

## Effect of Di 2-Ethyl Hexyl phthalate on some indices of Skin Mucus in common Carp (*Cyprinus carpio*)

## تأثیر دی ۲-اتیل هگزایل فتالات بر برخی شاخص‌های موکوسی پوست کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

Nastaran Pour-Ahmadi<sup>1</sup>, Saeid Alinejad Moealem<sup>2</sup>,  
Morteza Kamali<sup>3\*</sup>

1. M. A. of Biochemistry, Islamic Azad University, Babol Branch, Iran
  2. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Natural Resources and Marine Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
  3. Instructor, Department of Fisheries Science and Engineering, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University
- (Received: Nov. 28, 2018 - Accepted: Jul. 02, 2019)

نسترن پورا احمدی<sup>۱</sup>، سعید علی نژاد معلم<sup>۲</sup>، مرتضی کامالی<sup>۳\*</sup>

۱. کارشناس ارشد رشته بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بابل
  ۲. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بابل
  ۳. مربی، گروه علوم و مهندسی شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس
- (تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۹/۰۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۴/۱۱)

### Abstract

Due to its suitable properties and the low cost; Di 2-Ethyl Hexyl phthalate (DEHP) is widely used as a plasticizer in manufacturing of articles made of PVC. This substance is of paramount importance with the estrogen-like properties and its effects on the survival and health of ecosystems and the aquatic and human populations. In present study; effects of toxicity of DEHP on protein band model and amino acid profile of mucus common carp (*Cyprinus carpio*) was studied. 108 common carp (17.60±2.22gr) is gathered from warm water fish center and they were allocated into 9 tanks (12 Fish per tank). Fish adapted to new condition for a week. During this time; they were feed twice a day with same diets. Fishes were exposed at 3 concentration treatments containing 0; 0.1 and 1 mg/L DEHP under laboratory condition (25±0.5°C; pH: 7.4-8) for a period of 96 hours. We assessed skin mucus protein profiles by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and we were studied amino acid profile by HPLC. The results of the experiments to compare the protein pattern of carp's mucus (exposed to DEHP with two different concentrations) with the control sample (without exposure to DEHP) showed that there is a significant difference in the bands density between the two protein patterns. These results indicated that concentrations of DEHP beneficially affects Amino Acid profiles of skin mucus in carp and they were categorized in 4 branches. There were Significant differences between exposed and control groups. Therefore; fish skin mucus can be a biomarker for showing contaminants and toxins. And the high consumption of plastic materials can be a warning to the health of aquatic animals and humans.

**Keywords:** Biomarkers, common carp, pollution, phthalate esters.

### چکیده

دی ۲-اتیل هگزایل فتالات، به دلیل خواص مناسب و هزینه کم آن به طور گسترده‌ای در تولید محصولات PVC کاربرد دارد. در اثر رهاسازی این مواد با خواص شبه استروژنی و تأثیرات آن بر بقای اکوسیستم‌ها، سلامت و جمعیت آبزیان و انسان‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در مطالعه حاضر، اثر سمیت دو غلظت مختلف DEHP بر برخی شاخص‌های موکوسی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) بررسی شد. ۱۰۸ عدد بچه‌ماهی کپور معمولی به وزن ۱۷/۶۰±۲/۲۲ گرم از مراکز پرورش ماهیان گرمابی تهیه و پس از انتقال به تانک‌های ۱۰۰ لیتری قرار داده شدند. آزمایش شامل سه تیمار و سه تکرار طراحی شد. در انتهای دوره الگوی پروتئینی و پروفیل اسید آمینه موکوس پوست ماهی کپور ارزیابی شد. نتایج آزمایشات جهت مقایسه الگوی پروتئینی موکوس کپورماهی معمولی در معرض DEHP با دو غلظت مختلف قرار گرفته با نمونه شاهد (بدون مواجهه با DEHP) نشان داد که تفاوت قابل توجهی در تراکم باندها بین الگوی پروتئینی دو نمونه مشهود می‌باشد. اسیدهای آمینه موکوس پوست ماهی در چهار رده تقسیم‌بندی شدند که میانگین درصد اسید آمینه‌ها در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری در سطح ۹۵٪ داشتند. با توجه به حساسیت موکوس پوست ماهی نسبت به آلاینده‌ها و سموم می‌تواند نشانگر زیستی مناسبی برای نشان دادن آلاینده‌ها و سموم باشد و مصرف بالای مواد پلاستیکی می‌تواند هشداردهنده برای سلامتی آبزیان و انسان‌ها باشد.

**واژه‌های کلیدی:** آلودگی، زیست‌نشانگر، فتالات استر، ماهی کپور.

## مقدمه

جهانی فتالات‌ها را به تنهایی به خود اختصاص داده است و کاربرد وسیعی در تولید پلیمرها، انعطاف‌پذیری پی‌وی‌سی‌ها، ساخت مصالح ساختمانی، اسباب‌بازی‌ها، کفپوش و لوازم پزشکی دارد. DEHP تمایل زیادی به جذب شدن در مواد معلق آلی و کلوئیدی دارد که این موجب جذب توسط آبزیان و به تبع آن موجب سمیت در آنها می‌گردد (Fakharzadeh et al., 2011).

ترشح موکوس از ویژگی‌ها پوست ماهی است و این موکوس نقش مهمی در دفاع حیوان به‌عنوان یک مانع نیمه‌نفوذپذیر، شیمیایی و زیستی بر عهده دارد. عملکرد ایمونولوژیکی یا حفاظتی موکوس در نتیجه خواص مکانیکی و بیوشیمیایی آن است (Guardiola et al., 2015). بنابراین، موکوس اپیدرمی ماهی به عنوان مخزنی از ترکیبات ایمنی ذاتی و اکتسابی دستگاه ایمنی مانند گلیکوپروتئین‌ها، لیزوزیم، ایمنوگلوبولین، پروتئین‌های کمپلمان، آنزیم‌های پروتولیتیک و پپتیدهای ضد میکروبی مطرح است (Rajet et al., 2011). موکوس در ماهی‌های کوچک برای جمع‌آوری مواد مغذی معلق در آب استفاده می‌شود (Cone, 2009). ضخامت موکوس با تعادل بین نرخ ترشح و نرخ از بین رفتن و ریزش آن تعیین می‌شود. مواد سمی و محرک می‌توانند به‌طور قابل توجهی ترشح موکوس را تحریک کنند و بر ضخامت لایه موکوس اضافه کنند (Cone, 2009). موکوس پوست ماهی نقش حیاتی به عنوان سد دفاعی زیستی در مقابل پاتوژن‌ها یا آلاینده‌ها، مانند فلزات سنگین بر عهده دارد (Berntssen et al., 1997). به‌نظر می‌رسد تغییر در فعالیت پروتولیتیکی و تجزیه‌ای آنزیم‌های پوستی می‌تواند دلیلی بر تغییر پروفیل پروتئین باشد. بنابراین، برای مطالعه در زمینه بررسی اثر سمیت آلاینده‌ها می‌توان از شاخص‌های زیستی موکوس ماهی از جمله پروفیل پروتئین موکوس به عنوان روش مناسب و غیرکشنده بهره برد.

با توجه به استفاده از آب‌های سطحی برای پرورش ماهی کپور معمولی و احتمال رهاسازی

آلودگی ناشی از جذب آلاینده‌های زیست‌محیطی و تجمع مواد سمی در دوکفه‌ای‌ها، سخت پوستان، نرم‌تنان و ماهیان به‌واسطه مصرف انسانی آن‌ها، موجب نگرانی شده است (Costa et al., 2011). فتالات‌استرها به‌دلیل پراکنش آسان در طبیعت، عدم وجود پیوند شیمیایی با مواد پایه و ورود پیوسته به اکوسیستم‌های آبی از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. این ترکیبات با قابلیت زیاد برای جذب در فاز چربی و فاز جامد، پتانسیل بالقوه‌ای برای سمیت جانوران آبی محسوب می‌شوند (Oehlmann et al., 2008). بیش از ۸۵ درصد ترکیبات مختلف فتالات‌استر متعلق به دو ترکیب غالب شامل دی بوتیل فتالات (DnBP) و دی ۲-تیل هگزیل فتالات (DEHP) است که در حجم بالایی تولید و استفاده می‌شوند (Wang et al., 2014; Munoz-Ortuno et al., 2014). فتالات‌ها در محیط‌های آبی تحت تأثیر تجزیه زیستی در شرایط هوازی، بی‌هوازی، هیدرولیز، فتولیز، اکسیداسیون و ... قرار می‌گیرند و به همین دلیل آلاینده‌های فتالات‌استر سمیت حاد کمی دارند، اما مواجهه همیشگی با این ترکیبات در محیط زیست منجر به بروز سمیت مزمن این آلاینده‌ها در رده‌های مختلف جانوری می‌شود و به راحتی قابل سنجش و ردیابی می‌باشد (Adeniyi et al., 2011).

مسیرهای اصلی مواجهه آبزیان شامل جذب از طریق آبشش، منابع غذایی و تماس با رسوب است. در حال حاضر در آمریکا و بخش‌هایی از اتحادیه اروپا کاربرد برخی از ترکیبات فتالات‌استر (خصوصاً DBP و DEHP) در تولید برخی از کالاهای پرمصرف ممنوع گردیده است (Magdouli et al., 2013). DEHP با وزن مولکولی ۳۹۰/۵۷ گرم بر مول و حلالیت ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر، حدود ۲۵٪ از کل تولیدات

1. Di-n-butyl phthalate

2. Di (2-ethylhexyl) phthalate

تعویض آب و تجدید غلظت‌ها انجام شد (OECD, ۲۰۱۰) و آب مخازن مورد آزمایش هر ۲۴ ساعت یک بار تعویض و غلظت‌های نانوذرات مورد مطالعه مجدداً در مخازن اضافه شد. برای انجام آزمایش اصلی تست فتالات‌ها، محلول‌های استاندارد فتالات DEHP با درجه صنعتی (از شرکت Sigma) با درجه خلوص بالای ۹۸٪ تهیه گردید.

جمع‌آوری موکوس براساس روش Ross *et al.* (2007) با کمی اصلاحات انجام شد. ماهیان از ۲۴ ساعت قبل از نمونه‌برداری غذادهی نشدند. زمان نمونه برداری ۹۶ ساعت پس از تیمار بود. در پایان دوره از هر تانک ۵ عدد ماهی به صورت تصادفی نمونه‌برداری و پس از بیهوشی با ۵۰ میلی‌گرم در لیتر پودر گل میخک به صورت انفرادی درون کیسه‌های پلی‌اتیلنی (زیپ پلاست) حاوی ۱۰ میلی‌لیتر سدیم کلرید ۵۰ میلی‌مولار قرار گرفتند. پس از ۲ دقیقه ماهیان از کیسه‌ها خارج و به درون آب پر از اکسیژن قرار گرفتند. موکوس جمع‌آوری شده به لوله‌های سانتریفیوژ استریل ۱۵ میلی‌لیتری منتقل و با دور ۱۵۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ و سوپرناتانت به میکروتیوپ‌های ۱/۵ سی‌سی منتقل شدند. نمونه‌ها درون فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد ilshin مدل DF8517 ساخت کشور کره جنوبی قرار گرفت و بعد از آن لیوفیلایز شدند سپس پودر موکوس لیوفیلایزه تا زمان استفاده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند.

موکوس فریز شده جهت ارزیابی الگوی پروتئینی به دستگاه فریز درایر CHRiST مدل ALPHA 1-2 LD plus ساخت کشور آلمان منتقل شد تا لیوفیلایز گردد. SDS-PAGE بر اساس روش Laemmli (1970) انجام شد. نمونه‌های موکوس (۱۰ میلی‌گرم پروتئین خام) به نسبت ۱:۴ با بافرنمونه (۴٪ اس دی اس، ۵۰ میلی‌لیتر بر مول تریس اسیدکلریدریک، ۲٪ مرکاپتواتانول، ۱۲٪ گلیسرول، ۵٪ بروموفنول بلو) حل کرده و به مدت ۵ دقیقه در حرارت ۹۵ درجه

در آب‌های سطحی و جذب این آلاینده‌ها توسط این‌گونه، که به مقدار زیاد مورد مصرف مردم متصور می‌باشد، لذا در این تحقیق ارزیابی اثرات آلاینده DEHP بر بچه‌ماهیان کپور معمولی با روش الکتروفورزیک مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به این که تاکنون هیچ مطالعه‌ای بر تأثیر استرهای فتالات بر پروتئین موکوس پوست ماهی کپور معمولی به‌عنوان یک آلاینده صورت نگرفته است لذا تحقیق حاضر اولین گزارش تأثیر فتالات پرمصرف DEHP بر موکوس پوست ماهی کپور معمولی می‌باشد که اثرات منفی آن بر گونه‌ای به‌عنوان منبع پروتئینی پر مصرف این گونه مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

محل انجام این مطالعه دانشگاه تربیت مدرس (مواجهه ماهی با DEHP، تهیه موکوس و تعیین پروفیل اسیدآمیننه) و پردیس دانشگاهی علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان (الکتروفورز) بود. در این آزمایش ۱۸۰ عدد بچه‌ماهی کپور معمولی به وزن  $17/60 \pm 2/22$  گرم که از مراکز پرورش ماهیان گرمابی تهیه شده بود، استفاده شد. ماهیان در نه تانک ۱۰۰ لیتری پرورش که از قبل کلرزدایی و هوادهی شده بود، (سه تیمار شاهد، غلظت ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر DEHP در سه تکرار) (Hakim & Ali, 2014) با تراکم ۲۰ ماهی نگهداری شدند. اصول انتقال لارو ماهی مانند عدم استرس، کنترل دمای آب، اکسیژن دهی و عدم تغذیه تا رسیدن به محل پرورش ماهی رعایت شد. ماهیان به مدت یک هفته جهت سازگاری نگهداری شده و در طی این مدت با غذای مناسب به میزان دوبار در روز غذادهی شدند. در طول دوره مواجهه ماهی با آلاینده، سایر شرایط فیزیکی شیمیایی آب بطور نرمال برای همه تانک‌ها کنترل می‌شدند. آزمایش سمیت حاد و تحت حاد مطابق روش استاندارد سازمان همکاری و توسعه اقتصادی (OECD) به مدت ۹۶ ساعت و تحت شرایط ساکن با

در نهایت نتیجه به صورت درصد بیان گردید. برای محاسبه میانگین و انحراف معیار از نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۰ استفاده شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تیمار حاوی غلظت‌های مختلف نقره و هر تیمار سه تکرار انجام شد، پس از اندازه‌گیری فاکتورهای مطرح‌شده و ثبت آن‌ها، ابتدا نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. جهت بررسی اختلاف معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف، از آنالیز آماری یک طرفه (One-Way ANOVA) استفاده گردید. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (Chicago; version 19) و در سطح احتمال ۹۵ درصد ( $P > 0.05$ ) انجام گرفت.

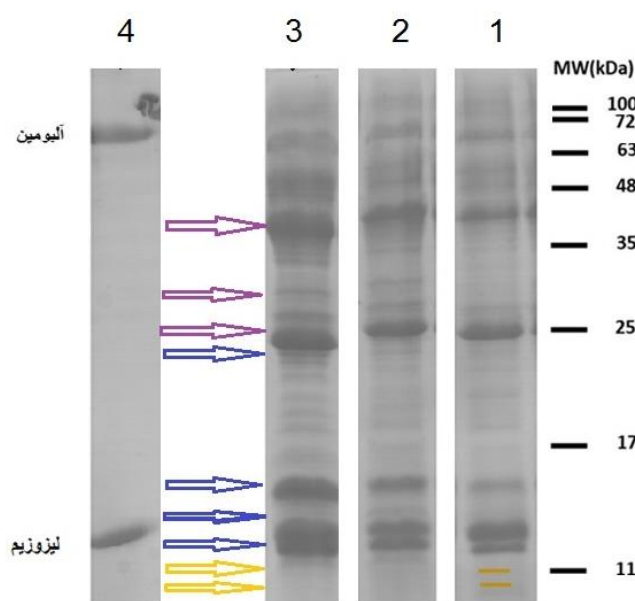
### نتایج

با مقایسه الگوی پروتئینی موکوس کپورماهی معمولی در معرض DEHP با دو غلظت مختلف با نمونه شاهد، در تراکم و ضخامت باندها اختلاف معنی‌داری نشان داد (شکل‌های ۱ و ۲).

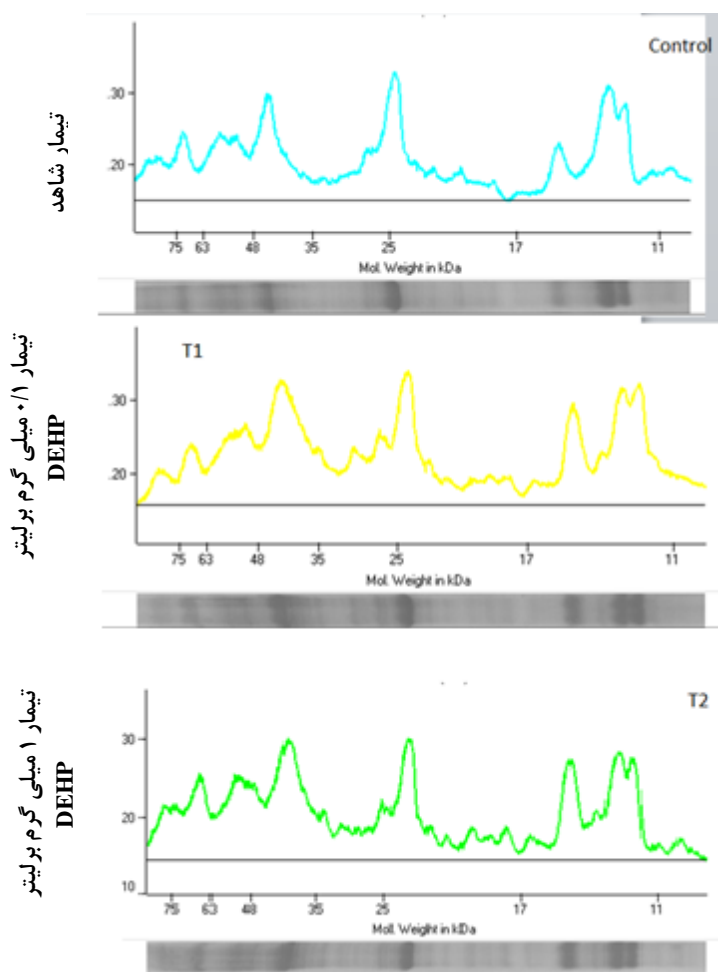
باندهای پروتئینی محدوده‌ای از ۱۱ تا ۱۸۰ کیلودالتون جرم مولکولی داشتند. بین تراکم باندهای پروتئینی تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود داشت. تخمین وزن مولکولی، افزایش تراکم باند را در مناطق ۱۴، ۱۶، ۲۵، ۲۶، ۳۰-۲۹، ۴۳ و ۶۶ کیلودالتون نشان داد. همچنین در ناحیه ۲۷ کیلودالتون از لاین ۳ (DEHP ۱ mg/L) یک باند جدید مشاهده شد که در تیمار ۰/۱ mg/L و تیمار شاهد وجود نداشت. کاهش تراکم یک باند با وزن مولکولی تقریباً ۱۱ کیلودالتون مشاهده گردید. لیزوزیم با وزن مولکولی تقریبی ۱۴ کیلودالتون در تیمارهای در معرض DEHP نسبت به تیمار شاهد افزایش تراکم باند را نشان داد و بیشترین افزایش تراکم باند در تیمار ۱ mg/L (لاین ۳) ثبت گردید (شکل‌های ۱ و ۲).

سانتی‌گراد حرارت داده و مدت ۳ دقیقه با دور ۱۰۰۰ سانتریفیوژ (Hetch مدل UNIVERSAL320R ساخت کشور آلمان) کرده، سپس از محلول صاف‌شده رویی جهت الکتروفورز DESAGA مدل DESTRONIC500/500 ساخت آلمان استفاده گردید. ۲۵ میکرولیتر از هر نمونه به همراه یک مارکر وزن مولکولی بر روی ژل پلی‌اکریل آمید ۱۸٪ و ژل انباری ۵٪ (استکینگ ژل) لود شد. الکتروفورز در ۱۲۰ ولت تا زمانی که مارکر بروموفنول بلو از استکینگ ژل عبور کند تنظیم شد، سپس در ۲۰۰ ولت به مدت ۷ ساعت با بافر الکتروفورز ۵ ایکس انجام شد. پس از اتمام الکتروفورز برای مشخص کردن باندهای پروتئینی ژل‌ها به وسیله ۵٪ کوماسی بلو (G250) به مدت ۲ ساعت رنگ‌آمیزی گردید و سپس طی ۲ مرحله به وسیله محلول رنگ‌بری کوماسی بلو به مدت ۴ ساعت رنگ‌بری انجام گرفت. عکسبرداری از ژل با استفاده از دستگاه اسکن SYNGENE مدل INGENIUS L ساخت کشور انگلستان انجام شد (Laemmli, 1970).

جهت تعیین پروفیل اسیدآمینو موکوس میزان ۰/۱ گرم نمونه موکوس که قبلاً به وسیله دستگاه فریز درایر CHRiST مدل ALPHA 1-2 LD plus ساخت کشور آلمان خشک شده بود را پس از دو مرحله هضم و اشتقاق به وسیله دستگاه HPLC KNAUER ساخت کشور آلمان با روش Lindroth & Mopper (1979) در آزمایشگاه علوم دریایی دانشگاه علوم دریایی تربیت مدرس نور مورد سنجش قرار گرفت. طول ستون ۴×۲۵۰ میلی‌متر و دمای ستون ۳۰ درجه سانتی‌گراد و نوع آن C18 بود. از آشکارساز ۱ فلورسان Shimadzu مدل RF-10Ax1 بین دو طول موج  $330^{nm}$  Excitation و  $Emission$  450<sup>nm</sup> نیز جهت شناسایی اسیدآمینوها استفاده شد و



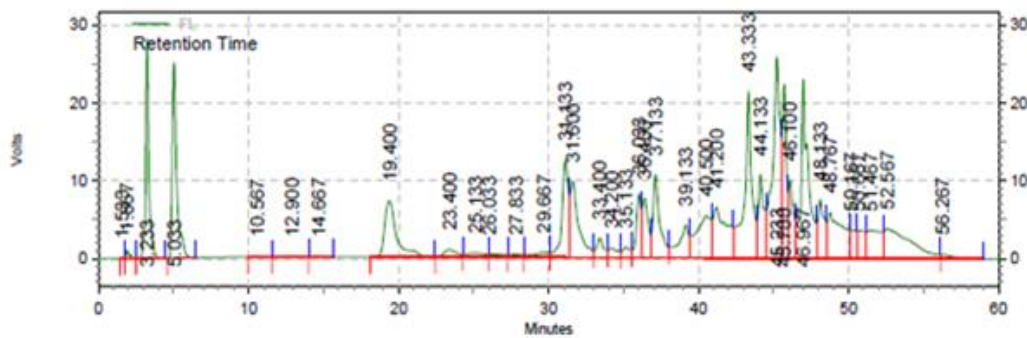
شکل ۱. نتایج اثر دو غلظت مختلف DEHP بر الگوی باندهای پروتئینی حاصل از الکتروفورز SDS-PAGE ردیف‌های آبی افزایش تراکم باندها را نشان می‌دهد. ردیف‌های زرد کاهش تراکم باندها را نشان می‌دهد. ردیف بنفش یک باند جدید را نشان می‌دهد. لاین ۱: شاهد، لاین ۲: DEHP با غلظت ۰/۱ mg/L، لاین ۳: DEHP با غلظت ۱ mg/L، لاین ۴: لیزوزیم و آلبومین.



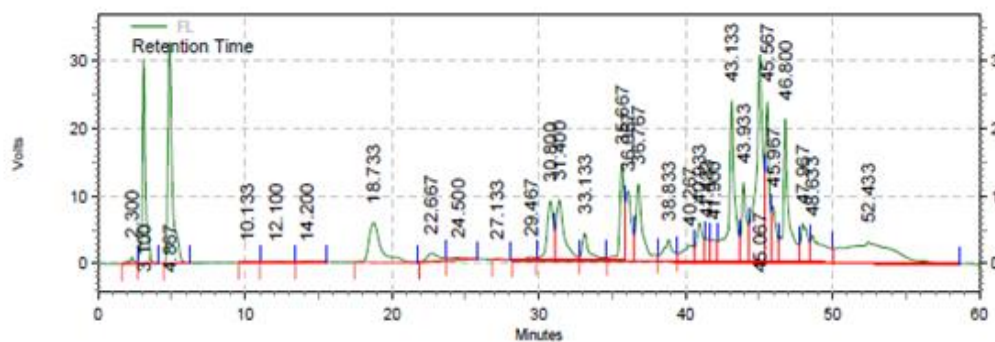
شکل ۲. اثر مقادیر مختلف DEHP بر الگوی باندهای پروتئینی حاصل از الکتروفورز ژل SDS-PAGE

۳، ۴ و ۵ تهیه و پس از مقایسه با استاندارد اسید آمینه، به صورت جدول ۱ ارائه گردید تا نتایج بر مبنای آن مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرد. درصد افزایش و کاهش اسید آمینه‌ها در هر تکرار به صورت جداگانه محاسبه گردید.

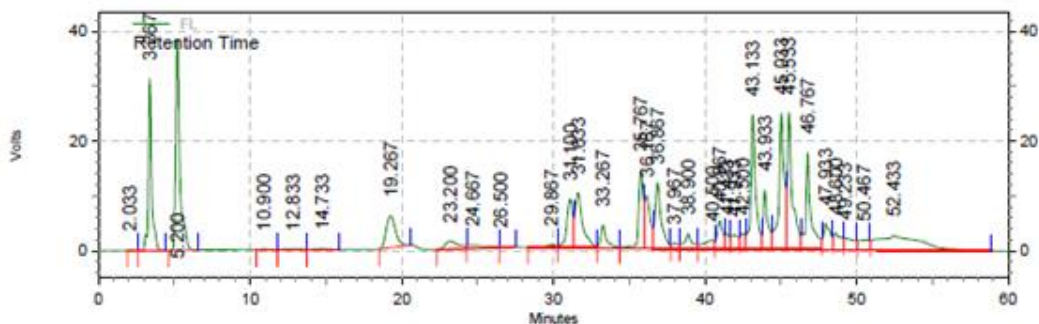
پس از تزریق نمونه‌ها به دستگاه HPLC نتایج آزمایشات صورت گرفته برای مقایسه اثر DEHP با دو غلظت متفاوت (۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) بر اسیدهای آمینه موکوس ماهی کپور معمولی به صورت شکل‌های



شکل ۳. نمودار پروفیل اسید آمینه موکوس نمونه ماهیان کپور معمولی شاهد



شکل ۴. نمودار پروفیل اسید آمینه موکوس نمونه ماهیان کپور معمولی در مواجهه با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر DEHP



شکل ۵. نمودار پروفیل اسید آمینه موکوس نمونه ماهیان کپور معمولی در مواجهه با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر DEHP

با ۱/۳۹٪، آرژنین با ۲/۷۳٪ و تیروزین با ۲/۹۲٪ قابل شناسایی بودند و سایر اسید آمینه‌ها در حدفاصل بین این درصدهای بیشترین و کمترین قرار گرفتند. اما در نمونه موکوس کپور ماهیان در معرض DEHP با

همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌گردد در نمونه شاهد بیشترین اسید آمینه‌ها در موکوس ماهی کپور معمولی فنیل‌آلانین با ۱۰/۵۵٪، لیزین با ۹/۴۶٪ و متیونین با ۸/۸۸٪ و کمترین اسیدهای آمینه هیستیدین

کپور در مواجهه با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. مقایسه اسیدهای آمینه موکوس پوست ماهی کپور دو گروه ماهیان در مواجهه با دو غلظت مختلف DEHP، اختلاف معنی‌داری بین غلظت اسیدهای آمینه هیستیدین، گلايسين، آرژینین و آلانین وجود نداشت (جدول ۱).

### بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به اهمیت صنعت آبی‌پروری و افزایش رو به رشد سالانه پرورش متراکم و فوق متراکم ماهیان آب‌های شور و شیرین که با عوامل استرس‌زای زیادی همراه است و بر سلامت ماهی تأثیر منفی می‌گذارند (Lee et al., 2004) و موجب ضعف فیزیولوژیک و افزایش حساسیت ماهی به عوامل بیماری‌زا شده، همچنین راهی برای بروز طیف وسیعی از بیماری‌ها می‌گردد.

غلظت ۰/۱ mg/L بیشترین درصدها متعلق به اسیدهای آمینه فنیل‌آلانین با ۱۲/۷۱٪، متیونین با ۸/۹۹٪، اسید گلوتامیک با ۸/۹۴٪ و لیزین ۷/۳۳٪ بود و کمترین مقادیر اسیدآمینه‌ها، هیستیدین با ۱/۵۱٪، تیروزین با ۲/۳۶٪ و لوسین با ۲/۹٪ کل اسیدهای آمینه شناسایی شده را تشکیل دادند. در آخر نمونه‌های موکوس کپورماهیان در معرض DEHP در تیمار با غلظت ۱ mg/L، بیشترین اسیدآمینه‌ها مربوط به اسیدگلوتامیک با ۱۰/۹۴٪، فنیل‌آلانین با ۹/۱۲٪ و متیونین با ۸/۲۶٪ بود و کمترین مقادیر اسیدآمینه‌ها مربوط به هیستیدین با ۱/۸۳٪، تیروزین با ۱/۸۴٪ و لوسین با ۲/۵۷٪ بود. غلظت اسیدهای آمینه موجود در موکوس پوست ماهی کپور در مواجهه با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر DEHP با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری داشت (به‌جز اسیدآمینه والین). غلظت اسیدهای آمینه هیستیدین، ترئونین، متیونین و ایزولوسین موجود در موکوس پوست ماهی

جدول ۱. مقایسه درصد اسیدهای آمینه موکوس ماهی کپور معمولی در معرض DEHP با ماهی کپور معمولی شاهد

ردیف	اسیدآمینه	موکوس نمونه شاهد درصد اسیدآمینه‌ها	موکوس نمونه ۰/۱mg/L درصد اسیدآمینه‌ها	موکوس نمونه ۱mg/L درصد اسیدآمینه‌ها
۱	اسید اسپارتیک	۵/۴±۰/۰۲ <sup>c</sup>	۶/۳۷±۰/۰۳ <sup>b</sup>	۷/۲۳±۰/۰۵ <sup>a</sup>
۲	اسید گلوتامیک	۶/۴۱±۰/۰۳ <sup>c</sup>	۸/۹۴±۰/۰۵ <sup>b</sup>	۱۰/۹۴±۰/۰۶ <sup>a</sup>
۳	سرین	۵/۰۸±۰/۰۳ <sup>c</sup>	۴/۷۳±۰/۰۲ <sup>b</sup>	۴/۰۴±۰/۰۲ <sup>a</sup>
۴	هیستیدین	۱/۳۹±۰/۰۳ <sup>bc</sup>	۱/۵۱±۰/۰۱ <sup>ab</sup>	۱/۸۳±۰/۰۱ <sup>a</sup>
۵	گلايسين	۴/۸۵±۰/۰۲ <sup>c</sup>	۳/۹۲±۰/۰۲ <sup>ab</sup>	۴/۰۹±۰/۰۲ <sup>a</sup>
۶	ترئونین	۴/۹۶±۰/۰۱ <sup>bc</sup>	۴/۸۶±۰/۰۳ <sup>b</sup>	۵/۵۷±۰/۰۴ <sup>a</sup>
۷	آرژینین	۲/۷۳±۰/۰۱ <sup>c</sup>	۴/۳۹±۰/۰۱ <sup>ab</sup>	۴/۸۳±۰/۰۵ <sup>a</sup>
۸	تائورین	۳/۰۹±۰/۰۱ <sup>c</sup>	۴/۱۲±۰/۰۲ <sup>b</sup>	۳/۹۲±۰/۰۱ <sup>a</sup>
۹	آلانین	۴/۴±۰/۰۳ <sup>c</sup>	۵/۲۳±۰/۰۳ <sup>ab</sup>	۵/۳۷±۰/۰۴ <sup>a</sup>
۱۰	تیروزین	۲/۹۲±۰/۰۲ <sup>c</sup>	۲/۳۶±۰/۰۱ <sup>b</sup>	۱/۸۴±۰/۰۱ <sup>a</sup>
۱۱	متیونین	۸/۸۸±۰/۰۲ <sup>bc</sup>	۸/۹۹±۰/۰۵ <sup>b</sup>	۸/۲۶±۰/۰۵ <sup>a</sup>
۱۲	والین	۳/۷±۰/۰۲	۳/۹۱±۰/۰۲	۳/۷۸±۰/۰۱
۱۳	فنیل‌آلانین	۱۰/۵۵±۰/۰۶ <sup>c</sup>	۱۲/۷۱±۰/۰۶ <sup>b</sup>	۹/۱۲±۰/۰۴ <sup>a</sup>
۱۴	ایزولوسین	۵/۴۱±۰/۰۴ <sup>bc</sup>	۵/۶۹±۰/۰۳ <sup>b</sup>	۶/۶۴±۰/۰۲ <sup>a</sup>
۱۵	لوسین	۳/۲۲±۰/۰۱ <sup>a</sup>	۲/۹±۰/۰۱ <sup>b</sup>	۲/۵۷±۰/۰۱ <sup>a</sup>
۱۶	لیزین	۹/۴۶±۰/۰۵ <sup>c</sup>	۷/۳۳±۰/۰۴ <sup>b</sup>	۶/۵۵±۰/۰۳ <sup>a</sup>
۱۷	سایر	۱۷/۵۵	۱۲/۰۴	۱۳/۴۴
۱۸	مجموع	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

در هر ردیف میانگین‌های دارای حروف بالانویس غیرمشترک با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند (P<۰/۰۵).

در این تیمار بالاترین افزایش تراکم باند لیزوزیم مشاهده شد.

باند‌های ۲۵/۹-۲۹/۷ و ۲۵-۲۸ کیلودالتون به ترتیب می‌تواند مربوط به پروتئین‌های پروتازوم زیر واحد آلفا<sup>۱</sup> و پروتازها<sup>۲</sup> باشد باند‌های ۴۵ و ۶۷ کیلودالتون به ترتیب می‌تواند مربوط به او-آلبومین و آلبومین باشد (Guardiola et al., 2015).

برخی مطالعات تغییر در الگوی پروتئینی موکوس پوست ماهی‌های گونه‌های مختلف را با استفاده از SDS-PAGE نشان داده‌اند (Guardiola et al., 2007; Subramanian et al., 2015) و گزارش کردند که با نتایج تحقیق حاضر مبنی بر تأثیر DEHP بر الگوی پروتئینی موکوس پوست ماهی کپور همسو است. اما وجود این، تجزیه و تحلیل و آزمایشات بیشتری نیاز است تا ترکیبات ضد استرس جدا و شناسایی شوند.

پوست ماهی به‌عنوان اولین اندام دفاعی بدن ماهی تحت شرایط مختلف استرس عکس‌العمل متفاوتی خواهد داشت و از مهمترین عکس‌العمل‌های پوست، تغییر در ترکیبات موکوس پوست ماهی می‌باشد. در اسید آمینه‌های موکوس تحت شرایط مختلف استرس تغییراتی ایجاد می‌شود که می‌تواند شاخص مناسبی جهت تشخیص شرایط محیطی باشد. در این تحقیق نیز تغییراتی در اسیدهای آمینه موکوس تحت دو غلظت مختلف DEHP به‌وجود آمده است. ارگانیزم‌های زیادی آرژنین و لیزین تولید می‌کنند تا لپیدهای پلی‌کاتیونی را افزایش دهند و خودشان را در برابر میکروب‌های پاتوژن حفاظت کنند (Nishikawa & Ogawa, 2004). (Balasubramanian et al., 2006) مطالعاتی روی موکوس پوست ماهی داشتند تا نشان دهد فعالیت ضد میکروبی قوی بخاطر مقدار بالای لیزین می‌باشد. تحقیق حاضر همچنین با

ماهی‌ها برای ادامه زندگی در محیط‌های آبی دارای عوامل مختلف سازگاری می‌باشند که از آنها در مقابل عوامل استرس‌زا محافظت می‌کنند. یکی از این عوامل موکوس نام دارد (Ingram, 1980). سیستم ایمنی موکوسی نقش کلیدی در مکانیسم دفاعی بدن بر عهده دارد (Raj et al., 2011; Dongarra et al., 2007; Ross et al., 2013) و به‌عنوان اولین مانع در مقابل عفونت عمل می‌کند (Caipang & Lazado, 2014). از دیگر ویژگی‌های این بافت همیشگی بودن آن و دور انداختن بافت‌های مرده و تولید مداوم آن است که از اتصال عوامل استرس‌زا و بیماری‌زا جلوگیری می‌کند (Ross et al., 2007).

در مطالعه حاضر با استفاده از تکنیک الکتروفورز، الگوی پروتئینی موکوس پوست ماهی کپور معمولی از طریق ژل SDS-PAGE تعیین گردید. SDS-PAGE به‌طور گسترده در مطالعات زیادی برای شناسایی تفاوت الگوی پروتئینی بسیاری از گونه‌ها استفاده شده است. تفاوت در الگوی پروتئینی یک موجود زنده را می‌توان به شرایط داخلی و خارجی، انواع بافت‌ها و مراحل مختلف تکامل نسبت داد (Kamikouchi et al., 2004; Khattab & Sherif, 2011).

در این مطالعه که به‌نظر می‌رسد برای اولین بار در ایران روی موکوس پوست ماهی کپور معمولی صورت گرفت، جداسازی و شناسایی وزن مولکولی پپتیدهای مختلف موجود در عصاره‌های موکوس پوست ماهی کپور معمولی به‌وسیله SDS-PAGE روی ژل ۱۸٪ نشان داده شد. با استفاده از SDS-PAGE باند‌های پروتئینی (با وزن مولکولی حدود ۱۴، ۱۶، ۲۵، ۴۵ و ۶۷ کیلودالتون) در موکوس پوست ماهی کپور معمولی شناسایی شدند. بر اساس شکل مقایسه نتایج اثر دو غلظت مختلف DEHP در تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر DEHP (لاین ۳) باند ۲۹-۳۰ کیلودالتون غایب بود که می‌تواند مربوط به کربونیک انهیدراز باشد که موکوس پوست ماهی کپور فاقد آن می‌باشد. همچنین

1. Proteasome subunit alpha  
2. Proteases



افزایش و در غلظت بالاتر (۱ میلی‌گرم در لیتر DEHP) مقدار آنها کاهش پیدا کرد مانند تائورین، متیونین، والین و فنیل‌آلانین.

اسیدهای آمینه اصلی (پایه‌ای) مانند: هیستیدین، لیزین و آرژنین به‌عنوان اسیدهای آمینه مؤثر در ضد عفونت شناخته می‌شوند. یک پلی‌پپتید با دیگر اسیدآمینه‌ها مانند: آلانین، آرژنین، ایزولوسین، فنیل‌آلانین، پرولین و سرین جهت ترمیم بافت و درمان زخم به‌کار می‌رود (Willett & Morse, 1966). موجودات زیادی اسیدآمینه آرژنین را جهت حفاظت خود در برابر عوامل استرس‌زا تولید می‌کنند (Nishikawa & Ogawa; 2004). ماهی کپور تحت شرایط استرس DEHP در مقادیر مختلف، مقدار آرژنین موکوس را افزایش داده تا در برابر میکروب‌های بیماری‌زا از خود حفاظت نماید. گلیسین ساده‌ترین اسیدآمینه از لحاظ فرمول شیمیایی می‌باشد که نقش حفاظتی دارد و به‌عنوان یک عامل غیراختصاصی حفاظتی در سطوح بالای سمیت استفاده می‌شود (Esimone et al., 2007). در این تحقیق در غلظت ۰/۱ mg/l DEHP، مقدار گلیسین کاهش یافت و در غلظت بالاتر افزایش یافت. به‌نظر می‌رسد دلیل این امر نقش حفاظتی در سطح پوست ماهی در غلظت ۱ mg/l DEHP باشد. اسیدآمینه فنیل‌آلانین در ماهی کپور به‌مانند موکوس پوست ماهی کفال (*Mugil cephalus*) مشاهده شده است (Esimone et al., 2007) که در غلظت ۰/۱ mg/l، DEHP، افزایش این اسیدآمینه مشاهده گردید و در غلظت ۱ mg/l DEHP، این اسیدآمینه به‌شدت کاهش یافت. Esimone et al. (2007) در تحقیقی روی ماهی کفال دریافتند که درصد اسیدآمینه فنیل‌آلانین در حضور کلرامفنیکل در برابر استرس مواد شیمیایی افزایش می‌یابد.

اسیدهای آمینه اصلی هیستیدین، لیزین و آرژنین (Alexander & Supp; 2014) با قند ترکیب شده و گلیکوپروتئین‌ها را تشکیل می‌دهند که در این تحقیق

تحقیقات Manivasagan et al. (2009) مطابقت دارد که بالاترین مقدار اسیدآمینه مربوط به اسیدآمینه لیزین بود که در موکوس پوست گربه ماهی وجود داشت. مقدار متوسط فنیل‌آلانین در سه گونه از گربه ماهی توسط Zuraini et al. (2006) به‌دست آمده است. در پوست آسیب دیده گربه‌ماهی *Parasilurus asotus* ترشح بسیار شدید لیزین در لایه موکوس دیده شده است (Park et al., 1998). نهایتاً می‌توان گفت تأثیر ماده DEHP بر موکوس پوست ماهیان کپور معمولی باعث گردید که اسیدهای آمینه موکوس در چهار گروه قرار گیرند.

از نظر درصد، اسیدهای آمینه موجود در موکوس ماهیان به سه دسته اسیدهای آمینه‌ای با مقدار بالا، مقدار متوسط و مقدار کم تقسیم می‌شوند. اسیدهای آمینه‌ای که مقدار بالا دارند شامل متیونین، فنیل‌آلانین و لیزین می‌شوند. اسیدهای آمینه‌ای که مقدار متوسط دارند شامل ایزولوسین، اسید اسپارتیک، اسید گلوتامیک و سرین می‌شوند و اسیدهای آمینه‌ای که با مقدار کم در موکوس ماهی مشاهده می‌شوند شامل هیستیدین، آرژنین و تیروزین است (Balasubramanian et al., 2013) که در نمونه شاهد این تحقیق با موارد بالا مطابقت دارد.

دسته اول اسیدهای آمینه‌ای که با افزایش غلظت ماده DEHP مقدار آنها در موکوس افزایش یافت مانند اسید اسپارتیک، اسید گلوتامیک، هیستیدین، آرژنین، آلانین و ایزولوسین.

دسته دوم اسیدهای آمینه‌ای که با افزایش غلظت DEHP مقدار این اسیدآمینه‌ها کاهش یافت مانند سرین، تیروزین، لوسین و لیزین.

دسته سوم اسیدهای آمینه‌ای که در غلظت کم (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر DEHP) مقدار آنها کاهش و در غلظت بالاتر (۱ میلی‌گرم در لیتر DEHP) مقدار آنها افزایش پیدا کرد مانند گلیسین و ترئونین.

و در آخر، دسته چهارم اسیدهای آمینه‌ای که در غلظت کم (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر DEHP) مقدار آنها

نشان داده است. با توجه به تغییرات ترکیبات بیوشیمیایی موکوس پوست از جمله تغییر در تعداد باندهای پروتئینی، می‌توان با مطالعات گسترده‌تر به موکوس پوست ماهیان به‌عنوان روشی ساده، کم هزینه و غیرتهاجمی برای بررسی اثرات آلاینده‌ها و عوامل پاتوژن توجه کرد. در مجموع موکوس خام پوست ماهی کپور شامل ۱۸ نوع اسید آمینه است که لیزین، فنیل‌آلانین بیشترین درصد را به خود اختصاص دادند. همه اسید آمینه‌ها در موکوس پوست ماهی کپور نقش مهمی در دفاع در برابر پاتوژن‌ها دارند.

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق، استفاده از این روش و پروفیل اسید آمینه‌ها موکوس ماهی را به‌عنوان یک زیست‌نشانگر بدون آسیب رساندن به ماهی، در اختیار سازمان‌هایی نظیر محیط زیست، شیلات و غذا و دارو و همچنین مراکز تحقیقاتی زیستی قرار داد تا با ارائه راهکارهای مناسب، تمهیدات لازم و جدی جهت این مشکل اتخاذ گردد.

## REFERENCES

- Adeniyi, A.; Okedei, O.; Yusuf, K.; (2011). Flame Ionization Gas chromatographic determination of Phthalate Esters in Water; Surface Sediment and Fish Species in the Ogun River; Environ Monit Assess. 172(1-4): 561-9.
- Balasubramanian, S.; Gunasekaran, G.; Baby rani, P.; Arul prakash, A.; Prakash, M.; Senthil raja, P.; (2013). A study on the antifungal properties of skin mucus from selected fresh water fishes. Golden Research Thoughts; 2(9): 01-06. ISSN:-2231-5063.
- Berntssen, M. H. G.; Kroglund, F.; Rosseland, B. O.; Wendelaar Bonga, S. E.; (1997). Responses of skin mucous cells to aluminium exposure at low pH in Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts; Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 54(5); 1039-1045.
- Costa, J.; Ferreira, M.; Salgueiro, L. R.; Reis-Henriques, M. A.; (2011). Comparison of the Waterborne and

نیز با افزایش غلظت DEHP، غلظت اسیدهای آمینه آرژنین و هیستیدین افزایش یافت و اسید آمینه لیزین به‌علت درشت مولکول بودن نسبت به سایر اسیدهای آمینه تمایل کمتری به ترکیب با قندها دارد.

## نتیجه‌گیری کلی

لایه موکوس اولین سد دفاعی در مقابل پاتوژن‌هاست و حاوی عوامل ایمنی غیراختصاصی مختلفی است. ترکیبات موکوس اپیدرم در گونه‌های مختلف ماهیان متفاوت بوده و این امر سبب تفاوت در مقاومت ماهیان در برابر بیماری‌ها می‌شود. فاکتورهای محیطی مربوط به گونه ماهی مانند شرایط فیزیکی شیمیایی و آلاینده‌ها بر دستگاه ایمنی ذاتی و همچنین ترکیبات موکوس تأثیر گذاشته و سبب تفاوت ترکیبات موکوسی بین گونه‌ها می‌گردد.

ماده DEHP به‌عنوان تحریک‌کننده سیستم ایمنی از طریق افزایش تراکم باندهای پروتئینی تأثیر خود را

- Dietary Routes of Exposure on the Effects of Benzo[a]Pyrene on Biotransformation Pathways on Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*); Journal of Chemospher; 84(10):1452-1460.
- Dongarra, M. L.; Rizzello, V.; Muccio, L.; Fries, W.; Cascio, A.; Bonaccorsi, I.; Ferlazzo, G.; (2013). Mucosal immunology and probiotics. Current allergy and asthma reports; 13: 19-26.
- Esimone, C.O.; Nworu, C.S.; Ekechukwu, A.C.; Awemu, A. G.; (2007). Effects of phenylalanine and glycine on some toxic effects of chloramphenicol. Sci Resear Essay; 2(4): 105- 111.
- Fakharzadeh; M.S.E.; Farhangi, M.; Mojazi Amiri, B.; (2011). The effect of hydrocortisone treatment by bathing and daphnia enrichment on the salinity stress in Persian sturgeon *Acipenser persicus* juvenile; Journal of International Aquatic Research; 125-133.
- Ingram, G. A.; (1980). Substances

- involved in the natural resistance of fish to infection-a review; *Journal of Fish Biology*; 16(1); 23-60.
- Guardiola, F. A.; Dioguardi, M.; Parisi, M. G.; Trapani, M. R.; Meseguer, J.; Cuesta, A.; Cammarata, M.; Esteban, M. A. (2015). Evaluation of waterborne exposure to heavy metals in innate immune defences present on skin mucus of gilthead seabream (*Sparus aurata*); *Fish & shellfish immunology*; 45(1); 112-123.
- Hakim, Y.; Ali, H.A.; (2014). Evaluation of the toxic effects of phtalate; Di-n-Butule Phthalate (DBP) on health of *Oreochromis niloticus*. *World J. Fish Marine Sci.*
- Kamikouchi A. Morioka M.; Kubo T. (2004). Identification of honeybee antennal proteins/genes expressed in a sex-and/or caste selective manner; *Zoological science*. 21: 53-62.
- Khatab, S.; El Sherif, F.; (2011). Effect of growth regulators on *Carpobrotus edulis* rapid micropropagation and molecular analysis; *Journal of American Science*; 7: 511-520.
- Khatab; S.; El Sherif; F.; El-Garhy; Ahmed H. A.; Ibrahim A.; (2014). Genetic and phytochemical analysis of the in vitro regenerated *Pilosocereus robinii* by ISSR; SDS-PAGE and HPLC. *Gene*; 533: 313-321.
- Laemmli; U. K.; (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4; *Nature*; 227: 680-685.
- Lazado, C. C.; Caipang, C. M. A.; (2014). Mucosal immunity and probiotics in fish; *Fish and shellfish immunology*; 39: 78-89.
- Lindroth, P.; Mopper, K.; (1979). High performance Liquid Chromatographic Determination of Subpicomole Amounts of Amino Acids by Precolumn Fluorescence Derivatization with o-Othaldialdehyde. *Analyte Chem*; 51: 1667-74.
- Magdouli, S.; (2013). Di 2-ethylhexylphtalate in the aquatic and terrestrial environment: A critical review. *Journal of environmental management*; 127; 36-49.
- Manivasagan, P.; Annamali, N.; Ashokkumar, S.; Sampathkumar, P.; (2009). Studies on the protenious gel secretion from the Skin of the catfish; *Arius maculates* (Thunberg; 1792) *African J Biotech.*; 8(24): 7125-7129
- Munoz-Ortuno; M. *et al.*; (2014). A cost-effective method for estimating di (2-ethylhexyl) phtalate in coastal sediments. *Journal of chromatography. A*; 1324; 57-62.
- Nishikawa, M.; Ogawa, K.; (2004). Antimicrobial activity of chelatable poly (Arginyl-Histidine) produced by the ergot fungus *Verticillium kibiense*. *Antimicr agents chemother*; 48: 229-235.
- OECD 203; (2010). OECD guideline for testing chemicals. Test No. 203: Acute Fish Test.
- Oehlmann, J.; Oetken, M.; Oehlmann, U.; (2008). A Critical Evulation of the Environmental Risk Assessment for Plasticizers in the Freshwater Environment in Europe; with Special Emphasis on Bisphenol A and Endocrine Disruption; *Environmental Research*; 108: 140-149.
- Cone, R. A.; (2009). Barrier properties of mucus; *Advanced Drug Delivery Reviews*; 61(2): 75-85.
- Raj, V.S.; Fournier, G.; Rakus, K.; Ronsmans, M. Ouyang, P.; Michel, B.; (2011). Skin mucus of *Cyprinus carpio* inhibits cyprinid herpesvirus 3 binding to epidermal cells; *Veterinary research*; 1: 42-92.
- Ross, N.W.; Subramanian, S.; Mackinnon, S. L.; (2007). A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. *Comparative Biochemistry and physiology part B: Biochemistry and Molecular Biology*; 148(3): 256-263.
- Subramanian, S.; MacKinnon, S. L.; Ros, N. W. S.; (2007). A comparative study on innate immune parameters in the

- epidermal mucus of various fish species; *Comparative Biochemistry and Physiology B*; 148(3): 256-263.
- Wang, J., *et al.*; (2014). Occurrence of phthalate esters in river sediments in areas with different land use patterns. *The Science of the total environment*; 500-501C; 113-119.
- Wesley Alexander, J.; Dorothy Supp, M.; (2014). Role of Arginine and Omega-3 Fatty Acids in Wound Healing and Infection. 1; 3(11): 682-690.
- Willett, N.P.; Morse, G.E.; (1966). Long-chain fatty acid inhibition of growth of *Streptococcus agalactiae* in a chemically defined medium. *J Bacteriol*; 91: 2245-2250.
- Zuraini, M.N.; Somchit, M.H.; Solihah Goh, Y.M.; (2006). Fatty acid and amino acid composition of three local Malaysia *Channa spp*" *Fish Food Chem*; 97: 674-678.