

## مقاله پژوهشی

## بررسی تأثیر نانو ذرات نقره بر آبشش تاس ماهی ایرانی *Acipenser persicus* با استفاده از روش HNMR

- خسرو رحیمی: گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
- ایمان سوری نژاد\*: گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۸

## چکیده

در تحقیق حاضر تغییرات بیوشیمیایی و پروفایل متابولیتی بچه ماهی تاس ماهی ایرانی *Acipenser persicus* که در معرض مستقیم نانو ذرات کلونید نقره طی روزهای مختلف قرار گرفته بود بررسی شد. بدین منظور، تعداد ۴۸۰ قطعه تاس ماهی ایرانی در وزن رهاسازی با میانگین وزن کل  $1/8 \pm 0/06$  گرم در دو دوره حاد ۹۶ ساعته و مزمن ۱۰ روزه در معرض سه غلظت متفاوت ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۵ و ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر نانو ذرات نقره کلونیدی به همراه تیمار شاهد آب شیرین قرار گرفتند تا تغییرات متابولیتی های آبشش این ماهیان در شرایط مقابله با نانو ذرات نقره کلونیدی و با روش متابولومیکس بر پایه HNMR سنجیده شود. مقایسه تیمار ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر نانو ذرات نقره نمونه برداری شده در روز دهم با سایر تیمارها نشان داد که متابولیت گلیسین و گلوکاتایون بیشترین میزان را داشتند ( $P < 0/05$ ). استیل کولین نقش تنظیم بونی داشته و بیشترین میزان آن در تیمار شاهد آب شیرین مشاهده شد. میزان متابولیت های گلیسین، لوسین و والین در تیمار آب شیرین نمونه برداری شده در روز دهم نسبت به دیگر تیمارها افزایش معنی دار از خود نشان داد. در نتیجه گیری کلی، متابولیت گلوکاتایون به عنوان نشانگر زیستی و عامل حساس به تغییر میزان نانو ذرات نقره در بافت آبشش تاس ماهی ایرانی در مطالعه حاضر شناسایی شد.

کلمات کلیدی: HNMR، آبشش، نانو ذرات نقره، *Acipenser persicus*



## مقدمه

میزان بالای آسیب‌های نانو ذرات نقره، مشخص شده است که تغییرات هیستوپاتولوژیک در کبد، ماهیچه و آبشش می‌تواند ناشی از وجود نانوذرات نقره باشد (Zhou و Wu، ۲۰۱۳). زمانی که ماهیان دوتنفسی در معرض تغییرات شوری ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم در لیتر قرار گرفتند مصرف اکسیژن در ماهیان در معرض شوری ۱۰ میلی‌گرم در لیتر به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ولی در شوری‌های ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم در لیتر مصرف اکسیژن افزایش یافت (Sutton و همکاران، ۲۰۱۸). Gutierrez و همکاران (۲۰۱۷) با قرار دادن ماهی اسکار (*Astronotus ocellatus*) در معرض استرس شوری ۲۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده کردند که افزایش جزئی در اسمولالیت پلاسما رخ داد. در مطالعه دیگری با استفاده از روش HNMR و بررسی تأثیر نانوذرات نقره نشان داده شد که متابولیت لاکتات در تاس‌ماهی ایرانی *Acipenser persicus* در روز دوم نمونه‌برداری کاهش یافته ولی متعاقب آن در روز چهارم نمونه‌برداری افزایش معنی‌دار از خود نشان داد که این تغییرات متعاقب دنا توره شدن آنزیم لاکتات دهیدروژناز بود که حاصل کاهش متابولیت لاکتات می‌باشد (Soltan Karimi و Kalbassi، ۲۰۱۸). تغییرات شوری در تاس‌ماهی ایرانی باعث تغییر متابولیت‌هایی در پلاسما خون این ماهی شد به طوری که با افزایش شوری، میزان گلوکز افزایش یافت. هم‌چنین کاهش متابولیت‌های تنظیم‌اسمزی مانند تاویرین و کولین و اسیدهای آمینه مانند آسپاراتات، گلوتامات، گلوتامین و لوسین نیز با افزایش شوری رخ داد (Hajirezaee و همکاران، ۲۰۱۸). در این تحقیق متابولومیکس مبتنی بر HNMR (Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance) در راستای مطالعات آبی‌پروری و زیست‌محیطی به‌کار گرفته شده است. هدف از این مطالعه مشخص کردن تغییرات بیوشیمیایی و پروفایل متابولیتی بچه‌ماهی تاس‌ماهی ایرانی *Acipenser persicus* است که در معرض مستقیم نانوذرات کلونید نقره طی روزهای مختلف قرار گرفته است.

## مواد و روش‌ها

**شرایط آزمایش و انجام آزمون سمیت حاد و مزمن:** در مطالعه حاضر تعداد ۴۸۰ قطعه بچه تاس‌ماهی ایرانی با میانگین وزن کل  $1/8 \pm 0/06$  گرم در وزن رهاسازی مورد مطالعه قرار گرفتند. این نمونه‌برداری از بچه تاس‌ماهی ایرانی در تابستان ۱۳۹۷ و در مرکز شهیدرجایی ساری انجام گرفت. قبل از شروع آزمایش ماهی‌ها به مدت یک‌ماه روزانه سه مرتبه در حد سیری با کرم قرمز منجمد (شرکت ماهیران، تهران) تغذیه شدند و ۴۸ ساعت پیش از شروع آزمایشات غذایی قطع گردید. ماهی‌ها در شرایط آزمایشگاهی به تعداد ۲۰ عدد در مخازن آزمایشی ۴۵ لیتری تحت هوادهی به مدت ۱۰ روز نگهداری شدند. تیمارهای این مطالعه در دو بخش حاد و مزمن صورت

پنج گونه از ۲۷ گونه ماهیان خاوباری در جهان در دریای خزر زندگی می‌کنند (Pikitch و همکاران، ۲۰۰۵). جمعیت‌های ماهیان خاوباری به دلایل متعددی هم‌چون صید بیش از حد، از بین رفتن زیستگاه‌ها و کیفیت آب محل زندگی‌شان در شرایط نامطلوب قرار دارد (Kynard، ۱۹۹۷؛ May و همکاران، ۱۹۹۷). این ماهیان در کارگاه‌های تکثیر به‌صورت مصنوعی تکثیر شده و بچه‌ماهی‌های انگشت‌قد جهت بازسازی ذخایر به رودخانه‌های خزر جنوبی رهاسازی می‌شوند. تولید و استفاده از نانوذرات فلزی در صنایع مختلف در سطح جهان رو به افزایش است که در این میان نانو ذرات نقره، مس، روی، تیتانیوم و کبالت دارای بیش‌ترین تولید و استفاده با توجه به خاصیت ضد عفونی‌کنندگی بوده‌اند (Economy و Nangmenyi، ۲۰۰۹). نقره به دلیل طیف وسیع ضد میکروبی خود و ایمنی نسبی از دیرباز مورد توجه بوده است. یکی از انواع فرم‌های نقره که خاصیت ضدباکتریایی قوی دارد، نانوذرات نقره (AgNPs) می‌باشد (Mohan و همکاران، ۲۰۰۷؛ Cho و همکاران، ۲۰۰۵). آبشش ماهیان ارگان چندمنظوره‌ای است که نقش اساسی در تنظیم یونی، تنظیم اسید و باز و دفع زائدات نیتروژنی را دارد (Wenwen و همکاران، ۲۰۱۹؛ Evans و همکاران، ۱۹۹۹). بسیاری از تحقیقات یونی و تنظیم‌اسمزی ماهیان بر آبشش آن‌ها تمرکز دارد (Sangiao-Alvarellos و همکاران، ۲۰۰۳؛ Marshall، ۲۰۰۲) و بنابراین در مطالعه حاضر به‌عنوان ارگان درگیر با تغییرات شوری برای انجام آزمایش در نظر گرفته شد. علوم اومیکس ابزاری تحلیلی و قدرتمند جهت مطالعه و بررسی کلی یک سیستم بیولوژیکی در ارتباط با محرک‌های محیطی و آشفتگی‌های زیست‌محیطی می‌باشند (Bowne و Roessner، ۲۰۰۹). کاربرد متابولومیکس در مطالعات محیط زیستی برای درک فرآیندها در سطح مولکول به‌ویژه وقتی مکانیسم عمل ناشناخته می‌باشد بسیار مفید است (Viant، ۲۰۰۹). طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته‌ای (NMR=Nuclear Magnetic Resonance) بر پایه پروتون، یک روش بسیار انعطاف‌پذیر و متنوع بوده که نقش قابل توجهی در شناسایی ترکیبات متابولیتی در مطالعات متابولومیکس ایفا می‌کند. این تکنیک در قیاس با تکنیک‌های سنتی، تحلیل جامعی ارائه می‌دهد و با وجود سهولت آماده‌سازی نمونه و استخراج در یک آزمایش واحد، اطلاعات شیمیایی در طیف‌های گسترده‌ای از ترکیبات موجود در نمونه، حاصل خواهند شد (Winning و همکاران، ۲۰۰۸). افزایش شوری، دما و هیپوکسی با تنفس، استرس انرژی و مسیرهای متابولیک بیوشیمیایی در تنظیم‌اسمزی سلول‌ها مرتبط است. گزارش شده است که در بیش‌تر ماهیان نانوذرات نقره عامل پراکسیداسیون چربی، اختلال در سیستم آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش گلوکوتایون می‌باشند (Martin و همکاران، ۲۰۱۶). با توجه به

فسفات پتاسیم (۰/۱ مولار، pH=۷/۴) حل و ۳۰ میکرولیتر TSP (سدیم تری متیل سیلان پروپیونات) به عنوان استاندارد داخلی به آن اضافه شد. سپس در دور ۱۳۰۰۰ g به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. در انتها ۶۵۰ میکرولیتر از محلول به تیوب های NMR  $\delta$ mm، جهت آنالیز NMR اضافه شد (Aru و همکاران، ۲۰۱۶). طیف های HNMR در ۳۰۰ k با استفاده از اسپکتروفتومتر Varian ۵۰۰ (Technologies, CA, USA Agilent) Unity Inova در فرکانس لارمور ۴۹۹/۸۳۹ مگاهرتز به دست آمدند.

#### آماده سازی داده های NMR و آنالیز آماری: طیف های NMR

با استفاده از نرم افزار MestRenova (Version 8.1, Mestrelab Research SL, Santiago de Compostela, Spain) مورد پردازش قرار گرفتند. برای شناسایی متابولیت ها، از نرم افزار Chenomx NMR (Chenomx Inc., Edmonton, Alberta, suite 8.2) استفاده شد. سپس با استفاده از نرم افزار Chenomx processor طیف های NMR پردازش شده و پس از قرار دادن پیک TSP، در تغییر شیمیایی صفر ppm و تنظیم pH و غلظت TSP، با پسوند Cnx ذخیره و سپس برای شناسایی متابولیت با نرم افزار Chenomx profiler باز شدند. تجزیه و تحلیل واریانس با استفاده از نرم افزار SPSS (SPSS 19.0)، نرم افزار IBM (USA, IL, Chicago, Inc. JBM) انجام شد. تجزیه و تحلیل مولفه های چندمتغیره (PCA) که فضای داده های چند بعدی را به مدلی با ابعاد کم تبدیل می کند، برای جداسازی گروه های نمونه مورد استفاده قرار گرفتند. قبل از تجزیه و تحلیل PCA، مجموعه داده های NMR نرمال شده و متعاقب آن با اعمال لگاریتم تغییرات و یکسان سازی خودکار داده ها آزمون انجام شد. تمام داده ها نرمال سازی شده و تجزیه و تحلیل PCA با استفاده از MetaboAnalyst، ابزار جامع مبتنی بر وب انجام شد که برای پردازش، تجزیه و تحلیل و تفسیر داده های متابولیتیک طراحی شده است.

## نتایج

متابولیت ها برای ورود به بخش سنجش آماری MNOVA نیازمند نرمال شدن هستند. شکل ۱ متابولیت های تیمار شاهد آب شیرین را در دو وضعیت معمولی و نرمال شده نمایش می دهد. طیف های HNMR آبشش تاس ماهی ایرانی در شکل ۲ نشان داده شده است. متابولیت های مشاهده شده شامل اسیدهای آمینه، اسمولیت ها و متابولیت های انرژی هستند. با استفاده از نمودارهای PCA و PLS-DA متابولیت ها و نحوه تغییرات آن ها در تیمارهای مختلف و با میزان های نانوذرات نقره متفاوت بررسی شدند و شرایط تفاوت معنی دار در آن ها بررسی شد. در شکل ۲ میزان این تغییرات بررسی و نمایش داده شده است.

پذیرفت. آزمایش سمیت حاد قبل از شروع آزمایشات مزمن به مدت ۴ روز و آزمایش سمیت مزمن به مدت ۱۰ روز انجام شد. ابتدا در دوره حاد برای تعیین غلظت کشنده، بچه ماهیان در معرض ۵ غلظت ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۱/۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر نانوذرات کلئیدی نقره به مدت ۴ روز قرار گرفتند. مطالعه سمیت در این دوره ۴ روزه، تحت شرایط نیمه ساکن semi-static انجام شد و آب مخازن هر ۲۴ ساعت یکبار تعویض و غلظت های مورد نظر مجدداً در مخازن برقرار می شد. آزمایش دوره مزمن براساس پروتکل OECD ۱۹۹۸ در یک دوره ۱۰ روزه و با غلظت های تجدیدشونده در هر ۴۸ ساعت انجام شد. نمونه برداری از ماهیان طی روزهای اول و دهم انجام شد. غلظت های ۰/۰۰۵، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر نانوذرات کلئیدی نقره مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه تیمار آب شیرین با حرف F غلظت های صفر، ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۵ و ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر به ترتیب از ۰ (تیمار شاهد) تا ۳ نام گذاری شدند و روز نمونه برداری نیز با عدد ۱ و ۱۰ نمایش داده شد. **نمونه برداری از ماهی های انگشت قد:** پس از پایان دوره آزمایش ده روزه، ماهیان با خروج از آب کشته شدند، سپس آبشش های چپ و راست به دقت و کامل از ماهی ها جدا شده و سریعاً با آب مقطر شستشو داده شدند. آبشش های جدا شده در میکروتیوب های پلاستیکی نام گذاری شده قرار گرفتند و نمونه ها سریعاً درون ازت مایع تثبیت شدند. نمونه ها برای نگهداری طولانی مدت به فریزر -۸۰ درجه سانتی گراد منتقل شدند و سپس جهت سنجش متابولیت ها، نمونه ها روی یخ خشک قرار گرفته و به دانشکده بیومدیkal دانشگاه کالیاری- ایتالیا منتقل شدند و برای سنجش متابولیتی مورد استفاده قرار گرفتند.

#### استخراج متابولیت ها از آبشش تاس ماهی ایرانی: جهت

استخراج متابولیت ها از آبشش تاس ماهی از پروتکل استخراج (Folch, ۱۹۷۵) استفاده شد. ابتدا نمونه های آبشش فریز شده، توزین و به ازای هر گرم نمونه، ۱۲ میلی لیتر حلال (کلروفرم/متانول/آب) به نسبت ۱:۱:۲ به نمونه ها اضافه شد. بعد از اضافه شدن حلال، نمونه روی یخ و با استفاده از هموژنایزر برقی، هموژن شد. نمونه های هموژن شده به سانتریفیوژ منتقل و در ۲۰۰۰g، در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. بعد از سانتریفیوژ دو فاز تشکیل گردید، فاز اول که حاوی متانول و آب با وزن مولکولی کم تر بود شامل متابولیت های محلول در آب بود و از فاز دوم حاوی کلروفرم به دقت جدا گردید. سپس فاز آب/متانول با استفاده از دستگاه چرخان تبخیرکننده (Eppendorf Concentrator Plus) خشک شدند و تا زمان سنجش متابولیت ها با دستگاه NMR در دمای -۸۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

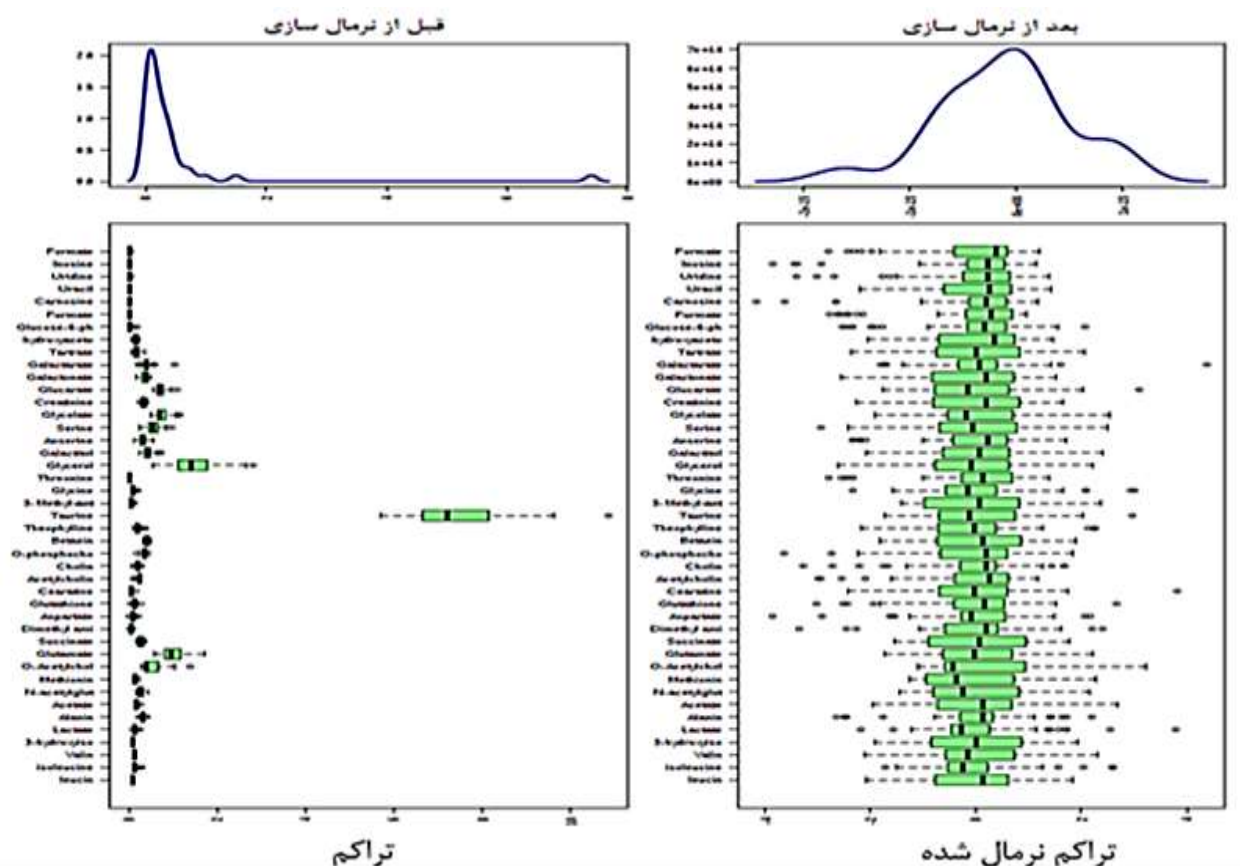
#### آماده سازی نمونه آبشش برای HNMR: نمونه های آبشش خشک

شده در دستگاه تغلیظ کننده Evaporatore در ۶۷۰ میکرولیتر بافر

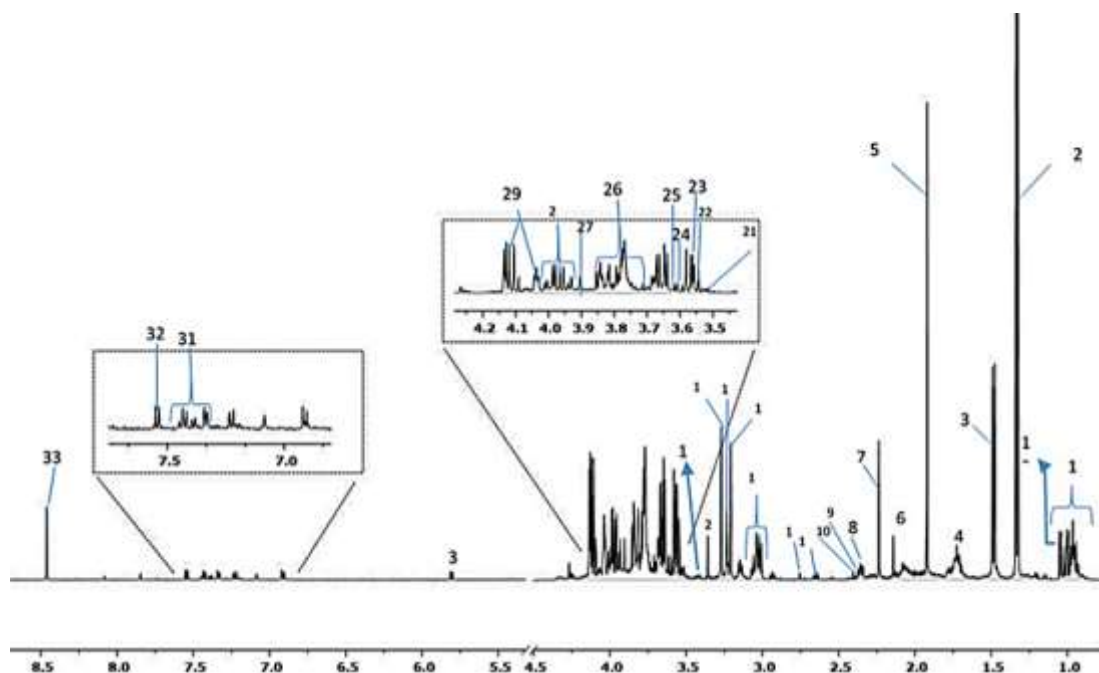


روز دهم (F2-10) تفاوت معنی‌دار داشتند ( $P < 0.05$ ). بیش‌ترین میزان متابولیت‌های گلیسین، لوسین و والین در تیمار F1-10 بود که نسبت به تیمارهای دیگر تفاوت معنی‌دار داشت ( $P < 0.05$ ). متابولیت‌های گلیسین و گلوکاتایون در تیمار F3-10 بیش‌تر از تیمارهای F0-1 و F0-10 بود که تفاوت معنی‌دار داشت ( $P < 0.05$ ). تفاوت ایجاد شده در متابولیت گلوکاتایون نشان از سمی بودن نانوذرات نقره کلونیدی است که تاس ماهیان جهت مقابله با آن شروع به تولید گلوکاتایون کرده و سمیت نانو ذرات نقره کلونیدی را کاهش داده اند و دیگر متابولیت‌ها که در نقش تامین کننده انرژی بوده اند مورد انتظار بودند. در تیمار F2-10 اسید فرمیک، متیونین و استیل کولین بیش‌ترین میزان را داشتند که تفاوت معنی‌دار با تیمار آب شیرین شاهد در روز اول نمونه‌برداری (F0-1) و آب شیرین با  $0.05$  میلی گرم در لیتر نانوذرات کلونید نقره در روز اول نمونه‌برداری (F2-1) داشتند ( $P < 0.05$ ). متابولیت‌های کولین و استیل کولین در تیمار F0-1 بیش‌تر از تیمارهای F0-10 و تیمار آب شیرین با میزان  $0.1$  میلی گرم در لیتر نانوذرات کلونیدی نقره در روز دهم نمونه‌برداری (F3-10) بودند ( $P < 0.05$ ). افزایش مقدار در متابولیت سوکسینات در تیمار F0-10 نسبت به تیمارهای F0-1 و F3-10 دیده شد که تفاوت معنی‌دار با هم داشتند ( $P < 0.05$ ).

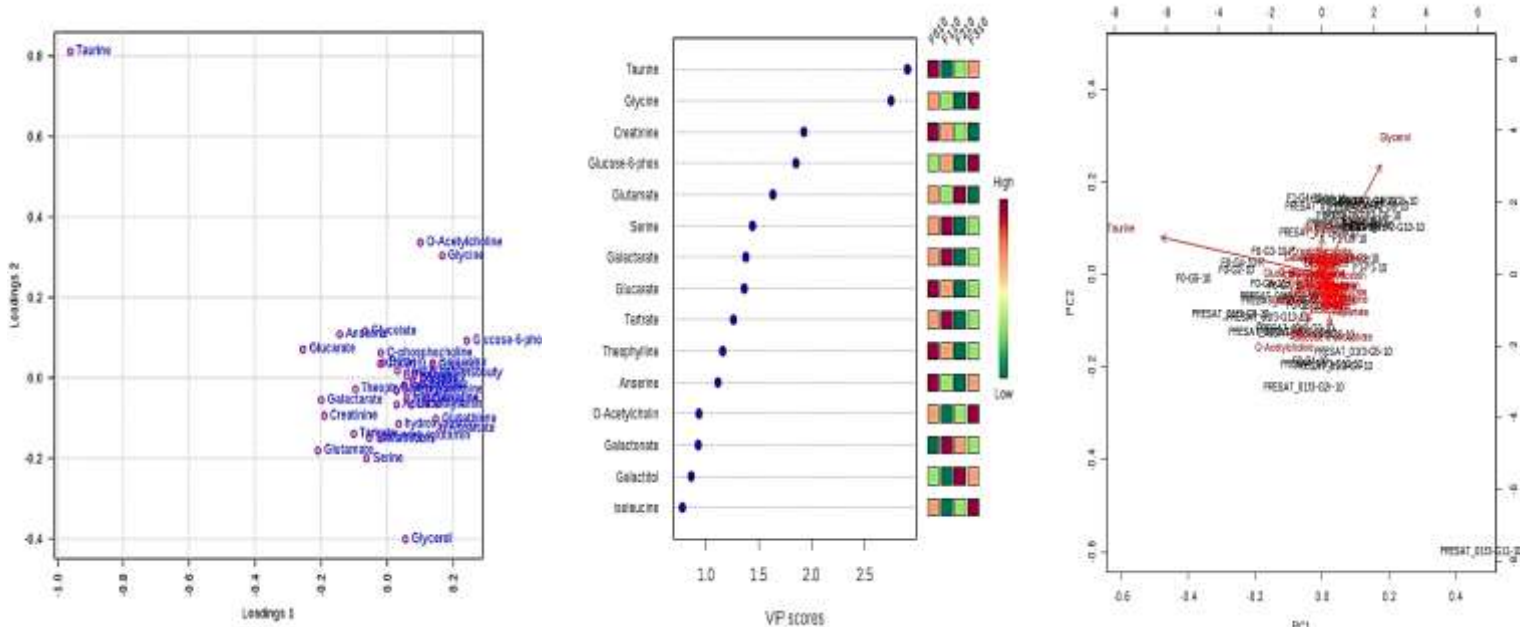
در شکل ۳ وضعیت متابولیت‌ها در PCA و PLS-DA در تیمار F1-10 و F1-10 و همین‌طور اهمیت نسبی متابولیت‌ها براساس غلظت آن‌ها مشخص شده است. متابولیت‌های مختلف در مسیرهای بیوشیمیایی بدن موثر بوده و نقش‌های مهمی در تعادل و نگهداری بدن در شرایط مناسب ایفا می‌کنند. متابولیت‌های تیمار F2 در مقایسه با تیمار F0 در مسیرهای بیوشیمیایی خاصی نقش دارند که در جدول ۱ عنوان شده‌اند. متابولیت‌های مختلفی در مسیرهای بیوشیمیایی عنوان شده موثر بوده که براساس تغییرات داده‌های تیمارها این متابولیت‌ها مشخص گردیده و نقش آن‌ها در این تحقیق بیان شده است. مسیر بیوشیمیایی بیوسنتز آمینواسیل tRNA در تیمار آب شیرین با  $0.01$  میلی گرم در لیتر نانوذرات نقره کلونیدی نمونه‌برداری شده در روز دهم (F1-10) تفاوت معنی‌دار با تیمار شاهد آب شیرین نمونه‌برداری شده در روز اول (F0-1) و آب شیرین نمونه‌برداری شده در روز دهم (F0-10) داشت که این تفاوت‌ها مربوط به متابولیت‌های گلیسین، لوسین، والین و متیونین بود ( $P < 0.05$ ). اسید آمینه لوسین، استیل کولین، گلوکاتایون، والین و گلیسین در این تحقیق بین تیمارهای آب شیرین شاهد در روز اول و دهم و هم‌چنین بین آب شیرین شاهد و آب شیرین با غلظت نانو مواد کلونیدی نقره  $0.05$  میلی گرم در لیتر نمونه‌برداری شده در



شکل ۱: نمونه‌ای از نرمال شدن متابولیت‌های اندازه‌گیری شده در تیمار آب شیرین شاهد



شکل ۲: نمایش متابولیت های طیف HNMRCPMG شناسایی شده فاز آبی حاصل آنالیز استخراج از آبش تاس ماهی ایرانی *Acipenser persicus*: (۱) اسید های آمینه شاخه دار (ایزولوسین، لوسین و والین) (۲) لاکتات (۳) آلانین (۴) لوسین (۵) استات (۶) متیونین (۷) استون (۸) گلوتامات (۹) پیرووات (۱۰) سوکسینات (۱۱) متیونین (۱۲) دی متیل آمین (۱۳) S-۲- هیدروکسی ایزو بوتیرات (۱۴) تائورین (۱۵) لیزین (۱۷) A- فسفوکولین (۱۸) کولین (۱۹) بتائین (۲۰) سوکسینات (۲۱) کولین (۲۲) گلیمین (۲۳) گلیسرول (۲۴) ترئونین (۲۵) والین (۲۶) گلوکونات (۲۷) بتائین (۲۸) سرین (۲۹) گلوکونات (۳۰) یوراسیل (۳۱) فنیل آلانین (۳۲) یوراسیل (۳۳) فورمات.



شکل ۳: بررسی متابولیت ها و وضعیت الف) PCA biplot بین PC های انتخاب شده، با نشان دادن متابولیت ها برای جداسازی گروه های دارای نانو کلونید نقره استفاده شدند. ب) متابولیت های مهم شناسایی شده توسط PLS-DA. جبهه های رنگی در سمت راست نشان دهنده غلظت نسبی متابولیت مربوطه در هر گروه مورد مطالعه است. ج) Loding-plot نشان دهنده اهمیت متابولیت ها در جدایش بین گروه هاست.



جدول ۱: مقایسه مسیرهای بیوشیمیایی مؤثر بین تیمار F۲ (آب شیرین با غلظت ۰/۰۰۵ میلی گرم در لیتر نانو کلونید نقره) و تیمار F0 شاهد آب شیرین

مقایسه مسیرهای بیوشیمیایی تفاوت بین تیمارها	مجموع کل متابولیت‌ها	تعداد متابولیت‌های تغییر یافته	تفاوت معنی‌دار آماري	خطای مثبت کاذب (FDR)
متابولیسم متان	۹	۳	۰/۰۰۰۵۶	۰/۰۴۵
بیوسنتز آمینو اسیل tRNA	۶۷	۶	۰/۰۰۱۶	۰/۰۶۵
متابولیسم گلوکاتینون	۲۶	۳	۰/۰۱۴	۰/۲۲
متابولیسم گلیسروفسفولیپید	۲۸	۳	۰/۰۱۷	۰/۲۳
متابولیسم گلیسین، سرین و ترئونین	۳۱	۳	۰/۰۲۲	۰/۲۶
بیوسنتز والین، لوسین و ایزولوسین	۱۳	۲	۰/۰۲۷	۰/۲۶
متابولیسم گلیوکسیلات و دکربوکسیلات	۱۸	۲	۰/۰۴۹	۰/۳۹

## بحث

ماهی‌ها در محیط‌هایی با شوری‌های متفاوت زندگی می‌کنند و مکانیسم‌های پیچیده‌ای برای حفظ تعادل اسمزی و یونی دارند که به آن‌ها امکان عملکرد، بقا و انجام فرایندهای فیزیولوژیکی را می‌دهد (Evans و همکاران، ۱۹۹۹). ذخایر انرژی یک عامل محدودکننده برای فرایندهای فیزیولوژیک است و بنابراین مطالعه متابولیسم انرژی، موضوع مهمی در مطالعات فیزیولوژیک می‌باشد. برای تنظیم اسمزی، آنزیم‌ها و فرایندهای تنظیم‌کننده پیچیده‌ای نیاز می‌باشند. در این مطالعه برای مشخص شدن تحمل تاس ماهیان ایرانی به نانو ذرات نقره آن‌ها را به طور مستقیم در برابر نانو ذرات نقره قرار داده و تغییرات متابولیت‌های آبشش آن‌ها سنجیده شد. در مسیر بیوشیمیایی بیوسنتز آمینو اسیل tRNA تفاوت موجود بین تیمار شاهد آب شیرین و تیمار نانو ذرات نقره مربوط به متابولیت‌های گلیسین، لوسین، والین و متیونین بود. در آبشش ماهی *Cynoglossus semilaevis* اسیدهای آمینه لوسین، گلیسین و والین اختلاف معنی‌دار در سطوح مختلف شوری آب داشتند (Wenwen و همکاران، ۲۰۱۹). هم‌چنین متابولیت متیونین در پلاسما ماهی *C. semilaevis* قرار گرفته در استرس شوری افزایش یافته است. افزایش اسیدهای آمینه پلاسما می‌تواند حاصل کاهش ساخت پروتئین‌های جدید باشد (Sadok و همکاران، ۲۰۰۴). متابولیت‌های لوسین و والین برای افزایش ایمنی در کنار تولید انرژی فعالیت دارند. متابولیت گلیسین در تولید DNA، فسفولیپیدها، کلاژن و تولید انرژی نقش دارد (Van Hove و همکاران، ۲۰۰۵). متابولیت‌های سرین و کولین از متابولیت‌های مهم در مسیر بیوشیمیایی "متابولیسم گلیسین، سرین و ترئونین" هستند. متابولیت سرین مشتق شده از متابولیت گلیسین است که حاصل تجزیه فسفولیپیدهاست و عامل مهمی در تکثیر سلولی است (De Koning و همکاران، ۲۰۰۳). متابولیت کولین یک متابولیت مهم در متابولیسم چربی‌هاست که به ویژه در غشای سلولی و در فسفولیپید وجود دارد. متابولیت کولین به دلیل نیاز تاس ماهیان به انرژی، لیپیدها

راتجزیه می‌کند و در بخش تامین انرژی دخیل است (Chen و همکاران، ۲۰۰۶). در تاس ماهیان ایرانی در تیمار F0-1 میزان متابولیت‌های سرین، اسید گلوکوتامیک و کولین بیش‌تر از تیمارهای F0-10 و F1-10 بود ( $P < 0.05$ ). در مطالعه حاضر در تیمار F0-1 چون تاس ماهیان در شرایط معمول و شاهد هستند از این‌رو تلاش برای تکثیر سلولی و تامین انرژی در متابولیت‌های آن‌ها دیده شده است و هم‌چنین به دلیل عدم تغذیه در مدت آزمایش تلاش تاس ماهیان استفاده از منابع چربی بافت‌ها به جای منابع هیدرات‌های کربن است. متابولیت لوسین و والین برای افزایش ایمنی در کنار تولید انرژی فعالیت دارند (Calder، ۲۰۰۶). نتایج نشان داد که تیمار F0-10 به دلیل طولانی بودن زمان (۱۰ روز) نیاز به تأمین انرژی داشته و هم‌چنین به دلیل این‌که در شرایط گرسنگی قرار گرفته‌اند سیستم بدنی آن‌ها در معرض ابتلا به بیماری قرار گرفته است و به همین دلیل میزان متابولیت‌های گلیسین، لوسین و والین که نیاز انرژی و ایمنی را برطرف می‌کنند بالا رفته بود. متابولیت‌های والین و لوسین در تأمین انرژی و سیستم ایمنی نقش دارند (Calder، ۲۰۰۶). متابولیت گلیسین در ساخت DNA، فسفولیپیدها، کلاژن و تولید انرژی دخیل می‌باشد (Van Hove و همکاران، ۲۰۰۵). در تحقیق حاضر میزان اسید فرمیک در تیمار F2-10 بیش‌ترین میزان را در بین تیمارها داشته که نشان‌دهنده نقش اساسی این متابولیت در نگه‌داری انرژی سلول‌های تاس ماهیان ایرانی است. اسید فرمیک با مهار فعالیت سیتوکروم اکسیداز باعث تجزیه ATP شده و باعث ماندگاری بیش‌تر انرژی در سلول‌ها می‌شود (Dal pra و همکاران، ۲۰۰۶). استیل کولین که عامل افزایش یون‌های  $K^+$  و  $Ca^{2+}$  می‌شود و احتمالاً وجود این متابولیت در تیمار F2-10 شرایط فعالیت آنزیم  $K^+-Na^+$  ATPase که یکی از آنزیم‌های مهم آبشش در شرایط تنظیم اسمزی است را افزایش داده و از این‌رو باعث انجام تبادل و تعادل یونی در این شرایط می‌شود (Shirahata و همکاران، ۲۰۰۷). افزایش اسید آمینه متیونین در تیمار F2-10 باعث افزایش تأثیر شده که در شرایط مقابله با استرس شوری نقش دارد. تاس ماهیان در شرایط شوری نیاز به تنظیم اسمزی دارند

آن‌ها بتوان به‌عنوان متابولیت موثر در تغییرات نانوذرات نقره از آن‌ها استفاده کرد که بر این اساس، متابولیت گلوکاتاتیون به‌عنوان یک عامل حساس به تغییر میزان نانوذرات نقره در مطالعه حاضر شناسایی شد.

## منابع

1. **Soltan Karimi, S. and Kalbasi, M.M., 2018.** Effect of water filters containing silver nanoparticles during incubation on changes in lactate metabolites and glutathione peroxidase and lactate dehydrogenase enzymes in Persian sturgeon embryos *Acipenser persicus*. *Physiology and Aquatic Biotechnology*. Vol. 6, No. 1, pp: 137-155. (In Persian)
2. **Amiraslani, B.; Sabouni, F.; Abbasi, S.; Nazem, H. and Sabet, M., 2012.** Recognition of betaine as an inhibitor of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in activated microglial cells. *Iran Biomed J.* Vol. 16, No. 2, pp: 84-89.
3. **Arjona, F.J.; Vargas-Chacoff, L.; Ruiz-Jarabo, I.; Goncalves, O.; Pascoa, I.; Del Rio, M.P.M. and Mancera, J.M., 2009.** Tertiary stress responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) to osmotic challenge: implications for osmoregulation, energy metabolism and growth. *Aquaculture*. Vol. 287, pp: 419-426.
4. **Bemis, W.E. and Kynard, B., 1997.** Sturgeon Rivers: an introduction to Acipenseriformes biogeography and life history. In: *Sturgeon Biodiversity and Conservation*. Eds. Birstein, V.J.; Waldman, J.R. and Bemis, W.E., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp: 167-183.
5. **Calder, P.C., 2006.** Branched-chain amino acids and immunity. *Journal of Nutrition*. Vol. 136, pp: 288S-293S.
6. **Chen, C.Y.; Li, C.W.; Kuo, Y.T.; Jaw, T.S.; Wu, D.K.; Jao, J.C.; Hsu, J.S. and Liu, G.C., 2006.** Early response of hepatocellular carcinoma to trans catheter arterial chemoembolization: choline levels and MR diffusion constants-initial experience. *Radiology*. Vol. 239, No. 2, pp: 448-456.
7. **Cho, K.H.; Park, J.E.; Osaka, T. and Park, S.G., 2005.** The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. *Electrochimica Acta*. Vol. 51, pp: 956-960.
8. **Cordeiro, O.D.; Silva, T.S.; Alves, R.N.; Costas, B.; Wulff, T.; Richard, N.; de Vareilles, M.; Conceição, L.E.C. and Rodrigues, P.M., 2012.** Changes in Liver Proteome Expression of Senegalese Sole (*Solea senegalensis*) in Response to Repeated Handling Stress. *Mar Biotechnol*. Vol. 14, pp: 714-729.
9. **Dal Pra, I.; Chiarini, A.; Boschi, A.; Freddi, G. and Armato, U., 2006.** Novel dermo-epidermal equivalents on silk fibroin-based formic acid-crosslinked three-dimensional nonwoven devices with prospective applications in human tissue engineering/regeneration/repair. *Int J Mol Med*. Vol. 18, No. 2, pp: 241-247.
10. **de Koning, T.J.; Snell, K.; Duran, M.; Berger, R.; Poll The, B.T. and Surtees, R., 2003.** L-serine in disease and development. *Biochem J*. Vol. 1, No. 371, pp: 653-661.
11. **Drevet, J.R., 2006.** The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story. *Mol Cell Endocrinol*. Vol. 16, No. 1-2, pp: 70-79.
12. **Evans, D.H.; Piermarini, P.M. and Potts, W.T.W., 1999.** Ionic transport in the fish gill epithelium. *J. exp. zool*. Vol. 283, pp: 641-652.
13. **Fernández-Alacid, L.; Sanahuja, I.; OrdóñezGrande, B.;**

و هم‌چنین در این شرایط با شرایط هیپوکسی روبه‌رو هستند که به دلیل وجود نانو ذرات نقره کلونیدی که عامل ایجاد شرایط کاهش اکسیژن در ماهیان هستند شرایط استرس‌زا را مطابق با شرایط شوری در این ماهیان ایجاد کرده که این نتیجه با تحقیق محققان دیگر مطابقت دارد (Schneider و همکاران، ۲۰۰۶). در تیمار F0-10 میزان اسیدسوکسینیک تفاوت معنی‌دار با بقیه تیمارها داشت ( $P < 0.05$ ) که نشان‌دهنده این موضوع است که اسیدهای مهم در چرخه اسید تری کربوکسیلیک هم‌چون سوکسینات افزایش معنی‌دار از خود نشان دادند و این حالت نمایانگر نیاز به مصرف انرژی بیشتر در تیمارهای با وجود نانوذرات نقره کلونیدی بالاتر است (Fernández-Alacid، ۲۰۱۹؛ Schreck و همکاران، ۲۰۱۶). اسیدفوماریک تغییر شکل یافته اکسیداسیون اسید سوکسینیک از طریق دهیدروژنز سوکسینات است. در سلول‌های انسانی اسیدفوماریک در اطراف سلول‌های توموری و سرطانی یافت می‌شود و عامل دسترسی سریع به اکسیژن است که نیاز تکثیر سلول‌های سرطانی و رشد رگ‌های خونی است. هم‌چنین اسیدفوماریک در شرایط ایجاد استرس اکسیژنی، عامل فعالیت فاکتور رونویسی ژن HIF ( $\alpha$ -HIF) می‌باشد که عامل مقابله با استرس اکسیژنی است (Sreekumar و همکاران، ۲۰۰۹). گلوکاتاتیون متابولیت دفع موادمسمی بدن است. گلوکاتاتیون حاوی گروه تیول (-SH) است که یک آنتی‌اکسیدان مؤثر و مفید است. مهم‌ترین نقش گلوکاتاتیون گروه تیول آن است که با شرایط پراکسیداسیون مقابله می‌کند. گلوکاتاتیون به مواد سمی وصل می‌شود تا اثرات سمی آن‌ها را از بین ببرد (Drevet، ۲۰۰۶). افزایش اسیدهای آمینه پلازما می‌تواند حاصل کاهش ساخت پروتئین‌های جدید باشد (Sadok و همکاران، ۲۰۰۴). اسید آمینه متیونین به تائورین تبدیل می‌شود و تائورین برای مقابله با استرس شوری افزایش می‌یابد (Schneider و همکاران، ۲۰۰۶). اسید گلوکاتامیک متابولیسم تائورین را مهار می‌کند (تائورین عامل مقاومت به شوری است) و از این‌رو در تنظیم اسمزی نقش دارد (Schneider و همکاران، ۲۰۰۶).

نتیجه‌گیری کلی از این مطالعه نشان داد که اصلی‌ترین متابولیتی که در شرایط افزایش نانوذرات نقره تغییر می‌کند گلوکاتاتیون می‌باشد و هم‌چنین متابولیت‌های سوکسینات و اسیدفوماریک در شرایط استرس اکسیژنی و متابولیت استیل کولین نیاز سلول‌های آبششی را برای تامین یون‌های مورد نیاز ماهی برطرف می‌کند. متابولیت‌های گلیسین، والین و لوسین نقش اصلی در ایمنی سلولی و تامین انرژی دارند. از این‌رو اندازه‌گیری متابولیت گلوکاتاتیون در تاس ماهی ایرانی می‌تواند نمایانگر ایجاد شرایط اکسیداسیون و استرس باشد که حاصل از نانوذرات نقره است. پیشنهاد می‌شود برای مطالعات آینده، متابولیت‌هایی که به‌عنوان نشانگر زیستی و براساس تغییرات وابسته به نانوذرات نقره رخ می‌دهند مشخص و اندازه‌گیری شوند تا با مشخص شدن





- response to intravenous taurine supplementation in adults with short-bowel syndrome undergoing long-term parenteral nutrition: a pilot study. *British Journal of Nutrition*. Vol. 96, No. 2, pp: 365-370.
30. Schreck, C.B.; Tort, L.; Farrell, A.P. and Brauner, C.J., 2016. Biology of Stress in Fish. The Concept of Stress in Fish. In *Fish Physiology*. Vol. 35. San Diego, CA: Academic Press.
  31. Shirahata, M.; Balbir, A.; Otsubo, T. and Fitzgerald, R.S., 2007. Role of acetylcholine in neurotransmission of the carotid body. *Respir Physiol Neurobiol*. Vol. 157, No. 1, pp: 93-105.
  32. Sreekumar, A.; Poisson, L.M.; Rajendiran, T.M.; Khan, A.P.; Cao, Q.; Yu, J.; Laxman, B.; Mehra, R.; Lonigro, R.J.; Li, Y.; Nyati, M.K.; Ahsan, A.; Kalyana-Sundaram, S.; Han, B.; Cao, X.; Byun, J.; Omenn, G.S.; Ghosh, D.; Pennathur, S.; Alexander, D.C.; Berger, A.; Shuster, J.R.; Wei, J.T.; Varambally, S.; Beecher, C. and Chinnaiyan, A.M., 2009. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature*. Vol. 457, No. 7231, pp: 910-914.
  33. Sutton, A.O.; Turko, A.J.; McLaughlin, R.L. and Wright, P.A., 2018. Behavioral and physiological responses of an amphibious, euryhaline mangrove fish to acute salinity exposure. *Copeia*. Vol. 106, pp: 305-311.
  34. Valenza, F.; Aletti, G.; Fossali, T.; Chevillard, G.; Sacconi, F.; Irace, M. and Gattinoni, L., 2005. Lactate as a marker of energy failure in critically ill patients: hypothesis. *Crit Care*. Vol. 9, No. 6, pp: 588-593.
  35. Van Hove, J.L.; Vande Kerckhove, K.; Hennermann, J.B.; Mahieu, V.; Declercq, P.; Mertens, S.; De Becker, M.; Kishnani, P.S. and Jaeken, J., 2005. Benzoate treatment and the glycine index in nonketotic hyperglycinaemia. *J Inherit Metab Dis*. Vol. 28, No. 5, pp: 651-663.
  36. Viant, M.R., 2009. Applications of metabolomics to the environmental sciences. *Metabolomics*. Vol. 5, pp: 1-2.
  37. Wenwen, J.; Xiangli, T.; Ziheng, F.; Li, L.; Shuanglin, D.; Haidong, L. and Kun, Z., 2019. Metabolic responses in the gills of tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) exposed to salinity stress using NMR-based metabolomics. *Science of the Total Environment*. Vol. 653, pp: 465-474.
  38. Winning, H.; Larsen, F.H.; Bro, R. and Engelsen, S.B., 2008. Quantitative analysis of NMR spectra with chemometrics. *Journal of Magnetic Resonance*. Vol. 190, No. 1, pp: 26-32.
  39. Wu, Y. and Zhou, Q., 2013. Silver nanoparticles cause oxidative damage and histological changes in medaka (*Oryzias latipes*) after 14 days of exposure. *Environ. Toxicol. Chem*. Vol. 32, No. 1, pp: 165-173.
  40. Yri, O.E.; Bjoro, T. and Fossa, S.D., 2006. Failure to achieve castration levels in patients using leuprolide acetate in locally advanced prostate cancer. *Eur Urol*. Vol. 49, No. 1, pp: 54-58.
  14. Sánchez-Nuño, S.; Herrera, M. and Ibarz, A., 2019. Skin mucus metabolites and cortisol in meagre fed acute stress attenuating diets: Correlations between plasma and mucus. *Aquaculture*. Vol. 499, pp: 185-194.
  15. Gutierrez, S.M.M.; Schulte, J.M.; Schofield, P.J. and Prodocimo, V., 2017. Osmoregulation and muscle water control in vitro facing salinity stress of the Amazon fish Oscar *Astronotus ocellatus* (Cichlidae). *Marine and Freshwater Behavior and Physiology*. Vol. 50, pp: 303-311.
  16. Hajirezaee, S.; Mirvaghefi, A.R.; Farahmand, H. and Agh, N., 2018. A metabolic approach to understanding adaptation to sea water by endangered Persian sturgeon, *Acipenser persicus* Fingerlings. *Aquaculture Research*. Vol. 49, pp: 341-351.
  17. Hirschhaeuser, F.; Sattler, U.G. and Mueller-Klieser, W., 2011. Lactate: a metabolic key player in cancer. *Cancer Res*. Vol. 71, No. 22, pp: 6921-6925.
  18. Horikoshi, T.; Matsumoto, M.; Usuki, A.; Igarashi, S.; Hikima, R.; Uchiwa, H.; Hayashi, S.; Brysk, M.M.; Ichihashi, M. and Funasaka, Y., 2005. Effects of glycolic acid on desquamation-regulating proteinases in human stratum corneum. *Exp Dermatol*. Vol. 14, No. 1, pp: 34-40.
  19. Kynard, B., 1997. Life history, latitudinal patterns, and status of the shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum*. *Environ. Biol. Fish*. Vol. 48, pp: 319-334.
  20. Lever, M. and Slow, S., 2010. The clinical significance of betaine, an osmolyte with a key role in methyl group metabolism. *Clin Biochem*. Vol. 43, No. 9, pp: 732-744.
  21. Lochnit, G.; Dennis, R.D. and Geyer, R., 2000. Phosphorylcholine substituents in nematodes: structures, occurrence and biological implications. *Biol Chem*. Vol. 381, No. 9-10, pp: 839-847.
  22. Marshall, W.S., 2002. Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> transport by fish gills: retrospective review and prospective synthesis. *J. Exp. Zool*. Vol. 293, pp: 264-283.
  23. Martin, J.D.; Colson, T.L.L.; Langlois, V.S. and Metcalfe, C.D., 2016. Biomarkers of exposure to nanosilver and silver accumulation in yellow perch (*Perca flavescens*). *Environ. Toxicol. Chem*. Vol. 9999, pp: 1-10.
  24. May, B.; Krueger, C.C. and Kincaid, H.L., 1997. Genetic variation at microsatellite loci in sturgeon: primer sequence homology in *Acipenser* and *Scaphirhynchus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci*. Vol. 54, pp: 1542-1547.
  25. 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*. Vol. 48, pp: 158-164.
  26. Nangmenyi, G. and Economy, J., 2009. Nanometallic particles for oligodynamic microbial disinfection. In: Savage, N.; Diallo, M.; Duncan, J.; Street, A. and Sustich, R., (eds) nanotechnology applications for clean water. William Andrew Inc. Publishing, Norwich. pp: 3-15.
  27. Pikitch, E.K.; Doukakis, P.; Lauck, L.; Chakrabarty, P. and Erickson, D.L., 2005. Status, trends and management of sturgeon and paddlefish fisheries. *Journal of Fish and Fisheries*. Vol. 6, pp: 233-265.
  28. Roessner, U. and Bowne, j., 2009. What is metabolomics all about? *Trends Biotechnology*. Vol. 24, pp: 102-104.
  29. Sangiao-Alvarellos, S.; Laiz-Carrión, R.; Guzmán, J.M.; Martín del Río, M.P.; Miguez, J.M.; Mancera, J.M. and Soengas, J.L., 2003. Acclimation of *S. aurata* to various salinities alters energy metabolism of osmoregulatory and nonosmoregulatory organs. *Am. J. Phys. Regul. Integr. Comp. Phys*. Vol. 285, pp: 897-907.
  30. Schneider, S.M.; Joly, F.; Gehrhardt, M.F.; Badran, A.M.; Myara, A.; Thuillier, F.; Coudray-Lucas, C.; Cynober, L.; Trivin, F. and Messing, B., 2006. Taurine status and





## Investigating the effects of silver nanoparticles on the gills of Iranian sturgeon *Acipenser persicus* using HNMR

- **Khosrow Rahimi:** Department of Fisheries, Faculty of Marine Science and Technology, Hormozgan University, Bandar Abbas, Iran
- **Iman Sourinejad\*:** Department of Fisheries, Faculty of Marine Science and Technology, Hormozgan University, Bandar Abbas, Iran

Received: December 2019

Accepted: March 2020

**Key words:** HNMR, Gill, Silver nanoparticles, *Acipenser persicus*

### Abstract

In present study, biochemical alterations and metabolite profile of Iranian sturgeon *Acipenser persicus* which were directly exposed to colloidal silver nanoparticles during different acute and chronic periods were investigated. A number of 480 pieces of sturgeon at releasing weight with mean total weight of  $1.8 \pm 0.06$  g were exposed to three different concentrations of 0.001, 0.005 and 0.01 mg/L of silver nanoparticles and the alterations of their gill metabolites were investigated in compare with the control treatment using HNMR. The comparison of 0.01 mg/L silver nanoparticles sampled on day 10 with other treatments showed that glycine and glutathione metabolites had the highest value with significant differences ( $P < 0.05$ ). Acetylcholine had an ionic regulating role and the highest level was observed in freshwater control treatment. The amount of glycine, leucine and valine metabolites in freshwater treatment increased on day 10 compared with the other treatments. Overall, the results showed that glutathione acts as a biomarker and as a sensitive agent to the alterations of the amounts of silver nanoparticles in the gill tissue of Iranian sturgeon.

---

\* Corresponding Author's email: [sourinejad@hormozgan.ac.ir](mailto:sourinejad@hormozgan.ac.ir)

