌اکسید نسبت به مواجهه منفرد با هر یک از نانو ذرات در ماهی *Carassius auratus* بیشتر افزایش یافت.

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، پس از گذشت ۴۲ و ۵۶ روز از آزمایش (در روزهای ۱۴ و ۲۸ پاک‌سازی)، اثرات عدم مواجهه و پاک‌سازی در برخی از تیمارها به‌خوبی مشاهده شد، اما در غلظت بالای تیمار نانو ذرات نقره منفرد و تیمارهای مواجهه توأم اگرچه دوره پاک‌سازی منجر به کاهش تغییرات بیان ژن نسبت به شاهد شد ولی همچنان تفاوت بیان ژن با شاهد در این تیمارها به‌ویژه در روز ۱۴ پاک‌سازی معنی‌دار بود. این امر نشان می‌دهد که مدت‌زمان پاک‌سازی، غلظت نانو ذرات و وجود نانو ذرات اکسید روی در تیمارهای مواجهه توأم در میزان پاک‌سازی مؤثر است. در دوره مواجهه حضور نانو ذرات اکسید روی در تیمارهای توأم منجر به افزایش شدت آسیب شد به نظر می‌رسد این افزایش شدت آسیب به زمان بیشتری برای برگشت به حالت اولیه نیاز داشته باشد. با این وجود، ماهی در دوره پاک‌سازی می‌تواند تا حدودی بر اثرات سمی غلبه کند تا این آلاینده‌ها از بدن حذف شوند. یافته‌های این مطالعه با مطالعاتی که میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در مواجهه با نانو ذرات بررسی کردند مشابه بود. به‌عنوان مثال Haghighat و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند که کاهش آنزیم‌های SOD و CAT ناشی از ۱۰ روز مواجهه منفرد و توأم با نانو ذرات نقره و تیتانیوم‌دی‌اکسید در ماهی کلمه دریای خزر (*Rutilus rutilus caspicus*) تا حدودی پس از دوره پاک‌سازی (۱۰ روز) بهبود یافت. همچنین Khosravi-Katuli و همکاران (۲۰۱۸) بیان کردند که پس از ۱۴ روز پاک‌سازی، فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT، GSH و GST ناشی از ۲۸ روز مواجهه با نانو ذرات اکسید روی و روی سولفات به‌صورت منفرد در ماهی *Rutilus rutilus Caspian roach* (*Rutilus rutilus caspicus*) به سطح اولیه بازگشت. مشابه مطالعه حاضر، بازگشت آنزیم‌ها به سطح اولیه پس از ۱۴ روز پاک‌سازی در مطالعه Khosravi-Katuli و همکاران (۲۰۱۸) می‌تواند به دلیل نوع نانوذره و درواقع اثرات تخریبی کمتر نانو ذرات اکسید روی باشد. در مطالعه دیگری نشان داده شد که میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ناشی از اثرات منفرد و توأم نانو ذرات نقره و اکسید روی در ماهی گورخری (*Danio reirio*)، پس از ۲۸ روز پاک‌سازی در اکثر تیمارها به‌ویژه تیمارهای منفرد به تیمار کنترل نزدیک شد (Mahjoubian et al., 2023b).

با توجه به نتایج این مطالعه، در دوره‌های پاک‌سازی، بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی در ماهی گورخری به سطح اولیه نزدیک شدند. با این حال، بهبود در تیمارهای مواجهه توأم کمتر رخ داد که می‌تواند به دلیل آسیب بیشتر این تیمارها در طول دوره مواجهه باشد. همه موارد فوق نشان داد که شدت تغییرات در میزان بهبودی مؤثر بوده و تغییرات شدید به زمان بیشتری برای بهبود نیاز دارد.

با توجه به نتایج مطالعه حاضر می‌توان گفت که بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی در مواجهه با نانو ذرات مختلف تغییر کرد، اما شدت تغییرات (هم کاهش و هم افزایش معنی‌دار) در تیمارهای مواجهه توأم بیشتر بود. شدیدتر بودن تغییرات در تیمارهای توأم نشان داد که قرار گرفتن در معرض هم‌زمان نانو ذرات سمیت اکسیداتیو بیشتری را در مقایسه با مواجهه منفرد نانو ذرات ایجاد نمود که حتی پس از دوره پاک‌سازی، تغییرات حاصله به سطح اولیه بازنگشت. با این حال، یافته‌های مطالعه حاضر، ظرفیت خوبی از پاک‌سازی را در تیمارهای منفرد برای استرس اکسیداتیو نشان داد. علاوه بر این تغییرات بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی در ماهیان در معرض قرارگرفته با نانو ذرات نشان‌دهنده این بود که ژن‌های آنتی‌اکسیدانی می‌توانند به‌عنوان شاخص مناسب جهت پایش وضعیت سلامت ماهیان مورد استفاده قرار گیرند. بر اساس نتایج این پژوهش می‌توان دریافت که مطالعات

بیشتری در مورد مواجهه توأم نانو ذرات برای درک بهتر اثرات توأم و مرتبط با آن‌ها ضروری است. چنین مطالعاتی منجر به درک بهتر ما از فعالیت‌های بیولوژیک و پاسخ‌های تطابقی ماهی‌ها در اکوسیستم‌های آلوده می‌شود.

References

1. Abdi, V., Sourinejad, I., Yousefzadi, M. and Ghasemi, Z., 2019. Biosynthesis of silver nanoparticles from the mangrove *Rhizophora mucronata*: its characterization and antibacterial potential. *Iranian journal of science and technology, transactions A: Science*, 43: 2163-2171.
2. Afifi, M., Saddick, S. and Zinada, O. A. A., 2016. Toxicity of silver nanoparticles on the brain of *Oreochromis niloticus* and *Tilapia zillii*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(6): 754-760.
3. Alkaladi, A., Afifi, M., Mosleh, Y. and AbuZinada, O., 2014. Histopathological effects of zinc oxide nanoparticles on the liver and gills of *Oreochromis niloticus*, protective effect of vitamins C and E. *Microbiology*, 8(6): 4549-4558.
4. Abo-Al-Ela, H. G. and Faggio, C., 2021. MicroRNA-mediated stress response in bivalve species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208: 111442.
5. Abdel-Latif, H. M., Shukry, M., El Euony, O. I., Mohamed Soliman, M., Noreldin, A.E., Ghetas, H. A. and Khallaf, M. A., 2021. Hazardous effects of SiO₂ nanoparticles on liver and kidney functions, histopathology characteristics, and transcriptomic responses in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Juveniles. *Biology*, 10(3): 183.
6. Baek, M. J., Son, J., Park, J., Seol, Y., Sung, B. and Kim, Y. J., 2020. Quantitative prediction of mixture toxicity of AgNO₃ and ZnO nanoparticles on *Daphnia magna*. *Science and Technology of Advanced Materials*, 21(1): 333-345.
7. Benavides, M., Fernández-Lodeiro, J., Coelho, P., Lodeiro, C. Diniz, M. S., 2016. Single and combined effects of aluminum (Al₂O₃) and zinc (ZnO) oxide nanoparticles in a freshwater fish, *Carassius auratus*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23: 24578-24591.
8. Blaser, S. A., Scheringer, M., MacLeod, M. and Hungerbühler, K., 2008. Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: contribution of nano-functionalized plastics and textiles. *Science of the Total Environment*, 390(2-3): 396-409.
9. Chai, T., Cui, F., Mu, P., Yang, Y., Xu, N., Yin, Z. and Wang, C., 2016. Enantio-alteration of gene transcription associated with bioconcentration in adult zebrafish (*Danio rerio*) exposed to chiral PCB149. *Scientific Reports*, 6(1): 1-9.
10. Cong, B., Liu, C., Wang, L. and Chai, Y., 2020. The impact on antioxidant enzyme activity and related gene expression following adult zebrafish (*Danio rerio*) exposure to dimethyl phthalate. *Animals*, 10(4): 717.
11. Craig, P. M., Wood, C. M. and McClelland, G. B., 2007. Oxidative stress response and gene expression with acute copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 293(5): R1882-R1892.
12. Diniz, M. S., De Matos, A. P. A., Lourenço, J., Castro, L., Peres, I., Mendonça, E. and Picado, A., 2013. Liver alterations in two freshwater fish species (*Carassius auratus* and *Danio rerio*) following exposure to different TiO₂ nanoparticle concentrations. *Microscopy and Microanalysis*, 19(5): 1131-1140.

13. Farag, M. R., Abo-Al-Ela, H. G., Alagawany, M., Azzam, M. M., El-Saadony, M. T., Rea, S. and Nouh, D. S., 2023. Effect of quercetin nanoparticles on hepatic and intestinal enzymes and stress-related genes in Nile tilapia fish exposed to silver nanoparticles. *Biomedicines*, 11(3): 663.
14. Gate, L., Paul, J., Ba, G. N., Tew, K. and Tapiero, H., 1999. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 53(4): 169-180.
15. Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R. W. and Nowack, B., 2009. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. *Environmental Science and Technology*, 43(24): 9216-9222.
16. Haghghat, F., Kim, Y., Sourinejad, I., Yu, I. J. and Johari, S. A., 2021. Titanium dioxide nanoparticles affect the toxicity of silver nanoparticles in common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere*, 262:127805.
17. Hao, L. and Chen, L., 2012. Oxidative stress responses in different organs of carp (*Cyprinus carpio*) with exposure to ZnO nanoparticles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 80:103-110.
18. Hasnidawani, J. N., Azlina, H.N., Norita, H., Bonnia, N. N., Ratim, S. and Ali, E. S., 2016. Synthesis of ZnO nanostructures using sol-gel method. *Procedia Chemistry*, 19: 211-216.
19. Hill, A.J., Teraoka, H., Heideman, W. and Peterson, R. E., 2005. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Sciences*, 86(1): 6-19.
20. Instruments, U. M. and Worcestershire, U., 2005. Manual, Zetasizer Nano Series User. In: Worcestershire.
21. Ibrahim, D., Neamat-Allah, A. N., Ibrahim, S. M., Eissa, H. M., Fawzey, M. M., Mostafa, D. I. and Khater, S. I., 2021. Dual effect of Selenium loaded Chitosan Nanoparticles on growth, antioxidant, immune related genes expression, transcriptomics modulation of caspase 1, cytochrome P450 and heat shock protein and *Aeromonas hydrophila* resistance of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 110: 91-99.
22. Johari, S. A., Kalbassi, M. R., Lee, S. B., Dong, M. S. and Yu, I. J., 2016. Silver nanoparticles affects the expression of biomarker genes mRNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Clinical Pathology*, 25: 85-90.
23. Keller, J. M., Escara-Wilke, J. F. and Keller, E. T., 2008. Heat stress-induced heat shock protein 70 expression is dependent on ERK activation in zebrafish (*Danio rerio*) cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 150(3): 307-314.
24. Khosravi-Katuli, K., Lofrano, G., Nezhad, H. P., Giorgio, A., Guida, M., Aliberti, F. and Rahimi, E., 2018. Effects of ZnO nanoparticles in the Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*). *Science of the Total Environment*, 626: 30-41.
25. Limbach, L. K., Wick, P., Manser, P., Grass, R. N., Bruinink, A. and Stark, W. J., 2007. Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress. *Environmental Science and Technology*, 41(11): 4158-4163.
26. Livak, K. J. and Schmittgen, T. D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *methods*, 25(4): 402-408.
27. Lopes, S., Pinheiro, C., Soares, A.M. and Loureiro, S., 2016. Joint toxicity prediction of nanoparticles and ionic counterparts: Simulating toxicity under a fate scenario. *Journal of Hazardous Materials*, 320: 1-9.
28. Mahjoubian, M., Naeemi, A. S., Moradi-Shoeili, Z., Tyler, C. R. and Mansouri, B., 2023a. Toxicity of silver nanoparticles in the presence of zinc oxide nanoparticles differs for acute and chronic exposures in zebrafish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 84(1): 1-17.

29. Mahjoubian, M., Naeemi, A. S., Moradi-Shoeili, Z., Tyler, C. R. and Mansouri, B., 2023b. Oxidative stress, genotoxic effects, and other damages caused by chronic exposure to silver nanoparticles (ag NPs) and zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs), and their mixtures in zebrafish (*Danio rerio*). Toxicology and Applied Pharmacology, 116569.
30. Mansour, W. A., Abdelsalam, N. R., Tanekhy, M., Khaled, A. A. and Mansour, A. T., 2021. Toxicity, inflammatory and antioxidant genes expression, and physiological changes of green synthesis silver nanoparticles on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 247:109068.
31. Nidya, M., Umadevi, M., Sankar, P. and Rajkumar, B. J., 2015. L-Glutamic acid functionalized silver nanoparticles and its nonlinear optical applications. Journal of Materials Science: Materials in Electronics, 26: 4124-4131.
32. Osmond, M. J. and McCall, M. J., 2010. Zinc oxide nanoparticles in modern sunscreens: an analysis of potential exposure and hazard. Nanotoxicology, 4(1): 15-41.
33. Panda, S.K., 2012. Assay guided comparison for enzymatic and non-enzymatic antioxidant activities with special reference to medicinal plants. Antioxidant Enzyme, 14: 382-400.
34. Saddick, S., Afifi, M. and Zinada, O. A. A., 2017. Effect of Zinc nanoparticles on oxidative stress-related genes and antioxidant enzymes activity in the brain of *Oreochromis niloticus* and *Tilapia zillii*. Saudi Journal of Biological Sciences, 24(7): 1672-1678.
35. Stehr, C. M., Myers, M. S., Johnson, L. L., Spencer, S. and Stein, J. E., 2004. Toxicopathic liver lesions in English sole and chemical contaminant exposure in Vancouver Harbour, Canada. Marine Environmental Research, 57(1-2): 55-74.
36. Santos, D., Felix, L., Luzio, A., Parra, S., Bellas, J. and Monteiro, S. M., 2021. Single and combined acute and subchronic toxic effects of microplastics and copper in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. Chemosphere, 277: 130262.
37. Souza, J. P., Mansano, A. S., Venturini, F. P., Marangoni, V. S., Lins, P. M., Silva, B. P. and Zucolotto, V., 2021. Toxicity of gold nanorods on *Ceriodaphnia dubia* and *Danio rerio* after sub-lethal exposure and recovery. Environmental Science and Pollution Research, 28: 25316-25326.
38. Vale, G., Mehennaoui, K., Cambier, S., Libralato, G., Jomini, S. and Domingos, R. F., 2016. Manufactured nanoparticles in the aquatic environment-biochemical responses on freshwater organisms: a critical overview. Aquatic Toxicology, 170: 162-174.
39. Westerfield, M., 2000. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). (No Title).
40. Whiteley, A. R., Bhat, A., Martins, E. P., Mayden, R. L., Arunachalam, M., Uusi-heikkila, S. I. L. V. A. and Bernatchez, L., 2011. Population genomics of wild and laboratory zebrafish (*Danio rerio*). Molecular Ecology, 20(20): 4259-4276.
41. WoodrowWilsonDatabase, 2015. Nanotechnology consumer product inventory. Retrieved from.