تأثیر مخلوط پپتیدهای زیست فعال ماهی ساردین، بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی سرم، پراکسیداسیون چربی‌ها و فراسنجه‌های خونی در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی ویستار تحت استرس بی‌حرکتی

شعله حیدری[۱]، ابراهیم حسین نجدگرامی[۱*] و مهدی نیکو[۲]

[۱] ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم،گروه زیست‌شناسی

[۲] ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده منابع طبیعی،گروه شیلات

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۲/۲ تاریخ پذیرش: ۹۶/۷/۳

چکیده

امروزه برای کاهش عوارض ناشی از انواع استرسها از داروهای شیمیایی مانند فلوکساتین استفاده می‌شود که دارای اثرات جانبی فراوانی می‌باشند. دراین تحقیق تأثیر استفاده از پپتیدهای زیست فعال بر روی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (TAC)، مالون دی آلدئید (MDA) و همچنین فراسنجه‌های خونی در مقایسه با داروی شیمیایی فلوکساتین در موشهای بزرگ آزمایشگاهی تحت استرس بی‌حرکتی بررسی شد. تعداد ۳۰ عدد موش نر در ۶ تیمار (کنترل C، استرس بی‌حرکتی به مدت ۲ ساعت در روز S، پپتیدهای زیست فعال P، فلوکساتین F، استرس و فلوکساتین S+F، استرس و پپتیدهای زیست فعال S+P) به مدت ۲۱ روز تحت تیمار قرارگرفتند. نتایج طرح نشان داد که اختلاف معنی‌دار بین تیمار C و تیمارهای S+P و S+F در TAC و MDA مشاهده نشد (P>۰,۰۵). همچنین در تیمار استرس بی‌حرکتی، تعداد گلبولهای قرمز، میزان هماتوکریت و هموگلوبین خون، به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمار کنترل و تیمارهای S+F و S+P افزایش یافت (P<۰,۰۵). سیستم ایمنی سلولی در موشها، تحت تأثیر استرس قرارگرفت و تعداد گلبولهای سفید و لنفوسیتها نسبت به کنترل و S+P به‌طور معنی‌داری کاهش یافتند (P<۰,۰۵). در حالیکه تعداد نوترفیلها افزایش معنی‌داری را نسبت به سایر تیمارها نشان داد (P<۰,۰۵). نتایج این طرح نشان داد که باتوجه به اثرات جانبی فلوکساتین که در درمان برخی از بیماریهای روحی و روانی استفاده می‌شود، پپتیدهای زیست فعال می‌توانند به‌عنوان یک جایگزین در صنعت دارویی موردمطالعه قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: پپتید زیست فعال، ماهی ساردین، فلوکساتین، آنتی‌اکسیدان، سیستم ایمنی، استرس بی‌حرکتی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۴۳۴۲۷۴۵۴۵ ، پست الکترونیکی: e.gerami@urmia.ac.ir

مقدمه

ازنظر تعریف لغوی، استرس به هرگونه پاسخ عمـومی و غیراختصاصـی بـدن در جهت حفظ هومئوستازی (Homeostasis) بدن می‌گویند (۲۰). امروزه ثابت‌شده است که شکل‌گیری بیماری‌های مختلف جسمانی و روانی مانند مشکلات قلبی و عروقی، پوستی، دستگاه ایمنی و بیماری‌هایی همچون زخم معده و سرطان ارتباط تنگاتنگی با استرس دارد (۱۰ و ۱۵). برای بررسی تأثیرات استرس و پاسخهای فیزیولوژیکی در بدن از مدلهای مختلفی استفاده می‌شود که از آن جمله می‌توان به مدل استرس محدودیت حرکتی (Restraint stress) اشاره کرد که در طول ۸۵ سال گذشته در جوندگان، به‌عنوان یک مدل در بررسی بیماریهای انسانی (۲۷) و در طول ۳۵ سال گذشته برای بررسی بیماریهای روانی مورد استفاده قرارگرفته است (۷). این مدل به‌طور منظم در مطالعه علائم رفتاری،

فیزیولوژیکی، نقص سیستم ایمنی بدن که بخشی از آن مرتبط با سیستم آنتی‌اکسیدانی می‌باشد استفاده می‌شود (۱۲، ۳۶ و ۴۶). امروزه برای درمان طیف وسیعی از مشکلات روانی، عصبی و افسردگی حاصل از آن و همچنین کنترل بسیاری از بیماری‌های دیگر ناشی از استرس، از داروهای ضدافسردگی مثل فلوکساتین (Fluoxetine)، پاروکسیتین (Paroxetine)، سرترالین (Sertraline) و فلوکسامین (Fluvoxamine) استفاده می‌کنند که مصرف درازمدت این داروها باعث بروز عوارض جانبی زیادی برای بیماران می‌شود (۵۰). ازاین‌رو محققان برای کاهش عوارض این داروها و جلوگیری از تأثیرات منفی آنها، سعی دریافتن روشها و داروهای ایمن با تأثیرات و عوارض جانبی کمتر دارند. یکی از روش‌هایی که اخیراً در صنعت غذایی پیشنهادشده است استفاده از مواد پروتئینی آبکافت شده طبیعی می‌باشد که به نام پروتئین آبکافته (Hydrolysate protien) یا پپتیدهای زیست‌فعال (Bioactive peptides) معروف هستند.

پپتیدهای زیست‌فعال یا پروتئینهای آبکافته‌ها، اولین بار بوسیله ملاندر در سال ۱۹۵۰ گزارش شد، و به‌عنوان ترکیبات غذایی استخراج‌شده از پروتئین مواد غذایی تعریف می‌شوند که علاوه براهمیت تغذیه‌ای، از حیث در اختیار قراردادن اسیدهای آمینه و سایر ترکیبات زیست فعال، دارای تأثیرات فیزیولوژیکی در بدن هستند (۳۹). پپتیدهای زیست‌فعال معمولاً دارای ۲ تا ۲۰ اسیدآمینه با وزن مولکولی ۲۰۰ تا ۱۸۰۰ دالتون هستند و بطور معمول از توالی‌های مختلف اسیدهای آمینه تشکیل‌شده‌اند که موقعیت خاص قرارگیری این اسیدهای آمینه در زنجیره پپتیدی، تعیین‌کننده ویژگی زیست‌فعالی پپتید می‌باشد (۱۷). پپتیدهای زیست‌فعال دارای اثرات متفاوتی در بدن جانداران می‌باشند که از آن جمله می‌توان به تأثیرات مثبت آنها برروی کاهش فشارخون (ممانعت از فعالیت آنزیم مبدل آنژیوتانسین)، تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن، تأثیرات ضد سرطانی و ضد میکروبی و همچنین تقویت‌کننده سیستم ایمنی و تأثیرات کاهندگی کلسترول اشاره کرد (۳). فعالیت تقویت‌کنندگی سیستم آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از زرده‌ی تخم‌مرغ (۴۷)، آبکافته سویا (۴۰)، ماهی‌ماکرل (۴۹)، پروتئین آب‌پنیر (۸) در مطالعات مختلف گزارش‌شده است. همچنین نتایج سایر مطالعات نشان داده است که پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از آبکافته کازئین به ترتیب در موش (۹) و انسان (۲۵ و ۳۸) باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بدن می‌شود. پپتیدهای زیست‌فعال می‌توانند با تأثیر برروی تکثیر لنفوسیت‌ها و تولید آنتی‌بادی‌ها و همچنین تکثیر نوتروفیلها در انسان (۳۳) و موش (۶ و ۳۴) باعث تقویت سیستم ایمنی شوند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست‌فعال در مدل‌های غذایی و زیستی از طریق سنجش پارامترهایی چون ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و تشکیل مالون دی آلدهید صورت می‌پذیرد (۴۲).

علیرغم انجام مطالعات متعدد در رابطه با تأثیر پپتیدهای زیست‌فعال پروتئین‌های مواد غذایی و بخصوص پپتیدهای زیست فعال آبزیان، هیچ منبعی در رابطه با بحث استرس بی‌حرکتی و تأثیرات پپتیدهای زیست‌فعال در رفع عوارض ناشی از این نوع استرس در منابع علمی یافت نشد. بنابراین، هدف این مطالعه بررسی تأثیر پپتیدهای زیست-فعال ماهی ساردین تخمیر شده بر روی فراسنجه‌های خونی و همچنین آنتی‌اکسیدانی به موشهای حاصل از استرس بی‌حرکتی در مقایسه با داروی فلوکساتین بوده است.

مواد و روشها

حیوانات و تیمارهای آزمایش: برای انجام این تحقیق، تعداد ۳۰ عدد موش نر صحرایی نژاد ویستار سالم با وزن اولیه۲۰ ±۱۰۰ گرم، از خانه حیوانات گروه زیست‌شناسی دانشگاه ارومیه تهیه و به ۶ قفس منتقل شدند. موشها در طول مدت آزمایش، در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد و رژیم نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با

جیره استاندارد تغذیه شدند و بعد از دو هفته آداپتاسیون با شرایط آزمایش، به ۶ گروه آزمایشی تقسیم و با تیمارهای موردنظر به مدت ۳ هفته تغذیه شدند. تیمارهای آزمایشی شامل: گروه کنترل بدون استرس بی‌حرکتی(C)، گروه استرس بی‌حرکتی + ۱ میلی‌لیتر آب مقطر(S)، گروه تغذیه با ۱۰میلی‌گرم پپتید در کیلوگرم وزن بدن در۱ میلی‌لیتر آب مقطر(P)، گروه تغذیه با ۲۰ میلی‌گرم فلوکساتین در کیلوگرم وزن بدن در۱ میلی‌لیتر آب مقطر(F)، گروه استرس بی‌حرکتی + ۱۰ میلی‌گرم پپتید در کیلوگرم وزن بدن در ۱ میلی‌لیتر آب مقطر(S+P)، گروه استرس بی‌حرکتی +۲۰ میلی‌گرم فلوکساتین در کیلوگرم وزن بدن در ۱ میلی‌لیتر آب مقطر(S+F).

فلوکساتین و پپتیدهای زیست‌فعال: فلوکساتین و پپتیدهای زیست فعال (۲۴) براساس وزن بدن موشها روزانه در ۱ میلی‌لیتر آب مقطر حل می‌شدند و نیم ساعت بعد از استرس بی‌حرکتی، از طریق گاواژ وارد دستگاه گوارش موشها می‌شد. در تیمار استرس بی‌حرکتی (۱) به‌جای محلول پپتیدهای زیست‌فعال و فلوکساتین، یک میلی‌لیتر آب مقطر خالص استفاده شد. همچنین کلیه موازین اخلاقی براساس دستورالعمل کمیته اخلاق و مراقبت از حیوانات دانشکده علوم دانشگاه ارومیه انجام شد.

پپتیدهای زیست فعال در این مطالعه از تخمیر ماهی ساردین در کنار نمک تولید گردید. جهت استخراج پپتید از محلول تخمیر شده ابتدا محلول در یک دستگاه خشک‌کن انجمادی خشک گردید و سپس بوسیله یک همزن الکتریکی ۱ قسمت پودر خشک‌شده با ۵ قسمت آب مقطر در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱/۵ ساعت در حمام آبی مخلوط شدند. در انتها، مخلوط بهم زده‌شده در دور g ۱۰۰۰۰ برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید و محلول رویی توسط کاغذ واتمن فیلتر گردیده تا عصاره پپتیدی شفافی حاصل گردد. عصاره پپتیدی سپس با استفاده از خشک‌کن انجمادی خشک گردیده و در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد برای استفاده‌های بعدی نگهداری شد. مقدار پروتئین عصاره پپتیدی به روش بیورت با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) تعیین می‌گردد (۲۲).

استرس بی‌حرکتی: برای القای استرس بی‌حرکتی از پلاستیکهای شفاف که به شکل مخروطی و با توجه به‌اندازه موشهای بزرگ آزمایشگاهی درست‌شده بودند استفاده شد. دراین محفظه‌ها موش‌ها قابلیت حرکت را تا حد ممکن از دست می‌دادند. موش‌ها روزانه به مدت ۲ ساعت (از ساعت ۱۰ تا ۱۲ صبح) در درون این مهارکننده‌ها قرارداده و تا حدامکان از تأثیر عوامل استرس‌زای دیگر مانند صدا و تغییرات نوری و دمایی بر آنها جلوگیری به عمل می‌آمد. پس از پایان القای استرس، حیوانات به قفس‌های خود برگردانده می‌شدند و پس از نیم‌ساعت استراحت، با فلوکساتین و پپتیدهای مورد نظر گاواژ می‌شدند.

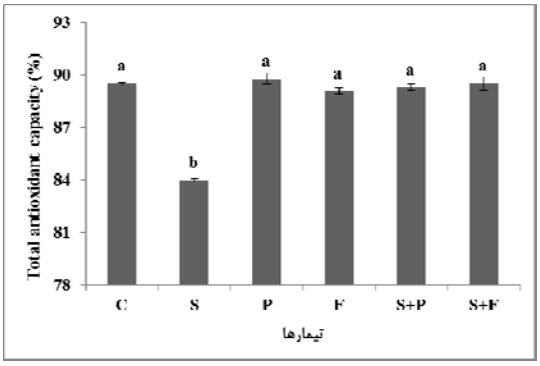
خون‌گیری و آنزیمهای آنتی‌اکسیدانی: در پایان ۲۱ روز دوره‌ی تحقیق، تمامی حیوانات بوسیله اتر بیهوش شدند و سپس خون‌گیری به‌صورت مستقیم از قلب انجام شد و سرم نمونه‌های خونی توسط سانتریفیوژ (g ۳۵۰۰، ۱۰ دقیقه) جدا شد و برای اندازه‌گیری ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی و پراکسیداسیون چربیها در ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. همچنین مقداری از خون‌گرفته شده برای اندازه‌گیری فراسنجه خونی و همچنین کشت افتراقی خون بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شد. ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی سرم در موش‌ها با استفاده از رادیکال‌های ABTS تهیه‌شده از ABTS و پتاسیم پرسولفات (به نسبت ۱ به ۱) به روش نیکو و همکاران (۲۰۱۴) (۳۷) موردسنجش قرارگرفتند. جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۷۳۴ نانومتر بااستفاده از اسپکتروفتومتر قرائت گردید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی برحسب درصد در مقایسه با نمونه کنترل

بیان گردید. مالون دی آلدئید سرم توسط اسپکتروفتومتری تیوباربیتوریک اسید بااستفاده از روش Buege and Aust در سال ۱۹۷۸ صورت پذیرفت. جذب سوپرناتانت توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. مقدار مالون دی آلدئید برحسب میلی‌گرم معادل مالون دی آلدئید در لیتر سرم تعیین شد.

محاسبات آماری: داده‌های بدست آمده در این طرح قبل از انجام هرگونه آنالیز آماری ازنظر همسان بودن واریانسها مورد ارزیابی قرارگرفتند. سپس براساس روشهای موجود، آنالیز واریانس یک‌طرفه در نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۷ (SPSS Inc., IL, USA) بر روی‌داده‌ها اجرا شد و تست دانکن (Duncan's multiple range Duncan,s multiple range) برای تعیین معنی‌دار بودن میانگین‌ها، در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام شد.

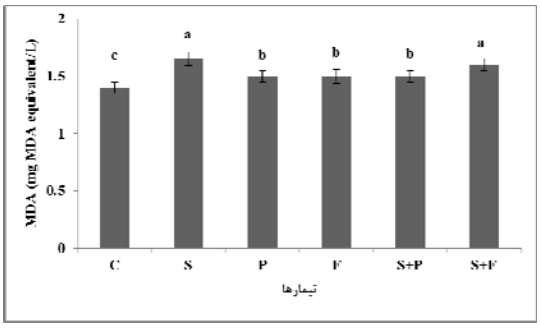
نتایج

نتایج تأثیرات استفاده از پپتیدهای زیست‌فعال ماهی ساردین بر روی ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی (TAC) در مقایسه با داروی شیمیایی فلوکساتین در سرم خون موشهای تحت استرس بی‌حرکتی، در شکل ۱ ارائه‌شده است. نتایج نشان داد که استفاده ازاسترس بی‌حرکتی (S)، به‌طور معنی‌داری میزان TAC را نسبت به سایر تیمارها، کاهش می‌دهد (P<۰,۰۵). میزان این پارامتر در سایر تیمارها به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و بالاترین میزان TAC در تیمار P (۱۰میلی‌گرم پپتید در کیلوگرم وزن بدن در۱ میلی‌لیتر آب مقطر) دیده شد اگرچه اختلاف معنی‌دار با سایر تیمارها به‌استثناء تیمار S نداشت (P<۰,۰۵). همچنین نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌دار بین استفاده از پپتیدهای زیست‌فعال به همراه استرس(S+P) و همچنین داروی فلوکساتین به همراه استرس (S+F)، در میزان این پارامتر دیده نشد (P<۰,۰۵) به‌عبارت‌دیگر پپتیدهای زیست‌فعال استفاده‌شده در این تحقیق، توانایی افزایش TAC را در برابر استرس در مقایسه با داروی شیمیایی فلوکساتین داشتند.



شکل ۱- تاثیر استفاده از پپتیدهای زیست فعال و فلوکساتین بر روی ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در سرم موشهای بزرگ آزمایشگاهی نژاد ویستار تحت استرس بی‌حرکتی. در این شکل: کنترل C، استرس بی‌حرکتی به مدت ۲ ساعت در روز S، پپتیدهای زیست فعال P، فلوکساتین F، استرس و فلوکساتین S+F، استرس و پپتیدهای زیست فعال S+P. * ستونها با حروف متفاوت انگلیسی، دارای اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد می‌باشند

تأثیرات استفاده از تیمارهای این آزمایش بر روی میزان MDA که شاخصی برای پراکسیداسیون چربیها می‌باشد در سرم خون بررسی شد و نتایج آن در شکل شماره ۲ ارائه شده است.



شکل ۲- تأثیر استفاده از پپتیدهای زیست فعال و فلوکساتین بر روی پراکسیداسیون چربیها در سرم موشهای بزرگ آزمایشگاهی نژاد ویستار تحت استرس بی‌حرکتی. در این شکل: کنترل C، استرس بی‌حرکتی به مدت ۲ ساعت در روز S، پپتیدهای زیست فعال P، فلوکساتین F، استرس و فلوکساتین S+F، استرس و پپتیدهای زیست فعال S+P.
*ستونها با حروف متفاوت انگلیسی، دارای اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد می‌باشند

بر اساس این نتایج، بالاترین میزان MDA در تیمارهای S+F و S مشاهده شد که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار داشتند (P<۰,۰۵). کمترین میزان MDA در تیمار C مشاهده شد که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار داشت (P<۰,۰۵). به‌عبارت‌دیگر استفاده از پپتیدهای زیست‌فعال به همراه استرس میزان MDA را نسبت به تیمار S+F و S در سرم خون کاهش می‌دهد (P<۰,۰۵).

پارامترهای خونی موش‌های تغذیه‌شده با پپتیدهای زیست-فعال در شرایط استرس بی‌حرکتی در جدول شماره ۱ ارائه‌شده است. براساس این نتایج استفاده از پپتیدها تأثیر معنی‌دار بر روی فراسنجه‌های خونی موردبررسی گذاشته است (P<۰,۰۵). تعداد گلبولهای قرمزخون به‌طور معنی‌داری در تیمارهای S+F و S کاهش یافت (P<۰,۰۵) و پایین‌ترین تعداد گلبولهای قرمز در تیمارS+F دیده شد در حالیکه استفاده از پپتیدها باعث عدم‌تغییر تعداد گلبولهای قرمزخون در موشهای تیمار S+P شد که اختلاف معنی‌دار با تیمار C نداشت (P<۰,۰۵). بالاترین و پایین‌ترین تعداد گلبولهای سفید خون به ترتیب در تیمارهای S و S+P مشاهده شد که دارای اختلاف معنی‌دار با سایر تیمارهای این‌مطالعه، مخصوصاً با تیمار C بودند (P<۰,۰۵). همچنین نتایج نشان داد که استفاده از پپتیدهای زیست‌فعال باعث کاهش معنی‌دار این سلولها در خون موشهای تحت استرس بی‌حرکتی (S+P) نسبت به تیمار C می‌شود (P<۰,۰۵). استرس بی‌حرکتی (S) میزان هماتوکریت و هموگلوبین خون موشها را به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمار C افزایش داد (P<۰,۰۵). در حالیکه استفاده از فلوکساتین و پپتیدهای زیست‌فعال به همراه استرس (S+F، S+P) باعث کاهش معنی‌دار این پارامترها در خون موشهای مورد بررسی شدند (P<۰,۰۵). خون موشها ازنظر کشت افتراقی گلبولهای سفیدخون در این مطالعه، موردبررسی قرارگرفت و نتایج کشت افتراقی نشان داد که استرس بی‌حرکتی (S) باعث کاهش معنی‌دار لنفوسیتها نسبت به تیمار C در خون موشها می‌شود (P<۰,۰۵). همچنین نتایج نشان داد که استفاده از پپتیدهای زیست‌فعال و فلوکساتین به همراه استرس تغییری در تعداد این دسته از سلولها ایجاد نمی‌کند و تغییرات آنها با تیمار C معنی‌دار نیست (P<۰,۰۵). الگوی تغییرات نوتروفیلها در خون موشها برعکس لنفوسیتها بود به‌طوریکه استرس بی‌حرکتی باعث افزایش معنی‌دار این دسته از سلولها در خون موشها شد (P<۰,۰۵). اختلاف معنی‌دار در تیمارهای S+F و S+P با تیمار C مشاهده نشد (P<۰,۰۵). مونوسیتها از دسته سلولهای سیستم ایمنی ذاتی بدن می‌باشند که در خون موشهای تحت استرس بی‌حرکتی (S) یافت نشدند (not detection). بااین‌حال پایین‌ترین تعداد این دسته از سلولها در تیمارهایی یافت شدند که فلوکساتین استفاده‌شده بود. موشهای تغذیه شده با پپتیدهای زیست-فعال تغییرات عمده‌ای را در این پارامتر نسبت به تیمار C نشان نداند.

جدول ۱- تأثیر استفاده از پپتیدهای زیست‌فعال و فلوکساتین بر روی فراسنجه‌های خونی در موشهای بزرگ آزمایشگاهی نژاد ویستار تحت استرس بی‌حرکتی

Monocyte	Neutrophil	Lymphocyte	WBC (10^3 /ml)	Hb (g/dl)	PCV (%)	RBC (10^6 /ml)	
۵/۰ ± ۱/۰	۲۱/۶ ± ۷/۵ c	۷۲/۶ ± ۲/۵ a	۵/۲ ± ۰/۲ a	۱۳/۲ ± ۰/۲ d	۳۳/۵ ± ۴/۰۵ d	۷/۱ ± ۰/۱ c	C
nd	۳۹/۰ ± ۱/۴ a	۶۰/۵ ± ۰/۶ b	۳/۹ ± ۰/۲ b	۱۵/۲ ± ۰/۳ a	۵۰/۳ ± ۱/۲ a	۸/۵ ± ۰/۳ a	S
۴/۵ ± ۰/۷	۲۸/۰ ± ۸/۵ bc	۶۸/۰ ± ۹/۹ ab	۵/۰± ۰/۶ a	۱۴/۳ ± ۰/۱ b	۳۹/۸ ± ۲/۵ c	۷/۵ ± ۰/۰۷ b	P
۱/۷ ± ۰/۵	۳۶/۲ ± ۴/۳ ab	۶۲/۰ ± ۴/۱ b	۵/۴ ± ۰/۲ a	۱۴/۸ ± ۰/۲ a	۴۵/۴ ± ۱/۷ b	۸/۲ ± ۰/۲ a	F
۵/۰ ± ۱/۰	۲۸/۰ ± ۶/۲ bc	۶۸/۶ ± ۷/۷ ab	۵/۷ ± ۰/۱ a	۱۲/۳ ± ۰/۳ e	۲۷/۸ ± ۲/۶ e	۶/۵ ± ۰/۳ d	S+P
۲/۳ ± ۰/۵	۲۶/۰ ± ۱/۰ c	۷۱/۶ ± ۳/۱ a	۳/۲ ± ۰/۱ c	۱۳/۷ ± ۰/۳ c	۳۷/۳ ± ۰/۵ cd	۷/۳ ± ۰/۱ bc	S+F

* داده‌ها با حروف متفاوت انگلیسی در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد می‌باشند

* در این شکل: کنترل C، استرس بی‌حرکتی به مدت ۲ ساعت در روز S، پپتیدهای زیست‌فعال P، فلوکساتین F، استرس و فلوکساتین S+F، استرس و پپتیدهای زیست‌فعال S+P

بحث

در این تحقیق تأثیرات استفاده از پپتیدهای زیست‌فعال ماهی ساردین در مقایسه با داروی شیمیایی فلوکساتین بر روی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و پراکسیداسیون چربیها در موشهای بزرگ آزمایشگاهی تحت استرس بی‌حرکتی بررسی شد و نتایج نشان داد که استفاده از پپتیدهای زیست‌فعال میزان ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی سرم را در موشهای تحت استرس افزایش و پراکسیداسیون چربیهای آن را کاهش می‌دهد. همچنین میزان فراسنجه‌های خونی موشهای تحت استرس همراه با پپتیدهای زیست‌فعال و همچنین فلوکساتین در این تحقیق بررسی شد که نتایج نشان داد که استفاده از پپتیدهای زیست فعال باعث بهبود معنی‌دار در تعداد سلولهای خونی بخصوص انواع گلبولهای سفید خون در موشهای تحت استرس می‌شود که با سیستم ایمنی موش در ارتباط می‌باشد.

بر اساس مطالعات انجام‌شده استرس در انواع مختلف خود، باعث تولید رادیکالهای آزاد فعال (Free Radical Reaction) در بدن جانداران می‌شود. این رادیکال‌ها پس از تشکیل سبب تخریب غشاء، پروتئینها، آنزیمها و همچنین ساختار DNA در سلولها می‌شوند (۱۶). تغییر ساختار و عملکرد این اجزاء سلولی، با بسیاری از بیمارهای مهم در بدن جانداران ازجمله انواع سرطانها و بیماریهای عصبی در ارتباط می‌باشند (۲۸). بدن جانداران با فعال کردن آنزیمهای آنتی‌اکسیدانی و همچنین دریافت مواد غذایی مانند سبزیجات، میوه‌ها و مواد پروتئینی تجزیه‌شده تحت عملکرد آنزیم‌های دستگاه گوارش به پپتیدها می‌تواند سبب مهار این رادیکال‌ها گردد (۲۱، ۲۸ و ۳۶). نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از پپتیدها، باعث افزایش ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در موشهای تحت استرس می‌شود که نشان‌دهنده تأثیرات مفید پپتید به‌عنوان ترکیب طبیعی در بهبود شرایط موشها می‌باشد. براساس تحقیقات انجام‌شده، پپتیدهای زیست‌فعال دارای خاصیت الکترون و هیدروژن دهندگی و همچنین احیاء کنندگی می‌باشند و از این طریق رادیکالهای آزاد تولیدشده در اثر استرس را به شکل پایدار آن تبدیل می‌کنند و تأثیرات مضر آنها را بی‌اثر می‌سازند (۸، ۳۰ و ۴۱). همچنین باتوجه به اینکه پپتیدهای زیست-فعال ازنظر ساختاری از ۲ تا ۲۰ اسیدآمینه تشکیل‌شده‌اند برخی از این اسیدهای آمینه مانند تریپتوفان، تیروزین، متیونین، سیستئین، هیستامین و فنیل آلانین دارای خواص بالای آنتی‌اکسیدانی و فعالیت مهارکنندگی (Scavenging activity) می‌باشند (۱۲ و ۲۹). بنابراین وجود خاصیت احیاء کنندگی و دارا بودن اسیدهای آمینه آنتی‌اکسیدانی می‌تواند ظرفیت مقابله با استرس را در بدن موشها افزایش دهد. همچنین تأثیرات استفاده از پپتیدهای زیست‌فعال بر میزان پراکسیداسیون چربیها در سرم، از طریق اندازه‌گیری مالون دی آلدئید (MDA) بررسی شد و نتایج نشان داد که استفاده از پپتیدهای زیست‌فعال برخلاف فلوکساتین، باعث کاهش پراکسیداسیون چربیها در موشهای تحت استرس می‌شود. نتایج این تحقیق با نتایج مطالعات خالد و همکاران در سال ۲۰۱۲ که به تأثیرات بازدارندگی پپتیدهای زیست‌فعال بر پراکسیداسیون چربیها بر بافت مغز و کبد موش اشاره‌کرده بودند همخوانی دارد.

بر اساس تحقیقات انجام‌شده استرس مخصوصاً از نوع بی‌حرکتی، می‌تواند سیستم قلبی و عروقی، دستگاه خون‌ساز و همچنین پاسخهای ایمنی را در بدن جانداران تحت تأثیر قراردهد (۱۴، ۱۹، ۴۳ و ۴۸). میلان و همکارانش در سال ۱۹۹۶، گزارش دادند که استفاده از استرس بی‌حرکتی در زمانهای مختلف (۲ ساعت به مدت دو روز و ۶ ساعت به مدت ۶ روز)، تأثیر معنی‌دار بر میزان گلبولهای قرمزخون موش ندارد. نتایج مشابه در مطالعه رایان و همکاران در سال ۲۰۱۲ در موشهای تحت استرس

بی‌حرکتی (۲ ساعت به مدت ۳ روز) بدست آمد. در مطالعه حاضر، استرس بی‌حرکتی باعث افزایش معنی‌دار گلبولهای قرمز، هماتوکریت و هموگلوبولین خون شد که با نتایج مطالعات قبلی در تضاد می‌باشد. به نظر می‌رسد مدت‌زمان استرس بی‌حرکتی باعث تغییر معنی‌دار این پارامترها شده است. همچنین نتایج نشان داد که استفاده از پپتیدهای زیست‌فعال به همراه استرس بی‌حرکتی باعث تعدیل معنی‌دار این پارامترها می‌شود در حالیکه استفاده از داروی فلوکساتین و استرس بی‌حرکتی هیچ‌گونه تعدیلی را در پارامترها ایجاد نمی‌کند. به نظر می‌رسد خاصیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست‌فعال به‌عنوان یک عامل مهم، نقش بازدارنده در افزایش چگالی خون بازی می‌کند. براساس یافته‌ها، هموگلوبین پروتئین اصلی در گلبولهای قرمز خون می‌باشد و ۹۰ درصد وزن خشک آن را تشکیل می‌دهد (۴۵). در زمان استرس، آهن موجود در هموگلوبین از حالت پایدار Fe^{+2} تبدیل به حالت Fe^{+3} تبدیل می‌شود و باعث تشکیل ماده‌ای به نام متموگلوبین (Methemoglobin) می‌شود که ظرفیت حمل اکسیژن در بدن را کاهش می‌دهد و بدن برای مقابله با کاهش ظرفیت حمل اکسیژن، تعداد گلبولهای قرمز را افزایش می‌دهد که درنهایت چگالی آن افزایش می‌یابد (۲).

بر اساس نتایج مطالعات گذشته، استرس بی‌حرکتی از طریق محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- غده فوق کلیوی می‌تواند بر روی تعداد و انواع گلبولهای سفید خون و درنهایت سیستم ایمنی تأثیرگذار باشد (۵ و ۱۱). هورمونهای اصلی مترشحه از غده فوق کلیوی مانند انواع گلوکوکورتیکوئیدها (Corticosterone, Cortisol, Cortisone) نقش اساسی در کاهش پاسخ ایمنی از طریق کاهش التهاب و تولید انواع سیتوکینین‌ها که مسئول تولید و تکثیر انواع لنفوسیتها می‌باشند بازی می‌کنند (۱۸، ۲۳و۳۱). در مطالعه حاضر تعداد گلبولهای سفیدخون و همچنین لنفوسیتها که از اجزای اصلی سیستم ایمنی اکتسابی می‌باشند در تیمار استرس بی‌حرکتی به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد که نشان‌دهنده ضعیف شدن سیستم ایمنی در این دسته از موشها می‌باشد. همچنین تعداد نوتروفیلها در این تیمار به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد. اختلاف معنی‌دار بین تیمار S+P و P با تیمار کنترل مشاهده نشد که نشان‌دهنده تأثیرات مثبت و آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست‌فعال در افزایش سیستم ایمنی باوجود استرس بی‌حرکتی می‌باشد.

نتایج این تحقیق نشان داد که پپتیدهای تولیدشده حین فرایند تخمیر ماهی ساردین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی موشها را در مقابله بااسترس بی‌حرکتی و همچنین مقابله با پراکسیداسیون چربیها افزایش می‌دهد. همچنین پارامترهای خونی موش‌ها تعدیل و سیستم ایمنی بدن در شرایط استرس بی‌حرکتی بهبود یافت. نتایج بدست آمده در این پارامترها با نتایج بدست آمده با داروی فلوکساتین که یک داروی شیمیایی می‌باشد معنی‌دار نیست. از اینرو، پپتید ماهی ساردین تخمیر شده عملکرد بالقوه به‌عنوان یک ترکیب فراسودمند در مدل موش از خود نشان داده و می‌تواند به‌عنوان یکی از مواد جایگزین با داروهای شیمایی مانند فلوکساتین موردبررسی قرارگیرند.

منابع

1. Ahmadi, R., Akbari Rad, S., & Moradi Binabaj, M., 2013. Protective effect of liquid extract of Aloe vera on serum creatine kinase activity in male rats exposed to acute and chronic immobilization stress. Journal of Gorgan University of Medical Science, 29, PP: 29-34
2. Arbos, K. A., Claro, L. M., Borges, L., Santos, C. A., & Weffort-Santos, A. M., 2008. Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts. Nutrition Research, 28, PP: 457-463
3. Arihara, K., 2006. Functional properties of bioactive peptides derived from meat proteins. In Advanced technologies for meat processing, PP: 245-273. CRC Press.
4. Bauer, M. E., Perks, P., Lightman, S. L., & Shanks, N., 2001. Restraint stress is associated

with changes in glucocorticoid immunoregulation. Physiology & behavior, 73, PP: 525-532.

5. Buege, J. A., & Aust, S. D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. Methods in Enzymology, 52, PP: 302–310.

6. Bounous, G., & Kongshavn, P.A., 1982. Influence of dietary proteins on the immune system of mice. The Journal of nutrition, 112, PP: 1747-1755.

7. Boyle, M. P., Brewer, J. A., Funatsu, M., Wozniak, D. F., Tsien, J. Z., Izumi, Y., & Muglia, L. J., 2005. Acquired deficit of forebrain glucocorticoid receptor produces depression-like changes in adrenal axis regulation and behavior. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102, PP: 473-478

8. Chi, C. F., Hu, F. Y., Wang, B., Li, T., & Ding, G. F., 2015. Antioxidant and anticancer peptides from the protein hydrolysate of blood clam (*Tegillarca granosa*) muscle. Journal of Functional Foods, 15, PP: 301-313

9. Cheison, S. C., Wang, Z., & Xu, S. Y., 2007. Preparation of whey protein hydrolysates using a single-and two-stage enzymatic membrane reactor and their immunological and antioxidant properties: characterization by multivariate data analysis. Journal of agricultural and food chemistry, 55, PP: 3896-3904

10. Dadkhah A., Khalaj Gh., Fatemi F., Dini S., Naeege, S., & Fadaee Monfared M., 2016. Considering the effect of Golpar (*Heracleum Persicum*) essential oils on the acute hepatotoxcity induced by acetaminophen in Wistar rats. Journal of Animal Researches, 29, PP: 292-306.

11. Dhabhar, F. S., Miller, A. H., McEwen, B. S., & Spencer, R. L., 1996. Stress-induced changes in blood leukocyte distribution. Role of adrenal steroid hormones. The journal of immunology, 157, PP: 1638-1644

12. Dantzer, R., O'Connor, J. C., Freund, G. G., Johnson, R. W., & Kelley, K. W., 2008. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. Nature reviews neuroscience, 9, PP; 46-56.

13. Davalos, A., Miguel, M., Bartolome, B., & Lopez-Fandino, R., 2004. Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. Journal of Food Protection, 67 , PP: 1939-1944.

14. Drolet, G., Dumont, É. C., Gosselin, I., Kinkead, R., Laforest, S., & Trottier, J. F., 2001. Role of endogenous opioid system in the regulation of the stress response. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 25, PP: 729-741.

15. Eysenck, M. W., 2000. Psychology: A student's handbook. Taylor & Francis, PP:1-436

16. Esch, T., Fricchione, G. L., & Stefano, G. B., 2003. The therapeutic use of the relaxation response in stress-related diseases. Medical Science Monitor, 9, PP: 23-34

17. Erdmann, K., Cheung, B. W., & Schröder, H., 2008. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. The Journal of nutritional biochemistry, 19, PP: 643-654

18. Fukui, Y., Sudo, N., Yu, X. N., Nukina, H., Sogawa, H., & Kubo, C., 1997. The restraint stress-induced reduction in lymphocyte cell number in lymphoid organs correlates with the suppression of in vivo antibody production. Journal of neuroimmunology, 79, PP: 211-217.

19. Falconer, J., Chan, E. C., Madsen, G., Thomson, M., Davies, J., & Smith, R., 1988. Secretion of β-endorphin into the maternal circulation by uteroplacental tissues in response to hypoglycaemic stress. Journal of Endocrinology, 118, PP: 5-8

20. Folkow, B., Schmidt, T. H., Moberg, K. U., Henry, J. P., & Henry, J. P., 1997. Stress, health and the social environment. Published for the Scandinavian Physiological Society by Blackwell Science.

21. Fielding, R. A., & Meydani, M., 1997. Exercise, free radical generation, and aging. Aging Clinical and Experimental Research, 9, PP: 12-18.

22. Gornall, A. G., Bardawill, C. J., & David, M. M., 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. Journal of Biological Chemistry, 177, PP: 751-766.

23. Horiguchi, N., Horiguchi, H., & Suzuki, Y., 2005. Effect of wheat gluten hydrolysate on the immune system in healthy human subjects. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 69, PP: 2445-2449.

24. Je, Y.J., Park, J.Y., Jung, W.K., & Kim, S.K., 2005. Isolation of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitor from fermented oyster sauce, *Crassostrea gigas*. Food Chemistry, 90, PP: 809–814.

25. Khaled, H. B., Ghlissi, Z., Chtourou, Y., Hakim, A., Ktari, N., Fatma, M. A., ... & Nasri, M., 2012. Effect of protein hydrolysates from sardinelle (*Sardinella aurita*) on the oxidative status and blood lipid profile of cholesterol-fed rats. Food research international, 45, PP: 60-68.

26. Kim, J. H., Desor, D., Kim, Y. T., Yoon, W. J., Kim, K. S., Jun, J. S., ... & Shim, I., 2007. Efficacy of αs1-casein hydrolysate on stress-related symptoms in women. European journal of clinical nutrition, 61, PP: 536-541.

27. Keim, K. L., & Sigg, E. B., 1977. Plasma corticosterone and brain catecholamines in stress: effect of psychotropic drugs. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 6, PP: 79-85.

28. Kurihara, H., Fukami, H., Asami, S., Totoda, Y., Nakai, M., & Shibata, H. 2004. Effects of oolong tea on plasma antioxidative capacity in mice loaded with restraint stress assessed using the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay. Biological Pharmacology Bulletin, 27, PP: 1093–1098

29. Lassoued, I., Mora, L., Nasri, R., Jridi, M., Toldrá, F., Aristoy, M. C., ... & Nasri, M., 2015. Characterization and comparative assessment of antioxidant and ACE inhibitory activities of thornback ray gelatin hydrolysates. Journal of Functional Foods, 13, PP:225-238.

30. Li, Z., Wang, B., Chi, C., Gong, Y., Luo, H., & Ding, G., 2013. Influence of average molecular weight on antioxidant and functional properties of cartilage collagen hydrolysates from Sphyrna lewini, Dasyatis akjei and Raja porosa. Food research international, 51, PP: 283-293

31. Millan, S., Gonzalez-Quijano, M. I., Giordano, M., Soto, L., Martin, A. I., & Lopez-Calderon, A., 1996. Short and long restraint differentially affect humoral and cellular immune functions. Life sciences, 59,PP: 1431-1442

32. Miyauchi, H., Hashimoto, S. I., Nakajima, M., Shinoda, I., Fukuwatari, Y., & Hayasawa, H., 1998. Bovine lactoferrin stimulates the phagocytic activity of human neutrophils: identification of its active domain. Cellular immunology, 187, PP: 34-37.

33. Mellander, O., 1950. The physiological importance of the casein phosphopeptide calcium salts. Acta Societatis Medicorum Upsaliensis. Upsaliensis 55, PP:247-255

34. Mercier, A., Gauthier, S. F., & Fliss, I., 2004. Immunomodulating effects of whey proteins and their enzymatic digests. International Dairy Journal, 14, PP: 175-183

35. Miller, N. J., & Rice-Evans, C. A., 1997. Factors influencing the antioxidant activity determined by the $ABTS^{+}$ radical cation assay. Free radical research, 26, PP: 195-199.

36. Nabiuni M., Hojati V., Ghorbani A., & Karimzadeh Bardei L., 2016. The Effect of Curcumin on Liver of Stradiol Valerate -induced Polycystic Ovarian Syndrome Wistar Rat. Journal of Animal Researches, 29, PP: 106-118.

37. Nikoo, M., Benjakul, S., Ehsani, A., Jing, L., Wu, F.F., Yang, N., Xu, B., Jin, Z., & Xu, X., 2014. Antioxidant and cryoprotective effects of a tetrapeptide isolated from Amur sturgeon skin gelatin. Journal of Functional Foods, 7, PP: 609-620.

38. Phelan, M., Aherne-Bruce, S. A., O'Sullivan, D., Fitz Gerald, R. J., & O'Brien, N. M., 2009. Potential bioactive effects of casein hydrolysates on human cultured cells. International Dairy Journal, 19, PP: 279-285

39. Pihlanto, A., & Korhonen, H., 2003. Bioactive peptides and proteins. In S. L. Taylor (Ed.), Advances in food and nutrition research, 47, PP: 175–276. San Diego, USA: Elsevier Inc.

40. Peñta-Ramos, E. A., & Xiong, Y. L., 2002. Antioxidant activity of soy protein hydrolysates in a liposomal system. Journal of Food Science, 67, PP: 2952-2956.

41. Rizzetti, D. A., Fernandez, F., Moreno, S., Ocio, J. A. U., Peçanha, F. M., Vera, G., ... & Wiggers, G. A., 2016. Egg white hydrolysate promotes neuroprotection for neuropathic disorders induced by chronic exposure to low concentrations of mercury. Brain Research, 1646, PP: 482-489.

42.Ryan, S.D. Dolatabadi, N. Chan, S.F. Zhang, X. Akhtar, M.W. Parker, J. Soldner, F. Sunico, C.R. Nagar, S. Talantova, M. 2013. Isogenic human iPSC Parkinson's model shows nitrosative stress-induced dysfunction in MEF2-PGC1α transcription, Cell, 155. PP: 1351-1364

43. Shahidi, F., & Zhong, Y., 2015. Measurement of antioxidant activity. Journal of Functional Foods, 18, PP: 757–781.

44. Steplewski, Z., & Vogel, W. H., 1986. Total leukocytes, T cell subpopulation and natural killer (NK) cell activity in rats exposed to restraint stress. Life sciences, 38, PP: 2419-2427

45. Sivilotti, M. L., 2004. Oxidant stress and haemolysis of the human erythrocyte. Toxicological reviews, 23, PP:169-188.

46. Solomon, M. B., Furay, A. R., Jones, K., Packard, A. E., Packard, B. A., Wulsin, A. C., & Herman, J. P., 2012. Deletion of forebrain glucocorticoid receptors impairs neuroendocrine stress responses and induces depression-like behavior in males but not females. Neuroscience, 203, PP: 135-143.

47. Sakanaka, S., & Tachibana, Y., 2006. Active oxygen scavenging activity of egg-yolk protein hydrolysates and their effects on lipid oxidation in beef and tuna homogenates. Food Chemistry, 95, PP: 243-249

48. Wang, J., Charboneau, R., Barke, R. A., Loh, H. H., & Roy, S., 2002. μ-Opioid receptor mediates chronic restraint stress-induced lymphocyte apoptosis. The Journal of Immunology, 169, PP:3630-3636

49. Wu, H. C., Chen, H. M., & Shiau, C. Y., 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). Food research international, 36, PP: 949-957.

50. Wong, D. T., Bymaster, F. P., & Engleman, E. A., 1995. Prozac (fluoxetine, Lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication. Life sciences, 57, PP: 411-441.

51. Zafir, A., & Banu, N., 2007. Antioxidant potential of fluoxetine in comparison to Curcuma longa in restraint-stressed rats. European Journal of Pharmacolology, 572, PP: 23–31.

The effect of bioactive peptides mixture extracted from sardine on total antioxidant capacity of serum, lipid peroxidation and blood parameters in rats exposed to restraint stress

Abstract

Todays, chemical drugs such as fluoxetine with different side effects are used to reduce stress effects. In the current study, the effects of Bioactive peptides from fermented sardine fish mixture on the total antioxidant capacity (TAC) and lipid peroxidation (MDA) of plasma and blood parameters as well was investigated in comparison with Fluoxetine in restrained male rat. Thirty healthy male rats (100 ± 20 g) were randomly distributed in 6 cages at a density of 5 rat/cage and treated experimental groups (Control C, 2 hours restrained per day S, Bioactive peptides P, Fluoxetine F, S+F, S+P. After 21 days, the results indicated that the lowest TAC and highest MDA was observes in restrained rats than control and S+P ($P<0.05$) whereas no significant difference was seen between control, S+F and S+P ($P>0.05$). The red blood cells, hematocrit and hemoglobin significantly increased in restrained rats than control and S+P ($P<0.05$). The cellular immunity was affected by restrained stress and a significant decrease was observed in the number of leukocytes and lymphocytes than control, S+P and S+F ($P<0.05$) whereas the number of neutrophils showed a significant increase then the others. Overall, our results indicate that bioactive peptides derived from fermented sardine could act as a potential functional ingredient with antioxidant activity for medicinal preparations.

Key word: Bioactive peptides, Sardine, fluoxetine, antioxidant, immune system, restrained stress