



بررسی تأثیر سینامالدهید روی عوارض ناشی از اکسیدروی (ZnO) در آبشش ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

فرزاد حیدردخت^۱، سید محمد حسینی^{۲*}، شیلا امیدظهير

۱. دانش‌آموخته دکتری دامپزشکی، دانشگاه آزاد واحد بابل، بابل، ایران

۲. استادیار گروه پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد واحد بابل، بابل، ایران

۳. استادیار گروه زیست دریا، دانشکده علوم دریایی و محیطی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۱/۱۶

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۰۹

چکیده

امروزه استفاده از گیاهان به‌عنوان یکی از راه‌های درمانی آلودگی با فلزات سنگین بسیار مورد توجه قرار گرفته است. دارچین از جمله گیاهانی است که دارای خواص درمانی بسیاری است که این خواص به علت مواد مؤثر موجود در آن است. یکی از مهمترین مواد مؤثر دارچین سینامالدهید است. در مطالعه حاضر اثر درمانی سینامالدهید بر ضایعات ناشی از اکسیدروی (ZnO) در آبشش ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) مورد بررسی قرار گرفت. ماهی‌های کپور معمولی در ۵ گروه با سه تکرار تقسیم شدند. گروه ۱ به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد، گروه ۲ در معرض ۳ میلی‌گرم در لیتر اکسیدروی قرار گرفت و گروه‌های ۳، ۴ و ۵ علاوه بر دریافت اکسیدروی به ترتیب غلظت‌های ۳/۶، ۷/۲ و ۱۰/۸ میلی‌گرم سینامالدهید را در ۱۰۰ گرم غذا به صورت خوراکی به مدت ۴۵ روز دریافت کردند. سپس از هر گروه ۶ ماهی به‌طور تصادفی جدا و از آبشش ماهی‌ها نمونه‌برداری شد. در این مطالعه بیشترین میزان غلظت روی، کمترین مقدار فعالیت کل آنتی‌اکسیدانی و بیشترین مقدار شاخص پراکسیداسیون لیپید در گروه ۲ مشاهده شد. همچنین شدیدترین آسیب در گروه ۲ به‌صورت هیپرپلازی سلول‌های بافت پوششی، اتصال، آتروفی و تخریب تیغه‌های آبششی ثانویه، پرخونی، تلنژکتازی و نفوذ سلول‌های آماسی مشاهده گردید. در گروه‌های درمانی با افزایش میزان دریافت سینامالدهید غلظت روی، علائم آسیب‌شناسی بافت و مقدار شاخص پراکسیداسیون لیپید کاهش و مقدار فعالیت کل آنتی‌اکسیدانی افزایش پیدا کردند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد سینامالدهید در مقابل عوارض ناشی از اکسیدروی تأثیر حفاظتی و درمانی دارد. بیشترین اثر حفاظتی در گروه ۵ به‌صورت کاهش تجمع زیستی روی، بهبود علائم آسیب‌شناسی بافتی ناشی از روی، کاهش مقدار شاخص پراکسیداسیون لیپید و افزایش مقدار فعالیت کل آنتی‌اکسیدانی مشاهده گردید.

واژگان کلیدی: ماهی کپور معمولی، دارچین، فلزات سنگین، تجمع زیستی، آنتی‌اکسیدان



The effect of cinnamaldehyde on the lesions caused by zinc oxide (ZnO) in the gills of common carp (*Cyprinus carpio*)

Farzad Heidardokht¹, Seyed Mohammad Hosseini^{2*}, Shila Omidzahir³

1. Graduated student, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Babol branch, Babol, Iran

2. Assistant Professor, Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Babol branch, Babol, Iran

3. Assistant Professor, Department of Marine Biology, Faculty of Marine and environmental Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

Received: 30-Dec-2022

Accepted: 5-Apr-2023

Abstract

Nowadays, the use of plants as one of the treatment methods of heavy metal pollution is considered. Cinnamon is one of the plants that has many therapeutic properties due to its effective ingredients. One of the most important effective ingredients of cinnamon is cinnamaldehyde. In the current study, the therapeutic effect of cinnamaldehyde on the lesions caused by zinc oxide (ZnO) in the gills of common carp (*Cyprinus carpio*) was investigated. In this study, common carp were divided into 5 groups in triplicates. Group 1 was considered as a control, group 2 was exposed to 3mg/L of zinc oxide, and groups 3, 4, and 5, in addition to receiving zinc oxide received concentrations of 3.6, 7.2, and 10.8mg of cinnamaldehyde in 100g diet, respectively for a period of 45 days. Then, 6 fishes were randomly selected from each group and their gills were sampled. The highest amount of zinc concentration, the lowest amount of total antioxidant activity and the highest amount of lipid peroxidation index were observed in group 2. Also, the most severe damage was observed in group 2 including epithelial cells hyperplasia, adhesion, atrophy and destruction of secondary lamellae, hyperemia, telangiectasia and infiltration of inflammatory cells. In the treatment groups with increase of cinnamaldehyde in the diets, zinc concentration, histopathology symptoms and lipid peroxidation index decreased, while the amount of total antioxidant activity increased. The results of this study showed that cinnamaldehyde has a protective and therapeutic effect against the damage caused by zinc oxide. The most protective effect was observed in group 5 including decrease of Zn bioaccumulation, improving histopathology symptoms, reducing the value of lipid peroxidation index and increasing the value of total antioxidant activity.

Keywords: *Cyprinus carpio*, Cinnamon, Heavy metals, Bioaccumulation and Antioxidant

۱. مقدمه

توسعه صنعتی و رعایت نکردن الزامات زیست‌محیطی سبب شده است که مقادیر زیادی از آلاینده‌ها وارد محیط زیست شوند. فلزات سنگین از دسته آلاینده‌های پایدار هستند که در موجودات آبی انباشته می‌شوند و پس از آلوده کردن موجودات آبی، ممکن است به ترکیبات سمی‌تر تبدیل شده و موجب به خطر انداختن سلامت موجودات بالاتر در زنجیره غذایی از جمله انسان‌ها شوند (Vutukuru, 2005; Jiang et al., 2012). تجمع فلزات سنگین در بافت‌ها موجب افزایش قابل توجه پراکسیداسیون لیپیدها در اندام‌ها و واکنش‌های استرس اکسیداتیو و در پی آن تخریب اسیدهای نوکلئوتیک، پروتئین‌ها و لیپیدها می‌شود (Farombi et al., 2007).

فلز روی (Zn) از جمله عناصر ضروری است که به مقدار کم برای تمام موجودات مورد نیاز است (Hilmy et al., 1987). افزایش بیش از حد فلز روی می‌تواند موجب ناهنجاری‌های پاتولوژیکی، ریختی، جلوگیری از رشد، تغییر شکل ساختاری در آبشش‌ها و مرگ و میر در ماهی‌ها شود (Skidmore, 1964; Hoseinifard et al., 2018). یکی از روش‌ها برای درمان آلودگی با فلزات سنگین استفاده از موادی است که به‌عنوان شلاتور یا آنتی‌اکسیدان عمل کرده و مانع از جذب و یا تأثیر فلزات سنگین در بافت‌های جانوران مختلف از جمله ماهی می‌گردد. امروزه استفاده از گیاهان در تحقیقات علمی به‌عنوان آنتی‌اکسیدان یا شلاتور مورد توجه ویژه قرار گرفته است. استفاده از گیاهان خام، عصاره گیاهان و ترکیبات تصفیه‌شده پایه‌گذار بسیاری از داروهای امروزی، عوامل شیمی درمانی و محصولات بهداشتی درمانی هستند (Mathew and Abraham, 2006).

دارچین که از پوست درختانی از تیره برگ بو و از جنس سیناموموم (Cinnamomum) به‌دست می‌آید، از جمله گیاهانی است که در غذاها و داروهای گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Chao et al., 2005). اثرات دارویی این گیاه به‌واسطه ترکیبات موجود در عصاره دارچین

می‌باشد. این گیاه دارای سینامالدهید، اوژنول، کادینن، کومارین آمیدون، موسیلاژ، تانن، مانیت، سینامومین، اسانس و رزین است. عصاره برگ دارچین دارای خواص ضدالتهابی است و عصاره پوسته آن خواص احیاکنندگی، شلاته‌کنندگی فلزات و بی‌اثرکنندگی رادیکال‌های آزاد و آنتی‌اکسیدانی دارد (Chang et al., 2001; Mathew and Abraham, 2006).

سینامالدهید (cinnamaldehyde) ترکیب پلی‌فنولی و اصلی‌ترین ماده تشکیل‌دهنده دارچین است که خاصیت ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی دارد. سینامالدهید یکی از ترکیبات اصلی دارچین است که بیش از ۷۵ درصد اسانس دارچین را تشکیل می‌دهد و به‌عنوان آنتی‌باکتریال و آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند (Ataie et al., 2019; Hosin et al., 2017).

Sharma و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند سینامالدهید از پراکسیداسیون لیپیدی در بافت کلیه و مغز موش جلوگیری می‌کند. Fe^{3+} مسئول تولید رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل و بسیار واکنش‌پذیر است. این رادیکال‌ها باعث پراکسیداسیون لیپیدی می‌شوند که با آسیب، التهاب و تخریب اکسیداتیو غشاهای سلولی همراه است. سینامالدهید با شلاته کردن Fe^{3+} باعث کاهش تولید رادیکال آزاد هیدروکسیل و در نتیجه مهار پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود. در تحقیقات دیگر نیز قدرت شلاته‌کنندگی سینامالدهید گزارش شده است (Mathew and Abraham, 2006; Sharma et al., 2016). مطالعات محدودی در مورد تأثیر سینامالدهید در ماهی‌ها صورت گرفته است که می‌توان به پیشگیری از عفونت باکتریایی (Faikoh et al., 2014) و ارتقاء عملکرد رشد، ایمنی و وضعیت آنتی‌اکسیدانی در ماهی تیلاپیا نیل (*Oreochromis niloticus*) (Amer et al., 2018) اشاره کرد. همچنین در تحقیقات دیگر سینامالدهید سبب افزایش معنی‌دار عملکرد رشد و پاسخ ایمنی در ماهی کفشک زبان‌گاو (*Cynoglossus semilaevis*) گردید (Wang et al., 2021). Amer و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند سینامالدهید به صورت مکمل غذایی سبب افزایش

ماهی‌ها ۲ بار در روز به میزان ۲ در صد وزن بدن غذادهی شدند. روزانه میزان نصف آب آکواریوم‌ها تعویض و اکسیدرویی به آب اضافه شد. شاخص‌های فیزیکی و شیمیایی آب آکواریوم‌ها شامل دما، اکسیژن محلول و pH اندازه‌گیری و ثبت گردید. در پایان دوره آزمایش از هر گروه ۶ عدد ماهی به‌طور تصادفی انتخاب و جهت نمونه‌برداری با استفاده از عصاره گل میخک بیهوش شدند.

۲.۲. تجمع زیستی روی

به‌منظور تعیین میزان تجمع زیستی روی، نمونه‌های بافت‌های آبشش جداسازی شد و در آن به مدت ۹۶ ساعت و دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک و به‌صورت پودر درآمدند. برای هضم شیمیایی یک گرم نمونه بافتی در فالكون به محلول اسیدنیتریک و اسیدپرکلریک با نسبت ۱۰ به ۴ به اضافه شد و به‌مدت یک شب در دمای اتاق قرار گرفت. نمونه‌های هضم شده در حمام آب ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ ساعت قرار گرفتند و به‌صورت محلول کاملاً شفاف درآمدند. سپس محتویات هر فالكون با استفاده از کاغذ صافی واتمن صاف و با استفاده از اسیدنیتریک ۱ درصد به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسید (AI-Weher, 2008). در نهایت میزان غلظت روی در نمونه‌های آبشش با استفاده از دستگاه جذب اتمی شعله‌ای (Buck-210VGP, UK) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای محاسبه غلظت روی از فرمول زیر استفاده شد (AI-Weher, 2008).

= (میکروگرم بر گرم) غلظت روی

(میلی‌لیتر) حجم نهایی نمونه × (میکروگرم بر میلی‌لیتر) غلظت خوانده شده توسط دستگاه
(گرم) وزن خشک نمونه

۳.۲. بررسی آسیب‌شناسی بافت

نمونه‌های جداسازی شده بافت‌آبشش در ظروف نمونه‌برداری حاوی فرمالین بافر ۱۰ درصد قرار گرفتند، پس از ۲۴ ساعت فرمالین نمونه‌ها تعویض شد. سپس آماده‌سازی بافت‌ها در دستگاه پردازنده بافت (دید سبز،

وزن بدن و دریافت غذا، ارتقاء فعالیت آنتی‌اکسیدانی، افزایش فعالیت کاتالاز سرم و گلوکاتینون عضلات و کاهش سطح مالون دی‌آلدهید (MDA) در عضلات ماهی تیلاپپای نیل (*Oreochromis niloticus*) می‌گردد. همچنین در تحقیق Ouyang و همکاران (۲۰۲۱) سینامالدهید سبب کاهش قابلیت چسبندگی باکتری آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*) به آبشش و روده در گربه ماهی کانال (*Ictalurus punctatus*) گردید. بنابراین سینامالدهید می‌تواند به‌عنوان یک گزینه مناسب برای پیشگیری و کنترل عفونت آئروموناس هیدروفیلا در آبزیان مورد استفاده قرارگیرد (Ouyang et al., 2021).

با توجه به قابلیت‌های درمانی سینامالدهید، هدف از این مطالعه بررسی تأثیر حفاظتی سینامالدهید به‌عنوان مکمل غذایی در میزان تجمع زیستی روی، استرس اکسیداتیو و همچنین آسیب‌های بافتی ناشی از فلز روی در بافت آبشش ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) می‌باشد.

۲. مواد و روش

۱.۲. تهیه و تیمار بندی ماهی‌ها

در این پژوهش بچه ماهیان کپور معمولی با میانگین وزنی $80 \pm 3/5$ گرم از یک مزرعه پرورش ماهیان گرمابی خریداری شدند. پس از گذشت ۲ هفته دوره سازگاری، ۱۲۰ قطعه ماهی به‌طور تصادفی به ۵ گروه ۸ تایی با ۳ تکرار تقسیم شدند. گروه ۱ به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد، گروه ۲ در معرض ۳ میلی‌گرم در لیتر اکسیدروی (ZnO) به‌صورت محلول در آب قرار گرفت و گروه‌های ۳، ۴ و ۵ علاوه بر دریافت میزان ۳ میلی‌گرم در لیتر اکسیدروی به‌ترتیب غلظت‌های ۳/۶، ۷/۲ و ۱۰/۸ میلی‌گرم سینامالدهید (Sigma-Aldrich) در ۱۰۰ گرم غذا به‌صورت خوراکی به مدت ۴۵ روز دریافت کردند. غلظت مورد استفاده سینامالدهید در این مطالعه براساس تحقیق Zhou و همکاران (۲۰۲۰) در نظر گرفته شد. در مدت آزمایش

لیپیدها، بر مبنای واکنش با تیوباربیتوریک اسید (TBA) انجام شد. بدین منظور ۲۰۰ میکرولیتر از محلول هموژنیزه شده با ۱۸۰۰ میکرولیتر TBA رقیق شد. محلول در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد، در حمام آب گرم به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد و بعد از سرد شدن در دمای اتاق، با دور ۲۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد تا رسوبات جدا شوند. جذب نوری مایع رویی در طول موج ۵۳۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Biotek Epoch) تعیین شد (Buege and Aust., 1978).

۵.۲. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 22 انجام شد. برای بررسی تغییرات داده‌ها در گروه‌های مختلف، ابتدا نرمال بودن هر مجموعه از داده‌ها به‌طور جداگانه با استفاده از آزمون کلموگروف-اسمیرنوف ارزیابی شد. سپس برای بررسی رابطه معنی‌داری از آزمون تجزیه و تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و آزمون تعقیبی دانکن استفاده شد.

۳. نتایج

۱.۳. میزان تجمع زیستی روی

در پژوهش حاضر بیشترین میزان غلظت روی در گروه ۲ که در معرض ۳ میلی‌گرم در لیتر اکسید روی قرار گرفت، مشاهده شد. همان‌طور که نمودار شکل ۱ نشان می‌دهد در گروه‌های درمانی با افزایش غلظت سینامالدهید میزان غلظت روی به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد، به‌طوری‌که کمترین میزان غلظت روی در بین گروه‌های درمانی در گروه ۵ که ۱۰/۸ میلی‌گرم سینامالدهید در ۱۰۰ گرم غذا دریافت کردند، مشاهده گردید.

۲.۳. میزان فعالیت کل آنتی‌اکسیدانی

نتایج حاصل از این بررسی نشان داد بیشترین مقدار فعالیت کل آنتی‌اکسیدانی مربوط به گروه شاهد و کمترین مقدار آن مربوط به گروه ۲ بود. در گروه‌هایی که

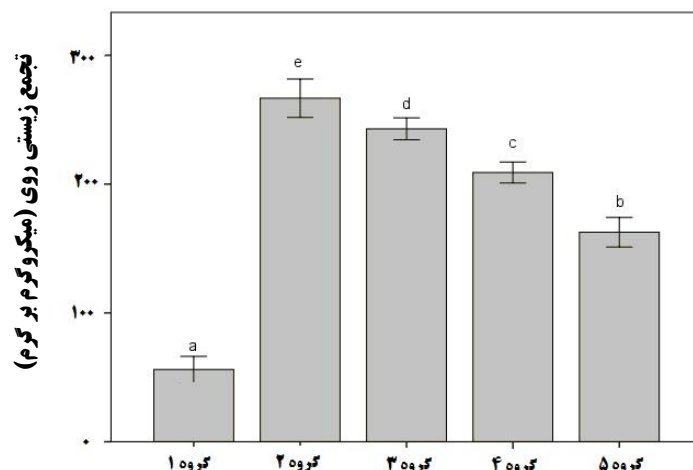
ایران) صورت گرفت و با استفاده از دستگاه میکروتوم (لایتر ۱۵۱۲، آلمان) برش‌هایی با اندازه ۵ میکرومتر از آن‌ها تهیه شد. نمونه‌های بافتی روی لام قرار گرفتند و به روش هماتوکسیلین ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شدند (Bancroft and Gamble, 2008). سپس لام‌های تهیه شده توسط میکروسکوپ نوری (الیمپوس CX21، ژاپن) مورد بررسی آسیب‌شناسی قرار گرفتند و تصاویر بافتی با استفاده از سیستم عکسبرداری متصل به میکروسکوپ تهیه شد. شدت آسیب بافتی براساس عدم وجود، خفیف، متوسط و شدید با درجات -، +، ++ و +++ ثبت شدند (Thophon et al., 2003).

۴.۲. آزمایش استرس اکسیداتیو

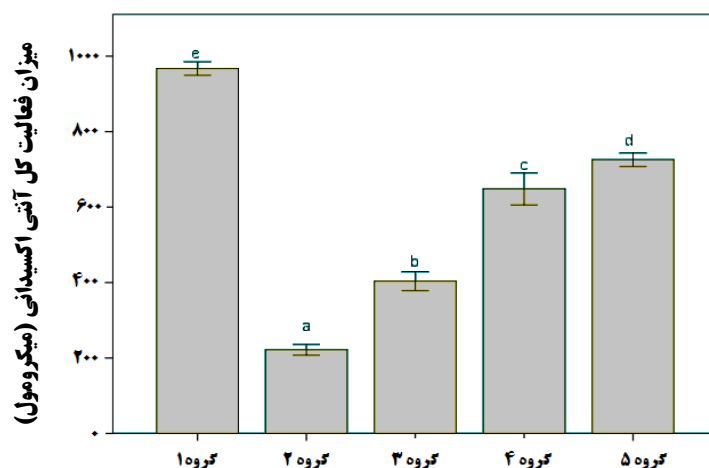
برای آماده‌سازی بافت جهت انجام آزمایش استرس اکسیداتیو، به هر یک گرم از بافت آبشش، ۱۰ میلی‌لیتر نمک بافر فسفات (PBS) اضافه گردید. سپس نمونه‌های بافتی به کمک دستگاه هموژنایزر (IKAT-18 Ultra Turrax, Cole-parmer, USA) هموژن شدند. نمونه‌های بافتی هموژن شده به کمک سانتریفیوژ یخچال‌دار در دور ۴۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. بعد از پایان سانتریفیوژ مایع رویی نمونه‌ها به میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل و برای انجام بررسی‌های استرس اکسیداتیو فریز شدند. اندازه‌گیری فعالیت کل آنتی‌اکسیدانی (TAC) با استفاده از آزمایش توان آنتی‌اکسیدانی احیاء فریک Fe^{3+} (FRAP) سنجیده شد. برای تهیه محلول معرف FRAP، ۳۰۰ میلی‌مول در لیتر استات بافر، ۱۰ میلی‌مول (tripirydyl-s-triazine 2,4,6- TPTZ) حل شده در ۴۰ میلی‌مول در لیتر اسید هیدروکلریک و ۲۰ میلی‌مول در لیتر کلرید فریک به نسبت ۱:۱:۱۰ مخلوط گردید. سپس ۵۰ میکرولیتر از مایع رویی نمونه بافتی به آن اضافه شد و پس از ۴ دقیقه انکوبه سیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، جذب نوری نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (Biotek Epoch) در طول موج ۵۹۳ نانومتر خوانده شد (Benzie and Strain, 1996). تعیین سطح مالون دی‌آلدئید (MDA) به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون

فعالیت کل آنتی‌اکسیدانی در همه گروه‌ها با یکدیگر تفاوت معنی‌دار داشت ($P < 0.05$ ، نمودار شکل ۲).

سینامالدهید را به‌عنوان مکمل غذایی دریافت کردند، با افزایش غلظت سینامالدهید مقدار فعالیت کل آنتی‌اکسیدانی افزایش یافت. نتایج نشان می‌دهد مقدار



شکل ۱- نمودار میزان تجمع زیستی روی (میانگین \pm انحراف معیار) در بافت آبشش ماهی کپور معمولی در گروه‌های مختلف مورد مطالعه (گروه ۱ شاهد، گروه ۲ در معرض ۳ میلی‌گرم در لیتر اکسید روی، گروه ۳ در معرض ۳ میلی‌گرم در لیتر اکسید روی + ۳/۶ میلی‌گرم سینامالدهید در ۱۰۰ گرم غذا، گروه ۴ در معرض ۳ میلی‌گرم در لیتر اکسید روی + ۷/۲ میلی‌گرم سینامالدهید در ۱۰۰ گرم غذا، گروه ۵ در معرض ۳ میلی‌گرم در لیتر اکسید روی + ۱۰/۸ میلی‌گرم سینامالدهید در ۱۰۰ گرم غذا (حروف متفاوت تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها را نشان می‌دهد))



شکل ۲- نمودار میزان فعالیت کل آنتی‌اکسیدانی (FRAP) (میانگین \pm انحراف معیار) در بافت آبشش ماهی کپور معمولی در گروه‌های مختلف مورد مطالعه (گروه ۱ شاهد، گروه ۲ در معرض ۳ میلی‌گرم در لیتر اکسید روی، گروه ۳ در معرض ۳ میلی‌گرم در لیتر اکسید روی + ۳/۶ میلی‌گرم سینامالدهید در ۱۰۰ گرم غذا، گروه ۴ در معرض ۳ میلی‌گرم در لیتر اکسید روی + ۷/۲ میلی‌گرم سینامالدهید در ۱۰۰ گرم غذا، گروه ۵ در معرض ۳ میلی‌گرم در لیتر اکسید روی + ۱۰/۸ میلی‌گرم سینامالدهید در ۱۰۰ گرم غذا (حروف متفاوت تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها را نشان می‌دهد))

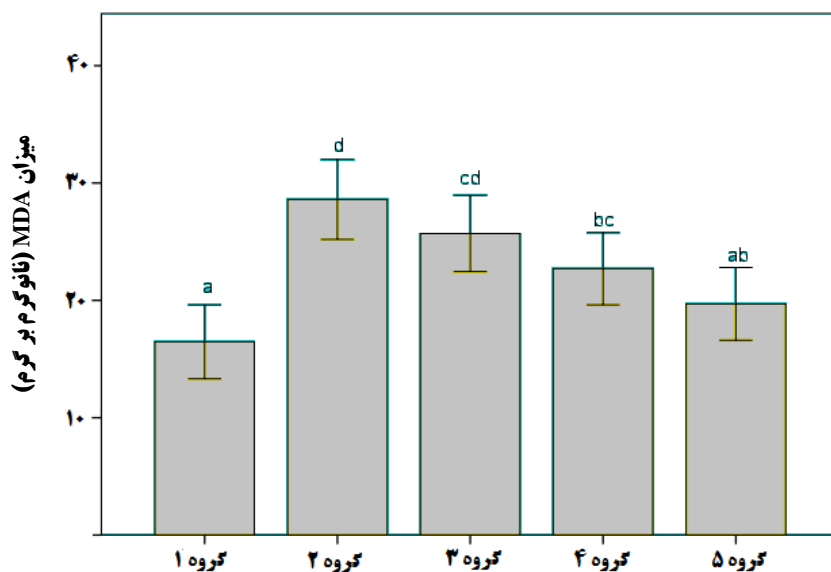
که تنها در معرض اکسید روی قرار داشت، نشان داد. در گروه‌هایی که سینامالدهید دریافت کردند، با افزایش غلظت دریافتی سینامالدهید، مقدار MDA کاهش یافت. به‌طوری

۳.۳. میزان پراکسیداسیون لیپید

نتایج حاصل از اندازه‌گیری MDA به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید، بیشترین مقدار MDA را در گروه ۲

نداشت ($P > 0.05$)، نمودار شکل ۳).

که کمترین مقدار بین گروه‌های درمانی در گروه ۵ مشاهده گردید، اگر چه با گروه ۴ از نظر آماری تفاوت معنی‌داری



شکل ۳- نمودار میزان پراکسیداسیون لیپید (MDA) (میانگین ± انحراف معیار) در بافت آبشش ماهی کپور معمولی در گروه‌های مختلف مورد مطالعه (گروه ۱ شاهد، گروه ۲ در معرض ۲ میلی‌گرم در لیتر اکسید روی، گروه ۳ در معرض ۳ میلی‌گرم در لیتر اکسید روی + ۲/۶ میلی‌گرم سینامالدهید در ۱۰۰ گرم غذا، گروه ۴ در معرض ۳ میلی‌گرم در لیتر اکسید روی + ۷/۲ میلی‌گرم سینامالدهید در ۱۰۰ گرم غذا، گروه ۵ در معرض ۳ میلی‌گرم در لیتر اکسید روی + ۱۰/۸ میلی‌گرم سینامالدهید در ۱۰۰ گرم غذا (حروف متفاوت تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها را نشان می‌دهد))

ثانویه، پرخونی، تلنژکتازی و نفوذ سلول‌های آماسی مشاهده شد. با دریافت سینامالدهید میزان آسیب بافتی در گروه‌ها کاهش پیدا کرد، به طوری که کمترین ضایعات در گروه ۵ مشاهده شد (تصاویر شکل ۴). نوع و شدت آسیب بافت در جدول ۱ ارائه شده است.

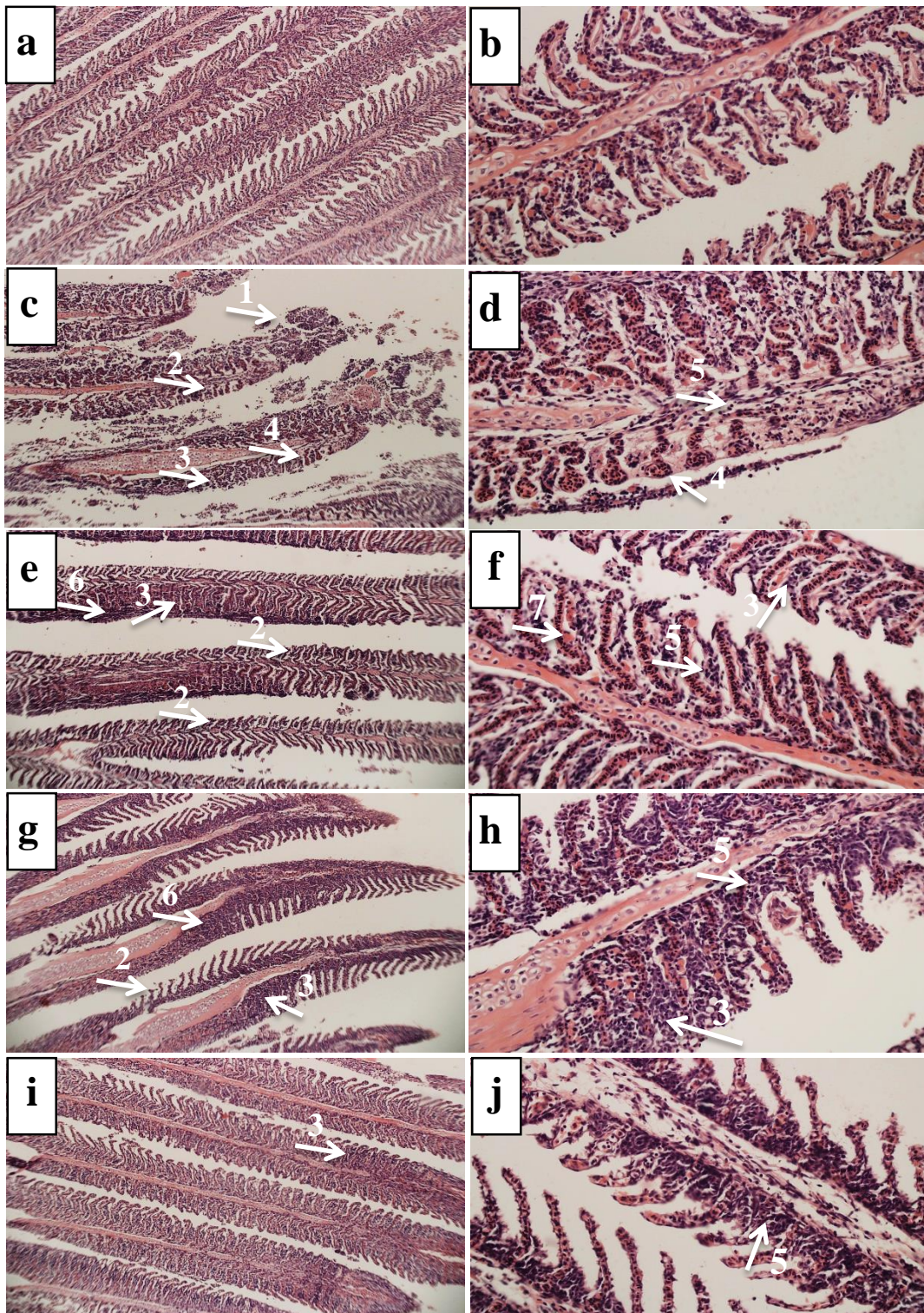
۴.۳. بررسی آسیب‌شناسی بافت آبشش

در بافت آبشش در گروه شاهد شرایط طبیعی بافتی مشاهده شد. بیشترین ضایعات در گروه ۲ که تنها در معرض اکسید روی بودند، به صورت هیپرپلازی سلول‌های بافت پوششی، اتصال، آتروفی و تخریب تیغه‌های آبششی

جدول ۱- نوع و شدت آسیب‌های مشاهده شده در بافت آبشش در گروه‌های مختلف مورد مطالعه (گروه ۱ شاهد، گروه ۲ در معرض ۳ میلی‌گرم در لیتر اکسید روی، گروه ۳ در معرض ۳ میلی‌گرم در لیتر اکسید روی + ۲/۶ میلی‌گرم سینامالدهید در ۱۰۰ گرم غذا، گروه ۴ در معرض ۳ میلی‌گرم در لیتر اکسید روی + ۷/۲ میلی‌گرم سینامالدهید در ۱۰۰ گرم غذا، گروه ۵ در معرض ۳ میلی‌گرم در لیتر اکسید روی + ۱۰/۸ میلی‌گرم سینامالدهید در ۱۰۰ گرم غذا)

گروه ۵	گروه ۴	گروه ۳	گروه ۲	گروه ۱	علائم آسیب‌شناسی بافت
-	-	+	++	-	پرخونی
-	+	+	+	-	هیپرپلازی سلول‌های بافت پوششی
-	-	+	++	-	تخریب تیغه‌های آبششی ثانویه
+	++	++	+++	-	نفوذ سلول‌های آماسی
-	+	+	++	-	آتروفی تیغه‌های آبششی ثانویه
-	-	-	++	-	تلنژکتازی
+	++	++	++	-	اتصال تیغه‌های آبششی ثانویه

علائم -، +، ++ و +++ به ترتیب عدم وجود، خفیف، متوسط و شدید بودن ضایعه را نشان می‌دهد.



شکل ۴- تصاویر آسیب‌شناسی بافت آبخش در گروه‌های مختلف مورد مطالعه (a, b): گروه ۱ (شاهد) شرایط طبیعی بافتی را نشان می‌دهد. c, d: گروه ۲ در معرض ۳ میلی‌گرم در لیتر اکسید روی؛ e, f: گروه ۳ در معرض ۳ میلی‌گرم در لیتر اکسید روی + ۳/۶ میلی‌گرم سینامالدهید در ۱۰۰ گرم غذا؛ g, h: گروه ۴ در معرض ۳ میلی‌گرم در لیتر اکسید روی + ۷/۲ میلی‌گرم سینامالدهید در ۱۰۰ گرم غذا و z, i: گروه ۵ در معرض ۳ میلی‌گرم در لیتر اکسید روی + ۱۰/۸ میلی‌گرم سینامالدهید در ۱۰۰ گرم غذا (۱) پیکان‌های (۱) تخریب تیغه‌های آبخشی ثانویه (۲) آتروفی تیغه‌های آبخشی ثانویه (۳) اتصال و چسبندگی تیغه‌های آبخشی ثانویه (۴) تلنژکتازی (۵) نفوذ سلول‌های آماسی (۶) هیپرپلازی سلول‌های بافت پوششی و (۷) پرخونی را نشان می‌دهند. (رنگ آمیزی H&E، شکل‌های سمت راست بزرگنمایی X40 و شکل‌های سمت چپ بزرگنمایی X10 دارند)

۴. بحث و نتیجه گیری نهایی

آبشش‌ها به علت تماس دائم با محیط خارج در مقابل آلودگی‌های محیطی بسیار آسیب‌پذیر هستند. آبشش‌ها به‌عنوان بافتی که به‌طور مداوم با محیط خارجی در ارتباط هستند و در معرض عوامل پیرامونی قرار می‌گیرند، حائز اهمیت هستند، زیرا آسیب‌های وارده به آبشش می‌تواند منجر به تغییرات و اختلال در عملکرد آن و فرایندهای اساسی مانند تبادل گازهای تنفسی، تنظیم اسمزی و تعادل اسید و باز گردد. تخریب ساختار بافت آبشش می‌تواند به‌عنوان یک پاسخ عمومی به استرس ایجاد شده توسط سموم رخ دهد، بنابراین آبشش به‌عنوان نشانگر مناسب برای بیان کیفیت آب و شاخص مناسب در تحقیقاتی که در زمینه تأثیر گذاری محیط زیست بر ماهی‌ها صورت می‌گیرد، مورد مطالعه قرار می‌گیرد (Pandey *et al.*, 2008).

در مطالعه حاضر عوارض ناشی از مسمومیت با اکسیدروی در بافت آبشش ماهی کپور معمولی و همچنین اثر حفاظتی سینامالدهید مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی بیشترین آسیب وارد شده به بافت آبشش در گروهی که تنها اکسید روی را دریافت کردند به‌صورت هیپرپلازی سلول‌های بافت پوششی، اتصال، آتروفی و تخریب تیغه‌های آبششی ثانویه، پرخونی، تلنزکتازی (اتساع و گشادشدن عروق خونی) و نفوذ سلول‌های آماسی مشاهده شد. در تحقیقی دیگر بر روی تأثیر نانوذرات اکسیدروی بر بافت آبشش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان اصلی‌ترین عوارض به‌صورت هیپرپلازی و هیپرتروفی سلول‌های رأسی در تیغه‌های آبششی ثانویه، هیپرتروفی و هیپرپلازی سلول‌های موکوسی در رشته‌های آبششی، چماقی و کوتاه شدن تیغه‌های آبششی ثانویه، جداشدگی شدید بافت پوششی تیغه‌های آبششی ثانویه گزارش شد (Khodabakhshi *et al.*, 2017). همچنین اثر نانو ذرات اکسید روی بر بافت آبشش ماهی کپور معمولی به صورت هیپرتروفی و هیپرپلازی تیغه‌های آبششی (Subashkumar and Selvanayagam, 2014) و

هیپرتروفی سلول‌های پیلار و جدا شدگی بافت پوششی تیغه‌های آبششی ثانویه گزارش شده است (Al-Tae and AL-Hamdani, 2013). در مطالعه حاضر کمترین مقدار فعالیت کل آنتی‌اکسیدانی در گروه ۲ که تنها در معرض اکسید روی بودند مشاهده شد، در حالی که با افزایش غلظت سینامالدهید در گروه‌های درمانی با سینامالدهید میزان فعالیت کل آنتی‌اکسیدانی افزایش پیدا کرد. استرس اکسیداتیو یکی از شایع‌ترین آثار آلاینده‌ها در ماهی‌ها است (Talas *et al.*, 2008; Jia *et al.*, 2011). تحقیقات نشان داده‌اند تجمع فلزات سنگین در بافت‌های ماهی از جمله آبشش باعث تحریک استرس اکسیداتیو می‌شوند (Vinodhini and Narayanan, 2009). کاهش فعالیت کل آنتی‌اکسیدانی در ماهی‌ها تحت تأثیر شرایط استرس‌زا یک پاسخ معمولی باشد (Sevcikova *et al.*, 2016). TAC ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی و توانایی مقاومت در برابر اکسیدان‌ها را نشان می‌دهد. TAC از مولکول‌های زیستی در برابر اکسیداسیون محافظت می‌کند. آنتی‌اکسیدان‌ها واکنش‌های استرس اکسیداتیو را کاهش می‌دهند (Limón-Pacheco and Gonsebatt, 2009).

در مطالعه حاضر بیشترین مقدار MDA در گروه ۲ که تنها در معرض اکسید روی قرار داشتند و کمترین مقدار آن در گروه ۵ که بیشترین مقدار سینامالدهید را دریافت کردند، مشاهده شد. افزایش MDA موجب تخریب آنزیم‌های لیزوزیمی، تحریک نکروز سلولی و تخریب پارانشیم بافتی می‌شود (Vinodhini and Narayanan, 2009). در مطالعه‌ای افزایش تجمع نانوذرات اکسیدروی در بافت‌های کپور معمولی سبب افزایش میزان پراکسیداسیون چربی و استرس اکسیداتیو گردید (Hao and Chen., 2012). طبق یافته Hansen و همکاران (۲۰۰۷) با افزایش تجمع روی در بافت آبشش ماهی قزل‌آلای قهوه‌ای آنزیم‌های استرس اکسیداتیو در این بافت افزایش یافت. در پژوهشی دیگر در معرض قرار گرفتن ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در مقابل فلزات سنگین کروم، سرب و کادمیوم باعث افزایش پراکسیداسیون گردید که در بافت‌های

موش‌هایی که تحت شرایط استرس‌زا بودند، گردید. همچنین سینامالدهید موجب کاهش MDA و پراکسیداسیون چربی در بافت مغز موش‌هایی که تحت تأثیر رژیم غذایی با چربی بالا بودند، گردید (Ataie et al., 2019). مطالعات اندکی در مورد اثرات سینامالدهید در ماهی‌ها انجام شده است. از آن جمله می‌توان به مطالعه Puspitasari و همکاران (۲۰۱۸) اشاره کرد که بر روی تأثیر سینامالدهید بر میزان تفریح تخم ماهیان گورخری (*Danio rerio*) انجام شد و سینامالدهید به عنوان محافظ تخم ماهی زبرا در برابر عفونت استرپتوکوکوس آگالاکتیه عمل کرد. همچنین Zhou و همکاران (۲۰۲۰) بهبود رشد، افزایش جذب غذا به دلیل افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی روده و هپاتوپانکراس ماهی کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*) را به دنبال مصرف سینامالدهید در جیره غذایی گزارش کردند. نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد سینامالدهید به عنوان یکی از ترکیبات اصلی دارچین که بیش از ۷۵ درصد اسانس دارچین را تشکیل می‌دهد، در بهبود اثرات ناشی از اکسید روی در ماهی کپور معمولی مؤثر بوده است، به طوری که در این مطالعه گروهی که بیشترین غلظت سینامالدهید (۱۰/۸ میلی گرم سینامالدهید در ۱۰۰ گرم غذا) را دریافت کردند، بهترین اثرات درمانی در بافت آبشش به صورت کاهش تجمع زیستی روی، بهبود علایم آسیب‌شناسی بافتی ناشی از روی، کاهش مقدار شاخص پراکسیداسیون لیپید و افزایش مقدار فعالیت کل آنتی‌اکسیدانی مشاهده شد.

آبشش، عضله، کبد، کلیه و روده بیش از دو برابر ماهی‌های گروه شاهد بود. فلزات سنگین ساختار غشاء سلولی و فیزیولوژی طبیعی آن را با فعال‌سازی پراکسیداسیون لیپیدها تغییر می‌دهند (Rajeshkumar et al., 2017). در مطالعه حاضر در گروه‌های درمانی که غلظت‌های مختلفی از سینامالدهید را دریافت کردند، درجاتی از بهبودی اثرات ناشی از اکسیدروی مشاهده گردید، به طوری که بیشترین تأثیر درمانی سینامالدهید در گروه ۵ که غلظت ۱۰/۸ میلی گرم سینامالدهید در ۱۰۰ گرم غذا دریافت کردند، مشاهده شد.

گیاه دارچین دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است و سینامالدهید یکی از مهمترین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در گیاه دارچین است که از واکنش‌های اکسیداتیو جلوگیری می‌کند (Hosin et al., 2017). کاهش MDA در گروه‌های درمانی با سینامالدهید به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی این ماده است (Ataie et al., 2019). آنتی‌اکسیدان‌ها شلاتور فلزات می‌شوند و کاهش تجمع روی می‌تواند به دلیل خاصیت شلاته‌کنندگی سینامالدهید در برابر فلزات باشد (Mathew and Abraham, 2006). در مطالعه Fathizad و همکاران (۲۰۱۳) دارچین موجب افزایش چشمگیر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در موش گردید. در بررسی Iqbal و همکاران (۲۰۲۰)، عصاره دارچین موجب کاهش MDA در بافت‌های کبد و کلیه در مسمومیت ناشی از نانوذرات نیکل در رت گردید. براساس گزارش Hosni و همکاران (۲۰۱۷) سینامالدهید با بهبود وضعیت دفاعی سلولی، باعث کاهش MDA و استرس اکسیداتیو در

۵. منابع

References

- Al-taee, S., Al-hamedani, A., 2013. Pathological study of Lethal Concentration of N-ZnO in Common Carp *Cyprinus Carpio* L. *Basrah Journal of Veterinary Research* 12(1), 200-207.
- Al-Weher, SM., 2008. Levels of heavy metal Cd, Cu and Zn in three fish species collected from the Northern Jordan Valley, Jordan. *Jordan Journal of Biological Sciences* 1(1), 41-46.
- Amer, S.A., Metwally, A.E., Ahmed, S.A., 2018. The influence of dietary supplementation of cinnamaldehyde and thymol on the growth performance, immunity and antioxidant status of monosex Nile tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*). *The Egyptian Journal of Aquatic Research* 44(3), 251-256.

- Ataie, Z., Mehrani, H., Ghasemi, A., Farrokhfall, K., 2019. Cinnamaldehyde has beneficial effects against oxidative stress and nitric oxide metabolites in the brain of aged rats fed with long-term, high-fat diet. *Journal of Functional Foods* 52(1), 545-551.
- Bancroft, J.D., Gamble, M. eds., 2008. *Theory and practice of histological techniques*. Elsevier health sciences. pp: 126-127.
- Benzie, I.F., Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry* 239(1), 70-76.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. In *Methods in enzymology* 52, 302-310.
- Chang, S.T., Chen, P.F., Chang, S.C., 2001. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Ethnopharmacology* 77(1), 123-127.
- Chao, L.K., Hua, K.F., Hsu, H.Y., Cheng, S.S., Liu, J.Y., Chang, S.T., 2005. Study on the antiinflammatory activity of essential oil from leaves of *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(18), 7274-7278.
- Faikoh, E.N., Hong, Y.H., Hu, S.Y., 2014. Liposome-encapsulated cinnamaldehyde enhances zebrafish (*Danio rerio*) immunity and survival when challenged with *Vibrio vulnificus* and *Streptococcus agalactiae*. *Fish & Shellfish Immunology* 38(1), 15-24.
- Fathiazad, F., Khaki, A., Nouri, M., Afshin, K.A., 2013. Effect of Cinnamon *Zeylanicum* on serum Testosterone and anti-oxidants levels in Rats. *International Journal of Women's Health and Reproduction Sciences* 1(1), 29-35.
- Farombi, E.O., Adelowo, O.A., Ajimoko, Y.R., 2007. Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African cat fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 4(2), pp.158-165.
- Hansen, B.H., Rømme, S., Garmo, Ø.A., Pedersen, S.A., Olsvik, P.A., Andersen, R.A., 2007. Induction and activity of oxidative stress-related proteins during waterborne Cd/Zn-exposure in brown trout (*Salmo trutta*). *Chemosphere* 67(11):2241-9.
- Hao, L. and Chen, L., 2012. Oxidative stress responses in different organs of carp (*Cyprinus carpio*) with exposure to ZnO nanoparticles. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80(6), 103-110.
- Hilmy, A.M., El Domiaty, N.A., Daabees, A.Y., Alsarha, A., 1987. The toxicity to *Clarias lazera* of copper and zinc applied jointly. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 87(2), 309-314.
- Hosni, A.A., Abdel-Moneim, A.A., Abdel-Reheim, E.S., Mohamed, S.M., Helmy, H., 2017. Cinnamaldehyde potentially attenuates gestational hyperglycemia in rats through modulation of PPAR γ , proinflammatory cytokines and oxidative stress. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 88(4), 52-60.
- Hoseinifard, S.M., Omidzahir, S., Hoseini, S.M., Beikae, H., 2018. Protective effect of garlic (*Allium sativum*) against zinc poisoning in the testicular tissue of goldfish (*Carassius auratus*). *Comparative Clinical Pathology* 27(2), pp.357-361.
- Iqbal, S., Jabeen, F., Peng, C., Ijaz, M.U., Chaudhry, A.S., 2020. Cinnamomum cassia ameliorates Ni-NPs-induced liver and kidney damage in male Sprague Dawley rats. *Human & Experimental Toxicology* 39(11), 1565-1581.
- Jiang, X., Wang, W., Wang, S., Zhang, B., Hu, J., 2012. Initial identification of heavy metals contamination in Taihu Lake, a eutrophic lake in China. *Journal of Environmental Sciences* 24(9), 1539-1548.
- Jia, X., Zhang, H., Liu, X., 2011. Low levels of cadmium exposure induce DNA damage and oxidative stress in the liver of Oujiang colored common carp *Cyprinus carpio* var. color. *Fish physiology and Biochemistry* 37(1), 97-103.

- Khodabakhshi, L., Poorbagher, H., Hosseini, S.V., 2017. Effects of Different Exposure Time and Concentration of Zinc Oxide (ZnO) Nanoparticles on the Histopathological Changes of the Gill in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Fisheries*. 70(1), 85-94. (In Persian).
- Limón-Pacheco, J., Gonsebatt, M.E., 2009. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 674(1-2), 137-147.
- Methew, S., Abraham, T.E., 2006. In vitro antioxidant activity and scavenging effects of Cinnamomum verum leaf extract assayed by different methodological. *Food and Chemical Toxicology* 44(2), 198-209.
- Ouyang, P., Chen, J., Yin, L., Geng, Y., Chen, D., Wang, K., Lai, W., Guo, H., Fang, J., Chen, Z., Tang, L., 2021. The sub-inhibitory concentration of cinnamaldehyde resists *Aeromonas hydrophila* pathogenicity via inhibition of W-pili production. *Aquaculture International* 29(4), 1639-1655.
- Pandey, S., Parvez, S., Ansari, R.A., Ali, M., Kaur, M., Hayat, F., Ahmad, F., Raisuddin, S., 2008. Effects of exposure to multiple trace metals on biochemical, histological and ultrastructural features of gills of a freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. *Chemico-Biological Interactions* 174(3), 183-192.
- Puspitasari, A.W., Arfiati, D., Hu, S.Y., 2018. Effect of cinnamaldehyde addition on zebrafish (*Danio rerio*) eggs against *Streptococcus agalactiae* infection. *Research Journal of Life Science* 4(3), 190-198.
- Rajeshkumar, S., Liu, Y., Ma, J., Duan, H.Y., Li, X., 2017. Effects of exposure to multiple heavy metals on biochemical and histopathological alterations in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Fish & Shellfish Immunology* 70(11), 461-472.
- Sevcikova, M., Modra, H., Blahova, J., Dobsikova, R., Plhalova, L., Zitka, O., Hynek, D., Kizek, R., Skoric, M., Svobodova, Z., 2016. Biochemical, haematological and oxidative stress responses of common carp (*Cyprinus carpio* L.) after sub-chronic exposure to copper. *Veterinarni Medicina* 61(1), 35-50
- Sharma, U.K., Sharma, A.K., Pandey, A.K., 2016. Medicinal attributes of major phenylpropanoids present in cinnamon. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 16(1), 1-11.
- Skidmore, J.F., 1964. Toxicity of zinc compounds to aquatic animals, with special reference to fish. *The Quarterly Review of Biology* 39(3), 227-248.
- Subashkumar, S., Selvanayagam, M., 2014. First report on: Acute toxicity and gill histopathology of fresh water fish *Cyprinus carpio* exposed to Zinc oxide (ZnO) nanoparticles. *International Journal of Scientific and Research Publications* 4(3), 1-4.
- Talas, Z.S., Orun, I., Ozdemir, I., Erdogan, K., Alkan, A., Yılmaz, I., 2008. Antioxidative role of selenium against the toxic effect of heavy metals (Cd+ 2, Cr+ 3) on liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792). *Fish Physiology and Biochemistry* 34(3), 217-222.
- Thophon, S., Kruatrachue, M., Upatham, E.S., Pokethitiyook, P., Sahaphong, S., Jaritkhuan, S., 2003. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environmental Pollution* 121(3), 307-320.
- Vinodhini, R., Narayanan, M., 2008. Bioaccumulation of heavy metals in organs of fresh water fish *Cyprinus carpio* (Common carp). *International Journal of Environmental Science & Technology* 5(2), 179-182.
- Vutukuru, S.S., 2005. Acute effects of hexavalent chromium on survival, oxygen consumption, hematological parameters and some biochemical profiles of the Indian major carp, *Labeo rohita*. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2(3), 456-462.
- Wang, Y., Wang, Q., Xing, K., Jiang, P., Wang, J., 2021. Dietary cinnamaldehyde and *Bacillus subtilis* improve growth performance, digestive enzyme activity, and antioxidant capability and shape intestinal microbiota in tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*. *Aquaculture* 531(2), 735798.
- Zhou, Y., Jiang, W.D., Zhang, J.X., Feng, L., Wu, P., Liu, Y., Jiang, J., Kuang, S.Y., Tang, L., Peng, Y., Zhou, X.Q., 2020. Cinnamaldehyde improves the growth performance and digestion and absorption capacity in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish Physiology and Biochemistry* 46(4), 1589-1601.