مجله بوم شناسی آبزیان

Journal homepage: http://jae.hormozgan.ac.ir

بهبود مقاومت آنزیمی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان *(Oncorhynchus mykiss)* با ویتامین C در مواجهه با غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی

فاطمه دارابی تبار[1*]، سید علی اکبر هدایتی[2]، امیر پرویز سلاطی[1]، سیدحسین حسینی فر[2]

[1] گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

[2] گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

نوع مقاله:
مقاله کوتاه

تاریخچه مقاله:
دریافت: ۹۴/۰۸/۱۳
اصلاح: ۹۴/۱۱/۱۷
پذیرش: ۹۵/۰۱/۲۱

کلمات کلیدی:
آنزیم‌های کبدی
نانو اکسید روی
ویتامین C

چکیده

نانو ذرات اکسید روی می‌توانند از طریق تنفس، پوست و تغذیه وارد بدن آبزیان شده و عملکرد فیزیولوژی بدن را دچار اختلال کند که آسکوربیک اسید می‌تواند به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی از اثرات منفی حاصل از این نانوذرات جلوگیری نماید. در مطالعه حاضر، تعداد ۱۷۰ قطعه ماهی با میانگین وزنی ۱۷۰ گرم در تانک‌های ۷۰ لیتری قرار گرفت. ماهیان در غلظت‌های ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو اکسید روی و ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C قرار داده شدند. فعالیت آنزیم‌های کبدی بعد از ۱۰ روز در تیمارهای ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانواکسید روی و ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C نسبت به سایر تیمارها کاهش معنی‌داری نشان داد. ویتامین C در روش خوراکی قادر است باعث بهبود شاخص‌های آنزیمی شود و اثرات تخریبی ناشی از نانو ذرات اکسید روی بر فعالیت آنزیم‌های کبدی را نیز کاهش دهد.

مقدمــه

نانو ذرات اکسید روی از طریق تغذیه، پوست و تنفس می‌توانند وارد رگ‌های خونی شده و با گیرنده‌های متصل بر روی سطح و درون سلول‌ها تعامل برقرار نمایند که این موضوع باعث خطرات بسیاری برای موجودات زنده به ویژه آبزیان می‌شود (Cheraghi *et al.*, 2004). آسکوربیک اسید می‌تواند به‌عنوان یک آنتی اکسیدان قوی سلول‌ها را در برابر آسیب اکسایش و عوامل اکسیدکننده مانند رادیکال‌های آزاد محافظت نماید (Dabrowski, 2001) و باعث جمع‌آوری و حذف آن‌ها از محیط عمل سلول‌ها شود (Li and Robinson, 1999). ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به عنوان یکی از مهم‌ترین گونه‌های آزادماهیان، با ارزش غذایی و اقتصادی بالا بوده و بخش بزرگی از میزان تولید آبزیان را در کشور و جهان به خود اختصاص می‌دهد (Azewedo *et al.*, 2004). از پارامترهای بیوشیمیایی مهم که از سنجش آن‌ها به‌عنوان یک شاخص آزمایشگاهی استاندارد جهت بررسی اختلالات کبدی در موجودات استفاده می‌شود آنزیم‌های کبدی ALT, AST, ALP, ACP هستند. این آنزیم‌ها، اساساً درون سلولی هستند و در بسیاری از اندام‌های مختلف آبزیان یافت می‌شوند (Ayalogu *et al.*, 2001). با توجه به اینکه، در حالت طبیعی مقادیر این آنزیم‌ها در درون سلول بیشتر از خارج سلول است، بنابراین بالا رفتن مقادیر بسیار کم آن‌ها در پلاسما و مایع بین سلولی خون می‌تواند به‌عنوان یک شاخص حساس نشان‌دهنده وقوع آسیب سلولی در برابر انواع آلاینده‌های

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: Darabitabar@gmail.com

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.8.2.15.9]

وارد شده از محیط پیرامون به بدن آبزیان باشد. بنابراین اندازه‌گیری و سنجش این آنزیم‌ها اهمیت بالایی دارند و در ارزیابی نحوه عملکرد سلول‌های کبدی به عنوان تست‌های استاندارد می‌توان از آن‌ها استفاده کرد (Parma *et al.*, 2007). به دلیل این‌که ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان یک گونه پرورشی پرمصرف بوده و حضور پررنگی در زنجیره غذایی دارد و تجمع نانوذرات فلزی در بدن این ماهی تغییرات زیادی را بر روی آنزیم‌های کبدی به وجود می‌آورد به انجام مطالعه حاضر می‌پردازیم.

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۷۰ قطعه ماهی با میانگین وزنی ۱۷۰ گرم در تانک‌های ۷۰ لیتری که قبل از شروع آزمایش به‌وسیله پرمنگنات پتاسیم و آب‌نمک غلیظ ۷۰ درصد شسته شده تا محیط عاری از هر گونه آلودگی برای ماهیان باشد، قرار گرفت. این ظروف حاوی آب کلر زدایی شده با دمای ۱۹- ۱۷ درجه سانتی‌گراد بود که به‌صورت ۲۴ ساعته هوادهی می‌شدند. در طول دوره آزمایش، میزان هوادهی، غذادهی، شرایط فیزیکوشیمیایی آب نظیر دما، پی اچ و اکسیژن محلول کنترل شد. طی این دوره ماهی‌ها با غذای تجاری به میزان ۲ درصد وزن بدن در روز تغذیه شدند و آب تانک‌های نگهداری ماهی‌ها هر ۲۴ ساعت یک‌بار تعویض شد (Chapman *et al.*, 1998). به منظور بررسی اثرات ویتامین C بر میزان تغییرات در پارامترهای موردنظر، دو سطح مواجهه‌ای برای نانو اکسید روی (۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر) و دو سطح ویتامین C (۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم غذا) اعمال شد. ۲۴ قطعه ماهی در چهار گروه آزمایشی (هر گروه ۶ قطعه) تقسیم شد.

در روزهای ۵ و ۱۰ پس از آغاز دوره مواجهه، خون‌گیری جهت بررسی پارامترهای آنزیمی از ماهیان در گروه‌های آزمایشی انجام شد. به‌منظور ترکیب ویتامین C با پلت‌ها، ابتدا ویتامین C در ۱۰ سی سی آب حل و به‌منظور جدا نشدن ویتامین C از پلت‌ها مقداری روغن کانولا به محلول آب و ویتامین C اضافه شد، سپس توسط آبپاش به روی پلت‌ها اسپری شد. سپس پلت‌های آغشته شده در دو نوبت صبح و بعدازظهر به ماهیان داده شد. برای تهیه سرم ۲ تا ۳ سی سی خون داخل ویال‌های بدون انعقاد ریخته شد و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰، سانتریفیوژ شد تا سرم خون تهیه شود. سپس سرم در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد در یخچال قرار گرفت (Goddard *et al.*, 2003). در نهایت شاخص‌های آنزیمی با دستگاه الایزا ساخت کشور ژاپن و کیت‌های مخصوص از شرکت Mancompany ایران اندازه‌گیری شد. برای انجام محاسبات آماری و ترسیم نمودارها از نرم افزارهای Excell 2003 و SPSS 20 استفاده شد.

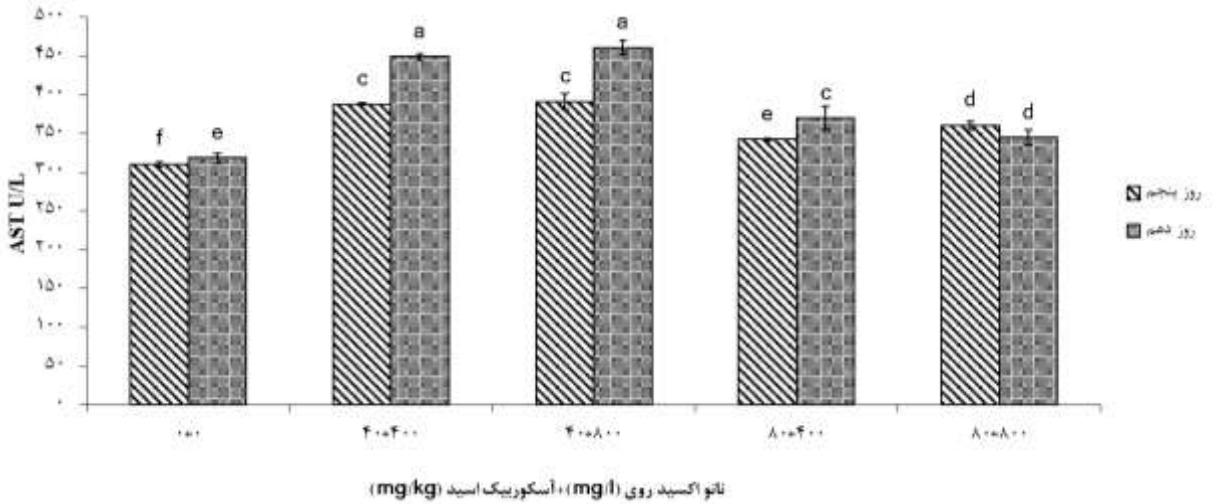
نتایـج

در طی مدت زمان آزمایش هیچ‌گونه تلفاتی در گروه شاهد مشاهده نشد. شاخص‌های آنزیمی در گروه شاهد و تیمار در طی روزهای پنجم و دهم اندازه‌گیری شدند و پس از حصول اطمینان از نرمال بودن داده‌ها، با استفاده از آزمون Univariate Analysis of Variance معنی‌دار بودن شاخص‌ها مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن در ذیل آمده است.

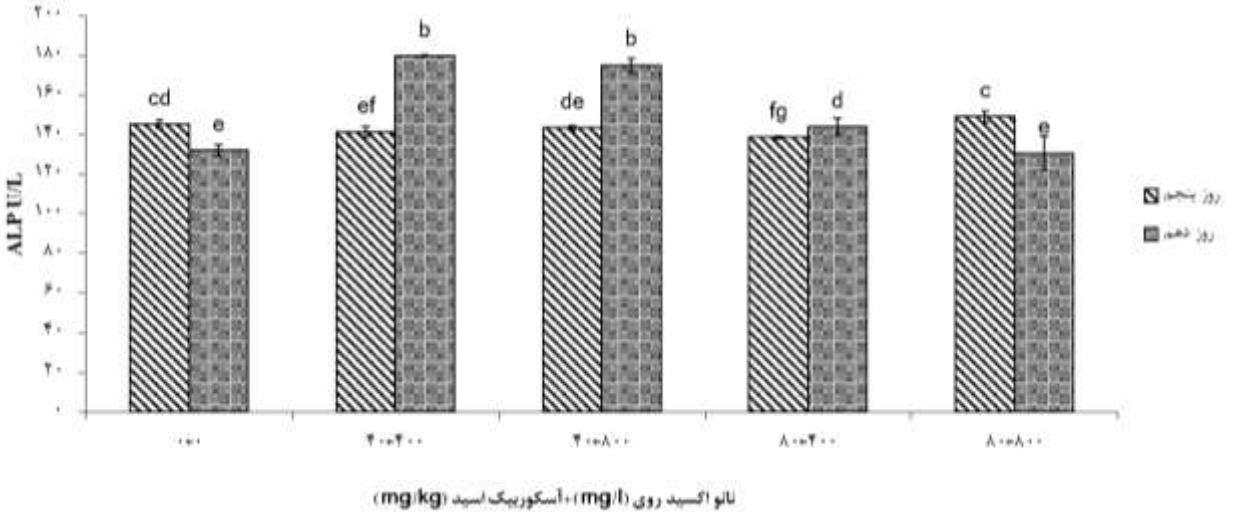
فعالیت آنزیم‌های ALP و AST در روز پنجم تیمار ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو و ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C افزایش معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها نشان دادند و با کاهش غلظت ویتامین C در تیمار ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانواکسید روی کاهش معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها مشاهده شد ($P<۰/۰۵$) (شکل ۱). در روز دهم در تیمارهای ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر نانواکسید روی و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C و تیمار ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو اکسید روی و ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C نسبت به سایر تیمارها افزایش معنی‌داری نشان دادند ($P<۰/۰۵$). در تیمار ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانواکسید روی و ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C نسبت به سایر تیمارها کاهش معنی‌داری وجود داشت ($P<۰/۰۵$) (شکل ۲).

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-04-25]

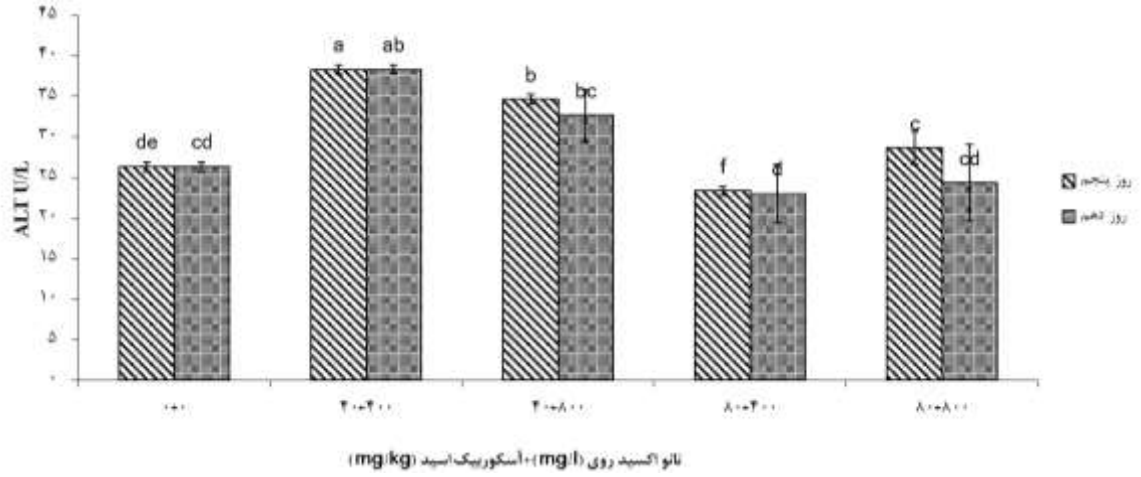
[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.8.2.15.9]



شکل ۱. بررسی تغییرات آنزیم AST در غلظت‌های مختلف نانواکسید روی و آسکوربیک اسید (ویتامین C) در روزهای پنجم و دهم



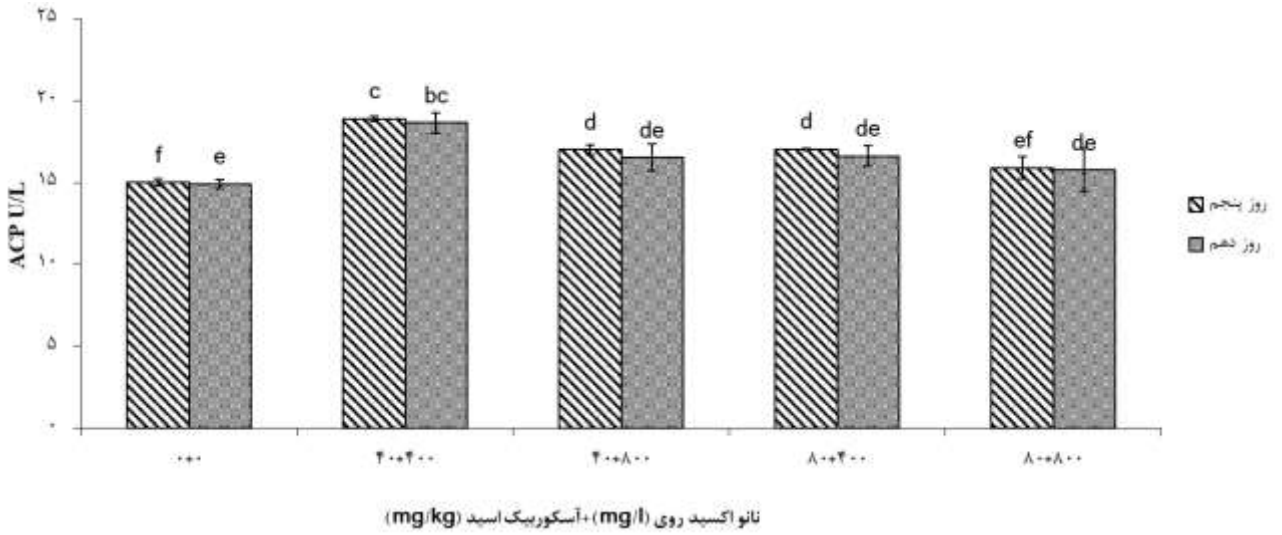
شکل ۲. بررسی تغییرات آنزیم ALP در غلظت‌های مختلف نانواکسید روی و آسکوربیک اسید (ویتامین C) در روزهای پنجم و دهم



شکل ۳. بررسی تغییرات آنزیم‌های ALT در غلظت‌های مختلف نانواکسید روی و آسکوربیک اسید (ویتامین C) در روزهای پنجم و دهم

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.8.2.15.9]



شکل ۴. بررسی تغییرات آنزیم‌های ACP در غلظت‌های مختلف نانواکسید روی و آسکوربیک اسید (ویتامین C) در روزهای پنجم و دهم

فعالیت آنزیم ALT در روز پنجم در تیمار ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو اکسید روی و ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C نسبت به سایر تیمارها افزایش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵). در روز دهم آنزیم ALT در تیمار ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانواکسید روی و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C نسبت به سایر تیمارها کاهش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵) (شکل ۳). فعالیت آنزیم ACP در روز پنجم در تیمار ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر نانواکسید روی و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C نسبت به سایر تیمارها افزایش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵). در روز دهم آنزیم ACP در تیمار ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانواکسید روی و ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C نسبت به سایر تیمارها کاهش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵) (شکل ۴).

بحث

یکی از دلایل افزایش آنزیم‌های ALT و AST در طی روزهای ۵ و ۱۰ قرارگیری در معرض سم نانو اکسید روی و ویتامین C ممکن است به علت صدمات سلولی کبدی حاصل از قرار گرفتن در معرض سم نانو اکسید روی باشد. آنزیم ALT برای کبد اختصاصی بوده و آسیب به سلول‌های کبدی می‌تواند باعث افزایش آزاد شدن این آنزیم در بدن آبزیان گردد؛ بنابراین دلیل افزایش آنزیم ALT در این مطالعه، به علت اثر تخریبی نانوذرات اکسید روی بر سلول‌های کبدی بوده است. همچنین انسداد مجاری صفراوی باعث افزایش غلظت سرمی آنزیم ALP بعد از قرارگیری در معرض غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانواکسید روی در روز ۱۰ می‌گردد. از این رو احتمالاً با توجه به تخریب سلول‌های کبدی و انسداد مجاری صفراوی غلظت ALP افزایش یافته است. در این مطالعه همچنین افزایش غلظت آنزیم‌های AST و ALP مشاهده شده ممکن است به دلیل افزایش آنابولیسم یا کاهش کاتابولیسم آن‌ها باشد (Christ *et al.*, 2004). در مطالعه انجام شده اثر سمیت نانو ذرات اکسید روی به علت کاربرد زیاد آن‌ها در صنایع مختلف بررسی شد و نتایج به دست آمده در بررسی تأثیر مقادیر مختلف نانو ذرات اکسید روی بر میزان آنزیم‌های کبدی نشان داد که نانو ذرات اکسید روی در غلظت‌های بالا باعث افزایش معنی‌دار آنزیم‌های کبدی می‌شوند. آنزیم ALP در تمام بافت‌های ماهی‌ها نظیر اپی‌تلیوم مجاری صفراوی، سلول‌های کبدی و نیز در مخاط روده و کلیه‌ها یافت می‌شود. لذا سطح این آنزیم در زمانی که انسداد مجاری صفراوی داخل و خارج کبدی، سیروز کبدی رخ می‌دهد، به شدت افزایش می‌یابد. همچنین تخریب بافت کبد موجب آزاد شدن و افزایش این آنزیم از سلول‌های آسیب‌دیده می‌گردد (Banaee *et al.*, 2008).

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.8.2.15.9]

طی تحقیقات بسیاری که بر روی انواع ویتامین‌ها انجام شده آسکوربیک اسید یا ویتامین C بر سیستم ایمنی و افزایش مقاومت آبزیان نقش مؤثرتری نسبت به بقیه ویتامین‌ها دارد. مطالعات نشان می‌دهند که اکثر ماهیان استخوانی به دلیل عدم وجود آنزیمی تحت عنوان ال-گلونولاکتون اکسیداز قادر به سنتز ویتامین C از ال-گلوکز نیستند، لذا ضروری است که مقدار مورد نیاز این ویتامین از راه تغذیه خارجی تامین کنند (Rasuli and Abdoli, 2005). نتایج این مطالعه نشان داد که آنزیم‌های ALP، AST، در روز ۵ با افزایش غلظت ویتامین C (۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و افزایش غلظت نانو اکسید روی (۸۰ میلی‌گرم بر لیتر) افزایش پیدا کردند. علت این افزایش احتمالاً عدم توانایی ویتامین C در تجزیه ملکول‌های هیدروژن پراکساید است. چرا که افزایش سطح این آنزیم‌ها نشان‌دهنده افزایش مقادیر پراکسید هیدروژن طی فرآیند سم‌زدایی در داخل سلول است. ولی با کاهش غلظت ویتامین C (۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) آنزیم ALP و AST کاهش پیدا کرد که می‌تواند به دلیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی ویتامین C در تجزیه هیدروژن پراکساید باشد. ولی بعد از مواجهه آنزیم‌های ALP و AST پس از ۱۰ روز در معرض غلظت بالای ویتامین C و نانواکسید روی (۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C و ۸۰ میلی‌گرم نانواکسید روی) میزان این آنزیم‌ها کاهش یافت که علت آن ممکن است به دلیل اثر ویتامین C در مدت زمان طولانی بر تخریب ناشی از نانو اکسید روی باشد. آنزیم ALT و ACP در روز ۵ و ۱۰ با کاهش غلظت ویتامین C و نانو اکسید روی (۴۰۰ میلی‌گرم ویتامین C و ۴۰ میلی‌گرم نانو اکسید روی) افزایش پیدا کرد. که علت این افزایش عدم تأثیر ویتامین C در غلظت پایین بوده است. ولی با افزایش غلظت ویتامین C (۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، میزان آنزیم‌ها کاهش پیدا کرد که علت این کاهش اثر آنتی‌اکسیدانی ویتامین C و خنثی‌سازی اثر رادیکال‌های آزاد ناشی از نانواکسید روی بوده است. از دیرباز اثبات گردیده است که ویتامین‌های محلول در آب مانند ویتامین C در بدن قابلیت ذخیره ندارند و در مقادیر بالاتر اثر بهتری از خود نشان می‌دهند (Halver, 1980). نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که ویتامین C به روش غذادهی، باعث افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی در برابر آلاینده‌های محیطی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌شود و قادر است باعث بهبود شاخص‌های آنزیمی شود و اثرات مخرب ناشی از سم نانو اکسید روی را بر فعالیت آنزیم‌های کبدی کاهش دهد.

منابـع

Ayalogu, O.E., Igbih, N.M., Dede, E. 2001. Biochemical changes in the serum and liver of albino rates exposed to petroleum samples (Gasoline, Kerosene, and Crude Petroleum). Journal of Applied Sciences and Environmental Management. 5(1): 97-100.

Azewedo, P.A., Leeson, S., Cho, C.Y., Bureau, D.P. 2004. Growth and feed utilization of large size rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) reared in fresh water: diet and species effects, and responses over time. Aquaculture Nutrition. 10: 401-411.

Banaee, M., Mirvagefei, A., Rafei, G., Majazi Amiri, B. 2008. Effect of sub-lethal diazinon concentrations on blood plasma biochemistry. International Journal of Environmental Research. 2: 189-198.

Banaee, M., Sureda, A., Mirvaghefi, A.R., Ahmadi, K. 2011. Effects of Diazinon on biochemical parameters of blood in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Pesticide Biochemistry and Physiology. 99:1-6.

Chapman, P.M., Dexter, R.N., Long, E.R. 1998. Synoptic measures of sediments contamination, toxicity and infaunal -community composition (the Sediment Quality Triad) in San Francisco Bay. Marine Ecological Progress Series. 37: 75-93.

Cheraghi, A., Bohrani, N., Malekfar, R. 2004. Technology office of the presidential committee on nanotechnology policy. Applications of Nanotechnology in the Diagnosis and Treatment of Diseases. 5: 85-94.

Christ-Crain, M., Meier, C., Puder, J., Staub, J., Huber, P., Keller, U. 2004. Changes in liver function correlate with the improvement of lipid profile after restoration of euthyroidism in patients with subclinical hypothyroidism. EXCLI Journal. 3:1-9.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.8.2.15.9]

Dabrowski, K. 2001. Ascorbic acid in aquatic organisms Status and Perspectives. CRC Press, USA. pp.33-48.

Goddard, W.A., Brenner, D.W., Lyshevski, S.E., Iafrate, G.J. 2003. Handbook of nanoscience, engineering, and technology. Boca Raton: CRC.

Halver, J.E. 1980. Vitamin requirements of finfish (Deficiency symptoms). Nutrition and food science; present knowledge and utilization.1nd edition. Springer US. 808 p.

Li, M.H., Robinson, E.H. 1999. Dietary ascorbic acid requirement for growth and health in fish. Journal of Applied Aquaculture. 9(2): 53-79.

Parma, M.J., Loteste, A., Campana, M., Bacchetta, C. 2007. Changes of hematological parameters in Prochilodus lineatus (Pisces, Prochilodontidae) exposed to sublethal concentration of cypermethrin. Journal of Environmental Biology. 28(1): 49-147

Rasuli, S., Abdoli, K. 2005. Fundamentals of fish immunology. 1nd edition. Simurgh. pp. 12-17.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1397.8.2.15.9]