آیا تغذیه با جیره حاوی آستاگزانتین می‌تواند منجر به بهبود پاسخ‌های فیزیولوژیک ماهی پرت (♂ *Cichlasoma citrinellum* × ♀ *Cichlasoma synspilum*) در مواجهه با نانو ذرات نقره محلول در آب شود؟

امین مخلص آبادی فراهانی، سالار درافشان*، فاطمه پیکان حیرتی و عیسی ابراهیمی

ایران، اصفهان، دانشگاه صنعتی اصفهان، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۷/۲۵

چکیده

هدف از این مطالعه بهبود سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و شاخص‌های بیوشیمیایی پلاسمای خون ماهی پرت در مواجه با تنش نانو ذرات نقره محلول در آب با استفاده از جیره غنی‌شده با آستاگزانتین به‌تنهایی یا توأم بانمک صفراوی بود. ۲۰۰ قطعه ماهی پرت در سه تیمار، شامل تیمارهای شاهد، آستاگزانتین، آستاگزانتین- نمک صفراوی به مدت ۹۰ روز تغذیه شدند. ماهیان سپس به مدت پنج روز در معرض ۲۵۰ µg/L نانو ذرات نقره محلول در آب قرارگرفتند. نتایج نشان داد که پس از تغذیه با جیره حاوی آستاگزانتین به‌تنهایی، سطح تمام آنزیم‌های اکسیداتیو پلاسما در مقایسه با سایر گروههای آزمایشی کاهش یافت (P<۰/۰۵). تنش نانو ذرات نقره منجر به افزایش سطح آنزیم‌های اکسیداتیو پلاسما در ماهیان گروه شاهد شد اما چنین افزایشی در ماهیان تغذیه‌شده با آستاگزانتین مشاهده نشد (P>۰/۰۵). پس از دوره تغذیه ۹۰ روزه، سطوح آنزیم‌های کبدی آسپارات ترانس آمیناز و آلانین ترانس آمیناز در تیمار آستاگزانتین- نمک صفراوی پایین‌تر از سطوح این آنزیم‌ها در ماهیان سایر گروههای آزمایشی بود (P<۰/۰۵)، پس از تنش نانو ذرات نقره سطح دو آنزیم مذکور در تیمارهای شاهد و آستاگزانتین، به‌طور محسوسی کاهش یافت بااین‌وجود تغییر محسوسی در تیمار آستاگزانتین- نمک صفراوی مشاهده نشد (P>۰/۰۵). نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از آستاگزانتین به‌تنهایی یا در تلفیق بانمک صفراوی می‌تواند باعث بهبود شاخص‌های اکسیداتیو و بیوشیمیایی پلاسمای خون ماهی پرت در مواجه با نانو ذرات نقره شود، اثرات تقویت‌کننده نمک صفراوی براثر بخشی آستاگزانتین در برخی شاخص‌ها مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: ماهی پرت، آستاگزانتین، تنش اکسیداتیو، نانو ذرات نقره

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۱۳۳۹۱۳۵۸۰ ، پست الکترونیکی: sdorafshan@cc.iut.ac.ir

مقدمه

ماهیان زینتی حیوانات خانگی محبوبی هستند که دارای بیش از ۴۵۰۰ گونه آب شیرین و ۱۴۵۰ گونه آب‌شور می‌باشد. تجارت ماهیان زینتی برای خیلی از کشورها مهم می‌باشد (۳۱). یکی از ماهیان محبوب زینتی ماهی پرت خونی است که از دگرآمیزی دو گونه (*Cichlasoma synspilum* و *Cichlasoma citrinellum*) تولید می‌شود (۳۵). میزان تلفات ماهیان زینتی اغلب به‌صورت تقریبی در نظر گرفته می‌شود و مطالعات تجربی و دقیق کمتر صورت گرفته است که این میزان در حدود ۲ الی ۷۲ درصد می‌باشد و این نشان‌دهنده یک مشکل عمده و جدی در صنعت ماهیان زینتی می‌باشد، بااین‌وجود تحقیقات بسیار کمی در این رابطه صورت گرفته است. از جمله تنش‌هایی ماهیان زینتی در معرض آن قرار می‌گیرند، کیفیت پایین آب و وجود فلزات سنگین ازجمله نانو ذرات

نقره در منابع آبی می‌باشد (۳۱).

نانو ذرات نقره، ذرات کوچکی با قطر کوچک‌تر از ۱۰۰ نانومتر هستند. نانو ذرات به دلیل اندازه کوچک، دارای سطح وسیع و اتم‌های فوق متراکم هستند. یک نانو نقره با ابعاد ۹ نانومتری در حدود ۲۴۰۰۰ اتم نقره دارد. نانو مواد نقره از پرکاربردترین نانو مواد در پروژه‌های نانوفنّاوری هستند و یک‌پنجم محصولات تولیدی را به خود اختصاص می‌دهند. آنها به دلیل داشتن خواص ضد میکروبی قوی، در محصولاتی مانند جوراب، باندها، فیلتر هوا، قوطی ذخیره غذا، وسایل آرایشی، ظروف آشپزخانه، اسباب‌بازی و صفحه‌کلید کامپیوترها کاربرد دارند. نانو ذرات نقره برای از بین بردن باکتری‌ها در دمای پایین استفاده می‌شود که در اصطلاح به آن لباس‌شویی نانو نقره (Nano Silver Washing Machine) گفته می‌شود (۱۷). با افزایش تولید محصولات نانو، خطر آزاد شدن نانو ذرات نقره به سیستم فاضلاب و سرانجام ورود به رودخانه، نهر و دریاچه به یک نگرانی تبدیل شد. نتایج مدل‌سازی‌ها نشان داد که بیشتر از ۱۵ درصد نقره به‌صورت یون نقره یا نانو ذرات نقره از پلاستیک‌های ضد میکروب و منسوجات وارد آب‌ها می‌شود. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که نانو ذرات نقره به‌راحتی از جوراب‌های حاوی آنها در طی فرایند شستشو آزاد می‌شود. اگر این مواد به‌درستی مدیریت نشوند، سبب اختلال در عملکرد تصفیه فاضلاب و تجمع حجم وسیع در پساب حاصله می‌شوند (۱۷). نانو ذرات نسبت سطح به حجم بالایی دارند که در همین راستا باعث می‌شود سرعت واکنش‌پذیری بالایی با غشاء سلولی داشته باشند و تولید رادیکال‌های آزاد کنند. مشکل مهمی که موجودات تکامل‌یافته با مولکول اکسیژن دارند، ناشی از ROS است. اختلال در روند اکسیداسیون ممکن است از طریق تولید پراکسیدها و رادیکال‌های آزاد آسیب اکسیداتیو ایجاد کند که طی آن به تمام اجزاء سلول ازجمله پروتئین‌ها، لیپیدها و DNA آسیب وارد می‌شود. به‌عبارت‌دیگر عدم تعادل بین اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها و افزایش اکسیدان‌ها را استرس اکسیداتیو می‌نامند. این پدیده ممکن است به صدمه دیدن بیومولکول‌ها منجر شود و درنتیجه ادامه حیات موجود زنده را به خطر اندازد. مکانیسم دفاع آنتی‌اکسیدانی در ماهی شامل سیستم آنزیمی و آنتی‌اکسیدان‌ها با وزن مولکولی پایین مشابه پستانداران است. اگرچه سیستم ایزوفرم‌های خاص آنزیم‌ها در گونه‌های مختلف ماهی به‌خوبی مشخص نشده‌اند (۱۸). سیستم‌های دفاعی که به جلوگیری از شکل‌گیری اکسی‌رادیکال‌ها گرایش دارند شامل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، و مالوندی‌آلدئید می‌باشد. گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز به‌صورت حیاتی در سم-زدایی رادیکال‌ها به مولکول‌های واکنش ناپذیر اهمیت دارند. در اکوسیستم‌های آبی، اکسیژن محلول و دما متغیرهای محیطی هستند که بر فرآیندهای اکسیدی تأثیر می‌گذارند. این متغیرها باید با دقت در بررسی‌های آزمایشگاهی با استرس اکسیدی کنترل شوند. امروزه استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و سنتتیک نظیر ویتامین‌ها و کاروتنوئیدها مثل آستاگزانتین در افزایش کارایی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی سلول و پیشگیری از تأثیرات سمی آلاینده‌های زیستی محیطی به امری رایج تبدیل‌شده است (۱۰). کاروتنوئیدها، آنتی‌اکسیدان‌های زیستی قویی هستند که انرژی تحریکی اکسیژن منفرد را جذب می‌کند و باعث تخریب مولکول کاروتنوئید می‌گردند، و به این طریق از تخریب مولکول های زیستی در دیگر بافت ها جلوگیری می کند (۱۳). همچنین کاروتنوئیدها از ایجاد واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکال‌های آزاد که با تخریب اسیدهای چرب غیراشباع شروع می‌شود و درنهایت باعث تخریب غشاهای لیپیدی می‌گردند، جلوگیری می‌نماید. آستاگزانتین کاروتنوئید است که در حفاظت از فسفولیپیدهای غشایی و لیپیدهای دیگر در برابر اکسیداسیون مؤثر است. آستاگزانتین یک مکمل غذایی با پایه چربی و وزن مولکولی ۵۹۶/۸ دالتون و فرمول مولکولی $C_{40}H_{52}O$، در آب غیرمحلول و چربی‌دوست

است (۳۰). حیوانات توانایی تولید آستاگزانتین را ندارند و این نیاز خود را از طریق جیره تأمین می‌کنند. میزان جذب کارتنوئیدها در میان آبزیان متفاوت است و بستگی به نوع گونه، طول دوره تغذیه، غلظت کارتنوئید، وزن و سن ماهی مورد مطالعه دارد، به‌عنوان‌مثال قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با وزن متوسط ۴۰۰ گرم تنها ۴ درصد از کارتنوئید موجود در جیره را جذب کرده است (۲۲). باتوجه به قیمت بالای آستاگزانتین اگر بتوان میزان جذب آن را افزایش داد، علاوه بر میزان افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی در بدن ماهی، هزینه‌های تأمین جیره نیز کاهش می‌یابد. نمک صفراوی می‌تواند فرآیند امولسیون شدگی چربی‌ها را تسهیل نماید و میزان جذب ترکیبات با پایه چربی را در روده کوچک افزایش دهد (۱۹). چربی‌ها ابتدا در روده کوچک به شکل آزاد به کمک انتقال‌دهنده‌های لیپوپروتئینی جذب خون می‌شوند. دراین مرحله آستاگزانتین موجود در جیره غذایی، آزاد و وارد سیستم گوارش می‌شود (۱۱). نمک صفراوی می‌تواند این فرآیند را افزایش و تسریع نماید (۲۸). یکی از این نمک‌های صفراوی، ترکیب Sodium Taurocholate با فرمول شیمیایی $C_{26}H_{44}NNaO_7S$ است که به هضم و جذب چربی‌ها کمک می‌کند طی آن فرآیند جذب آستاگزانتین را بیشتر و سریع‌تر می‌شود (۳۵).

هدف از این مطالعه بهبود سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی ماهی پرت در مواجه با تنش نانو ذرات نقره محلول در آب با استفاده از جیره غنی‌شده با آستاگزانتین و آستاگزانتین- نمک صفراوی به‌عنوان ترکیب آنتی‌اکسیدانی مرسوم در پرورش آبزیان بود. ازاین‌رو دراین فعالیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و پارامترهای بیوشیمیایی پلاسما خون ماهی‌های تغذیه‌شده با آستاگزانتین و آستاگزانتین- نمک صفراوی قبل و بعد از قرارگرفتن در معرض تنش نانو نقره، موردبررسی قرارگرفت.

مواد و روشها

۲۰۰ قطعه ماهی پرت با میانگین وزنی۶/۲± ۲۵/۵ گرم و میانگین طولی۰/۴۳± ۶/۳۴ سانتی‌متر به مدت دو هفته با شرایط آزمایشگاهی سازگار شدند. برای این آزمایش، سه تیمار شامل تیمار شاهد، تیمار تغذیه‌شده با ۴ گرم بر کیلوگرم آستاگزانتین و تیمار تغذیه‌شده با ۴ گرم بر کیلوگرم آستاگزانتین و ۱۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نمک صفراوی بر مبنای نتایج یانگ و همکاران در سال ۲۰۱۲ مورد استفاده قرارگرفتند (۳۵). ماهیان تحت آزمایش به مدت ۹۰ روز با جیره‌های تعیین‌شده روزانه ۳ بار (۸، ۱۲ و ۱۶) به میزان ۲ درصد وزنی تغذیه شدند. ترکیبات جیره پایه برحسب درصد شامل پودر ماهی ۲۱/۱۶، سویا ۲۱/۱۶، کلزا ۱۵/۸۷، ذرت ۲۴/۹۳، جو ۱۱/۱۲، روغن آفتاب‌گردان ۰/۵، مکمل‌های معدنی (مکمل معدنی ساخت شرکت خوراک دام و آبزیان مازندران، ایران (آهن ۲۱/۶۲ درصد، روی ۳۶/۰۵ درصد، سلنیوم ۰/۰۷ درصد، کبالت ۰/۳۶درصد، مس ۲۱/۶۳ درصد، منگنز ۱۸/۰۲ درصد، ید ۲/۱۶ درصد، کولین کلراید ۰/۰۴ درصد).) و مکمل‌های ویتامینی (مکمل ویتامینی ساخت شرکت ارس بازار، ایران محتوای ویتامین‌های A ۱۵/۲۴درصد، D_3 ۳/۰۴ درصد، K_3 ۰/۶۰درصد، E ۳/۰۴ درصد، B_1 ۶/۰۹ درصد، B_2 ۰/۹۱ درصد، B_6 ۰/۹۱ درصد، C ۳۰/۴۸ درصد، کلسیم پنتوتنات ۹/۱۴ درصد، متیونین ۱۸/۲۹ درصد، سیستئین ۹/۱۴ درصد).) هرکدام ۲/۳۸ درصد بود و از آستاگزانتین ساخت شرکت BASF آلمان و نمک صفراوی ساخت شرکت Fulka آمریکا استفاده شد. میزان پروتئین خام جیره ۳۷/۴۷ درصد، چربی خام ۳۷/۰۳ درصد، رطوبت ۳/۸۳ درصد و فیبر خام ۳/۳۶ درصد و میزان انرژی جیره ۲۰/۰۳ کیلوژول بر هر گرم جیره بود (۲۹).

در این آزمایش از نانو ذرات نقره ساخت شرکت Nanocid Colloid ایران استفاده شد و مشخصات آن به این شرح بود میزان غلظت ۲۰۰۰ mg/L، اندازه ذرات (قطر هیدرودینامیکی) ۵nm /۱۶۳ الی ۳/۹، میانگین قطر هیدرودینامیکی ۵۴/۸ nm، خلوص ۱۰۰ درصد و قطر بیشینه ۱۲۹ nm بود (۴). در ابتدا به دلیل مشخص نبودن

میزان LC_{50} نانو ذرات نقره، ماهی پرت در معرض غلظت‌های μg/L ۱۰۰۰، ۵۰۰ و ۲۵۰ از نانو ذرات نقره قرار گرفتند تا بیشترین غلظتی که باعث کاهش زنده‌مانی نمی‌شود، مشخص شود (۲۱). بدین منظور ده قطعه ماهی پرت برای هر غلظت در نظر گرفته شد. ماهی‌ها پس از گذراندن دوره تطابق در معرض دُزهای ذکرشده قرار گرفتند. ماهی‌های مواجه شده با غلظت‌های μg/L ۱۰۰۰و ۵۰۰ نانو ذرات نقره کمتر از ۲۴ ساعت تلف شدند و ماهی‌های مواجهه شده با غلظت ۲۵۰μg/L تا ده روز پس از معرض گذاری زنده ماندند. سپس هریک از تیمارهایی که با جیره‌های ذکرشده تغذیه‌شده بودند، در معرض نانو ذرات نقره با غلظت ۲۵۰μg/L برای مدت ۵ روز قرار گرفتند. تانک‌های آزمایش ۲۴ ساعت قبل از اضافه کردن ماهی به دُز موردنظر رسیدند، سپس شسته شده و مجدداً قبل از اضافه کردن ماهی به دُز موردنظر رسیدند تا میزان کاهش دُز ذرات موردنظر که در اثر چسبیدن به سنگ هوا و شیشه تانک ایجاد می‌شود، به حداقل برسد. تعویض آب به مقدار ۶۰ درصد و تنظیم دُز موردنظر هر ۴۸ ساعت یک‌بار انجام شد (۴). نمونه‌برداری از ۵ قطعه از ماهی از هر تیمار به‌صورت تصادفی بعد از تغذیه با جیره‌های موردنظر و بعد از قرارگرفتن در معرض تنش نانو ذرات نقره با بی‌هوش نمودن ماهیان توسط پودر گل میخک (۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر)، از ساقه دمی به میزان نزدیک به یک میلی‌لیتر با استفاده از سرنگ هپارینه شده انجام گرفت و پس برای استحصال پلاسما، در دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد و فوراً به یخچال منتقل گردید. در طول دوره آزمایش، میانگین دمای آب ۲۶ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۵/۸ میلی‌گرم بر لیتر، میزانpH =۸/۱، هدایت الکتریکی ۴۸۲/۲ میکرو زیمنس، آمونیاک ۱/۳۷میلی‌گرم بر لیتر و فسفات کل ۰/۰۹ قسمت در میلیون بود.

سنجش آنزیم‌های اکسیداتیو پلاسما: به‌منظور سنجش کاتالاز(CAT) از روش توصیف شده توسط Goth (1991) استفاده شد (۲۰). اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسیداز دیسموتاز (SOD) از روشویتربورن و همکاران (۱۹۷۵) (۳۳) و برای آنزیم مالون دی آلدئید (MDA) از روش ورتینگتون (۱۹۹۳) استفاده شد (۳۴).

آنزیم‌های کبدی پلاسما: سنجش اسپارتات ترانس آمیناز (AST) اسپارتات ترانس آمیناز موجود در پلاسما بر پایه رنگ انجام شد. اساس این روش تبدیل استارات به گلوتامات درنهایت به مالات است. قرائت و اندازه‌گیری نمونه‌ها با کمک دستگاه اتوانالایزر (TechniconRA-1000,USA) و در طول‌موج ۳۴۰ نانومتر انجام شد. برای سنجش آلانین ترانس آمیناز (ALT) میزان آلانین ترانس آمیناز موجود در پلاسما از روش رنگ‌سنجی و با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون بود. قرائت نمونه‌ها با کمک دستگاه اتوانالایزر و در طول‌موج ۳۴۰ نانومتر انجام گردید. برای سنجش آلکانین فسفاتاز (ALP) نیز از روش رنگ-سنجی براساس تبدیل نیتروفنیل فسفات به فسفات استفاده شد. این آزمون با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون انجام شد و نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اتوانالایز با طول ۴۵۰ نانومتر قرائت شد (۲۷).

پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین پلاسما: برای سنجش میزان کل پروتئین‌های موجود در پلاسما از روش بردفورد (۱۹۷۶) استفاده شد (۱۵). در این روش، میزان پلاسما آلبومین گاوی به‌عنوان محلول استاندارد در نظر گرفته شد و غلظت پروتئین در طول‌موج ۵۴۶ نانومتر و در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد محاسبه شد. برای اندازه‌گیری میزان آلبومین پلاسما از روش کومار و همکاران در سال ۲۰۰۵ استفاده شد (۲۵)، این روش شامل واکنش آلبومین با برموکرزول گرین در شرایط اسیدی و تشکیل کمپلکس سبز مایل به آبی است که شدت رنگ آن متناسب با غلظت آلبومین موجود در نمونه است. آلبومین پلاسما با استفاده از دستگاه اتوانالایزر (TechniconRA-1000,USA) و در طول‌موج ۶۲۰ نانومتر

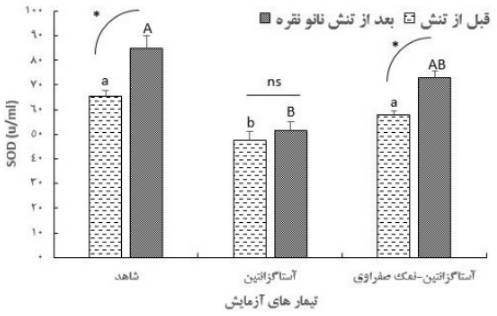
اندازه‌گیری شد و مقدار آلبومین پلاسما (گرم بر دسی لیتر) محاسبه شد. میزان گلبولین پلاسما از تفاضل میزان آلبومین از پروتئین کل برای هر نمونه مصاحبه شد (۲۷).

تحلیل آماری: برای بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون Kalmogorov- Smiranov و آنالیز داده‌ها با استفاده نرم‌افزارهای SPSS 19 و Excell 2013 انجام شد. این آزمایش در طرح کاملاً تصادفی انجام و با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (one way ANOVA) وجود اختلاف معنادار بودن بین تیمارها در سطح$P<۰/۰۵$ تحلیل شد. برای مقایسه میانگین تیمارهای مختلف پیش یا پس از تنش با استفاده از آزمون Duncan در سطح معناداری ۰/۰۵ درصد استفاده شد. برای مقایسه میانگین هر شاخص در هر تیمار پیش و پس از تنش از آزمون *t*-student مستقل در سطح ($P<۰/۰۵$) استفاده شد.

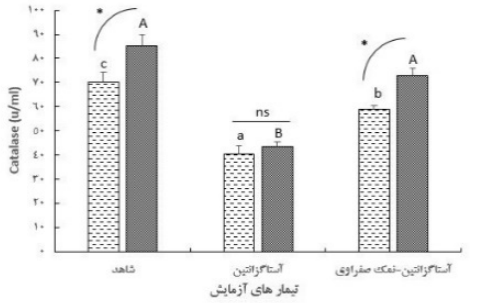
نتایج

آنزیم‌های اکسیداتیو پلاسما: استفاده از آستاگزانتین به‌تنهایی در جیره غذایی به مدت ۹۰ روز باعث کاهش سطح تمام آنزیم‌های اکسیداتیو موردبررسی در مقایسه با تیمار شاهد شد (شکل۱) ($P<۰/۰۵$). درحالی‌که استفاده از آستاگزانتین به‌صورت توأم بانمک صفراوی تنها باعث کاهش معنادار سطح آنزیم کاتالاز (CAT) در مقایسه با تیمار شاهد شد و بر روی سایر آنزیم‌های دفاع انتی اکسیدانی بی‌تأثیر بود (شکل۲–ب)، ($P<۰/۰۵$) آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و مالون دی آلدئید (MDA) در مقایسه با تیمار شاهد تفاوت معناداری را نشان ندادند (شکل۱–الف، ج)، ($P<۰/۰۵$). پس از تنش نانو ذرات نقره سطح تمامی آنزیم‌های اکسیداتیو در تیمار شاهد و آنزیم‌های کاتالاز و سوپر اکسیداز دیسموتاز در تیمار آستاگزانیتن– نمک صفراوی به‌صورت معناداری افزایش یافت (شکل۱)، ($P<۰/۰۵$) ولی این افزایش در تیمار آستاگزانتین مشاهده نشد (شکل۲) ($P<۰/۰۵$). به‌طور مشخص می‌توان بیان نمود که تغذیه ماهیان با آستاگزانتین به‌تنهایی منجر به کاهش اثرپذیری آنها از تنش نانو ذرات نقره در مقایسه با سایر گروههای آزمایشی بر مبنای تغییرات سطوح آنزیم‌های اکسیداتیو پلاسما شده بود.

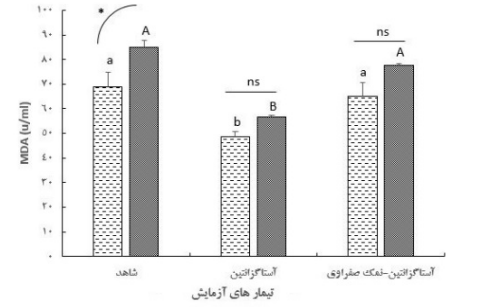
الف



ب



ج

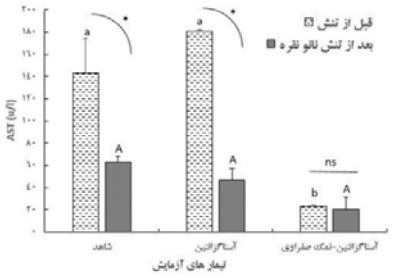


شکل۱– آنزیم‌های اکسیداتیو پلاسما ماهی پرت تغذیه‌شده با جیره‌های مختلف آزمایشی پیش و پس از تنش نانو ذرات نقره محلول در آب ۲۵۰µg/L به مدت ۵ روز. الف) سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) ب: کاتالاز (CAT) ج: مالون دی آلدئید (MDA). حروف کوچک نشان‌دهنده تفاوت معنادار در بین تیمارها پیش از تنش و حروف بزرگ نشان‌دهنده تفاوت معنادار بین تیمارهای مختلف آزمایشی پس از تنش

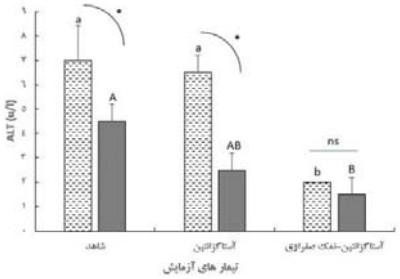
نانو ذرات نقره است. (Duncan; P<۰/۰۵) (*) نشان‌دهنده تفاوت معنادار بین زمان پیش و پس از تنش نانو ذرات نقره در یک تیمار مشخص است (t. test, P <۰/۰۵)

شاخص‌های بیوشیمیایی پلاسما: در پایان دوره ۹۰ روزه تغذیه با جیره‌های مورد آزمایش، سطح آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آلکالین فسفاتاز (ALP)، پروتئین کل و گلبولین در تیمار شاهد تفاوت معناداری با تیمار آستاگزانتین نداشت (شکل۲- الف، ب، ج)، (P<۰/۰۵) همچنین تفاوت معناداری بین ماهیان تیمار شاهد و تغذیه شده با جیره حاوی آستاگزانتین- نمک صفراوی، در آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP)، پروتئین کل و گلوبولین مشاهده نشد (شکل۲-ج)، (P<۰/۰۵) بااین‌وجود سطح آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) در تیمار آستاگزانتین- نمک صفراوی به‌صورت معناداری کمتر از دو تیمار دیگر بود (شکل۲- الف، ب) (P<۰/۰۵). پس از مواجه با نانو ذرات نقره به مدت ۵ روز، سطح آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) در تیمارهای شاهد و آستاگزانتین نسبت به زمان قبل از تنش به‌صورت معناداری کاهش یافت (P<۰/۰۵) ولی این کاهش در تیمار آستاگزانتین- نمک صفراوی مشاهده نشد (شکل ۲- ب، ج). هیچ تفاوت معناداری در میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز در تیمارهای متفاوت در زمان پیش از تنش در مقایسه با پس‌ازآن مشاهده نشد (شکل۲- ب، ج)، (P<۰/۰۵) همچنین میزان پروتئین کل و گلوبولین پلاسما در تیمار شاهد پس از تنش نانو ذارت نقره به‌صورت معناداری کاهش یافت (P<۰/۰۵)، ولی این کاهش در تیمارهای آستاگزانتین و آستاگزانتین - نمک صفراوی مشاهده نشد (شکل۲- د، هـ) (P<۰/۰۵). علی‌رغم این، میزان آلبومین در تیمار شاهد پس از تنش نانو ذرات نقره کاهش معناداری نداشت (P<۰/۰۵) ولی در تیمار آستاگزانتین به‌صورت معناداری کاهش پیدا کرد (شکل ۲-و)، (P<۰/۰۵).

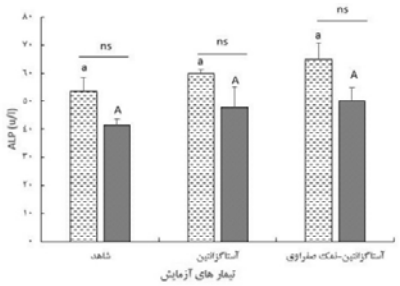
الف



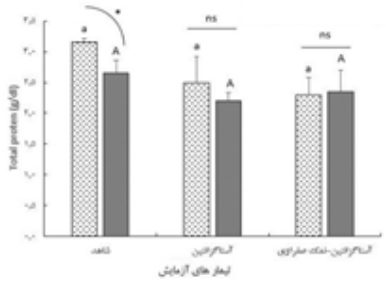
ب



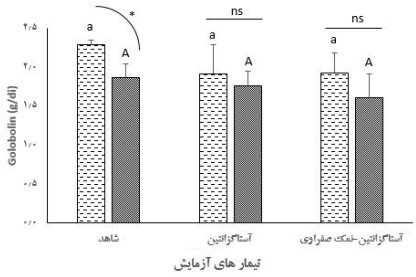
ج



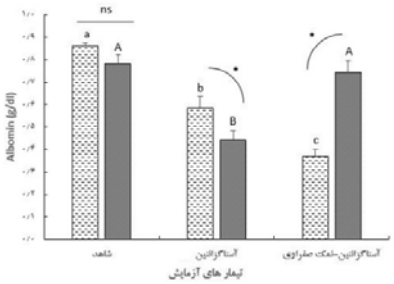
د



ه



و



شکل-۲- شاخص‌های بیوشیمیایی پلاسما ماهی پرت تغذیه‌شده با جیره‌های مختلف آزمایشی پیش و پس از تنش نانو ذرات نقره محلول در آب ۲۵۰µg/L به مدت ۵ روز. الف: آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) ب: آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، ج: آلکالین فسفاتاز (ALP)، د: پروتئین کل هـ: گلوبولین و: آلبومین. حروف کوچک نشان‌دهنده تفاوت معنادار در بین تیمارها پیش از تنش و حروف بزرگ نشان‌دهنده تفاوت معنادار بین تیمارهای مختلف آزمایشی پس از تنش نانو ذرات نقره است (Duncan; P<۰/۰۵) علامت (*) نشان‌دهنده تفاوت معنادار بین زمان پیش و پس از تنش نانو ذرات نقره در یک تیمار مشخص است (t. test, P <۰/۰۵)

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد میزان آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و مالون دی آلدئید در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی آستاگزانتین به مدت ۹۰ روز در مقایسه با تیمار شاهد به‌صورت معناداری کمتر بود. آنتی‌اکسیدان‌ها ازجمله آستاگزانتین از واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکال‌های آزاد که با تخریب اسیدهای چرب غیراشباع شروع می‌شود و درنهایت باعث تخریب غشاهای لیپیدی می‌شوند، جلوگیری می‌کند (۲۴). در بررسی اثر ویتامین E در دفاع آنتی‌اکسیدانی، کفشک ماهی(*Scophthalmus maximus*) و شانک زرد باله (*Acanthopagrus latus*) مشاهده شد میزان آنزیم کاتالاز در هر دو گونه با افزایش سطح ویتامین E، کاهش یافت اما کاهش آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز فقط در شانک زرد باله گزارش‌شد که می‌تواند بیانگر اثر متفاوت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در گونه‌های متفاوت باشد (۱۶). در مطالعه حاضر پس از تغذیه با جیره‌های مورد آزمایش میزان شاخص مالون دی آلدئید (MDA) در تیمار آستاگزانتین- نمک صفراوی برخلاف انتظار در مقایسه با تیمار آستاگزانتین به‌صورت معناداری بیشتر بود ولی با تیمار شاهد تفاوت معناداری نداشت. افزایش آنزیم‌های اکسیداتیو در تیمار آستاگزانتین- نمک صفراوی می‌تواند به دلیل افزایش جذب چربی باشد (۳۵). مطالعه بی‌ادرمن در سال ۲۰۰۵ نشان داد افزودن روغن ماهی به جیره به مدت ۳۰ روز باعث افزایش سطح سوپراکسید دیسموتاز و پس از ۶۰ روز باعث افزایش سطح میزان آنزیم مالون دی آلدئید می‌شود (۱۴). این مطالعه نشان داد که برای افزایش سطح آنزیم مالون دی آلدئید به مدت‌زمان بیشتری نیاز است. میزان آنزیم‌های اکسیداتیو در همه تیمارها پس از مواجه با نانو ذرات نقره به‌صورت معناداری افزایش پیدا کرد ولی این افزایش در تیمار آستاگزانتین مشاهده نشد که به‌خوبی نشان می‌دهد افزودن آستاگزانتین با خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود باعث کاهش اثرات نانو نقره در میزان آنزیم‌های اکسیداتیو شده است ولی در تیمار آستاگزانتین– نمک صفراوی شاید با افزایش جذب چربی جیره منجر به افزایش سطح آنزیم‌های اکسیداتیو پلاسما شده است، بااین‌وجود نتیجه‌گیری قطعی دراین خصوص نیازمند گنجاندن یک تیمار منحصراً تغذیه شده بانمک صفراوی و ارزیابی میزان چربی کبد و لاشه و سطوح چربی، کلسترول و تری گلیسیرید پلاسما است.

دراین مطالعه پس از مواجه با نانو ذرات نقره سطح تمام آنزیم‌های اکسیداتیو موردبررسی در تیمار شاهد افزایش یافت که دلیل آن می‌تواند خاصیت اکسیدکنندگی نانو ذرات نقره باشد. در پژوهشی که توسط آتتیا (۲۰۱۴) بر روی موش انجام شد، مشاهده شد که میزان سوپر اکسید دیسموتاز به‌صورت معناداری در تیمارهایی که تحت تنش

نانو نقره بودن افزایش یافت (۹). در مطالعه حاضر پس از تنش نانو ذرات نقره میزان آنزیم‌های اکسیداتیو در تیمار آستاگزانتین و آستاگزانتین- نمک صفراوی در مقایسه بازمان قبل از تنش اختلاف معنی‌داری نداشت. در مطالعه حامدی و همکاران (۱۳۹۵) مشاهده شد نانو ذرات اکسید روی تأثیر مخربی بر ویژگی‌های هیستوپاتولوژی کبد و شاخص‌های بیوشیمیایی کبد موش دارد (۳).

آنزیم‌های آلانین آمینو ترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز در میتوکندری حیوانات آبزی حضورداشته و سطح آن‌ها شاخص مهمی برای تشخیص آسیب های کبدی ماهی است (۲۷). باتوجه به مطالعات پیشین انتظار می‌رفت جیره حاوی آستاگزانتین باعث بهبود عملکرد کبد درنتیجه کاهش سطح آنزیم‌های کبدی شود ولی نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که پس از ۹۰ روز تغذیه با جیره‌های مورد آزمایش، فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز در تیمارهای شاهد و آستاگزانتین تفاوت معناداری باهم نداشتند. در مطالعه لیو و هارد در (۲۰۱۲) از ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آستاگزانتین در جیره گربه‌ماهی روگاهی (*Ictalurus punctatus*) استفاده شد و باعث کاهش معنادار آنزیم‌های کبدی شد (۲۶). بااین‌وجود در مطالعه که توسط اکبری و ربانی نژاد (۱۳۹۵) بر روی ماهی طلال (*Rastrelliger kanagurta*) مشخص شد که استفاده از مکمل آستاگزانتین باعث کاهش معنادار آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینو ترانسفراز می‌شود ولی تأثیر معناداری بر شاخص آلکالین فسفاتاز نداشت (۱). همچنین دلیل دیگر کاهش سطح آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز پس از تغذیه با جیره‌های مورد آزمایش در تیمار آستاگزانتین- نمک صفراوی می‌تواند این باشد که آسیب سلول‌های کیسه صفرا باعث کاهش ترشح نمک‌های صفراوی و افزایش آنزیم‌های کبدی می‌شود (۱۲) و استفاده از نمک صفراوی در جیره باعث کمک به فعالیت‌های کبد و درنتیجه کاهش آنزیم‌های کبدی می‌شود. در مطالعه حاضر میزان آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز در تیمارهای شاهد و آستاگزانتین پس از مواجه با نانو ذرات نقره کاهش داشته است. نقره از طریق تولید رادیکال‌های آزاد سبب تخریب سلول‌های کبدی و افزایش میزان آلانین آمینوترانسفراز در خون می‌شود (۵). باتوجه به اینکه حضور باکتری‌های مضرر در کبد می‌تواند باعث افزایش آنزیم‌های کبدی شود به نظر می‌رسد استفاده از نقره، اثرات مضر بر آنزیم‌های کبدی نداشته و باعث بهبود آنزیم آلکالین فسفاتاز کبدی می‌شود که می‌توانند به دلیل خواص ضد باکتریایی نانو ذرات نقره باشد و باعث افزایش اثربخشی، کاهش عوارض جانبی و مقدار سمیت آن شود (۱۰). مطالعه فغانی و همکاران (۱۳۹۲) بر روی اثر فلزات سنگین بر تاس ماهی روسی (*Acipenser gueldenstaedtii*) نشان داد که میزان آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز در تیمارهای تحت تأثیر فلزات سنگین به‌صورت معنی‌داری کاهش‌یافته است (۶). مطالعه مهرپاک و همکاران (۱۳۹۴) نشان داد که استفاده از کیتوزان به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان در جیره کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) تأثیر معناداری بر میزان آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز نداشته است (۷). درحالی‌که نتایج مطالعه حاجی رحیمی و همکاران (۱۳۹۴) نشان داد که استفاده نانو ذرات اکسید آهن و روی بر بافت کبد، عضله و آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز، آلانین آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تأثیر مخربی دارد (۲).

هرگونه تغییر در مقادیر این شاخص‌ها می‌تواند به‌عنوان یک شاخص بالینی در بررسی سلامت سیستم ایمنی، کلیه و کبد جانوران محسوب می‌شود (۲۳). محتوای پروتئین پلاسما در آبزیان، به‌عنوان شاخص تنش ایجادشده در اثر عوامل خارجی در نظر گرفته می‌شود (۳۲) و اگر عاملی بتواند از کاهش پروتئین پلاسما جلوگیری کند، می‌توان گفت میزان تنش را کاهش داده است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تنش نانو ذرات نقره در تیمار شاهد باعث

کاهش شاخص‌های پروتئین و گلبولین پلاسما شده است ولی در تیمارهای آستاگزانتین و آستاگزانتین- نمک صفراوی تفاوت معناداری در مشاهده نشد که نشان‌دهنده مقاومت این تیمارها در مقابل تنش نانو ذرات نقره است. میزان شاخص آلبومین در تمام تیمارها پیش از تنش در مقایسه با پس از تنش با نانو ذرات نقره تفاوت معناداری نداشت. کاهش معنادار پروتئین پلاسما خون ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در معرض سمیت حاد فلزات سنگین توسط سانچو و همکاران (۱۹۹۷) گزارش شد (۳۰). از مطالعه حاضر نتیجه می‌شود که با توجه به کاهش سطح آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) پس از تنش نانو ذرات نقره در تیمار آستاگزانتین در مقایسه با تیمار شاهد به نظر می‌رسد تنش نانو ذرات نقره باعث افزایش ROS می‌شود و آستاگزانتین توانسته توان آنتی‌اکسیدانی پلاسما خون و احتمالاً کبد را افزایش دهد و باعث کاهش میزان پراکسیداسیون چربی و حفظ چربی‌ها و پروتئین‌های پلاسما خون شود و این دلیلی است برای پایدار بودن سطح پروتئین کل پلاسما پس از دوره تنش نانو ذرات نقره در تیمار آستاگزانتین و درنتیجه دو عامل فوق به نظر می‌رسد آسیب‌های وارده به بافت‌های مختلف ازجمله کبد در اثر استفاده از آستاگزانتین در جیره کاهش پیداکرده و این امر باتوجه به کمتر بودن سطح آنزیم آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) در تیمار آستاگزانتین در زمان پس از تنش نانو ذرات نقره در مقایسه با تیمار شاهد قابل استنتاج است. به نظر می‌رسد استفاده از آستاگزانتین در جیره ماهی پرت می‌توان تا حدود زیادی شاخص‌های سلامتی ماهی را در دوره‌های پیش و پس از تنش بهبود دهد، اگرچه میزان بهبود یا نحوه پاسخ‌دهی شاخص‌ها بااستفاده از نمک صفراوی به همراه آستاگزانتین در برخی شاخص‌ها بهبودیافته است، اما این بهبود در تمامی شاخص‌های موردبررسی دیده نمی‌شود و لذا برای درک بهتر عملکرد نمک صفراوی پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی تغذیه ماهیان با جیره حاوی نمک صفراوی به‌تنهایی مدنظر قرارگرفته و همچنین متابولیت‌های مرتبط با متابولیسم چربی‌ها در لاشه و پلاسما موردتوجه قرارگیرد. در پایان برای پژوهش‌های آتی و جهت درک بهتر و دقیق‌تر مکانیسم اثر رنگدانه و نمک صفراوی، سنجش شاخص Reactive Oxygen species (ROS) و نیز وجود تیمارهای کنترل منفی و ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی نمک صفراوی به‌تنهایی پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

هزینه‌های انجام این تحقیق از محل پژوهانه شماره ۵۰۲/۹۱/۵۳۹۴۹ پرداختی از سوی معاونت پژوهشی دانشگاه صنعتی اصفهان به دکتر سالار درافشان و نیز حمایت مالی ستاد فناوری نانو ریاست جمهوری در قالب پایان‌نامه دانشجویی مقطع کارشناسی ارشد رشته تکثیر و پرورش آبزیان تأمین‌شده است.

منابع

۱- اکبری، پ.، و ربانی نژاد، ف.، ۱۳۹۵. اثر مکمل غذایی آستاگزانتین بر پاسخ استرس تراکم و عملکرد ماهی طلال (*Rastrelliger kanagurta*). نشریه شیلات، دوره ۲۸، شماره ۳، صفحات ۲۹۳-۳۰۶.

۲- حاجی رحیمی، ک.، فرخی، ف.، قاسم‌زاده، ر.، و توکمه چی، الف.، ۱۳۹۴. بررسی تأثیر نانو ذرات اکسید آهن و روی بر بافت کبد و عضله در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله پژوهش‌های جانوری، دوره ۳، شماره ۲۱، صفحات ۲۸۳-۲۹۱.

۳- حامدی، م.، دهکری، ر.، حیدر نژاد، م.، و دهکری، م.، ۱۳۹۵. اثر نانو ذرات اکسید روی بر فاکتور التهابی TGF-β، میزان بیوشیمیایی LDH سرمی و تغییرات بافتی در کبد موش، مجله پژوهش‌های جانوری، دوره ۲۹، شماره ۳۷، صفحات ۱-۴۵.

۴- رزم‌آرا، پ.، درافشان، س.، پیکان حیرتی، ف.، طالبی، م.، و رنجبر، م.، ۱۳۹۲. اثر نانو ذرات نقره کلوئیدی و نیترات نقره محلول در آب بر تغییرات بافتی آبشش گربه‌ماهی رنگین‌کمان *Pangasianodon hypophthalmus*. مجله بوم‌شناسی آبزیان، دوره۳ ، صفحات ۱۰-۱۸.

۵- سیچانی، س.، و رزمی، ن.، ۱۳۹۱. مقایسه تأثیر آنتی‌اکسیدانی اسپند و نانو ذرات نقره بر میزان فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز در موش‌های نر، نشر علمی پژوهشی فیض، دوره ۶، شماره ۷، صفحات ۷۰۳-۷۱۴.

۶- فغانی، ط.، سلطانی، م.، و شمسایی، م.، ۱۳۹۲. مطالعه تأثیر آستاگزانتین طبیعی (*Haematococcus pluvialis*) بر شاخص‌های رشد، ترکیب آنالیز لاشه و کبد فیل‌ماهی جوان (*Huso huso* Linnaeus, 1758)، زیست‌شناسی دریا، شماره ۵، صفحات ۶۹-۷۷.

۷- قوتی، ن.، و محمدی، و.، ۱۳۹۰. مقایسه و بررسی تغییرات سختی و قلیائیت با مسمومیت فلز سنگین روی در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، اکوبیولوژی تالاب، دوره ۸، شماره ۲، صفحات ۲۱-۲۸.

۸-مهرپاک، م.، نعمت دوست، ب.، و بنایی، ب.، ۱۳۹۴. تأثیر حفاظتی ویتامین C و کیتوزان بر شاخص‌های زیستی تنش اکسیداتیو در آبشش ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در معرض کلراید کادمیوم، مجله علمی شیلات ایران، دوره ۲۴، شماره ۵، صفحات ۳۱-۳۴.

9-Attia, A., 2014. Evaluation of the testicular alterations induced by silver nanoparticles in male mice: biochemical, histological and ultrastructural studies. *Research Journal of Pharmaceutical* 4, PP: 1558-1589.

10-Banaee, M., and Mohammadipour, S., Madhani, S., 2015. Effects of sublethal concentrations of permethrin on bioaccumulation of cadmium in zebra cichlid (*Cichlasoma nigrofasciatum*). *Toxicological and Environmental Chemistry* 97(2), PP: 200-207.

11-Barbosa, M., Morais, R., and Choubert, G., 1999. Effect of carotenoid source and dietary lipid content on blood astaxanthin concentration in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 176 (3), PP: 331–341.

12- Barry, M., Flynn, D. M., Letsky, E. A., and Risdon, R. A., 1974. Long term chelation therapy in thalassaemia major effect on liver iron concentration, liver histology and clinical progress. *British Medical Journal* 2, PP: 16-20.

13- Beutner, S., B., Bloedorn, S., Frixel, I., Hernandez Blanco, T., Hoffmann, H. D., Martin, B., Mayer, P., Noack, C., and Ruck, M., 2001. Quantitative assessment of antioxidant properties of natural colorants and phytochemicals: carotenoids, flavonoids, phenols and indigoids. The role of *β*-carotene in antioxidant functions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81 (6), PP: 559-568.

14- Biederman, J., 2005. Attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) *Evidence. Biological Psychiatry* 57(11), PP: 1215-1220.

15-Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. *Analytical Biochemistry* 72 (1-2), PP: 248-254.

16-Callan, C. K., Laidley, C. W., Kling, L. J., Breen, N. E., and Rhyne, A. L., 2014. The effects of dietary HUFA level on flame angelfish (*Centropyge loriculus*) spawning, egg quality and early larval characteristics. *Aquaculture Research* 45(7), PP: 1176-1186.

17-Choi, J. E., Kim, S., Ahn, J. H., Oun, P., Kang, Y. S., Park, K., and Yi, J., 2010. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. *Aquatic Toxicology* 100(2), PP: 151-159.

18-Di Giulio, R. T., and Meyer, J. N., 2008. Reactive oxygen species and oxidative stress. In Giulio and D.E. Hinton. *The Toxicology of Fishes* 32(2), PP: 273-324.

19-Erdman, J., 1988. The physiologic chemistry of carotenes in man. *Clinical Nutrition* 7(3), PP: 101–106.

20-Goth, L., 1991. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica* 196 (3), PP: 143-151.

21-Govindasamy, R., and Rahuman, A., 2012. Histopathological studies and oxidative stress of synthesized silver nanoparticles in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Journal of Environmental Sciences* 24 (6), PP:1091-1098.

22- Hardy, R., Torrissen, O., and Scott, T., 1990. Absorption and distribution of labeled canthaxanthin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 87(4), PP: 331–340.

23-John, G., Collette, B., Facey, D., and Bowen, W,. 2009. The diversity of fishes Ecology and Evolution. *Journal of Nutrition Cancer* 23, PP: 135-148.

24-Jyonouchi, H., Zhang, L., Gross, M., and Tomita, Y., 1994. Immunomodulating actions

of carotenoid senhancement of in vivo and in vitro antibody production to dependent antigens. *Journal of Nutrition Cancer* 21(1), PP: 47-58.

25-Kumar, A., Garcia, A., Meseda, C., He, Y., Weiss, C., Weir, A., and Merchlinsky, M., 2005. Identification and preliminary characterization of vaccinia virus (*Dryvax*) antigens recognized by vaccinia immune globulin. *Virology* 343 (1), PP:128-140.

26-Liu, Y., Hard, Y. F., 2012. Aggregation of stabilized TiO_2 nanoparticle suspensions in the presence of inorganic ions. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31 (8), PP: 1693-1698.

27-Moss, M. L., Sklair-Tavron, L., and Nudelman, R., 2008. Drug insight: tumor necrosis factor-converting enzyme as a pharmaceutical target for rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 4 (6), PP:300- 315.

28-Naguib, Y. M., 2000. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (4), PP: 1150-1154.

29-National Research Council, 2011. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. The National Academies Press, Washington, DC, 186 p.

30-Sancho, E., Ferrando, M., and Andreu, E., 1997. Sublethal effects of an organophosphate insecticide on the European eel, *Anguilla anguilla*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 36 (1), PP:57-65.

31-Saxby, A., Adams, L., Snellgrove, D., and Wilson, R. W., 2010. The effect of group size on the behavior and welfare of four fish species commonly kept in home aquaria. *Applied Animal Behavior Science* 125(3), PP: 195-205.

32-Singh, R. K., and Sharma, B., 1998. Carbofuran induced biochemical changes in Clarias batrachus. *Management Science* 53 (4), PP: 285-290.

33-Witerbourn, C., Hawkins, R. E., Brian, M., and Correll, R. W., 1975. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *Laboratory and Clinical Medicine* 85, PP: 337–341.

34-Worthington, E., 1993. Superoxide Dismutase. *Biochemical*. *Freehold*, PP: 368-369.

35-Yang, H., Mu, X., Luo, D., Song, H., Liu, C., and Luo, J., 2012. Bile salts, a novel effective feed additive for promoting absorption and pigmentation of astaxanthin in blood parrot (*Cichlasoma synspilum*♀× *Cichlasoma citrinellum*♂). *Aquaculture* 350 (1), PP: 42-45.

Can feeding on diet enriched with astaxanthin improve physiological responses of parrot fish (*Cichlasoma synspilum* ♀ × *Cichlasoma citrinellum* ♂) after exposure to water-born silver nanoparticle?

Mokhlesabady Farahany A., Dorafshan S., Paykan Heyrati F. and Ebrahimi E.

Dept. of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, I.R. of Iran

Abstract

The aim of this study was improving antioxidant defense system and monitoring some plasma biochemical parameters of parrot fish fed on diet enriched with astaxanthin alone or in combination with bile salt after exposure to water-born silver nanoparticles (AgNPs). 200 parrot fish were randomly distributed in three different treatments as control, astaxanthin and astaxanthin-bile salt. The fish were fed for 90 days and then subjected to AgNPs 250 µg/L for five days and some plasma biochemical parameters were measured before and after AgNPs stress. The results showed that feeding fish with diet enriched with astaxanthin could cause significant reduction in the plasma levels of all studied oxidative enzymes in comparison to the other groups ($P<0.05$). AgNPs caused significant elevation in the levels of plasma oxidative enzymes in the control while such elevations were not visible in fish fed on astaxanthin ($P>0.05$). At the end of feeding trail, day 90th, plasma levels of hepatic enzymes, asparat transaminase and alanin transaminase were significantly lower in the astaxanthin - bile salt group ($P<0.05$); after AgNPs stress, the levels of the mentioned enzymes were significantly reduced in groups of control and astaxanthin, while such reductions were not observed in the group fed on astaxanthin-bile salt diet ($P>0.05$). The results of this study showed that astaxanthin alone or in combination with bile salt could improve some plasma oxidative and biochemical parameters of parrot fish when the fish were subjected to AgNPs. The positive effect of bile salt on astaxanthin function was observed on some parameters.

Key words: Parrot fish, Astaxanthin, Oxidative stress, Silver nanoparticles.