



UNIWERSYTET SZCZECIŃSKI  
**INSTYTUT BIOLOGII**

mgr Anna Sielska

## ROZPRAWA DOKTORSKA

**Ekspresja genów związanych ze stresem oksydacyjnym w wylęgu wybranych gatunków  
ryb hodowlanych pod wpływem nanopierwiastków miedzi**

Expression of oxidative stress-related genes in hatchlings of selected farmed fish species  
under the influence of copper nanoparticles

Praca doktorska wykonana w Instytucie Biologii  
Uniwersytetu Szczecińskiego  
Promotor: dr hab. Lidia Skuza, prof. US

Szczecin 2024

## OŚWIADCZENIE DOKTORANTA

Oświadczam, że moja praca pt.: Ekspresja genów związanych ze stresem oksydacyjnym w wylęgu wybranych gatunków ryb hodowlanych pod wpływem nanopierwiastków miedzi

- a. została napisana przeze mnie samodzielnie,
- b. nie narusza praw autorskich w rozumieniu ustawy z dnia 4 lutego 1994 roku o prawie autorskim i prawach pokrewnych (Dz.U. 2022 r. poz. 2509) oraz dóbr osobistych chronionych prawem,
- c. nie zawiera danych i informacji, które ~~uzyskałem~~ / uzyskałam w sposób niedozwolony,
- d. nie była podstawą nadania tytułu naukowego lub zawodowego ani mnie ani innej osobie.

Ponadto oświadczam, że treść pracy przedstawionej przeze mnie do obrony, zawarta na przekazanym nośniku elektronicznym jest identyczna z jej wersją drukowaną.

Szczecin, dn. 17.09.2024



*podpis doktoranta*

Serdeczne podziękowania  
Pani dr hab. Lidii Skuzie, prof. US,  
za poświęcony czas, wsparcie  
i wyrozumiałość, a także za udzielenie  
wszechstronnej pomocy naukowej.

# Spis treści

<b>1. Wstęp</b> .....	8
1.1. Opis gatunków wykorzystanych do badań .....	8
1.2. Nanopierwiastki miedzi.....	9
1.3. Źródła nanopierwiastków miedzi oraz ich interakcje ze środowiskiem wodnym.....	13
1.4. Mechanizmy toksyczności nanopierwiastków miedzi. ....	15
1.5. Oddziaływanie nanopierwiastków miedzi na organizmy wodne. ....	19
<b>2. Cel badań</b> .....	23
<b>3. Materiały i metody</b> .....	24
3.1. Materiał badawczy .....	24
3.2. Opis nanopierwiastków .....	24
3.3. Etapy badań.....	25
3.4. Izolacja materiału genetycznego .....	26
3.4.1. Reakcja PCR i elektroforeza .....	26
3.4.2. Real-Time PCR .....	26
3.4.3. Analiza biochemiczna .....	29
3.4.4. Analiza statystyczna .....	29
<b>4. Omówienie publikacji stanowiących podstawę pracy doktorskiej</b> .....	31
4.1. Genotoksyczność nanopierwiastków miedzi u wylęgu <i>Salmo trutta</i> .....	31
4.2. Wpływ nanopierwiastków miedzi na enzymy związane ze stresem oksydacyjnym .....	32
4.2.1. Ekspresja genów oraz aktywność enzymatyczna u <i>Cyprinus carpio</i> i <i>Oncorhynchus mykiss</i> .....	32
4.2.2. Ekspresja genów u <i>Oncorhynchus mykiss</i> w porównaniu z siarczanem (VI) miedzi.....	36
<b>5. Stwierdzenia i wnioski</b> .....	38
<b>6. Streszczenie</b> .....	40

<b>7. Summary</b> .....	41
<b>8. Bibliografia</b> .....	42
<b>Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej z oświadczeniami o współautorstwie</b> .....	61

## Wykaz skrótów

- NPs – nanopierwiastki
- ROS – (z ang. *reactive oxygen species*) reaktywne formy tlenu
- Cu – miedź koloidalna
- CuO-NP – nanopierwiastki tlenku miedzi
- Cu-NPs – nanopierwiastki miedzi
- CuSO<sub>4</sub>·5 H<sub>2</sub>O – pentahydrat siarczanu (II) miedzi
- GPX/*gpx* – peroksydaza glutationowa
- CYP1A/*cyp1a* – podjednostka 1 cytochromu P450
- HSP70/*hsp70* – białka szoku cieplnego
- CAT/*cat* - katalaza
- SOD/*sod* – dysmutaza ponadtlenkowa
- FAO – (z ang. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa



Lista pozostałych publikacji stanowiących dorobek naukowy:

1. Skuza, L., Gastineau, R. & Sielska, A. The complete chloroplast genome of *Secale sylvestre* (*Poaceae: Triticeae*). *J Appl Genetics* 63, 115–117 (2022). <https://doi.org/10.1007/s13353-021-00656-x>; 100pkt., IF: 2.653

IF: 2.0

MNiSW: 140 pkt.

2. Sielska, A., Kowalska-Górska, M., Skuza, L. (2021). Wpływ nanopierwiastków miedzi na ekspresję peroksydazy glutationowej u karpia (*Cyprinus carpio*). W: *Młodzi naukowcy 2.0 Tom I*, ISBN: 9788395933684;

MNiSW: 80 pkt.

3. Sielska, A., Kowalska-Górska, M., Skuza, L. (2022). Wpływ nanopierwiastków tlenku miedzi (CuONP) na ekspresję peroksydazy glutationowej (*gpx*) u wylęgu pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*) W: *Młodzi naukowcy 2.0 Tom II*, ISBN: 978-83-966582-4-1.

MNiSW: 80 pkt.

4. Filip E., Sielska A., Czarniecka N. (2023). *Mikroskopia w badaniach biologicznych*. Szczecin : Volumina.pl Sp. z o.o, ISBN: 978-83-7867-857-1.

MNiSW: 80 pkt.

5. Czarniecka N., Sielska A., Filip E., (2024). *Zastosowanie metod molekularnych do identyfikacji glutenu w żywności przetworzonej w celu wykrywania fałszerstw żywności / W: Nauki penalne : synergia teorii i praktyki, redakcja Alicja Danielewska, Kinga Kalbarczyk, Lublin, Wydawnictwo Naukowe Tygiel Sp. z o.o.*

MNiSW: 80 pkt.

6. Kulasza, M., Sielska, A., Szenejko, M., Soroka M., Skuza L. (2024). Effects of copper, and aluminium in ionic, and nanoparticulate form on growth rate and gene expression of *Setaria italica* seedlings. *Scientific Reports*, 14, 15897 <https://doi.org/10.1038/s41598-024-66921-1>.

IF: 3.8

MNiSW: 140 pkt.



## 1. Wstęp

### 1.1. Opis gatunków wykorzystanych do badań

Do badań zawartych w niniejszej rozprawie doktorskiej wybrano gatunki ryb, które należą do jednych z najczęściej hodowanych (FAO, 2022; Kibenge, 2022; Takeuchi i wsp., 2002), głównie do produkcji żywności, ale również w akwarystyce ze względów estetycznych np. *Cyprinus carpio* var. *Koi* (Yang i wsp., 2022).

Karp zwyczajny (*Cyprinus carpio*) należy do rodziny karpiowatych (*Cyprinidae*), będącej największą rodziną ryb słodkowodnych (Billard, 1999; Richards, 2011). Jest gatunkiem wszystkożernym, zamieszkującym ciepłe zbiorniki wód słodkich, m.in. jeziora, płytkie zbiorniki (Peteri, 2005). Występuje naturalnie w Europie i Azji, jednakże w wyniku czynników antropogenicznych, zasięg jego występowania obejmuje cały świat (Billard, 1999). W krajach takich jak Australia jest postrzegany jako gatunek inwazyjny (Koehn, 2004; Stuart i wsp., 2021).

Zarówno pstrąg tęczowy (*Oncorhynchus mykiss*), jak i troć wędrowną (*Salmo trutta m. trutta*), należą do rodziny łososiowatych (*Salmonidae*). *O. mykiss*, jak i *S. trutta* obejmujących gatunki anadromiczne (forma wędrowna) – migrujące jako osobniki młodociane do zbiorników wód słonych (morza, oceany), a powracające na tarło do wód słodkich oraz nieanadromiczne (forma osiadła) (Mills, 2001). U *O. mykiss* występują zarówno formy migrujące (z ang. *steelhead trout*), jak i przebywające i rozmnażające się w wodach słodkich (Berejikian i wsp., 2014). *O. mykiss* jest gatunkiem natywnym na obszarach północnej części Pacyfiku (od Ameryki Północnej oraz Alaski aż po Azję), jednakże został introdukowany na inne kontynenty, takie jak Europa (Colihueque i wsp., 2019; [www.nps.gov/shen/learn/nature/rainbow-trout.htm](http://www.nps.gov/shen/learn/nature/rainbow-trout.htm)). W przypadku *S. trutta* do formy anadromicznej należy gatunek troci wędrownej (*Salmo trutta m. trutta*; z ang. *sea trout*), natomiast osiadłej – pstrąg potokowy (*Salmo trutta m. fario*) lub jeziorny (*Salmo trutta m. lacustris*) (Kalayci i wsp., 2018). Siedliska troci wędrownej obejmują zbiorniki wodne, takie jak ocean Atlantycki, morze Północne oraz morze Bałtyckie (Hansen i Mensberg, 1998; [www.fishbase.se/summary/salmo-trutta.html](http://www.fishbase.se/summary/salmo-trutta.html)). Zarówno *O. mykiss*, jak i *S. trutta* są gatunkami drapieżnymi, preferującymi wody chłodne.

Uważa się, że łososiowate (*Salmonidae*) są wyjątkowo wrażliwe na zmiany środowiskowe, takie jak ocieplenie klimatu czy obecność zanieczyszczeń, wpływając na ich wzrost i rozwój (Solokas i wsp., 2023; Williams i wsp., 2015). Podobnie stwierdzono, że *C. caprio* również wykazują wysoką podatność na obecność toksyn i zanieczyszczeń w środowisku (Kakakhel i wsp., 2021; Senze i wsp., 2024). Te cechy sprawiają, że gatunki te są dobrymi organizmami modelowymi w badaniach z zakresu ekotoksykologii. Ponadto ze względu na powszechność hodowli *C. carpio*, *S. trutta* oraz *O. mykiss* szczególnie w celach konsumpcyjnych i w produkcji żywności, istnieje konieczność badań dotyczących wpływu potencjalnych zanieczyszczeń środowiska i toksyn na te gatunki. Dane literaturowe sugerują również, że *C. carpio*, jak i *O. mykiss* mogą być wykorzystywane w badaniach dotyczących detekcji zanieczyszczeń metalami ciężkimi w środowisku wodnym (łuski, plemniki, poziom metalotioneiny) (Chan, 1995; Kollár i wsp., 2018; Łuszczek-Trojnar i Nowacki, 2021).

Stwierdzono, że zarówno aktywność GPX, SOD i CAT może być wykorzystana jako biomarkery zanieczyszczeń w środowisku wodnym (Farombi i wsp., 2007; Hamed i wsp., 2003; Pedrajas i wsp., 1995). Pomiar ekspresji genu *hsp70* u ryb pozwala na ocenę jakości wody, a także obecności zanieczyszczeń w akwenach (Rangaswamy i wsp., 2024). Ponadto, Hardilová i wsp. (2015), na podstawie przeprowadzonych na liniach komórkowych NIH-3T3 oraz L929 dowiedli, że aktywność HSP70 może posłużyć jako marker wskazujący na indukowany przez nanopierwiastki stres. CYP1A stanowi również dobry biomarker w ocenie toksyczności obecnych w środowisku zanieczyszczeń chemicznych wobec ryb (Goksøyr, 1995; Kim i wsp., 2013; Woo i wsp., 2023). Wśród badanych genów CYP, Cortés-Miranda i wsp. (2024) wytypowali m.in. *cyp1a* jako marker zanieczyszczeń u ryb, które poddawane są długotrwałej ekspozycji.

## 1.2. Nanopierwiastki miedzi

Definicja nanomateriałów zawarta jest w Zaleceniu Komisji UE z Dnia 10 Czerwca 2022 r. Dotyczącego Definicji Nanomateriałów. „Nanomateriał” oznacza naturalny, powstały przypadkowo lub wytworzony materiał składający się z cząstek w stanie stałym, które występują albo samodzielnie, albo jako możliwe do zidentyfikowania cząstki składowe w agregatach lub aglomeratach, i w którym co najmniej 50 % takich

cząstek w liczbowym rozkładzie wielkości spełnia co najmniej jeden z poniższych warunków:

- a) co najmniej jeden zewnętrzny wymiar cząstki mieści się w zakresie 1–100 nm;
- b) cząstka ma wydłużony kształt, taki jak pręt, włókno lub rurka, gdzie dwa wymiary zewnętrzne są mniejsze niż 1 nm, a drugi wymiar jest większy niż 100 nm;
- c) cząstka ma kształt płytki, gdzie jeden wymiar zewnętrzny jest mniejszy niż 1 nm, a pozostałe wymiary są większe niż 100 nm.”. Stanowi ona poszerzoną definicję określoną w Zaleceniu Komisji UE z Dnia 18 Października 2011 r. Dotyczącego Definicji Nanomateriałów, 2011), która jedynie odnosi się do rozmiarów cząsteczek. Nanopierwiastki należą do nanomateriałów, jednakże istnieje rozdzielność definicji pomiędzy nimi. Według Międzynarodowej Organizacji Normalizacyjnej (z ang. *The International Organization for Standardization*), „nanomateriały posiadają jedną lub więcej zewnętrznych wymiarów w nanoskali lub posiadają wewnętrzną strukturę albo strukturę powierzchni w nanoskali”, zaś „nanopierwiastki, posiadają trzy wymiary zewnętrzne znajdują się w nanoskali” (ISO 80004-1: 2023 (E)).

Nanomateriały, w tym nanopierwiastki mogą powstawać w sposób naturalny lub w wyniku działań natury antropologicznej – syntetycznie, otrzymywane za pomocą metod inżynierskich, syntez chemicznych, a także za pomocą układów biologicznych (Buzea i wsp., 2007; Garibo i wsp., 2020). Nanomateriały, jak i nanopierwiastki, oprócz naturalnie występujących i syntetycznych, klasyfikuje się na więcej grup (Jeevanandam i wsp., 2018; Khan i wsp., 2019): oparte na związkach węgla (nanorurki węglowe, grafen), organiczne (oparte na cząsteczkach organicznych, a także polimery), a także nieorganiczne, do których mogą należeć nanokompozyty, nanopierwiastki niemetali oraz metali (nanopierwiastki srebra, złota, miedzi). Obecne w całym środowisku nanopierwiastki, np. srebra, związków żelaza, magnetyt, są składnikami budulcowymi wielu struktur organizmów żywych, m. in. pancerzyków owadów (chityna), kości zwierząt, a nawet mogą być syntetyzowane przez mikroorganizmy (Asmathunisha i Kathiresan, 2013; Sharma i wsp., 2015). Innymi źródłami naturalnie powstałych nanopierwiastków mogą być pustynie, a także takie zjawiska jak erupcje wulkaniczne czy pożary (Buzea i wsp., 2007; Strambeanu i wsp., 2015).

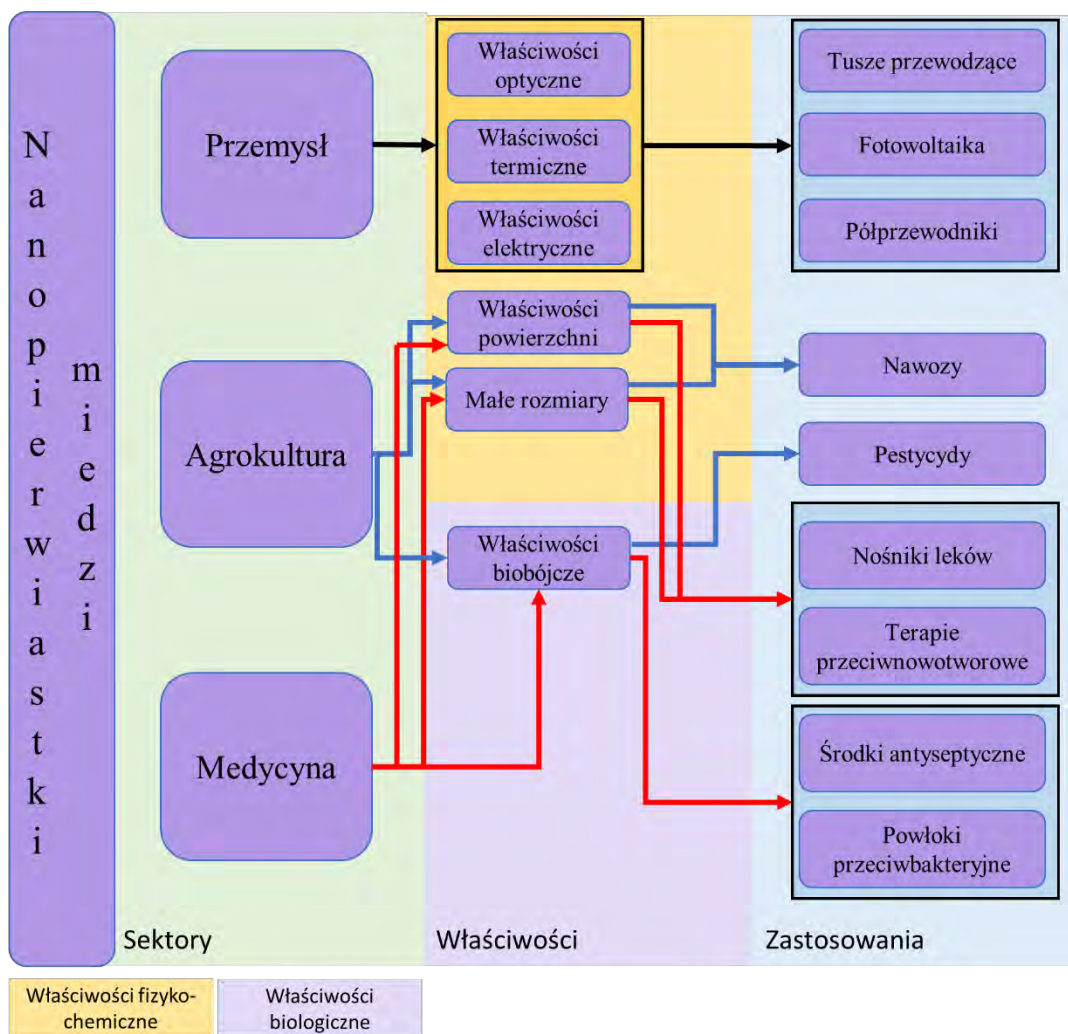
Syntetyczne nanopierwiastki (ENPs; z ang. *engineered nanoparticles*) to powstałe na drodze syntez chemicznych lub za pomocą układów biologicznych cząsteczki.

Zazwyczaj należą do nich nanopierwiastki metali, a także nanomateriały, do których należą nanokompozyty czy rurki węglowe (Jeevanandam i wsp., 2018). ENPs wykorzystywane są do produkcji, m. in. tworzyw sztucznych, powłok pokrywających tekstylia, nawozów czy produktów medycznych.

Nanopierwiastki, oprócz małych rozmiarów, charakteryzują się różnorodnymi kształtami. Ponadto, nanopierwiastki mogą tworzyć struktury, takie jak nanorurki, micelle, a także do ich powierzchni mogą być przyłączone inne cząsteczki, m.in. aminokwasy, lipidy, cukry czy grupy chemiczne (Qin i wsp., 2017). Te cechy, nadają im nieobecne w przypadku innych form metali ciężkich właściwości fizyko-chemiczne oraz biologiczne (Gavilán i wsp., 2017; Inam i wsp., 2019). Dzięki temu, syntetyczne nanopierwiastki, w szczególności powstałe na drodze tzw. „zielonej” syntezy, stanowią atrakcyjną, potencjalną alternatywę do stosowanych, np. w przemyśle metali ciężkich, które obecnie zazwyczaj postrzegane są jako zanieczyszczenia środowiska, wykazujące silne toksyczne działanie na organizmy żywe (Ali i wsp., 2021; Pandey i Madhuri, 2014).

Nanopierwiastki miedzi (Cu-NPs) ze względu na swoje właściwości, mogą być stosowane w wielu sektorach przemysłu (rys. 1). Wykazując wzmożone właściwości optyczne, nadające potencjał tych NPs w fotokatalizie, fotowoltaice czy jako składnik tuszy przewodzących (Alhajj i wsp., 2023; Dang i wsp., 2011; Rakshit i wsp., 2023). Ponadto, nanokompozyty zawierające nanopierwiastki miedzi charakteryzują się wysokim przewodnictwem termicznym oraz elektrycznym (Muhammed Ajmal i wsp., 2021). Wysokie właściwości zarówno optyczne, termiczne jak i elektryczne sprawiają, że Cu-NPs wykazują ogromny potencjał jako półprzewodniki (Hossain i wsp., 2023). Nanopierwiastki znajdują również zastosowanie w agrokulturze, m.in. jako składnik nawozów (Mustafa i wsp., 2024; Rashid i wsp., 2023) czy pestycydów (El-Saadony i wsp., 2020; Rahman i wsp., 2022). Jednakże najbardziej pożądaną cechą Cu-NPs są ich nadzwyczajne właściwości biobójcze, dlatego też przede wszystkim znajdują zastosowanie w medycynie. Wykazano, że nanopierwiastki miedzi przejawiają silne, specyficzne do szczepu działanie bakteriobójcze, często zbliżone do nanopierwiastków srebra w stosunku do szczepów bakterii, takich jak *Staphylococcus aureus* (Raja i wsp., 2023; Zia i wsp., 2018). Vasiliev i wsp. (2023) natomiast, donieśli o synergistycznym działaniu tych nanopierwiastków. W związku z tym nanopierwiastki miedzi mogą

służyć do pokrywania powierzchni tekstyliów, przede wszystkim szpitalnych, w celu nadania im właściwości biobójczych, zabezpieczając pacjentów i personel przed infekcjami (Ali i wsp., 2023). Ponadto, nanopierwiastki miedzi przejawiają wysoką aktywność w stosunku do komórek nowotworowych, ale również jako nośnik leków, stanowiąc potencjał w terapiach przeciwnowotworowych (Al-zharani i wsp., 2021; Ghasemi i wsp., 2023; Sriram i wsp., 2017).



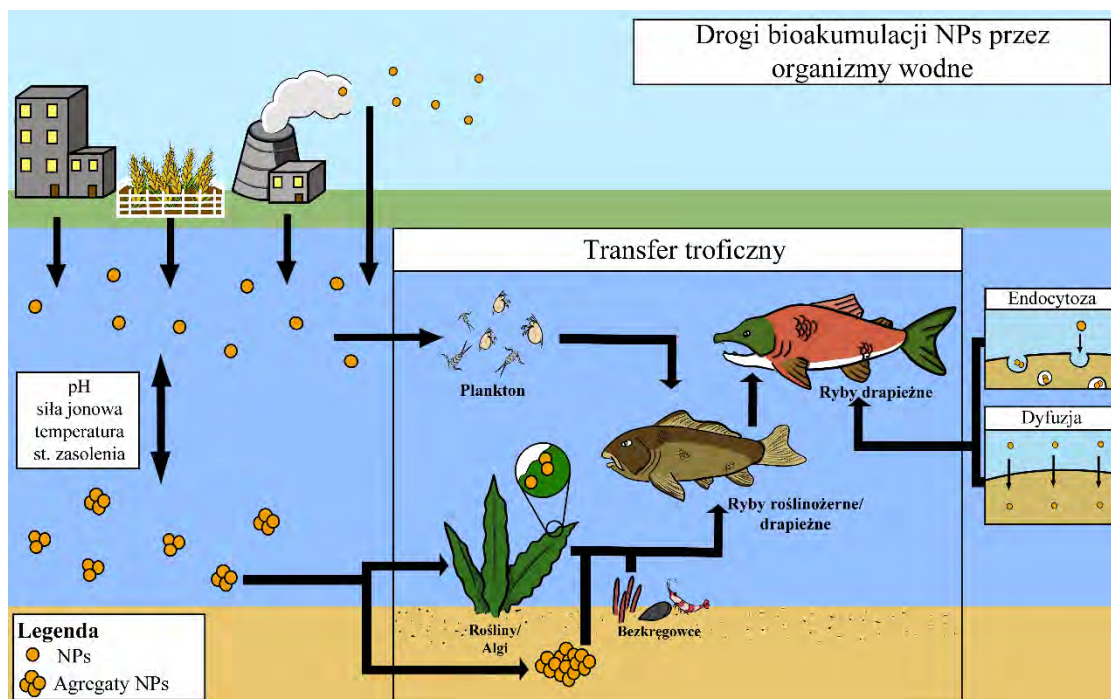
**Rysunek 1** Wybrane właściwości Cu-NPs i ich potencjalne zastosowania. Opracowano na podstawie: Alhajj i wsp., 2023; A. Ali i wsp., 2023; Dang i wsp., 2011; El-Saadony i wsp., 2020; Ghasemi i wsp., 2023; Hossain i wsp., 2023; Rakshit i wsp., 2023; Rashid i wsp., 2023; Vasiliev i wsp., 2023.

### 1.3. Źródła nanopierwiastków miedzi oraz ich interakcje ze środowiskiem wodnym.

Wysoki potencjał Cu-NPs i związane z tym liczne zastosowania przyczyniły się do ich rozpowszechnienia i wzrostu produkcji. Produkty zawierające NPs obecne są w prawie każdej przestrzeni człowieka. Problem stanowią jednak nanopierwiastki uwolnione w sposób niekontrolowany do środowiska, które w takiej formie zaliczane są do zanieczyszczeń (Ghangrekar i Chatterjee, 2018; Malakar i Snow, 2020). Ich źródłem są odpady przemysłowe, gospodarcze, medyczne, a także pochodzące z produktów z gospodarstw domowych (Domercq i wsp., 2018). NPs występujące w różnorodnych formach, takich jak aerozole, koloidy, cząstki stałe czy będące składnikami roztworów przedostają się do wszystkich sfer środowiska (powietrza, ciał wodnych, gleby) wieloma drogami, takimi jak ścieki, spływy z pól uprawnych, emisje fabryk (Akalin, 2021; Domercq i wsp., 2018). Ostatecznie wszystkie zanieczyszczenia związane z NPs trafiają do ostatecznego akceptora, jakim jest środowisko wodne (Öztürk, 2023; Yalsuyi i Vajargah, 2017). Obecne w środowisku wodnym nanopierwiastki mogą ulegać różnorodnym reakcjom, a także wchodzić w interakcje z zawartymi w nim cząsteczkami, materią organiczną i nieorganiczną, a nawet organizmami. Tierney i Pyle (2024) wnieśli obawę, że obecność w środowisku wodnym zanieczyszczeń w postaci metali i ich nanopierwiastków może wpłynąć negatywnie na łososiowate, m.in. poprzez zaburzenia sensoryczne (percepcja bodźców chemicznych) przyczyniające się do nieprawidłowych zachowań migracyjnych. Właściwości samych nanopierwiastków (np. kształt i wielkość, ładunek, obecność liganda) w połączeniu z czynnikami środowiskowymi, takimi jak temperatura, stopień zasolenia, twardość wody, pH, sprawiają, że nanopierwiastki w środowisku wodnym mogą ulegać interakcjom: biologicznym (biodegradacja, oddziaływanie z materią organiczną, adsorpcja), chemicznym (uwalnianie jonów, sulfidacja), bądź fizycznym (agregacja, adsorpcja) (Arenas-Lago i wsp., 2019; Abbas i wsp., 2020; Bathi i wsp., 2021). W ten sposób, w zbiornikach wodnych, nanopierwiastki w różnych formach (agregaty, jony, kompleksy) są powszechnie obecne w toni wodnej, na jej powierzchni lub osadzone w osadach dennych (Klaine i wsp., 2008). Zachowanie nanopierwiastków różni się pomiędzy wodami słodkimi a słonymi. Conway i wsp. (2015) donieśli, że w obecności

jonów, takich jak jony fosforanowe, chlorkowe czy siarczanowe (wody słone), Cu-NPs mogą tworzyć nierozpuszczalne kompleksy, również z materią organiczną. Odnotowano również, że wraz ze wzrostem pH zwiększa się tendencja Cu-NPs do tworzenia aglomeratów (Krzyżewska i wsp., 2016). Xiao i wsp. (2018) w badaniach stwierdzili, że zmiany w parametrach chemicznych wody wpływają na toksyczność wobec organizmów wodnych, jakim był badany organizm modelowy – *Daphnia magna*.

Następstwem obecności nanopierwiastków w środowisku jest bioakumulacja przez organizmy żywe, która może odbywać się drogami bezpośrednimi oraz pośrednimi (rys. 2). Drogą bezpośrednią Cu-NPs przedostają się do organizmów poprzez endocytozę oraz, gdy występują w postaci jonów lub bardzo małych cząsteczek, dyfuzję przez skrzela (Baker i wsp., 2014). Potwierdzono, że wielkość cząsteczek, a także obecność na ich powierzchni liganda, ma kluczowy wpływ na zdolność NPs do przedostawania się (internalizacji) do wnętrza komórek drogami endocytozy czy pinocytozy, a także oddziaływania z nimi i całym organizmem (Shang i wsp., 2014). W sposób pośredni, Cu-NPs ulegają bioakumulacji poprzez tzw. transfer troficzny (Wu i wsp., 2017). Gdy nanopierwiastki tworzą agregaty, w wyniku sedymentacji mogą opadać na dno lub osadzać się w osadach dennych, w których żerują organizmy czy na powierzchni roślin, którymi odżywiają się, m.in. gatunki roślinożerne. Mogą być również pobierane i akumulowane przez algi czy bezkręgowce (Arratia i wsp., 2019; Hanna i wsp., 2014; Perreault i wsp., 2012; Wan i wsp., 2018). Cu-NPs mogą dalej zostać zakumulowane przez organizmy na wyższym stopniu troficznym, w tym również człowieka (Mahanta i Kaushik, 2023). Yu i wsp. (2022) zaobserwowali, że wchłanianie Cu-NPs u organizmów wodnych odbywało się głównie drogą pokarmową, natomiast Wu i wsp. (2017) sugerują, że droga bezpośrednia w połączeniu z pośrednią mogą wpływać na toksyczność tych nanopierwiastków.



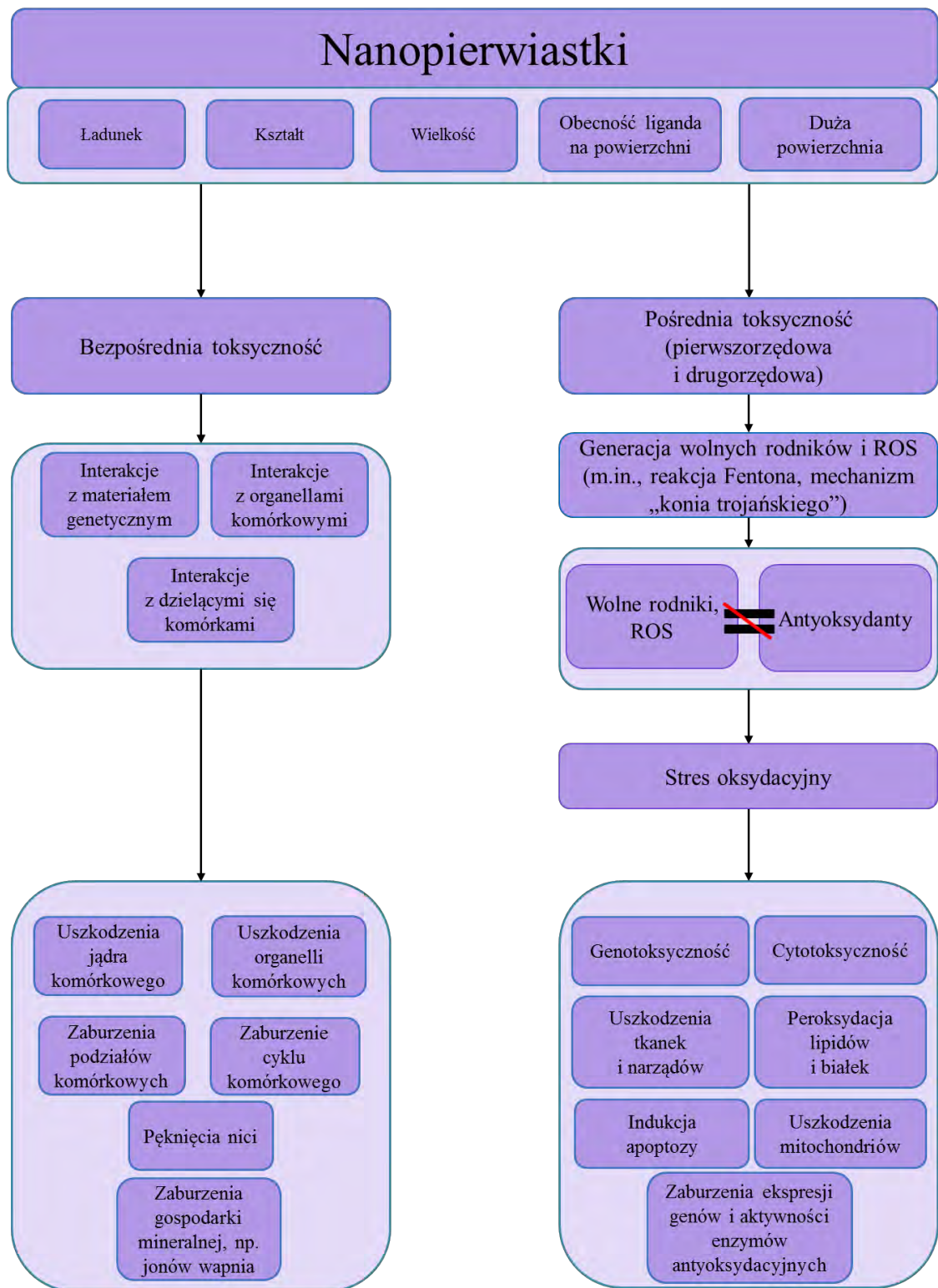
**Rysunek 2** Drogi bioakumulacji nanopierwiastków miedzi przez organizmy wodne. Opracowane na podstawie: (Abbas i wsp., 2020; Arratia i wsp., 2019; Baker i wsp., 2014; Conway i wsp., 2015; Hanna i wsp., 2014; Klaine i wsp., 2008; Mahanta i Kaushik, 2023; Vale i wsp., 2016).

#### 1.4. Mechanizmy toksyczności nanopierwiastków miedzi.

Nadające im tak pożądane właściwości biologiczne i fizyko-chemiczne cechy strukturalne nanopierwiastków, są również źródłem ich toksyczności (Shin i wsp., 2015; rys. 3). Toksyczność nanopierwiastków miedzi oraz innych nanopierwiastków może być indukowana w sposób pośredni, jak i sposób bezpośredniego kontaktu i oddziaływania z komórkami, materiałem genetycznym czy narządami organizmu, prowadząc do ich uszkodzenia (Shang i wsp., 2014). Jednym z głównych mechanizmów toksyczności Cu-NPs wywołujących negatywne skutki u organizmów jest indukcja stresu oksydacyjnego (Manke i wsp., 2013; Yang i wsp., 2009). Naz i wsp. (2020) sugerują, że nanopierwiastki wywołują toksyczne efekty zarówno w sposób pośredni, poprzez indukcję komórkowego systemu redoks, lub w sposób bezpośredni, gdzie oba mechanizmy prowadzą do produkcji reaktywnych form tlenu (RFT, bądź ROS (z ang. *Reactive Oxygen Species*)), tym samym do stresu oksydacyjnego. Stres oksydacyjny rozumiany jest poprzez zaburzenie właściwych proporcji pomiędzy oksydantami, do których należą cząsteczki, takie jak wolne



rodniki, ROS, a antyoksydantami (cząsteczki, takie jak witamina C, enzymy antyoksydacyjne i związane ze stresem), przyczyniając się do uszkodzeń (Halliwell i Poulsen, 2006; Sies, 1986, 2000). Zaburzenie tej równowagi przyczynia się do nagromadzenia wolnych rodników w komórkach, w wyniku czego dochodzi do uszkodzeń organelli komórkowych, takich jak mitochondria (Kowaltowski i Vercesi, 1999). W skrajnych warunkach, stężenie wolnych rodników może znacznie przekroczyć zdolność mechanizmów antyoksydacyjnych do detoksykacji (Abdelazeim i wsp., 2020). Czynniki te przyczyniają się do indukcji apoptozy.



**Rysunek 3** Mechanizmy toksyczności nanopierwiastków metali. Opracowano na podstawie: Egbuna i wsp., 2021; Hsiao i wsp., 2015; Kessler i wsp., 2022; Naz i wsp., 2020; Shang i wsp., 2014; Shin i wsp., 2015.

Proponowanych jest kilka modeli indukcji stresu oksydacyjnego przez nanopierwiastki miedzi (rys. 4). Stres oksydacyjny może indukować swoją toksyczność dwiema drogami: bezpośrednio poprzez generację dużej ilości ROS lub pośrednio poprzez inhibicję enzymów antyoksydacyjnych, takich jak peroksydaza glutationowa, katalaza, poprzez przeciążenie ich zdolności ochronnych (Abdelazeim i wsp., 2020; Manke i wsp., 2013). Kodali i Thrall (2015) sugerują również, że generacja wolnych rodników przez nanomateriały zachodzi poprzez modyfikację metabolizmu komórkowego i ekspresji genów, gdzie najbardziej powszechnym mechanizmem jest zaburzenie procesu oddychania komórkowego zachodzącego w mitochondriach. Generacja wolnych rodników i ROS przez nanopierwiastki miedzi może również odbywać się poprzez tzw. „mechanizm konia trojańskiego” (z ang. *trojan horse mechanism*), który znajduje również potencjalne zastosowanie w medycynie, w terapiach przeciwnowotworowych (Moschini i wsp., 2023). Mechanizm ten wykorzystuje właściwości nanopierwiastków, w tym miedzi, takie jak małe rozmiary czy struktura cząsteczek (Yih i Al-Fandi, 2006; Zhu i wsp., 2015). Nanopierwiastki miedzi w tym modelu odgrywają rolę nośników cząsteczek, takich jak jony, które wraz z Cu-NPs przedostają się do wnętrza komórek poprzez szlak endosomalno-lizosomalny (Gupta i wsp., 2022; Moschini i wsp., 2023). Przedostając się w ten sposób do lizosomów, pod wpływem niskiego pH, Cu-NPs ulegają rozpuszczeniu, przyczyniając się do uwolnienia dużej ilości jonów metali, w wyniku czego dochodzi do generacji wolnych rodników (Strauch i wsp., 2020; Studer i wsp., 2010).

Innym mechanizmem indukcji stresu oksydacyjnego jest reakcja Fentona, która może być również powiązana z mechanizmem konia trojańskiego, wykorzystująca obecność uwolnionych za pomocą tego mechanizmu dużej ilości jonów (Kessler i wsp., 2022; Strauch i wsp., 2020). Reakcja Fentona, której powszechnie ulegają jony żelaza (Sadowska-Bartosz et al., 2014), mogą również ulegać metale, takie jak miedź (reakcja typu Fenton) (Kessler i wsp., 2022; Ramos-Zúñiga i wsp., 2023). Jest ona dwuetapową reakcją, podczas której dochodzi do utlenienia  $\text{Cu}^+$  w obecności nadtlenu wodoru ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), w wyniku czego dochodzi do powstania jonu  $\text{Cu}^{2+}$ , anionu wodorotlenkowego oraz wysoko reaktywnego rodnika hydroksylowego. W drugim etapie zaś, dochodzi do reakcji Habera-Weissa (miedź jest redukowana w obecności anionu ponadtlenkowego

i nadtlenu wodoru), w wyniku której może ponownie zajść reakcja Fentona (Kessler i wsp., 2022; Pohanka, 2019).

#### 1.5. Oddziaływanie nanopierwiastków miedzi na organizmy wodne.

Istnieje wiele danych literaturowych opisujących toksyczność nanopierwiastków miedzi obejmujących genotoksyczność, cytotoksyczność, immunotoksyczność, organotoksyczność wywołaną m.in. w wyniku stresu oksydacyjnego (tab.1). Jednak we wszystkich tych analizach, w przypadku wybranych gatunków, badano wyłącznie organizmy dorosłe, najczęściej organy wewnętrzne.

Donosi się również o uszkodzeniach mitochondriów wywołanych działaniem nanopierwiastków miedzi. Braz-Mota i wsp. (2018) zaobserwowali w skrzelach *Apistogramma agassizii* wzrost poziomu ROS związany z wyciekami protonów z mitochondriów w wyniku ekspozycji na CuO-NPs w stężeniu  $3 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ , natomiast Wang i wsp. (2015) sugerują, że nanopierwiastki miedzi wywołują uszkodzenia błon mitochondrialnych oraz zwiększenie ich przepuszczalności, a także zmniejszają ich zdolność metaboliczną. Ponadto, w wyprowadzonej z *Poeciliopsis lucida* linii komórkowej PLHC-1 mitochondria charakteryzowały się nieprawidłowym kształtem, a także w ich strukturach obecne były cząsteczki nanopierwiastków miedzi (Hernández-Moreno i wsp., 2016).

Istotnym negatywnym skutkiem toksyczności nanopierwiastków miedzi u organizmów wodnych są zmiany histopatologiczne. U ryb, uszkodzenia obejmują narządy takie jak nerki, wątroba czy skrzela. Al-Bairuty i wsp. (2013) zaobserwowali u *Oncorhynchus mykiss* uszkodzenia w licznych narządach, takich jak wątroba, mózg, jelita, skrzela i mięśnie, przy czym ekspozycja na Cu-NPs wywołała większe uszkodzenia w jelitach, mózgu i wątrobie w porównaniu do  $\text{CuSO}_4$ . Uszkodzenia obejmowały m.in. obecność komórek nekrotycznych w badanych narządach, obrzęki skrzeli czy oddzielenie ścian naczyń krwionośnych od śródbłonka w wątrobie (Al-Bairuty i wsp., 2013). U osobników *Carassius auratus* oraz *Oreochromis niloticus*, ekspozycja na CuO-NPs wywołała m.in. rozrost (hiperplazję) komórek śródbłonka skrzeli w częściach szczytowych oraz w okolicach blaszek, deformację tkanki chrzęstnej, połączenie blaszek, natomiast w wątrobie – nekrozę, obecność jąder pyknotycznych obrzęki

i obecność komórek krwi wewnątrz tkanki (Badran i Hamed, 2024; Sadeghi i wsp., 2024). Ponadto, Badran i Hamed (2024) stwierdzili, że CuO-NPs wytworzone w wyniku syntezy chemicznej indukowały poważniejsze, zależne od dawki uszkodzenia niż nanopierwiastki wytworzone na drodze „zielonej” syntezy.

Oprócz wpływu Cu-NPs na dorosłe osobniki, ważne są również badania ich działania na osobniki młodociane, w różnych stadiach rozwojowych (m.in. wylęg, zarodek, ikra) (tab.1). Uważa się, że osobniki młode, w tym wylęg i formy zarodkowe są równie, jak nie bardziej, podatne na szkodliwe działanie obecnych w środowisku wodnym zanieczyszczeń (Gopalraaj i wsp., 2021).

**Tabela 1** Wybrane zaburzenia wywołane nanopierwiastkami miedzi u różnych gatunków ryb.

Zaburzenia	Nanopierwiastek	Stadium rozwojowe	Gatunek	Źródło
Genotoksyczność	Cu-NPs (nanoproszek)	wylęg	<i>Salmo trutta</i>	<b>Sielska i wsp., 2022</b>
	CuO-NPs			
	CuZnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> -NPs			
Immunotoksyczność	Cu-NPs	forma dorosła	<i>Takifugu fasciatus</i>	Wang i wsp., 2019
Hepatotoksyczność	Cu-NPs	forma dorosła	<i>Takifugu fasciatus</i>	Fu i wsp., 2021
Uszkodzenia skrzelii	CuO-NPs	forma dorosła	<i>Cyprinus carpio</i>	Forouhar Vajargah i wsp., 2018
	Cu-NPs		<i>Takifugu fasciatus</i>	Fu i wsp., 2021
Stres oksydacyjny	Cu-NPs	forma dorosła	<i>Takifugu fasciatus</i>	Wang i wsp., 2019
	CuO-NPs	wylęg	<i>Cyprinus carpio</i>	Naemi i wsp., 2020; <b>Sielska i wsp., 2024a</b>

			<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<b>Sielska i wsp., 2024b</b>
	Cu-NPs (forma koloidalna)		<i>Cyprinus carpio</i>	<b>Sielska i wsp., 2024a</b>
	Cu-NPs (nanoproszek)		<i>Cyprinus carpio</i>	
Indukcja apoptozy	Cu-NPs	forma dorosła	<i>Takifugu fasciatus</i>	Wang i wsp., 2019
	CuO-NPs	wylęg	<i>Cyprinus carpio</i>	Naemi i wsp., 2020
Obrzęki Wygięcie struny grzbietowej, Opóźniony wylęg, Bioakumulacja	CuO-NPs	zarodek	<i>Danio rerio</i>	Chao i wsp., 2021
		wylęg	<i>Cyprinus carpio</i>	Naemi i wsp., 2020

Stwierdzono, że ekspozycja na CuO-NPs może wpływać na mikrobiom wylęgu, wywołując schorzenia organizmu (Balasubramanian i wsp., 2024). Kosmówka pełni funkcję ochronną, zabezpieczając zarodek przed negatywnym działaniem środowiska zewnętrznego.

Nanopierwiastki i nanomateriały, takie jak kropki kwantowe, nanopierwiastki cynku, agregują i osadzają się na powierzchni kosmówki, często zaburzając jej integralność (Ozmen i wsp., 2023; Rotomskis i wsp., 2018). CuO-NPs mogą blokować również w niej pory, przyczyniając się m.in. do zaburzeń w wylęgu lub stresu oksydacyjnego (Aksakal i Ciltas, 2019). Ponadto Thit i wsp. (2017) donieśli, że osadzenie się CuO-NPs na powierzchni zarodków *Danio rerio* może powodować uwolnienie jonów miedzi do wnętrza. Badania Chao i wsp. (2021) potwierdziły korelację opóźnionego wylęgu u *Danio rerio* z uwalnianiem jonów miedzi z CuO-NPs w środowisku o niskiej sile jonowej, a także podali, że cząsteczki o mniejszej wielkości wykazują wyższą toksyczność wobec serca niż większe cząsteczki. Stwierdzono również, że w fazie pęcznienia, ikra jest szczególnie podatna na pobieranie substancji, w tym również

zanieczyszczeń w postaci nanopierwiastków, ze względu na większą przepuszczalność kosmówki (Dziewulska i wsp., 2021). Potwierdzono, że ekspozycja form młodocianych oraz zarodków na Cu-NPs, oprócz opóźnionego wylęgu, przyczynia się do zaburzeń związanych ze wzrostem i rozwojem wylęgu. U osobników *Danio rerio* poddanych ekspozycji na CuO-NPs zaobserwowano wygięcie struny grzbietowej, zmętnienie woreczka żółtkowego, a także uszkodzenia układu krążenia, jak obrzęk osierdzia oraz zaburzenia pracy serca (Chao i wsp., 2021; Hsiao i wsp., 2024). Ponadto, Ganesan i wsp. (2016) odnotowali również m.in. deformacje głowy i ogona, a także woreczka żółtkowego. U wylęgu indukowane są zmiany histopatologiczne, takie jak uszkodzenia wątroby czy skrzeli (Ostaszewska i wsp., 2016). U wylęgu *Cyprinus carpio* oraz jelitach form młodocianych *Epinephelus coioides* natomiast zaobserwowano zwiększoną częstotliwość apoptozy oraz aktywność ekspresję enzymów związanych ze stresem oksydacyjnym (Wang i wsp., 2015). W badaniach na formach młodocianych *Takifugu fasciatus* zbadano również, że apoptoza wynikająca z ekspozycji na nanopierwiastki miedzi może zachodzić poprzez szlak mitochondrialny zależny od kaspazy oraz szlak p53-Bax-Bcl2 (Wang i wsp., 2019).

## 2. Cel badań

Celem badań było potwierdzenie negatywnego wpływu nanopierwiastków miedzi na organizmy wodne, poprzez zbadanie:

- genotoksyczności wybranych nanopierwiastków miedzi na wylęg troci wędrowej (*Salmo trutta*), karpia zwyczajnego (*Cyprinus carpio*) i pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*),
- wpływu nanopierwiastków miedzi (nanoproszek miedzi, koloidalna miedź, nanopierwiastki tlenku miedzi) na ekspresję wybranych genów związanych ze stresem oksydacyjnym (peroksydaza glutationowa, cytochrom P450, białka szoku cieplnego HSP70, dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza) w wylęgu karpia zwyczajnego (*Cyprinus carpio*) i pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*),
- określenie wpływu tych nanopierwiastków na parametry biochemiczne w wylęgu *Cyprinus carpio*.



### 3. Materiały i metody

#### 3.1. Materiał badawczy

Jako materiał badawczy wykorzystano wylęg:

- troci wędrowej (*Salmo trutta*),
- karpia zwyczajnego (*Cyprinus carpio*),
- pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*).

Materiał biologiczny został przygotowany oraz udostępniony przez Instytut Hodowli Zwierząt, Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Zgodnie z Ustawą z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. 2015 poz. 266), do przeprowadzenia badań nie była konieczna zgoda komisji etycznej. Metoda otrzymywania badanego materiału była we wszystkich przypadkach identyczna. Po wymieszaniu z plemnikami, ikrę podzielono na grupy. W trakcie pęcznienia, inkubowano je przez trzy godziny w roztworach badanych nanopierwiastków, gdyż na tym etapie ikra jest najbardziej podatna na wchłanianie zanieczyszczeń i toksyn ze środowiska. Po zakończeniu etapu pęcznienia, ikrę przepłukano w wodzie, a następnie umieszczono w koszykach, w zamkniętym obiegu. Po uzyskaniu wylęgu, materiał przechowywano w alkoholu etylowym o stężeniu 95% do czasu analiz.

#### 3.2. Opis nanopierwiastków

Do badań genotoksyczności z wykorzystaniem wylęgu *Salmo trutta* wykorzystano nanoproszek Cu-NP (Sigma-Aldrich; <100 nm (BET)), CuO-NP (Sigma-Aldrich; <50 nm (TEM)), nanoproszek CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich; <100 nm (BET)) oraz nanoproszek CuZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich; <100 nm (BET)). *Cyprinus carpio* inkubowano w roztworze Cu-NP (Sigma-Aldrich; <100 nm (BET)), roztworze koloidalnej nano-miedzi (Cu) (Vitacoloids; 25ppm) oraz CuO-NP (Sigma-Aldrich; <50 nm (TEM)), natomiast *Oncorhynchus mykiss* – CuO-NP (Sigma-Aldrich; <50 nm (TEM)) i CuSO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich).

W celu przygotowania roztworów o pożądanym stężeniu, wykonano roztwór wyjściowy. Następnie rozcieńczono je metodą szeregu rozcieńczeń do badanych stężeń (roztwory poddawano sonikacji w łaźni wodnej):

- Cu-NP – 0,5 do 8,0 mg·dm<sup>-3</sup> oraz CuO-NPs, CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, CuZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> – 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 mg·dm<sup>-3</sup> do badań z wykorzystaniem *Salmo trutta*.
- Cu-NP, Cu oraz CuO-NP – 1,0 mg·dm<sup>-3</sup>.
- CuO-NP oraz CuSO<sub>4</sub> – 4-256 mg·dm<sup>-3</sup>.

Przed każdym użyciem, każdy z roztworów worteksowano.

### 3.3. Etapy badań

Pierwszy etap badań składał się z podstawowej oceny genotoksyczności nanopierwiastków miedzi w izolatach DNA z poddanej ekspozycji na nanopierwiastki miedzi ikry *Salmo trutta* za pomocą reakcji PCR. Następnie produkt, jakim był gen oksydazy cytochromowej (*colI*), uwidocznił na żelu agarozowym i zbadano pod kątem jego obecności, a także jakościowym i ilościowym.

Drugi etap składał się z analizy pomiaru ekspresji genów związanych ze stresem oksydacyjnym oraz aktywności enzymatycznej u gatunków *Cyprinus carpio* oraz *Oncorhynchus mykiss*. Ponadto dokonano analizy pomiaru aktywności enzymatycznej enzymów związanych ze stresem oksydacyjnym u wylęgu *C. carpio*. Osobniki *C. carpio* poddano ekspozycji na roztwór nanoproszku miedzi, koloidalnej miedzi oraz nanopierwiastków tlenku miedzi w stężeniu 1 mg·dm<sup>-3</sup>. Wylęg *O. mykiss* inkubowano natomiast w roztworach CuO-NP lub CuSO<sub>4</sub> w stężeniach w zakresie 4-256 mg·dm<sup>-3</sup>. Do badań wybrano:

- peroksydazę glutationową,
- podjednostkę 1A cytochromu P450,
- białko szoku cieplnego HSP70,
- dysmutazę ponadtlenkowa,
- katalazę.

### 3.4. Izolacja materiału genetycznego

DNA do badań wyizolowano z wylęgu *Salmo trutta* za pomocą zestawu DNeasy Blood & Tissue Kits (Qiagen) według protokołu dostarczonego przez producenta.

Z inkubowanego w roztworach nanopierwiastków miedzi wylęgu *Cyprinus carpio* oraz *Oncorhynchus mykiss* wyizolowano RNA za pomocą EXTRACTME Total RNA Kit (Blirt). Próbkę oczyszczono z DNA za pomocą DNA-azy I (Blirt).

Pomiary ilościowe i jakościowe zarówno DNA, RNA, jak i cDNA zostały wykonane za pomocą analizy spektrofotometrycznej, wykorzystując NanoDrop (ThermoFisher Scientific).

#### 3.4.1. Reakcja PCR i elektroforeza

Badanie genotoksyczności wykonano za pomocą technik PCR i elektroforetycznych. Materiał genetyczny wyizolowany z prób inkubowanych w Cu-NP rozdzielono na 0,8% żelu agarozowym.

W celu wykonania reakcji PCR, przygotowano mieszaniny reakcyjne zawierające bufor reakcyjny, dNTP, startery, polimerazę HotStarTaq DNA (ThermoFischer Scientific) oraz wyizolowany DNA. Otrzymane produkty rozdzielono na 1,5% żelu agarozowym.

Wyniki zwizualizowano za pomocą komory UV oraz przeanalizowano pod kątem jakościowym i ilościowym za pomocą spektrofotometru NanoDrop (ThermoFischer Scientific).

#### 3.4.2. Real-Time PCR

Pomiar toksyczności związanej z indukcją stresu oksydacyjnego wybranych nanopierwiastków miedzi wykonano za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR). Przed wykonaniem reakcji, przeprowadzono odwrotną transkrypcję za pomocą zestawu RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific), uzyskując cDNA. Do reakcji wykorzystano będące w zestawie losowe heksamery.

Mieszanina reakcyjna dla każdej z prób (zarówno w badaniach ekspresji genów u *C. carpio*, jak i *O. mykiss*) zawierała 6.6 µl sterylnej wody destylowanej, 0.2 µl z każdej pary starterów, 2.0 µl HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (ROX) (SolisBiotec) oraz 1 µl

cDNA. Każdą z prób wykonano w trzech powtórzeniach technicznych. Po reakcji Real-Time PCR sprawdzono obecność produktów za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 2% żelu agarozowym. Długości produktów wraz z sekwencjami wykorzystanych starterów przedstawiono w tabeli 2.

Podczas badań dokonano pomiaru względnej ekspresji genów (ekspresja badanych genów znormalizowanych względem genów referencyjnych) związanych ze stresem oksydacyjnym (*gpx*, *cyp1a*, *hsp70*, *cat*, *sod*) metodą  $2^{-\Delta Ct}$ . Parametr FC (z ang. *fold change*) został obliczony za pomocą metody porównawczej Livaka (Livak i Schmittgen, 2001). Jako gen referencyjny w reakcji Real-Time PCR wykorzystano gen  $\beta$ -aktyny oraz czynnika elongacyjnego alfa (Fazelan i wsp., 2020; Zhang i wsp., 2016). Wydajność ekspresji genów referencyjnych wyznaczono poprzez przeprowadzenie reakcji Real-Time PCR dla szeregu rozcieńczeń prób kontrolnych (0,01, 0,1, 1, 100, 1000 ng/ $\mu$ l). Pomiar Real-Time PCR wykonano za pomocą termocyklera CFX96 Real-Time System (Biorad), a wyniki w postaci danych liczbowych (wartości Ct) zwizualizowano za pomocą programu CFX Maestro (Biorad).

**Tabela 2** Startery wykorzystane w badaniach

Starter	Sekwencje starterów (5'-3')	Temperatura przyłączenia	Długość produktu [pz]	Literatura
LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATA TTGG	50.0°C	700	Folmer i wsp., 1994
HC02198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAA AATCA	50.0°C		
cyp1a2F	CTTCCGCCATATTGTCGTATC	52.4°C	135	Scown i wsp., 2010
cyp1a2R	CCACCACCTGCCCAAAC	51.9°C		
hsp70F	CTGCTGCTGCTGGATGTG	52.6°C	25	Scown i wsp., 2010
hsp70R	GCTGGTTGTCGGAGTAAGTG	53.8°C		
sodF	TGAGCTGTCGGAAGCCATCAA G	56.7°C	150	Fazelan i wsp., 2020
sodR	TTGGTTCCCACATGCAGCAATC C	57.1°C		
catF	AGACGACACCCATCGCTGTTCG	58.6°C	120	Fazelan i wsp., 2020
catR	AAGGTCCCAGTTGCCCTCATCG	58.6°C		
gpxF	GCTCCATTCGCAGTATTC	48.0°C	50	Scown i wsp., 2010
gpxR	TCCTTCCCATTACATCC	48.0°C		
ef1aF	CTTCGTCCCAATTTCTG	44.6°C	100	Zhang i wsp., 2016
ef1aR	ACCGTTAGCATTACCCT	44.6°C		
bactinF	CCTGTATGCCAACACCGTGCTG	58.6°C	100	Fazelan i wsp., 2020
bactinR	CTTCATGGTGGAGGGAGCAAG G	58.6°C		

### 3.4.3. Analiza biochemiczna

Pomiary aktywności enzymatycznej GPX, CYP1A2, HSP70, CAT oraz SOD, a także stężenia nadtlenu wodoru ( $H_2O_2$ ) i anionorodnika ponadtlenkowego ( $O_2^{\cdot-}$ ) zostały przeprowadzone w Katedrze Fizjologii i Biochemii Instytutu Biologii Uniwersytetu Szczecińskiego. W celu uzyskania ekstraktów białkowych, w których dokonano pomiarów aktywności enzymatycznej, zawieszono w buforze osobniki (ok. 5 osobników na próbę) zhomogenizowano w ciekłym azocie za pomocą homogenizatora kulkowego, a zawartość białek w uzyskanych ekstraktach zmierzono za pomocą metody Bradforda (Bradford, 1976).

Aktywność enzymatyczną GPX zmierzono metodą spektrofotometryczną, za pomocą protokołu opracowanego przez Awasthi i wsp., 1975. Aktywność CYP1A2 i HSP70 natomiast, zmierzono za pomocą techniki Western Blot (Laemmli, 1970) poprzez pomiar intensywności uwidocznionych prążków za pomocą programu Fiji ImageJ (Schindelin i wsp., 2012). Wykorzystano również zestawy BioVision Fluorometric CYP1A2 kit (BioVision) oraz Heat Shock Protein Assay Kit (Fluorometric) (BioVision). Pomiar aktywności enzymatycznej SOD i CAT wykonano za pomocą metod spektrofotometrycznych (Giannopolitis i Ries, 1977; Rao i wsp., 1996), natomiast ich izoform (Cu/ZnSOD, FeSOD, CAT-1 i CAT-2), wykorzystując native-PAGE (Beauchamp i Fridovich, 1971; Woodbury i wsp., 1971).

Pomiary stężenia  $H_2O_2$  oraz  $O_2^{\cdot-}$  wykonano za pomocą metod spektrofotometrycznych (Misra i Fridovich, 1972; Velikova i wsp., 2000).

### 3.4.4. Analiza statystyczna

Analizy statystyczne pomiarów ekspresji genów i aktywności enzymatycznej dla prób wyizolowanych z *Cyprinus carpio* oraz *Oncorhynchus mykiss* dokonano za pomocą programu Statistica for Windows ver. 13.3 (TIBCO Software Inc.). Analiza statystyczna ekspresji genów i aktywności enzymatycznej *C. carpio* została wykonana w Katedrze Fizjologii i Biochemii Instytutu Biologii Uniwersytetu Szczecińskiego. Pomiar istotności pomiarów ekspresji genów sprawdzono za pomocą testu post-hoc Tukeya (HSD) (dla *C. carpio* jednoczynnikowa ANOVA, dla *O. mykiss* wieloczynnikowa ANOVA), natomiast

aktywności enzymatycznej – testu Duncana (test porównań wielokrotnych). Za poziom istotności przyjęto wartość  $p < 0.05$ .

#### 4. Omówienie publikacji stanowiących podstawę pracy doktorskiej

##### 4.1. Genotoksyczność nanopierwiastków miedzi u wylęgu *Salmo trutta*

Na podstawie artykułu naukowego:

**Sielska, A., Skuza, L., & Kowalska-Górska, M. (2022).** *The effects of silver and copper nanoparticles and selenium on Salmo trutta hatchlings. Ecohydrology, 15(7), e2453.* <https://doi.org/10.1002/eco.2453>.

Genotoksyczność jest jednym ze skutków negatywnego działania nanopierwiastków, również miedzi, której mechanizmy powszechnie podzielono na pierwszorzędową i drugorzędową genotoksyczność (Shukla i wsp., 2021). Nanopierwiastki miedzi na drodze genotoksyczności pierwszorzędowej mogą ją wywoływać w sposób pośredni, np. poprzez indukcję stresu oksydacyjnego. Genotoksyczność indukowana stresem oksydacyjnym związana jest m.in. z oksydacją par zasad, z czego głównie wyróżnia się powstawanie 7,8-dihydro-8-oksoguaniny (Núñez i wsp., 1999). Oprócz tego obserwowalne są pęknięcia nici, powstawanie wiązań krzyżowych, aberracje chromosomowe, prowadząc do mutacji (Núñez i wsp., 1999; Sies, 1986). Nanopierwiastki miedzi ze względu na swoje wysokie powinowactwo do cząsteczek o dużej zawartości elektronów, mogą również w sposób bezpośredni wchodzić w interakcję z materiałem genetycznym w jądrze komórkowym, prowadząc do m.in., degradacji DNA czy pęknięć nici (Magaye i wsp., 2012; Naz i wsp., 2020; Solorio-Rodriguez i wsp., 2024). U gatunków ryb, takich jak *Clarias gariepinus*, *Channa punctatus*, *Ctenopharyngodon idella* czy *Cyprinus carpio*, nanopierwiastki miedzi, takie jak CuO-NPs indukują powstawanie mikrojąder, a także uszkodzenia jądra komórkowego w komórkach erytrocytów czy skrzelach (Khan i wsp., 2019; Kumar i wsp., 2023; Nikdehghan i wsp., 2018; Ogunsuyi i wsp., 2019). Brak degradacji DNA zaobserwowano w przypadku izolatów otrzymanych z wylęgu *S. trutta* eksponowanego na Cu-NPs w stężeniach 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 oraz 8.0 mg·dm<sup>-3</sup> (Sielska i wsp., 2022). U *Oreochromis niloticus* eksponowanego na CuO-NPs natomiast, zaobserwowano fragmentację DNA hepatocytów we wszystkich badanych dawkach (Abdel-Khalek, 2015). Brak produktów PCR zaobserwowano w przypadku ekspozycji na Cu-NPs w każdej badanej dawce oraz nanopierwiastki związków miedzi (Cu, CuO,



CuZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), zależnie od dawki (Sielska i wsp., 2022). Naz i wsp. (2020) tłumaczy, że nanopierwiastki miedzi poprzez interakcję z materiałem genetycznym, może zaburzać proces replikacji, co potwierdzają uzyskane wyniki (Sielska i wsp., 2022). Gallo i wsp. (2018) również zaobserwowali zależną od dawki CuO-NPs fragmentację DNA w plemnikach *Paracentrotus lividus*. Uszkodzenia DNA obecne były również u *Hypophthalmichthys nobilis* eksponowanego na CuO-NPs (Aziz i wsp., 2022). (Auclair i wsp., 2023), natomiast wykazali u form *O. mykiss* eksponowanego na CuO-NPs uszkodzenia DNA, które skorelowane były z aktywnością COX.

#### 4.2. Wpływ nanopierwiastków miedzi na enzymy związane ze stresem oksydacyjnym

##### 4.2.1. Ekspresja genów oraz aktywność enzymatyczna u *Cyprinus carpio* i *Oncorhynchus mykiss*

Na podstawie artykułów naukowych:

**Sielska, A., Cembrowska-Lech, D., Kowalska-Górska, M., Czerniawski, R., Krepski, T., & Skuza, L. (2024).** *Effects of copper nanoparticles on oxidative stress genes and their enzyme activities in common carp (Cyprinus carpio).* *The European Zoological Journal*, 91(1), 354–365. <https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2332290>

oraz

**Sielska, A., Kowalska-Górska, M., Szućko-Kociuba, I., & Skuza, L. (2024).** *Comparison of the effects of copper oxide nanoparticles (CuO-NPs) and copper (II) sulfate on oxidative stress parameters in rainbow trout hatchlings (Oncorhynchus mykiss).* *The European Zoological Journal*, 91(2), 897–905. <https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2385820>.

Jednym z głównych mechanizmów toksyczności indukowanej przez nanopierwiastki miedzi jest stres oksydacyjny. W jego wyniku dochodzi do generacji dużej ilości ROS, takich jak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, co zaobserwowano u wylęgu *C. carpio* eksponowanego na działanie nanoproszku miedzi, koloidalnej miedzi oraz CuO-NPs (Sielska i wsp., 2024a). W celu ochrony przed negatywnymi skutkami działania wolnych rodników, w organizmie występują wyspecjalizowane mechanizmy ochronne. Pierwszą linią

obrony przed stresem oksydacyjnym są enzymy antyoksydacyjne, należące do tzw. „wymiataczy wolnych rodników” (z ang. *scavenging enzymes*): peroksydaza glutationowa (GPX), dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) oraz katalaza (CAT). GPX jest posiadającą liczne izoformy (zależnie od gatunku) rodziną selenoenzymów, występującą zarówno u zwierząt, jak i roślin (Margis i wsp., 2008). SOD natomiast jest rodziną, wśród której wyróżnia się cztery klasy: Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD oraz Ni-SOD (Arockiaraj i wsp., 2014; Fridovich, 1995). GPX i SOD są zlokalizowane głównie w cytozolu oraz mitochondriach (Finaud i wsp., 2006; Fridovich, 1995), a CAT ponadto również w peroksysomach (Nitta i wsp., 2020). Aktywność tych enzymów w odpowiedzi na stres oksydacyjny jest ściśle ze sobą powiązana. Na początku, powstałe endo- lub egzogennie anionorodniki ponadtlenkowe ulegają katalizowanej przez SOD reakcji dysmutacji, w wyniku której dochodzi do powstania nadtlenu wodoru ( $H_2O_2$ ) i cząsteczki tlenu. Następnie  $H_2O_2$  jest redukowany do wody i tlenu przez GPX wykorzystując glutation jako donor elektronów oraz bezpośrednio CAT (Birben i wsp., 2012; Davies, 2000; Limón-Pacheco i Gonsebatt, 2009). Uważa się, że GPX wykazuje większą wydajność, w przypadku wysokiego stężenia wolnych rodników w środowisku organizmu, podczas gdy CAT – w niższych stężeniach (Finaud i wsp., 2006). Spadek aktywności oraz ekspresji GPX zaobserwowano u wylęgu *C. carpio* (Sielska i wsp., 2024a), natomiast w linii komórkowej RTG-2 wyprowadzonej z gonad *Oncorhynchus mykiss*, po ekspozycji na dawkę  $12.5 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$  nastąpił wzrost ekspresji genów, takich jak *gpx1a*, *gpx4b*, *cat* oraz *sod2* (Çiçek, 2023). W formach młodocianych *Oreochromis niloticus*, zaobserwowano zależny od dawki wzrost ekspresji *sod*, *cat* oraz *gpx* (Abdel-Latif i wsp., 2021). Podobnie, wzrost ekspresji *gpx* zaobserwowano u wylęgu *Oncorhynchus mykiss* inkubowanego w CuO-NPs w dawkach  $4\text{-}256 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ , jednakże ekspresja *sod* była niższa w porównaniu do kontroli (Sielska i wsp., 2024b). U wylęgu *C. carpio* poddanego działaniu nanoproszku miedzi, koloidalnej miedzi i CuO-NPs w stężeniu  $1 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  zaobserwowano spadek aktywności CAT (Sielska i wsp., 2024a). Podobny spadek aktywności CAT zanotowano w przypadku dawek subletalnych Cu-NPs, ale także CuO-NPs w wątrobie tego samego gatunku (Noureen i wsp., 2018). U wylęgu *Dicentrarchus labrax* natomiast, aktywność CAT wzrosła po 24 godzinach w wyniku na ekspozycję na Cu-NPs w stężeniach  $0.1$  oraz  $1 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ , natomiast SOD – tylko

w stężeniu 1 mg·dm<sup>-3</sup> (Torrónteras i wsp., 2024). Jednakże w przeprowadzonych badaniach na wylęgu *C. carpio*, w tej dawce zaobserwowano spadek aktywności w przypadku wszystkich badanych nanopierwiastków (Sielska i wsp., 2024a). Wyniki te są zgodne z obserwacjami Canli i Canli (2020), w których aktywność CAT u *Oreochromis niloticus* w każdej badanej dawce CuO-NPs (tj. 1, 5, 25 mg·dm<sup>-3</sup>) spadła. Sugeruje to, że aktywność enzymów antyoksydacyjnych może być gatunkowo zależna. Aktywność enzymatyczna prawdopodobnie jest również zależna od narządu, co zauważył Nagai i wsp. (1999) w przypadku GPX u ryb, a także Villarreal i wsp. (2014) w swoich badaniach, w których aktywność SOD i CAT w wątrobie *Oreochromis mossambicus* w dawce 5 mg·dm<sup>-3</sup> spadła, a w skrzelach wzrosła. W badaniach Kumara i wsp. (2024) natomiast, aktywności CAT, SOD i GPX wzrosły w narządach *Pangasianodon hypophthalmus*, takich jak skrzela, wątroba, nerki. W skrzelach i wątrobie *Oreochromis niloticus* aktywność SOD i CAT spadły, a GPX wzrosły (Tunçsoy i wsp., 2017).

Innymi białkami związanymi z ochroną organizmu przed stresem oksydacyjnym są białka szoku cieplnego (HSP70). HSP70 należą do konserwatywnej rodziny białek, które w prawidłowych warunkach fizjologicznych, odpowiadają m.in. za utrzymanie homeostazy białek, np. prawidłowe fałdowanie czy degradacja białek, a także wykazują zwiększoną aktywność w odpowiedzi na bodźce stresowe związane z temperaturą (szok cieplny), stres oksydacyjny czy chemiczny (metale ciężkie) (Murphy, 2013; A. Yu i wsp., 2015). Uważa się, że u ryb, zmiany w aktywności HSP70 są szczególnie kluczowe, m.in. ze względu na ich wrażliwość podczas wzrostu i rozwoju zarodkowego i wylęgu na obecność stresorów środowiskowych, takich jak zmiany temperatury, obecność metali ciężkich (Basu i wsp., 2002; Yamashita i wsp., 2010), zapewniając im ochronę przed ich negatywnym działaniem (Iwama i wsp., 1999). Zwiększoną aktywność HSP70 zaobserwowano u licznych gatunków ryb, takich jak *Rutilus kutum*, *Oreochromis niloticus* czy *Carassius auratus* w wyniku ekspozycji na różne rodzaje nanopierwiastków, m.in. srebra, tlenku cynku, tlenku glinu (Harsij i wsp., 2021; Masouleh i wsp., 2017; Temiz i Kargin, 2022). Podobnie, wzrost ekspresji oraz aktywności HSP70 zaobserwowano zarówno u wylęgu *C. carpio* w wyniku ekspozycji na nanoproszek miedzi, koloidalną miedź i CuO-NPs, a także wylęgu *Oncorhynchus mykiss* we wszystkich badanych stężeniach (4-256 mg·dm<sup>-3</sup>),

wykazując najwyższą ekspresję spośród badanych genów (Sielska i wsp., 2024a; Sielska i wsp., 2024b). Podobne wyniki uzyskał Abdel-Latif i wsp. (2021), gdzie u *Oreochromis niloticus* wykryto również wzrost ekspresji tego genu. Zależny od dawki Cu-NPs wzrost ekspresji, jak i aktywności HSP70 obecny był również w jelitach form młodocianych *Epinephelus coioides* (Wang i wsp., 2015).

Enzymy cytochromu P450 (CYP) są superrodziną hemoprotein odpowiadających za metabolizm i detoksykację ksenobiotyków, poprzez katalizę utlenienia swoich substratów (substraty są specyficzne dla każdego cytochromu) w obecności czynnika redukującego (Halliwell i Gutteridge, 2015). U ryb zidentyfikowano 18 rodzin CYP, wśród których znajduje się rodzina CYP1, do której należą podrodziny CYP1A, CYP1B, CYP1C oraz CYP1D (Andleeb i wsp., 2023; Nelson, 2003). Jest niewiele danych literaturowych dotyczących badań zmian ekspresji genu *cyp1a* u organizmów wodnych pod wpływem ekspozycji na nanopierwiastki miedzi. Wzrost ekspresji *cyp1a* wykryto u wylęgu *Oncorhynchus mykiss* (Sielska i wsp., 2024b). Natomiast wzrost ekspresji oraz spadek aktywności enzymatycznej zaobserwowano u eksponowanego na wszystkie badane nanopierwiastki miedzi wylęgu *C. carpio* (Sielska i wsp., 2024a). Wzrost ekspresji był obecny w skrzelach i wątrobie *Oreochromis mossambicus* (Villarreal i wsp., 2014). Dane literaturowe donoszą również o wpływie innych nanopierwiastków metali na ekspresję i aktywność CYP1A. Scown i wsp. (2010) donieśli o znacznym wzroście ekspresji *cyp1a* w skrzelach form młodocianych *Oncorhynchus mykiss* eksponowanych na 10  $\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$  Ag-NPs, natomiast Mansour i wsp. (2021) u *Oreochromis niloticus* – wzrost zależny od dawki (3.31-26.50  $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ ). Zależnych od dawki zmian w ekspresji genów *gpx*, *cyp1a*, *hsp70* oraz *sod* nie zaobserwowano u wylęgu *Oncorhynchus mykiss* (Sielska i wsp., 2024b).

Wzrost aktywności i ekspresji enzymów antyoksydacyjnych jest związany z fizjologiczną reakcją organizmu na obecność ROS wytworzonych w wyniku indukowanego przez nanopierwiastki miedzi stresu oksydacyjnego. Spadek w aktywności enzymatycznej i ekspresji genów może być tłumaczony przeciążeniem mechanizmów antyoksydacyjnych nadmiernym stężeniem ROS. Noureen i wsp. (2018) sugeruje również, że zjawisko to wynika z inhibicji syntezy tych enzymów.

#### 4.2.2. Ekspresja genów u *Oncorhynchus mykiss* w porównaniu z siarczanem (VI) miedzi

Na podstawie artykułu naukowego:

**Sielska, A., Kowalska-Górska, M., Szućko-Kociuba, I., & Skuza, L. (2024).** *Comparison of the effects of copper oxide nanoparticles (CuO-NPs) and copper (II) sulfate on oxidative stress parameters in rainbow trout hatchlings (Oncorhynchus mykiss).* *The European Zoological Journal*, 91(2), 897–905. <https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2385820>

W badaniach nad toksycznością nanopierwiastków, w tym miedzi, często porównuje się ich negatywne skutki z metalami w formie jonowej, np.  $\text{CuCl}_2$  czy  $\text{CuSO}_4$  (Pereira i wsp., 2023; Yavaş i Gülsoy, 2024) Istnieją liczne dane literaturowe porównujące toksyczność nanopierwiastków miedzi z innym powszechnym zanieczyszczeniem środowiska wodnego, jakim jest siarczan (V) miedzi ( $\text{CuSO}_4$ ).  $\text{CuSO}_4$  jest stosowanym w akwakulturze algicydem, herbicydem i fungicydem (Tsai, 2016), stąd jego powszechna obecność w środowisku wodnym.  $\text{CuSO}_4$  jako związek o udokumentowanej toksyczności, jest dobrym parametrem porównawczym wobec toksyczności innych związków miedzi będących zanieczyszczeniem środowiska wodnego, jakimi są nanopierwiastki miedzi.

W wyniku badań, u wylęgu *O. mykiss* eksponowanego na  $\text{CuSO}_4$  ekspresję wyższą niż w przypadku  $\text{CuO-NPs}$  zaobserwowano dla *gpx*, *hsp70* oraz *sod* w stężeniach 8-96  $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ , a *cyp1a* - 4, 16, 96, 128  $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  (Sielska i wsp., 2024b). W przypadku  $\text{CuO-NPs}$  wyższą ekspresją charakteryzowały się *gpx* w stężeniach 128 i 256  $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ , *cyp1a* w stężeniach 8, 64, 128  $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  oraz *hsp70* w stężeniu 4  $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Sugeruje to wyższą toksyczność  $\text{CuSO}_4$  niż  $\text{CuO-NPs}$  wobec badanego organizmu. Kwestia czy  $\text{CuO-NPs}$  wywołują poważniejsze zaburzenia niż  $\text{CuSO}_4$  jest debatowana w wielu pozycjach literaturowych. Wang i wsp. (2015) na podstawie własnych badań wywnioskowali, że w jelitach *Epinephelus coioides* podobną toksyczność  $\text{CuO-NPs}$  i  $\text{CuSO}_4$  (ostrzejsza toksyczność  $\text{CuO-NPs}$ ), natomiast w badaniach z 2016, u tego samego gatunku zaobserwowali podobną toksyczność obu związków z wyższą ostrością  $\text{CuSO}_4$ , ale w hepatocytach (Wang i wsp., 2016). Sugeruje to, że toksyczność obu tych związków

jest tkankowo-zależna, co zauważyli również Al-Bairuty i wsp. (2013). W badaniach Wang i wsp. (2016) wykazano obniżoną ekspresję oraz aktywność Mn-SOD oraz Cu/Zn-SOD zarówno w przypadku ekspozycji na CuO-NPs, jak i CuSO<sub>4</sub>. Spadek ekspresji *sod* zaobserwowano u wylęgu *O. mykiss* w przypadku ekspozycji na wszystkie badane dawki CuO-NPs, ale wzrost ekspresji tego genu w przypadku na ekspozycję na CuSO<sub>4</sub> (Sielska i wsp., 2024b). W badaniach obejmujących m.in. analizy biochemiczne (m.in. pomiary aktywności Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATP-azy), parametrów hematologicznych czy pomiar poziomu jonów czy glutationu u *Oncorhynchus mykiss* zaobserwowano również podobny stopień toksyczności CuO-NPs oraz CuSO<sub>4</sub> (Shaw i wsp., 2012). Jednakże Isani i wsp. (2013) donieśli o wyższej indukcji uszkodzeń DNA u *O. mykiss* eksponowanego na CuSO<sub>4</sub> niż w przypadku CuO-NPs. Podobnie Soliman i wsp. (2021) również zaobserwowali większą szkodliwość CuSO<sub>4</sub>, wykazując u *Oreochromis niloticus* wyższą genotoksyczność i aktywność SOD i CAT niż w przypadku CuO-NPs w dawce 15 mg·dm<sup>-3</sup>.

Wszystkie przedstawione badania jednak ukazują, że pomimo stwierdzonej w wielu przypadkach większej szkodliwości CuSO<sub>4</sub>, CuO-NPs również charakteryzowały się pewnym stopniem toksyczności, indukując stres oksydacyjny, genotoksyczność i zaburzenia hematologiczne i histopatologiczne. Sugeruje to konieczność dalszych badań pod kątem negatywnych skutków nanopierwiastków miedzi oraz kontroli ich stężenia w środowisku wodnym. Do podobnej konkluzji doszli Thit i wsp. (2017) zaznaczając, że pomimo stwierdzonej przez nich mniejszej toksyczności CuO-NPs, wymagany jest stała kontrola stężenia tych nanopierwiastków w środowisku. Ponadto, oprócz konieczności ochrony zarodków ryb przed działaniem CuO-NPs, takich jak badany *Danio rerio*, Pereira i wsp. (2023) wskazali również na odmiennosc mechanizmów ekspozycji oraz toksyczności obu związków. Khan i wsp. (2024) podkreślają również, że nanopierwiastki, takie jak tlenek miedzi, srebra czy złota powinny być wykorzystywane wyłącznie w celach diagnostycznych i terapeutycznych w kontekście pełnego zrozumienia mechanizmów ich toksyczności.

## 5. Stwierdzenia i wnioski

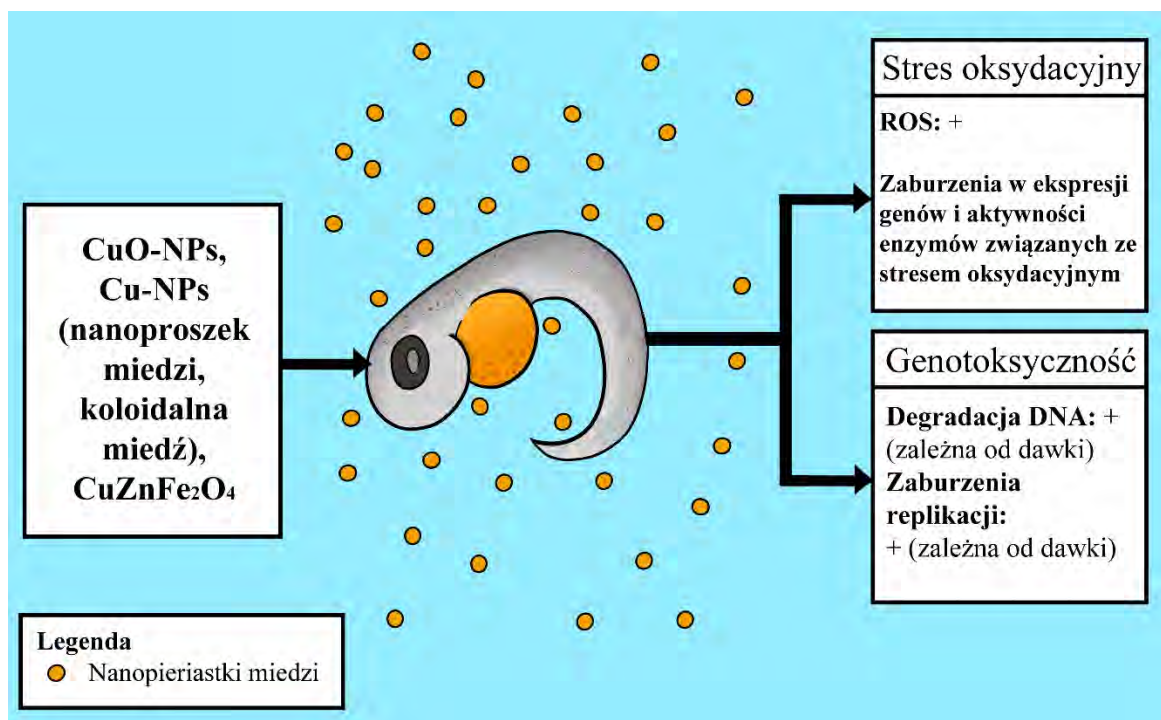
Na podstawie uzyskanych w niniejszych badaniach wyników potwierdzono, że nanopierwiastki miedzi wpływają negatywnie na organizmy wodne, jakimi są gatunki ryb *S. trutta*, *C. carpio* i *O. mykiss*. W kontekście przeprowadzonych badań stwierdzono (rys. 4):

- Nanopierwiastki miedzi, takie jak Cu-NPs, CuO-NPs oraz CuZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-NPs, wywołują zależną od dawki genotoksyczność (degradacja DNA), prawdopodobnie poprzez zaburzenie procesu replikacji.
- Nanopierwiastki miedzi, takie jak nanoproszek miedzi, koloidalna miedź oraz tlenek miedzi indukują stres oksydacyjny poprzez generację wolnych rodników, w wyniku czego dochodzi do zmian w ekspresji genów oraz aktywności enzymatycznej. Podczas gdy wzrost ekspresji genów, takich jak *cyp1a* i *hsp70* świadczy o mobilizacji organizmu do ochrony przed indukowanym przez nanopierwiastki miedzi stresem oksydacyjnym, tak spadek ekspresji i aktywności enzymatycznej (peroksydaza glutationowa, katalaza, dysmutaza ponadtlenkowa) może świadczyć o przeciążeniu możliwości ochronnych tych enzymów, uniemożliwiając prawidłową ochronę przed wywołanymi ROS uszkodzeniami.
- Nanopierwiastki tlenku miedzi wykazują niższą toksyczność niż CuSO<sub>4</sub>, jednakże podobnie wywołują wzrost ekspresji genów antyoksydacyjnych, takich jak *gpx*, *cyp1a* oraz *hsp70* wskazując na mobilizację mechanizmów obronnych organizmu w odpowiedzi na ekspozycję na te nanopierwiastki.

Dzięki przeprowadzonym badaniom udowodniono, że mechanizmem toksyczności tych nanopierwiastków jest indukcja stresu oksydacyjnego, podczas którego dochodzi do nadmiernej generacji wolnych rodników. Wywołane nią zakłócenia równowagi pomiędzy antyoksydantami a ROS, prowadzą do zaburzeń działania mechanizmów antyoksydacyjnych, a nawet ich przeciążenia. Poprzez ten mechanizm, nanopierwiastki miedzi wywołują uszkodzenia organizmu i zaburzają procesy fizjologiczne, również na poziomie molekularnym, do których należy m.in. replikacja DNA.

Przedstawione wnioski potwierdzają konieczność kontroli uwalniania nanopierwiastków, w tym miedzi do środowiska wodnego, a także dalszych badań w kierunku określenia

toksyczności i negatywnych skutków uwolnionych w sposób niekontrolowany do środowiska wodnego nanopierwiastków miedzi na ryby, szczególnie gatunki chronione oraz hodowlane. Badania na wylęgu stanowiły jedne z nielicznych, opisanych w literaturze badań dotyczących wpływu nanopierwiastków miedzi na parametry związane ze stresem oksydacyjnym u badanego wylęgu *S. trutta*, *C. carpio* i *O. mykiss*. Planowane jest poszerzenie badań o wpływ kształtu nanopierwiastków oraz parametrów środowiskowych (m.in. pH, temperatura) na ich toksyczność, szczególnie wobec form młodocianych ryb, a także wpływ nanopierwiastków miedzi na poszczególne stadia rozwojowe u ryb.



**Rysunek 4** Wpływ nanopierwiastków miedzi na organizmy wodne. Opracowano na podstawie: Sielska i wsp., 2024a; Sielska et al., 2022; Sielska i wsp., 2024b.



## 6. Streszczenie

Nanopierwiastki (NPs) metali, dzięki właściwościom fizyko-chemicznym oraz biologicznym, znajdują zastosowanie w przemyśle, elektronice, rolnictwie, a przede wszystkim w medycynie. Nanopierwiastki miedzi charakteryzują się szczególnymi, dorównującymi nanopierwiastkom srebra, właściwościami biobójczymi. Wraz ze wzrostem znaczenia nanopierwiastków metali, takich jak miedź, zwiększa się ryzyko niekontrolowanego przedostawania się tych cząsteczek do środowiska. Stwierdzono, że ostatecznym akceptorem zanieczyszczeń w postaci metali ciężkich i NPs jest środowisko wodne, gdzie na ich negatywne działanie narażone są organizmy żywe. Nanopierwiastki, w zależności od warunków środowiska, takich jak temperatura, pH czy stopień zasolenia ulegają przemianom i interakcjom w środowisku wodnym, co potencjalnie może wpływać na biodostępność i toksyczność NPs wobec organizmów żywych. Jednym z głównych mechanizmów toksyczności nanopierwiastków miedzi jest indukcja stresu oksydacyjnego.

Ze względu na wrażliwość ryb, szczególnie ich wylęgu, na obecność zanieczyszczeń w środowisku wodnym i związane z tym szkody natury ekologicznej jak i gospodarczej, jako materiał w niniejszych badaniach wykorzystano wylęg trzech gatunków powszechnie hodowanych ryb: troci wędrownej (*Salmo trutta*), karpia zwyczajnego (*Cyprinus carpio*) oraz pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*). W celu zbadania toksyczności nanopierwiastków miedzi u tych gatunków, wykorzystano metody z zakresu biologii molekularnej, jak i biochemii w postaci pomiaru ekspresji genów oraz aktywności enzymatycznej związanych ze stresem oksydacyjnym, takich jak peroksydaza glutationowa, cytochrom p450, białka szoku cieplnego HSP70, dysmutaza ponadtlenkowa oraz katalaza.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że nanopierwiastki miedzi wykazują toksyczność wobec wylęgu ryb, takich jak *S. trutta*, *C. carpio* oraz *O. mykiss*. poprzez zaburzenia mechanizmów antyoksydacyjnych wynikających z indukcji stresu oksydacyjnego, a także potencjalne zaburzenie replikacji DNA.

**Słowa kluczowe:** nanopierwiastki miedzi, stres oksydacyjny, ekotoksykologia, środowisko wodne, ekspresja genów, aktywność enzymatyczna, *Cyprinus carpio*, *Salmo trutta*, *Oncorhynchus mykiss*

## 7. Summary

Thanks to their physicochemical and biological properties, metal nanoparticles (NPs), are used in the industry, electronics, agriculture and mainly in medicine. Copper nanoparticles show distinctive antimicrobial properties, which are almost equal to the properties of silver nanoparticles. Along with the increasing significance of metal nanoparticles, the risk of their uncontrollable release is increased as well. It is confirmed that the aquatic environment is the final acceptor of various pollutants, such as heavy metals and NPs. There, aquatic organisms are exposed to the negative effects of those pollutants. Depending on environmental factors, such as temperature, pH or salinity level, nanoparticles interact with the aquatic environment, potentially affecting bioavailability and NPs toxicity towards living organisms. One of the main toxicity mechanisms of nanoparticles is the induction of the oxidative stress.

Due to the sensitivity of fish, especially their hatchlings, to present in the aquatic environment pollutants and associated with that ecological and economical losses, hatchlings of the three popular farmed fish species were used in the study: sea trout (*Salmo trutta*), common carp (*Cyprinus carpio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). In order to study the toxicity of copper nanoparticles in those species, the molecular and biochemical methods, such as gene expression and enzymatic activity analysis of the oxidative stress-related enzymes (i.e. glutathione peroxidase, cytochrome P450, heat shock protein HSP70, superoxide dismutase, catalase) were used.

The conducted study showed that copper nanoparticles exert the toxicity towards fish hatchlings, such as *S. trutta*, *C. carpio* and *O. mykiss*, by disturbing antioxidative mechanisms and potentially DNA replication.

**Keywords:** *copper nanoparticles, oxidative stress, ecotoxicology, aquatic environment, gene expression, enzymatic activity, Cyprinus carpio, Salmo trutta, Oncorhynchus mykiss*

## 8. Bibliografia

- Abbas, Q., Yousaf, B., Amina, Ali, M. U., Munir, M. A. M., El-Naggar, A., Rinklebe, J., & Naushad, M. (2020). Transformation pathways and fate of engineered nanoparticles (ENPs) in distinct interactive environmental compartments: A review. *Environment International*, *138*, 105646. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105646>
- Abdelazeim, S. A., Shehata, N. I., Aly, H. F., & Shams, S. G. E. (2020). Amelioration of oxidative stress-mediated apoptosis in copper oxide nanoparticles-induced liver injury in rats by potent antioxidants. *Scientific Reports*, *10*(1), 10812. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67784-y>
- Abdel-Khalek, A. A. (2015). Comparative Evaluation of Genotoxic Effects Induced by CuO Bulk and Nano-Particles in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Water, Air, & Soil Pollution*, *227*(1), 35. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2737-3>
- Abdel-Latif, H. M. R., Dawood, M. A. O., Mahmoud, S. F., Shukry, M., Noreldin, A. E., Ghetas, H. A., & Khallaf, M. A. (2021). Copper oxide nanoparticles alter serum biochemical indices, induce histopathological alterations, and modulate transcription of cytokines, HSP70, and oxidative stress genes in *Oreochromis niloticus*. *Animals*, *11*(3), 652. <https://doi.org/10.3390/ani11030652>
- Akalin, G. O. (2021). Interaction of copper (II) oxide nanoparticles with aquatic organisms: uptake, accumulation, and toxicity. *Toxicological & Environmental Chemistry*, *103*(4), 342–381. <https://doi.org/10.1080/02772248.2021.1926463>
- Aksakal, F. I., & Ciltas, A. (2019). Impact of copper oxide nanoparticles (CuO NPs) exposure on embryo development and expression of genes related to the innate immune system of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *223*, 78–87. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.05.016>
- Al-Bairuty, G. A., Shaw, B. J., Handy, R. D., & Henry, T. B. (2013). Histopathological effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on the organs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, *126*, 104–115. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.10.005>
- Alhaji, M., Safwan Abd Aziz, Md., Salim, A. A., Sharma, S., Kamaruddin, W. H. A., & Ghoshal, S. K. (2023). Customization of structure, morphology and optical characteristics of silver and copper nanoparticles: Role of laser fluence tuning. *Applied Surface Science*, *614*, 156176. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2022.156176>
- Ali, A., Petru, M., Azeem, M., Noman, T., Masin, I., Amor, N., Militky, J., & Tomková, B. (2023). A comparative performance of antibacterial effectiveness of copper and silver coated textiles. *Journal of Industrial Textiles*, *53*, 15280837221134990. <https://doi.org/10.1177/15280837221134990>
- Ali, M. M., Hossain, D., Al-Imran, Khan, Md. S., Begum, M., & Osman, M. H. (2021). Environmental Pollution with Heavy Metals: A Public Health Concern. In M. K. Nazal & str. 42

- H. Zhao (Eds.), *Heavy Metals* (p. Ch. 1). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.96805>
- Al-zharani, M., Qurtam, A. A., Daoush, W. M., Eisa, M. H., Aljarba, N. H., Alkahtani, S., & Nasr, F. A. (2021). Antitumor effect of copper nanoparticles on human breast and colon malignancies. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(2), 1587–1595. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09843-5>
- Andleeb, S., Banday, M. S., Rashid, S., Ahmad, I., Hafeez, M., Asimi, O., Rather, M. A., Baba, S. H., Shah, A., Razak, N., Fatima, A., & Hussain, I. (2023). Role of Cytochrome P450 in Xenobiotic Metabolism in Fishes (Review). In M. A. Rather, A. Amin, Y. A. Hajam, A. Jamwal, & I. Ahmad (Eds.), *Xenobiotics in Aquatic Animals: Reproductive and Developmental Impacts* (pp. 251–268). Springer Nature Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-99-1214-8\\_11](https://doi.org/10.1007/978-981-99-1214-8_11)
- Arenas-Lago, D., Abdolapur Monikh, F., Vijver, M. G., & Peijnenburg, W. J. G. M. (2019). Dissolution and aggregation kinetics of zero valent copper nanoparticles in (simulated) natural surface waters: Simultaneous effects of pH, NOM and ionic strength. *Chemosphere*, 226, 841–850. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.190>
- Arockiaraj, J., Palanisamy, R., Bhatt, P., Kumaresan, V., Gnanam, A. J., Pasupuleti, M., & Kasi, M. (2014). A novel murrel *Channa striatus* mitochondrial manganese superoxide dismutase: gene silencing, SOD activity, superoxide anion production and expression. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40(6), 1937–1955. <https://doi.org/10.1007/s10695-014-9981-0>
- Arratia, F., Olivares-Ferretti, P., García-Rodríguez, A., Marcos, R., & Carmona, E. R. (2019). Comparative toxic effects of copper-based nanoparticles and their microparticles in *Daphnia magna* by using natural freshwater media. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 53(3), 460–469. <https://doi.org/10.1080/00288330.2019.1598447>
- Asmathunisha, N., & Kathiresan, K. (2013). A review on biosynthesis of nanoparticles by marine organisms. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 103, 283–287. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.10.030>
- Auclair, J., Turcotte, P., Gagnon, C., Peyrot, C., Wilkinson, K. J., & Gagné, F. (2023). Investigation on the toxicity of nanoparticle mixture in Rainbow Trout juveniles. *Nanomaterials*, 13(2), 311. <https://doi.org/10.3390/nano13020311>
- Awasthi, Y. C., Beutler, E., & Srivastava, S. K. (1975). Purification and properties of human erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 250(13), 5144–5149. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)41289-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)41289-1)
- Aziz, S., Abdullah, S., Anwar, H., & Latif, F. (2022). DNA damage and oxidative stress in economically important fish, Bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) exposed to engineered copper oxide nanoparticles. *Pakistan Veterinary Journal*, 42(1). DOI: 10.29261/pakvetj/2022.002

- Badran, S. R., & Hamed, A. (2024). Is the trend toward a sustainable green synthesis of copper oxide nanoparticles completely safe for *Oreochromis niloticus* when compared to chemical ones?: using oxidative stress, bioaccumulation, and histological biomarkers. *Environmental Science and Pollution Research*, 31(6), 9477–9494. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-31707-x>
- Baker, T. J., Tyler, C. R., & Galloway, T. S. (2014). Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms. *Environmental Pollution*, 186, 257–271. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.11.014>
- Balasubramanian, S., Haneen, M. A., Sharma, G., & Perumal, E. (2024). Acute copper oxide nanoparticles exposure alters zebrafish larval microbiome. *Life Sciences*, 336, 122313. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.122313>
- Basu, N., Todgham, A. E., Ackerman, P. A., Bibeau, M. R., Nakano, K., Schulte, P. M., & Iwama, G. K. (2002). Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene*, 295(2), 173–183. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)00687-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)00687-X)
- Bathi, J. R., Moazeni, F., Upadhyayula, V. K. K., Chowdhury, I., Palchoudhury, S., Potts, G. E., & Gadhamshetty, V. (2021). Behavior of engineered nanoparticles in aquatic environmental samples: Current status and challenges. *Science of The Total Environment*, 793, 148560. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148560>
- Beauchamp, C., & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44(1), 276–287. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)
- Berejikian, B. A., Bush, R. A., & Campbell, L. A. (2014). Maternal Control over Offspring Life History in a Partially Anadromous Species, *Oncorhynchus mykiss*. *Transactions of the American Fisheries Society*, 143(2), 369–379. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/00028487.2013.862181>
- Billard, R. (1999). *The carp: biology and culture*. Springer Science & Business Media.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9–19. <https://doi.org/https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248–254. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Braz-Mota, S., Campos, D. F., MacCormack, T. J., Duarte, R. M., Val, A. L., & Almeida-Val, V. M. F. (2018). Mechanisms of toxic action of copper and copper nanoparticles in two Amazon fish species: Dwarf cichlid (*Apistogramma agassizii*) and cardinal tetra (*Paracheirodon axelrodi*). *Science of The Total Environment*, 630, 1168–1180. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.216>

- Buzea, C., Pacheco, I. I., & Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4), MR17–MR71. <https://doi.org/10.1116/1.2815690>
- Canli, E. G., & Canli, M. (2020). Effects of aluminum, copper and titanium nanoparticles on the liver antioxidant enzymes of the Nile fish (*Oreochromis niloticus*). *Energy Reports*, 6, 62–67. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.egy.2020.10.047>
- Chan, K. M. (1995). Metallothionein: Potential biomarker for monitoring heavy metal pollution in fish around Hong Kong. *Marine Pollution Bulletin*, 31(4), 411–415. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0025-326X\(95\)00125-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0025-326X(95)00125-7)
- Chao, S.-J., Huang, C. P., Lam, C.-C., Hua, L.-C., Chang, S.-H., & Huang, C. (2021). Transformation of copper oxide nanoparticles as affected by ionic strength and its effects on the toxicity and bioaccumulation of copper in zebrafish embryo. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 225, 112759. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112759>
- Çiçek, S. (2023). Influences of l-ascorbic acid on cytotoxic, biochemical, and genotoxic damages caused by copper II oxide nanoparticles in the rainbow trout gonad cells-2. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 266, 109559. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2023.109559>
- Colihueque, N., Estay, F. J., Crespo, J. E., Arriagada, A., Baessolo, L., Canales-Aguirre, C. B., Marín, J., & Carrasco, R. (2019). Genetic Differentiation and Origin of Naturalized Rainbow Trout Populations From Southern Chile, Revealed by the mtDNA Control Region Marker. *Frontiers in Genetics*, 10. <https://www.frontiersin.org/journals/genetics/articles/10.3389/fgene.2019.01212>
- Conway, J. R., Adeleye, A. S., Gardea-Torresdey, J., & Keller, A. A. (2015). Aggregation, Dissolution, and Transformation of Copper Nanoparticles in Natural Waters. *Environmental Science & Technology*, 49(5), 2749–2756. <https://doi.org/10.1021/es504918q>
- Cortés-Miranda, J., Rojas-Hernández, N., Muñoz, G., Copaja, S., Quezada-Romegialli, C., Veliz, D., & Vega-Retter, C. (2024). Biomarker selection depends on gene function and organ: the case of the cytochrome P450 family genes in freshwater fish exposed to chronic pollution. *PeerJ*, 12, e16925. <https://doi.org/10.7717/peerj.16925>
- Dang, T. M. D., Le, T. T. T., Fribourg-Blanc, E., & Dang, M. C. (2011). Synthesis and optical properties of copper nanoparticles prepared by a chemical reduction method. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 2(1), 015009. DOI: 10.1088/2043-6262/2/1/015009
- Davies, K. J. A. (2000). Oxidative Stress, Antioxidant Defenses, and Damage Removal, Repair, and Replacement Systems. *IUBMB Life*, 50(4–5), 279–289. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/713803728>

- Domercq, P., Praetorius, A., & Boxall, A. B. A. (2018). Emission and fate modelling framework for engineered nanoparticles in urban aquatic systems at high spatial and temporal resolution. *Environmental Science: Nano*, 5(2), 533–543. <https://doi.org/10.1039/C7EN00846E>
- Dziewulska, K., Kirczuk, L., Czerniawski, R., & Kowalska-Góralaska, M. (2021). Survival of embryos and fry of sea trout (*Salmo trutta m. trutta*) growing from eggs exposed to different concentrations of selenium during egg swelling. *Animals*, 11(10), 2921. <https://doi.org/10.3390/ani11102921>
- Egbuna, C., Parmar, V. K., Jeevanandam, J., Ezzat, S. M., Patrick-Iwuanyanwu, K. C., Adetunji, C. O., Khan, J., Onyeike, E. N., Uche, C. Z., Akram, M., Ibrahim, M. S., El Mahdy, N. M., Awuchi, C. G., Saravanan, K., Tijjani, H., Odoh, U. E., Messaoudi, M., Ifemeje, J. C., Olisah, M. C., ... Ibeabuchi, C. G. (2021). Toxicity of Nanoparticles in Biomedical Application: Nanotoxicology. *Journal of Toxicology*, 2021, 9954443. <https://doi.org/10.1155/2021/9954443>
- El-Saadony, M. T., Abd El-Hack, M. E., Taha, A. E., Fouda, M. M. G., Ajarem, J. S., N. Maodaa, S., Allam, A. A., & Elshaer, N. (2020). Ecofriendly synthesis and insecticidal application of copper nanoparticles against the storage pest *Tribolium castaneum*. *Nanomaterials*, 10(3), 587. <https://doi.org/10.3390/nano10030587>
- FAO. (2022). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation*. <https://doi.org/https://doi.org/10.4060/cc0461en>.
- Farombi, E. O., Adelowo, O. A., & Ajimoko, Y. R. (2007). Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African cat fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 4(2), 158–165. <https://doi.org/10.3390/ijerph2007040011>
- Fazelan, Z., Hoseini, S. M., Yousefi, M., Khalili, M., Hoseinifar, S. H., & Van Doan, H. (2020). Effects of dietary eucalyptol administration on antioxidant and inflammatory genes in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to ambient copper. *Aquaculture*, 520, 734988. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.734988>
- Finaud, J., Lac, G., & Filaire, E. (2006). Oxidative Stress. *Sports Medicine*, 36(4), 327–358. <https://doi.org/10.2165/00007256-200636040-00004>
- Folmer, O., Hoeh, W. R., Black, M. B., & Vrijenhoek, R. C. (1994). Conserved primers for PCR amplification of mitochondrial DNA from different invertebrate phyla. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294–299.
- Forouhar Vajargah, M., Mohamadi Yalsuyi, A., Hedayati, A., & Faggio, C. (2018). Histopathological lesions and toxicity in common carp (*Cyprinus carpio* L. 1758) induced by copper nanoparticles. *Microscopy Research and Technique*, 81(7), 724–729. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jemt.23028>

- Fridovich, I. (1995). Superoxide Radical and Superoxide Dismutases. *Annual Review of Biochemistry*. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.000525>
- Fu, D., Hu, Y., Chu, P., Wang, T., Chu, M., Shi, Y., Yin, S., Zhu, Y., Wang, Y., & Guo, Z. (2021). Histopathological and calreticulin changes in the liver and gill of *Takifugu fasciatus* demonstrate the effects of copper nanoparticle and copper sulphate exposure. *Aquaculture Reports*, 20, 100662. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100662>
- Gallo, A., Manfra, L., Boni, R., Rotini, A., Migliore, L., & Tosti, E. (2018). Cytotoxicity and genotoxicity of CuO nanoparticles in sea urchin spermatozoa through oxidative stress. *Environment International*, 118, 325–333. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.05.034>
- Ganesan, S., Anaimalai Thirumurthi, N., Raghunath, A., Vijayakumar, S., & Perumal, E. (2016). Acute and sub-lethal exposure to copper oxide nanoparticles causes oxidative stress and teratogenicity in zebrafish embryos. *Journal of Applied Toxicology*, 36(4), 554–567. <https://doi.org/10.1002/jat.3224>
- Garibo, D., Borbón-Nuñez, H. A., de León, J. N. D., García Mendoza, E., Estrada, I., Toledano-Magaña, Y., Tiznado, H., Ovalle-Marroquin, M., Soto-Ramos, A. G., Blanco, A., Rodríguez, J. A., Romo, O. A., Chávez-Almazán, L. A., & Susarrey-Arce, A. (2020). Green synthesis of silver nanoparticles using *Lysiloma acapulcensis* exhibit high-antimicrobial activity. *Scientific Reports*, 10(1), 12805. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69606-7>
- Gavilán, H., Posth, O., Bogart, L. K., Steinhoff, U., Gutiérrez, L., & Morales, M. P. (2017). How shape and internal structure affect the magnetic properties of anisometric magnetite nanoparticles. *Acta Materialia*, 125, 416–424. <https://doi.org/10.1016/j.actamat.2016.12.016>
- Ghangrekar, M. M., & Chatterjee, P. (2018). Water Pollutants Classification and Its Effects on Environment. In R. Das (Ed.), *Carbon Nanotubes for Clean Water* (pp. 11–26). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-95603-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-95603-9_2)
- Ghasemi, P., Shafiee, G., Ziamajidi, N., & Abbasalipourkabir, R. (2023). Copper Nanoparticles Induce Apoptosis and Oxidative Stress in SW480 Human Colon Cancer Cell Line. *Biological Trace Element Research*, 201(8), 3746–3754. <https://doi.org/10.1007/s12011-022-03458-2>
- Giannopolitis, C. N., & Ries, S. K. (1977). Superoxide Dismutases: I. Occurrence in Higher Plants 1 2. *Plant Physiology*, 59(2), 309–314. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>
- Goksøyr, A. (1995). Use of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish as a biomarker of aquatic pollution. In G. H. Degen, J. P. Seiler, & P. Bentley (Eds.), *Toxicology in Transition* (pp. 80–95). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-79451-3\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-642-79451-3_7)



- Gopalraaj, J., Manikantan, P., Arun, M., Balamuralikrishnan, B., & Anand, A. V. (2021). Toxic Effects of Nanoparticles on Fish Embryos. *Research Journal of Biotechnology Vol, 16*, 12.
- Gupta, G., Cappellini, F., Farcal, L., Gornati, R., Bernardini, G., & Fadeel, B. (2022). Copper oxide nanoparticles trigger macrophage cell death with misfolding of Cu/Zn superoxide dismutase 1 (SOD1). *Particle and Fibre Toxicology*, 19(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s12989-022-00467-w>
- Halliwell, B. B., & Poulsen, H. E. (2006). Oxidative Stress. In B. B. Halliwell & H. E. Poulsen (Eds.), *Cigarette Smoke and Oxidative Stress* (pp. 1–4). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/3-540-32232-9\\_1](https://doi.org/10.1007/3-540-32232-9_1)
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M., C. (2015). 1 Oxygen: boon yet bane—introducing oxygen toxicity and reactive species. In *Free Radicals in Biology and Medicine (5th edn)* (5th ed., pp. 1–29). Oxford Academic. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.003.0001>
- Hamed, R. R., Farid, N. M., Elowa, Sh. E., & Abdalla, A.-M. (2003). Glutathione Related Enzyme Levels of Freshwater Fish as Bioindicators of Pollution. *Environmentalist*, 23(4), 313–322. <https://doi.org/10.1023/B:ENVR.0000031409.09024.cc>
- Hanna, S. K., Miller, R. J., & Lenihan, H. S. (2014). Accumulation and toxicity of copper oxide engineered nanoparticles in a marine mussel. *Nanomaterials*, 4(3), 535–547. <https://doi.org/10.3390/nano4030535>
- Hansen, M. M., & Mensberg, K.-L. D. (1998). Genetic differentiation and relationship between genetic and geographical distance in Danish sea trout (*Salmo trutta* L.) populations. *Heredity*, 81(5), 493–504. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.1998.00408.x>
- Hardilová, Š., Havrdová, M., Panáček, A., Kvítek, L., & Zbořil, R. (2015). Hsp70 as an indicator of stress in the cells after contact with nanoparticles. *Journal of Physics: Conference Series*, 617(1), 012023. DOI: 10.1088/1742-6596/617/1/012023.
- Harsij, M., Paknejad, H., Khalili, M., Jafarian, H., & Nazari, S. (2021). Histological study and evaluation of Hsp70 gene expression in gill and liver tissues of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to Zinc oxide nanoparticles. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 20(3), 741–760. DOI: 10.22092/ijfs.2021.124052
- Hernández-Moreno, D., Li, L., Connolly, M., Conde, E., Fernández, M., Schuster, M., Navas, J. M., & Fernández-Cruz, M.-L. (2016). Mechanisms underlying the enhancement of toxicity caused by the coinubation of zinc oxide and copper nanoparticles in a fish hepatoma cell line. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(10), 2562–2570. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/etc.3425>
- Hossain, N., Mobarak, M. H., Mimona, M. A., Islam, M. A., Hossain, A., Zohura, F. T., & Chowdhury, M. A. (2023). Advances and significances of nanoparticles in semiconductor applications – A review. *Results in Engineering*, 19, 101347. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rineng.2023.101347>

- Hsiao, B.-Y., Horng, J.-L., Yu, C.-H., Lin, W.-T., Wang, Y.-H., & Lin, L.-Y. (2024). Assessing cardiovascular toxicity in zebrafish embryos exposed to copper nanoparticles. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 277, 109838. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2024.109838>
- Hsiao, I.-L., Hsieh, Y.-K., Wang, C.-F., Chen, I.-C., & Huang, Y.-J. (2015). Trojan-Horse Mechanism in the Cellular Uptake of Silver Nanoparticles Verified by Direct Intra- and Extracellular Silver Speciation Analysis. *Environmental Science & Technology*, 49(6), 3813–3821. <https://doi.org/10.1021/es504705p>
- <https://www.fishbase.se/summary/Salmo-trutta.html>. (n.d.). Retrieved April 15, 2024, from <https://www.fishbase.se/summary/Salmo-trutta.html>
- <https://www.nps.gov/shen/learn/nature/rainbow-trout.htm>. (2015, February 16). <https://www.nps.gov/shen/learn/nature/rainbow-trout.htm>
- Inam, M., Foster, J. C., Gao, J., Hong, Y., Du, J., Dove, A. P., & O'Reilly, R. K. (2019). Size and shape affects the antimicrobial activity of quaternized nanoparticles. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 57(3), 255–259. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pola.29195>
- Isani, G., Falcioni, M. L., Barucca, G., Sekar, D., Andreani, G., Carpenè, E., & Falcioni, G. (2013). Comparative toxicity of CuO nanoparticles and CuSO<sub>4</sub> in rainbow trout. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 97, 40–46. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.07.001>
- ISO 80004-1: 2023 (E) Nanotechnologies – Vocabulary — Part 1: Core vocabulary. (2023). ISO 80004-1: 2023 (E). <https://www.iso.org/obp/ui/en/#iso:std:iso:80004:-1:ed-1:v1:en:sec:3.1.10>
- Iwama, G. K., Vijayan, M. M., Forsyth, R. O. B. B., & Aackerman, P. A. (1999). Heat Shock Proteins and Physiological Stress in Fish1. *American Zoologist*, 39(6), 901–909. <https://doi.org/10.1093/icb/39.6.901>
- Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A., & Danquah, M. K. (2018). Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 9, 1050–1074. <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.98>
- Kakakhel, M. A., Wu, F., Sajjad, W., Zhang, Q., Khan, I., Ullah, K., & Wang, W. (2021). Long-term exposure to high-concentration silver nanoparticles induced toxicity, fatality, bioaccumulation, and histological alteration in fish (*Cyprinus carpio*). *Environmental Sciences Europe*, 33(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s12302-021-00453-7>
- Kalayci, G., Ozturk, R. C., Capkin, E., & Altinok, I. (2018). Genetic and molecular evidence that brown trout *Salmo trutta* belonging to the Danubian lineage are a single biological species. *Journal of Fish Biology*, 93(5), 792–804. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfb.13777>

- Kessler, A., Hedberg, J., Blomberg, E., & Odnevall, I. (2022). Reactive oxygen species formed by metal and metal oxide nanoparticles in physiological media—a review of reactions of importance to nanotoxicity and proposal for categorization. *Nanomaterials*, *12*(11), 1922. <https://doi.org/10.3390/nano12111922>
- Khan, A., Khan, M., Shah, N., Khan, M., Dawar, A., Shah, A. A., Dawar, F., & Khisroon, M. (2024). Genotoxicity of Copper, Silver and Green Synthetic Gold Nanoparticles in Fish (*Ctenopharyngodon idella*). *Biological Trace Element Research*, *202*(6), 2855–2863. <https://doi.org/10.1007/s12011-023-03877-9>
- Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, *12*(7), 908–931. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>
- Kibenge, F. S. B. (2022). Chapter 1 - Descriptions of major farmed aquatic animal species. In F. S. B. Kibenge, B. Baldisserotto, & R. S.-M. Chong (Eds.), *Aquaculture Pathophysiology* (pp. 1–44). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812211-2.00041-X>
- Kim, R.-O., Kim, B.-M., Hwang, D.-S., Au, D. W. T., Jung, J.-H., Shim, W. J., Leung, K. M. Y., Wu, R. S. S., Rhee, J.-S., & Lee, J.-S. (2013). Evaluation of biomarker potential of cytochrome P450 1A (CYP1A) gene in the marine medaka, *Oryzias melastigma* exposed to water-accommodated fractions (WAFs) of Iranian crude oil. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *157*(2), 172–182. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2012.11.003>
- Klaine, S. J., Alvarez, P. J. J., Batley, G. E., Fernandes, T. F., Handy, R. D., Lyon, D. Y., Mahendra, S., McLaughlin, M. J., & Lead, J. R. (2008). Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *27*(9), 1825–1851. <https://doi.org/https://doi.org/10.1897/08-090.1>
- Kodali, V., & Thrall, B. D. (2015). Oxidative Stress and Nanomaterial-Cellular Interactions. In S. M. Roberts, J. P. Kehrer, & L.-O. Klotz (Eds.), *Studies on Experimental Toxicology and Pharmacology* (pp. 347–367). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-19096-9\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-319-19096-9_18)
- Koehn, J. D. (2004). Carp (*Cyprinus carpio*) as a powerful invader in Australian waterways. *Freshwater Biology*, *49*(7), 882–894. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2004.01232.x>
- Kollár, T., Kása, E., Csorbai, B., Urbányi, B., Csenki-Bakos, Z., & Horváth, Á. (2018). In vitro toxicology test system based on common carp (*Cyprinus carpio*) sperm analysis. *Fish Physiology and Biochemistry*, *44*(6), 1577–1589. <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0541-x>
- Kowaltowski, A. J., & Vercesi, A. E. (1999). Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, *26*(3), 463–471. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00216-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00216-0)

- Krzyzewska, I., Kyziol-Komosinska, J., Rosik-Dulewska, C., Czupiol, J., & Antoszczyszyn-Szpicka, P. (2016). Inorganic nanomaterials in the aquatic environment: behavior, toxicity, and interaction with environmental elements. *Archives of Environmental Protection*, 42(1), 87–101. <https://doi.org/https://doi.org/10.1515/aep-2016-0011>
- Kumar, M., Singh, S., Dwivedi, S., Trivedi, A., Dubey, I., & Trivedi, S. P. (2023). Copper-induced Genotoxicity, Oxidative Stress, and Alteration in Transcriptional Level of Autophagy-associated Genes in Snakehead Fish *Channa punctatus*. *Biological Trace Element Research*, 201(4), 2022–2035. <https://doi.org/10.1007/s12011-022-03301-8>
- Kumar, N., Gismondi, E., & Reddy, K. S. (2024). Copper and nanocopper toxicity using integrated biomarker response in *Pangasianodon hypophthalmus*. *Environmental Toxicology*, 39(3), 1581–1600. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/tox.24058>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Limón-Pacheco, J., & Gonsebatt, M. E. (2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674(1), 137–147. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.09.015>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Łuszczek-Trojnar, E., & Nowacki, P. (2021). Common carp (*Cyprinus carpio* L.) scales as a bioindicator reflecting its exposure to heavy metals throughout life. *Journal of Applied Ichthyology*, 37(2), 235–245. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jai.14154>
- Magaye, R., Zhao, J., Bowman, L., & Ding, M. I. N. (2012). Genotoxicity and carcinogenicity of cobalt-, nickel- and copper-based nanoparticles. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 4(4), 551–561. <https://doi.org/10.3892/etm.2012.656>
- Mahanta, M., & Kaushik, K. K. (2023). Nanoparticles in Aquatic Environment: An Overview with Special Reference to Their Ecotoxicity. In J. A. Malik & M. J. Sadiq Mohamed (Eds.), *Modern Nanotechnology: Volume 2: Green Synthesis, Sustainable Energy and Impacts* (pp. 385–404). Springer Nature Switzerland. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-31104-8\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-031-31104-8_17)
- Malakar, A., & Snow, D. D. (2020). Chapter 17 - Nanoparticles as sources of inorganic water pollutants. In P. Devi, P. Singh, & S. K. Kansal (Eds.), *Inorganic Pollutants in Water* (pp. 337–370). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818965-8.00017-2>
- Manke, A., Wang, L., & Rojanasakul, Y. (2013). Mechanisms of Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Toxicity. *BioMed Research International*, 2013, 942916. <https://doi.org/10.1155/2013/942916>

- Mansour, W. A. A., Abdelsalam, N. R., Tanekhy, M., Khaled, A. A., & Mansour, A. T. (2021). Toxicity, inflammatory and antioxidant genes expression, and physiological changes of green synthesis silver nanoparticles on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 247, 109068. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109068>
- Margis, R., Dunand, C., Teixeira, F. K., & Margis-Pinheiro, M. (2008). Glutathione peroxidase family – an evolutionary overview. *The FEBS Journal*, 275(15), 3959–3970. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06542.x>
- Masouleh, F. F., Amiri, B. M., Mirvaghefi, A., Ghafoori, H., & Madsen, S. S. (2017). Silver nanoparticles cause osmoregulatory impairment and oxidative stress in Caspian kutum (*Rutilus kutum*, Kamensky 1901). *Environmental Monitoring and Assessment*, 189(9), 448. <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6156-3>
- Mills, D. (2001). Salmonids\*. In J. H. Steele (Ed.), *Encyclopedia of Ocean Sciences (Second Edition)* (pp. 29–38). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012374473-9.00018-7>
- Misra, H. P., & Fridovich, I. (1972). The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 247(10), 3170–3175. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)45228-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)45228-9)
- Moschini, E., Colombo, G., Chirico, G., Capitani, G., Dalle-Donne, I., & Mantecca, P. (2023). Biological mechanism of cell oxidative stress and death during short-term exposure to nano CuO. *Scientific Reports*, 13(1), 2326. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-28958-6>
- Muhammed Ajmal, C., Benny, A. P., Jeon, W., Kim, S., Kim, S. W., & Baik, S. (2021). In-situ reduced non-oxidized copper nanoparticles in nanocomposites with extraordinary high electrical and thermal conductivity. *Materials Today*, 48, 59–71. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mattod.2021.04.012>
- Murphy, M. E. (2013). The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis*, 34(6), 1181–1188. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt111>
- Mustafa, M., Azam, M., Nawaz Bhatti, H., Khan, A., Zafar, L., & Rehan Abbasi, A. M. (2024). Green fabrication of copper nano-fertilizer for enhanced crop yield in cowpea cultivar: A sustainable approach. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 56, 102994. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102994>
- Naeemi, A. S., Elmi, F., Vaezi, G., & Ghorbankhah, M. (2020). Copper oxide nanoparticles induce oxidative stress mediated apoptosis in carp (*Cyprinus carpio*) larva. *Gene Reports*, 19, 100676. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100676>
- Nagai, T., Inada, J., Hamada, M., Kai, N., Tanoue, Y., Kaminishi, Y., Nakagawa, H., Fujiki, K., Nakao, M., & Yano, T. (1999). Distribution of Glutathione Peroxidase Activity in Fish. *Fisheries Science*, 65(4), 665–666. <https://doi.org/10.2331/fishsci.65.665>

- Naz, S., Gul, A., & Zia, M. (2020). Toxicity of copper oxide nanoparticles: a review study. *IET Nanobiotechnology*, *14*(1), 1–13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2019.0176>
- Nelson, D. R. (2003). Comparison of P450s from human and fugu: 420 million years of vertebrate P450 evolution. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *409*(1), 18–24. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(02\)00553-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0003-9861(02)00553-2)
- Nikdehghan, N., Kashiri, H., & Hedayati, A. (2018). CuO nanoparticles-induced micronuclei and DNA damage in *Cyprinus carpio*. *AACL Bioflux*, *11*, 925–936.
- Nitta, Y., Muraoka-Hirayama, S., & Sakurai, K. (2020). Catalase is required for peroxisome maintenance during adipogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1865*(8), 158726. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbali.2020.158726>
- Noureen, A., Jabeen, F., Tabish, T. A., Yaqub, S., Ali, M., & Chaudhry, A. S. (2018). Assessment of copper nanoparticles (Cu-NPs) and copper (II) oxide (CuO) induced hemato-and hepatotoxicity in *Cyprinus carpio*. *Nanotechnology*, *29*(14), 144003. DOI: 10.1088/1361-6528/aaaaa7
- Núñez, M. E., Hall, D. B., & Barton, J. K. (1999). Long-range oxidative damage to DNA: effects of distance and sequence. *Chemistry & Biology*, *6*(2), 85–97.
- Ogunsuyi, O. I., Fadoju, O. M., Akanni, O. O., Alabi, O. A., Alimba, C. G., Cambier, S., Eswara, S., Gutleb, A. C., Adaramoye, O. A., & Bakare, A. A. (2019). Genetic and systemic toxicity induced by silver and copper oxide nanoparticles, and their mixture in *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Environmental Science and Pollution Research*, *26*(26), 27470–27481. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05958-6>
- Ostaszewska, T., Chojnacki, M., Kamaszewski, M., & Sawosz-Chwalibóg, E. (2016). Histopathological effects of silver and copper nanoparticles on the epidermis, gills, and liver of Siberian sturgeon. *Environmental Science and Pollution Research*, *23*(2), 1621–1633. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5391-9>
- Ozmen, N., Ozhan Turhan, D., Güngördü, A., Caglar Yilmaz, H., & Ozmen, M. (2023). Investigation of the effects of metal oxide nanoparticle mixtures on *Danio rerio* and *Xenopus laevis* embryos. *Chemistry and Ecology*, *39*(3), 215–234. <https://doi.org/10.1080/02757540.2022.2162893>
- Öztürk, A. E. (2023). The Effects of Micro & Nano Pollution on Fish Reproduction. In A. E. Öztürk (Ed.), *Nanotechnology in Reproduction*. Özgür Publications. <https://doi.org/https://doi.org/10.58830/ozgur.pub203.c937>
- Pandey, G., & Madhuri, S. (2014). Heavy metals causing toxicity in animals and fishes. *Research Journal of Animal, Veterinary and Fishery Sciences*, *2*(2), 17–23.
- Pedrajas, J. R., Peinado, J., & López-Barea, J. (1995). Oxidative stress in fish exposed to model xenobiotics. Oxidatively modified forms of Cu,Zn-superoxide dismutase as potential

- biomarkers. *Chemico-Biological Interactions*, 98(3), 267–282.  
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0009-2797\(95\)03651-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0009-2797(95)03651-2)
- Pereira, S. P. P., Boyle, D., Nogueira, A., & Handy, R. D. (2023). Differences in toxicity and accumulation of metal from copper oxide nanomaterials compared to copper sulphate in zebrafish embryos: Delayed hatching, the chorion barrier and physiological effects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 253, 114613.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114613>
- 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.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.02.046>
- Peteri, A. (2005, July 12). *FAO 2024. Cyprinus carpio. Cultured Aquatic Species Information Programme*. Fisheries and Aquaculture Division [Online].  
[https://www.fao.org/fishery/en/culturedspecies/cyprinus\\_carpio](https://www.fao.org/fishery/en/culturedspecies/cyprinus_carpio)
- Pohanka, M. (2019). Copper and copper nanoparticles toxicity and their impact on basic functions in the body. *Bratisl. Lek. Listy*, 120(6), 397–409.
- Qin, W., Huang, G., Chen, Z., & Zhang, Y. (2017). Nanomaterials in Targeting Cancer Stem Cells for Cancer Therapy. *Frontiers in Pharmacology*, 8.  
<https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2017.00001>
- Rahman, A., Pittarate, S., Perumal, V., Rajula, J., Thungrabeab, M., Mekchay, S., & Krutmuang, P. (2022). Larvicidal and antifeedant effects of copper nano-pesticides against *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) and its immunological response. *Insects*, 13(11), 1030.  
<https://doi.org/10.3390/insects13111030>
- Raja, F. N. S., Worthington, T., & Martin, R. A. (2023). The antimicrobial efficacy of copper, cobalt, zinc and silver nanoparticles: alone and in combination. *Biomedical Materials*, 18(4), 045003. DOI: 10.1088/1748-605X/acd03f
- Rakshit, S., Mondal, K. G., Jana, P. C., Kamilya, T., & Saha, S. (2023). Structural and optical properties of chemically synthesized copper oxide nanoparticles and their photocatalytic application. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 34(32), 2141.  
<https://doi.org/10.1007/s10854-023-11593-2>
- Ramos-Zúñiga, J., Bruna, N., & Pérez-Donoso, J. M. (2023). Toxicity mechanisms of copper nanoparticles and copper surfaces on bacterial cells and viruses. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13), 10503. <https://doi.org/10.3390/ijms241310503>
- Rangaswamy, B., Kim, W.-S., & Kwak, I.-S. (2024). Heat shock protein 70 reflected the state of inhabited fish response to water quality within lake ecosystem. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 21(1), 643–654. <https://doi.org/10.1007/s13762-023-04971-0>

- Rao, M. V., Paliyath, G., & Ormrod, D. P. (1996). Ultraviolet-B- and Ozone-Induced Biochemical Changes in Antioxidant Enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, *110*(1), 125–136. <https://doi.org/10.1104/pp.110.1.125>
- Rashid, M. I., Shah, G. A., Sadiq, M., Amin, N. ul, Ali, A. M., Ondrasek, G., & Shahzad, K. (2023). Nanobiochar and copper oxide nanoparticles mixture synergistically increases soil nutrient availability and improves wheat production. *Plants*, *12*(6), 1312. <https://doi.org/10.3390/plants12061312>
- Richards, J. G. (2011). BONY FISHES | Zebrafish. In A. P. Farrell (Ed.), *Encyclopedia of Fish Physiology* (pp. 1819–1823). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374553-8.00265-3>
- Rotomskis, R., Jurgelėnė, Ž., Stankevičius, M., Stankevičiūtė, M., Kazlauskienė, N., Jokšas, K., Montvydienė, D., Kulvietis, V., & Karabanovas, V. (2018). Interaction of carboxylated CdSe/ZnS quantum dots with fish embryos: Towards understanding of nanoparticles toxicity. *Science of The Total Environment*, *635*, 1280–1291. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.206>
- Sadeghi, S., Mousavi-Sabet, H., Hedayati, A., Zargari, A., Multisanti, C. R., & Faggio, C. (2024). Copper-oxide nanoparticles effects on goldfish (*Carassius auratus*): Lethal toxicity, haematological, and biochemical effects. *Veterinary Research Communications*. <https://doi.org/10.1007/s11259-024-10338-8>
- Sadowska-Bartosz, I., Galiniak, S., & Bartosz, G. (2014). Reakcja fentona. *Kosmos*, *63*(3), 309–314.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Scown, T. M., Santos, E. M., Johnston, B. D., Gaiser, B., Baalousha, M., Mitov, S., Lead, J. R., Stone, V., Fernandes, T. F., Jepson, M., van Aerle, R., & Tyler, C. R. (2010). Effects of Aqueous Exposure to Silver Nanoparticles of Different Sizes in Rainbow Trout. *Toxicological Sciences*, *115*(2), 521–534. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq076>
- Senze, M., Kowalska-Górska, M., & Czyż, K. (2024). Effect of Aluminum Concentration in Water on Its Toxicity and Bioaccumulation in Zooplankton (*Chaoborus* and *Chironomus*) and Carp (*Cyprinus carpio* L.) Roe. *Biological Trace Element Research*. <https://doi.org/10.1007/s12011-024-04062-2>
- Shang, L., Nienhaus, K., & Nienhaus, G. U. (2014). Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *Journal of Nanobiotechnology*, *12*(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-12-5>



- Sharma, V. K., Filip, J., Zboril, R., & Varma, R. S. (2015). Natural inorganic nanoparticles—formation, fate, and toxicity in the environment. *Chemical Society Reviews*, 44(23), 8410–8423. DOI: 10.1039/C5CS00236B
- Shaw, B. J., Al-Bairuty, G., & Handy, R. D. (2012). Effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): Physiology and accumulation. *Aquatic Toxicology*, 116–117, 90–101. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.02.032>
- Shin, S. W., Song, I. H., & Um, S. H. (2015). Role of physicochemical properties in nanoparticle toxicity. *Nanomaterials*, 5(3), 1351–1365. <https://doi.org/10.3390/nano5031351>
- Shukla, R. K., Badiye, A., Vajpayee, K., & Kapoor, N. (2021). Genotoxic Potential of Nanoparticles: Structural and Functional Modifications in DNA. *Frontiers in Genetics*, 12. <https://www.frontiersin.org/journals/genetics/articles/10.3389/fgene.2021.728250>
- Sielska, A., Cembrowska-Lech, D., Kowalska-Górska, M., Czerniawski, R., Krepski, T., & Skuza, L. (2024a). Effects of copper nanoparticles on oxidative stress genes and their enzyme activities in common carp (*Cyprinus carpio*). *The European Zoological Journal*, 91(1), 354–365. <https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2332290>
- Sielska, A., Kowalska-Górska, M., Szućko-Kociuba, I., & Skuza, L. (2024b). Comparison of the effects of copper oxide nanoparticles (CuO-NPs) and copper (II) sulfate on oxidative stress parameters in rainbow trout hatchlings (*Oncorhynchus mykiss*). *The European Zoological Journal*, 91(2), 897–905. <https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2385820>
- Sielska, A., Skuza, L., & Kowalska-Górska, M. (2022). The effects of silver and copper nanoparticles and selenium on *Salmo trutta* hatchlings. *Ecohydrology*, 15(7), e2453. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/eco.2453>
- Sies, H. (1986). Biochemistry of Oxidative Stress. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 25(12), 1058–1071. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/anie.198610581>
- Sies, H. (2000). What is Oxidative Stress? In J. F. Keaney (Ed.), *Oxidative Stress and Vascular Disease* (pp. 1–8). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4649-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4649-8_1)
- Soliman, H. A. M., Hamed, M., & Sayed, A. E.-D. H. (2021). Investigating the effects of copper sulfate and copper oxide nanoparticles in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using multiple biomarkers: the prophylactic role of Spirulina. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(23), 30046–30057. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-12859-0>
- Solokas, M. A., Feiner, Z. S., Al-Chokachy, R., Budy, P., DeWeber, J. T., Sarvala, J., Sass, G. G., Tolentino, S. A., Walsworth, T. E., & Jensen, O. P. (2023). Shrinking body size and climate warming: Many freshwater salmonids do not follow the rule. *Global Change Biology*, 29(9), 2478–2492. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/gcb.16626>
- Solorio-Rodriguez, S. A., Wu, D., Boyadzhiev, A., Christ, C., Williams, A., & Halappanavar, S. (2024). A Systematic Genotoxicity Assessment of a Suite of Metal Oxide Nanoparticles

- Reveals Their DNA Damaging and Clastogenic Potential. *Nanomaterials*, 14(9), 743. <https://doi.org/10.3390/nano14090743>
- Sriram, K., Maheswari, P. U., Ezhilarasu, A., Begum, K. M. M. S., & Arthanareeswaran, G. (2017). CuO-loaded hydrophobically modified chitosan as hybrid carrier for curcumin delivery and anticancer activity. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, 12(6), 858–871. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/apj.2124>
- Strambeanu, N., Demetrovici, L., & Dragos, D. (2015). Natural Sources of Nanoparticles. In M. Lungu, A. Neculae, M. Bunoiu, & C. Biris (Eds.), *Nanoparticles' Promises and Risks: Characterization, Manipulation, and Potential Hazards to Humanity and the Environment* (pp. 9–19). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-11728-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-11728-7_2)
- Strauch, B. M., Hubele, W., & Hartwig, A. (2020). Impact of endocytosis and lysosomal acidification on the toxicity of copper oxide nano- and micro-sized particles: uptake and gene expression related to oxidative stress and the DNA damage response. *Nanomaterials*, 10(4), 679. <https://doi.org/10.3390/nano10040679>
- Stuart, I. G., Fanson, B. G., Lyon, J. P., Stocks, J., Brooks, S., Norris, A., Thwaites, L., Beitzel, M., Hutchison, M., Ye, Q., Koehn, J. D., & Bennett, A. F. (2021). Continental threat: How many common carp (*Cyprinus carpio*) are there in Australia? *Biological Conservation*, 254, 108942. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108942>
- Studer, A. M., Limbach, L. K., Van Duc, L., Krumeich, F., Athanassiou, E. K., Gerber, L. C., Moch, H., & Stark, W. J. (2010). Nanoparticle cytotoxicity depends on intracellular solubility: Comparison of stabilized copper metal and degradable copper oxide nanoparticles. *Toxicology Letters*, 197(3), 169–174. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.05.012>
- Takeuchi, T., Satoh, S., & Kiron, V. (2002). Common carp, *Cyprinus carpio*. In *Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture* (pp. 245–261). CABI Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1079/9780851995199.0245>
- Temiz, Ö., & Kargin, F. (2022). Toxicological Impacts on Antioxidant Responses, Stress Protein, and Genotoxicity Parameters of Aluminum Oxide Nanoparticles in the Liver of *Oreochromis niloticus*. *Biological Trace Element Research*, 200(3), 1339–1346. <https://doi.org/10.1007/s12011-021-02723-0>
- Thit, A., Skjolding, L. M., Selck, H., & Sturve, J. (2017). Effects of copper oxide nanoparticles and copper ions to zebrafish (*Danio rerio*) cells, embryos and fry. *Toxicology in Vitro*, 45, 89–100. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.08.010>
- Tierney, K. B., & Pyle, G. G. (2024). Is salmonid migration at risk from chemical information disruption? *Aquaculture and Fisheries*, 9(3), 378–387. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aaf.2023.05.009>

- Torronteras, R., Díaz-de-Alba, M., Granado-Castro, M. D., Espada-Bellido, E., Córdoba García, F., Canalejo, A., & Galindo-Riaño, M. D. (2024). Induction of Oxidative Stress by Waterborne Copper and Arsenic in Larvae of European Seabass (*Dicentrarchus labrax* L.): A Comparison with Their Effects as Nanoparticles. *Toxics*, *12*(2), 141. <https://doi.org/10.3390/toxics12020141>
- Tsai, K.-P. (2016). Management of Target Algae by Using Copper-Based Algaecides: Effects of Algal Cell Density and Sensitivity to Copper. *Water, Air, & Soil Pollution*, *227*(7), 238. <https://doi.org/10.1007/s11270-016-2926-8>
- Tunçsoy, M., Duran, S., Ay, Ö., Cıçık, B., & Erdem, C. (2017). Effects of Copper Oxide Nanoparticles on Antioxidant Enzyme Activities and on Tissue Accumulation of *Oreochromis niloticus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *99*(3), 360–364. <https://doi.org/10.1007/s00128-017-2129-z>
- Vale, G., Mehennaoui, K., Cambier, S., Libralato, G., Jomini, S., & Domingos, R. F. (2016). Manufactured nanoparticles in the aquatic environment-biochemical responses on freshwater organisms: A critical overview. *Aquatic Toxicology*, *170*, 162–174. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.019>
- Vasiliev, G., Kubo, A.-L., Vija, H., Kahru, A., Bondar, D., Karpichev, Y., & Bondarenko, O. (2023). Synergistic antibacterial effect of copper and silver nanoparticles and their mechanism of action. *Scientific Reports*, *13*(1), 9202. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-36460-2>
- Velikova, V., Yordanov, I., & Edreva, A. (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*, *151*(1), 59–66. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00197-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00197-1)
- Villarreal, F. D., Das, G. K., Abid, A., Kennedy, I. M., & Kültz, D. (2014). Sublethal Effects of CuO Nanoparticles on Mozambique Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) Are Modulated by Environmental Salinity. *PLOS ONE*, *9*(2), e88723. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088723>
- Wang, T., Chen, X., Long, X., Liu, Z., & Yan, S. (2016). Copper Nanoparticles and Copper Sulphate Induced Cytotoxicity in Hepatocyte Primary Cultures of *Epinephelus coioides*. *PLOS ONE*, *11*(2), e0149484. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149484>
- Wang, T., Long, X., Liu, Z., Cheng, Y., & Yan, S. (2015). Effect of copper nanoparticles and copper sulphate on oxidation stress, cell apoptosis and immune responses in the intestines of juvenile *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology*, *44*(2), 674–682. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.03.030>
- Wang, T., Wen, X., Hu, Y., Zhang, X., Wang, D., & Yin, S. (2019). Copper nanoparticles induced oxidation stress, cell apoptosis and immune response in the liver of juvenile *Takifugu fasciatus*. *Fish & Shellfish Immunology*, *84*, 648–655. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.10.053>

- Wan, J.-K., Chu, W.-L., Kok, Y.-Y., & Cheong, K.-W. (2018). Assessing the toxicity of copper oxide nanoparticles and copper sulfate in a tropical *Chlorella*. *Journal of Applied Phycology*, 30(6), 3153–3165. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1408-3>
- Williams, J. E., Isaak, D. J., Imhof, J., Hendrickson, D. A., & McMillan, J. R. (2015). Cold-Water Fishes and Climate Change in North America. In *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.09505-1>
- Woodbury, W., Spencer, A. K., & Stahmann, M. A. (1971). An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Analytical Biochemistry*, 44(1), 301–305. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90375-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90375-7)
- Woo, S.-J., Joo, M.-S., Kim, S.-S., Yoo, H.-K., & Park, J.-J. (2023). Histopathological and Immunohistochemical Features and Expression Patterns of Cytochrome p450 1 Family Genes in Black Rockfish (*Sebastes schlegelii*): Exposure to 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and  $\beta$ -Naphthoflavone. *Fishes*, 8(12), 583. <https://doi.org/10.3390/fishes8120583>
- Wu, F., Bortvedt, A., Harper, B. J., Crandon, L. E., & Harper, S. L. (2017). Uptake and toxicity of CuO nanoparticles to *Daphnia magna* varies between indirect dietary and direct waterborne exposures. *Aquatic Toxicology*, 190, 78–86. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.06.021>
- Xiao, Y., Peijnenburg, W. J. G. M., Chen, G., & Vijver, M. G. (2018). Impact of water chemistry on the particle-specific toxicity of copper nanoparticles to *Daphnia magna*. *Science of The Total Environment*, 610–611, 1329–1335. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.188>
- Yalsuyi, A. M., & Vajargah, M. F. (2017). Acute toxicity of silver nanoparticles in Roach (*Rutilus rutilus*) and Goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of Environmental Treatment Techniques*, 5(1), 1–4.
- Yamashita, M., Yabu, T., & Ojima, N. (2010). Stress protein HSP70 in fish. *Aqua-BioScience Monographs*, 3(4), 111–141. DOI:10.5047/absm.2010.00304.0111
- Yang, H., Liu, C., Yang, D., Zhang, H., & Xi, Z. (2009). Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. *Journal of Applied Toxicology*, 29(1), 69–78. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jat.1385>
- Yang, M.-D. H., Wang, Q., Zhao, R., Li, Q.-S., Cui, M.-S., Zhang, Y., & Li, J.-T. (2022). *Cyprinus carpio* (common carp). *Trends in Genetics*, 38(3), 305–306. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.11.002>
- Yavaş, C., & Gülsoy, N. (2024). Research Article: Comparative genotoxic and histopathological effects of copper nanoparticles and copper chloride in goldfish (*Carassius auratus*). *IFRO*, 23(3), 485–503. <http://jifro.ir/article-1-5580-en.html>

- Yih, T. C., & Al-Fandi, M. (2006). Engineered nanoparticles as precise drug delivery systems. *Journal of Cellular Biochemistry*, 97(6), 1184–1190. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jcb.20796>
- Yu, A., Li, P., Tang, T., Wang, J., Chen, Y., & Liu, L. (2015). Roles of Hsp70s in Stress Responses of Microorganisms, Plants, and Animals. *BioMed Research International*, 2015, 510319. <https://doi.org/10.1155/2015/510319>
- Yu, Q., Zhang, Z., Monikh, F. A., Wu, J., Wang, Z., Vijver, M. G., Bosker, T., & Peijnenburg, W. J. G. M. (2022). Trophic transfer of Cu nanoparticles in a simulated aquatic food chain. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 242, 113920. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113920>
- Zalecenie Komisji UE z dnia 10 czerwca 2022 r. dotyczącego definicji nanomateriałów. (2022). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/?uri=CELEX%3A32022H0614%2801%29>
- Zalecenie Komisji UE z dnia 18 października 2011 r. dotyczącego definicji nanomateriałów. (2011). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/ALL/?uri=CELEX%3A32011H0696>
- Zhang, W., Jia, Y., Ji, X., Zhang, R., Liang, T., Du, Q., & Chang, Z. (2016). Optimal Reference Genes in Different Tissues, Gender, and Gonad of Yellow River Carp (*Cyprinus carpio* var) at Various Developmental Periods. *Pakistan Journal of Zoology*, 48(6). <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20173330447>
- Zhu, Y., Zhang, Y., Shi, G., Yang, J., Zhang, J., Li, W., Li, A., Tai, R., Fang, H., Fan, C., & Huang, Q. (2015). Nanodiamonds act as Trojan horse for intracellular delivery of metal ions to trigger cytotoxicity. *Particle and Fibre Toxicology*, 12(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s12989-014-0075-z>
- Zia, R., Riaz, M., Farooq, N., Qamar, A., & Anjum, S. (2018). Antibacterial activity of Ag and Cu nanoparticles synthesized by chemical reduction method: A comparative analysis. *Materials Research Express*, 5(7), 075012. DOI: 10.1088/2053-1591/aacf70

**Publikacje wchodzące w skład rozprawy  
doktorskiej z oświadczeniami o współautorstwie**

## Publikacja 1

Sielska, A., Skuza, L., & Kowalska-Górska, M. (2022). The effects of silver and copper nanoparticles and selenium on *Salmo trutta* hatchlings. *Ecohydrology*, 15(7), e2453. <https://doi.org/10.1002/eco.2453>

IF: 2.6

MNiSW: 100 pkt.

### Wkład współautorów:

mgr Anna Sielska: 70%; walidacja, przeprowadzenie badań, wizualizacja wyników oraz pisanie, przegląd i redakcja manuskryptu.

dr hab. Lidia Skuza, prof. US: 10%; opracowanie koncepcji i metodologii badań, walidacja, analiza formalna, wykonanie części badań, przegląd i redakcja manuskryptu oraz nadzór badań i pisanie manuskryptu.

dr hab. inż. Monika Kowalska-Górska: 20%; opracowanie koncepcji i metodologii badań, walidacja oraz przygotowanie materiału biologicznego do badań.

Szczecin, 24.09.2024

## Oświadczenie

Dotyczący pracy

Sielska, A., Skuza, L., & Kowalska-Górska, M. (2022). The effects of silver and copper nanoparticles and selenium on *Salmo trutta* hatchlings. *Ecohydrology*, 15(7), e2453.  
<https://doi.org/10.1002/eco.2453>

Ja niżej podpisana mgr Anna Sielska oświadczam, że mój wkład w przygotowanie pracy wynosił 70% i polegał na walidacji, przeprowadzeniu badań, wizualizacji wyników oraz pisaniu, przeglądzie i redakcji manuskryptu.

Podpis

Anna Sielska



Szczecin, 17.09.2024

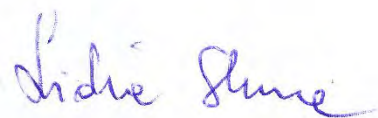
## Oświadczenie

dotyczące artykułu

Sielska, A., Skuza, L., & Kowalska-Górska, M. (2022). The effects of silver and copper nanoparticles and selenium on *Salmo trutta* hatchlings. *Ecohydrology*, 15(7), e2453.  
<https://doi.org/10.1002/eco.2453>

Ja niżej podpisana dr hab. Lidia Skuza, prof. US oświadczam, że mój wkład w przygotowanie pracy wynosił 10% i polegał na opracowaniu koncepcji i metodologii badań, walidacji, analizie formalnej, wykonaniu części badań, przeglądzie i redakcji manuskryptu oraz nadzorze badań i pisania manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby praca stanowiła części rozprawy doktorskiej mgr Anny Sielskiej.



Podpis

Wrocław, 16.09.2024

## Oświadczenie

dotyczące artykułu

Sielska, A., Skuza, L., & Kowalska-Górska, M. (2022). The effects of silver and copper nanoparticles and selenium on *Salmo trutta* hatchlings. *Ecohydrology*, 15(7), e2453.

<https://doi.org/10.1002/ecco.2453>

Ja niżej podpisana dr hab. inż. Monika Kowalska-Górska oświadczam, że mój wkład w przygotowanie pracy wynosił 20% i polegał na opracowaniu koncepcji i metodologii badań, walidacji oraz przygotowaniu materiału biologicznego do badań.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby praca stanowiła części rozprawy doktorskiej mgr Anny Sielskiej.



Podpis

This is the peer reviewed version of the following article: Sielska, A., Skuza, L., & Kowalska-Górska, M. (2022). The effects of silver and copper nanoparticles and selenium on *Salmo trutta* hatchlings. *Ecohydrology*, 15(7), e2453. <https://doi.org/10.1002/eco.2453>, which has been published in final form at <https://doi.org/10.1002/eco.2453>. This article may be used for non-commercial purposes in accordance with Wiley Terms and Conditions for Use of Self-Archived Versions. This article may not be enhanced, enriched or otherwise transformed into a derivative work, without express permission from Wiley or by statutory rights under applicable legislation. Copyright notices must not be removed, obscured or modified. The article must be linked to Wiley's version of record on Wiley Online Library and any embedding, framing or otherwise making available the article or pages thereof by third parties from platforms, services and websites other than Wiley Online Library must be prohibited.

Skuza Lidia (Orcid ID: 0000-0002-6362-844X)

The effects of silver and copper nanoparticles and selenium on *Salmo trutta* hatchlings.

Anna Sielska<sup>1,2,4,\*</sup>, Lidia Skuza<sup>1,2,\*</sup> and Monika Kowalska-Górska<sup>3,\*</sup>

1 Institute of Biology, University of Szczecin, PL-71-415, Szczecin, Poland

2 Centre for Molecular Biology and Biotechnology, University of Szczecin, PL-71-415, Szczecin, Poland

3 Department of Hydrobiology and Aquaculture, Faculty of Biology and Animal Science, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Norwida 25, 50-375 Wrocław, Poland

4 Doctoral School, University of Szczecin, PL-70-383, Szczecin, Poland

\* Correspondence: Anna Sielska: [anna.sielska@usz.edu.pl](mailto:anna.sielska@usz.edu.pl), 91 444 1564, Lidia Skuza: [lidia.skuza@usz.edu.pl](mailto:lidia.skuza@usz.edu.pl), 91 444 1535, Monika Kowalska-Górska: [monika.kowalska-gorska@upwr.edu.pl](mailto:monika.kowalska-gorska@upwr.edu.pl), 71 3205870

ORCID: Anna Sielska: 0000-0001-6019-2997; Monika Kowalska-Górska: 0000-0001-9614-2000 ; Lidia Skuza: 0000-0002-6362-844X

**Abstract:** With the increase of nanotechnology applications, the risk of environmental adverse effects has emerged. It is known that nanoparticles (NPs) can induce oxidative stress, cause organ and DNA damage or increase mortality rate in organisms, especially aquatic organisms. The present study aimed to investigate the potential genotoxicity of selenium, several nanoelements of copper and a commercial product containing ionic silver colloids on *Salmo trutta* hatchlings based on the use of the polymerase chain reaction (PCR) approach, and assess in a second step whether the addition of selenium and nanoparticles of copper and silver improves PCR precision and efficiency. Sea trout eggs were incubated in NPs solutions. Before presenting the results, PCR analysis and agarose gel electrophoresis were made. DNA of hatchlings from the eggs incubated in copper NPs were less degraded than those incubated in silver colloids or selenium, and in the second phase of the study a PCR product was only generated for samples incubated in selenium (Se). In agarose gel electrophoresis of isolates containing copper compounds, products were obtained in all samples, except for those containing 0.125 and 1.0 nM of Cu, and 0.25 and 1.0 nM of CuZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. It has been shown that genotoxic effects of tested nanoparticles vary in a concentration-dependent manner. Copper compounds did not interfere with PCR efficiency, except for CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, which improved product quality in all tested concentrations. Presented results give an opportunity for further studies on the effects of NPs on PCR reaction and genotoxicity.

**Keywords:** Copper nanoparticles; Silver nanoparticles; Selenium; *Salmo trutta* hatchlings; PCR

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1002/eco.2453

**Significance statement:** The present study aimed to investigate the potential genotoxicity of released to aquatic environment selenium, several nanoelements of copper and a commercial product containing ionic silver colloids on aquatic organisms, such as *Salmo trutta* hatchlings based on the use of the polymerase chain reaction (PCR) approach, and assess in a second step whether the addition of selenium and nanoparticles of copper and silver improves PCR precision and efficiency.

## 1. Introduction

There has been an increasing risk of environmental pollution (including soil, air, and both fresh and salt water) with the increase in production of nanomaterials and the unlimited possibilities of their use in industrial products (Colvin, 2003). The uptake of nanoparticles (NPs) in the aquatic environment is largely the result of anthropogenic influences (Domerq *et al.*, 2018). Recognition of the environmental impact of Ag NPs released into the environment from medical products, cosmetics, finishing treatments for clothing and leather goods, and other products is very difficult, because Ag NPs of different size and spatial structure, and thus chemical composition, have different effects on microorganisms. Ag NPs entering the environment, like all heavy metals, interact with abiotic and biotic factors and enter natural waters and plant tissues, including those which constitute food for humans and animals. Physicochemical changes affecting Ag, which occur in the oceans at different depths, contribute to the aggregation of NPs. In both salt and fresh water, aggregates of Ag and Cu NPs can sink to the bottom, which may pose a threat to benthic organisms feeding in those areas (Klaine *et al.*, 2008). Cu has many preventive applications because, like commercially used Ag, it possesses biocidal properties. For this reason, among others, Cu has begun to be used in commercial formulations. The widespread use of biocides makes it necessary to study their impact on the aquatic environment and fish.

Aquatic environments are considered to be among the most vulnerable, as this is where all pollutants, including nanopollutants, are eventually deposited. There are quite a few different nanopreparations available on the market today. Some of the most widely studied include nano copper(II) oxide (CuO) and nano Cu. In Poland, the average Se concentration in freshwater is about  $0.05 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ , and as such is lower than the amounts from other regions of the world where symptoms of excess Se have been recorded (May *et al.*, 2008; Niedzielski *et al.*, 2000). Research has shown that Se deficiency occurs in more than 70% of the areas in Poland, which other studies have also confirmed (Dębski *et al.*, 2001; Zabłocki, 1990). Se is less bioavailable from plant foods (e.g. broccoli) than from animal foods. In terms of its content in meat, the highest concentration of Se among consumed food products is found in fish (Fox *et al.*, 2004; Navarro-Alarcon and Cabrera-Vique, 2008). However, most of the publications on this element are from other countries (e.g. United States, Canada, Japan) and involve high concentrations that do not occur in Poland. Harmful effects of Se occur when physiologically permissible quantities in Se-contaminated areas exceed up to  $1 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$  (Vinceti *et al.*, 2013). Se bioaccumulation is observed in fish (Kowalska-Góralaska *et al.*, 2004; Kowalska-Góralaska *et al.*, 2011), and attention has also been drawn to the fact that Se concentrations are higher in predators, which would also confirm its biomagnification potential (Kowalska-Góralaska *et al.*, 2015).

Contamination of water bodies with nanoelements is associated with increased mortality and reduced breeding of fish, including in *Salmo trutta*, as a result of disturbances in DNA

replication, among others. There are many reports in the literature on the cytotoxic and genotoxic effects of NPs, such as silver (Ag) and copper (Cu) ions as well as zinc oxide (ZnO), on living organisms (Gomes *et al.*, 2013; Klaine *et al.*, 2008). Previous studies have shown that Ag NPs can inhibit cell growth and reproduction and affect human health (Ahamed *et al.*, 2010), as well as affect the metabolism of other organisms. Ag ions show very high toxicity in aquatic organisms, causing changes in their morphology and gene profile (Vale *et al.*, 2016). It is well known that the youngest organisms, including fish larvae still developing in the ovum, are always the most vulnerable to the impact of toxic compounds. Increased mortality as early as the hatching stage can contribute to both ecological and economic damage when NPs affect farmed fish species such as sea trout (*Salmo trutta*) and carp (*Cyprinus carpio*). Hence, it would be of interest to study the effects of NPs on this age group of fish.

CuO NPs regulated the expression of the cell cycle checkpoint protein p53 and the DNA repair proteins Rad51 and MSH2. These results show that CuO NPs have genotoxic potential in A549 cells; however, it is not entirely known whether CuO NPs also show genotoxic potential in other cells (Brun *et al.*, 2014). It was suggested that Cu NPs, in particular, have an effect on glutathione peroxidase (GPx) inhibition (Fahmy and Cormier, 2009). There are literature data confirming the negative effects of Cu NPs on physiology and morphology as well, e.g. the negative influence of high Cu concentrations, especially in ionic form, on sperm motility in *Salmo trutta*, resulting in reduced reproduction (Kowalska-Góralaska *et al.*, 2019). In addition, *Cyprinus carpio* and *Oncorhynchus mykiss* showed damage to the liver, kidneys, and gills, worsening with increasing dose (Al-Bairuty *et al.*, 2013; Gupta *et al.*, 2016). Selenium (Se), on the other hand, has an antagonistic effect, counteracting the formation of oxidative stress. Se has many important physiological functions, which were only discovered when it was found that Se deficiency was also harmful (Holben and Smith, 1999). Se has an antioxidant effect, stimulates immune processes, has an anticancer effect, and is involved in the proper functioning of the thyroid gland, male reproductive processes (e.g., testosterone metabolism), and is essential for foetal growth. Supplying Se in too low of quantities causes deficiency symptoms, while amounts ten times higher than optimal can start to be toxic (Hartikainen, 2004; Wysocka and Bulska, 2002). It can be expected that the addition of Se influences the correct functioning of oxygen stress enzymes. Numerous studies have been undertaken to test the effect of Se as a dietary component of many fish species. Se in the diet of hatchery fish such as *Poecilia reticulata* has been shown to positively affect growth and biochemical parameters (Ziaei-nejad *et al.*, 2020). Furthermore, in *Dicentrarchus labrax*, Se NPs administered daily at a dose of 1 mg kg<sup>-1</sup> improved growth, hematobiochemical parameters, antioxidant enzyme activity, and immune response (Abd El-Kader *et al.*, 2020). Similar results for immunological and antioxidant parameters were also obtained for *Oreochromis niloticus* (Dawood *et al.*, 2020). However, supplementation at appropriate doses is required. It has also been shown that excessive doses of selenomethionine (Se-Met) have toxic effects on *Carassius auratus* by decreasing antioxidant gene expression and liver damage (Bai *et al.*, 2019).

Some studies have been conducted on the effect of nanoelements on PCR reaction efficiency, but they mainly concern Au NPs (Cao *et al.*, 2012) potentially together with titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) NPs (Dantas *et al.*, 2017), although there are also reports on nanometals in general (Pan *et al.*, 2011). There is a lack of literature data on *Salmo trutta*, which can be a source of food for animals and humans. Studies on the use of gold (Au) NPs show that some NPs have a beneficial effect on polymerase chain reaction (PCR) precision, despite biocidal, destructive

interactions. It is unknown, however, whether NPs other than Au also have a beneficial effect on PCR precision (Cao *et al.*, 2012; Shen *et al.*, 2009). The PCR method is used as a model system for *in vitro* DNA replication to assess the genotoxicity of NPs.

The aim of this study was to investigate the effect of selected nanoelements, such as Ag NPs and Cu ions in different compounds, on the degree of DNA degradation, as well as Cu NPs, CuO NPs, copper iron oxide (CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) NPs, copper zinc iron oxide (CuZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) NPs. This study also investigates the effect of Se (an element with a specific role in the action of oxygen stress enzymes) on the efficiency of the amplification reaction (PCR) of the COI gene – the mitochondrial cytochrome c oxidase I gene in *Salmo trutta* DNA isolates. Furthermore, this research examines the ability of Cu NPs to improve the precision of PCR. Isolates of *Salmo trutta* hatchlings incubated in solutions with different concentrations of selected Cu nanoelements were used as DNA matrices in PCR reactions to investigate the effect of nanoelements on the replication mechanism *in vitro*.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Standards and solutions

Copper nanopowder in the form of Cu nanopowder (Aldrich 794317), CuO (Aldrich 544868-5G), CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (Aldrich 641723-10G), CuZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (Aldrich 641650-10G), commercially used colloidal silver in a form of Ag (50ppm) (Vitacoloids), and selenium standard solution in the form of Se in the form of SeO<sub>2</sub> in HNO<sub>3</sub> (Merck 119796) were used. They were diluted in distilled water.

Solutions obtained from the previously described compounds were used for analyses. A solution of 1 mg·dm<sup>-3</sup> was initially prepared to obtain the test concentration. The suspensions were sonicated in an ultrasonic bath for 30 min, and the suspensions were vortexed before each use (Kowalska-Górska *et al.*, 2019). Solutions of Se and nanoelements were prepared at concentrations ranging from 1.0 to 0.0625 nM (nominal concentrations). Stock suspensions of 1.0 to 0.0625 nM of tested compounds were prepared by mixing the compounds in deionized buffered water. The weight of the compounds mixed were from 0.0625 to 8.0 mg·dm<sup>-3</sup> for Cu NPs (Cu, CuO, CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, CuZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>); from 0.5 to 8.0 mg·dm<sup>-3</sup> for Ag; and from 0.5 to 16.0 mg·dm<sup>-3</sup> for Se.

### 2.2. Experiment on the incubation of sea trout eggs

The biological material used in this study were the *Salmo trutta* hatchlings obtained after conducting the egg incubation experiment. After fertilization (i.e., mixing the eggs with sperm and rinsing) the eggs were separated into groups of 50. Eggs were soaked in water for approximately 3 hours to allow them to swell before adding NPs and Se. Different concentrations of Se and Ag (from a commercially available preparation) were added to the water. During the swelling stage, eggs absorb pollutants, such as heavy metals, the most. After swelling, the eggs were rinsed and distributed into baskets placed in closed circuit water. The control group was not treated with Cu, Ag or Se. After obtaining the hatchlings, the samples were preserved in alcohol for DNA analysis. This study did not require ethical approval.

### 2.3. Genotoxicity assessment

Genotoxicity was studied by evaluating the degree of DNA degradation induced by the test materials: selenium (0.5–16.0 mg dm<sup>-3</sup>), Cu-NPs (0.5-8.0 mg dm<sup>-3</sup>) and Ag- NP (0.5-8.0 mg

dm-3). DNA was isolated using DNeasy Blood & Tissue Kits (Qiagen) reagents according to the method provided by the manufacturer. Both DNA quality and concentration were assessed using agarose gel electrophoresis and spectrophotometry. DNA isolates were diluted to a concentration of 100 ng  $\mu$ l<sup>-1</sup>, and 1  $\mu$ l of DNA was placed in 0.8% agarose gel to assess degradation.

#### 2.4. PCR precision and efficiency study

The effect of nanoelements and selenium on the specificity of the PCR was studied by adding 1 mg dm<sup>-3</sup> of Ag-NP, 1 mg dm<sup>-3</sup> of Cu-NPs and 1 mg dm<sup>-3</sup> of selenium to the second PCR amplification step, which was performed with control DNA as template. In the study described in this paper, the COI gene was used. This gene is one of the most conserved genes found in the mitochondrial genome of animals (Folmer *et al.*, 1994). It encodes the first subunit of cytochrome c oxidase. It is used to study phylogenetic relationships between invertebrates, among other things (Folmer *et al.*, 1994). The diversity of the sequences makes it possible to use this gene in the DNA barcoding of animals and to classify them into appropriate taxonomic groups. For this reason, it was decided to examine the influence of nanoelements on the efficiency of PCR reactions using primers universal for this gene (Hebert *et al.*, 2003). To obtain reliable, comparable results, the reaction was also carried out without the addition of nanoelements. In the last step of PCR, COI gene amplification reactions of all DNA isolates were performed with the addition of both selenium and NPs, using the same abovementioned concentrations. The reaction was performed in duplicate in a thermocycler (Bio-Rad) with a final volume of 25  $\mu$ l using universal primers for COI mtDNA gene amplification (Folmer *et al.*, 1994). A single PCR reaction mixture contained one PCR buffer, 0.24 mM of dNTPs, 0.5  $\mu$ M of each primer, 100 ng of genomic DNA, and 1U of HotStarTaq DNA polymerase. Control sample contained PCR buffer, 0.24 mM of dNTPs, 0.5  $\mu$ M of each primer, 100 ng of genomic DNA (from control group), and 1U of HotStarTaq DNA polymerase (Qiagen). In order to test the effect of NPs on PCR reaction efficiency, the PCR reaction matrix in the first step used DNA isolates from hatchlings incubated in different Se, Ag, and Cu solutions. No nanoelements were added to the reaction tube to check the preliminary amplification result. In the next step, PCR reactions were performed with control DNA as the template and with the addition of 2  $\mu$ l of the respective NPs to the reaction mixture. In the last step of the study, COI amplification reactions of all DNA isolates were performed with the addition of 2  $\mu$ l of the respective NPs. The optimal PCR program for COI amplification included an initial denaturation (at 95°C for 15 min) followed by 35 cycles, including denaturation at 95°C (for 45 s), primer annealing at 50°C (for 45 s), primer extension at 72°C (for 1 min), followed by a final extension step at 72°C for 10 min. PCR products were checked by electrophoresis in 1.5% (m/v) agarose gels containing Midori Green and TBE (Tris, boric acid, and EDTA) buffer, in an electrophoretic apparatus (Biosan); gels were visualised under ultraviolet light in an apparatus from Bio-Rad. Gels were analysed and archived using Molecular Imager GelDoc XR software. Products were scored and analysed using Quantity One software (Bio-Rad). Product size was determined by comparison with a DNA marker.



### 3. Results

For Se and Ag, there were no apparent differences in the electrophoretic analysis of 1  $\mu\text{l}$  of DNA isolates obtained from fertilized eggs (Fig.1). The electrophoretic images for Se and Ag were similar, both showing high molecular weight DNA at varying levels of contamination. However, in the case of isolates from hatchlings incubated in Cu, differences were evident compared to the other NPs tested.

At the next stage of the study, the occurrence of a product of the expected length was found only in material incubated in Se (the most intense in concentrations of 4.0 and 8.0  $\text{mg dm}^{-3}$ ) (Fig.2). In the remaining cases, the nanoelements negatively influenced the ability to obtain products in the PCR reaction. Lack of products may indicate the complete inhibition of amplification of genetic material by these nanoelements.

In the next step, amplification reactions of the COI gene were performed with the control sample as the matrix and with the addition of the studied nanoelements to the reaction mixture. As a result of this analysis, the expected products were obtained in all samples, except for those containing 0.125 and 1.0 nM of Cu, and 0.25 and 1.0 nM of  $\text{CuZnFe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{CuFe}_2\text{O}_4$  (Fig.3).  $\text{CuFe}_2\text{O}_4$  was the only nanoelement that improved PCR quality for all concentrations tested. For the other nanoelements, it was difficult to draw clear conclusions. COI amplification reactions of all DNA isolates with all analysed nanoelements (320 amplification reactions in total) resulted in products being obtained only in the PCR reactions that used 0.5 and 8.0  $\text{mg dm}^{-3}$  of Ag; in the other cases, no products were obtained. This may suggest that these two Ag concentrations are the most optimal for PCR reactions.

### 4. Discussion

The hatchlings of *Salmo trutta* feed on, among other things, insect larvae found at the bottom of water bodies (Klemetsen *et al.*, 2003). During feeding, they may take up a small amount of bottom sediment containing aggregates of nanoelements, which can result in the accumulation of these elements in the fish's body. Sea trout meat is consumed by many species, including humans, which contributes to further contamination with nanoelements. In addition, the potentially reduced hatching percentage of *Salmo trutta* exposed to nanoelements may contribute to the gradual extinction of the species or to economic losses associated with their farming. These fish can serve as bioindicators of metal contamination in water bodies, including nanoelements. Hepatic metallothionein levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) have been shown to increase in line with increased water pollution by heavy metals such as Cu, cadmium, and zinc (Roch *et al.*, 1982). Thus, it may be possible to estimate the threat of environmental pollution by metal nanoelements. Unfortunately, there is a lack of studies regarding the effect of Cu compounds (e.g.  $\text{CuZnFe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{CuFe}_2\text{O}_4$ ) on *Salmo trutta* hatchlings or whether they improve or deteriorate PCR efficiency. Due to this, the study presented in this manuscript shows some interesting data regarding genotoxicity and Nano-PCR.

Nano-PCR is an emerging technique of DNA amplification. It incorporates into its methodology the use of metallic NPs or nanostructures in order to improve PCR efficiency (Yuce *et al.*, 2014). This method is widely used in detection methods in the fields of virology (SARS-CoV-2, gene mutations), as well as in parasitology (waterborne parasites) (Rahimkhoei *et al.*, 2021; Xue *et al.*, 2021; Gabriel *et al.*, 2018). The increase of concentration of amplified

genomic fish DNA by gold NPs (Jeong et al, 2015) suggests that other nanoparticles, such as copper NPs, can show similar properties. Besides commonly used gold nanoparticles and graphene (Vanzha *et al.*, 2016; Ali *et al.*, 2018), there is data, which shows that other NPs can also improve PCR efficiency. Gabriel *et al* (2018) confirmed that the addition of copper oxide, alumina, graphene or their combinations to reaction mixture enhances PCR by increasing the density or improving the fidelity of product obtained from three species of amoebae.

In this study, the effects of selected nanoelements (i.e., Ag, Cu) and Se on DNA degradation and PCR reaction performance were analysed. Analysis of the degree of degradation of DNA isolated from *Salmo trutta* hatchlings incubated in different concentrations of Ag, Cu and Se, showed that there was no negative effect of these nanoelements on DNA; the lowest degradation of genetic material was characteristic of isolates from material incubated in Cu ions, regardless of the concentration of these ions. Ahamed *et al.* (2010) pointed out the lack of comprehensive knowledge of nanoelement toxicology, although Ag NPs are known to affect cell membranes and also genetic material (Ahamed *et al.*, 2010). Asharani *et al.* (2008) also demonstrated that *Danio rerio* embryos treated with different concentrations of Ag ions showed degeneration of the body and a bent dorsal strut due to the inhibition of cell division by these ions (Asharani *et al.*, 2008). High mortality and delays in hatching were also observed. Ag ions also accumulated in the cell nucleus, leading to damage and destabilisation of the genome. Similarly, Bacchetta *et al.* (2017) reported that Ag ions induced changes in the morphology and gene profile of *Piaractus mesopotamicus* (Bacchetta *et al.*, 2017).

The presence of Cu in both oxidised and reduced form means that it functions as a cofactor in many enzymes. It can be displaced from membrane proteins by heavy metals, such as cadmium, resulting suppression of antioxidant enzymes (Emmanouil *et al.*, 2007; Filipič *et al.*, 2006). Cu is necessary for the proper functioning of all known living organisms and is responsible for the production of energy in each cell, as well as for the removal of free radicals (e.g., superoxide dismutase). The presence of CuO causes the formation of ROS. It is assumed that the breakdown of CuO is the main cause of DNA damage and the formation of ROS, which can additionally contribute to mutations in genetic material. CuO NPs increase gene transcription (Vale *et al.*, 2016). CuO also induces oxidative stress and disrupts cell membrane integrity (Ahamed *et al.*, 2010). It has been shown that Cu ions induce very high DNA damage in *Anodonta anatina* gill cells (Sohail *et al.*, 2017). It has also been shown that Cu in ionic form causes more damage to genetic material than in nanoparticle form (Gomes *et al.*, 2013).

Se particles are increasingly used in the electronics industry and medicine (Barnaby *et al.*, 2011). Studies have not employed Se NPs, but a publication by Li *et al.* (2008) showed that Se NPs are less toxic than Se atoms or selenite; however, the toxicity may depend on the species exposed to it. In addition, Se NPs have shown therapeutic and anti-cancer properties. Se has antioxidant and antimicrobial properties (e.g., it inhibits the growth of *Staphylococcus aureus*, among others) (Geoffrion *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2008; Tran and Webster, 2011). Se particles can also be used as biosensors to detect hydrogen peroxide and compounds that remove toxic forms of Se from the environment and reduce mercury in water (Jiang *et al.*, 2012; Prasad *et al.*, 2015; Wadhvani *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2010).

Results indicating no significant effect on the quantity and quality of isolated fry DNA incubated in different nanoelements (positive result) were obtained for all DNA samples incubated in Cu, Ag, and Se ions at concentrations of 0.5–16.0 nM (Fig.1). However, DNA

isolates from material incubated in Se and Ag solutions showed significant degradation, as well as RNA contamination, compared to samples incubated in Cu solutions. The Cu samples were clearly less degraded and contaminated with RNA (Fig.1), which suggests the lack of any effect from incubation in Cu NPs on the quality of DNA isolates. It can be concluded that Cu ions do not adversely affect genetic material at the isolation level. The effect of nanoelement concentration was studied in the PCR amplification reaction, which is the primary method used in molecular laboratories. The PCR reaction can produce nonspecific, erroneous products that complicate diagnosis and identification. Unfortunately, despite many studies related to the effect of Au on PCR reaction efficiency, there are little data in the world literature on Ag and Cu nanoelements.

In analyses of the effect of selected NPs on the specificity of the PCR reaction, positive results were obtained for control samples containing no nanoelements (DNA samples isolated from fertilized incubated in Se, Ag, and Cu ions)(Fig.2) and for the following samples: 0.5, 0.25 and 0.0625 nM of Cu; 1.0, 0.5, 0.125 and 0.0625 nM of CuO; 1.0-0.0625 nM of  $\text{CuFe}_2\text{O}_4$ ; and 0.5, 0.125 and 0.0625 nM of  $\text{CuZnFe}_2\text{O}_4$  (Fig.3). Negative results were observed in the remaining samples. This indicates the genotoxicity of these NPs, but only at certain concentrations. A linear, direct relationship was not observed. The summary of shown results is presented in table 1.

It can be concluded that the negative effect of these nanoelements depends on their concentration. These ions probably interfere with and inhibit the DNA replication process in vitro (i.e., in the PCR reaction) as well as in the cells of living organisms. There is a risk of disturbing the reliability of amplification results when using samples taken from organisms that inhabit regions or habitats contaminated by these nanoelements.

## 5. Conclusion

The negative effects of the tested nanoelements depended upon their concentration. Cu-bearing compounds such as CuO,  $\text{CuFe}_2\text{O}_4$ , and  $\text{CuZnFe}_2\text{O}_4$  did not interfere with PCR efficiency, even if the material had been previously treated with Ag ions at the lowest and highest concentrations (0.5 and 8.0 nM, respectively). The study also suggests a protective effect exerted by Se, which can be further investigated in the next research. This study gives also an opportunity to expand the research to other nanoparticles, verifying their potential effect on genotoxicity and PCR reaction. Dose-dependent genotoxicity of Cu must be investigated.

**Author Contributions:** Conceptualization, L.S. and M. K.-G. methodology, L.S.; validation, A.S., L.S. and M.K.-G.; formal analysis, L.S.; investigation, A.S and L.S.; resources, M.K.-G.; writing—original draft preparation, A.S.; writing—review and editing, L.S. and A.S.; visualization, A.S.; supervision, L.S.. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** Not Applicable.

**Conflicts of Interest:** Not applicable.

**Ethical Statements:** Not applicable.

## 6. References

1. Abd El-Kader, M.F., Fath El-Bab, A.F., Shoukry, M., Abdel-Warith, A.-W.A., Younis, E.M., Moustafa, E.M.,... & Dawood, M. A. (2020). Evaluating the possible feeding strategies of selenium nanoparticles on the growth rate and wellbeing of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquac Reports*, 18, 100539. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100539>
2. Ali, Z., Jin, G., Hu, Z., Wang, Z., Khan, M.A., Dai, J. and Tang, Y. (2018). A review on NanoPCR: history, mechanism and applications. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 18(12), 8029-8046. <https://doi.org/10.1166/jnn.2018.16390>
3. Ahamed, M., AlSalhi, M.S., Siddiqui, M.K.J. (2010). Silver nanoparticle applications and human health. *Clin Chim Acta*, 411(23), 1841–1848. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.08.016>
4. Ahamed, M., Siddiqui, M.A., Akhtar, M.J., Ahmad, I., Pant, A.B., Alhadlaq, H.A. (2010). Genotoxic potential of copper oxide nanoparticles in human lung epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 396(2), 578–583. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.04.156>
5. Al-Bairuty, G.A., Shaw, B.J., Handy, R.D., Henry, T.B. (2013). Histopathological effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on the organs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol*, 126, 104–115. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.10.005>
6. Asharani, P.V., Lian, W.Y., Gong, Z., Valiyaveetil, S. (2008). Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnol.*, 19(25), 255102. <http://dx.doi.org/10.1088/0957-4484/19/25/255102>
7. Bacchetta, C., Ale, A., Simoniello, M.F., Gervasio, S., Davico, C., Rossi, A.S.,... & Cazenave, J. (2017). Genotoxicity and oxidative stress in fish after a short-term exposure to silver nanoparticles. *Ecol Indic*, 76, 230–239. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.01.018>
8. Bai, Z., Ren, T., Han, Y., Rahman, M.M., Hu, Y., Li, Z. & Jiang, Z. (2019). Influences of dietary selenomethionine exposure on tissue accumulation, blood biochemical profiles, gene expression and intestinal microbiota of *Carassius auratus*. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol*, 218, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.12.001>
9. Barnaby, S.N., Frayne, S.H., Fath, K.R., Banerjee, I.A. (2011). Growth of Se Nanoparticles on Kinetin Assemblies and their Biocompatibility Studies. *Soft Mater*, 9(4), 313–334. <https://doi.org/10.1080/1539445X.2010.516302>
10. Brun, N.R., Lenz, M., Wehrli, B., Fent, K. (2014). Comparative effects of zinc oxide nanoparticles and dissolved zinc on zebrafish embryos and eleuthero-embryos: Importance of zinc ions. *Sci Total Environ*, 476–477, 657–666. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.01.053>
11. Cao, X., Shen, M., Zhang, X., Hu, J., Wang, J., Shi, X. (2012). Effect of the surface functional groups of dendrimer-entrapped gold nanoparticles on the improvement of PCR. *Electrophoresis*, 33(16), 2598–2603. <https://doi.org/10.1002/elps.201200061>
12. Colvin, V.L. (2003). The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nat Biotechnol*, 21(10), 1166–1170. <https://doi.org/10.1038/nbt875>

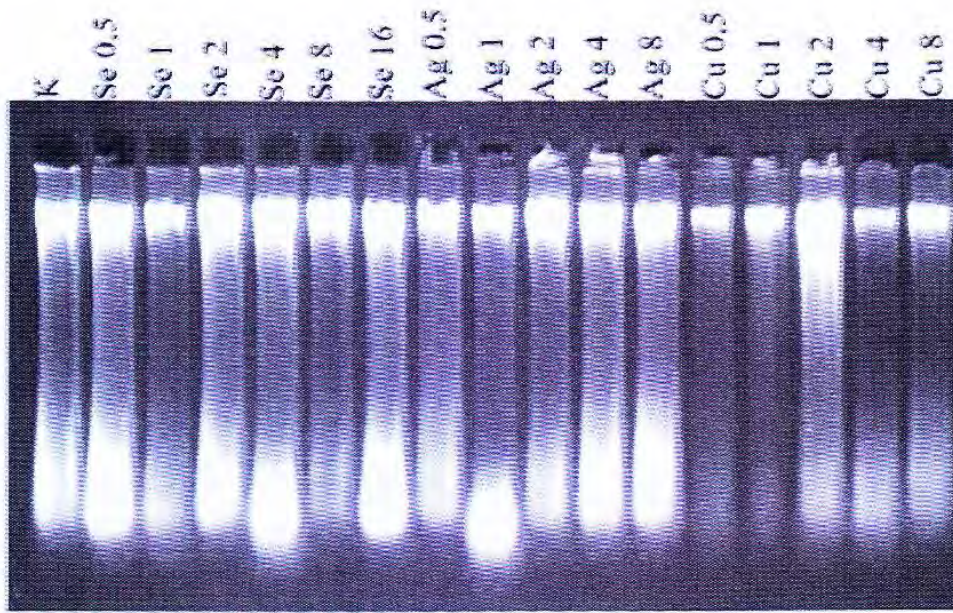
13. Dantas, P.V.P., Melo, C.F., Houllou, L.M., Machado, G. (2017). Nanoparticle-assisted Polymerase Chain Reaction (NanoPCR): Optimization of PCR detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* by the addition of nanoparticles. *J Appl Adv Res.*, 2(1), 13–20.
14. Dawood, M.A.O., Zommara, M., Eweedah, N.M., Helal, A.I. (2020). The evaluation of growth performance, blood health, oxidative status and immune-related gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed dietary nanoselenium spheres produced by lactic acid bacteria. *Aquaculture*, 515, 734571. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734571>
15. Dębski, R.E., Parsons, I.M., Woo, S.L.-Y., Fu, F.H. (2001). Effect of Capsular Injury on Acromioclavicular Joint Mechanics. *JBJS*, 83(9). [https://journals.lww.com/jbjsjournal/Fulltext/2001/09000/Effect\\_of\\_Capsular\\_Injury\\_on\\_Acromioclavicular.9.aspx](https://journals.lww.com/jbjsjournal/Fulltext/2001/09000/Effect_of_Capsular_Injury_on_Acromioclavicular.9.aspx)
16. Domercq, P., Praetorius, A., Boxall, A.B.A. (2018). Emission and fate modelling framework for engineered nanoparticles in urban aquatic systems at high spatial and temporal resolution. *Environ Sci Nano*, 5(2), 533–543. <http://dx.doi.org/10.1039/C7EN00846E>
17. Emmanouil, C., Sheehan, T.M.T., Chipman, J.K. (2007). Macromolecule oxidation and DNA repair in mussel (*Mytilus edulis* L.) gill following exposure to Cd and Cr(VI). *Aquat Toxicol*, 82(1), 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.01.009>
18. Fahmy, B., Cormier, S.A. (2009). Copper oxide nanoparticles induce oxidative stress and cytotoxicity in airway epithelial cells. *Toxicol Vitro*, 23(7), 1365–1371. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.03.013>
19. Filipič, M., Fatur, T., Vudrag, M. (2006). Molecular mechanisms of cadmium induced mutagenicity. *Hum Exp Toxicol*, 25(2), 67–77. <https://doi.org/10.1191/0960327106ht590oa>
20. Folmer, O., Hoeh, W.R., Black, M.B., Vrijenhoek, R.C. (1994). Conserved primers for PCR amplification of mitochondrial DNA from different invertebrate phyla. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 3(5), 294–299.
21. Fox, T.E., Van den Heuvel, E.G.H.M., Atherton, C.A., Dainty, J.R., Lewis, D.J., Langford, N.J.,.... & Fairweather-Tait, S. J. (2004). Bioavailability of selenium from fish, yeast and selenate: a comparative study in humans using stable isotopes. *Eur J Clin Nutr*, 58(2), 343–349. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601787>
22. Gabriel, S., Rasheed, A.K., Siddiqui, R., Appaturi, J.N., Fen, L.B. and Khan, N.A., (2018). Development of nanoparticle-assisted PCR assay in the rapid detection of brain-eating amoebae. *Parasitology research*, 117(6), 1801-1811. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5864-0>
23. Geoffrion, L.D., Hesabizadeh, T., Medina-Cruz, D., Kasper, M., Taylor, P., Vernet-Crua, A.,.... & Guisbiers, G. (2020), Naked Selenium Nanoparticles for Antibacterial and Anticancer Treatments. *ACS Omega* 5(6): 2660–2669. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03172>
24. Gomes, T., Araújo, O., Pereira, R., Almeida, A.C., Cravo, A., Bebianno, M.J. (2013). Genotoxicity of copper oxide and silver nanoparticles in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar Environ Res*, 84, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.11.009>

25. Gupta, Y.R., Sellegounder, D., Kannan, M., Deepa, S., Senthilkumaran, B., Basavaraju, Y. (2016). Effect of copper nanoparticles exposure in the physiology of the common carp (*Cyprinus carpio*): Biochemical, histological and proteomic approaches. *Aquac Fish*, 1, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2016.09.003>
26. Hartikainen, H. (2005). Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. *J Trace Elem Med Biol*, 18(4), 309–318. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2005.02.009>
27. Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S., de Waard, J.R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc R Soc London Ser B Biol Sci*, 270, S96–S99. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>
28. Holben, D.H., Smith, A.M. (1999). The Diverse Role of Selenium within Selenoproteins: A Review. *J Am Diet Assoc*, 99(7), 836–843. [https://doi.org/10.1016/S0002-8223\(99\)00198-4](https://doi.org/10.1016/S0002-8223(99)00198-4)
29. Jeong, H.Y., Baek, S.H., Chang, S.J., Yang, M., Lee, S.J., Lee, K.G. and Park, T.J. (2015). A hybrid composite of gold and graphene oxide as a PCR enhancer. *RSC advances*, 5(113), 93117–93121. <https://doi.org/10.1039/C5RA12932J>
30. Jiang, S., Ho, C.T., Lee, J.-H., Duong, H., Han, S., Hur, H.-G. (2012). Mercury capture into biogenic amorphous selenium nanospheres produced by mercury resistant *Shewanella putrefaciens* 200. *Chemosphere*, 87(6), 621–624. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.12.083>
31. Klaine, S.J., Alvarez, P.J.J., Batley, G.E., Fernandes, T.F., Handy, R.D., Lyon, D.Y.,... & Lead, J. R. (2008). Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environ Toxicol Chem*, 27(9), 1825–1851. <https://doi.org/10.1897/08-090.1>
32. Klemetsen, A., Amundsen, P.-A., Dempson, J.B., Jonsson, B., Jonsson, N., O'Connell, M.F. & Mortensen, E. (2003). Atlantic salmon *Salmo salar* L., brown trout *Salmo trutta* L. and Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.): a review of aspects of their life histories. *Ecol Freshw Fish*, 12(1), 1–59. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0633.2003.00010.x>
33. Kowalska-Góralaska, M., Dobicki, W., Pokorny, P. (2004). Bioakumulacja selenu w narządach karpia [*Cyprinus carpio* L.]. *Zesz Nauk Akad Rol we Wrocławiu Zootech*, (51), 125–130.
34. Kowalska-Góralaska, M., Ława, P., Senze, M. (2011). Impact of silver contained in the Nano silver preparation on the survival of brine shrimp (*Artemia salina* Leach 1819) larvae. *Ecol Chem Eng A*, 18(3), 371–377.
35. Kowalska-Góralaska, M., Carrola, J., Senze, J., Pokorny, P., Dobicki W.P.R. (2015). Zawartość selenu w mięśniach wybranych gatunków ryb pochodzących z hodowli stawowych w porównaniu do dziko żyjących pochodzących z Polski, Czech i Portugalii. In: 40 Międzynarodowe Seminarium Naukowo-Techniczne: Chemistry for Agriculture; Karpacz, 29112015-02122015.
36. Kowalska-Góralaska, M., Dziewulska, K., Kulasza, M. (2019). Effect of copper nanoparticles and ions on spermatozoa motility of sea trout (*Salmo trutta* m. *Trutta* L.). *Aquat Toxicol*, 211, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.03.013>
37. Li, H., Zhang, J., Wang, T., Luo, W., Zhou, Q., Jiang, G. (2008). Elemental selenium particles at nano-size (Nano-Se) are more toxic to Medaka (*Oryzias latipes*) as a consequence of hyper-accumulation of selenium: A comparison with

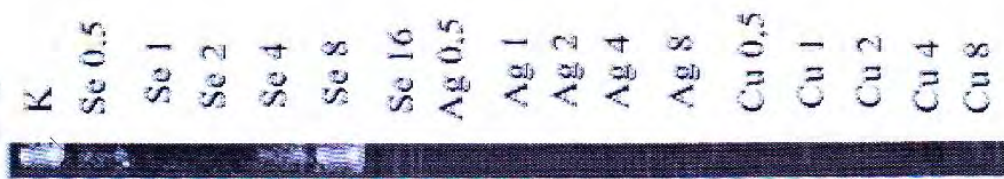
- sodium selenite. *Aquat Toxicol*, 89(4), 251–256. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.07.008>
38. May, T.W., Fairchild, J.F., Petty, J.D., Walther, M.J., Lucero, J., Delvaux, M.,... & Armbruster, M. (2008). An evaluation of selenium concentrations in water, sediment, invertebrates, and fish from the Solomon River Basin. *Environ Monit Assess*, 137(1), 213–232. <https://doi.org/10.1007/s10661-007-9742-y>
39. Navarro-Alarcon, M., Cabrera-Vique, C. (2008). Selenium in food and the human body: A review. *Sci Total Environ*, 400(1), 115–141. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.06.024>
40. Niedzielski, P., Siepak, M., Siepak, J. (2000). Występowanie i zawartości arsenu, antymonu i selenu w wodach i innych. *Rocz Ochr Środowiska*, 2, 317–341.
41. Pan, D., Wen, Y., Mi, L., Chunhai, F. and Hu, J. (2011) Nanomaterials-based Polymerase Chain Reactions for DNA Detection. *Current Organic Chemistry* 15: 486–497. <https://doi.org/10.2174/138527211794474447>
42. Prasad, K.S., Vaghasiya, J.V., Soni, S.S., Patel, J., Patel, R., Kumari, M.,... & Selvaraj, K. (2015). Microbial Selenium Nanoparticles (SeNPs) and Their Application as a Sensitive Hydrogen Peroxide Biosensor. *Appl Biochem Biotechnol*, 177(6), 1386–1393. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1814-9>
43. Rahimkhoei, V., Rezaie, J., Akbari, A., Nourani, A., Jabbari, N., Lighvan, Z.M. and Amini, M., (2021). Nano-based methods for novel coronavirus 2019 (2019-nCoV) diagnosis: A review. *Cell Biochemistry and Function*, 39(1), 29–34. <https://doi.org/10.1002/cbf.3606>
44. Roch, M., McCarter, J.A., Matheson, A.T., Clark, M.J.R., Olafson, R.W. (1982). Hepatic Metallothionein in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) as an Indicator of Metal Pollution in the Campbell River System. *Can J Fish Aquat Sci*, 39(12), 1596–1601. <https://doi.org/10.1139/f82-215>
45. Shen, C., Yang, W., Ji, Q., Maki, H., Dong, A., Zhang, Z. (2009). NanoPCR observation: different levels of DNA replication fidelity in nanoparticle-enhanced polymerase chain reactions. *Nanotechnology*, 20(45), 455103. <http://dx.doi.org/10.1088/0957-4484/20/45/455103>
46. Sohail, M., Khan, M.N., Qureshi, N.A., Chaudhry, A.S. (2017). Monitoring DNA damage in gills of freshwater mussels (*Anodonta anatina*) exposed to heavy metals. *Pak J Zool*, 49(1).
47. Tran, P.A., Webster, T.J. (2011). Selenium nanoparticles inhibit *Staphylococcus aureus* growth. *Int J Nanomedicine*, 6, 1553–1558. <https://doi.org/10.2147/ijn.s21729>
48. Vale, G., Mehennaoui, K., Cambier, S., Libralato, G., Jomini, S., Domingos, R.F. (2016). Manufactured nanoparticles in the aquatic environment-biochemical responses on freshwater organisms: A critical overview. *Aquat Toxicol*, 170, 162–174. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.019>
49. Vanzha, E., Pylaev, T., Khanadeev, V., Konnova, S., Fedorova, V. and Khlebtsov, N. (2016). Gold nanoparticle-assisted polymerase chain reaction: effects of surface ligands, nanoparticle shape and material. *RSC advances*, 6(111), 110146–110154. <https://doi.org/10.1039/C6RA20472D>
50. Vinceti, M., Crespi, C.M., Bonvicini, F., Malagoli, C., Ferrante, M., Marmiroli, S. & Stranges, S. (2013). The need for a reassessment of the safe upper limit of

- selenium in drinking water. *Sci Total Environ*, 443, 633–642. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.11.025>
51. Wadhvani, S.A., Shedbalkar, U.U., Singh, R., Chopade, B.A. (2016). Biogenic selenium nanoparticles: current status and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100(6), 2555–2566. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7300-7>
52. Wang, T., Yang, L., Zhang, B., Liu, J. (2010). Extracellular biosynthesis and transformation of selenium nanoparticles and application in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biosensor. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 80(1), 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.05.041>
53. Wysocka, A.I., Bulska, E. (2002). Dwa oblicza selenu, czyli o korzyściach i zagrożeniach związanych z obecnością selenu w organizmach żywych. *Anal Nauk i Prakt.*, (3), 13–17.
54. Xue, Z., You, M., Peng, P., Tong, H., He, W., Li, A., Mao, P., Xu, T., Xu, F., Yao, C. (2021). Taqman-MGB nanoPCR for highly specific detection of single-base mutations. *International Journal of Nanomedicine*, 16, 3695. <https://dx.doi.org/10.2147%2FIJN.S310254>
55. Yuce, M., Kurt, H., Mokkaçpati, V.R., Budak, H. (2014). Employment of nanomaterials in polymerase chain reaction: insight into the impacts and putative operating mechanisms of nano-additives in PCR. *RSC Advances*, 4(69), 36800–36814. <https://doi.org/10.1039/C4RA06144F>
56. Zabłocki, Z. (1990). Selen w glebach i roślinach Pomorza Zachodniego. Wydawn. Akademii Rolniczej w Szczecinie, Szczecin.
57. Ziaei-nejad, S., Shojaei, S.S., Amini Chermahini, M. (2020). Effects of enriched artemia with selenium nanoparticles on growth, survival and biochemical factors of guppy (*Poecilia reticulata*) *Iranian Journal of Fisheries Science*, 19(5), 2593–2607. Available from: <http://jifro.ir/article-1-4170-en.html>

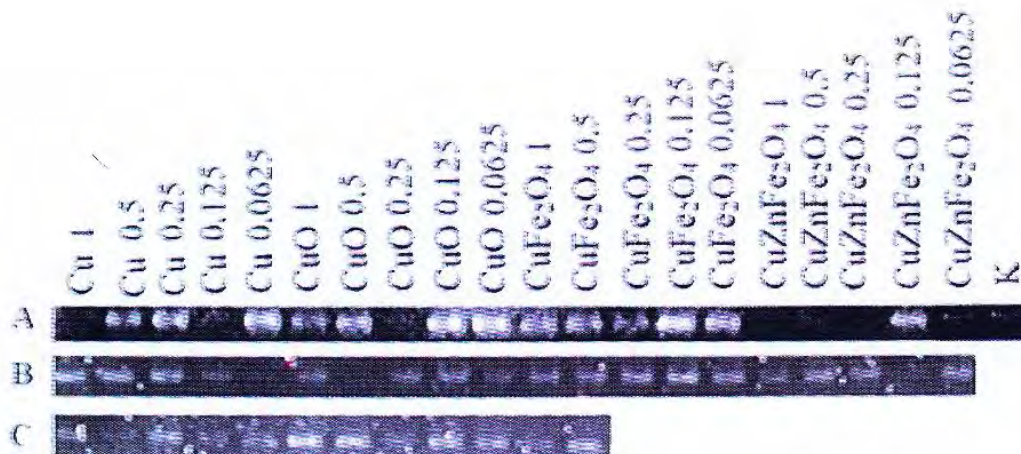




**Figure 1.** Electrophoretic analysis of 1  $\mu$ l of *Salmo trutta* DNA isolates incubated in selenium, silver, and copper solutions at different concentrations. The amplification reaction was performed using primers for the COI gene (HC02198 and LC01490), as well as Hot Start polymerase. A product of about 10000 base pairs in length was obtained. K – control, Se – selenium, Ag – silver NPs, Cu – copper NPs. Numbers indicate concentration of NPs or Se.



**Figure 2.** Electrophoresis of PCR products of DNA isolates from *Salmo trutta* hatchlings incubated in different solutions of silver, selenium, and copper without the addition of nanoelements. The amplification reaction was performed using primers for the COI gene. A product of about 700 base pairs in length was obtained. K – control, Se – selenium, Ag – silver NPs, Cu – copper NPs. Numbers indicate concentration of NPs or Se.



**Figure 3.** Electrophoresis of PCR products of DNA isolates from *Salmo trutta* hatchlings incubated with 0.5 (B) and 8.0 mg dm<sup>-3</sup>(C) of silver with the addition of nanoelements (A) to the PCR reaction mixture. The amplification reaction was performed using primers for the COI gene (HC02198 and LC01490), as well as Hot Start polymerase. A product of about 700 base pairs in length was obtained. K – control, Cu – copper NPs, CuO – copper oxide NPs, CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> - copper iron oxide NPs, CuZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> - copper zinc iron oxide NPs. Numbers indicate concentration of NPs or Se.

Accepted

**Table 1.** Effects of Ag, Cu and Se on product degradation, PCR efficiency and genotoxicity. '+' indicates presence of studied parameter, '-' its absence.

Nanoparticle Type Parameter	Ag	Cu	Cu compounds (CuO, CuFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> , CuZnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> )	Se
Degradation	+	-	-	+
PCR efficiency	no effect	+	+	+
Genotoxicity	-	Dose- dependent	Dose- dependent	-

## Publikacja 2

Sielska, A., Cembrowska-Lech, D., Kowalska-Górska, M., Czerniawski, R., Krepski, T., & Skuza, L. (2024). Effects of copper nanoparticles on oxidative stress genes and their enzyme activities in common carp (*Cyprinus carpio*). *The European Zoological Journal*, 91(1), 354–365. <https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2332290>

IF: 1.6

MNiSW: 140 pkt.

### Wkład współautorów:

Anna Sielska: 60%; walidacja, przeprowadzenie badań, wizualizacja wyników oraz pisanie, przegląd i redakcja manuskryptu.

dr Danuta Cembrowska-Lech: 15%; opracowaniu metodologii badań, wykonaniu części badań, przeglądzie i redakcji manuskryptu oraz pisaniu manuskryptu.

dr hab. inż. Monika Kowalska-Górska: 10%; opracowanie koncepcji i metodologii badań, walidacja oraz przygotowanie materiału biologicznego do badań.

prof. dr hab. Robert Czerniawski: 5%; przegląd i redakcja manuskryptu.

dr Tomasz Krepski: 5%; przegląd i redakcja manuskryptu.

dr hab. Lidia Skuza, prof. US: 5%; opracowanie koncepcji i metodologii badań, walidacja, analiza formalna, wykonanie części badań, przegląd i redakcja manuskryptu oraz nadzór badań i pisanie manuskryptu.

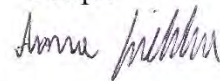
## Oświadczenie

Dotyczący pracy

Sielska, A., Cembrowska-Lech, D., Kowalska-Górska, M., Czerniawski, R., Krepski, T., & Skuza, L. (2024). Effects of copper nanoparticles on oxidative stress genes and their enzyme activities in common carp (*Cyprinus carpio*). *The European Zoological Journal*, 91(1), 354–365. <https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2332290>

Ja niżej podpisana mgr Anna Sielska oświadczam, że mój wkład w przygotowanie pracy wynosił 60% i polegał na walidacji, przeprowadzeniu badań, wizualizacji wyników oraz pisaniu, przeglądzie i redakcji manuskryptu.

Podpis



Szczecin, 16/09/2024

## Oświadczenie

dotyczące artykułu

Sielska, A., Cembrowska-Lech, D., Kowalska-Górska, M., Czerniawski, R., Krepski, T., & Skuza, L. (2024). Effects of copper nanoparticles on oxidative stress genes and their enzyme activities in common carp (*Cyprinus carpio*). *The European Zoological Journal*, 91(1), 354–365. <https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2332290>

Ja niżej podpisana dr Danuta Cembrowska-Lech oświadczam, że mój wkład w przygotowanie pracy wynosił 15% i polegał na opracowaniu metodologii badań, wykonaniu części badań, przeglądzie i redakcji manuskryptu oraz pisaniu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby praca stanowiła części rozprawy doktorskiej mgr Anny Sielskiej.



Podpis

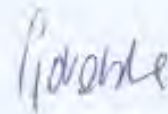
## Oświadczenie

dotyczące artykułu

Sielska, A., Cembrowska-Lech, D., Kowalska-Górska, M., Czerniawski, R., Krepski, T., & Skuza, L. (2024). Effects of copper nanoparticles on oxidative stress genes and their enzyme activities in common carp (*Cyprinus carpio*). *The European Zoological Journal*, 91(1), 354–365. <https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2352390>

Ja niżej podpisana dr hab. inż. Monika Kowalska-Górska oświadczam, że mój wkład w przygotowanie pracy wynosił 10% i polegał opracowaniu koncepcji i metodologii badań, walidacji oraz przygotowaniu materiału biologicznego do badań.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby praca stanowiła część rozprawy doktorskiej mgr Anny Sielskiej.



Podpis



Szczecin, 17.09.2024

## Oświadczenie

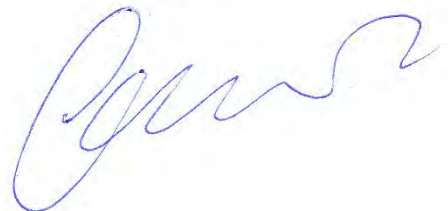
dotyczące artykułu

Sielska, A., Cembrowska-Lech, D., Kowalska-Góralaska, M., Czerniawski, R., Krepski, T., & Skuza, L. (2024). Effects of copper nanoparticles on oxidative stress genes and their enzyme activities in common carp (*Cyprinus carpio*). *The European Zoological Journal*, 91(1), 354–365. <https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2332290>

Ja niżej podpisana prof. dr hab. Robert Czerniawski oświadczam, że mój wkład w przygotowanie pracy wynosił 5% i polegał na przeglądzie i redakcji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby praca stanowiła części rozprawy doktorskiej mgr Anny Sielskiej.

Podpis



Szczecin, 19.09.2024

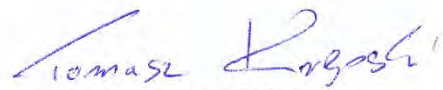
## Oświadczenie

dotyczące artykułu

Sielska, A., Cembrowska-Lech, D., Kowalska-Górska, M., Czerniawski, R., Krepski, T., & Skuza, L. (2024). Effects of copper nanoparticles on oxidative stress genes and their enzyme activities in common carp (*Cyprinus carpio*). *The European Zoological Journal*, 91(1), 354–365. <https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2332290>

Ja niżej podpisana dr Tomasz Krepski oświadczam, że mój wkład w przygotowanie pracy wynosił 5% i polegał na przeglądzie i redakcji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby praca stanowiła części rozprawy doktorskiej mgr Anny Sielskiej.



Podpis

## Oświadczenie

dotyczące artykułu

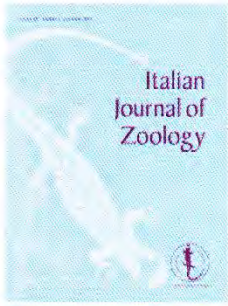
Sielska, A., Cembrowska-Lech, D., Kowalska-Górska, M., Czerniawski, R., Krepski, T., & Skuza, L. (2024). Effects of copper nanoparticles on oxidative stress genes and their enzyme activities in common carp (*Cyprinus carpio*). *The European Zoological Journal*, 91(1), 354–365. <https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2332290>

Ja niżej podpisana dr hab. Lidia Skuza, prof. US oświadczam, że mój wkład w przygotowanie pracy wynosił 5% i polegał na opracowaniu koncepcji i metodologii badań, walidacji, analizie formalnej, wykonaniu części badań, przeglądzie i redakcji manuskryptu oraz nadzorze badań i pisania manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby praca stanowiła części rozprawy doktorskiej mgr Anny Sielskiej.



Podpis



## Effects of copper nanoparticles on oxidative stress genes and their enzyme activities in common carp (*Cyprinus carpio*)

A. Sielska, D. Cembrowska-Lech, M. Kowalska-Góralaska, R. Czerniawski, T. Krepski & L. Skuza

To cite this article: A. Sielska, D. Cembrowska-Lech, M. Kowalska-Góralaska, R. Czerniawski, T. Krepski & L. Skuza (2024) Effects of copper nanoparticles on oxidative stress genes and their enzyme activities in common carp (*Cyprinus carpio*), The European Zoological Journal, 91:1, 354-365, DOI: [10.1080/24750263.2024.2332290](https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2332290)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2332290>



© 2024 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.



Published online: 10 Apr 2024.



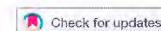
Submit your article to this journal [↗](#)









View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



## Effects of copper nanoparticles on oxidative stress genes and their enzyme activities in common carp (*Cyprinus carpio*)

A. SIELSKA <sup>1,2,3\*</sup>, D. CEMBROWSKA-LECH <sup>1</sup>, M. KOWALSKA-GÓRALSKA <sup>4</sup>,  
R. CZERNIAWSKI <sup>1,5</sup>, T. KREPSKI <sup>1,5</sup>, & L. SKUZA <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biology, University of Szczecin, Szczecin, Poland, <sup>2</sup>Centre for Molecular Biology and Biotechnology, University of Szczecin, Szczecin, Poland, <sup>3</sup>Doctoral School, University of Szczecin, Szczecin, Poland, <sup>4</sup>Department of Hydrobiology and Aquaculture, Faculty of Biology and Animal Science, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Wrocław, Poland, and <sup>5</sup>Department of Hydrobiology, University of Szczecin, Szczecin, Poland

(Received 31 October 2023; accepted 14 March 2024)

### Abstract

Copper nanoparticles (Cu-NPs) are becoming increasingly prevalent in the environment due to their wide range of applications, posing potential threats to living organisms. Negative effects of Cu-NP exposure have been confirmed in many fish species, and they include disorders in the expression of oxidative stress genes and the activity of enzymes they encode. Common carp, known for its sensitivity to nanopollutants in water, serves as a valuable model organism for nanoparticle toxicity assessment. This study investigated the effects of specific Cu-NPs – copper nanopowder (Cu-NPs), colloidal copper nanoparticles (Cu), and copper oxide nanoparticles (CuO-NPs) – on gene expression and enzyme activity (GPX, CYP1A, HSP70, SOD, CAT) in *C. carpio* hatchlings, utilizing molecular biology tools and biochemical analyses. Results showed that Cu increased the expression of the *hsp70* gene, Cu-NPs elevated the expression of the *cyp1a* and *hsp70* genes, and CuO increased *cyp1a* expression. Conversely, *sod* and *cat* exhibited reduced expression across all samples (Cu, Cu-NPs, CuO). All Cu forms induced significant ROS accumulation and notable alterations in oxidative stress biomarkers (SOD, CAT, GPX).

**Keywords:** *Cyprinus carpio*, copper nanoparticles, oxidative stress, ecotoxicology

### Introduction

In the past decade, a wide array of nanomaterials (NMs) has gained widespread global use. Recently, copper, copper-based nanoparticles (Cu-NPs), and copper oxide-based NPs (CuO-NP) have found application areas across diverse sectors, including industry, construction (Gupta & Siddique 2020), electrical equipment (Mitrea et al. 2016), organic synthesis catalysts (Barot et al. 2016; Lennox et al. 2016), antimicrobial agents (Dugal & Mascarenhas 2015), agriculture (Kalatehjari et al. 2015; Montes et al. 2016), transportation and drug delivery (Woźniak-Budych et al. 2016), paint components or water management (Ma et al. 2016; Ighalo et al. 2021). As nanotechnology and Cu-nanotech-based applications continue to develop, particularly in wastewater treatment, concerns have arisen

regarding their potential ecotoxicity to both human health and aquatic organisms. When released into water through various routes in the form of aggregates, a small particles or ions, these nanoparticles can accumulate in aquatic organisms (Hanna et al. 2014; Conway et al. 2015). Copper nanoparticles (Cu-NP) have been shown to induce oxidative stress in fish, leading to tissue and organ damage (e.g., gills and liver), DNA damage, increased mortality, changes in gene expression (including those related to oxidative stress) and alterations in enzyme activities (Aghamirkarimi et al. 2017; Saddick et al. 2017; Yalsuyi & Vajargah 2017). Elevated mortality rates, particularly among juveniles, pose significant challenges for fish farming, resulting in substantial economic losses. One such vulnerable organism is the common

\*Correspondence: A. Sielska, Institute of Biology, University of Szczecin, Szczecin PL-71-415, Poland. Email: [anna.sielska@usz.edu.pl](mailto:anna.sielska@usz.edu.pl)

carp (*Cyprinus carpio*), whose production exceeded 4189.5 kilotons in 2018 (FAO 2020). *C. carpio*, distributed mainly in Asian and European countries, holds significance in freshwater aquaculture due to its ease of rearing, low production cost, and high nutritional value of its muscle tissue (Rahman 2015). Furthermore, *C. carpio* serves as a crucial freshwater animal model and is extensively studied in ecotoxicological research owing to its heightened sensitivity to toxic substances (Bongers et al. 1998; Kakakhel et al. 2021). Histopathological changes in the gills of *C. carpio* exposed to Cu-NPs have been observed (Forouhar Vajargah et al. 2018; Noureen et al. 2021), and the presence of Cu-NPs in the organism can lead to metabolic disorders (Mazandarani & Hoseini 2017) and alterations in enzymatic activity (Liu et al. 2017). Fish larvae, being highly susceptible to the toxic effects of nanoparticles, are suggested to be more adversely affected than other life stages (Johari et al. 2013; Ma & Diamond 2013). Hence, investigating the impact of released Cu-NPs on the molecular and biochemical parameters of *C. carpio*, especially its larvae, is imperative.

Enzymes such as glutathione peroxidase (GPX), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) serve as the primary defense against oxidative stress by orchestrating a coordinated cellular response (Margis et al. 2008). SOD catalyzes the dismutation of two superoxide anion radicals into hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and oxygen. Subsequently, catalase facilitates the reduction of  $H_2O_2$  to water and oxygen (Ighodaro & Akinloye 2018). Extending beyond this primary defense, cytochromes P450, notably cytochrome P450 1A2, actively engage in xenobiotic metabolism, augmenting the cellular defense against external stressors (Široká & Drastichova 2004). The evaluation of both CYP1A2 expression and activity serves as indispensable biomarkers for the sensitive detection of environmental pollutants (Goksøyr 1995). Concurrently, cellular defense encompasses genetic regulation, with the upregulation of heat shock genes (*hsp*) in response to diverse stressors. This heightened expression strengthens cellular defense mechanisms against various stressors, including heat, reactive oxygen species (ROS), and toxic compounds (Schlesinger 1990; Abravaya et al. 1992). Collectively, these genes and the enzymes they encode form an intricate network, playing crucial roles in the cellular response to reactive oxygen species (ROS) and, consequently, oxidative stress. This comprehensive defense strategy extends to challenges induced not only by inherent oxidative stress but also by the presence of nanoparticles within the cellular environment.

Numerous studies document the deleterious impact of copper nanoparticles on tissues and the bioaccumulation in fish (Song et al. 2015; Shahzad et al. 2018). However, a notable gap in existing knowledge pertains to the absence of data concerning alterations in oxidative stress-related gene expression and enzymatic activity. Therefore, the primary objective of this study was to investigate the effect of copper nanoparticles in colloidal form (Cu), copper nanopowder (Cu-NPs) and copper oxide (CuO-NPs) on both the expression of genes related to oxidative stress and the activity of enzymes they encode, i.e. glutathione peroxidase (GPX), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), heat shock protein (HSP70) and cytochrome P450 (CYP1A).

## Materials and methods

### *Common carp eggs*

The biological material utilized in this study comprised *C. carpio* hatchlings obtained following egg incubation. Prior to exposure to nanoparticle solutions, the *C. carpio* eggs underwent incubation without prior contact with nanoparticles or toxins. The preparation of the biological material followed the protocol outlined by Sielska et al. (2022). Fertilization was conducted in Wojnarowicz solution, a standard medium for fish egg preparation. After fertilization (i.e., mixing the eggs with sperm and rinsing), the eggs were segregated into groups of 50 in nanoparticle-free water. Subsequently, the eggs underwent approximately 3 hours of soaking in water to facilitate swelling before the introduction of NPs (colloidal Cu, Cu-NPs and CuO-NPs). The biological material was incubated in NP suspensions during the swelling phase, a period when eggs are most susceptible to environmental toxins. After swelling, the eggs were rinsed and distributed into baskets within a closed circuit water system and left to hatch. Following hatching, *C. carpio* larvae were preserved in alcohol (Sielska et al. 2022). The control group did not undergo treatment with Cu-NPs, colloidal Cu or CuO-NPs. Ethical approval was not required to conduct the study.

### *Characterization of nanoparticles and preparation*

The suspensions were prepared using Cu nanopowder (nanopowder, <100 nm (BET), <3% oxygen passivation, 99% trace metals basis) (Sigma-Aldrich, 7440-50-8), nano Cu in colloidal form (25 ppm) (VitaColloids) and CuO nanopowder

(nanopowder, <50 nm particle size (TEM)) (Sigma-Aldrich, 1317-38-0).

Working concentration of  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  was prepared. The suspension was sonicated in an ultrasonic bath for 30 min, and vortexed before each use (Kowalska-Górska et al. 2019).

#### Real-time PCR

RNA was isolated from previously prepared biological material (*C. carpio* hatchlings) (13 samples in total: 2 controls, 4 CuNP, 3 Cu, 4 CuO) using the EXTRACTME Total RNA Kit (Blirt) according to the protocol provided by the manufacturer. Genomic DNA was removed using DNaseI plus Reaction Buffer, included in the EXTRACTME TotalRNA isolation kit (Blirt). Subsequently, reverse transcription was performed using the RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific) according to the protocol provided by the manufacturer. The concentration and quality of RNA and cDNA was determined using a NanoDrop spectrophotometer (ThermoFisher Scientific).

Each 10- $\mu\text{l}$  real-time PCR reaction mixture contained: 6.6  $\mu\text{l}$  of distilled water, 0.2  $\mu\text{l}$  of forward and reverse primer, 2.0  $\mu\text{l}$  of HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (ROX) (SolisBiodyne) (volume added according to manufacturer's recommendations) and 1  $\mu\text{l}$  of cDNA. The negative control contained 7.6  $\mu\text{l}$  of distilled water, 0.2  $\mu\text{l}$  of forward and reverse primers (synthesized by Genomed), 2.0  $\mu\text{l}$  of HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (ROX) (SolisBiodyne), without cDNA addition. The following gene primers were used for the reaction: *gpx*, *cyp1a* and *hsp70* (Scown et al. 2010), *sod* and *cat* (Fazelan et al. 2020) (Table I). The  $\beta$ -actin (Fazelan et al. 2020) and alpha elongation factor (*ef1a*) (Zhang et al. 2016) genes were used as reference genes (Table I). Real-

time PCR was performed in a thermocycler (Biorad) with the temperature profile recommended by the manufacturer. The annealing temperature was set individually for each gene.

The relative expression of each analyzed gene normalized to the reference gene ( $2^{-\Delta\text{Ct}}$ ) was calculated for each treatment. In addition, Livak's comparative method (Livak & Schmittgen 2001) was used to calculate the fold change in gene expression normalized to reference gene, relative to control results.

#### Enzyme extraction

All enzyme assays (GPX, HSP70, CYP1A, SOD and CAT) were analyzed in the same crude homogenate. The samples were crushed to a fine powder in liquid nitrogen using a laboratory mill ball and homogenized for 10 min in 10 mM HEPES (pH 7.4) (Sigma-Aldrich, 7365-45-9) containing 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Sigma-Aldrich, 60-00-4), 1 mM dithiothreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, 3483-12-3), and 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (Sigma-Aldrich, 329-98-6). Homogenates were centrifuged for 20 min at  $10,000 \times g$  at  $4^\circ\text{C}$ .

#### GPX, CYP1A and HSP70 assays

Glutathione peroxidase was assayed using the method of Awasthi et al. (1975). The reaction solution contained 0.1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  buffer (pH 7.0), 0.2 mM NADPH (Sigma-Aldrich, 2646-71-1), GR (Sigma-Aldrich, 9001-48-3), 4 mM GSH (Sigma-Aldrich, 70-18-8), 4 mM EDTA, 4 mM  $\text{NaN}_3$  (Sigma-Aldrich 26628-22-8), and the supernatant. The reaction solution was incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 10 min; 10 mM t-butyl hydroperoxide (Sigma-Aldrich, 75-91-2) was added to start the reaction. The reaction rate was determined at  $37^\circ\text{C}$  by

Table I. List of gene primers used in this study (Scown et al. 2010; Zhang et al. 2016; Fazelan et al. 2020).

Primer	Primer sequence (5'-3')	Annealing Temperature	Amplicon Length (bp)
cyp1a2F	CTTCCGCCATAITGTCGTATC	52.4°C	135
cyp1a2R	CCACCACCTGCCCAAAC	51.9°C	
hsp70F	CTGCTGCTGCTGGATGTG	52.6°C	25
hsp70R	GCTGGTGTGTCGGAGTAAGTG	53.8°C	
sodF	TGAGCTGTCCGAAGCCATCAAG	56.7°C	150
sodR	TTGGTTCCACATGCAGCAATCC	57.1°C	
catF	AGACGACACCCATCGCTGTTTCG	58.6°C	120
catR	AAGGTCCCAGTTGCCCTCATCG	58.6°C	
gpxF	GCTCCATTTCGCAGTATTC	48.0°C	50
gpxR	TCCCTCCCATTCACATCC	48.0°C	
ef1aF	CTTCGTCCCAATTTCTG	44.6°C	100
ef1aR	ACCGTTAGCAATTACCCT	44.6°C	
bactinF	CCTGTATGCCAACACCGTGCTG	58.6°C	100
bactinR	CTTCATGGTGGAGGGAGCAAGG	58.6°C	

measuring the absorbance at 340 nm. The results were expressed as  $U\text{ mg}^{-1}$  protein.

Cytochrome P450 1A (CYP1A) was examined with a fluorescence assay, employing BioVision Fluorometric CYP1A2 kit (BioVision, K893-100). All reagents were prepared and the assays were performed according to the kit's protocol.

Heat shock protein (HSP70) was assessed using a commercially available Heat Shock Protein Assay Kit (Fluorometric) (BioVision, K2024-100). The test procedure was conducted according to the manufacturer's recommendations of the HSP70 activity kit.

HSP70 and CYP1A protein level were conducted by Western blotting. The samples were loaded and separated on 10% SDS-PAGE gel (Laemmli 1970). The blotting PVDF membranes (Millipore) were probed with a mouse monoclonal anti-Hsp70 antibody (Abcam) or a mouse monoclonal anti-CYP1A antibody (Biosense laboratories), and peroxidase-conjugated secondary antibody (Abcam). The immunoblots were incubated with a detection solution containing acetate buffer, diaminobenzidine (Sigma-Aldrich, 91-95-2) and  $H_2O_2$  (Sigma-Aldrich, 7722-84-1). Band intensities were determined using the Fiji ImageJ software (Schindelin et al. 2012). The relative HSP70 or CYP1A activity was expressed as the mean intensity (percentage of the control).

#### SOD and CAT assays

**Spectrophotometric analysis.** SOD activity was estimated using the method of Giannopolitis and Ries (1977) by inhibiting the photoreduction of nitro blue tetrazolium chloride (Sigma-Aldrich, 298-83-9). The reaction solution contained: 0.1 M  $KH_2PO_4/K_2HPO_4$  (pH 7.8), 1.3  $\mu\text{M}$  riboflavin (Sigma-Aldrich, 83-88-5), 13 mM methionine (Sigma-Aldrich, 63-68-3), 63  $\mu\text{M}$  nitro blue tetrazolium chloride, 0.1 mM EDTA and the supernatant. The reaction was initiated by light ( $50\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ ) and the absorbance was measured at 560 nm after 15 min of irradiance. One unit of SOD activity was defined as the amount of the enzyme required to inhibit 50% reduction of NBT in comparison with the positive control. The activity was expressed as  $U\text{ mg}^{-1}$  protein.

The CAT activity was checked using the method of Rao et al. (1996). The catalase activity was spectrophotometrically determined at 240 nm in mixture solution: 50 mM  $KH_2PO_4/K_2HPO_4$  buffer (pH 7.0), and 14.3 mM  $H_2O_2$  and enzyme extract. The purified CAT (Sigma-Aldrich, 9001-05-2) was used

as a calibration standard. The CAT activity was expressed as  $U\text{ mg}^{-1}$  protein.

**Native-PAGE and activity staining of SOD and CAT.** Samples were run electrophoretically in native-PAGE gel (at 4°C and 150 V) (Laemmli 1970).

For SOD isoforms visualization, native gel (12% polyacrylamide gel) was soaked in 50 mM  $KH_2PO_4/K_2HPO_4$  buffer (pH 7.0) containing 5 mM  $H_2O_2$  (inactivate both Cu/ZnSOD and FeSOD) or 3 mM KCN (Sigma-Aldrich, 151-50-8) (inactivate only Cu/ZnSOD). After rinsing with distilled water, the gel was stained with 50 mM  $KH_2PO_4/K_2HPO_4$  buffer (pH 7.8) containing 10 mM EDTA, 28 mM TEMED (Sigma-Aldrich, 110-18-9), 30  $\mu\text{M}$  riboflavin and 245  $\mu\text{M}$  NBT for 20 min in the dark at 25°C. Finally, the gel was exposed to white light until the appearance of chromatic zones, representing SOD activity bands became visible (Beauchamp & Fridovich 1971).

For CAT isoforms visualization, 10% native-PAGE gel was stained by following the method of Woodbury et al. (1971). The gel was stained in 1% (w/v) potassium ferricyanide (Sigma-Aldrich 13,746-66-2) and 1% (w/v) ferric chloride (Sigma-Aldrich, 7705-08-0) solutions. Colorless bands of CAT isoenzymes appeared as the gel was stained blue.

#### Protein assay

The protein content in the enzymatic extracts was assayed by Bradford's method (Bradford 1976), using bovine serum albumin (BSA) as a standard (Bradford 1976).

#### Superoxide anion and hydrogen peroxide content

All ROS assays ( $O_2^{\cdot-}$  and  $H_2O_2$ ) were analyzed in the same crude homogenate. The samples were crushed to a fine powder in liquid nitrogen using laboratory mill ball and homogenized for 10 min in cold 50 mM Tris-HCl pH 7.5 with 2% (w/v) PVP (Sigma-Aldrich, 9003-39-8). The samples were centrifuged for 20 min at  $14,000\times g$  at 4°C, and the resulting supernatants were taken for spectrophotometric analysis.

Extracellular  $O_2^{\cdot-}$  level was estimated using the method described by Misra and Fridovich (1972). The reaction mixture consisted of 17 mM Tris HCl pH 7.5, 20 mM epinephrine (Sigma-Aldrich, 51-43-4) (in 0.5 M HCl) and the supernatant. The oxidation of epinephrine to adrenochrome was measured in the reaction solution at 480 nm for 1 min. The epinephrine extinction coefficient was  $\epsilon = 4.02$



$\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ . The results were expressed as relative units corresponds to the epinephrine oxidation rate in the extracts and calculated as  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{FW}$ .

Extracellular  $\text{H}_2\text{O}_2$  level was measured followed by the protocol of Velikova et al. (2000), and was measured in the reaction solution (2.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  buffer pH 7.0, 0.5 M KI (Sigma-Aldrich, 7681-11-0) in 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  buffer, pH 7.0, and the extract) at 390 nm. A standard curve was prepared using the hydroxy peroxide standard. The results were expressed as  $\text{nmol H}_2\text{O}_2 \text{mg}^{-1} \text{FW}$ .

#### Statistical analysis

All of the biochemical and gene expression analysis were carried out in 13 samples containing 5 larvae: 2 samples – controls, 4 samples – CuNP, 3 samples – Cu, 4 samples – CuO in three technical replicates, and the final means are presented with their standard deviation (SD). One-way analysis of variance, ANOVA (Statistica for Windows v. 13.0, Stat-Soft Inc., Tulsa, OK, USA) were used for data analysis of different parameter. Data were checked for normality and homogeneity of variance, and met these criteria. Duncan's multiple range test or post hoc Tukey's (HSD) test were used for analysis of variance.

## Results

### Gene expression

*Cyp1a2* gene expression increased in samples treated with Cu-NPs, Cu and CuO. The highest expression was found in samples isolated from individuals exposed to Cu (Figure 1(b)). The *hsp70* gene showed increased expression in samples from hatchlings treated with Cu, Cu-NPs and CuO-NPs (Figure 1(d)). The expression of *sod* and *cat*, however, decreased in all samples compared to controls (Figure 1(f,h)). For samples isolated from hatchlings incubated with CuO-NPs, the expression was similar to control (Figure 1(h)).

The expression of the *gpx* gene was found to be lower than in control for hatchlings incubated with Cu and Cu-NPs. The CuO-NPs-treated samples showed no changes compared to control (Figure 1(j)). In the case of CuO-NPs, the expression of *sod* and *cat*, although lower than in control, was characterized by the highest increase compared to Cu and CuO-NPs.

### Protein level and activity

Protein level of *cyp1a* and *hsp70* are presented in Figure 2. The level of *hsp70* was higher in Cu-NPs and CuO-NPs-treated samples, while it was comparable to control in Cu-treated samples. The level of *cyp1a* however, was lower than in control in all treatments.

The enzymatic activity of GPX, CYP1A, HSP70, SOD and CAT enzymes is illustrated by bar graphs (Figures 1 and 3). An increase in enzymatic activity was observed only for HSP70 in samples exposed to Cu-NPs and CuO-NPs. For Cu-treated samples, HSP70 activity did not change compared to control (Figure 1(c)). The activity of CYP1A, SOD, Cu/Zn SOD, CAT, CAT isoenzymes and GPX enzymes decreased in samples treated with Cu, Cu-NPs and CuO-NPs (Figures 1(a,e,g,i) and 3(a,b)). CAT-2 isoenzyme activity, despite being lower compared to control, was higher than that of CAT-1 (Figure 3(b)).

### Free radical content

The level of free radicals for individual samples is illustrated by bar graphs (Figure 4). In all samples (Cu, Cu-NPs, CuO-NPs), an increase in both  $\text{O}_2^{\cdot-}$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  was observed.  $\text{O}_2^{\cdot-}$  levels for all samples remained consistently high compared to control (Figure 4(a,b)). For  $\text{H}_2\text{O}_2$ , the highest increase was observed for samples incubated in CuO-NPs, and the lowest for samples treated with Cu (Figure 4(b)).

## Discussion

Copper, as one of the essential trace elements, plays a vital role in the growth and physiology of organisms, including fish, and its addition has been shown to stimulate growth and enhance hematological parameters and antioxidant capacity in species such as rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) or snow trout (*Schizothorax plagiostomus*) (Afshari et al. 2021; Delavari et al. 2022). It is worth noting, however, that precise dosage control is essential. As highlighted by Dawood et al. (2020), the recommended dietary dosage of Cu-NPs for *C. carpio* ranges between 2.19 and 2.91 mg/kg (Dawood et al. 2020). Copper nanoparticles are increasingly prevalent in various sectors of everyday life and industry. A notable application, owing to their biocidal properties, is their incorporation into disinfectants, which may feature Cu-NPs-coated fibers serving as potential agents against waterborne pathogens (Sheikh et al. 2011; Ghuglot et al. 2021). Additionally, Cu-

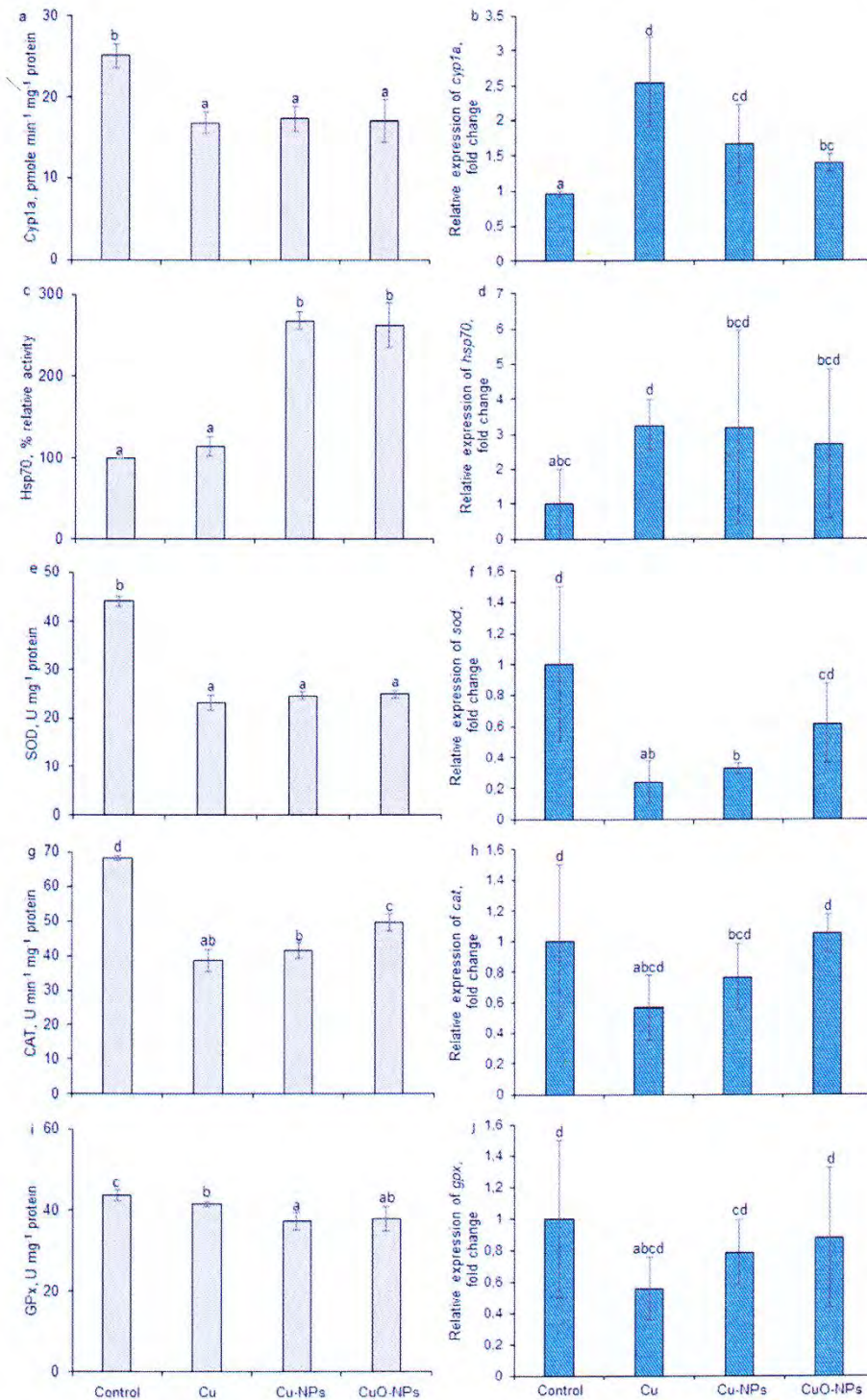


Figure 1. Effects of Cu, Cu-NPs or CuO (concentration  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) on enzymatic activity and transcribed level of *cyp1a* (a, b), *hsp70* (c, d), *sod* (e, f), *cat* (g, h) and *gp1x* (i, j). Relative expression was normalized by *bactin* and *ef1a* as reference transcripts. Vertical bars indicate  $\pm$  SD. Duncan's multiple range test was used to test for significance of differences ( $p \leq 0.05$ ) in enzymatic activity. Statistical analyses of gene expression were performed using a post hoc Tukey's (HSD) test with a confidence interval of 0.05 and a confidence level of 95%. Differences between the mean values were considered to be significant at  $p < 0.01$  or  $p < 0.05$ . Mean values with different letters (a–d) are significantly different ( $p < 0.05$ ).

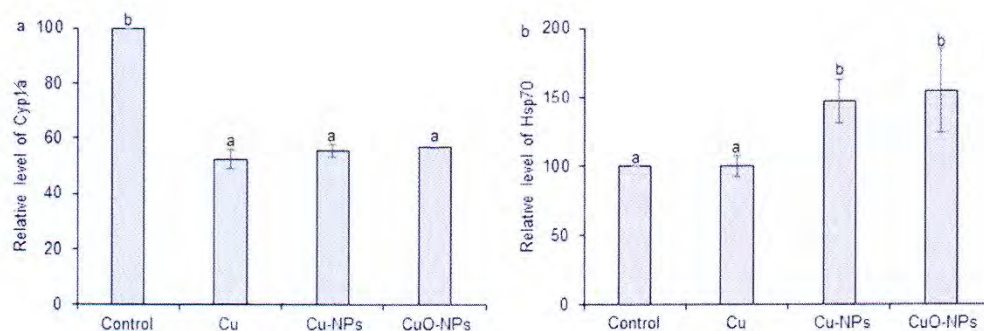


Figure 2. Effects of Cu, Cu-NPs or CuO (concentration  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) on gene expression revealed as protein level of CYP1A (a) and HSP70 (b). Vertical bars indicate  $\pm$  SD. Duncan's multiple range test was used to test for significance of differences ( $p \leq 0.05$ ). Mean values with different letters (a–b) are significantly different ( $p < 0.05$ ).

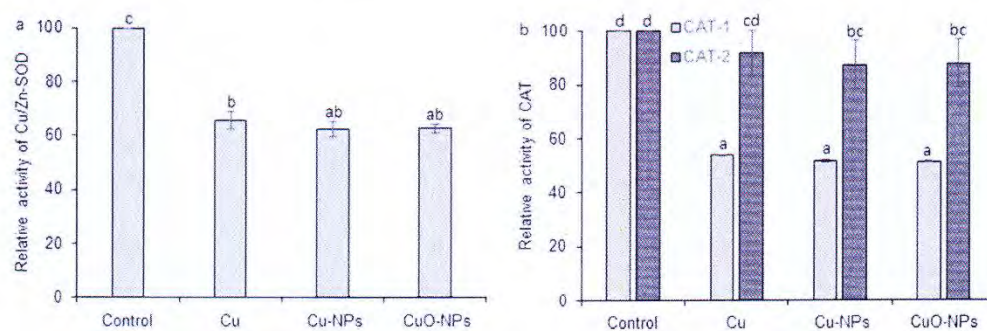


Figure 3. Effect of Cu, Cu-NPs or CuO-NPs (concentration  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) on Cu/Zn-SOD (a) and CAT (b) isoenzyme activity. Vertical bars indicate  $\pm$  SD. Duncan's multiple range test was used to test for significance of differences ( $p \leq 0.05$ ). Mean values with different letters (a–d) are significantly different ( $p < 0.05$ ).

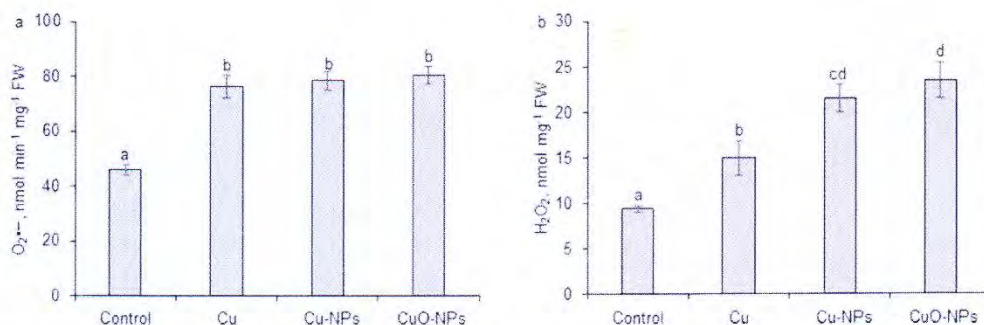


Figure 4. Effect of Cu, Cu-NPs or CuO-NPs (concentration  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) on superoxide anion ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) (a) and hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (b) levels. Vertical bars indicate  $\pm$  SD. Duncan's multiple range test was used to test for significance of differences ( $p \leq 0.05$ ). Mean values with different letters (a–d) are significantly different ( $p < 0.05$ ).

NPs can be used as probes for detecting mercury ions, catalysts or nanowires in electronics (Mirsafaei et al. 2015; Zhou et al. 2019; Pang et al. 2021). However, it has been found that under specific external conditions (water reservoirs) or internal environment (low pH of gastric acid) copper nanoparticles release ions that are highly toxic to organisms,

including aquatic ones, especially when ingested (Chen et al. 2006; Conway et al. 2015; Asif et al. 2021). The documented toxic effects of nanoparticles, including copper, are primarily attributed to the induction of oxidative stress (Martínez et al. 2021), leading to adverse alterations in the body, such as brain lesions,  $\text{H}^+$  ATPase activity, organ damages,

particularly liver, and increased mortality in fish species such as *O. mykiss*, *C. carpio* or *D. rerio* (Al-Bairuty et al. 2013; Song et al. 2015; Zhang et al. 2022). Despite limited data concerning *C. carpio* or its larvae, two earlier studies have demonstrated negative effects of Cu-NPs on adult organisms (Johari et al. 2020; Naeemi et al. 2020). Copper nanoparticles, when exceeding the optimal concentration in feed, induce toxic effects, such as increased mortality, weight loss, dose-dependent accumulation or alterations in biochemical parameters (Johari et al. 2020). Inappropriate dosage, combined with environmental exposure, may also pose a risk to animals' health. Notably, a decreasing LC50 value was observed in *C. carpio* hatchlings, alongside an increase in mortality in both juveniles and adults. The liver, gills and intestines are the main organs where dose- and time-dependent accumulation of CuO-NPs occurs in carp. At high doses, such as 1000 mg kg<sup>-1</sup>, CuO-NPs inhibit the activity of enzymes responsible for stress protection or cause a decrease in membrane Na<sup>+</sup> (Mansouri et al. 2016; Johari et al. 2020). The alterations in gene expression and enzymatic activity induced by Cu-NPs can be dependent on the tissue and even the species (Hoseini et al. 2016). Villarreal et al. (2014) demonstrated an increase in the expression of *cyp1a* in *Oreochromis mossambicus* under the influence of CuO-NPs, irrespective of water salinity. Similar upregulation of this gene was observed in the present study, in *C. carpio* hatchlings treated with all nanoparticles tested. The study revealed that the transcript level rose concurrently with a decrease in protein activity, suggesting that the active protein is encoded by the paralogous *cyp1a* gene or the protein's activity is not synchronized with transcript accumulation. Elevated expression of heat shock genes was observed in *Danio rerio* embryos exposed to CuO-NPs (Aksakal & Ciltas 2019), a phenomenon also observed in *Oreochromis niloticus* exposed to sublethal doses of CuO-NPs (Abdel-Latif et al. 2021). In the present study, an increase in *hsp70* expression occurred in hatchlings exposed to Cu, Cu-NPs and CuO-NPs. While elevated expression of *sod* and *cat* was reported in other species like *O. niloticus* or *D. rerio* (Kaur et al. 2019; Abdel-Latif et al. 2021), the current investigation revealed a decrease in the expression of these genes in hatchlings exposed to Cu, Cu-NPs and CuO-NPs. In *D. rerio*, a decline in *sod* expression was noted with increasing doses of CuO-NPs, mirroring a similar dose-dependent alteration observed in *Tilapia zillii* and *O. niloticus* exposed to zinc nanoparticles (Zn-NP) (Saddick et al. 2017). Regarding the *gpx* gene, an increase in its expression was previously observed

in *Danio rerio* larvae incubated with CuO-NPs at a dose of 1 µg/ml, while at higher concentrations, a reduced expression was recorded (Kaur et al. 2019). In the current study, a decrease in *gpx* gene expression was recorded in *C. carpio* hatchlings exposed to 1 mg dm<sup>-3</sup> Cu-NPs and Cu, while those treated with CuO-NPs showed the same level of expression as the control hatchlings. Changes have also been previously observed in the expression of *gpx*, *sod* and *cat* genes in various organs of *Gasterosteus aculeatus* fed *Tubifex tubifex* exposed to CuCl<sub>2</sub> and CuO-NPs. In the intestines, the expression of *sod* and *cat* was lower than in controls, while *gpx* levels remained unchanged. Conversely, in the liver, there was an increase in the expression of *cat* and *gpx*, with no changes observed for *sod* (Lammel et al. 2020). Zhang et al. (2022) reported a decrease in SOD and GPX activities, and an increase in CAT activity in *C. carpio* liver; however, in the present study the activity levels of these enzymes were decreased.

### Conclusion

In conclusion, gene expression levels in samples incubated with Cu and CuO-NPs were significantly higher than those incubated with Cu-NPs. Both *cyp1a* and *hsp70* genes exhibited elevated expression compared to controls in samples incubated with Cu, CuO-NPs, and Cu-NPs. Conversely, the expression of *sod*, *cat* and *gpx* genes either decreased or remained unchanged compared to the control. Notably, *hsp70* showed the highest expression among the genes studied. These findings suggest that Cu and CuO-NPs exert higher toxicity than Cu-NPs in *C. carpio* hatchlings. In terms of enzymatic activity, CYP1A, SOD, Cu/Zn SOD, CAT, CAT-1, CAT-2, and GPX enzymes exhibited lower activity in samples incubated with Cu, Cu-NPs, and CuO-NPs compared to the controls. However, HSP70 activity increased in hatchlings exposed to Cu-NPs and CuO-NPs. The presence of Cu, Cu-NPs, and CuO-NPs also caused the generation and increase of O<sub>2</sub><sup>•-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, confirming the induction of oxidative stress by copper nanoparticles. These findings imply that Cu, CuNPs and CuONPs exposure induces oxidative stress in *C. carpio* hatchlings. Meanwhile, the expression of antioxidant genes indicated normal protective responses in fish to counteract and mitigate the effects of oxidative damage exerted by Cu, CuNPs and CuONPs in their tissues.

Overall, copper nanoparticles induce oxidative stress by generating ROS, which can adversely impact fish organisms at the molecular and cellular

levels. Nanoparticle-induced ROS generation via Fenton-type reactions prompts the mobilization of antioxidant and stress mechanisms in the body (Manke et al. 2013), as evidenced by the increased expression and activity of *cyp1a* and *hsp70* observed in the present study. At high concentrations, nanoparticles, such as copper, can disrupt the delicate balance between ROS and antioxidants. This disturbance can potentially overload the protective capacity of the antioxidant mechanisms, resulting in lower expression and activity of enzymes involved in this process. A compromised antioxidant protection can consequently lead to further genotoxicity, cytotoxicity and other damage in fish such as *C. carpio*. Therefore, dose- and tissue-dependent toxicity requires further investigations. The presented results lay the groundwork for a more comprehensive understanding of how copper nanoparticles impact various molecular parameters, as well as whole cells and tissues.

#### Author contributions

Conceptualization, L.S. and M. K.-G.; methodology, L.S. and D. C.-L.; validation, A.S., L.S. and M.K.-G.; formal analysis, L.S.; investigation, A.S. and L.S.; resources, M.K.-G.; writing – original draft preparation, A.S. and D. C.-L.; writing – review and editing, L.S., A.S., R.C. and T. K.; visualization, A.S. and D. C.-L.; supervision, L.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

#### Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

#### Ethical statement

Ethical approval was not required to conduct the study, according to “Ustawa z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych” (Dz. U. 2015 poz. 266). All methods were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations.

#### Data availability statement

The datasets generated and analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

#### Funding

The research was financed under the grant “Development of a strategy for managing migratory salmonids in a restored river with an indication of ways to protect them. The example of the Drawa River” by the European Union from the European Maritime and Fisheries Funding included in the Operational Program Fisheries and Sea 2014-2020. [Agreement no. 0007-6520.13-OR1600001/22/23] and co-financed by the Minister of Science under the “Regional Excellence Initiative” Program. For [2024-2027].



#### ORCID

A. Sielska <http://orcid.org/0000-0001-6019-2997>  
 D. Cembrowska-Lech <http://orcid.org/0000-0002-1503-0064>  
 M. Kowalska-Górska <http://orcid.org/0000-0001-9614-2000>  
 R. Czerniawski <http://orcid.org/0000-0001-7785-087X>  
 T. Krepski <http://orcid.org/0000-0003-1245-1362>  
 L. Skuza <http://orcid.org/0000-0002-6362-844X>

#### References

- Abdel-Latif HMR, Dawood MAO, Mahmoud SF, Shukry M, Noreldin AE, Ghetas HA, Khallaf MA. 2021. Copper oxide nanoparticles alter serum biochemical indices, induce histopathological alterations, and modulate transcription of cytochromes, *hsp70*, and oxidative stress genes in *Oreochromis niloticus*. *Animals* 11(3):652. DOI: 10.3390/ani11030652.
- Abravaya K, Myers MP, Murphy SP, Morimoto RI. 1992. The human heat shock protein *hsp70* interacts with HSF, the transcription factor that regulates heat shock gene expression. *Genes & Development* 6(7):1153–1164. DOI: 10.1101/gad.6.7.1153.
- Afshari A, Sourinejad I, Gharaei A, Johari SA, Ghasemi Z. 2021. The effects of diet supplementation with inorganic and nanoparticulate iron and copper on growth performance, blood biochemical parameters, antioxidant response and immune function of snow trout *Schizothorax zarudnyi* (Nikolskii, 1897). *Aquaculture* 539:736638. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2021.736638.
- Aghamirkarimi S, Mashinchian Moradi A, Sharifpour I, Jamili S, Ghavam Mostafavi P. 2017. Sublethal effects of copper nanoparticles on the histology of gill, liver and kidney of the Caspian roach, *Rutilus rutilus caspicus*. *Global Journal of Environmental Science and Management* 3(3):323–332. DOI: 10.22034/gjesm.2017.03.03.009.
- Aksakal FI, Ciltas A. 2019. Impact of copper oxide nanoparticles (CuO NPs) exposure on embryo development and expression of genes related to the innate immune system of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 223:78–87. DOI: 10.1016/j.cbpc.2019.05.016.
- Al-Bairuty GA, Shaw BJ, Handy RD, Henry TB. 2013. Histopathological effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on the organs of rainbow trout

- (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands) 126:104–115. DOI: 10.1016/j.aquatox.2012.10.005.
- Asif S, Javed M, Abbas S, Ambreen F. 2021. Growth responses of carnivorous fish species under the chronic stress of water-borne copper. Iranian Journal of Fisheries Sciences 20 (3):773–788. DOI: 10.22092/ijfs.2021.350176.0.
- Awasthi YC, Beutler E, Srivastava SK. 1975. Purification and properties of human erythrocyte glutathione peroxidase. Journal of Biological Chemistry 250(13):5144–5149. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)41289-1.
- Barot N, Patel SB, Kaur H. 2016. Nitro resin supported copper nanoparticles: An effective heterogeneous catalyst for CN cross coupling and oxidative CC homocoupling. Journal of Molecular Catalysis A: Chemical 423:77–84. DOI: 10.1016/j.molcata.2016.06.009.
- Beauchamp C, Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry 44(1):276–287. DOI: 10.1016/0003-2697(71)90370-8.
- Bongers ABJ, Sukkel M, Gort G, Komen J, Richter CJJ. 1998. Development and use of genetically uniform strains of common carp in experimental animal research. Laboratory Animals 32 (4):349–363. DOI: 10.1258/002367798780599749.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72 (1):248–254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Chen Z, Meng H, Xing G, Chen C, Zhao Y, Jia G, Wang T, Yuan H, Ye C, Zhao F, Chai Z, Zhu C, Fang X, Ma B, Wan L. 2006. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. Toxicology Letters 163(2):109–120. DOI: 10.1016/j.toxlet.2005.10.003.
- Conway JR, Adeleye AS, Gardea-Torresdey J, Keller AA. 2015. Aggregation, dissolution, and transformation of copper nanoparticles in natural waters. Environmental Science & Technology 49(5):2749–2756. DOI: 10.1021/es504918q.
- Dawood MAO, Eweedah NM, Moustafa EM, El-Sharawy ME, Soliman AA, Amer AA, Atia MH. 2020. Copper nanoparticles mitigate the growth, immunity, and oxidation resistance in common carp (*Cyprinus carpio*). Biological Trace Element Research 198(1):283–292. DOI: 10.1007/s12011-020-02068-0.
- Delavari NM, Gharaei A, Mirdar HJ, Davari A, Rastiannasab A. 2022. Modulatory effect of dietary copper nanoparticles and vitamin C supplementations on growth performance, hematological and immune parameters, oxidative status, histology, and disease resistance against *Yersinia ruckeri* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Physiology and Biochemistry 48(1):33–51. DOI: 10.1007/s10695-021-01036-2.
- Dugal S, Mascarenhas S. 2015. Chemical synthesis of copper nanoparticles and its antibacterial effect against gram negative pathogens. Journal of Advanced Scientific Research 6(3):1–4.
- FAO. 2020. The state of world fisheries and aquaculture 2020. Sustainability in action. Food and Agriculture Organization 2020:1–244. DOI: 10.4060/ca9229en.
- Fazelan Z, Hoseini SM, Yousefi M, Khalili M, Hoseinifar SH, Van Doan H. 2020. Effects of dietary eucalyptol administration on antioxidant and inflammatory genes in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to ambient copper. Aquaculture 520:734988. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2020.734988.
- Forouhar Vajargah M, Mohamadi Yalsuyi A, Hedayati A, Faggio C. 2018. Histopathological lesions and toxicity in common carp (*Cyprinus carpio* L. 1758) induced by copper nanoparticles. Microscopy Research and Technique 81 (7):724–729. DOI: 10.1002/jemt.23028.
- Ghuglot R, Titus W, Agnihotri AS, Krishnakumar V, Krishnamoorthy G, Marimuthu N. 2021. Stable copper nanoparticles as potential antibacterial agent against aquaculture pathogens and human fibroblast cell viability. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 32:101932. DOI: 10.1016/j.cbac.2021.101932.
- Giannopolitis CN, Ries SK. 1977. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants 1 2. Plant Physiology 59 (2):309–314. DOI: 10.1104/pp.59.2.309.
- Goksøyr A. 1995. Use of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish as a biomarker of aquatic pollution. In: Degen GH, Seiler JP, Bentley P, editors. Toxicology in Transition. Archives of Toxicology. Berlin Heidelberg: Springer. pp. 80–95. DOI: 10.1007/978-3-642-79451-3\_7.
- Gupta N, Siddique R. 2020. Utilization of copper slag in self-compacting concrete – Strength and permeation properties. In: Mechtcherine V, Khayat K, Secrieru, E, editors. RheoCon SCC 2019. Cham, Switzerland: Springer. pp. 544–551. DOI: 10.1007/978-3-030-22566-7\_63.
- Hanna SK, Miller RJ, Lenihan HS. 2014. Accumulation and toxicity of copper oxide engineered nanoparticles in a Marine mussel. Nanomaterials: Overview and Historical Perspectives 4(3):535–547. DOI: 10.3390/nano4030535.
- Hoseini SM, Hedayati A, Taheri Mirghaed A, 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. DOI: 10.1016/j.etp.2016.08.002.
- Ighalo JO, Sagboye PA, Umenweke G, Ajala OJ, Omoarukhe FO, Adeyanju CA, Ogunniyi S, Adeniyi AG. 2021. CuO nanoparticles (CuO NPs) for water treatment: A review of recent advances. Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management 15:100443. DOI: 10.1016/j.enmm.2021.100443.
- Ighodaro OM, Akinloye OA. 2018. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. Alexandria Journal of Medicine 54(4):287–293. DOI: 10.1016/j.ajme.2017.09.001.
- Johari SA, Kalbassi MR, Soltani M, Yu IJ. 2013. Toxicity comparison of colloidal silver nanoparticles in various life stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). IFRO 12(1):76–95. <http://ijfro.ir/article-1-873-en.html>.
- Johari SA, Sarkheil M, Asghari S, Haghighat F, Dekani L, Keyvanshokoh S. 2020. Comparative toxicity of nanoparticulate and ionic copper following dietary exposure to common carp (*Cyprinus carpio*). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 229:108680. DOI: 10.1016/j.cbpc.2019.108680.
- Kakakhel MA, Wu F, Sajjad W, Zhang Q, Khan I, Ullah K, Wang W. 2021. Long-term exposure to high-concentration silver nanoparticles induced toxicity, fatality, bioaccumulation, and histological alteration in fish (*Cyprinus carpio*). Environmental Sciences Europe 33(1):14. DOI: 10.1186/s12302-021-00453-7.
- Kalatehjari P, Yousefian M, Khalilzadeh MA. 2015. Assessment of antifungal effects of copper nanoparticles on the growth of the fungus *Saprolegnia* sp. on white fish (*Rutilus frisii kutum*) eggs. The Egyptian Journal of Aquatic Research 41 (4):303–306. DOI: 10.1016/j.ejar.2015.07.004.
- Kaur J, Khatri M, Puri S. 2019. Toxicological evaluation of metal oxide nanoparticles and mixed exposures at low doses using

- zebra fish and THP1 cell line. *Environmental Toxicology* 34 (4):375–387. DOI: 10.1002/tox.22692.
- Kowalska-Górska M, Dziewulska K, Kulasza M. 2019. Effect of copper nanoparticles and ions on spermatozoa motility of sea trout (*Salmo trutta m. Trutta L.*). *Aquatic Toxicology* (Amsterdam, Netherlands) 211:11–17. DOI: 10.1016/j.aqua.tox.2019.03.013.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259):680–685. DOI: 10.1038/227680a0.
- Lammel T, Thit A, Cui X, Mouneyrac C, Baun A, Valsami-Jones E, Sturve J, Selck H. 2020. Trophic transfer of CuO NPs from sediment to worms (*Tubifex tubifex*) to fish (*Gasterosteus aculeatus*): A comparative study of dissolved Cu and NPs enriched with a stable isotope tracer (<sup>65</sup>Cu). *Environmental Science: Nano* 7(8):2360–2372. DOI: 10.1039/D0EN00227E.
- Lennox AJJ, Bartels P, Pohl M-M, Junge H, Beller M. 2016. In situ photodeposition of copper nanoparticles on TiO<sub>2</sub>: Novel catalysts with facile light-induced redox cycling. *Journal of Catalysis* 340:177–183. DOI: 10.1016/j.jcat.2016.04.011.
- Liu Y, Yan Z, Xia J, Wang K, Ling X, Yan B. 2017. Potential toxicity in crucian carp following exposure to metallic nanoparticles of copper, chromium, and their mixtures: A comparative study. *Polish Journal of Environmental Studies* 26(5):2085–2094. DOI: 10.15244/pjoes/69251.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> method. *Methods* 25(4):402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- Ma H, Diamond SA. 2013. Phototoxicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles to zebrafish (*Danio rerio*) is dependent on life stage. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32(9):2139–2143. DOI: 10.1002/etc.2298.
- Ma W, Soroush A, Van Anh Luong T, Brennan G, Rahaman MS, Asadishad B, Tufenkji N. 2016. Spray- and spin-assisted layer-by-layer assembly of copper nanoparticles on thin-film composite reverse osmosis membrane for biofouling mitigation. *Water Research* 99:188–199. DOI: 10.1016/j.watres.2016.04.042.
- Manke A, Wang L, Rojanasakul Y. 2013. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *BioMed Research International* 2013:942916. DOI: 10.1155/2013/942916.
- Mansouri B, Maleki A, Johari SA, Shahmoradi B, Mohammadi E, Shahsavari S, Davari B. 2016. Copper bioaccumulation and depuration in common carp (*Cyprinus carpio*) following Co-exposure to TiO<sub>2</sub> and CuO nanoparticles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 71(4):541–552. DOI: 10.1007/s00244-016-0313-5.
- Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M. 2008. Glutathione peroxidase family—an evolutionary overview. *The FEBS Journal* 275(15):3959–3970. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2008.06542.x.
- Martínez G, Merinero M, Pérez-Aranda M, Pérez-Soriano EM, Ortiz T, Villamor E, Begines B, Alcudia A. 2021. Environmental impact of nanoparticles' application as an emerging technology: A review. *Materials* 14(1):166. DOI: 10.3390/ma14010166.
- Mazandarani M, Hoseini SM. 2017. Anaemia and plasma lipid profile in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to ambient copper sulphate and nano-scale copper oxide. *Aquaculture Research* 48(3):844–852. DOI: 10.1111/arc.12928.
- Mirsafaei R, Heravi MM, Ahmadi S, Moslemin MH, Hosseinnajad T. 2015. In situ prepared copper nanoparticles on modified KIT-5 as an efficient recyclable catalyst and its applications in click reactions in water. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 402:100–108. DOI: 10.1016/j.molcata.2015.03.006.
- Misra HP, Fridovich I. 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry* 247 (10):3170–3175. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)45228-9.
- Mitreă S, Oprina G, Radu E, Marinescu V, Voina A, Lingvay I. 2016. Corrosion of copper and carbon steel in some electrical purposes oils. *Revista de Chimie (Bucharest)* 67(9):1707–1712.
- Montes M, Pierce CG, Lopez-Ribot JL, Bhalla AS, Guo RY. 2016. Properties of silver and copper nanoparticle containing aqueous suspensions and evaluation of their in vitro activity against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Journal of Nano Research* 37:109–121. DOI: 10.4028/www.scientific.net/JNanoR.37.109.
- Naeemi AS, Elmi F, Vaezi G, Ghorbankhah M. 2020. Copper oxide nanoparticles induce oxidative stress mediated apoptosis in carp (*Cyprinus carpio*) larva. *Gene Reports* 19:100676. DOI: 10.1016/j.genrep.2020.100676.
- Nooreen A, Jabeen F, Tabish TA, Ali M, Iqbal R, Yaqub S, Shakoor Chaudhry A. 2021. Histopathological changes and antioxidant responses in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to copper nanoparticles. *Drug and Chemical Toxicology* 44 (4):372–379. DOI: 10.1080/01480545.2019.1606233.
- Pang J, Xie R, Chua S, Zou Y, Tang M, Zhang F, Chai F. 2021. Preparation of fluorescent bimetallic silver/copper nanoparticles and their utility of dual-mode fluorimetric and colorimetric probe for Hg<sup>2+</sup>. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 261:120035. DOI: 10.1016/j.saa.2021.120035.
- Rahman MM. 2015. Role of common carp (*Cyprinus carpio*) in aquaculture production systems. *Frontiers in Life Science* 8 (4):399–410. DOI: 10.1080/21553769.2015.1045629.
- Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP. 1996. Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 110(1):125–136. DOI: 10.1104/pp.110.1.125.
- Saddick S, Afifi M, Abu Zinada OA. 2017. Effect of zinc nanoparticles on oxidative stress-related genes and antioxidant enzymes activity in the brain of *Oreochromis niloticus* and *Tilapia zillii*. *Saudi Journal of Biological Sciences* 24 (7):1672–1678. DOI: 10.1016/j.sjbs.2015.10.021.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J-Y, White DJ, Hartenstein V, Elicirri K, Tomancak P, Cardona A. 2012. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 9 (7):676–682. DOI: 10.1038/nmeth.2019.
- Schlesinger MJ. 1990. Heat shock proteins. *Journal of Biological Chemistry* 265(21):12111–12114. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)38314-0.
- Scown TM, Santos EM, Johnston BD, Gaiser B, Baalousha M, Mitov S, Lead JR, Stone V, Fernandes TF, Jepson M, van Aerle R, Tyler CR. 2010. Effects of aqueous exposure to silver nanoparticles of different sizes in rainbow trout. *Toxicological Sciences* 115(2):521–534. DOI: 10.1093/toxsci/kfq076.
- Shahzad K, Khan MN, Jabeen F, Kosour N, Chaudhry AS, Sohail M. 2018. Retracted Article: Evaluating toxicity of copper(II) oxide nanoparticles (CuO-NPs) through waterborne exposure to tilapia (*Oreochromis mossambicus*) by tissue accumulation, oxidative stress, histopathology, and genotoxicity. *Environmental Science and Pollution Research* 25(16):15943–15953. DOI: 10.1007/s11356-018-1813-9.

- Sheikh FA, Kanjwal MA, Saran S, Chung W-J, Kim H. 2011. Polyurethane nanofibers containing copper nanoparticles as future materials. *Applied Surface Science* 257 (7):3020–3026. DOI: [10.1016/j.apsusc.2010.10.110](https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2010.10.110).
- Sielska A, Skuza L, Kowalska-Górska M. 2022. The effects of silver and copper nanoparticles and selenium on *Salmo trutta* hatchlings. *Ecotoxicology* 15(7):e2453. DOI: [10.1002/eco.2453](https://doi.org/10.1002/eco.2453).
- Široká Z, Drastichová J. 2004. Biochemical marker of aquatic environment contamination—cytochrome P450 in fish. A review. *Acta Veterinaria Brno* 73(1):123–132. DOI: [10.2754/avb200473010123](https://doi.org/10.2754/avb200473010123).
- Song L, Vijver MG, Peijnenburg WJGM, Galloway TS, Tyler CR. 2015. A comparative analysis on the in vivo toxicity of copper nanoparticles in three species of freshwater fish. *Chemosphere* 139:181–189. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2015.06.021](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.06.021).
- Velikova V, Yordanov I, Edreva A. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines. *Plant Science* 151 (1):59–66. DOI: [10.1016/S0168-9452\(99\)00197-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00197-1).
- Villarreal FD, Das GK, Abid A, Kennedy IM, Kültz D, Johnson SJ. 2014. Sublethal Effects of CuO Nanoparticles on Mozambique Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) Are Modulated by Environmental Salinity. *Public Library of Science One* 9(2): e88723. DOI: [10.1371/journal.pone.0088723](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088723).
- Woodbury W, Spencer AK, Stahmann MA. 1971. An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Analytical Biochemistry* 44(1):301–305. DOI: [10.1016/0003-2697\(71\)90375-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90375-7).
- Wozniak-Budych MJ, Langer K, Peplińska B, Przysiecka Ł, Jarek M, Jarzębski M, Jurga S. 2016. Copper-gold nanoparticles: Fabrication, characteristic and application as drug carriers. *Materials Chemistry and Physics* 179:242–253. DOI: [10.1016/j.matchemphys.2016.05.036](https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2016.05.036).
- Yalsuyi AM, Vajargah MF. 2017. Acute toxicity of silver nanoparticles in Roach (*Rutilus rutilus*) and Goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of Environmental Treatment Techniques* 5 (1):1–4.
- Zhang L, Yang Z, Yang M, Yang F, Wang G, Liu D, Li X, Yang L, Wang Z. 2022. Copper-induced oxidative stress, transcriptome changes, intestinal microbiota, and histopathology of common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 246:114136. DOI: [10.1016/j.ecoenv.2022.114136](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114136).
- Zhang W, Jia Y, Ji X, Zhang R, Liang T, Du Q, Chang Z. 2016. Optimal reference genes in different tissues, gender, and gonad of Yellow River Carp (*Cyprinus carpio var*) at various developmental periods. *Pakistan Journal of Zoology* 48(6).
- Zhou Y, Wu S, Liu F. 2019. High-performance polyimide nanocomposites with polydopamine-coated copper nanoparticles and nanowires for electronic applications. *Materials Letters* 237:19–21. DOI: [10.1016/j.matlet.2018.11.067](https://doi.org/10.1016/j.matlet.2018.11.067).



### Publikacja 3

Sielska, A., Kowalska-Górska, M., Szućko-Kociuba, I., & Skuza, L. (2024). Comparison of the effects of copper oxide nanoparticles (CuO-NPs) and copper (II) sulfate on oxidative stress parameters in rainbow trout hatchlings (*Oncorhynchus mykiss*). *The European Zoological Journal*, 91(2), 897–905. <https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2385820>

IF: 1.6

MNiSW: 140 pkt.

#### Wkład współautorów:

Anna Sielska: 70%; walidacja, przeprowadzenie badań, wizualizacja wyników, pisanie, przegląd i redakcja manuskryptu oraz pozyskanie środków finansowych.

dr hab. inż. Monika Kowalska-Górska: 20%; opracowanie koncepcji i metodologii badań, walidacja oraz przygotowanie materiału biologicznego do badań.

dr Izabela Szućko-Kociuba: 5%; przegląd i redakcja manuskryptu oraz pozyskanie środków finansowych.

dr hab. Lidia Skuza, prof. US: 5%; opracowanie koncepcji i metodologii badań, walidacja, analiza formalna, wykonanie części badań, przegląd i redakcja manuskryptu, nadzór badań i pisanie manuskryptu oraz pozyskanie środków finansowych.

Szczecin, 24.09.2024


## Oświadczenie

Dotyczący pracy

Sielska, A., Kowalska-Górska, M., Szućko-Kociuba, I., & Skuza, L. (2024). Comparison of the effects of copper oxide nanoparticles (CuO-NPs) and copper (II) sulfate on oxidative stress parameters in rainbow trout hatchlings (*Oncorhynchus mykiss*). *The European Zoological Journal*, 91(2), 897–905. <https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2385820>

Ja niżej podpisana mgr Anna Sielska oświadczam, że mój wkład w przygotowanie pracy wynosił 70% i polegał na walidacji, przeprowadzeniu badań, wizualizacji wyników, pisaniu, przeglądzie i redakcji manuskryptu oraz pozyskaniu środków finansowych.

Podpis



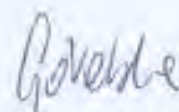
## Oświadczenie

dotyczące artykułu

Sielska, A., Kowalska-Górska, M., Szućko-Kociuba, I., & Skuza, L. (2024). Comparison of the effects of copper oxide nanoparticles (CuO-NPs) and copper (II) sulfate on oxidative stress parameters in rainbow trout hatchlings (*Oncorhynchus mykiss*). *The European Zoological Journal*, 91(2), 897–905. <https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2385820>

Ja niżej podpisana dr hab. inż. Monika Kowalska-Górska oświadczam, że mój wkład w przygotowanie pracy wynosił 20% i polegał na opracowaniu koncepcji, metodologii badań, walidacji oraz przygotowaniu materiału biologicznego do badań.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby praca stanowiła części rozprawy doktorskiej mgr Anny Sielskiej.



Podpis

Szczecin, 16.09.2024

## Oświadczenie

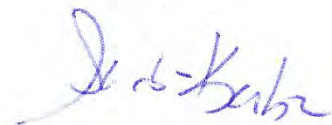
dotyczące artykułu

Sielska, A., Kowalska-Górska, M., Szućko-Kociuba, I., & Skuza, L. (2024). Comparison of the effects of copper oxide nanoparticles (CuO-NPs) and copper (II) sulfate on oxidative stress parameters in rainbow trout hatchlings (*Oncorhynchus mykiss*). *The European Zoological Journal*, 91(2), 897–905. <https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2385820>

Ja niżej podpisana dr Izabela Szućko-Kociuba oświadczam, że mój wkład w przygotowanie pracy wynosił 5% i polegał na przeglądzie i redakcji manuskryptu oraz pozyskaniu finansowania.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby praca stanowiła części rozprawy doktorskiej mgr Anny Sielskiej.

Podpis



Szczecin, 17.09.2024

## Oświadczenie

dotyczące artykułu

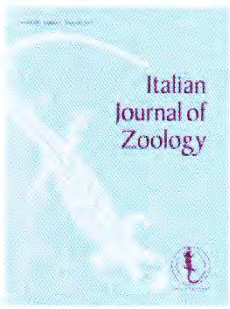
Sielska, A., Kowalska-Góralaska, M., Szućko-Kociuba, I., & Skuza, L. (2024). Comparison of the effects of copper oxide nanoparticles (CuO-NPs) and copper (II) sulfate on oxidative stress parameters in rainbow trout hatchlings (*Oncorhynchus mykiss*). *The European Zoological Journal*, 91(2), 897–905. <https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2385820>

Ja niżej podpisana dr hab. Lidia Skuza, prof. US oświadczam, że mój wkład w przygotowanie pracy wynosił 5% i polegał na opracowaniu koncepcji i metodologii badań, walidacji, analizie formalnej, wykonaniu części badań, przeglądzie i redakcji manuskryptu, pozyskaniu finansowania oraz nadzorze badań i pisania manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby praca stanowiła części rozprawy doktorskiej mgr Anny Sielskiej.



Podpis



## Comparison of the effects of copper oxide nanoparticles (CuO-NPs) and copper (II) sulfate on oxidative stress parameters in rainbow trout hatchlings (*Oncorhynchus mykiss*)

A. Sielska, M. Kowalska-Góralaska, I. Szućko-Kociuba & L. Skuza

To cite this article: A. Sielska, M. Kowalska-Góralaska, I. Szućko-Kociuba & L. Skuza (2024) Comparison of the effects of copper oxide nanoparticles (CuO-NPs) and copper (II) sulfate on oxidative stress parameters in rainbow trout hatchlings (*Oncorhynchus mykiss*), The European Zoological Journal, 91:2, 897-905, DOI: [10.1080/24750263.2024.2385820](https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2385820)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2385820>



© 2024 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.



Published online: 15 Aug 2024.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

## Comparison of the effects of copper oxide nanoparticles (CuO-NPs) and copper (II) sulfate on oxidative stress parameters in rainbow trout hatchlings (*Oncorhynchus mykiss*)

A. SIELSKA <sup>1,2,3\*</sup>, M. KOWALSKA-GÓRALSKA <sup>4</sup>, I. SZUĆKO-KOCIUBA <sup>1,2</sup>, & L. SKUZA <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biology, University of Szczecin, Szczecin, Poland, <sup>2</sup>Centre for Molecular Biology and Biotechnology, University of Szczecin, Szczecin, Poland, <sup>3</sup>Doctoral School, University of Szczecin, Szczecin, Poland, and <sup>4</sup>Department of Hydrobiology and Aquaculture, Faculty of Biology and Animal Science, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Wrocław, Poland

(Received 21 December 2023; accepted 21 July 2024)

### Abstract

Nanoparticles of copper oxide, released uncontrollably into the environment, pose a threat to living organisms. One of the mechanisms of their toxicity is the induction of oxidative stress, contributing to the disruption of antioxidant mechanisms. The aim of the present study was to assess the degree and toxic dose of copper oxide nanoparticle (CuO-NPs) associated with the induction of oxidative stress and compare them to the toxicity of copper sulfate (VI) (CuSO<sub>4</sub>) by measuring the expression of genes encoding some key enzymes involved in protection against oxidative stress: glutathione peroxidase (*gpx*), cytochrome P450 (*cyp1a*), heat shock protein (*hsp70*) and superoxide dismutase (*sod*). Hatchlings of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) were used as biological material. The test individuals were exposed for 2 hours to CuO-NPs and CuSO<sub>4</sub> in the concentration range of 4–256 mg dm<sup>-3</sup>. Individuals exposed to all concentrations of CuO-NPs showed an increase in the expression of *gpx*, *cyp1a* and *hsp70* genes, and a decrease in *sod* gene expression, while the hatchlings exposed to CuSO<sub>4</sub> exhibited an increase in the expression of all genes. The expression of *hsp70* and *sod* genes in the hatchlings exposed to CuSO<sub>4</sub> was higher than in the CuO-NP treatment, while the expression levels of *gpx* and *cyp1a* were similar. Based on the obtained results, potentially higher toxicity of CuSO<sub>4</sub> was observed in the hatchlings of *Oncorhynchus mykiss*. However, the elevated expression of *gpx*, *cyp1a* and *hsp70* after the exposure to CuO-NPs, indicates toxicity via oxidative stress. The decrease (*sod* in hatchlings exposed to CuO-NPs) or increase of gene expression was not dose-dependent. The presented study confirms a need for further research regarding the toxicity of metal nanoparticles to aquatic organisms and the necessity for monitoring the release of CuO-NPs into the aquatic environment.

**Keywords:** *Oncorhynchus mykiss*, copper oxide nanoparticles, copper (II) sulfate, oxidative stress, aquatic toxicology, ecotoxicology

### 1. Introduction

Copper oxide nanoparticles (CuO-NPs), similarly to silver nanoparticles (Ag-NPs), exhibit biocidal properties (Ren et al. 2009; Duffy et al. 2018). Moreover, they are increasingly being used in various applications, including cosmetics and textile production (Román et al. 2020). Due to their potential harmful effects on the environment, also during production, as well as the wide range of applications of engineered CuO-NPs (ENPs), methods for their “green”

synthesis (plant-mediated synthesis) are being developed. In this process, the produced NPs exhibit higher stability and consequently lower toxicity (Saif et al. 2016; Waris et al. 2021), providing an alternative to engineered NPs. CuO-NPs produced in this manner can be used, among other applications, in agriculture as biocidal agents (Shah et al. 2022) and potentially in medicine for anticancer therapies (Zughaibi et al. 2022). CuO-NPs, like other nanoparticles (NPs),

\*Correspondence: A. Sielska, Institute of Biology, University of Szczecin, ul. Wąska 13, PL-71-415, Szczecin, Poland. Email: [anna.sielska@usz.edu.pl](mailto:anna.sielska@usz.edu.pl)

can undergo various transformations depending on the conditions of the aquatic environment (e.g., aggregation, ion release, sedimentation, interactions with organic and inorganic matter) (Conway et al. 2015; Amde et al. 2017), posing a potential threat to aquatic organisms, including fish. In fish farming, copper sulfate ( $\text{CuSO}_4$ ) is commonly used as an anti-algal agent and a fungicide for water tank purification (Murray-Gulde et al. 2002; Yanong 2010). However, it has been observed that there is a risk of its toxic effects on both cultured and wild organisms (Closson & Paul 2014; Vasconcelos et al. 2022). Due to its negative impact,  $\text{CuSO}_4$  is currently considered as a water pollutant (Ghangrekar & Chatterjee 2018). Therefore, a  $\text{CuSO}_4$ , which is confirmed to exert toxicity and multiple adverse effects (in doses over  $1 \text{ mg dm}^{-3}$ ) on fish (Lasiené et al. 2016; Straus et al. 2023; Anwar et al. 2024), can be a valuable substance model to measure toxic effects of CuO-NPs.

Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is one of the most widely farmed species for consumption purposes. The production of *Oncorhynchus mykiss* is one of the most important aquacultures in the European Union ([https://oceans-and-fisheries.ec.europa.eu/ocean/blue-economy/aquaculture/overview-eu-aquaculture-fish-farming\\_en#aquaculture-production](https://oceans-and-fisheries.ec.europa.eu/ocean/blue-economy/aquaculture/overview-eu-aquaculture-fish-farming_en#aquaculture-production)), accounting for 2.6% of the total global fish production in 2020 (FAO 2022). Similar to the model species zebrafish, *Oncorhynchus mykiss* is also a useful species in toxicology studies (Thorgaard et al. 2002; Dai et al. 2014), including its response to heavy metal exposure, and can be utilized as a bioindicator (Bhat et al. 2023). The rainbow trout, which inhabits mainly fresh waters, also has anadromous forms, the so-called steelhead trout (Hardy 2002; Berejikian et al. 2014). Therefore, this species can be a useful model for studying the effects of nanoparticles and metal compounds on both fresh- and saltwater fish and how the environment (fresh and salt waters) can affect toxic abilities of nanoparticles.

In many studied fish species, such as *Oncorhynchus mykiss*, *Danio rerio*, or *Clarias gariepinus*, exposure to CuO-NPs can lead to adverse effects, including damage to genetic material and proteins, increased metabolism, formation of micronuclei, and alterations in the activity of antioxidant enzymes (Ogunsuyi et al. 2019; de Oliveira Eiras et al. 2022; Auclair et al. 2023). According to studies conducted on larval and juvenile forms of fish exposed to nanoparticles (NPs), hatchlings are more susceptible to their toxic effects than adult individuals. Johari et al. (2013) suggest that Ag-NPs exhibit high toxicity towards the embryonic and larval forms of *Oncorhynchus mykiss* (Johari et al. 2013). *Danio*

*rerio* embryos, on the other hand, showed body deformation or increased mortality when exposed to CuO-NPs in a low ionic strength environment (Chao et al. 2021). In carp hatchlings (*Cyprinus carpio*), CuO-NPs were shown to induce dose-dependent apoptosis and oxidative stress (Naeemi et al. 2020). It is confirmed, that the induction of oxidative stress is one of the main mechanism of toxicity of nanoparticles, including CuO-NPs. Moreover, there is lack of studies regarding toxicity of CuO-NPs on *O. mykiss* hatchlings and juvenile forms, especially the effects of CuO-NPs on expression of oxidative stress-related genes. Therefore, it is crucial to investigate the impact of CuO-NPs on aquatic organisms, especially juveniles, and to compare whether they exert higher toxicity than other forms of copper present in the environment, such as copper (II) sulfate ( $\text{CuSO}_4$ ).

The purpose of this study was to investigate whether, and at what doses within the examined range ( $4\text{--}256 \text{ mg dm}^{-3}$ ), CuO-NP and  $\text{CuSO}_4$  negatively affected the expression of oxidative stress-related genes (*gpx*, *cyp1a*, *hsp70*, and *sod*), which are the first line of defense against generated by pollutants (among others CuO-NPs) reactive oxygen species and their adverse effects. Additionally, the study aimed to compare which of the examined copper pollution sources demonstrated higher toxicity in *Oncorhynchus mykiss*.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Biological material preparation

*Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout) hatchlings, which were obtained from fertilized eggs, were used in this study. During this study, they were incubated in either CuO-NPs or  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$ . The biological material was obtained and prepared in the Faculty of Biology and Animal Science of Wrocław University of Environmental and Life Sciences (Poland). The fish eggs were divided into three groups: control, CuONPs 4–256, and  $\text{CuSO}_4$  4–256. The first stage was the fertilization of the eggs in Wojnarowicz solution. The incubation in solutions of the test compounds (concentrations ranging from 4 to  $256 \text{ mg dm}^{-3}$ ) was carried out during swelling for 2 hours. The incubation was conducted during swelling, because during this phase fish eggs absorb substances, including toxins, from the environment the most. The control group consisted of individuals that were not treated with the studied substances. After incubation, the eggs were rinsed in aquarium water and placed in baskets until hatching in closed-circuit water. The resulting



hatchlings were preserved in alcohol (95%) until analysis.

## 2.2. Suspension preparation

CuO nanopowder (particle size  $\sim$ 50 nm; cas no. 1317-38-0; Sigma Aldrich) and  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  (7758-99-8; Sigma Aldrich) were used to prepare suspensions at concentrations of 4, 8, 16, 24, 48, 96, 128 and 256  $\text{mg dm}^{-3}$ . All suspensions were sonicated in an ultrasonic bath for 30 minutes. Suspensions were vortexed before each use (Kowalska-Góralaska et al. 2019).

## 2.3. Isolation of the genetic material and reverse transcription

*Oncorhynchus mykiss* hatchlings were subjected to RNA isolation using the commercial EXTRACTME Total RNA Kit (Blirt). RNA was isolated from the hatchlings exposed to CuO-NPs at concentrations of 4–256  $\text{mg dm}^{-3}$  and  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  at concentrations of 4, and 16–128  $\text{mg dm}^{-3}$  in two replicates. The control sample and samples incubated in  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  solutions at concentrations of 8 and 256  $\text{mg dm}^{-3}$  were isolated in one replicate. DNA contamination from the samples was removed using DNase I (Blirt). Reverse transcription into cDNA was carried out using the RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific). These steps were carried out using protocols provided by the manufacturer. The genetic material (RNA and cDNA) was checked qualitatively and quantitatively using a NanoDrop spectrophotometer (ThermoFisher Scientific).

## 2.4. Real-time PCR

The cDNA samples obtained by reverse transcription were used for real-time PCR reactions. Each sample was performed using three technical replicates. Each analyzed sample contained 6.6  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ , 2.0  $\mu\text{l}$  5 $\times$

HOTFIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (ROX) (Solis BioDyne, 08-24 -00,001), 0.2  $\mu\text{l}$  Forward and Reverse primers, and 1  $\mu\text{l}$  cDNA, while the negative control did not contain cDNA in its composition. The *gpx*, *cyp1a*, *hsp70* (Scown et al. 2010) and *sod* (Fazelan et al. 2020) gene primers were used for the reaction, and the  $\beta$ -actin gene (Fazelan et al. 2020) served as the reference gene (Table I). Real-time PCR was performed in a thermal cycler (Biorad) according to the manufacturer's protocol (Solis BioDyne). Primer annealing temperatures were optimized individually for each gene (Table I).

Relative gene expression was normalized to the reference gene with  $2^{-\Delta\text{Ct}}$  method. In order to calculate the fold change in gene expression normalized to reference gene ( $2^{-\Delta\text{Ct}}$ ) in each treatment, Livak's comparative method was used (Livak & Schmittgen 2001).

## 2.5. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Statistica for Windows ver. 13.3 (TIBCO Software Inc.). Gene expression measurements were verified using the Tukey's post-hoc test (HSD). The significance level was set at 0.050, and the confidence interval at 95% (0.950).

## 3. Results

The relative expression results are shown in Figure 1, while their comparison between CuONPs and  $\text{CuSO}_4$  is summarized in Table II. No upward or downward trends were observed with increasing concentrations of CuO-NPs or  $\text{CuSO}_4$  (Figure 1). For the *hsp70* and *sod* genes, the samples isolated from individuals exposed to  $\text{CuSO}_4$  showed higher expression at all concentrations tested compared to those treated with CuO-NPs (Figure 1(c-d)). The expression of *gpx* and *cyp1a* showed a similar increase in both CuO-NPs and  $\text{CuSO}_4$  treatments.

Table I. Primer characteristics (Scown et al. 2010; Fazelan et al. 2020).

Primer	Primer sequence (5'-3')	Annealing temperature
<i>gpx</i> F	GCTCCATTTCGAGTATTC	54°C
<i>gpx</i> R	TCCTTCCCATTACATCC	54°C
<i>cyp1a2</i> F	CTTCCGCCATATTGTTCGTATC	52.4°C
<i>cyp1a2</i> R	CCACCACCTGCCCAAAC	51.9°C
<i>hsp70</i> F	CTGCTGCTGCTGGATGTG	52.6°C
<i>hsp70</i> R	GCTGGTTGTCCGAGTAAGTG	53.8°C
<i>sod</i> F	TGAGCTGTCCGGAAGCCATCAAG	56.7°C
<i>sod</i> R	TTGGTTCCCACATGCAGCAATCC	57.1°C
<i>bactin</i> F	CCTGTATGCCAACACCGTGCTG	58.6°C
<i>bactin</i> R	CTTCATGGTGGAGGGAGCAAGG	58.6°C

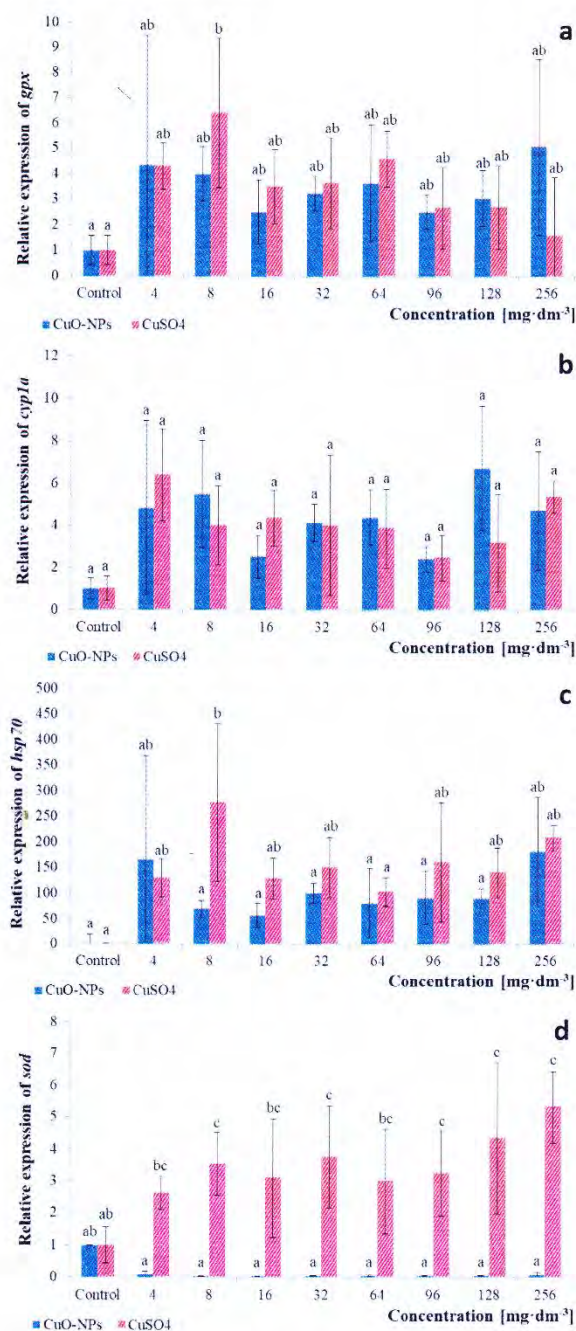


Figure 1. Relative expression levels of *gpx* (a), *cyp1a* (b), *hsp70* (c) and *sod* (d) normalized by the selected reference gene. Error bars represent SD  $\pm$  1. Values marked with different letters (a-c) indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ ).

The *gpx*, *cyp1a* and *hsp70* genes showed higher expression in both CuO-NPs and CuSO<sub>4</sub> groups than in the control (Figure 1(a-c)). For doses of 4, 128 and 256 mg dm<sup>-3</sup>, *gpx* expression was higher in fish exposed to CuO-NPs, while *cyp1a* expression

was higher at doses of 8, 32, 64, 256 mg dm<sup>-3</sup> (Figure 1(a,b)). Only samples isolated from individuals exposed to CuO-NPs exhibited lower *sod* expression than controls (Figure 1(d)). However, the highest increase in expression was recorded for the *hsp70* gene (Figure 1c).

Gene name	CuO-NPs	CuSO <sub>4</sub>
<i>gpx</i>	+	+
<i>cyp1a</i>	+	+
<i>hsp70</i>		+
<i>sod</i>		+

was higher at doses of 8, 32, 64, 256 mg dm<sup>-3</sup> (Figure 1(a,b)). Only samples isolated from individuals exposed to CuO-NPs exhibited lower *sod* expression than controls (Figure 1(d)). However, the highest increase in expression was recorded for the *hsp70* gene (Figure 1c).

#### 4. Discussion

Copper oxide nanoparticles exhibit toxicity towards aquatic organisms, causing damage at both the molecular and physiological levels, as well as morphological alterations.

In *Oncorhynchus mykiss*, CuO-NPs induced hepatotoxicity manifested as protein and DNA damage (Auclair et al. 2023). Genotoxicity induced by these nanoparticles was also observed in *Labeo rohita* (Aziz & Abdullah 2023). Toxic effects on organs, such as muscles in *Danio rerio* (Mani et al. 2020) and gills in *Oreochromis mossambicus* (Shahzad et al. 2018), were also reported.

Several pathways of NP toxicity to aquatic organisms have been described. The toxic effects of metal nanoparticles may correlate with the extent of their bioaccumulation in aquatic organisms. Several routes of nanoparticle absorption by fish are commonly distinguished, including the oral route, either directly or through trophic transfer (Donia & Carbone 2019). Another possible route of bioaccumulation in fish is the absorption/uptake of NPs from the aquatic environment through water ingestion (Dube & Okuthe 2023). It has also been suggested that the ability to bioaccumulate NPs from the aquatic environment is dependent on the degree of salinity (Ates et al. 2014). CuO-NPs in water with lower salinity undergo more efficient accumulation in organs than in higher salinity conditions. It has also been observed that metal nanoparticles can penetrate fish cells and their embryos through endocytosis or autophagy (Browning et al. 2013; Yue et al. 2017; Quevedo et al. 2021).

Increasingly often, the toxicity mechanism of CuO-NPs is referred to as the “Trojan horse

mechanism”, defined as the ability of these metals to enter cells, e.g., by means of endocytosis as carriers of other particles, and subsequently release high levels of ions inside those cells (Cronholm et al. 2013; Gonçalves et al. 2017; Moschini et al. 2023). As a result, a large number of free radicals are generated, contributing to the induction of oxidative stress (Sabella et al. 2014), i.e., an intermediate and one of the main nanoparticle toxicity mechanisms occurring in organisms. Therefore, biomarkers, such as glutathione peroxidase (*gpx*), superoxide dismutase (*sod*), cytochrome P450 (*cyp1a*), and heat shock protein (*hsp70*) genes are utilized as a crucial measure of the toxicity of nanoparticles such as CuO-NPs. Proper response and activity of those enzymes during oxidative stress is crucial to maintain the internal homeostasis and health of the organism. Studies reported in the literature concerning the effect of NPs on the activity of antioxidant mechanisms mainly involve measurements of enzymatic activities, including SOD, CAT, GPx, and to a smaller extent, changes in the expression of genes encoding these enzymes. Enzymes such as GPx, CAT, and SOD, acting as ROS scavenging enzymes, belong to the first line of defense against reactive oxygen species (ROS). They catalyze reactions that transform free radicals into non-toxic compounds, such as water (Mittler 2017; Ighodaro & Akinloye 2018).

A study by Abdel-Latif et al. (2021) also noted an increase in the expression of the *gpx* and *sod* genes in juveniles of *Oreochromis niloticus* exposed to CuO-NPs at concentrations of 20 and 50 mg dm<sup>-3</sup>, although with an upward trend. In the present study, however, exposure to CuO-NPs, at concentrations ranging from 4 to 256 mg dm<sup>-3</sup>, resulted only in an increase in the expression of the *gpx* gene, while a significant decrease in *sod* expression was observed. In the exposed to 50 µg dm<sup>3</sup> and 100 µg dm<sup>3</sup> of Cu-NPs, embryos of *Danio rerio*, the decrease of GPx activity and the increase in SOD activity was observed (Liu et al. 2024). This suggests that the susceptibility of *sod* to CuO-NPs can be species-dependent. It also implies that exposure of *O.mykiss*’ hatchlings to high concentrations of CuO-NPs exceeds the antioxidant capacity of *sod*, resulting in decreased expression. The alterations in *gpx* and *sod* suggest that CuO-NPs exert toxic effects on those genes separately. Unfortunately, there is a lack of studies explaining the mechanisms by which CuO-NPs exert changes and toxicity towards antioxidant enzymes’ gene expression (Canli & Canli 2020; Mani et al. 2020; Xu et al. 2024).

It has been suggested that cytochrome P450, as an enzyme involved in the detoxification of the body

and metabolism of xenobiotics (Sarasquete & Segner 2000), may also serve as a biomarker of contaminants present in the environment, including metals (Jönsson et al. 2010; Krishnasamy Sekar et al. 2023). The increase in the expression of *cyp1a* under the influence of CuO-NPs (regardless of salinity) was observed in *Oreochromis mossambicus* (Villarreal et al. 2014), which is also consistent with the results presented in this study.

Heat shock proteins, including HSP70, which belong to “stress proteins”, like other members in their family, are involved in maintaining protein homeostasis in the body. They also play protective functions in response to stress factors, such as heavy metals (Basu et al. 2002; Fernández-Fernández & Valpuesta 2018). Their expression increases as a result of exposure to stress factors (Kalmar & Greensmith 2009). In the present study, a significant increase in *hsp70* expression was observed at all concentrations tested, which would confirm the response of exposed *Oncorhynchus mykiss* individuals. These results correlate with the observations of Aksakal and Ciltas (2019), where *Danio rerio* embryos exposed to CuO-NPs also showed an increase in the expression of this gene. In juveniles of *Oreochromis niloticus*, an increase in *hsp70* gene expression was observed in the gills and liver under the influence of CuO-NPs (Abdel-Latif et al. 2021). In *Epinephelus coioides*, *hsp70* expression was elevated with increasing doses of CuO-NPs and CuSO<sub>4</sub> (Wang et al. 2015). However, in the present study, individuals exposed to CuSO<sub>4</sub> showed higher expression at each concentration, with the exception of 4 mg dm<sup>-3</sup>, than those treated with CuO-NPs. However, in the current study, the decrease (*sod* in hatchlings exposed to CuO-NPs) or increase of the gene expression was not proportional to the increasing dose of CuO-NPs or CuSO<sub>4</sub>. In the study of Xu et al. (2024), dose-dependent expression changes of *gpx* and *sod* after the CuO-NPs exposure were also not observed.

The toxicity of CuO-NPs and CuSO<sub>4</sub> is being studied and compared between several fish species. Currently, it is not unequivocally established whether CuO-NPs exhibit higher toxicity on antioxidant parameters than CuSO<sub>4</sub>. Tunçsoy and Erdem (2018), based on the measurement of the accumulation level of various organs, as well as the enzymatic activity of SOD, CAT, and GPx in the liver demonstrated higher toxicity of CuO-NPs than CuSO<sub>4</sub> in *Oreochromis niloticus*. However, a lower toxicity of CuO-NPs was observed by Pereira et al. (2023) in *Danio rerio* embryos. Similar conclusions were reported by Mazandarani and Hoseini (2017), who observed

this phenomenon in *Cyprinus carpio*. In the present study, although  $\text{CuSO}_4$  triggered a higher level of expression of the studied genes than CuO-NPs, the nanoparticles also induced an increase in the expression of genes related to antioxidant response (except for *sod*), which agrees with findings reported by Anwar et al. (2024) that both bulk forms of  $\text{CuSO}_4$  and  $\text{CuSO}_4$ -NPs exert toxicity on fish, with reported more severe effects of  $\text{CuSO}_4$ . Moreover, Thit et al. (2017) stated that despite lesser toxicity of CuO-NPs may pose a threat to aquatic organisms, including fish, and suggested that toxicity mechanisms of CuO-NPs may be explained by more than one mechanism (i.e. via dissolution) and can vary among species models, such as *D. rerio*. This has proved that CuO-NPs also exhibit toxic effects on aquatic organisms, as evidenced by the observed activation of defense mechanisms.

## 5. Conclusions

In summary, higher expression of *hsp70* and *sod*, as well as *gpx* (concentrations of  $896 \text{ mg dm}^{-3}$ ), and *cyp1a* (concentrations of 4, 16, 96,  $128 \text{ mg dm}^{-3}$ ), was observed in samples exposed to  $\text{CuSO}_4$ , indicating that this compound exhibited greater toxicity compared to CuONPs. Nevertheless, individuals exposed to CuO-NPs also showed high expression of the studied genes (*gpx*, *cyp1a*, *hsp70*), indicating the induction of oxidative stress. The decrease of *sod* in hatchlings exposed to all concentrations of CuO-NPs indicates potential overload in the capacity of antioxidant responses. This confirms that it is necessary to monitor and control nanoparticle emission into the environment, especially aquatic. However, based on the data obtained, the gene expression did not increase or decrease in a dose-dependent manner. Therefore, there is a need for further research into the negative effects of copper oxide nanoparticles and their toxicity mechanisms on aquatic organisms. In order to gain even more insight on antioxidant response mechanisms, future studies, such as a comparative analysis of oxidative stress-related genes in different species or comparison of gene expression and their enzymatic activity are planned.

## Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

## Author contributions

Conceptualization, L.S. and M. K.-G.; methodology, L.S.; validation, A.S., L.S. and M.K.-G.; formal analysis, L.S.; funding acquisition, A.S, Sz.-K., L.S.; investigation, A.S and L.S.; resources, M.K.-G.; writing—original draft preparation, A.S.; writing—review and editing, L.S., I. Sz.-K. and A.S.; visualization, A. S.; supervision, L.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

## Data availability statement

The datasets generated and analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

## Ethical statements

Ethical approval was not required to conduct the study, according to “Ustawa z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych” (Dz. U. 2015 poz. 266). All methods were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations.

## Funding



This study was funded by PhD grant provided by University of Szczecin (grant numbers: N-SD.412.42.1.2022; N-SD.412.43.1.2022; N-SD.412.12.2024; N-SD.412.13.2024) and co-financed by the Minister of Science under the “Regional Excellence Initiative” Program. For 2024–2027.

## ORCID

A. Sielska <http://orcid.org/0000-0001-6019-2997>  
 M. Kowalska-Górska <http://orcid.org/0000-0001-9614-2000>  
 I. Szućko-Kociuba <http://orcid.org/0000-0002-2974-1908>  
 L. Skuza <http://orcid.org/0000-0002-6362-844X>

## References

Abdel-Latif HMR, Dawood MAO, Mahmoud SF, Shukry M, Noreldin AE, Ghetas HA, Khallaf MA. 2021. Copper oxide nanoparticles alter serum biochemical indices, induce histopathological alterations, and modulate transcription of cytokines, HSP70, and oxidative stress genes in *Oreochromis niloticus*. *Animals* 11(3):652. DOI: 10.3390/ani11030652.

- Aksakal FI, Ciltas A. 2019. Impact of copper oxide nanoparticles (CuO NPs) exposure on embryo development and expression of genes related to the innate immune system of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 223:78–87. DOI: 10.1016/j.cbpc.2019.05.016.
- Amde M, Liu J, Tan Z-Q, Bekana D. 2017. Transformation and bioavailability of metal oxide nanoparticles in aquatic and terrestrial environments. A review. *Environmental Pollution* 230:250–267. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.06.064.
- Anwar A, Khan F-U, Younas W, Zaman M, Noorullah M, Li L, Zuberi A, Wang Y. 2024. Reduced toxic effects of nano-copper sulfate in comparison of bulk CuSO<sub>4</sub> on biochemical parameters in the Rohu (*Labeo rohita*). *Toxicology in vitro* 95:105766. DOI: 10.1016/j.tiv.2023.105766.
- Ates M, Dugo MA, Demir V, Arslan Z, Tchounwou PB. 2014. Effect of copper oxide nanoparticles to sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) at different salinities. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 9(1):369.
- Auclair J, Turcotte P, Gagnon C, Peyrot C, Wilkinson KJ, Gagné F. 2023. Investigation on the toxicity of nanoparticle mixture in rainbow trout juveniles. *Nanomaterials: Overview and Historical Perspectives* 13(2):311. DOI: 10.3390/nano13020311.
- Aziz S, Abdullah S. 2023. Evaluation of toxicity induced by engineered CuO nanoparticles in freshwater fish, *labeo rohita*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 23(8). DOI:10.4194/TRJFAS18762.
- Basu N, Todgham AE, Ackerman PA, Bibeau MR, Nakano K, Schulte PM, Iwama GK. 2002. Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene* 295(2):173–183. DOI: 10.1016/S0378-1119(02)00687-X.
- Berejikian BA, Bush RA, Campbell LA. 2014. Maternal control over offspring life history in a partially anadromous species, *Oncorhynchus mykiss*. *Transactions of the American Fisheries Society* 143(2):369–379. DOI: 10.1080/00028487.2013.862181.
- Bhat RA, Saoca C, Cravana C, Fazio F, Guerrero MC, Labh SN, Kesbiç OS. 2023. Effects of heavy pollution in different water bodies on male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reproductive health. *Environmental Science and Pollution Research* 30(9):23467–23479. DOI: 10.1007/s11356-022-23670-w.
- Browning LM, Huang T, Xu X-HN. 2013. Real-time in vivo imaging of size-dependent transport and toxicity of gold nanoparticles in zebrafish embryos using single nanoparticle plasmonic spectroscopy. *Interface Focus* 3(3):20120098. DOI: 10.1098/rsif.2012.0098.
- Canlı EĞ, Canlı M. 2020. Effects of aluminum, copper and titanium nanoparticles on the liver antioxidant enzymes of the Nile fish (*Oreochromis niloticus*). *Energy Reports* 6:62–67. DOI: 10.1016/j.egyr.2020.10.047.
- Chao S-J, Huang CP, Lam C-C, Hua L-C, Chang S-H, Huang C. 2021. Transformation of copper oxide nanoparticles as affected by ionic strength and its effects on the toxicity and bioaccumulation of copper in zebrafish embryo. *Ecotoxicology & Environmental Safety* 225:112759. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2021.112759.
- Closson KR, Paul EA. 2014. Comparison of the toxicity of two chelated copper algacides and copper sulfate to non-target fish. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 93(6):660–665. DOI: 10.1007/s00128-014-1394-3.
- Conway JR, Adeleye AS, Gardea-Torresdey J, Keller AA. 2015. Aggregation, dissolution, and transformation of copper nanoparticles in natural waters. *Environmental Science & Technology* 49(5):2749–2756. DOI: 10.1021/es504918q.
- Cronholm P, Karlsson HL, Hedberg J, Lowe TA, Winnberg L, Elihn K, Wallinder IO, Möller L. 2013. Intracellular uptake and toxicity of Ag and CuO nanoparticles: A comparison between nanoparticles and their corresponding metal ions. *Small* 9(7):970–982. DOI: 10.1002/sml.201201069.
- Dai Y-J, Jia Y-F, Chen N, Bian W-P, Li Q-K, Ma Y-B, Chen Y-L, Pei D-S. 2014. Zebrafish as a model system to study toxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33(1):11–17. DOI: 10.1002/etc.2406.
- de Oliveira Eiras MI, Costa LSD, Barbieri E. 2022. Copper II oxide nanoparticles (CuONPs) alter metabolic markers and swimming activity in zebra-fish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 257:109343. DOI: 10.1016/j.cbpc.2022.109343.
- Donia DT, Carbone M. 2019. Fate of the nanoparticles in environmental cycles. *International Journal of Environmental Science and Technology* 16(1):583–600. DOI: 10.1007/s13762-018-1960-z.
- Dube E, Okuthe GE. 2023. Engineered nanoparticles in aquatic systems: Toxicity and mechanism of toxicity in fish. *Emerging Contaminants* 9(2):100212. DOI: 10.1016/j.emcon.2023.100212.
- Duffy LL, Osmond-McLeod MJ, Judy J, King T. 2018. Investigation into the antibacterial activity of silver, zinc oxide and copper oxide nanoparticles against poultry-relevant isolates of *Salmonella* and *Campylobacter*. *Food Control* 92:293–300. DOI: 10.1016/j.foodcont.2018.05.008.
- FAO. 2022. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation. Rome: FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>.
- Fazelan Z, Hoseini SM, Yousefi M, Khalili M, Hoseinifar SH, Van Doan H. 2020. Effects of dietary eucalyptol administration on antioxidant and inflammatory genes in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to ambient copper. *Aquaculture* 520:734988. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2020.734988.
- Fernández-Fernández MR, Valpuesta JM. 2018. Hsp70 chaperone: A master player in protein homeostasis. *F1000Research* 7:1497. DOI: 10.12688/f1000research.15528.1.
- Ghangrekar MM, Chatterjee P. 2018. Water pollutants classification and its effects on environment. In: Das R, editor. *Carbon nanotubes for clean water*. Springer International Publishing. pp. 11–26. DOI: 10.1007/978-3-319-95603-9\_2.
- Gonçalves MFM, Gomes SIL, Scott-Fordsmand JJ, Amorim MJB. 2017. Shorter lifetime of a soil invertebrate species when exposed to copper oxide nanoparticles in a full lifespan exposure test. *Scientific Reports* 7(1):1355. DOI: 10.1038/s41598-017-01507-8.
- Hardy RW. 2002. Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture. CABI Publishing Wallingford UK. pp. 184–202. [https://oceans-and-fisheries.ec.europa.eu/ocean/blue-economy/aquaculture/overview-eu-aquaculture-fish-farming\\_en#aquaculture-production](https://oceans-and-fisheries.ec.europa.eu/ocean/blue-economy/aquaculture/overview-eu-aquaculture-fish-farming_en#aquaculture-production).
- Ighodaro OM, Akinloye OA. 2018. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine* 54(4):287–293. DOI: 10.1016/j.ajme.2017.09.001.
- Johari SA, Kalbassi MR, Soltani M, Yu JF. 2013. Toxicity comparison of colloidal silver nanoparticles in various life stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). <http://hdl.handle.net/1834/11597>.
- Jönsson ME, Gao K, Olsson JA, Goldstone JV, Brandt I. 2010. Induction patterns of new CYP1 genes in environmentally exposed rainbow trout. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 98(4):311–321. DOI: 10.1016/j.aquatox.2010.03.003.

- Kalmar B, Greensmith L. 2009. Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61(4):310–318. DOI: 10.1016/j.addr.2009.02.003.
- Kowalska-Górska M, Dziejulska K, Kulasza M. 2019. Effect of copper nanoparticles and ions on spermatozoa motility of sea trout (*Salmo trutta m. Trutta L.*). *Aquatic Toxicology* 211:11–17. DOI: 10.1016/j.aquatox.2019.03.013.
- Krishnasamy Sekar R, Arunachalam R, Anbazhagan M, Palaniyappan S, Veeran S, Sridhar A, Ramasamy T. 2023. Accumulation, chronicity, and induction of oxidative stress regulating genes through allium cepa L. Functionalized silver nanoparticles in freshwater common carp (*Cyprinus carpio*). *Biological Trace Element Research* 201(2):904–925. DOI: 10.1007/s12011-022-03164-z.
- Lasiene K, Straukas D, Vitkus A, Juodžiukynienė N. 2016. The influence of copper sulphate pentahydrate ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) on the embryo development in the guppies (*Poecilia reticulata*). *Italian Journal of Animal Science* 15(3):529–535. DOI: 10.1080/1828051X.2016.1209990.
- Liu N, Tong L, Li K, Dong Q, Jing J. 2024. Copper-nanoparticle-induced neurotoxic effect and oxidative stress in the early developmental stage of zebrafish (*Danio rerio*). *Molecules* 29(11):2414. DOI: 10.3390/molecules29112414.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  method. *Methods* 25(4):402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- Mani R, Balasubramanian S, Raghunath A, Perumal E. 2020. Chronic exposure to copper oxide nanoparticles causes muscle toxicity in adult zebrafish. *Environmental Science and Pollution Research* 27(22):27358–27369. DOI: 10.1007/s11356-019-06095-w.
- Mazandarani M, Hoseini SM. 2017. Anaemia and plasma lipid profile in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to ambient copper sulphate and nano-scale copper oxide. *Aquaculture Research* 48(3):844–852. DOI: 10.1111/are.12928.
- Mittler R. 2017. ROS Are Good. *Trends in Plant Science* 22(1):11–19. DOI: 10.1016/j.tplants.2016.08.002.
- Moschini E, Colombo G, Chirico G, Capitani G, Dalle-Donne I, Mantecca P. 2023. Biological mechanism of cell oxidative stress and death during short-term exposure to nano CuO. *Scientific Reports* 13(1):2326. DOI: 10.1038/s41598-023-28958-6.
- Murray-Gulde CL, Heatley JE, Schwartzman AL, Rodgers Jr. JH. 2002. Algicidal effectiveness of clearigate, cutrine-plus, and copper sulfate and margins of safety associated with their use. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 43(1):19–27. DOI: 10.1007/s00244-002-1135-1.
- Naeemi AS, Elmi F, Vaezi G, Ghorbankhah M. 2020. Copper oxide nanoparticles induce oxidative stress mediated apoptosis in carp (*Cyprinus carpio*) larva. *Gene Reports* 19:100676. DOI: 10.1016/j.genrep.2020.100676.
- Ogunsuyi OI, Fadoju OM, Akanni OO, Alabi OA, Alimba CG, Cambier S, Eswara S, Gutleb AC, Adaramoye OA, Bakare AA. 2019. Genetic and systemic toxicity induced by silver and copper oxide nanoparticles, and their mixture in *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Environmental Science and Pollution Research* 26(26):27470–27481. DOI: 10.1007/s11356-019-05958-6.
- Pereira SP, Boyle D, Nogueira A, Handy RD. 2023. Differences in toxicity and accumulation of metal from copper oxide nanomaterials compared to copper sulphate in zebrafish embryos: Delayed hatching, the chorion barrier and physiological effects. *Ecotoxicology & Environmental Safety* 253:114613. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2023.114613.
- Quevedo AC, Ellis L-JA, Lynch I, Valsami-Jones E. 2021. Mechanisms of silver nanoparticle uptake by embryonic zebrafish cells. *Nanomaterials: Overview and Historical Perspectives* 11(10):2699. DOI: 10.3390/nano11102699.
- Ren G, Hu D, Cheng EWC, Vargas-Reus MA, Reip P, Allaker RP. 2009. Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *International Journal of Antimicrobial Agents* 33(6):587–590. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2008.12.004.
- Román LE, Gomez ED, Solís JL, Gómez MM. 2020. Antibacterial cotton fabric functionalized with copper oxide nanoparticles. *Molecules* 25(24):5802. DOI: 10.3390/molecules25245802.
- Sabella S, Carney RP, Brunetti V, Malvindi MA, Al-Juffali N, Vecchio G, Janes SM, Bakr OM, Cingolani R, Stellacci F, Pompa PP. 2014. A general mechanism for intracellular toxicity of metal-containing nanoparticles. *Nanoscale* 6(12):7052–7061. DOI: 10.1039/c4nr01234h.
- Saif S, Tahir A, Asim T, Chen Y. 2016. Plant mediated green synthesis of CuO nanoparticles: Comparison of toxicity of engineered and plant mediated CuO nanoparticles towards *Daphnia magna*. *Nanomaterials: Overview and Historical Perspectives* 6(11):205. DOI: 10.3390/nano6110205.
- Sarasquete C, Segner H. 2000. Cytochrome P4501A (CYP1A) in teleostean fishes. A review of immunohistochemical studies. *Science of the Total Environment* 247(2):313–332. DOI: 10.1016/S0048-9697(99)00500-8.
- Scown TM, Santos EM, Johnston BD, Gaiser B, Baalousha M, Mitov S, Lead JR, Stone V, Fernandes TF, Jepson M, van Aerle R, Tyler CR. 2010. Effects of aqueous exposure to silver nanoparticles of different sizes in rainbow trout. *Toxicological Sciences* 115(2):521–534. DOI: 10.1093/toxsci/kfq076.
- Shah IH, Ashraf M, Sabir IA, Manzoor MA, Malik MS, Gulzar S, Ashraf F, Iqbal J, Niu Q, Zhang Y. 2022. Green synthesis and characterization of copper oxide nanoparticles using *Calotropis procera* leaf extract and their different biological potentials. *Journal of Molecular Structure* 1259:132696. DOI: 10.1016/j.molstruc.2022.132696.
- Shahzad K, Khan MN, Jabeen F, Kosour N, Chaudhry AS, Sohail M. 2018. RETRACTED ARTICLE: Evaluating toxicity of copper(ii) oxide nanoparticles (CuO-NPs) through waterborne exposure to tilapia (*Oreochromis mossambicus*) by tissue accumulation, oxidative stress, histopathology, and genotoxicity. *Environmental Science and Pollution Research* 25(16):15943–15953. DOI: 10.1007/s11356-018-1813-9.
- Straus DL, Ledbetter CK, Farmer BD, Deshotel MB, Heikes DL. 2023. Toxicity of copper sulfate to largemouth bass fry in naturally soft water. *The North American Journal of Aquaculture* 85(2):174–177. DOI: 10.1002/naaq.10284.
- Thit A, Skjolding LM, Selck H, Sturve J. 2017. Effects of copper oxide nanoparticles and copper ions to zebrafish (*Danio rerio*) cells, embryos and fry. *Toxicology in vitro* 45:89–100. DOI: 10.1016/j.tiv.2017.08.010.
- Thorgaard GH, Bailey GS, Williams D, Buhler DR, Kaattari SL, Ristow SS, Hansen JD, Winton JR, Bartholomew JL, Nagler JJ, Walsh PJ, Vijayan MM, Devlin RH, Hardy RW, Overturf KE, Young WP, Robison BD, Rexroad C, Palti Y. 2002. Status and opportunities for genomics research with rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology*

- Part B: Biochemistry & Molecular Biology 133(4):609–646. DOI: [10.1016/S1096-4959\(02\)00167-7](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(02)00167-7).
- Tunçsoy M, Erdem C. 2018. Copper accumulation in tissues of *Oreochromis niloticus* exposed to copper oxide nanoparticles and copper sulphate with their effect on antioxidant enzyme activities in liver. *Water, Air, and Soil Pollution* 229(8):269. DOI: [10.1007/s11270-018-3913-z](https://doi.org/10.1007/s11270-018-3913-z).
- Vasconcelos RT, Copatti CE, Albinati AC, Campeche DFB, Bonfá H, Melo J. 2022. Waterborne copper sulfate toxicity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juveniles affect survival, 730 growth, and physiology. *Journal of Applied Aquaculture* 1–22. DOI: [10.1080/10454438.2022.2128964](https://doi.org/10.1080/10454438.2022.2128964).
- Villarreal FD, Das GK, Abid A, Kennedy IM, Kültz D, Johnson SJ. 2014. Sublethal effects of CuO nanoparticles on mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) are modulated by environmental salinity. *PLOS ONE* 9(2):e88723. DOI: [10.1371/journal.pone.0088723](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088723).
- Wang T, Long X, Liu Z, Cheng Y, Yan S. 2015. Effect of copper nanoparticles and copper sulphate on oxidation stress, cell apoptosis and immune responses in the intestines of juvenile *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology* 44(2):674–682. DOI: [10.1016/j.fsi.2015.03.030](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.03.030).
- Waris A, Din M, Ali A, Ali M, Afridi S, Baset A, Ullah Khan A. 2021. A comprehensive review of green synthesis of copper oxide nanoparticles and their diverse biomedical applications. *Inorganic Chemistry Communications* 123:108369. DOI: [10.1016/j.inoche.2020.108369](https://doi.org/10.1016/j.inoche.2020.108369).
- Xu X-W, Yang H, Wei X-L, Abu-Elala N, Luo Z. 2024. Influences of dietary Cu levels on growth performance, muscle development, antioxidant capacity, and inflammatory response of juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Aquaculture Reports* 36:102080. DOI: [10.1016/j.aqrep.2024.102080](https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2024.102080).
- Yanong RP. 2010. Use of copper in marine aquaculture and aquarium systems: FA165/FA165, 12/2009. EDIS 2010(2). DOI: [10.32473/edis-fa165-2009](https://doi.org/10.32473/edis-fa165-2009).
- Yue Y, Li X, Sigg L, Suter MJ-F, Pillai S, Behra R, Schirmer K. 2017. Interaction of silver nanoparticles with algae and fish cells: A side by side comparison. *Journal of Nanobiotechnology* 15(1):16. DOI: [10.1186/s12951-017-0254-9](https://doi.org/10.1186/s12951-017-0254-9).
- Zughaibi TA, Mirza AA, Suhail M, Jabir NR, Zaidi SK, Wasi S, Zawawi A, Tabrez S, Roy A. 2022. Evaluation of anticancer potential of biogenic copper oxide nanoparticles (CuO NPs) against breast cancer. *Journal of Nanomaterials* 2022(1):5326355. DOI: [10.1155/2022/5326355](https://doi.org/10.1155/2022/5326355).