



تاثیر فیلترهای آب حاوی نانوذرات نقره طی دوران انکوباسیون بر تغییرات
متابولیت لاکتات و آنزیم‌های گلوکاتایون پراکسیداز و لاکتات دهیدروژناز در جنین
تاس‌ماهی ایرانی *Acipenser persicus*

ساحل سلطان کریمی^۱، محمد رضا کلباسی^{۲*}

تاریخ دریافت: بهمن ۹۵

تاریخ پذیرش: خرداد ۹۶

چکیده

نانوذره نقره به دلیل داشتن خواص ضدباکتریایی، به یکی از پرمصرف‌ترین ترکیبات نانویی تبدیل شده است و با توجه به توسعه استفاده از نانوذرات، خطرات ناشی از رهائش این مواد، از محصولات حاوی آن‌ها به محیط زیست وجود دارد. در پژوهش حاضر، شش نوع فیلتر حاوی درصدهای متفاوت نانوذرات نقره (۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد) همراه و بدون آمینوپروپیل تری‌اتوکسی سیلان (APTES)، به همراه یک فیلتر شاهد، برای کنترل قارچ *Saprolegnia* در انکوباتور تخم تاس‌ماهی ایرانی به کار گرفته شد که دو نوع از آن‌ها (حاوی یک درصد نانوذره) به عنوان فیلتر بهینه به طور کامل موفق به کنترل قارچ *Saprolegnia* شدند. فیلتر اول فاقد و فیلتر دوم حاوی آمینوپروپیل تری‌اتوکسی سیلان بود. سپس اثرات این فیلترهای بهینه بر روی جنین‌های تاس‌ماهی ایرانی نگهداری شده در این انکوباتورها، به وسیله سنجش تغییرات آنزیم‌های اکسیداتیو گلوکاتایون پراکسیداز و لاکتات دهیدروژناز به روش اسپکتروسکوپی و همچنین سنجش تغییرات متابولیت لاکتات به روش متابولومیکس بر پایه HNMR، در روزهای دوم و چهارم دوره انکوباسیون در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که استفاده از فیلترهای حاوی نانوذرات نقره به دلیل رهائش نقره از فیلتر به داخل آب و واکنش نقره با گروه تیول گلوکاتایون پراکسیداز، سبب کاهش معنی‌دار این آنزیم در هر دو نوبت نمونه‌برداری شد. همچنین کاهش لاکتات لاکتات دهیدروژناز در دومین روز انکوباسیون و همچنین افزایش معنی‌دار آن‌ها در چهارمین روز انکوباسیون به دلیل اختلال در فعالیت لاکتات دهیدروژناز در دومین روز انکوباسیون و ایجاد شرایط هیپوکسی در چهارمین روز انکوباسیون مشاهده شد. نتایج حاضر حاکی از آن است که سنجش آنزیم لاکتات دهیدروژناز و متابولیت لاکتات نسبت به گلوکاتایون پراکسیداز، نشانگر زیستی مناسب‌تری برای ارزیابی زود هنگام تغییرات درون سلولی برای آن دسته ماهیانی است که تحت تاثیر نانوذرات نقره قرار گرفته‌اند.

واژگان کلیدی: تاس‌ماهی ایرانی، نانوذرات نقره، لاکتات دهیدروژناز، گلوکاتایون پراکسیداز، لاکتات، متابولومیکس.

۱- دکترای شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران.

۲- استاد گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران.

* نویسنده مسئول: kalbassi_m@modares.ac.ir

مقدمه

موفقیت‌های آتی در صنعت آبی‌پروری، حیاتی است.

ساپروولگنیازیس که به وسیله قارچ‌های *Aphanomyces* و *Achlya Saprolegnia* ایجاد می‌شود، یکی از مهمترین بیماری‌هایی است که تخم و جنین ماهی را تحت تاثیر قرار می‌دهد و عدم کنترل آن موجب بروز تلفات سنگین و خسارات اقتصادی، در پرورش تجاری ماهی، به ویژه در مرحله انکوباسیون می‌شود (Johari et al., 2016). اگرچه برای کنترل *Saprolegnia* از مواد شیمیایی ضدعفونی کننده متعددی استفاده می‌شود اما این مواد دارای اثرات نامطلوب بر روی موجودات زنده و محیط زیست هستند. به عنوان مثال مالاشیت گرین یک داروی بسیار موثر در کنترل عفونت‌های قارچی در ماهی و تخم ماهی است که دارای اثرات سرطان‌زایی^۱، جهش‌زایی^۲ و قابلیت ایجاد بدشکلی^۳ است (Pottinger and Day, 1999). بنابراین استفاده از آن به ماهیان غیرخوراکی محدود شده است. فرمالین از دیگر داروهای مورد استفاده برای کنترل قارچ در آبزیان است که جدا از تاثیر نه چندان کارآمد

اخیرا جمعیت ماهیان خاویاری، به دلایل متعددی از جمله، بهره‌برداری بیش از حد، تغییرات زیستگاه‌ها، آلودگی، وجود سد در مسیر مهاجرت و از دست رفتن مکان‌های تخم‌ریزی، رو به کاهش است، بنابراین تمام گونه‌های ماهیان خاویاری در لیست قرمز IUCN به عنوان ماهیان در معرض خطر ارزیابی شده‌اند (Pourkazemi, 2006). با توجه به عدم امکان تکثیر طبیعی این ماهی در حوزه آب‌های جنوبی دریای خزر و کاهش محسوس صید ماهیان خاویاری در سال‌های اخیر (سالنامه آماری سازمان شیلات ایران، ۱۳۹۳)، این ماهیان در کارگاه‌های تکثیر ایران به صورت مصنوعی تکثیر می‌شوند و بچه ماهی‌های انگشت‌قد آن‌ها برای بازسازی ذخایر به رودخانه‌های خزر جنوبی رهاسازی می‌شوند. در کارگاه‌های تکثیر، با توجه به تراکم زیاد، عوامل بیماری‌زا در برخی شرایط، آلودگی در آب به سرعت گسترش یافته، سلامت جنین ماهی به مخاطره می‌افتد. بنابراین کاهش تلفات ماهیان در دوران تکثیر و پرورش اولیه، برای

- 2 Carcinogen
- 3 Mutagen
- 4 Teratogen

- 1 International Union for the Conservation of Nature

نانوذرات نقره (دارای APTES و فاقد APTES) بر روی بسترهای ژئولیت و سیلیس صورت گرفت. نتایج استفاده غیرمستقیم نشان داد که فیلتر محتوی ۱ درصد وزنی نانوذرات نقره ضمن کنترل کامل قارچ *Saprolegnia*، سبب افزایش معنی‌دار بازماندگی از زمان لقاح تا مرحله جذب کیسه زرده نسبت به گروه شاهد شد. اما تغییر معنی‌داری در بدشکلی، تخریب DNA و درصد تفریح ایجاد نکرد. میزان نقره رها شده از فیلتر ۱ (یک درصد نانونقره و فاقد APTES) و فیلتر ۲ (یک درصد نانونقره و دارای APTES) در روز دوم به ترتیب ۲/۱۳ و ۷/۸۴ میکروگرم در لیتر و در روز چهارم ۱/۵۶ و ۵/۹۲ میکروگرم در لیتر بود (بنان، ۱۳۹۵).

با توجه به توسعه استفاده از نانوذرات، خطرات ناشی از رهائش این مواد، از محصولات حاوی آن‌ها به محیط زیست وجود دارد و در این راستا سم‌شناسی زیست‌محیطی^۲ تبدیل به یک زمینه پژوهشی فعال شده است (Fasulo et Al., 2012). نانوذرات نقره به سبب آزاد کردن یون‌های نقره می‌توانند سبب کاهش اکسیژن آب و در نتیجه حساس شدن ماهی به شرایط کمبود اکسیژن شوند (Bilberg et al.,

آن نگرانی‌هایی در مورد اثرات زیست‌محیطی آن و اثرات آن بر مصرف کننده وجود دارد (Fitzpatrick et al., 1995). بنابراین روش‌های جدید برای کنترل قارچ در آبی‌پروری باید گسترش یابد تا از هدر رفت وقت و هزینه در تکثیر مصنوعی ماهیان جلوگیری شود. در این راستا یکی از روش‌های نوین، استفاده از برخی نانومواد مانند نانوذرات نقره است. نقره به دلیل طیف وسیع فعالیت ضد میکروبی خود علیه میکروارگانیسم‌های آبی بسیار مورد توجه است (Sotiriou and Pratsinis, 2010).

یکی از انواع فرم‌های نقره که خاصیت ضدباکتریایی قوی دارد، نانوذرات نقره است (Mohan et al., 2007). اخیراً در چندین مطالعه انجام شده کارایی استفاده غیرمستقیم نانوذرات نقره در کنترل میکروبی آبزیان به اثبات رسیده است (شهیم و همکاران، ۱۳۹۴؛ بنان، ۱۳۹۵؛ Kalbassi et al., 2011). بنان (۱۳۹۵) از فیلترهای حاوی نانوذرات نقره به منظور کاهش آلودگی به قارچ *Saprolegnia* در دوره رشد و نمو تخم تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) استفاده کردند که در گام اول ساخت فیلترهای ۰/۵ و ۱ درصد وزنی

نقره پرداخته شده است (Hussain et al., 2010). در شرایط کمبود اکسیژن، رادیکال‌های فعال اکسیژنی (ROS) (Bandyopadhyay et al., 1999) مانند آنیون سوپراکسید (O_2^-)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل (OH) تولید شده، سبب استرس اکسیداتیو و اختلال در عملکرد سلول می‌شوند (Taniyama and Griending, 2003). این رادیکال‌ها که در پاسخ به استرس‌های محیطی تولید می‌شوند، سبب آسیب به پروتئین‌ها، لیپیدها و DNA می‌شوند (Mourente et al., 2007). پراکسیداسیون لیپیدها در غشای سلولی می‌تواند در نفوذپذیری و سیالیت غشا اختلال ایجاد کند همچنین رادیکال‌های آزاد به طور مستقیم از طریق تداخل با فعالیت آنزیم‌ها و عملکرد پروتئین‌های ساختاری به پروتئین‌ها نیز آسیب می‌رسانند. سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن با فعال کردن آنزیم‌های اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) و گلوتاتیون ردوکتاز، اقدام به حذف رادیکال‌های آزاد می‌کند (Mourente et al., 2007). در چندین مطالعه به استرس اکسیداتیو حاصل از نانوذرات

نقره پرداخته شده است (Hussain et al., 2005; Arora et al., 2008; AshaRani et al., 2009). مطالعات Massarsky و همکاران (۲۰۱۳) نشان داد که با افزایش غلظت نانوذرات نقره میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در ماهی گورخری (*Danio rerio*) کاهش یافت. در مطالعه دیگری که تاثیرات نانوذرات نقره را روی سلول‌های کبدی ماهی مداکا (*Oryzias latipes*) مورد بررسی قرار داد، کاهش وابسته به غلظت نانوذرات نقره، در آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH)، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز مشاهده شد اما میزان گلوتاتیون پراکسیداز در تمامی نمونه‌ها حتی گروه شاهد بسیار پایین بود (Wu et al., 2013).

آنزیم لاکتات دهیدروژناز آنزیم دیگری است که در سراسر بدن ماهی وجود دارد (Markert and Faulhaber, 1965) و نقش بسیار مهمی را در حفاظت سلول در برابر آلاینده‌های زیست‌محیطی و سمی ایفا می‌کند. این آنزیم به عنوان یک نشانگر زیستی ارزشمند در تنظیم هیپوکسی موجود زنده یا سلول شناخته می‌شود (Kuthan et al., 1986; Lin et al., 2001). این فرضیه وجود

1 Reactive Oxygen Species

2- Glutathione Peroxidase

3- Lactate Dehydrogenase

مواد و روش‌ها**استفاده از فیلترهای حاوی نانوذرات نقره**

این بخش از مطالعه در کارگاه تکثیر، پرورش و بازسازی ذخایر تاس‌ماهیان شهید رجایی (ساری، مازندران) انجام پذیرفت. در این آزمایش از فیلترهای حاوی غلظت‌های متفاوت نانونقره (۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد) در دو نوع دارای آمینو پروپیل تری‌اتوکسی سیلان و فاقد آمینوپروپیل تری‌اتوکسی سیلان و یک فیلتر فاقد نانوذرات نقره به عنوان شاهد، در قالب سه تکرار در محل ورودی آب انکوباتورهای یوشچنکو نصب شد و تخم‌های لقاح یافته تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)، حاصل از تکثیر مصنوعی مولدین، به این انکوباتورها منتقل (بنان، ۱۳۹۵) و به مدت ۴ روز تحت این شرایط انکوبه شدند. بر اساس عملکرد فیلترها در مهار رشد قارچ در انکوباتورها، بهترین نوع آن‌ها از بین فیلترهای مورد استفاده، برای مطالعات بعدی انتخاب شد.

نمونه‌برداری از جنین

در روزهای ۲ و ۴ پس از لقاح از تمام تیمارها ۱۵ عدد تخم حاوی جنین سریعاً درون

دارد که فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز با قرارگیری طولانی مدت در محیط کم اکسیژن افزایش می‌یابد. بنابراین لاکتات افزایش یافته خود ناشی از شرایط بی‌هوازی و نهایتاً ناشی از استرس اکسیداتیو است (Prabakaran et al., 2004). عواملی همچون سن، وضعیت تغذیه و تخم‌ریزی بر روی سطح این آنزیم در ماهیان تاثیرگذار است.

اطلاعات درباره اثرات سمی نانوذرات نقره در مراحل اولیه زندگی ماهی، به ویژه در مرحله جنینی بسیار محدود است. مطالعات Wu و Zhou (۲۰۱۲a) نشان داد که میزان LDH در جنین ماهی مداکا با افزایش میزان نانوذرات نقره در محیط افزایش یافت.

با توجه به تاثیر موارد فوق، این مطالعه ضمن بررسی اثرات سمی نانوذرات نقره بر جنین تاس‌ماهی ایرانی با مطالعه تغییرات آنزیم‌های گلوکاتایون پراکسیداز و لاکتات دهیدروژناز و متابولیت لاکتات، به عنوان نشانگر زیستی، به بررسی اثرات سوء احتمالی فیلترهای تولیدی جهت تولید آن‌ها در مقیاس تجاری و همچنین انتخاب بهترین فیلتر جهت کاربردی کردن آن می‌پردازد.

عصاره آنزیمی استخراج شده با کمک بافر فسفات (pH ۷/۴) و ۲۴۰ میکرولیتر از Tris/NaCl/Pyruvate به کووت ۱ میلی‌لیتری اضافه و جذب آن در طول موج ۳۴۰ نانومتر در ۵ دقیقه اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم بر اساس غلظت پروتئین و به روش بردفورد محاسبه شد (Bradford, 1976) و مقدار آن به صورت (U/mg Protein) بیان شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز (GPX) بر اساس مقدار نمونه‌ای که در یک دقیقه میزان ۱ میکرومول از GSH (گلوکاتایون) را به GSSG تبدیل می‌کند، محاسبه می‌شود. برای سنجش آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز از کیت ZellBio (ZellBio GmbH, آلمان) استفاده شد. فعالیت GPX در ۴۱۲ نانومتر، به وسیله اسپکتروفتومتر (Ultrospec 2100 Pro, Amersham Biosciences, آمریکا) خوانده شد. سپس فعالیت آنزیم بر اساس میزان پروتئین موجود در بافت محاسبه شد.

استخراج متابولیت لاکتات از تخم

برای استخراج متابولیت از تخم جنین‌دار قره‌برون از پروتوکل استخراج (Folch, 1975)

میکروتیوب‌های ضدانجماد قرار داده شدند و برای تثبیت اولیه به تانک‌های حاوی ازت مایع منتقل شدند. سپس به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل و تا زمان انجام آزمایش‌های بعدی در آنجا نگهداری شدند.

سنجش آنزیم

به منظور تهیه عصاره آنزیمی برای سنجش آنزیم‌های گلوکاتایون پراکسیداز و لاکتات دهیدروژناز، نمونه‌های تخم تاس‌ماهی ایرانی توزین شدند و به آن‌ها بافر فسفات پتاسیم (pH ۷/۴) به میزان یک میلی‌لیتر به ازای هر ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه اضافه شد. نمونه‌ها به روی یخ به مدت ۹۰ ثانیه هموژن شدند. سپس به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (Hermle, Z36HK, Laborotechnik, آلمان) شدند و سوپرناتانت حاصل تا زمان سنجش آنزیم در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Atli and Canli, 2010).

سنجش فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH)، به ترتیب ۷۵۰ میکرولیتر Tris/NaCl/NADH و ۱۲۰ میکرولیتر از

(۰/۱ مولار، pH ۷/۴) حل شدند. سپس ۳۰ میکرولیتر TSP^۲ به عنوان استاندارد داخلی به آن‌ها اضافه شد. محلول به دست آمده در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. در انتها برای آنالیز HNMR ۶۵۰ میکرولیتر از محلول به تیوب‌های NMR ۵ میلی‌متری اضافه شد (Aru et al., 2016).

محاسبه غلظت لاکتات در طیف‌های حاصل از

HNMR

برای شناسایی متابولیت لاکتات، ابتدا طیف‌های به دست آمده از HNMR با استفاده از نرم‌افزار Chenomex Processor (Chenomx NMR Suite 8.2, Chenomx) (Inc., Canada) پردازش شد، خطوط پایه تنظیم شد و تصحیح فاز بر اساس پیک آب و TSP انجام شد. پس از قرار دادن پیک TSP (استاندارد داخلی) در تغییر شیمیایی ۰ ppm، وارد کردن pH نمونه (۷/۴) و غلظت TSP در نرم‌افزار، طیف مربوطه با پسوند Cnx ذخیره و سپس با استفاده از نرم‌افزار Chenomex Profiler (Chenomx NMR Suite 8.2,) (Chenomx Inc., Canada) باز و غلظت

استفاده شد. روش مورد استفاده برای استخراج روش متانول/کلروفرم/آب بود. ابتدا نمونه‌های فریز شده توزین و به ازای هر گرم نمونه، ۱۲ میلی‌لیتر حلال (کلروفرم/متانول/آب به نسبت ۲:۱:۱) به نمونه‌ها اضافه شد. سپس نمونه‌ها روی یخ با استفاده از همزن‌نایزر برقی، هموزن شدند. نمونه‌های هموزن شده به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه در سانتریفیوژ یخچال دار قرار داده شدند. بعد از سانتریفیوژ دو فاز تشکیل شد، فاز اول که حاوی متانول و آب با وزن مولکولی کمتر بود، شامل متابولیت‌های محلول در آب و فاز دوم یا کلروفرم که حاوی متابولیت‌های محلول در چربی بود، با استفاده از پیپت به دقت یکدیگر جدا شدند. سپس فاز آب/متانول با استفاده از دستگاه چرخان تبخیر کننده (Concentrator Eppendorf, Plus, آلمان) خشک شد و تا زمان سنجش متابولیت به روش HNMR^۱ در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

آماده‌سازی نمونه‌ها برای HNMR

نمونه‌های خشک شده در دستگاه تغلیظ کننده در ۶۷۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم

2- Trimethylsilyl Propanoic Acid Sodium Salt

1- Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance

توسط نرم افزار Microsoft Excel 2007 رسم شد.

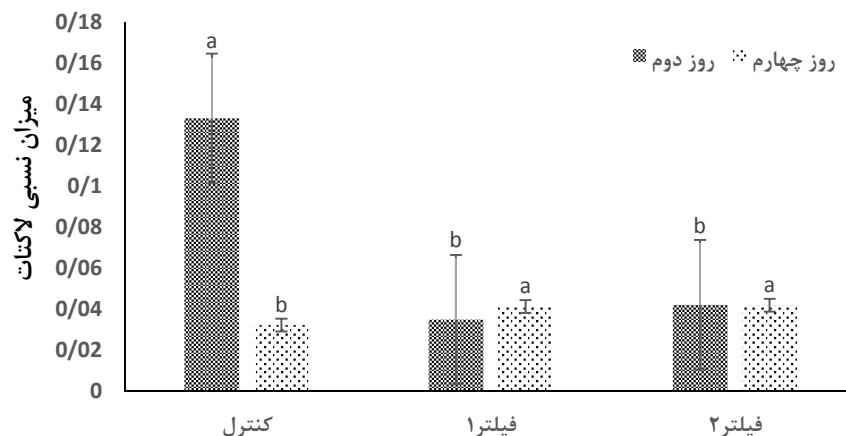
لاکتات در هر نمونه محاسبه شد (Campagna et al., 2016).

پردازش آماری داده‌ها

برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌های به دست آمده از مطالعات آنزیمی و همچنین متابولیت لاکتات از نرم افزار SPSS 22 استفاده شد. برای تعیین معنی دار بودن اختلاف داده‌ها از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (One way ANOVA) و پس از آن دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. تمام سنجش‌ها در سه تکرار انجام شد. نمودارها نیز

نتایج

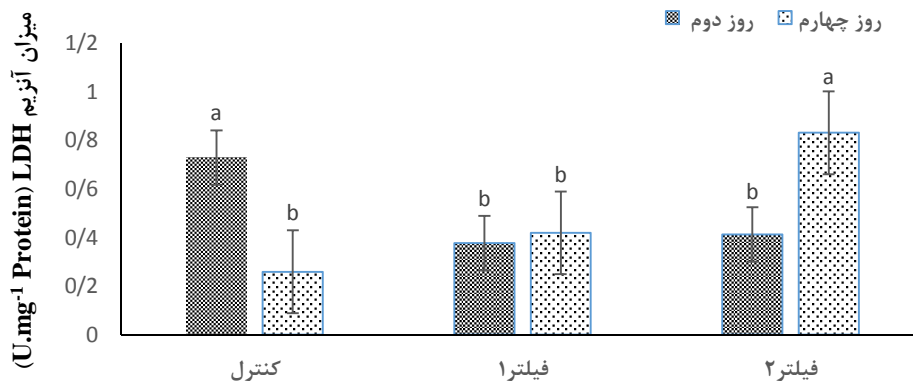
تغییرات فعالیت لاکتات و آنزیم‌های لاکتات دهیدروژناز و گلوکاتایون پراکسیداز نتایج سنجش متابولیت لاکتات در جنین تاس ماهی ایرانی نشان داد که میزان نسبی لاکتات در گروه‌های حاوی فیلتر نانوقره، در دومین روز انکوباسیون کمتر از گروه شاهد و در چهارمین روز انکوباسیون بیشتر از گروه‌های شاهد بود (شکل ۱).



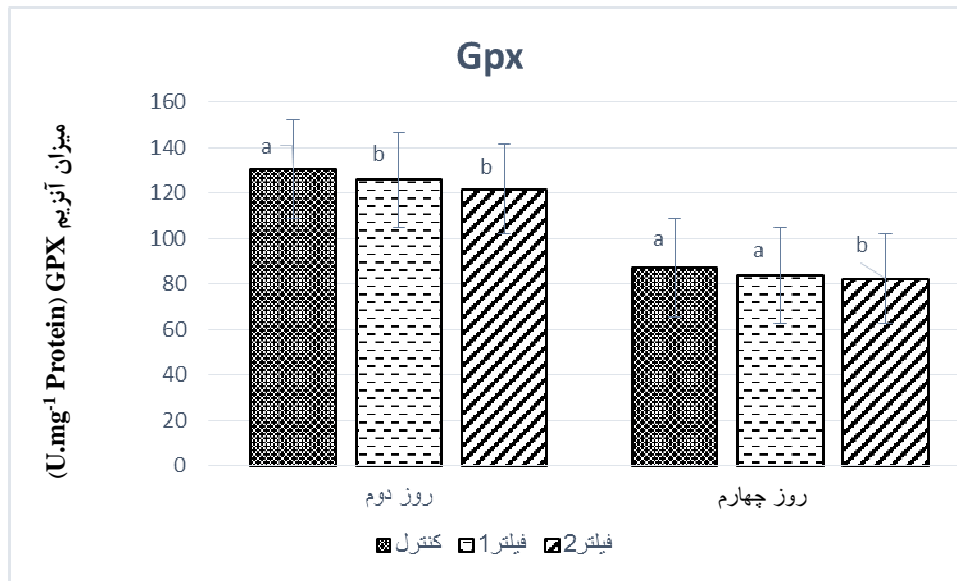
شکل ۱: میزان نسبی لاکتات در جنین‌های تاس ماهی ایرانی نگهداری شده در تیمارهای شاهد و نانوقره در دومین و چهارمین روز انکوباسیون (میانگین \pm خطای استاندارد). فیلتر ۱: دارای یک درصد نانوقره و بدون آمینوپروپیل تری اتوکسی سیلان؛ فیلتر ۲: دارای یک درصد نانوقره و آمینوپروپیل تری اتوکسی سیلان. حروف انگلیسی متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار است ($P < 0/05$).

روند کلی مشاهده شده در تغییرات لاکتات دهیدروژناز (LDH) مانند لاکتات بود و در دومین روز انکوباسیون نسبت به شاهد کاهش و در چهارمین روز افزایش نشان داد (شکل ۲). روند مشاهده شده در تغییرات آنزیم GPX، طی مراحل رشد و نمو جنینی با LDH

متفاوت بود و در گروه شاهد طی دوره انکوباسیون روند کاهشی نشان داد و در گروه‌های حاوی فیلتر نانونقره نیز میزان GPX در هر دو نوبت نمونه‌برداری نسبت به شاهد کاهش نشان داد (شکل ۳).



شکل ۲: سطوح آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) در جنین‌های تاس‌ماهی ایرانی در تیمارهای شاهد و نانونقره در دومین و چهارمین روز انکوباسیون (میانگین \pm خطای استاندارد). فیلتر ۱: دارای یک درصد نانونقره و بدون آمینوپروپیل تری‌اتوکسی سیلان؛ فیلتر ۲: دارای یک درصد نانونقره و آمینوپروپیل تری‌اتوکسی سیلان. حروف انگلیسی متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$).



شکل ۳: سطوح آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز (GPX) در جنین‌های تاس‌ماهی ایرانی در تیمارهای شاهد و نانوقره در دومین و چهارمین روز انکوباسیون (میانگین \pm خطای استاندارد). فیلتر ۱: دارای یک درصد نانوقره و بدون آمینوپروپیل تری‌اتوکسی سیلان؛ فیلتر ۲: دارای یک درصد نانوقره و آمینوپروپیل تری‌اتوکسی سیلان. حروف انگلیسی متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$).

بحث

نانوذرات نقره، آن‌ها را به گزینه‌ای مناسب برای تصفیه آب از طریق پوشش‌دهی بر روی بسترهای مختلف و استفاده در سیستم‌های فیلتراسیون آب تبدیل کرده است (Johari et al., 2016). در فیلترهای مورد استفاده در این مطالعه که حاوی بسترهای ژئولیت و سیلیس بودند، رهایش نانوقره به داخل آب کمتر از میزان مجاز اعلام شده برای آب آشامیدنی

نانوذرات نقره به دلیل خاصیت ضد میکروبی خود در محصولات متنوعی مورد استفاده قرار می‌گیرند و استفاده از آن‌ها در آبی‌پروری نیز رو به افزایش است. یکی از ویژگی‌های منحصر به فرد نانوذرات از جمله نانوذرات نقره، ترکیب شدن آسان آن‌ها با سایر مواد و پوشش‌دهی موثر سطوح است. این ویژگی

پایین‌تر بود که ممکن است ناشی از دنا توره شدن قسمتی از لاکتات دهیدروژناز توسط نانوذرات نقره باشد. فلزات سنگین سمی هستند و به مولکول‌های پروتئین و به ویژه به گروه‌های تیول آنزیم‌های حیاتی متصل می‌شوند و با آن‌ها واکنش می‌دهند (Bhupendra et al., 2010). گفته می‌شود نقره نیز به گروه‌های عاملی پروتئین‌ها وصل می‌شوند و منجر به غیرفعال‌سازی و دنا توره شدن پروتئین‌ها می‌شود (Piao et al., 2011)، در نتیجه میزان لاکتات دهیدروژناز در گروه‌های حاوی فیلتر و به تبع آن میزان لاکتات در آن‌ها کاهش می‌یابد. در چهارمین روز انکوباسیون مشاهده شد که میزان لاکتات در گروه شاهد کاهش نشان داده است. Osman و همکاران (۲۰۰۷) نیز اظهار داشتند که میزان LDH در اولین روزهای بعد لقاح بالاتر بود و پس از آن در طول تکوین جنین میزان آن کاهش یافت. بنابراین کاهش لاکتات در گروه شاهد، در چهارمین روز انکوباسیون هم می‌تواند به دلیل تجزیه ذخایر مادری (Osman et al., 2007) و کاهش ذخایر LDH موجود در جنین ماهی ناشی از عملکرد ژن‌های مادری باشد (Shaklee and Whitt, 1977) به طوری که میزان آنزیم لاکتات دهیدروژناز نیز در چهارمین روز

(۱ppm)، توسط آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا (EPA)^۱ و سازمان بهداشت جهانی (WHO)^۲ بود (بنان، ۱۳۹۵).

در دومین روز انکوباسیون همان طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، میزان لاکتات سنجش شده در گروه شاهد بیشتر از گروه‌های تحت فیلتر نانونقره بود. میزان بالای لاکتات جنین‌های تاس‌ماهی ایرانی در گروه شاهد می‌تواند ناشی از لاکتات دهیدروژناز ژن‌های مادری باشد (Shaklee and Whitt, 1977) که منجر به تولید بالاتر متابولیت لاکتات در جنین‌های این گروه شاهد شده است. به طوری که در شکل ۲ نیز میزان بالای لاکتات دهیدروژناز در دومین روز انکوباسیون در گروه شاهد مشهود است. از سوی دیگر پژوهشگران عقیده دارند، در طول مراحل اولیه رشد و نمو تخم، جنین معمولاً به شرایط بی‌هوازی تکیه دارد و این امر پذیرفته شده است که پس از مراحل گاسترولاسیون تا حدود زیادی تامین انرژی متابولیستی به متابولیسم هوازی تکیه دارد (Finn et al., 1995). اما در جنین‌های نگهداری شده در انکوباتور حاوی نانوذرات نقره، در دومین روز انکوباسیون، میزان لاکتات

1 United States Environmental Protection Agency

2 World Health Organization

درباره فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز، در هر دو نوبت نمونه برداری، در هر دو گروه حاوی فیلتر نانوقره، میزان آنزیم به طور معنی داری کمتر از گروه شاهد بود. با توجه به این که در مرحله جنینی، قسمت زیادی از بستر تغذیه ای را چربی های حاوی اسیدهای چرب غیراشباع تشکیل می دهند و تمایل به اکسید شدن دارند، پس نقش این آنزیم بسیار مهم خواهد بود. در مطالعه حاضر، میزان آنزیم GPX در طول دوره انکوباسیون کاهش پیدا کرد. Massarsky و همکاران (۲۰۱۳) نیز مشاهده کردند که در جنین ماهی گورخری (*Danio rerio*) با افزایش غلظت نانوذرات نقره، فعالیت GPX کاهش یافت. دلیل این کاهش ممکن است، تقابل یون نقره با گروه های تیول موجود در آنزیم GPX باشد. آنزیم GPX از طریق کاهش GSH، هیدروپراکسید تولیدی ناشی از اثر نانوذرات نقره را حذف می کند. از سوی دیگر در برخی مطالعات گزارش شده است که نانوذرات نقره به دلیل تولید ROS سبب کاهش ذخایر گلوکاتایون در سلول های کبدی موش (Hussain et al., 2005) و سلول های بنیادی موش (Braydich-Stolle et al., 2005) شده است. از این رو، کاهش فعالیت GPX در گروه های نگهداری شده در

انکوباسیون کاهش یافت و احتمالاً به دلیل تکیه جنین به تنفس هوازی به جای تنفس بی هوازی است (Finn et al., 1995).

اما درباره جنین های نگهداری شده در معرض فیلتر حاوی نانوذرات نقره، مشاهده شد که میزان لاکتات و لاکتات دهیدروژناز در روز چهارم انکوباسیون افزایش نشان داد. در مطالعه Wu و Zhou (۲۰۱۲b) نیز مشاهده شد که در روزهای اول قرارگیری جنین مداکا در معرض نانوذرات نقره میزان لاکتات دهیدروژناز، پایین تر از گروه شاهد بود اما با افزایش زمان، میزان آن نسبت به شاهد افزایش یافت. افزایش لاکتات دهیدروژناز و لاکتات می تواند حاصل شرایط بی هوازی ایجاد شده توسط نانوذرات نقره باشد. نانوذرات نقره می توانند در منافذ کوریون تجمع یابند و نقل و انتقالات غشایی را دچار اختلال کنند (Lee et al., 2007). بنابراین در شرایط بی هوازی، تولید لاکتات دهیدروژناز و لاکتات در جنین افزایش می یابد. افزایش لاکتات در کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) (Lardon et al., 2013) و *Austrofundulus limnaeus* (Podrabsky et al., 2007) در اثر شرایط هیپوکسی و در *Gasterosteus aculeatus* در اثر وجود مس گزارش شده است (Wu et al., 2009).

کاهش نشان داد (Regoli et al., 2005). بنابراین روند کاهش GPX در سه گروه مورد آزمایش می‌تواند روند طبیعی تغییرات آنزیم GPX، طی مراحل رشد و نمو جنینی باشد. برای جمع‌بندی نهایی می‌توان اظهار کرد که با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعات آنزیمی و متابولیت لاکتات، به نظر می‌رسد لاکتات دهیدروژناز و لاکتات نسبت به گلوکاتیون پراکسیداز، به عنوان نشانگرهای زیستی آنزیمی و متابولیتی قابل اطمینانی محسوب شوند و تغییرات درون سلولی را که ممکن است در آینده بر ماهی اثرگذار باشند بهتر نمایان می‌کنند، ضمن این که استنتاج دقیق‌تر این موضوع مستلزم بررسی ماهیان مواجه شده با این فیلتر در سنین بالاتر است.

فیلتر می‌تواند به دلیل کاهش GSH باشد (Mannervik, 1987).

در مطالعه حاضر، در مقایسه آنزیم GPX در دو نوبت نمونه‌برداری، در تمام تیمارها روند کاهش مشاهده شد. مطالعات Diaz و همکاران (۲۰۱۰) بر روی جنین *Acipenser naccarii* روند کاهش آنزیم GPX را از سومین روز بعد از لقاح تا زمان تفریح نشان داد. به طور مشابهی آزمایش‌ها بر روی جنین *Lates calcarifer* نیز روند کاهش را از زمان لقاح تا تفریح برای این آنزیم گزارش کردند. اگر چه در زمان گاسترولاسیون میزان آن اندکی افزایش داشت (Kalaimani et al., 2008). در مطالعه انجام شده بر روی *Pleuragramma antarcticum* نیز از زمان لقاح تا ۳-۵ روز بعد از لقاح میزان GPX روند

منابع

- بنان ا. ۱۳۹۵. کاربرد فیلترهای حاوی نانوذرات نقره در کنترل عفونت قارچی دوران انکوباسیون و مقایسه اثرات حاد و مزمن آن بر تغییرات شاخص‌های فیزیولوژیکی و آسیب DNA بچه تاس‌ماهی ایرانی *Acipenser persicus* در شوری‌های مختلف. پایان‌نامه دکتری تخصصی، دانشگاه تربیت مدرس. ۹۸ص.
- سالنامه آماری سازمان شیلات ایران. ۱۳۹۳. دفتر برنامه‌ریزی و بودجه، انتشارات سازمان
- Environmental Safety, 73: 1884–1889.
- Braydich-Stolle L., Hussain S., Schlager J.J. and Hofmann M.C. 2005.** In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicological Sciences*, 88(2): 412–419.
- Bandyopadhyay U., Das D. and Banerjee R.K. 1999.** Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis. *Current Science*, 77(5): 658–666.
- Bhupendra C., Anjana K., Nidhi A. and updhyay R.V. 2010.** Highly bacterial resistant silver nanoparticles: Synthesis and antibacterial activities. *Journal of Nanoparticle Research*, 12(5): 1677–1685.
- Bilberg K., Hans M., Tobias W. and Erik B. 2010.** Silver nanoparticles and silver nitrate
- شیلات ایران. ۶۴ص.
- شهیم ا.، کلباسی م.، سلطانی م. و جوهری س.ع. ۱۳۹۴. کاربرد فوم‌های پلی‌اورتان محتوی زئولیت نقره در سیستم فیلتراسیون آب پرورش بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به منظور جلوگیری از عفونت استرپتوکوکوس اینیایی. مجله تحقیقات دامپزشکی، ۷۰(۱): ۶۳–۷۱.
- Arora S., Jain J., Rajwade M. and Paknikar K.M. 2008.** Cellular responses induced by silver nanoparticles. In *Vitro Studies*, 179(2): 93–100.
- Aru V., Pisano M.B., Savorani F., Engelsen S.B., Cosentino S. and Cesare Marincola F. 2016.** Metabolomics analysis of shucked mussels' freshness. *Food Chemistry*, 205: 58–65.
- Asharani P.V., Mun G.L.K., Hande M.P. and Valiyaveetil S. 2009.** Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *American Chemical Society Nano*, 3: 279–290.
- Atli G. and Canli M. 2010.** Ecotoxicology and environmental safety response of antioxidant system of freshwater fish *Oreochromis niloticus* to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures. *Ecotoxicology and*

- cause respiratory stress in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). *Aquatic Toxicology*, 96(2): 159–165.
- Bradford M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2): 248–254.
- Campagna M., Locci E., Piras R., Noto A., Lecca L.I., Pilia I., Cocco P.D., Aoja E. and Scano P. 2016.** Metabolomic patterns associated to QTc interval in shiftworkers: An explorative analysis. *Biomarkers*, 21(7): 607–613.
- Diaz M.E., Furne M., Trenzado C.E., Garcia-Gallego M., Domezain A., and Sanz A. 2010.** Antioxidant defences in the first life phases of the sturgeon *Acipenser naccarii*. *Aquaculture*, 307(1-2): 123–129.
- Fasulo S., Iacono F., Cappello T., Corsaro C., Maisano M., D'Agata A., Giannetto A., De Domenico E., Parrino V., Lo Paro G. and Mauceri A. 2012.** Metabolomic investigation of *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819) caged in aquatic environments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 84: 139–146.
- Finn R.N., Widdows J. and Fyhn H.J. 1995.** Calorespirometry of developing embryos and yolk-sac larvae of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Marine Biology*, 122(1): 157–163.
- Fitzpatrick M.S., Screck C.B.C. and Hitwood R.L. 1995.** Evaluation of three candidate fungicides for treatment of adult spring chinook salmon. *Progress in Fish Culturing*, 57: 153–155.
- Folch J., Less M. and Stanley G.H.S. 1957.** A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226: 497–509.
- Hussain S.M., Hess K.L., Gearhart J.M., Geiss K.T. and Schlager J.J. 2005.** In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology In Vitro*, 19: 975–983.
- Johari S.A., Kalbassi M.R., Soltani M. and Yu I.J. 2016.** Application of nanosilver-coated zeolite as water filter media for fungal disinfection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. *Aquaculture International*, 24(1): 23–38.
- Kalaimani N., Chakravarthy N., Shanmughan R., Thirunavukkarasu A.R., Alavandi S.V. and Santiago T.C. 2008.** Anti-oxidant status in embryonic, post-hatch and larval

- stages of Asian seabass (*Late calcarifer*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 34: 151–158.
- Kalbassi M.R., Shahim A., Soltani M. and Johari S.A. 2011.** Application of polyurethane foam containing silver zeolite (Zeomic) in water filtration system for infection control of *Streptococcus iniaie* in rainbow trout. International Conference on Biological Responses to Nanoscale Particles. University of Duisburg, Germany.
- Kuthan H., Haussmann H.J. and Werringlover J. 1986.** Aspectrophotometric assay for superoxide dismutase activities in crude tissue fractions. *Biochemichal Journal*, 237: 175–180.
- Lardon I., Eyckmans M., Vu T.N., Laukens K., De Boeck G. and Domnisse R. 2013.** 1H-NMR study of the metabolome of a moderately hypoxia-tolerant fish, the common carp (*Cyprinus carpio*). *Metabolomics*, 9(6): 1216–1227.
- Lee K.J., Nallathamby P.D., Browning L.M., Osgood C.J. and Xu X.H.N. 2007.** In vivo imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of zebrafish embryos. *American Chemical Society Applied Nano Material*, 1(2): 133–143.
- Lin C.T., Lee T.L., Duan K.J. and Su J.C. 2001.** Purification and characterization of black porgy muscle Cu/Zn superoxide dismutase. *Zoological Studies*, 40(2): 84–90.
- Mannervik B., Castro V.M., Danielson U.H., Tahir M.K., Hansson J. and Ringborg U. 1987.** Increase in the amount of glutathione transferase. *Carcinogenesis*, 8: 1929–1932.
- Markert C.L. and Faulhaber I. 1965.** Lactate dehydrogenase isozyme patterns of fish. *Journal of Experimental Zoology*, 159(3): 319–332.
- Massarsky A., Dupuis L., Taylor J., Eisa-Beygi S., Strek L., Trudeau V.L. and Moon TW. 2013.** Assessment of nanosilver toxicity during zebrafish (*Danio rerio*) development. *Chemosphere*, 92(1): 59–66.
- Mohan Y.M., Lee K., Premkumar T. and Geckeler K.E. 2007.** Hydrogel networks as nanoreactors: A novel approach to silver nanoparticles for antibacterial applications. *Polymer*, 48(1): 158–164.
- Mourente G., Bell J.G. and Tocher D.R. 2007.** Does dietary tocopherol level affect fatty acid metabolism in fish? *Fish Physiology and Biochemistry*, 33: 269–280.

- Osman A.G.M., Mekkawy I.A., Verreth J. and Kirschbaum F. 2007.** Effects of lead nitrate on the activity of metabolic enzymes during early developmental stages of the African catfish *Clarias gariepinus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 33: 1–13.
- Piao M.J., Kang K.A., Lee I.K., Kim H.S., Kim S., Choi J.Y. and Hyun J.W. 2011.** Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicology Letters*, 201(1): 92–100.
- Podrabsky J.E., James P.L., Teresa W.M., Fan R.H. and George N.S. 2007.** Extreme anoxia tolerance in embryos of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*: Insights from a metabolomics analysis. *The Journal of Experimental Biology*, 210: 2253–2266.
- Pottinger T.G. and Day J.G. 1999.** A *Saprolegnia parasitica* challenge system for rainbow trout: Assessment of Pyceze as an antifungal control agent for both fish and ova. *Diseases of Aquatic Organisms*, 36: 129–141.
- Pourkazemi M. 2006.** Caspian Sea sturgeon conservation and fisheries: Past present and future. *Journal of Applied Ichthyology*, 22(1): 12–16.
- Prabakaran S., Swatton J.E., Ryan M.M., Huffaker S.J., Huang J.T.J., Griffin J.L. and Bahn S. 2004.** Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: Evidence for compromised brain metabolism and oxidative stress. *Molecular Psychiatry*, 9(7): 684–697.
- Regoli F., Nigro M., Benedetti M., Fattorini D. and Gorbi S. 2005.** Antioxidant efficiency in early life stages of the Antarctic silverfish, *Pleuragramma antarcticum*: Responsiveness to pro-oxidant conditions of platelet ice and chemical exposure. *Aquatic Toxicology*, 75(1): 43–52.
- Shaklee J.B. and Whitt G.S. 1977.** Patterns of enzyme ontogeny in developing sunfish. *Differentiation*, 9: 85–95.
- Sotiriou G.A. and Pratsinis S.E. 2010.** Antibacterial activity of nanosilver ions and particles. *Environmental Science and Technology*, 44(14): 5649–5654.
- Taniyama Y. and Griendling K.K. 2003.** Reactive oxygen species in the vasculature. *Molecular and Cellular Mechanism Journal*, 42: 1075–1081.
- Wu H., Ortega F., Falciani F., Viant M.R., Chipman J.K. and Tyler C.R. 2009.** Identifying health impacts of exposure to copper using transcriptomics and

metabolomics in a fish model. *Environmental Science And Technology*, 44(2): 820–826.

Wu Y. and Zhou Q. 2012a. Silver nanoparticles cause oxidative damage and histological changes in medaka (*Oryzias Latipes*) after 14 days of exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(1): 165–173.

Wu Y. and Zhou Q. 2012b. Dose- and time-related changes in aerobic metabolism, chorionic

disruption, and oxidative stress in embryonic medaka (*Oryzias latipes*): Underlying mechanisms for silver nanoparticle developmental toxicity. *Aquatic Toxicology* 124–125: 238–246.

Wu H., Liu X., Zhang X., Ji C., Zhao J. and Yu J. 2013. Proteomic and metabolomic responses of clam *Ruditapes philippinarum* to arsenic exposure under different salinities. *Aquatic Toxicology*, 136–137: 91–100.



Effects of filters containing silver nanoparticles on lactate, lactate dehydrogenase and glutathione peroxidase of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) embryo

Sahel Soltan Karimi¹, Mohammad Reza Kalbasi^{2*}

Received: February 2017

Accepted: June 2017

Abstract

Silver nanoparticles because of their antibacterial properties have become one of the most widely used combinations of nanomaterial and due to the development of nanoparticles, there are the risks of releasing of such materials to the environment from products containing them. In this study, six types of a filter containing silver nanoparticles containing 0.25, 0.5 and 1 percentage nanosilver with and without Aminopropyl triethoxysilane is used to control the Saprolegnia fungus in Persian sturgeon egg incubators. Two of six filters contain one percentage of silver nanoparticles could prevent Saprolegnia fungus completely as the optimal filter. The effects of these two types of optimized filters on embryos of Persian sturgeon kept in the incubator examined by studying the changes of some oxidative enzymes including glutathione peroxidase and lactate dehydrogenase and also by studying lactate changes by HNMR, in the second and fourth days of the incubation period. The results showed that the use of filters containing silver nanoparticles due to the release of silver from the filter into the water reduced glutathione peroxidase in both sampling days and reduced lactate and lactate dehydrogenase in second incubation day and increased them in the fourth day. So measuring these enzymes is a good biomarker for early assessment of those intracellular changes in fish that are affected by such filters.

Key words: *Persian Sturgeon, Nano Silver, Lactate Dehydrogenase, Glutathione Peroxidase, Lactate.*

1- Ph.D. in Fisheries, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.

2- Professor in Department of Fisheries, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.

*Corresponding Author: kalbassi_m@modares.ac.ir