

سمیت سه نانوماده مبتنی بر کربن برای کرم‌های خاکی: اثر مورفولوژی بر بیومارکرها سیتوتوکسیسیتی و

متابولومیکس

محدثه عطایی^۱، فاطمه همتی^۲، زهرا کامیستانی^۳، بابک کرمی^۴

1: دانشجوی کارشناسی گروه صنایع غذایی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

Email: iranscience20@gmail.com

2: دانشجوی کارشناسی گروه صنایع غذایی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

3: دانشجوی کارشناسی گروه صنایع غذایی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

4: استادیار گروه صنایع غذایی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

چکیده:

استفاده گسترده از نانومواد مبتنی بر کربن (CNS) منجر به تجمع آن‌ها در اکوسیستم‌های خاکی شده و به‌طور پایدار تنوع زیستی فون و کل محیط زیست را تهدید می‌کند. باین حال، درباره تأثیر CNS با غلظت‌های بالا بر زیست‌مندان خاکی نسبت به موجودات جوی یا آبی اطلاعات کمتری وجود دارد. در این مطالعه، اثرات سه نوع CN شامل CB (carbon black)، RGO (reduced graphene oxide) و SWCNT (single-wall carbon nanotube) بر *Eisenia fetida* به‌عنوان یک بی‌مهره خاکی هشداردهنده زود هنگام برای رویدادهای آلودگی مقایسه شد. مشاهدات نشان دادند که سمیت CNS برای کرم‌های خاکی وابسته به مورفولوژی است. نسبت منظر (aspect ratio) و اندازه هیدرودینامیکی CNS به احتمال زیاد اثرات نامطلوب آن‌ها را بر وزن بدن، سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی، کوئلوموسیت‌ها و پروفایل‌های متابولومیکس غیرهدفمند کرم‌ها تعیین کرده‌اند. تحلیل‌های رگرسیون چندمتغیره نشان داد که CNS با نسبت منظر بالاتر (SWCNT) و سپس RGO تنش بیشتری بر فرایندهای متابولیکی کرم‌های خاکی وارد کردند. زیست‌پذیری سلولی و نسبت phenylalanine/leucine بیومارک‌های متمایزی بودند که میزان اثرات زیان‌بار اشکال مختلف CNS را نشان دادند. تغییرات متابولیت غشایی choline بیانگر آن بود که آسیب بالقوه CNS نوک‌تیز احتمالاً ناشی از اختلال در غشاء بوده است. این نتایج به‌طور قوی نشان می‌دهند که ریسک زیست‌محیطی خاکی CNS با مورفولوژی ذرات آن‌ها مرتبط است و به درک جامع‌تر nano-agriculture کمک می‌کند.

کلمات کلیدی: نانومواد مبتنی بر کربن، کربن بلک، اکسید گرافن کاهش‌یافته، نانولوله کربنی تک‌دیواره

مقدمه:

نانومواد پیشرفته مزایای قابل توجه و منحصر به فردی فراهم می‌کنند. در میان آن‌ها، نانومواد مبتنی بر کربن (CNS) در سطح جهانی استفاده می‌شوند. Carbon black (CB)، شکل صنعتی دوده است که طی احتراق ناقص هیدروکربن‌ها از فاز گازی مجدداً چگالش می‌یابد. CB معمولاً به عنوان تقویت کننده در تایرهای لاستیکی و نیز در صنایع جوهر چاپ و رنگ به کار می‌رود. Reduced graphene oxide (RGO) یک ورقه دوبردی است که از graphene oxide (GO) از طریق تیمارهای حرارتی، شیمیایی یا الکتریکی مشتق می‌شود. نانولوله کربنی تک دیواره (single-wall carbon nanotube; SWCNT) استوانه‌ای است که با رول کردن یک ورقه گرافن تاخورد به شکل لوله تشکیل می‌شود. نانولوله‌های گرافن و نانولوله‌های کربنی (CNT) به دلیل ساختار اتمی تک لایه sp^2 با آرایش تعریف شده، خواص منحصر به فرد مشابهی در فیزیک، شیمی، الکترونیک و مکانیک دارند و پتانسیل گسترده‌ای برای کاربردهای فناورانه نظیر ابررسانایی (superconductivity) و ذخیره سازی انرژی (energy storage) نشان می‌دهند. با افزایش تولید و کاربردهای جهانی، CNS به طور اجتناب ناپذیر در طول چرخه عمر خود، از سنتز تا دفع، وارد محیط زیست می‌شوند. در این راستا، مطالعات متعددی بر ایمنی زیست محیطی آن‌ها تمرکز کرده و نشان داده‌اند که CNS برای سلول‌های مدل و انسانی سیتوتوکسیک هستند. برای حیوانات آزمایشگاهی سمیت قابل توجه دارند. برای موجودات آبی مانند *Daphnia magna* و *Danio rerio* سمیت نشان می‌دهند و دارای فعالیت ضد میکروبی هستند. خاک احتمالاً یک مخزن مهم برای نانومواد مهندسی شده از طریق رواناب سطحی، آبیاری با لجن و مسیرهای دیگر است. اخیراً اشاره شده است که کامپوزیت‌های CN به دلیل عملکرد بالای انتقال بار و جذب، برای تصفیه آب و پالایش خاک کاربرد خواهند داشت. علاوه بر این، گزارش شده است که CNS تعبیه شده در کودها می‌توانند با افزایش جذب آب و مواد مغذی، بیماری‌های گیاهی را سرکوب کرده و رشد گیاه را تقویت کنند. با این حال، ورود عمدی CNS خطر برای ماهیت بکر اکوسیستم‌های کشاورزی را افزایش داده و زیستگاه موجودات خشکی و تنوع زیستی فون را تهدید می‌کند. کرم‌های خاکی نقش مهمی در اکوسیستم‌های خشکی دارند و پاسخ‌های بیوشیمیایی آن‌ها به عنوان هشدار زودهنگام آلودگی خاک به فلزات سنگین و آفت کش‌ها در نظر گرفته می‌شود. حساسیت کرم‌های خاکی به نانومواد نوظهور در خاک‌ها نشان داده شده است؛ برای مثال، پس از مواجهه با 500 mg/kg نانولوله‌های کربنی چند دیواره (MWCNTs)، رفتار اجتنابی و آسیب DNA در آن‌ها القا می‌شود. انواع مختلف CNS می‌توانند کرم‌های خاکی را به وضعیت اولیه استرس اکسیداتیو وارد کنند و این مکانیسم پذیرفته شده‌ترین توضیح برای سمیت CN است. علاوه بر این، متابولومیکس فناوری مفیدی برای مطالعه سمیت زیرکشنده نانومواد است. گروه Simpson پاسخ کرم‌های خاکی به نانوذرات متعدد را با استفاده از متابولومیکس مبتنی بر $^1\text{H NMR}$ ارزیابی کرده‌اند. با این حال، تغییرات پاسخ متابولیکی کرم‌های خاکی به انواع مختلف CNS هنوز بررسی نشده است. مورفولوژی شکل یک نانوماده عامل مهمی در تعیین اثرات بیولوژیکی آن است (با مورفولوژی‌های مختلف ممکن است مکانیزم‌های مشابهی برای اثرات مثبت بر سلول‌های گوجه‌فرنگی داشته باشند. در مقابل، توان سمیت سیتوتوکسیک بر alveolar macrophages به ترتیب $\text{C}_{60} > \text{MWCNT} > \text{SWCNT}$ رتبه‌بندی شد نانوذرات نقره (AgNPs) سمیت وابسته به شکل نشان دادند (نانوکره‌ها نسبت به نانولوله‌ها و نانوسیم‌ها سمی‌تر بودند) برای مویچه‌های ریشه NaYF_4 . دوپ شده با لانتانید نیز وابستگی شکل ذره به تعامل با غشاء را نشان داد. با تعمیم این موضوع به بی‌مهرگان خاک، هیچ مطالعه‌ای به طور

سیستماتیک اثرات بیولوژیکی CNS با شکل‌های مختلف بر کرم‌های خاکی بررسی نکرده است. از این‌رو، در این مطالعه فرض شد که مورفولوژی CNS نقش قابل‌توجهی در تأثیر بر پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی کرم‌های خاکی در محیط‌های خاکی دارد. برای پر کردن این شکاف دانشی، ویژگی‌های سمی سه نانوذره کربنی با ابعاد نانو (nano-dimensions)، نسبت منظر (aspect ratios) تعریف‌شده به‌عنوان نسبت بیشینه طول جانبی به کمینه ضخامت یا قطر نانوذره و قطر هیدرودینامیکی (hydrodynamic diameter) مقایسه شد. بیومارکر استرس اکسیداتیو *Eisenia fetida* پس از مواجهه مستقیم با CNS روی کاغذ صافی به مدت ۴۸ ساعت و سمیت CNS بر coelomocytes در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) بررسی شد. تغییرات وزن بدن و پروفایل متابولیکی مبتنی بر LC-MS کرم‌های خاکی پس از مواجهه با CNS در خاک‌های آلوده به مدت ۲۸ روز نیز تحلیل گردید. هدف این مطالعه افزایش درک از روابط بین خواص CNS و سمیت آن‌ها برای فون خاک بود.

۲. بخش تجربی

۲.۱. مواد

پودر تجاری CB (<۹۵٪ خلوص) RGO دست‌نخورده (<۹۸٪ خلوص و >۱۰ لایه) و SWCNT (<۹۵٪ خلوص) تهیه

شد.

۲.۲. مشخصه‌یابی ذرات

مورفولوژی CNS تحت میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) مدل JEM-2100F مشاهده شد. مساحت سطح ویژه آن‌ها با استفاده از روش چندنقطه‌ای Brunauer-Emmett-Teller (BET) تعیین گردید. اندازه‌گیری پتانسیل زتا (ζ) بر روی CNS (0.1 mg/mL) در 0.۱ M NaNO₃ با pH تنظیم‌شده یا در محیط کشت سلولی با استفاده از Zetasizer Nano analyzer (Malvern, UK) انجام شد. پراکندگی نور دینامیکی (DLS) برای برآورد اندازه هیدرودینامیکی CNS در محیط کشت استفاده شد. طیف‌سنجی XPS سری Shimadzu-Kratos مجهز به منبع Al K α برای مطالعه وضعیت اکسیژن سطحی به‌کار رفت. طیف‌های FTIR با استفاده از اسپکترومتر Bruker Alpha در بازه طول موج ۴۰۰-۴۰۰۰ cm⁻¹ اندازه‌گیری شد. برای شناسایی نقص‌های ساختاری گرافیتی، پراکندگی رامان با LabRAM HR800 و طول موج لیزر ۶۳۳ nm انجام شد. ناخالصی‌های فلزی در CNS پس از فرایند هضم با استفاده از ICP-OES (inductively coupled plasma-optical emission spectrometer) تحلیل گردید.

۲.۳. حیوانات و آزمون‌های سمیت

۲.۳.۱. کرم‌های خاکی

کرم‌های خاکی بالغ و سالم *Eisenia fetida* (وزن متوسط 0.398 ± 0.056 g, $n = 270$) با clitellum و ساختار سنی همگن برای آزمون‌های سمیت استفاده شدند. تمام موجودات یک هفته پیش از مواجهه با خاک آزمایش سازگار شدند. [1]

۲.۳.۲. مواجهه تماس با کاغذ صافی

آزمون تماس با کاغذ صافی برای بررسی تعامل مستقیم CNS با کرم‌های خاکی انجام شد. کرم‌ها پیش از مواجهه، به مدت ۳ ساعت روی کاغذ صافی مرطوب و تمیز نگهداری شده و اجازه داده شد تا depurate شوند. ذرات CN (0.02 g) در محلول BSA (بوفالو سرم آلبومین) به غلظت ۵ mg/mL تازه معلق شدند و با استفاده از Dounce homogenizer (Kimble, USA) به تعداد ۵۰ ضربه هموژن‌سازی شدند، سپس به مدت ۳۰ دقیقه سونیکه شده و ۳۰ ثانیه ورتکس شدند. یک سوسپانسیون پایدار ذرات کربنی (1 mg/mL) تهیه شد و برای ساخت رقیق‌سازی‌های ۰.۰۰۷، ۰.۰۰۷ و ۰.۷ mg/mL استفاده گردید. سپس ۱ mL از سوسپانسیون بلافاصله روی کاغذ صافی چگالی ۸۵-۸۰ g/m² ریخته شد و در یک پتری دیش با قطر ۹ cm پخش شد. کاغذهای صافی کنترل با ۱ mL محلول BSA آماده شدند. ذرات با غلظت‌های سریالی (0.1-15.7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) روی کاغذ رسوب داده شدند. پس از خشک شدن، ۱ mL آب Milli-Q به هر پتری اضافه شد تا کاغذ صافی مرطوب شود. کرم‌ها شسته، خشک و در پتری‌ها قرار داده شدند. هر پتری با درپوش پوشانده شد (بدون مهر و موم). برای هر تیمار، ۱۰ تکرار انجام شد که هر تکرار شامل یک کرم در هر پتری بود. آزمون‌ها در تاریکی و دمای $20 \pm 1^\circ\text{C}$ به مدت ۴۸ ساعت انجام شدند. کنترل کیفیت روش با استفاده از ۲-chloracetamide به‌عنوان ماده مرجع، انجام شد. [2]

۲.۳.۳. مواجهه با خاک در شرایط انکوباسیون

خاک سطحی تقریباً عمق ۲۰ cm از یک سایت کشاورزی جمع‌آوری شد. پس از جمع‌آوری، نمونه‌های خاک در هوا خشک شده و از الک ۲ mm عبور داده شدند. pH خاک در محلول ۰.۰۱ M CaCl₂ برابر ۶.۷۶ بود و سایر ویژگی‌های خاک در جدول ۱ نشان داده شده است. مقدار ۰.۰۶ g یا ۰.۶ CN g در ۱۵۶ mL آب Milli-Q در یک بشر شیشه‌ای ۱ L با سطح مقطع تقریباً ۸۰ cm² پخش شد و به مدت ۲ ساعت اولتراسونیک شد. سپس ۶۰۰ g خاک (وزن خشک در هوا) به آرامی به سوسپانسیون‌ها اضافه شد و مخلوط‌ها با کاردک استیل ضدزنگ به‌طور شدید هم زده شدند تا غلظت‌های پیش‌تعیین شده ۱۰۰ و ۱۰۰۰ mg CN/kg خاک به‌صورت یکنواخت حاصل شود. محتوای آب به اندازه کافی بود تا $50 \pm 1\%$ ظرفیت نگهداری حداکثر آب خاک برقرار شود. خاک تیمار شده دارای عمق ۷-۸ cm و $pH = 7.0 \pm 0.2$ ($n=21$) بود. هر تیمار برای تمام CNS سه تکرار (containers) انجام شد و سه کنترل (CK) بدون CN به‌صورت همزمان برقرار شد. تمامی ۲۱ ظرف پس از توزین،

تحت شرایط انکوباسیون به مدت یک هفته برای تعادل نگهداری شدند. در ابتدای انکوباسیون، ۵ گرم کود گاوی عاری از آلودگی روی سطح کشت کرم‌ها اضافه شد. سپس ۲۱۰ گرم خاکی شسته، خشک و وزن‌کشی شدند و ۱۰ گرم به صورت تصادفی در هر ظرف قرار داده شدند. ظرف‌ها با فویل آلومینیومی پوشانده شدند تا تهویه امکان‌پذیر باشد. ظرف‌ها در چمبر اقلیمی با دمای $20 \pm 1^\circ\text{C}$ و رطوبت محیط $79\% \pm 1\%$ به مدت ۲۸ روز نگهداری شدند و رطوبت خاک به صورت هفتگی با توزین مجدد تنظیم شد. پس از دوره انکوباسیون، کرم‌ها جمع‌آوری، شمارش، با آب Milli-Q شسته و با دستمال خشک شدند. سپس وزن‌کشی، depurate روی کاغذ صافی مرطوب به مدت ۲۴ ساعت، فلاش فریز با نیتروژن مایع و نگهداری در -80°C تا زمان آنالیز انجام شد. [3]

جدول ۱

ویژگی‌های خاک طبیعی جمع‌آوری شده از یک سایت کشاورزی

pH	Organic matter (%)	WHC (%)	Texture (%)			The total amount of heavy metal (mg/kg)				
			<0.002 mm	0.002–0.02 mm	0.02–2 mm	Cu	Ni	Pb	Zn	Cd
6.76 ± 0.07	2.7 ± 0.0	60.5 ± 1.5	8.01	32.11	59.88	3.9	2.58	4.3	234	0.28

* Organic matter was measured by soil weight loss on ignition at 360°C (McShane et al., 2012). WHC: water holding capacity, measured according to the method described in the OECD guideline (OECD, 2004).

۲.۳.۴. استخراج کوئلوموسیت‌ها، تیمار و آزمون سیتوتوکسیسیته

کوئلوموسیت‌های کرم خاکی (سلول‌های اولیه) با استفاده از روش ethanol extrusion با تغییرات جزئی جمع‌آوری شدند، همان‌طور که در مطالعه قبلی ما شرح داده شد. سلول‌ها در محیط کشت RPMI-1640 (Keygen Biotech, Nanjing, China) حاوی ۱۰٪ FBS Gibco و ۸۰ U/mL پنی‌سیلین/استرپتومایسین کشت داده شدند. تراکم سوسپانسیون سلولی به 5×10^5 سلول/mL تنظیم شد و ۱۰۰ μL به هر چاهک از یک صفحه ۹۶ چاهکی اضافه گردید. ذرات کربنی در محیط کشت با استفاده از روش هموژنیزاسیون-اولتراسونیک که پیش‌تر شرح داده شد، معلق شدند. حجم مساوی از رقیق‌سازی‌های سریالی CN اضافه شد تا غلظت نهایی مواجهه ۱–۱۰۰ mg/L حاصل شود. هر تیمار شامل ۴ تکرار بود. سلول‌های تازه بدون تیمار به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. صفحه‌ها در شرایط ایستا، تاریکی و دمای 20°C به مدت ۱۲ h نگهداری شدند. سیتوتوکسیسیته با استفاده از Cell Counting Kit-8 (ApexBio, USA) آزمایش شد. سلول‌های تیمار شده دو بار با PBS شسته شده و با WST-8 (water-soluble tetrazolium salt) به مدت ۲ h انکوبه شدند. سپس جذب نوری در ۴۵۰ nm مرجع ۶۵۰ nm با میکروپلیت‌ریدر (Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) اندازه‌گیری شد. زیست‌پذیری سلول‌ها به صورت درصد گروه کنترل بیان شد [4].

۲.۳.۵. آزمون تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)

تولید ROS داخل سلولی با استفاده از ۷،۲-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) اندازه‌گیری شد. سوسپانسیون سلولی 2×10^5 سلول/mL در ۹۶ well plate در معرض غلظت‌های نهایی مختلف (1-100 mg/L) قرار گرفت. $10 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ به عنوان کنترل مثبت و RPMI-1640 بدون نانوذره به عنوان کنترل منفی استفاده شد. پس از ۲ ساعت انکوباسیون، CNS شسته شده و $5 \mu\text{L DCFH-DA}$ (200 μM) به هر چاهک اضافه شد. صفحه به مدت ۴ ساعت دیگر در 20°C و تاریکی انکوبه شد. نمونه‌ها دو بار با PBS (300 g) شسته و در $200 \mu\text{L PBS}$ مجدداً معلق شدند. فلورسانس با فلوریمتر F-7000 (Hitachi, Japan) در $\lambda_{\text{exc}} = 500 \text{ nm}$ و $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$ اندازه‌گیری شد. آزمون‌های کنترل با اضافه کردن CNS به محیط بدون سلول انجام شد تا احتمال خوانش فلورسانس ناشی از واکنش DCFH-DA با خود CN بررسی شود. مطابق طیف فلورسانس سه‌بعدی (Fig. S1) هیچ تداخل فلورسانس خودبخودی ریبوفلاوین در کوئلوموسیت‌ها مشاهده نشد. [5]

۲.۴. تحلیل‌های بیوشیمیایی

۲.۴.۱. فعالیت‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و محتوای مالون دی‌آلدهید (MDA)

پس از ۴۸ ساعت تماس با کاغذ صافی، کرم‌های خاکی زنده از هر تیمار طبق روش تمیز تقسیم‌بندی شدند. هوموژنات با افزودن نمونه و بافر Tris-HCl سرد (50 mM, pH 7.6) به نسبت ۹/۱ w/v در یک لوله سانتریفیوژ ۵۰ mL و هموژنیزاسیون با F10 electric homogenizer تهیه شد. هوموژنات‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در 4°C و سرعت ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند و سوپرناتانت‌ها جمع‌آوری گردید. فعالیت‌های SOD و CAT و محتوای MDA با پیروی دقیق از پروتکل‌های سازنده کیت‌ها اندازه‌گیری شد. جزئیات اندازه‌گیری در متن مکمل S1 شرح داده شده است [1].

۲.۴.۲. تحلیل متابولیت‌ها

پس از مواجهه خاکی، ۵ کرم خاکی از یک ظرف به دو زیرنمونه تقسیم شده و با نیتروژن مایع آسیاب شدند. هر نمونه (50 mg) به $500 \mu\text{L}$ محلول متانول HPLC grade حاوی $5 \mu\text{g/mL L-2-chloro-phenylalanine}$ (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA) به عنوان استاندارد داخلی در یک لوله سانتریفیوژ ۱.۵ mL اضافه شد. نمونه‌ها (شش مجموعه برای هر تیمار، در مجموع ۴۲ نمونه) به مدت ۲۴۰ S در 50°C و ۴ Hz هموژنیزه، به مدت ۲ دقیقه ورتکس و ۱ دقیقه ساکن شدند، سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲,۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردیدند. سوپرناتانت استخراج‌شده ($100 \mu\text{L}$) در ویال نمونه با لوله داخلی برای LC-MS قرار گرفت. تحلیل روی Agilent 1290 Infinity UPLC مجهز به ستون Waters ACQUITY UPLC HSS T3 ($2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$, $2.5 \mu\text{m}$) و طیف‌سنجی جرمی Agilent 6545 UHD QTOF-MS در TinyGene Bio-Tech (Shanghai) Co., Ltd. انجام شد. فازهای متحرک شامل استون‌نیتریل (Merck) و آب فوق‌العاده خالص با ۰.۱٪ فرمیک اسید (Sigma-Aldrich) با سرعت جریان

۰.۳۵ mL/min بودند. منبع یون‌سازی Electrospray در حالت یون مثبت و بازه اسکن m/z 50–3000 استفاده شد. پارامترهای جزئی LC-MS در جدول S1 آمده است [1].

۲.۵. تحلیل‌های آماری

داده‌های خام LC-MS با دقت و مطابق روش شرح داده‌شده در متن مکمل S2 پردازش شدند. تحلیل‌های OPLS-PCA (unsupervised) و DA (supervised orthogonal partial least squares discriminant) (principal component analysis) برای طبقه‌بندی و خوشه‌بندی پروفایل متابولیک کرم‌های خاکی مربوط به مواجهه با CNs به کار رفت (fold cross-validation (CV). برای تعیین ابعاد مدل OPLS-DA (تعداد مؤلفه‌های معنادار) استفاده شد. سهم مربعات مجموع متغیرهای $X (R^2X)$ و متغیرهای $Y (R^2Y)$ که توسط مؤلفه‌ها توضیح داده می‌شد گزارش شد تا میزان انطباق مدل با داده‌های آموزش مشخص گردد. Q^2Y که از CV برآورد شد، به عنوان شاخص اولیه قابلیت پیش‌بینی مدل استفاده شد. برای اعتبارسنجی، ۴۰۰ بار جایگشت برچسب‌های کلاس انجام شد تا توزیع مرجع Q^2Y ایجاد شود و با مقدار مشاهده‌شده مقایسه شود تا معناداری مدل تعیین گردد (Westerhuis) و همکاران، ۲۰۰۸؛ Phipson و Smyth، ۲۰۱۰). (جزئیات بیشتر درباره CV و آزمون جایگشت در متن مکمل S2 آمده است. برای تحلیل معنی‌داری آماری بین تیمارها، از ANOVA یک‌طرفه و سپس Least Significant Difference (LSD) multiple comparisons یا در صورت عدم برابری واریانس‌ها، Kruskal–Wallis و پس از آن Nemenyi post hoc test استفاده شد. معنی‌داری آماری در سطح $p < 0.05$ پذیرفته شد. [6]

۳. بحث

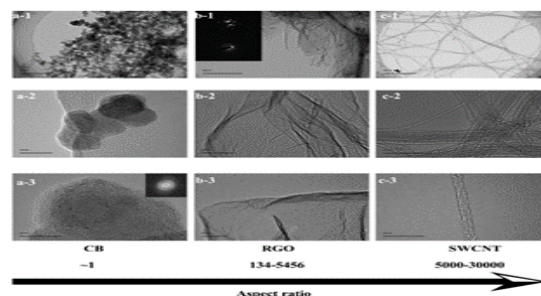
۳.۱. مشخصه‌یابی CN

همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، قطر اولیه CB ها بین ۲۰–۷۰ nm بود و نسبت منظر (aspect ratio) آن‌ها تقریباً ۱ بود که ناشی از شکل تقریباً کروی آن‌ها است. ورقه‌های RGO دارای ضخامت ۰.۵۵–۳.۷۴ nm و اندازه جانبی ۰.۵–۳ μm بودند، بنابراین نسبت منظر بالای ۱۳۴–۵۴۵۶ داشتند. SWCNT ها قطر ۱–۲ nm و طول ۵–۳۰ μm داشتند و بنابراین بالاترین نسبت منظر ۵۰۰–۳۰,۰۰۰ را دارا بودند. توزیع قطر هیدرودینامیکی CB ها و RGO ها تک‌مد (unimodal) بود، در حالی که توزیع قطر هیدرودینامیکی SWCNT ها دو مد (bimodal) با اوج در ۵.۶ μm (۸۸.۳٪) و ۲۵۵ nm (۱۱.۷٪) داشت شکل ۲. قطرهای هیدرودینامیکی متوسط پس از پراکندگی اولتراسونیک به ترتیب زیر بود:

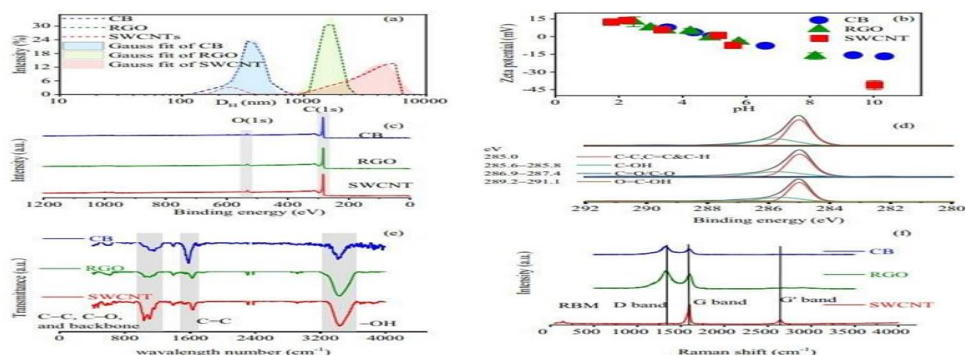
CB (370.2 nm) < RGO (1631.5 nm) < SWCNT (3185.4 nm)

نتایج مربوط به مساحت سطح ویژه، بار سطحی، اکسیژن، نقص‌ها و ناخالصی‌های فلزات سنگین در شکل‌های b-f2، متن مکمل S3، شکل S2 و جداول S2–S3 نشان داده شده است. تفاوت‌های خواص سطحی سه ماده محدود به درجه نقص‌ها و میزان ناخالصی فلزی بود. نسبت شدت اوج‌های Raman ID/IG برای CB، RGO و SWCNT به ترتیب 0.1 ± 0.1 ، 0.2 ± 0.0 و 0.1 ± 0.0 بود که بیشترین

نقص‌ها مربوط به CB و کمترین نقص‌ها مربوط به SWCNT را نشان می‌دهد. و ناخالصی‌های اصلی که با ICP-OES تعیین شدند شامل Fe و Ni بود و تنها محتوای آهن در نمونه SWCNT بیش از ۰.۱٪ بود) جدول S3. مقادیر اندازه‌گیری شده با XRF عموماً بالاتر از مقادیر ICP-OES بود، به‌طوری که مجموع درصد ۳۴ فلز سنگین (شامل مقادیر غیرقابل شناسایی) برای SWCNT برابر با ۵.۴۶٪، CB برابر با ۲.۴۸٪ و RGO برابر با ۱.۱۴٪ بود. مطابق آزمون آزادسازی آهن، هیچ آهن متحرکی در محیط کشت سلولی در دسترس نبود (شکل S2). توضیح جزئیات مربوط به مساحت سطح ویژه، پتانسیل زتا، FTIR و XPS در متن مکمل S3 ارائه شده است. [1]



شکل ۱: تصاویر TEM سه نوع CNS در رزولوشن‌های مختلف نشان داده شده است: شکل CB نامنظم بود. (a) ورقه‌های RGO تک‌لایه یا با چند لایه (>۱۰) از reduced graphene oxide روی هم قرار گرفته بودند و الگوی پراش الکترونی منطقه انتخابی (SAED) نشان داد که هر دو ناحیه تک‌کریستالی و چندکریستالی در شبکه RGO وجود دارد. (b) SWCNT‌ها لوله‌های توخالی بلند بودند. به دلیل چسبندگی قوی، بین ۲ تا ۲۰ لوله یک باندل کربنی تشکیل می‌دادند. (c) توضیح اختصارات CNS: نانومواد کربنی و CB: کربن سیاه و RGO: گرافن اکسید کاهش یافته SWCNT: نانولوله کربنی تک‌دیواره



شکل ۲ مشخصه‌یابی سه نوع CNS:

(a) اندازه Dynamic Light Scattering (DLS) در محیط کشت.

(b) پتانسیل زتا به عنوان تابعی از pH در 0.1 M NaNO_3

(c) طیف‌های XPS survey.

(d) تجزیه اوج XPS (1s) C با استفاده از مؤلفه‌های گاوسی پس از Shirley background subtraction.

(e) طیف‌های FTIR.

(f) طیف‌های Raman.

توضیحات: RBM مد تنفسی شعاعی ($< 200 \text{ cm}^{-1}$) که مختص SWCNT است.

۳.۲. رشد کرم خاکی

تمام کرم‌های خاکی در طول دوره مواجهه زنده ماندند، حتی در غلظت‌های بسیار بالاتر ($15.7 \mu\text{g CN/cm}^2$) کاغذ صافی یا 1000 mg CN/kg خاک (نسبت به سناریوی واقعی. این موضوع تأیید می‌کند که مطالعه سمیت زیرکشنده (sublethal toxicity) روی کرم‌های خاکی را ارزیابی کرده است. گونه‌های مختلف کرم خاکی تحمل مشخصی نسبت به CB اسیدی، RGO و CNT دارند. با این حال، کرم‌ها در تیمارهای CN نسبت به کنترل کاهش وزن داشتند جدول S4. رشد مثبت نسبت به وزن اولیه در کنترل و تیمارهای CB مشاهده شد، در حالی که در تیمارهای RGO و SWCNT رشد منفی رخ داد. مهار رشد ناشی از SWCNT و RGO بیشتر از CB بود. همچنین، اثر مهاری RGO به صورت وابسته به دوز بود (از -6% برای غلظت 0.01% تا -13.8% برای غلظت 0.1%)، در حالی که حداکثر مهار رشد در تیمار 0.01% SWCNT با -14.5% رخ داد. کاهش وزن ممکن است ناشی از کاهش پروتئین و کربوهیدرات‌ها باشد، زیرا کرم‌ها به دلیل اجتناب از زیستگاه (habitat avoidance) غذای کمتری مصرف می‌کنند (Zhao) و همکاران، ۲۰۱۷. (به طور کلی، CNS تنها زمانی به صورت حاد سمی به نظر می‌رسند که دوز آن‌ها بیش از غلظت محیطی باشد و نوع نانومواد در تعیین سمیت حاد نقش اساسی دارد [7].

۳.۳. بیومارکرهای استرس اکسیداتیو

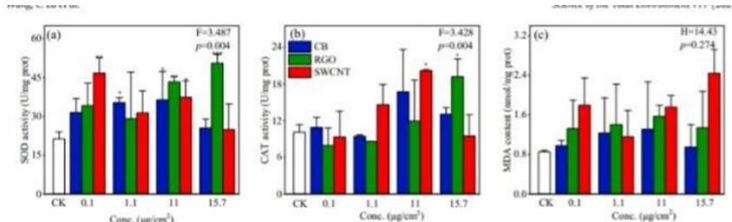
فعالیت‌های SOD و CAT و محتوای MDA در کرم‌هایی که به مدت ۴۸ h با CNS مواجه شدند، اندازه‌گیری شد تا استرس اکسیداتیو در vivo نشان داده شود. تغییرات آن‌ها نمایانگر سلسله‌ای از رویدادها بود که تلاش و پیامدهای کرم‌ها برای مقابله با گونه‌های اکسیژن اضافی را منعکس می‌کرد. فعالیت SOD در تمام تیمارهای CN افزایش یافت یا نزدیک به کنترل باقی ماند (شکل ۳). به طور مشخص، فعالیت‌ها نسبت به کنترل به ترتیب زیر افزایش یافت:

$$11.0 \mu\text{g/cm}^2 \text{ CB} > 71.3 \mu\text{g/cm}^2 \text{ CB}$$

۱۳۵.۱٪ RGO 15.7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

۱۱۹.۸٪ SWCNT 0.1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

افزایش فعالیت SOD در غلظت پایین SWCNT و غلظت بالا RGO به دلیل تولید $\text{O}_2^{\bullet-}$ بود که توسط SOD فعال شده به H_2O_2 تبدیل می‌شود سپس، فعالیت CAT برای تجزیه H_2O_2 و جلوگیری از آسیب اکسیداتیو به پروتئین و لیپیدها تحریک شد، به‌ویژه در تیمارهای SWCNT 11.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ و RGO 15.7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ شکل ۳b محتوای MDA که نشان‌دهنده پراکسیداسیون لیپید است، در کرم‌های مواجه شده با CNS بالاتر از نمونه‌های کنترل بود. به طور خاص، در تیمار SWCNT 15.7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ، ۱.۸۷ MDA برابر کنترل بود، احتمالاً به دلیل تاخیر در عملکرد SOD و CAT شکل ۳c با این حال، تفاوت بین تیمارها از نظر آزمون غیر پارامتریک معنادار نبود به دلیل انحراف معیار زیاد، که مانع نتیجه‌گیری قطعی در مورد MDA شد. مطالعه قبلی نشان داده بود که فعالیت SOD در مواجهه با MWCNT 5.7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ افزایش می‌یابد، اما در ۱۴.۲۹ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ کاهش می‌یابد، زیرا غلظت بالای نانوذرات از دفاع آنتی‌اکسیدانی طبیعی فراتر می‌رود. این نتایج نشان می‌دهند که CNS باعث استرس اکسیداتیو جزئی در کرم‌های خاکی (Tier 1 مطابق مدل سلسله‌مراتبی) می‌شوند و این اثر از طریق تماس مستقیم ایجاد می‌شود. [8]



شکل ۳ تأثیرات نانومواد کربنی مختلف بر روی کرم‌های خاکی:

(A) فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD)

(B) فعالیت کاتالاز (CAT)

(C) محتوای مالون‌دی‌آلدید (MDA) در بافت‌های کرم خاکی

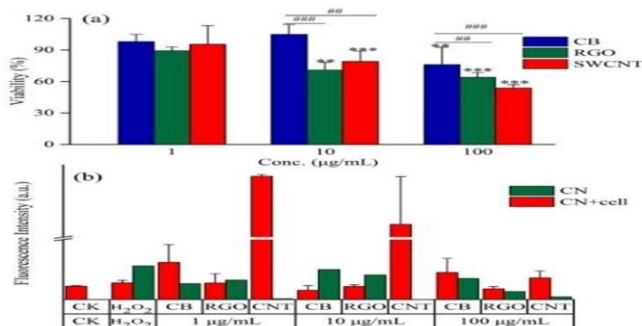
داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه شده‌اند.

۳.۴. بقا و تولید ROS در Coelomocytes

Coelomocytes به عنوان سلول‌های ایمنی متحرک در coelom کرم خاکی، به تدریج برای ارزیابی ایمونوتوکسیک بودن نانوذرات مانند AuNPs، C60 و MWCNT در بی‌مهرگان خاک استفاده شده‌اند. در مطالعه پیگیری، سیتوتوکسیسیته CNS بر coelomocytes کرم خاکی در دامنه ۱۰۰-۱۰ $\mu\text{g/mL}$ با استفاده از آزمایش WST-8 پس از ۱۲ ساعت مواجهه سنجیده شد. شکل ۴a. CNS باعث کاهش وابسته به غلظت بقا سلولی coelomocytes شدند. در $1 \mu\text{g/mL}$ تفاوت معناداری بین سه CN مشاهده نشد. در $10 \mu\text{g/mL}$ ، RGO (71.0% , $p < 0.01$) و SWCNT (79.2% , $p < 0.001$) به‌طور مشابه و به‌طور قابل توجهی بیشتر از CB سیتوتوکسیک بودند. در $100 \mu\text{g/mL}$ ، سیتوتوکسیک بودن وابسته به نسبت منظر (aspect ratio) مشاهده شد، CB: 76.2% و SWCNT: 53.9% این نتایج نشان می‌دهد که SWCNT بیشترین اثر سیتوتوکسیک را دارد، پس از آن RGO و CB تنها در غلظت بالا اثر بازدارنده نشان می‌دهد.

تولید ROS

تولید ROS ممکن است علت یا پیامد سیتوتوکسیسیته باشد. SWCNT در ۱ و $10 \mu\text{g/mL}$ باعث افزایش تولید ROS درون سلولی coelomocytes شد: 21.3% برابر و 17.7% برابر نسبت به کنترل منفی در حالی که RGO و SWCNT $100 \mu\text{g/mL}$ چنین افزایشی نداشتند (شکل ۴b). همچنین، فلورسانس مثبت در تیمار SWCNT + سلول بسیار بالاتر از SWCNT تنها بود، که نشان می‌دهد تولید DCF از طریق میانجیگری ROS درون سلولی بوده و نه اکسیداسیون مستقیم توسط نانولوله‌ها. بیشترین سطح ROS در پایین‌ترین غلظت SWCNT باعث مرگ بسیار کم سلول‌ها شد، نشان می‌دهد که تولید ROS نه علت و نه نتیجه سیتوتوکسیسیته است. این نکته توسط تعداد زیاد سلول‌های مرده و تولید کم ROS در غلظت‌های بالا CB و RGO تأیید شد. کاهش سیگنال فلورسانس در $100 \mu\text{g/mL}$ SWCNT ممکن است ناشی از آپاپتوز سلولی و غیرفعال شدن هیدرولاز مرتبط باشد که DCFH-DA را به DCFH تبدیل می‌کند. تحلیل ROS نشان داد که مکانیزم‌های دیگر، مانند آسیب مکانیکی وابسته به خواص مختلف CNS، ممکن است سیتوتوکسیسیته را تعیین کنند. [1]



شکل ۴ (a) تأثیر CNS بر بقای coelomocytes کرم خاکی تفاوت معنادار نسبت به میانگین کنترل‌های بدون درمان تفاوت معنادار بین تیمارها سطوح معنی‌داری وجود دارد.

۳.۵. پروفایل متابولیسم و متابولیت‌های ویژه

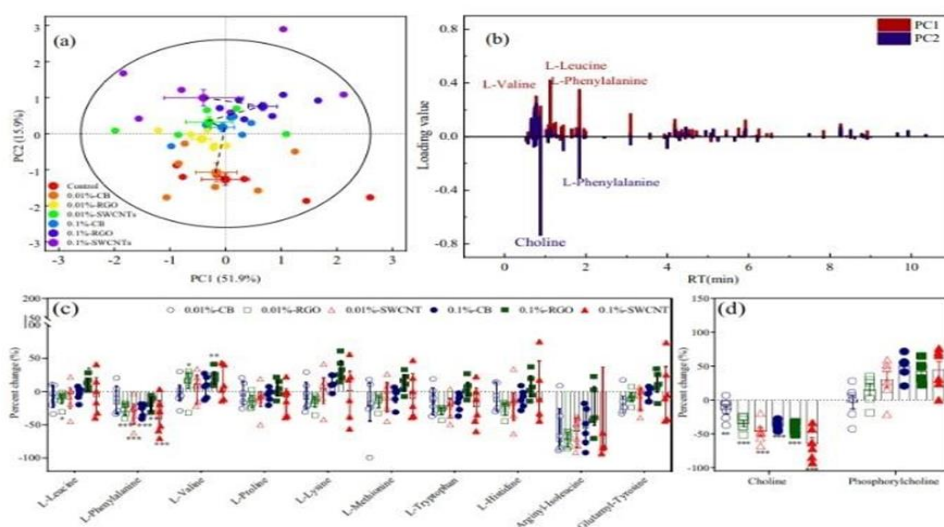
متابولومیکس غیرهدفمند مبتنی بر UPLC-MS از عصاره‌های کرم خاکی، پروفایل متابولیتی شامل ۳۵۷۴ سیگنال با ۱۹۳۶ متابولیت شناسایی شده تولید کرد که شامل آمینواسیدها، اسیدهای آلی، کربوهیدرات‌ها، لیپیدها و سایر ترکیبات بود. برای تمایز اثر تیمارها نسبت به کنترل از OPLS-DA استفاده شد. این تحلیل مدلی با سه مؤلفه پیش‌بینی‌کننده و یک مؤلفه عمود بر آن (orthogonal) ایجاد کرد R^2X . تجمعی: ۴۹.۷٪ و R^2Y تجمعی: ۳۳.۷٪ و Q^2Y تجمعی: ۶.۵٪ با وجود مقدار پایین Q^2Y ، بررسی کلاس‌بندی و خطای پیش‌بینی نشان داد که عضویت در تیمارهای خاص بهتر از بقیه دسته‌ها تفکیک شد جدول ۲ و شکل S3؛ جزئیات متن S4. و تفکیک معنادار بین تیمارها در محور پیش‌بینی ($t[1]$ (AVNOA, $p < 0.05$) مشاهده شد که ۸.۹٪ واریانس کل را توضیح می‌دهد (شکل S4). ترتیب انحراف نمونه‌ها از کنترل به صورت $CB < RGO < SWCNT$ در هر دو غلظت ۰.۰۱٪ و ۰.۱٪ بود. تفکیک و پیش‌بینی در غلظت بالا واضح‌تر بود، نشان‌دهنده اثر وابسته به دوز بر متابولیسم (جدول S5. و با توجه به اینکه حالت یون مثبت (positive ion mode) در MS رزولوشن بالاتری برای قطعات حاوی گروه‌های پایه که پروتون جذب کرده و آدکت می‌سازند دارد (Banerjee و Mazumdar, ۲۰۱۲)، آمینواسیدها، کولین و کربوهیدرات‌ها برای تحلیل ویژه انتخاب شدند. تحلیل PCA نشان داد که PC1 و PC2 به ترتیب ۵۱.۹٪ و ۱۵.۹٪ واریانس کل را توضیح می‌دهند شکل a.۵ هرچند PC1 اطلاعات کافی را ارائه داد، امتیازها روی محور X جدا نشدند، به این معنا که برخی، اما نه تمام متابولیت‌ها تحت تأثیر CNS قرار گرفتند. سه متابولیت با بیشترین بار مثبت در PC1:

L-leucine و L-phenylalanine و L-valine شکل b۵ بیشتر آمینواسیدها در کرم‌های تیمار شده کاهش یافتند، به جز L-valine و چند آمینواسید در تیمارهای RGO شکل c۵. S5. یکی از دلایل کاهش سطح آمینواسیدها: آسیب پروتئین که موجب مصرف آمینواسیدهای مرتبط برای سنتز آنزیم‌ها جهت مقابله با استرس CN می‌شود. همچنین اختلال در گلیکولیز باعث تبدیل آمینواسیدها به پیرووات یا واسطه‌های چرخه TCA برای حفظ تعادل انرژی می‌شود. آمینواسیدها بیومارکرهای بالقوه برای کرم‌هایی هستند که در معرض C60 و چندین GO قرار گرفته‌اند و با اثرهای سم‌شناسی خاص مرتبط هستند. بنابراین، افزودن CNS می‌تواند متابولیسم آمینواسیدهای خاص کرم‌ها را مختل کند. نسبت‌های زوجی متابولیت‌ها برای شناسایی پاسخ‌های متابولیک استفاده شدند، با فرض اینکه نسبت متابولیت‌ها در گونه آزمایشی باید مشخص باشد. نسبت L-phenylalanine و L-leucine به صورت وابسته به شکل کاهش یافت: $CB 0.01\%$: کاهش ۴٪ و $SWCNT 0.1\%$: کاهش ۳۶٪. این نسبت به طور مؤثر اختلال ایجادشده توسط CNS با مورفولوژی‌های مختلف بر کرم‌های خاکی را نشان می‌دهد (شکل ۶، جدول S6). نمرات PC2 گروه‌های تیمار شده به وضوح از کنترل تفکیک شدند و فاصله آن‌ها همان روند مشاهده شده در تحلیل OPLS-DA را نشان داد که وابسته به غلظت و نوع CN بود (شکل ۵. a) این موضوع نشان می‌دهد که PC2 ممکن است با مورفولوژی CN‌ها که در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفته است مرتبط باشد. بر اساس الگوی نمره‌ها، متابولیت‌هایی که بار

منفی روی PC2 دارند، یعنی کولین و-L فنیل آلانین، باید در گروه‌های CN نسبت به کنترل کاهش یافته باشند. کولین، پیش‌ساز غشاء سلولی، به‌طور مستقیم غشاء سلولی را نمی‌سازد، بلکه می‌تواند در مسیر آنابولیسم یا کاتابولیسم ترکیبات لیپیدی دخیل باشد و در میان متابولیت‌های مختلف، بیشترین تمایز را بین تیمارهای مختلف نشان داد. به‌طور مشخص، مقادیر کولین در گروه‌های تیمار شده با CB، RGO و SWCNT در غلظت ۰.۰۱٪ (و در ۰.۱٪ مقادیر داخل پرانتز) به ترتیب به میزان ۱۴.۰٪ (۳۸.۸٪)، ۳۵.۱٪ (۴۳.۱٪) و ۴۶.۸٪ (۶۴.۸٪) کاهش یافته است (شکل ۵). d) متابولیت‌های حاوی کولین در بافت‌ها، پلاسما و خطوط سلولی پیش‌تر با موفقیت به‌عنوان بیومارکرهایی برای تشخیص زودهنگام بیماری‌ها مانند سرطان و دیابت مورد استفاده قرار گرفته‌اند. کاهش مشاهده شده کولین در این مطالعه ممکن است به دلیل مصرف آن برای سنتز فسفولیپیدها و ترمیم غشاء آسیب‌دیده یا از دست رفتن فیزیکی فسفولیپیدها باشد، که به‌طور مستقیم منجر به کاهش کولین، محصول شکست فسفولیپیدها، می‌شود. اختلافات متابولیت‌های مرتبط با غشاء احتمالاً توسط مورفولوژی سه نوع CN تعیین شده است. ویژگی‌های مورفولوژیک عمدتاً بر فرآیندهای دینامیک در سطح نانو-زیستی (nano-bio interface) اثر می‌گذارند (Nel) و همکاران، ۲۰۰۹)، شامل جهت‌گیری، انرژی و سطح اتصال بین نانوذرات و لیپیدها. لوله‌های کوتاه‌تر SWCNT که در فرآیند پراکندگی تولید شده‌اند، ممکن است به‌راحتی از طریق اندوسیتوز یا نفوذ مستقیم به داخل سلول منتقل شوند، در حالی که لوله‌های بلند که تنها بخشی از آن‌ها وارد سلول شد، ثبات غشاء را به‌طور جدی مختل کردند (شکل S6). اگرچه نانومواد در محیط خاک احتمالاً با اسیدهای هیومیک یا مواد معدنی رسی ترکیب می‌شوند، کرم‌ها ترکیبات خاک را هضم کرده و لوله‌های کربنی غیرقابل هضم را در روده خود جمع می‌کنند. مواد گرافنی با لبه‌های تیز خود قادرند ساختار غشاء را مکانیکی مختل کنند از طریق مکانیزم‌هایی مانند درج، پیچیدن، برش با نانوچاقو، استخراج و سایر فرآیندها دارای سطح جانبی بزرگی است که می‌تواند با همان مکانیزم‌ها باعث آسیب غشاء شود، ولی پتانسیل مخرب آن کمی کمتر از SWCNT است به دلیل نسبت منظر کمتر. کروی CB با اندازه خوشه‌ای ۹۵ نانومتر می‌تواند توسط سلول‌های اپی‌تلیال برونشیا اندوسیتوز شود و در اندوزوم قرار گیرد و سپس از طریق مسیر لیزوزومی دفع گردد. از آنجایی که CB دارای کوچک‌ترین اندازه DLS است، عبور از غشاء کمترین زمان و انرژی را نیاز دارد و بنابراین کمترین آسیب به غشاء ایجاد می‌کند. این مشاهدات به‌طور جالبی نشان می‌دهد که کولین ممکن است متابولیت کلیدی برای نشان دادن میزان آسیب غشاء باشد که توسط CN‌های با شکل‌های متفاوت ایجاد می‌شود. [1]

جدول ۲ ویژگی‌های مدل تحلیل OPLS-DA (Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis) را نشان می‌دهد و همچنین مقادیر p به‌دست آمده از آزمون معناداری با استفاده از تعداد Q^2 از طریق آزمون جایگشت ۴۰۰ باره برچسب‌های کلاس ارائه شده است. این جدول نشان می‌دهد که چگونه مدل OPLS-DA قادر است نمونه‌ها را براساس پروفایل متابولیت‌ها و تیمارهای CN دسته‌بندی کند Q^2 . نشان‌دهنده توان پیش‌بینی مدل است و آزمون جایگشت ۴۰۰ باره برای مقایسه مقدار Q^2 مشاهده شده با توزیع تصادفی انجام شده تا معناداری مدل تعیین شود. مقادیر p گزارش شده نتیجه این آزمون هستند و نشان می‌دهند که تفکیک تیمارها توسط مدل فراتر از تصادف است

True class	Predicted class								Sensitivity ^{a,c}	Specificity ^{b,c}	R ² _Y	Q ² _Y	Permutation test ^d	
	Control	L-CB	L-RGO	L-SWCNT	H-CB	H-RGO	H-SWCNT	Total					n	p
Control	5	1	0	0	0	0	0	6	0.83	0.94	0.45	0.28	1	0.005
L-CB	2	2	2	0	0	0	0	6	0.33	0.94	0.20	0.11	10	0.027
L-RGO	0	0	6	0	0	0	0	6	1	0.94	0.40	0.12	5	0.015
L-SWCNT	0	1	0	3	0	1	1	6	0.5	0.97	0.19	−0.23	275	0.688
H-CB	0	0	0	1	0	3	2	6	0	1	0.12	−0.01	41	0.105
H-RGO	0	0	0	0	0	6	0	6	1	0.89	0.39	−0.04	45	0.115
H-SWCNT	0	0	0	0	0	0	6	6	1	0.92	0.62	0.23	2	0.007
Total	7	4	8	4	0	10	9	6	0.67	0.94	0.34	0.07	0	0.002



شکل ۵

(a) نمودار نمرات PC1 در مقابل PC2؛ میانگین‌ها $\pm$ انحراف معیار نمرات نمونه‌ها در بیضی اطمینان ۹۵٪ گزارش شده است.

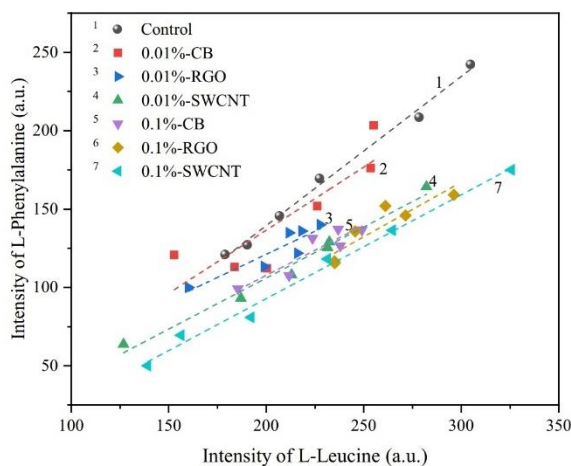
(b) مقادیر بارگذاری (loading values) برای PC1 و PC2.

(c) درصد تغییرات مرتبط با ۱۰ اسید آمینه‌ای که بیشترین سهم را در PC1 دارند.

(d) پاسخ‌های متابولیت‌های مرتبط با کولین به قرار گرفتن در معرض CNها. داده‌ها به صورت درصد تغییر گروه‌های تیمار شده با CN نسبت به گروه کنترل بیان شده‌اند. نمودارها شامل نمونه‌های فردی، میانگین‌ها و بازه‌های اطمینان ۹۵٪ هستند.

۳.۶. تأثیر ویژگی‌های ماده بر سمیت

سه ماده‌ای که در این مطالعه انتخاب شدند، از نظر ابعاد نانویی (nano-dimensions) با یکدیگر متفاوت بودند و تأثیرات آن‌ها بر تغییر وزن کرم‌ها، زنده‌مانی coelomocyte ها و متابولیت‌های مرتبط با غشاء همگی روند مشابهی را نشان دادند. $SWCNT > RGO > CB$: این روند نشان می‌دهد که مورفولوژی CN ها ممکن است نقش غالب و تعیین‌کننده‌ای در مکانیزم اثرات سمی آن‌ها بر کرم‌های خاکی داشته باشد. با این حال، لازم است توجه شود که ویژگی‌های دیگری مانند: مساحت سطح ویژه، بار سطحی و میزان اکسیژن سطحی و نقص‌های ساختاری و ناخالصی‌های فلزات سنگین می‌توانند بر شاخص‌های سمی‌شناختی نیز تأثیرگذار باشند. با این حال، کنترل یک ویژگی مورفولوژیکی به تنهایی و حفظ سایر ویژگی‌ها کاملاً یکسان دشوار است، مگر اینکه از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی (molecular dynamics simulations) در محیط کامپیوتری استفاده شود. براساس داده‌های به‌دست آمده، سایر پارامترها عامل اصلی تأثیرگذار بر سمیت نبودند و این نتیجه‌گیری به این دلیل قابل استناد است که مقادیر هر یک از این پارامترها برای سه نوع CN تقریباً یکسان بوده یا ترتیب آن‌ها با ترتیب شدت سمیت سه CN همخوانی نداشت. [9]



شکل ۶ منحنی‌های برازش خطی (linear fitting curves) تغییرات L-phenylalanine نسبت به L-leucine را برای تیمارهای CN نشان می‌دهند که از خط مبنا (کنترل) منحرف شده‌اند.

۴. نتیجه‌گیری

تداخلات مستقیم CN ها (نانومواد کربنی) با کرم‌های خاکی مورد بررسی قرار گرفت. مشاهده شد که ترتیب اثر بر چندین شاخص به صورت $SWCNT \geq RGO > CB$ بود، که نشان می‌دهد مورفولوژی شامل نسبت ابعاد (aspect ratio) و اندازه هیدرودینامیکی (DLS size) تعیین‌کننده تأثیر CN ها بر کرم‌ها بوده است. هیچ سمیت حاد مشاهده نشد، اما کاهش وزن قابل توجهی در تیمارهای RGO و SWCNT رخ داد، که احتمالاً ناشی از اختلال در متابولیسم بود CN ها باعث برهم خوردن نسبت L-phenylalanine به L-leucine شدند، که می‌تواند نشان‌دهنده اختلال در متابولیسم انرژی باشد. کولین (choline) به عنوان یک متابولیت شناسایی شد که اختلافات آسیب غشایی (membrane damage) مرتبط با مورفولوژی مواد را نشان می‌دهد. با این حال، مکانیزم‌های مولکولی و بیولوژیکی مربوط به ارتباط بین آسیب غشایی و تغییرات متابولومیک نیازمند مطالعات بیشتری است. مطالعه حاضر درک بهتری از اثرات بیولوژیکی CN ها با پارامترهای متفاوت در محیط خاک ارائه می‌دهد و می‌تواند برای طراحی و استفاده ایمن‌تر از این نانومواد مفید باشد.

منابع:

- 1: Kun Xu, Xiaofeng Wang, Chengxiu Lu, Yaxin Liu, Dong Zhang, Jiemin Cheng *College of Geography and Environment, Shandong Normal University, Jinan 250014, Shandong, China
- 2: Sforzini, S., Moore, M.N., Mou, Z., Boeri, M., Banni, M., Viarengo, A., 2017. Mode of action of Cr(VI) in immunocytes of earthworms: implications for animal health. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 138, 298.
- 3: Hendershot, W., Lalande, H., Duquette, M., 1993. Soil reaction and exchangeable acidity. In: Carter, M.R., Gregorich, E.G. (Eds.), *Soil Sampling and Methods of Analysis*. Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 141–145.
- 4: Xu, K., Liu, Y., Wang, X., Li, S., Cheng, J., 2020. Combined toxicity of functionalized nanocarbon black and cadmium on *Eisenia fetida* coelomocytes: the role of adsorption. *J. Hazard. Mater.* 122815.
- 5: Homa, J., Klimek, M., Kruk, J., Cocquerelle, C., Vandenbulcke, F., Plytycz, B., 2010. Metalspecific effects on metallothionein gene induction and riboflavin content in coelomocytes of *Allobophora chlorotica*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1937–1943.
- 6: Westerhuis, J.A., Hoefsloot, H.C., Smit, S., Vis, D.J., Smilde, A.K., van Velzen, E.J., van



Duijnhoven, J.P., van Dorsten, F.A., 2008. Assessment of PLSDA cross validation. *Metabolomics* 4, 81–89.

7: Zhao, S., He, L., Lu, Y., Duo, L., 2017. The impact of modified nano-carbon black on the earthworm *Eisenia fetida* under turfgrass growing conditions: assessment of survival, biomass, and antioxidant enzymatic activities. *J. Hazard. Mater.* 338, 218–223.\\

8: Panzarino, O., Hyršl, P., Dobeš, P., Vojtek, L., Vernile, P., Bari, G., Terzano, R., Spagnuolo, M., De Lillo, E., 2016. Rank-based biomarker index to assess cadmium ecotoxicity on the earthworm *Eisenia andrei*. *Chemosphere* 145, 480–486.

9: Jiang, W., Wang, Q., Qu, X., Wang, L., Wei, X., Zhu, D., Yang, K., 2017. Effects of charge and surface defects of multi-walled carbon nanotubes on the disruption of model cell membranes. *Sci. Total Environ.* 574, 771–780.