

تأثیر استرس اکسیداتیو ناشی از انگل داکتیلوژیروس *Dactylogyrus* (Monogenea: Dactylogyridae) بر آسیب به DNA، لیپیدها و پروتئین‌ها در بافت آبشش کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

الهام اکبری^۱، سعید مشکینی^{۲*}، بیژن اسمعیل نژاد^۳

چکیده

بدن بسیار ضروری به نظر می‌رسد. انگل‌ها با توجه به حساسیت و اهمیت اندام مورد هدف خود در ماهیان، ممکن است باعث ایجاد طیف وسیعی از عوارض و مشکلات شوند. از جمله خسارات ناشی از آلودگی‌های انگلی، ایجاد استرس‌های اکسیداتیو (Oxidative stress) در بافت‌های بدن است که خود مقدمه‌ای برای بروز عوارض و مشکلات بعدی در بدن خواهد بود (۱).

ماهیان دارای مکانسیم‌های آنزیمی و غیر آنزیمی برای مقابله و خنثی سازی مولکول‌های فعال اکسیدان می‌باشند. این آنزیم‌ها به طور دقیق و هماهنگ با یکدیگر عمل می‌کنند تا هر نوع شکل فعال اکسیژن را حذف کرده و با استرس اکسیداتیو مقابله نمایند. کوچکترین انحراف و تغییر در غلظت‌های فیزیولوژیک این آنزیم‌ها می‌تواند به آسیب‌پذیری بافت‌ها و ارگان‌ها منجر شود (۲). به عبارت دیگر، می‌توان استرس اکسیداتیو را ناشی از عدم توازن میان تولید مولکول‌های مضر اکسیدان و توانایی بدن در مقابله با آنها دانست. به دنبال آلودگی به برخی انگل‌ها و تولید بیش از اندازه مولکول‌های اکسیدان در بافت‌های حیاتی، واکنش‌های زنجیره‌ای در بدن رخ می‌دهد که به تخریب و نابودی مولکول‌های زیستی شامل لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک منتهی می‌شود.

از مهم‌ترین انگل‌های شایع در ماهیان آب شیرین که نقش مهمی در ایجاد آسیب‌های بافتی دارند، انگل‌های تک‌میزبانه (Monogenea) به ویژه خانواده داکتیلوژیریده

انگل‌ها می‌توانند با ایجاد استرس‌های اکسیداتیو در بافت‌های ماهیان باعث ایجاد طیف گسترده‌ای از آسیب‌ها به ترکیبات بیوشیمیایی حیاتی بدن شوند. هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات استرس اکسیداتیو ناشی از انگل داکتیلوژیروس بر آسیب به DNA، لیپیدها و پروتئین‌ها در بافت آبشش ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) بود. تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی کپور معمولی از مزارع پرورش ماهی استان آذربایجان غربی تهیه شده و پس از بررسی میکروسکوپی نمونه‌های بافت آبشش آنها، تعداد ۲۲ قطعه (۱۸/۳۳ درصد) ماهیان آلوده به انگل داکتیلوژیروس تشخیص داده شدند و بقیه ماهیان که فاقد آلودگی بودند به عنوان گروه شاهد مورد استفاده قرار گرفتند. برای بررسی استرس اکسیداتیو ناشی از انگل داکتیلوژیروس در بافت آبشش ماهیان، میزان آسیب وارد شده به DNA از طریق آزمون کامت قلبایی، مقدار آسیب وارده به لیپیدها از طریق اندازه‌گیری میزان مالون دی‌آلدئید و میزان آسیب وارده به پروتئین‌ها از طریق مقدار کربونیل شدن پروتئین (گروه تیول)، در بافت آبشش ماهیان آلوده و غیر آلوده (به عنوان گروه شاهد) مورد اندازه‌گیری و مقایسه قرار گرفت. پس از تجزیه و تحلیل داده‌ها، نتایج نشان داد که انگل مونوژن داکتیلوژیروس به طور معنی‌داری ($P < 0/05$) باعث استرس اکسیداتیو در بافت آبشش آلوده از طریق افزایش سطح آسیب DNA، افزایش مقادیر مالون دی‌آلدئید و پروتئین‌های کربونیل شده می‌گردد.

واژگان کلیدی: کپور ماهیان، استرس اکسیداتیو، بهداشت ماهیان، انگل‌های ماهیان.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۸/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۲/۱

مقدمه

با افزایش تراکم در سیستم‌های پرورشی ماهیان و افزایش احتمال آلودگی انگلی آنها، برای پیشگیری از بروز بیماری‌ها و کاهش ضایعات در محیط‌های پرورشی، انجام مطالعات انگل‌شناسی و بررسی نحوه آسیب‌رسانی آنها به بافت‌های

۱- دانش‌آموخته دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۲* - دانشیار گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (s.meshkiniy@urmia.ac.ir)

۳- دانشیار گروه باتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

خسارت این انگل به چربی‌ها، پروتئین‌ها و DNA بافت آبشش ماهیان مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش کار

تهیه ماهیان و تعیین آلودگی انگلی

در فصل‌های پاییز و زمستان ۱۳۹۶ و بهار ۱۳۹۷ تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی کپور معمولی (در هر فصل ۴۰ ماهی) به طور تصادفی از استخرهای خاکی پرورش ماهی کپور موجود در چهار مزرعه در شهرستان جلغا و مراکز عرضه ماهی کپور زنده سد ارس شهرستان پلدشت در استان آذربایجان غربی جمع آوری شد. این ماهیان در کیسه‌های نایلونی دوجداره مخصوص حمل ماهی، حاوی یک سوم آب و دو سوم اکسیژن به آزمایشگاه انگل شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه منتقل شدند. از آنجایی که مواد بیهوش کننده باعث بیهوشی و جدا شدن انگل‌ها از آبشش‌های ماهیان می‌شود و تشخیص ماهیان آلوده را با مشکل مواجه می‌کند، ماهیان را با ضربه به جمجمه آنها کشته و بلافاصله سرپوش‌های آبششی آنها با قیچی بریده شده و آبشش‌های هر طرف بطور کامل برداشته شده و در ظروف پتری دیش قرار داده شدند. رشته‌های آبششی هر آبشش، یک به یک جدا شد و در داخل پتری دیش شستشو داده شده و از محتوای شستشو داده شده مقداری در پلیت ریخته شده و در زیر لوپ (Nikon SMZ800N, Japan) رای مشاهده انگل‌ها بررسی گردید. بعد از آن مقداری از موکوس نمونه‌های آبشش بر روی لام قرار گرفت و با چکاندن یک قطره سرم فیزیولوژی و گذاشتن لام بر روی نمونه، لام مرطوب از آن تهیه شد و با بزرگنمایی‌های ۱۰×، ۴۰×، ۶۰× و در صورت نیاز بزرگنمایی ۱۰۰× میکروسکوپ نوری (Olympus, CH40, Japan) مورد بررسی قرار گرفتند و آلودگی یا عدم آلودگی آبشش‌ها به انگل‌های مونوژن بویژه داکتیلوژیروس مشخص گردید. ماهیانی بدون آلودگی به عنوان گروه شاهد مورد استفاده قرار گرفتند. انگل‌های یافت شده در آبشش

(Dactylogyridae) و جنس داکتیلوژیروس (Dactylogyrus) می‌باشد (۳). این انگل‌ها که از گروه کرم‌های پهن برگگی شکل (Trematodes) هستند، عمدتاً انگل خارجی، هرمافرودیت، دارای اندام چسبیدن قدامی و خلفی بوده و سیر تکاملی مستقیم دارند (۳). داکتیلوژیروس‌ها که از انگل‌های اختصاصی آبشش و پوست ماهیان هستند، با آسیب به آبشش‌های ماهیان، فعالیت آن را مختل کرده و در نتیجه عمل جذب اکسیژن به خوبی انجام نمی‌گیرد که منجر به مرگ ماهی می‌شود. این انگل در انتخاب میزبان خود به طور اختصاصی عمل کرده و گونه‌های مختلف آن در گونه‌های خاصی از ماهیان ایجاد آلودگی می‌کنند. از گونه‌های مهم جنس داکتیلوژیروس که باعث آلودگی آبشش‌های ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) می‌شوند، می‌توان به *D. anchoratus*، *D. extensus* و *D. sahalensis* اشاره کرد (۴).

در اکوسیستم‌های مصنوعی مانند استخرهای پرورشی که ماهیان با تراکم به مراتب بیشتر از محیط طبیعی در کنار هم قرار دارند، به دلیل فراوانی میزبان، تراکم انگل‌ها بسیار بیشتر از شرایط طبیعی است و احتمال آلودگی ماهیان به انگل‌ها به مراتب بیشتر بوده و این موضوع رعایت اصول بهداشتی و درمانی را بسیار با اهمیت تر می‌کند. انگل‌هایی که برای کامل کردن چرخه زیستی خود به میزبان واسطه نیاز ندارند (بسیاری از تک‌یاختگان پوست و آبشش‌ها، سخت پوستان و کرم‌های پهن تک میزبانه) در استخرهای پرورشی که تنوع گونه‌ای چندانی در ماهیان وجود ندارد، بیشتر دیده می‌شوند (۵).

با توجه به تراکم بالای ماهیان در سیستم‌های پرورش ماهی و نقش انگل داکتیلوژیروس در آلودگی آبشش‌ها و ایجاد استرس اکسیداتیو در این اندام مهم و حیاتی، در این مطالعه سعی بر آن شد تا با بررسی ماهیان کپور معمولی پرورشی و تعیین میزان آلودگی آنها به انگل داکتیلوژیروس، میزان

سانتریفیوژ (Zenithlab-04C, Azin Lab) اول با دور ۱۱۷۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد انجام و محلول رویی برداشت گردید. سپس با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده به رسوب موجود، مرحله دوم سانتریفیوژ با دور ۱۱۳۰ به مدت ۷ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد انجام شد. جهت بارگذاری سلول‌ها روی لام‌ها، محلول رویی حذف و ۱۰ میکرولیتر بافر لیز کننده و ۱۰۰ میکرولیتر آگارز نقطه ذوب پایین به آن اضافه شد و با یک مرتبه پیست کردن به سرعت روی لام‌های آغشته به آگارز که از قبل با غلظت ۱/۲٪ آگارز نقطه ذوب نرمال روپوش دار شده بودند، بارگذاری گردید. به منظور بسته شدن ژل، به مدت ۶۰ دقیقه (دمای چهار درجه سانتی‌گراد) در یخچال قرار گرفتند. پس از این مدت با استفاده از بافر لیز کننده (۱۴/۶ گرم سدیم کلرید، ۳/۲۷ گرم اتیلن دی آمین تتراستیک اسید، ۰/۱۲ گرم تریس، ۰/۸ گرم هیدروکسید سدیم، ۱۰٪ دی متیل سولفوکسید و یک میلی‌لیتر تریتون X-100) به مدت ۶۰ دقیقه اقدام به حذف دیواره سلولی و سایر محتویات سیتوپلاسم سلول‌ها گردید. به منظور باز شدن پیچش DNA، لام‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در بافر سرد قلیایی (pH>۱۳)، بافر الکتروفورز حاوی ۱۲ گرم هیدروکسید سدیم، ۰/۳۷ گرم EDTA قرار گرفتند و در نهایت الکتروفورز با جریان ۲۱-۲۰ ولت به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. جهت رنگ‌آمیزی از روش رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید استفاده شد. پس از خنثی‌سازی لام‌ها با بافر خنثی (۴/۸۵٪ تریس) روی هر ژل ۱۰ میکرولیتر از محلول ۱X اتیدیوم بروماید (به ازای هر ۱۰۰ میلی‌لیتر ژل آگارز مقدار یک میکرولیتر اتیدیوم استفاده شد) ریخته شد. پنج تا ۱۰ دقیقه پس از اضافه کردن رنگ، لام‌ها آماده عکس‌برداری شدند. جهت کمی‌سازی و تبدیل پیکسل‌های تصاویر به اعداد از نرم افزار Comet Score نسخه ۱/۵ استفاده شد. برای بررسی هر کامت، نسبت طول دم (Tail) به سر (Head) در هر کامت در نظر گرفته شد. برای انجام آنالیزهای آماری در هر اسلاید

توسط پیست پاستور، سوزن‌های تشریح و یا پنس ظریفی جدا و برای شناسایی نهایی در الکل ۷۰ درصد تثبیت و نگهداری شدند. شناسایی انگل‌ها بر اساس کلید شناسایی انگل‌های منوژن (۶) انجام گردید.

اندازه‌گیری شاخص‌های آسیب آبششی ماهیان

برای بررسی آثار مخرب انگل داکتیلوژیروس بر بافت آبشش، آزمایش کامت قلیایی بمنظور تعیین میزان آسیب وارده به DNA سلول‌های بافت آبشش، آزمایش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای آبشش با اندازه‌گیری ترکیب رنگی مالون دی‌آلدئید و میزان کربونیل شدن پروتئین‌های بافت آبشش ماهیان بمنظور تعیین آسیب وارده به ترکیبات پروتئینی انجام شد.

سنجش آسیب DND آبشش

پس از شستشوی نمونه‌های آبشش ماهیان با بافر فسفات نمکی (PBS) (هشت گرم کلرید سدیم، ۰/۲ گرم کلرید پتاسیم، ۱/۴۴ گرم فسفات سدیم و ۰/۲۴ گرم فسفات پتاسیم)، به میکروتیوب حاوی بافر PBS (pH=۷/۴) و ۱۰٪ DMSO انتقال داده شدند و تا زمان آزمایش در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای سنجش آسیب DNA از روش سنجش کامت قلیایی استفاده شد (۷). برای این منظور آگارز نقطه ذوب نرمال، نقطه ذوب پایین و رنگ اتیدیوم بروماید محصول شرکت سیگما تهیه شد. دستگاه الکتروفورز (Capillary 2 Automated Electrophoresis - SEBIA) به همراه منبع تأمین برق ساخت ایران، لام‌های هاشوردار ۷۱۰۵ چینی و میکروتیوب اپندروف، سرسمپلرهای شرکت QC-Lab تهیه گردید. ابتدا نمونه‌های بافت آبشش با استفاده از یخ (چهار درجه سانتی‌گراد) جهت جلوگیری از آسیب‌های احتمالی، به تدریج ذوب شدند. جهت دستیابی به سوسپانسیون سلولی و سلول‌های منفرد با استفاده از بافر لیز کننده (Lysis Buffer) و محلول ایزوتونیک، اقدام به هموژن کردن بافت آبشش به روش قیچی زدن گردید. سپس جهت دستیابی به سلول‌های منفرد،

کردن یک گرم نمونه بافت آبشش در داخل لوله آزمایش، پنج میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه شد. نمونه‌ها به مدت یک دقیقه با دور ۳۰۰۰g سانتریفیوژ شدند و مایع رویی نمونه‌ها برداشته شد و به هر نمونه ۱ میلی لیتر پپسین اضافه گردید. در پایان برای اندازه گیری گروه تیول که نمایانگر مقدار پروتئین‌های کربونیل شده است، نمونه‌ها بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-3600 Plus, Shimadzu) با طول موج ۲۸۰ نانومتر قرائت شدند (۹).

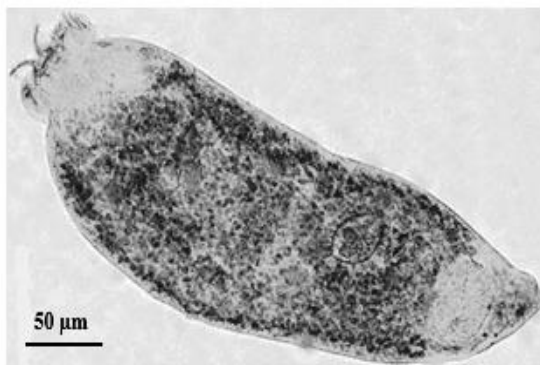
تجزیه و تحلیل آماری

برای بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌ها از آزمون Kolmogrov-Smirnov استفاده شد و داده‌های حاصل از آنالیزهای استرس اکسیداتیو وارده به پروتئین‌ها، چربی‌ها و DNA بافت آبشش ماهیان با آزمون آماری t-test مقایسه و تجزیه و تحلیل شدند. نمودارها با نرم افزار Excel 2013 رسم شدند.

نتایج

بررسی میکروسکوپی نمونه‌های بافت آبشش

از بین ۱۲۰ نمونه ماهی تهیه شده، تعداد ۲۲ نمونه (معادل با ۱۸/۳۳ درصد) از نظر آلودگی به انگل مونوزن داکتیلوژیروس مثبت تشخیص داده شدند. تصویر انگل داکتیلوژیروس تشخیص داده شده در نمونه‌های ماهی آلوده در نگاره ۱ آورده شده است.



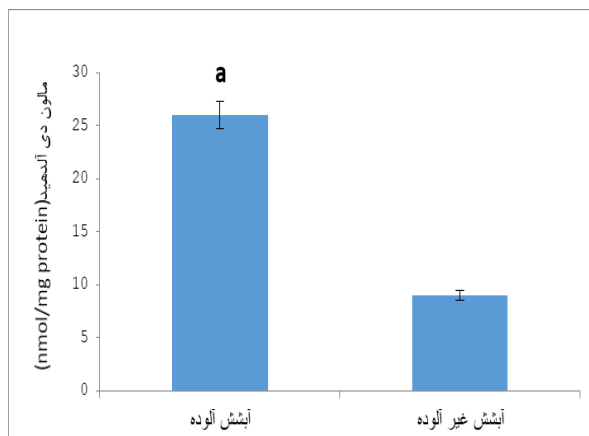
نگاره ۱- انگل داکتیلوژیروس در موكوس آبشش ماهیان آلوده با بزرگنمایی ۱۰۰×

۵۰ تا ۱۰۰ کامت مورد ارزیابی قرار گرفت و نهایتاً اعداد به دست آمده برای گروه های تیمار و شاهد بر اساس واحد Arbitrary Unit (مقیاس تصادفی) بیان شدند. به منظور آشکارسازی دنباله‌های کامت از میکروسکوپ فلورسانس Nikon E200 مجهز به دوربین Olympus DP72 و بزرگنمایی ۱۰۰× استفاده شد.

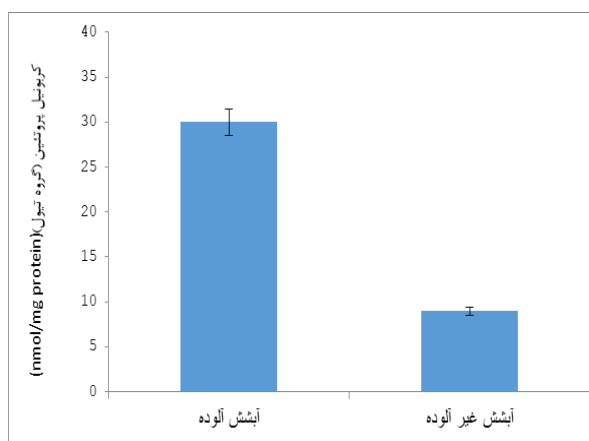
اندازه گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدهای بافت آبشش

برای اندازه‌گیری محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدها (مالون‌دی‌آلدئید) از روش Saleh و همکاران (۲۰۰۹) استفاده شد (۸). در این روش اساس واکنش، تشکیل کمپلکس مالون‌دی‌آلدئید-تیوباریتوریک اسید بین یک مولکول مالون‌دی‌آلدئید و دو مولکول تیوباریتوریک اسید است. به ۵۰۰ میکرولیتر از بافت هموزنه آبشش، سه میلی لیتر اسید ارتوفسفریک اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (Zenithlab-04C, Azin Lab) شد. به ۱/۵ میلی لیتر از مایع رویی، دو میلی لیتر تیوباریتوریک اسید ۰/۶۷ درصد اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری جوش قرار گرفت. سپس دو میلی لیتر N-بوتانل به محلول اضافه و بعد از ورتکس شدید به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد. جذب محلول رویی صورتی رنگ (حاوی مالون‌دی‌آلدئید) در طول موج ۵۳۲ نانومتر قرائت شد. غلظت مالون‌دی‌آلدئید بر حسب نانو مول بر میلی‌گرم پروتئین (nmol/mg protein) با استفاده از ۱-۳-۳-۱- ترا اتوکسی پروپان به عنوان استاندارد تعیین شد.

اندازه گیری میزان کربونیل شدن پروتئین‌های بافت آبشش سطح پروتئین کربونیل بافت آبشش به روش رنگ سنجی شیمیایی و با استفاده از کیت مخصوص (Cayman, USA) اندازه‌گیری شد. در این روش معرف ۲-۴- دی نیترو فیل هیدرازین با گروه‌های کربونیل موجود در پروتئین‌ها کمپلکس زرد رنگ ایجاد می‌کند. مقدار این کمپلکس پس از قرائت با اسپکتروفتومتر در طول موج ۳۸۰ نانومتر معادل با میزان کربونیل شدن پروتئین بافت است. پس از هموزن



نمودار ۲- مقایسه غلظت مالون‌دی‌آلدئید بافت آبشش ماهیان آلوده و غیر آلوده به داکتیلوژیروس. حروف لاتین متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار بین گروه‌ها است ($P < 0.05$).



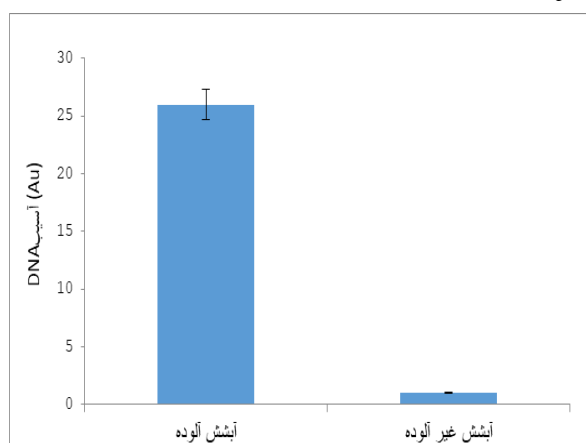
نمودار ۳- مقایسه میزان کربونیل شدن پروتئین‌های بافت آبشش ماهیان آلوده و غیر آلوده به داکتیلوژیروس. حروف لاتین متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار بین گروه‌ها است ($P < 0.05$).

بحث

استرس اکسیداتیو در نتیجه افزایش تولید اکسیدان‌هایی مثل اکسیژن‌های فعال بوجود می‌آید که باعث خسارت به ساختار چربی‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک در بافت‌ها می‌شود. بدن ماهیان با آنزیم‌هایی مانند سوپراکسید دیسموتاز، گلووتاتیون پراکسیداز، کاتالاز و گلووتاتیون-اس-ترانسفراز که از مهمترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی یافت شده

ارزیابی میزان آسیب به DNA بافت آبشش

آنالیز آماری داده‌های مربوط به میزان آسیب به DNA نشان داد که نسبت طول دم به طول سر کامت‌ها در ماهیان آلوده به انگل به مراتب بیشتر از ماهیان گروه شاهد (سالم) بود که نشان دهنده تخریب شدید و معنی‌دار ($P < 0.05$) در DNA ماهیان آلوده به انگل نسبت به ماهیان غیر آلوده است (نمودار ۱).



نمودار ۱- مقایسه میزان آسیب به DNA (نسبت طول دم به سر کامت‌ها) بافت آبشش ماهیان آلوده و غیر آلوده به داکتیلوژیروس. حروف لاتین متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار بین گروه‌ها است ($P < 0.05$).

ارزیابی پراکسیداسیون لیپیدهای بافت آبشش

آنالیز آماری داده‌های مربوط به پراکسیداسیون لیپیدهای بافت آبشش (غلظت مالون‌دی‌آلدئید بافت آبشش) نشان داد که تفاوت معنی‌داری ($P < 0.05$) در غلظت مالون‌دی‌آلدئید بین ماهیان آلوده و غیر آلوده وجود داشت (نمودار ۲).

ارزیابی میزان کربونیل شدن پروتئین‌های بافت آبشش

آنالیز آماری داده‌های مربوط به میزان کربونیل شدن پروتئین‌ها در بافت آبشش نشان داد که تفاوت معنی‌داری ($P < 0.05$) در غلظت گروه تیول بین ماهیان آلوده و غیر آلوده وجود دارد، (نمودار ۳).

علاوه بر آسیب DNA، ضایعات شدید در عضلات و سایر ارگان‌های ماهیان صید شده از دریای مدیترانه را بر اثر مسمومیت شدید آنها با آرسنیک و جیوه گزارش کردند (۱۶). از آنجایی که در مطالعه حاضر هیچگونه مزارع کشاورزی در نزدیکی یا اطراف محل‌های نمونه‌برداری ماهیان (مراکز پرورش ماهی) وجود نداشت، احتمال وجود آلودگی به سموم کشاورزی و نقش آن در ایجاد استرس اکسیداتیو ماهیان بسیار کم است و تا کنون گزارش علمی در این زمینه منتشر نشده است. با این وجود برای انجام آزمایشات مشابه در آینده، بررسی مجدد در زمینه ایجاد مزارع یا هرگونه فعالیت کشاورزی در منطقه ضروری به نظر میرسد.

یکی از محصولات نهایی استرس‌های اکسیداتیو، آلدئیدهای فعالی مانند مالون‌دی‌آلدئید می باشد. این مواد باعث طیف گسترده‌ای از آسیب‌های سلولی شده و به احتمال قوی، در بروز بعضی از بیماری‌ها نقش دارند. انگل‌های مختلف از جمله داکتیلوژیروس‌ها در پوست و آبشش‌ها با ضعف کردن سیستم آنتی‌اکسیدانی میزبان از طریق حمله به لیپیدهای غشاء و ایجاد واکنش‌های زنجیره‌ای تولید رادیکال‌های آزاد، منجر به پر اکسیداسیون چربی‌ها می‌شوند. هیدروپراکسیدهای چربی تمایل دارند از قسمت هیدروفوبیک داخلی غشاء به سمت سطح غشاء حرکت کرده و در نتیجه ارگانیزاسیون غشاء را به هم بزنند. پر اکسیداسیون غشاهای بیولوژیک نفوذپذیری آن‌ها را نسبت به یون‌ها افزایش داده و باعث تخریب پروتئین‌های غشایی مثل گیرنده‌ها و آنزیم‌ها نیز می‌شوند (۱۷). لذا مالون‌دی‌آلدئید به عنوان یک شناساگر مطمئن و قابل اعتماد برای ردیابی میزان تخریب لیپیدها در اثر استرس اکسیداتیو به کار گرفته می‌شود (۱۸).

همانطور که نتایج مطالعه کنونی نشان می‌دهد، محتوای مالون‌دی‌آلدئید در ماهی‌های آلوده به طور قابل ملاحظه‌ای

در بدن ماهیان می‌باشند، به مقابله با ملکول‌های فعال اکسیژن می‌پردازند (۱۰).

بافت آبشش متشکل از سلول‌های مژه دار و بدون مژه فعالی بوده و این سلول‌ها در طول رشته‌های آبششی تکثیر می‌یابند. این سلول‌ها که به سلول‌های شبه-اپیتلیال هم معروفند، مستعد آسیب‌های کروموزومی هستند. به طوری که کوچکترین تغییرات در محیط زندگی آبزیان، حیات این سلول‌ها را به خطر می‌اندازد. آلودگی به انواع ترکیبات شیمیایی مانند آفت کش‌ها، فلزات سنگین و عفونت‌های انگلی و باکتریایی باعث آسیب‌های ژنوتوکسیک در این سلول‌ها می‌شود (۱۱-۱۲). یافته‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهد که میزان آسیب و تخریب DNA در سلول‌های مشتق از آبشش ماهیان کپور آلوده به انگل داکتیلوژیروس در مقایسه با ماهیان سالم به مراتب خیلی بیشتر است (نمودار ۱). تخریب DNA می‌تواند به دنبال متلاشی شدن سلول و حمله رادیکال‌های آزاد به هسته سلول رخ دهد. علاوه بر انگل‌ها عوامل دیگری همچون مسمومیت با فلزات سنگین، آفت کش‌ها و علف‌کش‌های مورد استفاده در کشاورزی هم می‌توانند باعث استرس اکسیداتیو و صدمه به هسته سلول‌ها در بافت‌های حیاتی ماهیان شوند (۱۳). در راستای یافته‌های مطالعه کنونی، Varotto و همکاران (۲۰۱۳) مشاهده کردند که میزان تخریب DNA در آبشش ماهی *Mytilus galloprovincialis* در معرض غلظت‌های مختلف کادمیوم، مس و جیوه به شکل وابسته به غلظت، افزایش می‌یابد (۱۳). همچنین Guilherme و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که مار ماهی مهاجر *Anguilla anguilla* در معرض آفت‌کش گلیوفسفات دچار تخریب شدید DNA در سلول‌های آبشش می‌شود (۱۴). چنین تاثیر مخربی بر DNA سلول‌های بافت‌های حیاتی ماهیان توسط Wang و همکاران (۲۰۱۸) نیز در بافت کبد، آبشش و عضله ماهی کپور معمولی نیز گزارش شده است (۱۵). Della Torre و همکاران (۲۰۱۰)

مالون‌دی‌آلدئید به دنبال آلودگی با انگل داکتیلوژیروس، سایر محققین نیز یافته‌های مشابهی را به دنبال آلودگی با دیگر انگل‌ها گزارش کرده‌اند. Bello و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کرده‌اند که مقادیر مالون‌دی‌آلدئید در عضله ماهی‌های آلوده به انگل برگی شکل چند میزبان *Clinostomum detruncatum* تا دو برابر بیشتر از ماهیان غیر آلوده است (۲۲). به نظر می‌رسد که پراکسیداسیون چربی‌ها می‌تواند یک شاخص زیستی مناسب برای ردیابی اثرات پاتولوژیک انگل‌های آبزیان باشد.

یکی دیگر از محصولات ناشی از استرس اکسیداتیو، پروتئین‌های کربونیل شده می‌باشند. نتایج مطالعات اخیر به وضوح نشان می‌دهد که پروتئین‌های کربونیل در تعدادی از بیماری‌های انسان نقش دارند. مشخص شده است که گونه‌های فعال اکسیژن می‌توانند به گروه‌های آمینی مستقر در پروتئین‌ها حمله و باعث تشکیل گروه کربونیل در ساختار آمینو اسیدها شوند (۲۳). نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که محتوای پروتئین‌های کربونیل در ماهیان کپور آلوده با انگل داکتیلوژیروس به طور معنی داری ($P < 0.05$) افزایش چشمگیری در مقایسه با ماهیان سالم داشته است (نمودار ۳). این یافته حاکی از تخریب پروتئین‌ها به دنبال استرس اکسیداتیو است. همچنین Vasemagi و همکاران (۲۰۱۷) نشان داده‌اند که ماهیان سالمون وحشی (*Salmo salar*) آلوده به انواع انگل‌های دستگاه گوارش، محتوای پروتئین‌های کربونیل شده بیشتری را در مقایسه با هم‌تایان سالم خود دارا بودند (۲۴).

از آنجایی که این مطالعه در شهرستان‌های جلفا و پلدشت که دارای آب و هوای سرد و کوهستانی می‌باشند، انجام شده و در این مناطق به دلیل برودت هوا، اقلیم بهاری مشابه اقلیم پاییزی و سرد و مرطوب است و نیز از طرفی نمونه برداری در زمستان، طی روزهای گرم، هنگامی که دمای آب استخر در محدوده ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد بوده و کپور

($P < 0.05$) افزایش یافته است (نمودار ۲). این یافته، به وضوح نشان می‌دهد که آلودگی با انگل داکتیلوژیروس به لیپیدهای سلولی آسیب جدی وارد می‌کند. یکی از محل‌های عمده و حساس تجمع لیپیدها، غشا سلول‌ها و اندامک‌های داخلی سلولی است و چنین آسیب گسترده به غشاهای سلولی می‌تواند به متلاشی شدن سلول منجر گردد.

کپورماهیان آلوده به داکتیلوژیروس دارای علائمی مانند هیپرپلازی آبشش‌ها، کاهش رشد و افزایش تعداد تنفس هستند که می‌تواند به دلیل مرگ و تخریب سلول‌های آبشش در اثر آسیب جدی به غشای سلولی و لیپیدهای موجود در ساختار این غشا باشد. در عفونت‌های بسیار شدید که قاعدتا میزان القاء استرس اکسیداتیو نیز بسیار زیاد است، ممکن است خونریزی و متاپلازی در آبشش‌ها و حتی عفونت‌های ثانویه باکتریال نیز مشاهده شود (۱۹). در مطالعه کنونی از میان ۲۲ عدد ماهی آلوده به داکتیلوژیروس (نگاره ۱)، علائم ظاهری مبنی بر عفونت ثانویه مشاهده نشد، اما قطعا انجام بررسی‌های دقیق میکروبیولوژیکی در تکمیل یافته‌های چنین مطالعاتی بسیار مناسب بوده که به دلیل محدودیت‌های مختلف در این مطالعه انجام نشد. شواهد موجود حاکی از ارتباط مستقیم و موثری بین شدت آلودگی به انواع انگل‌ها و استرس اکسیداتیو ایجاد شده در بدن میزبان است (۲۰-۲۱). اما از آنجا که هدف اصلی مطالعه کنونی ارزیابی شیوع انگل مونوژن داکتیلوژیروس در کپور معمولی در استان آذربایجان غربی بود و همچنین ضایعات اکسیداتیو ناشی از این انگل به مولکول‌های زیستی در این مطالعه به‌طور اولیه مورد ارزیابی قرار گرفت، بنابراین شدت آلودگی به این انگل بررسی نشده و در مطالعه‌های آتی، ارتباط شدت آلودگی به این انگل و بررسی تعادل اکسیدانی/آنتی‌اکسیدانی از طریق اندازه‌گیری شاخص‌های دیگر استرس اکسیداتیو به خصوص فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پیشنهاد می‌گردد. همراستا با یافته‌های مطالعه کنونی مبنی بر افزایش محتوای

- Oryzias latipes* (Beloniformes: Adrianichthyidae) in Japan. Species Diversity. 2017; 22(1): 1-5.
4. Neary ET, Develi N, Ozgül G. Occurrence of *Dactylogyrus* species (Platyhelminths, Monogenean) on Cyprinids in Almus Dam Lake, Turkey. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 2012; 12: 15-21.
 5. Soler-Jiménez LC, Paredes-Trujillo AI, Vidal-Martínez VM. Helminth parasites of finfish commercial aquaculture in Latin America. Journal of Helminthology. 2017; 91(2): 110-36.
 6. Gussev AV. Parasitic metazoan: Monogenea. In: Bauer ON (ed) Key to parasites of freshwater fishes of USSR, 1st edn, Vol. 2. Nauka, Leningrad, USSR, 1985; p 424 (In Russian)
 7. Pu X, Wang Z, Klaunig JE. Alkaline Comet Assay for assessing DNA damage in individual cells. Current Protocols in Toxicology. 2015; 65(1): 1-11.
 8. Saleh MA, Al-Salahy MB, Sanousi SA. Oxidative stress in blood of camels (*Camelus dromedaries*) naturally infected with *Trypanosoma evansi*. Veterinary Parasitology. 2009; 162(3): 192-9.
 9. Hasan-Zaiem A, Saghebjo M, Foadodini M, Saed-Mocheshi S. The effect of aerobic training and *Pistacia atlantica* extract on the levels of Heat Shock Protein 70 and protein Carbonyl in the heart tissue of diabetic Rats. Journal of Isfahan Medical School. 2015; 33(347): 1333-1348.
 10. Vinagre C, Madeira D, Narciso L, Cabral HN, Diniz M. Effect of temperature on oxidative stress in fish: lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. Ecological Indicators. 2012; 23: 274-9.
 11. Ahmadi A, Borji H, Naghibi A, Nasiri MR, Sharifiyazdi H. Morphologic and molecular (28S rDNA) characterization of *Dactylogyrus* spp. in *Cyprinus carpio* and *Ctenopharyngodon idella* in Mashhad, Iran. The Canadian Journal of Veterinary Research. 2017; 81: 280-4.

ماهیان مورد مطالعه در این مطالعه در دمای بهینه نگهداری می شدند، احتمال تاثیر دما بر شاخص های استرس اکسیداتیو بسیار ناچیز است. عدم وجود ارتباط مستقیم بین دما و استرس اکسیداتیو در برخی منابع موجود هم گزارش شده است (۱۰)، اما با این وجود، بهتر است در پژوهش های آتی تاثیر عامل دما بر شاخص های استرس اکسیداتیو نیز مورد مطالعه قرار گیرد.

براساس یافته های مطالعه کنونی، آلودگی به انگل داکتیلوژیروس باعث القاء استرس اکسیداتیو و تخریب مولکول های زیستی در آبشش ماهی کپور معمولی می شود. به طوری که میزان خسارت به ملکول های DNA، مقادیر مالون دی آلدئید ناشی از اکسیداسیون لیپیدهای ساختاری سلول ها و همچنین میزان پروتئین های کربونیل شده در بافت آبشش در ماهیان آلوده افزایش یافته که نشان دهنده تخریب اسیدهای نوکلئیک، لیپیدها و پروتئین ها می باشد. لذا برای جلوگیری از این آسیب های مهم به بافت حیاتی آبشش ماهیان و نیز برای جلوگیری از ایجاد شرایط مناسب برای آلودگی های ثانویه احتمالی، رعایت کامل اصول بهداشتی به ویژه در مزارع پرورش ماهی متراکم ضروری به نظر می رسد.

فهرست منابع

1. Fabbender C, T. B. Assessment of genotoxicity in gonads, liver and gills of Zebrafish (*Danio rerio*) by use of the Comet Assay and Micronucleus Test after In Vivo exposure to Methyl Methanesulfonate. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 2013; 91(1): 89-95.
2. Nazarizadeh A, Asri-Rezaie S. Comparative study of Antidiabetic activity and Oxidative Stress induced by Zinc Oxide Nanoparticles and Zinc Sulfate in diabetic Rats. Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists. 2016; 17: 834-43.
3. Nitta M, Nagasawa K. *Dactylogyrus oryzias* n. sp. (Monogenea: Dactylogyridae) from

12. Siddiqui AA. Effects of Seasons, host age, size and sex on Monogenetic Trematode, *Hamatopeduncularia indicus* of host fish, *Arius jella*. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*. 2014; 4(2): 1146-51.
13. Varotto L, Domeneghetti S, Rosani U, Manfrin C, Cajaraville MP, Raccanelli S, et al. DNA damage and transcriptional changes in the gills of *Mytilus galloprovincialis* exposed to nanomolar doses of combined metal salts (Cd, Cu, Hg). *PLoS one*. 2013; 8(1): e54602.
14. Guilherme S, Gaivão I, Santos MA, Pacheco M. DNA Damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a Glyphosate-based herbicide -- elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress. *Mutation Research*. 2012; 743(1-2): 1-9.
15. Wang C, Harwood JD, Zhang - Chemosphere Q. Oxidative stress and DNA damage in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to the herbicide mesotrione. *Chemosphere*. 2018; 193: 1080-1086.
16. Della Torre C, Petoichi T, Corsi I, Maddalena Dinardo M, Baroni D, Alcaro L, et al. DNA damage, severe organ lesions and high muscle levels of As and Hg in two benthic fish species from a chemical warfare agent dumping site in the Mediterranean Sea. *Science of the Total Environment*. 2010; 408(9): 2136-45.
17. Crnogaj M, Petlevski R, Mrljak V, Kis, I., Torti M, Kucer N, Matijatko V, et al. Malondialdehyde levels in serum of dogs infected with *Babesia canis*. *Veterinarni Medicina*. 2010; 55(4): 163-71.
18. Bitá S, Mesbah M, Ghorbanpour Najafabadi M. Study of antioxidant enzymes and lipid peroxidation changes in common carp exposed to silver nanoparticles synthesized using *Sargassum* seaweed. *Veterinary Researches & Biological Products*. 2017; 119: 150-160.
19. Wangchu L, Narba D, Yassa M, Tripathi A. *Dactylogyrus barnae* sp. n. (Platyhelminthes: Monogenoidea) infecting gills of *Barilius barna* Hamilton, 1822 (Pisces: Cyprinidae) from a global biodiversity hotspot - Arunachal Pradesh (India). *Veterinary World*. 2017; 10(5): 505-9.
20. Van de Crommenacker J, Richardson DS, Koltz AM, Hutchings K, Komdeur J. Parasitic infection and oxidative status are associated and vary with breeding activity in the Seychelles warbler. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2012; 279(1733):1466-1476.
21. Dimitrijević B, Borozan S, Katić-Radojević S, Stojanović S. Effects of infection intensity with *Strongyloides papillosus* and albendazole treatment on development of oxidative/nitrosative stress in sheep. *Veterinary parasitology*. 2012; 186(3-4):364-75.
22. Bello ARR, Fortes E, Bello-Klein A, Bello AA, Llesuy SF, Robaldo RB, et al. Lipid peroxidation induced by *Clinostomum detrunctum* in muscle of the freshwater fish *Rhamdia quelen*. *Diseases of Aquatic Organism*. 2000; 42: 233-6.
23. Mehrabian Fard M, Baghshani H, Shahsavani D, Gholipour Kanani H. Effect of dietary supplementation of *Spirulina* (*Spirulia platensis*) on cyanide-induced oxidative damage of Common Carp *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758. *Applied Ichthyology Research*. 2017; 5(3): 103-114.
24. Vasemagi A, Visse M, Kisand V. Effect of environmental factors and an emerging parasitic disease on gut microbiome of wild salmonid fish. *mSphere*. 2017; 2(6): e00418-7.

