فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال چهارم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۹۵

بررسی اثر محافظتی ویتامین C بر شکستگی DNA در سلول‌های آبشش و کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در مواجهه با غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید روی (ZnO)

الهه چهارده بالادهی[۱]*، سیدعلی اکبر هدایتی[۲]، حامد کلنگی میاندره[۳]، طاهره باقری[۴]

تاریخ دریافت: فروردین ۹۵ تاریخ پذیرش: خرداد ۹۵

چکیده

این مطالعه به بررسی اثر آلاینده نوظهور نانوذره اکسید روی (ZnO) بر روی بافت کبد و آبشش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و به دنبال آن بررسی اثر ایمنی ویتامین C بر شکستگی DNA پس از اعمال نانوذره پرداخته است. برای این منظور از ترکیب سطوح مختلف نانوذره روی (۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم در لیتر) و ویتامین C (۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) استفاده شد (۹ تیمار هر یک با سه تکرار) و ماهیان با میانگین وزنی ۱۰±۱۷۰ گرم به مدت ۱۰ روز تحت تیمار با جیره‌های آزمایشی قرار گرفتند. نمونه‌گیری در روزهای پنجم و دهم از بافت کبد و آبشش صورت گرفت. نمونه‌های مورد نظر پس از جداسازی در میکروتیوپ‌های حاوی الکل ٪۹۶ نگهداری شدند. استخراج DNA به روش شکستگی DNA با الکتروفورز انجام گرفت، سپس با ژل الکتروفورز اجرا شد و در پایان با دستگاه ژل‌داک عکس‌برداری شد. درصد شکستگی DNA با استفاده از میانگین وزنی تعیین شد. بر طبق نتایج، اثر غلظت ZNO و ویتامین C و اثر متقابل زمان- غلظت بر روی سطح آسیب DNA در بافت کبد و آبشش بین تیمارهای مختلف کاملا معنی‌دار بود. بیشترین آسیب در بافت کبد و آبشش در غلظت۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره اکسید روی در روز پنجم مشاهده شد. همچنین در هر دو بافت در روز دهم میزان شکستگی DNA کاهش یافت. به علاوه، حضور ویتامین C موجب کاهش شکستگی DNA شد.

واژگان کلیدی: *آبزی، آلودگی، بهبود مقاومت، نانو سم‌شناسی.*

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد شیلات، گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۲- دانشیار گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۳- استادیار گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۴- استادیار گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
* نویسنده مسئول: baladehi.elahe@ yahoo.com

مقدمه

نانوذرات با اندازه کمتر از ۱۰۰ نانومتر از ذرات بزرگ‌تر با ترکیب مشابه متمایز هستند. با کاهش اندازه ذرات، تعداد ذره در واحد جرم افزایش می‌یابد. با این وجود کوچکی اندازه آن‌ها می‌تواند یک خطر ایمنی ایجاد کند زیرا ذرات با اندازه کوچک‌تر شانس بیشتری برای عبور از سدهای زیستی دارند و راحت‌تر به بدن وارد می‌شوند. سپس جذب، انتشار، متابولیسم یا دفع انجام شده، با ملکول‌های زیستی برهم‌کنش ایجاد می‌کنند که این خود پتانسیلی برای برهم ریختن عملکرد سلولی است (Ferrari, 2005). از تاثیرات منفی احتمالی نانوذرات بر جاندران آبزی، می‌توان به آسیب وارده به محتوای ژنتیکی (آسیب به DNA از طریق رادیکال‌های آزاد و صدمات کروموزومی)، تاثیر بر رشد (فاکتور وضعیت)، تاثیر بر رفتار (مهاجرت، فرار و رفتارهای تولیدمثلی)، تاثیر بر تولیدمثل (هماوری و کاهش انرژی تولیدمثل) و تاثیر بر سیستم ایمنی (اختصاصی و غیراختصاصی) اشاره کرد (Singh et al., 2009).

نانوذره اکسید روی ترکیبی غیرآلی با فرمول ZNO و معمولا به صورت پودری سفید رنگ است که ظرفیت کاتالیزوری بالا و اثر ضد میکروبی دارد. امروزه در طیف وسیعی از فناوری ها اعم از تولید کرم‌های ضد آفتاب، لوازم آرایشی بهداشتی، رنگ و پماد، لوله گرفته تا ناوگان‌های دریایی و غیره استفاده می‌شود (Borm et al., 2006). با توجه به کاربرد روزافزون نانوروی در صنایع مختلف و نظر به این که به دلیل سطح ثقلی پایین، اکوسیستم‌های پذیرنده نهایی آلاینده‌های محیطی هستند، ناگزیر در سال‌های آتی حضور نانوروی در روخانه‌ها و دریاها مشهود خواهد بود.

یکی از راه‌های پیشگیرانه در زمینه مدیریت بهداشتی مزارع پرورش ماهی استفاده از محرک‌های طبیعی و غیرزنده سیستم ایمنی است. ویتامین C از جمله موادی است که به عنوان محرک سیستم ایمنی مطرح است (Muntro et al., 1999). اسید آسکوربیک یا ویتامین C به عنوان یکی از ضروری‌ترین مواد مغذی است. ویتامین C محلول در آب بوده، جذب آن نسبتا ساده است چرا که آب به طور دائم از طریق روده در حال جذب است (Dabrowski, 2001). ویتامین C به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی در حفاظت از سلول‌ها در برابر آسیب اکسایش نقش مهمی را بازی می‌کند (Li and Robinson, 1999). یکی از ویژگی‌های این ویتامین، قدرت احیاکنندگی آن

است که از این ویژگی برای واکنش‌های احیای رادیکالی استفاده می‌شود. طی پژوهش‌های صورت گرفته افزودن ویتامین C به جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌تواند سبب خنثی‌سازی و احیای رادیکال‌های آزاد «O_2، OH و H_2O_2» شود و از آسیب‌های حاصل از استرس‌های اکسیداتیو جلوگیری به عمل آورد (Verlhac et al., 1998).

یک حوزه مدیریتی حساس در ارزیابی خطرات احتمالی نانوذرات، ژنوتوکسیکولوژی است. ژنوتوکسیکولوژی مطالعه اثرات مضر آلاینده‌ها و سموم بر فرآیند وراثت است. مواد ژنوتوکسیک دارای توانایی تغییر DNA هستند که این تغییرات می‌تواند تثبیت شده، با انتقال به نسل‌های بعدی، تاثیرات خود را اعمال کنند. این نکته اهمیت مطالعات ژنوتوکسیک را نشان می‌دهد. نانوذرات ترکیبات ژنوتوکسیک هستند که توانایی تخریب DNA را دارند و می‌تواند سبب آسیب DNA، شکستگی‌های یک یا دو رشته DNA، تغییر یا حذف بازها، ترکیبات اضافی DNA، اتصال عرضی بین رشته DNA- DNA و یا DNA- پروتئین شوند (Mitchelmore and Chipman, 1997).

شکستگی DNA به عنوان یک بیومارکر، آلودگی‌های محیطی در ماهی و دیگر گونه‌های آبزی در نظر گرفته شده است و توجه زیادی را به خود جلب کرده است. چرا که صدمه به DNA ممکن است آغاز کننده و تسریع کننده جهش و سرطان‌زایی باشد یا بر باروری تاثیر بگذارد (Singh et al., 2009).

روش‌های مختلفی برای تعیین میزان تخریب ماده ژنتیکی وجود دارد که می‌توان آزمون سنجش ریزهسته[1] آزمون کامت، تبادل کروماتید خواهری، تغییرات کروموزومی و شکستگی رشته DNA را نام برد. در بین روش‌های مختلف، روش بررسی شکستگی رشته DNA با الکتروفورز بر روی ژل آگاروز، روش مقرون به صرفه‌ای است و با استفاده از این روش می‌توان به بررسی هر دو رشته DNA پرداخت. در نتیجه DNA آسیب دیده از هسته خارج شده و به سمت آند (قطب مثبت) مهاجرت می‌کند. هرچه میزان آسیب وارده به DNA بیشتر باشد، میزان DNA جابه‌جا شده هم بیشتر خواهد بود و در ضمن درخشان‌تر نیز دیده می‌شود (Lee and Steinert, 2003).

ماهی‌ها ممکن است اندیکاتور مناسبی برای پایش آلودگی‌ها باشند، چرا که پاسخ

1- Micronuclei

بیوشیمیایی آن‌ها کاملا مشابه پاسخ‌های موجود در پستانداران است (Banaee et al., 2008). ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان یکی از مهم‌ترین گونه‌های آزادماهیان، با ارزش اقتصادی بالا برای پرورش جهانی بوده، بخش بزرگی از میزان تولید آبزیان را به خود اختصاص می‌دهد و حضور پررنگی در زنجیره غذایی دارد (Azewedo et al., 2004).

آلاینده‌های شیمیایی آبشش‌ها، کلیه و کبد را تحریک می‌کنند که این بافت‌ها ارائه دهنده یک ابزار مفید برای سنجش تاثیرات ژنوبیوتیک هستند. آبشش به دلیل داشتن اپی‌تلیوم ویژه و ارتباط مستقیم آن با محیط پیرامون، مهم‌ترین اندامی است که تنظیم اسمزی در آن صورت می‌گیرد (Farkas et al., 2010). کبد ماهی، شاخص حساس آلودگی محیط است و به دلیل تجمع زیستی فوق العاده نسبت به سایر بافت‌های بدن، برای تعیین میزان آلودگی، ارجحیت دارد (Safahieh et al., 2011).

در حال حاضر نگرانی زیادی پیرامون آلودگی موجودات زنده در مواجه با آلاینده‌ها وجود دارد، علاوه بر آن گفتنی است، با توجه به نوظهور بودن علم نانوتکنولوژی و کاربردهای این فناوری در علوم مختلف، امروزه خطرات احتمالی این ذرات برای محیط زیست و سیستم‌های زیستی و ارزیابی دقیق آن‌ها حائز اهمیت است. اطلاعات کمی در رابطه با سمیت ژنتیکی نانوذره اکسیدروی و اثر مقاومتی ویتامین C بر روی ماهیان وجود دارد با این حال مطالعاتی در زمینه آسیب DNA تحت تاثیر نانوذرات صورت گرفته است که می‌توان به اثرات سمیت سلولی و سمیت ژنتیکی نانوذره نقره با غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۳، ۰/۵، ۳ و ۵ میکروگرم بر سانتی‌مترمربع بر روی سلول‌های لاین ماهی مداکا *Oryzias latipes* (Wise et al., 2010) که نتایج ثابت کرد اختلالات کروموزومی با افزایش غلظت افزایش یافت، تاثیر نانوذره نقره و طلا با غلظت-های ۱۷/۴ و ۱۹ میلی‌گرم در لیتر بر روی سلول‌های کبدی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان که نتایج نشان داد حتی در غلظت‌های اندک هم غشای سلولی و حتی DNA در سلول کبد تخریب می‌شود (Farkas et al., 2010)، تاثیر نانوذرات نقره در مقایسه با یون‌های نقره بر روی آسیب DNA و استرس اکسیداتیو روی ماهی مداکا (Chae et al., 2009) اشاره کرد.

هدف از این مطالعه تعیین میزان شکستگی DNA با استفاده از روش میانگین وزن‌دهی به صورت کمی و نیز بررسی بافت کبد و آبشش ماهی‌ها با استفاده از الکتروفورز DNA استخراج شده بر روی ژل آگاروز است. در مطالعه حاضر

این امکان فراهم شده است تا ارزیابی نسبتا سریعی از شکستگی DNA پس از تاثیر نانوذره اکسیدروی بر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (به عنوان شاخص آلودگی آب) فراهم شود و نیز اثر مقاومتی ویتامین C در شرایط بهینه آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه

در فروردین ماه ۱۳۹۴، تعداد ۱۷۰ قطعه ماهی نابالغ با میانگین وزن ۱۰±۱۷۰ گرم از مرکز ماهی‌سرای کهر با نام تجاری اکسیر سلامت واقع در شهرستان کرج خریداری شد. سپس ماهیان به آزمایشگاه تکثیر و پرورش دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شدند.

شرایط نگهداری ماهیان

در آزمایشگاه به منظور سازگاری با شرایط آزمایشگاهی، ماهی‌ها در تانک‌های ۷۰ لیتری که قبل از شروع آزمایش به وسیله پرمنگنات پتاسیم و آب نمک غلیظ ۷۰ درصد کاملا شسته شده بودند تا محیط عاری از هر گونه آلودگی و بیماری و مناسب برای ماهیان باشد، قرار گرفتند. این مخازن حاوی آب کلرزدایی شده با دمای ۲±۱۶ درجه سانتی‌گراد بودند که به صورت ۲۴ ساعته هوادهی می‌شدند. در طول دوره آزمایش، میزان هوادهی، غذادهی، شرایط فیزیکوشیمیایی آب مانند دما، pH و اکسیژن محلول کنترل شد. ماهیان در دوره نوری ۱۳ ساعت تاریکی و ۱۱ ساعت روشنایی به مدت یک هفته نگهداری شدند تا به شرایط آزمایشگاه سازگار شوند. پلت‌های تجاری از شرکت فرادانه بر اساس GFT برای رشد ماهی تهیه شد. طی این دوره ماهی‌ها با غذای تجاری به میزان ٪۲ وزن بدن در روز غذادهی شدند (در دو نوبت) و آب تانک‌های نگهداری ماهی‌ها نیز هر ۲۴ ساعت یک‌بار تعویض شد (Chapman et al., 1998). شاخص‌های فیزیکوشیمیایی اندازه‌گیری شده آب در کارگاه شامل دما و pH با دستگاه قابل حمل مولتی‌متر (TES-2900، TES، تایوان) و اکسیژن و سختی آب با دستگاه دیجیتال اندازه‌گیری اکسیژن (5510، لوترون، تایوان) و به طور روزانه اندازه‌گیری شدند. نانو اکسیدروی یا ZNO (Tecnan، اسپانیا) استفاده شده در این مطالعه دارای رنگ سفید با اندازه متوسط ذرات بین ۲۰ تا ۳۰nm، سطح مخصوص ۳۵-۵۰m^2/g، چگالی واقعی ۵/۶g/mL، چگالی ۰/۱۱۵cm^3/g و درجه خلوص ٪۹۹ بود.

به منظور بررسی اثرات نانوذره اکسیدروی بر میزان تغییرات شکستگی DNA دو سطح مواجهه‌ای برای نانوذره ZnO (۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم در لیتر) اعمال شد. به منظور بررسی اثرات ویتامین C بر میزان تغییرات شکستگی DNA در بافت آبشش و کبد دو سطح مواجهه‌ای برای نانوذره ZnO (۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم در لیتر؛ خدابخشی و پورباقر، ۱۳۹۲) و دو سطح ویتامین C افزودنی به غذا (۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم غذا؛ N.R.C, 2011) اعمال شد. پس از اتمام دوره سازگاری، ۱۶۲ قطعه ماهی در نه گروه آزمایشی (هر گروه ۶ قطعه) با سه تکرار تقسیم شد. به طوری که گروه‌های مورد نظر عبارت بودند از: جیره پایه بدون ZnO؛ جیره پایه به همراه ۴۰ میلی‌گرم در لیتر ZnO؛ جیره پایه با ۸۰ میلی-گرم در لیتر ZnO؛ جیره پایه با ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C و بدون ZnO؛ جیره پایه با ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر ZnO؛ جیره پایه با ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C و ۸۰ میلی‌گرم در لیتر ZnO؛ جیره پایه با ۸۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C و بدون ZnO؛ جیره پایه با ۸۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر ZnO؛ جیره پایه با ۸۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C و ۸۰ میلی‌گرم در لیتر ZnO.

برای تهیه محلول ذخیره (استوک) نانو اکسید روی، ۱۰ گرم در لیتر پودر نانو اکسید روی در آب مقطر، داخل حمام سونیکاتور (FS 600N، Life Scientz، چین) به روش فراصوت به مدت ۶ ساعت قرار داده شد تا محلول همگن نانو اکسید روی به دست آید. ویتامین C مورد استفاده از نوع ال- اسکوربیل ۲- پلی‌فسفات (ACROS، آمریکا) با درجه خلوص ٪۹۹ بود.

ترکیب ویتامین C با جیره پایه بر اساس روش روغن پوش‌سازی (Oil Coating) انجام شد (Treves-Brown, 2000). به این ترتیب که ابتدا ویتامین C در ۱۰ میلی‌لیتر آب حل شد و برای جدا نشدن آن از پلت‌ها، مقداری روغن کانولا به محلول آب و ویتامین C اضافه شد. سپس ترکیب به دست آمده توسط آب‌پاش به روی پلت‌ها اسپری شد. نانوذرات روی نیز در محیط آب تیمارها به حالت سوسپانسیون معلق در آمدند. پلت‌های آغشته شده در دو نوبت صبح و بعد از ظهر برای تغذیه ماهیان به کار رفت.

در روزهای پنجم و دهم پس از قرارگیری ماهیان در معرض غلظت‌های مختلف نانو اکسید روی و ویتامین C، بافت کبد و آبشش آن‌ها برای اندازه‌گیری میزان شکستگی DNA

جداسازی شد. برای این منظور ابتدا ماهیان به صورت تصادفی با ساچوک برداشته شدند و در داخل تشت پلاستیکی ۵ لیتری که حاوی ۲۰۰ppm پودر گل میخک بود، بیهوش شدند. سپس نمونه‌های بافت کبد و آبشش ماهیان برداشته شد و در الکل ٪۹۶ نگهداری شد. استخراج DNA نمونه‌ها طبق دستور العمل موجود در کیت Cinnapure DNA (سیناکلون، ایران) به دور از هرگونه آلودگی بین‌نمونه‌ای انجام گرفت و پس از این که ژل حاوی DNA بر روی دستگاه الکتروفورز ران شد، برای عکس‌برداری در دستگاه ژل داکیومنتیشن (D56-20M، Uvitec، فرانسه) قرار داده شد. برای به دست آوردن میزان شکستگی، در مرحله اول، عکس‌های تهیه شده در نرم‌افزار فتوشاپ CS6 Portable 2015 ابتدا سیاه سفید و بعد Invert شدند. در مرحله دوم پس از ارسال تصاویر اسمیر حاصل از DNA به نرم‌افزار Image J نسخه java 1.6.0-10 (شکل ۱ C)، گراف تراکم پیکسل حاصل از غلظت DNA به دست آمد (شکل ۱ D). در میانگین وزنی سطح زیر گراف به ۱۰ قسمت تقسیم شد و مساحت هر یک از قسمت‌ها به دست آمد (شکل ۱E). در نهایت درصد شکستگی بر طبق روش میانگین وزنی محاسبه شد (شکل ۱ F). اثر غلظت نانوذره اکسیدروی و ویتامین C و زمان بر روی شکستگی DNA در بافت‌های مورد بررسی با استفاده از ANOVA دوطرفه در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ تعیین شد و از پس‌آزمون دانکن نیز به منظور بررسی اثر متغیرهای سم و زمان مورد بررسی در ارتباط با بافت کبد و آبشش در سطح معنی‌داری ٪۵ استفاده شد. تمامی داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است.

نتایج

شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب

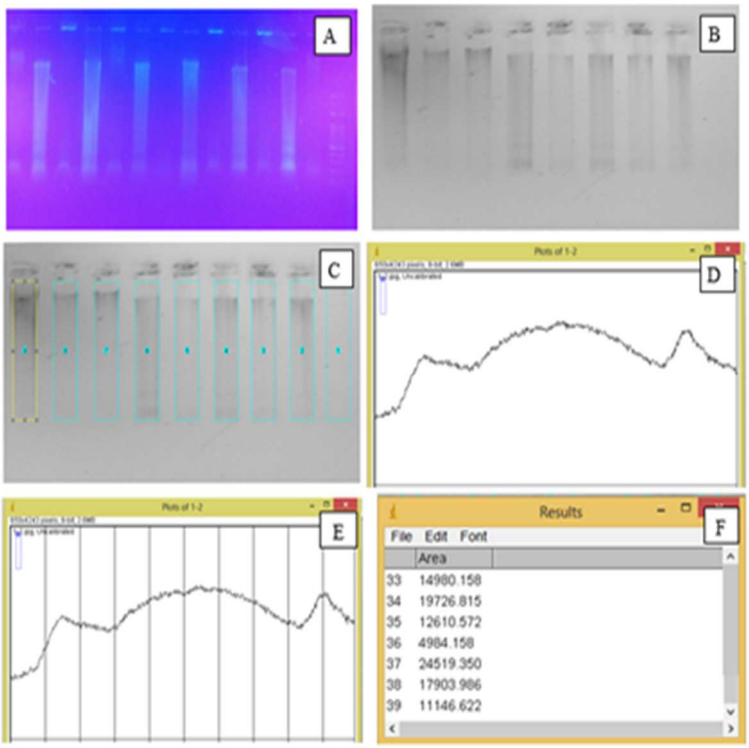
شاخص‌های فیزیکوشیمیایی اندازه‌گیری شده آب در کارگاه شامل دما °C ۲±۱۶، pH ۰/۴±۷/۲، اکسیژن ۰/۲±۶/۷۴ و سختی آب ۱۶±۱۸۵ میلی‌گرم در لیتر ثبت گردید.

درصد شکستگی DNA

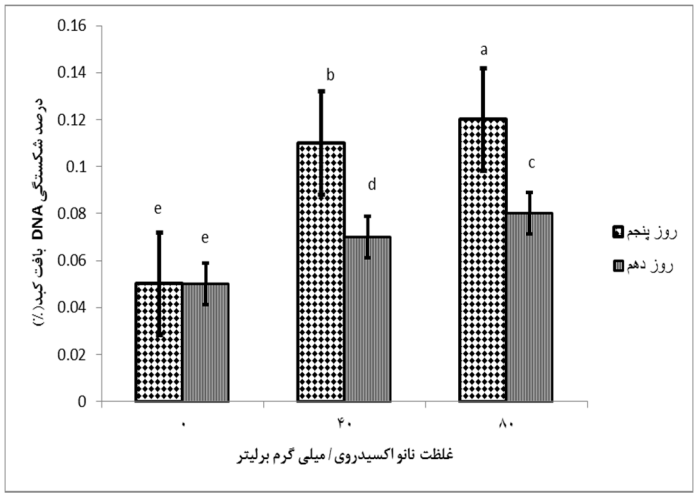
تجزیه واریانس دوطرفه تفاوت معنی‌داری را بین میزان درصد شکستگی DNA نمونه‌های بافت کبد و آبشش که در معرض نانوذره اکسید روی در روزهای پنجم و دهم قرار گرفتند با گروه شاهد نشان داد. همچنین زمان و اثر متقابل غلظت- زمان تاثیر معنی‌داری بر میزان درصد شکستگی DNA داشت.

همان‌گونه که در شکل‌های ۱ و ۲ و ۳ مشاهده می‌شود با افزایش غلظت نانوذره اکسید روی میزان شکستگی در بافت کبد و آبشش نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری داشت ($P<۰/۰۵$). بیشترین میزان شکستگی DNA در بافت کبد و آبشش در غلظت ۸۰ میلی‌گرم در لیتر در روز پنجم مشاهده شد. همچنین بافت آبشش نسبت به کبد در غلظت ۸۰ میلی‌گرم در لیتر، میزان حداکثر شکستگی را به خود نسبت داد.

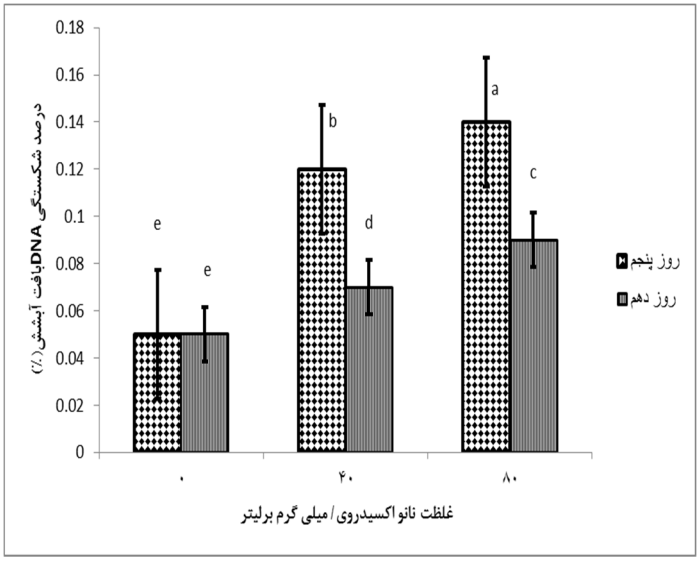
مدت زمان نگهداری ماهیان در معرض نانوذره اکسید روی بر میزان شکستگی DNA بافت کبد و آبشش اثر معنی‌داری داشت. همان‌گونه که در شکل‌های ۲ و ۳ مشاهده می‌شود، با افزایش مدت زمان قرارگیری در معرض نانوذره، میزان شکستگی DNA در بافت کبد و آبشش کاهش معناداری پیدا کرد به طوری که در روز پنجم بیشترین آسیب دیده شد.



شکل ۱: تصاویر مولکولی درصد شکستگی DNA با استفاده از روش میانگین وزنی

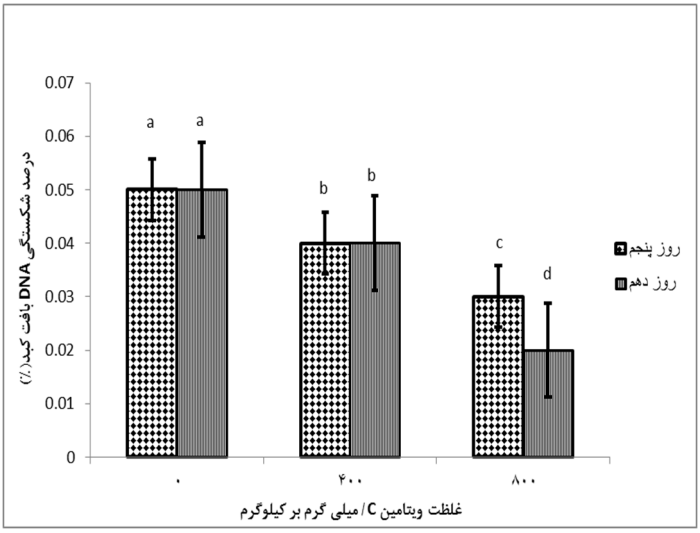


شکل ۲: درصد شکستگی DNA در بافت کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در روزهای پنجم و دهم مواجهه با غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید روی (میانگین ± انحراف معیار). وجود حروف متفاوت انگلیسی نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌داری است (P<۰/۰۵).

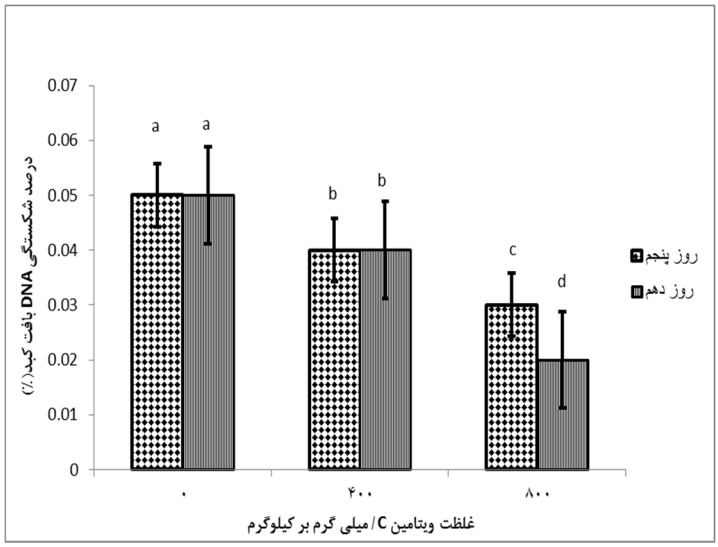


شکل ۳: درصد شکستگی DNA در بافت آبشش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در روزهای پنجم و دهم مواجهه با غلظت‌های مختلف نانوذره اکسیدروی (میانگین ± انحراف معیار). وجود حروف متفاوت انگلیسی نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌داری است (P<۰/۰۵).

تجزیه واریانس دوطرفه تفاوت معنی‌داری را بین میزان درصد شکستگی DNA نمونه‌های بافت کبد و آبشش که در معرض ویتامین C قرار گرفتند با گروه شاهد نشان داد. همچنین زمان و اثر متقابل غلظت- زمان تاثیر معنی‌داری بر میزان درصد شکستگی DNA داشت. همان-گونه که در شکل‌های ۴ و ۵ مشاهده شد. میزان شکستگی DNA در بافت کبد و آبشش با افزایش غلظت ویتامین C نسبت به تیمار شاهد کاهش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). میزان شکستگی DNA در بافت کبد و آبشش با افزایش غلظت ویتامین C کاهش یافته است. میزان شکستگی DNA در بافت کبد و آبشش در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم در روزهای پنجم و دهم یکسان بود. همچنین کمترین میزان شکستگی DNA در غلظت ۸۰۰ میلی-گرم در کیلوگرم در روز دهم مشاهده شد.



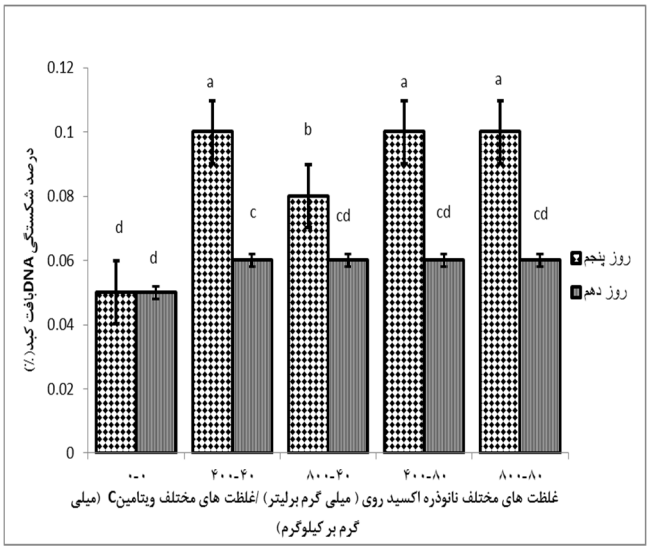
شکل ۴: درصد شکستگی DNA در بافت کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در روزهای پنجم و دهم مواجهه با غلظت‌های مختلف ویتامین C (میانگین ± انحراف معیار). وجود حروف متفاوت انگلیسی نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌داری است (P<۰/۰۵).



شکل ۵: درصد شکستگی DNA در بافت آبشش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در روزهای پنجم و دهم مواجهه با غلظت‌های مختلف ویتامین C (میانگین ± انحراف معیار). وجود حروف متفاوت انگلیسی نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌داری است (P<۰/۰۵).

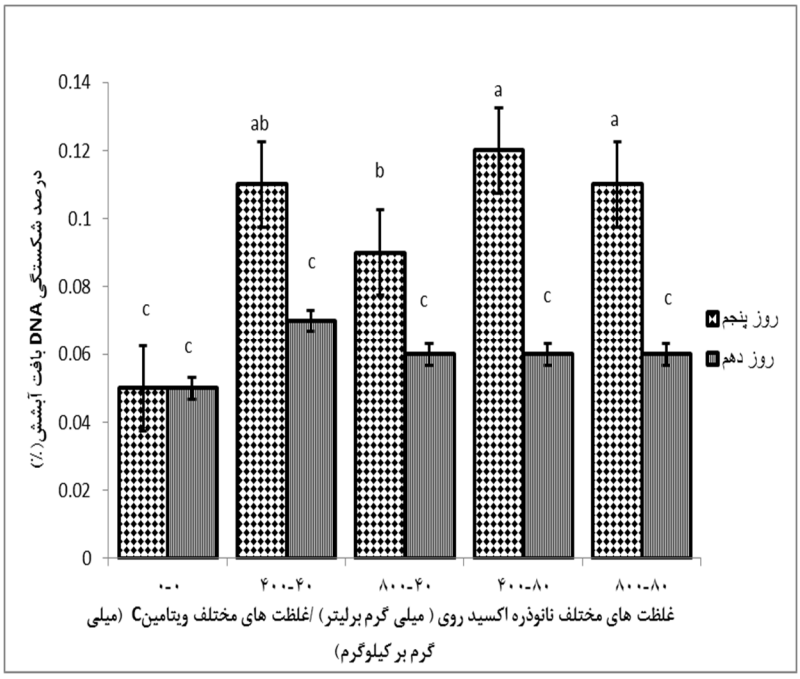
همان‌گونه که در شکل ۶ مشاهده می‌شود، میزان شکستگی DNA در بافت کبد در روزهای پنجم و دهم درتمامی تیمارها نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشت. میزان شکستگی DNA بافت کبد در تیمارهای ۴۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذره اکسیدروی ZnO و ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامینC و ۸۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذره اکسیدروی ZnO و ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C و ۸۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذره اکسیدروی ZnO و ۸۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین در روز پنجم نسبت به تیمار شاهد یکسان بود و اختلاف معناداری بین این تیمارها مشاهده نشد. از طرفی کمترین میزان شکستگی DNA در بافت کبد در روز پنجم مربوط به تیمار ۴۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذره اکسیدروی و ۸۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C بود.

با توجه به شکل ۶ در روز دهم میزان شکستگی DNA در بافت کبد نسبت به تیمار شاهد افزایش داشت. از طرفی میزان شکستگی DNA در تمام تیمارها به جز تیمار شاهد یکسان بود و همچنین میزان شکستگی DNA در روز دهم نسبت به روز پنجم در تمامی تیمارها به صورت معنی‌داری کاهش یافت.



شکل ۶: درصد شکستگی DNA در بافت کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در روزهای پنجم و دهم مواجهه با غلظت‌های مختلف نانوذره روی و غلظت‌های مختلف ویتامین C (میانگین ± انحراف معیار). وجود حروف متفاوت انگلیسی نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌داری است (P<۰/۰۵).

با توجه به شکل ۷ میزان شکستگی DNA در بافت کبد و آبشش در تمام تیمارها نسبت به تیمار شاهد در روزهای پنجم و دهم افزایش معنی‌داری داشت. از طرفی میزان شکستگی DNA در روز پنجم نسبت به روز دهم در تمام تیمارها بیشتر بود. بیشترین میزان شکستگی DNA در روز پنجم مربوط به تیمار ۸۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذره اکسیدروی ZnO و ۸۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C بود و کمترین میزان شکستگی DNA در بافت آبشش در روز پنجم مربوط به تیمار ۴۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذره اکسیدروی و ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C بود. همچنین میزان شکستگی DNA در روز دهم در تیمارهای ۴۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذره اکسیدروی ZnO و ۸۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C و ۸۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذره اکسیدروی ZnO و ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C و ۸۰



شکل ۷: درصد شکستگی DNA در بافت آبشش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در روزهای پنجم و دهم مواجهه با غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید روی و غلظت‌های مختلف ویتامین C (میانگین ± انحراف معیار). وجود حروف متفاوت انگلیسی نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌داری است (P<۰/۰۵).

میلی‌گرم در لیتر نانوذره اکسیدروی ZnO و ۸۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

بحث

از آنجا که تکنولوژی نانو در حال رشد است و شمار انواع نانومواد و کاربردهای آن در حال افزایش است، بنابراین احتمال این که این مواد به میزان قابل توجهی به محیط زیست انتشار پیدا کنند، یک واقعیت است که با افزایش نگرانی‌ها از جهت سلامت انسان و محیط زیست همراه است. یکی از مهم‌ترین و نخستین اثرات ناشی از نانوذرات بر جانداران آبزی، آسیب وارده به محتوای ژنتیکی است. نانوذرات با ورود به پیکره یک جاندار می‌توانند به ماکروملکول‌هایی

مثل اسیدهای نوکلئیک (DNA) آسیب رسانده، موجبات تخریب آن‌ها را فراهم کند. نانوذرات گوناگونی مانند نانوذرات نقره، نانوذرات اکسید روی، نانوذرات اکسید تیتانیوم و غیره به علت خاصیت ژنوتوکسیک خود می‌توانند با اتصال به رشته DNA موجب شکستگی تک رشته یا دو رشته ملکول DNA شوند. همچنین رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) ناشی از آن‌ها می‌توانند با اکسید کردن ترکیبات ساختاری DNA به ویژه بازهای آلی موجب شکستن DNA شوند. به نظر می‌رسد آسیب DNA ناشی از مواد ژنوبیوتیک، عمدتا به صورت تغییرات در ستون فسفات، قند و یا تغییرات پایه‌ای مانند آلکیلاسیون‌ها، پیوندهای متقاطع و یا ایجاد ترکیب‌های اضافی DNA باشد (Frenzilli et al., 2009).

مطالعه حاضر نشان داد که بیشترین سطح آسیب DNA در دو بافت کبد و آبشش در غلظت ۸۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذره اکسیدروی ZNO در روز پنجم دیده شد و میزان شکستگی DNA در بافت آبشش بیشتر بود. Wise و همکاران (۲۰۱۰) اثرات سمیت سلولی و سمیت ژنتیکی نانوذره نقره را بر روی سلول‌های لاین ماهی مداکا (*Oryzias latipes*) مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که در تیمارها قرار گرفته در معرض غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۳، ۳ و ۵ میکروگرم در سانتی‌مترمربع نانونقره، اختلالات کروموزومی و آنئوپلوپیدی (تعداد غیرطبیعی کروموزوم) رخ داد (Wise et al., 2010). نتایج حاصل از این مطالعه اثرات سمیت سلولی و ژنتیکی نانوذره نقره را برای سلول‌های ماهی در محیط کشت سلولی به اثبات رساند. مطالعات Guilherm و همکاران (۲۰۱۰) بر روی مارماهی *Anguila anguila* پس از مواجهه با آفت‌کش رانداپ گلی فسات نشان داد که تفاوت سطح آسیب ژنومی بین‌بافتی تحت تاثیر عواملی مثل نوع گونه، نوع و غلظت سم و مدت زمان مواجهه با سم قرار دارد و انواع مختلف سلول در بافت‌های مختلف بر حسب مواد آلاینده حساسیت‌های متفاوتی نسبت به آسیب DNA دارند. بنابراین بافت‌های مختلف ماهی ظرفیت‌های متفاوتی در نگهداری و تجمع سموم دارند (Ahmed et al., 2013). بافت کبد به علت دخیل بودن در امر متابولیسم و سم زدایی از بدن، شاخص مناسبی برای مطالعات آسیب شناسی ژنتیکی است (Devaux et al., 1997). سلول‌های آبشش نیز از حساسیت بالایی در مقابل ترکیبات و عوامل مخرب برخودار هستند. این اندام یکی از اولین بافت-هایی است که به صورت مستقیم در معرض

آسیب محیطی قرار دارد (Fassbendre and Braunbeck, 2013).

در مطالعه‌ای با مقایسه دو بافت آبشش و لنفوسیت دریافتند که بیشترین میزان آسیب DNA در بافت آبشش ایجاد شد. به این خاطر که آبشش اندامی است که به صورت پیوسته و مستقیم در ارتباط با مواد شیمیایی محلول است. این امر در نهایت باعث آسیب DNA می‌شود (Ali et al., 2008).

در مطالعه حاضر، مدت زمان مواجهه با سم اثر معنی‌داری بر روی روند تغییرات در آسیب DNA در بافت‌های مورد بررسی داشت به طوری‌که با افزایش دوره مواجهه، تغییراتی در میزان آسیب DNA در هر دو بافت مشاهده شد. نتایج نشان می‌دهد که میزان آسیب DNA در هر دو بافت در روز ۱۰ کاهش یافت که این نتایج با نتایج مطالعه Henao و همکارانش (۲۰۰۵) روی ماهی تیلاپیا در مواجهه با آفت‌کش سایپرمترین و دیازینون با غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۱۰و ۵ میلی‌گرم در لیتر همخوانی داشت. همچنین در مطالعه‌ای که Sharma و همکاران (۲۰۰۷) بر روی ماهی *Mystus vittatus* انجام دادند، بیشترین میزان آسیب DNA در همه بافت‌ها یک روز پس از مواجهه با سم مشاهده شد و با ادامه آزمایش، میزان آسیب تا روز هفتم به صورت واضحی کاهش یافت. دو پدیده ترمیم در شکستگی ایجاد شده و از بین رفتن سلول-هایی که آسیب زیادی به آن‌ها وارد شده، می-تواند به مرور زمان باعث کاهش سطح آسیب شود (Banu et al., 2001).

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که آسیب DNA در دو بافت کبد و آبشش ماهی با افزایش غلظت میزان شکستگی معنی‌دار بود و بین تیمارها اختلاف مشاهده شد. این نتایج با مطالعه‌ای که تاثیر نانوذرات نقره و طلا را بر روی سلول‌های کبدی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسی قرار داد و نشان داد که نانوذرات حتی در غلظت‌های بسیارکم هم اثرات منفی زیادی بر کبد ماهی برجای گذاشت و با افزایش غلظت نانوذرات میزان شکستگی افزایش یافت (Farkas et al., 2010) مشابه بود.

طی مطالعات بسیاری که انجام شده است مشخص شد که از میان ویتامین‌ها، ویتامین C بر سیستم ایمنی و افزایش مقاومت آبزیان نقش موثرتری نسبت به بقیه ویتامین‌ها دارد. از نظر فرمول شیمیایی این ویتامین از ساده‌ترین انواع ویتامین‌ها است و شباهت ساختمانی نسبی با اسید آسکوربیک دارد. مطالعات نشان می‌دهند که اکثر ماهیان استخوانی به دلیل عدم وجود آنزیمی تحت عنوان ال- گلونولاکتون اکسیداز

قادر به سنتز ویتامین C از ال- گلوکز نیستند. از این رو، ضروری است که مقدار مورد نیاز این ویتامین از راه تغذیه خارجی تامین شود (رسولی، ۱۳۸۴). در بررسی عملکرد هم‌زمان ویتامین‌های E و C بر روی ایمنی ماهی آزاد، مشخص شد که با افزایش ویتامین C در تیمار اثر بخشی آن بیشتر شد، اما این پدیده در مورد ویتامین E مشاهده نشد. بر همین اساس می‌توان اذعان داشت که عامل اصلی تحریک سیستم ایمنی عمومی در ماهی آزاد ویتامین C بوده است که نقش بیشتری در مقایسه با ویتامین E داشته است (De Menezes et al., 2006). سن ماهی نیز می‌تواند برمیزان نیاز ویتامین C اثر داشته باشد. میزان نیاز ویتامین C برای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان حدود ۴۰۰-۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم است. این مساله با مطالعات دیگری که در این زمینه انجام شده است نیز هم‌خوانی دارد.

نتایج این مطالعه نشان داد که مکمل ویتامین C به تنهایی موجب تغییراتی در میزان شکستگی DNA در بافت کبد و آبشش شد که شامل کاهش معنی‌دار شکستگی در غلظت ۸۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C در روز ۵ و ۱۰ بود. طی مطالعات انجام شده ویتامین C دارای توانایی دهندگی الکترون است. به طوری که به عنوان احیا کننده رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) عمل می‌کند و دارای نقش تعدیل کننده‌ای برفعالیت دفاع آنتی‌اکسیدانی دارد (Sies and Stahl, 1995).

نتایج این مطالعه نشان داد میزان شکستگی DNA در روز ۵ با افزایش غلظت ویتامین C (۴۰۰ میلی گرم در کیلوگرم) و افزایش غلظت نانو اکسید روی (۸۰ میلی‌گرم در لیتر) افزایش پیدا کرد. که علت این افزایش احتمالا عدم توانایی ویتامین C در تجزیه و احیای رادیکال-های آزاد است. چرا که رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) ناشی از آن‌ها می‌توانند با اکسید کردن ترکیبات ساختاری DNA به ویژه بازهای آلی موجب شکست DNA شود. ولی با افزایش غلظت ویتامین C (۸۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) میزان شکستگی DNA کاهش پیدا کرد که می‌تواند به دلیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی ویتامین C در احیای رادیکال‌های آزاد باشد. همچنین بعد از مواجهه بافت کبد و آبشش پس از ۱۰ روز با غلظت بالای ویتامین C و نانو اکسید روی ZNO (۸۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C و ۸۰ میلی‌گرم در لیتر نانواکسید روی) شکستگی کاهش یافت که علت آن ممکن است به دلیل اثر ویتامین C در مدت زمان طولانی بر تخریب ناشی از نانواکسید روی ZNO یا پدیده

ترمیم در شکستگی ایجاد شده و یا از بین رفتن سلول‌هایی که آسیب زیادی به آن‌ها وارد شده بود، باشد. از دیرباز اثبات شده است که ویتامین‌های محلول در آب همانند ویتامین C در بدن قابلیت ذخیره ندارند و در مقادیر بالاتر اثر بهتری از خود نشان می‌دهند (Halver, 1980). طبق پژوهشی که توسط Winston و همکاران در سال ۱۹۹۸ انجام گرفت مشخص شد ویتامین E، اسید آسکوربیک (ویتامین C)، یوریک اسید و گلوتاتیون، در حدود ۷۰ درصد از سهم آنتی‌اکسیدانی کل را به خود اختصاص می‌دهند. نتایج این مطالعه نشان دهنده سهم قابل توجه ویتامین‌های E و C را از ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل نشان می‌دهد.

مطالعه حاضر نشان می‌دهد که روش میانگین وزنی می‌تواند برای کمیت شکستگی رشته DNA استفاده شود. ژل الکتروفورز روش حساسی برای تشخیص شکستگی دو رشته DNA در غلظت‌های پایین نانوذره اکسیدروی ZNO در آب‌های سطحی است. بنابراین می‌توان این‌گونه بیان کرد که در تکنیک شکستگی DNA با الکتروفورز علاوه بر یک رشته DNA از دو رشته DNA نیز اطلاعات کاملی را فراهم می‌آید. همچنین روشی بسیار کم هزینه و ساده است و می‌توان از آن در مطالعات سم‌شناسی ژنتیکی و پایش زیستی استفاده کرد. همچنین نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که ویتامین C در روش خوراکی، ایمنی غیر اختصاصی را در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تحریک می‌کند و می‌تواند باعث بهبود شکستگی DNA شود و اثرات تخریبی ناشی از نانوذرات اکسید روی ZNO بر فعالیت بافت کبد و آبشش را نیز کاهش دهد.

منابع

خدابخشی ل. و پورباقر ه. ۱۳۹۲. اثر نانوذره اکسید روی (ZnO) بر بافت کبد و آبشش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). سمینار دانشجویی دانشگاه تهران. ۵۴ص.

رسولی س. و عبدی ک. ۱۳۸۴. مبانی ایمنی‌شناسی ماهیان. انتشارات سیمرغ. ۲۵۱ص.

Ahmed M.K., Kundu G.K., Al-Mamun M.H., Sarkar S.K., Akter M.S. and Khan M.S. 2013. Chromium (VI) induced acute toxicity and genotoxicity in freshwater stinging catfish, *Heteropneustes fossilis*. Journal of Ecotoxicology and environmental Safety, 92: 64–70.

Ali D., Nagpure N.S., Kumar S., Kumar R. and Kushwaha B. 2008. Genotoxicity assessment of acute exposure of chlorpyrifos to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. Journal of Chemosphere, 71(10): 1823–1831.

Azewedo P.A., Leeson S., Cho C.Y. and Bureau D.P. 2004. Growth and feed utilization of large size rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) reared in freshwater: Diet and species effects, and responses over time. Aquaculture Nutrition, 10(6): 401–411.

Banaee M., Mirvaghefi A. R., Rafei G. R. and Majazi Amiri B. 2008. Effect of sub-lethal diazinon concentration on blood plasma¬ biochemistry. International Journal of Environmental Research, 2(2), 189-198.

Banu B.S., Danadevi K., Rahman M.F., Ahuja Y.R. and Kaiser J. 2001. Genotoxic effect of monocrotophos to sentinel species using comet assay. Food and Chemical Toxicology, 39(4): 361–366.

Borm P.J., Robbins S., Haubold T., Kuhlbusch D. and Fissan H. 2006. The potential risks of nanomaterials: A review carried out for ECETOC. Particle Fibre Toxicol., 3: 11. DOI: 10.1186/1743- 8977-3-1

Chae Y., Pham C.H., Lee J., Bae Y., and Gu, M.2009. Evalution of the toxic impac of silver nanoparticles on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Aguat Toxicol,4;94(4):320-7.

Chapman P.M., Dexter R.N. and Long E.R. 1998. Synoptic measures of sediments contamination, toxicity and infaunal-community composition

(the Sediment Quality Triad) in San Francisco Bay. Marine Ecological Progress Series, 37: 75–93.

Dabrowski K. 2001. Ascorbic Acid in Aquatic Organisms Status and Perspectives. CRC Press, USA. 280P.

De Menezes G.C., Tavares-Dias M., Ono E.A., De Andrade J.I.A., Brasil E.M., Roubach R., Urbinati E.C., Marcon J.L. and Affonso E.G. 2006. The influence of dietary vitamin C and E supplementation on the physiological response of pirarucu, *Arapaima gigas*, in net culture. Comparative Biochemistry and Physiology A, 145(2): 9–274.

Devaux A., Pesonen M. and Monod G. 1997. Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes. Toxicology in Vitro, 11(1-2): 71–79.

Farkas J., Christian P., Urrea J.A.G. and Roos N. 2010. Effect of silver and gold nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocyteses. Aquatic Toxicology, 96: 44–52.

Fassbender C. and Braunbeck T. 2013. Assessment of genotoxicity in gonads, liver and gills of zebrafish (*Danio rerio*) by use of the comet assay and micronucleus test after in vivo exposure to methyl methanesulfonate. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 91(1): 89–95.

Ferrari M. 2005. Cancer nanotechnology: opportunities and challeng. Nat rey cancer, 5: 161–171.

Frenzilli G., Nigro M. and Lyons B.P. 2009. The comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environment. Mutation Research, Reviews in Mutation Research, 681: 80–92.

Guilherme S., Gaivao I., Santos M.A. and Pacheco M. 2010. European eel (*Anguilla anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup®- a glyphosate-based herbicide. Mutagenesis, 25(5): 523–530.

Halver J.E. 1980. Vitamin requirements of finfish. P: 8–191. In: Santos W., Lopes N., Barbosa J.J., Chaves D. and Valente J.V. (Eds.). Nutrition and Food Science, Present Knowledge and Utilization. Plenum Press, New York.

Handy R.D., Al-Bairuty G., Al-Jubory A., Ramsden C.S., Boyle D. and Shaw, B.J. 2006. Effects of manufactured nanomaterials on fishes: a target organ and body systems physiology approach. J Fish Biol. 79(4): 821-853.

Henao B., Palacio J.A. and Camargo M. 2005. Evaluación genotóxica de

los plaguicidas cipermetrina y diazinón en tilapia roja (*Oreochromis* sp.). Journal of Actualidades Biológicas, 27(82): 43–55.

Lee R.F. and Steinert S. 2003. Use of single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. Journal of Mutation Research, 544: 43–64.

Li M.H. and Robinson E.H. 1999. Dietary ascorbic acid requirement for growth and health in fish. Journal of Applied Aquaculture, 9(2): 53–79.

Mitchelmore C.L. and Chipman J.K. 1997. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the Comet assay in environmental monitoring. Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 399(2): 135–147.

Muntro D., Marrero M., Izquierdo M.S., Robaina L., Vergara J.M. and Tort L. 1999. Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. Aquaculture, 171(3-4): 269–278.

N.R.C. 2011. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. National Academies Press, Washington DC, USA. 392P.

Safahieh A., Hedayati A., Savari A. and Movahedinia A. 2011. Effect of sublethal dose of mercury toxicity on liver cells and tissue of yellowfin seabream. Journal of Toxicology and Industrial Health: 28(7): 583-592..

Sato M., Kondo T., Yoshinaka R. and Ikeda S. 1982. Effect of dietary ascorbic acid levels on collagen formation in rainbow trout. Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish. 48(4): 553-556.

Sharma S., Nagpure N.S., Kumar R., Pandey S., Srivastava S.K., Singh P.J. and Mathur P.K. 2007. Studies on the genotoxicity of endosulfan in different tissues of fresh water fish *Mystus vittatus* using the comet assay. Journal of Archives of environmental contamination and toxicology, 53(4):617-623.

Sies H. and Stahl W. 1995. Vitamins E and C, betacarotene, and other carotenoids as antioxidants. The American Journal of Clinical Nutrition, 62(6): 1315–1321.

Singh N., Monshion B., Jenkis G.I.S., Griffiths S.M., Williams P.M. and Moffeis T.O. 2009. Nanogenotoxicology: the DNA damaging potential engineered nanomaterials. Biomaterials, 30: 3897–3974.

Treves-Brown K. 2000. Applied Fish Pharmacology. Master of Arts, Cambridge, UK. 302P.

Verlhac V., Obach A., Gabaudan J., Schuep W. and Hole R. 1998. Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss)*. Fish and shellfish Immunology, 8: 409-424.

Winston G.W., Regoli F., Dugas A.J., Fong J.H. and Blanchard K.A. 1998. A rapid G.C. assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids, free radical. Free Radical Biology and Medicine, 24(3): 93–480.

Wise J.P., Goodale B.C., Wise S.S., Craig G.A., Pongan A.F., Walter R.B., Thompson W.D., Ng A.K., Aboueissa A.M., Mitani H., Spalding M.J. and Mason M.D. 2010. Silver nanospheres are cytotoxic and genotoxic to fish cells. Aquatic Toxicology, 97(1): 34–41.

Aquatic Physiology and Biotechnology

Vol. 4, No. 4, Winter 2017

The Protective effect of vitamin C on DNA breakage of gills and liver cells in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to different concentrations of zinc oxide nanoparticles (ZnO)

Elahe Chahardeh Baladehi[1]*, Ali Akbar Hedayati[2], Hamed Kolangi Miandareh[3], Tahereh Bagheri[4]

Received: April 2016 Accepted: June 2016

Abstract

This study was to evaluate the effect of emerging pollutant nanoparticles of zinc oxide (ZnO) and safety effects of vitamin C on the DNA breakage in the liver and gill cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish were exposed to nanoparticles on three levels (0, 40 and 80 mg/L) and three levels of vitamin C (0, 400 and 800 mg/Kg) in 9 treatments with 3 replications. Fish with average weight 170 ± 10 gr were treated in 10 days. Liver and gill tissues were sampled in the fifth and tenth days at summer 2015. After the isolation, target samples were stored in microtubes contain alcohol 96%. DNA extraction was run with gel electrophoresis. At the end of the test, it was photographed with Gel-doc. Breakage of DNA was determined using the weighted average. According to the results, in liver and gill, the effect of zinc oxide nanoparticle, vitamin C and interaction with time-concentration were quite significant on the level of DNA damage. Most damages on liver and gill tissues in 80 mg/L of zinc oxide nanoparticles were on the 5th day. Also in both tissues, DNA breakage rate was on the 10th day. However, vitamin C has reduced DNA breakage.

Key words: *Aquatic, Pollution, Improve Resistance, Nano-toxicology*.

1- M.Sc. Student in Fisheries, Fisheries Department, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

2- Assistant Professor, Fisheries Department, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

3- Associate Professor, Fisheries Department, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

4- Assistant Professor, Fisheries Department, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

*Corresponding Author: baladehi.elahe@ yahoo.com