

تأثیر حفاظتی ویتامین C و کیتوزان بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در معرض پاراکوات

زینب شریفی‌نسب^۱، مهدی بنایی^{۱*}، بهزاد نعمت‌دوست حقی^۱، احمد نوری^۲

*mahdibanaee@yahoo.com

۱- دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء (ص) بهبهان، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، گروه شیلات، بهبهان، ایران، کدپستی: ۶۳۶۱۱۶-۴۷۱۸۹

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

تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۵

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۵

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی تأثیر حفاظتی ویتامین C و کیتوزان بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون ماهی‌ها 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 میلی‌گرم 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. نتایج این مطالعه نشان داد که پاراکوات موجب افزایش معنی‌دار فعالیت‌های آنزیم آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آلکالین فسفاتاز (ALP)، و نیز افزایش معنی‌دار سطوح گلوکز، کلسترول، تری‌گلیسرید، اوره و کراتینین خون ماهیان در مقایسه با گروه کنترل شد ($p < 0/05$)؛ ولی فعالیت‌های آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) و استیل کولین‌استراز (AChE)، و سطوح پروتئین کل پلاسما و گلبولین در ماهیان را در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش داد ($p < 0/05$). پاراکوات تأثیری بر سطح آلبومین پلاسما در مقایسه با گروه کنترل نداشت ($p > 0/05$). اگرچه تجویز ویتامین C یا کیتوزان (به تنهایی) به ماهیان تحت تیمار پاراکوات مانع از تغییرات برخی از فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون ماهیان در معرض پاراکوات شد، نتایج نشان داد که خاصیت آنتی‌اکسیدانی ویتامین C بیشتر از کیتوزان است. با این حال تجویز کمپلکس ویتامین C با کیتوزان نقش مؤثری در پیشگیری از استرس اکسیداتیو و پیشگیری از تغییرات پارامترهای بیوشیمیایی خون در ماهیان در معرض پاراکوات داشته است.

نکات کلیدی: پاراکوات، ویتامین C، کیتوزان، استرس اکسیداتیو، فراسنجه‌های بیوشیمیایی

*نویسنده مسئول

مقدمه

گاه در پی کاهش سطح ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلولی یا افزایش بیش از حد ترکیبات واکنشگر اکسیژنی (ROS)، تعادل بین اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها برهم می‌خورد و همین امر ممکن است به بروز استرس اکسیداتیو منجر گردد (Monteiro *et al.*, 2006). بسیاری از آلاینده‌های زیست محیطی، نظیر آفت‌کش‌ها و علف‌کش‌ها ممکن است از طریق اختلال در سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی سلولی یا تغییر در سطح فعالیت آنزیم‌های از بین برنده و خورنده رادیکال‌های آزاد و افزایش نرخ تولید ترکیبات واکنشگر اکسیژنی در آبزیان، زمینه را برای بروز استرس اکسیداتیو در این ارگانیسم‌ها مهیا سازد (Monteiro *et al.*, 2006). ترکیبات واکنشگر اکسیژنی (ROS) نظیر آنیون سوپراکسید (O_2^-)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال‌های فوق‌العاده فعال هیدروکسیل (OH^\cdot) می‌توانند با واکنش با ماکرومولکول‌های زیستی و تولید پراکسیداسیون لیپیدی، DNA های آسیب دیده و پروتئین‌های اکسید منجر به بروز آسیب‌های اکسیداتیو استرس گردند (Monteiro *et al.*, 2006).

پاراکوات (۱،۱-دی‌متیل ۴،۴-بی‌پیریدیلیوم دی-کلراید)، یکی از پرکاربردترین علف‌کش‌های کشاورزی است که در حین سم‌پاشی و یا پس از سم‌پاشی ممکن است به صورت عمدی یا سهوی وارد آب‌های سطحی گردد (Awadalla, 2012). این علف‌کش 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.*, 2016; Sharifinasab *et al.*, 2013). در کبد ماهیان، پاراکوات تحت تاثیر عملکرد آنزیم‌های نظیر NADPH سیتوکروم P450، گزانتین اکسیداز، NADH اوبی‌کینون اوکسی‌ردوکتاز و نیتریک اکسید سنتتاز تجزیه شده (Gil *et al.*, 2014) و متابولیت‌های آن، منوکاتیون پاراکوات (PQ^+)، به عنوان دهنده الکترون عمل کرده و پس از اکسید شدن به دی‌کاتیون پاراکوات (PQ^{2+}) تبدیل می‌شود؛ NADPH نیز با گرفتن الکترون

اکسیژن مولکولی را به رادیکال‌های فعال سوپر اکسید که مسئول پراکسیداسیون لیپیدی هستند تبدیل می‌کنند (Sharifinasab *et al.*, 2016). پاراکوات و متابولیت‌های آن علاوه بر تاثیر مستقیم بر عملکرد غشای سلول، می‌توانند بر فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی درون سلولی نیز اثر گذاشته و سبب ایجاد تغییراتی در فاکتورهای بیوشیمیایی سلولی و خون ماهیان گردند (Banaee *et al.*, 2016; Sharifinasab *et al.*, 2016).

یکی از فرضیه‌های مطرح در علم سم‌شناسی محیطی این است که می‌توان با تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی سلولی، کارایی سیستم سم‌زدایی موجودات زنده را در برابر آلاینده‌های محیطی افزایش داد و بدین ترتیب تسریع و تسهیل دفع ترکیبات سمی از بدن جانوران، از شدت و حدت آسیب‌های زیستی این ترکیبات در ارگانیسم‌ها کاست (Limón-Pacheco and Gonsebatt, 2009; Ozturk *et al.*, 2009; Banaee *et al.*, 2015). نتایج تحقیقات صورت گرفته نشان می‌دهد که بسیاری از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌توانند از سلول‌ها در برابر اثرات مخرب عوامل زیست‌محیطی حفاظت کنند (El-Shenawy *et al.*, 2010). ویتامین‌ها به عنوان آنتی‌اکسیدان می‌توانند با حفظ و تنظیم عملکرد غشای سلولی نظیر انتقال یون‌ها و پایداری غشای سلولی از آزاد شدن یون Fe^{+2} و Mg^{+2} باند شده به پروتئین‌ها جلوگیری کنند و بدین ترتیب نرخ پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش دهند (El-Shenawy *et al.*, 2010). تاثیر سلولی و مولکولی ویتامین C به عنوان آنتی‌اکسیدان در پیشگیری از آسیب وارده به غشای سلولی و پروتئین‌های سلولی و نیز به عنوان یک ترکیب خورنده و از بین برنده رادیکال‌های آزاد سبب شده که این ویتامین به عنوان یکی از آنتی‌اکسیدان‌های مطرح در سیستم‌های زیستی از جایگاه ویژه‌ای برخوردار باشد (Sharifinasab *et al.*, 2016). در بدن موجودات زنده، ویتامین C به‌عنوان یک دهنده الکترون عمل می‌کند و با احیا و خنثی کردن رادیکال‌های آزاد نظیر هیدروکسیل رادیکال‌ها، پراکسیل

مطالعه بررسی تأثیر حفاظتی ویتامین C و کیتوزان بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون ماهی‌های کپور معمولی در معرض پاراکوات است.

مواد و روش کار

کیتوزان با وزن مولکولی پایین (با درجه دی‌اسیلاسیون ۸۰ درصدی) از شرکت آلدریج، 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 ($4/40 \pm 37/65$ 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 24 ± 2 سانتی‌گراد، دوره‌ی نوری ۱۴ ساعت روشنایی: ۱۰ ساعت تاریکی، اکسیژن 6 ± 1 میلی‌گرم در لیتر، $7/6 \pm 0/2$ pH) سازگار گردیدند. در طی دوره‌ی سازگاری ماهی‌ها با جیره 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) که تنها با جیره فرموله شده تجاری بدون هیچ گونه افزودنی تغذیه شدند؛ 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 و تنها با جیره فرموله شده تجاری بدون هیچ گونه افزودنی تغذیه شدند؛ 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

۱۸۳

رادیکال‌ها و آنیون‌های سوپر اکسید پیش از واکنش آنها با مولکول‌های زیستی، به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند (Evans and Halliwell, 2001; Padayatty) (et al., 2003; Awadalla, 2012). این ویتامین در نوسازی دیگر مولکول‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر آلفا توکفرول، گلوکاتینون و بتا کاروتن (Evans and Halliwell, 2001; Awadalla, 2012) و نیز کمک به ترمیم بافت‌های آسیب دیده، سنتز کلاژن و بافت اسکلتی روند بهبود ماهیان در معرض آلاینده‌های محیطی را تسریع می‌کند (Sharifinasab et al., 2016). از این‌رو، 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 بردگی رادیکال‌های آزاد (Je and Kim, 2006; Yan et al., 2006; Yoon et al., 2008; Kim et al., 2009; Yuan et al., 2009; Sun et al., 2011; Yoon et al., 2011) و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و همچنین کارایی آن به‌عنوان حامل دارویی و هورمونی و مکمل‌های ویتامینی (Grenha et al., 2005; Kavaz et al., 2010; Alishahi et al., 2011a,b; Wei et al., 2013)، ویژگی‌های ضد باکتریایی و ضد قارچی کیتوزان (Benhabiles et al., 2012) در پیشگیری از آسیب‌های وارد به اندام‌های مختلف جانوران آزمایشگاهی در معرض مواد شیمیایی مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد. قابلیت 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 ماهیان مؤثر باشد. از این رو با توجه به ویژگی‌های کیتوزان در نقل و انتقال 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 بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون ماهی‌های در معرض پاراکوات مؤثر باشد؛ بنابراین، هدف این

پس از خون‌گیری، نمونه‌های خون جهت استحصال پلاسما، در دستگاه سانتی‌فوژ با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی خون با استفاده از کیت‌های تهیه شده از شرکت پارس آزمون و با دستگاه اسپکتروفوتومتری UV/Vis (مدل ۲۱۰۰ یونیکو آمریکا) صورت گرفت. سطح پروتئین تام پلاسما براساس واکنش بایوره و در طول موج ۵۴۰ نانومتر، آلومین پلاسما براساس واکنش برمورزول‌گرین و در طول موج ۶۳۰ نانومتر، گلبولین پلاسما براساس نسبت آلومین از پروتئین تام پلاسما (Johnson *et al.*, 1999)، گلوکز پلاسما براساس روش آنزیمی گلوکز اکسیداز و در طول موج ۵۰۰ نانومتر، سطح کلسترول پلاسما نیز به روش آنزیمی (CHO-PAP) در طول موج ۵۱۰ نانومتر، کراتینین به روش JAFFE و در طول موج ۵۱۰ نانومتر (Foster-Swanson *et al.*, 1994) و تری‌گلیسرید براساس روش آنزیمی GPO-PAP و در طول موج ۵۱۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید (Rifai *et al.*, 1999). سطح فعالیت استیل‌کولین استراز نیز با استفاده از استیل‌کولین ایودید و دی‌تیوبیس-نیتروبنزوئیک اسید به عنوان سوبسترا و در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (Knedel and Boettger, 1967). سطح فعالیت آنزیم‌های آسپارات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز پلاسما براساس مقدار مصرف NADPH و تبدیل آن به NAD^+ در طول موج ۳۴۰ نانومتر، لاکتات دهیدروژناز پلاسما براساس تبدیل پیرووات به لاکتات در طول موج ۳۴۰ نانومتر، آلکالین فسفاتاز براساس تبدیل نیتروفنیل فسفات به نیتروفنول و فسفات و در طول موج ۴۰۵ نانومتر تعیین و براساس میزان جذب نوری OD و فرمول ارائه شده در دستورالعمل کیت‌ها محاسبه گردید (Moss and Henderson, 1999).

نرمال بودن داده‌ها بر اساس آزمون Kolmogorov-Smirnov مورد ارزیابی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها به روش تجزیه واریانس یک‌طرفه (ANOVA) در سطح اطمینان ۹۵٪ ($p < 0.05$) و با استفاده از نرم‌افزار SPSS (IBM) 19 انجام شد؛ مقایسه میانگین‌ها نیز با آزمون

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 میلی‌گرم ویتامین C به ازای هر کیلوگرم غذای فرموله شده تجاری تغذیه شدند؛ انجام گردید. دوره آزمایش ۲۱ روز در نظر گرفته شده است. در طی آزمایش و در زمان تعویض آب، معادل حجم آب تعویضی مجدداً محلول پاراکوات به آب افزوده شد (جدول ۱).

جدول ۱: گروه‌های مختلف آزمایشی تحت تیمار کیتوزان، ویتامین C و پاراکوات

گروه‌های آزمایشی	غذای فرموله شده تجاری	کیتوزان (۱۰۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم غذا)	ویتامین C (۱۰۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم غذا)	پاراکوات (۰/۰۲ میلی‌گرم در هر لیتر آب)
گروه یک	*	---	---	---
گروه دو	*	*	---	---
گروه سه	*	---	---	*
گروه چهار	*	*	---	*
گروه پنج	*	---	*	*
گروه شش	*	*	*	*

پس از گذشت ۲۱ روز از آغاز آزمایش، ۱۲ ماهی از هر تیمار بصورت تصادفی صید و پس از بیهوش نمودن آنها با محلول پودر گل میخک (۱:۵۰۰۰)، از ساقه‌ی دمی آنها با استفاده از سرنگ‌های خلاء‌دار حاوی ماده‌ی ضد انعقاد هیپارین خون‌گیری صورت گرفت.

شده است. قرار گرفتن ماهیان در معرض پاراکوات منجر به افزایش معنی‌داری در سطح فعالیت آنزیم آسپاراتات آمینوترانسفراز گردید. با وجود اینکه تجویز ویتامین C به تنهایی سبب کاهش سطح فعالیت آنزیم AST و حفظ سطح آن در سطح گروه کنترل شد، اما تجویز ویتامین C به همراه کیتوزان و همچنین کیتوزان به تنهایی تاثیر در حفظ سطح فعالیت آنزیم AST در خون ماهیان در معرض پاراکوات در سطح گروه کنترل نداشت (شکل ۱).

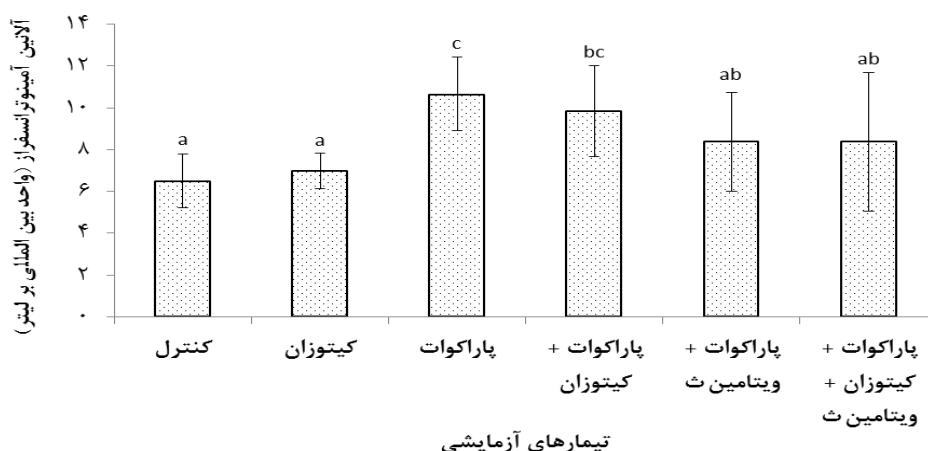
دانکن صورت گرفت. نتایج به صورت میانگین به همراه انحراف معیار نشان داده شده است.

نتایج

تغییرات فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون ماهی در معرض پاراکوات و نیز خون ماهیان تحت تیمار پاراکوات و کیتوزان، پاراکوات و ویتامین ث و نیز پاراکوات و کمپلکس ویتامین ث و کیتوزان در مقایسه با ماهیان گروه کنترل و ماهیان تحت تیمار کیتوزان در شکل ۱ تا ۱۳ نشان داده



شکل ۱: تغییرات سطح فعالیت آنزیم آسپاراتات آمینوترانسفراز در خون ماهیان؛ اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل با حروف الفبای انگلیسی مشخص شده است. حروف غیرمشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($p < 0.05$).

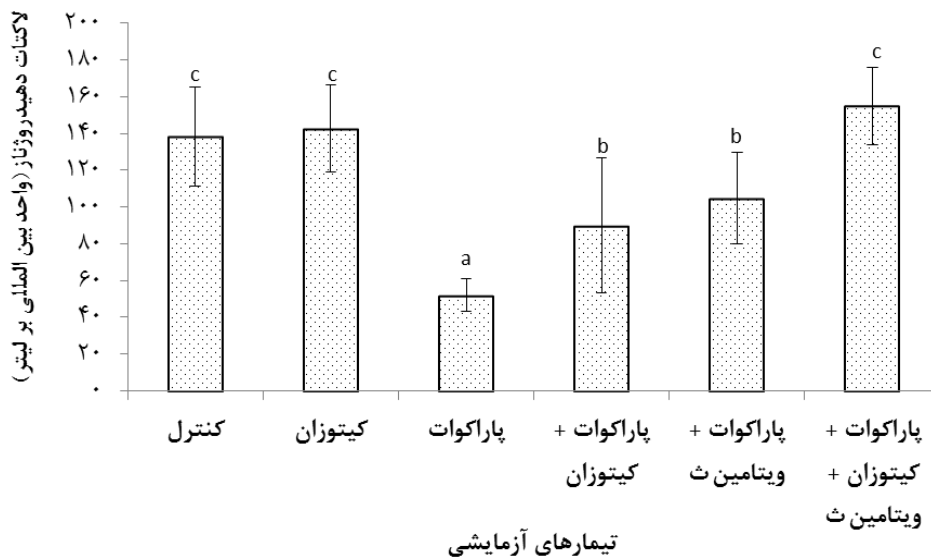


شکل ۲: تغییرات سطح فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز در خون ماهیان؛ اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل با حروف الفبای انگلیسی مشخص شده است. حروف غیرمشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($p < 0.05$).

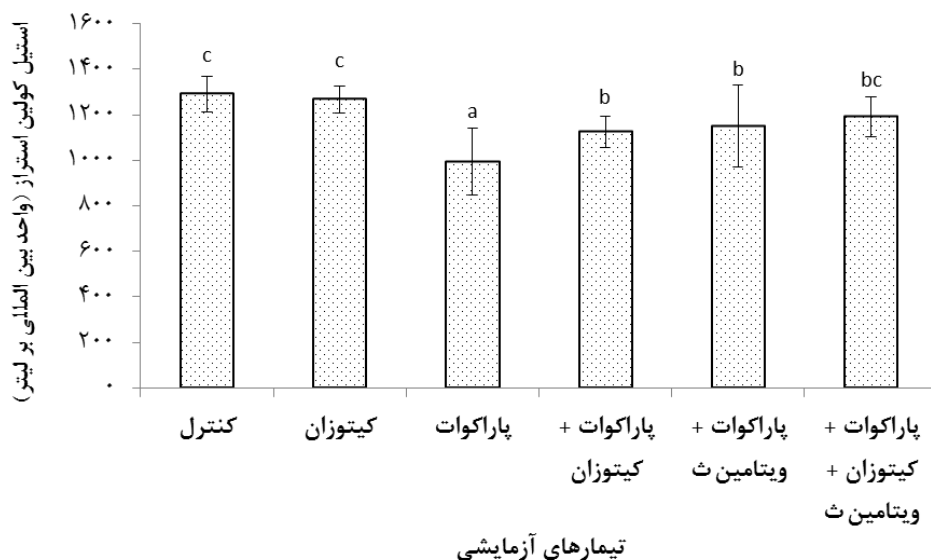
شریفی‌نسب و همکاران تأثیر حفاظتی ویتامین C و کیتوزان بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون ماهی کپور معمولی در...

همراه کیتوزان و همچنین کیتوزان به تنهایی به ماهیان در معرض پاراکوات موجب تنظیم سطح فعالیت آنزیم ALT و حفظ آن در سطح گروه کنترل گردید (شکل ۲).

اگرچه سطح فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز در خون ماهیان در معرض پاراکوات در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش یافت، اما تجویز ویتامین C به



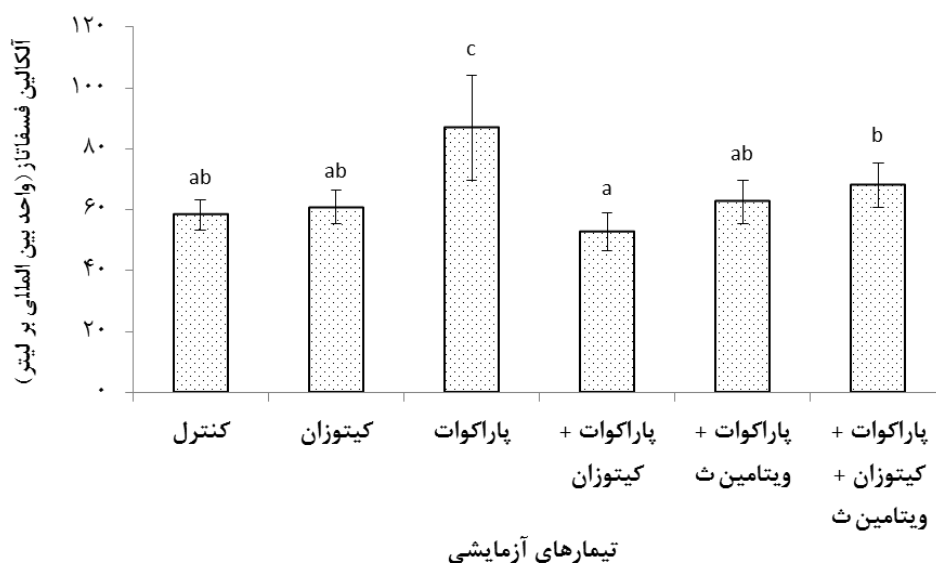
شکل ۳: تغییرات سطح فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در خون ماهیان؛ اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل با حروف الفبای انگلیسی مشخص شده است. حروف غیرمشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($p < 0.05$).



شکل ۴: تغییرات سطح فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز در خون ماهیان؛ اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل با حروف الفبای انگلیسی مشخص شده است. حروف غیرمشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($p < 0.05$).

فعالیت آنزیم‌های AChE و LDH و حفظ آن در سطح گروه کنترل شد (شکل ۴ و ۳).

براساس نتایج بدست آمده سطح فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در خون ماهیان در معرض پاراکوات در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش یافت، اما تغذیه ماهیان در معرض پاراکوات با مکمل غذایی حاوی ویتامین C و کیتوزان به تنهایی و نیز توأم موجب تنظیم سطح فعالیت آنزیم ALP و بازگشت آن به سطح کنترل شد (شکل ۵).



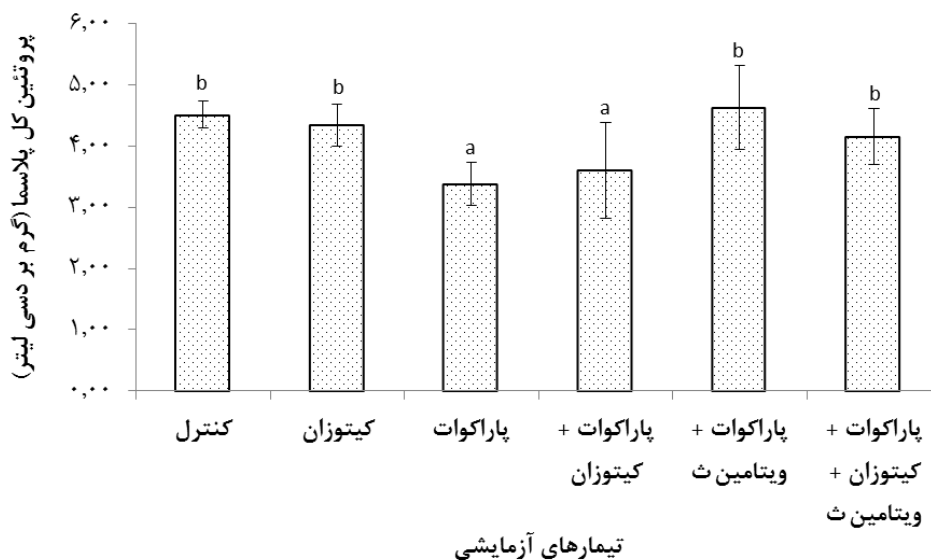
شکل ۵: تغییرات سطح فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در خون ماهیان؛ اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل با حروف الفبای انگلیسی مشخص شده است. حروف غیرمشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($p < 0.05$).

ویتامین C به تنهایی و همچنین ویتامین C و کیتوزان سبب تنظیم سطح پروتئین کل پلاسما در ماهیان در معرض پاراکوات و بازگشت آن به سطح گروه کنترل گردید (شکل ۶).

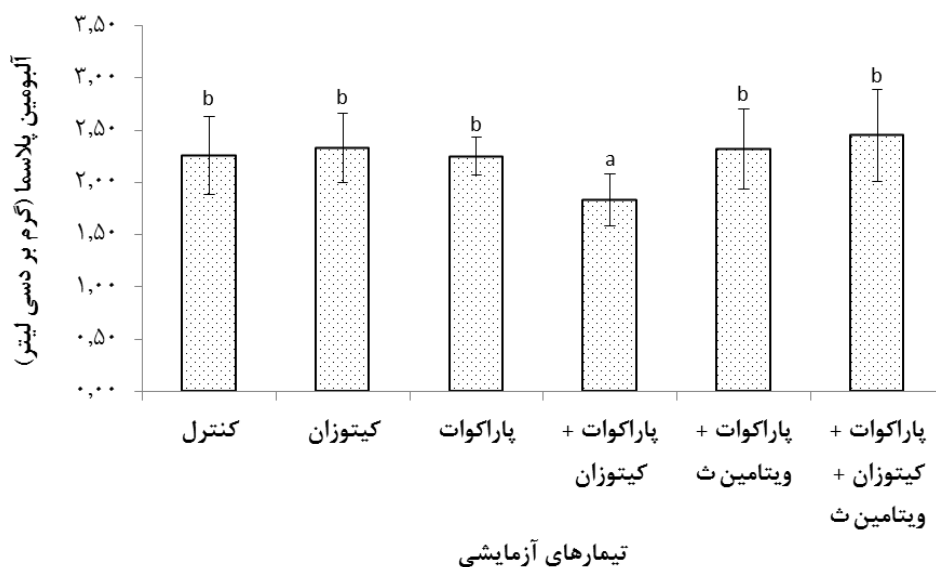
نتایج نشان داد که سطح فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز و استیل کولین استراز در خون ماهیان در معرض پاراکوات در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافت. اگرچه تجویز ویتامین C و کیتوزان به تنها سبب افزایش سطح فعالیت آنزیم LDH و AChE گردید، اما همچنان سطح فعالیت این آنزیم‌ها در این ماهیان به طور معنی‌داری کمتر از ماهیان گروه کنترل است. با این وجود تغذیه ماهیان در معرض پاراکوات به مکمل غذایی حاوی کمپلکس ویتامین C و کیتوزان موجب تنظیم سطح

سطح پروتئین کل پلاسما در ماهیان در معرض پاراکوات به طور معنی‌داری پایین‌تر از گروه کنترل است. اگرچه تغذیه ماهیان با جیره غذایی حاوی کیتوزان تاثیر معنی‌داری در بازگشت سطح پروتئین کل پلاسما در ماهیان در معرض پاراکوات به سطح کنترل نداشت، اما تجویز

شریفی‌نسب و همکاران تأثیر حفاظتی ویتامین C و کیتوزان بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون ماهی کپور معمولی در...



شکل ۶: تغییرات سطح پروتئین کل در خون ماهیان؛ اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل با حروف الفبای انگلیسی مشخص شده است. حروف غیرمشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($p < 0.05$).

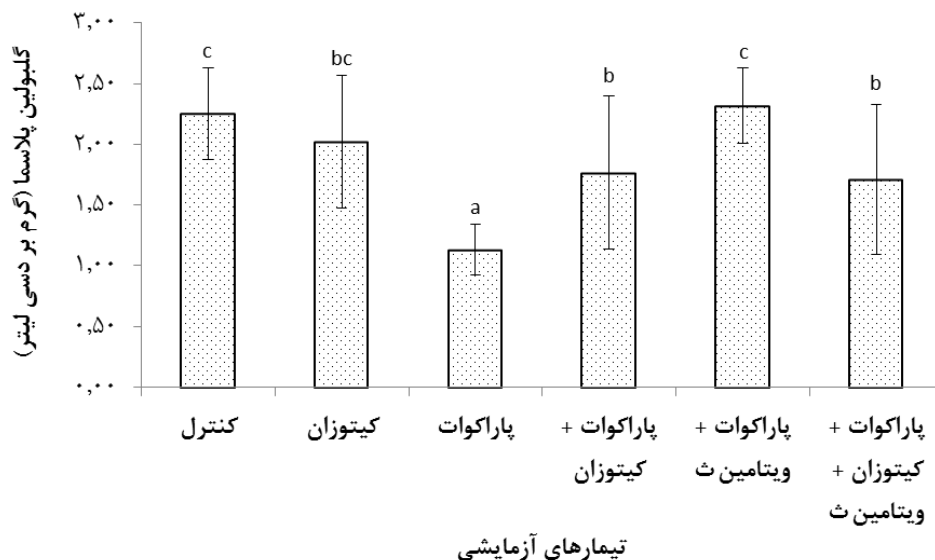


شکل ۷: تغییرات سطح آلبومین در خون ماهیان؛ اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل با حروف الفبای انگلیسی مشخص شده است. حروف غیرمشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($p < 0.05$).

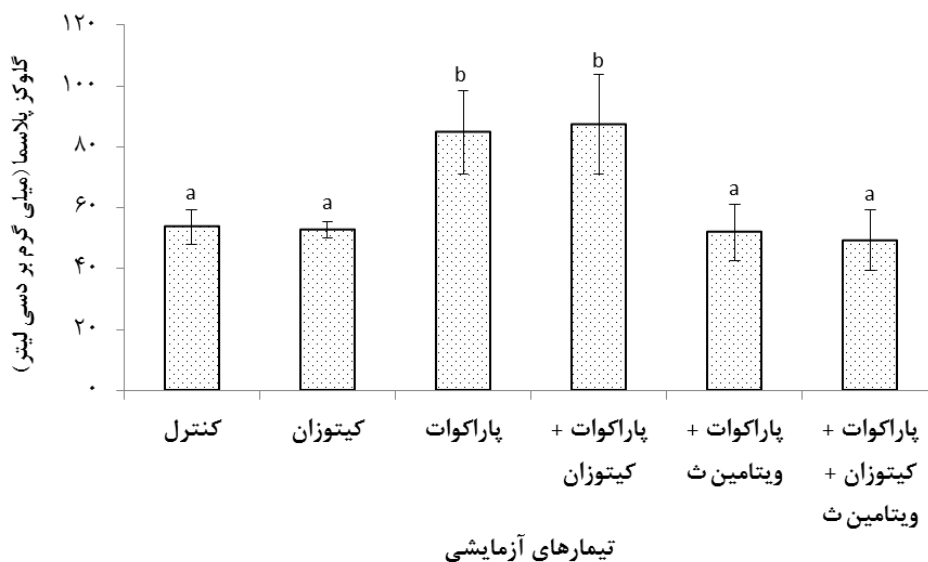
کیتوزان و کیتوزان به تنها سبب افزایش سطح گلبولین در مقایسه با سطح گلبولین خون ماهیان در معرض پاراکوات (به تنهایی) گردید، اما تنها در زمانی که ماهیان با جیره غنی شده از ویتامین C تغذیه شدند، سطح گلبولین در

سطح آلبومین در ماهیان تحت تیمار پاراکوات و کیتوزان به طور معنی‌داری پایین‌تر از دیگر گروه‌ها است (شکل ۷). نتایج نشان داد که سطح گلبولین پلاسما ماهیان در معرض پاراکوات در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافت. با وجود اینکه تجویز ویتامین C و

ماهیان در معرض پاراکوات در سطح گروه کنترل باقی ماند (شکل ۸).



شکل ۸: تغییرات سطح گلبولین در خون ماهیان؛ اختلاف معنی دار بین گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل با حروف الفبای انگلیسی مشخص شده است. حروف غیرمشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها است ($p < 0.05$).



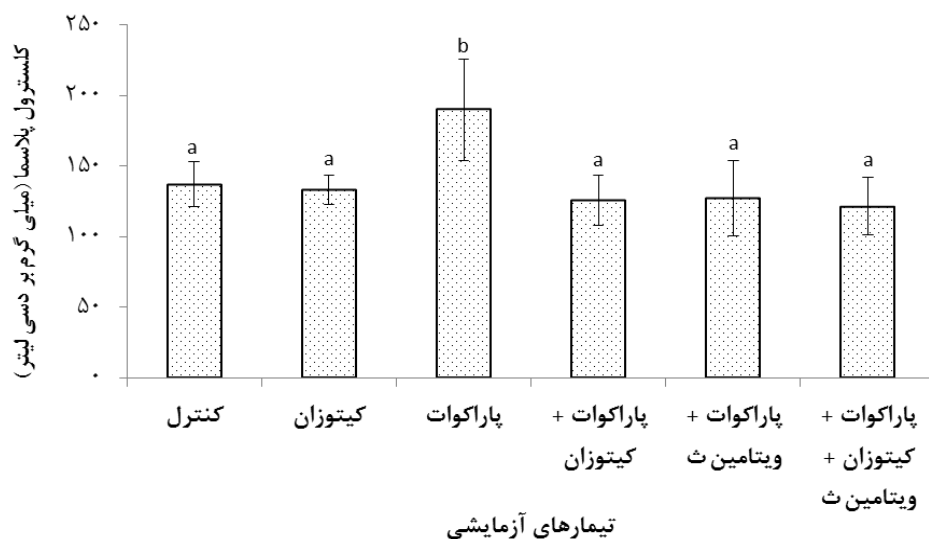
شکل ۹: تغییرات سطح گلوکز در خون ماهیان؛ اختلاف معنی دار بین گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل با حروف الفبای انگلیسی مشخص شده است. حروف غیرمشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها است ($p < 0.05$).

پاراکوات با مکمل غذایی حاوی ویتامین C به تنهایی و ویتامین C توام با کیتوزان موجب تنظیم سطح گلوکز و حفظ آن در سطح کنترل شد (شکل ۹).

قرار گرفتن ماهیان در معرض پاراکوات موجب افزایش معنی داری سطح گلوکز خون نسبت به گروه‌های ۱ و ۲ گردید. براساس نتایج بدست آمده تغذیه ماهیان در معرض

شریفی‌نسب و همکاران تأثیر حفاظتی ویتامین C و کیتوزان بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون ماهی کپور معمولی در...

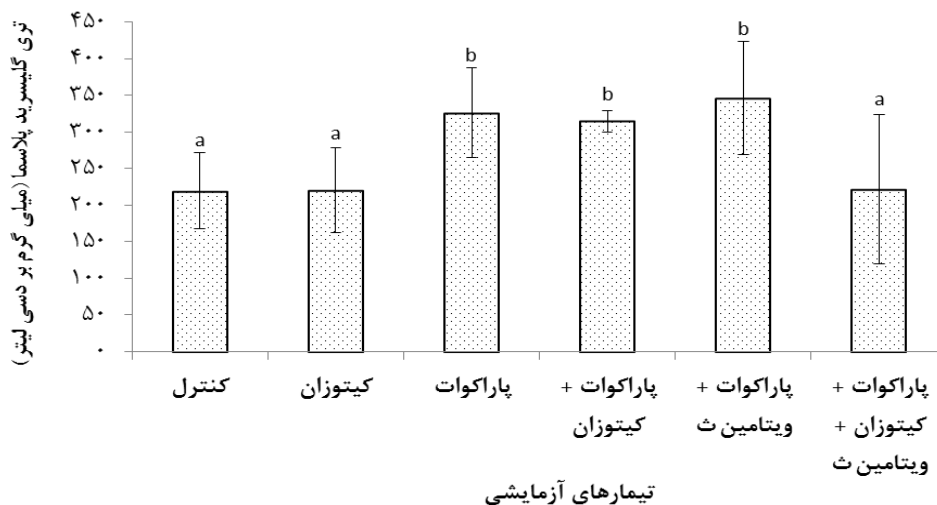
افزایش معنی‌داری در سطح کلسترول خون ماهیان در معرض پاراکوات (به تنهایی) مشاهده شد. تجویز ویتامین C و کیتوزان به ماهیان تحت تیمار پاراکوات مانع از افزایش سطح کلسترول گردید (شکل ۱۰).



شکل ۱۰: تغییرات سطح کلسترول در خون ماهیان؛ اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل با حروف الفبای انگلیسی مشخص شده است. حروف غیرمشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($p < 0.05$).

کیتوزان به ماهیان تحت تیمار پاراکوات مانع از افزایش سطح تری‌گلیسرید خون گردید (شکل ۱۱).

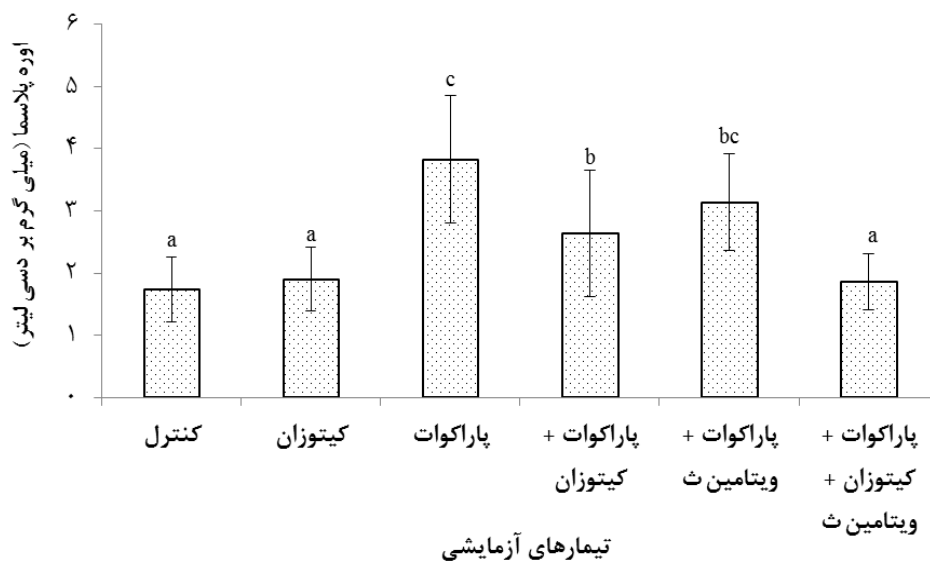
سطح تری‌گلیسرید خون در ماهیان در معرض پاراکوات به طور معنی‌داری بیشتر از سطح تری‌گلیسرید خون ماهیان گروه کنترل است. تنها تجویز کمپلکس ویتامین C و



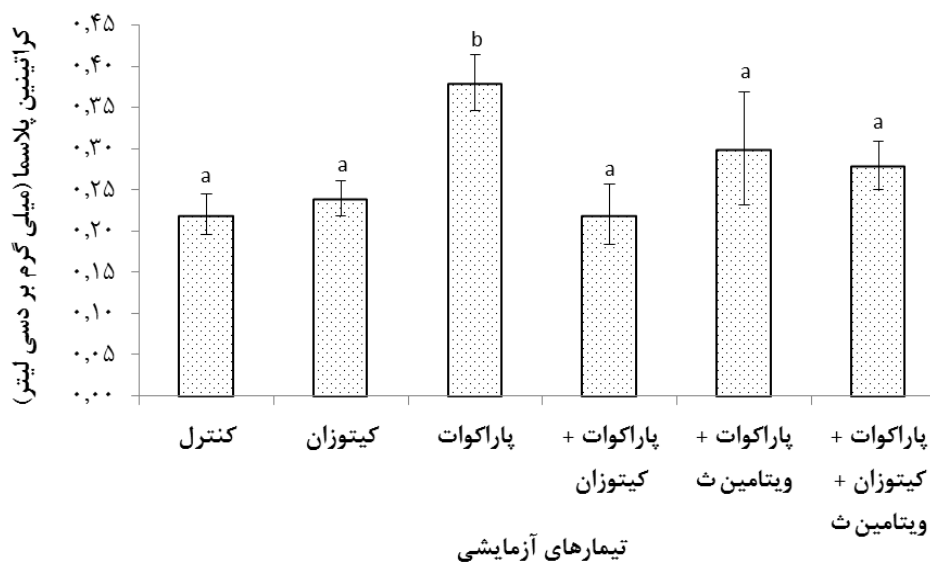
شکل ۱۱: تغییرات سطح تری‌گلیسرید در خون ماهیان؛ اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل با حروف الفبای انگلیسی مشخص شده است. حروف غیرمشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($p < 0.05$).

پاراکوات سبب گردید تا سطح اوره در حد کنترل باقی بماند (شکل ۱۲).

افزایش معنی داری در سطح اوره خون ماهیان در معرض پاراکوات در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد. تجویز کمپلکس ویتامین C و کیتوزان به ماهیان تحت تیمار



شکل ۱۲: تغییرات سطح اوره در خون ماهیان؛ اختلاف معنی دار بین گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل با حروف الفبای انگلیسی مشخص شده است. حروف غیرمشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها است ($p < 0.05$).



شکل ۱۳: تغییرات سطح کراتینین در خون ماهیان؛ اختلاف معنی دار بین گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل با حروف الفبای انگلیسی مشخص شده است. حروف غیرمشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها است ($p < 0.05$).

بدست آمده تغذیه ماهیان در معرض پاراکوات با مکمل غذایی حاوی ویتامین C، کیتوزان به تنهایی و یا بصورت

قرار گرفتن ماهیان در معرض پاراکوات موجب افزایش معنی داری سطح کراتینین خون گردید. براساس نتایج

کمپلکس ویتامین C و کیتوزان موجب کاهش سطح کراتینین شد (شکل ۱۳).

بحث

در این مطالعه، تاثیر حفاظتی ویتامین C و کیتوزان بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون ماهی در معرض پاراکوات مورد بررسی قرار گرفت. علف‌کش پاراکوات ممکن است از طریق متیلاسیون (منومتیل دی‌پیریدون) و یا اکسیداسیون (پاراکوات پیریدین و پاراکوات پیریدین) در سلول‌های کبدی تجزیه و سپس متابولیت‌های آن از بدن دفع می‌گردد (Ahmad et al., 2010; Ranjbar, 2014). متابولیسم پاراکوات در سلول‌ها با تولید رادیکال‌های آزاد همراه است؛ در طی فرایند متابولیسم، پاراکوات در حضور اکسیژن به سرعت اکسید شده 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). این رادیکال‌های آزاد از طریق پراکسیداسیون لیپیدی فسفولیپیدهای غشای سلولی (Mussi and Calcaterra, 2010) و همچنین دیپلریزاسیون نمودن غشای میتوکندری بر تراوایی و نفوذ پذیری غشای سلولی و میتوکندری‌ها اثر می‌گذارد و با ایجاد حالت تورم میتوکندریایی و نیز ایجاد اختلال در عملکرد این اندامک سبب مرگ سلولی شود (Jang et al., 2015). از اینرو آسیب وارده به غشای سلولی، سبب آزاد شدن آنزیم‌های درون سلولی به مایعات خارج سلولی و افزایش سطح آنها در خون شود (Banaee et al., 2011).

لذا افزایش سطح آنزیم آسپاراتات آمینوترانسفراز در خون ماهیان در معرض پاراکوات را می‌توان به مسمومیت سلولی و آسیب وارده به غشای سلولی سلول‌های کبد، سلول‌های میوکارد قلب، ماهیچه‌های اسکلتی، کلیه، مغز و آبشش ماهیان نسبت داد. افزایش سطح آلانین آمین-ترانسفراز نیز ممکن است به دلیل انسداد کیسه صفراوی، نکرور بافت کبد، آسیب وارده به غشای سلولی، به ویژه

سلول‌های کبد، کلیه‌ها، قلب، سلول‌های ماهیچه‌ای و گلبول‌های قرمز خون باشد (Banaee et al., 2016). افزایش سطح آلکالین فسفاتاز در خون ممکن است ناشی از آسیب وارده به کبد، مسمومیت کبدی و هیپرپلازی کبدی، آسیب به سلول‌های کوپفر مجاری صفراوی، روده و گرانولوسیت‌ها، باشد (Banaee et al., 2016).

اگرچه افزودن مکمل ویتامین C و کیتوزان به صورت مجزا به جیره غذایی می‌تواند از طریق افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلولی، کمک به نوسازی گلوپروتئین احیا (GSH)، آلفا توکفرول، و بتا کاروتن (Kim et al., 2009; Sun et al., 2011; Awadalla, 2012) حذف ترکیبات واکنشگر فعال اکسیژنی (ROS) و رادیکال‌های آزاد (Padayatty et al., 2003; Je and Kim, 2006; Yoon et al., 2011; Awadalla, 2012) و نیز تسریع روند ترمیم بافت‌ها و پیش‌گیری از پراکسیداسیون لیپیدی غشای سلولی عملکرد فیزیولوژیکی غشای سلولی را در حد مطلوبی حفظ کرده و در مواردی مانع از آزاد شدن آنزیم‌ها به خارج از سلول و افزایش سطح فعالیت آنها در خون می‌گردد. اما قابلیت بالای کیتوزان در انتقال زیستی ویتامین C (Alishahi et al., 2011a,b)، و کارایی بالای کمپلکس ویتامین C و کیتوزان در جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدی غشای سلولی و حفظ عملکرد فیزیولوژیکی غشای سلولی سبب شده که نتایج بدست آمده در زمان تجویز کمپلکس ویتامین C و کیتوزان از نظر آماری مقبولیت بیشتری داشته باشد. تاثیر کیتوزان و مشتقات آن در تنظیم سطح فعالیت آنزیم‌های AST و ALT در پلاسما موش‌های آزمایشی تحت تیمار تراکلرید کربن گزارش شده است (Yan et al., 2006).

آسیب‌های شدید هیستوپاتولوژیک به کبد، پانکراس، قلب، آبشش‌ها و کلیه‌ها ممکن است عامل اصلی کاهش سطح سنتز لاکتات دهیدروژناز در بافت‌ها و نیز کاهش سطح آن در خون ماهیان در معرض پاراکوات باشد. تغذیه ماهیان در معرض پاراکوات به مکمل غذایی حاوی کمپلکس ویتامین C و کیتوزان موجب تنظیم سطح

ساختار پروتئین‌ها و عملکرد آنها تأثیر گذارد (Dere and Dağ, 2003) و موجب شکسته شدن و آلکیلاسیون پروتئین‌ها گردد (Jaiswal *et al.*, 2002). کاهش گلوبولین پلاسما و سطح آلبومین ممکن است با کاهش در سطوح کل پروتئین در پلاسما در ارتباط باشد (Jaiswal *et al.*, 2002). کاهش سطح آلبومین و گلوبولین ممکن است به دلیل اثر پاراکوات در بیوسنتز آلبومین در کبد، اختلال عملکرد کبد، سندرم نفروتیک و سوء تغذیه باشد (Ahmad *et al.*, 2012; Banaee, 2013). تجویز ویتامین C به تنهایی و همچنین کمپلکس ویتامین C و کیتوزان ممکن است به دلیل پیشگیری از آسیب سلولی و نیز نقش ویتامین C و کیتوزان در ترمیم آسیب‌های وارده به کبد سطح پروتئین کل پلاسما در ماهیان در معرض پاراکوات را در سطح نرمال نگاه می‌دارد. تأثیر حفاظتی کیتوزان و مشتقات آن بر سلول‌های کبدی موش‌های آزمایشی تحت تیمار تتراکلرید کربن (Yan *et al.*, 2006)، پاراکوات (Yoon *et al.*, 2011) نیز موید همین امر است.

کلسترول، لیپید مورد نیاز در شکل‌گیری غشای سلولی را تامین می‌کند. کلسترول همچنین به عنوان پیش ماده در تشکیل نمک‌های صفراوی، سنتز کورتیکواستروئیدها، استروئیدهای جنسی نقش دارد. بخشی از کلسترول از طریق رژیم غذایی و بخش دیگر توسط کبد و لایه مخاطی روده سنتز می‌شود. افزایش کلسترول در خون ماهیان در معرض پاراکوات ممکن است ناشی از بروز اختلال در متابولیسم لیپوپروتئین‌ها، آسیب پاتولوژیک کبدی و کلیوی و یا اختلال در سیستم غدد ترشحی درون‌ریز باشد. بی‌اشتهایی عصبی ناشی از آسیب وارده به سیستم عصبی ماهیان نیز می‌تواند یکی دیگر از دلایل افزایش کلسترول در خون ماهیان در معرض پاراکوات باشد (Banaee *et al.*, 2016). تجویز ویتامین C و کیتوزان به ماهیان تحت تیمار پاراکوات موجب گردید تا پیشگیری از آسیب وارده به بافت کبد سطح کلسترول در حد نرمال نگه دارد. تری‌گلیسریدها منبع تامین انرژی برای فرایندهای مختلف متابولیکی در بدن است. تری‌گلیسرید اضافی نیز به صورت بافت چربی در بدن ذخیره می‌شود و اسیدهای چرب مواد

فعالیت آنزیم‌های LDH و بازگشت آن به سطح نرمال شد. ویتامین C به دلیل داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی می‌تواند با حذف رادیکال‌های آزاد و پیشگیری از پراکسیداسیون لیپیدی غشای سلولی موش‌های آزمایشگاهی در معرض کلورپیریفوس، مانع از تغییر سطح فعالیت آنزیم‌های کبدی در خون شود (Ambali and Ayo, 2012).

کاهش سطح فعالیت استیل کولین‌استراز در خون ماهیان در معرض پاراکوات ممکن است نشان دهنده تأثیر این آفت‌کش در ممانعت از فعالیت این آنزیم در گلبول‌های قرمز، آبشش‌ها مغز، پلاسما و عضلات باشد (Banaee *et al.*, 2016). کاهش سطح فعالیت استیل کولین‌استراز می‌تواند به بروز اختلالات عصبی و رفتاری در ماهیان منتج شود (Banaee *et al.*, 2011). تجویز مکمل غذایی حاوی کمپلکس ویتامین C و کیتوزان به ماهیان در معرض پاراکوات به موجب تنظیم سطح فعالیت آنزیم‌های AChE و بازگشت آن به سطح نرمال شد. تجویز مکمل خوراکی ویتامین C تأثیر معنی‌داری در حفظ سطح فعالیت آنزیم استیل کولین‌استراز در مغز موش‌های آزمایش تحت تیمار سم اسکوپولامین (نوعی آلکالوئید گیاهی) داشت (Lee *et al.*, 2001). تجویز ویتامین C توانست با تنظیم سطح فعالیت استیل کولین‌استراز از کاهش فعالیت این نوروترانسمیتر عضلانی در موش‌های تحت تیمار کلورپیریفوس جلوگیری کند (Ambali and Ayo, 2012). نقش ویتامین C در بهبود سطح فعالیت آنزیم استیل کولین‌استراز در موش‌های تحت تیمار متیداتینون نیز گزارش شده است (Yavuz *et al.*, 2004).

کاهش در پروتئین کل نشان دهنده افزایش بسیج ذخایر پروتئین برای انطباق با شرایط تنش است. سوء تغذیه، کاهش بهره‌وری کبد در سنتز پروتئین، و کاهش جذب مواد غذایی، به ویژه پروتئین، در دستگاه گوارش ممکن است از عوامل مهم در کاهش پروتئین کل پلاسما باشد. واکنش پاراکوات یا متابولیت‌های آزاد آن با اسیدهای آمینه‌ای نظیر فنیل‌آلانین، متیونین، سیستئین، هیستیدین و تریپتوفان و تغییر ماهیت آنها می‌تواند بر

دفع کراتینین اضافی در خون باشد (Banaee *et al.*, 2016). براساس نتایج بدست آمده تغذیه ماهیان در معرض پاراکوات با مکمل غذایی حاوی ویتامین C، کیتوزان به تنهایی و یا بصورت کمپلکس ویتامین C و کیتوزان موجب کاهش سطح کراتینین شد. تحقیقات نشان می‌دهد که در افراد مبتلا به نارسایی‌های کلیوی با افزایش سطح آنتی‌اکسیدان‌های نظیر ویتامین C در جیره غذایی، از میزان کراتینین خون کاسته می‌شود (Chen *et al.*, 2002).

اگرچه بخش قابل توجهی از محصول متابولیکی نیتروژنی در ماهیان به صورت آمونیاک از طریق آبشش‌ها دفع می‌گردد، اما مقدار بسیاری اندکی از محصول متابولیکی نیتروژنی در ماهیان به صورت اوره از طریق کلیه‌ها دفع می‌شود. لذا افزایش سطح اوره در خون ماهیان در معرض پاراکوات ممکن است ناشی از آسیب وارده به کلیه‌ها و اختلال در دفع اوره از خون است. تجویز کمپلکس ویتامین C و کیتوزان به ماهیان تحت تیمار پاراکوات سبب گردید تا سطح اوره در حد نرمال باقی بماند.

عدم تعادل بین ترکیبات واکنشگر فعال اکسیژنی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در ماهیان در معرض پاراکوات از جمله دلایل مهم است که باعث تغییرات نامطلوب در فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون است. در نتیجه، در این مطالعه فرضیه مطرح شده در این پژوهش مبنی بر اینکه دارد، اما استفاده از مکمل ویتامین C، کیتوزان به ویژه به صورت کمپلکس می‌تواند بطور معنی‌داری تاثیر غلظت تحت کشنده پاراکوات بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون ماهی کپور معمولی را مرتفع نماید، مورد تأیید قرار گرفت.

تشکر و قدردانی

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

خام مورد نیاز برای سنتز گلوکز محسوب می‌شوند. افزایش سطح تری‌گلیسرید خون در ماهیان در معرض پاراکوات ممکن است ناشی از تجزیه چربی ذخیره در بافت‌ها به منظور تامین انرژی برای مقابله با اثر سمی پاراکوات باشد. سیروز کبدی، بی‌اشتهایی عصبی، نارسایی کلیوی از دیگر عوامل مؤثر در افزایش سطح تری‌گلیسرید خون در ماهیان در معرض پاراکوات است (Banaee *et al.*, 2016). تجویز کمپلکس ویتامین C و کیتوزان به ماهیان تحت تیمار پاراکوات موجب گردید تا سطح تری‌گلیسرید در حد نرمال باقی بماند.

افزایش گلوکز در خون ماهیان در معرض پاراکوات ممکن است به دلیل آسیب‌های شدید وارده به کبد، پانکراس، کلیه‌ها و اختلال در متابولیسم گلوکز و چربی باشد (Acker and Nogueira, 2012). براساس شواهد موجود، افزایش کورتیزول، افزایش نرخ تجزیه گلیکوژن ذخیره شده در کبد و عضلات و کاهش سطح فعالیت آنزیم گلوکز ۶ فسفات دهیدروژناز در هیپاتوسیت‌ها سبب افزایش گلوکز خون جهت تامین انرژی مورد نیاز برای مقابله با مسمومیت ماهیان با پاراکوات است (Sharifinasab *et al.*, 2016). براساس نتایج بدست آمده تغذیه ماهیان در معرض پاراکوات با مکمل غذایی حاوی ویتامین C به تنهایی و کمپلکس ویتامین C با کیتوزان موجب تنظیم سطح گلوکز و حفظ آن در سطح نرمال شد. ویتامین C می‌تواند با مهار اثر رادیکال‌های آزاد بر هیپاتوسیت‌ها از ذخایر گلیکوژنی کبد محافظت کند (Ambali and Ayo, 2012). تاثیر حفاظتی ویتامین C در حفظ و نوسازی ذخایر گلیکوژنی کبد موش‌های تحت تیمار کلورپیریفوس نیز مشاهده شده است (Ambali and Ayo, 2012).

کراتینین آخرین محصول متابولیسم کراتین در سلول ماهیچه‌های اسکلتی است که از طریق کلیه‌ها از بدن دفع می‌گردد. مقدار کراتینین خون متناسب با توده عضلانی است. لذا افزایش سطح کراتینین در خون ماهیان در معرض پاراکوات ممکن است ناشی از آسیب وارده به عضلات اسکلتی و یا بروز اختلال در عملکرد کلیه‌ها در

منابع

- albumin. PLOS One, 7(6): e38372. doi: 10.1371/journal.pone.0038372.
- Ahmad, I., Shukla, S., Kumar, A., Singh, B.K., Patel, D.K., Pandey, H.P. and 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): 566-79.
- Alishahi, A., Mirvaghefi, A., Tehrani, M.R., Farahmand, H., Koshio, S., Dorkoosh, F.A. and 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.
- Alishahi, A., Mirvaghefi, A., Tehrani, M.R., Farahmand, H., Shojaosadati, S.A., Dorkoosh, F.A. and Elsabee, M.Z., 2011b.** Shelf life and delivery enhancement of vitamin C using chitosan nanoparticles. *Food Chemistry*, 126(3): 935-940.
- Ambali, S.F. and Ayo, J.O., 2012.** Vitamin C attenuates chronic chlorpyrifos-induced alteration of neurobehavioral parameters in wistar rats. *Toxicology International*, 19(2): 144-152.
- Awadalla, E.A., 2012.** Efficacy of vitamin C against liver and kidney damage induced by paraquat toxicity. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64: 431-434.
- Banaee, M., Sureda, A., Mirvaghefi, A.R. and Ahmadi, K., 2011.** Effects of diazinon on biochemical parameters of
- Acker, C.I. and Nogueira, C.W., 2012.** Chlorpyrifos acute exposure induces hyperglycemia and hyperlipidemia in rats. *Chemosphere*, 89(5): 602-608.
- Ahmad, E., Rabbani, G., Zaidi, N., Ahmad, B. and Khan, R.H., 2012.** Pollutant-induced modulation in conformation and β -Lactamase activity of human serum blood in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99: 1-6.
- Banaee, M., 2013.** Physiological dysfunction in fish after insecticides exposure: Insecticides often undesired but still so Important, edited by Stanislav Trdan, Published by InTech. Chapter 4: 103-142.
- Banaee, M., Davoodi, M.H. and Zoheiri, F., 2013.** Histopathological changes induced by paraquat on some tissues of gourami fish (*Trichogaster trichopterus*). *Open Veterinary Journal*, 3(1): 36-42.
- Banaee, M., Sureda, A., Shahaf, S. and Fazilat, N., 2015.** Protective effects of silymarin extract on malathion-induced zebra cichlid (*Cichlasoma nigrofasciatum*) hepatotoxicity. *Iranian Journal of Toxicology*, 9(28): 1239-1246.
- Banaee, M., Nemadoost Haghi, B., Vaziriyani, M., Taheri, S. and Shahafve, S., 2016.** Effects of sub-lethal toxicity of paraquat on blood biochemical parameters of common carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758). *Iranian Journal of Toxicology*, Article in Press.

- Benhabiles, M.S., Salah, R., Lounici, H., Drouiche, N., Goosen, M.F.A. and Mameri, N., 2012.** Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. *Food Hydrocolloids*, 29(1): 48-56.
- Chen, J., He, J., Ogden, L.G., Batuman, V. and Whelton, P.K., 2002.** Relationship of serum antioxidant vitamins to serum creatinine in the US population, *American Journal of Kidney Diseases*, 39(3):460-468.
- Dere, E. and Dağ, Ş., 2003.** *In-vitro* interaction of paraquat with some amino acids. *Fen Bilimleri Dergisi*, 24(2): 7-17.
- El-Shenawy, N.S., El-Salmy, F., Al-Eisa, R.A. and El-Ahmary, B., 2010.** Amelioratory effect of vitamin E on organophosphorus insecticide diazinon induced oxidative stress in mice liver', *Journal of Pesticide Biochemistry and Physiology*, 96: 101-107.
- Evans, P. and Halliwell, B., 2001.** Micronutrients oxidant, antioxidant status. *British Journal of Nutrition*, 85: 67-74.
- Foster-Swanson, A., Swartzentruber, M. and Roberts, P., 1994.** Reference interval studies of the rate-blanked creatinine, Jaffe method on BM /Hitachi Systems in Six U.S. Laboratories (Abstract). *Clinical Chemistry*, No. 361.
- Grenha, A., Seijo, B. and Remuñan-Lopez, C., 2005.** Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 25: 427-437.
- Hsu, S.T., Chen, L.C., Leu, M.H., Hsiao, W.F., Lee, W.Y. and Pan, T.C., 2013.** Experimental improvement of preparation of acrylic acid-modified middle deacetylated chitosan and its application in absorbing paraquat. *Polymer Engineering and Science*, 53(3): 468-473.
- Jaiswal, R., Khan, M.A. and 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): 163-70.
- Jang, Y.J., Won, J.H., Back, M.J., Fu, Z., Jang, J.M., Ha, H.C., Hong, S.B., Chang, M. and Kim, D.K., 2015.** Paraquat induces apoptosis through a mitochondria-dependent pathway in RAW264.7 cells. *Biomolecules & Therapeutics*, 23(5): 407-413.
- Je, J.Y. and Kim, S.K., 2006.** Reactive oxygen species scavenging activity of amino derivatized chitosan with different degree of deacetylation. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 14: 5989-5994.
- Johnson, A.M., Rohlfs, E.M. and 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.
- Kavaz, D., Odabas, S., Demirbilek, M., Güven, E.Ö. and Denkbaz, E.B., 2010.** Bleomycin loaded magnetic chitosan

- nanoparticles as multifunctional nanocarriers. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 25: 305-318.
- Kim, J.N., Chang, I.Y., Kim, H.I. and Yoon, S.P., 2009.** Long-term effects of chitosan oligosaccharide in streptozotocin-induced diabetic rats. *Islets*, 1: 111-116.
- Knedel, M. and Boettger, R., 1967.** Kinetic method for determination of pseudocholinesterase (acetylcholine acylhydrolase) activity. *Wiener klinische Wochenschrift*, 45, 325-327.
- Lee, L., Kang, S.A., Lee, H.O., Lee, B.H., Jung, I.K., Lee, J.E. and Hoe, Y.S., 2001.** Effect of supplementation of vitamin E and vitamin C on brain acetylcholinesterase activity and neurotransmitter levels in rats treated with scopolamine, an inducer of dementia. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 47(5): 323-328.
- Limón-Pacheco, J. and Gonsebatt, M.E., 2009.** The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Journal of Mutation Research/Fundamental and Molecular*, 674: 137-147.
- Monteiro, D.A., de Almeida, J.A., Rantin, F.T. and Kalinin, A.L., 2006.** Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 143: 141-149.
- Moss, D.V. and Henderson, A.R., 1999.** Clinical enzymology In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 3rd Ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 617-721 p.
- Mussi, M.A. and Calcaterra, N.B., 2010.** Paraquat-induced oxidative stress response during amphibian early embryonic development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology Pharmacology*, 151(2): 240-247.
- Ozturk, I.C., Ozturk, F., Gul, M., Ates, B. and 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.
- Padayatty, S.J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.H., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S.K. and 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.
- Ranjbar, A., 2014.** Evidence of oxidative damage in paraquat toxicity. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 16(12): 1-7.
- Rifai, N., Bachorik, P.S. and Albers, J.J., 1999.** Lipids, lipoproteins and apolipoproteins. In: Burtis CA, Ashwood ER, eds. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 3rd ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia. pp.809-861.

- Sharifinasab, Z., Banaee, M., Mohiseni, M. and Noori, A., 2016.** Vitamin C and chitosan alleviate toxic effects of paraquat on some biochemical parameters in hepatocytes of common carp, *Iranian Journal of Toxicology*, 10(31): 31-41.
- Sun, T., Zhu, Y., Xie, J. and Yin, X., 2011.** Antioxidant activity of *N*-acyl chitosan oligosaccharide with same substituting degree. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 21 (2): 798-800.
- 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: 3912–23.
- Yan, Y., Wanshun, L., Baoqin, H., Bing, L. and Chenwei, F., 2006.** Protective effects of chitosan oligosaccharide and its derivatives against carbon tetrachloride induced liver damage in mice. *Hepatology Research*, 35: 178–184.
- Yavuz, T., Delibas, N., Yildirim, B., Altuntas, I., Candir, O., Cora, A., Karaman, N., Ibrsim, E. and Kutsal, A., 2004.** Vascular wall damage in rats induced by methidathion and ameliorating effect of vitamins E and C', *Archive Toxicology*, 78:655–659.
- 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.
- Yoon, S.P., Han, M.S., Kim, J.W., Chang, I.Y., Kim, H.L., Chung, J.H. and Shin, B.C., 2011.** Protective effects of chitosan oligosaccharide on paraquat-induced nephrotoxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 49(8): 1828-1833.
- Yuan, W.P., Liu, B., Liu, C.H., Wang, X.J., Zhang, M.S., Meng, X.M. and 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.

Protective effects of vitamin C and chitosan on blood biochemical parameters in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to paraquat

Sharifinasab Z.¹; Banaee M.^{1*}; Nematdoost Haghi B.¹; Noori A.²

*mahdibanaee@yahoo.com

1-Behbahan Khatam Alanbia University of Technology, Natural Resources and Environmental Faculty, Aquaculture Department, Behbahan, Iran

2-Hormozgan University, Marine Science and Technology Faculty, Aquaculture Department, Bandar Abbas, Iran

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the protective effects of vitamin C and chitosan on blood biochemical parameters of common carp which are exposed to paraquat. Fish were fed enriched diet with chitosan (1000 mg Kg⁻¹ feed), Vitamin C (1000 mg Kg⁻¹ feed) and vitamin C combined with chitosan and were simultaneously exposed to 0.02 mg L⁻¹ paraquat for 21 days. The results of this study showed that paraquat significantly increased aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP) activities, and significantly increased glucose, cholesterol, triglycerides, urea and creatinine levels as compared with control group (p<0.05); However, paraquat decreased (p<0.05) lactate dehydrogenase (LDH), acetylcholinesterase (AChE) activities and total protein and globulin levels. Paraquat had not effect on plasma albumin levels Compared with the control group (p>0.05). Although administration of vitamin C or chitosan (alone) prevented changes in certain blood biochemical parameters in fish exposed to paraquat, the results showed that antioxidant properties of vitamin C are more than chitosan. However, administration of vitamin C and chitosan complex may prevent oxidative stress and inhibit changes in blood biochemical parameters in fish exposed to paraquat.

Keywords: Paraquat, Vitamin C, Chitosan, Oxidative stress, Biochemical parameters

*Corresponding author