



## بررسی تغییرات آنزیم آنتی‌اکسیدان SOD در کبد ماهیان درمان‌شده با اکسی‌وت (اکسی‌تتراسایکلین)

سهیلا فیض بخش کوفلی<sup>۱</sup>، علیرضا میرواقفی<sup>۲\*</sup>، پگاه فرهنگ<sup>۳</sup>

۱- کارشناس، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۲- استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۳- کارشناس ارشد، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۱۸

تاریخ ارسال: ۱۳۹۷/۰۸/۰۲

### چکیده

هدف از انجام این مطالعه بررسی تأثیر جیره غذایی حاوی آنتی‌اکسیدان سنتتیک BHT (butylated hydroxytoluen) و آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین روی محتوی آنزیم آنتی‌اکسیدانی سوپراکساید دیسموتاز (SOD) در کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss*) به‌طور آزمایشی بیمار شده با *Aeromonas hydrophila* بود. تیمارهای آزمایشی شامل: تیمار شاهد، دو تیمار تغذیه شده با جیره غذایی حاوی مقادیر ثابت اکسی‌تتراسایکلین (دوز مؤثره حاوی ۲۰ درصد) و به همراه ۰/۵ درصد و ۰/۸ درصد BHT و یک تیمار تغذیه شده با جیره غذایی حاوی فقط اکسی‌تتراسایکلین تقسیم بودند. ابتدا ماهیان در معرض *A. hydrophila* به غلظت  $10^6$  CFU/ml (LC<sub>50</sub>) قرار داده شدند و از کبد ماهیان بیمار و گروه شاهد (دریافت‌کننده فقط سرم فیزیولوژی) نمونه‌برداری صورت گرفت. ماهیان به مدت دو روز با جیره‌های فوق‌الذکر تغذیه و سپس نمونه‌برداری دوم انجام شد. در مرحله بعدی، اکسی‌تتراسایکلین از جیره دو گروه تیماری دریافت‌کننده مقادیر ثابت اکسی‌تتراسایکلین و مقادیر متفاوت BHT حذف شد و غذاهای به‌مدت یک هفته فقط با مقادیر BHT ذکر شده ادامه یافت و نمونه‌برداری نهایی از کبد ماهیان صورت گرفت. آنالیزهای آماری با نرم افزار SAS 9.2 انجام شد. مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که استفاده از جیره غذایی حاوی اکسی‌تتراسایکلین و ۰/۵ درصد BHT در حین درمان با اکسی‌تتراسایکلین (اکسی‌وت) و نیز جیره حاوی فقط ۰/۸ درصد BHT در ادامه درمان آنتی‌بیوتیکی می‌تواند موجب افزایش محتوی SOD کبد ماهیان شود.

واژگان کلیدی: *Aeromonas hydrophila*، SOD، BHT، اکسی‌تتراسایکلین، *Onchorhynchus mykiss*



## **Study of superoxide dismutase (SOD), an antioxidant enzyme, changes in the liver of Rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) treated by oxytetracycline**

**S. Feyzbakhsh Kofeli<sup>1</sup>, A. Mirvaghefi<sup>2\*</sup>, P. Farhang<sup>3</sup>**

*1- BSc graduate, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran*

*2- Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran*

*3-MSc graduate, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran*

**Received: 29-Nov-2019**

**Accepted: 24-Oct-2018**

### **Abstract**

This study was conducted to investigate the effect of dietary supplemented by butylated hydroxytoluen (BHT), a synthetic antioxidant, and oxytetracycline (OTC) on superoxide dismutase (SOD) on content of the liver in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) experimentally exposed Aed against *Aeromonas hydrophila*. Fish were divided into experimental treatments in triplicates and received the following experimental diets, after bacterial exposure ( $10^6$  CFU/ml through peritonile injection), for 2 days:(E)-control; (B)- OTC.; (C)- OTC plus dietary 0/5 % BHT; (D)- OTC plus dietary 0/8 % BHT(9 g OTC, effective dosage 20%, was administrated in diets for three treatments as mentioned above, B, C and D). After fish liver sampling, OTC was omitted from(C) and (D) treatments and experiment was continued by: (C1)- dietary 0/5 % BHT (D1)- dietary 0/8 percent BHT, for 7 days and final sampling was applied. Statistical analysis in SAS 9.2 software showed that using the dietary supplemented by OTC and 0/5 % BHT during antibiotic treatment as well as using dietary supplemented by 0/8 % BHT in following antibiotic treatment can induce of SOD increase in the liver of fish.

**Keyword:** *Aeromonas hydrophila*, SOD, BHT, oxytetracycline, *Onchorhynchus mykiss*.

## ۱. مقدمه

در حال حاضر توسعه سریع آبی‌پروری منتج به وضعیت‌های پرورش رو به متراکم ماهی و افزایش استرس شده است که این امر می‌تواند سیستم ایمنی را ضعیف کند (Jiang et al., 2016). بیش از دو دهه کوشش‌هایی برای درک بهتر ارتباط بین تغذیه، پاسخ ایمنی و مقاومت در برابر بیماری در گونه‌های مختلف به‌ویژه در ماهیان پرورشی انجام شده است (Niu et al., 2014). سیستم ایمنی می‌تواند به‌وسیله دامنه و سیعی از فاکتورها شامل بیماری، آلودگی‌ها، هورمون‌ها و مواد مغذی تحت تأثیر قرار گیرد (Shiau et al., 2015). عفونت‌های باکتریایی مسئول بیشتر مرگ‌ومیر ماهیان پرورشی در سراسر جهان هستند. آئروموناس سپتی سمیا (خونریزی‌دهنده) به‌وسیله *Aeromonas hydrophila* ایجاد می‌شود که یکی از رایج‌ترین و چالش‌برانگیزترین بیماری‌های ایجادکننده مرگ‌ومیر بالا در ماهیان آب شیرین است (Gobi et al., 2016). این بیماری اغلب سبب آسیب‌های جدی و ضررهای اقتصادی در صنعت پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) شده است (Fečkaninova et al., 2017). ایمنی یک مکانیسم فیزیولوژیکی حیاتی در جانوران جهت حفاظت در برابر عفونت و نیز حفظ هموستازی داخلی است. تنفس انفجاری (RB)<sup>۱</sup> یکی از مکانیسم‌های اصلی به‌کاررفته توسط لوکوسیت‌های چندریخت‌هسته<sup>۲</sup> برای حذف باکتریایی و قارچی است (Lu et al., 2016). چندین نوع عملکرد اکسیژن‌واکنشی (ROS) به‌وسیله فاگوسیت‌های ماهی طی تنفس انفجاری تولید می‌شود. لوکوسیت‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌ها را فراگرفته و از بین می‌برند و متعاقباً محصولات ROS مثل سوپراکساید آنیون ( $O_2^-$ ) افزایش می‌یابد. رها سازی سوپراکساید آنیون ( $O_2^-$ ) به‌عنوان RB شناخته شده است (Chen et al., 2015; Shiau et al., 2015) و روی هم‌رفته مشتقات آن کشنده باکتری‌ها هستند

(Shiau et al., 2015). رادیکال سوپراکساید آنیون ( $O_2^-$ ) و رادیکال هیدروکسید ( $OH^\cdot$ ) دو ROS مهم هستند که به‌طور پی‌درپی به‌عنوان محصولات جانبی متابولیسم نرمال تولید می‌شوند و شدیداً در آسیب اکسیداتیو سلول درگیر هستند. ROS اضافی ایجاد آسیب اکسیداتیو می‌کند (Feng et al., 2016). استرس اکسیداتیو، افزایش در تولید رادیکال آزاد به‌وسیله سلول‌ها است که منتج به آسیب سلول و بافت خواهد شد (Lu et al., 2016). استرس اکسیداتیو به‌طور مستقیم در بیماری‌زایی عفونت‌های باکتریایی شامل *Aeromonas hydrophila* مشارکت می‌کند (Baldissera et al., 2017). برای حفاظت سلول‌ها و بافت‌ها از آسیب اکسیداتیو، ماهی سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی آنتی‌اکسیداتیو ذاتی جهت کمک به خنثی کردن فعالیت رادیکال آزاد دارد (Lu et al., 2016) که استرس اکسیداتیو نتیجه عدم تعادل بین گونه‌های اکسیژن‌واکنشی (ROS) و دفاع آنتی‌اکسیدانی است (Sindhi et al., 2013). آنتی‌اکسیدان‌ها مکانیسم دفاعی اصلی فعال بدن به‌عنوان پاکسازهای رادیکال آزاد هستند (Yehye et al., 2015). سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی در ماهیان شامل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مثل سوپراکساید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و گلوکاتایون پروکسیداز (GPx) و اجزای غیر آنزیمی مثل گلوکاتایون (GSH) هستند که می‌توانند سطوح مبارزه با استرس اکسیداتیو را بالا ببرند (Feng et al., 2016) و این آنزیم‌ها از تولید ROS کنترل‌نشده جلوگیری می‌کنند (Li et al., 2013). SOD آنزیم پاکساز رادیکال آزاد اکسیژن است که مسئول اولین خط دفاعی بر علیه ROS است (Jiang et al., 2016). سوپراکساید دیسموتاز (SOD)، سوپراکساید آنیون‌ها را به پراکسید هیدروژن و اکسیژن مولکولی کاتالیز می‌کند و گلوکاتایون پروکسیداز (GPx) و کاتالاز (CAT)، دیسموتایشین<sup>۳</sup> پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن

<sup>1</sup> Respiratory burst

<sup>2</sup> Polymorphonucleus

<sup>3</sup> Dismutation

آنتی‌اکسیدان - پیش - اکسیدان کبدی قزل‌آلای دریایی (*Salmo trutta m. trutta L.*) را از طریق اکسیداسیون پروتئین و ممانعت از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مثل کاتالاز (CAT) معیوب کند. اخیراً محققین ثابت کردند که درمان آنتی‌اکسیداتیو به‌طور عمده با استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، یک شیوه درمانی معقول برای پیشگیری و معالجه آسیب کبد است زیرا استرس اکسیداتیو در شروع و پیشرفت آسیب کبدی مشارکت می‌کند (Baldissera et al., 2017). تیمار کورستین به‌طور معنی‌داری آسیب اکسیداتیو به‌وجودآمده توسط اکسی‌تتراسایکلین در ماهیچه ماهیان را به‌علت اثر آنتی‌اکسیدانی خود تقلیل داده است (Pês et al., 2017). هرچند عملکرد همه آنتی‌اکسیدان‌ها صرف‌نظر از منبع آن‌ها به‌طور مشابه پیشگیری از ایجاد آسیب توسط رادیکال‌های آزاد است. آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک به‌طور گسترده‌ای در صنعت غذای انسان و خوراک دام و همچنین در صنعت قنادی و روغن خوراکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. BHA یک آنتی‌اکسیدان بسیار قابل حل در چربی است و در مقابل گرما و وضعیت‌های قلیایی ملایم پایدار است. BHT<sup>۳</sup> یک جامد متبلور سفید با ویژگی‌های مشابه با BHA است. BHT<sup>۴</sup> مناسب برای تیمار حرارتی است اما به اندازه BHA پایدار نیست. BHT وزن مولکولی پایینی دارد و برای فنول‌های مانع‌شونده تنوع وسیعی از کاربردها است، و از واکنش‌های زنجیره رادیکال آزاد ممانعت می‌کند (Yehye et al., 2015). لذا، هدف از انجام این آزمایش بررسی تأثیر آنتی‌اکسیدان سنتتیک BHT روی محتوی آنزیم آنتی‌اکسیدانی SOD در کبد ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان بی‌مارشده با *A. hydrophila* در حین و پس از درمان با آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین بود.

مولکولی را کاتالیز می‌کنند (Chen et al., 2015). سطوح فعالیت دو آنزیم CAT و SOD برای کمی‌کردن استرس اکسیداتیو در سلول‌ها به‌کار می‌روند (Lu et al., 2016). در معرض‌گذاری ماهیان در برابر زی‌بیگانگان<sup>۱</sup>، علت اصلی آسیب اکسیداتیو به‌وجودآمده به‌سبب افزایش تولید گونه‌های اکسیژن‌واکنشی (ROS) در مقابله با ارگانسیم‌ها است (Menezes et al., 2016). علاوه بر این‌ها کبد جایگاه واکنش‌های اکسیداتیو چندگانه و بیش‌ترین تولید رادیکال آزاد است و آن عضوی برای حذف زی‌بیگانگان است (Atli et al., 2016). کبد در تلاش برای پاکسازی رادیکال‌های آزاد اضافی، نقشی اساسی در تنظیم متابولیسم اکسایش-کاهش<sup>۲</sup> و تولید بسیاری از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مثل CAT و SOD بازی می‌کند (Baldissera et al., 2017). اکسی‌تتراسایکلین یک آنتی‌بیوتیک وسیع‌الطیف متعلق به طبقه تتراسایکلین است که به‌عنوان ممانعت‌کننده سنتز پروتئین عمل می‌کند (Leal et al., 2017). و به‌طور گسترده‌ای برای اهداف درمانی در انسان‌ها و نیز به‌عنوان یک آنتی‌بیوتیک و ترقی‌دهنده رشد در جانوران پرورشی به‌کار می‌رود و در زمره متداول‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در مزارع پرورش ماهی در آسیای جنوب شرقی است (Boonsaner and Hawker, 2013). این آنتی‌بیوتیک از پرکاربردترین آنتی‌بیوتیک‌ها در آبی‌پروری است و اغلب از طریق جیره یا حمام‌دادن (غوطه‌وری در مانی) تجویز می‌شود (Leal et al., 2017). از آنجایی که رادیکال‌های آزاد مسئول به‌وجودآمدن آسیب سلولی شناخته شده‌اند، صدها آنتی‌اکسیدان طبیعی و سنتتیک به‌جهت تأثیرشان به‌عنوان پاکسازهای رادیکال بررسی شدند. عملکرد آنتی‌اکسیدان‌ها جلوگیری کردن و واکنش نشان‌دادن با رادیکال‌های آزاد با یک میزان سریعتر نسبت به سوبسترا است (Yehye et al., 2015). در مطالعه‌ای محققین ثابت کردند که *A. hydrophila* ممکن است وضعیت

<sup>1</sup> Xenobiotic

<sup>2</sup> Redox

<sup>3</sup> Butylated hydroxytoluene

<sup>4</sup> Butylated hydroxytoluene

## ۲. مواد و روش‌ها

### ۱.۲. طرح آزمایش و تیمارها

تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با وزن متوسط  $30 \pm 175/92$  گرم از مرکز پرورش ماهی خریداری شد. ۷۲ قطعه از این ماهیان در چهار تیمار سه تکراری به قرار شش عدد ماهی در هر تکرار تقسیم شدند. ابتدا همه تیمارها با جیره غذایی پایه جهت تطبیق‌پذیری با شرایط جدید به میزان ۲ درصد وزن بدن تغذیه شدند. غذای مورد استفاده در این آزمایش، پلت اکسترود GFT2 تهیه‌شده از یک شرکت تجاری بود. غذای پلت‌شده به اندازه ۲ درصد وزن بدن ماهیان توسط ترازوی دیجیتال توزین شد. ۹ گرم آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین ۲۰ درصد در ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر حل و روی پلت‌ها اسپری شد. پس از خشک شدن نسبی پلت‌ها، غذا به سه قسمت مساوی برای سه تیمار تقسیم شد. سپس ۰/۸ و ۰/۵ درصد جیره دو تیمار، آنتی‌اکسیدان BHT (تهیه‌شده از یک شرکت تجاری) توزین و هر یک از این دو مقدار در حدود دو قاشق چای‌خوری روغن مایع خوراکی حل و به دو جیره حاوی اکسی‌تترا سایکلین اضافه شدند. این دو تیمار شامل: تیمار C (دریافت‌کننده جیره حاوی اکسی‌تتراسایکلین و ۰/۵ درصد جیره، BHT) و تیمار D (گروه دریافت‌کننده جیره حاوی اکسی‌تتراسایکلین و ۰/۸ درصد BHT) بودند. یکی از تیمارها نیز جیره حاوی فقط اکسی‌تتراسایکلین دریافت کرد. تیمار E (دریافت‌کننده فقط سرم فیزیولوژی) پس از نمونه‌برداری فوق از دور آزمایش خارج شد.

### ۲.۲. تهیه باکتری و تزریق آن

باکتری منجمد شده آئروموناس هیدرو فیلا (*Aeromonas hydrophila*) از دانشکده دامپزشکی تهیه شد. محلول قابل تزریق با دوز باکتریایی  $10^6$  CFU/ml ( $LC_{50}$ ) تهیه شد. از هر تیمار پنج ماهی به صورت تصادفی با ساچوک صید و در آب

حاوی پودر گل‌میخک بی‌هوش شدند. تیمار شاهد (E) فقط سرم فیزیولوژی دریافت کرد. به هر ماهی ۰/۲ میلی‌لیتر محلول تزریقی حاوی باکتری به‌وسیله سرنگ مخصوص تزریق انسولین به صورت درون‌صفاقی تزریق شد. علاوه بر گروه E که به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد، داده‌های SOD حاصل از نمونه‌برداری اول پس از در معرض قراردادی اولیه در برابر باکتری *A. hydrophila* به‌عنوان شاهد دوم (گروه A) در آنالیزها و مقایسات میانگین تیمارها به‌کار برده شد. ماهیان تزریق‌شده به مدت ۲ روز جهت نشان‌دادن علائم بیماری تغذیه نشدند. سپس از کبد ماهیان مبتلا به *A. hydrophila* قبل از دریافت تیمار غذایی و نیز تیمار شاهد (E) نمونه‌برداری صورت گرفت. ماهیان بیمار به مدت دو روز با جیره‌های تیماری فوق‌الذکر غذادهی شدند و نمونه‌برداری دوم از کبد این ماهیان صورت گرفت. سپس اکسی‌تتراسایکلین از تیمارهای حاوی مقادیر متفاوت BHT حذف و غذادهی به مدت یک هفته با تیمارهای حاوی BHT مربوطه ادامه یافت. تیمار دریافت‌کننده فقط اکسی‌تتراسایکلین نیز از دور آزمایش خارج شد. سپس از دو گروه تیماری دریافت‌کننده فقط ۰/۵ درصد جیره، BHT (تیمار C1) و ۰/۸ درصد جیره، BHT (تیمار D1) نمونه‌برداری سوم انجام گرفت.

### ۳.۲. نمونه برداری و اندازه‌گیری آنزیم

۱۰۰ میلی‌گرم از کبد هر ماهی نمونه‌برداری و توزین شد، یک سی‌سی محلول بافر فسفات به آن اضافه و با استفاده از دستگاه هموژنایزر هموژن شد. سوپراکساید دیسموتاز گروهی از آنزیم‌ها هستند که تجزیه آنیون سوپراکساید را به اکسیژن و هیدروژن پراکسید تسریع می‌نمایند (Maklund and Marklund, 1974). معرف‌های به‌کاررفته براساس Maklund و Marklund (1974) شامل: تریس اسیدکلریدر یک (۵۰ میلی‌مولار،  $pH = 8/2$ ) و محلول پیروگالول<sup>۱</sup> (۱۰ میلی‌مولار،  $pH = 7/4$ ) بودند. ۲ میلی‌لیتر از تریس اسیدکلریدر یک ۵۰ میلی‌مولار به لوله

<sup>۱</sup> Pyrogallol

(دریافت‌کننده جیره حاوی فقط اکسی‌تتراسایکلین)، C (دریافت‌کننده جیره حاوی اکسی‌تتراسایکلین و ۰/۵ درصد جیره BHT) و D (دریافت‌کننده جیره حاوی اکسی‌تتراسایکلین و ۰/۸ درصد جیره BHT) در سطح  $\alpha = 0/05$  معنی‌دار شد (CV= ۳/۱۴۹۲۳۱). مقایسه میانگین تیمارها با روش‌های L.S.D، توکی، دانت، دانکن و S.N.K. اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای B، C و D در برابر تیمار A نشان داد. کمترین اختلاف معنی‌دار بین تیمار C (دریافت‌کننده جیره حاوی اکسی‌تتراسایکلین و ۰/۵ درصد BHT) و تیمار A (شاهدی که فقط باکتری دریافت کرده بود) مشاهده شد. بیشترین اختلاف معنی‌دار بین تیمار B (دریافت‌کننده فقط اکسی‌تتراسایکلین) و تیمار A (دریافت‌کننده فقط باکتری) مشاهده شد. هیچ اختلاف معنی‌داری میان تیمارهای B، C و D مشاهده نشد (نمودار ۱ شکل). همان‌طوری که در نمودار شکل ۱ مشاهده می‌شود، تیمار A بیشترین میانگین SOD و تیمار B کمترین میانگین SOD را داشت.

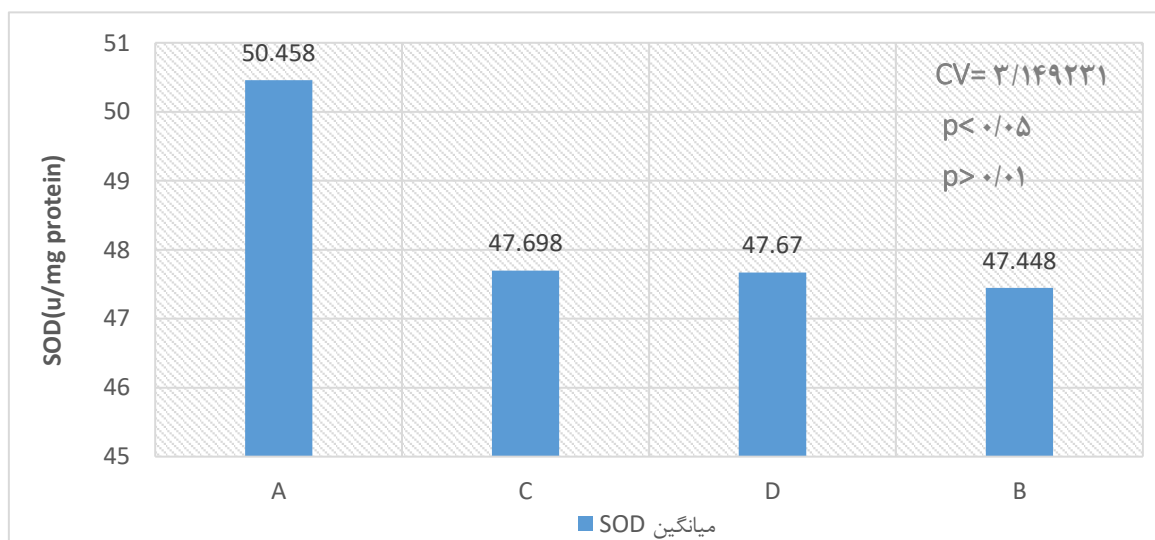
آزمایش اضافه شد. سپس ۳۰ میکرولیتر سرم و در نهایت ۲۰ میکرولیتر از محلول پیروگالول اضافه شد. اندازه‌گیری اکسیداسیون خودکار پیروگالول در ۴۲۰ نانومتر صورت پذیرفت. در نهایت از طریق برابری یک واحد آنزیم با مقدار آنزیمی که قادر به مهار نرخ اکسیداسیون پیروگالول تا ۵۰ درصد است، محاسبات به عمل آمد.

#### ۴.۲. تجربه و تحلیل داده‌ها

آنالیزهای آماری با نرم افزار SaS 9.2 انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از تجزیه واریانس یکطرفه استفاده شد. برای تعیین سطح معنی‌داری بین میانگین‌ها از آزمون‌های L.S.D، توکی، دانت، دانکن و S.N.K. استفاده شد.

#### ۳. نتایج

نتایج تجزیه واریانس داده‌های SOD گروه A (دریافت‌کننده فقط *A. hydrophila*) به همراه گروه‌های B



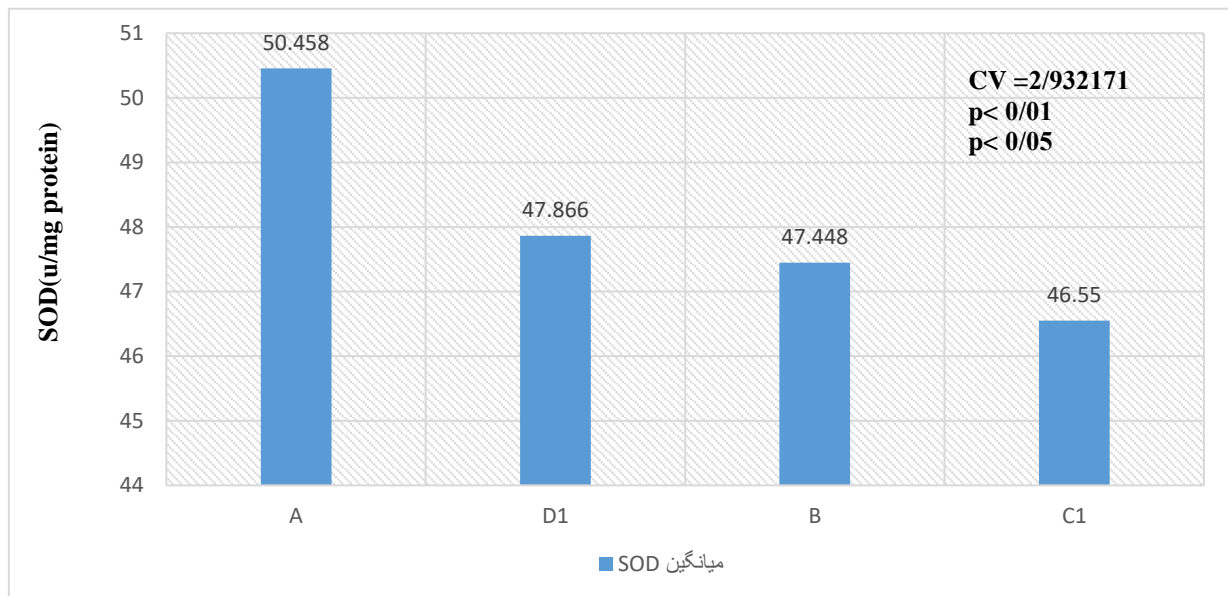
شکل ۱ - نمودار مقایسه SOD در بین تیمارهای A (گروه کنترل که فقط باکتری آنرومونااس هیدروفیلا و جیره پایه دریافت کرده است)، تیمار B (گروه دریافت‌کننده فقط اکسی‌تتراسایکلین)، تیمار C (گروه دریافت‌کننده اکسی‌تتراسایکلین و ۰/۵ درصد BHT)، تیمار D (دریافت‌کننده جیره حاوی اکسی‌تتراسایکلین و ۰/۸ درصد جیره BHT)

B (دریافت‌کننده جیره حاوی فقط اکسی‌تتراسایکلین) در مرحله دوم آزمایش و تیمار شاهد A (دریافت‌کننده فقط *A. hydrophila*) در سطح ۹۹ و ۹۵ درصد معنی‌دار شد ( $p < 0/05$ ،  $p < 0/01$  و CV= ۲/۹۳۲۱۷۱). مقایسات

تجزیه واریانس داده‌های SOD حاصل از نمونه‌برداری سوم شامل داده‌های تیمار D1 (دریافت‌کننده فقط ۰/۸ درصد BHT) و تیمار C1 (دریافت‌کننده فقط ۰/۵ درصد BHT) همراه با داده‌های به دست آمده از تیمار

میانگین تیمارها با روش‌های L.S.D، توکی، دانت، دانکن و S.N.K، کمترین اختلاف معنی‌دار بین تیمار A (دریافت‌کننده جیره حاوی فقط اکسی‌تتراسایکلین) و C1 (دریافت‌کننده جیره حاوی فقط ۰/۵ درصد BHT) مشاهده شد (نمودار شکل ۲).

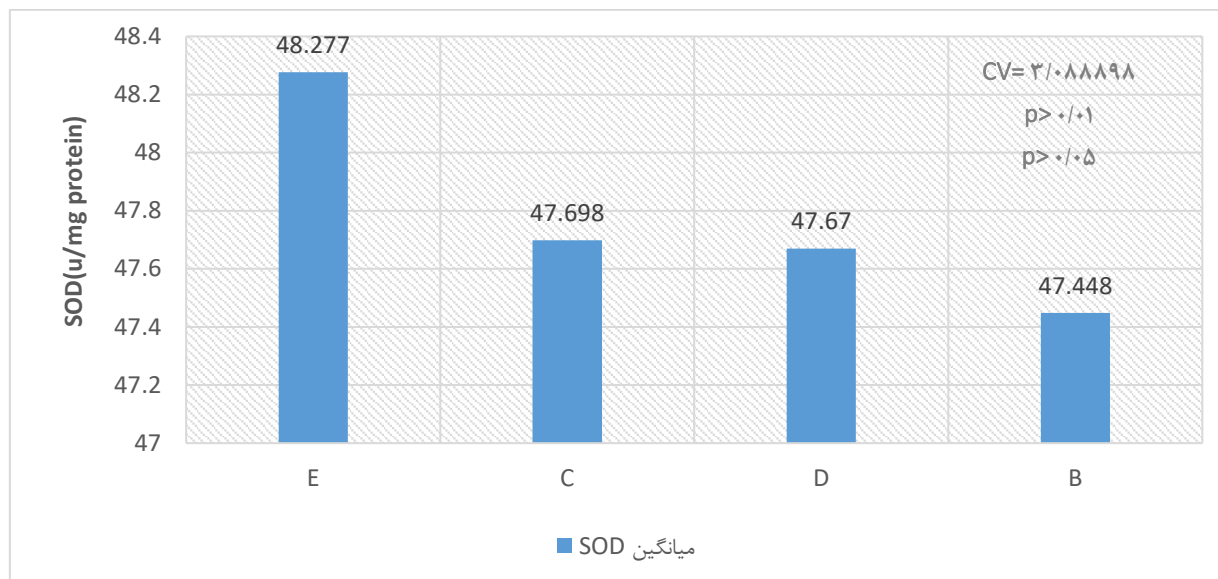
میانگین تیمارها با روش‌های L.S.D، توکی، دانت، دانکن و S.N.K، کمترین اختلاف معنی‌دار بین تیمار A (دریافت‌کننده جیره حاوی فقط ۰/۸ درصد BHT) و تیمار D1 (دریافت‌کننده جیره حاوی فقط ۰/۵ درصد BHT) و عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین دو تیمار فوق‌الذکر در سطح



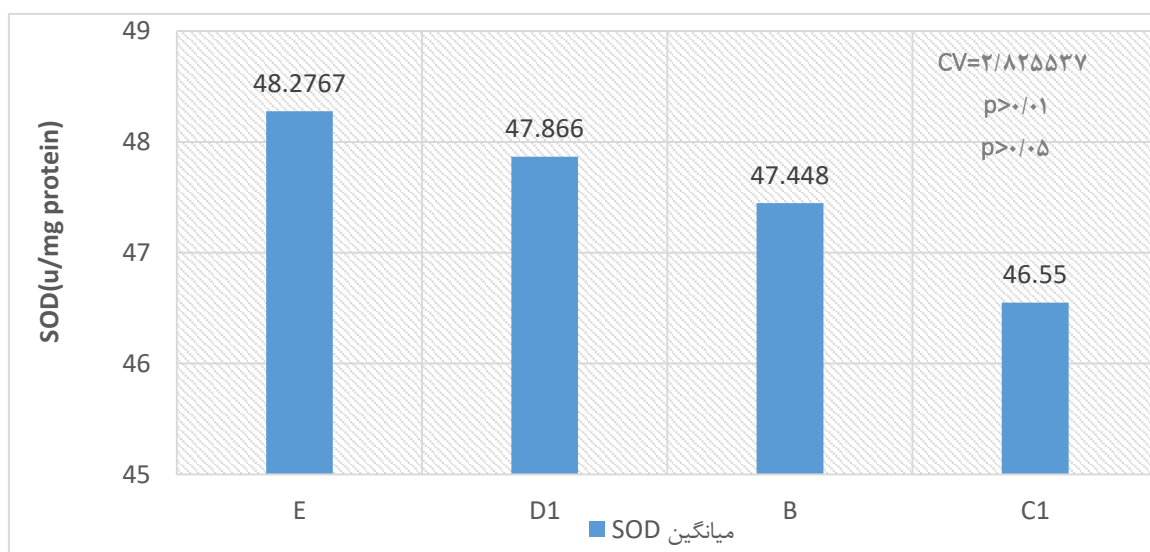
شکل ۲ - نمودار مقایسه SOD در بین تیمارهای A (گروه کنترل که فقط باکتری آنرومونا هیدروفیلا و جیره پایه دریافت کرده است)، تیمار D1 (دریافت‌کننده جیره حاوی فقط ۰/۸ درصد BHT)، تیمار B (گروه دریافت‌کننده جیره حاوی فقط اکسی‌تتراسایکلین)، تیمار C1 (دریافت‌کننده جیره حاوی فقط ۰/۵ درصد BHT)

شاهدی که فقط سرم فیزیولوژی و جیره پایه دریافت کرده بود) همراه با تیمارهای B (گروه دریافت‌کننده جیره حاوی فقط اکسی‌تتراسایکلین در مرحله دوم آزمایش)، C1 (گروه دریافت‌کننده جیره حاوی فقط ۰/۵ درصد BHT)، D1 (گروه دریافت‌کننده جیره حاوی فقط ۰/۸ درصد BHT) هیچ تفاوت معنی‌داری در سطح  $\alpha = 0/01$  و  $p > \alpha = 0/05$  و  $p > 0/05$  نشان ندادند (CV = ۲/۸۲۵۵۳۷). مقایسه میانگین تیمارها به روش دانکن هیچ تفاوت معنی‌داری را میان تیمارها نشان نداد (نمودار شکل ۴).

آنالیز آماری داده‌های SOD تیمار E (گروه شاهدی که فقط سرم فیزیولوژی و جیره پایه دریافت کرده بود) همراه با تیمارهای B (گروه دریافت‌کننده جیره حاوی فقط اکسی‌تتراسایکلین)، C (گروه دریافت‌کننده جیره حاوی اکسی‌تتراسایکلین و ۰/۵ درصد BHT)، D (گروه دریافت‌کننده جیره حاوی اکسی‌تتراسایکلین و ۰/۸ درصد BHT) هیچ تفاوت معنی‌داری در سطح  $\alpha = 0/01$  و  $\alpha = 0/05$  نشان نداد (CV = ۳/۰۸۸۸۹۸). مقایسه میانگین تیمارها به روش دانکن هیچ تفاوت معنی‌داری را میان تیمارها نشان نداد (نمودار شکل ۳). همچنین آنالیز آماری داده‌های SOD تیمار E (گروه



شکل ۳ - نمودار مقایسه SOD در بین تیمارهای E (گروه شاهد، دریافت کننده سرم فیزیولوژی و جیره پایه)، C (گروه دریافت کننده جیره حاوی اکسی تتراسایکلین و ۰/۵ درصد BHT)، D (گروه دریافت کننده جیره حاوی اکسی تتراسایکلین و ۰/۸ درصد BHT). عدم معنی داری در سطح  $\alpha=0/01$  و  $\alpha=0/05$



شکل ۴ - نمودار مقایسه SOD در بین تیمارهای E (گروه شاهد، دریافت کننده سرم فیزیولوژی و جیره پایه)، D1 (گروه دریافت کننده جیره حاوی فقط ۰/۸ درصد BHT)، B (جیره دریافت کننده فقط اکسی تتراسایکلین)، C1 (جیره دریافت کننده فقط ۰/۵ درصد BHT). عدم معنی داری در سطح  $\alpha=0/05$

همچنین یک محتوی مهم اولین خط دفاعی در مقابل هجوم پاتوژن‌ها است و به‌عنوان یک شاخص حیاتی جهت ارزیابی پاسخ‌های ایمنی غیراختصاصی به کار می‌رود (Wang et al., 2016). با توجه به نمودار شکل ۱ و نمودار شکل ۲ تیمار A (شاهدی که فقط باکتری آئروموناس

#### ۴. بحث و نتیجه‌گیری

SOD به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان داخلی توانایی ممانعت از تشکیل کنترل‌نشده یون‌های منفی اکسیژن واکنشی و مقاومت در برابر آسیب اکسیداتیو را دارد.



۰/۵ درصد BHT در جیره حاوی اکسی‌تتراسایکلین توانسته اثرات مضر اکسی‌تتراسایکلین را خنثی کند. کمترین اختلاف معنی‌دار بین تیمار A (دریافت‌کننده فقط باکتری) و تیمار D1 (دریافت‌کننده فقط ۰/۸ درصد BHT) در سطح  $\alpha = 0.05$  و عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین این دو تیمار در سطح  $\alpha = 0.01$  مشاهده شد. این نشان می‌دهد که استفاده از جیره حاوی فقط ۰/۸ درصد BHT در ادامه درمان، می‌تواند اثرات مضر اکسی‌تتراسایکلین روی SOD کبد ماهیان را بهبود دهد. همچنین بیشترین اختلاف معنی‌دار بین تیمار A و تیمار C1 (دریافت‌کننده جیره حاوی فقط ۰/۵ درصد BHT) مشاهده شد. به عبارتی تیمار C1 کمترین میزان SOD را در مقایسه با تیمار A داشت. بنابراین، جیره حاوی فقط ۰/۵ درصد BHT (تیمار C1) قادر به خنثی‌سازی اثرات مضر اکسی‌تتراسایکلین نبوده است. به گزارش Yehye و همکاران (۲۰۱۵) هر چند اثرات جانبی منفی جدی از مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی گزارش نشده است برخی ترکیبات فنولیک در صورت استفاده در مقادیر زیاد می‌تواند مضر باشد. بنابراین، پایین‌آمدن SOD کبد ماهیان دریافت‌کننده جیره حاوی ۰/۸ درصد BHT و اکسی‌تتراسایکلین (تیمار D در نمودار ۱) را می‌توان به بالابودن دوز BHT و هم‌افزایی اثرات منفی آن با اثرات منفی اکسی‌تتراسایکلین نسبت داد.

بر اساس نتایج به‌دست آمده در آزمایش حاضر پیشنهاد می‌شود در صورت استفاده از جیره حاوی BHT در حین درمان آنتی‌بیوتیکی بیماری باکتریایی *Aeromonas hydrophila* در قزل‌آلای رنگین‌کمان از ۰/۵ درصد BHT همراه با اکسی‌تتراسایکلین در جیره استفاده گردد و هنگام حذف اکسی‌تتراسایکلین در ادامه درمان جهت جبران اثرات مضر آنتی‌بیوتیک فوق‌روی SOD کبد پیشنهاد می‌شود از جیره حاوی ۰/۸ درصد BHT استفاده شود.

هیدروفیلا و جیره پایه دریافت کرده بود) بی‌شترین میزان SOD را نشان داده است. به گزارش pês و همکاران (۲۰۱۸) اکسی‌تتراسایکلین یکی از رایج‌ترین آنتی‌بیوتیک‌ها در پرورش ماهیان به‌علت بالاترین کارایی و اقتصادی بودن در مقایسه با سایر آنتی‌بیوتیک‌ها است. در کنار اثرات مفید آن به‌عنوان عامل آنتی‌بیوتیکی، نشان داده شد که اکسی‌تتراسایکلین موجب آسیب DNA، مداخله‌کردن با مکانیسم‌های ایمنی و تنظیم ژن‌های شایسته ایمنی، ایجاد آسیب کبدی و منجرشدن به استرس اکسیداتیو، افزایش سطوح پروکسیداسیون لیپید و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) می‌شود. مطالعات ثابت کردند که تجویز خوراکی اکسی‌تتراسایکلین منجر به تولید گونه‌های اکسیژن‌واکنشی و آسیب DNA در گونه‌های مختلف ماهیان نیز می‌شود. از طرف دیگر، تیمار B (دریافت‌کننده فقط اکسی‌تتراسایکلین) در مقایسه با تیمار A (دریافت‌کننده فقط آئروموناس هیدروفیلا) کمترین میزان SOD را نشان داد. براین‌اساس و نیز بر اساس نمودار شکل ۱. که بیشترین اختلاف معنی‌دار بین تیمار B (دریافت‌کننده فقط اکسی‌تتراسایکلین) و تیمار A (دریافت‌کننده فقط باکتری) مشاهده شد علت کاهش محتوی SOD کبد ماهیان تیمار دریافت‌کننده جیره حاوی فقط اکسی‌تتراسایکلین قابل‌توجه است، که احتمالاً نشان می‌دهد استفاده از جیره حاوی فقط اکسی‌تتراسایکلین برای درمان ماهیان مبتلا به *A. hydrophila* کافی نیست. به گزارش pês و همکاران (۲۰۱۸) کورستین قادر بود از کاهش فعالیت SOD در گروهی که جیره حاوی کورستین به‌علاوه اکسی‌تتراسایکلین دریافت کرده بودند جلوگیری کند. از طرف دیگر، کمترین اختلاف معنی‌دار بین تیمار C (دریافت‌کننده جیره حاوی اکسی‌تتراسایکلین و ۰/۵ درصد BHT) و تیمار A براساس مقایسه میانگین به‌دست آمد (نمودار شکل ۱). این نشان می‌دهد که استفاده از

## References

- Alti, G., Canli, E.G., Eroglu, A., Canli, M., 2016. Characterization of antioxidant system parameters in four freshwater fish species. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 126, 30-37.

- Baldissera, M.D., Souza, C.F., Ju'nior, G.B., de Vargas, A.C., Boligon, A.A., Campos, M.M.A., Stefani, L.M., Baldisseroto, B., 2017. Melaleuca alternifolia essential oil enhances the non-specific immune system and prevents oxidative damage in *Rhamdia quelen* experimentally infected by *Aeromonas hydrophila*: Effects on cholinergic and purinergic system in liver tissue. *Fish and Shellfish Immunology* 61, 1-8.
- Boonsaner, M., Hawker, D.W., 2013. Evaluation of food chain transfer of the antibiotic oxytetracycline and human risk assessment. *Chemosphere* 93, 1009-1014.
- Chen, Y.Y., Chen, J.C., Tseng, K.C., Lin, Y.C., Huang, C.L., 2015. Activation of immunity, immune response, antioxidant ability, and resistance against *Vibrio alginolyticus* in white shrimp *Litopenaeus vannamei* decrease under long-term culture at low pH. *Fish and Shellfish Immunology* 46, 192-199.
- Fečkaninová, A., koščová, J., Mudroňová, D., Popelka, P., Toropilová, J., 2017. The use of probiotic bacteria against *Aeromonas* infections in salmonid aquaculture. *Aquaculture* 469, 1-8.
- Feng, L., Chen, Y.P., Jiang, W.D., Liu, Y., Jiang, J., Wu, P., Zhao, J., Kuang, S.Y., Tang, L., Tang, W.N., Zhang, Y.A., Zhou, X.Q., 2016. Modulation of immune response, physical barrier and related signaling factors in the gills of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fed supplemented diet with phospholipids. *Fish and Shellfish Immunology* 48, 79-93.
- Gobi, N., Ramya, C., Vaseeharan, B., Malaikozhundn, B., Vijayakumar, S., Murugan, K., Benelli, G., 2016. *Oreochromis mossambicus* diet supplementation with *Psidium guajava* leaf extracts enhance growth, immune, antioxidant response and resistance to *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology* 58, 572-583.
- Jiang, W.D., Hu, K., Liu, Y., Jiang, J., Wu, P., Zhao, J., Zhang, Y.A., Zhou, X.Q., Feng, L., 2016. Dietary myo-inositol modulates immunity through antioxidant activity and the Nrf2 and E2F4/cyclin signalling factors in the head kidney and spleen following infection of juvenile fish with *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology* 49, 374-386.
- Leal, J.F., Henriques, I.S., Coreia, A., Santos, E.B.H., Esteves, V.I., 2017. Antibacterial activity of oxytetracycline photoproducts in marine aquaculture's water. *Environmental Pollution* 220, 644-649.
- Li, M., Chen, L., Qin, J.G., Li, E., Yu, N., Du, Z., 2013. Growth performance, antioxidant status and immune response in dark barbel catfish *Pelteobagrus vachelli* fed different PUFA/vitamin E dietary levels and exposed to high or low ammonia. *Aquaculture* 406-407, 18-27.
- Lu, Y., Liang, X.P., Jin, M., Sun, P., Ma, H.N., Yuan, Y., Zhou, Q.C., 2016. Effects of dietary vitamin E on the growth performance, antioxidant status and innate immune response in juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Aquaculture* 464, 609-617.
- Maklud S., Marklund G., 1974. Involvement of superoxide anion radical in autoxidation of pyrogallol and a convenient assay of superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry* 47, 469-474.
- Menezes, C., Marins, A., Murussi, C., Pretto, A., Leitemperger, J., Loro, V.L., 2016. Effects of diphenyl diselenide on growth, oxidative damage, and antioxidant response in silver catfish. *Science of the Total Environment* 542, 231-237.
- Niu, H., Jia, Y., Hu, P., Meng, Z., Lei, J., 2014. Effect of dietary vitamin E on the growth performance and nonspecific immunity in sub-adult turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish and Shellfish Immunology* 41, 501-506.
- Pês, T.S., Saccol, E.M.H., Londero, È.P., Bressan, C.A., Ourique, G.M., Rizzetti, T.M., Pretes, O.D., Zanella, R., Baldisserotto, B., Pavanato M.A., 2018. Protective effect of quercetin against oxidative stress induced by oxytetracycline in muscle of silver catfish. *Aquaculture* 484, 120-125.
- Shiau, S.Y., Gabaudan, J., Lin, Y.H., 2015. Dietary nucleotide supplementation enhances immune responses and survival to *Streptococcus iniae* in hybrid tilapia fed diet containing low fish meal. *Aquaculture Reports* 2, 77-81.
- Sindhi, V., Gupta V., Sharma, K., Bhatnagar, S., Kumari, R., Dhaka, N., 2013. Potential applications of antioxidant- A review. *Journal of Pharmacy Research*. 7, 828-835.
- Wang, E., Chen, X., Wang, K., Wang, J., Chen, D., Geng, Y., Lai, W., Wei, X., 2016. Plant polysaccharides used as immunostimulants enhance innate immune response and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* infection in fish. *Fish and Shellfish Immunology* 59, 196-202.
- Yehye, W.A., Abdul Rahman, N., Ariffin, A., Abd Hamid, S.B., Alhadi, A.-A., Kadir, F.-A., Yaeghoobi, M., 2015. Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene(BHT): A review. *European Journal of Medicinal Chemistry* 101, 295-312.