أثر التغير الفصلي على فعالية بعض إنزيمات كبد أسماك التونا الزرقاء، مصراتة- ليبيا

عادل عمر أبودبوس، إسماعيل محمد الهمالي، ليلى ميلاد شغالة، حليمة محمد الغويل

قسم علم الحيوان، كلية العلوم، جامعة مصراتة

الملخص Abstract:

الدراسة الحالية تمت على بعض انزيمات وظائف الكبد (AST وALP وALT وLDH) لتقدير أثر التغير الفصلي على فسيولوجيا أسماك التونا الزرقاء (*Euthynnus alletteratus*)، التي جمعت من ساحل البحر لمدينة مصراتة - ليبيا، وذلك خلال شتاء وربيع، 2016-2017. نتائج الدراسة أظهرت زيادة نشاط كل أنزيمات الدراسة خلال فصل الربيع بالمقارنة مع فصل الشتاء. علاوة على ذلك، الدراسة الحالية أشارت لوجود معنوية ($P>0.05$) بين النشاط الانزيمي والموسم لكل الأنزيمات باستثناء انزيم LDH.

الكلمات المفتاحية: انزيمات وظائف الكبد، التونا الزرقاء، فعالية الانزيم.

المقدمة Introduction:

تعتبر أسماك التونا الزرقاء (التونا الصغيرة Little tunny)، والتي تعرف بشكل عام بأسماك التونا (Tunas) وهي تابعة لجنس أيوثيننا Euthynnus، التي تقع ضمن عائلة سكومبريديا (Family Scombridae). تمتاز أسماك *E. alletteratus* Rafinesque, 1810، بشكلها الأسطواني ذو لون مزرق من الجهة الظهرية، بينما يظهر سطحها البطني بلون فضي، في حين ينتشر على كامل السطح الظهري من الجهة الخلفية خطوط على شكل أمواج. يميز هذا النوع من الأسماك وجود لطخ غامقة تحت الزعنفة الحوضية، بالإضافة لعدد من الاشواك المحصورة بين مؤخرة الزعنفة الظهرية والذيلية. يصل أقصى طول لهذا النوع من الأسماك العظمية إلى 122سم، ويبلغ أقصى وزنها 16.5 كجم، كما أن عمرها قد يصل كأقصى مدى إلى 10 سنوات [1].

تعيش اسماك التونا الزرقاء (*E. alletteratus*) في المياه الدافئة والمدارية التي تتراوح درجة حرارتها ما بين 24-30م° كالمحيط الأطلسي، والبحر المتوسط، والبحر الأسود. صنفت أسماك التونا الزرقاء من قبل اتفاقية الأمم المتحدة لقانون البحار (UNCLOS) بالنوع عالي الهجرة (Highly migratory species) من بين أسماك نفس العائلة [2]، وهي تعد من بين أهم الأسماك الموجودة في الشاطئ الليبي [3]. حيث خلال أواخر فصل الربيع وبداية فصل الصيف تهاجر اعداد كبيرة من أسماك التونا من المحيط الأطلسي قاصدة خليج سرت بليبيا ودلتا النيل التي تعتبر مكان ملائم في البحر المتوسط لوضع البيوض لهذا النوع من الأسماك [4].

كبد الأسماك العظمية من الغدد خارجية الافراز الملحقة بالقناة الهضمية، وهي عضو له العديد من الوظائف، حيث تلعب دورا هاما في فسيولوجية الأسماك، ويعزى لها العديد من

الوظائف المهمة كالتقليل من سمية المواد، وتخليق البروتين، وكذلك انتاج مواد كيموحيوية (أنزيمات) لها دور في عملية الهضم [5].

تعتبر الانزيمات ذات أهمية حيث تلعب دورا مهما في عمليات الأيض في الخلايا الطبيعية للعديد من الأعضاء والأجهزة كالكبد، والجهاز الهضمي. هناك العديد من انزيمات وظائف الكبد، والتي من بينها أنزيم AST (Aspartate transaminase) وهو يوجد في الكبد، وخلايا القلب ونسيج العضلات المخططة، كما أن أنزيم ALP (Alkaline phosphatase)، يلاحظ في معظم الانسجة والأعضاء كالكبد والعظام والمشيمة وبشكل خاص في الغشاء البلازمي لخلايا تلك الانسجة، حيث يعمل على تحفيز التحلل المائي (Hydrolysis) للإسترات أحادية الفوسفات (Monophosphate esters) [6]. تفرز خلايا الكبد من ضمن أنزيماتها المعروفة بأنزيمات وظائف الكبد أيضا ALT (Alanine transminase)، الذي يعرف بإنزيم ألانين ترنسمينيز الذي تشير المستويات المرتفعة منه إلى التراكم الكبير للدهون بالإضافة لإصابة الكبد، لذا يعتبر من الانزيمات التي تدل على الحالة الفسيولوجيا للأسماك [7]. يوجد نوع أخر من الأنزيمات يعرف بإنزيمي التحللي LDH (Lactate dehydrogenase)، وهو موجود في كل أنسجة الجسم وبشكل خاص في خلايا الكبد والعظم (Osteoblasts). يعد LDH من الانزيمات المهمة التي تحفز تحلل الجليكوجين (تمثيل الكربوهيدرات Carbohydrate metabolism)، كما أنه يعتبر كمعيار أو مقياس لتعرض الكائن للإجهاد الناتج عن التلوث الكيميائي ونقص كمية الاوكسيجين[8].

لاحظ Sanders and Waagbo [9] خلال دراستهم على اسماك المزارع المائية (Catfish و Comman carp) ارتفاع نسبة AST وALP وALT في الشتاء مما كان عليه في فصل الخريف، كما أن Melloti *et al.* [10] أشار إلى أثر التغير الموسمي (الفصلي) على نشاط وفعالية انزيم AST وLDH في مصل دم أسماك Catfish وComman carp، بينما انزيم AST في مصل دم نفس الأسماك أظهر نشاطا في الشتاء مقارنة بالخريف. كذلك الدراسة التي قام بها Shhsavani *et al.* [11] على فعالية مجموعة من أنزيمات أسماك *Acipenser stellatus palls* (AST وALP وALT وLDH) في مصل الدم أنها تختلفت باختلاف الفصل (الموسم) خلال السنة. كذلك الدراسة التي أجريت على لبعض الانزيمات المضادة للأكسدة في كبد وعضلات أحد أنواع اسماك البوري (*Mullus barbatus*) من بحر البنادقيّين (Adriatic Sea)، أشارت نتائجها لوجود تباين في مستوى النشاط الانزيمي باختلاف فصول الدراسة [12].

أشار Dorcas and Solomon [13] إلى ارتفاع مستوى انزيمي ALT وAST في مصل الدم ناجم عن حدوث ضرر في خلايا الكبد، كذلك أظهرت دراسة قام بها Alhemmali *et al.* [14] أن مستوى فعالية بعض انزيمات كبد أسماك القرموط الافريقي كانت مرتبة حسب المتسلسلة التالية AST وALP وALT وLDH.

بين Rangraz and Jafaryan [15] في دراسة أجريت على فعالية انزيم AST وALP وALT لنوعين من أسماك *Hosu hosu* خلال فصلين مختلفين (شتاء والربيع)، حدوث زيادة في فعالية ونشاط انزيمات الدراسة خلال فصل الخريف مقارنة بالشتاء.

تهدف هذه الدراسة للتعرف على مستوى النشاط الانزيمي لبعض أنزيمات الايض لكبد أسماك *E. alletteratus* (أسماك دخيلة)، وكذلك أثر التغير الفصلي على معدل النشاط الانزيمي.

المواد والطرائق Materials and Methods:

جمع العينات

جمعت عينات الدراسة (أسماك التونا الزرقاء) من البحر الأبيض المتوسط قبالة ساحل مدينة مصراتة- ليبيا، وذلك خلال فصلين مختلفين من فصول السنة (الشتاء والربيع، 2016-2017). وضعت العينات في أكياس بلاستيكية ثم نقلت بواسطة حافظة مملوءة بالثلج مباشرة إلى معمل الاحياء المائية بقسم علم الحيوان كلية العلوم جامعة مصراتة. اخذت القياسات الخارجية (Morphometric) وهي الوزن (بالجرام) والطول الشوكي (Fork length) بالسنتيمتر، لكل عينة من عينات الدراسة (جدول 1، شكل 1).

جدول 1. متوسط الطول الشوكي (سم) و أوزان (جم) أسماك الدراسة.

فصل الدراسة	الطول الشوكي (سم)	الوزن (جم)
الشتاء	39	800
الربيع	38	707

شكل 1. منظر عام لسمكة *E. allettertus*، (FL) الطول الشوكي، و(SL) الطول القياسي بالسنتيمتر.

طريقة العمل

فصلت الكبد بعد عمل شق طولي من الناحية البطنية للأسماك وأخذ منها وزن 0.5 جم (Severin Elelstrogerate Gmbh, Rohre 27, D-59846 Sundern)، ووضعت في أنبوب خالي من المواد الحافظة وحفظة في مكان بارد (-20م°)، إلى حين البدء في الخطوة التالية. سحق نسيج الكبد باستخدام ساق زجاجي في أنبوبة اختبار يحتوي 1مم من محلول الفوسفات المنظم رقمه الهيدروجيني 7.4 (50 mM، 300mM NaCl) وذلك حسب ما ذكره [16، 17].

أثناء عملية سحق النسيج روعي تبريد الانبوب والساق الزجاجي المستخدم في السحق، وذلك للحفاظ على درجة حرارة النسيج خلال عملية السحق. تمت عملية فصل المحلول المتجانس بالطرد المركزي على 4000 لفة في درجة حرارة -4م° (EBA 420-Hettich Zentrisugen) لمدة ربع ساعة، حيث تمت عملية الفصل في وحدة الأبحاث التابعة لقسم علم الحيوان بكلية العلوم/جامعة مصراتة. نقلت العينات إلى مختبر ابن سيناء لتحاليل الطبية بمدينة مصراتة في حافظة ثلج بلاستيكية للحفاظ على درجة الحرارة باردة ولضمان عدم تأثر الانزيمات بدرجة حرارة الجو،

وذلك لاستخدام الرائق في قياس مستوى النشاط الانزيمي بواسطة جهاز المطياف الذري (spectrophotometer) (Cobas. Integral 400 Plus Roche) بأطوال موجية مختلفة حسب نوع الانزيم.

التحليل الاحصائي

استخدم في هذه الدراسة برنامج SPSS لتحليل البيانات احصائيا، حيث استخدم اختبار T-test لإيجاد العلاقة بين متغيرين. قيمة P-value التي استخدمت لدلاله المعنوية 0.05. استخدم المتوسط±الانحراف المعياري (mean±standard error) لكل المعايير الانزيمية.

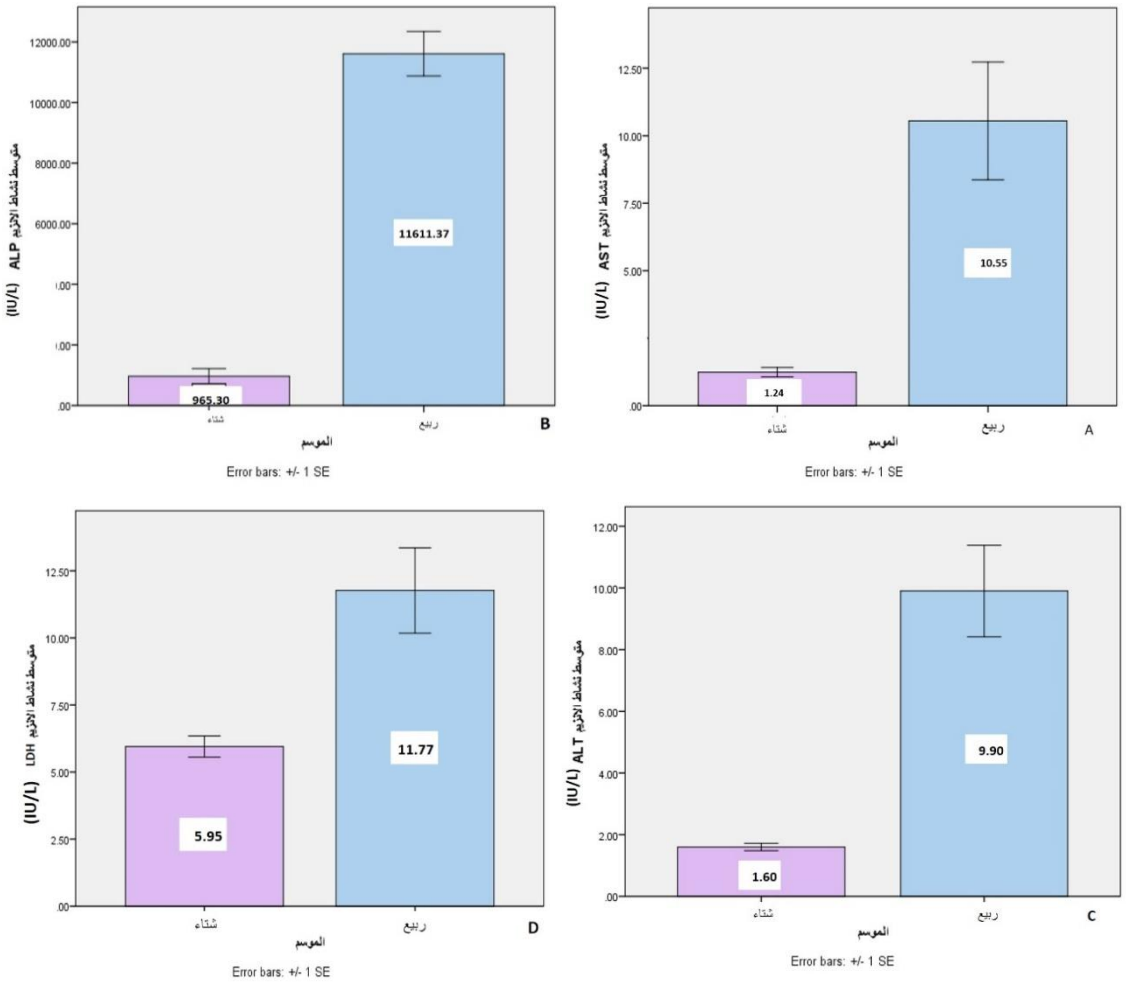
النتائج Results:

أشارت النتائج الخاصة بأنزيمات وظائف الكبد (Liver functions)، AST (SGOT)، ALP، ALT (SGPT) وLDH لكبد أسماك التونا الزرقاء (*E. alletteratus*)، المجمعة من الشاطئ البحري لمدينة مصراتة، لوجود تفاوت بين معدل النشاط الانزيمي لجميع انزيمات الدراسة بين فصل الشتاء والربيع (شكل 2).

أظهرت الدراسة الحالية (شكل A-2) أن هناك نشاط عالي لأنزيم AST خلال فصل الربيع، حيث وصل متوسط فعالية هذا الانزيم إلى IU/L10.6، بينما لم يتجاوز متوسط فعالية نفس الانزيم إلى IU/L 1.2، وذلك خلال فصل الشتاء. يشير الشكل (B-2) لارتفاع كبير في معدل نشاط انزيم ALP خلال فصلي الدراسة، حيث بلغ متوسط فعاليته إلى IU/L 965.3 وIU/L 11611.4، خلال فصل الشتاء والربيع على التوالي.

لوحظ من شكل (C-2)، ان متوسط فعالية انزيم ALT أيضا كان مرتفع في اسماك التونا الزرقاء خلال فصل الربيع (IU/L 9.9) بالمقارنة بفعالية نفس الانزيم في فصل الشتاء (IU/L 1.6). نشاط انزيم اللاكتيك ديهيروجنيز (LDH) هو الاخر أظهر انخفاضا خلال فصل الشتاء (IU/L 5.9) بالمقارنة مع نشاطه في فصل الربيع (IU/L 11.8).

أظهر التحليل الاحصائي للبيانات أن هناك دلالة معنوية ($P<0.05$) عند مقارنة مستوى متوسط النشاط الانزيمي لكل من AST وALP وALT بين فصلي الدراسة، حيث كانت قيمة P-value أقل من 0.05. بينما لا يوجد فرق معنوي عند مقارنة متوسط فعالية أنزيم LDH بين نفس فصلي الدراسة (جدول 2) للأنزيمات السابقة.



شكل 2. متوسط النشاط الانزيمي (IU/L) خلال فصل الشتاء والربيع (2016-2017) لأسماك *E. alletteratus*، (A) انزيم AST، (B) انزيم ALP، (C) انزيم ALT و(D) انزيم LDH.

جدول 2. متوسط نشاط انزيمات كبد أسماك *E. alletteratus* خلال فصل الشتاء والربيع، 2016-2017.

الفصل (الموسم)	انزيمات الكبد (المتوسط±الانحراف المعياري)			
	AST	ALP	ALT	LDH
الشتاء	0.2±1.2	251.9±965.3	0.2±1.6	0.3 ±5.9
الربيع	2.9±10.6	735.2±11611.4	1.5±9.9	1.6±11.8

فرق معنوي عند مستوي (P>0.05).

المناقشة discussion:

نتائج هذه الدراسة أظهرت تباين في مستوى نشاط انزيم AST وALT بين فصلي الدراسة (الشتاء والربيع) حيث كانت قيمة المعنوية أقل من (0.05). هذه النتائج تتفق مع ما وصل اليه Rangraz and Jafaryan [15] في دراستهم على فعالية انزيمات AST وALT (*Hosu hosu*)، حيث اشارت الدراسة إلى زيادة فعالية ونشاط انزيمات الدراسة خلال فصل الربيع مقارنة بالشتاء. بينما اختلفت نتائج الدراسة الحالية مع ما ذكره Sanders and Waagbo [9] عند دراسة نفس الانزيمات في دم أحد أنواع أسماك القرموط والكارب. النشاط الفسيولوجي لأسماك الدراسة كان أعلى في فصل الربيع وهذا راجع لوفرة الغذاء واعتدال درجة الحرارة مقارنة بفصل الشتاء، الأمر الذي أدى لنشاط الأسماك وزيادة عمليات البناء (Metabolism).

الدراسة الحالية التي تمت على أنزيم ALP لكبد أسماك التونا الزرقاء أشارت لوجود ارتفاع ملحوظ لمتوسط فعالية هذا الانزيم مما يدل على وجود نشاط فسيولوجي لأسماك الدراسة خلال فصل الشتاء، والذي سجل ارتفاعا أكثر في فصل الربيع. هذا الارتفاع في مستوى نشاط انزيم ALP، كان سببه هو اقتراب وضع البيوض أثناء فترة عبور ساحل مدينة مصراتة باتجاه خليج سرت بليبيا [3] ودلتا النيل لوضع البيوض، حيث أشار Sanders and Waagbo [9] إلى أن أحد أسباب ارتفاع نسبة هذا الانزيم تكون خلال مرحلة نضج البيوض في الأسماك (خاصة عند اقتراب وضع البيوض)، وكذلك أثناء فترة النمو (تكوين العظم) أو نتيجة هضم وجبة دهنية. كذلك النشاط الانزيمي في الأسماك يكون استجابة أولية لزيادة في إفراز الادرينالين (Adrenaline) والكورتيزول (Cortisol) محدثة بذلك تغيرات على فسيولوجيا الأسماك وخاصة في نشاط انزيمات الكبد وبلازما الدم [17]. كذلك أشار Bodin *et al.* [18] لارتفاع نسبته في دم الأطفال في سن النمو (IU/L350) بالمقارنة بنسبته عند البلوغ والتي تقدر ما بين 24-71 وحدة دولية لكل لتر من الدم (IU/L).

كذلك الحال بالنسبة لأنزيم LDH حيث اشارت الدراسة الحالية لوجد اختلاف بين متوسط فعالية إنزيم LDH لكبد أسماك *E. alletteratus* بين فترتي الدراسة وهذا يؤكد أثر التغير الفصلي على فعالية أو نشاط انزيم LDH، حيث اشارت نتائج دراسة قام بها Shhsavani *et al.* [11] لنتائج مماثلة، حيث وجدا في دراستهم أثر لفصول السنة على فعالية انزيم لاكتيت ديهيدروجنيز (LDH) في أحد أنواع الأسماك البحرية. كما يعد زيادة معدل الأيض (Metabolic rate) في الكبد الأسماك اثناء عملية النمو، سبباً لزيادة نشاط وفعالية انزيم LDH [19، 20]

شكر وتقدير:

نشكر د. إبراهيم سليمان حنيش، رئيس قسم الإحصاء، كلية العلوم، جامعة مصراتة، على تحليل البيانات الخاصة بالبحث إحصائيا. كما نشكر لسيد: عبدالسلام الكرشيني (رئيس مختبر ابن سيناء لتحاليل الطبية) بمدينة مصراتة، على مجهوداته في تحليل العينات مختبريا.

المراجع References:

1- Collette, B. and Heessen, H. Euthynnus alletteratus. The IUCN Red List of Threatened Species 2015. Available at 08 March 2017 [http://www.iucnredlist.org/details/170345/1M].
2- FAO (1997): Review of the state of world fishery resources: Marine fishes. Marine resources service fishery resources division fisheries department. Available at Available at 08 March 2017. [http://www.fao.org/docrep/003/W4248E/W4248E00.HTM].
3- Tawil, M., Y. Historical catch of bluefin tuna (Thunnus thynnus L.) and little tuna (E. alletteratus) from a Libyan trap net. In FAO Copemed Scientific Documents SCRS, 2002, 02/ 097.
4- Abolghait, S. K. and Garbaj, A. M. Determination of cadmium, lead and mercury residual levels in meat of canned light tuna (Katsuwonus pelamis and Thunnus albacares) and fresh little tunny (Euthynnus alletteratus) in Libya. Open Veterinary Journal, 2015, Vol. 5(2): 130-137.
5- Maton, A., Jean, H., Charles, W., McLaughilin, S., J., Maryanna, Q., W., David, L. and Wright, J., D. Human biology and health. Englewood Cliffs, New Jersey, USA: Prentice Hall.
6- Kumari, K., Ranjan, N. and Sinha, R. C. Multiple biomarker response in the fish, Lebo rohita due to hexavalent chromium. 2nd international conference on biotechnology and food science, 2011, Vol. 7: 155-158.
7- Kaplan, L. A. and Pesce, A. J. Clinical chemistry: Theory Analysis of correlation. Mosby YearBook Inc., Missouri. 2009. Pp 1200.
8- Diammantino, T. C., Almeida, E., Soares, A. M. and Quilhermino, I. Lactic dehydrogenase activity an effect criterion in toxicity test with Daphnia magna straus. Chemosphere, 2001, Vol. 45: 533-568.
9- Sanders K.L. and Waagbo R. Normalranges of some blood chemistry parameters in adult farmed Atlantic salmon (salmosalar). Journal of Fish Biology, 1988, Vol. 32: 729-736.
10- Melloti P., Meluzzi A., Zucchi P., Giordani G. and Cataudella S. Seasonal effects on some serum and muscle enzymes of catfish (Ictalurus melas) and common carp (Cyprinus carpio). Journal of Applied Ichthyology, 2007, Vol. 5: 74-79.
11- Shhsavani, D. Mohri, S. M. and Kanani, H. G. Determination of normal values of some blood serum enzymes in Acipenser stellatus pallas. Fish physiology and biochemistry, 2008, Vol. 36(91): 39-43.
12- Sladjan, P., Borkovic-Mitic, B., G., Svetlana, G., Despotovic, J., P. G. and Zorica, s., S. Seasonal changes of oxidative stress biomarkers in white muscle of Longfin gurnard (Chelidonychthys obscurus) from the Adriatic Sea.
13- Dorcas, I., K. and Solomon, R., J. Calculation of liver function test of Clarias garipinus collected from three commercial fish pounds. Nature and Science, 2014, 12(10): 107-123.
14- Alhemmali, E. M., Bashir, F. A., Rhouma, N. and Alkeskas, A. A. Effects of sub-lethal concentrations Diazinon on some physiological parameters of liver and kidney in the African catfish. Direct Research Journal of Agriculture and Food Science, 2015, Vol. 3(8). 162-166.

15- Rangraz, M. and Jafaryan, H. (2015): Study of blood serum factors of Beluga (Huso huso) in pen culture. European aquaculture society, 2015, Available at 07 May 2017. [http://www.was.org/easoline/Abstractditail].

16- أبودبوس، ع.، ع. الدور الوقائي لبعض مضادات الاكسدة ضد الفشل الكلوي الحاد المحدث معمليا بأحد الملوثات البيئية في ذكور الجردان البيضاء البالغة. رسالة ماجستير، 2012، كلية العلوم، جامعة مصراتة.

17- Georgieva, E., Stoyanova, S., Velcheva, I., Vasileva, T., Bivolarski, V., Iliev, I. and Yancheva, V. Metal effects on histological and biochemical parameters of common rudd (*Scardinius erythrophthalmus* L.). North-Western Journal of Zoology, 2016, Vol. **12** (2): 261-270.

18- Bodin, N., Burgeot, T., Stanisiere, J. Y., Bocquene, G., Menard, D., Minier, C., Boutet, I., Amat, A., Cherel. Y. and Budzinski, H. Seasonal variations of battery of biomarkers and physiological indices for the mussel *Mytilus galloprovicialis* transplanted into the northwest Mediterranean Sea. Comparative biochemistry and physiology, 2004, Vol. **138**: 411-427.

19- Dobsikova, R., Svobodova, Z., Blahova, J., Modra, H. and Velisek, J. Stress response to long distance transportation of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Acta Vet. Brno., 2004 Vol. 75: 437-448.

20- Wagner, T. and and Congleton, J. L. Blood chemistry correlated of nutritional condition, tissue damage, and stress in migrating juvenile Chinook salmon (*Onchorhynchus ishawytscha*). Journal of Canadian fish aquatic science, 2004, Vol. 61: 1066-1074.

Abstract:

Activities some liver function enzymes (AST, ALP, ALT and LDH) were used to estimate impact of seasonal variation on the physiology of Little tunny (*Euthynnus alletteratus*), which collected from coast of Misurata-Libya, during winter and spring, 2016-2017. The currently study showed that increase activities of all enzyme study during the spring compared with winter. Furthermore, the present study indicated that significant presence (P> 0.05) between enzymes activity and the season except enzyme of LDH.

Key words: Liver function enzymes, Little tunny, Enzyme activity.

[1-4]Zoology department, faculty of science, University of Misurata.