

مقاله علمی - پژوهشی:

تأثیر کوئرستین عادی و نانوکپسوله شده با کیتوزان بر پروفایل اسید چرب بافت عضله و تخمک ماهی زبرا (*Danio rerio*)

محمد رضا کلباسی*، محمد بهزادی طایمه^۱، حامد پاک‌نژاد^۲

*Kalbassi_m@modares.ac.ir

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی نور، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران.
۲- گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹۹

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۹

چکیده

مطالعه حاضر به بررسی تأثیر کوئرستین عادی و نانوکپسوله شده بر پروفایل اسید چرب بافت عضله و تخمک ماهی زبرا (*Danio rerio*) پرداخته است. بدین منظور، تعداد ۱۲۰ ماهی زبرا را به چهار گروه آزمایشی در سه تکرار تقسیم شده و با جیره های شاهد (بدون افزودنی)، ۴۰۰ mg نانوکیتوزان، ۴۰۰ mg کوئرستین عادی و ۴۰۰ mg کوئرستین نانوکپسوله شده به مدت ۴۰ روز تغذیه شدند. سپس به منظور بررسی پروفایل اسید چرب، از بافت عضله و تخمک ماهی مذکور نمونه برداری شد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که نانوکیتوزان تأثیر معنی داری بر پروفایل اسید چرب عضله و تخمک نداشت ($p < 0.05$). در بافت عضله تیمارهای کوئرستین عادی و نانوکپسوله شده، درصد اسیدهای چرب دکوزاهگزانوئیک اسید، آراشیدونیک اسید و مجموع اسیدهای چرب HUFA و n-۳ در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی دار یافتند ($p < 0.05$). همچنین در ماهیانی که کوئرستین نانوکپسوله شده دریافت کردند، درصد اسیدهای چرب آراشیدونیک اسید و ایکوزاپنتانوئیک اسید در مقایسه با سایر گروه‌ها افزایش معنی دار یافتند ($p < 0.05$). علاوه بر این، در تخمک ماهی زبرا در تیمار کوئرستین عادی درصد اسید چرب ایکوزاپنتانوئیک اسید و همچنین در تیمار کوئرستین نانوکپسوله شده درصد اسیدهای چرب ایکوزاپنتانوئیک اسید و دکوزاهگزانوئیک اسید و مجموع اسیدهای چرب HUFA، n-۳ و نسبت n-۳ به n-۶ به طور معنی داری افزایش یافت ($p < 0.05$). بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که کوئرستین باعث بهبود پروفایل اسید چرب بافت عضله و تخمک ماهی زبرا شده و فرایند نانوکپسوله کردن باعث بهبود عملکرد کوئرستین شده است.

کلمات کلیدی: اسید چرب، تغذیه، کوئرستین، ماهی زبرا، نانوکپسول

نویسنده مسئول

مقدمه

نانوفناوری عبارت است از تولید، دست‌کاری و کاربرد موادی که حداقل یک بعد آنها اندازه کمتر از ۱۰۰ نانومتر دارد. اولین جرقه فناوری نانو را Richard Finman (۱۹۵۹) طی سخن‌رانی با عنوان "در سطوح پایین فضای زیادی وجود دارد" ثبت نمود. واژه فناوری نانو را اولین بار Noriu Taynguchi (۱۹۷۴)، استاد دانشگاه علوم توکیو، بر زبان‌ها جاری نمود. این واژه را Key Eric Dexler (۱۹۸۶) در کتابی با نام "موتور آفرینش: آغاز دوران فناوری نانو" باز آفرینی و تعریف مجدد نمود (Bozsaky, 2016). در سال‌های اخیر نانوفناوری در ایران و کشورهای مختلف جهان وارد زمینه‌های مختلف علمی و صنعتی شده است و به سرعت رو به رشد است. از مهم‌ترین کاربردهای نانوفناوری در سال‌های اخیر، استفاده از این فناوری در حوضه‌های پزشکی، داروسازی و صنایع غذایی به منظور تولید سیستم‌های انتقال و رهایش هدفمند ترکیبات غذا-دارو می‌باشد. هدف استفاده از نانوحامل‌ها، کاهش تخریب ترکیبات زیست فعال، جلوگیری از اثرات جانبی آنها و افزایش دسترسی زیستی به آنهاست (Chamundeeswari et al., 2019).

تاکنون بسیاری از نانو مواد و ترکیبات آلی و معدنی به عنوان حامل ترکیبات زیست فعال برای پیشبرد روش‌های موثر در افزایش زیست‌فراهمی این ترکیبات مورد استفاده قرار گرفته‌اند. برخی از نانوحامل‌های مورد استفاده در این حوضه شامل نانولیپوزوم، نانوامولسیون، نانونیوزوم، نانوفیتوزوم، نانوذرات لیپیدی جامد، نانوحامل‌های لیپیدی و نانو کیتوزان می‌باشند (Chamundeeswari et al., 2019). در این بین نانوحامل کیتوزان به دلیل توانایی‌های منحصر به فرد توجه محققان زیادی را به خود جلب کرده است. همچنین کیتوزان پلیمری زیستی با ساختاری ویژه، قابلیت اصلاح مکانیکی و شیمیایی ممتازی دارد. این ویژگی‌ها در کنار زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری، عدم سمیت و ایمنی‌زایی کم سبب شده است که کیتوزان گزینه‌ای مناسب جهت نانوکپسوله کردن ترکیبات زیست فعال باشد. علاوه بر این، کیتوزان توانایی قابل توجهی را در چسبیدن به سطوح موکوزی سطح سلول دارد. از این

رو، می‌تواند به طور موقتی و گذرا، اتصالات بین سلولی را باز کند و عبور ترکیبات فراسودمند را از عرض غشاهای زیستی تسهیل کند. علاوه بر افزایش جذب، فرایند نانوکپسوله کردن با کیتوزان باعث افزایش پایداری این ترکیبات در برابر شرایط محیطی و شرایط فیزیکیوشیمیایی سیستم گوارشی می‌شود (Tayemeh et al., 2020b).

اخیراً پژوهشگران فعالیت‌های بیولوژیک عصاره‌های گیاهی و تاثیرات آن بر سلامتی را مورد مطالعه قرار داده‌اند و دریافته‌اند که گیاهان ارتباط بسیار نزدیکی با سلامتی دارند و از مهم‌ترین منابع دارویی به‌شمار می‌روند. گیاهان دارویی غنی از منبع متابولیت‌های ثانویه نظیر آلکالوئیدها، استروئیدها و فلاونوئیدها هستند و در این بین فلاونوئیدها به دلیل به دام انداختن رادیکال‌های آزاد، نقش مهمی را ایفاء می‌کنند (طایمه و همکاران، ۱۳۹۹). کوئرستین یک پلی‌فنول در گروه فلاونون‌هاست که به عنوان یکی از پنج زیر گروه ترکیبات فلاونوئیدی طبقه‌بندی می‌شود و به طور طبیعی در سبزیجات، میوه‌ها و گیاهان دارویی وجود دارد. از مهم‌ترین فعالیت‌های بیولوژیک کوئرستین می‌توان به خواص ضد سرطان، ضد التهاب، آنتی‌اکسیدانی، کاهش‌دهنده چربی خون و بازکننده عروق خونی اشاره کرد (Wang et al., 2016). علاوه بر این، مطالعات نشان داده است که کوئرستین به طور قابل توجهی سبب بهبود پروفایل اسید چرب در موجوداتی نظیر گوسفند شده است (Andrés et al., 2014) که عدم بررسی تاثیر آن بر پروفایل اسید چرب در بافت عضله و تخمک‌آبزیان سبب شکل‌گیری مطالعه حاضر شده است. با این وجود، زیست‌فراهمی کوئرستین به دلیل حلالیت کم در آب، تخریب در برابر نور، گرما و اکسیژن و نیز کاهش فعالیت بیولوژیک آن در مواجهه با دستگاه گوارش بسیار کم است که می‌تواند دلیلی بر عدم استفاده آن در جیره غذایی باشد (Tayemeh et al., 2020b).

ماهی زبرافیش (*Danio rerio*) گونه‌ای صلح‌جو و مقاوم از خانواده کپورماهیان (Cyprinidae) می‌باشد. به طور طبیعی این ماهی در آبهای شیرین مناطق گرمسیری ساکن است (Tayemeh et al., 2020b). اخیراً از ماهی مذکور بارها به عنوان گونه‌ای مدل در کارهای تحقیقاتی

مواد و روش‌ها

نانوانکپسولاسیون کوئرستین با استفاده از کیتوزان تبدیل کیتوزان به نانوکیتوزان با روش انعقاد یونی انجام شد. بدین منظور به ۱۰ میلی لیتر محلول کیتوزان (ساخت شرکت سیگما) (1 g L^{-1}) مقدار ۴ میلی لیتر تری پلی فسفات (ساخت شرکت سیگما) (1 g L^{-1}) به صورت قطره ای اضافه شد. به منظور انکپسولاسیون کوئرستین (ساخت شرکت سیگما) نیز از روش مذکور فوق استفاده شد. با این تفاوت که به محلول کیتوزان اولیه میزان ۳ میلی گرم کوئرستین اضافه شد. در ادامه پس از اتمام فرایند انکپسولاسیون، سوسپانسیون حاصله را با استفاده از سانتریوفیوژ (۹۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد) و آب مقطر سه بار شستشو داده و نهایتاً سوسپانسیون حاصله به مدت ۳ دقیقه با توان ۵۰ با دستگاه التراسونیک، سونیکه شد (Tayemeh *et al.*, 2020b).

آنالیز نانو کپسول کوئرستین-کیتوزان و نانوکیتوزان
به منظور بررسی ساختار مورفولوژی نانوکپسول ساخته شده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM, Scanning Electron Microscope). برای اندازه گیری اندازه سایز نانوذرات و پتانسیل زتا از دستگاه پراکنش نور پویا (DLS, Dynamic Light Scattering). برای تعیین نوع برهمکنش بین کوئرستین و کیتوزان از دستگاه اسپکتروفتومتر فروسرخ (FTIR, Fourier-Transform Infrared Spectroscopy) و در نهایت برای بررسی بازده و کارایی انکپسولاسیون از روش منحنی کالیبراسیون استفاده شد. مشخصات نانوکپسول، نانوکیتوزان و روش بررسی آنها در مطالعه پیشین نگارندگان گزارش شده است (Tayemeh *et al.*, 2020b). اما به منظور درک بهتر، این مشخصات در مطالعه حاضر نیز به اختصار در قسمت نتایج و بحث توضیح داده شده‌اند.

تهیه خوراک

برای ساخت خوراک، ابتدا خوراک ماهی زبرا را از مرکز مربوط به فروش غذای ماهیان زینتی در شهرستان نور،

استفاده شده است. از دلایل معرفی ماهی مذکور به عنوان گونه مدل می‌توان به نگهداری آسان، امکان تکثیر در شرایط مصنوعی، زاد آوری بالا و مقاومت بالا در محیط آزمایشگاهی اشاره کرد (Rothenbücher *et al.*, 2019). اما از مهمترین دلایلی که این ماهی اخیراً به عنوان گونه مدل معرفی شده، این است که ۷۱ درصد ژنوم این ماهی شبیه انسان است. به علاوه، این ماهی به دلیل حساسیت بالا به ترکیبات محیطی در مطالعات دارورسانی و رهاپش هدفمند ترکیبات غذا-دارو بسیار کاربردی و مفید می‌باشد (Tayemeh *et al.*, 2020b).

چربی‌ها و اسیدهای چرب به سبب تامین انرژی بدن، مشارکت در ساختمان غشای سلولی، پیش ساز پروستاگلاندین‌ها و هورمون‌های استروئیدی با کارکردهای فیزیولوژیک متنوع در رشد و تولید مثل از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. نسبت اسیدهای چرب مختلف به ویژه اسیدهای چرب چند غیر اشباع (PUFA) در بین گونه‌های مختلف تحت تاثیر جیره، اندازه، سن، دما، دوره تولید مثلی و شوری متفاوت است. همچنین محتوای چربی بدن و ترکیب اسیدهای چرب بدن ماهی در تمام دوره زندگی، تابعی از محتوای اسیدهای چرب غذای مصرفی است. در واقع، غذا مهم‌ترین عاملی است که ترکیب اسیدهای چرب و میزان چربی بافت بدن را در ماهی تحت تاثیر قرار می‌دهد (Asgari *et al.*, 2020; Ghosi Mobaraki *et al.*, 2020). با این وجود، این ترکیبات در زمان نگهداری بسیار مستعد اکسید شدن هستند. از سویی، این ترکیبات ناپایدار از طریق استرس اکسیداتیو ناشی از آلاینده‌ها و بیماری‌ها بسیار آسیب پذیرند (Tayemeh *et al.*, 2020a). بنابراین، استفاده از ترکیبات آنتی اکسیدانی در جیره آبزیان به منظور پیشگیری از استرس اکسیداتیو و متعاقباً اکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع بسیار ضروری است. از این رو، در مطالعه حاضر از کوئرستین به عنوان یک ترکیب آنتی اکسیدانی قدرتمند در خوراک ماهی زبرا استفاده شده است. همچنین جهت افزایش زیست فراهمی و رفع محدودیت‌های کوئرستین برای رسیدن به بافت هدف از نانوحامل کیتوزان استفاده شد.

میلی‌متر عبور داده شد. رشته‌های به‌دست آمده به مدت ۲۴ ساعت در آون خشک و پس از خرد شدن در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. درصد پروتئین، چربی، ماده معدنی، رطوبت و اسید چرب خوراک مورد استفاده در تحقیق در جدول ۱ ارائه شده است.

مازندران خریداری شده و سپس به پودر تبدیل شد. برای هر تیمار دوز مشخصی از کوئرستین عادی یا کپسوله شده با کیتوزان به پودر حاصله اضافه شد. سپس مقدار مشخصی آب به خوراک اضافه شده تا خمیری شکل شود. خمیر حاصله از چرخ گوشت دستی با اندازه چشمه ۲

جدول ۱: پروفایل اسید چرب خوراک استفاده شده در مطالعه حاضر

Table 1: Fatty acid profile of the diet which was used in the present study

آنالیز تقریبی							
HUFAΣ	PUFAΣ	MUFAΣ	SFAΣ	رطوبت	ماده معدنی	چربی	پروتئین
۲۸/۴	۸/۲۲	۲۰/۰۶	۱۱/۰۶	۷/۴	۱۰/۵	۱۵/۴	۳۷/۵
میزان (%)							

درصد وزن بدن در سه نوبت تغذیه شدند. پس از پایان دوره سازگاری، عمل غذادهی با خوراک مخصوص هر تیمار به مدت ۴۰ روز انجام شد. در این مدت مرتباً دمای آب و میزان اکسیژن آب مورد بررسی قرار می‌گرفت. در این مطالعه دمای آب ۲۸ درجه سانتی‌گراد، میزان اکسیژن محلول در آب ۸ میلی‌گرم در لیتر و دوره نوری ۱۲:۱۲ (روشنایی: تاریکی) در نظر گرفته شد. نهایتاً با اتمام دوره ۴۰ روزه از بافت تخمک و عضله ماهی مذکور جهت بررسی پروفایل اسید چرب نمونه‌برداری شد.

شرح آزمایش و تیمار بندی

در این آزمایش به منظور بررسی رهایش هدفمند کوئرستین و نیز تاثیر آن در پروفایل اسید چرب بافت عضله و تخمک ماهی مدل زبرا، تعداد ۴ تیمار در ۳ تکرار در نظر گرفته شد (جدول ۲). بدین صورت که تعداد ۱۰ عدد ماهی برای هر تکرار در آکواریوم‌های ۴۰ لیتری قرار داده شد (تعداد کل ماهیان ۱۲۰ عدد). پس از تیمار بندی، مدت زمان یک هفته برای سازگاری ماهیان با شرایط جدید در نظر گرفته شد. در این مدت تمامی تیمارها با خوراک فراهم شده برای ماهیان گروه شاهد به میزان ۵-۳

جدول ۲: تیمارهای استفاده شده در تحقیق حاضر

Table 2: Experimental treatments which were employed in the current study

توضیحات	تیمارهای تحقیق	ردیف
بدون هیچ گونه افزودنی	شاهد	۱
خوراک کنترل + ۴۰۰ میلی‌گرم نانوکیتوزان	نانوکیتوزان	۲
خوراک کنترل + ۴۰۰ میلی‌گرم کوئرستین	۴۰۰ میلی‌گرم کوئرستین	۳
با کیتوزان خوراک کنترل + ۴۰۰ میلی‌گرم کوئرستین کپسوله شده	۴۰۰ میلی‌گرم کوئرستین کپسوله شده	۴

سپس درب ظرف بسته و به شدت تکان داده شد. ظرف حاوی نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شد. پس از خنک شدن مقدار ۲/۲۵ میلی لیتر از محلول تری فلوراید بور به ترکیب اضافه و به مدت ۳ دقیقه در آب جوش قرار داده شد. پس از خنک شدن در دمای محیط، مقدار ۱ میلی‌لیتر ان‌هگزان اضافه و پس از تکان دادن

بررسی پروفایل اسید چرب بافت و تخمک

مطابق با روش Asgari و همکاران (۲۰۲۰) ابتدا توسط اتانول و کلروفرم چربی نمونه‌ها جدا شدند و سپس جهت بررسی پروفایل اسید چرب متیل استری شدند (Asgari *et al.*, 2020). بدین منظور، مقدار ۵ میلی‌لیتر سود متانولی ۲ درصد به نمونه چربی استخراج شده اضافه شد.

دهنده نتایج مرتبط با کوئرستین عادی و کپسوله شده با کیتوزان و همچنین نانوذرات کیتوزان است. بر اساس نتایج مرتبط با آن پیک‌های مرتبط با کوئرستین عادی (OH, C=O, C-O و C=C) پس از فرآیند نانوانکپسولاسیون حذف یا جابه‌جا شدند که نانوکپسوله شدن کوئرستین را اثبات می‌کند.

نتایج مربوط به محتوای پروفایل اسید چرب بافت عضله پس از ۴۰ روز تغذیه با خوراک حاوی کوئرستین در دو فرم عادی و کپسوله شده و همچنین نانوکیتوزان در جدول ۳ ارائه شده است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که محتوای اسید چرب در ماهیانی که نانوکیتوزان دریافت کردند، تغییر معنی‌داری پیدا نکرده است. در بافت عضله درصد اسید چرب دکوزاهگزانوئیک اسید (DHA)، آراشیدونیک اسید (ARA) و همچنین مجموع اسیدهای چرب HUFA و ۳-n در تیمارهای کوئرستین عادی و نانوکپسوله شده، در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌دار یافتند ($p < 0.05$). همچنین در ماهیانی که کوئرستین نانوکپسوله شده دریافت کردند، درصد اسیدهای چرب آراشیدونیک اسید و ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA) در مقایسه با سایر گروه‌ها (حتی گروه کوئرستین عادی) افزایش معنی‌دار یافتند ($p < 0.05$).

نتایج مربوط به محتوای پروفایل اسید چرب تخمک ماهی زبرا پس از ۴۰ روز تغذیه با خوراک حاوی کوئرستین در دو فرم عادی و کپسوله شده و نیز نانوکیتوزان در جدول ۴ ارائه شده است. نتایج این مطالعه نشان داد که تغییر معنی‌داری در پروفایل اسید چرب ماهیانی که نانوکیتوزان استفاده کردند، مشاهده نشد. علاوه بر این، درصد اسید چرب ایکوزاپنتانوئیک اسید در تخمک ماهیانی که کوئرستین عادی دریافت کردند در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌دار پیدا کرد ($p < 0.05$). همچنین در ماهیانی که کوئرستین را در فرم نانوکپسوله شده دریافت کردند، مشاهده شد که درصد اسیدهای چرب ایکوزاپنتانوئیک اسید و دکوزاهگزانوئیک اسید و نیز مجموع اسیدهای چرب HUFA، ۳-n و نسبت ۳-n به ۶-n به طور معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0.05$).

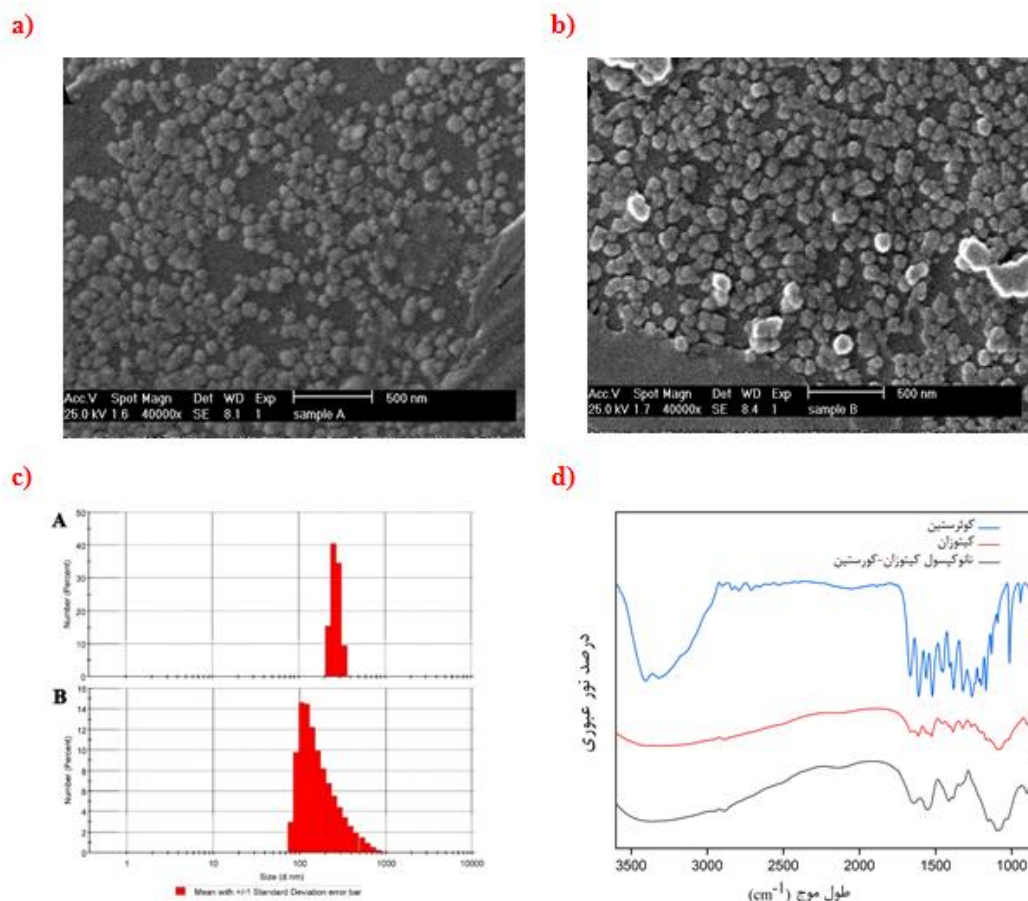
مقدار ۱ میلی‌لیتر محلول نمک اشباع اضافه شد. ترکیب مذکور به شدت تکان داده شد. تا زمان تشکیل ۲ فاز مختلف، ظرف نمونه در یک جای ثابت قرار داده شد. فاز بالایی برای بررسی پروفایل اسید چرب با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع جداسازی شد.

آنالیز آماری

طرح کلی این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. تجزیه تحلیل داده‌ها و مشخص کردن سطوح معنی‌داری با استفاده از نرم‌افزار SPSS و با آزمون آماری دانکن با درصد اطمینان ۹۵ و با آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) انجام شدند.

نتایج

نتایج مرتبط با آزمون SEM نانوذرات کیتوزان و نانوکپسول کوئرستین-کیتوزان در شکل ۱ نشان داده شده است. بر اساس تصاویر ارائه شده در شکل، مورفولوژی نانوذرات کیتوزان و نانوکپسول آن کروی بودند. به منظور بررسی سایز، پتانسیل زتا، Z-Average size و Polydispersity Index (شاخص بس پاشیدگی) نانوکپسول کوئرستین-کیتوزان از DLS استفاده شد (شکل ۱) که بر اساس آن نتایج مرتبط با سایز نانوکپسول ذکر شده قبل سونیکیت برابر با ۲۷۱/۹ نانومتر و بعد از سونیکیت برابر با ۱۸۶/۶ نانومتر بود. علاوه بر این، نتایج مرتبط با پتانسیل زتا نیز قبل از سونیکیت برابر با ۱۴/۷ mV و بعد از سونیکیت برابر با ۱۷/۵ mV بود. علاوه بر این، نتایج به دست آمده در خصوص Z-Average size اینگونه بود که، قبل از سونیکیت میزان آن برابر با ۵۳۰۹ و بعد از سونیکیت نیز برابر با ۲۷۰/۵ d.nm بود. نتایج مرتبط با شاخص بس پاشیدگی نانوکپسول کوئرستین-کیتوزان قبل از سونیکیت برابر با ۱/۰۰ و بعد از سونیکیت برابر با ۰/۲۴۵ بود. از سویی، با استفاده از منحنی کالیبراسیون میزان کارایی انکپسولاسیون $95/38 \pm 0/008$ درصد و همچنین محتوای بارگذاری برابر با $14/07 \pm 1/46$ درصد بدست آمد. نتایج مرتبط با آزمون FTIR نیز در شکل ۱ نشان داده شده است که نشان



شکل ۱: مورفولوژی نانوذرات کیتوزان (a) و نانوکپسول کوئرستین-کیتوزان (b) به همراه نتایج سایز هیدرودینامیکی نانوکپسول کوئرستین-کیتوزان قبل از سونیکیت (c, A) و بعد از سونیکیت (c, B) و نتایج آزمون FTIR کوئرستین در دو فرم عادی و کپسوله شده و همچنین نانوکیتوزان

Figure 1: Morphology of chitosan nanoparticles (a) and nanoencapsulated quercetin (b) coupled with hydrodynamic size of nanoencapsulated quercetin before (c-A) and after (c-B) sonication, as well as FTIR spectra of quercetin, chitosan nanoparticles, and nanoencapsulated quercetin

جدول ۳: محتوای اسید چرب بافت عضله ماهی زبرا (*Danio rerio*) پس از ۴۰ روز تغذیه با تیمارهای نانوکیتوزان، کوئرستین عادی، کوئرستین کپسوله شده و شاهد

Table 3: Fatty acid profile of muscle tissue of zebrafish (*Danio rerio*) following 40-day feeding with diets containing chitosan nanoparticles, free quercetin, and nanoencapsulated quercetin

نانوکپسول کوئرستین	کوئرستین	نانو کیتوزان	شاهد	درصد اسید چرب
۰/۵۳ ± ۰/۱۷	۰/۶۱ ± ۰/۲۲	۰/۵۴ ± ۰/۳	۰/۵ ± ۰/۱۴	C14:0
۵/۲۹ ± ۰/۱۷	۴/۱۷ ± ۰/۸۴	۳/۹۱ ± ۰/۵۱	۳/۹۶ ± ۰/۰۲	C16:0
۳/۵۴ ± ۰/۰۱	۴/۸۶ ± ۰/۶۷	۴/۱۵ ± ۰/۷۳	۵/۳۳ ± ۰/۶۴	C18:0
۱/۱۹ ± ۰/۳۴	۱/۴۴ ± ۰/۵۳	۱/۳۸ ± ۰/۴۶	۱/۱۵ ± ۰/۱۲	C22:0
۳/۶۶ ± ۰/۰۸	۳/۰۳ ± ۰/۲۶	۲/۹۲ ± ۰/۷۴	۲/۵۹ ± ۰/۱۸	C18:1n7
۱۷/۴۷ ± ۱/۵	۱۹/۱۵ ± ۰/۶۲	۱۸/۴۴ ± ۳/۲۳	۲۱/۷۸ ± ۱/۸۲	C18:1n9
۱/۷۸ ± ۰/۰۴	۱/۸۱ ± ۰/۲۹	۱/۲۷ ± ۰/۱۴	۱/۲۸ ± ۰/۰۱	C22:1n9

درصد اسید چرب	شاهد	نانو کیتوزان	کوئرستین	نانوکپسول کوئرستین
n3	$^{b}27/08 \pm 2/55$	$^{b}26/46 \pm 1/52$	$^{ab}30/79 \pm 2/24$	$^{a}33/82 \pm 0/77$
n6	$4/71 \pm 1/16$	$5/52 \pm 2/11$	$5/02 \pm 1/16$	$4/72 \pm 0/31$
n3/n6	$^{b}5/74 \pm 1/19$	$^{b}4/79 \pm 1/96$	$^{b}5/72 \pm 1/50$	$^{a}6/72 \pm 0/11$

داده‌ها به صورت $ME \pm SD$ بیان شده‌اند. حروف متفاوت نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها است ($p < 0/05$).

SFA: اسیدهای چرب اشباع (شامل: C14:0, C16:0, C18:0, C20:0, C22:0), MUFA: اسیدهای چرب غیر اشباع تک زنجیره: (شامل: C18:1n7, C18:1n9, C20:1n9, C22:1n9), PUFA: اسیدهای چرب غیر اشباع چند زنجیره (شامل: C18:2n-6, C18:3n3, C20:3n3, C20:4n6, C20:5n3, C22:6n3), HUFA: اسیدهای چرب غیر اشباع بلند زنجیره (شامل: C20:4n6 (ARA), C20:5n3 (EPA), C22:6n3 (DHA)).

بحث

در این مطالعه علاوه بر ساخت و آنالیز نانوکپسول کوئرستین-کیتوزان به بررسی تأثیر کوئرستین عادی و کپسوله شده، نانوکیتوزان و نیز تیمار شاهد پس از ۴۰ روز تغذیه ماهی زبرا روی پروفایل اسید چرب بافت عضله و تخمک ماهی زبرا پرداخته شد. در مطالعه حاضر، نتایج مشخصات نانوکپسول ساخته شده و نیز نانو کیتوزان با نتایج سایر مطالعات همخوانی داشت. به عبارت دیگر، Zhang و همکاران (۲۰۰۸) در مطالعه‌ای، کوئرستین را به‌وسیله کیتوزان با روش انعقاد یونی با هدف افزایش زیست‌فراهمی کپسوله کردند (Zhang et al., 2008). در این مطالعه با استفاده از FTIR کپسوله شدن کوئرستین در کیتوزان را اثبات کردند. همچنین Nan و همکاران (۲۰۱۸) نیز کوئرستین را با استفاده از کیتوزان کپسوله کردند و علاوه بر بررسی کارایی انکپسولاسیون ($13/5 \pm 0/77$ درصد)، محتوای بارگزار ($90/98 \pm 1/66$ درصد)، سایز هیدرودینامیک ($183/63 \pm 1/52$ نانومتر) و پتانسیل زتا (37 میلی‌ولت)، با استفاده از Transmission Electron Microscopy (TEM)، مورفولوژی (کروی شکل) آن را بررسی کردند (Nan et al., 2018). در مطالعه دیگری Baksi و همکاران (۲۰۱۸) با روش انعقاد یونی، کوئرستین را در کیتوزان نانوکپسوله کردند و با استفاده از FTIR کپسوله شدن کوئرستین در کیتوزان را نشان دادند. همچنین در این مطالعه مورفولوژی نانوکپسول‌های ساخته شده با استفاده از TEM کروی شکل به‌دست آمد. علاوه بر این، نتایج سایز هیدرودینامیک، پتانسیل زتا و شاخص بس پاشیدگی را قبل و بعد از سونیکیت به‌ترتیب برابر با $339/37$ و $114/6$

نانومتر، $18/3$ و $22/53$ میلی‌ولت، $0/551$ و $0/295$ بدست آوردند (Baksi et al., 2018). مطابقت یافته‌های این تحقیق با مطالعه سایرین، پایداری و بهینه بودن نانوکپسول کوئرستین-کیتوزان ساخته شده را نشان داد. به طور کلی، یافته‌های این مطالعه نشان داد که تیمار کوئرستین با افزایش درصد اسیدهای چرب دکوزاهگزانوئیک اسید، آراشیدونیک اسید و مجموع اسیدهای چرب HUFA و $n-3$ در بافت عضله و نیز با افزایش اسید چرب ایکوزاپنتانوئیک اسید در تخمک ماهیان باعث بهبود پروفایل اسید چرب ماهی زبرا شده است. بر اساس مطالعات انجام شده، ماهی زبرا قادر به افزایش طول و تعداد پیوند دو گانه اسیدهای چرب می‌باشد (Tocher et al., 2001) که میزان این طولی سازی و ایجاد پیوند دو گانه وابسته به فاکتورهای تغذیه‌ای به‌خصوص نوع و مقدار چربی جیره می‌باشد (Jaya-Ram et al., 2008). بنابراین، در این خصوص ممکن است کوئرستین باعث بهبود فعالیت آنزیم‌های طولی‌سازی و غیر اشباع سازی و نیز به‌واسطه داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی بالا، مانع از اکسیداسیون اسیدهای چرب بلند زنجیره در ماهیان تغذیه شده باشد. در مطالعه‌ای Andrés و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که تیمار کوئرستین باعث بهبود پروفایل اسید چرب بافت عضله گوسفندان تغذیه شده با بذر کتان می‌شود (Andrés et al., 2014). در این مطالعه علت بهبود پروفایل اسید چرب گوشت گوسفند، اثرات مثبت و مفید کوئرستین بر شاخص‌های طولی سازی و غیر اشباع سازی اسیدهای چرب در بافت عضله ذکر شده است. اگرچه تأثیر کوئرستین بر پروفایل اسید چرب در ماهیان در مطالعات گزارش نشده است، با

کوئرتستین نانوکپسوله شده، یافته‌های این تحقیق با نتایج مطالعات زیادی مطابقت داشت (Baksi *et al.*, 2018; Nan *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2008).

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر به ساخت و بررسی نانوکپسول کوئرتستین-کیتوزان و نیز تاثیر آن بر پروفایل اسید چرب بافت عضله و تخمک ماهی زبرا پرداخته شد. نتایج این مطالعه نشان داد که کوئرتستین باعث بهبود پروفایل اسید چرب بافت عضله و تخمک ماهی زبرا می‌شود. علاوه بر این، در این مطالعه نشان داده شده که کیتوزان به خوبی توانایی نانوانکپسوله کردن کوئرتستین را دارد و سبب بهبود عملکرد آن می‌شود. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از فرآیند رهایش کنترل شده ترکیبات زیست فعال و فراسودمند باعث افزایش سرعت جذب این ترکیبات می‌شود. از سویی، انحصار ترکیبات فراسودمند در این سیستم‌های کارآمد تحویل باعث افزایش نیمه عمر، پایداری، حلالیت، جذب و بهبود عملکرد ترکیبات غذا-دارو می‌شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را نسبت به دانشگاه تربیت مدرس دارند. این مطالعه در قالب رساله کارشناسی ارشد با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

منابع

اکبری، پ. و سندک‌زهی، الف. ۱۳۹۵. اثر پودر جلبک اسپیرولینا (*Spirulina platensis*) روی رشد، تغذیه، ترکیب شیمیایی و اسیدهای چرب لاشه ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus Linnaeus, 1758*).
مجله منابع طبیعی ایران، ۶۹ (۱): ۹-۱. DOI: 10.22059/JFISHERIES.2016.57878
اکبری، پ. و شهرکی، ن. ۱۳۹۵. اثر عصاره جلبک پادینا (*Padina astraulis Hauck*) روی رشد، تغذیه، ترکیب شیمیایی و اسیدهای چرب لاشه ماهی کفال

این وجود مطالعات زیادی نشان داده‌اند که عصاره‌های گیاهی و ترکیبات زیست فعال مشتق شده از گیاهان با بهبود فعالیت آنزیم‌های طویل‌سازی و غیر اشباع سازی سبب بهبود پروفایل اسید چرب در آبزیان شده‌اند. همچنین در این مطالعات ذکر شده است که این عصاره‌های گیاهی و ترکیبات زیست فعال به واسطه توان آنتی‌اکسیدانی بالا، مانع از اکسیداسیون اسیدهای چرب بلند زنجیره در آبزیان می‌شوند (Yanar *et al.*, 2007; Zakeš *et al.*, 2008; Asgari *et al.*, 2020; Ghosi *et al.*, 2020). در مطالعه دیگری اکبری و شهرکی (۱۳۹۵) نشان دادند که ۶۲ روز تغذیه عصاره جلبک پادینا موجب بهبود پروفایل اسید چرب بافت عضله ماهی کفال خاکستری شده است (اکبری و شهرکی، ۱۳۹۵). همچنین اکبری و سندک‌زهی (۱۳۹۵) نشان دادند که پروفایل اسید چرب بافت عضله ماهی کفال پس از ۶۲ روز تغذیه با پودر جلبک اسپیرولینا بهبود پیدا کرد. به عبارت دیگر، این مطالعه نشان داد که پودر جلبک اسپیرولینا باعث افزایش اسیدهای چرب غیر اشباع چند زنجیره شده است (اکبری و سندک‌زهی، ۱۳۹۵).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که کوئرتستین کپسوله شده با کیتوزان باعث بهبود پروفایل اسید چرب بافت عضله و تخمک در ماهی زبرا در مقایسه با سایر تیمارها از جمله تیمار کوئرتستین عادی شده است. به عبارت دیگر، در ماهیانی که کوئرتستین کپسوله شده دریافت کردند، اسیدهای چرب دکوزاهگزانوئیک اسید، ایکوزاپنتانوئیک اسید و آراشیدونیک اسید و نیز مجموع اسیدهای چرب HUFA و n-۳ در بافت عضله ماهیان افزایش معنی‌دار پیدا کرده است. به علاوه، درصد اسیدهای چرب ایکوزاپنتانوئیک اسید و دکوزاهگزانوئیک اسید و نیز مجموع اسیدهای چرب HUFA، n-۳ و نسبت n-۳ به n-۶ به طور معنی‌داری در تخمک ماهی زبرا افزایش یافت. از دلایل احتمالی بهبود عملکرد کوئرتستین کپسوله شده می‌توان به افزایش حلالیت در خون، پایداری در برابر شرایط محیطی، افزایش جذب از طریق روده، افزایش پایداری در برابر شرایط دستگاه گوارش و عدم سم‌زدایی آن در بافت کبد اشاره کرد. در خصوص بهبود عملکرد

- Chamundeeswari, M., Jeslin, J. and Verma, M.L., 2019.** Nanocarriers for drug delivery applications. *Environmental Chemistry Letters*, 17(2): 849-865. DOI:10.1007/s10311-018-00841-1.
- Ghosi Mobaraki, M.R., Abedian Kenari, A., Bahrami Gorji, S. and Esmaili, M., 2020.** Effect of dietary fish and vegetable oil on the growth performance, body composition, fatty acids profile, reproductive performance and larval resistance in pearl gourami (*Trichogaster leeri*). *Aquaculture Nutrition*, 26(3): 894-907. DOI:10.1111/anu.13048.
- Jaya-Ram, A., Kuah, M.K., Lim, P.S., Kolkovski, S. and Shu-Chien, A.C., 2008.** Influence of dietary HUFA levels on reproductive performance, tissue fatty acid profile and desaturase and elongase mRNAs expression in female zebrafish *Danio rerio*. *Aquaculture*, 277(3-4): 275-281. DOI:10.1016/j.aquaculture.2008.02.027.
- Nan, W., Ding, L., Chen, H., Khan, F.U., Yu, L., Sui, X. and Shi, X., 2018.** Topical use of quercetin-loaded chitosan nanoparticles against ultraviolet B radiation. *Frontiers in pharmacology*, 9: 826. DOI:10.3389/fphar.2018.00826.
- خاکستری (*Mugil cephalus Linnaeus, 1758*).
 مجله علمی شیلات ایران، ۲۵ (۲): ۱۶۱-۱۷۰. DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110248
 طایمه، ب.م.، کلباسی، م. و پاک‌نژاد، ح. ۱۳۹۹. اثر محافظتی کوئرستین بر سمیت نانوذرات نقره در بافت آبشش، مغز و نخاع ماهی زبرا (*Danio rerio*). مجله علمی شیلات ایران.
- Andrés, S., Morán, L., Aldai, N., Tejido, M.L., Prieto, N., Bodas, R. and Giráldez, F.J., 2014.** Effects of linseed and quercetin added to the diet of fattening lambs on the fatty acid profile and lipid antioxidant status of meat samples. *Meat Science*, 97(2): 156-163. DOI:10.1016/j.meatsci.2014.02.001.
- Asgari, M., Abedian Kenari, A., Esmaili, M. and Rombenso, A., 2020.** Effects of hydroalcoholic extract of honeybee pollen on growth performance, flesh quality, and immune and stress response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Nutrition*. DOI:10.1111/anu.13098.
- Baksi, R., Singh, D.P., Borse, S.P., Rana, R., Sharma, V. and Nivsarkar, M., 2018.** In vitro and in vivo anticancer efficacy potential of Quercetin loaded polymeric nanoparticles. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106: 1513-1526. DOI:10.1016/j.biopha.2018.07.106.
- Bozsaky, D., 2016.** Application of nanotechnology-based thermal insulation materials in building construction. *Slovak Journal of Civil Engineering*, 24(1):17-23. DOI: https://doi.org/10.1515/sjce-2016-0003.

- Rothenbücher, T.S., Ledin, J., Gibbs, D., Engqvist, H., Persson, C. and Hulsart-Billström, G., 2019.** Zebrafish embryo as a replacement model for initial biocompatibility studies of biomaterials and drug delivery systems. *Acta Biomaterialia*, 100: 235-243.
- Tayemeh, M.B., Esmailbeigi, M., Shirdel, I., Joo, H.S., Johari, S.A., Banan, A., Nourani, H., Mashhadi, H., Jami, M.J. and Tabarrok, M., 2020a.** Perturbation of fatty acid composition, pigments, and growth indices of *Chlorella vulgaris* in response to silver ions and nanoparticles: A new holistic understanding of hidden ecotoxicological aspect of pollutants. *Chemosphere*, 238: 124576. DOI:10.1016/j.chemosphere.2019.124576.
- Tayemeh, M.B., Kalbassi, M.R., Paknejad, H. and Joo, H.S., 2020b.** Dietary nanoencapsulated quercetin homeostated transcription of redox-status orchestrating genes in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to silver nanoparticles. *Environmental Research*, 185: 109477. DOI:10.1016/j.envres.2020.109477.
- Tocher, D.R., Agaba, M., Hastings, N., Bell, J.G., Dick, J.R. and Teale, A.J., 2001.** Nutritional regulation of hepatocyte fatty acid desaturation and polyunsaturated fatty acid composition in zebrafish (*Danio rerio*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 24(4): 309-320.
- Wang, W., Sun, C., Mao, L., Ma, P., Liu, F., Yang, J. and Gao, Y., 2016.** The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 56: 21-38. DOI: 10.1016/j.tifs.2016.07.004.
- Yanar, Y., Büyükçapar, H., Yanar, M. and Göcer, M., 2007.** Effect of carotenoids from red pepper and marigold flower on pigmentation, sensory properties and fatty acid composition of rainbow trout. *Food chemistry*, 100(1): 326-330. DOI:10.1016/j.foodchem.2005.09.056.
- Zakęś, Z., Kowalska, A., Demska-Zakęś, K., Jeney, G. and Jeney, Z., 2008.** Effect of two medicinal herbs (*Astragalus radix* and *Lonicera japonica*) on the growth performance and body composition of juvenile pikeperch [*Sander lucioperca* (L.)]. *Aquaculture Research*, 39(11): 1149-1160. DOI:10.1111/j.1365-2109.2008.01977.x.
- Zhang, Y., Yang, Y., Tang, K., Hu, X. and Zou, G., 2008.** Physicochemical characterization and antioxidant activity of quercetin-loaded chitosan nanoparticles. *Journal of Applied Polymer Science*, 107(2): 891-897. DOI:10.1002/app.26402.

Influence of both free and nanoencapsulated quercetin on fatty acid profile of zebrafish (*Danio rerio*) muscle and eggs

Kalbassi M.R.^{1*}; Bhezadi Tayemeh M.¹; Paknejad H.²

*Kalbassi_m@modares.ac.ir

- 1- Department of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Mazandaran, Noor, Iran
- 2- Department of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan

Abstract

This study was designed to determine the influence of both free and nanoencapsulated quercetin on fatty acid profile of zebrafish (*Danio rerio*) muscle and eggs. To this end, a total of 120 fish were divided into 4 experimental groups and fed with following diets: control, without additive; chitosan, 400 mg nanochitosan per kg diet; Qu, 400 mg free quercetin per kg diet; Qu-chi, 400 mg nanoencapsulated quercetin per kg diet. To assess fatty acid profile, the muscle and eggs was dissected after feeding trial. No significant difference was recorded for fatty acid profile of muscle and eggs in the chitosan group. Considering muscle tissue, however, the fish treated with free quercetin significantly elevated the levels of ARA, DHA, \sum HUFA, and \sum n-3 when compared to control group, whereas the fish received nanoencapsulated quercetin showed a significant increase in DHA, EPA, ARA, \sum n-3, and \sum HUFA levels in comparison to the other groups. Concerning eggs fatty acids, the fish received free quercetin increased the percentage of EPA, yet the animals treated with nanoencapsulated quercetin did the levels of EPA, DHA, \sum HUFA, n3/n6, and \sum n-3. Together, quercetin could enhance the fatty acid profile of zebrafish muscle and eggs, and nanoencapsulation process could enhance the performance of free quercetin.

Keywords: Fatty acid, Nutrition, Quercetin, Nano-capsule, Zebrafish

*Corresponding author