

## بررسی فعالیت ضداکسیدانی عصاره جنینی گورخرماهی (*Danio rerio*)

سیده مهسا حسینی چوپانی<sup>۱</sup>، امیرحسین اسماعیلی تمندگانی<sup>۲\*</sup>، مهدی علیخانی<sup>۳</sup>

۱- گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

۲- گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

۳- گروه پزشکی بازساختی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، موسسه زیست شناسی و فناوری سلول های بنیادی رویان، تهران، ایران

### چکیده

### نوع مقاله

#### مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۰۱

تاریخ چاپ الکترونیکی: ۱۴۰۲/۰۳/۱۵

\*نویسنده مسئول:

Amirh.smiley@modares.ac.ir

گورخرماهی به دلیل ویژگی های متنوع از جمله خودنوسازی به عنوان یک مدل آزمایشگاهی مفید مطرح است. جنین این ماهی در مراحل اولیه رشد ویژگی های منحصر بفردی دارد و در مطالعات مختلفی اثرات آن مشاهده شد. فاکتورهای تمایزی موجود در سلول های بنیادی جدا شده از جنین گورخرماهی، در بهبود وضعیت عملکردی بیماران تاثیرگذار بوده و قرارگرفتن در معرض عصاره های جنین گورخرماهی در مراحل اولیه رشد ممکن است بیان سلول های بنیادی چند توان را افزایش داده و اثرات مثبتی را اعمال کند. در این مطالعه به بررسی ویژگی های ضداکسیدانی عصاره جنینی گورخرماهی در مراحل جنینی مختلف تکوینی پرداختیم. عصاره تخم گورخرماهی در مراحل مختلف جنینی تهیه شد. اثر آن در غلظت های ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی گرم بر میلی لیتر بر میزان فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH، فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS و قدرت احیاکنندگی آهن (FRAP) مورد بررسی قرارگرفت. گروه های مورد مطالعه شامل عصاره پروتئین در مراحل مورولا، بلاستولا و گاسترولا بود. طبق نتایج بدست آمده میزان پروتئین در مراحل مختلف جنینی متغیر بوده است و میزان پروتئین با پیشرفت رشد جنینی افزایش و میزان چربی کاهش نشان داد. عصاره پروتئین در مرحله گاسترولا بالاترین میزان مهار DPPH و نیز کاهندگی یون آهن را در غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به گروه های مورولا و بلاستولا نشان داد ( $P < 0.05$ ). همچنین عصاره پروتئینی در مرحله جنینی بلاستولا بیشترین میزان مهار ABTS را در غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به گروه های دیگر به همراه داشت ( $P < 0.05$ ). در مجموع، با توجه به خواص بالای ضداکسیدانی مشاهده شده در عصاره تخم گورخرماهی، می تواند به عنوان کاندید امیدوارکننده ای به عنوان مکمل دارویی به منظور افزایش سطح سلامت از طریق بروز عملکرد ضداکسیدانی باشد.

**کلید واژه ها:** ABTS، DPPH، FRAP، فعالیت ضداکسیدانی، عصاره جنینی، گورخرماهی.

### مقدمه

در دنیای ما هیچ موضوعی حیرت انگیزتر از سلول زنده نیست. سلول های بنیادی سلول های اولیه ای هستند که برخی از انواع آن ها به نام سلول بنیادی پروتوان، توانایی ایجاد هر نوع سلولی را در بدن دارا هستند. سلول بنیادی جنینی، سلول های بنیادی اولیه نیز نامیده می شوند که از جنین در مرحله نمو حاصل می شوند. سلول های بنیادی دارای کاربردهای گوناگونی هستند که مشخص ترین آن ها توان بالقوه این سلول ها در درمان بعضی از بیماری ها است [۱].

گورخرماهی (*Danio rerio*) از خانواده Cyprinidae و ساکن زیستگاه های طبیعی آب های شیرین مناطق گرمسیری است. گورخرماهی در مدت زمان ۱۰ هفته به بلوغ می رسد و همچنین این ماهی کوچک دارای نرخ باروری خوبی است. چنانچه در شرایط مطلوب نگهداری شود، گورخرماهی می تواند حدود ۲۰۰ تخم در هفته بگذارد [۲، ۳] و در شرایط آزمایشگاهی می تواند در طول سال تخم ریزی کند. گورخرماهی نسبت به پستانداران توانایی بسیار بالایی در بازسازی بافت های پیچیده دارند [۴]، آن ها می توانند اندام های قطع شده را رشد دهند و همچنین بافت های آسیب دیده همچون قلب، سیستم عصبی مرکزی، شبکه چشم، نخاع و سایر بافت را ترمیم کنند. گورخرماهی هم پذیرای رودیکردهای ژنتیکی

رو به جلو و هم معکوس هستند. مطالعات بر روی گورخرماهی در برخی موارد به عنوان راهنمایی برای اندیشیدن استراتژی‌های بازسازی در پستانداران عمل کرده است [۵].

جنین این ماهی در مراحل اولیه رشد ویژگی‌های منحصر بفردی دارد و در مطالعات مختلفی اثرات آن دیده شد. فاکتورهای تمایزی موجود در سلول‌های بنیادی جدا شده از جنین گورخرماهی، در بهبود وضعیت عملکردی بیماران تاثیرگذار بوده و قرارگرفتن در معرض عصاره‌های جنین گورخرماهی در مراحل اولیه رشد ممکن است بیان سلول‌های بنیادی چند توان را افزایش داده و اثرات مثبتی را اعمال کند [۴]. تاکنون مطالعاتی بر روی اثرات عصاره جنینی گورخرماهی صورت گرفته که شامل تاثیرات آن بر روی سرطان روده [۷،۶]، پستان [۸]، کارسینوم کبدی [۱۰،۹] و یا در زمینه بازسازی مو [۱۱]، شنوایی حسی عصبی [۱۲]، الگوی پیری [۴]، سلول‌های بنیادی مزانشیمی [۱۳] و ملانوما [۱۴] می‌باشد.

ضداکسیدان‌ها گروهی از ترکیبات هستند که رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را در سلول خنثی می‌کنند. رادیکال‌های آزاد در طول متابولیسم سلولی تولید می‌شوند و عدم تعادل بین تشکیل و حذف رادیکال آزاد می‌تواند، استرس اکسیداتیو را القا کند [۱۶،۱۵]. فعالیت‌های مضر رادیکال‌های آزاد با آسیب به غشا، DNA و آنزیم‌ها مرتبط است. استرس اکسیداتیو یک عامل اصلی کمک‌کننده در میزان بالای مرگ و میر مرتبط با اختلال در تنظیم ایمنی است و منجر به ایجاد چندین بیماری می‌گردد و سیستم ایمنی بدن عمدتاً به استرس اکسیداتیو حساس است. این ضداکسیدان‌ها می‌توانند نقش مهمی را در بسیاری از بیماری‌های مزمن از جمله بیماری‌های قلبی و عروقی، کم‌خونی، سرطان، التهاب و پیری ایفا کنند و از طغیان این بیماری‌ها جلوگیری کنند. از سوی دیگر، ضد اکسیدان‌ها در صنعت، کاربردهایی را در زمینه‌های مختلف از جمله نگهداری مواد غذایی، مراقبت‌های بهداشتی و آرایشی دارند [۱۷]. همچنین ضداکسیدان‌ها، عملکرد سلول‌های ایمنی را در برابر اختلالات هموستاتیک ناشی از استرس اکسیداتیو حفظ می‌کنند. بنابراین، از آنجایی که سیستم ایمنی یک شاخص سلامت و تحلیل‌گر طول عمر است، محافظت از این سیستم توسط ضداکسیدان‌های رژیم غذایی انجام می‌شود [۱۶]. در سال‌های اخیر پپتیدهای زیست‌فعال که از ماهیان بدست آمده است توجه زیادی را به خود اختصاص داده است. پپتیدهای زیست‌فعال ویژگی‌های عملکردی متفاوتی دارند و می‌توانند خواص زیست‌فعال مثل خواص مهارکنندگی آنزیم تبدیل‌کننده آنژیوتنسنین I، عملکرد ضدانعقادی، تنظیم‌کنندگی سیستم هورمونی، تقویت سیستم ایمنی، بازدارندگی رنین، خواص ضدفشارخون، ضدسرطان، ضدتومور، ضددیابت، ضد میکروبی و همچنین فعالیت ضداکسیدانی داشته باشند [۱۸، ۱۹، ۲۰]. تخمک ماهی محصولی بسیار با ارزش است و در بسیاری از نقاط دنیا مصرف می‌شود [۲۱]. خاویار، تخم استحصالی از ماهیان خاویاری است که به عنوان یک محصول دریایی با ارزش شناخته شده است که در مقایسه با سایر ماهی‌ها به منبعی عالی از مواد مغذی است که عملکردهای بیولوژیکی مختلفی در اندام‌های بدن انجام می‌دهد [۲۲]. تاکنون مطالعاتی بر روی تخم ماهیان انجام شده که از این مطالعات می‌توان به پژوهش روشنی و همکاران [۲۳] (مقایسه خواص ضداکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده و فرکشن‌های پپتیدی تهیه شده از تخمک ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*))، پورعاشوری و همکاران [۲۴] (ارزیابی خواص ضداکسیدان و کاربرد تخمک ماهی قزل‌آلا رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)) هیدرولیز شده با استفاده از آنزیم‌های آلکالاز و پپسین، چالامایا و همکاران [۲۵] (پروتئین هیدرولیز شده و بررسی خواص عملکردی از تخم مریگا (*Cirrhinus mrigala*)) و مطالعه لورگا و همکاران [۲۶] (مواد مغذی و خواص ضداکسیدانی تخم حلزون) اشاره کرد.

اگرچه مطالعات بر روی تخم لقاح یافته و عصاره‌های جنینی بسیار محدود می‌باشد، مطالعه حاضر در پی آن خواهد بود که به بررسی ویژگی‌های ضداکسیدانی عصاره جنینی گورخرماهی (*D. rerio*) در مراحل مختلف جنینی (مورلا، بلاستولا، گاسترولا) بپردازد.

## مواد و روش‌ها

### تهیه جنین گورخرماهی

به منظور تهیه عصاره جنینی از گورخرماهی در این مطالعه از گورخرماهی معمولی (*D. rerio*) موجود در بازار به تعداد ۱۰۰۰ قطعه ماهی پیش مولد گورخرماهی با میانگین وزنی ۲۲۰ صدم گرم در مرحله پیش مولدی تهیه شدند. ابتدا ماهیان مولد برای تکثیر در آکواریوم‌های ۴۰ لیتری در آزمایشگاه ماهیان مدل دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس نگهداری شدند و روزانه سه بار تغذیه شدند. ماهی‌ها در مرحله تکثیر دوبار در روز توسط خوراک ساخته شده با محتوای (پروتئین، چربی، فیبر، رطوبت و خاکستر جیره به ترتیب ۵۵، ۱۴، ۱/۳، ۱۰ و ۱۵ درصد) و یک وعده نیز با آرتمیای غنی شده به میزان سه گرم تغذیه شدند. مولدین تحت شرایط استاندارد نوری (۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی) و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از انجام عمل تکثیر، تخم‌ها جمع‌آوری و بلافاصله توسط آب استریل شده شستشو داده شدند. به منظور انجام فرآیند تکوین، تخم‌ها در درون محیط جنینی قرار گرفتند و در دمای مناسب انکوبه شدند. جنین‌ها در مرحله جنینی مورد نظر بر اساس جدول تکوین وابسته به دما در زمان مورد نظر جمع‌آوری و تا زمان عصاره‌گیری در فریز نگهداری شدند [۲].

### آنالیز تقریبی تخم گورخرماهی

برای سنجش ترکیب تقریبی نمونه‌ها از روش Aoac و همکاران [۲۷] استفاده شد. برای اندازه‌گیری رطوبت، نمونه‌ها پس از وزن شدن با پتری‌دیش در آون با دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت قرار داده شدند. برای تعیین میزان پروتئین، نمونه‌ها توسط دستگاه دایجستر در دمای ۴۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت هضم شدند و مقدار پروتئین با استفاده از دستگاه کجلدال اتوماتیک (Analyser kjeltec Auto) ساخت سوئد اندازه‌گیری شد. برای تعیین مقدار خاکستر، نمونه خشک در کوره الکتریکی (Nobetherm L5/11/B170) ساخت آلمان به مدت ۶ ساعت در ۶۰۰ درجه سوزانده شد. برای اندازه‌گیری چربی، نمونه‌ها در داخل کاغذ کارتوش قرار داده شدند و چربی‌زدایی توسط دستگاه سوکسوله (Foss 2050 Soxtec) ساخت آلمان انجام شد.

### تهیه عصاره جنینی گورخرماهی

عصاره جنینی، پس از انجام عمل تکثیر تخم گورخرماهی در مراحل جنینی مختلف، شامل مورلا (۲/۲۰ ساعت بعد از لقاح)، بلاستولا (۵/۲۰ ساعت بعد از لقاح) و گاسترولا (۱۰/۲۰ ساعت بعد از لقاح) جمع‌آوری شدند [۲۸]. به منظور تهیه عصاره، تخم‌ها در کنار یخ با دور ۸۰۰۰ به مدت ۴ دقیقه هم‌ژنایز شدن و در نهایت به فالكون ۵۰ منتقل شدند و به صورت متناوب به مدت ۵ دقیقه در نیتروژن مایع و حمام آبی ۳۷ درجه قرار گرفتند این مرحله سه مرتبه تکرار شد و سپس در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۲۰۰ دور سانتریفیوژ شدند. عصاره تهیه شده توسط فیلتر سرسرنگی ۰/۲ میکرون عبور داده شد و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند [۲۹].

### سنجش DPPH

به منظور بررسی فعالیت حذف رادیکال آزاد دیفنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH)، از روش Shimada و همکاران [۳۰]، با کمی تغییرات استفاده شد. برای انجام آزمایش ابتدا محلول DPPH ۰/۱۶ میلی‌مولار در اتانول ۹۶ درصد آماده شد. ابتدا براساس روش بردفورد غلظت عصاره‌ها سنجیده شد و سپس ۵۰۰ میکرولیتر نمونه با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ۵۰۰ میکرولیتر محلول DPPH اضافه و به مدت یک دقیقه ورتکس شد. جذب نوری نمونه‌ها پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق در شرایط تاریکی در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر (ELISA Reader Epock، آمریکا) اندازه‌گیری شد. اسکوربیک اسید در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به عنوان شاهد ارزیابی شد.

$$100 \times (\text{جذب نمونه شاهد} \div (\text{جذب نمونه مورد ارزیابی} - \text{جذب نمونه شاهد})) = \text{درصد مهار کنندگی}$$

## سنجش ABTS

توانایی مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTS یکی از روش‌های مشهور تعیین ظرفیت ضداکسیدانی است که این روش براساس ربایش رادیکال نسبتاً پایدار ABTS می‌باشد که به یک محلول بی‌رنگ تبدیل می‌شود و شدت کاهش رنگ نشان دهنده مقدار رادیکال ABTS است [۳۱]. نتایج این روش براساس عدد ترلکس مطرح می‌شود که بر مبنای مقایسه ظرفیت ربایش ضداکسیدانی نسبت به ترلکس است. برای سنجش فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS از روش Alemen و همکاران [۳۲] استفاده شد. جهت آماده سازی محلول رادیکال ABTS، ابتدا ۷ میلی‌مولار و پتاسیم پرسولفات ۲/۴۵ میلی‌مولار جهت اکسیداسیون ABTS با یکدیگر مخلوط شدند و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در مکان تاریک نگهداری شدند. پس از طی زمان مورد نظر، محلول حاصل با افزودن آب مقطر تا رسیدن به میزان جذب  $0.02 \pm 0.07$  در طول موج ۷۳۴ نانومتر رقیق شد. ۲۰ میکرولیتر از نمونه عصاره جنینی با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در مراحل مختلف با ۹۸۰ میکرولیتر محلول ABTS رقیق سازی و مخلوط گردید سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در شرایط تاریکی نگهداری شدند. جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۳۴ نانومتر در سه تکرار توسط دستگاه اسپکتوفتومتر (ELISA Reader Epock، آمریکا) خوانده شد. جهت مقایسه از آسکوربیک‌اسید استفاده شد و درصد مهارکنندگی رادیکال ABTS با استفاده از رابطه ذیل بدست آمد:

$$100 \times (\text{جذب نمونه شاهد} - \text{جذب نمونه شاهد}) = \text{درصد مهار کنندگی ABTS}$$

## سنجش FRAP

به طور کلی ضداکسیدان‌ها، رادیکال‌های آزاد را با ۲ مکانیسم اصلی غیرفعال می‌کنند. اولین مکانیسم TRAP و دومین مکانیسم، روش وابسته به انتقال تک الکترون یا FRAP نامیده می‌شود. در این روش مواد با انتقال تک الکترون به رادیکال‌های آزاد و فلزات در محیط واکنش، عملکرد خود را انجام می‌دهند [۳۳]. در این روش مواد دارای خاصیت احیاکنندگی با فری سیانید ( $\text{Fe}^{3+}$ ) واکنش داده و تشکیل فروسیانید ( $\text{Fe}^{2+}$ ) می‌کنند که خود این ترکیب با  $\text{FeCl}_3$  واکنش داده و یک ترکیب رنگی تولید می‌کند [۳۴]. اگر پروتئین دارای قدرت کاهندگی یون آهن باشد رنگ سبز در محیط واکنش ایجاد می‌گردد و هرچه رنگ سبز قوی‌تر باشد و میزان جذب نوری بالاتر باشد، نشان دهنده فعالیت کاهندگی بیشتر است [۲۳]. با افزایش میزان ترکیبات فنولی موجود در عصاره قدرت احیاکنندگی آن افزایش می‌یابد، در نتیجه عصاره قادر خواهد بود با اهدا تعداد بیشتری الکترون یا اتم‌های هیدروژن واکنش‌های زنجیری تشکیل رادیکال‌های آزاد را شکسته و اکسیداسیون را به تاخیر بیاورد [۳۵]. ظرفیت اهدا الکترون در ترکیبات بیواکتیو به فعالیت ضداکسیدانی آن‌ها مربوط می‌شود [۳۶]. در این روش در صورتی که پروتئین‌های عصاره جنینی دارای قدرت کاهندگی یون آهن باشند، رنگ سبز در محیط واکنش ایجاد می‌گردد و هر چه رنگ سبز قوی‌تر باشد، نشان دهنده فعالیت کاهندگی بالاتر است.

به منظور بررسی فعالیت کاهندگی یون آهن، از روش Oyaizu [۳۷] استفاده شد. ۱۰۰ میکرولیتر نمونه (غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با ۲۵۰ میکرولیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار (PH=۶) و ۲۵۰ میکرولیتر فری سیانید پتاسیم ۱ درصد ترکیب شد و ترکیب حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد درون حمام آبی قرارگرفت. بعد از آن، ۲۵۰ میکرولیتر تری کلرواستیک‌اسید ۱۰ درصد به آن اضافه شد. ترکیب حاصل به مدت ۱۰ دقیقه سانتیفیوژ شد و در نهایت به ۵۰۰ میکرولیتر از فاز بالایی، ۲۵۰ میکرولیتر آب مقطر و ۵۰ میکرولیتر کلرید فریک آبدار ۰/۱ درصد اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه (به منظور ایجاد تغییر رنگ) میزان جذب محلول نهایی در طول موج ۷۰۰ نانومتر در سه تکرار توسط دستگاه طیف سنج نوری (ELISA Reader Epock، آمریکا) اندازه‌گیری شد.

## روش تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ و رسم نمودارها با برنامه Excel 2013 انجام شد. تمامی داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  SD گزارش شده‌اند و ارزیابی‌ها در سه تکرار صورت گرفت. نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیروویلیک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج با استفاده از آزمون آنالیز واریانس دوطرفه تجزیه و تحلیل شدند و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون آماری Duncan در سطح احتمال پنج درصد استفاده شد.

## یافته‌ها

### تعیین ترکیبات تقریبی

نتایج مربوط به ترکیبات تقریبی تخم گورخرماهی در جدول ۱، نشان داده شده است. داده‌ها براساس وزن خشک نمونه تعیین شد. میزان پروتئین در مراحل مختلف جنینی متغیر بوده است و روند افزایشی میزان پروتئین با پیشرفت رشد جنینی وجود داشته است و بیشترین مقدار پروتئین مربوط به مرحله مورلا می‌باشد که ۳۴/۴ درصد حاصل شد. میزان چربی در مراحل مختلف جنینی متغیر بوده و روند کاهشی میزان چربی با پیشرفت رشد جنینی وجود داشته است و بیشترین مقدار چربی مربوط به مرحله مورلا می‌باشد که ۶/۰۳ درصد حاصل شد. بیشترین میزان رطوبت و خاکستر مربوط به مورلا است که میزان آن ۷۱/۵ و ۰/۰۷۱ درصد می‌باشد.

جدول ۱. ترکیبات تقریبی تخم گورخرماهی در مراحل جنینی مختلف

مراحل جنینی	رطوبت (درصد)	پروتئین (درصد)	چربی (درصد)	خاکستر(درصد)
مورلا	۵۹/۵	۳۴/۴	۶/۰۳	۰/۰۷۱
بلاستولا	۶۶/۴	۲۸/۹	۵/۲۸	۰/۰۵۴
گاسترولا	۶۹/۱	۲۶/۵	۴/۲۷	۰/۰۴۲

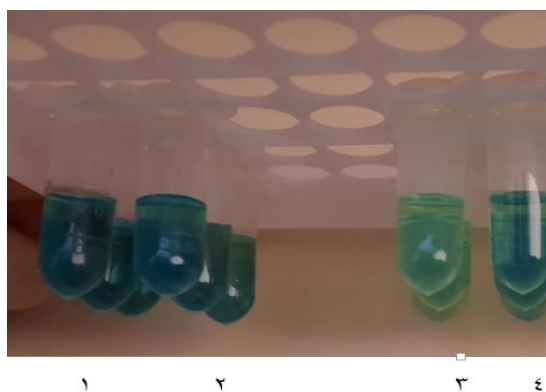
### قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH

یافته‌های بدست آمده از آنالیز تجزیه واریانس دوطرفه (Two-way ANOVA)، نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری بین اثر متقابل غلظت و عصاره جنینی مراحل مختلف (مورلا- بلاستولا- گاسترولا) در قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH وجود دارد ( $P < 0.05$ ) (جدول ۲).

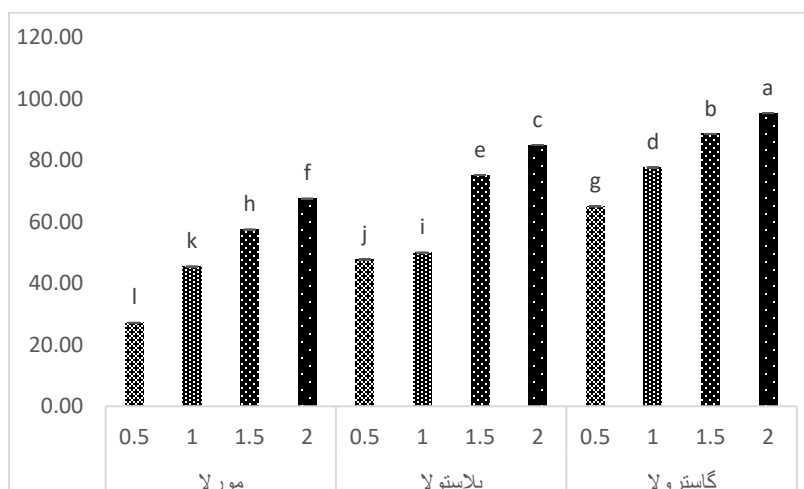
جدول ۲. آنالیز واریانس دوطرفه قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH در بین غلظت‌های (۱/۵، ۱، ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و عصاره‌های جنینی (مورلا، بلاستولا، گاسترولا)

P - Value	F - Value	میانگین	درجه آزادی	مجموع مربعات درجه آزادی	منابع تغییرات
۰/۰۰۰	۲۴۵۴/۳۲۰	۰/۲۹۶	۲	۰/۵۹۳	مراحل جنینی
۰/۰۰۰	۱۸۲۴/۱۰۵	۰/۲۲۰	۳	۰/۶۶۱	غلظت
۰/۰۰۰	۴۹/۵۶۷	۰/۰۰۶	۶	۰/۰۳۶	عصاره جنینی × غلظت
		۰/۰۰۰	۲۴	۰/۰۰۳	خطا
			۳۶	۵/۴۶۰	کل

بر اساس نتایج بدست آمده از مقایسه میانگین تیمارها مشخص شد که بیشترین میزان قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH متعلق به عصاره گاسترولا و غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر با میزان ۹۵/۲۸ درصد مشاهده شده که دارای بالاترین اثر ضد اکسیدانی بود (شکل ۱) ( $P < 0.05$ ). همانطور که مشاهده می شود کمترین فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد در مرحله مورلا مشاهده شد و تغییر غلظت عصاره در فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد در مراحل جنینی افزایش معناداری داشته است. همچنین میزان مهارکنندگی رادیکال آزاد در مراحل جنینی با پیشرفت رشد جنینی وابسته به غلظت بود و با افزایش غلظت، ارتباط مستقیمی با درصد مهارکنندگی مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). میزان مهار رادیکال آزاد DPPH توسط اسکوربیک اسید در غلظت ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر ۸۵/۴۲ درصد بود (شکل ۲).



شکل ۱. اثر غلظت عصاره جنینی گورخر ماهی بر توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH. ۱. ویتامین ث ۲. گاسترولا ۳. مورلا ۴. بلاستولا



شکل ۲. اثر تغییر غلظت عصاره جنینی گورخر ماهی بر توانایی مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH در غلظت های (۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ میلی گرم بر میلی لیتر) (میانگین  $\pm$  SD). حرف انگلیسی متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار است.

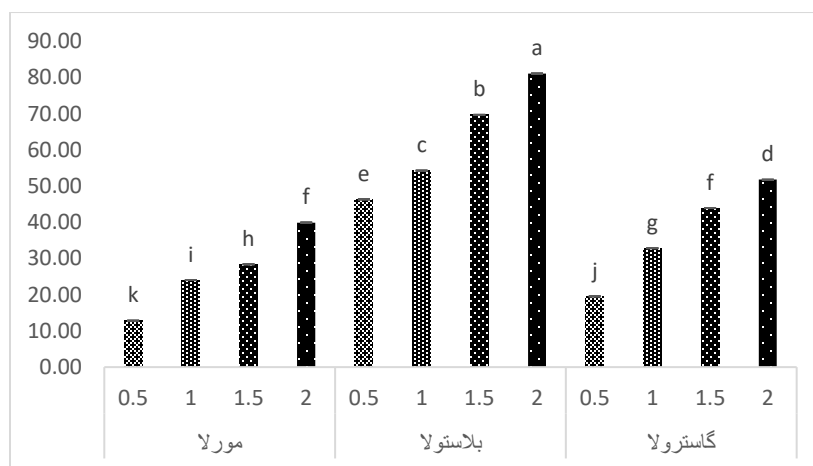
### قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTS

یافته های بدست آمده از آنالیز تجزیه واریانس دوطرفه (Two-way ANOVA)، نشان می دهد که تفاوت معنی داری بین اثر متقابل غلظت و عصاره جنینی مراحل مختلف (مورلا- بلاستولا- گاسترولا) در قدرت مهار رادیکال آزاد ABTS در سطح خطای ۵ درصد وجود دارد (جدول ۳).

جدول ۳. آنالیز واریانس دوطرفه قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH در بین غلظت‌های (۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و عصاره‌های جنینی (مورلا، بلاستولا، گاسترولا)

منابع تغییرات	مجموع مربعات درجه آزادی	درجه آزادی	میانگین	F - Value	P - Value
مراحل جنینی	۱/۸۳۹	۲	۰/۹۲۰	۷۶۶۵/۸۶۴	۰/۰۰۰
غلظت	۱/۶۹۹	۳	۰/۵۶۶	۴۷۲۰/۴۹۲	۰/۰۰۰
عصاره جنینی × غلظت	۰/۵۴۸	۶	۰/۰۹۱	۷۶۱/۵۸۹	۰/۰۰۰
خطا	۰/۰۰۳	۲۴	۰/۰۰۰		
کل	۲۵/۹۶۰	۳۶			

بر اساس نتایج بدست آمده از مقایسه میانگین تیمارها مشخص شد که بیشترین میزان قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTS متعلق به عصاره بلاستولا و غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با میزان ۸۱/۱۱ درصد مشاهده شده که دارای بالاترین اثر ضد اکسیدانی بود ( $P < 0.05$ ). همانطور که مشاهده می‌شود کمترین فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد در مرحله مورلا مشاهده شد. طبق نتایج بدست آمده میزان غلظت در بین عصاره‌های مختلف افزایش معناداری با درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد ایجاد کرد (شکل ۳).



شکل ۳. اثر تغییر غلظت عصاره جنینی گورخرماهی بر توانایی مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTS در غلظت‌های (۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) (میانگین  $\pm$  SD). حرف انگلیسی متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است.

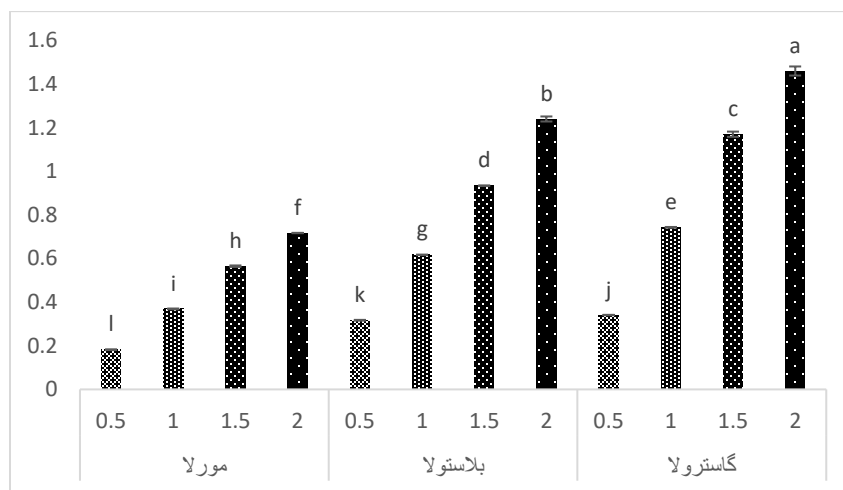
### قدرت کاهندگی یون آهن سه ظرفیتی (یون فریک)

یافته‌های بدست آمده از آنالیز تجزیه واریانس دوطرفه (Two-way ANOVA)، نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری بین اثر متقابل غلظت و عصاره جنینی مراحل مختلف (مورلا- بلاستولا- گاسترولا) در قدرت کاهندگی یون  $Fe^{3+}$  وجود دارد ( $P < 0.05$ ) (جدول ۴).

جدول ۴. آنالیز واریانس دوطرفه قدرت کاهندگی یون آهن سه ظرفیتی در بین عصاره‌های جنینی گورخرماهی و دوزهای تزریقی (۱۰، ۲۵، ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)

منابع تغییرات	مجموع مربعات درجه آزادی	درجه آزادی	میانگین	F - Value	P - Value
مراحل جنینی	۱/۳۸۶	۲	۰/۶۹۳	۳۷۴۵/۵۴۹	۰/۰۰۰
غلظت	۳/۷۷۱	۳	۱/۲۵۷	۶۷۹۴/۱۳۴	۰/۰۰۰
عصاره جنینی × غلظت	۰/۳۱۱	۶	۰/۰۵۲	۲۸۰/۰۲۸	۰/۰۰۰
خطا	۰/۰۰۴	۲۴	۰/۰۰۰		
کل	۲۴/۲۲۵	۳۶			

بر اساس نتایج بدست آمده از مقایسه میانگین تیمارها مشخص شد که بالاترین قدرت کاهندگی یون  $Fe^{3+}$  متعلق به عصاره گاسترولا در غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر مشاهده ( $P < 0.05$ ) و پیشرفت رشد جنینی اختلاف معناداری با درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد ایجاد کرد ( $P < 0.05$ ). استفاده از اسکوربیک اسید در غلظت ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر توانست در مقایسه با مرحله جنینی گاسترولا میزان کاهندگی مشابهی را نشان دهد (شکل ۴).



شکل ۴. اثر تغییر غلظت عصاره جنینی گورخرماهی بر قدرت کاهندگی یون آهن سه ظرفیتی (یون فریک) در غلظت‌های (۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ میلی گرم بر میلی لیتر) (میانگین  $\pm$  SD). حرف انگلیسی متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار است.

## بحث

پژوهش حاضر با هدف بررسی فعالیت ضد اکسیدانی عصاره جنینی گورخرماهی انجام شد. آنالیز تخم گورخرماهی (جدول ۱) نشان داد که تخم گورخرماهی در مرحله جنینی مورلا دارای درصد بالایی از پروتئین است (۳۴/۴ درصد) و می‌تواند به عنوان یک منبع پروتئینی ارزشمند به منظور تولید پروتئین هیدرولیز شده مورد استفاده قرارگیرد. بر اساس نتایج Roushani و همکاران [۲۳]، نتایج حاصل از تعیین ترکیب تقریبی تخمک ماهی سفید دارای میزان رطوبت ۶۱/۰۷، پروتئین ۲۸/۸۱، چربی ۶/۸۴، خاکستر ۱/۳ درصد گزارش شد که میزان پروتئین آن تقریباً مشابه با



مرحله بلاستولا بوده است. در مطالعه Pourashouri و همکاران [۲۴]، نتایج حاصل از تعیین ترکیبی تخمک ماهی سفید دارای میزان رطوبت ۶۳/۵۸، پروتئین ۲۷/۰۶، چربی ۶/۰۸، خاکستر ۰/۰۴ درصد گزارش شد که میزان پروتئین آن با مرحله گاسترولا و چربی آن با مرحله مورلا تقریباً مشابه است و میزان درصد خاکستر آن با مرحله گاسترولا کاملاً مشابه و با مرحله بلاستولا هم تقریباً مشابه بوده است.

در تمام سیستم‌های زنده، سلول‌ها به سطوح کافی از دفاع ضداکسیدانی نیاز دارند تا از اثرات مضر تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) جلوگیری کنند. از آنجایی که ROS در داخل بدن و برای جلوگیری از آسیب سلول‌های ایمنی تولید می‌شود. سیستم‌های دفاعی ضداکسیدانی یا برای جلوگیری از تولید ROS یا رهگیری هر محصولی که تولید می‌شود کار می‌کنند [۳۸]. این ضداکسیدان‌ها عملکردهای مختلف ایمنی را بهبود می‌بخشند و نقش محافظتی مهمی در عفونت‌های ناشی از باکتری‌ها، ویروس‌ها یا انگل‌ها از خود نشان می‌دهند. ضداکسیدان‌ها با تعدیل حساسیت میزبان یا مقاومت در برابر پاتوژن‌های عفونی می‌توانند نقش اساسی در از بین بردن رادیکال‌های آزاد داشته باشند که موجب پیشگیری و درمان بیماری‌های عفونی در حیوانات می‌شود [۴۱، ۳۹].

DPPH یک رادیکال آزاد پایدار با رنگ بنفش تیره است [۴۲]. پایه و اساس این روش این است که رادیکال DPPH به عنوان پذیرنده الکترون از یک مولکول اهدا کننده مانند ضداکسیدان عمل می‌کند و در نتیجه DPPH به DPPH<sub>2</sub> تبدیل می‌شود. هنگامی که یک محلول DPPH با یک ضداکسیدان مخلوط می‌شود، رنگ آن از بنفش به زرد تبدیل می‌شود [۴۳]. در نهایت از روی اندازه‌گیری کاهش شدت جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر به وسیله طیف سنجی میتوان به خصوصیات ضداکسیدانی پی برد.

فعالیت مهار رادیکال عصاره جنینی گورخرماهی با استفاده از دو مدل رادیکال آزاد در شرایط آزمایشگاهی یعنی DPPH و ABTS ارزیابی شد. هنگامی که رادیکال‌های DPPH و ABTS با یک ماده اهداکننده پروتون مانند یک ضداکسیدان مواجه می‌شوند، رادیکال حذف می‌شود و با تغییر رنگ، جذب کاهش می‌یابد [۴۴]. همانطور که نشان داده شد، عصاره گورخرماهی فعالیت مهارکننده رادیکال DPPH و ABTS خوبی را وابسته به دوز نشان دادند.

در پژوهشی Chalamaiah و همکاران [۴۵]، به بررسی فعالیت ضداکسیدانی و خواص عملکردی پروتئین آنزیمی تخم ماهی کپور پرداختند که گزارش شد میزان فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH و ABTS وابسته به دوز می‌باشد و با افزایش میزان دوز فعالیت مهارکنندگی افزایش می‌یابد که با یافته‌های ما مطابقت دارد. میزان درصد مهارکنندگی رادیکال DPPH در عصاره گورخرماهی در مرحله گاسترولا در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تقریباً ۹۵ درصد بوده که این میزان از مهارکنندگی نسبت به پروتئین تخم ماهی کپور بیشتر است و عدم مطابقت نتایج را نشان می‌دهد ولی نتایج نشان داد، عصاره گورخرماهی در مرحله بلاستولا با غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، میزان مهارکنندگی رادیکال آزاد آن تقریباً با این پژوهش مطابقت دارد. نتایج تست ABTS در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تقریباً ۸۰ درصد بوده که با نتایج عصاره بلاستولا در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مطابقت دارد. یافته‌های ما با نتایج گزارش شده توسط Intarasirisawat و همکاران [۴۶] و Chalamaiah و همکاران [۴۷] مطابقت دارد که گزارش کردند فعالیت مهار DPPH و ABTS با افزایش غلظت‌ها افزایش می‌یابد. پپتیدهای مختلف با توالی آمینواسیدی و اندازه متفاوت ممکن است فعالیت ضداکسیدانی متفاوتی را نشان دهند [۴۸] که احتمال می‌رود علت تفاوت فعالیت مهار ضداکسیدانی در عصاره‌های جنینی در مراحل متفاوت همین موضوع می‌باشد. توانایی یک پپتید در مهار رادیکال آزاد نه تنها به اندازه پپتید بلکه بیشتر به توالی آمینواسیدی پپتیدها بستگی دارد و فعالیت ضداکسیداسیونی پروتئین‌های هیدرولیز شده مربوط به محتوای اسیدآمینوهای آگریزشان است که باعث افزایش حلالیت آن‌ها در چربی شده و فعالیت اکسیداسیونی را بهبود می‌بخشند [۴۹]. بنابراین افزایش قدرت ضدآنتی‌اکسیدانی در غلظت‌های بالاتر با افزایش میزان این آمینواسیدها برای مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS در ارتباط است [۵۰].

همانطور که در شکل ۳ نشان داده شد میزان قدرت کاهندگی آهن با افزایش غلظت افزایش پیدا کرد. در پژوهش Roushani و همکاران [۲۳]، بر روی تخمک *R.kutum* نشان داد که افزایش غلظت، تاثیر چندانی بر روی قدرت کاهندگی آهن نداشته و با نتایج ما مطابقت ندارد. در پژوهشی که Chalamaiiah و همکاران [۴۷]، بر روی تخمک *Labeo rohita* گزارش کردند با نتایج ما مطابقت داشته و همچنین نتایج گزارش شده از Chalamaiiah و همکاران [۴۵]، بر روی تخمک *Cyprinus carpio* مطابقت نتایج را مبنی بر تاثیر افزایش غلظت بر افزایش فعالیت مهار قدرت کاهندگی آهن را نشان داد. قدرت کاهنده مواد موجود در عصاره جنینی گورخرماهی احتمالاً به دلیل وجود پپتیدها یا اسیدهای آمینه‌ای است که به عنوان اهداکننده الکترون عمل می‌کنند و می‌توانند با رادیکال‌های آزاد واکنش دهند تا محصولات پایدارتری تشکیل دهند. هیدرولیزهای پروتئینی با قدرت کاهشی بالاتر، توانایی بهتری برای اهدای الکترون یا هیدروژن دارند و به عنوان یک شاخص مهم از پتانسیل آن برای استفاده به عنوان یک ضداکسیدان عمل می‌کنند [۵۱].

حداکثر تعداد پروتئین‌هایی که تا به امروز در گورخرماهی شناسایی شده‌اند به ترتیب به ۵۲۶۷ و ۸۴۷۵ در جنین و بالغ محدود شده‌اند [۵۲]. پروتئین‌ها عوامل زیستی بنیادی هستند که رویدادهای کلیدی درون سلول‌ها را تنظیم می‌کنند [۵۳، ۵۴]. در سال‌های اخیر، پروفایل پروتئومیکس جهانی بالغین و جنین‌های گورخرماهی به طور گسترده برای درک فرآیندهای رشد و همچنین برای خلاصه‌کردن مکانیسم‌های بیماری انجام شده است [۵۵]. گورخرماهی در مراحل اولیه جنینی، ماهیتی بسیار پویا دارد و با رویدادهایی که با تمایز سلولی و ریخت‌زایی همراه هستند مشخص می‌شوند [۵۶]. پروفایل کمی پروتئوم‌های مرحله اولیه گورخرماهی حاوی ۸۳۶۳ پروتئین است که بیشترین تعداد پروتئین‌های گزارش شده برای مراحل اولیه جنینی است. عملکردهای پروتئین به فراوانی آن‌ها مرتبط است که در آن پروتئین‌های با فراوانی بالا عمدتاً با عملکردهای هسته سلولی مرتبط هستند و پروتئین‌های با فراوانی کم عملکردهای تنظیمی را به عهده دارند [۵۷].

سیستم ایمنی شبکه پیچیده‌ای از سلول‌ها و پروتئین‌ها است که از بدن در برابر بیماری‌ها و عوامل بیماری‌زا مانند باکتری، ویروس و انگل‌های تک یاخته‌ای محافظت می‌کند. بیماری‌های خود ایمنی عمدتاً زمانی رخ می‌دهند که سیستم ایمنی آنتی‌بادی‌هایی را علیه برخی از سلول‌های طبیعی تولید کند. بیماران مبتلا به بیماری‌های خود ایمنی معمولاً کمبود ضداکسیدان‌های غذایی را دارند [۵۸، ۵۹]. عصاره‌های جنین گورخرماهی مکانیسم‌های آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی مقاوم فعال کرده و با عوارض جانبی ناشی از شیمی‌درمانی، هم در مطالعات برون‌تنی و درون‌تنی، مقابله می‌کند [۸]. نتایج نشان داد افزودن عصاره جنین گورخرماهی در مراحل اولیه تکوین موجب افزایش بیان مارکرهای پرتوانی در سلول‌های بنیادی بزرگسال مشتق شده از چربی انسان می‌شود [۱۳]. بنابراین احتمال می‌رود اثرات مفیدی که عصاره جنینی گورخرماهی در انواع سرطان‌های [۸، ۷، ۶] ذکر شده ایجاد کردند به علت اثرات خوب ضداکسیدانی آن باشد.

## نتیجه گیری

نتایج آنالیز تخم گورخرماهی نشان داد که این محصول در مرحله گاسترولا منبع غنی از پروتئین (۳۴/۳ درصد) می‌باشد. مرحله گاسترولا در تست‌های ضداکسیدانی ABTS, DPPH در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب درصد مهارکنندگی ۹۵ و ۵۰ درصد را نشان داد. در بررسی تست ضداکسیدان احیای یون آهن در مرحله گاسترولا بیشترین جذب (۱/۴۵ درصد) را در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نشان داد. در مجموع با توجه به نتایج پژوهش حاضر می‌توان بیان نمود که جنین گورخرماهی منبع بالقوه‌ای از ترکیباتی با خواص ضداکسیدانی بوده و در صورت انجام پژوهش‌های تکمیلی و بررسی عملکرد زیست فعال آن در مدل حیوانی و انسانی، می‌تواند به عنوان مکمل دارویی به منظور افزایش سطح سلامت از طریق بروز عملکرد ضداکسیدانی مورد استفاده قرارگیرد.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند هیچگونه تعارض منافی وجود ندارد.

سه‌م نویسنده‌گان: سیده مهسا حسینی چوپانی (نویسنده اول)، پژوهشگر اصلی (۴۰ درصد)؛ امیر حسین اسماعیلی تمندگانی (نویسنده دوم)، تحلیل‌گر کمکی (۴۰ درصد)؛ مهدی علیخانی (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (۲۰ درصد).

## منابع:

1. Baharvand H, KAZEMI AS. Embryonic stem cells: concepts and potentials. *Cells*: 2005; 178-193. in Persian
2. Brand M, Granato M, Nüsslein-Volhard C. Keeping and raising zebrafish. *Zebrafish: a practical approach*. 2002; 1:7-37.
3. Carpio Y, Estrada MP. Zebrafish as a genetic model organism. *Biocología Aplicada*. 2006;23(4):265-70.
4. Canaider S, Maioli M, Facchin F, Bianconi E, Santaniello S, Pigliaru G, Ljungberg L, Burigana F, Bianchi F, Olivi E, Tremolada C. Human stem cell exposure to developmental stage zebrafish extracts: a novel strategy for tuning stemness and senescence patterning. *CellR4*. 2014;2(5): e1226.
5. Gemberling M, Bailey TJ, Hyde DR, Poss KD. The zebrafish as a model for complex tissue regeneration. *Trends in Genetics*. 2013 Nov 1;29(11):611-20.
6. Livraghi T, Meloni F, Frosi A, Lazzaroni S, Bizzarri M, Frati L, Biava PM. Treatment with stem cell differentiation stage factors of intermediate-advanced hepatocellular carcinoma: an open randomized clinical trial. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*. 2005 Jul 1;15(7-8):399-408.
7. Proietti S, Cucina A, Giuliani A, Verna R, Palombi E, Bava PM, Pensotti A. Fish protein extract enhances clinical response to salvage chemotherapy in colon cancer patients. *Organisms. Journal of Biological Sciences*. 2018 Dec 21;2(2):81-90.
8. Proietti S, Cucina A, Pensotti A, Biava PM, Minini M, Monti N, Catizone A, Ricci G, Leonetti E, Harrath AH, Alwasel SH. Active fraction from embryo fish extracts induces reversion of the malignant invasive phenotype in breast cancer through down-regulation of TCTP and modulation of E-cadherin/ $\beta$ -catenin pathway. *International journal of molecular sciences*. 2019 Apr 30;20(9):2151.
9. Livraghi T, Ceriani R, Palmisano A, Pedicini V, G Pich M, A Tommasini M, Torzilli G. Complete response in 5 out of 38 patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with stem cell differentiation stage factors: case reports from a single centre. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2011 Feb 1;12(2):254-60.
10. D'Anselmi F, Cucina A, M Biava P, Proietti S, Coluccia P, Frati L, Bizzarri M. Zebrafish stem cell differentiation stage factors suppress Bcl-xL release and enhance 5-Fu-mediated apoptosis in colon cancer cells. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2011 Feb 1;12(2):261-7.
11. Biava PM, Bonizzoni E, Zafiropoulos S, Laudani A, Burigana F, Burian LI, Lotti T. Stem cell growth and differentiation factors from Zebrafish embryo and their role as epigenetic regulators in hair regeneration: Results after transdermal administration using cryopass laser treatment. *Aesthetic Med*. 2020; 6:11-9.
12. Biava PM, Ciaurelli S, Cibelli RB, Pisano G. Stem Cell Differentiation Stage Factors (SCDSFs) Taken from Zebrafish Embryo During Organogenesis and Their Role as Epigenetics Regulators Able to Reverse Neurosensory Hearing Loss.
13. Facchin F, Alviano F, Canaider S, Bianconi E, Rossi M, Bonsi L, Casadei R, Biava PM, Ventura C. Early Developmental Zebrafish Embryo Extract to Modulate Senescence in Multisource Human Mesenchymal Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019 May 29;20(11):2646.
14. Na YR, Seok SH, Kim DJ, Han JH, Kim TH, Jung H, Park JH. Zebrafish embryo extracts promote sphere-forming abilities of human melanoma cell line. *Cancer science*. 2009 Aug;100(8):1429-33.
15. Debnath T, Kim EK, Lee KG, Debnath NC, Mathur R. Antioxidant compounds from marine seaweeds and their mechanism of action. *Journal of Marine Research*. 2020 Mar 1;78(2):131-48.
16. Hajian S. Positive effect of antioxidants on immune system. *Immunopathologia Persa*. 2014 Nov 17;1(1): e02.
17. Vitale GA, Coppola D, Palma Esposito F, Buonocore C, Ausuri J, Tortorella E, de Pascale D. Antioxidant molecules from marine fungi: Methodologies and perspectives. *Antioxidants*. 2020 Nov 26;9(12):1183.
18. Shahidi F, Zhong Y. Bioactive peptides. *Journal of AOAC international*. 2008 Jul 1;91(4):914-31.
19. Rajapakse N, Jung WK, Mendis E, Moon SH, Kim SK. A novel anticoagulant purified from fish protein hydrolysate inhibits factor XIIIa and platelet aggregation. *Life sciences*. 2005 Apr 15;76(22):2607-19.

20. Jiang H, Tong T, Sun J, Xu Y, Zhao Z, Liao D. Purification and characterization of antioxidative peptides from round scad (*Decapterus maruadsi*) muscle protein hydrolysate. *Food Chemistry*. 2014 Jul 1; 154:158-63.
21. Sampath Kumar NS, Nazeer RA, Jaiganesh R. Purification and identification of antioxidant peptides from the skin protein hydrolysate of two marine fishes, horse mackerel (*Magalaspis cordyla*) and croaker (*Otolithes ruber*). *Amino acids*. 2012 May; 42:1641-9.
22. Lee KE, Nho YH, Yun SK, Park SM, Kang S, Yeo H. Caviar extract and its constituent dha inhibits uvb-irradiated skin aging by inducing adiponectin production. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020 May 11;21(9):3383.
23. Roushani Y, Rezaie M, Hosseini SF, Pezeshk S. Comparison of antioxidant properties of hydrolyzed protein and peptide fractions prepared from whitefish (*Rutilus frisii kutum*) eggs. *Utilization and Cultivation of Aquatics*. 2022 May 22;11(1):69-80.in Persian
24. Pourashouri P, Yeganeh S, Shabanpour B. Chemical and microbiological changes of salted Caspian Kutum (*Rutilus frisii kutum*) roe.in Persian
25. Chalamaiah M, Rao GN, Rao DG, Jyothirmayi T. Protein hydrolysates from meriga (*Cirrhinus mrigala*) egg and evaluation of their functional properties. *Food Chemistry*. 2010 Jun 1;120(3):652-7.
26. Górka A, Oklejewicz B, Duda M. Nutrient content and antioxidant properties of eggs of the land snail *Helix aspersa maxima*. *J Nutr Food Sci*. 2017;7(3):594.
27. AOAC. Official methods of analysis (15th ed). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.1990.
28. Webb SE, Miller AL. Ca<sup>2+</sup> signalling and early embryonic patterning during zebrafish development. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*. 2007 Sep;34(9):897-904.
29. Hong Y, Schartl M. Isolation and differentiation of medaka embryonic stem cells. *Embryonic Stem Cell Protocols: Volume 1: Isolation and Characterization*. 2006:3-16.
30. Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, Nakamura T. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of agricultural and food chemistry*. 1992 Jun;40(6):945-8.
31. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*. 1999 May 1;26(9-10):1231-7.
32. Alemán A, Giménez B, Pérez-Santin E, Gómez-Guillén MC, Montero P. Contribution of Leu and Hyp residues to antioxidant and ACE-inhibitory activities of peptide sequences isolated from squid gelatin hydrolysate. *Food chemistry*. 2011 Mar 15;125(2):334-41.
33. Ghiselli A, Serafini M, Maiani G, Azzini E, Ferro-Luzzi A. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radical Biology and Medicine*. 1995 Jan 1;18(1):29-36.
34. Zhu QY, Hackman RM, Ensunsa JL, Holt RR, Keen CL. Antioxidative activities of oolong tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002 Nov 6;50(23):6929-34.
35. Siddhuraju P, Mohan PS, Becker K. Studies on the antioxidant activity of Indian Laburnum (*Cassia fistula* L.): a preliminary assessment of crude extracts from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp. *Food chemistry*. 2002 Oct 1;79(1):61-7.
36. Wong SP, Leong LP, Koh JH. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food chemistry*. 2006 Jan 1;99(4):775-83.
37. Oyaizu M. Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese journal of nutrition and dietetics*. 1986;44(6):307-15.
38. Hughes DA. Effects of dietary antioxidants on the immune function of middle-aged adults. *Proceedings of the Nutrition Society*. 1999 Feb;58(1):79-84.
39. Lesourd B, Mazari L. Nutrition and immunity in the elderly. *Proceedings of the nutrition society*. 1999 Aug;58(3):685-95.
40. A Puertollano M, Puertollano E, Alvarez de Cienfuegos G, A de Pablo M. Dietary antioxidants: immunity and host defense. *Current topics in medicinal chemistry*. 2011 Jul 1;11(14):1752-66.
41. Liu Q, Kong B, Xiong YL, Xia X. Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. *Food chemistry*. 2010 Jan 15;118(2):403-10.
42. Lassoued I, Mora L, Nasri R, Jridi M, Toldrá F, Aristoy MC, Barkia A, Nasri M. Characterization and comparative assessment of antioxidant and ACE inhibitory activities of thornback ray gelatin hydrolysates. *Journal of Functional Foods*. 2015 Mar 1; 13:225-38.

43. Nalinanon S, Benjakul S, Kishimura H, Shahidi F. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. *Food chemistry*. 2011 Feb 15;124(4):1354-62.
44. Liu Q, Kong B, Xiong YL, Xia X. Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. *Food chemistry*. 2010 Jan 15;118(2):403-10.
45. Chalamaiah M, Jyothirmayi T, Diwan PV, Dinesh Kumar B. Antioxidant activity and functional properties of enzymatic protein hydrolysates from common carp (*Cyprinus carpio*) roe (egg). *Journal of food science and technology*. 2015 Sep; 52:5817-25.
46. Intarasirisawat R, Benjakul S, Visessanguan W, Wu J. Antioxidative and functional properties of protein hydrolysate from defatted skipjack (*Katsuwonus pelamis*) roe. *Food chemistry*. 2012 Dec 15;135(4):3039-48.
47. Chalamaiah M, Jyothirmayi T, Bhaskarachary K, Vajreswari A, Hemalatha R, Kumar BD. Chemical composition, molecular mass distribution and antioxidant capacity of rohu (*Labeo rohita*) roe (egg) protein hydrolysates prepared by gastrointestinal proteases. *Food research international*. 2013 Jun 1;52(1):221-9.
48. Nalinanon S, Benjakul S, Kishimura H, Shahidi F. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. *Food chemistry*. 2011 Feb 15;124(4):1354-62.
49. Klompong V, Benjakul S, Kantachote D, Shahidi F. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food chemistry*. 2007 Jan 1;102(4):1317-27.
50. Je JY, Qian ZJ, Byun HG, Kim SK. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry*. 2007 May 1;42(5):840-6.
51. Je JY, Lee KH, Lee MH, Ahn CB. Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. *Food Research International*. 2009 Nov 1;42(9):1266-72.
52. Pauli A, Valen E, Lin MF, Garber M, Vastenhouw NL, Levin JZ, Fan L, Sandelin A, Rinn JL, Regev A, Schier AF. Systematic identification of long noncoding RNAs expressed during zebrafish embryogenesis. *Genome research*. 2012 Mar 1;22(3):577-91.
53. Löbner C, Wee S, Ler SG, Li RH, Carney T, Blackstock W, Gunaratne J. Expanding the zebrafish embryo proteome using multiple fractionation approaches and tandem mass spectrometry. *Proteomics*. 2012 Jun;12(11):1879-82.
54. Singh SK, Rakesh KS, Ramamoorthy K, Pardha Saradhi AV, Idris MM. Proteome profile of zebrafish brain based on Gel LC-ESI MS/MS analysis. *J Proteomics Bioinform*. 2010; 3:135-42.
55. Palmblad M, Henkel CV, Dirks RP, Meijer AH, Deelder AM, Spaink HP. Parallel deep transcriptome and proteome analysis of zebrafish larvae. *BMC research notes*. 2013 Dec;6(1):1-8.
56. Thomas RJ. Yolk distribution and utilization during early development of a teleost embryo (*Brachydanio rerio*). *J. Embryol. Exp. Morphol*. 1968, 19, 203-15.
57. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics*. 1995 Jul;203(3):253-310.
58. Rezaieyazdi Z, Sahebari M, Saadati N, Khodashahi M. Vitamin E and Autoimmune Diseases: A Narrative Review. *Reviews in Clinical Medicine*. 2018 Mar 1;5(2).
59. Khadim RM, Al-Fartusie FS. Antioxidant vitamins and their effect on immune system. In *Journal of Physics: Conference Series* 2021 Mar 1 (Vol. 1853, No. 1, p. 012065). IOP Publishing.

## Investigating the antioxidant activity of zebrafish embryo extract (*Danio rerio*)

Seyedeh Mahsa Hosseini Choupani<sup>1</sup>, Amirhossein Esmaili Tamandgani<sup>2\*</sup>, Mehdi Alikhani<sup>3</sup>

- 1- Department of Aquaculture, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran
- 2- Department of Aquaculture, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran
- 3- Department of Regenerative Medicine, Cell Science Research Center, Royan Institute of Stem Cell Biology and Technology, Tehran, Iran

### ABSTRACT

Zebrafish is considered as a useful laboratory model due to its diverse characteristics, including self-renewal. The embryo of this fish has unique characteristics in the early stages of development, and its effects were observed in various studies. The differentiating factors present in stem cells isolated from zebrafish embryos are effective in improving the functional status of patients, and exposure to zebrafish embryo extracts in the early stages of development may increase the expression of multipotent stem cells and exert positive effects. In this study, we investigated the antioxidant properties of the zebrafish embryo extract in different embryonic stages of development. The Zebrafish egg extract was prepared in different embryonic stages. Its effect in concentrations of 0.5, 1, 1.5 and 2 mg/ml on DPPH free radical scavenging activity, ABTS radical inhibitory activity and iron reducing power (FRAP) were investigated. The studied groups included protein extracts in morula, blastula and gastrula stages. According to the obtained results, the amount of protein varied in different embryonic stages and the amount of protein increased with the progress of fetal growth and the amount of fat decreased. The protein extract in the gastrula stage showed the highest level of DPPH inhibition and iron ion reduction at a concentration of 2 mg/ml compared to the morula and blastula groups ( $P < 0.05$ ). Also, the protein extract in the embryonic stage of blastula had the highest inhibition of ABTS at a concentration of 2 mg/ml compared to other groups ( $P < 0.05$ ). In general, due to the high antioxidant properties observed in zebrafish egg extracts, it can be a promising candidate as a medicinal supplement to increase the level of health through the occurrence of antioxidant activity.

**KEYWORDS:** ABTS, DPPH, FRAP, Antioxidant activity, Embryonic extract, Zebrafish

### ARTICLE TYPE

Original Research

### ARTICLE HISTORY

Received: 24 February 2023

Accepted: 22 May 2023

ePublished: 5 June 2023

\* Corresponding Author:

Email address: Amirh.smiley@modares.ac.ir

Tel:

© Published by Tarbiat Modares University

ISSN: 2322-5513