Archive of SID

پاتوبیولوژی مقایسه‌ای، علمی ـ پژوهشی، سال شانزدهم، زمستان، شماره ۴، ۱۳۹۸، ۲۹۷۲-۲۹۶۳

تأثیر استرس اکسیداتیو ناشی از انگل داکتیلوژیروس Dactylogyrus (Monogenea: Dactylogyridae)بر آسیب به DNA، لیپیدها و پروتئین‌ها در بافت آبشش کپور معمولی (Cyprinus carpio)

الهام اکبری[۱]، سعید مشکینی[۲*]، بیژن اسمعیل نژاد[۳]

چکیده

انگل‌ها می‌توانند با ایجاد استرس‌های اکسیداتیو در بافت‌های ماهیان باعث ایجاد طیف گسترده‌ای از آسیب‌ها به ترکیبات بیوشیمیایی حیاتی بدن شوند. هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات استرس اکسیداتیو ناشی از انگل داکتیلوژیروس بر آسیب به DNA، لیپیدها و پروتئین‌ها در بافت آبشش ماهی کپور معمولی (Cyprinus carpio) بود. تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی کپور معمولی از مزارع پرورش ماهی استان آذربایجان غربی تهیه شده و پس از بررسی میکروسکوپی نمونه‌های بافت آبشش آنها، تعداد ۲۲ قطعه (۱۸/۳۳ درصد) ماهیان آلوده به انگل داکتیلوژیروس تشخیص داده شدند و بقیه ماهیان که فاقد آلودگی بودند به عنوان گروه شاهد مورد استفاده قرار گرفتند. برای بررسی استرس اکسیداتیو ناشی از انگل داکتیلوژیروس در بافت آبشش ماهیان، میزان آسیب وارد شده به DNA از طریق آزمون کامت قلیایی، مقدار آسیب وارده به لیپیدها از طریق اندازه گیری میزان مالون دی‌آلدئید و میزان آسیب وارده به پروتئین‌ها از طریق مقدار کربونیله شدن پروتئین (گروه تیول)، در بافت آبشش ماهان آلوده و غیر آلوده (به عنوان گروه شاهد) مورد اندازه‌گیری و مقایسه قرار گرفت. پس از تجزیه و تحلیل داده‌ها، نتایج نشان داد که انگل مونوژن داکتیلوژیروس به طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) باعث استرس اکسیداتیو در بافت آبشش آلوده از طریق افزایش سطح آسیبِ DNA، افزایش مقادیر مالون دی‌آلدئید و پروتئین‌های کربونیله شده می‌گردد.

واژگان کلیدی: *کپور ماهیان، استرس اکسیداتیو، بهداشت ماهیان، انگل‌های ماهیان.*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۸۱۲/۱٤ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۲۰

مقدمه

با افزایش تراکم در سیستم‌های پرورشی ماهیان و افزایش احتمال آلودگی انگلی آنها، برای پیشگیری از بروز بیماری‌ها و کاهش ضایعات در محیط‌های پرورشی، انجام مطالعات انگل‌شناسی و بررسی نحوه آسیب رسانی آنها به بافت‌های بدن بسیار ضروری به نظر می رسد. انگل‌ها با توجه به حساسیت و اهمیت اندام مورد هدف خود در ماهیان، ممکن است باعث ایجاد طیف وسیعی از عوارض و مشکلات شوند. از جمله خسارات ناشی از آلودگی‌های انگلی، ایجاد استرس‌های اکسیداتیو (Oxidative stress) در بافت‌های بدن است که خود مقدمه ای برای بروز عوارض و مشکلات بعدی در بدن خواهد بود (۱).

ماهیان دارای مکانسیم‌های آنزیمی و غیر آنزیمی برای مقابله و خنثی سازی مولکول‌های فعال اکسیدان می باشند. این آنزیم‌ها به طور دقیق و هماهنگ با یکدیگر عمل می کنند تا هر نوع شکل فعال اکسیژن را حذف کرده و با استرس اکسیداتیو مقابله نمایند. کوچکترین انحراف و تغییر در غلظت‌های فیزیولوژیک این آنزیم‌ها می تواند به آسیب پذیری بافت‌ها و ارگان‌ها منجر شود (۲). به عبارت دیگر، می توان استرس اکسیداتیو را ناشی از عدم توازن میان تولید مولکول‌های مضر اکسیدان و توانایی بدن در مقابله با آنها دانست. به دنبال آلودگی به برخی انگل‌ها و تولید بیش از اندازه مولکول‌های اکسیدان در بافت‌های حیاتی، واکنش‌های زنجیره ای در بدن رخ می دهد که به تخریب و نابودی مولکول‌های زیستی شامل لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک منتهی می شود.

از مهم ترین انگل‌های شایع در ماهیان آب شیرین که نقش مهمی در ایجاد آسیب‌های بافتی دارند، انگل‌های تک میزبانه (Monogenea) به ویژه خانواده داکتیلوژیریده

۱-دانش آموخته دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران،

*۲- دانشیار گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (s.meshkiniy@urmia.ac.ir)

۳-دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران،

www.SID.ir

Archive of SID

(Dactylogyridae) و جنس داکتیلوژیروس (Dactylogyrus) می‌باشد (۳). این انگل‌ها که از گروه کرم‌های پهن برگی شکل (Trematodes) هستند، عمدتا انگل خارجی، هرمافرودیت، دارای اندام چسبیدن قدامی و خلفی بوده و سیر تکاملی مستقیم دارند (۳). داکتیلوژیروس‌ها که از انگل‌های اختصاصی آبشش و پوست ماهیان هستند، با آسیب به آبشش‌های ماهیان، فعالیت آن را مختل کرده و در نتیجه عمل جذب اکسیژن به خوبی انجام نمی‌گیرد که منجر به مرگ ماهی می شود. این انگل در انتخاب میزبان خود به طور اختصاصی عمل کرده و گونه‌های مختلف آن در گونه‌های خاصی از ماهیان ایجاد آلودگی می‌کنند. از گونه‌های مهم جنس داکتیلوژیروس که باعث آلودگی آبشش‌های ماهی کپور معمولی *(Cyprinus carpio)* می شوند، می توان به *D. extensus*، *D. anchoratus*، *D. sahulensis* و *D. vastator* اشاره کرد (٤).

در اکوسیستم‌های مصنوعی مانند استخرهای پرورشی که ماهیان با تراکم به مراتب بیشتر از محیط طبیعی در کنار هم قرار دارند، به دلیل فراوانی میزبان، تراکم انگل‌ها بسیار بیشتر از شرایط طبیعی است و احتمال آلودگی ماهیان به انگل‌ها به مراتب بیشتر بوده و این موضوع رعایت اصول بهداشتی و درمانی را بسیار با اهمیت تر می کند. انگل‌هایی که برای کامل کردن چرخه زیستی خود به میزبان واسطه نیاز ندارند (بسیاری از تک‌یاختگان پوست و آبشش‌ها، سخت پوستان و کرم‌های پهن تک میزبانه) در استخرهای پرورشی که تنوع گونه ای چندانی در ماهیان وجود ندارد، بیشتر دیده می شوند (۵).

با توجه به تراکم بالای ماهیان در سیستم‌های پرورش ماهی و نقش انگل داکتیلوژیروس در آلودگی آبشش‌ها و ایجاد استرس اکسیداتیو در این اندام مهم و حیاتی، در این مطالعه سعی بر آن شد تا با بررسی ماهیان کپور معمولی پرورشی و تعیین میزان آلودگی آنها به انگل داکتیلوژیروس، میزان خسارت این انگل به چربی‌ها، پروتئین‌ها و DNA بافت آبشش ماهیان مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌کار

تهیه ماهیان و تعیین آلودگی انگلی

در فصل‌های پاییز و زمستان ۱۳۹٦ و بهار ۱۳۹۷ تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی کپور معمولی (در هر فصل ٤٠ ماهی) به طور تصادفی از استخرهای خاکی پرورش ماهی کپور موجود در چهار مزرعه در شهرستان جلفا و مراکز عرضه ماهی کپور زنده سد ارس شهرستان پلدشت در استان آذربایجان غربی جمع آوری شد. این ماهیان در کیسه‌های نایلونی دوجداره مخصوص حمل ماهی، حاوی یک سوم آب و دو سوم اکسیژن به آزمایشگاه انگل شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه منتقل شدند. از آنجایی که مواد بیهوش کننده باعث بیهوشی و جدا شدن انگل‌ها از آبشش‌های ماهیان می‌شود و تشخیص ماهیان آلوده را با مشکل مواجه می‌کند، ماهیان را با ضربه به جمجمه آنها کشته و بلافاصله سرپوش‌های آبششی آنها با قیچی بریده شده و آبشش‌های هر طرف بطور کامل برداشته شده و در ظروف پتری دیش قرار داده شدند. رشته‌های آبششی هر آبشش، یک به یک جدا شد و در داخل پتری دیش شستشو داده شده و از محتوای شستشو داده شده مقداری در پلیت ریخته شده و در زیر لوپ (Nikon SMZ800N, Japan) رای مشاهده انگل‌ها بررسی گردید. بعد از آن مقداری از موکوس نمونه‌های آبشش بر روی لام قرار گرفت و با چکاندن یک قطره سرم فیزیولوژی و گذاشتن لامل بر روی نمونه، لام مرطوب از آن تهیه شد و با بزرگنمایی‌های ۱۰×، ٤٠×، ٦٠× و در صورت نیاز بزرگنمایی ۱۰۰× میکروسکوپ نوری (Olympus, CH40, Japan) مورد بررسی قرار گرفتند و آلودگی یا عدم آلودگی آبشش‌ها به انگل‌های مونوژن بویژه داکتیلوژیروس مشخص گردید. ماهیانی یدون آلودگی به عنوان گروه شاهد مورد استفاده قرار گرفتند. انگل‌های یافت شده در آبشش

www.SID.ir

Archive of SID

توسط پیپت پاستور، سوزن‌های تشریح و یا پنس ظریفی جدا و برای شناسایی نهایی در الکل ۷۰ درصد تثبیت و نگهداری شدند. شناسایی انگل‌ها بر اساس کلید شناسایی انگل‌های منوژن (٦) انجام گردید.

اندازه گیری شاخص‌های آسیب آبششی ماهیان

برای بررسی آثار مخرب انگل داکتیلوژیروس بر بافت آبشش، آزمایش کامت قلیایی بمنظور تعیین میزان آسیب وارده به DNA سلول‌های بافت آبشش، آزمایش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای آبشش با اندازه گیری ترکیب رنگی مالون دی آلدئید و میزان کربونیل شدن پروتئین‌های بافت آبشش ماهیان بمنظور تعیین آسیب وارده به ترکیبات پروتئینی انجام شد.

سنجش آسیب DND آبشش

پس از شستشوی نمونه‌های آبشش ماهیان با بافر فسفات نمکی (PBS) (هشت گرم کلرید سدیم، ۰/۲ گرم کلرید پتاسیم، ۱/٤٤ گرم فسفات سدیم و ۰/۲٤ گرم فسفات پتاسیم)، به میکروتیوب حاوی بافر PBS (pH =۷/٤) و ٪۱۰ DMSO انتقال داده شدند و تا زمان آزمایش در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. برای سنجش آسیب DNA از روش سنجش کامت قلیایی استفاده شد (۷). برای این منظور آگارز نقطه ذوب نرمال، نقطه ذوب پایین و رنگ اتیدیوم بروماید محصول شرکت سیگما تهیه شد. دستگاه الکتروفورز (Capillarys 2 Automated Electrophoresis - SEBIA) به همراه منبع تأمین برق ساخت ایران، لام‌های‌هاشوردار ۷۱۰۵ چینی و میکروتیوب اپندروف، سرسمپلرهای شرکت QC-Lab تهیه گردید. ابتدا نمونه‌های بافت آبشش با استفاده از یخ (چهار درجه سانتی‌گراد) جهت جلوگیری از آسیب‌های احتمالی، به‌تدریج ذوب شدند. جهت دستیابی به سوسپانسیون سلولی و سلول‌های منفرد با استفاده از بافر لیز کننده (Lysis Buffer) و محلول ایزوتونیک، اقدام به هموژن کردن بافت آبشش به روش قیچی زدن گردید. سپس جهت دستیابی به سلول‌های منفرد، سانتریفیوژ (Zenithlab-04C, Azin Lab) اول با دور ۱۱۷۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد انجام و محلول رویی برداشت گردید. سپس با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده به رسوب موجود، مرحله دوم سانتریفیوژ با دور ۱۱۳۰ به مدت ۷ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد انجام شد. جهت بارگذاری سلول‌ها روی لام‌ها، محلول رویی حذف و ۱۰ میکرولیتر بافر لیز کننده و ۱۰۰ میکرولیتر آگارز نقطه ذوب پایین به آن اضافه شد و با یک مرتبه پیپت کردن به سرعت روی لام‌های آغشته به آگارز که از قبل با غلظت ٪۱/۲ آگارز نقطه ذوب نرمال روپوش دار شده بودند، بارگذاری گردید. به منظور بسته شدن ژل، به مدت ٦۰ دقیقه (دمای چهار درجه سانتی‌گراد) در یخچال قرار گرفتند. پس از این مدت با استفاده از بافر لیز کننده (١٤/٦ گرم سدیم کلرید، ۳/۲۷ گرم اتیلن دی آمین ترا استیک اسید ،۰/۱۲ گرم تریس، ۰/۸ گرم هیدروکسید سدیم، ۱۰٪ دی متیل سولفوکسید و یک میلی‌لیتر تریتون X-100) به مدت ٦۰ دقیقه اقدام به حذف دیواره سلولی و سایر محتویات سیتوپلاسم سلول‌ها گردید. به منظور باز شدن پیچش DNA، لام‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در بافر سرد قلیایی (pH>۱۳)، بافر الکتروفورز حاوی ۱۲ گرم هیدروکسید سدیم، ۰/۳۷گرم EDTA قرار گرفتند و در نهایت الکتروفورز با جریان ۲۱-۲۰ ولت به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. جهت رنگ‌آمیزی از روش رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید استفاده شد. پس از خنثی‌سازی لام‌ها با بافر خنثی (٤/۸۵٪ تریس) روی هر ژل ۱۰ میکرولیتر از محلول 1X اتیدیوم بروماید (به ازای هر ۱۰۰ میلی لیتر ژل آگارز مقدار یک میکرولیتر اتیدیوم استفاده شد) ریخته شد. پنج تا ۱۰ دقیقه پس از اضافه کردن رنگ، لام‌ها آماده عکس‌برداری شدند. جهت کمی سازی و تبدیل پیکسل‌های تصاویر به اعداد از نرم افزار Comet Score نسخه ۱/۵ استفاده شد. برای بررسی هر کامت، نسبت طول دم (Tail) به سر (Head) در هر کامت در نظر گرفته شد. برای انجام آنالیزهای آماری در هر اسلاید

www.SID.ir

Archive of SID

۵۰ تا ۱۰۰ کامت مورد ارزیابی قرار گرفت و نهایتا اعداد به دست آمده برای گروه های تیمار و شاهد بر اساس واحد Arbitrary Unit (مقیاس تصادفی) بیان شدند. به منظور آشکارسازی دنباله‌های کامت از میکروسکوپ فلورسانس Nikon E200مجهز به دوربین Olympus DP72 و بزرگنمایی ۱۰۰× استفاده شد.

اندازه گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدهای بافت آبشش

برای اندازه‌گیری محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدها (مالون‌دی‌آلدئید) از روش Saleh و همکاران (۲۰۰۹) استفاده شد (۸). در این روش اساس واکنش، تشکیل کمپلکس مالون‌دی‌آلدئید-تیوباربیتوریک اسید بین یک مولکول مالون‌دی‌آلدئید و دو مولکول تیوباربیتوریک اسید است. به ۵۰۰ میکرولیتر از بافت هموژنه آبشش، سه میلی لیتر اسید ارتوفسفریک اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (Zenithlab-04C, Azin Lab) شد. به ۱/۵ میلی لیتر از مایع رویی، دو میلی لیتر تیوباربیتوریک اسید ۰/٦۷ درصد اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری جوش قرار گرفت. سپس دو میلی لیتر N-بوتانل به محلول اضافه و بعد از ورتکس شدید به مدت ۱۵ دقیقه در دور g ٤۰۰۰ سانتریفیوژ شد. جذب محلول رویی صورتی رنگ (حاوی مالون دی‌آلدئید) در طول موج ۵۳۲ نانومتر قرائت شد. غلظت مالون دی‌آلدئید بر حسب نانو مول بر میلی‌گرم پروتئین (nmol/mg protein) با استفاده از ۱-۳-۳-۱- تترا اتوکسی پروپان به عنوان استاندارد تعیین شد.

اندازه گیری میزان کربونیل شدن پروتئین‌های بافت آبشش

سطح پروتئین کربونیل بافت آبشش به روش رنگ سنجی شیمیایی و با استفاده از کیت مخصوص (Cayman, USA) اندازه‌گیری شد. در این روش معرف ۲-٤- دی نیترو فنیل هیدرازین با گروه‌های کربونیل موجود در پروتئین‌ها کمپلکس زرد رنگ ایجاد می‌کند. مقدار این کمپلکس پس از قرائت با اسپکتروفتومتر در طول موج ۳۸۰ نانومتر معادل با میزان کربونیل شدن پروتئین بافت است. پس از هموژن کردن یک گرم نمونه بافت آبشش در داخل لوله آزمایش، پنج میلی لیترآب مقطر به آن اضافه شد. نمونه‌ها به مدت یک دقیقه با دور ۳۰۰۰g سانتریفیوژ شدند و مایع رویی نمونه‌ها برداشته شد و به هر نمونه ۱ یک میلی‌لیتر پپسین اضافه گردید. در پایان برای اندازه گیری گروه تیول که نمایانگر مقدار پروتئین‌های کربونیله شده است، نمونه‌ها بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-3600 Plus, Shimadzu) با طول موج ۲۸۰ نانومتر قرائت شدند (۹).

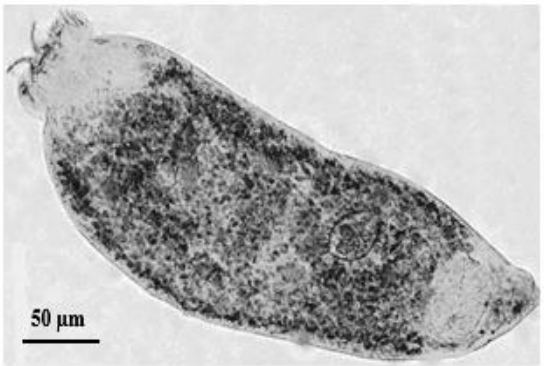
تجزیه و تحلیل آماری

برای بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌ها از آزمون Kolmogrov-Smirnov استفاده شد و داده‌های حاصل از آنالیزهای استرس اکسیداتیو وارده به پروتئین‌ها، چربی‌ها و DNA بافت آبشش ماهیان با آزمون آماری t-test مقایسه و تجزیه و تحلیل شدند. نمودارها با نرم افزار Excel 2013 رسم شدند.

نتایج

بررسی میکروسکوپیک نمونه‌های بافت آبشش

از بین ۱۲۰ نمونه ماهی تهیه شده، تعداد ۲۲ نمونه (معادل با ۱۸/۳۳ درصد) از نظر آلودگی به انگل مونوژن داکتیلوژیروس مثبت تشخیص داده شدند. تصویر انگل داکتیلوژیروس تشخیص داده شده در نمونه‌های ماهی آلوده در نگاره ۱ آورده شده است.



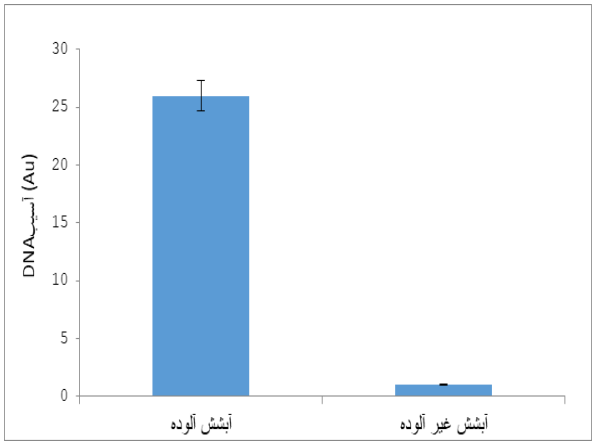
نگاره ۱- انگل داکتیلوژیروس در موکوس آبشش ماهیان آلوده با بزرگنمایی۱۰۰×

www.SID.ir

Archive of SID

ارزیابی میزان آسیب به DNA بافت آبشش

آنالیز آماری داده‌های مربوط به میزان آسیب به DNA نشان داد که نسبت طول دُم به طول سَر کامت‌ها در ماهیان آلوده به انگل به مراتب بیشتر از ماهیان گروه شاهد (سالم) بود که نشان دهنده تخریب شدید و معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) DNA در ماهیان آلوده به انگل نسبت به ماهیان غیر آلوده است (نمودار ۱).



نمودار ۱- مقایسه میزان آسیب به DNA (نسبت طول دُم به سَر کامت ها) بافت آبشش ماهیان آلوده و غیر آلوده به داکتیلوژیروس. حروف لاتین متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار بین گروه‌ها است ($P<۰/۰۵$).

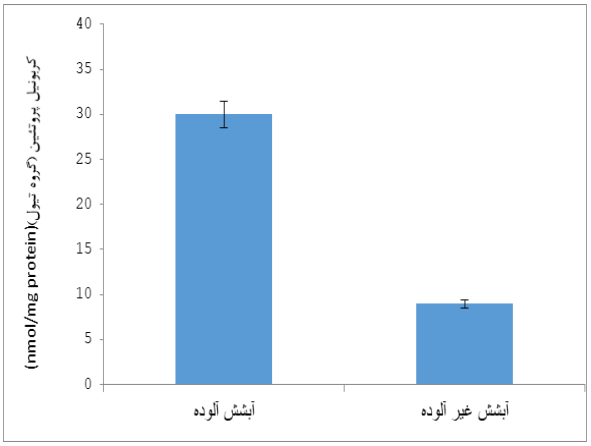
ارزیابی پراکسیداسیون لیپیدهای بافت آبشش

آنالیز آماری داده‌های مربوط به پراکسیداسیون لیپیدهای بافت آبشش (غلظت مالوندی‌آلدئید بافت آبشش) نشان داد که تفاوت معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) در غلظت مالوندی‌آلدئید بین ماهیان آلوده و غیر آلوده وجود داشت (نمودار ۲).

ارزیابی میزان کربونیل شدن پروتئین‌های بافت آبشش

آنالیز آماری داده‌های مربوط به میزان کربونیل شدن پروتئین‌ها در بافت آبشش نشان داد که تفاوت معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) در غلظت گروه تیول بین ماهیان آلوده و غیر آلوده وجود دارد، (نمودار ۳).

نمودار ۲- مقایسه غلظت مالوندی‌آلدئید بافت آبشش ماهیان آلوده و غیر آلوده به داکتیلوژیروس. حروف لاتین متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار بین گروه‌ها است ($P<۰/۰۵$).



نمودار ۳- مقایسه میزان کربونیل شدن پروتئین‌های بافت آبشش ماهیان آلوده و غیر آلوده به داکتیلوژیروس. حروف لاتین متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار بین گروه‌ها است ($P<۰/۰۵$).

بحث

استرس اکسیداتیو در نتیجه افزایش تولید اکسیدان‌هایی مثل اکسیژن‌های فعال بوجود می آید که باعث خسارت به ساختار چربی‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک در بافت‌ها می شود. بدن ماهیان با آنزیم‌هایی مانند سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز، کاتالاز و گلوتاتیون-اس-ترانسفراز که از مهمترین آنزیم‌های آنتی اکسیدانیِ یافت شده

www.SID.ir

Archive of SID

در بدن ماهیان می باشند، به مقابله با ملکول‌های فعال اکسیژن می پردازند (۱۰).

بافت آبشش متشکل از سلول‌های مژه دار و بدون مژه فعالی بوده و این سلول‌ها در طول رشته‌های آبششی تکثیر می یابند. این سلول‌ها که به سلول‌های شبه-اپیتلیال هم معروفند، مستعد آسیب‌های کروموزومی هستند. به طوری که کوچکترین تغییرات در محیط زندگی آبزیان، حیات این سلول‌ها را به خطر می اندازد. آلودگی به انواع ترکیبات شیمیایی مانند آفت کش‌ها، فلزات سنگین و عفونت‌های انگلی و باکتریایی باعث آسیب‌های ژنوتوکسیک در این سلول‌ها می‌شود (۱۱-۱۲). یافته‌های مطالعه حاضر نشان می دهد که میزان آسیب و تخریب DNA در سلول‌های مشتق از آبشش ماهیان کپور آلوده به انگل داکتیلوژیروس در مقایسه با ماهیان سالم به مراتب خیلی بیشتر است (نمودار ۱). تخریب DNA می تواند به دنبال متلاشی شدن سلول و حمله رادیکال‌های آزاد به هسته سلول رخ دهد. علاوه بر انگل‌ها عوامل دیگری همچون مسمومیت با فلزات سنگین، آفت کش‌ها و علف‌کش‌های مورد استفاده در کشاورزی هم می‌توانند باعث استرس اکسیداتیو و صدمه به هسته سلول‌ها در بافت‌های حیاتی ماهیان شوند(۱۳). در راستای یافته‌های مطالعه کنونی، Varotto و همکاران (۲۰۱۳) مشاهده کردند که میزان تخریب DNA در آبشش ماهی *Mytilus galloprovincialis* در معرض غلظت‌های مختلف کادمیوم، مس و جیوه به شکل وابسته به غلظت، افزایش می‌یابد (۱۳). همچنین Guilherme و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که مار ماهی مهاجر *Anguilla anguilla* در معرض آفت‌کش گلیوفسفات دچار تخریب شدید DNA در سلول‌های آبشش می شود (۱٤). چنین تاثیر مخربی بر DNA سلول‌های بافت‌های حیاتی ماهیان توسط Wang و همکاران (۲۰۱۸) نیز در بافت کبد، آبشش و عضله ماهی کپور معمولی نیز گزارش شده است (۱۵). Della Torre و همکاران (۲۰۱۰) علاوه بر آسیب DNA، ضایعات شدید در عضلات و سایر ارگان‌های ماهیان صید شده از دریای مدیترانه را بر اثر مسمومیت شدید آنها با آرسنیک و جیوه گزارش کردند (۱٦). از آنجایی که در مطالعه حاضر هیچگونه مزارع کشاورزی در نزدیکی یا اطراف محل‌های نمونه‌برداری ماهیان (مراکز پرورش ماهی) وجود نداشت، احتمال وجود آلودگی به سموم کشاورزی و نقش آن در ایجاد استرس اکسیداتیو ماهیان بسیار کم است و تا کنون گزارش علمی در این زمینه منتشر نشده است. با این وجود برای انجام آزمایشات مشابه در آینده، بررسی مجدد در زمینه ایجاد مزارع یا هرگونه فعالیت کشاورزی در منطقه ضروری به نظر میرسد.

یکی از محصولات نهایی استرس‌های اکسیداتیو، آلدئیدهای فعالی مانند مالون‌دی‌آلدئید می باشد. این مواد باعث طیف گسترده ای از آسیب‌های سلولی شده و به احتمال قوی، در بروز بعضی از بیماری‌ها نقش دارند. انگل‌های مختلف از جمله داکتیلوژیروس‌ها در پوست و آبشش‌ها با ضعیف کردن سیستم آنتی اکسیدانی میزبان از طریق حمله به لیپیدهای غشاء و ایجاد واکنش‌های زنجیره‌ای تولید رادیکال‌های آزاد، منجر به پر اکسیداسیون چربی‌ها می‌شوند. هیدروپراکسیدهای چربی تمایل دارند از قسمت هیدروفوبیک داخلی غشاء به سمت سطح غشاء حرکت کرده و در نتیجه ارگانیزاسیون غشاء را به هم بزنند. پر اکسیداسیون غشاهای بیولوژیک نفوذپذیری آن‌ها را نسبت به یون‌ها افزایش داده و باعث تخریب پروتئین‌های غشایی مثل گیرنده‌ها و آنزیم‌ها نیز می‌شوند (۱۷). لذا مالون دی‌آلدئید به عنوان یک شناساگر مطمئن و قابل اعتماد برای ردیابی میزان تخریب لیپیدها در اثر استرس اکسیداتیو به کار گرفته می شود (۱۸).

همانطور که نتایج مطالعه کنونی نشان می دهد، محتوای مالون‌دی‌آلدئید در ماهی‌های آلوده به طور قابل ملاحظه ای

www.SID.ir

Archive of SID

(P<۰/۰۵) افزایش یافته است (نمودار ۲). این یافته، به وضوح نشان می دهد که آلودگی با انگل داکتیلوژیروس به لیپیدهای سلولی آسیب جدی وارد می‌کند. یکی از محل‌های عمده و حساس تجمع لیپیدها، غشا سلول‌ها و اندامک‌های داخلی سلولی است و چنین آسیب گسترده به غشاهای سلولی می تواند به متلاشی شدن سلول منجر گردد.

کپورماهیان آلوده به داکتیلوژیروس دارای علائمی مانند هیپرپلازی آبشش‌ها، کاهش رشد و افزایش تعداد تنفس هستند که می‌تواند به دلیل مرگ و تخریب سلول‌های آبشش در اثر آسیب جدی به غشای سلولی و لیپیدهای موجود در ساختار این غشا باشد. در عفونت‌های بسیار شدید که قاعدتا میزان القاء استرس اکسیداتیو نیز بسیار زیاد است، ممکن است خونریزی و متاپلازی در آبشش‌ها و حتی عفونت‌های ثانویه باکتریال نیز مشاهده شود (۱۹). در مطالعه کنونی از میان ۲۲ عدد ماهی آلوده به داکتیلوژیروس (نگاره ۱)، علائم ظاهری مبنی بر عفونت ثانویه مشاهده نشد، اما قطعا انجام بررسی‌های دقیق میکروبیولوژیکی در تکمیل یافته‌های چنین مطالعاتی بسیار مناسب بوده که به دلیل محدودیت‌های مختلف در این مطالعه انجام نشد. شواهد موجود حاکی از ارتباط مستقیم و موثری بین شدت آلودگی به انواع انگل‌ها و استرس اکسیداتیو ایجاد شده در بدن میزبان است (۲۰-۲۱). اما از آنجا که هدف اصلی مطالعه کنونی ارزیابی شیوع انگل مونوژن داکتیلوژیروس در کپور معمولی در استان آذربایجان غربی بود و همچنین ضایعات اکسیداتیو ناشی از این انگل به مولکول‌های زیستی در این مطالعه به‌طور اولیه مورد ارزیابی قرار گرفت، بنابراین شدت آلودگی به این انگل بررسی نشده و در مطالعه‌های آتی، ارتباط شدت آلودگی به این انگل و بررسی تعادل اکسیدانی/آنتی اکسیدانی از طریق اندازه‌گیری شاخص‌های دیگر استرس اکسیداتیو به خصوص فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پیشنهاد می‌گردد.

همراستا با یافته‌های مطالعه کنونی مبنی بر افزایش محتوای مالون‌دی‌آلدئید به دنبال آلودگی با انگل داکتیلوژیروس، سایر محققین نیز یافته‌های مشابهی را به دنبال آلودگی با دیگر انگل‌ها گزارش کرده‌اند. Bello و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کرده اند که مقادیر مالون‌دی‌آلدئید در عضله ماهی‌های آلوده به انگل برگی شکل چند میزبانه *Clinostomum detruncatum* تا دو برابر بیشتر از ماهیان غیر آلوده است (۲۲). به نظر می‌رسد که پراکسیداسیون چربی‌ها می‌تواند یک شاخص زیستی مناسب برای ردیابی اثرات پاتولوژیک انگل‌های آبزیان باشد.

یکی دیگر از محصولات ناشی از استرس اکسیداتیو، پروتئین‌های کربونیله شده می‌باشند. نتایج مطالعات اخیر به وضوح نشان می‌دهد که پروتئین‌های کربونیله در تعدادی از بیماری‌های انسان نقش دارند. مشخص شده است که گونه‌های فعال اکسیژن می توانند به گروه‌های آمینی مستقر در پروتئین‌ها حمله و باعث تشکیل گروه کربونیل در ساختار آمینو اسیدها شوند (۲۳). نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که محتوای پروتئین‌های کربونیله در ماهیان کپور آلوده با انگل داکتیلوژیروس به طور معنی داری (P<۰/۰۵) افزایش چشمگیری در مقایسه با ماهیان سالم داشته است (نمودار ۳). این یافته حاکی از تخریب پروتئین‌ها به دنبال استرس اکسیداتیو است. همچنین Vasemagi و همکاران (۲۰۱۷) نشان داده اند که ماهیان سالمون وحشی (*Salmo salar*) آلوده به انواع انگل‌های دستگاه گوارش، محتوای پروتئین‌های کربونیله شده بیشتری را در مقایسه با همتایان سالم خود دارا بودند (۲٤).

از آنجایی که این مطالعه در شهرستان های جلفا و پلدشت که دارای آب و هوای سرد و کوهستانی می باشند، انجام شده و در این مناطق به دلیل برودت هوا، اقلیم بهاری مشابه اقلیم پاییزی و سرد و مرطوب است و نیز از طرفی نمونه برداری در زمستان، طی روزهای گرم، هنگامی که دمای آب استخر در محدوده ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی گراد بوده و کپور

www.SID.ir

Archive of SID

ماهیان مورد مطالعه در این مطالعه در دمای بهینه نگهداری می شدند، احتمال تاثیر دما بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو بسیار ناچیز است. عدم وجود ارتباط مستقیم بین دما و استرس اکسیداتیو در برخی منابع موجود هم گزارش شده است (۱۰)، اما با این وجود، بهتر است در پژوهش‌های آتی تاثیر عامل دما بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو نیز مورد مطالعه قرار گیرد.

براساس یافته‌های مطالعه کنونی، آلودگی به انگل داکتیلوژیروس باعث القاء استرس اکسیداتیو و تخریب مولکول‌های زیستی در آبشش ماهی کپور معمولی می‌شود. به طوری که میزان خسارت به ملکول‌های DNA، مقادیر مالون‌دی‌آلدئید ناشی از اکسیداسیون لیپیدهای ساختاری سلول‌ها و همچنین میزان پروتئین‌های کربونیله شده در بافت آبشش در ماهیان آلوده افزایش یافته که نشان دهنده تخریب اسیدهای نوکلئیک، لیپیدها و پروتئین‌ها می‌باشد. لذا برای جلوگیری از این آسیب‌های مهم به بافت حیاتی آبشش ماهیان و نیز برای جلوگیری از ایجاد شرایط مناسب برای آلودگی‌های ثانویه احتمالی، رعایت کامل اصول بهداشتی به ویژه در مزارع پرورش ماهی متراکم ضروری به نظر می‌رسد.

فهرست منابع

1 1. Fabbender C, T. B. Assessment of genotoxicity in gonads, liver and gills of Zebrafish (Danio rerio) by use of the Comet Assay and Micronucleus Test after In Vivo exposure to Methyl Methanesulfonate. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 2013; 91(1): 89–95.

2. Nazarizadeh A, Asri-Rezaie S. Comparative study of Antidiabetic activity and Oxidative Stress induced by Zinc Oxide Nanoparticles and Zinc Sulfate in diabetic Rats. Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists. 2016; 17: 834-43.

3. Nitta M, Nagasawa K. Dactylogyrus oryziasi n. sp. (Monogenea: Dactylogyridae) from Oryzias latipes (Beloniformes: Adrianichthyidae) in Japan. Species Diversity. 2017; 22(1): 1-5.

4. Neary ET, Develi N, Ozgül G. Occurrence of Dactylogyrus species (Platyhelminths, Monogenean) on Cyprinids in Almus Dam Lake, Turkey. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 2012; 12: 15-21.

5. Soler-Jiménez LC, Paredes-Trujillo AI, Vidal-Martínez VM. Helminth parasites of finfish commercial aquaculture in Latin America. Journal of Helminthology. 2017; 91(2): 110-36.

6. Gussev AV. Parasitic metazoan: Monogenea. In: Bauer ON (ed) Key to parasites of freshwater fishes of USSR, 1st edn, Vol. 2. Nauka, Leningrad, USSR, 1985; p 424 (In Russian)

7. Pu X, Wang Z, Klaunig JE. Alkaline Comet Assay for assessing DNA damage in individual cells. Current Protocols in Toxicology. 2015; 65(1): 1-11.

8. Saleh MA, Al-Salahy MB, Sanousi SA. Oxidative stress in blood of camels (Camelus dromedaries) naturally infected with Trypanosoma evansi. Veterinary Parasitology. 2009; 162(3): 192-9.

9. Hasan-Zaiem A, Saghebjoo M, Foadodini M, Saed-Mocheshi S. The effect of aerobic training and Pistacia atlantica extract on the levels of Heat Shock Protein 70 and protein Carbonyl in the heart tissue of diabetic Rats. Journal of Isfahan Medical School. 2015; 33(347): 1333-1348.

10. Vinagre C, Madeira D, Narciso L, Cabral HN, Diniz M. Effect of temperature on oxidative stress in fish: lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, Dicentrarchus labrax. Ecological Indicators. 2012; 23: 274-9.

11. Ahmadi A, Borji H, Naghibi A, Nasiri MR, Sharifiyazdi H. Morphologic and molecular (28S rDNA) characterization of Dactylogyrus spp. in Cyprinus carpio and Ctenopharyngodon idella in Mashhad, Iran. The Canadian Journal of Veterinary Research. 2017; 81: 280–4.

www.SID.ir

Archive of SID

12. Siddiqui AA. Effects of Seasons, host age, size and sex on Monogenetic Trematode, Hamatopeduncularia indicus of host fish, Arius jella. Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences. 2014; 4(2): 1146-51.
13. Varotto L, Domeneghetti S, Rosani U, Manfrin C, Cajaraville MP, Raccanelli S, et al. DNA damage and transcriptional changes in the gills of Mytilus galloprovincialis exposed to nanomolar doses of combined metal salts (Cd, Cu, Hg). PloS one. 2013; 8(1): e54602.
14. Guilherme S, Gaivão I, Santos MA, Pacheco M. DNA Damage in fish (Anguilla anguilla) exposed to a Glyphosate-based herbicide -- elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress. Mutation Research. 2012; 743(1-2): 1–9.
15. Wang C, Harwood JD, Zhang - Chemosphere Q. Oxidative stress and DNA damage in common carp (Cyprinus carpio) exposed to the herbicide mesotrione. Chemosphere. 2018; 193: 1080-1086.
16. Della Torre C, Petochi T, Corsi I, Maddalena Dinardo M, Baroni D, Alcaro L, et al. DNA damage, severe organ lesions and high muscle levels of As and Hg in two benthic fish species from a chemical warfare agent dumping site in the Mediterranean Sea. Science of the Total Environment. 2010; 408(9): 2136-45.
17. Crnogaj M, Petlevski R, Mrljak V, Kis, I., Torti M, Kucer N, Matijatko V, et al. Malondialdehyde levels in serum of dogs infected with Babesia canis. Veterinarni Medicina. 2010; 55(4): 163-71.
18. Bita S, Mesbah M, Ghorbanpour Najafabadi M. Study of antioxidant enzymes and lipid peroxidation changes in common carp exposed to silver nanoparticles synthesized using Sargassum seaweed. Veterinary Researches & Biological Products. 2017; 119: 150-160.
19. Wangchu L, Narba D, Yassa M, Tripathi A. Dactylogyrus barnae sp. n. (Platyhelminthes: Monogenoidea) infecting gills of Barilius barna Hamilton, 1822 (Pisces: Cyprinidae) from a global biodiversity hotspot - Arunachal Pradesh (India). Veterinary World. 2017; 10(5): 505-9.
20. Van de Crommenacker J, Richardson DS, Koltz AM, Hutchings K, Komdeur J. Parasitic infection and oxidative status are associated and vary with breeding activity in the Seychelles warbler. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 2012; 279(1733):1466-1476.
21. Dimitrijević B, Borozan S, Katić-Radivojević S, Stojanović S. Effects of infection intensity with Strongyloides papillosus and albendazole treatment on development of oxidative/nitrosative stress in sheep. Veterinary parasitology. 2012; 186(3-4):364-75.
22. Bello ARR, Fortes E, Bello-Klein A, Bello AA, Llesuy SF, Robaldo RB, et al. Lipid peroxidation induced by Clinostomum detruncatum in muscle of the freshwater fish Rhamdia quelen. Diseases of Aquatic Organism. 2000; 42: 233–6.
23. Mehrabian Fard M, Baghshani H, Shahsavani D, Gholipour Kanani H. Effect of dietary supplementation of Spirulina (Spirulia platensis) on cyanide-induced oxidative damage of Common Carp Cyprinus carpio Linnaeus, 1758. Applied Ichthyology Research. 2017; 5(3): 103-114.
24. Vasemagi A, Visse M, Kisand V. Effect of environmental factors and an emerging parasitic disease on gut microbiome of wild salmonid fish. mSphere. 2017; 2(6): e00418-7.

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir