

Changes in metabolic indexes of the Caspian kutum fry in acute and subacute exposure to the nanoparticle of copper oxide and silver nanocolloid

Mina Ahmadpour¹, Razyeh Amani², Behrooz Heidari^{3*}

1. M.A. in Marine Biology, Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran

2. M.A. in Marine Biology, Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran

3. Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran and Associate Professor, Department of Marine Sciences, Caspian Sea Basin Research Center, University of Guilan, Rasht, Iran

(Received: Jan. 27, 2019 - Accepted: Jun. 15, 2019)

تغییرات شاخص‌های متابولیسمی بچه ماهی سفید دریای خزر در مواجهه حاد و نیمه‌مزمن با ترکیبات نانوذرات اکسید مس و نانوکلئید نقره

مینا احمدپور^۱، رازی‌ه امانی^۲، بهروز حیدری^{۳*}

۱. کارشناس ارشد، زیست‌شناسی دریا، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۲. کارشناس ارشد، زیست‌شناسی دریا، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۳. دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران و دانشیار، گروه علوم دریایی، پژوهشکده حوضه آبی دریای خزر، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۳/۲۵)

Abstract

The high application of the nanoparticles in industry, health and agriculture increases the possibility of nanoparticles entering the environment, especially the aquatic environment. In the present study, the effects of nano colloidal silver and copper oxide nanoparticles (Cu_2ONPs) were investigated on the liver and blood plasma of the Caspian kutum (*Rutilus kutum*) fry by measuring the activity of the ALT, AST, ALP and LDH enzymes. The samples (17.1 ± 3.6 g) were prepared from the Propagation and Reconstruction Center of Dr. Yousoufpour. After exposing the fish to different concentrations of the nano colloidal silver and Cu_2ONPs , the blood was collected on the 7th and 21st days of the experiment. At the same time, the liver tissue of the fish was removed and stored in the $-70^\circ C$ until analyzes of the parameters. The results showed changes in the activity of the enzymes in the liver and plasma of the Caspian kutum fry. The most changes of enzymes were observed in the plasma on the 7th day of the experiment. The LDH enzyme had the most changes in the plasma other than the enzymes. On the 21st day, only the plasma LDH had a significant variation. In the liver, the levels of ALT, AST, ALP and LDH enzymes were almost increased during exposure to the nanoparticles. In the liver, as with plasma, the most changes of the enzymes belonged to the LDH. In conclusion, fluctuations in the metabolic enzymes indicate a change in the physiological state of fish under nanoparticles stress that can threaten aquatic health.

Keywords: Enzyme, fish, nanoparticles, pollutants, stress.

چکیده

افزایش کاربرد و مصرف نانوذرات در صنعت، بهداشت و کشاورزی امکان ورود این نانوذرات به محیط‌زیست، خصوصاً محیط‌های آبی را افزایش می‌دهد. مطالعه حاضر، اثرات نانوذرات کلئید نقره و اکسیدمس (Cu_2O) بر کبد و پلاسمای خون بچه ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus kutum*) با سنجش میزان فعالیت آنزیم‌های ALT، AST، ALP و LDH را بررسی کرد. بچه ماهی‌ها (17.1 ± 3.6 گرم) از مرکز تکثیر و بازسازی دکتر یوسف پور تهیه شدند. پس از تیمار بندی و در معرض قرار دادن ماهی‌ها با نانوذرات کلئید نقره و نانوذرات اکسیدمس (Cu_2ONPs) در غلظت‌های مختلف، خون‌گیری در دو نوبت در روز هفتم و بیست و یکم آزمایش انجام گرفت. هم‌زمان بافت کبد ماهی‌ها نیز جدا شد و در فریزر $-70^\circ C$ تا زمان انجام آنالیز پارامترها نگه‌داری شدند. نتایج، تغییر در فعالیت آنزیم‌ها در کبد و پلاسمای خون بچه ماهی سفید دریای خزر در معرض نانوذرات را نشان داد. بیشترین تغییرات در پلاسما در روز هفتم آزمایش مشاهده شد. آنزیم LDH نسبت به دیگر آنزیم‌ها بیشترین تغییرات را در پلاسما داشت. در روز بیست و یکم آزمایش فقط آنزیم LDH در پلاسما دارای تغییرات معنی‌دار نسبت به شاهد بود. در کبد، سطوح آنزیم‌های ALT، AST، ALP و LDH در معرض نانوذرات تقریباً افزایش یافتند. در کبد همانند پلاسما بیشترین تغییرات متعلق به آنزیم LDH بود. در مجموع، تغییر در آنزیم‌های متابولیسمی نشان‌دهنده تغییر در وضعیت فیزیولوژیک ماهی تحت استرس ایجادشده توسط نانوذرات که می‌تواند سلامت آبی را به خطر بیندازد.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات، آنزیم، آلاینده‌ها، استرس، ماهی.

مقدمه

ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus kutum*) یکی از مهم‌ترین ماهیان شیلاتی در شمال ایران است. ارزش غذایی و اقتصادی بالای این گونه باعث شده مورد توجه صیادان و مردم حاشیه دریای خزر باشد (Shafiei sabet *et al.*, 2015). کاهش ذخایر این گونه در سال‌های گذشته به دلایل مختلفی همچون صید بیش‌ازحد، تخریب مناطق نوزادگاهی و چراگاهی و ورود فاضلاب به محیط‌زیست آن بوده است (Fazli *et al.*, 2014). در سال‌های گذشته تکثیر مصنوعی این گونه باعث افزایش ذخایر آن در دریای خزر شده است (Shafiei sabet *et al.*, 2015). اما ورود فاضلاب‌های شهری، کشاورزی و صنعتی از طریق رودخانه‌های حوضه آبریز دریای خزر (Karbassi & Nadjafpour, 1996) همچنان حیات این گونه را تهدید می‌کند. از طرفی در سال‌های اخیر پیشرفت نانو تکنولوژی، افزایش تولید و مصرف محصولات حاوی نانوذرات در ایران مشاهده شده است (Ghazinoory *et al.*, 2012)، که این مسئله می‌تواند باعث افزایش تولید فاضلاب نانویی و ورود آن به دریای خزر شود.

نانوذرات نقره و مس جز پرکاربردترین نانوذرات هستند (Ahmadi *et al.*, 2016; Beyene *et al.*, 2017). خواص ضد میکروبی این نانوذرات (Beyene *et al.*, 2017; Perreault *et al.*, 2012) از دلایل کاربرد وسیع آن‌ها می‌باشد. این نانوذرات دارای کاربردهای فراوان در زمینه‌های مختلفی همچون پزشکی، نساجی و لوازم‌آرایی می‌باشند (Abdel-Khalek *et al.*, 2015; Echavarri-Bravo *et al.*, 2017; Jahan *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2017). در واقع کاربردهای متنوع و مفید نانوذرات باعث پیشرفت و بهبود کیفیت زندگی شده است (Morganti *et al.*, 2007) و در اقتصاد کشورهای مختلف بسیار

تأثیرگذار می‌باشند (Sarkar & Beitollahi 2009). ولی با توجه به افزایش تولید و استفاده از نانومواد مهندسی‌شده نیاز است که تأثیر این نانومواد بر محیط‌زیست و خطرات احتمالی آن‌ها بویژه در رابطه با ماهیان خوراکی بیشتر مورد بررسی قرار بگیرد. در این راستا Monfared & Soltani (2013) اثرات نانوذرات نقره را بر روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بررسی کردند. نتایج نشان‌دهنده آسیب به بافت کبد و افزایش میزان برخی از آنزیم‌های کبدی در سرم خون ماهیان بود. در مطالعه‌ای دیگر Abdel-Khalek *et al.* (2015) سمیت نانوذرات اکسید مس و اکسید مس توده را در ماهی تیلاپپای نیل مورد بررسی قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان‌دهنده سمیت بیشتر نانوذرات اکسید مس در مقایسه با اکسید مس توده بود. همچنین اثرات نامطلوب بر هپاتوسیت‌های کبد، کاهش فعالیت میتوکندری، کاهش زیست‌پذیری سلول و یکپارچگی غشا در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در معرض با نانوذرات نقره دیده شده است (Farkas *et al.*, 2010). نانوذرات به‌عنوان یک عامل تنش‌زا می‌توانند باعث تغییرات فیزیولوژیک در ماهیان شوند (Razmara *et al.*, 2014). در واقع نانوذرات می‌توانند وارد بدن موجودات شده و در غشا نفوذ کرده و به سلول‌ها، بافت‌ها و اندام‌ها دسترسی داشته باشند (Beyene *et al.*, 2017) و به‌عنوان یک آلاینده می‌توانند بر عملکرد زیستی موجودات تأثیر منفی بگذارند.

یکی از مهم‌ترین شاخص‌های فیزیولوژیک در ماهیان ویژگی‌های بیوشیمیایی می‌باشد (Esmael *et al.*, 2018). بررسی پارامترهای بیوشیمیایی در بافت کبد که به‌عنوان اندام سم‌زدا شناخته می‌شود و در خون به دلیل نقش مهم آن در تعاملات بافت‌ها در سنجش وضعیت سلامت آبزیان از جمله ماهیان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. پارامترهای بیوشیمیایی می‌تواند شامل آنزیم‌های متابولیسمی نظیر آلانین آمینوترانسفراز (ALT)،

مدت ۷ روز در این شرایط نگاه‌داری شدند. در طول این مدت پارامترهای آب (میانگین دما $19 \pm 1^\circ\text{C}$ ، اکسیژن محلول $7.4 \pm 0.1 \text{ mg/L}$ ، pH 7.6 ± 0.2 و سختی آب $263 \pm 4 \text{ mg/L}$) به‌طور مداوم اندازه‌گیری شدند. غذاهای دو بار در روز انجام گرفت و هر بار یک ساعت بعد از غذاهای، باقی‌مانده غذا جهت جلوگیری از آلودگی جمع‌آوری شد.

تهیه نانوذرات

نانوکلئیدنقره با غلظت 4000 mg/L با نام تجاری نانوسید از شرکت نانو نصب پارس (تهران - ایران) تهیه شد. نانوذرات کلئید نقره به شکل کروی با قطر 160.6 نانومتر و به رنگ قهوه‌ای تیره بودند.

نانوذرات اکسیدمس (Cu_2O) با توجه به روش *Bai et al.* (2012) سنتز شد. جهت سنتز ابتدا 0.125 گرم پلی وینیل پیرولیدون (PVP) با 0.05 گرم استات مس مخلوط گردید و 100 میلی‌لیتر آب دیونیزه به آن‌ها اضافه شد، ارلن حاوی این مواد بر روی هم زن مغناطیسی با دور 300 قرار داده شد تا مواد به‌خوبی مخلوط شوند و محلول تقریباً آبی‌رنگی تشکیل شود. سپس مقدار 0.2 گرم سدیم هیدروکسید (NaOH) در 20 میلی‌لیتر آب دیونیزه حل گردید و درون بورت ریخته شد تا قطره‌قطره (۳ قطره در ثانیه) به محلول در حال به هم خوردن اضافه گردد. اضافه شدن سود به محلول اولیه باعث تغییر رنگ محلول به آبی شد. سپس 0.132 گرم اسید آسکوربیک که در 15 میلی‌لیتر آب دیونیزه حل شده بود داخل بورت ریخته شد. با اضافه کردن اسید آسکوربیک ابتدا رنگ محلول سبز شده و در نهایت پس از 30 دقیقه قرار گرفتن روی هم‌زن مغناطیسی به نارنجی تغییر رنگ داد. سپس به مدت 15 دقیقه و با دور 4000 rpm سانتریفیوژ شد (*Centurion Scientific, UK*)، در نهایت رسوب به‌دست‌آمده به مدت 24 ساعت درون آون قرار داده شد تا خشک شود (*Bai et al., 2012*).

آسپارات آمینوترانسفراز (AST)، آلکالین فسفاتاز (ALP) و لاکتات دهیدروژناز (LDH) باشد. آنزیم‌های ALT، AST و ALP به‌عنوان شاخص سلامت کبد محسوب می‌شوند (*Barzegarzadeh, Zarandi & Dabidy-Roshan, 2012*). آنزیم LDH در تشخیص آسیب‌های بافتی ناشی از آلاینده‌ها در ماهیان کاربرد دارد (*Esmaeel, Kaviyani et al., 2018*). همچنین این آنزیم‌ها در فرایندهای متابولیسمی مختلف نظیر چرخه کربس، گلیکولیز، گلوکونئوزنز، متابولیسم پروتئین و عملکرد سم‌زدایی کبد نقش دارند (*De Smet & Blust, Oloyede & 2001; Jiang et al., 2012; Sunmonu, 2008; Taheri et al., 2017; Vafadarnejad et al., 2018*).

با وجود مطالعات بسیار در رابطه با تأثیر فلزات سنگین و نانوذرات فلزی بر میزان فعالیت این آنزیم‌ها در ماهیان مختلف (*Esmaeel Kaviyani et al., 2018; Monfared & Soltani, 2013; Öner et al., 2008*)، مطالعات اندکی در رابطه با ماهی سفید دریای خزر به‌عنوان یک گونه ارزشمند و بومی وجود دارد. لذا در مطالعه حاضر به بررسی اثرات نانوذرات اکسیدمس (Cu_2O) و نانوکلئید نقره بر آنزیم‌های متابولیسمی (ALT، AST، ALP و LDH) در پلاسمای خون و کبد بچه ماهیان سفید دریای خزر (*Rutilus kutum*) پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

تعداد 200 قطعه بچه ماهی سفید با میانگین وزن $17/1 \pm 3/6$ گرم و میانگین قد $14 \pm 0/7$ سانتی‌متر از مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ژنتیکی ماهیان استخوانی شادروان دکتر یوسف پور واقع در سیاهکل تهیه شد. سپس بچه‌ماهی‌ها به وان فایبرگلاس 1000 لیتری واقع در کارگاه زیست‌شناسی دریا در دانشگاه گیلان انتقال پیدا کردند. جهت سازگاری نمونه‌ها به

آنالیز XRD

جهت تشخیص نوع ماده سنتز شده (Cu_2O) و همچنین فاز و خصوصیات کریستالی آن از روش XRD استفاده شد. برای این منظور ۰/۱ گرم از نانوذره سنتز شده به آزمایشگاه تحقیقاتی بیم گستر تابان واقع در تهران فرستاده شد.

تعیین $\text{LC}_{50}96\text{h}$ نانوکلوئید نقره

در آکواریوم‌هایی با حجم ۴۰ لیتر آب در شرایط یکسان (میانگین دما $19 \pm 1^\circ\text{C}$ ، اکسیژن محلول $7/4 \pm 0/1 \text{ mg/L}$ و سختی آب $7/6 \pm 0/2 \text{ pH}$ و سختی آب 263 ± 4) ۱۰ قطعه بچه ماهی سفید اضافه شده و غلظت‌های مختلف از نانوکلوئید نقره اعمال شد (Mazarei et al., 2015). در نهایت غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم/لیتر به‌عنوان $\text{LC}_{50}96\text{h}$ تعیین شد.

آزمایش دوم: تیمار بندی نانوذرات اکسیدمس I (Cu_2O)

با توجه به $\text{LC}_{50}96\text{h}$ نانوذره اکسید مس، غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵ از LC_{50} ۹۶ ساعته برای انجام آزمایش در نظر گرفته شد. ۱۵ قطعه نمونه ماهی برای هر تیمار در آکواریوم‌های شیشه‌ای با حجم ۸۳ لیتر برای ایجاد غلظت‌های فوق در شرایط یکسان فیزیکی‌وشیمیایی در نظر گرفته شدند. برای ایجاد سازگاری به مدت ۲۴ ساعت ماهی‌ها در آکواریوم نگهداری شدند. ۲۴ ساعت قبل از شروع آزمایش غذادهی متوقف گردید. قبل از اضافه کردن نانوذرات به آکواریوم‌ها، نانو ذرات به مدت ۵ دقیقه توسط دستگاه سونیکاتور همگن شدند. نمونه‌برداری به‌صورت تصادفی در روزهای هفتم و بیست و یکم انجام گرفت.

تهیه نمونه خون

به‌منظور انجام نمونه‌گیری در روزهای هفتم و بیست و یکم آزمایش تعداد سه قطعه بچه ماهی به‌صورت تصادفی از هر یک از آکواریوم‌های تیمار و شاهد گرفته شد. ابتدا خون‌گیری از ورید ساقه دمی با استفاده از سرنگ انسولین آغشته به ماده ضد انعقاد (EDTA) انجام شد. برای جداسازی پلاسما به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ و در دمای 4°C سانتریفیوژ شده (Centurion Scientific, UK) سپس پلاسماهای جدا شده به فریزر -70 تا زمان انجام آنالیزها انتقال پیدا کردند.

تهیه نمونه کبد

برای آماده‌سازی نمونه‌های کبد جهت سنجش آنزیمی، ابتدا کبدها وزن شدند، سپس با توجه به وزن هر قطعه کبد به نسبت ۱ به ۵، بافر فسفات ($\text{pH}=7/2$) به آن‌ها اضافه شد و به مدت ۲ دقیقه توسط دستگاه سونیکاتور هموزن شدند. در ادامه، جهت جداسازی ضایعات بافتی به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ و در دمای 4°C سانتریفیوژ شد

آزمایش اول: تیمار بندی نانوذرات کلوئید نقره

با توجه به $\text{LC}_{50}96\text{h}$ به‌دست‌آمده غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۳۵ و ۰/۷ از غلظت LC_{50} ۹۶ ساعته برای انجام آزمایش در نظر گرفته شد. برای ایجاد غلظت‌های فوق و شاهد با شرایط یکسان فیزیکی‌وشیمیایی ذکر شده، تعداد ۱۵ قطعه نمونه برای هر تیمار به آکواریوم‌های شیشه‌ای با حجم ۸۰ لیتر اضافه شدند. برای ایجاد سازگاری، ۲۴ ساعت در آکواریوم‌ها نگهداری شده و غذادهی ۲۴ ساعت قبل از شروع آزمایش متوقف گردید. بعد از تیمار بندی نمونه‌برداری به‌صورت تصادفی در روزهای هفتم و بیست و یکم انجام گرفت.

تعیین $\text{LC}_{50}96\text{h}$ نانوذرات اکسیدمس I (Cu_2O)

با توجه به مطالعه (Jahanbakhshi et al., 2015)، $\text{LC}_{50}96\text{h}$ نانوذره اکسید مس برای ماهی سفید دریای خزر مقدار ۱/۷ میلی‌گرم بر لیتر در نظر گرفته شد (Jahanbakhshi et al., 2015).

داده‌ها بین تیمارهای مختلف از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) و پس‌آزمون دانکن با سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P < 0.05$) استفاده شد. جهت بررسی تفاوت در روزهای ۷ و ۲۱ آزمایش آزمون T-Test مستقل در نظر گرفته شد.

نتایج

خصوصیات نانوذره اکسید مس

آنالیز پراش اشعه X (XRD) جهت بررسی نانوذرات اکسیدمس I (Cu_2O) سنتز شده انجام گرفت (شکل ۱). با توجه به نتایج XRD و نمودار حاصل از آن و همچنین با توجه به (Jcpds file No-77-0199) نمونه سنتز شده با داده‌های حاصل از روش سنتز یکسان بوده و تنها ماده تشکیل‌شده، نانوذره اکسیدمس I (Cu_2O) می‌باشد. همچنین با استفاده از داده‌های آنالیز XRD و فرمول دبای شرر ($L = \frac{k\lambda}{\beta \cos\theta}$) و قرار دادن طول موج اشعه ایکس برابر 1.54 \AA (انگستروم λ)، پهنای نیمه ارتفاع برابر 0.246 (β) و موقعیت بلندترین پیک برابر $36/48$ ($\cos\theta$)، اندازه ذرات حاصل از سنتز نانوذره اکسیدمس I (Cu_2O) $35/5$ نانومتر به دست آمد (ثابت $K=0.9$).

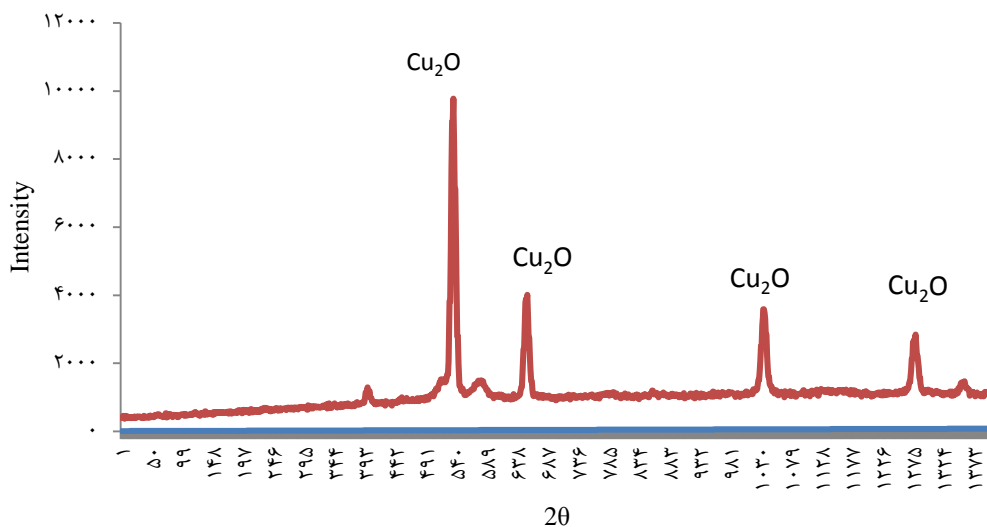
(Centurion Scientific, UK). در نهایت مایع رویی جهت انجام سنجش آنزیمی برداشته شد.

سنجش آنزیم‌ها

جهت سنجش آنزیم‌ها از کیت‌های آنزیمی شرکت پارس آزمون (ایران- تهران) استفاده گردید. برای این منظور با توجه به دستورالعمل داخل هر کیت برای سنجش آنزیم ALT و AST از روش IFCC (فدراسیون بین‌المللی شیمی بالینی و طب آزمایشگاهی) و برای آنزیم‌های ALP و LDH از روش DGKC (استاندارد انجمن بیوشیمی آلمان) استفاده گردید. سپس جذب نمونه‌ها برای آنزیم‌های ALT، AST و LDH در طول موج 405 نانومتر و برای آنزیم ALP در طول موج 405 نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد.

آنالیز آماری

جهت تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نسخه ۲۵ نرم‌افزار SPSS و جهت ترسیم نمودارها از نرم‌افزار Excel 2007 استفاده گردید. برای سنجش پراکنش نرمال داده‌ها از روش Kolmogrov-Smirnov استفاده گردید. در صورت نرمال بودن، جهت تشخیص تفاوت

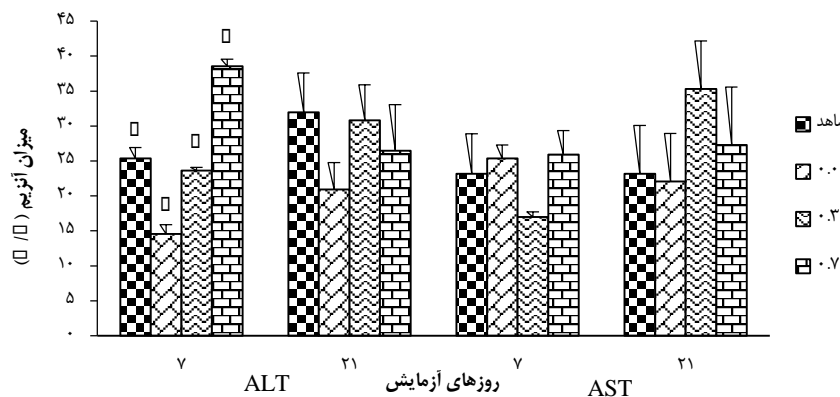


شکل ۱. آنالیز XRD نانوذرات اکسیدمس I (Cu_2O)

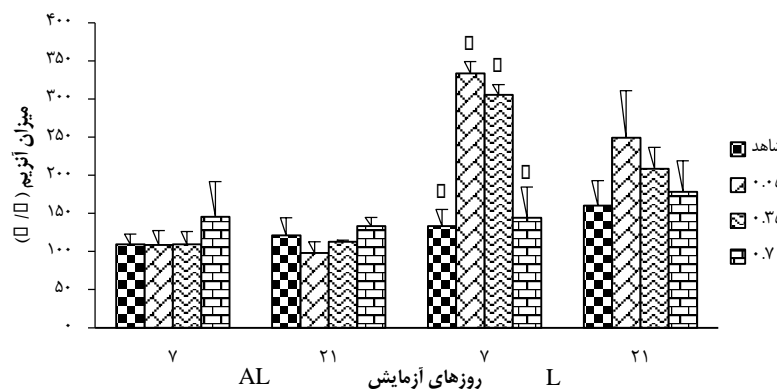
اثرات نانوکلوئیدنقره بر آنزیم‌های پلاسمای خون

آنالیز داده‌های آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) پلاسما در روز هفتم معارضه با نانوکلوئید نقره نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف بود ($p < 0.05$). تیمار ۰/۷ دارای افزایش معنی‌دار و تیمار ۰/۰۵ دارای کاهش معنی‌دار نسبت به تیمار شاهد بودند ($p < 0.05$). اختلاف معنی‌داری در میزان آنزیم ALT در روز بیست و یکم آزمایش در بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد ($p > 0.05$). (شکل ۲). بیشترین میزان ALT در روز هفتم آزمایش در غلظت ۰/۷ ثبت گردید. آنالیز داده‌های آنزیم آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) پلاسما هیچ‌گونه تغییر معنی‌داری در تیمارهای مختلف در معارضه با نانوکلوئیدنقره در روزهای هفتم و بیست و یکم آزمایش نشان نداد.

(شکل ۲) ($p > 0.05$) میانگین میزان آنزیم AST در روز بیست و یکم بیشتر از روز هفتم بود ($p < 0.05$). آنالیز داده‌های آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) پلاسما هیچ‌گونه تغییر معنی‌داری در تیمارهای مختلف در معارضه با نانوکلوئید نقره در روزهای هفتم و بیست و یکم آزمایش نشان نداد ($p > 0.05$) (شکل ۳). آنالیز داده‌های آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) در روز هفتم آزمایش بین تیمارهای مختلف در معارضه با نانوکلوئیدنقره نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بود. درواقع تیمار ۰/۰۵ و ۰/۳۵ دارای افزایش معنی‌دار نسبت به شاهد بودند ($p < 0.05$). آنالیز داده‌های روز بیست و یکم هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین تیمارها نشان نداد (شکل ۳). بیشترین میزان LDH در روز هفتم آزمایش و در غلظت ۰/۰۵ و ۰/۳۵ ثبت گردید.



شکل ۲. میزان فعالیت آنزیم‌های ALT و AST پلاسما در غلظت‌های مختلف از نانوکلوئیدنقره در روزهای هفتم و بیست و یکم آزمایش. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.05$).



شکل ۳. میزان فعالیت آنزیم‌های LDH و ALP پلاسما در غلظت‌های مختلف از نانوکلوئیدنقره در روزهای هفتم و بیست و یکم آزمایش. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.05$). داده‌های LDH تقسیم بر ۱۰۰ شده است.

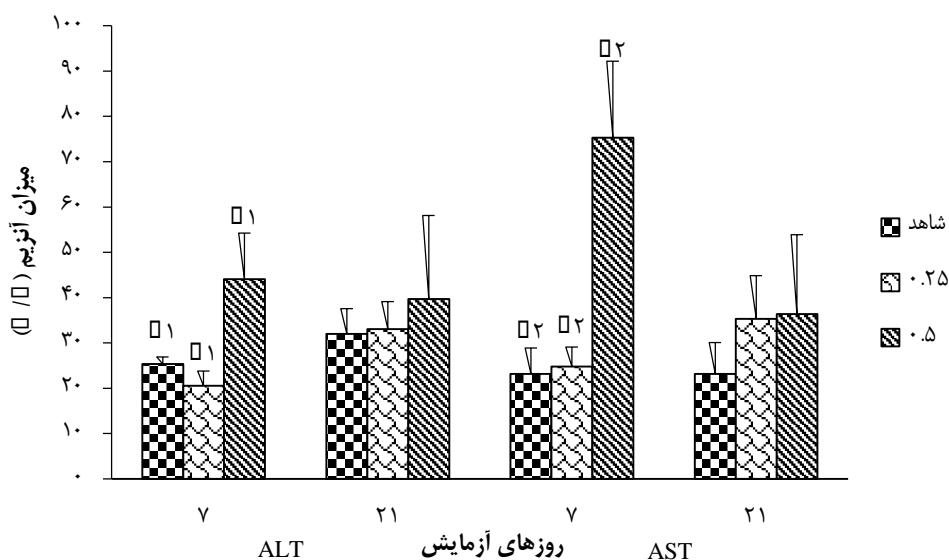
آنالیز داده‌های آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) در پلاسما ماهی‌ها در تیمارهای در معرض با نانوذرات اکسیدمس I (Cu₂O) نشان‌دهنده تغییرات معنی‌دار در روز هفتم آزمایش بود ($p < 0.05$) (شکل ۵). به‌گونه‌ای که تیمار ۰/۵ و ۰/۲۵ دارای کاهش معنی‌دار نسبت به شاهد بودند ($p < 0.05$). تغییرات معنی‌داری در میزان آنزیم ALP در روز بیست و یکم آزمایش مشاهده نشد ($p > 0.05$). میانگین میزان آنزیم در روز بیست و یکم نسبت به روز هفتم افزایش نشان داد.

آنالیز داده‌های آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) در پلاسما ماهی‌ها در تیمارهای مختلف در معرض با نانوذرات اکسیدمس I (Cu₂O) نشان‌دهنده تغییرات معنی‌دار در روز هفتم آزمایش بود ($p < 0.05$) (شکل ۵). هر دو تیمار ۰/۲۵ و ۰/۵ دارای افزایش معنی‌دار نسبت به شاهد بودند ($p < 0.05$). همچنین تغییرات معنی‌داری در میزان آنزیم LDH در روز بیست و یکم آزمایش مشاهده شد، به‌گونه‌ای که هر دو تیمار ۰/۵ و ۰/۲۵ دارای افزایش معنی‌دار نسبت به شاهد بودند (شکل ۵). بیشترین میزان غلظت آنزیم LDH در تیمار ۰/۵ در روزهای هفتم و بیست و یکم آزمایش ثبت گردید.

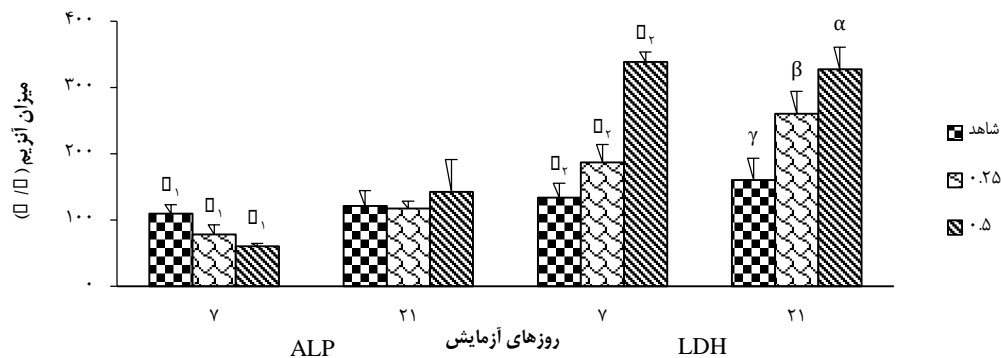
اثرات نانوذره اکسیدمس I (Cu₂O) بر فعالیت آنزیم‌های پلاسمای خون

آنالیز داده‌های آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) در پلاسما ماهی‌ها در تیمارهای در معرض با نانوذرات اکسیدمس I (Cu₂O) نشان‌دهنده تغییرات معنی‌دار در روز هفتم آزمایش بود ($p < 0.05$) (شکل ۴). به‌گونه‌ای که تیمار ۰/۵ دارای افزایش معنی‌دار نسبت به شاهد و تیمار ۰/۲۵ بود ($p < 0.05$) ولی تغییرات معنی‌داری در میزان آنزیم ALT در روز بیست و یکم آزمایش مشاهده نشد ($p > 0.05$). بیشترین میزان آنزیم ALT متعلق به تیمار ۰/۵ در روز هفتم بود (شکل ۴).

آنالیز داده‌های آنزیم آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) در پلاسما بچه ماهی سفید دریای خزر در تیمارهای مختلف در معرض با نانوذرات اکسیدمس I (Cu₂O) نشان‌دهنده تغییرات معنی‌دار در روز هفتم آزمایش بود ($p < 0.05$) (شکل ۴). تیمار ۰/۵ دارای افزایش معنی‌دار نسبت به شاهد و تیمار ۰/۲۵ بود ($p < 0.05$). تغییرات معنی‌داری در میزان آنزیم AST در روز بیست و یکم آزمایش مشاهده نشد ($p < 0.05$). همانند ALT، بیشترین میزان آنزیم AST در تیمار ۰/۵ در روز هفتم گزارش شد.



شکل ۴. میزان فعالیت آنزیم‌های ALT و AST پلاسما در غلظت‌های مختلف از نانوذره اکسیدمس I در روزهای هفتم و بیست و یکم آزمایش. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.05$).



شکل ۵. میزان فعالیت آنزیم‌های ALP و LDH پلاسما در غلظت‌های مختلف از نانوذره اکسیدمس I در روزهای هفتم و بیست و یکم آزمایش. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.05$). داده‌های LDH تقسیم بر ۱۰۰ شده است.

نسبت به سایر تیمارها بود ($p < 0.05$). در روز بیست و یکم فقط تیمار ۰/۷ دارای افزایش معنی‌دار نسبت به شاهد بود و تیمار ۰/۰۵ کاهش معنی‌دار نسبت به شاهد داشت ($p < 0.05$) (شکل ۷).

آنالیز داده‌های آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) کبد در تیمارهای مختلف در معارضه با نانوکلوئیدنقره نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در روز هفتم و بیست و یکم آزمایش بود ($p < 0.05$) (شکل ۷). تیمارها در روز هفتم دارای افزایش معنی‌دار نسبت به شاهد بودند ($p < 0.05$). در روز بیست و یکم نیز تیمارها همگی دارای افزایش معنی‌دار نسبت به شاهد بودند، همچنین تیمارهای ۰/۷ و ۰/۳۵ دارای افزایش معنی‌دار نسبت به تیمار ۰/۰۵ بودند ($p < 0.05$) (شکل ۷).

اثرات نانوذره اکسیدمس I (Cu_2O) بر میزان فعالیت آنزیم‌ها در کبد

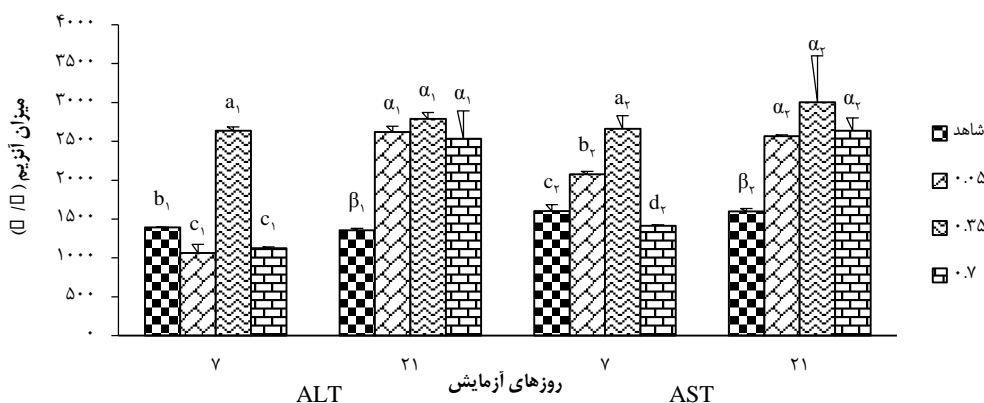
آنالیز داده‌های آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) کبد در تیمارهای مختلف در معارضه با نانوذره اکسیدمس I (Cu_2O) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در روز ۷ و ۲۱ آزمایش بود ($p < 0.05$) (شکل ۸). تیمار ۰/۵ دارای افزایش معنی‌دار نسبت به تیمار ۰/۲۵ در روز هفتم آزمایش بود ($p < 0.05$). در روز بیست و یکم نیز تیمار ۰/۵ دارای افزایش معنی‌دار نسبت به شاهد و تیمار ۰/۲۵ بود ($p < 0.05$) (شکل ۸). بیشترین میزان غلظت آنزیم ALT در تیمار ۰/۵ در روزهای ۷ و ۲۱ مشاهده گردید.

اثرات نانوکلوئیدنقره بر میزان فعالیت آنزیم‌ها در کبد

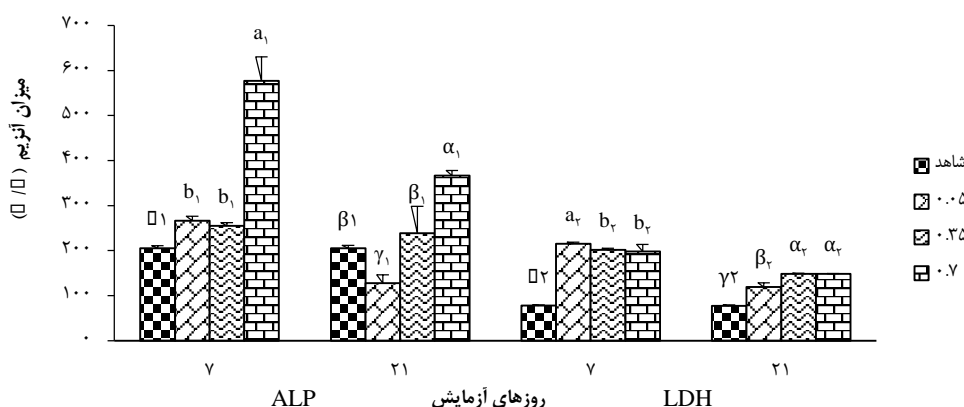
آنالیز داده‌های آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) در کبد ماهی‌ها در تیمارهای در معرض با نانوکلوئیدنقره نشان‌دهنده تغییرات معنی‌دار در روز ۷ و ۲۱ آزمایش بود ($p < 0.05$) (شکل ۶). در روز هفتم آزمایش تیمار ۰/۳۵ دارای افزایش معنی‌دار و دو تیمار ۰/۷ و ۰/۰۵ دارای کاهش معنی‌دار نسبت به شاهد بودند ($p < 0.05$). همچنین افزایش معنی‌دار در میزان آنزیم ALT در هر سه تیمار در روز بیست و یکم آزمایش مشاهده شد ($p < 0.05$) (شکل ۶).

آنالیز داده‌های آنزیم آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) کبد در تیمارهای مختلف در معارضه با نانوکلوئیدنقره نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در روز هفتم و بیست و یکم آزمایش بود ($p < 0.05$) (شکل ۶). در روز هفتم آزمایش، تیمار ۰/۳۵ و ۰/۰۵ دارای افزایش معنی‌دار نسبت به شاهد بودند ($p < 0.05$). تمامی تیمارها در روز بیست و یکم دارای افزایش معنی‌دار نسبت به شاهد بودند ($p < 0.05$) (شکل ۶).

آنالیز داده‌های آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) کبد در تیمارهای مختلف در معارضه با نانوکلوئیدنقره نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در روز هفتم و بیست و یکم آزمایش بود ($p < 0.05$) (شکل ۷). تیمارها در روز هفتم دارای افزایش معنی‌دار نسبت به شاهد بودند ($p < 0.05$). همچنین تیمار ۰/۷ دارای افزایش معنی‌دار



شکل ۶. میزان فعالیت آنزیم ALT و AST کبد در غلظت‌های مختلف از نانوکلوئیدنقره در روزهای هفتم و بیست و یکم آزمایش. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.05$).



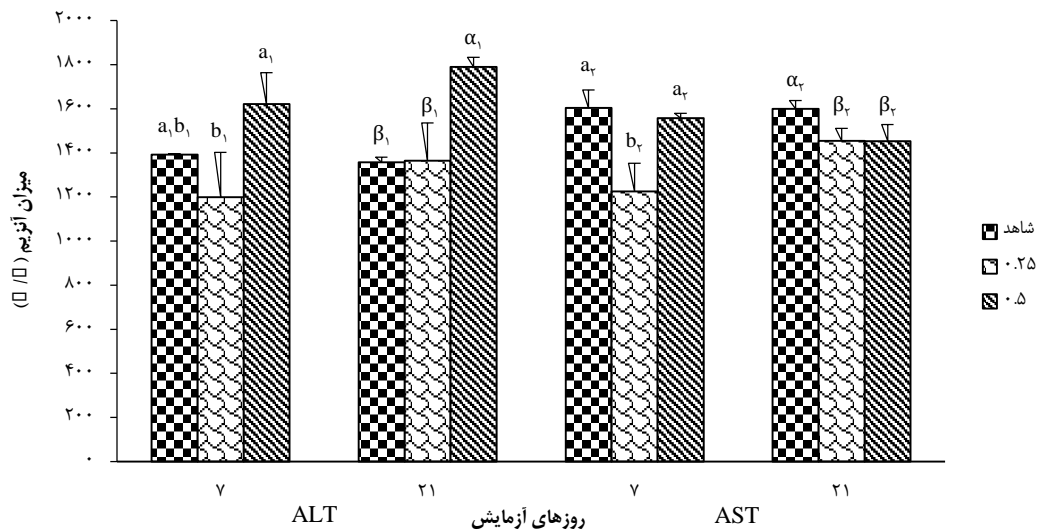
شکل ۷. میزان فعالیت آنزیم ALP و LDH کبد در غلظت‌های مختلف از نانوکلوئیدنقره در روزهای هفتم و بیست و یکم آزمایش. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.05$). داده‌های LDH تقسیم بر ۱۰۰ شده است.

آزمایش بودند ($p < 0.05$). در روز بیست و یکم نیز هر دو تیمار ۰/۵ و ۰/۲۵ دارای کاهش معنی‌دار نسبت به شاهد بودند ($p < 0.05$) (شکل ۹).

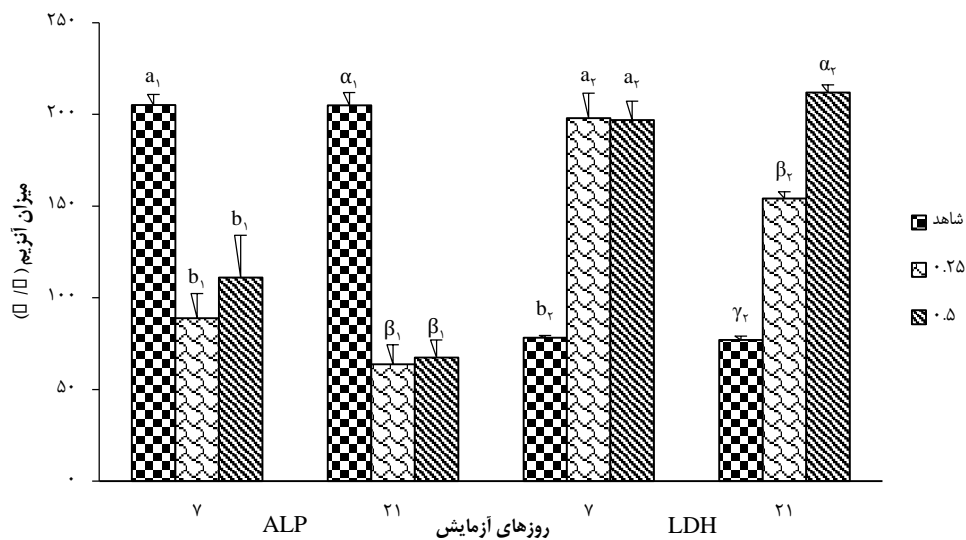
آنالیز داده‌های آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) کبد در تیمارهای مختلف در معارضه با نانوذره اکسیدمس I (Cu₂O) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در روز هفتم و بیست و یکم آزمایش بود ($p < 0.05$) (شکل ۹). تیمار ۰/۲۵ و ۰/۵ دارای افزایش معنی‌دار نسبت به تیمار شاهد در روز هفتم آزمایش بودند ($p < 0.05$). در روز بیست و یکم نیز هر دو تیمار ۰/۵ و ۰/۲۵ دارای افزایش معنی‌دار نسبت به شاهد بودند ($p < 0.05$) همچنین تیمار ۰/۵ دارای افزایش معنی‌دار نسبت به تیمار ۰/۲۵ بود (شکل ۹).

آنالیز داده‌های آنزیم آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) کبد در تیمارهای مختلف در معارضه با نانوذره اکسیدمس I (Cu₂O) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در روز هفتم و بیست و یکم آزمایش بود ($p < 0.05$) (شکل ۸). تیمار ۰/۲۵ دارای کاهش معنی‌دار نسبت به تیمار شاهد و تیمار ۰/۵ در روز هفتم آزمایش بود ($p < 0.05$). در روز بیست و یکم نیز هر دو تیمار ۰/۲۵ و ۰/۵ دارای کاهش معنی‌دار نسبت به شاهد بودند ($p < 0.05$) (شکل ۸).

آنالیز داده‌های آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) کبد در تیمارهای مختلف در معارضه با نانوذره اکسیدمس I (Cu₂O) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در روز ۷ و ۲۱ آزمایش بود ($p < 0.05$) (شکل ۹). تیمار ۰/۲۵ و ۰/۵ دارای کاهش معنی‌دار نسبت به تیمار شاهد در روز هفتم



شکل ۸. میزان فعالیت آنزیم‌های ALT و AST کبد در غلظت‌های مختلف از نانوذره اکسیدمس I (Cu₂O) در روزهای هفتم و بیست و یکم آزمایش. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشد (p < ۰/۰۵).



شکل ۹. میزان فعالیت آنزیم‌های ALP و LDH کبد در غلظت‌های مختلف از نانوذره اکسیدمس I (Cu₂O) در روزهای هفتم و بیست و یکم آزمایش. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشد (p < ۰/۰۵). داده‌های LDH تقسیم بر ۱۰۰ شده است.

در روز ۲۱ آزمایش در بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد. همچنین با اینکه میزان آنزیم AST به‌خصوص در غلظت‌های بالاتر و در روز ۲۱ نسبت به شاهد افزایش نشان داد ولی این افزایش معنی‌دار نبود. رابطه با نانوذرات اکسیدمس I، افزایش معنی‌دار در میزان فعالیت آنزیم‌های ALT و AST در روز هفتم آزمایش در تیمار ۰/۵ نسبت به تیمار ۰/۲۵ و شاهد مشاهده شد. در ضمن هیچ‌گونه تغییر معنی‌داری در

بحث

تغییر در میزان فعالیت آنزیم‌ها در پلاسمای خون ماهیان در معرض با نانوذرات

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر میزان آنزیم ALT در روز هفتم آزمایش در تیمارهای در معرض با نانوکلوئیدنقره، در تیمار ۰/۷ دارای افزایش معنی‌دار و در تیمار ۰/۰۵ دارای کاهش معنی‌دار نسبت به شاهد بود و تفاوت معنی‌داری در میزان این آنزیم

توده را در ماهی تیلاپپای نیل بررسی کردند و افزایش فعالیت آنزیم‌های ALT، AST و ALP در سرم خون ماهیان در معرض نانوذرات را گزارش کردند. آن‌ها افزایش آمینوترانسفرازها را ناشی از تخریب سلول‌های کبدی یا افزایش سنتز آنزیم‌ها توسط کبد و افزایش ALP را ناشی از تغییرات فیزیولوژیکی و عملکردی در ماهیان در معرض با نانوذرات دانسته‌اند (Abdel-Khalek *et al.*, 2015).

در مطالعه حاضر هیچ‌گونه تغییر معنی‌داری در میزان آنزیم ALP در پلاسماي خون ماهیان در معرض با نانوکلوئیدنقره در روز هفتم و بیست و یکم آزمایش مشاهده نشد. ولی در رابطه با نانوذرات اکسیدمس I کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم در روز ۷ آزمایش در تیمارهای ۰/۵ و ۰/۲۵ نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد اما تغییرات معنی‌داری در میزان آنزیم در روز ۲۱ آزمایش مشاهده نشد. البته به‌طور کلی میزان فعالیت آنزیم ALP در روز ۲۱ در مقایسه با روز ۷ دارای افزایش بود. نانوذرات می‌توانند وارد گردش خون کبدی شده و در مجاری صفراوی و مجاری پانکراس رسوب کرده و باعث انسداد تدریجی آن‌ها شوند و یا برای سلول‌های کبدی ایجاد سمیت کنند (Soleimani *et al.*, 2015). لذا کاهش میزان فعالیت آنزیم ALP در تیمارهای در معرض با نانوذرات اکسیدمس I می‌تواند ناشی از تخریب مجاری صفراوی و یا سلول‌های کبدی باشد. علاوه بر آن کاهش این آنزیم می‌تواند ناشی از اثر مهارکنندگی مستقیم این نانوذرات بر آنزیم ALP باشد. گزارش شده یون‌های منیزیم قادر به مهار و کاهش فعالیت آنزیم ALP هستند (Farah *et al.*, 2012). لذا این احتمال نیز وجود دارد که نانوذرات مس باعث اختلال در عملکرد سلول‌ها شده و باعث آزاد شدن یون‌های منیزیم به خون و کاهش سطح سرمی ALP شده باشند. در مطالعه‌ای کاهش فعالیت آنزیم ALP در سرم خون ماهی کپور معمولی در معرض با نانوذرات اکسید مس گزارش شده است. آن‌ها دلیل احتمالی

میزان فعالیت هر دو آنزیم در روز ۲۱ آزمایش مشاهده نشد. آنزیم‌های ALT و AST جز آنزیم‌های غیرفعال در پلاسما هستند. افزایش این آنزیم‌ها در خون به‌عنوان شاخص آسیب کبدی در نظر گرفته شده و نشانه تغییر در عملکرد کبد (Monfared & Soltani, 2013) یا آسیب کبدی (Shahsavani *et al.*, 2010) است. افزایش مشاهده شده در میزان آنزیم ALT در تیمارهای در معرض با نانوذرات کلوئید نقره و اکسیدمس I می‌تواند نشان‌دهنده آسیب کبدی و به دنبال آن نشت این آنزیم از سلول‌های کبدی به جریان خون باشد. البته میزان نشت آنزیم‌های ALT و AST با توجه به میزان آسیب متفاوت است، در آسیب‌های خفیف ALT که در سیتوپلاسم هپاتوسیت‌ها وجود دارد به محیط خارج سلولی نشت می‌کند و در آسیب شدیدتر آنزیم AST که در اندامک‌های سلولی مانند میتوکندری‌ها وجود دارد به جریان خون وارد می‌شود (Imani *et al.*, 2016). لذا با توجه به این که در مطالعه حاضر آنزیم AST در تیمارهای در معرض با نانوکلوئیدنقره افزایش قابل توجهی نداشته است این احتمال وجود دارد که آسیب وارد شده خفیف باشد. ولی در رابطه با تیمارهای نانوذرات اکسیدمس I هر دو آنزیم ALT و AST دارای افزایش معنی‌دار نسبت به شاهد بود که می‌تواند ناشی از آسیب شدیدتر باشد، چراکه آنزیم AST آنزیمی است که در آسیب‌های شدید کبدی مطرح است. در مطالعه Monfared *et al.* (2013) افزایش میزان آنزیم ALT و AST در سرم خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در معرض با نانوذرات نقره مشاهده شد که در مورد آنزیم ALT با مطالعه حاضر در تیمارهای در معرض نانوکلوئیدنقره همسو است. در مطالعه Esmaeel Kaviyani *et al.* (2018) نیز افزایش فعالیت آنزیم ALT و AST در بچه ماهی آزاد خزر (*Salmo trutta caspius*) در معرض با نانوذرات اکسید مس مشاهده شد. Abdel-Khalek *et al.* (2015) سمیت نانوذرات اکسید مس و اکسید مس

مکانیسم‌هایی در بدن موجود جهت حفظ هموستاز و سازگاری با شرایط موجود باشد. همچنین این احتمال وجود دارد که اتصال نانوذرات به یکدیگر باعث کاهش اثرگذاری آن‌ها به‌مرورزمان شده باشد. در واقع نانوذرات تمایل به اتصال به یکدیگر دارند، اتصال آن‌ها به یکدیگر باعث افزایش سایز آن‌ها می‌شود. این امر می‌تواند باعث کاهش جذب سلولی و در نتیجه کاهش اثرگذاری آن‌ها شود. از طرفی با افزایش غلظت نانوذرات احتمال برخورد نانوذرات به یکدیگر و اتصال آن‌ها به یکدیگر افزایش می‌یابد.

در مجموع با توجه به نتایج به‌دست‌آمده می‌توان گفت که شدت آسیب‌های وارده در روز ۷ آزمایش بیشتر از روز ۲۱ است و به‌مرورزمان از آسیب‌های وارده کاسته می‌شود. همچنین با توجه به تغییر در میزان فعالیت آنزیم‌های پلاسمای خون در تیمارهای در معرض نانوذرات می‌توان گفت که نانوذرات اکسید مس دارای اثرات نامطلوب شدیدتری نسبت به نانوذرات کلوتید نقره بر بچه ماهی‌های سفید دریای خزر هستند.

تغییر در میزان فعالیت آنزیم‌ها در کبد ماهیان در معرض با نانوذرات

طبق نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر شاهد افزایش معنی‌دار در میزان فعالیت آنزیم‌های ALT و AST در بیشتر تیمارهای در معرض با نانوکلوئیدنقره در روز ۷ آزمایش بودیم. البته برخی از تیمارها کاهش معنی‌دار نسبت به شاهد نشان دادند. همچنین نتایج نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار در تمامی تیمارها در روز ۲۱ معارضه با نانوکلوئیدنقره نسبت به تیمار شاهد بود. به‌طورکلی میزان فعالیت آنزیم‌های ALT و AST دارای افزایش معنی‌دار در روز ۲۱ در مقایسه با روز ۷ آزمایش بود. در رابطه با نانوذرات اکسیدمس I فعالیت آنزیم ALT تنها در تیمار ۰/۵ در روز ۷ و ۲۱ آزمایش دارای افزایش معنی‌دار نسبت به شاهد و تیمار ۰/۲۵ بود. تیمار ۰/۲۵ در هر دو روز تفاوت معنی‌داری

کاهش فعالیت آنزیم ALP را اختلال در سیستم حمل‌ونقل غشایی بیان کرده‌اند (Hoseini *et al.*, 2016).

طبق نتایج، میزان آنزیم LDH در روز ۷ آزمایش در ماهیان در تیمارهای ۰/۰۵ و ۰/۳۵ از نانوکلوئیدنقره دارای افزایش معنی‌دار نسبت به شاهد بود و تیمار ۰/۷ تغییر معنی‌داری نشان نداد. هیچ‌گونه تغییرات معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم در روز ۲۱ آزمایش مشاهده نشد. به‌طورکلی میزان آنزیم LDH در روز ۲۱ نسبت به روز ۷ کاهش معنی‌دار نشان داد و به سطح شاهد نزدیک شد. آنزیم LDH در هر دو تیمار ۰/۵ و ۰/۲۵ از نانوذرات اکسیدمس I دارای افزایش معنی‌دار در روز ۷ و ۲۱ آزمایش بود. سطح سرمی این آنزیم در خون به دنبال آسیب غشای سلولی و یا نکرور سلول افزایش پیدا می‌کند (Esmael *et al.*, 2018). افزایش مشاهده‌شده در میزان این آنزیم در مطالعه حاضر می‌تواند در نتیجه آسیب به غشای سلولی و نشت این آنزیم از اندام‌های مختلف حاوی این آنزیم مانند کبد باشد. در این راستا در مطالعه Esmael *et al.* (2018) نیز افزایش فعالیت آنزیم LDH در ماهیان در معرض با نانوذرات روی مشاهده شد که به‌مرورزمان میزان این آنزیم در ماهیان در معرض کاهش یافت و به سطح شاهد نزدیک شد که همسو با مطالعه حاضر است. همچنین در مطالعه Vafadarnejad *et al.* (2018) افزایش فعالیت آنزیم‌های AST، ALP و LDH بدون تغییر فعالیت آنزیم ALT در ماهیان در معرض با نانو اکسید مس مشاهده شد.

به‌طورکلی تغییر معنی‌دار در میزان فعالیت آنزیم‌ها در روز ۷ آزمایش مشاهده شد، ولی به‌غیراز آنزیم LDH در تیمارهای در معرض با نانوذرات اکسیدمس I هیچ‌گونه تغییر معنی‌داری در روز ۲۱ آزمایش دیده نشد. در واقع اثرات نانوذرات در روزهای اول شدت داشته و با افزایش مدت‌زمان آزمایش از شدت اثرات کاسته شده است. این امر می‌تواند ناشی از

آمینوترانسفراز را ناشی از استرس فلزی دانسته و افزایش فعالیت آنزیم‌ها را ناشی از افزایش تقاضای انرژی و کاهش آن‌ها را ناشی از تجمع بالا نانوذرات در بافت می‌داند. کاهش فعالیت ALT و AST در تیمار ۰/۷ از نانوکلوئید نقره و تیمار ۰/۲۵ از نانوذرات اکسیدمس I می‌تواند ناشی از اثر مهارکنندگی مستقیم نانوذرات بر فعالیت آمینوترانسفرازها باشد. همچنین این احتمال وجود دارد که ناشی از تخریب بافت کبد باشد. در واقع در شدت آسیب کمتر می‌توانیم شاهد افزایش فعالیت آمینوترانسفرازها به دلیل افزایش تقاضای انرژی باشیم و با افزایش شدت آسیب کبدی به دلیل تخریب کبد شاهد کاهش فعالیت آن‌ها در کبد باشیم. همچنین با توجه به اینکه آنزیم AST به‌عنوان آنزیمی میتوکندریایی شناخته می‌شود این احتمال وجود دارد که آسیب به میتوکندری باعث کاهش فعالیت این آنزیم باشد. کاهش پتانسیل غشای میتوکندری، نشت لاکتات دهیدروژناز و افزایش اشکال فعال اکسیژن در سلول‌های کبدی موش‌های در معرض با نانوذرات نقره گزارش شده است (Hussain *et al.*, 2005). همچنین در مطالعه Farkas *et al.* (2010) کاهش فعالیت میتوکندری، کاهش زیست‌پذیری سلولی و یکپارچگی غشاء در هپاتوسیت‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در معرض با نانوذرات نقره مشاهده شد. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که نانوذرات نقره با کاهش فعالیت‌های متابولیک و یکپارچگی غشا دارای سمیت سلولی شدید برای سلول‌های کبدی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان هستند. از طرفی میزان فعالیت آنزیم AST در روز ۲۱ در مقایسه با روز ۷ افزایش نشان داد که می‌تواند ناشی از مکانیسم‌هایی در بدن موجود در جهت حفظ هموستاز باشد و یا این امکان وجود دارد که رسوب نانوذرات در کف آکواریوم ناشی از اتصال آن‌ها به یکدیگر و افزایش سایز آن‌ها از اثرگذاری نانوذرات کاسته و در نتیجه شاهد افزایش فعالیت آنزیم AST در کبد ماهیان در معرض با نانوذرات اکسیدمس بودیم.

با شاهد نشان نداد. همچنین میزان فعالیت آنزیم ALT در کبد ماهیان در معرض نانوذرات اکسیدمس دارای افزایش در روز ۲۱ در مقایسه با روز ۷ آزمایش بود. در رابطه با آنزیم AST شاهد کاهش معنی‌دار در تیمار ۰/۲۵ در روز ۷ آزمایش و در هر دو تیمار در روز ۲۱ آزمایش در مقایسه با تیمار شاهد بودیم. ولی به‌طور کلی میزان فعالیت آنزیم در روز ۲۱ در مقایسه با روز ۷ افزایش نشان داد. افزایش فعالیت آنزیم‌های ALT و AST در کبد می‌تواند ناشی از استرس ایجادشده توسط نانوذرات و به دنبال آن افزایش تقاضای انرژی در بدن باشد که با توجه به نقش آمینوترانسفرازها در متابولیسم پروتئین و اسیدآمینو به‌عنوان منابع تأمین‌کننده انرژی در ماهی‌ها می‌تواند موجب افزایش سنتز و فعالیت این آنزیم‌ها در کبد ماهیان در معرض با نانوذرات باشد. در مطالعه‌ای افزایش تخریب پروتئین، افزایش آمینواسیدهای آزاد و افزایش فعالیت آنزیم پروتئاز در کبد، به همراه افزایش فعالیت آنزیم‌های ALT و AST در کبد ماهیان کپور معمولی در معرض با کادمیوم مشاهده شد که افزایش فعالیت این آنزیم‌ها در کبد را ناشی از افزایش انتقال گروه‌های آمینی برای هدایت آمینواسیدهای آزاد به چرخه TCA^۱ و یا به نفع گلوکوتئوزن می‌دانند (De Smet & Blust 2001). در واقع ترانس آمینازها به‌عنوان آنزیم‌هایی که دارای نقش کلیدی در متابولیسم اسیدآمینو و ارائه‌دهنده واسطه‌های ضروری برای گلوکوتئوزن مطرح هستند (Oloyede & Sunmonu 2008). Oner *et al.* (2009) تأثیر فلزات سنگین روی، کادمیوم، نقره، کروم، مس را بر شاخص‌های آنزیمی و غیر آنزیمی در ماهی تیلاپیا نیل بررسی کردند که نتایج نشان‌دهنده افزایش میزان AST و کاهش ALT در کبد ماهی تیلاپیا نیل است. آن‌ها این افزایش و کاهش در سطح آنزیم‌های

1. Tricarboxylic acid

et al. (2012) افزایش فعالیت ALP در غلظت‌های پایین از مس و کاهش فعالیت آنزیم در غلظت‌های بالای مس در کبد ماهی *Carassius auratus gibelio var* مشاهده شد. آن‌ها افزایش فعالیت ALP را ناشی از افزایش سنتز این آنزیم و افزایش هیدرولیز استرهای فسفات برای آزاد کردن انرژی و افزایش عملکرد سم‌زدایی کبد دانسته‌اند و کاهش آن را ناشی از آسیب کبدی و اتصال مس به گروه‌های SH- بر روی آنزیم ALP و کاهش فعالیت آن می‌دانند. همچنین بیان می‌کند که این احتمال وجود دارد که آسیب به غشا با کاهش فسفولیپیدهای خاص مورد نیاز برای فعالیت این آنزیم باعث کاهش میزان فعالیت آنزیم شده باشد (Jiang *et al.*, 2012).

طبق نتایج افزایش فعالیت آنزیم LDH در روز ۷ و ۲۱ آزمایش در تمامی تیمارها در معرض با نانوکلوئیدنقره و نانوذرات اکسیدمس I مشاهده شد. البته میزان فعالیت آنزیم LDH در روز ۲۱ در مقایسه با روز ۷ کاهش معنی‌دار نشان داد. افزایش فعالیت آنزیم LDH در کبد ماهیان در معرض با نانوذرات می‌تواند نشان‌دهنده افزایش سنتز و فعالیت آنزیم به دلیل استرس ایجادشده توسط نانوذرات و افزایش تقاضای انرژی در بدن موجود باشد. چراکه LDH آنزیمی است که در مسیرهای بی‌هوازی تولید انرژی نقش دارد و در شرایطی که میزان زیاد انرژی در مدت‌زمان اندکی نیاز است، برای مثال در مقابله با استرس‌های شیمیایی فعالیت آن افزایش می‌یابد (Sabouri *et al.*, 2017). دلیل کاهش میزان فعالیت آنزیم LDH در روز ۲۱ در مقایسه با روز ۷ هم می‌تواند ناشی از مکانیسم‌هایی در بدن موجود جهت سازگاری با شرایط و حفظ هموستاز باشد. همچنین اتصال نانوذرات به یکدیگر و رسوب آن‌ها در کف آکواریوم می‌تواند باعث کاهش اثرگذاری آن‌ها و در نتیجه کاهش فعالیت آنزیم LDH شود. در این راستا اثر مکمل‌های غذایی نانوذرات اکسید روی بر برخی از بیومارکرهای بیوشیمیایی کپور معمولی

در رابطه با آنزیم ALP شاهد افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم در هر سه تیمار در معرض نانوکلوئیدنقره در روز ۷ آزمایش بودیم. البته در روز ۲۱ آزمایش تنها تیمار ۰/۷ افزایش معنی‌دار نسبت به شاهد نشان داد و در تیمار ۰/۰۵ کاهش معنی‌دار نسبت به شاهد دیده شد. همچنین میزان فعالیت آنزیم ALP در روز ۲۱ در مقایسه با روز ۷ دارای کاهش معنی‌دار بود. افزایش میزان فعالیت آنزیم ALP در کبد می‌تواند ناشی از افزایش سنتز آنزیم به دنبال تنش ایجادشده و افزایش نیاز انرژی در بدن باشد. در این راستا مطالعه Samsami *et al.* (2017) نشان‌دهنده افزایش فعالیت آنزیم‌های ALT، AST و ALP در کبد ماهی کپور معمولی در معرض با نانوکلوئیدنقره بود (Samsami *et al.*, 2017)، که با نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر همخوانی دارد. در مطالعه Sadeghi *et al.* (2017) افزایش فعالیت آنزیم‌های کبدی (ALT، AST و ALP) در کبد ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) در معرض با کلرید روی مشاهده شد (Sadeghi *et al.*, 2017). طبق نتایج میزان فعالیت آنزیم ALP در هر دو تیمار از نانوذرات اکسیدمس I در روز ۷ و ۲۱ آزمایش کاهش معنی‌دار نسبت به شاهد نشان داد. همچنین میزان فعالیت آنزیم ALP در روز ۲۱ در مقایسه با روز ۷ دارای کاهش معنی‌دار بود. کاهش فعالیت آنزیم می‌تواند ناشی از تخریب بافت کبد و یا آسیب به مجاری صفراوی باشد، همچنین احتمال مهار آنزیم توسط نانوذرات وجود دارد. علاوه بر آن یون منیزیم می‌تواند اثر مهارکنندگی بر فعالیت آنزیم ALP داشته باشد. لذا این احتمال وجود دارد نانوذرات با اثر تخریبی بر سلول‌ها باعث خروج یون منیزیم شده و در نتیجه باعث کاهش فعالیت ALP شوند. کاهش فعالیت آنزیم ALP و افزایش فعالیت آنزیم‌های ALT، AST و LDH در کبد و پلاسمای خون موش صحرائی در معرض با سلنیوم و جیوه گزارش شده است (El-Demerdash 2001). در مطالعه Jiang

در کل مطالعه حاضر نشان‌دهنده این است که نانوکلوئیدنقره و نانوذره اکسیدمس (Cu₂O) قادر به ایجاد تغییرات در پارامترهای بیوشیمیایی مورد مطالعه هستند. این تغییرات شامل افزایش و کاهش در فعالیت آنزیم‌های مذکور در بافت کبد و پلاسما خون ماهیان در معرض با نانوذرات بود. با توجه به نقش این آنزیم‌ها در فرآیندهای زیستی، هرگونه تغییر در میزان فعالیت این آنزیم‌ها می‌تواند نشانه ایجاد تنش در جاندار و اختلال در عملکرد یا آسیب به اندام‌های حاوی این آنزیم‌ها، به‌خصوص کبد باشد. در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که این نانوذرات دارای اثرات نامطلوب بر بچه ماهی‌های سفید دریای خزر (*Rutilus kutum*) هستند و وجود این نانوذرات در محیط‌زیست این گونه می‌تواند باعث اختلال در عملکرد فیزیولوژیک آن شود.

(*Cyprinus carpio*) بررسی شده است که نتایج نشان‌دهنده افزایش فعالیت آنزیم‌های ALT، AST، LDH و کاهش ALP در کبد ماهیان در معرض بود (Taheri *et al.*, 2017). آن‌ها افزایش فعالیت ALT و AST را ناشی از افزایش متابولیسم پروتئین در سلول و افزایش LDH را ناشی از استرس متابولیکی دانسته و کاهش ALP را ناشی از اثر مهارتی نانوذرات روی بر این آنزیم می‌دانند. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده به‌نظر می‌رسد که نانوذرات اکسید مس (Cu₂O) اثرات نامطلوب شدیدتری نسبت به نانوذرات کلوئید نقره بر کبد بچه ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus kutum*) دارند. در مجموع تقریباً شدت اثرات نانوذرات در روز ۲۱ کمتر از روز ۷ آزمایش بود که می‌تواند ناشی از سازگاری موجود باشد.

REFERENCES

- Abdel-Khalek, A.A.; Kadry, M.A.; Badran, S.R.; Marie, M.A.S. (2015). Comparative toxicity of copper oxide bulk and nano particles in Nile tilapia; *Oreochromis niloticus*: biochemical and oxidative stress. *The Journal of Basic & Applied Zoology*; 72: 43-57.
- Ahmadi, H.; Naemi, A.S.; Nazarhaghghi, F.; Ghafari, H. (2016). Subacute Effects of copper oxide nanoparticles on some hematological indices and gill tissue of the juvenile carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Aquaculture Development*; 10(4): 1-14.
- Bai, Y.; Yang, T.; Gu, Q.; Cheng, G.; Zheng, R. (2012). Shape control mechanism of cuprous oxide nanoparticles in aqueous colloidal solutions. *Powder Technology*; 227: 35-42.
- Barzegarzadeh-Zarandi, H.; Dabidy-Roshan, V. (2012). Changes in some liver enzymes and blood lipid level following interval and continuous regular aerobic training in old rats. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences*; 14(5): 13-23.
- Beyene, H.D.; Werkneh, A.A.; Bezabh, H.K.; Ambaye, T.G. (2017). Synthesis paradigm and applications of silver nanoparticles (AgNPs), a review. *Sustainable Materials and Technologies*; 13: 18-23.
- De Smet, H.; Blust, R. (2001). Stress responses and changes in protein metabolism in carp *Cyprinus carpio* during cadmium exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*; 48(3): 255-262.
- Echavarri-Bravo, V.; Paterson, L.; Aspray, T.J.; Porter, J.S.; Winson, M.K.; Hartl, M.G. (2017). Natural marine bacteria as model organisms for the hazard-assessment of consumer products containing silver nanoparticles. *Marine Environmental Research*; 130: 293-302.
- El-Demerdash, F. (2001). Effects of selenium and mercury on the enzymatic activities and lipid peroxidation in brain, liver, and blood of rats. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*; 36: 489-499.

- Esmaeel Kaviyani, F.; Naeemi, A.S.; Salehzadeh, A. (2018). Short term effects of zinc oxide nanoparticles on hematological parameters and metabolic enzymes of juvenile Caspian trout (*Salmo trutta caspius*). Iranian Scientific Fisheries Journal; 26(5): 43-50.
- Farah, H.S.; Al-Atoom, A.A.; Shehab, G.M. (2012). Explanation of the decrease in alkaline phosphatase (ALP) activity in hemolysed blood samples from the clinical point of view: In vitro study. Jordan Journal of Biological Sciences; 5(2): 125-128.
- Farkas, J.; Christian, P.; Urrea, J.A.G.; Roos, N.; Hassellöv, M.; Tollefsen, K.E.; Thomas, K.V. (2010). Effects of silver and gold nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. Aquatic Toxicology; 96(1): 44-52.
- Fazli, H.; Kor, D.; Daryanabard, G. (2014). Spatial and temporal distribution of Kutum (*Rutilus frisii kutum*, Kamensky 1901) in Iranian waters of the Caspian Sea. Iranian Scientific Fisheries Journal; 23(1): 63-74.
- Ghazinoory, S.; Yazdi, F.S.; Soltani, A.M. (2012). Iran and nanotechnology: A new experience of on time entry. New York, Springer. pp. 85-108.
- Hoseini, S.M.; Hedayati, A.; Mirghaed, A.T.; Ghelichpour, M. (2016). Toxic effects of copper sulfate and copper nanoparticles on minerals, enzymes, thyroid hormones and protein fractions of plasma and histopathology in common carp *Cyprinus carpio*. Experimental and Toxicologic Pathology; 68(9): 493-503.
- Hussain, S.; Hess, K.; Gearhart, J.; Geiss, K.; Schlager, J. (2005). In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. Toxicology in vitro; 19(7): 975-983.
- Imani, A.; Sarvi Moghanlo, K.; Khani, S. (2016). Pathology of copper nanoparticles on liver histoarchitecture and haemato-biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings before and after a recovery period. Veterinary Researches & Biological Products; 29(4): 110-118.
- Jahan, S.; Yusoff, I.B.; Alias, Y.B.; Bakar, A.F.B.A. (2017). Reviews of the toxicity behavior of five potential engineered nanomaterials (ENMs) into the aquatic ecosystem. Toxicology reports; 4: 211-220.
- Jahanbakhshi, A.; Hedayati, A.; Pirbeigi, A.; Javadimoosavi, M. (2015). Determination of acute toxicity and the effects of sub-acute concentrations of CuO nanoparticles on blood parameters in *Rutilus rutilus*. Nanomedicine Journal; 2(3): 195-202.
- Jiang, H.; Yang, H.; Kong, X.; Wang, S.; Liu, D.; Shi, S. (2012). Response of acid and alkaline phosphatase activities to copper exposure and recovery in freshwater fish *Carassius auratus gibelio* Var. Life Science Journal; 9(3): 233-245.
- Karbassi, A.; Nadjafpour, S. (1996). Flocculation of dissolved Pb, Cu, Zn and Mn during estuarine mixing of river water with the Caspian Sea. Environmental Pollution; 93(3): 257-260.
- Mazarei, S.; Sajjadi, M.M.; Sourinejad, I.; Johari, S.A.; Asadi, M. (2015). Effect of lethal concentration of Nano Silver in *Aphanius dispar*. Journal of Aquatic Ecology; 4(4): 110-115.
- Monfared, A.L.; Soltani, S. (2013). Effects of silver nanoparticles administration on the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): histological and biochemical studies. European Journal of Experimental Biology; 3(2): 285-289.
- Morganti, P.; Yuanhong, L.; Morganti, G. (2007). Nano-structured products: technology and future. Journal of Applied Cosmetology; 25(4): 159-176.
- Oloyede, O.; Sunmonu, T. (2008). Decrease in activities of selected rat liver enzymes following consumption of chemical effluent. Journal of Applied Sciences and Environmental Management; 12(3): 95-100.

- Öner, M.; Atli, G.; Canli, M. (2008). Effects of Metal (Ag, Cd, Cr, Cu, Zn) Exposures on Some Enzymatic and Non-Enzymatic Indicators in the Liver of *Oreochromis niloticus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*; 82(3): 317-321.
- Perreault, F.; Oukarroum, A.; Melegari, S.P.; Matias, W.G.; Popovic, R. (2012). Polymer coating of copper oxide nanoparticles increases nanoparticles uptake and toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Chemosphere*; 87(11): 1388-1394.
- Razmara, P.; Paykan heyrati, F.; Dorafshan, S. (2014). Effect of silver nanoparticles on some hematological parameters of Rainbow catfish, *Pangasius hypophthalmus*. *Journal of Cell & Tissue*; 5(3): 263-272.
- Sabouri, S.; Falahatkar, B.; Khoshkholgh, M.R.; Poursaeid, S.; Abtahi, B. (2017). Cortisol and Lactate dehydrogenase alternation in juvenile Caspian Kutum (*Rutilus frisii*) exposed to crude oil pollution. *Journal of Animal Research*; 30(1): 25-36.
- Sadeghi, P.; Attaran Fariman, G.; Kasalkhe, N. (2017). Evaluation the effects of sub-lethal concentrations of zinc chloride on hepatic enzymes activity in grey mullet (*Mugil cephalus*) in vitro. *Journal of Aquatic Ecology*; 6(4): 117-123.
- Samsami, A.; Rahimi, R.; Shaluei, F.; Hashemi, G. (2017). Effect of colloidal nanosilver particles on some of liver enzymes in common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Animal Physiology and Development*; 10(3): 63-71.
- Sarkar, S.; Beitollahi, A. (2009). An overview on nanotechnology activities in Iran. *Iranian Journal of Public Health*; 38: 65-68.
- Shafiei S.S.; Imanpoor, M.R.; Aminian F.B.; Gorgin, S. (2015). Study on morphological structure of Kutum population (*Rutilus frisii kutum*) in southern of Caspian Sea using Truss network system. *Journal of Environmental Science and Technology*; 17(3): 115-126.
- Shahsavani, D.; Mohri, M.; Kanani, H.G. (2010). Determination of normal values of some blood serum enzymes in *Acipenser stellatus* Pallas. *Fish Physiology and Biochemistry*; 36(1): 39-43.
- Soleimani, F.; Nabipour, I.; Faraji C.F.; Dobaradaran, S. (2015). Nanoparticles impact on human and environment: a review of toxicity, exposure, control strategies, and future prospects. *Iranian South Medical Journal*; 18(3): 630-663.
- Song, L.; Vijver, M.G.; Peijnenburg, W.J.; Galloway, T.S.; Tyler, C.R. (2015). A comparative analysis on the in vivo toxicity of copper nanoparticles in three species of freshwater fish. *Chemosphere*; 139: 181-189.
- Taheri, S.; Banaee, M.; Haghi, B.N.; Mohiseni, M. (2017). Effects of dietary supplementation of zinc oxide nanoparticles on some biochemical biomarkers in common carp (*Cyprinus carpio*). *International Journal of Aquatic Biology*; 5(5): 286-294.
- Vafadarnejad, M.; Gharaei, A.; Mirdar Harijani, J.; Miri, M. (2018). Determining of copper oxide nanoparticles (CuO NPs) LC50 in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and its effects on hematological and liver enzymes activity indices. *Journal of Fisheries*; 71(1): 11-21.