View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Aquatic Commons

تاثیر حفاظتی ویتامین C و کیتوزان بر شاخص‌های زیستی استرس اکسیداتیو در آبشش ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در معرض کلراید کادمیوم

میلاد مهرپاک[1]، مهدی بنایی[1*]، بهزاد نعمت‌دوست حقی[1]، احمد نوری[2]

*Mahdibanaee@yahoo.com

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

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

تاریخ دریافت: خرداد ١٣٩٤ تاریخ پذیرش: آذر ١٣٩٤

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی تاثیر تجویز آنتی‌اکسیدان‌هایی نظیر ویتامین C و کیتوزان بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو در سلول‌های آبشش ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در معرض کلراید کادمیوم است. در این آزمایش ماهی‌ها به مدت ۲۱ روز با جیره تجاری (گروه شاهد)، جیره حاوی کیتوزان (۱۰۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم غذا)، جیره حاوی ویتامین C (۱۰۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم غذا) و جیره حاوی ویتامین C همراه با کیتوزان تغذیه شدند و به طور همزمان در معرض ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر کلراید کادمیوم قرار گرفتند. در این آزمایش، شاخص‌های استرس اکسیداتیو نظیر فعالیت آنزیم کاتالاز، آنتی‌اکسیدان کل و مالون‌دی آلدهید و پارامترهای بیوشیمیایی سلولی نظیر فعالیت آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز، آلانین آمینوترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز اندازه‌گیری شد. سطح فعالیت آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز، لاکتات دهیدروژناز و کاتالاز و همچنین سطح مالون دی‌آلدهید در سلول‌های آبششی ماهی‌های در معرض کلراید کادمیوم به طور معنی‌داری افزایش یافت. در حالی که سطح فعالیت آنزیم آلانین آمینو ترانسفراز و سطح آنتی‌اکسیدان کل سلولی کاهش یافت. سطح فعالیت آنزیم‌ها و نیز مالون دی‌آلدهید در ماهی‌های تحت تیمار ویتامین C و ویتامین C و کیتوزان به حالات نرمال بازگشت. در حالی که تجویز ویتامین C و کیتوزان تاثیر معنی‌داری بر سطح آنتی‌اکسیدان کل نداشت. از این‌رو، تجویز آنتی‌اکسیدان‌هایی نظیر ویتامین C و کیتوزان ممکن است کارایی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و سم‌زدایی سلول‌های آبششی ماهی‌های در معرض کلراید کادمیوم را افزایش دهد.

لغات کلیدی : کیتوزان، ویتامین C، کلراید کادمیوم، سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی

*نویسنده مسئول

مقدمه

کادمیوم یکی از مهم‌ترین فلزات سنگین است که به طور گسترده در صنایع الکترونیکی، پلاستیک‌سازی و باتری-سازی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Choi *et al*., 2013). این فلز ممکن است از طریق فعالیت‌های صنعتی، معدن-کاری و نیز فاضلاب‌های شهری و کشاورزی وارد آب‌های سطحی و زیرزمینی شود و از طریق تماس مستقیم یا زنجیره غذایی وارد بدن آبزیان گردد (Choi *et al*., 2013; Banaee *et al*., 2015a).

کادمیوم می‌تواند از طریق جذب سطحی به وسیله آبشش‌ها و پوست و نیز از طریق سیستم گوارشی وارد بدن ماهی‌ها گردد (Choi *et al*., 2013; Banaee *et al*., 2015a). کادمیوم نیز مانند دیگر آلاینده‌هایی که از طریق آبشش‌ها جذب شده‌اند ممکن است قبل از رسیدن به کبد، تجزیه شده و دفع گردد. با وجود اینکه ظرفیت متابولیسمی آبشش‌ها در مقایسه با کبد بسیار ناچیز است اما عملکرد آبشش‌ها در تجزیه و دفع آلاینده‌ها می‌تواند به طور معنی‌داری مانع از تجمع آلاینده‌های زیست‌محیطی در دیگر اندام‌ها شود (Ventura-Lima *et al*., 2009). بدین‌ترتیب آبشش‌ها می‌توانند از طریق کاهش جذب مولکول‌های سمی به وسیله دیگر اندام‌ها، نقش بسیار حیاتی در حفاظت این اندام‌های در مقابله با مواد مضر شیمیایی ایفا کنند (Mdgela *et al*., 2006; Ventura-Lima *et al*., 2009).

مطالعات سم‌شناسی در سطح سلولی نشان می‌دهد که کادمیوم معمولا می‌تواند از طریق ایجاد اختلال در فرآیندهای متابولیسمی میتوکندری و اختلال در زنجیره انتقال الکترون، پراکسیداسیون لیپیدی غشای سلولی و تاثیر گذاری بر تراوایی و نفوذپذیری غشای سلولی و ممانعت از واکنش فسفوریلاسیون اکسیداتیو و سنتز پروتئین و اختلال در کانال‌های انتقال یونی بر فعالیت‌های فیزیولوژیکی سلول‌ها اثر گذارد (Wang *et al*., 2004; Gonzalez *et al*., 2006). افزایش نرخ تشکیل ترکیبات فعال واکنشی اکسیژنی (ROS) درون سلولی در زمان مواجهه ماهی‌ها با کادمیوم می‌تواند زمینه‌ساز بروز آسیب-های استرس اکسیداتیو در ماهیان باشد (Bozcaarmutlu and Arinç, 2007; Zahedi *et al*., 2013). سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی سلولی می‌تواند با خنثی کردن رادیکال‌های آزاد اکسیژنی و یا از طریق اتصال به فلز کادمیوم و یا تغییر در شکل زیستی آن در دفع کادمیوم اضافی از سلول‌ها عمل نماید (Xu *et al*., 2003).

از این‌رو تغییر ظرفیت آنتی‌اکسیدان تام سلولی می-تواند در ایجاد تعادل و خنثی نمودن رادیکال‌های آزاد و حفاظت از سلول‌ها مؤثر باشد. امروزه استفاده از آنتی-اکسیدان‌های طبیعی و سنتتیک نظیر ویتامین‌ها در افزایش کارایی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی سلولی و پیشگیری از تاثیر سمی آلاینده‌های زیست محیطی به امری رایج تبدیل شده است (Ozturk *et al*., 2009; Ibrahim and Banaee, 2014; Banaee *et al*., 2015b). ویتامین C از نظر فیزیولوژیک یکی از قوی‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب محسوب می‌شود. علاوه بر این، ویتامین C به عنوان یک آنتی‌اکسیدان مهم در بازتولید ویتامین E و افزایش ذخیره گلوتاتیون سلولی نقش مهمی ایفا می‌کند. از این‌رو ویتامین C در حفاظت از گروه‌های تیول پروتئینی در برابر اکسیداسیون بسیار مؤثر عمل می‌کند (Naziroğlu *et al*., 2010). ویتامین C (اسید اسکوربیک)، به عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی می‌تواند در خنثی نمودن رادیکال‌های آزاد و پیشگیری از پراکسیداسیون لیپیدی اسیدهای چرب غیر اشباع موجود در غشای سلول‌ها هم در زمان فعالیت طبیعی سلول‌ها و هم زمانی که موجود در معرض یک ترکیب سمی قرار می‌گیرد، مؤثر باشد (Ozturk *et al*., 2009).

کیتوزان نیز یکی دیگر از ترکیبات طبیعی است که به دلیل ویژگی‌های داروشناسی نظیر خواص ضد سرطانی، درمان جراحات پوستی، محرک سیستم ایمنی، ضد باکتریایی (Alishahi *et al*., 2014)، محرک رشد (اسمعیلی‌راد و همکاران، ۱۳۹۳) و دیگر ویژگی‌های زیستی مورد توجه محققین قرار گرفته است. کیتوزان به‌عنوان حامل دارویی و هورمونی، در انتقال و رهاسازی ترکیبات پپتیدی و پروتئینی (Grenha *et al*., 2005)، فاکتورهای رشد، داروهای ضد سرطان (Wei *et al*., 2013)، داروهای ضد درد و ضدالتهاب (Agarwal *et al*., 2010; Grenha *et al*., 2010a,b)، آنتی‌بیوتیک‌ها (Kavaz *et al*., 2010) و ویتامین‌ها (Alishahi *et al*.,

2011a,b) نیز استفاده می‌شود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی کیتوزان نیز اخیرا بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Xie *et al*., 2001; Jeon *et al*., 2003; Qi and Xu, 2006; Yan *et al*., 2006; Santhosh *et al*., 2007; Sun *et al*., 2011; Yoon *et al*., 2011). افزایش سطح فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (طافی و همکاران، ۱۳۹۲) و پیشگیری از استرس اکسیداتیو ناشی از پراکسید هیدروژن در کفشک ماهی تحت تیمار کیتوزان حاکی از تاثیر کیتوزان در افزایش کارایی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی ماهیان است (Samarakoon *et al*., 2013). تجویز کیتوزان به ماهی-های کپور در معرض مس می‌تواند از شدت آسیب وارده به سیستم ایمنی ماهیان بکاهد (Dautremepuits *et al*., 2004).

با توجه به ویژگی‌های کیتوزان در نقل و انتقال ویتامین‌ها در سیستم‌های زیستی و همچنین با در نظر گرفتن خواص آنتی‌اکسیدانی ویتامین C و کیتوزان این فرضیه مطرح می‌شود که تجویز ویتامین C و کیتوزان به تنهایی و یا همراه با یکدیگر ممکن است در کاهش اثرات سمی کادمیوم و نیز تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی آبشش ماهی‌های در معرض کلراید کادمیوم مؤثر باشد. بنابراین، هدف این مطالعه بررسی تاثیر حفاظتی ویتامین C و کیتوزان در برابر استرس اکسیداتیو ایجاد شده در سلول‌های آبششی ماهی‌های کپور معمولی در معرض کادمیوم است. از این‌رو در این مطالعه فعالیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و پارامترهای بیوشیمیایی سلول‌های آبششی ماهی‌های در معرض کادمیوم و نیز تاثیر تجویز ویتامین C و کیتوزان در برقراری تعادل بین نرخ پراکسیداسیون لیپیدی و ظرفیت آنتی اکسیدانی سلولی و سطح فعالیت آنزیم‌های درون سلولی آبشش ماهی‌ها اندازه‌گیری شد.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی

کیتوزان با وزن مولکولی پایین (با درجه دی‌اسیلاسیون ۸۰ درصدی) از شرکت سیگما آلدریچ (آمریکا)، کلراید کادمیوم با خلوص ۹۹ درصدی از شرکت مرک (آلمان) و اسید اسکوربیک (ویتامین C) با خلوص ۵۰ درصدی از شرکت رویان دارو (ایران) تهیه گردید.

تهیه ماهی و شرایط نگهداری

۱۸۰ عدد ماهی کپور معمولی (۴/۴۰±۳۷/۶۵ گرمی) از یک مزرعه‌ی خصوصی واقع در شهرستان بهبهان، استان خوزستان خریداری و به آزمایشگاه تکثیر و پرورش آبزیان دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء (ص) بهبهان، انتقال داده شد. پس از انتقال، ۱۰ ماهی به‌طور تصادفی در ۱۸ مخزن پلاستیکی (۸۰ لیتری) مجهز به هواده با تعویض روزانه ۴۰ درصدی آب توزیع گردید. پیش از شروع آزمایش، ماهی‌ها به مدت ۲ هفته با شرایط آزمایشگاهی (دمای آب ۲±۲۴ سانتیگراد، دوره‌ی نوری ۱۴ ساعت روشنایی:۱۰ ساعت تاریکی، اکسیژن ۱±۶ میلی گرم در لیتر، pH: ۷/۶±۰/۲) سازگار گردیدند. در طی دوره‌ی سازگاری ماهی‌ها با جیره‌ی تجاری کپور به‌صورت دو بار در روز و معادل ۳٪ وزن بدن تغذیه شدند.

طرح آزمایش

آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی و با ۶ تیمار آزمایشی شامل ماهی‌های گروه کنترل (گروه I)؛ ماهی‌های گروه II که با جیره غذایی حاوی ۱۰۰۰ میلی‌گرم کیتوزان به ازای هر کیلوگرم غذای فرموله شده تجاری تغذیه شدند؛ ماهی‌های گروه III که در معرض ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر کلراید کادمیوم قرار گرفتند؛ ماهی‌های گروه IV که همزمان با قرار گرفتن در معرض ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر کلراید کادمیوم، با جیره غذایی حاوی ۱۰۰۰ میلی‌گرم کیتوزان به ازای هر کیلوگرم غذای فرموله شده تجاری تغذیه شدند؛ ماهی‌های گروه V که همزمان با قرار گرفتن در معرض ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر کلراید کادمیوم، با جیره غذایی حاوی ۱۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین C به ازای هر کیلوگرم غذای فرموله شده تجاری تغذیه گردیدند و ماهی‌های گروه VI که همزمان با قرار گرفتن در معرض ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر کلراید کادمیوم، با جیره غذایی حاوی ۱۰۰۰ میلی‌گرم کیتوزان و ۱۰۰۰ ویتامین C به

ازای هر کیلوگرم غذای فرموله شده تجاری تغذیه شدند انجام گردید. دوره آزمایش ۲۱ روز در نظر گرفته شد. در طی آزمایش و در زمان تعویض آب، معادل حجم آب تعویضی مجددا محلول کلراید کادمیوم به آب افزوده شد. در پایان روز بیست و یکم، ۹ ماهی از هر گروه صید و بیهوش شدند. پس از آسان‌کشی، آبشش ماهی‌ها جدا گردید و با سرم فیزیولوژی شسته شده و با هموژنایز به مدت ۲ دقیقه در محلول بافر فسفات سرد با pH برابر ۷/۴، هموژن گردید. سپس هموژن حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ با ۱۵۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. محلول رویی جهت اندازه-گیری پارامترهای بیوشیمیایی جمع آوری و تا زمان انجام آنالیزهای بیوشیمیایی در دمای ۲۵- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی

اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی خون با استفاده از کیت‌های تهیه شده از شرکت پارس آزمون و با دستگاه اسپکتروفتومتر UV/VIS یونیکو (ساخت آمریکا) مدل ۲۱۰۰ صورت گرفت. اندازه‌گیری سطح فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز و آنزیم آلانین آمینوترانسفراز عصاره بافتی براساس مقدار مصرف NADPH و تبدیل آن به +NAD صورت گرفت. اندازه‌گیری سطح فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز عصاره بافتی براساس تبدیل پیروات به لاکتات صورت گرفت. در این واکنش پیروات با NADH و هیدروژن در حضور LDH واکنش داده و لاکتات و +NAD تولید می‌شود. شدت جذب نور در طول موج ۳۴۰ نانومتر و در طی ۳ دقیقه اندازه‌گیری و برحسب میزان جذب نوری OD و براساس فرمول اختصاصی کاتالوگ محاسبه گردید (Moss and Henderson, 1999). آنزیم کاتالاز بر اساس روش گوث (۱۹۹۱) با اندکی تغییرات سنجیده شد (Góth, 1991). فعالیت آنزیم کاتالاز براساس فرایند تجزیه پراکسید هیدروژن و تشکیل کمپلکس با ثبات با مولیبدات آمونیوم اندازه‌گیری گردید. تغییرات رنگی کمپلکس مولیبدات و پراکسید هیدروژن در طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده شد. فعالیت آنزیم کاتالاز در نهایت براساس فرمول ذیل محاسبه گردید.

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

بلانک ۱، شامل ۱ میلی‌لیتر سوبسترا (پراکسید هیدروژن)، ۱ میلی‌لیتر مولیبدات و ۲ میلی‌لیتر آب مقطر بود. بلانک ۲ شامل ۱ میلی‌لیتر سوبسترا (پراکسید هیدروژن)، ۱ میلی‌لیتر مولیبدات و ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات بود. بلانک ۲ شامل ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات، ۱ میلی‌لیتر مولیبدات و ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات بود.

ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل سلولی به روش توانایی احیای آهن فریک (روش FRAP) به فرو اندازه‌گیری شد. میزان جذب نوری در طی ۵ دقیقه در طول موج ۵۹۳ نانومتر به وسیله اسپکتروفتومتر قرائت گردید. جهت رسم منحنی استاندارد نیز از محلول سولفات آهن ۷ آبه در غلظت‌های ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرو مول بر لیتر استفاده گردید (Benzie and Strain, 1996).

مالون دی‌آلدهید (MDA) با استفاده از اسید تیوباربیتوریک سنجیده و بر اساس میکرو مول بر گرم بافت بیان شد. در این روش جذب نوری در طول موج ۵۳۲ نانومتر قرائت شد. در این آزمایش از تترا اتوکسی پروپانول و اتانول مطلق به عنوان استاندارد مالون دی-آلدهید استفاده گردید (Placer *et al.*, 1966).

اندازه‌گیری پروتئین تام عصاره بافتی براساس واکنش بایوره صورت گرفت. شدت جذب نور در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری و برحسب میزان جذب نوری و سطح پروتئین استاندارد و براساس فرمول ارائه شده در کاتالوگ کیت محاسبه شد. استاندارد پروتئین تام نیز بصورت جداگانه تهیه گردید (Johnson *et al.*, 1999).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

نرمال بودن داده‌ها براساس آزمون Kolmogorov-Smirnov مورد ارزیابی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها به روش تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) در سطح اطمینان ۹۵٪ ($p<۰/۰۵$) و با استفاده از نرم افزار SPSS (IBM) 19 انجام شد. مقایسه میانگین‌ها نیز با آزمون

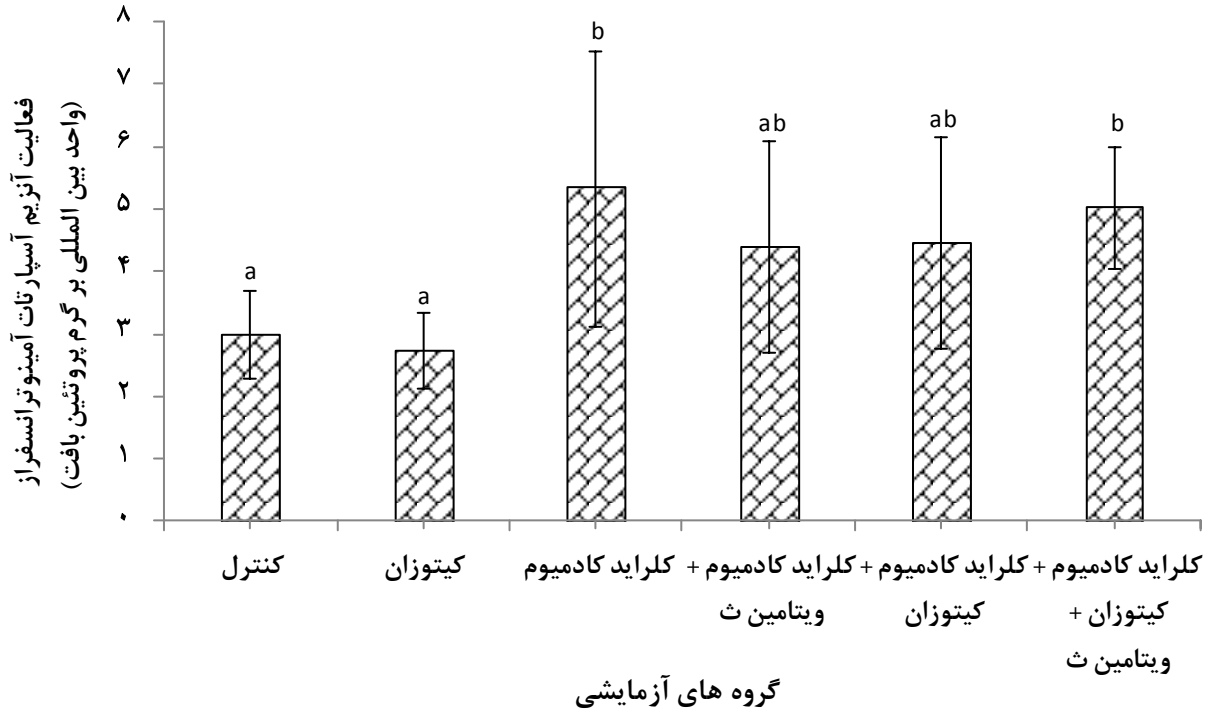
دانکن صورت گرفت. نتایج به صورت میانگین به همراه انحراف معیار نشان داده شد.

نتایج

تغییر در پارامترهای بیوشیمیایی در سلول‌های آبششی ماهی‌ها در شکل‌های ۱ تا ۶ ارائه شده است. در طول دوره آزمایش هیچ گونه مرگ و میری در بین گروه‌های مختلف آزمایشی مشاهده نگردید.

سطح فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز در سلول-های آبششی ماهی‌های در معرض کلراید کادمیوم به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل است. تجویز کیتوزان به تنهایی تاثیر معنی‌داری بر سطح فعالیت این آنزیم نداشت. این در حالی است که تجویز ویتامین C و کیتوزان به تنهایی برای ماهی‌های در معرض کلراید کادمیوم سبب کاهش سطح فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز و کادمیوم تاثیری در بازگشت فعالیت این آنزیم به سطح نرمال نداشت (شکل ۱).

اختلاف معنی‌داری در سطح فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز در سلول‌های آبششی ماهی‌های گروه کنترل و گروه تحت تیمار کیتوزان مشاهده نشد. این در حالی است که تماس ماهی‌ها با کلراید کادمیوم سبب کاهش معنی‌دار سطح فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز گردید. نتایج نشان می‌دهد که اگرچه تجویز کیتوزان و ویتامین C به تنهایی و یا توام با یکدیگر به ماهی‌های تحت تیمار کلراید کادمیوم موجب افزایش سطح فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز در مقایسه با ماهی‌های تحت تیمار کلراید کادمیوم به تنهایی گردید، اما سطح فعالیت این آنزیم هنوز در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی-داری پایین‌تر است (شکل ۲).



شکل ۱: تغییرات سطح فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز در سلول‌های آبشش ماهی‌ها

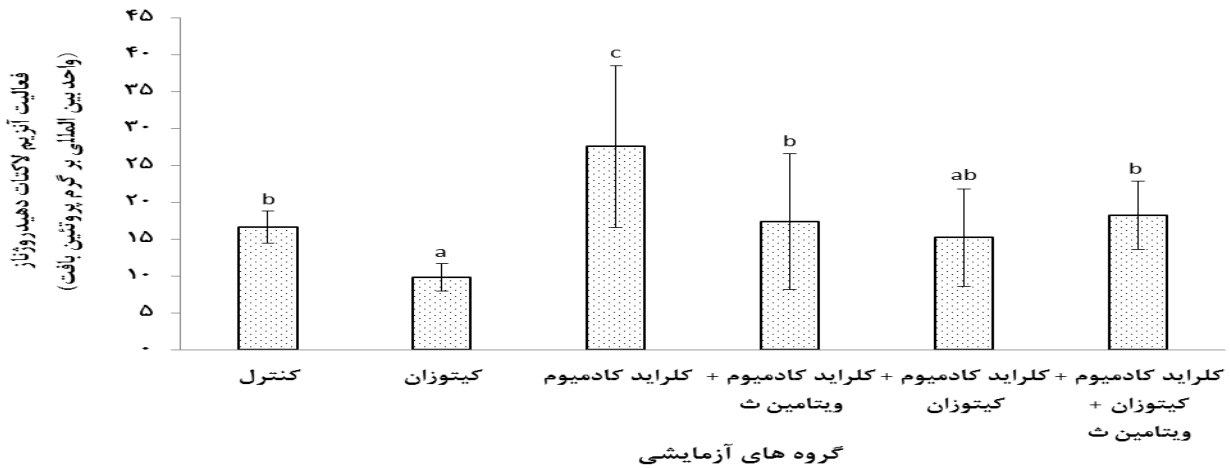
تفاوت معنی‌داری بین میانگین‌های عددی گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل با حروف الفبای انگلیسی ($p<0.05$) مشخص شده است. نمودارها براساس انحراف از معیار ± میانگین ترسیم شده است.

هر چند قرار گرفتن ماهی‌ها در معرض کلراید کادمیوم موجب افزایش معنی‌دار سطح فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در سلول‌های آبششی گردید اما تجویز کیتوزان و ویتامین C به تنهایی و یا توام با یکدیگر به ماهی‌های تحت تیمار کلراید کادمیوم موجب تنظیم سطح فعالیت این آنزیم و بازگشت آن به سطح نرمال شد (شکل ۳).

افزایش معنی‌دار سطح فعالیت آنزیم کاتالاز در ماهی-های در معرض کلراید کادمیوم در مقایسه با گروه کنترل مشاهده گردید. این در حالی است که پس از تجویز کیتوزان و ویتامین C به تنهایی و یا توام با یکدیگر به ماهی‌های تحت تیمار کلراید کادمیوم، سطح فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش یافت (شکل ۴).

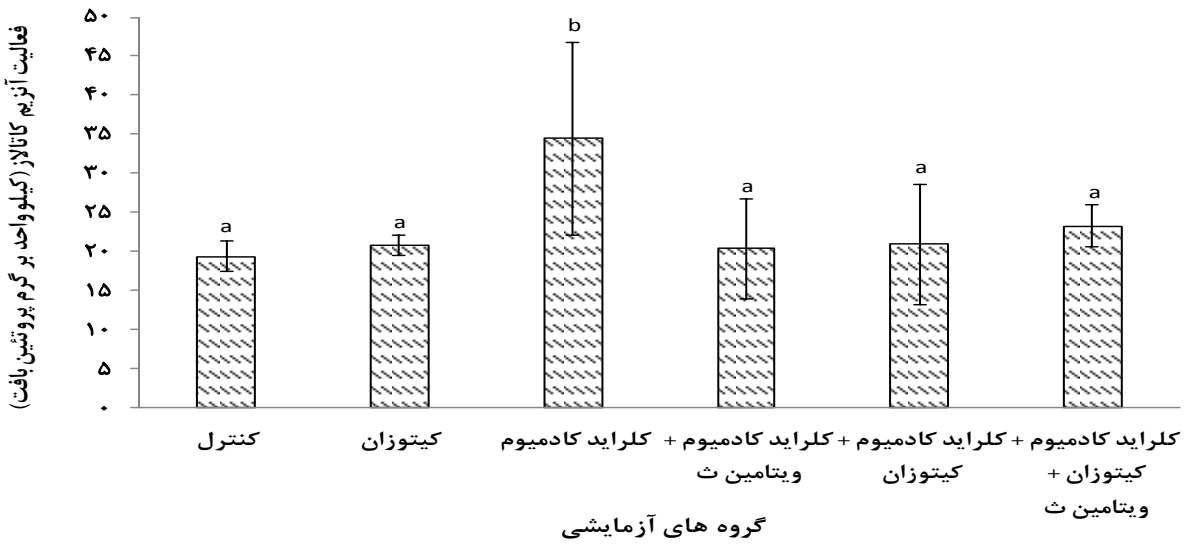
شکل ۲: تغییرات سطح فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز در سلول‌های آبشش ماهی‌ها

تفاوت معنی‌داری بین میانگین‌های عددی گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل با حروف الفبای انگلیسی ($p<0.05$) مشخص شده است. نمودارها براساس انحراف از معیار ± میانگین ترسیم شده است.



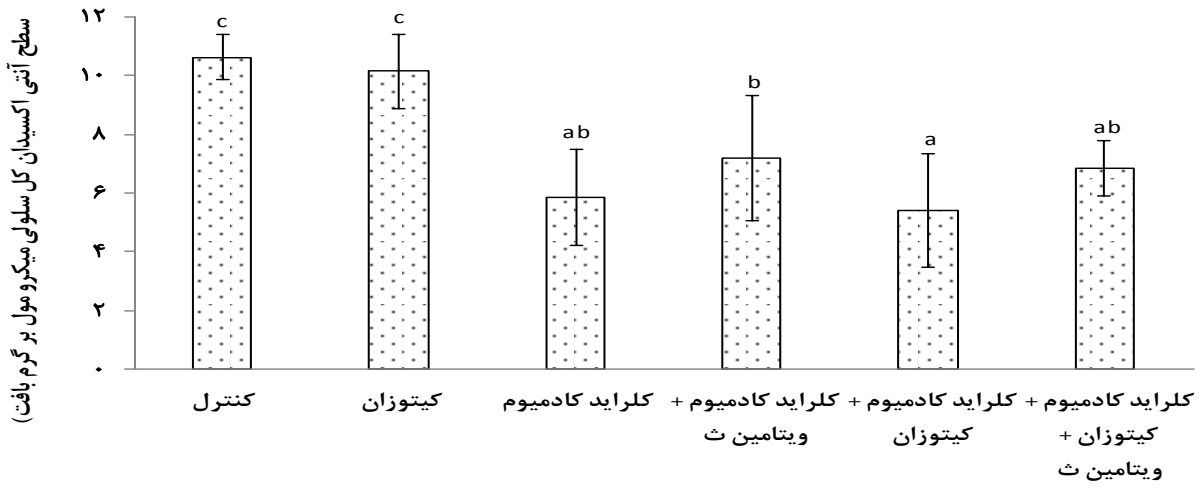
شکل ۳: تغییرات سطح فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در سلول‌های آبشش ماهی‌ها

تفاوت معنی‌داری بین میانگین‌های عددی گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل با حروف الفبای انگلیسی ($p<0.05$) مشخص شده است. نمودارها براساس انحراف از معیار ± میانگین ترسیم شده است.



شکل ۴: تغییرات سطح فعالیت آنزیم کاتالاز در سلول‌های آبشش ماهی‌ها

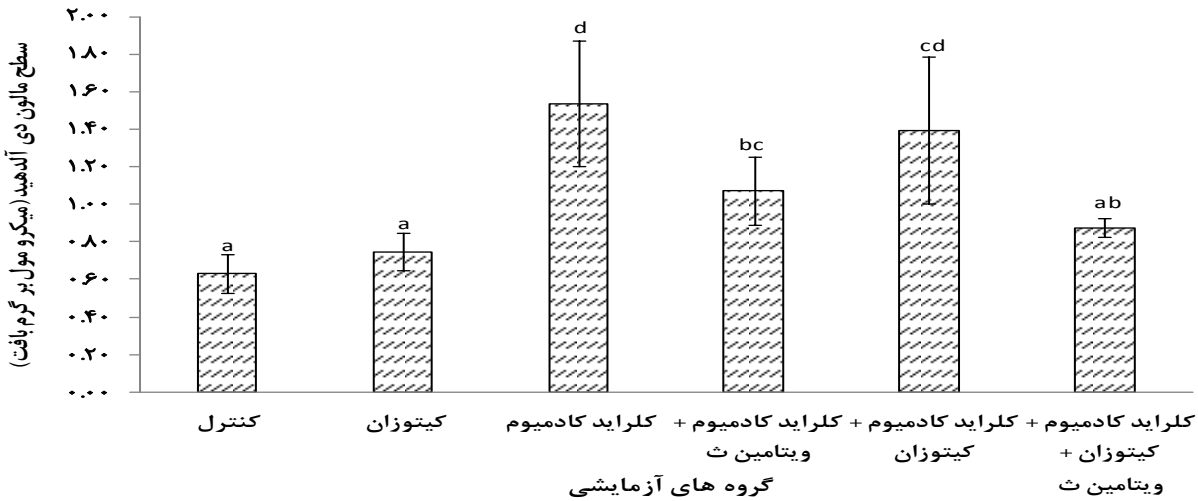
تفاوت معنی‌داری بین میانگین‌های عددی گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل با حروف الفبای انگلیسی ($p<0.05$) مشخص شده است. نمودارها براساس انحراف از معیار ± میانگین ترسیم شده است.



سکل ۵: تغییرات سطح آنتی‌اکسیدان کل در سلول‌های آبسس ماهی‌ها

تفاوت معنی‌داری بین میانگین‌های عددی گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل با حروف الفبای انگلیسی ($p<0.05$) مشخص شده است. نمودارها براساس انحراف از معیار ± میانگین ترسیم شده است.

. نتایج نشان می‌دهد که تجویز کیتوزان به تنهایی تاثیر معنی‌داری بر سطح آنتی‌اکسیدان کل سلولی آبشش‌ها در مقایسه با گروه کنترل نداشت. تماس ماهی‌ها با کلراید کادمیوم سبب کاهش معنی‌دار سطح آنتی‌اکسیدان تام سلول‌های آبششی گردید. نتایج نشان می‌دهد که تجویز کیتوزان و ویتامین C به تنهایی و یا توام با یکدیگر به ماهی‌های تحت تیمار کلراید کادمیوم، تاثیر معنی‌داری در افزایش سطح آنتی‌اکسیدان تام سلول‌های آبششی و بازگشت آن به سطح نرمال نداشت (شکل ۵).



شکل ۶: تغییرات سطح مالون دی‌آلدهید در سلول‌های آبشش ماهی‌ها

تفاوت معنی‌داری بین میانگین‌های عددی گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل با حروف الفبای انگلیسی ($p<0.05$) مشخص شده است. نمودارها براساس انحراف از معیار ± میانگین ترسیم شده است.

افزایش معنی‌داری در سطح مالون دی‌آلدهید در سلول-های آبششی ماهی‌های در معرض کلراید کادمیوم در مقایسه با گروه کنترل مشاهده گردید. بر اساس نتایج بدست آمده تجویز ویتامین C همراه با کیتوزان سبب کاهش معنی‌دار سطح مالون دی‌آلدهید در سلول‌های آبششی ماهی‌های در معرض کلراید کادمیوم و رسیدن به سطح نرمال گردید. اگرچه تجویز ویتامین C موجب کاهش کاهش معنی‌دار سطح مالون دی‌آلدهید در سلول-های آبششی ماهی‌های در مقایسه با گروه تحت تیمار کلراید کادمیوم به تنهایی گردید اما همچنان سطح مالون دی‌آلدهید در این گروه در مقایسه با ماهی‌های گروه کنترل به طور معنی‌داری بالا بود. تجویز کیتوزان نیز به ماهی‌های در معرض کلراید کادمیوم تاثیری در کاهش سطح مالون دی‌آلدهید نداشت (شکل ۶).

بحث

آبشش ماهی‌ها اندامی چند کاره است که علاوه بر تبادل گازی، در تنظیم اسمزی و یونی، تنظیم تعادل اسید و بازی و دفع مواد زائد نیتروژنی نقش مهمی دارد. علی‌رغم نقش آبشش در جذب آلاینده‌های زیست محیطی و نیز اثبات توانایی آن در سم‌زدایی و دفع سموم محیطی (Mdgela *et al*., 2006; Ventura-Lima *et al*., 2009)، هنوز ابهاماتی درباره نقش و اهمیت آبشش‌ها در سم‌زدایی این ترکیبات وجود دارد. از این‌رو اندازه‌گیری سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر کاتالاز، سطح آنتی‌اکسیدان کل و مالون‌دی آلدهید و همچنین سطح فعالیت آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز، آلانین آمینوترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز می‌تواند در شناخت هرچه بیشتر نقش آبشش‌ها در مواجهه با آلاینده‌های زیست محیطی مفید باشد.

از آنجایی که آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز نقش مهمی در مراحل نهایی تجزیه پروتئین جهت تولید ATP ایفا می‌کند (Banaee *et al*., 2011)، افزایش سطح فعالیت این آنزیم نقش موثری در استفاده از اسیدهای آمینه در فرایند اکسیداسیون یا گلوکوژنز در سلول‌ها بازی می‌کند تا انرژی لازم برای سلول جهت مقابله با تاثیر سمی کادمیوم را فراهم نماید. این در حالی است که تجویز کیتوزان و ویتامین C به تنهایی موجب شده تا سطح فعالیت این آنزیم در سلول‌های آبششی به سطح نرمال بازگردد (شکل ۱).

کاهش سطح فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز ممکن است ناشی از تاثیر کادمیوم بر سنتز زیستی این آنزیم باشد. کاهش سطح فعالیت این آنزیم ممکن است سبب ایجاد اختلال در فرایند انتقال اسیدهای آمینه در واکنش-های بیوشیمیایی درون سلولی گردد. اگرچه تغذیه ماهی با جیره حاوی ویتامین C و کیتوزان به تنهایی یا همراه با

یکدیگر نتوانسته سطح فعالیت این آنزیم را به سطح نرمال بازگرداند، اما استفاده از ویتامین C و کیتوزان سبب افزایش معنی‌دار سطح فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز در مقایسه با ماهی‌هایی شد که بدون آن که تحت تیمار آنتی‌اکسیدانی قرار داشته باشند در معرض کلراید کادمیوم قرار گرفتند (شکل ۲). تجویز کیتوزان به موش‌های آزمایشگاهی تحت تیمار تترا کلراید کربن موجب بازگشت فعالیت آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز به سطح نرمال گردید (Ramasamy *et al*., 2014). این نویسندگان همچنین نشان دادند که کیتوزان می‌تواند با افزایش پایداری غشای سلول‌ها مانع آزاد شدن آنزیم‌های درون سلولی به داخل خون گردد. با این وجود شریفی نسب و همکاران (مقاله در دست چاپ) نشان دادند که تجویز ویتامین C و کیتوزان تأثیر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز سلول‌های آبششی ماهیان کپور در معرض پاراکوات نداشته است.

همانطور که پیشتر نیز گفته شد، کادمیوم ممکن است از طریق ایجاد اختلال در فرآیندهای فیزیولوژیکی سلول‌ها نظیر ممانعت از فسفوریلاسیون اکسیداتیو در میتوکندری‌ها و ایجاد هیپوکسی سلولی، موجب کاهش سطح تولید ATP و مرگ سلول‌ها گردد. در چنین شرایطی دیگر اکسیداسیون مجدد NADH با اکسیژن از طریق زنجیره تنفسی میسر نیست. لذا پیروات به‌وسیله‌ی NADH و طی واکنش بیوشیمیایی که به‌وسیله‌ی آنزیم لاکتات دهیدروژناز کاتالیز می‌شود، به لاکتات احیا می‌گردد. از این‌رو افزایش آنزیم لاکتات دهیدروژناز در سلول‌های آبششی ماهی کپور در معرض کلراید کادمیوم ممکن است منعکس کننده ایجاد شرایط هیپوکسی برای سلول‌ها باشد (شکل ۳). بدین ترتیب، افزایش آنزیم لاکتات دهیدروژناز سبب می‌شود که در غیاب اکسیژن زمینه برای ادامه فرآیند گلیکولیز و اکسیداسیون مجدد NADH به‌وسیله‌ی لاکتات، فراهم گردد (Murray *et al*., 2003). نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که تجویز ویتامین C و کیتوزان به تنهایی و یا به صورت توام با یکدیگر می‌تواند سطح فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز را به سطح نرمال بازگرداند (شکل ۳). تجویز ویتامین C، و کیتوزان به ماهی‌های در معرض پاراکوات تاثیری در بازگشت سطح فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز به سطح نرمال نداشت (شریفی‌نسب و همکاران، مقاله در دست چاپ).

کاتالاز یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های سیستم آنتی‌اکسیدانی است که در تجزیه پراکسید هیدروژن به آب و مولکول اکسیژن نقش دارد. افزایش سطح فعالیت کاتالاز در سلول‌های آبششی به وضوح گویای افزایش سطح تولید پراکسید هیدروژن در این سلول‌ها است. از آنجایی که پراکسید هیدروژن محصول دسیموته شدن هیدروکسی رادیکال‌ها می‌باشد، کیتوزان و ویتامین C ممکن است با خنثی نمودن هیدروکسی رادیکال‌ها سبب کاهش سطح تولید پراکسید هیدروژن شوند. از این‌رو تجویز کیتوزان و ویتامین C به ماهی‌های در معرض کلراید کادمیوم موجب کاهش سطح فعالیت کاتالاز شده است (شکل ۴). با این وجود، تجویز ویتامین C و کیتوزان، تاثیر معنی‌داری در تنظیم سطح فعالیت کاتالاز در ماهی‌های کپور در معرض پاراکوات نداشت (شریفی‌نسب و همکاران، مقاله در دست چاپ). تجویز ویتامین C به تنهایی یا ویتامین C همراه با کیتوزان در تنظیم سطح فعالیت آنزیم کاتالاز در سلول‌های کبدی ماهیان کپور در معرض کلراید کادمیوم (Mehrpak *et al*., 2015) و پاراکوات (Sharifinasab *et al*., Article in press) مؤثر بوده است.

کاهش سطح آنتی‌اکسیدان تام سلولی نشان دهنده نقش سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی در حذف رادیکال‌های آزاد تولید شده در طی فرایند سم‌زدایی کادمیوم در آبشش ماهی‌های در معرض کلراید کادمیوم است. اگرچه تجویز ویتامین C و کیتوزان ممکن است با افزایش یا حفظ ذخیره آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی سلول‌ها در سطح نرمال نقش حفاظتی از سلول‌ها را در برابر آلاینده‌های زیست محیطی ایفا کند (Ozturk *et al*., 2009; Ramasamy *et al*., 2014)، اما ظاهرا تجویز ویتامین C و کیتوزان به تنهایی یا توام با یکدیگر تاثیری بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل سلول‌های آبششی نداشته است. احتمالا یکی از دلایل این امر تماس مداوم آبشش‌ها با کلراید کادمیوم و جذب و نفوذ آن به درون سلول‌ها

باشد. مسلما ادامه این روند در دراز مدت ممکن است سبب برهم خوردن توازن بین سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و رادیکال‌های آزاد به نفع پراکسیدان‌ها گردد که این امر سبب بروز پراکسیداسیون لیپیدی اسیدهای چرب غیر اشباع موجود در ساختار غشای سلولی و اختلال در فرایندهای فیزیولوژیکی سلول‌ها خواهد گردید (شکل ۵). مشابه این نتیجه توسط شریفی‌نسب و همکاران (مقاله در دست چاپ) در سلول‌های آبششی ماهیان کپور تحت تیمار همزمان پاراکوات و ویتامین C و کیتوزان گزارش شده است. این در حالی است که تجویز ویتامین C به تنهایی یا ویتامین C همراه با کیتوزان موجب افزایش آنتی‌اکسیدان تام سلولی در سلول‌های کبدی ماهیان کپور در معرض کلراید کادمیوم (Mehrpak *et al*., 2015) و پاراکوات (Sharifinasab *et al*., Article in press) شده است.

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که قرار گرفتن ماهی‌ها در معرض کادمیوم سبب افزایش معنی‌دار پراکسیداسیون لیپیدی گردید. افزایش مالون دی‌آلدهید در بافت آبشش بیانگر افزایش سطح پراکسیداسیون لیپیدی است. این امر می‌تواند به دلیل نقصان در مکانیسم‌های سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی به منظور پیشگیری از تشکیل بیش از حد رادیکال‌های آزاد در ماهی‌های در معرض کلراید کادمیوم باشد. مالون دی‌آلدهید به عنوان یکی از مهم‌ترین محصولات پراکسیداسیون لیپیدی اسیدهای چرب غیراشباع غشای سلولی، به دلیل تمایل به واکنش زیاد به گروه‌های تیول و آمین موجود در ساختار بیوشیمیایی پپتیدها، آنزیم‌ها و اسیدهای نوکلئیک از سمیت بالا برای سلول‌ها برخوردار می‌باشد (Oropesa *et al*., 2009). این در حالی است که تجویز ویتامین C به تنهایی و همچنین همراه با کیتوزان موجب کاهش سطح مالون دی‌آلدهید در بافت آبشش گردید. این نتایج نشان می‌دهد که خاصیت از بین برندگی رادیکال‌های آزاد ویتامین C ممکن است به مراتب بیشتر از کیتوزان باشد (شکل ۶). اگرچه تجویز ویتامین C و کیتوزان به ماهی‌های در معرض پاراکوات سبب کاهش معنی‌دار سطح مالون دی‌آلدهید در سلول-های آبششی گردید، اما سطح مالون‌دی آلدهید در این ماهی‌ها همچنین به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل گزارش شده است (شریفی‌نسب و همکاران، مقاله در دست چاپ). تجویز ویتامین C همراه با کیتوزان و ویتامین C به تنهایی موجب کاهش سطح مالون دی‌آلدهید در هپاتوسیت ماهیان کپور در معرض کلراید کادمیوم (Mehrpak *et al*., 2015) و پاراکوات (Sharifinasab *et al*., Article in press) شده است. کیتوزان به دلیل داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌تواند موجب کاهش سطح مالون دی‌آلدهید در کبد موش‌های آزمایشگاهی تحت تیمار تترا کلراید کربن و استامینوفن گردد (Ozcelik *et al*., 2014; Ramasamy *et al*., 2014).

بر اساس نتایج بدست آمده در این مطالعه، می‌توان چنین اذعان کرد که تجویز آنتی‌اکسیدان‌هایی نظیر ویتامین C و کیتوزان ممکن است با افزایش کارایی سیستم دفاع آنتی-اکسیدانی و سم‌زدایی سلول‌های آبششی ماهی‌های در معرض کلراید کادمیوم از شدت مسمومیت این ماهی‌ها بکاهد و تاثیر کادمیوم بر دیگر بافت‌ها را نیز کاهش دهد. با این وجود باید به این نکته توجه داشت که تجویز آنتی-اکسیدان‌ها ممکن است همیشه تاثیر حفاظتی مناسبی بر آبشش ماهی‌های در معرض آلاینده‌های زیست محیطی نداشته باشد زیرا آبشش ماهی‌ها به طور مستقیم با آلاینده‌های زیست محیطی در تماس است و فعالانه این مواد را جذب می‌کند. همچنین سلول‌های آبششی در مقایسه با سلول‌های کبدی از توانایی متابولیسم و سم-زدایی کمتر برخوردار است.

تشکر و قدردانی

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

منابع

اسمعیلی‌راد، ا.، علیشاهی، م.، قربانپور، م.، و زارعی، م. ۱۳۹۳. تاثیر تجویز خوراکی کیتوزان استحصال شده از پوسته میگوی پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) بر فاکتورهای خونی و

رشد ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). مجله تحقیقات دامپزشکی، ۳۹۳-۳۸۵ :(۴)۶۹.

اطافی، ع.ا.، مشکینی، س.، و توکمه‌چی، ا. ۱۳۹۲. مطالعه تاثیر کیتوزان بر برخی از پاسخ‌های ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و افزایش مقاومت آن به دنبال روباروئی تجربی با آئروموناس هیدروفیلا. مجله پژوهش‌های جانوری، ۴۷۷-۴۶۸ :(۴)۲۶.

شریفی‌نسب، ز.، بنایی، م.، محسنی، م.، و نوری، ا. تأثیر حفاظتی ویتامین C و کیتوزان بر پارامترهای بیوشیمیایی سلول‌های آبششی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در معرض پاراکوات. مجله توسعه آبزی پروری (در دست چاپ).

Agrawal, P., Strijkers, G.J. and Nicolay, K., 2010. Chitosan-based systems for molecular imaging. Advanced Drug Delivery Reviews, 62: 42-58.

Alishahi, A., Mirvaghefi, A., Tehrani, M. R., Farahmand, H., Koshio, S., Dorkoosh, F.A. and Elsabee, M.Z., 2011a. Chitosan nanoparticle to carry vitamin C through the gastrointestinal tract and induce the non-specific immunity system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Carbohydrate Polymers, 86(1): 142-146.

Alishahi, A., Mirvaghefi, A., Tehrani, M. R., Farahmand, H., Shojaosadati, S.A., Dorkoosh, F.A. and Elsabee, M. ., 2011b. Shelf life and delivery enhancement of vitamin C using chitosan nanoparticles. Food Chemistry, 126(3): 935-940.

Alishahi, M., Esmaeili Rad, A., Zarei, M. and ghorbanpour, M., 2014. Effect of dietary chitosan on immune response and disease resistance in *Cyprinus carpio*. Iranian Journal of Veterinary Medicine, 8(2): 125-133.

Banaee, M., Mohammadipour, S. and Madhani, S., 2015a. Effects of sublethal concentrations of permethrin on bioaccumulation of cadmium in zebra cichlid (*Cichlasoma nigrofasciatum*). Toxicological & Environmental Chemistry, doi:10.1080/02772248.2015.1031668.

Banaee, M., Sureda, A., Mirvaghefi, A.R. and Ahmadi, K., 2011. Effects of Diazinon on Biochemical Parameters of Blood in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Pesticide Biochemistry and Physiology, 99: 1–6.

Banaee, M., Sureda, A., Shahaf, S. and Fazilat, N., 2015b. Protective Effects of Silymarin Extract on Malthion-Induced Zebra Cichlid (*Cichlasoma nigrofasciatum*) Hepatotoxicity. Iranian Journal of Toxicology, 9(28): 1239-1246.

Benzie, I.F. and Strain, J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Analytical biochemistry, 239(1):70-6.

Bozcaarmutlu, A. and Arinç, E., 2007. Effect of mercury, cadmium, nickel, chromium and zinc on kinetic properties of NADPH-cytochrome P450 reductase purified from leaping mullet (*Liza saliens*). Toxicology in Vitro, 21: 408–416.

Choi, K.S., Yoo, I.S., Shin, K.O. and Chung, K.H., 2013. Effects of taurine on cadmium exposure in muscle, gill, and

bone tissues of *Carassius auratus*. Nutrition Research and Practice, 7(1): 22-25.

Dautremepuits, C., Betoulle, S., Paris-Palacios, S. and Vernet, G., 2004. Immunology-related perturbations induced by copper and chitosan in carp (*Cyprinus carpio* L.). Archive Environmental Contamination and Toxicology, 47(3): 370-378.

Gonzalez, P., Baudrimont, M., Boudou, A. and Bourdineaud, J.P., 2006. Comparative effects of direct cadmium contamination on gene expression in gills, liver, skeletal muscles and brain of the zebrafish (*Danio rerio*). Bio Metals, 19: 225–235.

Góth, L., 1991. A simple method for determination of serum catalase and revision of reference range. In: Clinica Chimica Acta, 196: 143-152.

Grenha, A., Al-Qadi, S., Seijo, B. and Remuñán-Lopez, C., 2010a. The potential of chitosan for pulmonary drug delivery. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 20: 33-43.

Grenha, A., Gomes, M.E., Rodrigues, M., Santo, V.E., Mano, J.F., Neves, N.M. and Reis, R.L., 2010b. Development of new chitosan/carrageenan nanoparticles for drug delivery applications. Journal of Biomedical Materials Research, Part A, 92: 1265-1272.

Grenha, A., Seijo, B. and Remuñan-Lopez, C., 2005. Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 25: 427-437.

Ibrahim, A.T.A. and Banaee, M., 2014. Ameliorative effect of lycopene and vitamin E on some haematological and biochemical parameters of *Oreochromis Niloticus* against diazinon toxicity. MedCrave Advance in Plants & Agriculture Research, 1(3): 1-9 (00014).

Jeon, T.I., Hwang, S.G., Park, N.G., Jung, Y.R., Shin, S.I., Choi, S.D. and Park, D. K., 2003. Antioxidative effect of chitosan on chronic carbon tetrachloride-induced hepatic injury in rats. Toxicology, 187 (1): 67-73.

Johnson, A.M., Rohlfs, E.M. and Silverman, L.M., 1999. Proteins. In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd Ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company. pp. 477-540.

Kavaz, D., Odabas, S., Demirbilek, M., Güven, E.Ö. and Denkbas, E.B., 2010. Bleomycin Loaded Magnetic Chitosan Nanoparticles as Multifunctional Nanocarriers. Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 25: 305-318.

Mdgela, R., Myburgh, J., Correia, D., Braathen, M., Ejobi, F., Botha, C., Sandvik, M. and Skaare, J.V., 2006. Evaluation of the gill filament-based EROD assay in African sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*) as a monitoring tool for waterborne PAH-type contaminants. Ecotoxicology, 15: 51–59

Mehrpak, M., Banaee, M., Nematdoost Haghi, B. and Noori, A., 2015. Protective effects of vitamin C and chitosan against cadmium-induced oxidative stress in the

liver of common carp (*Cyprinus carpio*). Iranian Journal of Toxicology, 9(30): 1360-1367.

Moss, D.V. and Henderson, A.R., 1999. Clinical enzymology In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd Ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company. pp. 617-721.

Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A. and Rodwell, V.W., 2003. Harper's Illustrated Biochemistry, Twenty-Sixth Edition. Lange Medical Books/McGraw-Hill (Medical Publishing Division). New York, 402 p.

Naziroğlu, M., Klink, F., Uğuz, A.C., Çelik, Ö., Bal., R., Butterworth, P.J. and Baydar, M. L., 2010. Oral vitamin C and E combination modulates blood lipid peroxidation and antioxidant vitamin levels in maximal exercising basketball players. Cell Biochemistry and Function, 28: 300-305.

Oropesa, A.L., García-Cambero, J.P. and Soler, F., 2009. Glutathione and malondialdehyde levels in common carp after exposure to simazine. Environmental Toxicology and Pharmacology, 27: 30–38.

Ozcelik, E., Uslu, S., Erkasap, N. and Karimi, H., 2014. Protective effect of chitosan treatment against acetaminophen-induced hepatotoxicity. Kaohsiung Journal of Medical Sciences, 30: 286-290.

Ozturk, I.C., Ozturk, F., Gul, M., Ates, B. and Cetin, A., 2009. Protective effects of ascorbic acid on hepatotoxicity and oxidative stress caused by carbon tetrachloride in the liver of Wistar rats. Cell Biochemistry and Function, 27: 309-315.

Placer, Z. A., Cushman, L.L. and Johnson, B.C., 1996. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. Analytical biochemistry, 16(2):359-64.

Qi, L. and Xu, Z., 2006. In vivo antitumor activity of chitosan nanoparticles. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 16(16): 4243-4245.

Ramasamy, P., Subhapradha, N., Shanmugam, V. and Shanmugam, A., 2014. Protective effect of chitosan from *Sepia kobiensis* (Hoyle, 1885) cuttlebone against CCl4 induced hepatic injury. International Journal of Biological Macromolecules, 65: 559-563.

Samarakoon, K.W., Cha, S.H., Lee, J.H. and Jeon, Y.J., 2013. The growth, innate immunity and protection against H_2O_2-induced oxidative damage of a chitosan-coated diet in the olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Fish Aquatic Sciences, 16(3): 149-158.

Santhosh, S., Sini, T.K., Anandan, R. and Mathew, P.T., 2007. Hepatoprotective activity of chitosan against isoniazid and rifampicin-induced toxicity in experimental rats. European Journal of Pharmacology, 572(1): 69-73.

Sharifinasab, Z., Banaee, M., Mohiseni, M. and Noori, A., 2015. Vitamin C and chitosan alleviate toxicity effects of paraquat on some biochemical parameters

in hepatocytes of common carp. Iranian Journal of Toxicology, Article in Press.

Sun, T., Zhu, Y., Xie, J. and Yin, X., 2011. Antioxidant activity of *N*-acyl chitosan oligosaccharide with same substituting degree. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 21(2): 798-800.

Ventura-Lima, J., de Castro, M.R., Acosta, D., Fattorini, D., de Carvalho, L.M., Bohrer, D., Geracitano, L.A., Regoli, F., Barros, D.M., Marins, L.F.F., de Silva, R.S., Bonan, C.D., Bogo, M.R. and Monserrat, J.M., 2009. Effects of arsenic (As) exposure on the antioxidant status of gills of the zebrafish *Danio rerio* (Cyprinidae). Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, 149: 538-543.

Wang, Y., Fang, J., Leonard, S.S. and Rao, K.M.K., 2004. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. Free Radical Biology and Medicine, 36: 1434-1443.

Wei, W., Lv, P.P., Chen, X.M., Yue, Z.G., Fu, Q., Liu, S.Y., Yue, H. and Ma, G.H., 2013. Codelivery of mTERT siRNA and paclitaxel by chitosan-based nanoparticles promoted synergistic tumor suppression. Biomaterials, 34:3912–23.

Xie, W., Xu, P. and Liu, Q., 2001. Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 11(13): 1699-1701.

Xu, J., Maki, D. and Stapleton, S.R., 2003. Mediation of Cadmium-Induced Oxidative Damage and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Expression through glutathione depletion. Journal of Biochemical and Molcular Toxicology, 17(2): 67-75.

Yan, Y., Wanshun, L., Baoqin, H., Bing, L., and Chenwei, F., 2006. Protective effects of chitosan oligosaccharide and its derivatives against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. Hepatology Research, 35(3): 178-184.

Yoon, S.P., Han, M.S., Kim, J.W., Chang, I. Y., Kim, H.L., Chung, J.H. and Shin, B. C., 2011. Protective effects of chitosan oligosaccharide on paraquat-induced nephrotoxicity in rats. Food and Chemical Toxicology, 49(8): 1828-1833.

Zahedi, S., Akbarzadeh, A., Rafati, M., Banaee, M., Sepehri moghadam, H. and Raeici, H., 2013. Biochemical responses of juvenile European sturgeon, (*Huso huso*) to a sub-lethal level of copper and cadmium in freshwater and brackish water environments. Journal of Environmental Health Science and Engineering, 11:26. DOI: 10.1186/2052-336X-11-26.

The protective effect of vitamin C and chitosan on oxidative biomarkers in gills of common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to cadmium chloride

Mehrepak M.[1]; Banaie M.[1*]; Nematdoste Haghi B.[1]; Noori A.[2]

[*]Mahdibanaee@yahoo.com

1-Faculty of Natural Resources and Environment**,** Khatam Alanbia University of Technology, Behbahan

2- Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandarabbas.

Received: June 2015 Accepted: December 2015

Keywords*:* Chitosan, Vitamin C, Cadmium chloride, Antioxidant defense system

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the effect of antioxidants, vitamin C and chitosan, on oxidative stress markers in gills of fish during exposure to cadmium chloride. Fish were fed with either of commercial diet (control group), chitosan enriched diet (100 mg Kg-1 feed), Vitamin C enriched diet (100 mg Kg-1 feed), or chitosan + vitamin C enriched diet, and simultaneously exposed to 0.2 mg L^{-1} cadmium chloride for 21 days. At the end of experiment, oxidative stress biomarkers such as catalase activity, total antioxidant and malondialdehyde as well as cellular biochemical parameters including aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and lactate dehydrogenase activities were measured. The aspartate aminotransferase, lactate dehydrogenase and catalase activities as well as malondialdehyde levels significantly increased in gill cells of fish exposed to cadmium chloride, while the cellular total antioxidant levels and alanine aminotransferase activity significantly decreased. Enzyme activities and malondialdehyde levels in fish treated with vitamin C and vitamin C combined with chitosan were returned to the normal level after 21 days. However, administration of vitamin C and chitosan did not have significant effect on the cellular total antioxidant. In conclusion, administration of natural antioxidant such as vitamin C and chitosan may increase the efficiency of the antioxidant defense system and detoxification of gill cells of fish exposed to cadmium chloride.

* Corresponding author