کاربرد یک پلی‌ساکارید جدید از ریشه گیاه چوبک نکائی (*Acanthophyllum glandulosum*) در بهبود سلامت قزل‌آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) در معرض کلرید جیوه

کامبیز جهان بین[۱]، سید علی اکبر هدایتی[۲]، الهه حسن نتاج نیازی*[۳] و سیده آمنه حسینی[۴]

۱. استادیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه صنعتی شاهرود، دانشکده کشاورزی

۲. استادیار گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، دانشکده شیلات و محیط زیست

۳. دانشجوی دکترای شیلات، دانشگاه ارومیه، پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، گروه تکثیر و پرورش آبزیان

۴. دانشجوی کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، دانشکده شیلات و محیط زیست

*نویسنده مسئول : e.niazie@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۳/۰۴/۰۸ تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۲/۲۹

چکیده

پلی‌ساکاریدها، پلیمرهای زیستی‌ای هستند که نقش کلیدی در بهبود سلامتی ایفا می‌کنند. در مطالعه حاضر اثرات پلی‌ساکارید جدید از ریشه گیاه چوبک نکائی (*Acanthophyllum glandulosum*) بر شاخص‌های خونی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در معرض تحت حاد (sub-acute) جیوه بررسی شد. تعداد ۵۴۰ ماهی در ۳ تیمار مختلف (هر تیمار با سه تکرار) در مخازن فایبرگلاس تقسیم بندی شدند: تیمار اول به عنوان تیمار شاهد قرار داده شد (فاقد محلول جیوه و پلی ساکارید)، تیمار دوم با ۶۰ µg /L جیوه و تیمار سوم حاوی ۶۰ µg /L جیوه و ۱٪ پلی ساکارید آزمایشی بود که ۲۴ ساعت قبل از قرار گرفتن ماهی‌ها در معرض جیوه به مخزن ریخته شده بود. پارامترهای هماتولوژی و بیوشیمیایی خون آنالیز شدند. نتایج مطالعه حاضر نشان دادند که برخی فاکتورهای خونی به طور معنی‌داری در تیمار حاوی پلی‌ساکارید و جیوه در مقایسه با تیمار فقط جیوه تنظیم شدند. پلی‌ساکارید دارای اثرات تنظیمی بر فاکتورهایی از قبیل تعداد گلبول‌های قرمز (R.B.C)، هماتوکریت (Ht)، حجم متوسط گویچه (M.C.V) و کورتیزول بود. همچنین، پلی‌ساکارید بر مقدار هموگلوبین (Hb) و درصد غلظت هموگلوبین داخل گویچه (M.C.H.C) تاثیر گذاشت اما این تاثیر معنی‌داری نبود. از طرفی دیگر، پلی‌ساکارید هیچ گونه اثر تنظیمی بر وزن هموگلوبین داخل گویچه (M.C.H)، مقدار پروتئین و گلوکز نداشت. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که پلی‌ساکارید مستخرج از ریشه چوبک نکائی اثرات مفیدی بر میزبان داشته و احتمالا به عنوان یک پره بیوتیک عمل کرده که می‌تواند سلامت میزبان را بهبود ببخشد.

واژگان کلیدی: قزل‌آلای رنگین کمان، سلامت ماهی، پر بیوتیک، پلی‌ساکارید، جیوه

مقدمه

جنس چوبک [۱] (متعلق به خانواده میخک[۲]) با ۶۱ گونه در جهان شناخته شده است که از این میزان ۲۳ گونه بومی ایران می‌باشد (رشینگر، ۱۹۸۸). بر اساس اطلاعات موجود، بیشترین تعداد گونه‌های این جنس در شرق ایران (بخصوص استان خراسان) و در مناطق مجاور از جمله ترکمنستان و افغانستان ثبت شده است (شیمان- چکا، ۱۹۸۸). از شرق افغانستان به سمت چین و غرب ترکیه به سمت سوریه، از تعداد گونه‌های این جنس کاسته می‌شود بطوریکه

[۱] Acanthophyllum
[۲] Caryophyllaceae

فقط یک گونه در چین (چوبک افغانستانی[۳]) و یک گونه در سوریه (چوبک فراهم[۴]) وجود دارد. بطور کلی تمامی گونه‌های این جنس متعلق به نواحی ایران- توران می‌باشد (غفاری، ۲۰۰۴). چوبک تاکنون به عنوان گیاهان صابونی شناخته شده و از زمان‌های قدیم بطور گسترده به عنوان یک ماده شوینده در استان خراسان و نیز سایر مناطق ایران مورد استفاده قرار گرفته است. بعلاوه ریشه گیاه چوبک به عنوان خلط آور، قی آور و نیز داروی زخم برای اسب ها کاربرد داشته است. اطلاعات بسیار کمی در ارتباط با ترکیبات شیمیایی گونه‌های چوبک وجود دارد ولی در تمامی آنها به وجود ساپونین‌ها، پلی‌ساکاریدها و مونوساکاریدها در جنس چوبک اشاره شده است (کوربانوا و همکاران، ۲۰۰۳ و جهان بین و همکاران، ۲۰۱۱a). چوبک نکائی (*Acanthophyllum glandulosum*) یکی از مهم‌ترین گونه‌های این جنس می‌باشد که در مناطق مختلفی از ایران از جمله قاینات و گناباد جهت تولید شیرینی سنتی و نیز حلوا شکری کاربرد دارد ولی تاکنون اطلاعاتی در مورد ترکیبات تشکیل دهنده و نیز خواص آن چاپ نشده است. بنابراین انجام هرگونه مطالعه جدید برای شناخت موارد ذکر شده ضروری به نظر می رسد.

پربیوتیک‌ها عناصر غذایی غیرقابل هضمی هستند که از طریق تحریک رشد یا فعال کردن یک یا تعداد محدودی از گونه‌های باکتریایی که در روده وجود دارند، اثرات سودمندی بر میزبان داشته و سلامتی آن‌را بهبود می‌بخشند (گیبسون و روبرفروید، ۱۹۹۵). کربوهیدرات‌ها، بیشترین موادی هستند که بعنوان پربیوتیک در تغذیه انسان‌ها و حیوانات مورد بررسی قرار گرفته‌اند (شعاعی و همکاران، ۱۳۹۱).

پلی‌ساکاریدها دسته ای از ترکیبات قندی هستند که به عنوان پلیمرهای زیستی شناخته شده و نقش کلیدی در عوامل درمانی ایفا می‌کنند. مقالات منتشر شده نشان می‌دهد پلی‌ساکاریدهای متعددی از گیاهان، قارچ ها و جانوران جدا شده است که دارای عوارض جانبی کمتر نسبت به مواد سنتزی بوده و نیز دارای طیف گسترده‌ای از عملکردهای بیولوژیکی از قبیل ضد تومور، محرک سیستم ایمنی و خصوصیات ضد اکسیدکنندگی هستند (جیمنز- مدینا و همکاران، ۲۰۰۸). پلی‌ساکاریدهای گیاهی نسبت به پلی‌ساکاریدهای جانوری دارای مزیت می باشند زیرا اغلب مصرف‌کنندگان، مواد به دست آمده از منابع گیاهی را نسبت به منابع جانوری ترجیح می‌دهند. مطالعات کمی در رابطه با تاثیر پلی‌ساکاریدها بر پارامترهای خونی ماهیان صورت گرفته است که از آن جمله می‌توان به پژوهش شعاعی و همکاران (۱۳۹۱) و طافی و همکاران (۱۳۹۲) روی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، جهانبین و همکاران (۲۰۱۱b) روی سالمون آتلانتیک اشاره کرد.

جیوه از عناصر بسیار سمی در محیط زیست محسوب می‌شود به گونه‌ای که در بین فلزات سنگین بیش‌ترین توجه معطوف به جیوه است. جیوه در ردیف عناصری است که در بدن آبزیان بویژه ماهیان، تجمع پیدا می‌کند. همچنین به دلیل سمیت بالا و دفع بسیار کند در ماهیان از خطرناک‌ترین آلاینده های زیست‌محیطی می‌باشد (آگاه و همکاران، ۲۰۰۷). آلودگی جیوه در اکوسیستم‌های آبی رو به گسترش است و پیش‌بینی شده که این افزایش باز هم ادامه می‌یابد (نریاگو و پاکینا، ۱۹۸۸). با افزایش

[۳] *A. punges*
[۴] *A. vertticillatum*

سطوح آلودگی در زیست بوم‌های آبی، مقادیر آلاینده ها به ویژه جیوه در ماهیان به دلیل اثرات بالقوه بر انسان مورد توجه است (هاراکه و همکاران، ۲۰۰۳). جیوه معمولا از طرق مختلف از قبیل سنگ، خاک، تصفیه فاضلاب، هوا، آتشفشان، سوخت نفت، گاز، زغال سنگ، معادن، تجهیزات الکتریکی، رنگ‌سازی، کاغذ و صنایع و غیره وارد اکوسیستم آبی می‌شود (اسماعیلی،۱۳۸۱). ماهی جیوه را به طور مستقیم از منابع غذایی جذب می‌کند (کونیقام و همکاران، ۱۹۹۴). از طرفی دیگر، جیوه یک زنوبیوتیک[۵] سیتوتوکسیک[۶] با اثرات بیوشیمیایی در سطوح سلولی و زیر سلولی می‌باشد (الیوری و همکاران، ۲۰۰۰). مقالات منتشر شده نشان می‌دهد که قرار گرفتن آبزیان در معرض جیوه می‌تواند موجب تغییرات فاکتورهای هماتولوژیک، ساختار پروتئین و جلوگیری از انتقال گلوکز شود (باسکین و همکاران، ۲۰۰۳).

قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) از خانواده آزادماهیان[۷] و متعلق به انشعابات اقیانوس آرام در آسیا و آمریکای شمالی می باشد. امروزه تکثیر و پرورش آن در اکثر مناطق دنیا که واجد شرایط بوم شناختی آن باشد فراهم شده است و از نظر اقتصادی از جمله ماهیان با ارزش خوراکی محسوب می‌شود.

پس از کاربرد پربیوتیک به عنوان محرک ایمنی، ارزیابی پارامترهایی از قبیل پارامترهای خون شناسی حائز اهمیت است. اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی روش‌هایی هستند که معمولا در سم‌شناسی آبزیان و نظارت‌های زیستی جهت تعیین اثرات یک ماده بر موجودات آبزی استفاده می‌شوند. با این‌حال، شاخص‌های خون شناسی در اغلب موارد هنگام تشخیص‌های بالینی ماهی جهت تعیین غلظت‌های تحت کشنده‌ی آلاینده‌ها استفاده می‌شوند (کیم و همکاران، ۲۰۰۸). بر این مبنا، مطالعه حاضر به بهره‌وری از یک پلی ساکارید جدید به دست آمده از یک منبع گیاهی به عنوان یک افزودنی موثر جهت بررسی اثرات تحت کشنده جیوه بر شاخص‌های هماتولوژی و بیوشیمیایی خون ماهی قزل‌آلا می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

تهیه پلی‌ساکارید

جمع آوری ریشهٔ گیاه چوبک نکائی

ریشهٔ گیاه در فواصل زمانی اردیبهشت تا تیر ماه ۱۳۹۱ از منطقهٔ گناباد واقع در استان خراسان جمع آوری شد. ریشه ها پس از انتقال به آزمایشگاه، در مجاورت با هوا، خشک و در دمای اتاق نگهداری شدند. پیش از انجام آزمایش، به منظور جدا کردن سایر مواد خارجی چسبیده به بخش بیرونی ریشه-های گیاه، ابتدا پوسته خارجی آن‌ها توسط چاقو تمیز و سپس با استفاده از آب شستشو داده شد و در مجاورت با هوا خشک گردیدند. ریشه ها پس از خشک شدن توسط دستگاه خُردکن آزمایشگاهی به قطعات ریز به ابعاد ۰/۱۵ میلی متر تبدیل شدند.

استخراج و خالص سازی پلی‌ساکارید

استخراج پلی‌ساکارید از ریشه گیاه چوبک نکائی (*Acanthophyllum glandulosum*) مطابق با روش جهان‌بین و همکاران (۲۰۱۱a) که در ادامه خواهد آمد انجام گرفت. ابتدا ریشه های خُرد شده گیاه (۳۳۰ گرم) با استفاده از اتانول ۹۵٪ (۱ لیتر) به مدت ۱۰ ساعت در دمای جوش چربی زدایی شدند.

[۵] xenobiotic
[۶] cytotoxic
[۷] Salmonidae

به منظور انجام بهتر کار، هر سه ساعت یکبار اتانول استفاده شده با اتانول تازه جایگزین گردید و در نهایت اتانول حاوی ترکیبات غیر ضروری، دور ریخته شد. این مرحله به منظور حذف رنگ‌ها، مواد چربی دوست، ساپونین‌ها و نیز مونوساکاریدها انجام گرفت. در نهایت ریشه‌های گیاهی شستشو داده شده با اتانول، در مجاورت با هوا خشک شدند. جداسازی پلی‌ساکاریدهای محلول در آب از ۲۰۰ گرم نمونهٔ گیاهی خشک شده پس از شستشو با اتانول، به مدت ۱۰ ساعت در ۲ لیتر آب گرم (۵۰ درجهٔ سانتیگراد) انجام گرفت. این مرحله ۳ بار تکرار شد و در نهایت عصاره‌های آبی بدست آمده از هر مرحله با هم ترکیب شدند. در ادامه برای حذف پروتئین‌ها از عصاره آبی حاوی پلی‌ساکارید از روش سواگ استفاده شد (استاب، ۱۹۶۵). ترسیب پلی ساکاریدها از عصارهٔ آبی پروتئین زدایی شده با افزودن اتانول ۹۶ درصد (به میزان سه برابر حجم عصاره) انجام گرفت و رسوبات بدست آمده پس از جداسازی با سانتریفیوژ (۵۰۰۰ دور در دقیقه) توسط اتانول ۹۶ درصد شستشو داده شدند. شست و شوی نهایی بر روی کاغذ صافی با استفاده از اتانول مطلق، استن و اتر انجام شد و در نهایت رسوبات باقیمانده (پلی-ساکاریدهای محلول در آب خالص) بر روی کاغذ صافی پس از حل شدن در آب یون‌زدایی شده، خشک گردیدند.

برای خالص‌سازی پلی‌ساکاریدهای محلول در آب، ابتدا پلی‌ساکاریدهای خام حاصل از مرحلهٔ استخراج در حجم کمی از آب یون زدایی شده حل شد و پس از عبور از صافی های ۰/۴۵ میکرومتر وارد ستون کروماتوگرافی حاوی دی اتیل آمینو اتیل سلولز[۸] (۲/۶ سانتیمتر × ۳۰ سانتیمتر) گردید. در ادامه ستون توسط محلول آبی کلرید سدیم با گرادیان غلظتی بین صفر تا یک مولار شسته شد و پایش فرایندتوسط روش فنل-اسید سولفوریک انجام گرفت (دوبویس و همکاران، ۱۹۵۶).

نمونه‌های جمع‌آوری شده از ستون دی اتیل آمینو اتیل سلولز جهت انجام مراحل خالص سازی بیشتر وارد ستون کروماتوگرافی ژل تراوای سفادکس جی-۱۰۰[۹] (۱/۶ سانتیمتر × ۷۰ سانتیمتر) شدند. عمل شستشوی ستون با استفاده از آب یون‌زدایی شده با سرعت جریان حجمی ۹ میلی لیتر بر ساعت انجام گرفت و در نهایت پلی‌ساکارید خالص (کاملاً سفید) جمع‌آوری و سپس با روش انجمادی خشک شد.

تعیین میزان قند کل و مونوساکاریدهای تشکیل دهنده پلی‌ساکارید

میزان قند کل پلی‌ساکارید توسط روش فنل- اسید سولفوریک و استفاده از منحنی‌های استاندارد با غلظت‌های مختلف دِ-گلوکز تعیین شد (دوبویس و همکاران، ۱۹۵۶). برای شناسایی مونوساکاریدهای تشکیل دهنده پلی ساکارید از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا مُدل اِیجیلنت اِچ پی[۱۰] سری ۱۱۰۰ همراه با ستون زورباکس حاوی گروههای آمین[۱۱] استفاده شد. استونیتریل- آب با نسبت حجمی ۸۰ به ۲۰ و سرعت جریان حجمی ۲ میلی لیتر بر دقیقه به عنوان فاز متحرک مورد استفاده قرار گرفت. دمای آون ۳۰ درجه سانتیگراد، آشکارساز مورد استفاده از نوع ضریب شکست و حجم تزریق نیز ۲۰ میکرولیتر بود (جهان‌بین و همکاران، ۲۰۱۲).

تیماربندی و طراحی آزمون

این آزمایش در قالب یک طرح کاملا تصادفی می-باشد که طی یک دوره ۲۱ روزه انجام گرفت. در ابتدا، ۵۴۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان با

[۸] DEAE-Cellulose

[۹] Sephadex G-100

[۱۰] Agilent HP

[۱۱] Zorbax NH2 column

میانگین وزنی ۳۰ گرم به مدت ۲ هفته در وان‌های ۳۰۰ لیتری با شرایط جدید سازگار شدند و طی این مدت ماهی‌ها با جیره فرموله شده (۱/۵٪ وزن بدن در روز) تغذیه شدند. سپس ماهیان در ۳ تیمار مختلف (۳ تکرار برای هر تیمار) توزیع شدند. تیمار اول به عنوان تیمار شاهد قرار داده شد (فاقد محلول جیوه و پلی ساکارید)، تیمار دوم با ۶۰ µg /L جیوه و تیمار سوم حاوی ۱٪ پلی ساکارید که ۲۴ ساعت قبل از قرار گیری ماهی‌ها در معرض جیوه به درون مخزن ریخته شده بود تا پلی ساکارید با القای ایمنی ماهی، تغییرات فیزیولوژیک ناشی از جیوه را کاهش دهد. ماهی‌ها در سیستم گردشی مجهز به فیلترهای فیزیکی، شیمیایی و هوادهی قرار گرفتند. در طول دوره‌ی آزمایش سعی بر این بود که فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب ثابت نگه داشته شود.

خون‌گیری

برای جمع‌آوری نمونه خون، ماهی‌ها به سرعت از آب گرفته شده، بصورت ثابت روی میز قرار داده، سر ماهی توسط پارچه‌ای پوشیده شده و سپس خون گیری توسط سرنگ هپارینه از عروق ساقه دمی صورت گرفت. برای به حداقل رساندن استرس، مراحل خون‌گیری از هر ماهی در کمتر از ۱ دقیقه صورت گرفت. نمونه های خون فورا در دو قسمت تقسیم شدند، یک قسمت به لوله‌های هپارینه به منظور آنالیزهای هماتولوژی و بخش باقیمانده به لوله‌های غیرهپارینه جهت تجزیه و تحلیل بیوشیمیایی خون منتقل شدند. گروه اول در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شدند و گروه دوم بعداز ۱۵ دقیقه نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، به منظور جداسازی سرم ازخون، به مدت ۱۰ دقیقه تحت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس تمام نمونه‌ها بلافاصله در نیتروژن مایع غوطه‌ور شدند و تا زمان تجزیه و تحلیل به فریزر ۸۰- منتقل شدند (هدایتی و همکاران، ۲۰۱۰).

تجزیه و تحلیل هماتولوژی

درصد هماتوکریت (Ht %) بلافاصله بعد از نمونه برداری، با قرار دادن خون تازه در لوله های موئینه، به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه توسط میکروسانتریفیوژ سانتریفیوژ شدند (Hettich, Germany) و سپس ابعاد لوله‌ها اندازه‌گیری شد (گلدن فارب و همکاران، ۱۹۷۱). خواندن هماتوکریت با کمک میکروهماتوکریت خوان انجام شد. مقادیر هموگلوبین (Hb mg/l) با روش رنگ‌سنجی سیانومت‌هموگلوبین اندازه‌گیری شد (لی و همکاران، ۱۹۹۸). شاخص‌های اریتروسیت (وزن هموگلوبین داخل گویچه (MCH)، حجم متوسط گویچه (MCV) و درصد غلظت هموگلوبین داخل گویچه (MCHC) از تعداد گلبول‌های قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین به روش لی و همکاران (۱۹۹۸) بر اساس فرمول زیر محاسبه شد:

$$MCHC(mg\ l^{-1}) = Hb(mgdl^{-1}) / Ht(ratio)$$

شمارش گلبول‌های قرمز به روش ساندنز و همکاران (۱۹۸۸) انجام شد.

آزمایشات بیوشیمیایی

اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی سرم با روش آنالیز تصادفی RA-1000 (Technicon Instruments Corporation, Tarrytown, NY, USA) انجام شد. تعیین مقدار گلوکز سرم با استفاده از کیت تجاری با دستورالعمل آزمایشی تشخیص بیماری (Boehringer GmbH Diagnostica)، با روش گلوکز اکسیداز صورت گرفت (تریندر،۱۹۶۹). مقادیر کورتیزول و پروتئین کل سرم با استفاده از کیت‌های کورتیزول و پروتئین کل (شرکت پارس آزمون) اندازه‌گیری شد.

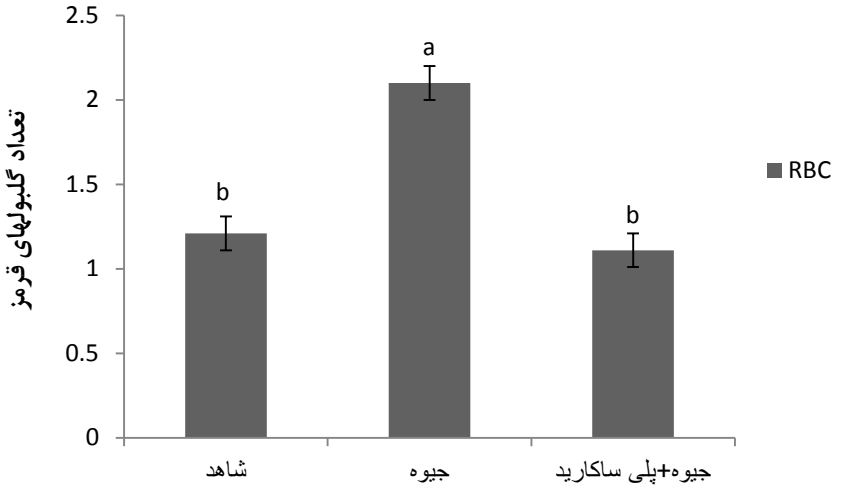
تجزیه و تحلیل آماری

در این مطالعه، به منظور تعیین تفاوت معنی‌دار بین داده‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) با آزمون دانکن استفاده شد. تفاوت بین میانگین‌ها در سطح معنی‌داری ۹۵ درصد (p<۰/۰۵) آنالیز شدند. داده‌ها بصورت میانگین ± انحراف استاندارد گزارش شده است.

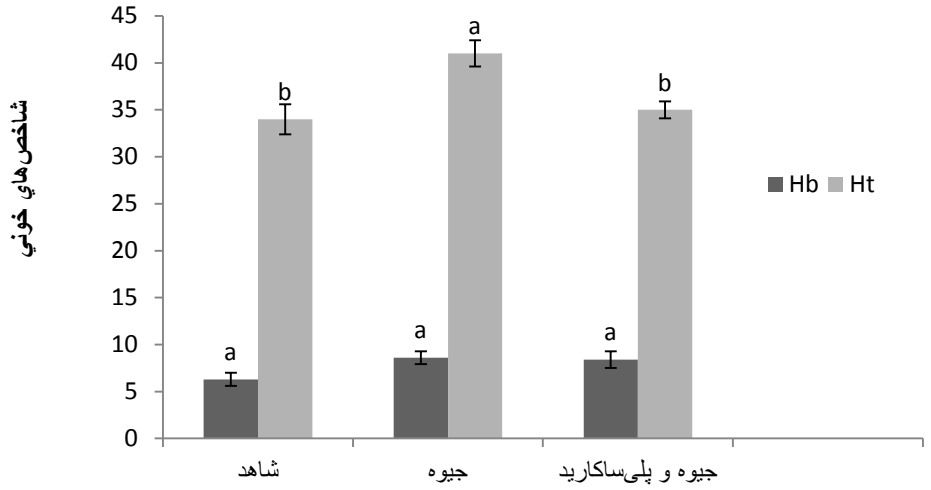
نتایج

در این بررسی پلی ساکارید کاملاً خالص بدست آمده به رنگ سفید و همگن بود. میزان قند کُل پلی ساکارید خالص ۹۸/۶٪ بدست آمد که این میزان بالای قند کُل در پلی ساکارید چوبک نکائی نشان دهنده درجه خلوص بالای پلی ساکارید می باشد. بررسی ترکیب مونوساکاریدهای تشکیل دهندهٔ پلی ساکارید حاصل از چوبک نکائی توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا نشان داد که گالاکتوز، گلوکز و آرابینوز مونوساکاریدهای غالب تشکیل دهندهٔ پلی ساکارید بوده و به ترتیب با نسبت مولی ۵/۱، ۱/۶ و ۱/۰ در ساختار پلی ساکارید وجود دارند. بر اساس مطالب ذکر شده در بالا اینگونه نتیجه‌گیری می‌شود که پلی ساکارید استخراج شده از ریشهٔ گیاه چوبک نکائی از نوع گلوکو-آرابینو-گالاکتان می‌باشد.

طی دوره‌ی آزمایش، در هیچکدام از تیمارها تلفاتی مشاهده نشد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که فاکتورهای خونی ماهی از قبیل گلبول‌های قرمز (RBC)، هموگلوبین (Hb)، هماتوکریت (Ht)، وزن هموگلوبین داخل گویچه (MCH) و حجم متوسط گویچه (MCV) در تیمار در معرض جیوه به طور معنی‌داری افزایش یافت (p<0.5) ولی درصد غلظت هموگلوبین داخل گویچه (MCHC) به طور معنی-داری کاهش یافت (p<0.5) (شکل ۱، ۲، ۳).

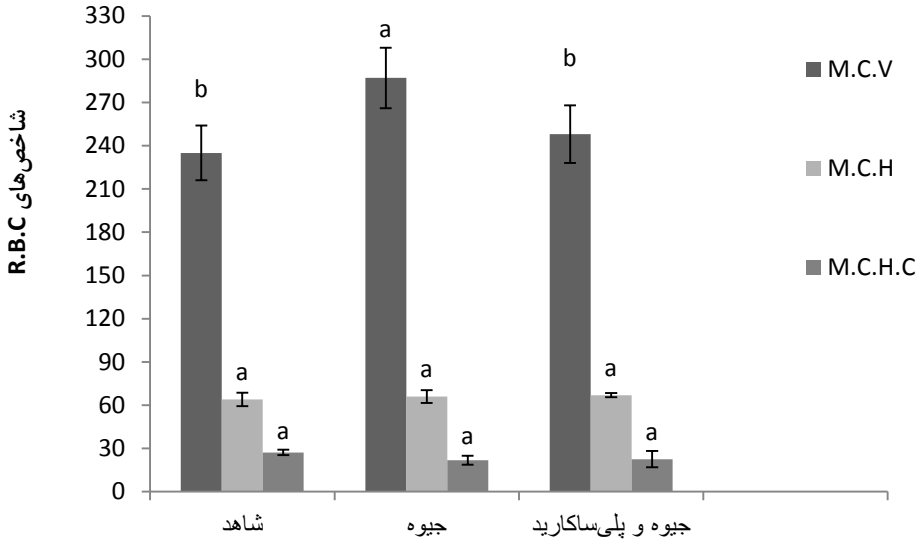


شکل ۱- تغییر تعداد گلبول‌های قرمز (L/^{۱۲} ۱۰ ×) خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در معرض جیوه و ترکیب جیوه و پلی ساکارید

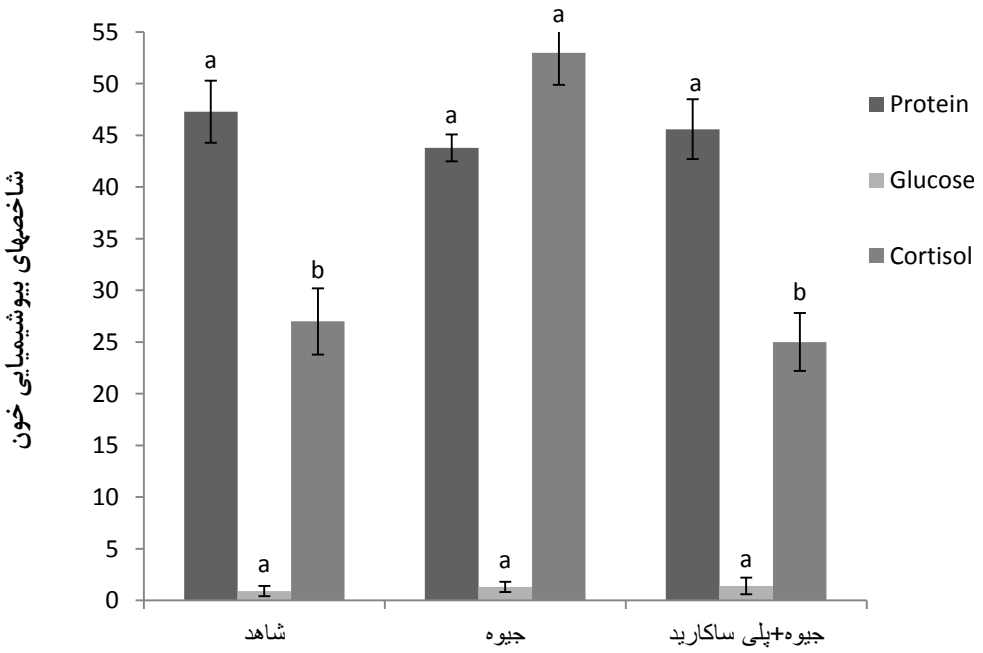


شکل ۲- تغییرات هماتوکریت (٪) و هموگلوبین (g/100ml) خون قزل‌آلای رنگین کمان در معرض جیوه و ترکیب جیوه و پلی‌ساکارید

از طرف دیگر، تعداد گلبول‌های قرمز، هماتوکریت و MCV ماهی در معرض جیوه با افزودن پلی ساکارید به آب تعدیل شده و مشابه گروه شاهد شد. همچنین، مقدار هموگلوبین ماهی با افزایش پلی-ساکارید به آب کاهش یافته ولی این کاهش، معنی-دار نبود ($p>0.5$). مقدار MCHC نیز با افزودن پلی‌ساکارید به آب، افزایش یافت اما این افزایش نیز معنی دار نبود ($p>0.5$). در تحقیق حاضر، مقدار کورتیزول خون تیمار در معرض جیوه به طور معنی-داری افزایش پیدا کرد ($p<0.5$) که با افزودن پلی ساکارید به آب، مقدار کورتیزول تعدیل یافت و به گروه شاهد بسیار نزدیک شد (شکل ۴). همچنین، مقدار گلوکز نیز در این تیمار افزایش یافت ($p>0.5$) ولی با افزودن پلی‌ساکارید به آب، تغییر معنی‌داری مشاهده نشد ($p>0.5$) (شکل ۴). مقدار پروتئین خون ماهیان تحت تاثیر جیوه نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت اما با افزودن پلی‌ساکارید، مقدار آن افزایش یافت ($p>0.5$) (شکل ۴).



شکل ۳- تغییرات M.C.V (فمتولیتر[۱۲] (fl))، M.C.H (پیکوگرم در سلول)و M.C.H.C (g/dl) خون قزل‌آلای رنگین کمان در معرض جیوه و ترکیب جیوه و پلی‌ساکارید



شکل ۴- تغییرات پروتئین (g/L)، گلوکز (mM) و کورتیزول سرم خون قزل آلای رنگین کمان در معرض جیوه و ترکیب جیوه و پلی ساکارید

[۱۲] هر فمتولیتر برابر 10^{-15} لیتر یا یک میکرومترمکعب می‌باشد.

بحث

استفاده از مکمل‌های غذایی که در تقویت سیستم ایمنی نقش دارند از جمله راهکارهایی است که علاوه بر تأمین مواد مغذی لازم در جهت حمایت از رشد و نمو موجودات آبزی، می‌تواند در افزایش سلامت، مقاومت نسبت به استرس و عوامل بیماریزا نیز مفید واقع شود (گالتین، ۲۰۰۲؛ ولویک و همکاران، ۲۰۰۴) از جمله این مکمل‌های غذایی، پربیوتیک‌ها هستند که ترکیبات غذایی غیر قابل هضمی هستند که بطور انتخابی با تحریک رشد و یا فعالیت یک یا تعداد محدودی از میکروفلور روده به میزبان سود می‌رسانند و به همین دلیل سبب افزایش سلامتی میزبان می‌شوند (گیبسون و روبرفروید، ۱۹۹۵). بر اساس تحقیقات گیبسون و همکارانش (۲۰۰۳)، عمدتا پربیوتیک‌ها شامل الیگوساکاریدهایی هستند که به طور معمول می‌توانند منجر به بهبود فلور میکروبی دستگاه گوارش شوند. این در حالی است که الیگوساکاریدها نیز از پلی‌ساکاریدها مشتق می شوند. به دلیل اطلاعات اندک در سایر گونه‌های ماهیان، بیشتر یافته‌های قبلی درباره پربیوتیک‌ها مربوط به آزادماهیان است (مریفیلد و همکاران، ۲۰۱۰). مطالعه حاضر به بررسی یک کربوهیدرات مشتق شده جدید جهت بهبود سلامت ماهی می پردازد.

پارامترهای هماتولوژی می‌تواند به عنوان شاخص سم شناسی در ماهیان در نظر گرفته شود (سنچو و همکاران، ۲۰۰۰). با این‌حال اطلاعات اندکی در رابطه با پاسخ هماتولوژیک ماهی در معرض فلزات سنگین موجود است.

کاسیلوس و همکاران (۱۹۷۴) در تحقیقی اثرات استرس بر ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) را مطالعه کرده و اذعان نمودند که استرس به هر دلیلی سبب افزایش تعداد گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت می شود که با تحقیق حاضر همخوانی دارد. نیلسون و همکاران (۱۹۸۴) با مطالعه روی ماهی کاد دریافتند که تحریکات عصبی- هورمونی آدنرژیکی ناشی از استرس، موجب انقباض طحال شده که این امر موجب افزایش RBC و Hb می‌شود ولی با حذف عامل استرس با گذشت زمان پارامترهای خونی به حالت نرمال بر می‌گردند. شاهسونی و همکاران (۱۳۸۲) با بررسی تاثیر ماده شوینده (شامپو) بر پارامترهای خونی ماهی قرمز (*Carassius auratus*) دریافتند که تعداد گلبول‌های قرمز (RBC) ماهی در معرض این آلاینده افزایش می‌یابد که می‌تواند ناشی از استرس شیمیایی محیط و یا بر اثر هیپرپلازی بافت آبشش باشد که برای تامین اکسیژن مورد نیاز، میزان گلبول قرمز خون افزایش می‌یابد که با مطالعه حاضر همخوانی دارد. نتایج این تحقیق با یافته‌های چودهاری و همکاران (۲۰۰۴) مطابقت دارد. این محققین دریافتند که هموگلوبین و هماتوکریت در معرض آب آورده از فلزات افزایش می‌یابد و این افزایش، ظرفیت حمل اکسیژن را بالا برده و تبادلات گازی را بهبود می‌بخشد. از طرفی دیگر، اولیویرا- ریبیرو و همکاران (۲۰۰۶) مقادیر بالای هموگلوبین و هماتوکریت را در ماهی نئوتروپیکال (*Hoplias malaricus*) در معرض جیوه تایید کردند. بنسال و همکاران (۱۹۹۷) در بررسی هماتولوژی که روی ماهیان استخوانی آب شیرین انجام دادند، یافتند که یکسری مواد شیمیایی مانند آلدرین، ازون، کلروان، مس و متاسیستوکس سبب افزایش Hb و RBC در ماهیان می‌گردد و دسته دیگر مانند روی، سرب، مالاتیون، کادمیوم و جیوه سبب کاهش میزان هموگلوبین، هماتوکریت و

تعداد گلبول‌های قرمز شده و کم خونی در ماهیان را بوجود می‌آورد که برخلاف یافته‌های تحقیق حاضر می‌باشد. در مطالعات دیگر، رنجانا و پیوش (۲۰۱۱) پارامترهای هماتولوژی ماهی کپور را تحت تاثیر فلز روی بررسی کردند و به این نتیجه دست یافتند که تعداد گلبول‌های قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت، پروتئین و گلوکز سرم خون ماهی کاهش یافت که با نتایج مطالعه حاضر مغایرت دارد. اندروز و همکاران (۲۰۰۹) در اضافه کردن مانان الیگوساکارید به عنوان پربیوتیک به جیره غذایی ماهیان انگشت قد گونه راهو (*Labeo rohito*) افزایش معنی داری را در میزان گلبول قرمز و هموگلوبین مشاهده کردند. جهان‌بین و همکاران (۲۰۱۱a) با بکارگیری پلی ساکارید جدید از گیاه چوبک تماشایی (*Acanthophyllum bracteatum*) جهت بهبود سلامت سالمون آتلانتیک در معرض جیوه و القای آن در آب گزارش کردند بدلیل افزایش بار باکتریایی روده ماهی سالمون، شاخص‌های هماتولوژیک (تعداد گلبول‌های قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت، MCH و MCV در تیمار جیوه نسبت به تیمار شاهد بالاتر بود و تزریق پلی‌ساکارید به تیمار جیوه منجر به تعدیل شاخص‌های هماتولوژیک و نزدیکی آن به تیمار شاهد شد که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی داشت، اما تفاوت معنی‌داری در هماتوکریت و MCHC مشاهده نکردند که در مغایرت با نتایج این پژوهش بود.

در مطالعه حاضر، مقادیر گلوکز به عنوان شاخص استرس جهت ارزیابی مطمئن واکنش استرس در معرض شرایط جیوه سمی اندازه‌گیری شدند. وینودهینی و نارایانان (۲۰۰۹) افزایش معنی‌دار گلوکز خون ماهی کپور، *Cyprinus carpio* را در معرض فلزات سنگین مشاهده کردند. جهان‌بین و همکاران (۲۰۱۱a) نیز افزایش معنی‌دار گلوکز را در معرض جیوه مشاهده کردند. هدایتی (۲۰۱۲) با بررسی اثر سمیت جیوه بر پاسخ ایمنی باس دریایی، افزایش معنی‌دار گلوکز و کاهش غیرمعنی دار پروتئین را گزارش کرد. گلوکز نقش مهمی در تامین انرژی زیستی ماهیان و تبدیل شان به انرژی شیمیایی (ATP) دارد که در شروع می‌تواند به عنوان انرژی مکانیکی بیان شود. در شرایط نامطلوب، سلول‌های کرومافین، هورمون‌های کاته‌کلامین، آدرنالین، و نورآدرنالین را به خون ترشح می‌کنند. این هورمون‌های استرس، به همراه کورتیزول، می-توانند تولید گلوکز را با روش‌های گلوکونئوژنزیز و گلیکونئوژنزیز افزایش دهند. فلزات سنگین، مقدار گلوکز خون را به دلیل گلیکوژنولیز گسترده و سنتز گلوکز از آمینواسیدها و پروتئین‌های اضافی بافت کبدی افزایش می‌دهند (آلمیدا و همکاران، ۲۰۰۱) که روند مشابه آن در تحقیق حاضر مشاهده شد.

کورتیزول نقش بسزایی در تنظیم مواد متابولیکی دارد و بدین سبب اختلال در هموستازی گلوکز در تغییرات میزان کورتیزول طی مواجهه با فلزات مهم است و این مسئله نشان دهنده نقش کورتیزول در افزایش آمادگی بدن ماهی در مقابله با استرس‌های محیطی است (وندلر بونگا، ۱۹۹۷). کورتیزول به طور گسترده به عنوان شاخص استرس در ماهیان مطرح می‌باشد که معمولا بعد از قرارگیری در معرض عوامل استرس‌زا افزایش می‌یابد (بارتون، ۲۰۰۲). کوبوکاوا و همکاران (۱۹۹۹) با بررسی اثر استرس حاد بر مقادیر کورتیزول و گلوکز سالمون ساک‌آی، افزایش کورتیزول و گلوکز را مشاهده کردند. فعال‌سازی محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- فوق کلیوی ناشی از استرس منجر به رهاسازی کورتیزول به جریان خون و در نتیجه افزایش کورتیزول خون می‌شود (ردی و

لیترلند، ۱۹۹۸). افزایش سریع و معنی‌دار کورتیزول پلاسما در تیمارهای در معرض فلزات در مطالعات متعددی گزارش شده است (زاهدی و همکاران، ۱۳۹۱؛ گیل و همکاران، ۱۹۹۳). مواجهه ماهیان با فلزات سنگین سبب می‌شود مقدار کورتیزول پلاسما به سرعت افزایش یابد که این پاسخ به عنوان بخشی از پاسخ غیراختصاصی تلقی می‌شود (دتلاف و همکاران، ۱۹۹۹). به طور کلی مواردی مانند متابولیسم انرژی، تنظیم تعادل یونی و اسمزی، نمو سلول‌های کلرایدی، حفظ هموستازی بدن، سرکوب ایمنی، تقویت پاسخ دفاعی و القا متالوتیونین از جمله دلایل ذکر شده جهت توجیه افزایش غلظت کورتیزول پلاسما در مواجهه با فلزات سنگین می-باشند (ویلت و یانگ، ۲۰۰۴). القا متالوتیونین توسط کورتیزول به نقش حساس این هورمون در رفع سمیت فلزات از طریق القا ساخت سیتوزولی این ملکول هموستاز و خورنده فلزات سنگین اشاره دارد و متالوتیونین باعث افزایش مقاومت سلول‌ها نسبت به فلزات سمی می‌شود (ویو و همکاران، ۲۰۰۷).

کاهش پروتئین سرم خون ماهی در معرض فلزات سنگین بخوبی تایید شده است، بعنوان مثال، در ماهی آب شیرین *Sarotherodon mossambicus* و کپور معمولی در معرض فلز جیوه (کنلی، ۱۹۹۶ و ردی و باگیلاکشمی، ۱۹۹۴). پراسات و آریولی (۲۰۰۸) نیز کاهش مقدار پروتئین خون ماهی کپور هندی (*Catla catla*) را در معرض دوزهای تحت کشنده جیوه گزارش کردند. در مطالعات دیگر، جهان‌بین و همکاران (۲۰۱۱a) نیز کاهش مقدار پروتئین خون ماهی سالمون آتلانتیک را در معرض جیوه مشاهده کردند.

پروتئین‌ها دارای عملکرد مهمی در متابولیسم سلول هستند. کاتابولیسم پروتئین‌ها نقش مهمی در تولید انرژی بدن در ماهیان ایفا می‌کند. در اکوسیستم‌های آلوده، پروتئین‌ها مکانیسم فیزیولوژیکی با نقش مهم تامین انرژی جهت مقابله با وضعیت استرسی تشکیل می‌دهند. کاهش مقدار پروتئین ممکن است به علت شکست پروتئین به آمینواسید در معرض جیوه باشد (شکوری و همکاران، ۲۰۰۴) اما در مطالعه حاضر، مقدار پروتئین خون ماهی در معرض جیوه تغییری نکرد که با مطالعات سایر محققان مغایرت داشت که احتمالا به دلیل اندازه‌گیری پروتئین کل سرمی در تحقیق حاضر می باشد.

محرک‌های ایمنی با تأثیری که می‌توانند روی سیستم ایمنی بدن ایجاد کنند باعث مقاومت بیشتر آبزیان شده و تحت شرایط نامناسب محیطی که ممکن است با استرس‌هایی همانند تنش‌های شیمیایی، فیزیکی و عفونی همراه باشد، مؤثر واقع شده و در نهایت افزایش مقاومت ماهیان را در پی داشته باشد (احمدی فر و همکاران، ۲۰۰۹). نتایج تحقیق حاضر آشکار کرد که پلی‌ساکارید استخراج شده از ریشه گیاه چوبک نکائی (*Acanthophyllum glandulosum*) پس از حلالیت در آب و ورود به دستگاه گوارش ماهی توانسته است به عنوان یک پربیوتیک عمل کند و منجر به تعدیل برخی پارامترهای خونی در معرض جیوه شود. با استناد به نتایج به دست آمده از آزمایشات هماتولوژی و بیوشیمیایی سرم خون این ماهی می‌توان از این پلی‌ساکارید به عنوان یک محرک سیستم ایمنی یاد کرد که سبب افزایش مقاومت ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان در مواجهه با جیوه شده است. شاخص‌های خونی به مقادیر مشابه مقادیر تیمار شاهد رسیدند که نشان می‌دهد پلی ساکارید اضافه شده، اثرات تنظیمی واضحی بر بسیاری از پارامترهای سلامت ماهی قزل‌آلا داشت.

احتمالاً این تأثیر به علت فعالیت برخی باکتری‌های مفید روده می‌باشد. این باکتری‌ها که توسط این پلی‌ساکارید فعال شده‌اند، دارای اثرات ممانعت-کنندگی جذب جیوه در خون هستند. مطالعات بیشتری جهت کسب آگاهی بیشتر درباره این پلی ساکارید و اثراتش مورد نیاز است.

منابع

اسماعیلی ساری، ع.، ۱۳۸۱. آلاینده‌ها، بهداشت و استاندارد در محیط زیست. انتشارات نقش مهر، تهران، ایران. ۷۶۷ صفحه.

زاهدی، س.، میرواقفی، ع.، مجازی امیری، ب.، رفیعی، غ.، هدایتی، م.، مخدومی، چ.، زارعی دنگسرکی، ع. و مهدوی صاحبی، س. ،۱۳۹۱. بررسی اثر مواجهه با مس و کادمیوم بر شاخص‌های بیوشیمیایی پلاسما و کبد بچه فیل ماهی (Huso Huso). مجله منابع طبیعی ایران، ۶۵(۳): ۲۷۱-۲۸۲.

شاهسونی، د.، مهری، و. و نظری، ک. ،۱۳۸۲. بررسی تاثیر ماده شوینده آنیونی (شامپو) بر پارامترهای خونی ماهی حوض (Carassius auratus). مجله پژوهش و سازندگی در امور دام و آبزیان. ۶۱: ۹۹ - ۱۰۴.

شعاعی، ر.، اکرمی، ر.، قبادی، ش.، رزاقی منصور، م. و امانی دنجی، ک. ،۱۳۹۱. تاثیر پربیوتیک مانان الیگوساکارید و بتا ۱ و ۳ گلوکان (تکنوموس) بر برخی پارامترهای خون شناسی و بیوشیمی سرم خون بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان. مجله بهره برداری و پرورش آبزیان. ۱(۱): ۴۱ - ۵۴.

طافی، ع.ا.، مشکینی، س. و توکمه چی، ا. ،۱۳۹۲. مطالعه تاثیر کیتوزان بر برخی از پاسخ‌های ایمنی ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و افزایش مقاومت آن به دنبال رویارویی تجربی با آئروموناس هیدروفیلا. مجله پژوهش‌های جانوری (مجله زیست‌شناسی ایران). ۲۶ (۴): ۴۶۸- ۴۷۷.

Agah, H., Leermarkers, M., Elskens, M., Fatemi, S.M.R., Baeyens, W. 2007. Total mercury and methyl mercury concentrations in fish from the Persian Golf and the Caspian Sea. *Journal of water, air, and soil pollution* 181, 95-105.

Andrews, S.R., Sahu, N.P., Pal, A.K., Kumar, S. 2009. Haematological modulation and growth of Labeo rohita fingerlings: effect of dietary mannan oligosaccharide, yeast extract, protein hydrolysate and chlorella. *Aquaculture Research* 41, 61-69.

Ahmadifar, E., Jalali, M. A., Sudagar, M., Azari Takami, Gh., Mohammadi Zaraj Abazi, A. 2009. Effects of aquaVac Ergosan on growth performance, survival and haematological factors in beluga (Huso Huso) juvenile. Gorgan *Journal of Agriculture, Science and Natural Resourse* 16, 72- 80.

Almeida, J. A., Novelli, E.L.B., Dal-Pai Silva, M., Alves-Junior, R. 2001. Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Pollution* 114, 169-175.

Banasal, S.K., Dalela, R.C. 1997. Physiology difunction of the

Dethloff, G. M., Schlenk, D., Khan, S., Bailey, H. C. 1999. The effects of copper on blood and biochemical parameters of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 36, 415-423.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J.K., Rebers, P. A., Smith, F.1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Journal of Fish Biology* 28, 350-356.

Gatlin DM. 2002. Nutrition and fish health, In: Fish Nutrition (eds. J.E. Halver and R.W. Hardy), pp. 671-702. Academic press, San Diego California, USA,

Ghaffari, S. M. 2004. Cytotaxonomy of some species of Acanthophyllum (Caryophyllaceae) from Iran. *Biologia Brasileira* 59, 53-60.

Gibson, G. R., Rastall, R. A., Fuller, R. 2003. The health benefits of probiotics and prebiotics. In: Gut Flora, Nutrition, Immunity and Health (eds. by R. Fuller and G.Perdigon,), pp. 52–76. : Blackwell Publishing Ltd. Oxford, UK,.

Gibson, G. R., Roberfroid, M. B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal Nutrition* 125, 1401–1412.

Gill, T. S., Leitner, G., Porta, S., Epple, A. 1993. Responses of plasma cortisol to environmental cadmium in the eel, Anguilla haemopoietic system in a fresh water teleost. *Bulletin of Environmental.Contamination and Toxicology* 22 (3), 18-20.

Barton, B.A. 2002. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology* 42, 517–525.

Baskin, D.S., Nago, H., Didenko, V. 2003. Thimerol induces DNA breaks, caspase 3 activation, membrane damage, and cell death in cultured human neurons and fibroblasts. *Toxicological Science* 74(2), 361–368.

Canli, M. 1996 . Effects of mercury, chromium, and nickel on glycogen reserves and protein levels in tissues of *Cyprinus carpio*. *Turkish Journal of Zoology* 20, 161–168.

Casillas, E., Smith, L. S. 1974. Effects of stress on blood coagulation and haematology in rianbow trout exposed to hypoxia. *Journal of Fish Biology* 6 (5), 379-380.

Chowdhury, M.J., McDonald, D.G., Wood, C.C. 2004. Gastrointestinal uptake and fate of cadmium in rainbow trout acclimated to sublethal dietary cadmium. *Aquatic Toxicology* 69(2), 149-163.

Cunningham, A., Smith, S. L., Trippett, J.P., Greene, A. 1994. A national fish consumption advisory data base: A step toward consistency. *Fisheries*, 14-23.

Jahanbin, K., Moini, S., Gohari, A.R., Djomeh, Z.E., Masi, P. 2012. Isolation, purification and characterization of a new gum from Acanthophyllum bracteatum roots. *Food Hydrocolloids* 27, 14–21.

Jimenez-Medina, E., Berruguilla, E., Romero, I., Algarra, I., Collado, A., Garrido, F. 2008. The immunomodulator PSK induces in vitro cytotoxic activity in tumour cell lines via arrest of cell cycle and induction of apoptosis. *BMC Cancer* 8, 78.

Kim, S. G., Park, D. K., Jang, S.W., Lee, J.S., Kim, S.S., Chung, M. H. .2008. Effects of dietary benzo pyrene on growth and hematological parameters in juvenile rockfish, Sebastes schlegeli (Hilgendorf). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 81(5), 470–474.

Kubokawa, K., Watanabe, T., Yoshioka, M., Iwata, M. 1999. Effects of acute stress on plasma cortisol, sex steroid hormone and glucose levels in male and female sockeye salmon during the breeding season. *Aquaculture* 172, 335-349.

Kurbanova, A. D., Arifkhodzhaev, A.O., Rakhimov, D.A., Shashkov A.S. 2003. Polysaccharides of saponin-bearing plants. xv. Structure of glucoarabinogalactan from acantophyllum borszczowii roots. *Chemistry Natural Compounds* 5, 361-364.

Lee, R. G., Foerster, J., Jukens, J., rostrata Lesueur. *Comparative Biochemistry and Physiology* 104, 489-495.

Harakeh, S., Sabra, N., Kassak, K., Doughan, B., Sukhan, C. 2003. Mercury and arsenic levels among Lebanese dentists: A call for action. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 70, 629-635.

Hedayati, A., Safahieh, A., Savari, A., Marammazi, J. 2010. Detection of mercury chloride acute toxicity in Yellowfin sea bream (Acanthopagrus latus). *World Journal of Fish and Marine Science* 2(2), 86–92.

Hedayati, A. 2012. Effect of marine mercury toxicity on immunological responses of seabream. *Asian Journal of Animal Sciences* 6 (1), 1-12.

Jahanbin, K., Gohari, A. R., Moini, S., Djomeh, Z.E., Masi, P. 2011a. Isolation, structural characterization and antioxidant activity of a new water-soluble polysaccharide from *Acanthophyllum bracteatum* roots. *International Journal Biological Macromolecules* 49, 567–572.

Jahanbin, K., Hedayati, A., Moini, S., Gohari, A. R., Emam-Djomeh, Z., Esposito, A., Bagheri, T. 2011b. The first application of a new polysaccharide from Acanthophyllum bracteatum for the health improvement of Atlantic salmon exposed to mercury chloride. *Toxicology and Industrial Health* 28 (4), 377-384.

SHSY5Y neuroblastoma cells. *Journal of Neurochemistry* 74(1), 231–236.

Prasath, P.M.D., Arivoli, S. 2008. Biochemical study of freshwater fish *Catla catla* with reference to mercury chloride. *Iranian Journal of Environmental Health Science Engineering* 5, 109-116.

Ranjana, S., Peyush, P. 2011. Effect of heavy metal on biochemical and hematological parameters in Cyprinus carpio and its use as a bioindicators of pollution stress. *Journal of Ecophysiology & Occupational Health* 11, 21-28.

Rechinger, K. H.1988. Isotype of Acanthophyllum Khuzistanicum, Flora Iranica, Flora des iranischen hochlandes und der umrahmenden Gebirge, Caryophyllaceae II, Akademische Druck und Verlagsanstalt Graz, Austria, p 253.

Reddy, P. S., Bhagyalakshmi, A. 1994. Changes in oxidative metabolism in selected tissues of the crab (Scylla serrata) in response to cadmium toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 29(3), 255–264.

Sancho, E., Ceron, J.J., Ferrando, M.D. 2000. Cholinesterase activity and hematological parameters as biomarkers of sublethal molinate exposure in Anguilla anguilla. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 46(1), 81–86.

Sandnes, K., Lie, O., Waagbo, R. 1988. Normal ranges of some blood chemistry parameters in

Paraskevas, F., Greer, J.P., Rodgers, G. M. 1998. Wintrobe's Clinical Hematology. 10th ed. New York, NY: Lippincott Williams & Wilkins.

Merrifield, D., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S., Baker, R., Bogwald, J., Castex, M., Ringo, E. 2010. The current status and future focus of probiotic and rebiotic applications for salmonids. *Aquaculture* 302 (1-2), 1-18.

Nriagu, J. O., Pacyna, J. M. 1988. A quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* 333, 134-139.

Nilsson, S., Grove, D. J., 1984. Adrenergic and cholinergic innervation of the spleen of the cod (*Gadus morhua*). *European Journal of Pharmacology* 28, 135-137.

Oliveira-Ribeiro, C., Filipak Neto, F., Mela, M., Silva, P., Randi, M., Rabitto, I., Alves Costa, J.R., Pelletier, E. 2006. Hematological findings in neotropical fish Hoplias malabaricus exposed to subchronic and dietary doses of methylmercury, inorganic lead, and tributyltin chloride. *Environmental Research* 101(1), 74–80.

Olivieri, G., Brack, C., Muller-Spahn, F., Stahelin, H.B., Herrmann, M., Renards, P., Brockhaus, M., Hock, C. 2000. Mercury induces cell cytotoxicity and oxidative stress and increases ß-amyloid secretion and tau phosphorylation in

Na+, K+-ATPase activity and in vitro responsiveness to cortisol in juvenile Chinook salmon. *Comparative Biochemistry and Physiology* 138 A, 297-303.

Vinodhini, R., Narayanan, M. 2009. The impact of toxic heavy metals on the hematological parameters in common carp (Cyprinus Carpio). *Iranian Journal of Environmental Health, Science & Engineering* 6(1), 23-8.

Vulevic, J., Rastall, R. A., Gibson, G, R. 2004. Developing a quantitative approach for determining the invitro prebiotic potential of dietary oligosaccharides. *FEMS Microbiology Letters* 236, 153-159.

Wu, S. M., Shih, M. J., Ho, Y. C. 2007. Toxicological stress response and cadmium distribution in hybrid tilapia (Oreochromis sp.) upon cadmium exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology* 145 C, 218-226.

adult farmed Atlantic salmon, Salmo salar. *Journal of Fish Biology* 32(1), 129–136.

Schiman-Czeika, H. 1988. Acanthophyllum. In: Rechinger, k. H. (ed.), Flora Iranica. Graz, Wien.

Shakoori, A.R., Iqbal, M.J., Mughal, A.L., Ali, S. S. 2004. Biochemical changes induced by inorganic mercury on the blood, liver and muscles of freshwater Chinese carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Journal of Ecotoxicology and Environmental Monitoring* 4, 81-92.

Staub A.M. 1965. Removal of protein – Sevag method, In: Methods in Carbohydrate Chemistry (ed. by R.L. Whistler.), pp. 5–6. Academic Press, New York.

Trinder, P. 1969 Determination of glucose concentration in the blood. *Annals of Clinical Biochemistry* 6, 24-27

Veillette, P.A., Young, G.2004. Temporal changes in intestinal

Application of a new polysaccharide extracted from the roots of *Acanthophyllum glandulosum* on health improvement of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), exposed to mercury chloride

Kambiz Jahanbin[1], Aliakbar Hedayati[2], *Elaheh Hassan Nataj Niazie[3], Seyde Amene Hosseini[2]

1- Shahrood Industrial University, Faculty of Agriculture, Semnan, Iran.

2- Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Faculty of Fishery and Environment, Department of Fishery, Gorgan, Iran.

3- Artemia and Aquaculture Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran.

* Corresponding Author: e.niazie@gmail.com
Received:29/06/2014 Accepted:19/05/2015

Abstract

Polysaccharides are known as biopolymers and shown to play key roles in therapeutic agents. In current study we examined possible efficiency of freshly derived polysaccharide from the roots of *Acanthophyllum glandulosum* on blood indices of rainbow trout exposed to sub acute doses of mercury chloride. 540 Fish were divided into three equal triplicate groups. The first treatment was control group, the second treatment tanks contained 60 µg/1 of an aqueous solution of Hg and the third treatment contained 60 µg/1 HgCl and 1% freshly extracted polysaccharide 24 h before introduction of fish to the tanks. Serum hematological and biochemical parameters were analyzed. Results of the present study showed some hematological levels were significantly adjusted in polysaccharide and mercury exposure group compared to mercury exposure groups. Adding polysaccharide had adjustment effects on some parameters including RBC, Ht, MCV and Cortisol. Polysaccharide had not significant adjustment effect on MCHC, MCH, Hb levels, protein levels and glucose. Finally, our results confirm that the new polysaccharide has useful effects on the host and probably act as a prebiotic that can improve the host health.

Key words: *Oncorhynchus mykiss*, Fish health, Prebiotic, Polysaccharide, Mercury