

تغییرات آنزیم‌های دخیل در دفاع آنتی‌اکسیدانی طی مراحل اول زندگی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورش یافته در تراکم‌های مختلف

سمیراشریفی^۱ امیر پرویز سلاطی^{۱*} پیمان اسدیان^۲ عین‌الله گرجی پور^۳ حسین مرادیان^۳

(۱) گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر-ایران

(۲) گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد-ایران

(۳) موسسه تحقیقات علوم شیلاتی یاسوج-ایران

(دریافت مقاله: ۲۶ تیر ماه ۱۳۹۲، پذیرش نهایی: ۱۰ مهر ماه ۱۳۹۲)

چکیده

زمینه مطالعه: تراکم ذخیره‌سازی به عنوان یک فاکتور استرس بیولوژیکی در ارزی‌های پروری شناخته شده است و می‌تواند ترکیبات ژنتیکی، بعضی فاکتورهای استرس، فعالیت‌های آنزیمی و مصرف اکسیژن را تحت تأثیر قرار دهد. **هدف:** در این مطالعه تغییرات آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، سوپر اکسید دسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و گلوکاتایون پراکسیداز (GPX) در تخم و لارو قزل‌آلای رنگین‌کمان *Oncorhynchus mykiss* طی نگهداری در تراکم‌های ذخیره‌سازی مختلف مورد بررسی قرار گرفت. **روش کار:** سه گروه از تخم‌ها در تراف‌ها (ابعاد $10 \times 9 \times 16$ cm، حجم ۱۰L) با تراکم ۴۰۰ تخم در لیتر (گروه ۱ به عنوان تراکم متداول)، ۲۰۰ تخم در لیتر (گروه ۲ به عنوان تراکم پایین) و ۶۰۰ تخم در لیتر (گروه ۳ به عنوان تراکم بالا) و در سه تکرار پرورش داده شدند. تخم‌ها در تراف‌های آب شیرین جریان دار با دمای $10/8^{\circ}C$ نگه‌داری گردیدند. نمونه برداری در روز لقاح (۱)، تسهیم (۳)، ارگان زایی (۸)، چشم‌زدگی (۱۶)، تخم‌گشایی (۳۱) و شروع تغذیه فعال (۴۸) صورت گرفت. **نتایج:** افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های SOD و GPX از چشم‌زدگی تا تخم‌گشایی دیده شد. ($p < 0/01$) فعالیت این آنزیم‌ها تا شروع تغذیه فعال کاهش یافتند ($p < 0/01$)، در ضمن این فعالیت در مقایسه با لقاح، بیشتر بود. تغییرات مشابهی در فعالیت SOD و GPX در تراکم‌های پایین و بالا (گروه ۲ و ۳) مشاهده گردید. فعالیت CAT تا ارگان‌زایی در مقایسه با لقاح، افزایش یافت و پس از آن، کاهش معنی‌داری را تا شروع تغذیه فعال در مقایسه با لقاح نشان داد ($p < 0/01$). الگوی تغییرات فعالیت CAT در تراکم بالا مشابه با تراکم متداول بود اما گروه با تراکم پایین تا زمان چشم‌زدگی بیشترین بود. فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و GPX در روزهای نمونه برداری در میان گروه‌های مختلف، اختلاف معنی‌داری نشان ندادند ($p > 0/05$). **نتیجه‌گیری نهایی:** نتایج به دست آمده نشان داد که تراکم‌های مورد استفاده در این مطالعه اثری بر تکامل سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در مراحل اولیه زندگی قزل‌آلای رنگین‌کمان ندارند.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، تراکم، لارو، پراکسیداسیون لیپید، قزل‌آلای رنگین‌کمان

تولید گونه‌های واکنشگر اکسیژن (ROS) در زندگی هوازی اجتناب ناپذیر است، از این رو همه ارگانسیم‌های هوازی دارای مکانیسم‌های گوناگونی برای به حداقل رساندن اثرات ناشی از ROS هستند. این مکانیسم‌ها شامل آنزیم‌های حذف‌کننده ROS، ترکیبات با وزن مولکولی پایین که مستقیماً ROS را حذف می‌کنند (که در جانوران منشأ درون زاد داشته یا از غذا به دست می‌آید) و پروتئین‌هایی که مسئول جدا کردن پرواکسیدان‌ها به خصوص آهن و مس هستند، می‌باشند. تعدادی از این مکانیسم‌ها، شامل بعضی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در حد بالایی در جریان سیر تکامل حفظ شده‌اند. در میان مهره‌داران این مکانیسم‌ها در روند تکامل حفظ شده‌اند (۴). از آنجا که ماهی مخصوصاً در مراحل اولیه زندگی نسبت به تغییرات وابسته به محیط مانند دما، اکسیژن و آلودگی آسیب پذیر است، مراحل جنینی و لاروی ماهی از حساسیت و اهمیت بالایی برخوردار می‌باشند (۲۲) و شناسایی روند تغییرات سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌تواند به طراحی استراتژی مناسب تکثیر نماید. دفاع آنتی‌اکسیدانی غیر آنزیمی مشاهده شده در پستانداران، در ماهی نیز مشاهده شده است (۱۸). اما با وجود شباهت‌های بسیار بین دفاع آنتی

مقدمه

ایمنی یک مکانیسم مهم فیزیولوژیک در حیوانات برای محافظت آنها در مقابل عفونت‌ها و تنظیم محیط داخلی بدن می‌باشد. ایمنی می‌تواند غیر اختصاصی (مکانیسم دفاع ذاتی میزبان در مقابل عفونت‌ها) بوده و یا اختصاصی (فرآیند اختصاصی در پاسخ به عوامل خارجی خاص) باشد. ماهی از نظر تکاملی از ابتدایی‌ترین مهره‌داران بوده و سیستم ایمنی آن نیز تکامل کمتری نسبت به حیوانات خونگرم دارد. سیستم ایمنی غیر اختصاصی در مهره‌داران ابتدایی نقش بیشتری نسبت به سیستم ایمنی اختصاصی دارد (۹). در ماهی مکانیسم‌های دفاع مختلفی در ایمنی غیر اختصاصی وجود دارد که شامل: ۱- سد دفاعی بافت‌های پوششی (اپیتلیوم پوست و آبشش) ۲- مولکول‌های دفاع غیر اختصاصی هومورال (پروتئین‌های فاز حاد، لایزوزیم، اینترفرون، کمپلمان، پروپدین، لیزین، آگلوتینین، لکتین، تریپسین، سائتوکین، پرسپیپتین، پروتئین باند شده با یونهای فلزی و بازدارنده‌های پروتئین‌زای و ایکوزانوئیدها) می‌باشد.



برای جلوگیری از اثرات نور با استفاده از پوشش کارتن پلاست، تخم‌ها در تاریکی قرار گرفتند. جهت نمونه برداری لاروها تا زمان شروع تغذیه فعال که حدود ۵۰ روز طول کشید نگهداری شدند. در طی اجرای پروژۀ اکسیژن محلول و دمای آب به صورت روزانه و pH آب به صورت هفتگی اندازه‌گیری شدند. دبی آب نیز هر هفته یک بار اندازه‌گیری شد. با توجه به درجه حرارت آب ($10/8^{\circ}\text{C}$) انکوباسیون تخم‌ها، نمونه برداری در زمان‌های ۱ (لقاح)، ۳ (تسهیم)، ۸ (ارگان‌زایی)، ۱۶ (چشم‌زدگی)، ۳۱ (تخم‌گشایی) و ۴۸ (شروع تغذیه فعال) صورت گرفت. تعیین مرحله تکاملی بر اساس زمان‌های مشخص شده در مطالعات بافت‌شناسی انجام گرفت. نمونه‌ها در ازلت مایع فریز شدند و تا زمان آنالیز در دمای -80°C نگهداری گردیدند.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها: برای ارزیابی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی، فعالیت آنزیم‌های GPX، CAT و SOD اندازه‌گیری شد. برای همگن کردن، ۱g از نمونه‌های تخم (تعداد تخم در گ برابر با ۱۳ عدد تخم) و لاروز هر تکرار توسط ترازو وزن و در یک فالکن ریخته شد. بافر فسفات 20mM و 1mM EDTA به آن اضافه گردید (۵). سپس توسط دستگاه هموژنایزر مدل IKA[®] عمل همگن سازی در مجاورت یخ انجام گرفت. جهت جداسازی فاز مایع از باقی مانده‌ها، از سانتریفیوژ مدل K240R با دور 7400rpm به مدت 10min در دمای 4°C استفاده شد. بعد از عمل سانتریفیوژ، مایع رویی توسط سمپلر جدا گردید. اندازه‌گیری کاتالاز بر اساس روش Goth در سال ۱۹۹۱، اندازه‌گیری فعالیت آنزیم GPX به روش Paglia و Valentine در سال ۱۹۶۷ و سوپراکسید دیسموتاز بر اساس روش Marklund در سال ۱۹۷۴ صورت پذیرفت.

کلیه داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار (SD) آورده شده است. جهت تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصل از انجام آزمایشات، از نرم افزار SPSS (Version 16) استفاده شد. برای تعیین تفاوت بین میزان فعالیت آنزیم‌ها در تراکم‌ها و مراحل مختلف از One-way ANOVA استفاده شد و در صورت نشان دادن اختلاف، از پس‌آزمون دانکن جهت مقایسه اختلاف میانگین‌ها استفاده گردید. وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌داری در سطح آماری $0/05$ و $0/001$ تعیین شد. جهت تعیین میانگین، انحراف معیار و خطای استاندارد از آمار توصیفی استفاده گردید.

نتایج

دمای آب، میزان اکسیژن ورودی و pH در طول دوره انکوباسیون اندازه‌گیری شدند. دمای آب با میانگین $19/0 \pm 0/59^{\circ}\text{C}$ در طول آزمایش تقریباً ثابت بود. میانگین pH، $7/23 \pm 0/04$ ، میانگین اکسیژن ورودی $7/93 \pm 0/25\text{mg/L}$ و دبی آب 8L/min ثبت گردیدند.

فعالیت SOD در روز لقاح (۱) در تراکم‌های پایین، متداول و بالا به ترتیب $5/40 \pm 0/11$ و $5/95 \pm 0/28$ ، $6/10 \pm 0/60$ units/mg protein شد (تصویر ۱). افزایش معنی‌داری در فعالیت SOD تا زمان چشم‌گیری شد (تصویر ۱). افزایش معنی‌داری در فعالیت SOD تا زمان چشم‌زدگی نسبت به لقاح در تراکم متداول دیده شد ($p < 0/001$)، اما پس از آن

اکسیدانی، اختلافات مهمی نیز بین گونه‌های ماهی و پستاندار وجود دارد (۱۱). از این رو با توجه به گسترش پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان در کشور این مطالعه با هدف ارزیابی تغییرات دفاع آنتی‌اکسیدانی در مراحل اولیه زندگی و اثر تراکم پرورش بر این سیستم صورت پذیرفت.

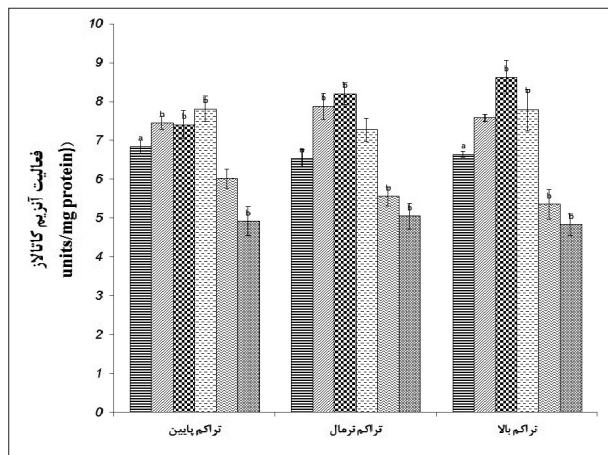
مواد و روش کار

تکثیر مصنوعی مولدین: تعداد پنج عدد مولد ماده ۴ ساله (میانگین وزن $2240 \pm 35\text{g}$) و ۳ عدد مولد نر ۴ ساله (میانگین وزن $1750 \pm 22\text{g}$) بعد از بررسی رسیدگی جنسی و تأیید رسیدگی جنسی آنها، به وان‌های مخصوص منتقل و با ماده بیهوش کننده پودر گل میخک ($150-200\text{g}$) بیهوش شدند (۲۷). مولدین بیهوش شده از وان‌ها خارج شده و با آب تمیز شست‌شوداده شدند. بدن مولدین به آرامی با حوله خشک و با فشار به شکم مولد ماده تخم‌گیری انجام شد. تخم‌ها درون یک تشت ریخته و سپس اسپرم اضافه گردید. عمل لقاح به روش مصنوعی و خشک با اختلاط تخمک و اسپرم بدون مایعات تخمدانی و آب همراه انجام گرفت. بعد از لقاح تخم‌ها به مدت $20-30\text{min}$ با آب به تدریج شسته تا ضایعات آن خارج شده و آب حاوی تخم‌ها کاملاً شفاف گردد. در مرحله بعد به منظور سفت شدن تخم‌ها، مقداری از آب چشمه تأمین کننده سالن انکوباسیون به تخم‌ها اضافه گردید و اجازه داده شد تا حدود ۴۵ دقیقه فرآیند جذب آب طول بکشد.

طرح آزمایش: پس از انجام عملیات لقاح، هنگامی که تخم‌ها به خوبی آب جذب نمودند با استفاده از پوآر اقدام به جمع‌آوری تخم‌های سفید و لقاح نیافته گردید و تخم‌های لقاح یافته به سالن انکوباسیون تخم‌بامی $10/8^{\circ}\text{C}$ ، انتقال داده شدند و در سه ترف تحقیقاتی 10L لیتری که هر کدام حاوی سه سینی با ابعاد $16 \times 9/5 \times 10\text{Cm}$ بودند، توزیع گردیدند. در این مطالعه جهت بررسی روند تکامل سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و اثر تراکم بر تکامل این سیستم در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، تخم‌ها در سه تراکم متفاوت پرورش داده شدند. تراکم متداول (400egg/L)، تراکم پایین (200egg/L) و تراکم بالا (600egg/L) که تخم‌ها در هر سه تراکم در سه تکرار با شرایط یکسان پرورشی توزیع گردیدند. جهت شمارش تخم از صفحات شمارش تخم استفاده گردید. این صفحات دارای تعداد مشخصی سوراخ هستند که در قطرهای مختلف طراحی شده‌اند. این صفحات به داخل تشت حاوی تخم فرو برده شد و به تعداد سوراخ‌ها، بر روی آن تخم قرار گرفت. در این تحقیق برای از بین بردن اثرات دوره انکوباسیون سینی‌های مربوط به هر تکرار به صورت متناوب در ترف‌های مختلف قرار داده شدند.

در طول دوره انکوباسیون از ۴۸ ساعت بعد از لقاح تا روز شانزدهم بعد از لقاح (شروع چشم‌زدگی) ضد عفونی بر اساس دستورالعمل بخش بهداشت مرکز به روش شستشو به صورت روزانه توسط مالاشیت گرین با دوز $0/5\text{ppm}$ به مدت 30min صورت گرفت. در طول مدت انکوباسیون





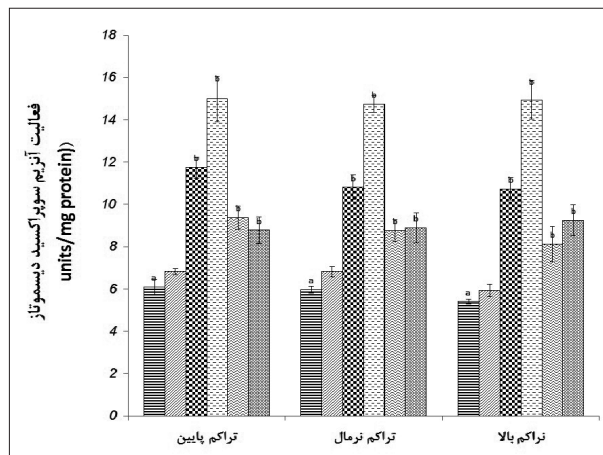
تصویر ۲. نتایج فعالیت CAT (units/mg protein) در روزهای مختلف نمونه برداری (لقاح [L] تسهیم [S] ارگان زایی [A] چشم زدگی [E] تفریح [F] شروع تغذیه فعال [F]) در هر یک از تراکم‌ها (۲۰۰ egg/l، ۴۰۰ egg/l و ۶۰۰ egg/l). داده‌ها به صورت mean±SD بیان شده‌اند.

داری کاسته شد ($p < 0.001$). در تراکم‌های پایین، متداول و بالا فعالیت GPX در روز لقاح (۱) به ترتیب ۴/۹۵±۰/۲۸ units/mg protein، ۴/۴۳±۰/۲۸ و ۵/۲۶±۰/۳۱ اندازه‌گیری شد (تصویر ۳). نتایج به دست آمده در تراکم متداول نشان داد که فعالیت GPX در زمان تفریح افزایش قابل توجهی در مقایسه با زمان‌های قبلی نمونه برداری دارد. سپس از فعالیت GPX در شروع تغذیه فعال به میزان زیادی کاسته شد، اما سطح فعالیت این آنزیم نیز کم‌کم در شروع تغذیه فعال نسبت به سطح فعالیت آن در زمان لقاح، بیشتر بود ($p < 0.001$). در دو تراکم بالا و پایین نیز تغییرات فعالیت آنزیم مانند آنچه در تراکم متداول ثبت گردید تا زمان تفریح روندی افزایشی نشان داد و پس از آن کاهش یافت.

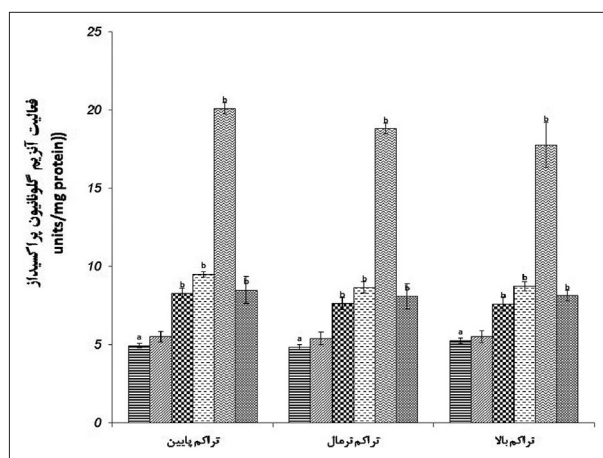
در تیمارهای مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری در فعالیت SOD، CAT و GPX در هر یک از زمان‌های نمونه برداری، روزهای لقاح، تسهیم، ارگان‌زایی، چشم‌زدگی، تفریح و شروع تغذیه فعال مشاهده نشد ($p > 0.05$).

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه، فعالیت آنزیم‌های مورد بررسی را در مراحل ابتدایی زندگی قزل‌آلای رنگین‌کمان اندک نشان داد که می‌تواند ناشی از سطوح بالای آنتی‌اکسیدان‌هایی با وزن مولکولی پایین در مراحل ابتدایی تشکیل باشد. Rudneva در سال ۱۹۹۹ با بررسی کوسه ماهی (*Squalus acanthias*)، گاو ماهی گردخزری (*Neogobius melanostomus*)، گاو ماهی مرمری (*Proterorhinus marmoratus*) به دست آورد. Guerriero و همکاران در سال ۲۰۰۴ سطوح بالایی از ویتامین E را در تخم باس دریایی قبل و بعد از لقاح و جنین‌های سالم بر خلاف تخم‌ها و جنین‌های مرده و Mani-Ponset و همکاران در سال ۱۹۹۶ نیز



تصویر ۱. نتایج فعالیت SOD (units/mg protein) در روزهای مختلف نمونه برداری (لقاح [L] تسهیم [S] ارگان زایی [A] چشم زدگی [E] تفریح [F] شروع تغذیه فعال [F]) در هر یک از تراکم‌ها (۲۰۰ egg/l، ۴۰۰ egg/l و ۶۰۰ egg/l). داده‌ها به صورت mean±SD بیان شده‌اند.



تصویر ۳. فعالیت GPX (units/mg protein) در روزهای مختلف نمونه برداری (لقاح [L] تسهیم [S] ارگان زایی [A] چشم زدگی [E] تفریح [F] شروع تغذیه فعال [F]) در هر یک از تراکم‌های (۲۰۰ egg/l، ۴۰۰ egg/l و ۶۰۰ egg/l). داده‌ها به صورت mean±SD بیان شده‌اند.

فعالیت SOD تا شروع تغذیه فعال به طور معنی‌داری در تراکم نرمال کاهش یافت ($p < 0.001$). در شروع تغذیه فعال سطح فعالیت این آنزیم در مقایسه با زمان لقاح بیشتر بود. روند افزایشی و کاهش‌ی مشابهی در تغییرات فعالیت SOD در تراکم‌های پایین و بالا مشابه تراکم متداول مشاهده گردید. فعالیت CAT در روز لقاح (۱) در تراکم‌های پایین، متداول و بالا به ترتیب ۶/۸۳±۰/۳۱، ۶/۵۳±۰/۳۹ و ۶/۶۳±۰/۱۳ ثبت گردید (تصویر ۲). در تراکم متداول فعالیت CAT تا ارگان‌زایی در مقایسه با لقاح، افزایش یافت و پس از آن، کاهش معنی‌داری را تا شروع تغذیه فعال در مقایسه با لقاح نشان داد ($p < 0.001$). تغییرات فعالیت CAT در تراکم بالا مشابه با تراکم متداول بود اما فعالیت CAT در تراکم پایین تا زمان چشم‌زدگی افزایش معنی‌داری در مقایسه با روز لقاح نشان داد و پس از آن، از فعالیت این آنزیم نسبت به روز لقاح به طور معنی



فاکتورهای استرس، فعالیت‌های آنزیمی و مصرف اکسیژن را تحت تأثیر قرار دهد. با اعمال تراکم، افزایش در تقاضای انرژی با تغییر تنظیمات متابولیک جبران می‌شود (۲۸، ۳۰) و می‌تواند تولید ROS را افزایش دهند. همچنین گزارش شده که تراکم یک پاسخ هماتولوژیک جهت جبران افزایش نیاز به اکسیژن فراهم می‌کند (۲۴). Trenzado و همکاران در سال ۲۰۰۹ با بررسی اثر تراکم بر روی قزل‌آلای رنگین‌کمان یافتند که تعداد گلبول‌های قرمز و همچنین هموگلوبین در گروه‌هایی با تراکم بالاتر در مقایسه با گروه‌هایی با تراکم پایین‌تر جهت جبران افزایش نیاز به اکسیژن، افزایش نشان دادند، اما فعالیت CAT و GPX با اعمال تراکم تحت تأثیر قرار نگرفت. Li و همکاران در سال ۲۰۰۶ اثرات تراکم ذخیره سازی را بر فعالیت SOD و میگوچی (Fenneropenaeus chinensis) مورد بررسی قرار دادند. آنها تغییرات معنی داری در فعالیت آنزیم‌های SOD و مشاهده نکردند که تأیید کننده نتایج مطالعه حاضر می‌باشد. Aksakal و همکاران در سال ۲۰۱۱ با بررسی افزایش تراکم ذخیره سازی بر روی عوامل بازدارنده آنزیم‌های متابولیک آنتی‌اکسیدانی شامل گلوکز-۶ فسفات دهیدروژناز (G6PD)، ۶-فسفولگلوکونات دهیدروژناز (6PGD) و گلوکاتایون ردوکتاز (GR) در بافت‌های کبد، کلیه، آبشش و عضله در قزل‌آلای رنگین‌کمان مشاهده کردند که افزایش تراکم ذخیره سازی فعالیت متابولیک آنتی‌اکسیدانی مهم در تمام بافت‌ها بجز کلیه را تضعیف می‌کند.

اندازه‌گیری مقادیر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD، CAT و GPX در مطالعه حاضر نشان داد که طی مراحل رشد و نمو جنین به خوبی در برابر خطرات ناشی از رادیکال‌های آزاد محافظت می‌شود، اما پس از تفریح جنین، فعالیت این آنزیم‌ها کاهش یافته و مقدار پراکسیداسیون لیپید و به افزایش می‌گذارد که نشان دهنده عدم تعادل بین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و افزایش تولید MDA و خطرات ناشی از استرس اکسیداتیو است. از این رو نیاز به افزودن آنتی‌اکسیدان‌های مکمل به جیره غذایی مولدین و جیره آغازین لارو پیشنهاد می‌شود. همچنین تراکم‌های اعمال شده در این تحقیق تأثیر معنی داری بر فعالیت آنزیم‌ها نشان ندادند.

تشکر و قدردانی

از دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر به جهت پشتیبانی مالی این پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

- Aceto, A., Amicarelli, F., Sacchetta, P., Dragan, B., Bucciarelli, T., Masciocco, L., Miranda, M., Dillio, C. (1994) Developmental aspects of detoxifying enzymes in fish (*Salmo iridaeus*). Free Radic Res.

نتیجه‌ای مشابه در ماهی سیم دریایی (*Sparus aurata*) باس دریایی (*Stizostedion lucio-perca*) و ماهی سوف (*labrax Dicentrarchus*) گزارش کردند. علت افزایش در فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و GPX طی روزهای بعدی را می‌توان القای فعالیت آنها جهت مقابله با رادیکال‌های آزاد تولید شده دانست (۲۲). Rudneva-Titova در سال ۱۹۹۶ با بررسی تکامل جنینی و لاروی ماهیان دریایی سیاه افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD و CAT را مشاهده کردند. در سی باس آسیایی (*Lates calcarifer*) نیز فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در طی روند تکامل جنین روند افزایشی نشان داد، در حالی که آنتی‌اکسیدان‌هایی با وزن مولکولی پایین مانند ویتامین C و GSH کاهش یافتند (۱۰). Sanz و همکاران در سال ۲۰۱۰ افزایش فعالیت آنزیم SOD در طول دوره جنینی *Acipenser naccarii* و *Aceto* و همکاران در سال ۱۹۹۴ افزایش تدریجی فعالیت SOD و CAT را در قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Salmo iridaeus*) در مراحل اولیه جنینی نشان دادند که مشابه نتایج مطالعه حاضر است. در میگوچی آب شیرین نیز Subramanian و Arun در سال ۱۹۹۸ با بررسی روند تکامل جنینی *Macrobrachium malcolmsonii* نتایج مشابهی به دست آوردند که با یافته‌های این مطالعه هم‌خوانی دارد. پس از افزایش در فعالیت آنزیم‌های SOD، GPX و CAT، کاهش معنی داری نیز در فعالیت این آنزیم‌ها تا شروع تغذیه فعال مشاهده گردید. در مطالعه انجام شده توسط Moyano و همکاران در سال ۱۹۹۶ علت روند کاهش آنزیم‌های SOD، CAT و GPX در لاروهای تخم‌گشایی شده ناشی از کاهش سطوح پروتئین در طول تکامل رشد و نمو بیان شده است. میزان پروتئین در مرحله لاروی کمتر از تخم است که این ناشی از کاهش مقدار کوریون و مایع پری ویتلین در مرحله لاروی گزارش شده است (۱۵). Peters و Livingstone در سال ۱۹۹۶ کاهش فعالیت SOD را در سفره ماهی (*Scophthalmus maximus*) در طول تکامل جنین از ۱۱ روز پس از تخم‌گشایی و Dandapat و همکاران در سال ۲۰۰۳ کاهش فعالیت SOD را در اواسط تکامل لاروی *rosenbergii* *Macrobrachium* ثبت کردند. کاهش فعالیت آنزیم‌های SOD، GOX و CAT در مرحله لاروی باس دریایی (*Lates calcarifer*) (۱۰) و کاهش فعالیت آنزیم CAT و GPX در مرحله لاروی *Dentex dentex* (۱۵) نیز گزارش شده است. کاهش فعالیت SOD در مرحله لاروی احتمالاً می‌تواند ناشی از کاهش تولید و قابلیت دسترسی به O-2 در این مرحله باشد. زیرا GSH نیز می‌تواند O-2 سیستم سلولی را حذف و کاهش فعالیت SOD را جبران کند (۸، ۳۰).

فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و GPX و غلظت MDA در روزهای مختلف دوره نمونه برداری بین سه تراکم متداول، پایین و بالا، اختلاف معنی داری نشان ندادند ($p > 0.05$). تراکم ذخیره سازی به عنوان یک فاکتور استرس بیولوژیکی در آبرزی پروری شناخته شده است. شرایط محیطی مانند تراکم ذخیره سازی می‌تواند ترکیبات ژنتیکی، بعضی



- 21: 285-294.
2. Aksakal, E., Ekinci, D., Erdogan, O., Beydemir, S., Alim, Z., Ceyhun, S.B. (2011) Increasing stocking density causes inhibition of metabolic-antioxidant enzymes and elevates mRNA levels of heat shock protein 70 in rainbow trout. *Livest Sci.* 141: 69-75.
 3. Dandapat, J., Chainy, G.B.N., Rao, K.J. (2003) Lipid peroxidation and antioxidant defence status during larval development and metamorphosis of giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp Biochem Physiol.* 135C: 221-233.
 4. Di Giulio, R.T., Hinton, D.E. (2008) *The Toxicology of Fishes.* (1st ed.) CRC Press, Taylor and Francis Group. Boca, Raton, USA.
 5. Fontagné, S., Lataillade, E., Brèque, J., Kaushik, S. (2008) Lipid peroxidative stress and antioxidant defence status during ontogeny of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br J Nutr.* 100: 102-11.
 6. Goth, L. (1991) A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta.* 196: 143-152.
 7. Guerriero, G., Ferro, R., Russo, G.L., Ciarcia, G. (2004) Vitamin E in early stages of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) development. *Comp Biochem Physiol.* 138: 435-439.
 8. Hussain, S., Slikker, J.r.W., Ali, S.F. (1996) Role of metallo-thionein and other antioxidants in scavenging superoxid radicals and their possible role in neuroprotection. *Neurochem Int.* 29: 145-152.
 9. Iwama, G., Nakanishi, T. (1996) *Innate Immunity In Fish.* (1st ed.) Academic Press. London, UK.
 10. Kalaimani, N., Chakravarthy, N., Shanmugham, R., Thirunavukkarasu, A.R., Alavandi, S.V., Santiago, T.C. (2008) Anti-oxidant status in embryonic, post-hatch and larval stages of Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Fish Physiol Biochem.* 34: 151-158.
 11. Kennish, J.M., Russell, M.L., Netzel, S.J. (1989) The role of iron chelates in the NADPH-dependent oxidation of 2- keto-4- thiomethylbutyric acid (KMBA) by rainbow trout and Pacific salmon microsomal fractions. *Mar Environ Res.* 28: 87-91.
 12. Li, Y., Li, J., Wang, Q. (2006) The effects of dissolved oxygen concentration and stocking density on growth and non-specific immunity factors in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Aquaculture.* 256: 608-616.
 13. Maklund, S. (1974) Involvement of superoxide anion radical in autoxidation of pyrogallol and a convenient assay of superoxide dismutase. *Eur J Biochem.* 46: 469-474.
 14. Mani-Ponset, E., Guyot, J.P., Connes, D.R. (1996) Utilization of yolk reserves during post-embryonic development in three teleost species: the sea bream *Sparus aurata*, the sea bass *Dicentrarchus labrax* and the pike-perch *Stizostedion lucioperca*. *Mar Biol.* 126: 539-547.
 15. Mourente, G., Tocher, D.R., Di'az, E., Grau, A., Pastor, E. (1999) Relationships between antioxidants, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation products during early development in *Dentex dentex* eggs and larvae. *Aquaculture.* 179: 309- 324.
 16. Moyano, F.J., Díaz, M., Alarcón, F.J., Sarasquete, M.C. (1996) Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead sea-bream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol Biochem.* 15: 121-130.
 17. Nafisi behabadi, M. (2009) *An Applied Guide for Cultivation of rainbow Trout.* Hormozgan University Press. Hormozgan, Iran.
 18. Nimmo, I.A. (1987) The glutathione S-transferases of fish. *Fish Physiol Biochem.* 3: 163-172.
 19. Paglia, D.E., Valentine, W.N. (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 70: 158-169.
 20. Rudneva, I.I. (1999) Antioxidant system of Black Sea animals in early development. *Comp Biochem Physiol.* 122C: 265- 271.
 21. Rudneva-Titova, I.I. (1996) Blood antioxidant system of elasmobranchii and some teleost species of Black Sea fish (in Russian). *J Evol Biochem Physiol.* 32: 197-203.
 22. Sanz, A., Díaz, M.E., Furné, M., Trenzado, C.E., García-Gallego, M., Domezain, A. (2010) Anti-



- oxidant defences in the first life phases of the sturgeon. *Aquaculture*. 307: 123-129.
- Subramanian, P., Arun, S. (1998) Antioxidant enzymes in fresh water prawn *Macrobrachium malcolmsonii* during embryonic and larval development. *Comp Biochem Physiol*. 121B: 273-277.
24. Trenzado, C.E., Morales, A.E., de la Higuera, M. (2006) Physiological effects of crowding in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, selected for low and high stress responsiveness. *Aquaculture*. 258: 583-593.
25. Trenzado, C.E., Morales, A.E., Palma, J.M., Higuera, M. (2009) Blood antioxidant defenses and hematological adjustments in crowded/uncrowded rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed on diets with different levels of antioxidant vitamins and HUFA. *Comp Biochem Physiol*. 149: 440-447.
26. Van der Boon, J., van den Thillart, G.E.E.J.M., Addink, A.D.F. (1991) The effects of cortisol on intermediary metabolism in teleost fish. *Comp Biochem Physiol*. 100: 47-53.
27. Velisek, J., Svobodova, Z., Piaakova, V. (2005) Effects of clove oil anesthesia on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Acta Vet Brno*. 74: 139-146.
28. Vijayan, M.M., Ballantine, J.S., Leatherland, J.F. (1990) High stocking density alters the energy metabolism of brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *Aquaculture*. 88: 371-381.
29. Winterbourn, C.C., Metodiewa, D. (1999) Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med*. 27: 322-328.



Alterations to antioxidative enzymes in early life stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared in different densities

Sharifi, S.¹, Salati, A.P.^{1*}, Asadian, P.², Gorjipor, E.³, Moradian, H.³

¹Department of Fisheries, Faculty of Marine Natural Resources, Khoramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr-Iran

²Department of Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Lorestan, Khorramabad-Iran

³Iranian Fisheries Research Organization, Yasouj-Iran

(Received 16 July 2013 , Accepted 2 October 2013)

Abstract:

BACKGROUND: Stocking density induced stress that affects energy intake, growth rate, enzymatic activity and oxygen consumption in fish. **OBJECTIVES:** In this study the development of antioxidant enzyme Glutathione peroxidase (GPX), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) in egg and larvae of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) that kept in different stocking density was investigated. **METHODS:** Four groups of eggs, cultured in pans (size 16×9.5×10 cm, volume 10 L) with density of 400egg/l (group1 as routine density), 200egg/l (group2 as low density) and 600egg/l (group3 as high density) in triplicate. Eggs were held in tanks supplied with flow-through freshwater at 10.8°C. samples were taken at day1 (fertilization), 3 (Cleavage), 8(organogenesis), 16 (eyed egg), 31 (hatch) and 48 (active feeding). **RESULTS:** A significant increase in GPX and SOD activity was seen from fertilization till eggs were eyed. ($p<0.001$). The activity of these enzymes decreased to active feeding ($p<0.001$), meanwhile this activity was higher than the fertilization starts. Similar changes were seen in SOD and GPX activities in higher and lower densities (Group 2, 3). CAT activity increased from fertilization to organogenesis and then toward active feeding significantly decreased in compare to fertilization ($p<0.001$). Pattern of changes of catalase activity in high density group was similar to routine density but in low density group it was higher until eggs were eyed. GPX, SOD and CAT activities did not show significant difference in similar days among different groups ($p<0.05$). **CONCLUSIONS:** Our results showed that rearing densities used in this study could not affect antioxidant defense development in early life stages of *O. mykiss*.

Key words: antioxidant enzymes, crowding, larvae, lipid peroxidation, *Oncorhynchus mykiss*

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. Activity of SOD (units/mg protein) in different sampling days (fertilization, Cleavage, organogenesis, eyed egg, hatch and active feeding) in 200 egg/l, 400 egg/l and 600 egg/l densities.

Figure 2. Activity of CAT (units/mg protein) in different sampling days (fertilization, Cleavage, organogenesis, eyed egg, hatch and active feeding) in in 200 egg/l, 400 egg/l and 600 egg/l densities.

Figure 3. Activity of GPX (units/mg protein) in different sampling days (fertilization, Cleavage, organogenesis, eyed egg, hatch and active feeding) in 200 egg/l, 400 egg/l and 600 egg/l densities.



*Corresponding author's email: salatia@gmail.com, Tel: 0632-4234725, Fax: 0632-4234725

J. Vet. Res. 68, 4:389-395, 2013