مجله علوم و فنون شیلات
دوره ۱۲ شماره ۲، بهار ۱۴۰۲، صفحات ۱۱۲ تا ۱۲۱

تاثیر دی اتیل هگزیل فتالات بر برخی پارامترهای ایمنی غیراختصاصی موکوس پوست ماهی کپور معمولی *(Cyprinus carpio)*

نسترن پوراحمدی[۱]، فهیمه طلابیان[۲]، مرتضی کمالی[۳]*

۱) مازندران، آمل، آموزش و پرورش شهرستان آمل

۲) مازندران، محمودآباد، رشته علوم و مهندسی شیلات، دانشگاه غیر انتفاعی خزر محمودآباد

۳) مازندران، نور، گروه علوم و مهندسی شیلات، دانشگاه تربیت مدرس

چکـــیده

در مطالعه حاضر، اثر سمیت دو غلظت ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر دی‌اتیل‌هگزیل‌فتالات(DEHP)، بر برخی سنجه‌های غیر اختصاصی موکوسی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) بررسی شد. ۱۸۰ عدد بچه ماهی کپور معمولی به وزن ۲/۲۲+۱۷/۶۰ گرم از مراکز پرورش ماهیان گرمابی تهیه و پس از انتقال به حوضچه‌های ۱۰۰ لیتری قرار داده شدند. آزمایش شامل سه تیمار و سه تکرار طراحی شد. در انتهای دوره پارامترهای لایزوزیم، آلکالین فسفاتاز، پروتئینن محلول و ایمونوگلوبولین موکوس پوست ماهی کپور اندازه‌گیری و ارزیابی شد. نتایج نشان داد که میزان سنجه‌های لایزوزیم، آلکالین فسفاتاز و ایمونوگلوبولین موکوس پوست ماهی کپور معمولی در رویارویی با DEHP با افزایش غلظت و مدت زمان رویارویی، کاهش یافت و میزان پروتئین محلول کل موکوس پوست ماهی کپور معمولی در رویارویی با DEHP با افزایش غلظت و مدت زمان رویارویی، افزایش یافت. با توجه به حساسیت موکوس پوست ماهی نسبت به آلاینده‌ها و سموم میتواند نشانگر زیستی مناسبی برای نشان دادن آلاینده‌ها و سموم باشد و مصرف زیاد مواد پلیمری مانند فتالات استرها میتواند هشداردهنده برای سلامتی آبزیان و انسان‌ها باشد.

کـــلید واژه‌ها: فتالات استر، موکوس پوست، سنجه‌های ایمنی، کپور معمولی

نوع مقـاله

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۰۱

تاریخ چاپ الکترونیکی: ۱۴۰۲/۰۳/۱۵

***نویسنده مسئول:**
kamalilasem@gmail.com

مقدمه

فتالات‌ها (دی استرهای بنزن- ۱و۲ دی کربوکسیلیک اسید) به طور عمده به عنوان پلاستی‌سایزر (روان کننده) برای افزایش انعطاف پذیری، کارآیی و شفافیت در ساخت پلیمرهای PVC و پلی وینیل استات، پلاستیک، صنایع سلولزی، پلی اتیلن و ... استفاده شدند. اکنون تولید جهانی فتالات‌ها به مقدار ۶ میلیون تن در سال برآورد شده است[۱]. فتالات‌ها به دلیل حجم بالای تولید، استفاده گسترده از آن‌ها در محصولات مختلف به خصوص مواد پلاستیکی، رهاسازی، انتقال آسان و پراکنش وسیع در بخش‌های مختلف محیط زیست به عنوان یک آلاینده مختل کننده سیستم هورمونی درون‌ریز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند، به طوری‌که جزء فراوان‌ترین آلاینده‌های محیط زیست هستند. در حال حاضر استفاده از فتالات‌ها در بسیاری از محصولات در اتحادیه اروپا و آمریکا به دلیل مضرات آن حذف شده است و EPA [۱] (آژانس حفاظت محیط زیست) نیز فتالات‌ها را در لیست اولویت‌های مواد شیمیایی تحت بررسی خود قرار داده است و به همین دلیل فتالات‌ها موضوع مهمی از نظر امنیت محیط زیست جهانی به شمار می‌روند و به همین دلیل ترکیبات مناسبی برای ارزیابی خطرات اکولوژیک (ERA)[۲] در محیط‌های آبی هستند[۲]. تولید زیاد، استفاده گسترده از مواد پلاستیکی حاوی فتالات استرها، رهاسازی آسان در طبیعت به دلیل عدم وجود پیوند شیمیایی با مواد پایه و خاصیت مختل‌کنندگی غدد درون ریز باعث می‌شود که فتالات استرها به عنوان گروهی از آلاینده‌ها با پتانسیل قوی برای ورود به اکوسیستم‌های آبی و تاثیر بر تولید مثل جانوران آبزی مطرح باشند. فتالات‌ها از طریق ورود فاضلاب خانگی، کشاورزی، صنعتی، شیرابه‌های مواد زائد، رواناب حاصل از

[1] Environmental Protection Agency
[2] Ecological Risk Assessment

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-04-06]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1402.12.2.2.8]

بارندگی، پراکندگی زباله‌های پلاستیکی و ... وارد اکوسیستم‌های آبی می‌شوند و به همین دلیل فتالات‌ها با مقادیر فراوان در محیط‌های آبی حضور دارند. این مواد به دلیل چربی دوستی و تجزیه آرام در شرایط بی‌هوازی اغلب در غلظت‌های زیاد در رسوبات نیز وجود دارند[۳]. تحقیقات نشان داده است که مقدار فتالات‌ها در آب از طریق تجزیه نوری، هیدرولیز و تجزیه زیستی در شرایط هوازی کاهش می‌یابد. به همین دلیل فتالات‌ها به عنوان عوامل سمیت حاد در محیط‌های آبی بررسی نمی‌شوند، بلکه به دلیل رهاسازی و ورود ممتد این مواد به سیستم‌های آبی، رویارویی مزمن و طولانی مدت با فتالات‌ها عمده ترین نگرانی است. تاکنون سمیت مزمن این مواد در زمینه سرطان‌زایی و تاثیر بر هورمون‌های تولید مثلی، نقص در تولید مثل اثبات شده است. DEHP با فرمول شیمیایی $C_{24}H_{38}O_4$، حدود ۴۰ درصد از کل تولید جهانی فتالات را به تنهایی به خود اختصاص داده است. این ترکیب کاربرد وسیعی در تولید پلیمرها و انعطاف پذیری در پلیمرهای PVC دارد و در ساخت مصالح ساختمانی، اسباب بازی، کفپوش، لوازم پزشکی و ... به کار می‌رود. دی‌اتیل هگزیل فتالات در اکوسیستم‌های آبی، با خاصیت آب‌گریزی و حلالیت کم در آب تمایل زیادی به جذب شدن به مواد معلق آلی و کلوئیدها دارد که این امر بر میزان حضور در آب، رسوب و به تبع آن سمیت آن موثر است[۱].

سیستم ایمنی ماهی‌ها در دفاع در برابر عوامل استرس‌زا ضروری است. هر بخش سیستم ایمنی ارزش محافظتی خاص خود را دارد و ترکیب نهایی این بخش‌ها به پاسخ ایمنی مناسب منتج خواهد شد[۴]. از آنجاکه بیشتر آلاینده ها و عوامل عفونی فرآیند عفونت‌زایی را در سطح مخاطی آغاز می‌کنند یا بر این سطوح اثر می‌گذارند، پاسخ ایمنی مخاطی نقش مهمی در برابر آلاینده و عوامل عفونی دارد [۵] و مطالعات زیادی برای آزمایش ترکیب سلولی و مولکولی آنها در گونه‌های مختلف آغاز شده است. پوست، آبشش و لوله گوارش ماهیان، سطح زیادی (بیشتر از دیگر مهره‌داران) برای هجوم عوامل بیماری‌زای احتمالی فراهم می‌کند [۶]. برای جلوگیری و کنترل آلاینده‌ها و بیماری‌های عفونی آگاهی عمیق از سازوکارهای موجود در موکوس اهمیت دارد. بنابراین بررسی دفاع ایمونولوژیکی موکوس پوست به عنوان بخش مهمی از سیستم ایمنی حائز اهمیت است. در ماهی‌ها لایه موکوس اپیدرم را می‌پوشاند. ساختار و عملکرد آن نشان‌دهنده سازگاری ماهی‌ها با ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی و زیست‌محیطی است. محیط‌زیست آبی مملو از آلاینده‌ها و موجودات بیماری‌زاست[۷]. بنابراین، پوست ماهیان و سایر مهره‌داران آبزی به عنوان خط مقدم در برابر هجوم عوامل بیماری‌زای محیط اهمیت زیادی دارد. به دلیل تماس ماهی‌ها با محیط، بیماری‌های پوستی ماهی‌ها نسبت به مهره‌داران خشکی نسبتاً رایج‌تر است. پوست ماهی‌ها اندامی چندکاره است و ممکن است نقش مهمی در حفاظت، ارتباطات، دریافت حسی، حرکت، تنفس، تنظیم یونی و اسمزی، دفع و تنظیم دمایی داشته باشد[۸]. موکوس مایع پیچیده‌ای است و ترکیب آن در سراسر سطح اپیتلیال متفاوت است. موکوس پوست در معرض محیط پیرامونی است. عملکرد متفاوتی برای موکوس ماهی بیان شده است و نقش آنها به‌عنوان ترکیب کلیدی در ایمنی ماهی‌ها مورد توجه قرار گرفته است. نقش دفاعی موکوس در مقاومت به بیماری مورد مطالعه قرار گرفته است[۹]. علاوه بر این، موکوس پوست ماهی محیطی را فراهم می‌کند که در آن سازوکار ضدباکتریایی عمل می‌کند. موکوس پوست ماهی به‌عنوان مخزنی از انواع مواد زیست فعال و همچنین مولکول‌های دفاعی مختلف از هر دو دستگاه ایمنی ذاتی و اکتسابی[3] عمل می‌کند[۱۰][۱۱]. موکوس پوست ماهی‌ها حاوی انواع مولکول‌های زیست فعال (ازجمله مولکول‌های دفاعی) است. مواد زیادی با فعالیت مهار میکروارگانیسم‌ها و زیست‌کش (مانند کمپلمانت، پروتئین‌های واکنشی سی [4](C-reactive)، پروتئازها، لکتین‌ها، لایزوزیم، همولیزین‌ها، آگلوتینین، آنزیم‌های پروتئولتیک، پپتیدهای ضدمیکروبی، آنتی‌بادی‌ها، ایمنوگلوبین‌ها) وجود دارند و در موکوس‌های اپیدرمی و یا پوستی شناسایی شده‌اند[۴][۱۲].

لایزوزیم، پروتئین محلول کل، ایمونوگلوبولین و آنزیم فسفاتاز قلیایی از سنجه هایی هستند که به شدت تحت تاثیر عوامل استرس‌زای محیطی بخصوص آلاینده‌ها و عوامل بیماریزا هستند. به همین علت این سنجه‌ها می‌تواند شاخص‌های مناسبی جهت سنجش آسیب‌رسانی آلاینده‌ها و عوامل بیماریزا به موجودات آبزی بخصوص ماهی باشد[۱۳] [۱۴] [۱۵].

[3] Innate and Acquired Immune System
1-C-reactive Proteins

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-04-06]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1402.12.2.2.8]

در این تحقیق سعی شده که تاثیر DEHP بر برخی سنجه‌های ایمنی غیراختصاصی در موکوس پوست ماهی کپور معمولی مورد بررسی قرار گرفتکه اثرات منفی احتمالی آن در ماهی کپور معمولی به عنوان یکی از منابع پروتئینی پر مصرف مشخص گردد.

مواد و روش‌ها

آزمایش شامل۳ تیمار و ۳ تکرار طراحی شده که طی آن ۲ تیمار با غلظت ۰/۱ و ۱ میلی گرم بر لیتر DEHP و یک تیمار هم به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. داخل هر حوضچه ۲۰ عدد ماهی قرار داده شد[۱۶]. آزمایش سمیت حاد و تحت حاد مطابق روش استاندارد سازمان همکاری و توسعه اقتصادی (OECD) به مدت ۹۶ ساعت و تحت شرایط ساکن با تعویض آب و تجدید غلظت‌ها انجام شد[۱۷]. در طول دوره رویارویی ماهی با آلاینده، سایر شرایط فیزیکو شیمیایی آب بطور نرمال برای همه حوضچه ها تنظیم گردید.

جمع‌آوری موکوس براساس روش[۱۸] با کمی اصلاحات انجام شد. ۱۸۰ عدد بچه ماهی کپور معمولی به وزن ۱۵ تا ۲۰ گرم از مراکز پرورش ماهیان گرمابی تهیه و پس از انتقال به حوضچه های ۱۰۰ لیتری پرورش که از قبل ضد عفونی شده بود، قرار داده شدند. ماهیان به مدت یک هفته جهت سازگاری نگهداری شده و در طی این مدت با غذای مناسب به میزان دوبار در روز غذادهی شدند.

از هر حوضچه ۵ عدد ماهی به صورت تصادفی نمونه‌برداری و پس از بیهوشی با ۵۰ میلی‌گرم در لیتر پودر گل میخک به صورت انفرادی درون کیسه‌های پلی‌اتیلنی (زیپ پلاست) حاوی ۱۰ میلی‌لیتر سدیم کلرید ۵۰ میلی‌مولار قرار گرفتند. ماهیان از ۲۴ ساعت قبل از نمونه‌برداری غذادهی نشدند. پس از ۲ دقیقه ماهیان از کیسه‌ها خارج و به درون آب پر از اکسیژن قرار گرفتند. موکوس جمع‌آوری شده به لوله‌های سانتریفیوژ استریل ۱۵ میلی‌لیتری منتقل و با دور g × ۱۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند و سوپرناتانت به میکروتیوپ‌های ۱/۵ سی‌سی منتقل شدند. نمونه‌ها درون فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و بعد از آن لیوفیلایز شدند سپس پودر موکوس لیوفیلایزه تا زمان استفاده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند.

سنجش شاخص لایزوزیم، لایزوزیم موکوس بر اساس روش کدورت‌سنجی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر پرکین المر (مدل Lambda 25) و بر مبنای تجزیه باکتری گرم مثبت (*Micrococcus lysodeikticus*) حساس به آنزیم لایزوزیم سنجش شد .برای سنجش این آنزیم از باکتری *Micrococcus luteus* به عنوان سوبسترا استفاده شد. برای تهیه این سوسپانسیون، باکتری لیوفیلیزه شده میکروکوکوس لوتئوس را در بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۴ موالر حل کرده و جذب این محلول در مقابل شاهد)کووت حاوی فسفات سدیم(، در طول موج ۴۵۰ نانومتر، برابر ۰/۷-۰/۶ تنظیم شد. سپس، کاهش در جذب سلـولهای *Micrococcus luteus* در مدت ۱۰ دقیقه ثبت شد که در واقع، یک واحد فعالیت آنزیم، به صورت مقدار آنزیمی که در طول موج ۴۵۰ نانومتر و دمای ۲۵ درجه سانتی گرادکاهشی معادل ۰/۰۰۱ در دقیقه در جذب سلولهای میکروکوکوس لوتئوس ایجاد می‌کند، بیان می‌شود[۱۹].

سنجش شاخص پروتئین کل برای این منظور از منحنی استاندارد آلبومین سرم گاوی استفاده شد. اندازه‌گیری با اضافه کردن معرف رنگی فولین سیوکالتیو فنول (Folin-Ciocalteu's phenol reagent) به ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های رقیقشده موکوس و استاندارد و قرائت نوری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد. با انتقال جذب نوری به دست آمده به منحنی استاندارد، میزان پروتئین محلول بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد[۲۰].

سنجش ایمونوگلوبولین کل ابتدا میزان پروتئین موکوس تعیین و سپس به نمونه موکوس، پلی‌اتیلن گلیکول ۱۲ ٪اضافه شد. پس از ۲ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای اتاق و تاریکی، نمونه‌ها سانتریفیوژ شده (rpm۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه) و غلظت پروتئین در قسمت باالیی محلول بار دیگر اندازه‌گیری شد. در واقع، پلی‌اتیلن گلیکول باعث رسوب ایمونوگلوبولین موجود در پروتئین شد و میزان ایمونوگلوبولین کل از محاسبه اختلاف غلظت پروتئین در نمونه اولیه (پروتئین محلول) و غلظت پروتئین پس از افزودن پلی‌اتیلن گلیکول محاسبه شد[۲۰].

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-04-06]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1402.12.2.2.8]

سنجش شاخص آنزیم فسفاتاز قلیایی فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی موکوس با استفاده از کیت تجاری شرکت پارس آزمون بر اساس پروتکل ارائه شده توسط شرکت سنجش شد. میزان جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر پرکین المر (Lambda 25) و با طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده و سپس با استفاده از ضریب مشخص، عدد نهایی محاسبه شد[۲۱].

نتایج

پس از بررسی و تجزیه تحلیل آماری داده‌های تیمارهای آزمایشی، نشان داد که میزان لایزوزیم موکوس پوست ماهی کپور معمولی در رویارویی با DEHP در تیمار غلظتی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر اختلاف معنی داری با گروه شاهد در مدت ۴ ساعت رویارویی نداشت. اما میزان لایزوزیم تیمار غلظتی ۱ میلی‌گرم در لیتر DEHP در مدت ۴ ساعت رویارویی با گروه شاهد و تیمار غلظتی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر DEHP نشان داد (P<۰/۰۵). بر اساس تجزیه و تحلیل داده‌ها منتج از آزمایشات در مدت زمان ۹۶ ساعت رویارویی، میزان لایزوزیم پوست ماهی کپور معمولی در تیمار غلظتی ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر اختلاف معنی داری در سطح ۹۵٪ با یکدیگر و گروه شاهد داشتند. همچنین مشاهده گردید میزان لایزوزیم موکوس پوست ماهی کپور معمولی در رویارویی با DEHP با افزایش غلظت DEHP و مدت زمان رویارویی، روند کاهشی نشان داد (جدول ۱).

جدول ۱: میزان لایزوزیم موکوس پوست بچه ماهی کپور معمولی در رویارویی با DEHP

تیمار DEHP	شاهد	غلظت ۰/۱ mg/l	غلظت ۱mg/l
میزان لایزوزیم موکوس ساعت ۴	۷۹/۲۳±۱/۶^{a}	۷۵/۶۷±۱/۹^{a}	۴۹±۳/۱^{b}
میزان لایزوزیم موکوس ساعت ۹۶	۷۸/۸۱±۲/۱^{a}	۶۴/۳۶±۲/۲^{b}	۳۲/۳۱±۲/۶^{c}

در هر ردیف میانگین‌های دارای حروف بالانویس غیرمشترک اختلاف معنی دار دارند (P<۰/۰۵)

نتایج آماری داده‌ها نشان داد که میزان آلکالین فسفاتاز موکوس پوست ماهی در رویارویی با DEHP با افزایش غلظت و زمان رویارویی روند کاهشی داشته است. میزان آلکالین فسفاتاز پوست ماهی در رویارویی با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر DEHP در مدت زمان ۴ ساعت با گروه شاهد و تیمار غلظتی ۱ میلی‌گرم بر لیتر اختلاف معنی داری نداشت، اما میزانش در تیمار غلظتی ۱ میلی‌گرم در لیتر در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی دار در سطح ۹۵٪ نشان داد (جدول ۲). در مدت مواجه ۹۶ ساعت ماهی کپور معمولی با DEHP، میزان آلکالین فسفاتاز در موکوس پوست ماهی در رویارویی با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر DEHP در مدت زمان ۹۶ ساعت با گروه شاهد و غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر آن اختلاف معنی‌داری نشان نداد. میزان آلکالین فسفاتاز موکوس پوست ماهی کپور معمولی در تیمار غلظتی ۱ میلی‌گرم در لیتر با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری داشت (جدول ۲).

جدول ۲: میزان آلکالین فسفاتاز موکوس پوست بچه ماهی کپور معمولی در رویارویی با DEHP

تیمار DEHP	شاهد	غلظت ۰/۱ mg/l	غلظت ۱mg/l
آلکالین فسفاتاز ساعت ۴	۲۷/۳۱±۱/۱۱^{a}	۲۵/۶۱±۲/۱^{ab}	۲۳/۷۹±۰/۹^{b}
آلکالین فسفاتاز ساعت ۹۶	۲۹/۰۲±۱/۱۶^{a}	۲۲/۲۶±۳/۰۱ ^{ab}	۱۸/۰۸±۱/۱۲ ^{b}

در هر ردیف میانگین‌های دارای حروف بالانویس غیرمشترک اختلاف معنی دار دارند (P<۰/۰۵)

تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که میزان پروتئین محلول موکوس پوست ماهی کپور معمولی در رویارویی با DEHP با افزایش غلظت و مدت زمان رویارویی افزایش یافت. میزان پروتئین محلول موکوس پوست ماهی کپور معمولی در تیمارهای غلظتی ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر DEHP در مدت زمان ۴ و ۹۶ ساعت رویارویی اختلاف معنی‌داری در سطح ۹۵٪ با گروه شاهد نشان داد و همچنین بین این دو تیمار غلظتی اختلاف معنی‌دار وجود داشت (P<۰/۰۵) (جدول ۳).

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-04-06]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1402.12.2.2.8]

جدول ۳: میزان پروتئین محلول موکوس پوست بچه ماهی کپور معمولی در رویارویی با DEHP

تیمار DEHP	شاهد	غلظت ۰/۱ mg/l	غلظت ۱mg/l
پروتئین محلول موکوس ساعت ۴	۱/۴۳±۰/۰۳^{a}	۱/۵۴±۰/۰۵^{b}	۱/۷۱±۰/۰۵^{c}
پروتئین محلول موکوس ساعت ۹۶	۱/۴۵±۰/۰۴^{a}	۱/۶۷±۰/۰۶^{b}	۲/۰۳±۰/۰۷^{c}

در هر ردیف میانگین‌های دارای حروف بالانویس غیرمشترک اختلاف معنی دار دارند (P<۰/۰۵)

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که میزان غلظت ایمونوگلوبولین موکوس پوست ماهی کپور معمولی در رویارویی با DEHP، با افزایش غلظت DEHP و مدت زمان رویارویی روند کاهشی داشت. میزان غلظت ایمونوگلوبولین موکوس پوست ماهی در رویارویی با DEHP در تیمارهای غلظتی ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر در مدت زمان رویارویی ۴ ساعت اختلاف معنی‌داری در سطح ۹۵٪ نشان نداد و این دو گروه نسبت به هم در این مدت اختلاف معنی داری نداشت. اما میزان غلظت ایمونوگلوبولین موکوس پوست ماهی در مدت رویارویی ۹۶ ساعت، هر دو تیمار غلظتی ۰/۱ و ۱ DEHP اختلاف معنی دار بین گروه های مختلف با گروه شاهد در سطح ۹۵٪ مشاهده گردید (جدول ۴).

جدول ۴: میزان ایمونوگلوبولین موکوس پوست بچه ماهی کپور معمولی در رویارویی با DEHP

تیمار DEHP	شاهد	غلظت ۰/۱ mg/l	غلظت ۱mg/l
ایمونوگلوبولین ساعت ۴	۲/۳۱±۰/۲۱^{a}	۲/۰۱±۰/۱۳^{a}	۱/۸۷±۰/۴۱^{a}
ایمونوگلوبولین ساعت ۹۶	۲/۳۱±۰/۱۹^{a}	۱/۵۱±۰/۰۷^{b}	۱/۲۳±۰/۱۴^{b}

در هر ردیف میانگین‌های دارای حروف بالانویس غیرمشترک اختلاف معنی دار دارند (P<۰/۰۵)

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به افزایش رو به رشد پرورش ماهیان آبهای شور و شیرین و همچنین آلاینده های محیطی که با عوامل استرس‌زای زیادی همراه است و بر شرایط زندگی ماهی تأثیر منفی میگذارند و موجب ضعف فیزیولوژیک و افزایش حساسیت ماهی به آلاینده‌ها و عوامل بیماریزا شده، همچنین راهی برای بروز طیف وسیعی از بیماریها می‌گردد. ماهی‌ها جهت زندگی در محیط‌های آبی در شرایط مختلف دارای عوامل مختلفی جهت حفاظت خود در شرایط استری‌زای محیطی هستند که موکوس یکی از این عوامل حفاظتی در برابر شرایط استرس‌زای محیط می باشد[۲۲]. ماهیان برای زندگی در محیط‌های آبی دارای عوامل مختلف سازگاری می‌باشند که از آنها در مقابل عوامل استرس‌زا محافظت می‌کنند. یکی از این عوامل، موکوس پوست می‌باشد. ماهییت ایمنی موکوسی نقش کلیدی در دستگاه دفاعی بدن بر عهده دارد. از دیگر ویژگی‌های این بافت همیشگی بودن آن و دور انداختن بافت‌های مرده و تولید مداوم آن است که از اتصال عوامل استرسزا و بیماری‌زا جلوگیری می‌کند[۲۳].

پوست ماهی به عنوان اولین اندام دفاعی بدن ماهی تحت شرایط مختلف استرس واکنش متفاوتی خواهد داشت و از مهمترین واکنش‌های پوست، تغییر در ترکیبات ایمنی غیراختصاصی موکوس پوست ماهی می‌باشد. در سنجه‌های ایمنی غیراختصاصی موکوس تحت شرایط مختلف استرس تغییراتی ایجاد می‌شود که می‌تواند شاخص مناسبی جهت تشخیص شرایط محیطی باشد .در این تحقیق نیز تغییراتی در سنجه‌های ایمنی غیراختصاصی موکوس تحت دو غلظت ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر DEHP به وجود آمده است.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-04-06]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1402.12.2.2.8]

لایزوزیم آنزیمی در دستگاه ایمنی غیر اختصاصی است که نشان‌دهنده مناسبی برای وضعیت ایمنی موجود باشد. این آنزیم اهمیت زیادی در ایمنی ذاتی موکوس پوست ماهیان دارد و میزان آن در شرایط مختلف محیطی مثل دما، شوری، غذا، استرس و غیره متفاوت است[۲۴]. اندازه‌گیری آنزیم لایزوزیم در موکوس پوست ماهی معمولی در رویارویی با DEHP در دو تیمار غلظتی ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر در دو زمان ۴ و ۹۶ ساعته نشان داد که روند کاهشی از لحاظ غلظت داشت که نشان‌دهنده کاهش قدرت ایمنی در ماهی شده است. در حقیقت آلاینده DEHP مانع تولید لایزوزیم در موکوس پوست شد. نکته قابل اهمیت در کاهش تولید آنزیم لایزوزیم در موجهه با آلاینده‌ها و سموم در این است که ماهیان در برابر عوامل استرس‌زا ابتدا شرایط ایمنی بدن را افزایش می دهند، اما در رویارویی با DEHP، کاهش یافت و از لحاظ آماری این کاهش بجز در تیمار غلظتی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر در مدت ۴ ساعت رویارویی اختلاف معنی‌داری داشت و این می‌توان نکته مهمی در تاثیر این آلاینده بر شرایط فیزیولوژیک ماهی کپور معمولی باشد.

آنزیم آلکالین فسفاتاز یکی از ترکیبات مهم موکوس پوست ماهی است که به دلیل فعالیت تجزیه کنندگی، عاملی مهمی جهت ضد فعالیت آلاینده‌ها، سموم و باکتریایی می‌باشد. این آنزیم نقش حفاظتی در برابر عفونتهای انگلی و بهبود زخم ناشی از عوامل مختلف دارد و همچنین، باعث مقاومت ماهی در برابر استرس، آلاینده‌ها و عوامل بیماریزا می‌شود[۲۵]. میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز اندازه‌گیری شده در موکوس پوست ماهی کپور معمولی در رویارویی با تیمار غلظتی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر DEHP در مدت ۴ و ۹۶ ساعت روند کاهشی داشته اما از لحاظ آماری در سطح ۹۵٪ اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد مشاهده نگردید. اما در رویارویی با تیمار غلظتی ۱ میلی‌گرم در لیتر در مدت ۴ و ۹۶ اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید. آنچه قابل توجه است روند کاهشی میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز که نشان‌دهنده تاثیر تخریبی آلاینده DEHP در ساختار تولید این آنزیم می‌باشد.

پروتئین محلول کل یکی از شاخص‌های ایمنی با باندهای کربوهیدراتی است که به همراه فاکتورهای مختلف موکوس، در هنگام موجهه با عوامل استرس‌زا نقش آگلوتینه کردن آنها را برعهده دارند و باعث محافظت در برابر آلاینده‌ها، سموم و عفونتهای ناشی از انگل‌ها می‌شوند[۲۶]. اندازه‌گیری پروتئین محلول کل در موکوس پوست ماهی کپور در رویارویی با DEHP در دو تیمار غلظتی ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر در مدت رویارویی ۴ و ۹۶ ساعت نشان داد که میزان آن از لحاظ آماری در سطح ۹۵٪ بصورت معنی‌داری افزایش یافت که موجب افزایش ایمنی در ماهیان می‌شود که در مقایسه با تاثیر DEHP بر دو شاخص آنزیم لایزوزیم و آلکالین فسفاتاز که در جهت کاهش ایمنی بود، قابل توجه می باشد.

ایمونوگلوبولین پروتئینی است که در ایمنی اختصاصی نقش دارد. این پروتئین توسط لنفوسیتهای B که بیشترین توانایی تولید ایمونوگلوبولین را دارند ترشح، و سبب افزایش ظرفیت دستگاه ایمنی می‌شوند. داده‌های منتج از اندازه‌گیری ایمونوگلوبولین موکوس پوست ماهی کپور روند کاهشی داشته و در مدت مواجه ۴ ساعت با DEHP اختلاف معنی داری بین تیمارهای مختلف با گروه شاهد مشاهده نگردید اما در مدت ۹۶ ساعت موجهه اختلاف معنی‌داری در سطح ۹۵٪ مشاهده شد که نشان‌دهنده کاهش ایمنی ماهی در برابر این آلاینده می باشد.

نتیجه گیری کلی

لایه موکوس پوست ماهیان اولین سد دفاعی در مقابل آلاینده‌ها و پاتوژن‌هاست و حاوی عوامل ایمنی غیراختصاصی مختلفی است .اجزای مواد موکوس پوست در گونه‌های مختلف ماهیان متفاوت بوده و این امر سبب تفاوت در واکنش و مقاومت ماهیان در برابر عوامل استرس‌زا می‌گردد. شرایط فیزیکو شیمیایی و آلاینده‌ها بر دستگاه ایمنی ذاتی و همچنین اجزای ترکیبات موکوس تأثیر گذاشته و سبب تفاوت ترکیبات موکوسی می‌شود. در این تحقیق ماده DEHP نهه تنها به‌عنوان تحریک‌کننده سیستم ایمنی ماههی از خود نشان داده است بلکه می توان گفت که قدرت تخریبی سیستم ایمنی در موکوس پوست ماهی را نیز دارد. با توجه به تغییرات ترکیبات بیوشیمیایی موکوس پوست ماهی از جمله روند تغیرات

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-04-06]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1402.12.2.2.8]

سنجه‌های ایمنی غیر اختصاصی موکوس پوست ماهی، می‌توان با مطالعات گسترده‌تر به موکوس پوست ماهیان به‌عنوان روشی ساده، کم هزینه و غیرتهاجمی و غیرکشنده برای بررسی اثرات آلاینده‌ها و عوامل پاتوژن توجه کرد.

منابع

1- Magdouli, S, et al., (2013), "Di 2-ethylhexylphtalate in the aquatic and terrestrial environment: A critical review". Journal of environmental management, 127, pp. 36-49.
2- Bhatia, H, et al., (2014), "Di-n-butyl phthalate causes estrogenic effects in adult male Murray rainbowfish (Melanotaenia fluviatilis)". Aquatic Toxicology, 149, pp. 103-115.
3- Zheng, X., Zheng, B. T., & Teng, Y., (2014), "Distribution of phthalate acid esters in lakes of Beijing and its relationship with anthropogenic activities". The Science of the total environment, 476-477, pp. 107-113.
4- Whyte, S. K., (2007), "The innate immune response of finfish—a review of current knowledge", Fish and Shellfish Immunology, vol. 23, no. 6, pp. 1127–1151.
5- McNeilly, T. N., Naylor, S. W., Mahajan, A.et al., (2008), "Escherichia coli O157:H7 colonization in cattle following systemic and mucosal immunization with purified H7 flagellin", Infection and Immunity, vol. 76, no. 6, pp. 2594–2602.
6- Rajan, B., Fernandes, J. M. O., Caipang, C. M. A., Kiron, V., Rombout, J. H. W. M., and Brinchmann, M. F., (2011), "Proteome reference map of the skin mucus of Atlantic cod (Gadus morhua) revealing immune competent molecules", Fish and Shellfish Immunology, vol. 31, no. 2, pp. 224–231.
7- Salinas, I., Zhang, Y. A., Sunyer, J. O., (2011), "Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish", Developmental and Comparative Immunolology, vol. 35, no. 12, pp. 1346– 1365.
8- Marshall, W. S., Bellamy, D., (2010), "The 50 year evolution of in vitro systems to reveal salt transport functions of teleost fish gills", Comparative Biochemistry and Physiology. *A*, vol. 155, no. 3, pp. 275–280.
9- Pinky, S., Mittal, S., Mittal, A. K., (2008), "Glycoproteins in the epithelium of lips and associated structures of a hill stream fish Garra lamta (Cyprinidae, Cypriniformes): a histochemical investigation", Journal of Veterinary Medicine Series C, vol. 37, no. 2, pp. 101–113.
10- Huang, Z. H., Ma, A. J., Wang, X. A., (2011), "The immune response of turbot, Scophthalmus maximus (L.), skin to high water temperature", Journal of Fish Diseases, vol. 34, no. 8, pp. 619–627.
11- Tadiso, T. M., Sharma, A., Hordvik, I., (2011), "Analysis of poly- meric immunoglobulin receptor- and CD300-like molecules from Atlantic salmon", Molecular Immunology, vol. 49, no. 3, pp. 462–473.
12- Palaksha, K. J., Shin, G. W., Kim, Y. R., Jung, T. S., (2008), "Evaluation of non-specific immune components from the skin mucus of olive flounder (Paralichthys olivaceus)", Fish and Shellfish Immunology, vol. 24, no. 4, pp. 479–488.
13- Nigam, A. K., Kumari, U., Mittal, S., and Mittal, A. K., (2012), "Comparative analysis of innate immune parameters of the skin mucous secretions from certain freshwater teleosts, inhabiting different ecological niches", Fish Physiology and Biochemistry, vol. 38, no. 5, pp. 1245–1256.
14- Subramanian, S., MacKinnon, S.L., Ross, N.W. 2007. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. Comparative Biochemistry and Physiology 148B: 256-263.
15- Saurabh S., Sahoo, P. K., (2008), "Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system", Aquaculture Research, vol. 39, no. 3, pp. 223–239.
16- Hakim, Y.; Ali, H.A.; (2014). Evaluation of the toxic effects of phtalate; Di-nButule Phthalate (DBP) on health of Oreochromis niloticus. World J. Fish Marine Sci.
17- OECD 203; (2010). OECD guideline for testing chemicals. Test No. 203: Acute Fish Test
18- Ross, N. W., Subramanian, S., and Mackinnon, S. L., (2007), "A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species", Comparative Biochemistry and physiology part B: Biochemistry and Molecular Biology 148(3) 256-263.
19- Subramanian, S., MacKinnon, S.L., Ross, N.W. 2007. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. Comparative Biochemistry and Physiology 148B: 256-263.
20- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry 193: 265-275.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-04-06]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1402.12.2.2.8]

21- Smith, D.R., Padilla, W.J., Vier, D., NematNasser, S.C., Schultz, S. 2000. Composite medium with simultaneously negative permeability and permittivity. Physical Review Letters 84: 41-84.
22- Raj, V.S.; Fournier, G.; Rakus, K.; Ronsmans, M. Ouyang, P.; Michel, B.; (2011). Skin mucus of Cyprinus carpio inhibits cyprinid herpesvirus 3 binding to epidermal cells; Veterinary research; 1: 42-92.
23- Lazado, C. C., Caipang, C. M. A., (2014), "Mucosal immunity and probiotics in fish", Fish and shellfish immunology. 39: 78-89.
24- Kolangi Miandare, H., Farvardin, Sh., Shabani, A., Hoseinifar, S.H., Ramezanpour, S. 2016. The effects of galacto-oligosacharide on systemic and mucosal immune response, growth performance and appetite related gene transcript in goldfish (Carassius auratus gibelio). Fish and Shellfish Immunology 55: 479-483.
25- Suzuki, Y., Tasumi, S., Tsutsui, Sh., Okamoto, M., and Suetake, H., (2003), "Molecular diversity of skin mucus lectins in fish". Comprative Biochemistry and Physiology Part B 136: 723-730.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-04-06]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1402.12.2.2.8]

Journal of Fisheries Science and Technology
Volum12, Issue 2, Spring 2023
Pages: 112-121

The effect of diethylhexyl phthalate on some non-specific immune parameters of common carp skin mucus *(Cyprinus carpio)*

Nastaran Pourahmadi[1], Fahime Talabian[2], Morteza Kamali[3]*

1) Mazandaran, Amol, Amol city education

2) Mazandaran, Mahmoudabad, Fisheries Science and Engineering, non-profit Caspian University Mahmoudabad

3) Mazandaran, Noor, Department of Fisheries Science and Engineering, Tribet Modares University

A B S T R A C T

In the present study, the effect of phthalate ester toxicity (0.1 and 1 mg/L) was investigated on some non-specific mucus parameters of common carp (*Cyprinus carpio*). 180 common carp (17.60±2.22gr) is gathered from warm water fish center and they were allocated into 9 tanks (20 Fish per tank). Fish adapted to new condition for a week. During this time; they were feed twice a day with same diets. Fishes were exposed at 3 concentration treatments containing 0; 0.1 and 1 mg/L DEHP under laboratory condition (25±0.5°C; pH: 7.4-8) for a period of 96 hours. Alkaline phosphatase, lysozyme, soluble protein, and immunoglobulin of mucus was measured and evaluated. The results showed that the levels of lysozyme, alkaline phosphatase and immunoglobulin in common carp skin mucus decreased when exposed to DEHP (with increasing concentration and exposure duration) And the level of soluble protein of common carp skin mucus increased when exposed to DEHP (with increasing concentration and exposure duration). These results indicated that concentrations of DEHP beneficially affects Amino Acid profiles of skin mucus in carp and they were categorized in 4 branches. There were Significant differences between exposed and control groups. Therefore; fish skin mucus can be a biomarker for showing contaminants and toxins. And the high consumption of plastic materials can be a warning to the health of aquatic animals and humans.

KEYWORDS: Phthalate esters, Skin Mucus, Im Common carp

ARTICLE TYPE

Original Research

ARTICLE HISTORY

Received:24 February 2023

Accepted:22 May 2023

ePublished:5 June 2023

* Corresponding Author:
Email address: kamalilasem@gmail.com
Tel:
© Published by Tarbiat Modares University
ISSN: 2322-5513

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-04-06]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1402.12.2.2.8]