

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 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. در این آزمایش، شاخص‌های استرس اکسیداتیو نظیر فعالیت آنزیم کاتالاز، آنتی‌اکسیدان کل و مالون‌دی‌آلدهید و پارامترهای بیوشیمیایی سلولی نظیر فعالیت آنزیم‌های آسپاراتات آمینوترانسفراز، آلانین آمینوترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز اندازه‌گیری شد. سطح فعالیت آنزیم‌های آسپاراتات آمینوترانسفراز، آلانین آمینوترانسفراز، لاکتات دهیدروژناز و کاتالاز و همچنین سطح مالون‌دی‌آلدهید 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، مالون‌دی‌آلدهید در سلول‌های آبششی گردید، اما سطح فعالیت این آنزیم در این ماهی‌ها همچنین به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود ($P < 0.05$). تجویز ویتامین C و کیتوزان تأثیر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم‌های آسپاراتات 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.

مقدمه

بر اساس آمارنامه کشاورزی در سال ۱۳۹۰، بیش از ۱۱۸۱۱۸۷ لیتر انواع مختلف علف کش در ایران توسط کشاورزان و باغداران خریداری و مصرف گردیده است. پاراکوات (۱،۱-دی متیل ۴،۴-بی پیریدیلیوم دی کلراید) یکی از پرکاربردترین علف کش های حال حاضر در صنعت کشاورزی است. این علف کش برای جانوران بسیار سمی بوده و گزارش های زیادی در دهه های اخیر از مسمومیت انسان ها و جانوران با این علف کش گزارش شده است (Awadalla, 2012). کارایی بالا، قیمت مناسب و امکان استفاده از این علف کش در مزارع مختلف کشاورزی و باغ های میوه سبب شده که پاراکوات جزء ۵ علف کش پر مصرف در ایران محسوب می گردد (آمارنامه کشاورزی، ۱۳۹۰). این علف کش ممکن است از طریق وزش باد در حین سم پاشی و یا زهکش یا آبخویی مزارع کشاورزی پس از سم پاشی وارد آب های سطحی شده و بر آبزیان ساکن در اکوسیستم های نزدیک به زمین های کشاورزی تأثیر گذارد. ماهی ها یکی از مهم ترین گونه های آبرزی ساکن آب های آلوده هستند که تحت تأثیر این سم قرار دارند. پاراکوات مانند دیگر آلاینده های محیطی ممکن است از طریق آبخش ها، پوست و سیستم گوارشی ماهی ها جذب شود و از طریق خون به دیگر بافت های بدن انتقال یابد (Banaee et al., 2013).

یکی از مهم ترین بافت هایی که بیشترین تأثیر را از مسمومیت با پاراکوات می پذیرد، سیستم تنفسی جانوران است (Awadalla, 2012)؛ زیرا پاراکوات در محیط غنی از اکسیژن ممکن است تحت تأثیر یک کاهنده الکترونی به رادیکال آزاد تبدیل شده و

به سرعت با مولکول اکسیژن وارد واکنش گردد. از این رو در محیط های غنی از اکسیژن سمیت پاراکوات افزایش می یابد زیرا در چنین شرایطی تشکیل رادیکال های سوپر اکسید بیشتر خواهد بود (Tomita et al., 2007). پاراکوات ممکن است از طریق یک سیستم چند گانه سبب ایجاد مسمومیت و بروز آسیب به غشای سلولی گردد (Awadalla, 2012). نیتریک اکسید های تولید شده در طی فرایند سم زدایی پاراکوات نقش مهمی در ایجاد سمیت سلولی دارند. در واقع نیتریک اکسید ها مهم ترین عامل مختل کننده فرایند انتقال الکترون در زنجیره تنفسی میتو کندری سلول ها محسوب می شوند (Tomita et al., 2001). از این رو پاراکوات با ایجاد اختلال در سیستم انتقال الکترونی در میتو کندری سلول ها، مانع از احیای NADP به NADPH می گردد و این اختلال می تواند منجر به تشکیل آنیون سوپر اکسید، رادیکال اکسیژن و رادیکال های پروکسیل و هیدروکسیل شود (Awadalla, 2012). بدین ترتیب این ترکیبات فعال واکنشگر اکسیژنی (ROS) ممکن است با چربی های غیر اشباع غشای اندامک های سلولی واکنش داده و زمینه را برای مرگ سلول مهیا سازد. تبدیل پراکسیداسیونی اکسیژن به رادیکال های سوپر اکسید و پراکسید هیدروژن نیز ممکن است از طریق پراکسیداسیون لیپیدی غشای سلولی موجب برهم خوردن تعادل فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سلول ها گردد.

اگرچه در بسیاری از مناطق دنیا قوانین زیست محیطی متعددی جهت ایجاد محدودیت در استفاده از آفت کش ها وضع شده و استانداردهای برای نحوه و میزان مصرف آن ها در حد قابل قبول

تعریف شده است؛ اما این تلاش‌ها هنوز در بسیار از کشورهای در حال توسعه غالباً نتیجه مطلوبی در پی نداشته است. از این رو محققین تلاش‌هایی در جهت شناخت هرچه بیشتر سیستم سم‌زدایی آبزیان و نیز چگونگی تقویت و ارتقای آن به منظور 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.

اسکوریک 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 به عنوان یک دهنده الکترون عمل می‌کند و با احیا و خنثی کردن رادیکال‌های آزاد پیش از واکنش آن‌ها با مولکول‌های زیستی، به عنوان 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). از این رو، 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 بردن 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 به عنوان 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 مورد استفاده 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 به وسیله آبشش‌ها مؤثر باشد.

بر اساس آمارنامه کشاورزی در سال ۱۳۹۰، بیش از ۱۱۹۶۸ باب مزرعه پرورش ماهیان گرم‌آبی در تولید انواع گونه‌های ماهیان گرم‌آبی فعال هستند و میزان تولید این مزارع بیش از ۱۳۲۴۸۹ تن گزارش شده 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 به ویژه علف‌کش پاراکوات بسیار محتمل است. از سویی دیگر تهیه و نگهداری ماهی کپور معمولی و سازگار نمودن آن با شرایط آزمایشگاهی در مقایسه با دیگر گونه‌های

پرورشی و وحشی موجود در استان خوزستان، بسیار ساده تر و راحت تر است.

ازاین رو با توجه به ویژگی های کیتوزان در نقل وانتقال ویتامین ها در سیستم های زیستی و همچنین با در نظر گرفتن خواص آنتی اکسیدانی ویتامین C و کیتوزان این فرضیه مطرح می شود که تجویز ویتامین C و کیتوزان به تنهایی و یا همراه با یکدیگر ممکن است در کاهش اثرات سمی پاراکوات و نیز تقویت سیستم دفاع آنتی اکسیدانی آبشش ماهی های در معرض پاراکوات مؤثر باشد؛ بنابراین، هدف این مطالعه بررسی تأثیر حفاظتی ویتامین C و کیتوزان در برابر استرس اکسیداتیو ایجاد شده در سلول های آبششی ماهی های کپور معمولی در معرض پاراکوات است. ازاین رو در این مطالعه فعالیت سیستم دفاع آنتی اکسیدانی و پارامترهای بیوشیمیایی سلول های آبششی ماهی های در معرض پاراکوات و نیز تأثیر تجویز ویتامین C و کیتوزان در برقراری تعادل بین نرخ پراکسیداسیون لیپیدی و ظرفیت آنتی اکسیدانی سلولی و سطح فعالیت آنزیم های درون سلولی آبشش ماهی ها اندازه گیری شده است.

مواد و روش ها

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

۱۸۰ عدد ماهی کپور معمولی ($37/65 \pm 4/40$) گرمی) از یک مزرعه ی خصوصی واقع در شهرستان

بهبهان، استان خوزستان خریداری و به آزمایشگاه تکثیر و پرورش آبزیان دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء (ص) بهبهان، انتقال داده شد. پس از انتقال، ماهی ها به طور 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، ماهی ها به مدت ۲ هفته با شرایط آزمایشگاهی (دمای آب 24 ± 2 سانتی گراد، دوره ی نوری ۱۴ ساعت روشنایی: ۱۰ ساعت تاریکی، اکسیژن 6 ± 1 میلی گرم در لیتر، $pH: 7/6 \pm 0/2$) سازگار گردیدند. در طی دوره ی سازگاری ماهی ها با جیره ی تجاری کپور به صورت دو بار در روز و معادل ۲٪ وزن بدن تغذیه شدند.

آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی و با ۶ تیمار آزمایشی شامل ماهی های گروه کنترل (گروه ۱)؛ ماهی های گروه ۲ که با جیره غذایی حاوی ۱۰۰۰ میلی گرم کیتوزان به ازای هر کیلو گرم غذای فرموله شده تجاری تغذیه شدند؛ ماهی های گروه ۳ که در معرض $0/02$ میلی گرم بر لیتر پاراکوات قرار گرفتند؛ ماهی های گروه ۴ که هم زمان با قرار گرفتن در معرض $0/02$ میلی گرم بر لیتر پاراکوات، با جیره غذایی حاوی ۱۰۰۰ میلی گرم کیتوزان به ازای هر کیلو گرم غذای فرموله شده تجاری تغذیه شدند؛ ماهی های گروه ۵ که هم زمان با قرار گرفتن در معرض $0/02$ میلی گرم بر لیتر پاراکوات، با جیره غذایی حاوی ۱۰۰۰ میلی گرم ویتامین C به ازای هر کیلو گرم غذای فرموله شده تجاری تغذیه گردیدند؛ و ماهی های گروه ۶ که هم زمان با قرار گرفتن در معرض $0/02$ میلی گرم بر لیتر پاراکوات، با جیره غذایی حاوی ۱۰۰۰ میلی گرم کیتوزان و ۱۰۰۰ ویتامین C به ازای هر کیلو گرم غذای

فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس فرایند تجزیه پراکسید هیدروژن و تشکیل کمپلکس با ثبات با مولیبدات آمونیوم اندازه گیری گردید. سپس تغییرات رنگی کمپلکس مولیبدات و پراکسید هیدروژن در طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانش شد. فعالیت آنزیم کاتالاز در نهایت بر اساس فرمول ذیل محاسبه گردید.

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

بلاک ۱، شامل ۱ میلی لیتر سوبسترا (پراکسید هیدروژن)، ۱ میلی لیتر مولیبدات و ۲ میلی لیتر آب مقطر است. بلاک ۲، شامل ۱ میلی لیتر سوبسترا (پراکسید هیدروژن)، ۱ میلی لیتر مولیبدات و ۲ میلی لیتر بافر فسفات است. بلاک ۳، شامل ۱ میلی لیتر بافر فسفات، ۱ میلی لیتر مولیبدات و ۲ میلی لیتر بافر فسفات است.

ظرفیت آنتی اکسیدان کل سلولی به روش توانای احیای آهن فریک به فرو اندازه گیری شد (روش FRAP). به طور خلاصه، محلول معرف FRAP شامل ۵ میلی لیتر محلول ۱۰ میلی مول بر لیتر TPTZ یا ۶،۴،۲-تری پیریدیل اس تریازین در محلول ۴۰ میلی مول بر لیتر اسید کلریدریک به اضافه ۵ میلی لیتر کلراید آهن سه ظرفیتی (۲۰ میلی مول بر لیتر) و ۵۰ میلی لیتر بافر فسفات (۰/۳ میلی مول بر لیتر با pH: ۳/۶) است که بایستی به صورت تازه تهیه گردد. ۱۰۰ میکرو لیتر از نمونه مجهول با ۳ میلی لیتر محلول معرف FRAP مخلوط می گردد. محلول TPTZ-Fe²⁺ آبی رنگ است و میزان جذب نوری در طی ۵ دقیقه در طول موج ۵۹۳ نانومتر به وسیله اسپکتوفتومتر قرائت گردید. جهت رسم منحنی استاندارد نیز از محلول سولفات آهن ۷ آب در

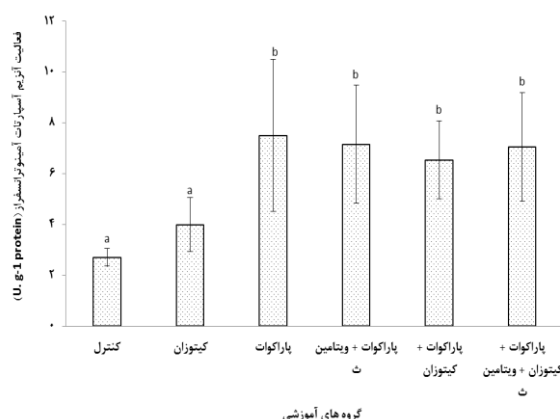
فرموله شده تجاری تغذیه شدند؛ انجام گردید. دوره آزمایش ۲۱ روز در نظر گرفته شده است. در طی آزمایش و در زمان تعویض آب، معادل حجم آب تعویضی مجدداً محلول پاراکوات به آب افزوده شد.

در پایان روز بیست و یکم، ۹ ماهی از هر گروه صید و بی هوش شدند. پس از آسان کشی، آبشش ماهی ها 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 سانتیفریوژ با ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد. محلول رویی جهت اندازه گیری پارامترهای بیوشیمیایی جمع آوری و تا زمان انجام آنالیزهای بیوشیمیایی (حداکثر به مدت ۲ هفته) در دمای ۲۵- درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

اندازه گیری فاکتورهای بیوشیمیایی خون با استفاده از کیت های تهیه شده از شرکت پارس آزمون و با دستگاه اسپکتوفتومتر UV/VIS یونیکو (ساخت آمریکا) مدل ۲۱۰۰ صورت گرفت.

اندازه گیری سطح فعالیت آنزیم آسپارات 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 طول موج ۳۴۰ نانومتر و در طی ۳ دقیقه اندازه گیری 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).



شکل ۱: تغییرات سطح فعالیت آنزیم آسپاراتات آمینوترانسفراز در بافت آبششی ماهی ها

افزایش معنی داری در سطح فعالیت آنزیم آسپاراتات آمینوترانسفراز در سلول های آبششی ماهی های در معرض پاراکوات در مقایسه با ماهی های گروه کنترل مشاهده شد ($P < 0.05$). نتایج نشان داد که تجویز ویتامین C و کیتوزان به ماهی های در معرض پاراکوات نیز تأثیر در بازگشت سطح فعالیت این آنزیم به سطح نرمال نداشت (شکل ۱).

قرار گرفتن ماهی ها در تماس با پاراکوات سبب افزایش معنی دار سطح فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز در سلول های آبششی ماهی ها گردید. علاوه بر این تجویز ویتامین C و کیتوزان به ماهی های در معرض پاراکوات نیز تأثیر در تنظیم سطح فعالیت این آنزیم در مقایسه با گروه کنترل نداشت. هرچند اختلاف معنی داری بین سطح فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز در گروه های تحت تیمار پاراکوات و کیتوزان و همچنین پاراکوات و ویتامین C با ماهی های تحت تیمار کیتوزان مشاهده نشد (شکل ۲).

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

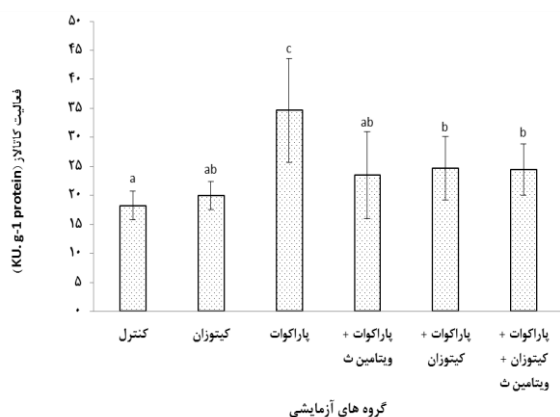
مالون دی آلدئید (MDA) با استفاده از اسید تیوباربتوریک سنجیده و بر اساس میکرو مول بر گرم بافت بیان می شود. در این روش جذب نوری محلول صورتی رنگ تشکیل شده در طول موج ۵۳۲ نانومتر قرائت شد. در این آزمایش از تترا اتوکسی پروپانول و اتانول مطلق به عنوان استاندارد مالون دی آلدئید استفاده گردید (Placer et al., 1966).

اندازه گیری پروتئین تام عصاره بافتی بر اساس واکنش بایوره صورت گرفت. شدت جذب نور در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه گیری و برحسب میزان جذب نوری OD و سطح پروتئین استاندارد و بر اساس فرمول ارائه شده در کاتالوگ کیت محاسبه شد. استاندارد پروتئین تام نیز باید به صورت جداگانه تهیه گردد (Johnson et al., 1999).

نرمال بودن داده ها بر اساس آزمون Kolmogorov-Smirnov مورد ارزیابی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده ها به روش تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) در سطح اطمینان ۹۵٪ ($P < 0.05$) و با استفاده از نرم افزار SPSS 19 (IBM) انجام شد؛ مقایسه میانگین ها نیز با آزمون دانکن صورت گرفت. نتایج به صورت میانگین به همراه انحراف معیار نشان داده شده است.

نتایج

تغییر در پارامترهای بیوشیمیایی در سلول های آبششی ماهی ها در شکل ۱-۶ ارائه شده است. در طول دوره آزمایش هیچ گونه مرگ و میری در بین گروه های مختلف آزمایشی مشاهده نگردید.

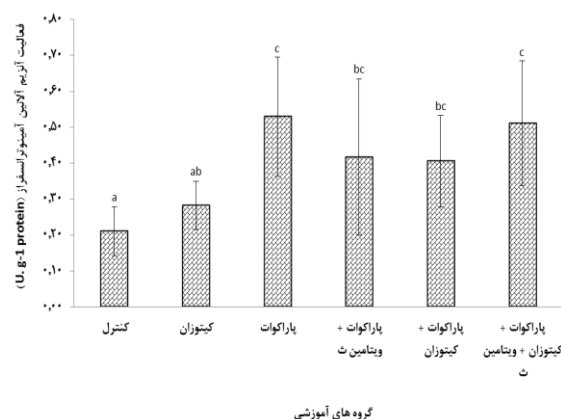


شکل ۴: تغییرات سطح فعالیت آنزیم کاتالاز در بافت آبششی ماهی‌ها

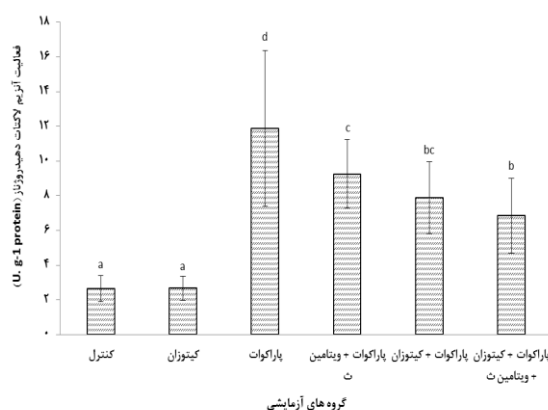
سطح فعالیت آنزیم کاتالاز در سلول‌های آبششی ماهی‌های در معرض پاراکات به طور معنی داری بیشتر از ماهی‌های گروه کنترل بود ($P < 0.05$). اگرچه تجویز ویتامین C، کیتوزان به ماهی‌های در معرض پاراکات سبب کاهش معنی دار سطح فعالیت آنزیم کاتالاز در سلول‌های آبششی گردید، اما سطح فعالیت این آنزیم در این ماهی‌ها همچنین به طور معنی داری بیشتر از گروه کنترل بود (شکل ۴).

نتایج نشان داد که سطح مالون دی آلدئید در بافت آبششی ماهی‌ها پس از تماس با پاراکات به طور معنی داری افزایش یافت ($P < 0.05$). تجویز ویتامین C و ویتامین C همراه با کیتوزان در آبشش ماهی‌های در معرض پاراکات سبب کاهش معنی دار سطح مالون دی آلدئید در مقایسه با گروه تحت تیمار پاراکات به تنهایی گردید. با این وجود هنوز سطح مالون دی آلدئید در بافت آبششی این ماهی‌ها به طور معنی داری بیشتر از گروه کنترل بود (شکل ۵).

سطح آنتی اکسیدان کل سلولی در بافت آبشش در معرض پاراکات به طور معنی داری کمتر از ماهی‌های



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



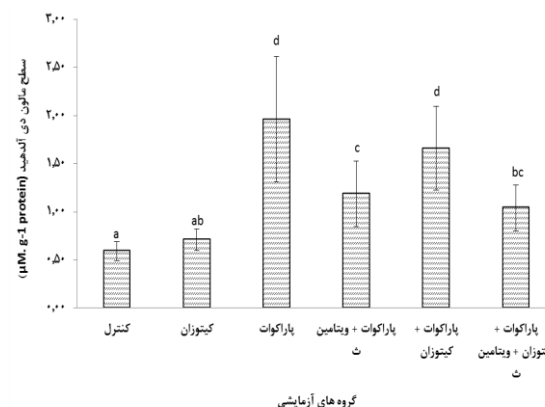
شکل ۳: تغییرات سطح فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در بافت آبششی ماهی‌ها

سطح فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در سلول‌های آبششی ماهی‌های در معرض پاراکات در مقایسه با ماهی‌های گروه کنترل به طور معنی داری افزایش یافت ($P < 0.05$). علی‌رغم کاهش معنی دار سطح فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در سلول‌های آبششی ماهی‌های در گروه‌های تحت تیمار ویتامین C، کیتوزان و پاراکات در مقایسه با ماهی‌های در معرض پاراکات، هنوز اختلاف معنی داری بین سطح فعالیت این آنزیم در این ماهی‌ها با گروه کنترل وجود داشت (شکل ۳).

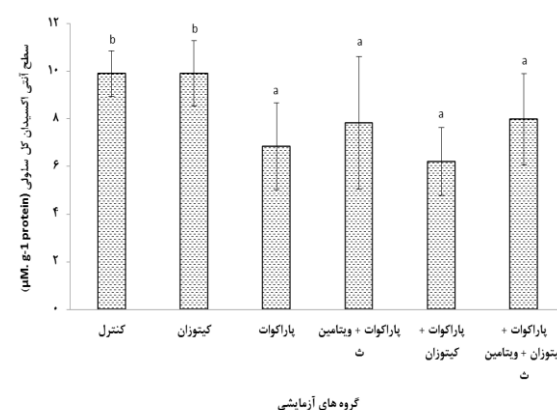
آمینو در فرایند اکسیداسیون یا گلوکوزنر در سلول‌ها جهت تأمین انرژی لازم برای مقابله با تأثیر سمی پاراکوات مؤثر باشد. با این حال، مطالعات صورت گرفته نشان می‌دهد که پاراکوات یا رادیکال‌های آزاد آن ممکن است با اسیدهای آمینه‌ای نظیر فیل‌آلانین، متیونین، سیستئین، هیستیدین و تربیتوفان در سلول‌های مختلف واکنش 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 آسپارات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز ممکن است پاسخ مناسبی جهت افزایش سطح اسیدهای آمینه آزاد جهت تسریع فرایند سم‌زدایی باشد. از آنجایی که 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

گروه کنترل است ($P < 0.05$). تجویز ویتامین C و کیتوزان نیز تأثیر معنی‌داری در سطح آنتی‌اکسیدان کل سلولی نداشت (شکل ۵).



شکل ۵: تغییرات سطح مالون دی آلدئید در بافت آبششی ماهی‌ها



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

بحث

نتایج به‌دست آمده در این مطالعه نشان داد که پاراکوات سبب ایجاد استرس اکسیداتیو و تغییر در سطح شاخص‌های بیوشیمیایی در سلول‌های آبششی شده است. آنزیم‌های آسپارات 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

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). از این‌رو، 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. از این‌رو با افزایش سطح لاکتات، سطح فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز نیز افزایش می‌یابد (Murray et al., 2003). از آنجایی که 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 (نومتیل دی‌پیریدون) و یا اکسیداسیون (پاراکوات پیریدین و پاراکوات پیریدینون) 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 تکیه بر 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 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). 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) در نتیجه 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 ایجاد شده در ماهی‌های تحت تیمار ویتامین C و کیتوزان است.

کاهش سطح آنتی اکسیدان کل سلولی در بافت آبشش در معرض پاراکوات و همچنین عدم تأثیر تجویز ویتامین C و کیتوزان بر سطح آنتی اکسیدان کل سلولی آبشش ماهی ها نیز مؤید همین امر است. محبی مقدم و همکاران (۱۳۹۵) دریافتند که تجویز خوراکی بتاکاروتن به ماهی های کپور معمولی نمی تواند تغییر معنی دار در سطح آنتی اکسیدان کل سلولی آبشش ایجاد نماید.

مالون دی آلدهید 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 معنی داری سطح مالون دی آلدهید در بافت آبششی ماهی ها پس از تماس با پاراکوات بیانگر بروز استرس اکسیداتیو در این سلول ها است. هرچند تجویز ویتامین C و ویتامین C همراه با کیتوزان در آبشش ماهی های در معرض پاراکوات سبب کاهش معنی دار سطح مالون دی آلدهید در مقایسه با گروه تحت تیمار پاراکوات به تنهایی گردید. با این وجود بالا بودن سطح مالون دی آلدهید در بافت آبششی این ماهی ها در مقایسه با گروه کنترل، همچنان نشان دهنده برتری میزان تولید رادیکال های آزاد بر ظرفیت آنتی اکسیدانی سلولی است. پراکسیداسیون لیپیدی غشای سلولی همچنین موجب افزایش نرخ شکنندگی اسموتیک غشای سلولی، کاهش سیالیت غشا و کاهش بقای اندامک ها به ویژه میتوکندری و نیز افزایش نرخ نفوذپذیری پراکسید هیدروژن به درون سلول می گردد. لذا، پراکسیداسیون لیپیدی غشای سلول های آبششی می تواند 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 به دست آمده در این مطالعه، می توان چنین اذعان کرد که با توجه به مکانیسم ایجاد سمیت سلولی در بافت تنفسی (آبشش)، تجویز آنتی اکسیدان های نظیر ویتامین C و کیتوزان علی رغم داشتن تأثیر جزئی در افزایش کارایی سیستم دفاع آنتی اکسیدانی و سم زدایی سلول های آبششی، نتوانسته است از شدت مسمومیت ایجاد شده در آبشش ماهی های در معرض پاراکوات بکاهد. تماس مستقیم آبشش ماهی ها با پاراکوات، جذب آن توسط سلول های آبششی و احتمالاً اکسیداسیون سریع آن در محیط غنی از اکسیژنی (در بافت آبششی) ممکن است مهم ترین دلیل عدم تأثیر گذاری آنتی اکسیدان های فوق ذکر در کاهش استرس اکسیداتیو در سلول های آبششی باشد.

سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء (ص) بهپهان انجام شده است. بدین وسیله نویسندگان این مقاله از مسئولین محترم تحصیلات تکمیلی دانشگاه و معاونت محترم آموزشی و پژوهشی دانشکده منابع طبیعی تشکر و قدردانی می نمایند.

منابع

۱. آمارنامه کشاورزی، ۱۳۹۰. معاونت برنامه ریزی 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 بافت های ماهی کپور

- 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., Denkbaz, E.B., 2010. Bleomycin Loaded Magnetic Chitosan Nanoparticles as Multifunctional معمولی (*Cyprinus carpio*). نشریه توسعه آبنزی پروری، ۱۰(۴)، ۱۰۳-۱۱۱.
 ۳. محمدی بردبری، ا.، قاضی خوانساری، م.، ۱۳۸۵. بررسی اثر آنتی اکسیدانی کاپتوپریل بر روی سمیت ناشی از پاراکوات در میتوکندری جداسده 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

- 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.
 - 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., Nohnno, T., 2001. The role of nitric oxide in paraquat-induced