

(OPEN ACCESS)

Effect of sub lethal doses of silver nitrate (AgNO_3) on the expression of antioxidant genes (CAT and SOD), stress related genes (HSP70) and liver enzymes of zebrafish (*Danio rerio*)

Azadeh Sadat Hosseini¹, Ali Shabani^{*2}, Roghieh Safari³, Seyed Aliakbar Hedayati⁴

1. Ph.D. Student of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: azad.hosseyni@yahoo.com
2. Corresponding Author, Associate Prof., Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: shabani@gau.ac.ir
3. Associate Prof., Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: fisheriessafari@yahoo.com
4. Professor, Dept. of Aquatics Production and Exploitation, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: marinebiology1@gmail.com

Article Info	ABSTRACT
Article type: Full Length Extension Paper	The purpose of this research was to investigate the effect of sub-lethal concentrations of silver nitrate (AgNO_3) on antioxidant and stress genes expression and some biochemical indices of zebra fish. For this purpose, zebra fish with the average weight of 0.5 ± 0.03 g were exposed to different levels of silver nitrate (T_1 : 10%, T_2 : 25% and T_3 : 50%) and control group for 14 days, each containing 3 replicates. At the end of the experiment, samples were collected to evaluate Sod, Cat, HSP70 and IGF-I genes expression and some biochemical factors including: ALP, ALT and AST. Results showed that genes expression (SOD, Cat and HSP70) were up-regulated at 25 and 50% which had significant differences with control ($P < 0.05$). The highest IGF-I level significantly was observed in control and the lowest expression was in 50% treatment ($P < 0.05$). ALP, ALT and AST activities in fish exposed to 10% silver nitrate had remarkable differences with others groups ($P < 0.05$). Therefore, it can be concluded, silver nitrate had destructive effects on zebra fish which can be used to evaluate the effect of heavy metals on fish.
Article history: Received: 08.19.2023 Revised: 09.07.2023 Accepted: 09.30.2023	
Keywords: Biochemical factor, Gene expression, Heavy metals, Oxidative destructive, Zebra fish	

Cite this article: Hosseini, Azadeh Sadat, Shabani, Ali, Safari, Roghieh, Hedayati, Seyed Aliakbar. 2025. Effect of sub lethal doses of silver nitrate (AgNO_3) on the expression of antioxidant genes (CAT and SOD), stress related genes (HSP70) and liver enzymes of zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 14 (1), 221-233.



© The Author(s).

DOI: 10.22069/japu.2023.21668.1810

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

اثرات غلظت‌های تحت کشنده نیترات نقره بر بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی (SOD و Cat) و مرتبط با استرس (HSP70) و آنزیم‌های کبدی سرم ماهی زبرا (*Danio rerio*)

آزاده سادات حسینی^۱، علی شعبانی^{۲*}، رقیه صفری^۳، سید علی اکبر هدایتی^۴

۱. دانشجوی دکتری تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
رایانامه: azad.hosseyni@yahoo.com
۲. نویسنده مسئول، دانشیار گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: shabani@gau.ac.ir
۳. دانشیار گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
رایانامه: fisheriessafari@yahoo.com
۴. استاد گروه تولید و بهره‌برداری آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
رایانامه: marinebiology1@gmail.com

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله:	هدف از این پژوهش بررسی اثرات غلظت‌های تحت کشنده نیترات نقره بر بیان ژن‌های
مقاله کامل علمی - ترویجی	آنتی‌اکسیدانی (SOD و Cat) و مرتبط با استرس (HSP70) و آنزیم‌های کبدی سرم ماهی
	گورخری (<i>Danio rerio</i>) می‌باشد. تعداد ۲۴۰ قطعه ماهی زبرا با میانگین وزنی 0.03 ± 0.05 گرم به مدت ۱۴ روز در معرض غلظت‌های تحت کشنده ۰ (شاهد)، ۱۰ (تیمار ۱)، ۲۵ (تیمار ۲)
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۲۸	و ۵۰ (تیمار ۳) درصد نیترات نقره و هر تیمار شامل ۳ تکرار قرار گرفتند. در پایان دوره
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۰۶/۱۶	آزمایش نمونه‌برداری از ماهیان زبرا جهت ارزیابی بیان ژن‌های SOD، Cat و HSP70
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۰۸	و فاکتورهای بیوشیمیایی سرم انجام شد. نتایج نشان داد که سطح بیان ژن‌های SOD، Cat
واژه‌های کلیدی:	و HSP70 در تیمارهای ۲۵ و ۵۰ درصد افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد
آسیب اکسیداتیو،	داشت ($P < 0.05$). میزان فعالیت آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپاراتات
بیان ژن،	آمینوترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP) در ماهیانی که در مواجهه با ۱۰ درصد نیترات
فاکتورهای بیوشیمیایی،	نقره قرار گرفته بودند اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها و شاهد داشت ($P < 0.05$).
فلزات سنگین،	در مجموع می‌توان چنین استنباط کرد که قرار گرفتن در معرض غلظت‌های تحت کشنده
ماهی زبرا	نیترات نقره منجر به ایجاد تغییر در سطح بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی و استرس و فاکتورهای

بیوشیمیایی ماهی زبرا می‌شود و می‌توان از این فاکتورها جهت ارزیابی اثرات فلزات سنگین بر ماهی استفاده کرد.

استناد: حسینی، آزاده سادات، شعبانی، علی، صفری، رقیه، هدایتی، سید علی‌اکبر (۱۴۰۴). اثرات غلظت‌های تحت کشنده نیترات نقره بر بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی (SOD و Cat) و مرتبط با استرس (HSP70) و آنزیم‌های کبدی سرم ماهی زبرا (*Danio rerio*). نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان، ۱۴ (۱)، ۲۳۳-۲۲۱.
DOI: 10.22069/japu.2023.21668.1810



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

آلاینده‌ها یکی از مهم‌ترین مشکلاتی هستند که همواره در اکوسیستم‌های آبی وجود دارند و پرورش را با مخاطراتی مواجهه می‌کنند. وجود این آلاینده‌ها منجر به برهم خوردن تعادل اکوسیستم‌ها شده و آن‌ها را در معرض خطر نابودی قرار می‌دهد (۱). هنگامی که آب آلوده شود به تبع، آبزیان موجود در آن نیز آلوده می‌شوند و در نهایت این آلودگی در طول زنجیره غذایی به انسان منتقل خواهد شد و با گذشت زمان در بدن انباشته می‌شود و سلامت انسان را به خطر می‌اندازد (۲). به‌طور کلی فلزات سنگین رایج‌ترین آلاینده‌هایی هستند که با غلظت‌های بالا در فاضلاب‌های صنایع وجود دارند و باعث ایجاد آسیب در محیط‌های آبی، آبزیان و نهایت انسان می‌شوند. این فلزات پس از ورود به بدن موجودات در بافت‌های چربی، عضلانی، استخوانی و مفاصل رسوب می‌کنند و با گذشت زمان و انباشته شدن در بدن منجر به بروز بیماری و حتی مرگ می‌شوند (۳). بعضی از فلزات سنگین تقریباً در هر غلظتی که باشند باعث ایجاد مسمویت می‌شوند و بعضی دیگر در شرایطی که غلظت آن‌ها از حد آستانه تحمل موجود بالاتر رود، سمیت ایجاد می‌کنند (۴). هنگامی که موجودات زنده در معرض آلاینده‌های مختلف قرار می‌گیرند، ایجاد تغییرات بیوشیمیایی و ملکولی به‌عنوان اولین تغییرات قابل اندازه‌گیری می‌توانند اطلاعات زیادی در ارتباط با اثرات این مواد تنش‌زا در این موجودات را در اختیار قرار دهند (۷). اگر در زمان مواجهه با یک آلاینده، بافتی از بدن موجود زنده دچار آسیب شود، تغییراتی در فعالیت‌های آنزیم‌ها ایجاد می‌شود که منجر به بروز اختلال در عملکرد طبیعی آن بافت می‌شود. در نتیجه افزایش یا کاهش در سطح آنزیم‌ها می‌تواند نمایانگر آسیب‌دیدگی در بافت‌ها باشد (۸). نقره دارای خواص فیزیکی و شیمیایی ویژه‌ای است که سبب شده‌اند در مصارف

الکترونیکی، توری، دارویی و بهداشتی مورد استفاده قرار گیرد (۵). به دلیل کاربردهای متعدد آن در صنایع مختلف، وارد اکوسیستم آبی شده و وارد بدن آبزیان می‌شود. هنگام مواجهه آبزیان با غلظت‌های مختلف این فلز، پاسخ‌های متعددی مانند آسیب‌های بافتی، تغییرات آنزیمی، تغییرات پارامترهای خونی‌شناسی، ژنتیکی، رفتاری، تولیدمثلی و حتی مرگ در گونه‌های مختلف گزارش شده است (۶). از این تغییرات می‌توان به‌عنوان نشانگرهای زیستی جهت بررسی وجود آلاینده‌ها استفاده کرد. در ارتباط با اثرات فلزات سنگین بر ماهیان مطالعات متعددی انجام شده است. رزم‌آرا و همکاران (۱۳۹۳) تغییرات بافت‌شناسی گریه‌ماهی رنگین‌کمان (*pangasianodon hypophthalmus*) را در مواجهه با غلظت‌های ۱ و ۲۰ میکروگرم نانوذرات نقره و نیترات نقره مورد بررسی قرار دادند و انواع آسیب‌های بافتی مانند هایپرپلازی رشته و تیغه ثانویه، کوتاه شدن و حلقه‌ای شدن تیغه‌های ثانویه را در بافت آبشش مشاهده کردند (۹). خسروی و همکاران (۱۳۹۷) گزارش کردند که قرار گرفتن ماهیان کپور در معرض غلظت‌ها ۰/۰۲۵ و ۰/۰۴۵ میلی‌گرم در لیتر نیترات نقره به‌مدت ۲۱ روز منجر به افزایش بیان ژن HSP70، آسیب‌های بافتی و تخریب ساختار پرزهای روده شد (۱۰). باتوجه به این‌که آبی‌پروری تقریباً نیمی از غذاهای دریایی مصرفی جمعیت رو به رشد جهان را تشکیل می‌دهد و روز به روز در حال گسترش می‌باشد، نگرانی‌ها در ارتباط با اثرات ورود فلزات سنگین به منابع آبی و اثرات مخرب آن بر آبزیان به یکی از بزرگ‌ترین دغدغه‌های فعالان این صنعت تبدیل شده است و ماهی به‌عنوان یک آبی‌پروری بهترین تجمع‌کننده زیستی عالی شناخته شده است و می‌تواند تجمع فلزات سنگین را در سطوح تروفي بالاتر نشان دهد هم‌چنین به دلیل تحرک بالا، تنوع و تراکم زیاد می‌تواند آلودگی‌های چندین ساله یک منطقه را نشان دهد (۱۱).

میان و با آب محتوی غلظت‌های نیترات نقره برای هر تیمار انجام شد.

نمونه‌برداری ژنتیکی: در این پژوهش به‌منظور سنجش میزان بیان ژن‌های مذکور پس از بیهوش شدن ماهیان به‌وسیله پودر گل میخک (۰/۵ گرم بر لیتر)، سر و دم ماهیان با استفاده از ست تشریح کاملاً استریل، جدا شدند و بقیه ماهی در ویال‌های استریل قرار گرفت و ویال‌ها فوراً به ازت مایع منتقل شدند. نمونه‌ها تا زمان استخراج RNA در فریزر ۸۰- آزمایشگاه نگهداری شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA: جهت استخراج RNA ابتدا نمونه‌های بافتی در مجاورت کامل با ازت مایع درون هاون‌های چینی استریل شده کوبیده شدند. سپس استخراج با استفاده از ماده هضم کننده RNX-Plus و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. هم‌چنین سنتز cDNA با استفاده از مسترمیکس سنتز cDNA شرکت جینت بایو محصول کشور کره و طبق دستورالعمل آن انجام شد.

طراحی پرایمر: به‌منظور طراحی پرایمرهای Cat، SOD، HSP70 و β actine به‌عنوان ژن رفرنس از بانک ژنی NCBI و نرم‌افزار PRIMER3.0 استفاده شد. در طراحی پرایمر طول رشته، مکان صحیح چسبیدن و دمای ذوب بسیار مهم می‌باشند.

تهیه ماهی: تعداد ۲۴۰ قطعه بچه‌ماهی زبرا از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان زیتنی بخش خصوصی واقع در شصت‌کلاهی استان گلستان تهیه و به‌وسیله کیسه‌های پلاستیکی محتوی آب و اکسیژن (۱:۳) به آزمایشگاه شهید ناصر فضلی برآبادی (سالن ونیرو) دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شدند. به‌منظور سازگاری با محیط آزمایشگاه، ماهیان زبرا در آکواریوم‌های ۲۰ لیتری توزیع شده و حدود ۱۴ روز با جیره غذایی پایه تغذیه شدند. در طول دوره سازگاری همه فاکتورهای فیزیکیوشیمیایی آب اندازه‌گیری می‌شد.

تیماربندی و شرایط پرورش: بچه‌ماهیان زبرا با میانگین وزن 0.1 ± 0.03 در ۱۲ آکواریوم ۲۰ لیتری (۲۰ عدد ماهی در هر آکواریوم) تقسیم شدند و در معرض ۳ غلظت تحت کشنده ۱۰، ۲۵ و ۵۰ درصد نیترات نقره قرار گرفتند. گروه شاهد نیز در آب عاری هر گونه آلودگی نیترات نقره قرار گرفت. هر تیمار آزمایشی شامل ۳ تکرار بود. آزمایش به‌مدت ۱۴ روز انجام شد. در طول دوره آزمایش همه شرایط فیزیکیوشیمیایی برای همه آکواریوم‌ها یکسان بود و روزانه اندازه‌گیری می‌شد. دمای آب ۲۵ درجه سانتی‌گراد، $pH=7.6$ و اکسیژن آب $7/8$ بود. در طول دوره پرورش ماهیان با غذای بیومار و طی ۳ نوبت در طول روز تغذیه می‌شدند. تعویض آب یک روز در

جدول ۱- توالی پرایمرهای (SOD، Cat و HSP70) و ژن رفرنس (B-Actine).

Table 1. Sequence of primers (SOD, Cat and HSP70) and reference gene (B-Actine).

شماره دسترسی Access number	طول قطعه (جفت باز) Length of piece (open pair)	توالی Sequence	نام پرایمر Primer name
BC055516.1	200	F:GGGTGGCAATGAGGAAAG R:GCCACATAGAAATGCACAG	SOD
AJ007505.1	197	F:GCATGTTGGAAAGACGACAC R:GTGGATGAAAGACGGAGACA	Cat
AB062281.1	200	F: CTGCTGCTGCTGGATGTG R: GCTGGTTGTCGGAGTAAGTG	HSP70
NM_001124235.1	140	F:ATGGGCCAGAAAGACAGCTACGTG R: CTTCTCCATGTCGTCCCAGTTGGT	Beta-Actine

Real-time PCR (QPCR): برای انجام ریل تایم هر ویال محتوی ۱۰ میکرولیتر سایبر گرین، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم تگ پلی‌مراز، آغازگر پیش‌رونده و پس‌رونده هر کدام ۰/۲ میکرولیتر، ۶/۴ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز، ۱ میکرولیتر DMSO و ۲ میکرولیتر cDNA بود. پس از آماده‌سازی، ویال‌ها درون دستگاه iCycler (Bio-Rad) qPCR- قرار گرفتند و دستگاه بر اساس برنامه‌ای که از قبل بر روی آن نوشته شده بود فعالیت کرد. خروجی دستگاه تحت عنوان CT درون اکسل ذخیره شد.

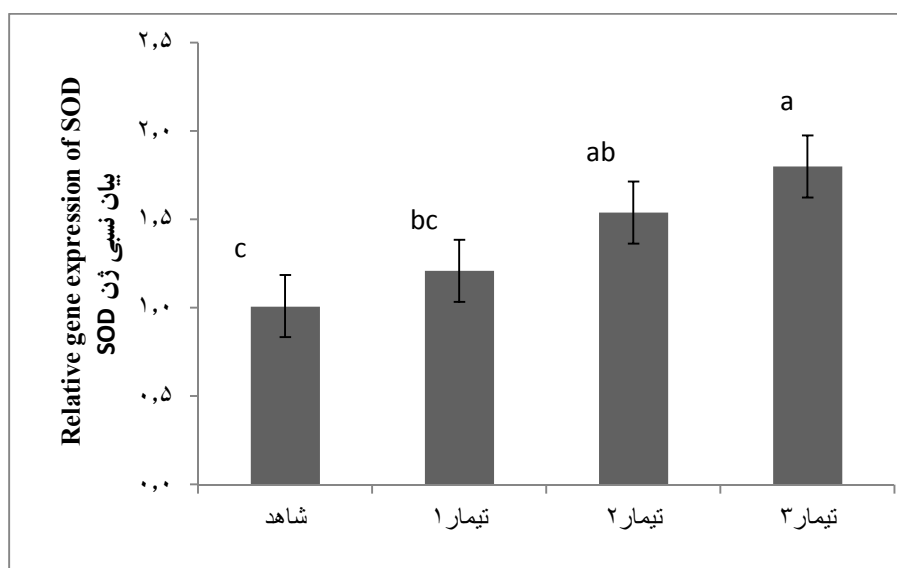
آنزیم‌های کبدی: به‌منظور ارزیابی پارامترهای بیوشیمیایی سرم، از هر تیمار ۳ عدد ماهی با محلول پودر گل میخک (۰/۵ گرم بر لیتر) بی‌هوش شدند و در ویال‌های استریل قرار گرفتند و بلافاصله به ازت مایع منتقل شدند. سپس ماهی کامل فریز شده در مجاورت با ازت مایع در هاون‌های چینی کاملاً پودر شد و مقدار مشخصی در ویال‌های جدید ریخته شد و به‌میزان ۱ سی‌سی محلول آماده فسفات بافر به هر ویال اضافه شد. ویال‌ها به‌مدت ۱۰ در دستگاه سانتریفیوژ با دور rpm ۸۰۰۰ سانتریفیوژ شدند و سپس فاز بالایی محلول جدا شد و به ویال‌های جدید منتقل شد. آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز (ALP)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپارات آمینوترانسفراز (AST) توسط کیت پارس آزمون (ساخت ایران) و

دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۳۴۰ نانومتر برای ALT و AST و طول موج ۴۰۵ نانومتر برای ALP (Borges, 2004) اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: برای توزیع نرمال و همگنی داده‌ها از آزمون آزمون کولموگروف-اسمیرنوف Kolmogorov – Smirnov استفاده شد. بیان نسبی ژن‌ها با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ توسط نرم‌افزار اکسل انجام شد. و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) و تست دانکن توسط نرم‌افزار Spss ۲۰ انجام شد.

نتایج

میزان بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز (SOD): تأثیر سطوح مختلف غلظت‌های تحت‌کشنده نیترات نقره بیان ژن SOD در شکل ۱ گزارش شده است. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نیترات نقره میزان بیان ژن SOD افزایش یافت. به‌طوری‌که بالاترین سطح بیان در ماهیان قرار گرفته در معرض ۵۰ درصد غلظت تحت‌کشنده بود و تیمار ۵۰ درصد و ۲۵ درصد اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشتند ($P < 0/05$). بین تیمارهای ۵۰ درصد و ۲۵ درصد اختلاف معنی‌داری در میزان بیان این ژن مشاهده نشد ($P > 0/05$) هم‌چنین تیمار ۲۵ درصد و تیمار ۱۰ درصد نیز اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند ($P > 0/05$).



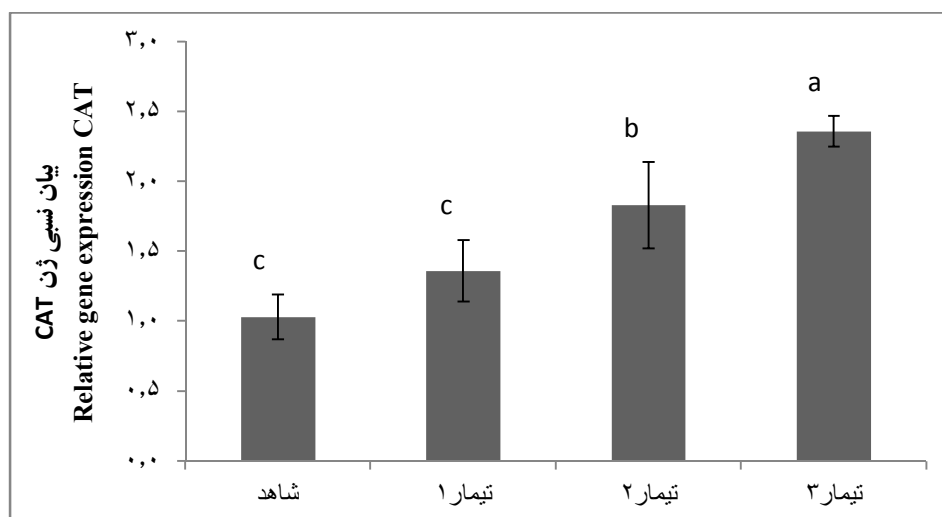
شکل ۱- تأثیر سطوح مختلف تحت کشنده نیترات نقره بر میزان بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در ماهی زبرا. حروف انگلیسی غیرمشترک نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۰/۰۵ در بین تیمارها می‌باشد.

Figure 1. The effect of different sublethal levels of silver nitrate on the gene expression of superoxide dismutase (SOD) in zebrafish.

Non-common English letters indicate significance at the 0.05 level among treatments.

میزان بیان این ژن در تیمار ۲۵ درصد نیز در سطح معنی‌داری با تیمار ۱۰ درصد و گروه شاهد اندازه‌گیری شد ($P < 0.05$). بین تیمار ۱۰ درصد و گروه شاهد اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد ($P > 0.05$).

میزان بیان ژن کاتالاز (Cat): میزان بیان ژن Cat نیز تحت تأثیر سطوح مختلف تحت کشنده نیترات نقره قرار گرفت (شکل ۲). بالاترین سطح بیان mRNA ژن کاتالاز در تیمار ۵۰ درصد نیترات نقره بود که اختلاف معنی‌داری با تیمار ۱۰ درصد و شاهد داشت

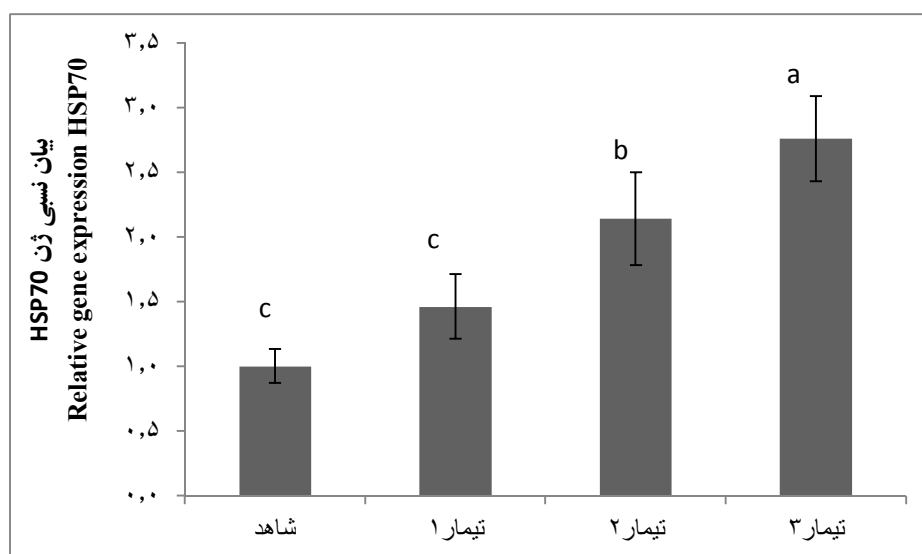


شکل ۲- تأثیر سطوح مختلف تحت کشنده نیترات نقره بر میزان بیان ژن کاتالاز (Cat) در ماهی زبرا. حروف انگلیسی غیرمشترک نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۰/۰۵ در بین تیمارها می‌باشد.

Figure 2. The effect of different sublethal levels of silver nitrate on the gene expression of the catalase (Cat) in zebrafish. Non-common English letters indicate significance at the 0.05 level among treatments.

تیمار ۵۰ درصد و کم‌ترین مقدار در تیمار شاهد مشاهده شد. بین تیمار ۵۰ درصد و گروه شاهد اختلاف در سطح معنی‌داری اندازه‌گیری شد ($P < 0.05$) و تیمار ۱۰ درصد با شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت ($P > 0.05$).

میزان بیان ژن پروتئین شوک حرارتی (HSP70): مقادیر مختلف بیان ژن HSP70 تحت تأثیر غلظت‌های تحت کشنده نیترات نقره در شکل ۳ خلاصه شده است. سطح بیان ژن HSP70 در ماهیان زبرا در مواجهه با غلظت‌های تحت کشنده نیترات نقره روندی افزایشی را نشان داد. بالاترین سطح بیان در



شکل ۳- تأثیر سطوح مختلف تحت کشنده نیترات نقره بر میزان بیان ژن پروتئین شوک حرارتی (HSP70) در ماهی زبرا.

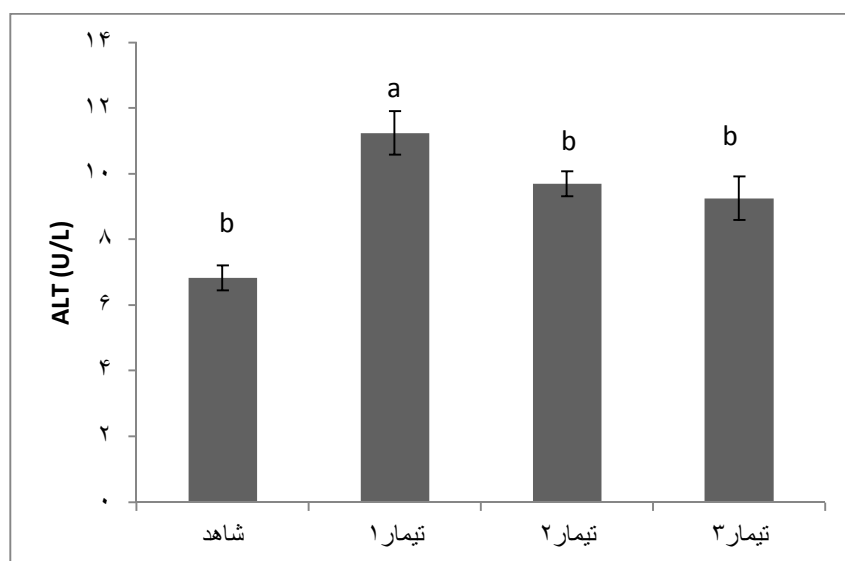
حروف انگلیسی غیرمشترک نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۰/۰۵ در بین تیمارها می‌باشد.

Figure 3. The effect of different sublethal levels of silver nitrate on the gene expression of the heat shock protein (HSP70) in zebrafish.

Non-common English letters indicate significance at the 0.05 level among treatments.

معنی‌داری بالاتر از سایر تیمارها و گروه شاهد بود ($P < 0.05$). بین تیمار ۵۰ درصد، ۲۵ درصد و گروه شاهد اختلاف معنی‌داری در سطح آنزیم ALT مشاهده نشد ($P > 0.05$).

آلانین آمینوترانسفراز (ALT): روند تغییرات آنزیم ALT در بین تیمارهای مختلف تحت تأثیر غلظت‌های تحت کشنده نیترات نقره در شکل ۴ خلاصه شده است. میزان آنزیم ALT در ماهیانی که در مواجهه با ۱۰ درصد نیترات نقره قرار گرفته بودند به شکل



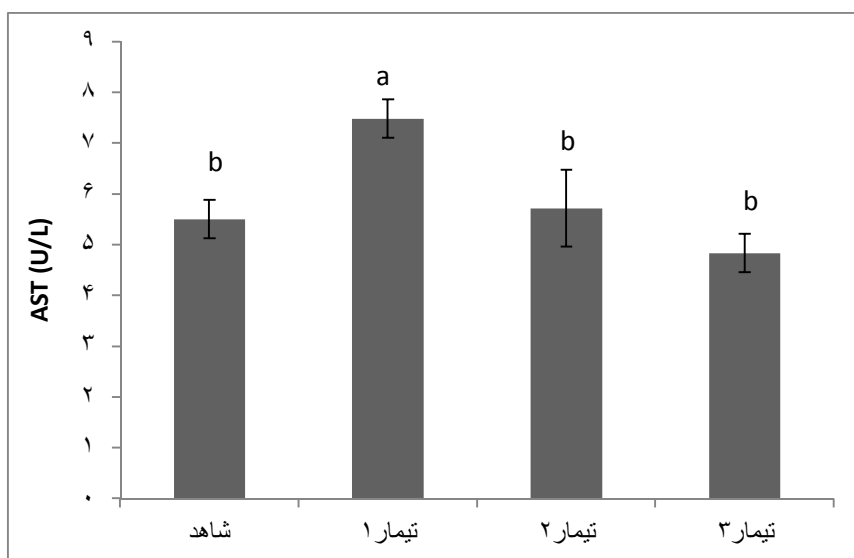
شکل ۴- تأثیر سطوح مختلف تحت کشنده نیترات نقره بر میزان آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) در ماهی زبرا. حروف انگلیسی غیرمشتک نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۰/۰۵ در بین تیمارها می‌باشد.

Figure 4. The effect of different sublethal levels of silver nitrate on the amount of alanine aminotransferase (ALT) enzyme in zebrafish.

Non-common English letters indicate significance at the 0.05 level among treatments.

نقره بود که اختلاف معنی‌داری با شاهد و سایر تیمارها داشت ($P < 0.05$). بین شاهد و تیمار ۲۵ درصد و ۵۰ درصد اختلاف معنی‌دار نبود ($P > 0.05$).

آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST): سطح آنزیم AST نیز تحت تأثیر سطوح مختلف غلظت‌های تحت کشنده نیترات نقره قرار گرفت (شکل ۵). نتایج نشان داد که بیش‌ترین سطح آنزیم AST در تیمار ۱۰ درصد نیترات



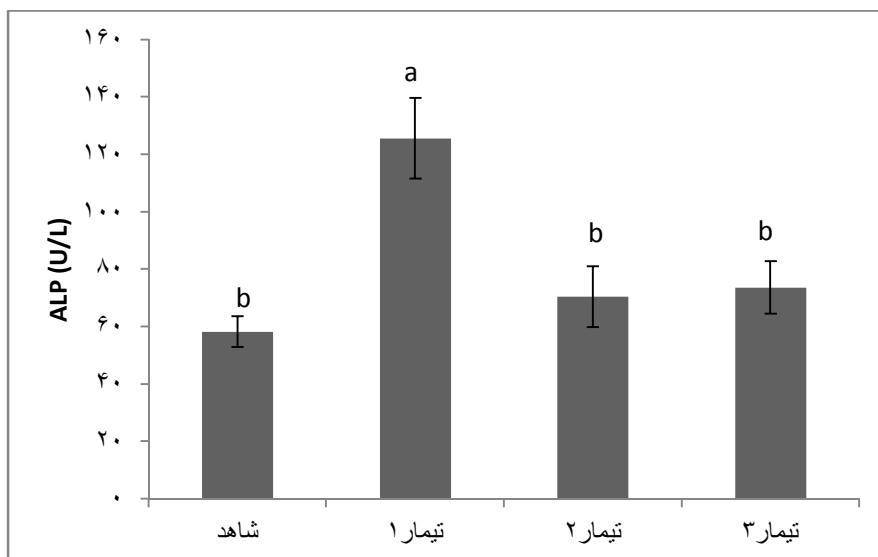
شکل ۵- تأثیر سطوح مختلف تحت کشنده نیترات نقره بر میزان آنزیم آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) در ماهی زبرا. حروف انگلیسی غیرمشتک نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۰/۰۵ در بین تیمارها می‌باشد.

Figure 5. Effect of different sublethal levels of silver nitrate on aspartate aminotransferase (AST) enzyme levels in zebrafish.

Non-common English letters indicate significance at the 0.05 level among treatments.

داشت که اختلاف معنی‌داری با شاهد و دیگر تیمارها داشت ($P < 0.05$). شاهد کم‌ترین میزان ALP را داشت و با تیمار ۲۵ درصد و ۵۰ درصد اختلاف معنی‌داری نداشت ($P > 0.05$).

آلکالین فسفاتاز (ALP): روند تغییرات آنزیم ALP متأثر از غلظت‌ها تحت کشنده نیترات نقره در ماهی زبرا در شکل ۶ خلاصه شده است. نتایج نشان داد که تیمار ۱۰ درصد نیترات نقره، بیش‌ترین میزان ALP را



شکل ۶- تأثیر سطوح مختلف تحت کشنده نیترات نقره بر میزان آلکالین فسفاتاز (ALP) در ماهی زبرا. حروف انگلیسی غیرمشترک نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۰/۰۵ در بین تیمارها می‌باشد.

Figure 6. The effect of different sublethal levels of silver nitrate on the amount of alkaline phosphatase (ALP) enzyme in zebrafish.

Non-common English letters indicate significance at the 0.05 level among treatments.

دیگر فرایندهای فیزیولوژیک را مهار می‌کند زیرا تجمع فزاینده H_2O_2 و OH منجر به آسیب سلولی اکسیداتیو می‌شود. درواقع همکاری بین این دو آنزیم سبب ایجاد تعادل بین تولید گونه‌های اکسیژنی فعال (ROS) و دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌شود. در مطالعه حاضر میزان بیان ژن‌های SOD و Cat تحت‌تأثیر غلظت‌های تحت کشنده نیترات نقره نسبت به گروه شاهد افزایش پیدا کرد به‌طوری‌که با افزایش سطح غلظت‌ها تحت کشنده نیترات نقره میزان بیان نیز افزایش یافت و در ماهیانی که در معرض ۵۰ درصد نیترات نقره بودند بالاترین سطح بیان مشاهده شد. هنگامی که موجودات در معرض آلودگی‌های ناشی از فلزات سنگین قرار می‌گیرند، میزان ROS به‌صورت

بحث و نتیجه‌گیری

علاوه‌بر ارزیابی فاکتورهای بیوشیمیایی، بافت‌شناسی و رفتارشناسی، سنجش میزان بیان ژن می‌تواند تکنیکی مؤثر در مطالعات مربوط به بررسی تأثیر آلاینده‌های محیطی بر جانوران باشد. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند SOD و Cat نقش مهمی در کاهش تأثیر استرس اکسیداتیو ناشی از فلزات سنگین دارند، این آنزیم‌ها اولین خط دفاعی بدن در مواجهه با استرس، آلاینده‌ها و سمیت اکسیژن در موجودات زنده را تشکیل می‌دهند. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) رادیکال آنیوسوپر اکسید را به اکسیژن و H_2O_2 تبدیل می‌کند و آنزیم کاتالاز رادیکال H_2O_2 به‌دست آمده از فرآیند آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و

قابل توجهی در بدن افزایش پیدا می‌کند. بنابراین سیستم آنتی‌اکسیدانی موجود در بدن موجودات میزان ROS اضافی را از بدن حذف می‌کند زیرا ROS می‌تواند منجر به ایجاد آسیب‌های بافتی در جانور شود. در مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی، SOD و Cat به‌عنوان اولین سد دفاعی در مقابل استرس اکسیداتیو ناشی از حضور ROS دارای عملکردهای حیاتی هستند (۱۲). هم‌راستا با نتایج به‌دست آمده از این پژوهش پارک و همکاران (۲۰۲۰) گزارش کردند که قرار گرفتن ماهی زبرا در برابر سمیت فلز کادمیم و افزایش دما منجر به افزایش بیان ژن SOD شد. آن‌ها گزارش کردند که هنگامی که ماهیان زبرا در معرض کادمیم و افزایش دما قرار گرفتند سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و ROS افزایش یافت. آن‌ها معتقدند که ترکیب این دو استرس ممکن است باعث بروز پاسخ‌های دفاعی به استرس اکسیداتیو ناشی از تولید ROS باشد (۱۳). مطالعات نشان داده‌اند که فلزات سنگین از طریق تولید رادیکال‌های آزاد باعث ایجاد استرس اکسیداتیو می‌شوند و بافت‌های ماهی مانند ماهیچه، آبشش، کبد، روده و کلیه با سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی که دارند از خودشان در مقابل استرس اکسیداتیو ناشی از حضور فلزات سنگین محافظت می‌کنند (۱۴). استرس اکسیداتیو ناشی از حضور فلزات سنگین منجر به تجزیه پروتئین‌ها، غیرفعال شدن آنزیم‌ها، پراکسیداسیون چربی‌ها و حتی مرگ سلولی می‌شود (ماگالهااس و همکاران، ۲۰۲۰). در چنین شرایطی سلول‌ها به‌منظور مقابله با ROS از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و مواد آنتی‌اکسیدانی با وزن ملکولی پایین مانند اسید اسکوربیک، گلووتاتیون، سوپراکسید دیسموتاز و ... کمک می‌گیرند تا مانع از مرگ سلولی شوند. بنابراین افزایش سطح بیان ژن‌های SOD و Cat در این مطالعه را می‌توان به مقابله با تنش اکسیداتیو ناشی از حضور نیترات نقره نسبت داد.

پروتئین‌های شوک حرارتی (HSP70) به‌عنوان محافظان ملکولی عمل می‌کنند که در شرایط بروز استرس ناشی از نیترات نقره بیان آن در ماهیان زبرا افزایش یافت. این پروتئین تمایل دارد که در شرایط بروز استرس و آسیب‌های اکسیداتیو با مداخله در باز کردن پروتئین‌های کنترل نشده نقشی محافظتی را در راستای حفظ هومئوستازی پروتئین‌ها و سلول اعمال کند (۱۵). هم‌راستا با نتایج به‌دست آمده از این پژوهش، وانگ و همکاران (۲۰۱۹) اثرات محافظتی HSP70، Cat و SOD را در ماهیان زبرا به‌هنگام مواجهه با سمیت ۱۰۰ تا ۲۰۰ میکروگرم بر لیتر کادمیم گزارش کردند (۱۶).

آنزیم‌های ALP، ALT و AST به‌صورت متداول برای تشخیص آسیب‌های وارده به بافت‌های ماهیان استفاده می‌شوند. علاوه بر این می‌توانند میزان آلودگی محیط و سمیت ناشی از حضور فلزات سنگین را با حساسیت بالایی قبل از بروز اثرات خطرناک نشان دهند (اونر و همکاران، ۲۰۰۹). در این پژوهش سطح آنزیم‌های ALP، ALT و AST در تیمارهای نیترات نقره تا سطح ۲۵ درصد نسبت به گروه شاهد افزایش یافت. این آنزیم‌ها بیش‌تر در میتوکندری سلول‌های بدن به‌خصوص سلول‌های کبدی قرار دارند و به‌هنگام ایجاد آسیب خفیف، التهاب و یا نکروز سلول‌های کبدی سطح آن‌ها در پلاسما افزایش می‌یابد. هم‌چنین هر گونه آسیب و یا اختلال در عضلات اسکلتی و نارسایی قلبی نیز باعث افزایش سطح آنزیم‌ها در پلاسما می‌شود (۱۷). طی مطالعات انجام شده بر روی گربه‌ماهی آب شیرین، *Myxus vittatus* (۱۸)، ماهی زبرا *Danio rerio* (۱۹) و ماهی کپور معمولی، *Cyprinus carpio* (۲۰) به‌ترتیب در تماس با مسمومیت آرسنیک، اندوسولفان و نانوآکسید مس افزایش سطح آنزیم‌های ALT و AST نشان‌دهنده بروز آسیب‌های شدید در بافت کبد این گونه‌ها

افزایش آنزیم ALP تحت تأثیر سمیت نیترات نقره احتمالاً آسیب‌های وارد شده به کبد و انسداد مجاری صفراوی در ماهی زبرا می‌باشد (۱۹).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج به‌دست آمده از این پژوهش نشان داد که قرار گرفتن ماهیان زبرا در معرض غلظت‌های تحت کشنده نیترات نقره منجر به افزایش بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی (SOD و Cat) و استرس (HSP70) شد. همچنین فعالیت آنزیم‌های کبدی (AST و ALT) نیز در سطح ۱۰ درصد نیترات نقره افزایش یافت و سپس به‌دلیل بروز آسیب در بافت کبد در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ درصد روندی کاهشی را نشان داد. بنابراین می‌توان چنین نتیجه گرفت که بررسی روند تغییرات این فاکتورها می‌تواند شاخص مناسبی جهت بررسی اثر فلزات سنگین در ماهیان باشد.

می‌باشد در پژوهشی که توسط حنایی کاشانی و همکاران (۱۳۹۵) انجام شد، تأثیر سم ارگانوفسفره دیازینون بر ماهی قرمز (*Carassius auratus*) منجر به افزایش ALT و AST گردید و با افزایش غلظت سم میزان این آنزیم‌ها نیز افزایش یافت. تاس‌ماهی با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر سم دیازینون سبب افزایش معنی‌دار سطح این آنزیم‌ها در پلاسما شد که این امر ناشی از آزاد شدن این آنزیم‌ها از سلول‌های آسیب دیده به‌خصوص سلول‌های کبدی است (۲۱) که با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد.

آلکالین فسفاتاز (ALP) آنزیمی است که در اپیتلیوم مجاری صفراوی، سلول‌های کبدی و در مخاط روده و کلیه یافت می‌شود. همچنین در سلول‌های کوپفر کبد نیز وجود دارد. به‌هنگام انسداد مجاری صفراوی داخل و خارج کبدی، سیروزی و اختلالات کبدی، سطح این آنزیم افزایش پیدا می‌کند (۱۷). طبق نتایج به‌دست آمده از این گزارش دلیل

منابع

- Hedayati, S. A., Jahanbakhshi, A., & Ghaderi Marzi, F. (2013). Aquatic toxicology. Gorgan university of agriculture and natural resources. 210p.
- Boenigk, J., Beisser, D., Zimmermann, S., Bock, C., Jakobi, J., Grabner, D., & Sures, B. (2014). Effects of silver nitrate and silver nanoparticles on a planktonic community: general trends after short-term exposure. *PloS one*, 9 (4), e95340.
- Majnoni, F., Mansouri, B., Rezaei, M., & Hamidian, A. H. (2013). Metal concentrations in tissues of common carp, *Cyprinus carpio*, and silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix* from the Zarivar Wetland in Western Iran. *Fisheries & Aquatic Life*, 21 (1), 11-18.
- Mansouri, B., Pourkhabbaz, A., Ebrahimpour, M., Babaei, H., & Hossein Hamidian, A. (2013). Bioaccumulation and elimination rate of cobalt in *Capoeta fusca* under controlled conditions. *Chemical Speciation & Bioavailability*, 25 (1), 52-56.
- Gong, P., Li, H., He, X., Wang, K., Hu, J., Tan, W., & Yang, X. (2007). toxicology. *Environ. Int.* 33, 414-25.
- Nair, K. K., Kiremidjian, A. S., & Law, K. H. (2006). Time series-based damage detection and localization algorithm with application to the ASCE benchmark structure. *Journal of Sound and Vibration*, 291 (1-2), 349-368.
- Rose, W. L., Nisbet, R. M., Green, P. G., Norris, S., Fan, T., Smith, E. H., ... & Anderson, S. L. (2006). Using an integrated approach to link biomarker responses and physiological stress to growth impairment of cadmium-exposed larval topmelt. *Aquatic toxicology*, 80 (3), 298-308.

8. Valarmathi, S., & Azariah, J. (2003). Effect of copper chloride on the enzyme activities of the crab *Sesarma quadratum* (Fabricius). *Turkish Journal of Zoology*, 27 (3), 253-256.
9. Razm Ara, P., Dorafshan, S., Peykan Horiyati, F., Talebi, M., & Ranjbar, M. (2013). Effect of colloidal silver nanoparticles and silver nitrate dissolved in water on gill tissue of rainbow catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*. *Journal of Aquatic Ecology*, 3, 10-18.
10. Khosravi Katooli, KH., Shaabani, A., Kolangi, H., & Imanpour, M. R. (2017). The effect of sub-lethal concentrations of silver nanoparticles and silver nitrate on HSP70 gene expression and gill, liver and intestinal tissue damage in common carp, *Cyprinus carpio*. *Journal of Animal Environment*, 10, 17-29.
11. Van Geast, J. (2010). Bioaccumulation of sediment-associated contaminants in freshwater organism: development and standardization of a laboratory method. PhD thesis, University of Guelph, Canada. 1-232.
12. Meng, D., Zhang, P., Zhang, L., Wang, H., Ho, C. T., Li, S., ... & Zhao, H. (2017). Detection of cellular redox reactions and antioxidant activity assays. *Journal of Functional Foods*, 37, 467-479.
13. Park, K., Han, E. J., Ahn, G., & Kwak, I. S. (2020). Effects of combined stressors to cadmium and high temperature on antioxidant defense, apoptotic cell death, and DNA methylation in zebrafish, *Danio rerio* embryos. *Science of the Total Environment*, 716, 137130.
14. Atli, G., & Canli, M. (2007). Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 145 (2), 282-287.
15. Liu, X., Shi, H., Liu, Z., Wang, J., & Huang, J. (2019). Effect of heat stress on heat shock protein 30 (Hsp30) mRNA expression in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 19(8), 681-688.
16. Wang, C. C., Si, L. F., Guo, S. N., & Zheng, J. L. (2019). Negative effects of acute cadmium on stress defense, immunity, and metal homeostasis in liver of zebrafish: the protective role of environmental zinc dpre-exposure. *Chemosphere*, 222, 91-97.
17. Banaee, M., Mirvaghefi, A. R., Rafiee, G. R., & Mojazi Amiri, B. (2008). Effect of sublethal diazinon concentrations on blood plasma biochemistry. *International Journal of Environmental Research*, 2, 189-198.
18. Prakash, S., & Verma, A. K. (2020). Effect of Arsenic on Serum Biochemical parameters of a fresh water cat fish, *Mystus vittatus*. *International Journal of Biological Innovations*, 2 (1), 11-19.
19. Kiapour, S., Shaabani, A., & Safari, R. (2021). Effects of exposure to sub-lethal doses of endosulfan poison on blood serum biochemical factors in zebrafish. *Journal of Animal Environment*, 13, 363-370.
20. Sahrai, H., Hosseini, A., Hedayati, S. A. A., & Ghorbani, R. (2020). Investigating the effect of exposure to sub-lethal concentrations of nano copper oxide on growth factors and biochemical parameters of common carp, *Cyprinus carpio*, *Journal of environmental science and technology*, 22, 31-42.
21. Hanai Kashani, Z., Imanpour, M. R., Zadmajid, V., & Mazandarani, M. (2016). Determining the degree of toxicity and the effect of diazinon poison on the biochemical indices of the blood of red fish male breeders *Carassius auratus*. *Journal Aquatic Physiology and Biotechnology*, 5, 59-68.

