اثر مسمومیت با آمونیاک و نیتریت بر مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی ماهیان

طراوت ملایم رفتار *، رحیم پیغان
گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز
*نویسنده مسوول: taravat.fishery@gmail.com

چکیده

وجود ترکیبات نیتروژنی مثل آمونیاک و نیتریت، در مقادیر بیشتر از حد مجاز، می‌تواند باعث مسمومیت حاد در آبزیان و تاثیر بر اکوسیستم‌های آبی شود، از طرفی ورود این مواد شیمیایی به بدن ماهی می‌تواند باعث تولید رادیکال‌های آزاد شود که به عنوان عوامل مساعد کننده در بروز بیماری‌های مختلف موثر هستند. ازمهمترین رادیکال‌های آزاد، فرم های فعال اکسیژن هستند که از طریق مسیرهای مختلف متابولیکی مانند متابولیسم هوازی در زنجیره تنفسی میتوکندری، تولیدمی‌شوند. آنتی اکسیدان‌ها، عوامل محافظت کننده دربرابر آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد می‌باشند و به‌راحتی می‌توانند با رادیکال‌های آزاد، مقابله کرده و واکنش زنجیره‌ای آنها را قبل از هر گونه تخریب مولکول‌های حیاتی، پایان دهند. عدم تعادل میان تولید رادیکال‌های آزاد و دفاع‌های آنتی‌اکسیدانی منجر به ایجاد استرسی به نام استرس اکسیداتیومی‌شود. در واقع استرس اکسیداتیو تعادل میان اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌هارا به نفع اکسیدان‌ها به‌هم زده که باعث اکسیداسیون مولکول‌های زیستی مانند پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک، لیپیدها و کربوهیدرات شده و منجر به آسیب سلولی می شود. در این مقاله اثر آمونیاک و نیتریت به عنوان عوامل اکسیدانی بر سیستم آنتی‌اکسیدانی از جمله گلوتاتیون، سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل و مالون دی‌آلدئید در ماهیان مختلف مورد بحث و بررسی قرار گرفته است.

کلمات کلیدی: آمونیاک، نیتریت، آنتی‌اکسیدان، استرس اکسیداتیو، رادیکال آزاد

مقدمه

بشر در طول دو قرن گذشته و به ویژه در طول پنج دهه‌ی اخیر، به‌طور قابل ملاحظه‌ای با افزایش استفاده از نیتروژن و انتقال آن در مناطق زیادی از کره زمین، چرخه‌ی جهانی نیتروژن را تغییر داده است (Howarth et al., 2000). درنتیجه علاوه بر منابع طبیعی، نیتروژن غیرآلی می‌تواند از طریق منابع نقطه‌ای و غیر نقطه‌ای به دست آمده از فعالیت‌های انسانی وارد اکوسیستم‌های آبی شود. منابع غیر نقطه‌ای عموماً مهم‌تر از منابع نقطه‌ای هستند، زیرا بزرگ‌تر بوده و کنترل آنها مشکل‌تر است (Howarth et al., 2000; National Research Council, 2000). نیتروژن ذره‌ای و نیتروژن آلی به عنوان ورودی‌های با منشا انسانی به محیط زیست، نیز می‌توانند باعث آلودگی نیتروژنی غیر آلی شوند (National Research Council, 2000). غلظت ترکیبات نیتروژنی معدنی (NO_3^-، NO_2^-، NH_4^+) که در سراسر جهان در زمین و سطح آب‌ها در حال افزایش هستند، باعث اثرات قابل توجهی در بسیاری از موجودات آبزی و در نهایت، موجب تخریب آب شیرین، مصب‌ها و اکوسیستم‌های دریایی-ساحلی می‌شوند (Camargo and Ward, 1992). آمونیاک متداول‌ترین عامل آلودگی آب است که می‌تواند از طریق خروج مواد زائد گیاهی، تخریب مواد آلی حاوی نیتروژن، رواناب کود و منابع صنعتی وارد سیستم‌های طبیعی آبی شود. آمونیاک هم‌چنین از مواد زائد اصلی متابولیسمی ماهیان استخوانی است و به عنوان یک محصول از کاتابولیسم پروتئین‌ها تولید می‌شود (Randall and Wrigh, 1987). که یکی از سمی‌ترین مواد برای اکوسیستم‌ها و ارگانیسم‌های آبزی است و به نظر می‌رسد اثر مستقیم روی رشد موجودات آبزی داشته (Colt, 2006) و باعث کاهش رشد و کاهش مقاومت نسبت به بیماری‌ها (Lemarie et al., 2004) یا حتی باعث تلفات ماهی در سیستم‌های پرورش متراکم می‌شود (Wang and Walsh, 2000). نیتریت محصول میانی تشکیل شده در پروسه نیتریفیکاسیون باکتریایی آمونیاک است که در بین سایر مواد نیتروژنی در آب‌های طبیعی فراوانی کمتری دارد (Kroupova et al., 2008). به طور کلی، افزایش بیش از حد سطوح نیتریت در سیستم‌های پرورشی می‌تواند باعث کاهش رشد (Colt et al., 1981)، بسیاری از مشکلات فیزیکولوژیکی (Deane and Woo, 2007)، اختلال در تنظیم یون‌ها و فرآیندهای دفعی، اختلالات قلبی و عروقی (Jensen, 2003)، افزایش حساسیت به بیماری و مرگ و میر احتمالی شود (ملایم رفتار و همکاران،۱۳۹۵). استرس اکسیداتیو تعادل میان اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها را به نفع اکسیدان‌ها به‌هم زده و این احتمالا منجر به آسیب سلولی شده که باعث اکسیداسیون مولکول‌های زیستی مانند پروتئین‌ها، اسید-های نوکلئیک، لیپیدها و کربوهیدرات می‌شود (Hintsala et al., 2016). حیوانات دارای توانایی برای زندگی درمحل‌های آلوده هستند که این توانایی عمدتاً به دلیل وجودمکانیسم‌های دفاعی است که باعث سم‌زدایی، دفع، حفاظت از آنتی‌اکسیدان و پاسخ به استرس می‌گردد (Bard, 2000). تجمع مواد سمی باعث واکنش‌های اکسایش-کاهش و تولید رادیکال‌های آزاد، به ویژه رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود، دیگر گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) که موجب تغییرات بیوشیمیایی در بافت ماهی شده، نیز تولید می‌گردند (Narra, 2016). به منظورمقابله با اثرات سمیROS، ارگانیسم‌های هوازی از آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی جهت از بین بردن رادیکال‌های آزاد استفاده می‌کنند. با این‌حال، زمانی‌که تولید ROS بیش از ظرفیت آنتی‌اکسیدان سلولی باشد، باعث ایجاد استرس اکسیداتیو و آسیب اکسیداتیو خواهد شد (Narra, 2016). ماهی‌ها نیز دارای مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌باشند که از جمله آن‌ها می‌توان به آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی شامل سوپر اکساید دیسموتاز(SOD)، کاتالاز (CAT) و آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی از قبیل گلوتاتون GSH اشاره کرد که به همراه تعداد دیگری از آنزیم‌ها مجموعه‌ای از دفاع آنتی‌اکسیدانی سلولی را تشکیل می‌دهند و نقش حذف رادیکال‌های آزاد را بر عهده دارند (Halliwell and Gutteridge, 1990).

گلوتاتیون

گلوتاتیون تری‌پپتید حاوی تیول، یکی از مهم‌ترین آنتی-اکسیدان‌های سلولی است که با عملکردهای بیولوژیکی مختلف،انواع اکسیژن و متابولیت‌های واکنش‌پذیر را از بین می‌برد. به‌علاوه، می‌تواند به عنوان یک سوبسترا برای آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز ترانسفرازو S –گلوتاتیون که خنثی‌کننده سموم هستند، عمل کند. تخلیه GSH

درنهایت باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود، که به آسیب DNA، توقف کامل و یا کاهش مقاومت در برابرآسیب اکسیداتیو منجرمی‌شود (Nordberg et al., 2001).

ازویژگی‌های بسیاری از استرس‌های محیطی، افزایش تولید گونه‌های نیتروژن فعال (RNS) است که به دلیل استرس اکسیداتیو ایجاد می‌شود (Federici et al., 2007). مطالعات متعدد نشان داده‌است که قرار گرفتن در معرض نیتریت در اکوسیستم‌های آبی می‌تواند باعث افزایش تشکیل گونه‌های اکسیژن فعال ROS و گونه‌های نیتروژن فعال RNS شود (Sun et al., 2014; Jensen et al., 2015). ROS و RNS قادر به حمله به سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی هستند، که منجربه از دست دادن اجزای آنتی‌اکسیدانی (SOD، CAT، GPX و GSH) می‌شود (Bopp et al., 2008). در مطالعه‌ای که توسط Jia و همکاران در سال ۲۰۱۶ روی اثر مسمومیت ۹۶ ساعته نیتریت (به میزان ۰، ۰/۰۲، ۰/۰۸، ۰/۴ و ۰/۸ میلی‌مولار) در ماهی توربوت *Scophthalmus maximus* (با متوسط وزن ۸/۲± ۹۰/۳ گرم، شوری ۲۹-۲۷ ppt، دمای ۱۸-۱۷ درجه سانتی‌گراد) انجام شد، میزان گلوتاتیون آبشش در گروه‌هایی که در معرض ۰/۴ و ۰/۸ میلی‌مولار قرار گرفته‌بودند، کاهش پیدا کرد. آن‌ها بیان کردند که قرارگرفتن درمعرض نیتریت می‌تواند آسیب اکسیداتیو را در ماهی القا کند.

سطح بالای آمونیاک در محیط‌های آبی به دلایل بسیاری، سمی است، که یکی از آنها این است که آمونیاک می‌تواند باعث القای استرس اکسیداتیو در ماهی شود (Sun et al., 2012). GSH به عنوان یک بستر یا کوفاکتور برای واکنش‌های آنزیمی مختلف چرخه وابسته به گلوتاتیون عمل می‌کند و در تجزیه H_2O_2 به آب و کاهش هیدرو-پراکسیدهای چربی دخیل است. بنابراین، تغییردر سطح GSH ممکن است یک شاخص مهم از توانایی دفاعی ارگانیسم در مقابل استرس اکسیداتیو باشد (Cheung et al., 2001). در مطالعه‌ای که Sun و همکاران در سال ۲۰۱۲ روی کپور سرگنده به مدت ده روز انجام دادند افزایش میزان GSH با افزایش غلظتNH_3-N (۰، ۰/۰۶ و ۰/۲۶۴ میلی‌گرم بر لیتر) در آب را گزارش دادند. Yang و همکاران در سال ۲۰۱۱ مطالعه‌ای را روی مجاورسازی ۹۶ ساعته آمونیاک (به میزان ۰، ۰/۱۷۸، ۰/۲۲۴، ۰/۲۸۲، ۰/۳۸ و ۰/۵۰۱) در ماهی *Carassius auratus* (با وزن متوسط ۱/۱۹± ۴/۶۸، دمای۱± ۲۵ درجه سانتی‌گراد) انجام دادند، آن‌ها گزارش کردند که میزان گلوتاتیون موجود در بافت کبد با توجه به زمان مجاورسازی و غلظت آمونیاک درنوسان بود، همچین بیان کردند زمانی که ماهی‌ها در معرض غلظت کم آمونیاک قرار گرفتند توانایی آن‌ها برای از بین بردن O^{-}_2 و H_2O_2 در یک زمان کوتاه، افزایش یافت اما زمانی که در معرض غلظت بالای آمونیاک قرار گرفتند فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و سطح گلوتاتیون کاهش یافت که کاهش فعالیت آنزیم-های آنتی‌اکسیدانی می‌تواند به افزایش تولید O_2 مرتبط باشد (Arrillo and Melodia, 1991).

سوپراکسید دیسموتاز

سوپراکسیددیسموتاز اولین خط دفاعی علیه ROS می-باشد وافزایش فعالیت آن نشاندهنده‌ی افزایش تولید ROS است (Mishra et al., 2006). این آنزیم با تبدیل O_2 به H_2O_2 می‌تواند سلول‌ها را از آسیب ناشی از ROS محافظت کند (Langston et al., 2002). سوپراکسیددیسموتاز نسبت به استرس آلاینده‌ها خیلی حساس می‌باشد و می‌تواند به‌عنوان علامت استرس اکسیداتیو برای هشدار اولیه آلودگی محیطی استفاده شود، بنابراین سنجش فعالیت SOD، یک فاکتور مهم به منظور تعیین قابلیت‌های آنتی‌اکسیدانی یک سیستم بیولوژیکی محسوب می‌شود. کاهش در فعالیت SOD به-عنوان شاخصی برای از بین رفتن رادیکال‌های آزاد استفاده می‌شود، که نشان می‌دهد سیستم دفاعی آنتی-اکسیدانی به‌وسیله ROS متلاشی شده‌است (Vander Oost et al., 2003).

Sinha و همکاران در سال ۲۰۱۴ روی دفاع آنتی-اکسیدانی سه ماهی آب شیرین در مقابل آمونیاک تحقیق نمودند و به این نتیجه رسیدند که میزان آنزیم سوپراکسیددیسموتاز موجود در کبد در ماهی حوض و ماهی کپور معمولی به ترتیب از ۲۴ و ۴۸ ساعت تا ۸۴ ساعت افزایش پیدا کرد درحالی‌که در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان میزان این آنزیم بعد از ۱۸۰ ساعت افزایش یافت. آن‌ها بیان کردند که پاسخ ضعیف SOD درکبد ماهی قزل‌آلا نشان می‌دهد که، در این ماهی SOD به عنوان اولین خط دفاعی برای مقابله با تولید ROS ایجاد شده به واسطه‌ی آمونیاک نمی‌باشد.

در یک نگاه کلی معمولا در مراحل اولیه استرس اجزای سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی برای خنثی‌سازی اثر استرس به‌طور جبرانی افزایش می‌یابند، اما هنگامی که شدت استرس یا مدت زمان آن زیاد شود، بر دفاع آنتی‌اکسیدانی غلبه کرده و بدین ترتیب فعالیت اجزای دفاع آنتی-اکسیدانی کم می‌شود (Foldbjerg and Autrup, 2013). نیتریت نه تنها باعث آسیب اکسیداتیو می‌شود، بلکه ممکن است باعث آغاز «آپوپتوز»[1] شود. آپوپتوز ناشی از نیتریت ممکن است منجر به تشکیل اکسید نیتریت (NO)و ROS شود (Simon et al., 2000).

نتایج مطالعات متعددی نشان داده‌اند که لزوماً هنگامی‌که ماهی تحت تاثیر سموم و آلاینده‌ها قرار می‌گیرد سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی آن فعال نمی‌شود و از سویی دیگر تغییرات فعالیت این آنزیم‌ها با توجه به نوع و ماهیت آلاینده‌ها در یک اندام خاص بروز می‌کند و در بسیاری از موارد میزان فعالیت آن‌ها در یک اندام کم ودر همان هنگام در اندامی دیگر زیاد می‌گردد (Rosa et al., 2005).

به‌طورکلی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند CAT ممکن است نقش بیشتری را در خون نسبت به SOD بازی کند هرچند که SOD اولین خط دفاع در برابراسترس اکسیداتیو محسوب می‌شود (Eyckmans et al., 2011). همچنین کاهش فعالیت آنزیم SOD می‌تواند نشان دهنده‌ی از دست دادن مکانیسم جبران به دلیل افزایش بیش از حد ROS باشد. افزایش بیش از حد ROS ممکن است با تشکیل پراکسید چربی و اکسید پروتئین، غشای سلولی را نابود سازد (Silvestre et al., 2008).

کاتالاز

کاتالاز آنزیمی است که تقریباً در همه‌ی موجودات زنده و در اکثر ارگان‌های بدن یافت می‌شود. این آنزیم سبب تبدیل رادیکال‌های آزاد پراکسید هیدروژن (H_2O_2) به آب و اکسیژن می‌شود (Chelikani et al., 2004).

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} H_2O + 1/2O_2$$

در مطالعه‌ای که Yang و همکاران در سال ۲۰۱۱ روی القاء بلند مدت آمونیاک در ماهی *Carassius auratus* انجام دادند، گزارش نمودند که میزان آنزیم کاتالاز موجود در کبد در پایان ۹۶ ساعت، اختلاف معنی‌داری را در غلظت ۰/۲۸۲ میلی گرم در لیتر آمونیاک در مقایسه با سایر غلظت‌ها، نشان داد. Metwally در سال ۲۰۱۴ مطالعه‌ای را بر روی اثر آمونیوم کلراید (به میزان ۰، ۲، ۴، ۸ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر) بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی ماهی تیلاپیای نیل به مدت ۱۴ روز انجام داد. آن‌ها گزارش نمودند که در این ماهی میزان آنزیم کاتالاز در گروه‌های در معرض آمونیوم کلراید نسبت به گروه شاهد در سرم، کبد و عضله افزایش می‌یابد. در مطالعه‌ای که Hegazi و همکاران در سال ۲۰۱۰ روی غلظت تحت کشنده آمونیاک (۵ و ۱۰ میل‌گرم بر لیتر به مدت ۷۰ روز) در ماهی تیلاپیای نیل *Oreochromis niloticus* انجام دادند، بیان نمودند که میزان آنزیم کاتالاز درکبد و عضله سفید افزایش معنی‌داری را در گروه‌های دارای آمونیاک با غلظت پایین و بالا پیدا کرده‌است. همچنین Koteswara و همکاران در سال ۲۰۱۴ گزارش نمودند القاء آمونیاک (۳/۲۴ میلی‌گرم بر لیتر به مدت ۱۴ روز) باعث افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز موجود در بافت مغز ماهی کپور معمولی در گروه‌های در معرض آمونیاک نسبت به گروه شاهد می‌شود.

در مطالعه‌ای که Jia و همکاران در سال ۲۰۱۶ روی اثر القاء نیتریت را بر استرس اکسیداتیو در ماهی *Scophthalmus maximus* به مدت ۹۶ ساعت انجام دادند، گزارش نمودند که آنزیم کاتالاز کاهش معنی‌داری را در پایان آزمایش در گروه‌های ۰/۴ و ۰/۸ میلی مولار نیتریت نسبت به گروه شاهد نشان داد و در غلظت‌های ۰/۰۸ و ۰/۰۲ میلی‌مولار نیتریت میزان این آنزیم افزایش داشته اما این افزایش معنی‌دار نبوده‌است. آن‌ها بیان کردند که قرارگرفتن درمعرض نیتریت می‌تواند آسیب اکسیداتیو را در ماهی القا کند.

با توجه به اینکه نیترات نسبت به نیتریت تقریباً غیر سمی می‌باشد، تولید آن در واکنش با نیتریت می‌تواند به عنوان یک مکانیسم سم‌زدایی برای نیتریت مشاهده شود. جهت تولید نیترات از نیتریت در حیوانات چند سیستم شناخته شده‌است که از جمله‌ی آن‌ها می‌توان به کاتالاز اشاره کرد (Kroupova et al., 2005). همان‌طورکه بیان شد کاتالاز آنزیمی است که در همه جا و در همه نوع از موجودات زنده وجود دارد و بهترین راه حل برای تسریع تجزیه H2O2 به آب و اکسیژن می‌باشد.

[1]-Apoptosis

با این‌حال، کاتالاز شامل گروه‌های هم پورفیرین در مرکزخود است و در نتیجه می‌تواند گیرنده‌های مختلف، از جمله نیتریت را توسط عملکرد شبه عنوان پراکسیداز با توجه به واکنش سه مرحله کلاسیک پراکسیدازها، اکسید کند (Silanikove et al., 2014).

$$\text{Catalase-compound I} + NO_2^- \rightarrow \text{Catalase-compound II} + NO_3^-$$

$$\text{Catalase-compound II} + NO_2^- \rightarrow \text{Catalase} + NO_3^-$$

$$\text{Catalase} + H_2O_2 \rightarrow \text{Catalase-compound I} + H_2O$$

هرچند که فعالیت کاتالاز پاسخ متفاوتی را در مطالعات مختلف در مواجهه با آلاینده‌ها نشان داده است به‌طوری که در برخی مطالعات کاهش و برخی دیگر فعالیت افزایشی نشان داده است. فعالیت افزایشی آن نشان دهنده پاسخ آنتی‌اکسیدانی در مقابله با آسیب استرس اکسیداتیو می‌باشد (Cao et al., 2010).

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

به‌طورکلی تمامی عوامل آنتی‌اکسیدانی موجود در بدن موجود زنده چه آنزیم‌های درون‌سلولی و چه ترکیبات مغذی آنتی‌اکسیدانی (عوامل غیر آنزیمی) همگی تحت عنوان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC) نامیده می‌شوند (Mahfouz et al., 2009). به عبارتی این فاکتور بیوشیمیایی بیانگر میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل موجود زنده جهت از بین بردن رادیکال‌های آزاد است (Miller et al., 1993). بنابراین اندازه‌گیری آن می‌تواند اطلاعات مفیدی را در رابطه با چگونگی تغییرات سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی کل و واکنش بدن موجود زنده در مواجهه با آن عامل (مفید یا مضر)، در اختیار محققین قرار دهد.

کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل می‌تواند ناشی از فرآیندهای پاک‌سازی و مهار رادیکال‌های آزاد توسط عوامل آنزیمی و غیرآنزیمی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و مصرف این عوامل در داخل سلول‌ها باشد. درمجموع می‌توان چنین استدلال کرد که با افزایش فرآیندهای اکسیداتیو توسط گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل نیز کاهش می‌یابد (Monteiro et al., 2006).

مالون دی‌آلدئید

نمونه بارز آسیب‌های اکسیداتیو، واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیون لیپیدها است که طی آن رادیکال‌های آزاد، الکترون را از لیپیدهای غشاء سلولی می‌ربایند و موجب آسیب به غشاء سلولی می‌شوند، که این روند به شکل یک واکنش زنجیره‌ای ادامه می‌یابد (Pereira et al., 1995). از جمله محصولات این فرآیند تولید مالون دی‌آلدهاید (MDA) است که رابطه مستقیم با صدمات وارده به سلول در طی القاء استرس اکسیداتیو داشته و می‌تواند در ارزیابی این آسیب‌ها کمک شایانی نماید (Doba et al., 1985).

بالابودن سطح MDA منعکس کننده‌ی استرس اکسیداتیو تولید شده و تخلیه آنتی‌اکسیدان‌ها در بافت‌های مختلف می‌باشد (Üner et al., 2001). Sun و همکاران در سال ۲۰۱۴ مطالعه‌ای را روی مسمومیت حاد نیتریت (به میزان ۰/۱، ۱۵ و ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر) به مدت ۴۸ ساعت در ماهی *Megalobrama amblycephala* انجام دادند و افزایش معنی‌دار میزان MDA را گزارش نمودند. همچنین در مطالعه‌ای که Jia و همکاران در سال ۲۰۱۶ روی اثر القاء ۹۶ ساعته نیتریت (۰، ۰/۰۲، ۰/۰۸، ۰/۴ و ۰/۸ میلی‌مولار نیتریت) بر استرس اکسیداتیو در ماهی *Scophthalmus maximus* به مدت ۹۶ ساعت انجام دادند، گزارش نمودند که میزان MDA در بافت آبشش افزایش معنی‌داری را در گروه‌های در معرض نیتریت نسبت به گروه شاهد نشان داد.

افزایش سطح این شاخص می‌تواند بیانگر بالا رفتن سطح پراکسیداسیون لیپید در سلول‌های در معرض سم به دلیل تولید رادیکال‌های هیدروکسیل OH به عنوان یک اکسیدکننده قوی و عامل کلیدی در شروع فرآیند اکسیداسیون لیپیدها باشد. در مطالعه‌ای که Yang و همکاران در سال ۲۰۱۱ روی القاء بلند مدت آمونیاک در ماهی *Carassius auratus* انجام دادند، گزارش نمودند که قرار گرفتن در معرض طولانی‌مدت آمونیاک منجر به تغییرات قابل توجه MDA در آبشش و خون شد، اما روند آن بین این دو بافت معکوس بود. دلیل آن ممکن است این باشد که قرار گرفتن طولانی مدت در معرض آمونیاک، منجر به تغییرات پاتولوژیک در آبشش، ایجاد پراکسید لیپید و پس از آن انتشار MDA به داخل خون می‌شود. همچنین Metwally در سال ۲۰۱۴ مطالعه‌ای را روی اثر آمونیوم کلراید بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی ماهی تیلاپیای نیل به مدت ۱۴ روز انجام داد. آن‌ها گزارش نمودند که در این ماهی میزان MDA در گروه‌های در معرض آمونیوم

کلراید نسبت به گروه شاهد در سرم، کبد و عضله افزایش یافت. بااین‌حال، مکانیسم‌هایی که بوسیله آمونیاک باعث تولید رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو در ماهی می-شود، اندک است.

MDA محصول نهایی پراکسیداسیون چربی می‌باشد. غلظت MDA به عنوان شاخصی برای ارزیابی فرآیندهای سمی ناشی از رادیکال‌های آزاد است (Doyotte و همکاران، ۱۹۹۷)، که گاهی اوقات حتی به مرگ سلول‌ها و تغییرات پاتولوژیک در بافت منجرخواهد شد. پراکسید-های چربی علت اصلی آسیب سلولی ناشی از مواد سمی در نظرگرفته شده‌است (Doyotte et al., 1997). علاوه براین، شایع‌ترین اسیدهای چرب چند غیراشباع (PUFA) که در گونه‌های ماهی حضور دارد، ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA) است که به پراکسیداسیون لیپیدی بسیارحساس می‌باشد (Rau et al., 2004). کاهش MDA نشان‌دهنده فعال شدن سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی و غلبه بر پراکسیداسیون لیپیدی می‌باشد. نتایج مطالعات متعدد نشان می‌دهد که سطوح پائین یا فقدان پراکسیداسیون لیپیدی، منعکس کننده اثرات محافظتی آنزیم‌های آنتی-اکسیدان است (Oruc and Usta, 2007).

توصیه‌های ترویجی

راهکارهایی برای حذف آمونیاک و نیتریت در محیط‌های پرورش آبزیان عبارتند از:

۱- تعویض آب: مؤثرترین و سریعترین روش برای کاهش غلظت آمونیاک و نیتریت تعویض آب خصوصاً تخلیه آب از کف استخرها و وارد کردن آب تازه به استخرها می باشد.

۲- هوادهی: برای حذف آمونیاک می توان از طریق هوادهی و تبدیل آمونیوم به گاز آمونیاک با دستگاه های هواده اقدام کرد.

۳- کنترل غذادهی در استخرها: غذای مناسب و مقدار کافی آن می‌تواند در رشد آبزیان و بهبود کیفی محیط پرورشی کاملاً مؤثر باشد. توزیع غذای بیش از اندازه به آبزیان با توجه به عدم مصرف آن، می تواند یکی از منابع تولید آمونیاک در آب شود.

۴- کنترل تراکم فیتوپلانکتونی استخرها: فیتوپلانکتون ها با دریافت یون آمونیوم، در تعدیل غلظت آمونیاک آب مؤثر می باشد: ولی افزایش تراکم آنها سبب افزایش غلظت آمونیاک در آب خواهد شد. بنابراین همیشه تراکم پلانکتونی را باید در حد مطلوب در نظر گرفت.

۵- تنظیم تراکم: تراکم بالای ذخیره سازی علاوه بر مصرف زیاد مواد غذائی، سبب افزایش تولید مواد دفعی و در نتیجه تولید آمونیوم می گردد.

۶- بهبود و اصلاح خاک استخرها: رسوبات کف استخرها با توجه به درصد بالای مواد آلی موجود در آن به عنوان یکی از منابع مهم آمونیاک در استخرها مطرح می‌باشند. بنابراین در اینگونه استخرها با تخلیه خاک‌های حاوی مواد آلی فراوان می‌توان به بهبود خاک کف استخرها کمک نمود.

۷- فیلترهای بیولوژیک: مشخص شده که بعد از اکسیژن، آمونیاک در سیستم های مدار بسته و فوق متراکم، عامل محدودکننده می باشد. عمل نیتریفیکاسیون، اکسید شدن آمونیاک به نیتریت و نیتریت به نیترات بوده که عمل اصلی فیلترهای بیولوژیک می‌باشد.

نتیجه گیری کلی

در حال حاضر صنعت پرورش آبزیان به ویژه ماهیان گرمابی در کشور در حال گسترش است. در این بین بسیاری از آلاینده ها تاثیر منفی بر پرورش ماهیان گرمابی دارند. آلاینده‌های مختلف با تولید رادیکال‌های آزاد باعث تغییر در سیستم‌های آنتی اکسیدان سلول و پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء موجودات زنده می شوند. در واقع استرس اکسیداتیو و تغییر در سیستم‌های اکسیدانی و آنتی اکسیدانی آبزیان و سایر موجودات زنده یکی از فاکتورهای مهم در سمیت ایجاد شده توسط آلاینده های مختلف از جمله آمونیاک و نیتریت می باشد. از طرفی در ایران بدلیل کم آبی، در استخرهای خاکی پرورش ماهیان گرمابی، تعویض آب بسیار اندکی صورت می گیرد، که در چنین محیط‌هایی یکی از عوامل آسیب رسان افزایش آمونیاک و نیتریت در محیط پرورش است که عمدتاً افزایش میزان آنها، محصول نهایی کاتابولیسم پروتئین‌هایی است که توسط میکروارگانیسم‌ها و ماهیان مصرف می‌شود. بنابراین مسمومیت ماهی با آمونیاک و نیتریت یکی از عمده ترین دلایل مرگ و میر ماهیان در محیط‌های پرورش است. در مجموع با جمع بندی مطالعات صورت گرفته می توان نتیجه گرفت وجود نیتریت و آمونیاک در آب می‌تواند باعث بر هم خوردن توازن اکسیدان/آنتی‌اکسیدان و افزایش گونه‌های فعال

اکسیژن، در ماهیان مختلف شود. بنابراین، فعالیت عوامل آنتی‌اکسیدانی می‌توانند به عنوان یک بیومارکر حساس در ماهیان مختلف در محیط‌های پرورشی و همچنین در برنامه‌های بیومانیتورینگ مورد استفاده قرار بگیرند.

منابع

ملایم رفتار، ط؛ پیغان،ر؛ راضی جلالی، م؛ شهریاری، ع. (۱۳۹۵)"تعیین میزان غلظت کشنده و تغییرات رفتاری در مسمومیت حاد با آمونیاک و نیتریت در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)"، فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری، ۳۵(۴): ۳۴-۲۳.

ANJANA VAMAN, V. S.; TINU, SK.; GEETHA, C. S.; LISSY, K. K. & MOHANAN, P. V. 2013. Effect offibrin glue on antioxidant defense mechanism, oxidative DNA damage andchromosomal aberrations. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 23 (7), 500-508.

ARRILLO, A. & MELODIA, F. 1991. Nitrite oxidation in Eisema foetida (Savigny): ecologicalimplications. *Functional Ecology*, 5 (5), 629-634.

BARD, S. M. 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*. 48, 357-389.

BOPP, S. K., ABICHT, H. K. & KNAUER, K. 2008. Copper-induced oxidative stress inrainbow trout gill cells. *Aquatic Toxicology*, 86, 197-204.

CAMARGO, J. A. & WARD, J. V. 1992. Short-term toxicity of sodium nitrate ($NaNO_3$) to nontarget freshwater invertebrates. *Chemosphere*, 24, 23–8.

CAO, L., HUANG, W., LIU, J., YIN, X. & DOU, S. 2010. Accumulation and oxidative stress biomarkers in Japanese flounder larvae and juveniles under chronic cadmium exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 151, 386–392.

CHELIKANI, P., FITA, I. & LOEWEN, P. C. 2004. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61, 192-208.

CHEUNG, C. C. C., ZHENG, G. J., L. I. A., RICHARDSON, B. J. & LAM, P. K. S. 2001. Relationshipsbetween tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons andantioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Aquatic Toxicology*, 52, 189–203.

COLT, J. 2006. Water quality requirements for reuse systems. *Aquaculture*, 34, 143-156.

COLT, J., LUDWIG, R., TCHOBANOGLOUS, G. & CECH, J. J. 1981. The effect of nitrite on the short-term growth and survival of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*, 24, 111–122.

DEANE, E. E. & WOO, N. Y. 2007. Impact of nitrite exposure on endocrine, osmoregulatory and cytoprotective functions in the marine teleost *Sparus sarba*. *Aquatic Toxicology*, 82, 85-93.

DOBA, T., BURTON, G. W. & INGOLD, K. U. 1985. Antioxidant and co-antioxidant activity of vitamin C. The effect of vitamin C, either alone or in the presence of vitamin E or a water-soluble vitamin E analogue, upon the peroxidation of aqueous multilamellar phospholipid liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 835 (2), 298–303.

DOYOTTE, A., COSSU, C., JACQUIN, M. C., BABUT, M. & VASSEUR, P. 1997. Antioxidant enzymes,glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or fieldexposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquatic Toxicology*. 39 (2), 93–110.

EYCKMANS, M., CELIS, N., HOREMANS, N., BLUST, R. & DE BOECK, G. 2011. Exposure towaterborne copper reveals differences in oxidative stress response in three freshwaterfish species. *Aquatic Toxicology*, 103, 112-120.

FEDERICI, G., SHAW, B. J. & HANDY, R. D. 2007. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology*, 84, 415–430.

FOLDBJERG, R. & AUTRUP, H. 2013. Mechanisms of Silver Nanoparticle Toxicity. *Archives of Basic and Applied Medicine*, 1, 5–15.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. 1990. The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives of Biochemistry and Biophysics Journal*, 280 (1), 1–8.

HEGAZI, M. M., ATTIA, Z. I. & ASHOUR, O. A. 2010. Oxidative stress and antioxidantenzymes in liver and white muscle of Nile tilapia juveniles inchronic ammonia exposure. *Aquatic Toxicology*, 99, 118-125.

HINTSALA, H. R., JOKINEN, E., HAAPASAARI, K. M., MOZA, M., RISTIMЄAKI, A., SOINI, Y., KOIVUNEN, J. & KARIHTALA, P. 2016. Nrf2/Keap1 pathway and expression of oxidative stress lesions 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and nitrotyrosine in Melanoma. *Anticancer Research*, 36 (4), 1497-1506.

HOWARTH, R. W., ANDERSON, D., CLOERN, J., ELFRING, C., HOPKINSON, C. & LAPOINTE, B. 2000. Nutrient pollution of coastal rivers, bays, and seas. *Issues in Ecology*, 7, 1-15.

JENSEN, F. B. 2003. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 135, 9-24.

JENSEN, F B., GERBER, L., HANSEN, M. N. & MADSEN, S. S. 2015. Metabolic fates andeffects of nitrite in brown trout under normoxic and hypoxic conditions: blood andtissue nitrite metabolism and interactions with branchial NOS, Na+/K+-ATPase andhsp70 expression. *The Journal of experimental biology*, 218, 2015-2022.

JIA, R., LIU, B. L., HAN, C., HUANG, B. & LEI, J. L. 2016. The physiological performance and immune response of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) to nitrite exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 40 (6), 181-182.

KOTESWARA, R., SHOBHA, R., RANI, A. & NEERAJ, P. 2014. Ambient ammonia stress on detoxificationenzymes in brain tissue of fish fingerlings of *Cyprinuscarpio*. *International Journal of Science and Research*, 3, 2277-8179.

KROUPOVA, H., MACHOVA, J. & SVOBODOVA, Z. 2005. Nitrite influence on fish: *A review. Veterinary Medicine – Czech*, 50 (11), 461-471.

KROUPOVA, H., MACHOVA, J., PIACKOVA, V., BLAHOVA, J., DOBSIKOVA, R., NOVOTNY, L. AND SVOBODOVA, Z. 2008,. Effects of subchronic nitrite exposure on rainbow trout (*Onocorhynchus mykiss*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71, 813-820.

LANGSTON, A. L., HOARE, R., STEFANSSON, M., FITZGERALD, R., WERGELAND, H. & MULCAHY, M. 2002. The effect of temperature on non-specific defence parameters of three strains of juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 12, 61-76.

LEMARIE, G., DOSDAT, A., COVE, D., DUTTO, G., GASSET, E. & PERSON-LE RUYE, J. 2004. Effect of chronic ammonia exposure on growth of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, 229 (1-4), 479–491.

MAHFOUZ, R., SHARMA, R., SHARMA, D., SABANEGH, E. & AGARWAL, A. 2009. Diagnostic value of the total antioxidant capacity (TAC) in human seminal plasma. *Fertility and Sterility*, 91, 805-811.

METWALLY, M. A. A. & WAFEEK, M. 2014. Effect of Ammonia Toxicity on Carbohydrate Metabolism In Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 6 (3), 252-261.

MILLER, N. J., RICE-EVANS, C., DAVIES, M. J., GOPINATHAN, V. & MILNER, A. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84, 407-412.

MISHRA, S., SRIVASTAVA, S., TRIPATHI, R. D., KUMAR, R., SETH, C. S. & GUPTA, D. K. 2006. Leaddetoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation. *Chemosphere*, 65 (6), 1027-1039.

MONTEIRO, D. A., ALMEIDA, J. A. D., RANTIN, F. T. & KALININ, A. L. 2006. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 141, 143-149.

NARRA, M. R. 2016. Single and cartel effect of pesticides onbiochemical and haematological status of Clarias batrachus: a long-termmonitoring. *Chemosphere*, 144, 966-974.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. .2000. Clean coastal waters: understanding and reducing the effects of nutrient pollution. Washington, DC: National Academic Press.

NORDBERG, J. & ARNER, E. 2001. Reactive oxygen species, antioxidant,and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, 31, 1287-1312.

ORUC, E. Ö. & USTA, D. 2007. Evaluation of oxidative stress responsesand neurotoxicity potential diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23, 48-55.

PEREIRA, B., ROSA, L. F., SAFI, D. A., BECHARA, E. J. & CURI, R. 1995. Hormonal regulation of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in rat macrophages. *Biochemical Pharmacology*, 50, 2093-2098.

RANDALL, D. J. & WRIGHT. P. A. 1987. Ammonia distribution and excretion in fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 3, 107-120.

RAU, M. A., WHITAKER, J., FREEDMAN, J. H. & DI GIULIO, R. T. 2004. Differential susceptibility of fish and rat liver cells to oxidative stress and cytotoxicity uponexposure to prooxidants. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 137, 335-342.

ROSA, M. M., AMILA, E. M. & ANA, S. 2005. Antioxidant defencees in fish: Biotic andabiotic factors. *Review in Fish Biology andFisheries*, 15, 75-88.

SILANIKOVE, N., MERINB, U. & LEITNER, G. 2014. Nitrite and catalase levels rule oxidative stabilityand safety properties of milk: a review. *Royal Society Chemistery Advances*, 4, 26476-26486.

SILVESTRE, J. S., MALLAT, Z., TEDGUI, A. & LÉVY, B. I., 2008. Post-ischaemic neovascularization and inflammation. *Cardiovascular research*, 78(2), 242-249.

SIMON, H. U., HAJ-YEHIA, A. & LEVI-SCHAFFER, F. 2000. Role of reactive oxygen species(ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*, 5, 415-418.

SINHA, A. K., ABDELGAWAD, H., GIBLEN, T., ZINTA, G., DE ROP, M., ASARD, H., BLUST, R. & DEBOECK, G. 2014. Anti-oxidative defences are modulated differentially in threefreshwater teleosts in response to ammonia-induced oxidative stress. *PLOSONE*, 9 (4), e95319.

SUN, H., LÜ, K., MINTER, E. J. A., CHEN, Y., YANG, Z. & MONTAGNES, D. J. S. 2012. Combined effects ofammonia and microcystin on survival, growth, antioxidant responses, and lipid peroxidation of bighead carp *Hypophthalmythys nobilis* larvae. *Journal of Hazardous Materials*, 221, 213-219.

SUN, S., GE, X., XUAN, F., ZHU, J. & YU, N. 2014. Nitrite-induced hepatotoxicity in bluntsnoutbream (*Megalobrama amblycephala*): the mechanistic insight from transcriptome tophysiology analysis. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37, 55-65.

ÜNER, N., ORUÇ, E. Ö., CANLI, M. & SEVGLER, Y. 2001. Effects of cypermethrin onantioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in liver and kidney of thefreshwater fish, *Oreochromis niloticus* and *Cyprinus carpio* (L.). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 67, 657-664.

VANDER OOST, R., BEYER, J. & VERMEULEN, N. P. E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13, 57-149.

WANG, Y. & WALSH, P. J. 2000. High ammonia tolerance in fishes of the family Batrachoididae (Toadfish and Midshipmen). *Aquatic Toxicology*, 50, 205-219.

YANG, W., XIANG, F., LIANG, X. & YANG, Z. H. 2011. Toxicity of Ammonia and Its Effects on OxidativeStress Mechanisms of Juvenile Crucian Carp (*Carassius auratus*). *Journal of Freshwater Ecology*, 25, 297-302.

Effect of ammonia and nitrite toxicity on the antioxidant mechanisms of fish

Taravat Molayem Raftar[1*], Rahim Peyghan[1]

[1] Shahid Chamran University, Ahvaz

*Corresponding author: taravat.fishery@gmail.com

Abstract

The presence of the nitrogen compounds such as ammonia and nitrite, in excess of the limit, can cause acute toxicity inaquatic animalsand affect aquatic ecosystems and organisms. On the other hand, the entry of these chemicals into the body of fish can produce free radicals that are effective factors in the incidence of various diseases. The most important free radicals are reactive oxygen species that are considered as free radicals and are produced by various metabolic pathways such as aerobic metabolism in the mitochondrial respiratory chain. Antioxidants are protective agents against the damage caused by free radicals and can easily withstand free radicals and end their chain reaction before any degradation of vital molecules. The imbalance between the production of free radicals and antioxidant defense leads to stress called oxidative stress. In fact, oxidative stress disturbs the balance of oxidants and antioxidants in favor of oxidants, which causes the oxidation of biological molecules such as proteins, nucleic acids, lipids, and carbohydrates and leading to cellular damage. In this paper, the effects of ammonia and nitrite as oxidative agents have been discussedon the antioxidant system such as glutathione, superoxide dismutase, catalase, total antioxidant capacity and malondialdehyde in different fish.

Keywords: ammonia, nitrite, antioxidant, oxidative stress, free radicals