

"مقاله پژوهشی"

اثرات محافظتی آستاگزانتین علیه استرس اکسیداتیو ایجادشده با دیازینون در آبش ماهی قزل‌آلای رنگین کمان

صدیقه شعبان‌زاده^۱، صابر وطن‌دوست^۱، سیدمهدی حسینی فرد^{۲*}، نجمه شیخ‌زاده^۳، امیرعلی شهبازفر^۴

۱- گروه شیلات، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران

۲- گروه دامپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران

۳- گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۴- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۹/۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۷/۱۱

چکیده

مطالعه حاضر به منظور بررسی اثرات محافظت‌کنندگی آستاگزانتین علیه دیازینون با بهره‌گیری از شاخص‌های بیوشیمیایی و بیان ژن در آبش ماهی قزل‌آلای رنگین کمان انجام شد. ماهی‌ها با مقادیر مختلف (۰/۵، ۲ و ۵ گرم در کیلوگرم) آستاگزانتین تجاری به مدت ۶۰ روز تغذیه شدند. بعد از مرحله خوراک‌دهی، ماهی‌ها با ۰/۱۱ میلی‌گرم در لیتر دیازینون به مدت ۹۶ ساعت چالش داده شدند. بعد از مرحله درون‌تنی، آبش‌های ماهی‌ها به منظور مطالعه شاخص‌های بیوشیمیایی و بیان ژن‌های مرتبط با سیستم آنتی‌اکسیدان نمونه‌برداری شدند. نتایج نشان داد که تغذیه با آستاگزانتین قادر به کاهش میزان محصولات ناشی از پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان آبش است. ضمناً میزان بیان mRNA مربوط به برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، شامل سوپرکسید دیسموتاز، گلوکاتایون اس ترانسفراز، گلوکاتایون پراکسیداز و فاکتور شماره ۲ مربوط به فاکتور ۲ اریترئوئید هسته‌ای (Nrf2)، در ماهی‌های تغذیه شده با آستاگزانتین و مجاور شده با دیازینون افزایش یافت. هر چند تغییر معنی‌داری در میزان بیان mRNA مربوط به آنزیم کاتالاز در این مطالعه دیده نشد. این مطالعه پیشنهاد می‌کند که آستاگزانتین قادر به بهبود استرس اکسیداتیو ایجادشده با دیازینون در آبش ماهی قزل‌آلای رنگین کمان است.

کلمات کلیدی: آستاگزانتین، دیازینون، آبش، قزل‌آلای رنگین کمان، سیستم آنتی‌اکسیدان

مقدمه

در سال‌های اخیر، استفاده از حشره‌کش‌ها به دلیل اثرات منفی بر محیط‌زیست و جانوران آبی مورد توجه قرار گرفته‌اند (Kaoud Hussein, 2015). این ترکیبات با ورود به بدن موجودات زنده قادر به تجمع یافتن و ایجاد اثرات سمی هستند. از جمله این موجودات آبی می‌توان به گونه‌های ماهی اشاره نمود که از طریق خوراک آلوده، تنفس و پوست قادر به دریافت این مواد مضر هستند. بنابراین آبخش ماهی یکی از اولین مسیرهای ورود مستقیم حشره‌کش‌ها به شمار می‌آیند (Ullah and Zorriehzakra, 2015). اغلب ترکیبات سمی به بدن سبب بروز استرس اکسیداتیو می‌شوند. در کل، با توجه به تغییرات سریع شاخص‌های بیوشیمیایی در زمان مجاورت با ترکیبات آسیب‌رسان، این فراسنجه‌ها جهت تعیین مخاطرات بر اکوسیستم‌های آبی مورد توجه قرار گرفته‌اند. به عنوان مثال، بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند آنزیم کاتالاز، گلوکاتایون پراکسیداز، گلوکاتایون اس ترانسفراز و سوپراکسید دیسموتاز به عنوان فاکتورهای مهم جهت بررسی تأثیرات منفی آلوده‌کننده‌ها بر بدن موجودات زنده محسوب می‌شوند. در مطالعات سم‌شناسی، بررسی اکسیداسیون لیپید، پروتئین و اسید نوکلئیک نیز از شاخص‌های مهم در بروز آسیب‌های سلولی می‌باشند (Uçar et al., 2020).

دیازینون یکی از انواع پرمصرف حشره‌کش‌های ارگانوفسفره است که در کشاورزی به وفور مورد استفاده قرار می‌گیرد. آمار نشان‌دهنده میزان مصرف سالیانه ۳۷۷۵ تن دیازینون در ایران است (Banaee et al., 2011). مطالعات گوناگون بیانگر آلودگی آب‌های سطحی با دیازینون و مشتقات آن است (Abdelkhalek

2011; Banaee et al., 2017). از طرف دیگر، این سم قابلیت ماندگاری بالایی در محیط‌های آبی دارد. بنابراین، آلودگی موجودات آبی مانند ماهی‌ها با این سم بسیار محتمل به نظر می‌رسد. سمومی مانند دیازینون قادر به ایجاد اثرات منفی مانند کاهش رشد، اختلالات تولیدمثلی، افزایش حساسیت در برابر انواع عوامل عفونی در گونه‌های ماهی هستند (کشتکار لنگرودی و تهرانی فرد، ۱۳۹۷؛ Abdelkhalek et al., 2011; Banaee et al., 2017).

آستاگزانتین نوعی رنگدانه با ارزش کتوکاروتنوئیدی است که در صنایع مختلف مانند آبی‌پروری، صنایع غذایی، دارویی و آرایشی کاربرد دارد. مطالعات مختلف نشان داده است که مصرف این مکمل غذایی اثرات ضد التهابی، ضد پیری، آنتی-اکسیدانی، محافظت در برابر آفتاب و تقویت پاسخ‌های ایمنی دارد (Al-Higuera-Ciapara et al., 2006; Bulishi et al., 2015; Fakhri et al., 2018). هر چند در ماهی‌ها بیشتر مطالعات مربوط به اثرات آستاگزانتین بر رنگ پوست و فیله بوده است اما تعدادی از مطالعات نیز اثرات مثبت این کاروتنوئید بر رشد، سیستم آنتی‌اکسیدان و ایمنی و مقاومت در برابر عوامل محیطی و بیماری‌زا در گونه‌های مختلف ماهی را نشان داده است (اکبری و ربانی نژاد، ۱۳۹۵؛ مخلص آبادی فراهانی و همکاران، ۱۳۹۷؛ عرب و همکاران، ۱۳۹۸؛ Roy and Pal, 2015; Lim et al., 2018; Yu and Liu, 2020). تعداد محدودی از مطالعات نیز اثرات مثبت آستاگزانتین در تخفیف استرس ناشی از مواد سمی در گونه‌های ماهی را نشان داده‌اند. به عنوان مثال، Li و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که آستاگزانتین قادر به بهبود وضعیت سیستم آنتی‌اکسیدان

در شهر ارجمند (فیروزکوه، ایران) در این بررسی مورد استفاده قرار گرفتند. ماهی‌ها در ۱۵ تانک به ابعاد ۰/۹۰ × ۰/۶۰ × ۰/۳۰ متر به تعداد ۱۰ قطعه در هر تانک توزیع شدند. فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب تانک‌ها به صورت زیر بود: دما ۱۱/۹ - ۱۲/۵ درجه سانتی‌گراد. pH ۷/۴ - ۷/۸. اکسیژن محلول ۸/۴ - ۹/۲ میلی‌گرم در لیتر. میزان جریان آب ورودی ۰/۶ لیتر بر ثانیه. ماهی‌ها جهت سازگاری یافتن با شرایط آزمایشگاهی جدید به مدت ده روز با جیره پایه خوراک (جدول ۱) را دریافت کردند.

متعاقب مجاورت خامه ماهی (*Channa argus*) با ترکیب سمی سلنیم است. با توجه به اثرات مفید آستاگزانتین در ماهی و فقدان اطلاعات در زمینه اثرات محافظتی این رنگدانه علیه ترکیبات حشره‌کش مانند دیازینون، مطالعه حاضر پایه‌ریزی گردید تا اثرات محافظتی این نوع رنگدانه به صورت خوراکی در آبشش ماهی‌های قزل‌آلای چالش داده شده با سم دیازینون بررسی شود.

مواد و روش‌ها

ماهی

۱۵۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزن 20.70 ± 0.62 گرم در مزرعه پرورش ماهی واقع

جدول ۱: ترکیبات و آنالیز مربوط به جیره پایه مورد استفاده در این مطالعه

| جیره پایه | ترکیبات (گرم در کیلوگرم) |
|-----------|--------------------------|
| ۵۲۰ | پودر ماهی |
| ۲۳۰ | پودر سویا |
| ۸۸ | آرد گندم |
| ۹۰ | آرد ذرت |
| ۱۲ | لسیتین سویا |
| ۲۰ | سلولز |
| ۲۰ | مکمل ویتامینی |
| ۲۰ | مکمل معدنی |
| ۸۷/۵۲ | آنالیز تقریبی خوراک (%) |
| ۴۳/۱۶ | ماده خشک |
| ۱۳/۹۳ | پروتئین خام |
| ۸/۳۲ | چربی خام |
| 4465.93 | خاکستر |
| | انرژی نام (کالری در گرم) |

*جزئیات مربوط به ترکیبات خوراک در مقاله Mousavi و همکاران (۲۰۲۰) ارائه شده است.

طراحی آزمایشگاهی

جیره‌های آزمایشی با افزودن آستاگزانتین تجاری ۱۰٪ (Lucantin Pink) ساخته شده در شرکت BASF آلمان به جیره پایه ارائه شده در جدول ۱ به میزان ۰/۵، ۲ و ۵ گرم در کیلوگرم تهیه شدند. انتخاب مقادیر مناسب براساس مطالعات پیشین بود (Lim et al., 2018). مواد تشکیل دهنده‌ی غذای ماهی‌ها خوب مخلوط شده، به صورت پلت در آمده و از یک الک با مش ۳/۵ میلی‌متری عبور داده شدند. جیره‌های آزمایشی پس از آماده شدن و قبل از استفاده در طرح آزمایشی به صورت جداگانه در کیسه‌های پلاستیکی تحت دمای ۸ تا ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. ترکیب‌های شیمیایی موجود در جیره ماهی‌ها بر پایه‌ی روش‌های مرسوم تعریف شده بودند (AOAC, 1995). در این مطالعه، گروه‌های مورد مطالعه به صورت زیر بودند:

گروه ASX1: حاوی ۰/۵ گرم بر کیلوگرم آستاگزانتین تجاری افزوده شده به جیره

گروه ASX2: حاوی ۲ گرم بر کیلوگرم (آستاگزانتین تجاری افزوده شده به جیره)

گروه ASX3: حاوی ۵ گرم بر کیلوگرم (آستاگزانتین تجاری افزوده شده به جیره)

گروه CTR (گروه کنترل منفی): فاقد ترکیب افزودنی گروه ASX0 (گروه کنترل مثبت): فاقد ترکیب افزودنی

تمامی گروه‌ها به مدت ۶۰ روز با جیره‌های آزمایشی مورد تغذیه قرار گرفتند. بعد از دوره ۶۰ روزه غذایی با آستاگزانتین، ماهی‌های گروه ASX0 (گروه کنترل مثبت) در معرض دیازینون قرار گرفتند اما

ماهی‌های گروه CTR (گروه کنترل منفی) با این مواد سمی درگیر نشدند که در ذیل اشاره گردیده است.

روش آزمون سمیت

آزمون سمیت حاد مطابق با شماره‌ی ۲۰۳ راهنمای استاندارد OECD انجام شد. دیازینون (باسودین) با خلوص ۶۰ درصد از شرکت پارتونار (تهران، ایران) خریداری شد. در روز ۶۰، همه‌ی ماهی‌های گروه‌های ASX0، ASX1، ASX2 و ASX3 با دیازینون در دوز ۰/۱۱ میلی‌گرم بر لیتر (U.S. EPA, 2005) درگیر شدند. در مقابل، ماهی‌های گروه CTR طی آزمون سمی شدن در معرض دیازینون قرار نگرفتند. آب موجود در همه تانک‌ها به طور مداوم در معرض هوادهی قرار داشت و فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آن، تحت نظارت قرار می‌گرفتند و مانند آزمون خوراک-دهی نگهداری می‌شدند. روش تکرار ایستاتیک به مدت ۹۶ ساعت با تعویض ۲۴ ساعته محلول دیازینون به کار گرفته شد (Banaee et al., 2011).

نمونه برداری آبشش ماهی‌ها

بعد از آزمون سمیت، هر ۱۰ ماهی موجود در هر تانک با محلول روغن گل میخک (۵۰ میکرو لیتر بر لیتر) بیهوش شدند. بعد از آن، کمان اول آبشش در سمت راست هر ماهی از مجموع ۵ ماهی جدا شد و بلافاصله در نیتروژن مایع فریز شد تا جهت آزمایش ریل تایم PCR مورد استفاده قرار گیرد. جهت بررسی شاخص‌های بیوشیمیایی در آبشش نیز در پنج قطعه ماهی باقی مانده، همان ناحیه آبشش (کمان اول آبشش در سمت راست هر ماهی) برداشت شد و با هموژنایزر دستی یکنواخت گردید. سپس ترکیبات هموژن شده بافتی با بافر تریس هیدروکلراید ۲۵ میلی‌مولار با pH

PCR، و ۲۰ پیکومول رونوشت بردار معکوس PCR تا رسیدن به حجم ۲۰ میکرولیتر تشکیل شده بود. برنامه PCR مورد استفاده در این مطالعه شامل مرحله دناتوره اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۳ دقیقه، سپس ۴۰ چرخه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد در مدت ۲۰ ثانیه، و در ۶۰ درجه برای ۳۰ ثانیه، و دمای ذوب ۶۵ تا ۹۵ درجه سانتی گراد بود. میزان بیان ژن‌های هدف در قیاس با ژن خانه دار بتا اکتین با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد (Livak and Schmittgen, 2001). راندمان PCR نیز با استفاده از منحنی‌های استاندارد بر پایه رقت‌های ده برابری بدست آمده از تکرارهای واکنش‌های PCR محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

تمامی نتایج به صورت میانگین \pm خطای استاندارد ارائه شدند. پس از تعیین نرمال بودن داده‌ها و همگن بودن واریانس با استفاده از آزمون‌های Shapiro-Wilk و Levene، معنی‌دار بودن اختلاف‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) در نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمون توکی نیز برای تعیین اختلافات بین تیمارها انجام شد. اختلافات بین گروه‌ها کمتر از ۰/۰۵ بیانگر معنی‌داری اختلافات بود.

نتایج

کمترین میزان تولیدات مربوط به پراکسیداسیون لیپیدی در گروه CTR دیده شد. در گروه‌های چالش داده شده با سم دیازینون، میزان پراکسیداسیون لیپیدی افزایش معنی‌داری یافت اما کمترین میزان این ترکیبات به ترتیب در گروه‌های ASX3، ASX2 و ASX1 در مقایسه با گروه ASX0 مشاهده شد (شکل ۱).

برابر ۷/۲ مخلوط شد تا برای بررسی‌های بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گیرد (Ahmadifar et al., 2019). فعالیت آنتی‌اکسیدانی کلی با استفاده از قابلیت کاهش ترکیبات آهن‌دار عیار سرم، محاسبه شد (Benzie and Strain, 1996). فراورده‌های پراکسیداسیون لیپیدی به وسیله آزمایش تیوباربتوریک اسید اندازه‌گیری شد و با واحد nmol بر dl سرم، بیان گردید (Satoh, 1978).

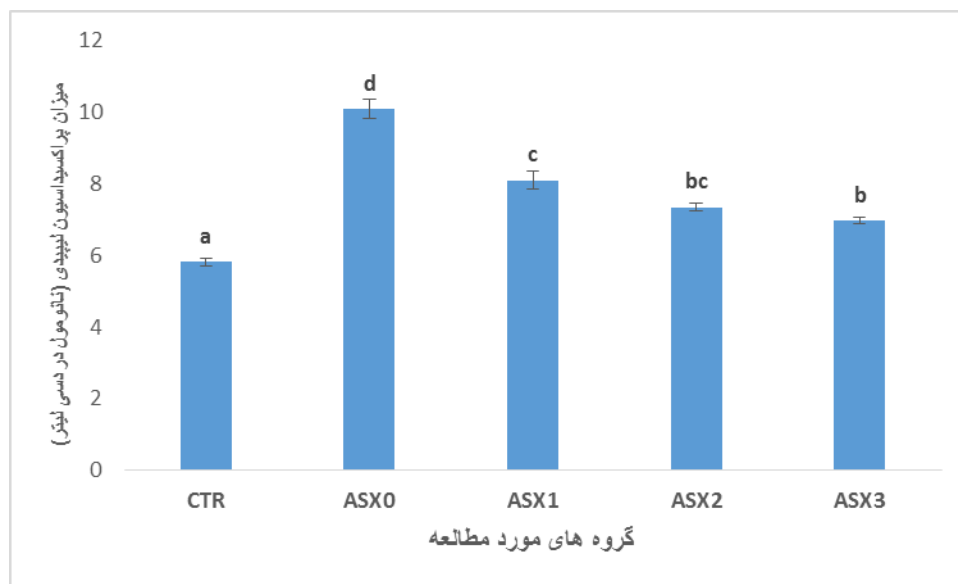
ریل تایم PCR

بافت آبشش هر ماهی به صورت جداگانه با هموژنایزر دستی یکنواخت شده و ۶۰ میلی‌گرم از بافت هموژن شده با استفاده از کیت آکوزول (Accuzol) ساخت شرکت Bioneer (کره جنوبی) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده جهت جداسازی RNA مورد استفاده قرار گرفت. خلوص و کمیت RNA توسط اسپکتروفوتومتر بایوراد (Bio-Rad, CA, USA) سنجش شد. RNA استخراج شده توسط کیت رونویس معکوس ترموفیشر (Thermo Fisher Scientific، آمریکا) رونویسی معکوس شد.

cDNA یا DNA رونویسی شده از تک رشته RNA توسط PCR جهت بررسی بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتیون اس ترانسفراز، گلوکاتیون پراکسیداز و فاکتور شماره ۲ مربوط به فاکتور ۲ اریترئید هسته‌ای (Nrf2) با استفاده از ژن‌های انتخابی (جدول ۲) و SYBR® Premix Ex Taq™ II (شرکت بیوتکنولوژی TaKaRa با مسئولیت محدود، چین) بر اساس دستورالعمل داده شده سنجش شد. ترکیب حاصل برای PCR از ۱۰ میکرولیتر مخلوط SYBR® Premix Ex Taq™ II، ۱ میکرولیتر cDNA ساخته شده، ۲۰ پیکومول پرایمر رونوشت بردار

جدول ۲: پرایمرهای استفاده شده جهت انجام ریل تایم PCR

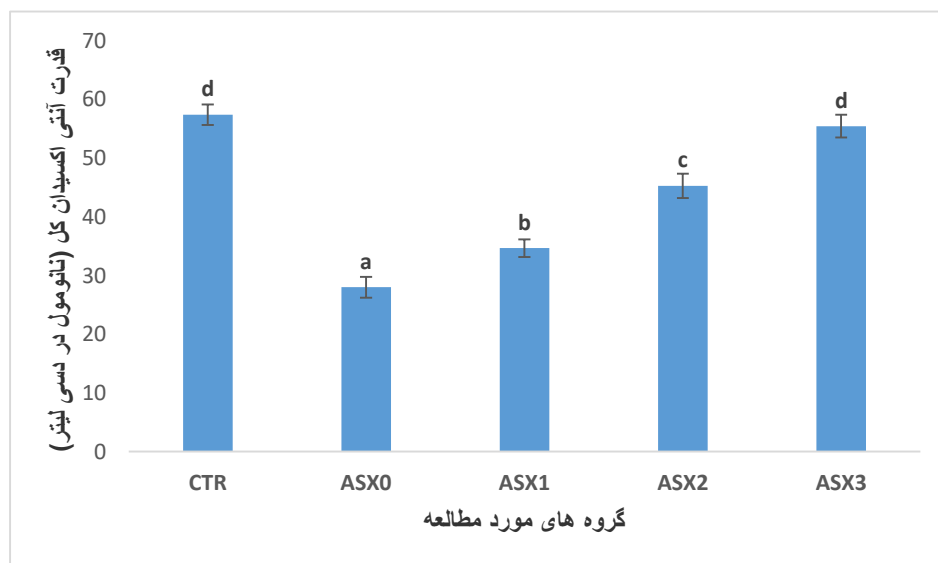
| ژن مورد مطالعه | پرایمرها | راندمان PCR برای پرایمرها | شماره بانک ژنی | اندازه قطعه تکثیر شده (bp) |
|------------------------|------------------------------------------------|---------------------------|----------------|----------------------------|
| کاتالاز | TGATGTCACACAGGTGCGTA GTGGGCTCAGTGTGTTGAG | ۹۵/۶۸ | BX087110.3 | ۱۹۵ |
| سوپراکسید دیسموتاز | TCCCTGACCTGACCTACGAC GGCCTCCTCCATTAACCTC | ۹۶/۴۵ | CA352127.1 | ۲۰۱ |
| گلوکاتیون اس ترانسفراز | CAGAGGACAGCTCCCTGCTT CTGAACCGGCTCTCCAGGTA | ۹۳/۰۷ | NM_001160559.1 | ۱۸۷ |
| گلوکاتیون پراکسیداز | CGAGCTCCATGAACGGTACG TGCTTCCCGTTCACATCCAC | ۹۴/۵۴ | CA357669.1 | ۱۸۳ |
| Nrf2 | TGAGCTGCAGCAATGTCTGA GTTGGGCAATGGGTAGAAGC | ۹۸/۴۳ | CA360709.1 | ۱۲۴ |
| بتا-اکتین | ATGGAAGATGAAATCGCCGCAC TGGCCCATCCCAACCATCAC | ۹۳/۴۳ | AJ438158 | ۱۹۱ |



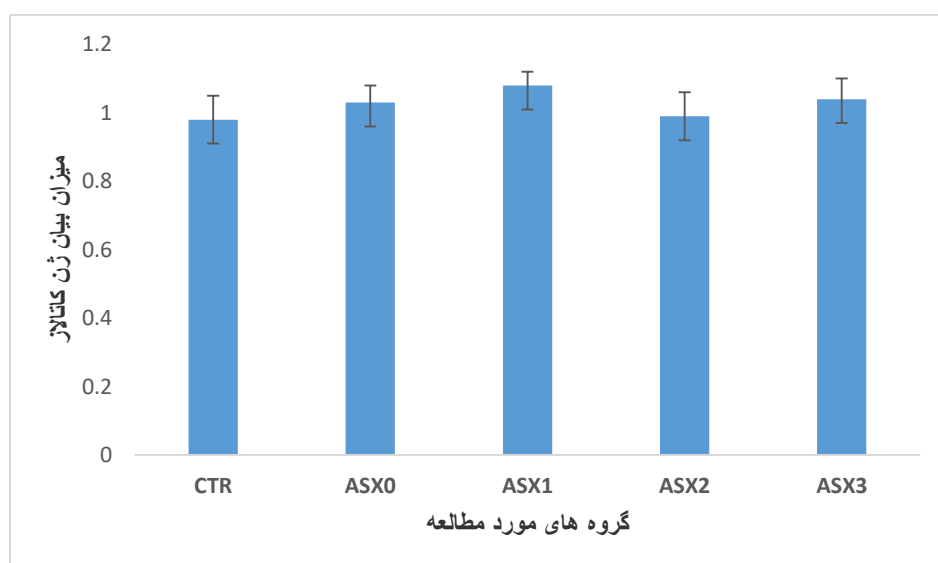
شکل ۱: میزان پراکسیداسیون لیپیدی در آبشش ماهی های قزل آلاهی رنگین کمان تغذیه شده با آستاگراتین و چالش داده شده با سم دیازینون.

دیازینون (ASX0) بهبود فعالیت آنتی‌اکسیدان کل آبشش مشاهده شد (شکل ۲). در خصوص بیان ژن‌های مربوط به فعالیت آنتی‌اکسیدان در آبشش ماهی نیز در مورد کاتالاز هیچ تغییر معنی‌داری مشاهده شد (شکل ۳).

در خصوص فعالیت آنتی‌اکسیدان کل آبشش نیز در گروه CTR بالاترین میزان دیده شد. در ماهی‌های چالش داده شده با سم نیز مصرف آستاگزانتین در دوز بالا (ASX3) سبب بهبود فعالیت آنتی‌اکسیدان کل در حد گروه CTR گردید. در گروه‌های دیگر مصرف کننده دوز متوسط (ASX2) و دوز پایین (ASX1) نیز در مقایسه با گروه کنترل چالش داده شده با سم



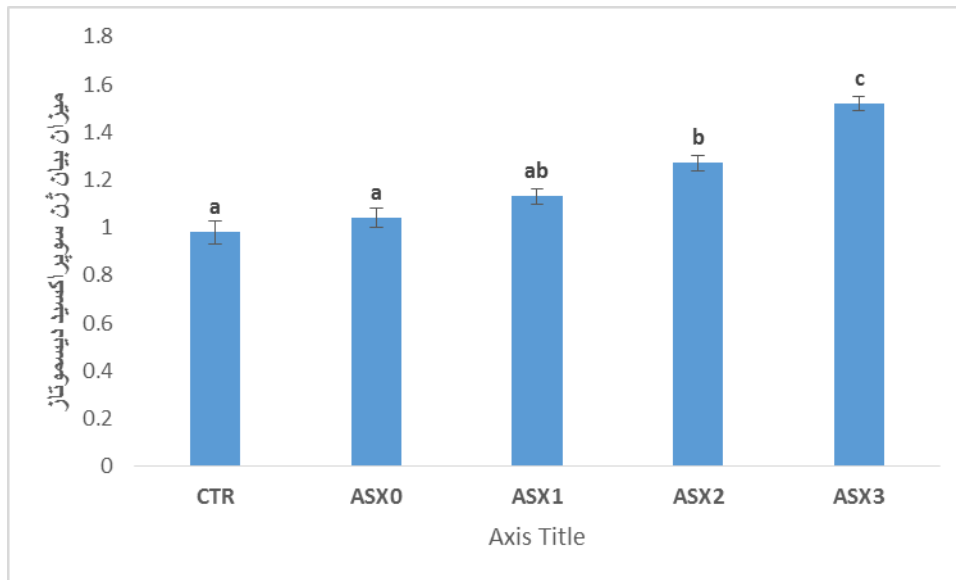
شکل ۲: میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان کل در آبشش ماهی‌های قرل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با آستاگزانتین و چالش داده شده با سم دیازینون.



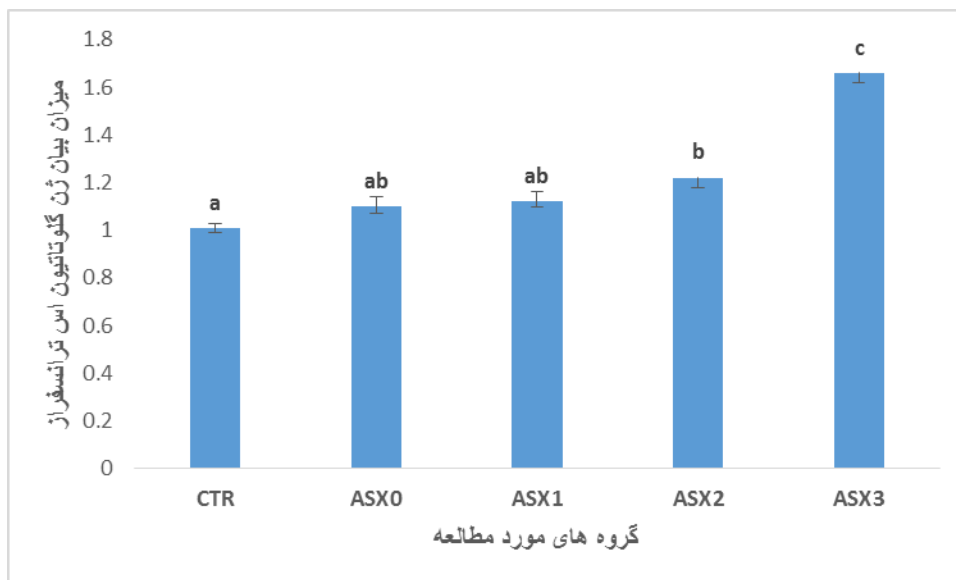
شکل ۳: میزان بیان ژن کاتالاز در مقایسه با ژن خانه‌دار بتا‌اکتین در آبشش ماهی‌های قرل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با آستاگزانتین و چالش داده شده با سم دیازینون.

معنی داری در بیان این دو ژن دیده شد (شکل های ۴ و ۵).

در مقابل، دو ژن سوپراکسید دیسموتاز و گلوکاتین اس ترانسفراز الگوی مشابهی را نشان دادند به طوری که در گروه های چالش داده شده با سم و دریافت کننده دوزهای بالا (ASX3) و متوسط (ASX2) افزایش



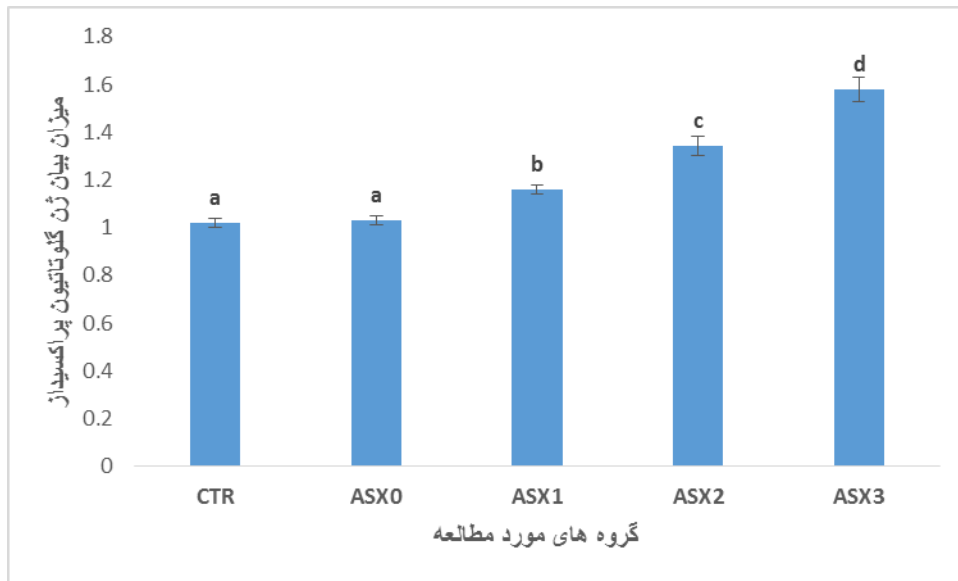
شکل ۴. میزان بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز در مقایسه با ژن خانه دار بتا اکتین در آبشش ماهی های قزل آلابی رنگین کمان تغذیه شده با آستاگرانترین و چالش داده شده با سم دیازینون.



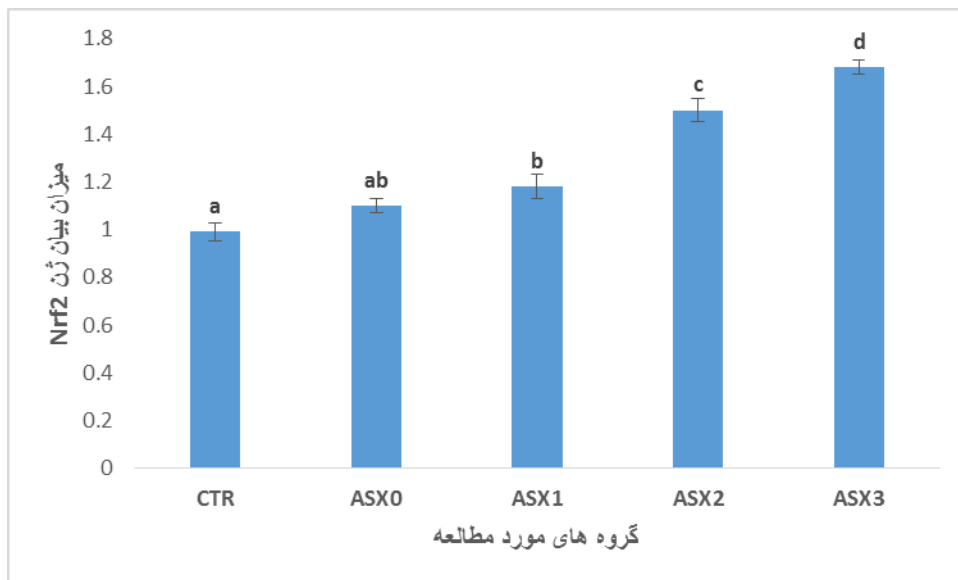
شکل ۵. میزان بیان ژن گلوکاتین اس ترانسفراز در مقایسه با ژن خانه دار بتا اکتین در آبشش ماهی های قزل آلابی رنگین کمان تغذیه شده با آستاگرانترین و چالش داده شده با سم دیازینون.

این دو ژن در مقایسه با سایر گروه‌ها رخ داد (شکل‌های ۶ و ۷).

دو ژن گلوکوتایون پراکسیداز و Nrf2 نیز الگوی مشابهی را نشان دادند به صورتیکه در سه گروه چالش داده شده با سم و دریافت کننده آستاگزانتین شامل‌های ASX1 و ASX2، ASX3 افزایش معنی‌داری در بیان



شکل ۶. میزان بیان ژن گلوکوتایون پراکسیداز در مقایسه با ژن خانه‌دار بتا اکتین در آبشش ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با آستاگزانتین و چالش داده شده با سم دیازینون. ستون‌های با حروف متفاوت با یکدیگر اختلاف معنی‌داری دارند. داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد می‌باشند. گروه-بندی‌ها در شکل ۱ ذکر گردید.



شکل ۷. میزان بیان ژن Nrf2 در مقایسه با ژن خانه‌دار بتا اکتین در آبشش ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با آستاگزانتین و چالش داده شده با سم دیازینون.

بحث

در کشورهای مختلف افزودنی‌های خوراکی کاربردی در آبی‌پروری به صورت وسیعی مورد استفاده قرار می‌گیرند. از جمله این ترکیبات می‌توان به آستاگزانتین اشاره نمود که مطالعات مختلف بیانگر اثرات مفید این ترکیب طبیعی در بهبود وضعیت سلامت حیوانات مختلف منجمله گونه‌های ماهی است (Roy and Pal, 2015; Lim *et al.*, 2018; Yu and Liu, 2020). در مطالعه حاضر اثرات مثبت آستاگزانتین خوراکی در بهبود وضعیت سیستم آنتی‌اکسیدان و بیان ژن‌های مرتبط با سیستم آنتی‌اکسیدان در آبشش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان متعاقب چالش با سم دیازینون نشان داده شد.

سموم مختلف مانند دیازینون قادر به افزایش میزان محصولات حاصل از پراکسیداسیون لیپیدی هستند. در این مطالعه نیز در گروه کنترل چالش داده شده با دیازینون بالاترین میزان این شاخص گزارش شد. همسو با این یافته، پایین‌ترین میزان قدرت آنتی‌اکسیدان کل در آبشش ماهی‌های این گروه به دست آمد. نتایج مشابهی نیز در مطالعات قبلی با قرارگیری گونه‌های ماهی مانند تیلاپیای نیل، کپور معمولی و قزل‌آلای رنگین‌کمان در معرض سم دیازینون مشاهده شد (Oruc, 2011; Al-Ghanim, 2014; Mirvaghefi *et al.*, 2017; Abdelkhalik *et al.*, 2016). در مقابل، مصرف آستاگزانتین با کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدی و بهبود فعالیت آنتی‌اکسیدان کل قادر به تخفیف اثرات مضر دیازینون در آبشش ماهی‌های درگیر بود. در مطالعات گذشته نیز اثرات مثبت آستاگزانتین در کاهش میزان محصولات ناشی از پراکسیداسیون لیپیدی پرداخته‌اند. به عنوان مثال، شیخ-

زاده و همکاران (۱۳۹۹) نشان دادند که میزان پراکسیداسیون لیپیدی در سرم ماهی‌های قزل‌آلای تغذیه شده با آستاگزانتین در مقایسه با گروه کنترل به صورت معنی‌داری کاهش یافت. همسو با این نتایج، مصرف آستاگزانتین در ماهی بادکنکی (*Takifugu obscurus*) سبب کاهش تولید گونه‌های فعال اکسیژن متعاقب ایجاد استرس حرارتی گردید (Cheng *et al.*, 2019). در کل، آستاگزانتین در خنثی نمودن رادیکال‌های آزاد بهتر از رنگدانه‌های دیگر مانند بتاکاروتن عمل می‌کند که مکانسیم عمل آستاگزانتین مربوط به ایجاد غلظت مناسب آن در پلاسما و دسترسی راحت‌تر آن نسبت به رنگدانه‌هایی مانند بتاکاروتن است (Shimidzu *et al.*, 1996).

درون یک سلول طبیعی، عوامل آنتی‌اکسیدان مانند ترکیبات با وزن مولکولی پایین و آنزیم‌های آنتی-اکسیدان، شامل کاتالاز، سوپرکسید دیسموتاز، گلوکوتایون اس ترانسفراز و گلوکوتایون پراکسیداز، قادر به غیرفعال کردن محصولات ناشی از فرایند اکسیداسیون و ایجاد رادیکال‌های آزاد می‌باشند. در این مطالعه، افزایش بیان ژن‌های مربوط به آنزیم‌های آنتی-اکسیدان در ماهی‌های دریافت کننده آستاگزانتین و چالش داده شده با دیازینون نشان‌دهنده فعال شدن سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان در جهت غلبه با استرس اکسیداتیو ایجاد شده با سم است. همگام با این یافته، در ماهی پیمانوی طلایی (*Trachinotus ovatus*) نیز متعاقب استرس کمبود اکسیژن، مصرف آستاگزانتین سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گردید (Xie *et al.*, 2020). در همین راستا، در ماهی بادکنکی نیز مصرف آستاگزانتین و چالش با استرس افزایش دما، فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدان و آنزیم‌های مربوطه

منابع

۱. اکبری، پ.، ربانی نژاد، ف.، ۱۳۹۵. اثر مکمل غذایی آستاگزانتین بر پاسخ استرس تراکم و عملکرد ماهی طلال (*Rastrelliger kanagurta*). مجله منابع طبیعی ایران، ۶۹، ۳۰۹-۳۲۲.
۲. شیخ زاده، ن.، ظهوری، م.، موسوی، ش.، ۱۳۹۹. اثرات آستاگزانتین بر کارایی رشد، میزان بازماندگی و پراکسیداسیون لیپیدی در ماهی قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). تحقیقات دامپزشکی و فراورده های بیولوژیک، ۳۴(۴)، ۱۹۳-۱۸۷.
۳. عرب، م.، شالویی، ف.، فتح اللهی، م.، پیرعلی، ا.، ۱۳۹۸. اثر آستاگزانتین بر شاخص های رشد و رنگ پذیری لاشه ماهی قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). نشریه توسعه آبرزی پروری، ۱۳، ۸۵-۹۶.
۴. کشتکار لنگرودی، ا.، تهرانی فرد، ا.، ۱۳۹۷. تاثیر زیر حد کشندگی سم دیازینون بر پارامترهای خونی و بافت های آبشش و عضله بچه ماهی قره برون. نشریه توسعه آبرزی پروری، ۱۲، ۱۱۹-۱۲۹.
۵. مخلص آبادی فراهانی، ا.، درافشان، س.، پیکان حیرتی، ف.، ۱۳۹۷. تأثیر دوره محرومیت غذایی بر شاخصهای خونشناسی ماهی پرت (*Cichlasoma synspilum* ♀ × *Cichlasoma citrinellum* ♂) تغذیه شده با جیره حاوی آستاگزانتین و نمک صراوی. فصلنامه علمی پژوهشی محیط زیست جانوری، ۴، ۴۰۷-۴۱۴.
6. Abdelkhalek, N.K.M., Eissa, I.A.M., Ahmed, E., Kilany, O.E., El-Adl, M., Dawood, M.A.O., Hassan, A.M., Abdel-Daim, M.M., 2017. Protective role of dietary *Spirulina platensis* against diazinon-

افزایش معنی داری یافت (Cheng et al., 2019). به نظر می رسد که ترکیبات حاوی آنتی اکسیدان هایی مانند انواع رنگدانه ها از طریق تقویت فعالیت بافت های کبد و کلیه قادر به محافظت موجودات در برابر عوامل آسیب رسان مانند انواع مواد آلوده کننده محیطی هستند (Abdelkhalek et al., 2017).

Nrf2 یک فاکتور بیان هسته ای است که قادر به اتصال با عوامل مربوط به پاسخ های آنتی اکسیدان و تنظیم بیان ژن های مربوطه در گونه های ماهی است (Ming et al., 2020). در این مطالعه، افزایش بیان ژن Nrf2 در ماهی های قزل آلائی تغذیه شده با آستاگزانتین و مجاور شده با سم دیازینون دیده شد. به همین صورت، آستاگزانتین خوراکی سبب افزایش بیان این فاکتور در ماهی های پمپانوی طلایی مجاور شده با استرس کمبود اکسیژن گردید (Xie et al., 2020). به نظر می رسد که آستاگزانتین از طریق مسیر بیان Nrf2 قادر به افزایش فعالیت آنتی اکسیدان و تخفیف استرس اکسیداتیو است.

در کل، نتایج این مطالعه نشان داد که مصرف آستاگزانتین تجاری قادر به بهبود فعالیت آنتی اکسیدان کل، میزان پراکسیداسیون لیپیدی و بیان برخی ژن های مربوط به آنزیم های آنتی اکسیدان در آبشش ماهی های قزل آلائی رنگین کمان چالش داده شده با سم دیازینون است.

سپاسگزاری

مؤلفین بر خود لازم می دانند که از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل تشکر و قدردانی نمایند.

- Health problems. *European Journal of Academic Essays*, 2(9), 15-22.
16. Li, M.Y., Gao, C.S., Du, X.Y., Zhao, L., Niu, X.T., Wang, G.Q., Zhang, D.M., 2020. Effect of sub-chronic exposure to selenium and astaxanthin on *Channa argus*: Bioaccumulation, oxidative stress and inflammatory response. *Chemosphere*, 244, 125546.
 17. Lim, K.C., Yusoff, F.M., Shariff, M., Kamarudin, M.S., 2018. Astaxanthin as feed supplement in aquatic animals. *Reviews in Aquaculture*, 10, 738-773.
 18. Livak, K. J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ method. *Methods*, 25, 402-408.
 19. Ming, J., Ye, J., Zhang, Y., Xu, Q., Yang, X., Shao, X., Qiang, J., Xu, P., 2020. Optimal dietary curcumin improved growth performance, and modulated innate immunity, antioxidant capacity and related genes expression of NF- κ B and Nrf2 signaling pathways in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) after infection with *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*, 97, 540-554.
 20. Mirvaghefi, A., Ali, M., Poorbagher, H., 2016. Effects of vitamin C on oxidative stress parameters in rainbow trout exposed to diazinon. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 33(2), 113-120.
 21. Mousavi, S., Sheikhzadeh, N., Tayefi-Nasrabadi, H., Alizadeh-Salteh, S., Khani Oushani, A., Firouzmandi, M., Mardani, K., 2020. Administration of grape (*Vitis vinifera*) seed extract to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) modulates growth performance, some biochemical parameters, and antioxidant-relevant gene expression. *Fish Physiology and Biochemistry*, 46, 777-786.
 22. OECD Guidelines for the testing of chemicals. Test No. 203: Fish, acute toxicity test, organization for economic cooperation and development, Paris, France, 1992.
 23. Oruc, E., 2011. Effects of diazinon on antioxidant defense system and lipid peroxidation in the liver of *Cyprinus carpio* induced Oxidative damage in Nile tilapia; *Oreochromis niloticus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 54, 99-104.
 7. Ahmadifar, E., Sheikhzadeh, N., Roshanaei, K., Dargahi, N., Faggio, C., 2019. Can dietary ginger (*Zingiber officinale*) alter biochemical and immunological parameters and gene expression related to growth, immunity and antioxidant system in zebrafish (*Danio rerio*)? *Aquaculture*, 507, 341-348.
 8. Al-Bulishi, M.S.M., Changhu, X., Tang, Q.J., 2015. Health aspects of astaxanthin: A review. *Canadian Journal of Clinical Nutrition*, 3, 71-78.
 9. Al-Ghanim, K.A., 2014. Effect of an organophosphate insecticide diazinon on the activity of acetylcholinesterase and lipid peroxidation of a common carp, *Cyprinus Carpio* L. *Pakistan Journal of Zoology*, 46(1), 161-166.
 10. Banaee, M., Sureda, A., Mirvaghefi, A.R., Ahmadi, C., 2011. Effects of diazinon on biochemical parameters of blood in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99, 1-6.
 11. Benzie, I.F.F., Strain, J.J., 1996. Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
 12. Cheng, C.H., Guo, Z.X., Ye, C.X., Wang, A.L., 2018. Effect of dietary astaxanthin on the growth performance, non-specific immunity, and antioxidant capacity of pufferfish (*Takifugu obscurus*) under high temperature stress. *Fish Physiology and Biochemistry*, 44, 209-218.
 13. Fakhri, S., Abbaszadeh, F., Dargahi, L., Jorjani, M., 2018. Astaxanthin: A mechanistic review on its biological activities and health benefits. *Pharmacological Research*, 136, 1-20.
 14. Higuera-Ciapara, I., Felix-Valenzuela, L., Goycoolea, F.M., 2006. Astaxanthin: A review of its chemistry and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 185-196.
 15. Kaoud Hussein, A., 2015. Article review: Heavy metals and pesticides in aquaculture:

- (L.). *Environmental Toxicology*, 26(6), 571-578.
24. Roy, S.S., Pal, R., 2015. Microalgae in aquaculture: A review with special references to nutritional value and fish dietetics. *Proceedings of the Zoological Society*, 68, 1-8.
25. Satoh, K., 1978. Serum lipid peroxidation in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clinica Chimica Acta*, 90, 37-43.
26. Shimidzu, N., Goto, M., Miki, W., 1996. Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms. *Fisheries Science*, 62, 134-137.
27. Uçar, A., Parlak, V., Özgeriş, F.B., Yeltekin, A.C., Alak, G., Atamanalp, M., 2020. Determination of Fipronil toxicity by different biomarkers in gill and liver tissue of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). In *Vitro Cellular and Developmental Biology – Animal*, 56, 543-549.
28. Ullah, S., Zorriehzahra, M.J., 2015. Ecotoxicology: a review of pesticides induced toxicity in fish. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 3, 40-57.
29. U.S. EPA, Aquatic life ambient water quality criteria Diazinon Final, Office of Science and Technology Washington, DC, (CAS Registry Number 333-41-5), 2005. pp. 1-85.
30. Yu, W., Liu, J., 2020. Astaxanthin isomers: Selective distribution and isomerization in aquatic animals. *Aquaculture*, 520, 734915.
31. Xie, J., Fang, H., He, X., Liao, S., Liu, Y., Tian, L., Niu, J., 2020. Study on mechanism of synthetic astaxanthin and *Haematococcus pluvialis* improving the growth performance and antioxidant capacity under acute hypoxia stress of golden pompano (*Trachinotus ovatus*) and enhancing anti-inflammatory by activating Nrf2-ARE pathway to antagonize the NF- κ B pathway. *Aquaculture*, 518, 734657.