تأثیر حفاظتی ویتامین C و کیتوزان بر پارامترهای بیوشیمیایی سلول‌های آبششی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در معرض پاراکوات

مهدی بنایی *[۱]، زینب شریفی نسب[۱]، محمد محیسنی[۱]، احمد نوری[۲]

۱-گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و محیط‌زیست، دانشگاه صنعتی خاتم‌الانبیاء (ص) بهبهان، بهبهان، ایران، کد پستی: ۶۳۶۱۶-۴۷۱۸۹

۲-گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

تاریخ دریافت: ۷ شهریور ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: ۲۵ آذر ۱۳۹۶

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی تأثیر تجویز آنتی‌اکسیدان‌های نظیر ویتامین C و کیتوزان بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو در سلول‌های آبشش ماهی‌های در معرض پاراکوات است. در این آزمایش ماهی‌ها به مدت ۲۱ روز با جیره واجد کیتوزان (۱۰۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم غذا)، ویتامین C (۱۰۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم غذا) و ویتامین C همراه با کیتوزان تغذیه شدند و به‌طور همزمان در معرض ۰/۰۲ میلی‌گرم بر لیتر پاراکوات قرار گرفتند. در این آزمایش، شاخص‌های استرس اکسیداتیو نظیر فعالیت آنزیم کاتالاز، آنتی‌اکسیدان کل و مالون‌دی آلدهید و پارامترهای بیوشیمیایی سلولی نظیر فعالیت آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز، آلانین آمینوترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز اندازه‌گیری شد. سطح فعالیت آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز، آلانین آمینوترانسفراز، لاکتات دهیدروژناز و کاتالاز و همچنین سطح مالون دی‌آلدهید در سلول‌های آبششی ماهی‌های در معرض پاراکوات به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. درحالی‌که سطح آنتی‌اکسیدان کل سلولی کاهش یافت. اگرچه تجویز ویتامین C، کیتوزان به ماهی‌های در معرض پاراکوات سبب کاهش معنی‌دار سطح فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز و کاتالاز، مالون دی‌آلدهید در سلول‌های آبششی گردید، اما سطح فعالیت این آنزیم در این ماهی‌ها همچنین به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود ($P< ۰/۰۵$). تجویز ویتامین C و کیتوزان تأثیر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز، آلانین آمینوترانسفراز و سطح آنتی‌اکسیدان کل نداشت. به دلیل بالا بودن سطح اکسیژن در بافت تنفسی ماهی‌ها (آبشش)، سمیت پاراکوات ممکن است بسیار شدید باشد. نتایج این مطالعه نشان داد که تجویز آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی نظیر ویتامین C و کیتوزان تأثیر جزئی بر پارامترهای بیوشیمیایی سلول‌های آبششی دارد و نمی‌تواند آن‌ها را به سطح نرمال بازگرداند.

کلمات کلیدی: کیتوزان، ویتامین C، پاراکوات، آبشش، سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی.

* عهده‌دار مکاتبات (✉). mahdibanaee@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

بر اساس آمارنامه کشاورزی در سال ۱۳۹۰، بیش از ۱۱۸۱۱۸۷ لیتر انواع مختلف علف‌کش در ایران توسط کشاورزان و باغداران خریداری و مصرف گردیده است. پاراکوات (۱،۱- دی متیل ۴،۴-بی‌پیریدیلیوم دی کلراید) یکی از پرکاربردترین علف‌کش‌های حال حاضر در صنعت کشاورزی است. این علف‌کش برای جانوران بسیار سمی بوده و گزارش‌های زیادی در دهه‌های اخیر از مسمومیت انسان‌ها و جانوران با این علف‌کش گزارش‌شده است (Awadalla, 2012). کارایی بالا، قیمت مناسب و امکان استفاده از این علف‌کش در مزارع مختلف کشاورزی و باغ‌های میوه سبب شده که پاراکوات جزء ۵ علف‌کش پرمصرف در ایران محسوب می‌گردد (آمارنامه کشاورزی، ۱۳۹۰). این علف‌کش ممکن است از طریق وزش باد در حین سم‌پاشی و یا زهکش یا آبشویی مزارع کشاورزی پس از سم‌پاشی وارد آب‌های سطحی شده و بر آبزیان ساکن در اکوسیستم‌های نزدیک به زمین‌های کشاورزی تأثیر گذارد. ماهی‌ها یکی از مهم‌ترین گونه‌های آبزی ساکن آب‌های آلوده هستند که تحت تأثیر این سم قرار دارند. پاراکوات مانند دیگر آلاینده‌های محیطی ممکن است از طریق آبشش‌ها، پوست و سیستم گوارشی ماهی‌ها جذب شود و از طریق خون به دیگر بافت‌های بدن انتقال یابد (Banaee *et al.*, 2013).

یکی از مهم‌ترین بافت‌هایی که بیشترین تأثیر را از مسمومیت با پاراکوات می‌پذیرد، سیستم تنفسی جانوران است (Awadalla, 2012)؛ زیرا پاراکوات در محیط غنی از اکسیژن ممکن است تحت تأثیر یک کاهنده الکترونی به رادیکال آزاد تبدیل‌شده و به‌سرعت با مولکول اکسیژن وارد واکنش گردد. ازاین‌رو در محیط‌های غنی از اکسیژن سمیت پاراکوات افزایش می‌یابد زیرا در چنین شرایطی تشکیل رادیکال‌های سوپر اکسید بیشتر خواهد بود (Tomita *et al.*, 2007). پاراکوات ممکن است از طریق یک سیستم چندگانه سبب ایجاد مسمومیت و بروز آسیب به غشای سلولی گردد (Awadalla, 2012). نیتریک اکسیدهای تولیدشده در طی فرایند سم‌زدایی پاراکوات نقش مهمی در ایجاد سمیت سلولی دارند. درواقع نیتریک اکسیدها مهم‌ترین عامل مختل‌کننده فرایند انتقال الکترون در زنجیره تنفسی میتوکندری سلول‌ها محسوب می‌شوند (Tomita *et al.*, 2001). ازاین‌رو پاراکوات با ایجاد اختلال در سیستم انتقال الکترونی در میتوکندری سلول‌ها، مانع از احیای NADP به NADPH می‌گردد و این اختلال می‌تواند منجر به تشکیل آنیون سوپر اکسید، رادیکال اکسیژن و رادیکال‌های پروکسیل و هیدروکسیل شود (Awadalla, 2012). بدین ترتیب این ترکیبات فعال واکنشگر اکسیژنی (ROS) ممکن است با چربی‌های غیراشباع غشای اندامک‌های سلولی واکنش داده و زمینه را برای مرگ سلول مهیا سازد. تبدیل پراکسیداسیونی اکسیژن به رادیکال‌های سوپر اکسید و پراکسید هیدروژن نیز ممکن است از طریق پراکسیداسیون لیپیدی غشای سلولی موجب برهم خوردن تعادل فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سلول‌ها گردد.

اگرچه در بسیاری از مناطق دنیا قوانین زیست‌محیطی متعددی جهت ایجاد محدودیت در استفاده از آفت‌کش‌ها وضع‌شده و استانداردهای برای نحوه و میزان مصرف آن‌ها در حد قابل‌قبول

Archive of SID

www.SID.ir

تعریف‌شده است؛ اما این تلاش‌ها هنوز در بسیار از کشورهای درحال‌توسعه غالباً نتیجه مطلوبی در پی نداشته است. ازاین‌رو محققین تلاش‌هایی در جهت شناخت هرچه بیشتر سیستم سم‌زدایی آبزیان و نیز چگونگی تقویت و ارتقای آن به‌منظور مقابله به آلاینده‌های محیطی و کاهش پیامدهای زیستی آن انجام داده‌اند. استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و سنتتیک نظیر ویتامین‌ها در افزایش کارایی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی سلولی و پیشگیری از تأثیر سمی آلاینده‌های زیست‌محیطی یکی از این راه‌کارها است (Ozturk *et al.*, 2009; Banaee *et al.*, 2015). در این روش معمولاً با تجویز یک یا چند ترکیب آنتی‌اکسیدانی تلاش می‌شود که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلولی و توان سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی افزایش داده شود تا فرایند سم‌زدایی و دفع ترکیبات سمی از بدن جانوران تسهیل گردد و آسیب ناشی از مسمومیت با مواد سمی به حداقل برسد.

اسکوربیک اسید یا ویتامین C، یک ویتامین محلول در آب است که از قابلیت بالایی در حذف رادیکال‌های آزاد نظیر هیدروکسیل رادیکال‌ها، پراکسیل رادیکال‌ها و آنیون‌های سوپر اکسید برخوردار هست (Padayatty *et al.*, 2003). ویتامین C به‌عنوان یک دهنده الکترون عمل می‌کند و با احیا و خنثی کردن رادیکال‌های آزاد پیش از واکنش آن‌ها با مولکول‌های زیستی، به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند (Evans and Halliwell, 2001; Awadalla, 2012). علاوه بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی ویتامین C در حذف رادیکال‌های آزاد، این ویتامین در بازسازی دیگر مولکول‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر آلفا توکفرول، گلوتاتیون و بتا کاروتن نیز نقش دارد (Evans and Halliwell, 2001; Awadalla, 2012). ازاین‌رو، ویتامین C یکی از مهم‌ترین کاندیدها برای افزایش کارایی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در ماهی‌ها است.

کیتوزان یکی دیگر از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی محلول در آب است که به دلیل داشتن خاصیت از بین برندگی رادیکال‌های آزاد (Je and Kim, 2006; Yoon *et al.*, 2011) و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی (Yoon *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2011; و همچنین کارایی آن به‌عنوان حامل دارویی و هورمونی و مکمل‌های ویتامینی (Grenha *et al.*, 2005; Kavaz *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2010; Alishahi *et al.*, 2011a,b)، در پیشگیری از آسیب‌های وارد به اندام‌های مختلف جانوران آزمایشگاهی در معرض مواد شیمیایی مختلف مورداستفاده قرار می‌گیرد. همچنین کارایی کیتوزان در حذف پاراکوات از آب (Hsu *et al.*, 2013) نیز ممکن است در کاهش قابلیت دسترسی زیستی این علف‌کش در محیط و میزان جذب آن به‌وسیله آبشش‌ها مؤثر باشد.

بر اساس آمارنامه کشاورزی در سال ۱۳۹۰، بیش از ۱۱۹۶۸ باب مزرعه پرورش ماهیان گرم آبی در تولید انواع گونه‌های ماهیان گرم آبی فعال هستند و میزان تولید این مزارع بیش از ۱۳۲۴۸۹ تن گزارش‌شده است؛ که از این میزان، بیش از ۳۱۹۲۷ تن مربوط به استان خوزستان هست. اغلب این مزارع پرورش ماهی نیز در مجاور زمین‌های کشاورزی است. لذا قرار گرفتن این ماهیان در معرض انواع مختلف آفت‌کش‌ها به‌ویژه علف‌کش پاراکوات بسیار محتمل است. از سویی دیگر تهیه و نگهداری ماهی کپور معمولی و سازگار نمودن آن با شرایط آزمایشگاهی در مقایسه با دیگرگونه‌های

Archive of SID
www.SID.ir

پرورشی و وحشی موجود در استان خوزستان، بسیار ساده‌تر و راحت‌تر است.

ازاین‌رو با توجه به ویژگی‌های کیتوزان در نقل‌وانتقال ویتامین‌ها در سیستم‌های زیستی و همچنین با در نظر گرفتن خواص آنتی‌اکسیدانی ویتامین C و کیتوزان این فرضیه مطرح می‌شود که تجویز ویتامین C و کیتوزان به‌تنهایی و یا همراه با یکدیگر ممکن است در کاهش اثرات سمی پاراکوات و نیز تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی آبشش ماهی‌های در معرض پاراکوات مؤثر باشد؛ بنابراین، هدف این مطالعه بررسی تأثیر حفاظتی ویتامین C و کیتوزان در برابر استرس اکسیداتیو ایجادشده در سلول‌های آبششی ماهی‌های کپور معمولی در معرض پاراکوات است. ازاین‌رو در این مطالعه فعالیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و پارامترهای بیوشیمیایی سلول‌های آبششی ماهی‌های در معرض پاراکوات و نیز تأثیر تجویز ویتامین C و کیتوزان در برقراری تعادل بین نرخ پراکسیداسیون لیپیدی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلولی و سطح فعالیت آنزیم‌های درون‌سلولی آبشش ماهی‌ها اندازه‌گیری شده است.

مواد و روش‌ها

کیتوزان با وزن مولکولی پایین (با درجه دی‌اسیلاسیون ۸۰ درصدی) از شرکت آلدریچ، آمریکا؛ پاراکوات تجاری با خلوص ۲۰ درصدی از شرکت جیانگ سوهای بانگ چین و اسید اسکوربیک (ویتامین C) با خلوص ۵۰ درصدی از شرکت رویان دارو، ایران تهیه گردید.

۱۸۰ عدد ماهی کپور معمولی (۴/۴۰±۳۷/۶۵ گرمی) از یک مزرعه‌ی خصوصی واقع در شهرستان بهبهان، استان خوزستان خریداری و به آزمایشگاه تکثیر و پرورش آبزیان دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی خاتم‌الانبیاء (ص) بهبهان، انتقال داده شد. پس از انتقال، ماهی‌ها به‌طور تصادفی در ۱۸ مخزن پلاستیکی ۸۰ لیتری (۱۰ ماهی در هر مخزن) مجهز به هواده با تعویض روزانه ۴۰ درصدی آب توزیع گردید. پیش از شروع آزمایش، ماهی‌ها به مدت ۲ هفته با شرایط آزمایشگاهی (دمای آب ۲±۲۴ سانتی‌گراد، دوره‌ی نوری ۱۴ ساعت روشنایی:۱۰ ساعت تاریکی، اکسیژن ۱±۶ میلی‌گرم در لیتر، pH:۷/۶±۰/۲) سازگار گردیدند. در طی دوره‌ی سازگاری ماهی‌ها با جیره‌ی تجاری کپور به‌صورت دو بار در روز و معادل ۲٪ وزن بدن تغذیه شدند.

آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی و با ۶ تیمار آزمایشی شامل ماهی‌های گروه کنترل (گروه ۱)؛ ماهی‌های گروه ۲ که با جیره غذایی حاوی ۱۰۰۰ میلی‌گرم کیتوزان به ازای هر کیلوگرم غذای فرموله شده تجاری تغذیه شدند؛ ماهی‌های گروه ۳ که در معرض ۰/۰۲ میلی‌گرم بر لیتر پاراکوات قرار گرفتند؛ ماهی‌های گروه ۴ که هم‌زمان با قرار گرفتن در معرض ۰/۰۲ میلی‌گرم بر لیتر پاراکوات، با جیره غذایی حاوی ۱۰۰۰ میلی‌گرم کیتوزان به ازای هر کیلوگرم غذای فرموله شده تجاری تغذیه شدند؛ ماهی‌های گروه ۵ که هم‌زمان با قرار گرفتن در معرض ۰/۰۲ میلی‌گرم بر لیتر پاراکوات، با جیره غذایی حاوی ۱۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین C به ازای هر کیلوگرم غذای فرموله شده تجاری تغذیه گردیدند؛ و ماهی‌های گروه ۶ که هم‌زمان با قرار گرفتن در معرض ۰/۰۲ میلی‌گرم بر لیتر پاراکوات، با جیره غذایی حاوی ۱۰۰۰ میلی‌گرم کیتوزان و ۱۰۰۰ ویتامین C به ازای هر کیلوگرم غذای

Archive of SID

www.SID.ir

فرموله شده تجاری تغذیه شدند؛ انجام گردید. دوره آزمایش ۲۱ روز در نظر گرفته‌شده است. در طی آزمایش و در زمان تعویض آب، معادل حجم آب تعویضی مجدداً محلول پاراکوات به آب افزوده شد.

در پایان روز بیست و یکم، ۹ ماهی از هر گروه صید و بی‌هوش شدند. پس از آسان کشی، آبشش ماهی‌ها جدا گردید و با سرم فیزیولوژی شسته شده و با هموژنایز دستی به مدت ۲ دقیقه در محلول بافر فسفات سرد با pH برابر ۷/۴، هموژن گردید. سپس هموژن حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در سانتیفیوژ با ۱۵۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. محلول رویی جهت اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی جمع‌آوری و تا زمان انجام آنالیزهای بیوشیمیایی (حداکثر به مدت ۲ هفته) در دمای ۲۵- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی خون با استفاده از کیت‌های تهیه‌شده از شرکت پارس آزمون و با دستگاه اسپکتوفتومتر UV/VIS یونیکو (ساخت آمریکا) مدل ۲۱۰۰ صورت گرفت.

اندازه‌گیری سطح فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و لاکتات دهیدروژناز (LDH) عصاره بافتی بر اساس مقدار مصرف NADPH و تبدیل آن به +NAD صورت گرفت. شدت جذب نور در طول‌موج ۳۴۰ نانومتر و در طی ۳ دقیقه اندازه‌گیری و برحسب میزان جذب نوری OD و بر اساس فرمول اختصاصی کاتالوگ محاسبه گردید (Moss and Henderson, 1999).

آنزیم کاتالاز (CAT) بر اساس روش گوث (۱۹۹۱) با اندکی تغییرات سنجیده شد (Góth, 1991). فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس فرایند تجزیه پراکسید هیدروژن و تشکیل کمپلکس با ثبات با مولیبدات آمونیوم اندازه‌گیری گردید. سپس تغییرات رنگی کمپلکس مولیبدات و پراکسید هیدروژن در طول‌موج ۴۰۵ نانومتر خوانش شد. فعالیت آنزیم کاتالاز درنهایت بر اساس فرمول ذیل محاسبه گردید.

$$\text{فعالیت کاتالاز}(\text{kU.L}^{-1}) = \frac{\text{A}\left(\text{نمونه مجهول}\right) - \text{A(بلانک یک)}}{\text{A}\left(\text{بلانک دو}\right) - \text{A(بلانک سه)}} \times 271$$

بلانک ۱، شامل ۱ میلی‌لیتر سوبسترا (پراکسید هیدروژن)، ۱ میلی‌لیتر مولیبدات و ۲ میلی‌لیتر آب مقطر است. بلانک ۲، شامل ۱ میلی‌لیتر سوبسترا (پراکسید هیدروژن)، ۱ میلی‌لیتر مولیبدات و ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات است. بلانک ۲، شامل ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات، ۱ میلی‌لیتر مولیبدات و ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات است.

ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل سلولی به روش توانای احیای آهن فریک به فرو اندازه‌گیری شد (روش FRAP). به‌طور خلاصه، محلول معرف FRAP شامل ۵ میلی‌لیتر محلول ۱۰ میلی مول بر لیتر TPTZ یا ۶،۴،۲- تری‌پیریدیل اس تریازین در محلول ۴۰ میلی‌مول بر لیتر اسیدکلریدریک به‌اضافه ۵ میلی‌لیتر کلراید آهن سه‌ظرفیتی (۲۰ میلی‌مول بر لیتر) و ۵۰ میلی‌لیتر بافر فسفات (۰/۳ میلی‌مول بر لیتر با pH: ۳/۶) است که بایستی به‌صورت تازه تهیه گردد. ۱۰۰ میکرو لیتر از نمونه مجهول با ۳ میلی‌لیتر محلول معرف FRAP مخلوط می‌گردد. محلول Fe^{2+}-TPTZ آبی‌رنگ است و میزان جذب نوری در طی ۵ دقیقه در طول‌موج ۵۹۳ نانومتر به‌وسیله اسپکتوفتومتر قرائت گردید. جهت رسم منحنی استاندارد نیز از محلول سولفات آهن ۷ آبِ در

Archive of SID

www.SID.ir

غلظت‌های ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرو مول بر لیتر استفاده گردید (Benzie and Strain, 1996).

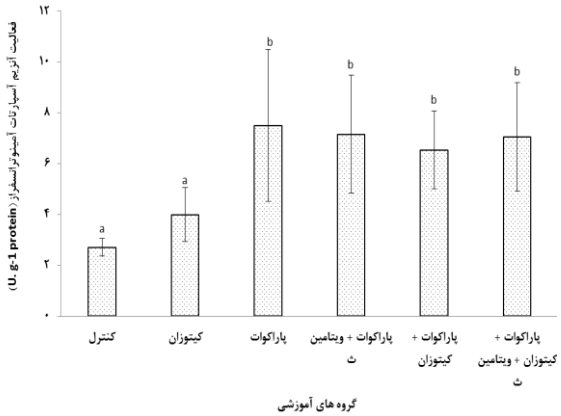
مالون دی‌آلدهید (MDA) با استفاده از اسید تیوباربیتوریک سنجیده و بر اساس میکرو مول بر گرم بافت بیان می‌شود. در این روش جذب نوری محلول صورتی‌رنگ تشکیل‌شده در طول‌موج ۵۳۲ نانومتر قرائت شد. در این آزمایش از تترا اتوکسی پروپانول و اتانول مطلق به‌عنوان استاندارد مالون دی‌آلدهید استفاده گردید (Placer *et al.*, 1966).

اندازه‌گیری پروتئین تام عصاره بافتی بر اساس واکنش بایوره صورت گرفت. شدت جذب نور در طول‌موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری و برحسب میزان جذب نوری OD و سطح پروتئین استاندارد و بر اساس فرمول ارائه‌شده در کاتالوگ کیت محاسبه شد. استاندارد پروتئین تام نیز باید به‌صورت جداگانه تهیه گردد (Johnson *et al.*, 1999).

نرمال بودن داده‌ها بر اساس آزمون Kolmogorov-Smirnov مورد ارزیابی قرار گرفت. تجزیه‌وتحلیل داده‌ها به روش تجزیه واریانس یک‌طرفه (ANOVA) در سطح اطمینان ۹۵٪ (۰/۰۵ >P) و با استفاده از نرم‌افزار SPSS 19 (IBM) انجام شد؛ مقایسه میانگین‌ها نیز با آزمون دانکن صورت گرفت. نتایج به‌صورت میانگین به همراه انحراف معیار نشان داده‌شده است.

نتایج

تغییر در پارامترهای بیوشیمیایی در سلول‌های آبششی ماهی‌ها در شکل ۱-۶ ارائه‌شده است. در طول دوره آزمایش هیچ‌گونه مرگ‌ومیری در بین گروه‌های مختلف آزمایشی مشاهده نگردید.

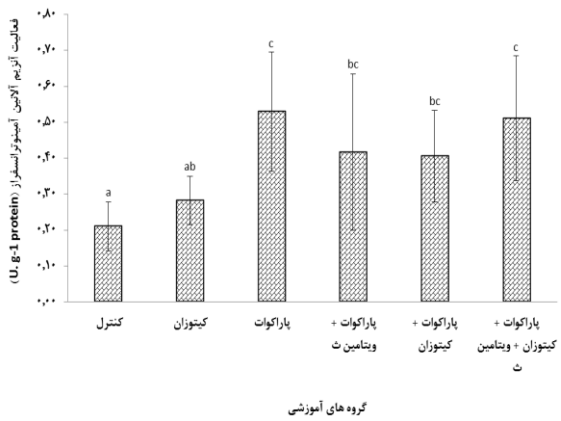


شکل ۱: تغییرات سطح فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز در بافت آبششی ماهی‌ها

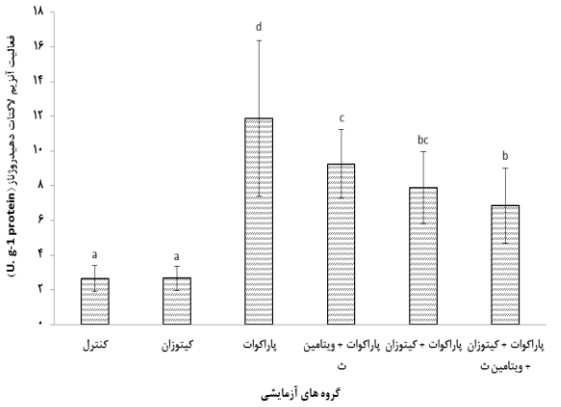
افزایش معنی‌داری در سطح فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز در سلول‌های آبششی ماهی‌های در معرض پاراکوات در مقایسه با ماهی‌های گروه کنترل مشاهده شد (۰/۰۵ >P). نتایج نشان داد که تجویز ویتامین C و کیتوزان به ماهی‌های در معرض پاراکوات نیز تأثیر در بازگشت سطح فعالیت این آنزیم به سطح نرمال نداشت (شکل ۱).

قرار گرفتن ماهی‌ها در تماس با پاراکوات سبب افزایش معنی‌دار سطح فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز در سلول‌های آبششی ماهی‌ها گردید. علاوه براین تجویز ویتامین C و کیتوزان به ماهی‌های در معرض پاراکوات نیز تأثیر در تنظیم سطح فعالیت این آنزیم در مقایسه با گروه کنترل نداشت. هرچند اختلاف معنی‌داری بین سطح فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز در گروه‌های تحت تیمار پاراکوات و کیتوزان و همچنین پاراکوات و ویتامین C با ماهی‌های تحت تیمار کیتوزان مشاهده نشد (شکل ۲).

Archive of SID
www.SID.ir

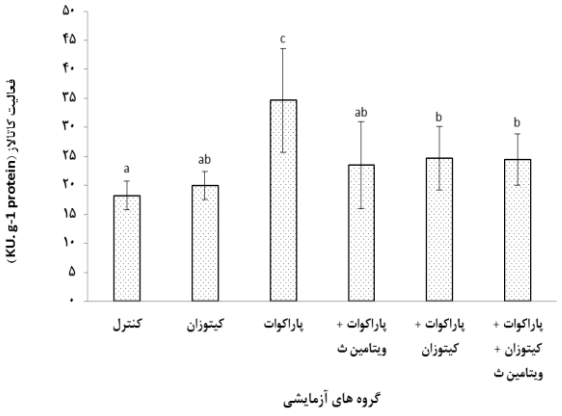


شکل ۲: تغییرات سطح فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز در بافت آبششی ماهی‌ها



شکل ۳: تغییرات سطح فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در بافت آبششی ماهی‌ها

سطح فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در سلول‌های آبششی ماهی‌های در معرض پاراکوات در مقایسه با ماهی‌های گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P< ۰/۰۵$). علی‌رغم کاهش معنی‌دار سطح فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در سلول‌های آبششی ماهی‌های در گروه‌های تحت تیمار ویتامین C، کیتوزان و پاراکوات در مقایسه با ماهی‌های در معرض پاراکوات، هنوز اختلاف معنی‌داری بین سطح فعالیت این آنزیم در این ماهی‌ها با گروه کنترل وجود داشت (شکل ۳).



شکل ۴: تغییرات سطح فعالیت آنزیم کاتالاز در بافت آبششی ماهی‌ها

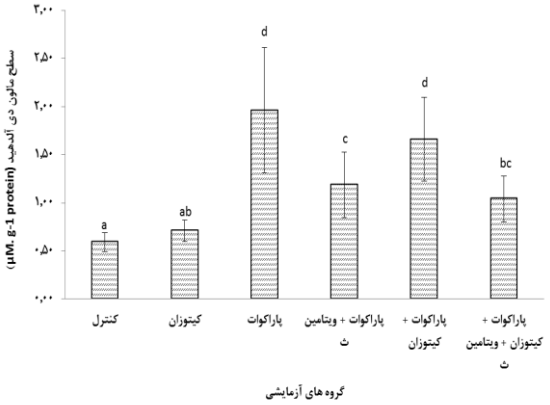
سطح فعالیت آنزیم کاتالاز در سلول‌های آبششی ماهی‌های در معرض پاراکوات به‌طور معنی‌داری بیشتر از ماهی‌های گروه کنترل بود ($P< ۰/۰۵$). اگرچه تجویز ویتامین C، کیتوزان به ماهی‌های در معرض پاراکوات سبب کاهش معنی‌دار سطح فعالیت آنزیم کاتالاز در سلول‌های آبششی گردید، اما سطح فعالیت این آنزیم در این ماهی‌ها همچنین به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود (شکل ۴).

نتایج نشان داد که سطح مالون دی‌آلدهید در بافت آبششی ماهی‌ها پس از تماس با پاراکوات به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P< ۰/۰۵$). تجویز ویتامین C و ویتامین C همراه با کیتوزان در آبشش ماهی‌های در معرض پاراکوات سبب کاهش معنی‌دار سطح مالون دی‌آلدهید در مقایسه با گروه تحت تیمار پاراکوات به‌تنهایی گردید. بااین‌وجود هنوز سطح مالون دی‌آلدهید در بافت آبششی این ماهی‌ها به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود (شکل ۵).

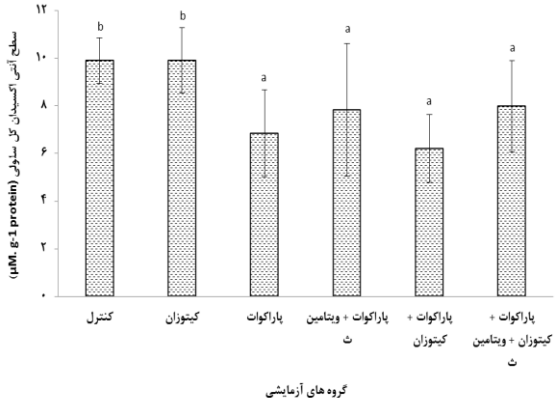
سطح آنتی‌اکسیدان کل سلولی در بافت آبشش در معرض پاراکوات به‌طور معنی‌داری کمتر از ماهی‌های

Archive of SID
www.SID.ir

گروه کنترل است ($P< ۰/۰۵$). تجویز ویتامین C و کیتوزان نیز تأثیر معنی‌داری در سطح آنتی‌اکسیدان کل سلولی نداشت (شکل ۶).



شکل ۵: تغییرات سطح مالون دی‌آلدهید در بافت آبششی ماهی‌ها



شکل ۶: تغییرات سطح آنتی‌اکسیدان کل سلولی در بافت آبششی ماهی‌ها

بحث

نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه نشان داد که پاراکوات سبب ایجاد استرس اکسیداتیو و تغییر در سطح شاخص‌های بیوشیمیایی در سلول‌های آبششی شده است. آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز نقش مهمی در مراحل نهایی تجزیه پروتئین جهت تولید ATP ایفا می‌کند (Banaee *et al.*, 2011)، لذا افزایش سطح فعالیت این آنزیم‌ها در سلول‌های آبششی، ممکن است در استفاده از اسیدهای آمینه در فرایند اکسیداسیون یا گلوکوژنز در سلول‌ها جهت تأمین انرژی لازم برای مقابله با تأثیر سمی پاراکوات مؤثر باشد. بااین‌حال، مطالعات صورت گرفته نشان می‌دهد که پاراکوات یا رادیکال‌های آزاد آن ممکن است با اسیدهای آمینه‌ای نظیر فنیل‌آلانین، متیونین، سیستئین، هیستیدین و تریپتوفان در سلول‌های مختلف واکنش داده و سبب تغییر ماهیت آن‌ها شوند (Banaee *et al.*, 2013) که این امر می‌تواند بر ساختار پروتئین‌ها و عملکرد آن‌ها تأثیر می‌گذارد (Dere and Dağ, 2003) و موجب شکسته شدن و آلکیلاسیون پروتئین‌ها می‌گردد (Jaiswal *et al.*, 2002). از سویی دیگر، اسیدهای آمینه نیز نقش مهمی در سم‌زدایی و دفع سموم از طریق ترکیب شدن (کونژوگه شدن) با متابولیک‌های سمی ایفا می‌کنند (Dere and Dağ, 2003)، لذا افزایش سطح فعالیت آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز ممکن است پاسخ مناسبی جهت افزایش سطح اسیدهای آمینه آزاد جهت تسریع فرایند سم‌زدایی باشد. ازآنجایی‌که سمیت پاراکوات تحت تأثیر اکسیژن افزایش می‌یابد، عدم تأثیرگذاری تجویز ویتامین C و کیتوزان به ماهی‌های در معرض پاراکوات در تنظیم سطح فعالیت این آنزیم‌ها را، ممکن است بتوانیم به بالا بودن نرخ اکسیداسیون بالای پاراکوات در سلول‌های آبششی نسبت دهیم.

تحقیقات نشان می‌دهد که پاراکوات می‌تواند با دپلاریزاسیون نمودن غشای میتوکندری بر تراوایی و نفوذپذیری غشای میتوکندری‌ها تأثیر گذارد و با ایجاد حالت تورم میتوکندریایی و نیز ایجاد اختلال در عملکرد این اندامک سبب مرگ سلولی شود (محمدی بردبری و قاضی خوانساری، ۱۳۸۵). یکی دیگر از

Archive of SID
www.SID.ir

مهم‌ترین مکانیسم‌های ایجاد سمیت سلولی توسط پاراکوات، تأثیر این علف‌کش بر سیستم انتقال الکترون در میتوکندری، کاهش ظرفیت NADPH سلولی و افزایش نرخ پراکسیداسیون لیپیدهای غشای سلولی و اندامک‌های درون‌سلولی است (Ranjbar, 2014). ازاین‌رو، افزایش سطح فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در سلول‌های آبششی ماهی‌های در معرض پاراکوات ممکن است نشان‌دهنده بروز اختلال در فرایند فسفوریلاسیون اکسیداتیو در میتوکندری‌ها و ایجاد هیپوکسی سلولی باشد؛ درواقع اکسیداسیون پاراکوات در بافت آبشش ممکن است زمینه‌ساز بروز هیپوکسی در سلول‌ها باشد. در چنین شرایطی سطح تولید ATP کاهش خواهد یافت. لذا برای ادامه فرایند گلیکولیز و اکسیداسیون مجدد NADH در شرایط بی‌هوازی، پیرووات به لاکتات تجزیه می‌شود و لاکتات به‌وسیله آنزیم لاکتات دهیدروژناز تجزیه می‌گردد. ازاین‌رو با افزایش سطح لاکتات، سطح فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز نیز افزایش می‌یابد (Murray *et al.*, 2003). ازآنجایی‌که در حضور اکسیژن سمیت پاراکوات چند برابر می‌شود، تجویز ویتامین C و کیتوزان تأثیر محدودی در کاهش سمیت پاراکوات در سلول‌های آبششی داشتند و به‌رغم کاهش سطح فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در سلول‌های آبششی ماهی‌های در معرض پاراکوات، هنوز اختلاف معنی‌داری بین سطح فعالیت این آنزیم در این ماهی‌ها با گروه کنترل مشاهده گردید.

اگرچه متابولیسم و سم‌زدایی پاراکوات در سلول‌های جانوری بسیار ناچیز است و بخش قابل‌توجهی از آن بدون تغییر از طریق ادرار دفع می‌گردد، اما این علف‌کش ممکن است از طریق متیلاسیون (منومتیل دی‌پیریدون) و یا اکسیداسیون (پاراکوات پیریدین و پاراکوات پیریدیون) تجزیه و دفع گردد (Ahmad *et al.*, 2010; Ranjbar, 2014). به‌هرحال، متابولیسم پاراکوات در سلول‌ها به تولید رادیکال‌های آزاد همراه است؛ بنابراین سیستم سم‌زدایی سلولی با تکیه‌بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل سلولی که شامل آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی است تلاش می‌کند تا با حذف رادیکال‌های آزاد یا خنثی نمودن آن‌ها، از بروز استرس اکسیداتیو پیشگیری کند.

در طی فرایند متابولیسم، پاراکوات در حضور اکسیژن به‌سرعت اکسیدشده و سطح آنیون‌های سوپر اکسید افزایش می‌یابد. این رادیکال‌ها ممکن است به‌طور خود به خودی یا تحت تأثیر سوپر اکسید دیسموتاز به پراکسید هیدروژن تبدیل شوند (Ranjbar, 2014). لذا افزایش سطح فعالیت آنزیم کاتالاز در سلول‌های آبششی ماهی‌های در معرض پاراکوات ممکن است پاسخی فیزیولوژیک به افزایش سطح تولید پراکسید هیدروژن (محمدی بردبری و قاضی خوانساری، ۱۳۸۵) درنتیجه سم‌زدایی این سم در سلول‌های آبششی باشد. اگرچه تجویز ویتامین C، کیتوزان به ماهی‌های در معرض پاراکوات سبب کاهش معنی‌دار سطح فعالیت آنزیم کاتالاز در سلول‌های آبششی شد، اما سطح فعالیت این آنزیم در این ماهی‌ها همچنین به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل است. این نتایج نشان می‌دهد که نرخ تولید رادیکال‌های آزاد پراکسید هیدروژن و هیدروکسی رادیکال‌ها در سلول‌های آبششی ماهی‌های در معرض پاراکوات بیشتر از افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ایجادشده در ماهی‌های تحت تیمار ویتامین C و کیتوزان است.

Archive of SID

www.SID.ir

کاهش سطح آنتی‌اکسیدان کل سلولی در بافت آبشش در معرض پاراکوات و همچنین عدم تأثیر تجویز ویتامین C و کیتوزان بر سطح آنتی‌اکسیدان کل سلولی آبشش ماهی‌ها نیز مؤید همین امر است. محبی مقدم و همکاران (۱۳۹۵) دریافتند که تجویز خوراکی بتاکاروتن به ماهی‌های کپور معمولی نمی‌تواند تغییر معنی‌دار در سطح آنتی‌اکسیدان کل سلولی آبشش ایجاد نماید.

مالون دی‌آلدهید محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدی اسیدهای چرب غیراشباع و اسیدهای چرب کوتاه زنجیره موجود در غشای سلولی است (محمدی بردبری و قاضی خوانساری، ۱۳۸۵). لذا افزایش معنی‌داری سطح مالون دی‌آلدهید در بافت آبششی ماهی‌ها پس از تماس با پاراکوات بیانگر بروز استرس اکسیداتیو در این سلول‌ها است. هرچند تجویز ویتامین C و ویتامین C همراه با کیتوزان در آبشش ماهی‌های در معرض پاراکوات سبب کاهش معنی‌دار سطح مالون دی‌آلدهید در مقایسه با گروه تحت تیمار پاراکوات به‌تنهایی گردید. بااین‌وجود بالا بودن سطح مالون دی‌آلدهید در بافت آبششی این ماهی‌ها در مقایسه با گروه کنترل، همچنان نشان‌دهنده برتری میزان تولید رادیکال‌های آزاد بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلولی است. پراکسیداسیون لیپیدی غشای سلولی همچنین موجب افزایش نرخ شکنندگی اسموتیک غشای سلولی، کاهش سیالیت غشا و کاهش بقای اندامک‌ها به‌ویژه میتوکندری و نیز افزایش نرخ نفوذپذیری پراکسید هیدروژن به درون سلول می‌گردد. لذا، پراکسیداسیون لیپیدی غشای سلول‌های آبششی می‌تواند با افزایش نفوذپذیری پراکسید هیدروژن به درون سلول شدت و حدت سمیت پاراکوات را تشدید کند (محمدی بردبری و قاضی خوانساری، ۱۳۸۵).

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه، می‌توان چنین اذعان کرد که با توجه به مکانیسم ایجاد سمیت سلولی‌دربافت تنفسی(آبشش)، تجویز آنتی‌اکسیدان‌های نظیر ویتامین C و کیتوزان علی‌رغم داشتن تأثیر جزئی در افزایش کارایی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و سم‌زدایی سلول‌های آبششی، نتوانسته است از شدت مسمومیت ایجادشده در آبشش ماهی‌های در معرض پاراکوات بکاهد. تماس مستقیم آبشش ماهی‌ها با پاراکوات، جذب آن توسط سلول‌های آبششی و احتمالاً اکسیداسیون سریع آن در محیط غنی از اکسیژنی (در بافت آبششی) ممکن است مهم‌ترین دلیل عدم تأثیرگذاری آنتی‌اکسیدان‌های فوق ذکر در کاهش استرس اکسیداتیو در سلول‌های آبششی باشد.

سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه صنعتی خاتم‌الانبیاء (ص) بهبهان انجام‌شده است. بدین‌وسیله نویسندگان این مقاله از مسئولین محترم تحصیلات تکمیلی دانشگاه و معاونت محترم آموزشی و پژوهشی دانشکده منابع طبیعی تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

۱. آمارنامه کشاورزی، ۱۳۹۰. معاونت برنامه‌ریزی و اقتصاد، مرکز فناوری اطلاعات و ارتباطات وزارت جهاد کشاورزی، تهران. ۲، ۱-۴۴۳.

۲. محبی مقدم، م.، باغشنی، ح.، شاهسونی، د.، ۱۳۹۵. تأثیر مکمل غذایی بتاکارتن بر برخی بیومارکرهای وضعیت اکسیداتیو در بافت‌های ماهی کپور

Archive of SID
www.SID.ir

معمولی (*Cyprinus carpio*). نشریه توسعه آبزی‌پروری، ۱۰(۴)، ۱۰۳-۱۱۱.

۳. محمدی بردبری، ا.، قاضی خوانساری، م.، ۱۳۸۵. بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی کاپتوپریل بر روی سمیت ناشی از پاراکوات در میتوکندری جداشده کبد موش صحرایی. مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان، ۱۳(۳)، ۱۳۲-۱۴۰.

4. Ahmad, I., Shukla, S., Kumar, A., Singh, B.K., Patel, D.K., Pandey, H.P., Singh, C., 2010. Maneb and paraquat induced modulation of toxicant responsive genes in the rat liver: Comparison with polymorphonuclear leukocytes. Chemico-Biological Interactions, 188(3), 566-579.
5. Alishahi, A., Mirvaghefi, A., Tehrani, M.R., Farahmand, H., Koshio, S., Dorkoosh, F.A., Elsabee, M.Z., 2011a. Chitosan nanoparticle to carry vitamin C through the gastrointestinal tract and induce the non-specific immunity system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Carbohydrate Polymers, 86(1), 142-146.
6. Alishahi, A., Mirvaghefi, A., Tehrani, M.R., Farahmand, H., Shojaosadati, S.A., Dorkoosh, F.A., Elsabee, M.Z., 2011b. Shelf life and delivery enhancement of vitamin C using chitosan nanoparticles. Food Chemistry, 126(3), 935-940.
7. Awadalla, E.A., 2012. Efficacy of vitamin C against liver and kidney damage induced by paraquat toxicity. Experimental and Toxicologic Pathology, 64, 431-434.
8. 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.
9. Banaee, M. Davoodi, M.H. Zoheiri, F. 2013. Histopathological changes induced by paraquat on some tissues of gourami fish (*Trichogaster trichopterus*). Open Veterinary Journal, 3(1), 36-42.
10. Banaee, M., Sureda, A., Shahaf, S., Fazilat, N., 2015. Protective Effects of Silymarin Extract on Malthion-Induced Zebra Cichlid (*Cichlasoma nigrofasciatum*) Hepatotoxicity. Iranian Journal of Toxicology, 9(28), 1239-1246.
11. Benzie, I.F., Strain, J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Analytical biochemistry, 239(1), 70-76.
12. Dere, E., Dağ, Ş., 2003. In-Vitro Interaction of Paraquat with Some Amino Acids. Fen Bilimleri Dergisi, 24(2), 7-17.
13. Evans, P., Halliwell, B., 2001. Micronutrients oxidant, antioxidant status. British Journal of Nutrition, 85, 67–74.
14. Góth, L., 1991. A simple method for determination of serum catalase and revision of reference range. In: Clinica Chimica Acta, 196, 143-152.
15. Grenha, A., Seijo, B., Remuñan-Lopez, C., 2005. Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 25, 427-437.
16. Hsu, S.T., Chen, L.C., Leu, M.H., Hsiao, W.F., Lee, W.Y., Pan, T.C., 2013. Experimental improvement of preparation of acrylic acid-modified middle deacetylated chitosan and its application in absorbing paraquat. Polymer Engineering & Science, 53(3), 468-473.
17. Jaiswal, R., Khan, M.A., Musarrat, J., 2002. Photosensitized paraquat-induced structural alterations and free radical mediated fragmentation of serum albumin. Journal of Photochemistry and Photobiology, Part B. 67(3), 163-170.
18. Je, J.Y., Kim, S.K., 2006. Reactive oxygen species scavenging activity of amino derivatized chitosan with different degree of deacetylation. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 14, 5989–5994.
19. Johnson, A.M., Rohlfs, E.M., Silverman, L.M., 1999. Proteins. In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd Ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 477-540 p.
20. Kavaz, D., Odabas, S., Demirbilek, M., Güven, E.Ö., Denkbas, E.B., 2010. Bleomycin Loaded Magnetic Chitosan Nanoparticles as Multifunctional

Archive of SID

www.SID.ir

Nanocarriers. Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 25, 305-318.
21. Kim, J.N., Chang, I.Y., Kim, H.I., Yoon, S.P., 2009. Long-term effects of chitosan oligosaccharide in streptozotocin-induced diabetic rats. Islets, 1, 111–116.
22. Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W., 2003. Harper's Illustrated Biochemistry, Twenty-Sixth Edition. Lange Medical Books/McGraw-Hill (Medical Publishing Division). New York, 402 pages.
23. Ozturk, I.C., Ozturk, F., Gul, M., Ates, B., Cetin, A., 2009. Protective effects of ascorbic acid on hepatotoxicity and oxidative stress caused by carbon tetrachloride in the liver of Wistar rats. Cell Biochemistry and Function, 27, 309-315.
24. Padayatty, S.J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.H., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S.K., Levine, M., 2003. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. Journal of the American College of Nutrition, 22(1), 18-35.
25. Placer, Z.A., Cushman, L.L., Johnson, B.C., 1996. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. Analytical biochemistry, 16(2), 359-364.
26. Ranjbar, A., 2014. Evidence of oxidative damage in paraquat toxicity. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences, 16(12), 1-7.
27. Sun, T., Zhu, Y., Xie, J., Yin, X., 2011. Antioxidant activity of *N*-acyl chitosan oligosaccharide with same substituting degree. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 21 (2), 798-800.
28. Tomita, M., Okuyama, T., Ishikawa, T., Hidaka, K., Nohno, T., 2001. The role of nitric oxide in paraquat-induced cytotoxicity in the human A549 lung carcinoma cell line. Free Radical Research, 34, 193-202.
29. Tomita, M., Okuyama, T., Katsuyama, H., Miura, Y., Nishimura, Y., Hidaka, K., Otsuki, T., Ishikawa, T., 2007. Mouse model of paraquat-poisoned lungs and its gene expression profile. Toxicology, 231, 200-209.
30. Wei, W., Lv, P.P., Chen, X.M., Yue, Z.G., Fu, Q., Liu, S.Y., Yue, H., and Ma, G.H., 2013. Codelivery of mTERT siRNA and paclitaxel by chitosan-based nanoparticles promoted synergistic tumor suppression. Biomaterials, 34, 3912–3923.
31. Yan, Y., Wanshun, L., Baoqin, H., Bing, L., Chenwei, F., 2006. Protective effects of chitosan oligosaccharide and its derivatives against carbon tetrachloride induced liver damage in mice. Hepatology Research, 35, 178–184.
32. Yoon, H.J., Moon, M.E., Park, H.S., Kim, H.W., Im, S.Y., Lee, J.H., Kim, Y.H., 2008. Effects of chitosan oligosaccharide (COS) on the glycerol-induced acute renal failure in vitro and in vivo. Food Chemistry and Toxicology, 46, 710–716.
33. Yoon, S.P., Han, M.S., Kim, J.W., Chang, I.Y., Kim, H.L., Chung, J.H., Shin, B.C., 2011. Protective effects of chitosan oligosaccharide on paraquat-induced nephrotoxicity in rats. Food and Chemical Toxicology, 49 (8), 1828-1833.
34. Yuan, W.P. Liu, B. Liu, C.H. Wang, X.J. Zhang, M.S. Meng, X.M. Xia, X.K. 2009. Antioxidant activity of chito-oligosaccharides on pancreatic islet cells in streptozotocin-induced diabetes in rats. World Journal of Gastroenterology, 15, 1339–1345.

Archive of SID

www.SID.ir