



## مقاله علمی - پژوهشی:

# اثرات حفاظتی ریشه ماکا (*Lepidium meyenii*) بر شاخص‌های بیوشیمیایی استرس در ماهی زبرا (*Danio rerio*) طی حمل‌ونقل

رقیه صفری<sup>۱\*</sup>، حامد آزادی<sup>۱</sup>، امیرمحمد خواجه‌وی<sup>۱</sup>، مینا رهبر<sup>۱</sup>، فائزه مرتضایی<sup>۱</sup>، محمدحسین هجرتی<sup>۱</sup>

\*fisheriessafari@yahoo.com

۱- گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ پذیرش: آبان ۱۴۰۳

تاریخ دریافت: مرداد ۱۴۰۳

## چکیده

این مطالعه با هدف بررسی تأثیر سطوح مختلف پودر ریشه ماکا (*Lepidium meyenii*) در جیره غذایی بر شاخص‌های بیوشیمیایی ماهی زبرا (*Danio rerio*) در مواجهه با استرس حمل‌ونقل انجام شد. تعداد ۳۰۰ قطعه ماهی زبرا با میانگین وزنی  $0.29 \pm 0.01$  گرم به صورت تصادفی به چهار گروه شاهد و سه تیمار با سطوح ۰/۵، ۱ و ۲ درصد پودر ریشه ماکا (به ترتیب C، T<sub>1</sub>، T<sub>2</sub> و T<sub>3</sub>) تقسیم شده و به مدت ۸ هفته تغذیه شدند. در انتهای آزمایش، ماهیان به مدت دو ساعت در معرض استرس حمل‌ونقل قرار گرفتند و شاخص‌های بیوشیمیایی، آنزیم‌های کبدی و هورمون کورتیزول ارزیابی شدند. نتایج نشان داد که پودر ریشه ماکا به‌ویژه در سطح ۲ درصد، به طور معنی‌داری سطوح گلوکز، کورتیزول، تری‌گلیسرید، کلسترول، لاکتات دهیدروژناز، آسپاراتات آمینوترانسفراز، آلانین آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز را کاهش داد ( $P < 0.05$ ). بر اساس نتایج حاصله، استفاده از پودر ریشه ماکا به عنوان یک افزودنی گیاهی طبیعی در جیره غذایی ماهی زبرا به‌ویژه سطح ۲ درصد می‌تواند به کاهش اثرات منفی استرس حمل‌ونقل کمک کند.

**کلمات کلیدی:** ماکا، استرس حمل‌ونقل، شاخص‌های بیوشیمیایی، کورتیزول، ماهی زبرا

## مقدمه

ماهی زبرا (*Danio rerio*) یکی از مدل‌های رایج آزمایشگاهی در مطالعات زیست‌شناسی، ژنتیک، فیزیولوژی و آبی‌پروری است که به دلیل رشد سریع، تولیدمثل بالا، اندازه کوچک و هزینه پایین نگهداری، کاربرد وسیعی یافته است (Lawrence, 2007; Ulloa et al., 2014). در فرایند پرورش و بهره‌برداری از ماهیان زینتی و اقتصادی، حمل‌ونقل به عنوان یکی از مراحل حساس مطرح است که می‌تواند سبب بروز استرس‌های فیزیولوژیک قابل‌توجهی شود. استرس ناشی از حمل‌ونقل با تغییراتی در شاخص‌های بیوشیمیایی (افزایش سطح کورتیزول، گلوکز و فعالیت آنزیم‌های کبدی)، همراه است که در نهایت ممکن است رشد، ایمنی و بقاء ماهی را تحت تاثیر قرار دهد (Barton, 2002; Brick and Cech Jr, 2002; Urbinati et al., 2004).

در سال‌های اخیر، به منظور کاهش اثرات منفی استرس در آبزیان، استفاده از ترکیبات طبیعی و گیاهان دارویی به عنوان جایگزین‌های ایمن و مؤثر برای ترکیبات شیمیایی مورد توجه قرار گرفته است (Citarasu, 2010). براساس مطالعات، این افزودنی‌ها غنی از ترکیبات زیست‌فعال نظیر آنتی‌اکسیدان‌ها، فیتواستروژن‌ها و پلی‌ساکاریدها هستند که می‌توانند به طور چشمگیری سلامت و عملکرد ماهیان پرورشی را بهبود بخشند (Chakraborty et al., 2014; Hu et al., 2025).

یکی از گیاهان دارویی که پتانسیل بالایی در بهبود پاسخ‌های فیزیولوژیک دارد، گیاه ماکا (*Lepidium meyenii*) است. ماکا، گیاهی بومی ارتفاعات آند در آمریکای جنوبی، سرشار از ترکیبات فعال زیستی همچون پلی‌فنول‌ها، گلوکوزینولات‌ها، آلکالوئیدها و پلی‌ساکاریدهاست که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، تعدیل‌کنندگی استرس و تقویت‌کننده سیستم ایمنی است (Sandoval et al., 2002; Zha et al., 2014).

مطالعات متعدد بر آبزیان نشان داده‌اند که استفاده از عصاره‌های گیاهی مانند گزنه (*Urtica dioica*)، موسیر (*Allium hirtifolium*)، گل ختمی (*Alcea rosea*)، سیر (*Allium sativum*)، آویشن (*Thymus vulgaris*) و زنجبیل (*Zingiber officinale*) می‌تواند اثرات استرس‌های محیطی را کاهش دهد، پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی را بهبود بخشد و میزان بقاء ماهیان را افزایش دهد (Safari et al., 2025; Ghafarifarsani et al., 2022; Harikrishnan et al., 2011; Farag et al., 2021).

## مواد و روش‌ها

### تهیه جیره آزمایشی

پودر ریشه ماکا از عطاری شهر گرگان تهیه شد. برای آماده سازی جیره های غذایی حاوی سطوح مختلف ماکا، ابتدا پودر خشک شده ریشه ماکا از الک ۳۰ میکرون عبور داده شد. مقادیر تعیین شده (۵/۰، ۱ و ۲ درصد) از پودر ریشه ماکا با جیره تجاری بیومار به کمک محلول ژلاتین ۳ درصد مخلوط گردید. جیره های آماده شده به مدت ۲۴ ساعت در هوای محیط آزمایشگاه خشک شده و سپس در بسته بندی های نفوذناپذیر به نور و رطوبت قرار داده شدند. تمام نمونه ها تا زمان مصرف در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. جیره گروه شاهد تنها حاوی جیره پایه بیومار همراه با ژلاتین اسپری شده (بدون افزودن پودر ریشه ماکا) بود.

### شرح آزمایش

در این پژوهش، ۳۰۰ قطعه ماهی زبرا (میانگین وزنی ۰/۲۹±۰/۰۱ گرم) تهیه و پس از انتقال به سالن آبی‌پروری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، به مدت ۲ هفته با شرایط جدید سازگار شدند. این ماهی ها در ۱۲ آکواریوم شیشه ای (حجم ۴۰ لیتر؛ تعداد ۲۵ قطعه در هر مخزن) توزیع گردیدند. طرح آزمایش به صورت کاملاً تصادفی با ۴ گروه مختلف (شامل سه تیمار و یک شاهد) و هر گروه در سه تکرار طراحی شد. جیره‌های غذایی مورد استفاده شامل خوراک تجاری بیومار به همراه مقادیر ۵/۰، ۱ و ۲ درصد پودر ریشه ماکا برای گروه های تیمار (به ترتیب T<sub>1</sub>، T<sub>2</sub> و T<sub>3</sub>) و جیره پایه برای گروه شاهد (C) بود.

غذادهی به میزان ۳ درصد زیست‌توده روزانه و در دو نوبت (ساعت ۰۸:۰۰ و ۱۵:۰۰) به مدت ۸ هفته انجام پذیرفت. شاخص‌های فیزیکیوشیمیایی آب شامل دمای آب (۲±۲۶ درجه

سانتی گراد)، pH (۷/۸±۰/۱)، اکسیژن محلول (۷/۷±۰/۰) میلی گرم در لیتر) و دوره نوری (۱۲ ساعت روشنایی / ۱۲ ساعت تاریکی) به صورت روزانه کنترل و ثبت گردید. برای حفظ کیفیت آب، سیستم هوادهی پیوسته در تمام مدت آزمایش فعال بود. همچنین پیش از هر بار غذادهی، پسماندهای غذایی و مواد دفعی از محیط خارج می شد.

### بررسی مقاومت به استرس حمل و نقل

پس از اتمام دوره ۸ هفته تغذیه، به منظور ارزیابی تحمل ماهی ها در شرایط استرس حمل و نقل، از هر تکرار آزمایشی ۱۸ قطعه ماهی به صورت تصادفی انتخاب گردید. ۲۴ ساعت پیش از آغاز تست، تغذیه قطع شد. ماهی های انتخابی در کیسه های پلاستیکی مخصوص حاوی ۵۰۰ میلی لیتر آب تصفیه شده (از محیط پرورش) و ۵۰۰ میلی لیتر اکسیژن خالص با نسبت ۱:۱ قرار داده شدند. کیسه ها به دقت بسته بندی شده و به مدت دو ساعت در معرض استرس حمل و نقل قرار گرفتند.

### ارزیابی شاخص های بیوشیمیایی سرم

بلافاصله پس از اتمام تست استرس حمل و نقل، ۹ قطعه ماهی از هر تیمار (۳ قطعه از هر تکرار) با دوز بالای عصاره پودر گل میخک بی هوش و سپس کشته شدند. با توجه به محدودیت های نمونه گیری خونی ناشی از ابعاد کوچک ماهیان، از روش عصاره گیری کل بدن مطابق دستورالعمل Yousefi و همکاران (۲۰۱۸) استفاده شد. نمونه ها در محیط نیتروژن مایع همگن سازی شده و با افزودن بافر نمکی فسفات (به نسبت ۱:۲ وزنی/حجمی) هموژنیزه گردیدند. سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتی گراد با سرعت ۴۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. سوپرناتانت جمع آوری شده در فریزر -۸۰ درجه سانتی گراد تا زمان انجام آزمایش های بعدی نگهداری گردید (Yousefi et al., 2018).

سنجش سطوح گلوکز، کلسترول، تری گلیسیرید و لاکتات دهیدروژناز (LDH) در نمونه های سرم ماهی با استفاده از روش های طیف سنجی و مطابق با دستورالعمل های ارائه شده به وسیله کیت های تجاری شرکت پارس آزمون (تهران، ایران) انجام پذیرفت. اندازه گیری جذب نوری نمونه ها در طول موج ۵۴۶ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر مدل UV-2150 (Unico, New Jersey, USA) و در شرایط استاندارد دمایی (۳۷ درجه سانتی گراد) صورت گرفت (McGowan et al., 1983).

برای تعیین سطح آنزیم آسپارات آمینوترانسفراز، از کیت شرکت پارس آزمون (کرج، ایران) و دستگاه اتوالایزر (perstige 24i, Boeki, Japan) با روش آنزیمی IFCC بر اساس دستورالعمل استاندارد سنجش شد. در این آزمایش، تغییرات جذب نوری در طول موج ۳۴۰ نانومتر به عنوان معیار سنجش در نظر گرفته شد و نتایج بر حسب واحد بین المللی (IU) گزارش گردید. واکنش شیمیایی بین ال-آسپارات و ۲-اگزالوگلو تارات در حضور آنزیم AST انجام می گیرد. این فرایند منجر به تولید دو ماده: اگزالوگلو تارات و ال-مالات، می شود. نکته کلیدی اینجاست که در طول این واکنش، مقدار NADH مصرفی که خاصیت جذب نوری دارد، با میزان محصولات تشکیل شده رابطه مستقیم دارد. همین ویژگی، اساس سنجش دقیق فعالیت آنزیم AST را تشکیل می دهد. سنجش فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) با روش استاندارد IFCC انجام شد که در آن از دستگاه اتوالایزر (perstige 24i, Boeki, Japan) و کیت تشخیصی شرکت پارس آزمون (کرج، ایران) طبق دستورالعمل سازنده استفاده گردید. در این روش، واکنش بین ال-آلانین و ۲-اگزالوگلو تارات به وسیله آنزیم ALT کاتالیز شده و منجر به تولید پیروات می شود. پیروات حاصل در ادامه به ال-لاکتات تبدیل می گردد. از آنجایی که در این فرایند، NADH (که جذب نوری در ۳۴۰ نانومتر دارد) به میزان متناسب با تولید پیروات مصرف می شود، کاهش جذب نوری مبنای محاسبه کمی فعالیت آنزیم ALT قرار گرفت. نتایج نهایی بر حسب واحد بین المللی (IU) گزارش شد (Reitman and Frankel, 1957).

سنجش آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) با استفاده از کیت تولیدی شرکت پارس آزمون (کرج، ایران) و بر اساس روش استاندارد DGKC انجمن بیوشیمی آلمان انجام شد. در این آزمایش، محلول های معرف ۱ (حاوی دی اتانول آمین و کلرید منیزیم) و معرف ۲ (حاوی پی-نیترو فیل فسفات) با نسبت ۴ به ۱ ترکیب شدند. سپس ۲۰ میکرو لیتر از نمونه مورد نظر با ۱۰۰۰ میکرو لیتر از مخلوط معرف ها مخلوط گردید و جذب نوری آن پس از ۱ دقیقه در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه گیری شد. در ادامه، تغییرات جذب نوری در دقیقه های ۱، ۲ و ۳ ثبت و میانگین این مقادیر محاسبه شد. نهایتاً، میانگین حاصله در ضریب ۲۷۵۷ ضرب گردید تا فعالیت آنزیم تعیین شود. برای کنترل کیفی آزمایش، از کنترل های TruLab P و TruLab N

شرکت پارس آزمون استفاده شد (Fischbach and Zawta, 1992).

سنجش کورتیزول سرمی با روش الایزا (واحد  $\text{ng mL}^{-1}$ ) با استفاده از کیت Monobind (آمریکا) انجام شد. در این روش، ۲۵ میکرولیتر از نمونه‌ها، استانداردها و کنترل‌ها به چاهک‌های پوشیده با آنتی‌بادی افزوده شد. پس از افزودن ۵۰ میکرولیتر آنزیم کونژوگه و ۵۰ میکرولیتر بیوتین-کورتیزول و اختلاط (۲۰ ثانیه)، پلیت به مدت ۶۰ دقیقه در ۲۶ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از شستشوی سه‌باره چاهک (با ۳۵۰ میکرولیتر محلول شستشو)، ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترا اضافه و پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون، واکنش با ۵۰ میکرولیتر محلول توقف متوقف شد. جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزایدر (Sirio S, Seac RADIM, Italy) اندازه‌گیری و غلظت‌ها بر اساس منحنی استاندارد محاسبه گردید. دقت روش با ضرایب تغییرات درون‌آزمون (۶/۱ درصد) و برون‌آزمون (۹/۷ درصد) تأیید شد (Tintos *et al.*, 2006).

### روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تمامی داده‌ها از نظر توزیع نرمال با آزمون Shapiro-Wilk

مورد بررسی قرار گرفتند. تحلیل آماری با استفاده از روش آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) در سطح معنی‌داری  $P < 0.05$  انجام شد. در صورت مشاهده تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها، مقایسه میانگین‌ها با آزمون چنددامنه‌ای توکی (Tukey's HSD) انجام پذیرفت. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شدند. کلیه محاسبات آماری و ترسیم نمودارها با نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۸ انجام شد.

### نتایج

#### شاخص‌های بیوشیمیایی

با توجه به جدول ۱، سطح گلوکز و تری‌گلیسرید سرم در گروه شاهد و  $T_1$  به طور معنی‌داری بالاتر از تیمارهای  $T_2$  و  $T_3$  بود ( $P < 0.05$ ). سطح کلسترول در گروه شاهد به طور معنی‌داری بالاتر از تیمارهای تغذیه‌شده با پودر ریشه ماکا بود ( $P < 0.05$ ). مقادیر این شاخص در تیمارهای آزمایشی ماکا اختلاف معنی‌داری نشان نداد ( $P > 0.05$ ). فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) نیز در تیمار شاهد به طور معنی‌داری بالاتر از تیمارهای تغذیه شده با ماکا بود و روند آن با افزایش سطوح ماکا، کاهش یافت ( $P < 0.05$ ).

جدول ۱: شاخص‌های بیوشیمیایی سرم بدن ماهی زبرا (*D. rerio*) تغذیه شده با سطوح مختلف پودر ریشه ماکا (*L. meyenii*) به مدت ۸ هفته، پس از قرارگیری در معرض استرس حمل و نقل (میانگین  $\pm$  انحراف معیار،  $n = 9$ ).

| شاخص‌ها                 | C                    | $T_1$                | $T_2$                   | $T_3$               |
|-------------------------|----------------------|----------------------|-------------------------|---------------------|
| گلوکز (mg/dl)           | $25.48 \pm 0.19^a$   | $23.32 \pm 0.57^a$   | $19.95 \pm 0.76^b$      | $17.93 \pm 0.57^b$  |
| کلسترول (mg/dl)         | $112.5 \pm 5.90^a$   | $98.96 \pm 1.47^b$   | $91.05 \pm 0.88^b$      | $92.71 \pm 1.47^b$  |
| تری‌گلیسرید (mg/dl)     | $170.73 \pm 3.45^a$  | $168.29 \pm 3.45^a$  | $143.90 \pm 6.90^b$     | $98.78 \pm 1.73^c$  |
| لاکتات دهیدروژناز (U/L) | $323.81 \pm 13.46^a$ | $278.57 \pm 10.10^b$ | $247.62 \pm 13.46^{bc}$ | $230.95 \pm 3.37^c$ |

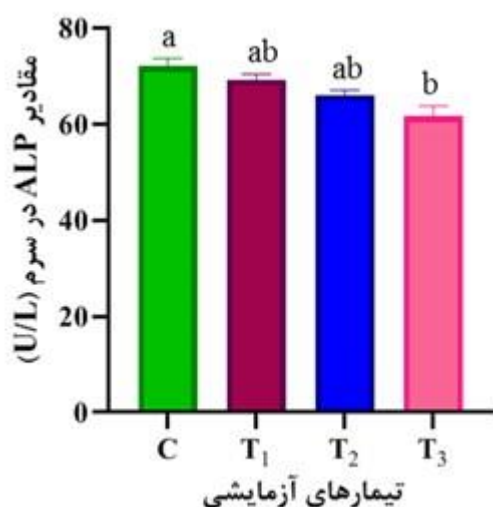
حروف لاتین کوچک غیر مشترک در هر سطر نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است ( $P < 0.05$ ). C: گروه شاهد (فاقد ماکا)،  $T_1$ : تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۵ درصد ماکا،  $T_2$ : تغذیه شده با جیره حاوی ۱ درصد ماکا،  $T_3$ : تغذیه شده با جیره حاوی ۲ درصد ماکا

#### مقادیر هورمون کورتیزول در سرم

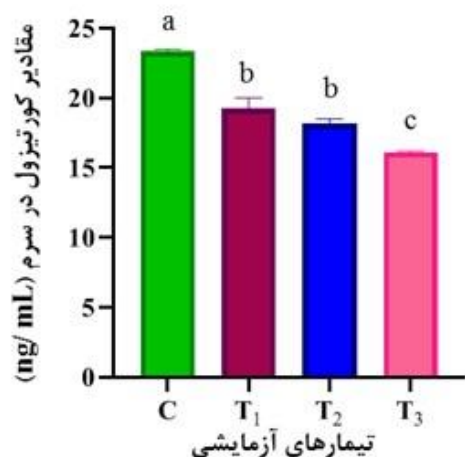
غلظت هورمون کورتیزول در سرم (شکل ۴) با افزایش مقادیر سطوح ماکا در جیره رابطه معکوس نشان داد به‌طوری‌که بالاترین میزان آن در گروه شاهد و پایین‌ترین میزان آن در گروه تغذیه شده با ۲ درصد پودر ریشه ماکا به‌دست آمد ( $P < 0.05$ ).

#### فعالیت آنزیم‌های کبدی

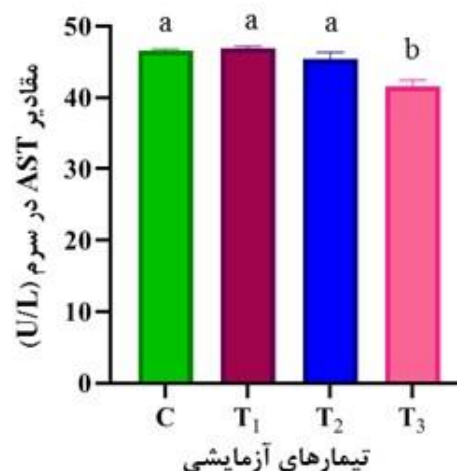
با توجه به شکل‌های ۱، ۲ و ۳، فعالیت آنزیم‌های ALT، AST و ALP در سرم ماهیان تغذیه شده با سطوح مختلف ریشه ماکا به طور معنی‌داری در تیمار  $T_3$  کمتر از سایر گروه‌ها بود ( $P < 0.05$ ).



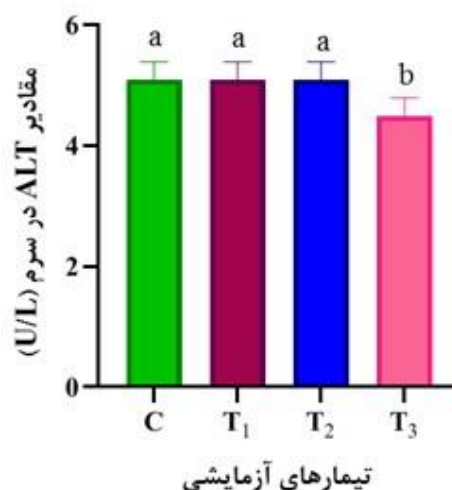
شکل ۳: سطوح آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) در سرم ماهی زبرا (*D. rerio*) تغذیه شده با سطوح مختلف پودر ریشه ماکا (*L. meyenii*) به مدت ۸ هفته، پس از قرارگیری در معرض استرس حمل و نقل (میانگین  $\pm$  انحراف معیار؛  $n=9$ ). حروف لاتین کوچک غیر مشترک نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار است ( $P < 0.05$ ).  
C: گروه شاهد (فاقد ماکا)، T<sub>1</sub>: تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۵ درصد ریشه ماکا، T<sub>2</sub>: تغذیه شده با جیره حاوی ۱ درصد ریشه ماکا، T<sub>3</sub>: تغذیه شده با جیره حاوی ۲ درصد ریشه ماکا



شکل ۴: سطوح هورمون کورتیزول در سرم ماهی زبرا (*D. rerio*) تغذیه شده با سطوح مختلف پودر ریشه ماکا (*L. meyenii*) به مدت ۸ هفته، پس از قرارگیری در معرض استرس حمل و نقل (میانگین  $\pm$  انحراف معیار؛  $n=9$ ). حروف لاتین کوچک غیر مشترک نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار است ( $P < 0.05$ ).  
C: گروه شاهد (فاقد ماکا)، T<sub>1</sub>: تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۵ درصد ریشه ماکا، T<sub>2</sub>: تغذیه شده با جیره حاوی ۱ درصد ریشه ماکا، T<sub>3</sub>: تغذیه شده با جیره حاوی ۲ درصد ریشه ماکا



شکل ۱: سطوح آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) در سرم ماهی زبرا (*D. rerio*) تغذیه شده با سطوح مختلف پودر ریشه ماکا (*L. meyenii*) به مدت ۸ هفته، پس از قرارگیری در معرض استرس حمل و نقل (میانگین  $\pm$  انحراف معیار؛  $n=9$ ). حروف لاتین کوچک غیر مشترک نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار است ( $P < 0.05$ ).  
C: گروه شاهد (فاقد ماکا)، T<sub>1</sub>: تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۵ درصد ریشه ماکا، T<sub>2</sub>: تغذیه شده با جیره حاوی ۱ درصد ریشه ماکا، T<sub>3</sub>: تغذیه شده با جیره حاوی ۲ درصد ریشه ماکا



شکل ۲: سطوح آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) در سرم ماهی زبرا (*D. rerio*) تغذیه شده با سطوح مختلف پودر ریشه ماکا (*L. meyenii*) به مدت ۸ هفته، پس از قرارگیری در معرض استرس حمل و نقل (میانگین  $\pm$  انحراف معیار؛  $n=9$ ). حروف لاتین کوچک غیر مشترک نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار است ( $P < 0.05$ ).  
C: گروه شاهد (فاقد ماکا)، T<sub>1</sub>: تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۵ درصد ریشه ماکا، T<sub>2</sub>: تغذیه شده با جیره حاوی ۱ درصد ریشه ماکا، T<sub>3</sub>: تغذیه شده با جیره حاوی ۲ درصد ریشه ماکا

## بحث

یافته‌های این پژوهش نشان داد که استفاده از گیاه ماکا در جیره غذایی ماهی زبرا موجب تغییرات در شاخص‌های بیوشیمیایی خون پس از مواجهه با استرس حمل‌ونقل می‌شود. مصرف جیره‌های حاوی سطوح بالاتر ریشه گیاه ماکا (۱-۲ درصد) منجر به کاهش معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) در غلظت گلوکز خون ماهی زبرا شد. گلوکز به عنوان یکی از شاخص‌های متابولیک کلیدی، در ارزیابی وضعیت استرس در ماهیان نقش مهمی ایفاء می‌کند. در شرایط تنش‌زا، افزایش سطح کورتیزول موجب فعال‌سازی مسیرهای گلیکوژنولیز شده که در نهایت به افزایش گلوکز خون منجر می‌گردد (Barton and Iwama, 1991; Mommsen et al., 1999). این پاسخ، یک مکانیسم تطابقی برای تأمین سریع انرژی مورد نیاز اندام‌های حیاتی مانند عضلات و مغز محسوب می‌شود (Barton, 2002). در این مطالعه، تفاوت معنی‌داری در سطح گلوکز بین گروه شاهد و تیمار T<sub>1</sub> مشاهده نشد که احتمالاً به دلیل دوز پایین ماکا و ناکافی بودن آن برای ایجاد تغییرات متابولیک قابل توجه بوده است. با این حال، در تیمارهای T<sub>2</sub> و T<sub>3</sub>، سطح گلوکز به طور قابل توجهی کاهش یافت. این کاهش ممکن است نشان‌دهنده نقش حفاظتی ماکا از طریق کاهش پاسخ هورمونی استرس یا افزایش بازجذب گلوکز باشد (Sandoval et al., 2014; Zha et al., 2002). این نتایج با مطالعاتی هم‌خوانی دارد که گزارش کرده‌اند، افزودن عصاره‌های گیاهی با خواص آنتی‌اکسیدانی به جیره ماهیان می‌تواند با تعدیل محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-بین‌کلیوی (HPI)، از افزایش گلوکز ناشی از استرس جلوگیری کنند (Yuan et al., 2021; Shohreh et al., 2025).

در مطالعه حاضر، تیمارهای تغذیه‌شده با سطوح مختلف پودر ریشه ماکا، مقادیر پایین‌تری از کلتسترول را نسبت به شاهد نشان دادند. کلتسترول یکی از شاخص‌های لیپیدی مهم در خون است که تغییرات آن می‌تواند تحت تأثیر استرس، تغذیه، و وضعیت فیزیولوژیک ماهی قرار گیرد. در شرایط استرس‌زا (حمل‌ونقل)، افزایش هورمون‌های استرس‌زا به‌ویژه کورتیزول می‌تواند باعث تحریک تجزیه لیپیدها و افزایش سطح کلتسترول خون شود (Montero et al., 2001). مطالعات پیشین نیز تأثیر مثبت ترکیبات گیاهی در کنترل سطح کلتسترول را نشان داده‌اند. مطالعه بر قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) نشان داد که افزودن عصاره ریحان (*Ocimum basilicum*) به

جیره غذایی پس از ۳۰ روز موجب کاهش معنی‌دار کلتسترول سرم شد (Pastorino et al., 2022) که این موضوع نشان‌دهنده خاصیت حفاظتی گیاهان دارویی در برابر اختلالات لیپیدی است.

تری‌گلیسرید نیز یکی دیگر از نشانگرهای لیپیدی است که در پاسخ به استرس تغییر می‌کند. افزایش کورتیزول در اثر استرس می‌تواند با افزایش تجزیه چربی‌ها (لیپولیز)، منجر به افزایش اسیدهای چرب آزاد و در ادامه، تری‌گلیسرید خون شود (Li et al., 2024). در این مطالعه، تیمارهای دریافت‌کننده ماکا نسبت به گروه کنترل پس از استرس حمل‌ونقل، مقادیر کمتری از تری‌گلیسرید را نشان دادند که می‌تواند بیانگر تأثیر ضد استرسی ماکا و کاهش تحریک مسیرهای لیپولیتیک باشد. نتایج حاضر از جنبه کاهش تری‌گلیسرید با یافته‌های غفاری فارسانی و همکاران (۲۰۲۲) در مطالعه بر قزل‌آلای رنگین‌کمان (O. mykiss) که اثرات حفاظتی عصاره موسیر (*Allium hirtifolium*) را بررسی کرده بودند، همخوانی قابل توجهی نشان می‌دهد (Ghafarifarsani et al., 2022).

در مطالعه حاضر، تیمارهای تغذیه‌شده با سطوح مختلف پودر ریشه ماکا، به‌ویژه سطح ۲ گرم در کیلوگرم (T<sub>3</sub>)، سطح پایین‌تری از LDH را نسبت به شاهد داشتند. آنزیم LDH شاخص مهمی برای سنجش میزان تنفس بی‌هوازی و استرس فیزیولوژیک در ماهیان است. در پاسخ به استرس، فعالیت این آنزیم افزایش می‌یابد که نشانگر تمایل بیشتر سلول‌ها به مصرف مسیرهای بی‌هوازی برای تأمین انرژی فوری است (Chang et al., 2020). این یافته‌ها حاکی از آن است که ماکا توانسته از شدت پاسخ‌های استرسی بکاهد و متابولیسم انرژی را در مسیر طبیعی تری حفظ کند. این نتایج با یافته‌های مطالعه‌ای که اثر جیره‌های حاوی ترکیب گیاهی *Mucuna pruriens* و *Pedaliium murex* (به نسبت ۱:۱) را بر شاخص‌های هماتولوژیک بچه‌ماهیان روهو (*Labeo rohita*) بررسی کرده بود، هم‌خوانی دارد (Ojha et al., 2016).

نتایج مطالعه حاضر نشان‌دهنده تأثیر معنی‌دار افزودن پودر ریشه ماکا به جیره غذایی ماهی زبرا بر فعالیت آنزیم‌های کبدی پس از استرس حمل‌ونقل بود به‌طوری‌که فعالیت آنزیم‌های AST، ALT و ALP به طور معنی‌داری در تیمار T<sub>3</sub> کمتر از سایر گروه‌ها بود. این آنزیم‌ها در شرایط طبیعی درون سلول‌های کبدی حضور دارند، اما در صورت آسیب یا نکرز سلولی به جریان خون انتشار پیدا می‌کنند. از این‌رو، افزایش سطح این

همکاران (۲۰۰۶) نشان داده‌اند که مصرف ماکا به‌ویژه در دوزهای بالا و دوره‌های طولانی‌تر منجر به کاهش قابل‌توجه سطح کورتیزول خون در موش‌های نر و ماده گردید. این کاهش احتمالاً ناشی از ترکیبات فعال موجود در ماکا است که با تأثیر تعدیل‌کننده بر محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال (HPA) می‌توانند ترشح کورتیزول را مهار کنند (Meissner et al., 2006).

در مجموع، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تغذیه ماهی زبرا با سطوح مختلف گیاه دارویی ریشه ماکا به‌ویژه سطح ۲ درصد به مدت دو ماه، می‌تواند با تعدیل شاخص‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی، اثرات استرس حمل‌ونقل را کاهش دهد. کاهش سطوح کورتیزول، گلوکز، تری‌گلیسرید، کلسترول، LDH و آنزیم‌های کبدی در برخی تیمارها، بیانگر بهبود وضعیت متابولیک، عملکرد کبدی و پاسخ بهتر به استرس بود. این نتایج نشان می‌دهد که پودر ریشه ماکا به عنوان یک افزودنی گیاهی طبیعی می‌تواند با تقویت مقاومت فیزیولوژیک ماهی، رویکردی مؤثر در مدیریت استرس در شرایط حمل‌ونقل و آبی‌پروری باشد. با توجه به نتایج حاصله، استفاده هدفمند از این گیاه در تغذیه ماهیان می‌تواند به ارتقاء سلامت و بهبود عملکرد در صنعت پرورش ماهی کمک کند.

## منابع

- Abdel-Tawwab, M., Hamed, H.S., Monier, M.N. and Amen, R.M., 2024. The ameliorative effects of dietary rosemary (*Rosmarinus officinalis*) against growth retardation, oxidative stress and immunosuppression induced by waterborne lead toxicity in Nile tilapia fingerlings. *Annals of Animal Science*, 24(1), 139–149. DOI:10.2478/aoas-2023-0057
- Barton, B.A. and Iwama, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*, 1, 3-26. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(91\)90019-G](https://doi.org/10.1016/0959-8030(91)90019-G).

آنزیم‌ها در سرم به عنوان نشانه‌ای از استرس اکسیداتیو، التهاب یا آسیب بافت کبدی شناخته می‌شود (Abdel-Tawwab et al., 2024). در این مطالعه، کاهش غلظت این آنزیم‌ها در گروه‌های تغذیه‌شده با پودر ریشه ماکا می‌تواند بیانگر نقش حفاظتی این گیاه دارویی در کاهش اثرات استرس‌زا و تثبیت عملکرد سلول‌های کبدی باشد. ترکیبات فعال موجود در ماکا مانند پلی‌فنول‌ها و فلاونوئیدها احتمالاً با خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود از غشاء سلولی محافظت کرده و مانع از انتشار آنزیم‌ها به سرم شده‌اند. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که عصاره‌های گیاهی می‌توانند اثرات محافظتی قابل‌توجهی بر عملکرد کبد در گونه‌های مختلف آبی داشته باشند. در این زمینه، پژوهش‌ها حاکی از آن است که عصاره موسیر (*A. hirtifolium*) قادر به کاهش معنی‌دار سطوح آنزیم‌های کبدی (ALT، AST، ALP) در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) شده است. این اثرات احتمالاً از طریق مکانیسم‌های مختلفی از جمله خواص آنتی‌اکسیدانی قوی، مهار پراکسیداسیون لیپیدها و کاهش استرس اکسیداتیو اعمال می‌شوند (Ghafarifarsani et al., 2022). به طور مشابه، مطالعات انجام شده بر ماهی زبرا (*D. rerio*) نیز نشان داده‌اند که عصاره گل ختمی (*Alcea rosea*) می‌تواند به طور مؤثری سطوح آنزیم‌های کبدی را تعدیل نماید (Safari et al., 2025). این یافته‌ها به خوبی گویای این واقعیت هستند که ترکیبات گیاهی مختلف با مکانیسم‌های عمل مشابه می‌توانند گزینه‌های درمانی امیدوارکننده‌ای برای محافظت از کبد و بهبود عملکرد آن در گونه‌های آبی باشند.

در مطالعه حاضر، افزایش قابل‌توجه سطح کورتیزول در گروه شاهد پس از حمل‌ونقل تأییدکننده وقوع پاسخ استرسی شدید است. اما در گروه‌هایی که با پودر ریشه ماکا تغذیه شده بودند، این افزایش به طور معنی‌داری مهار شده و در بالاترین سطح ماکا (۲ درصد پودر ریشه ماکا)، کمترین مقدار کورتیزول مشاهده شد. کورتیزول به عنوان هورمون اصلی استرس در ماهیان، نقش کلیدی در هماهنگ‌سازی پاسخ فیزیولوژیک به تنش‌های محیطی دارد. این هورمون از غدد بین‌کلیوی ترشح شده و از طریق محور HPI کنترل می‌شود. در مواجهه با استرس، این محور فعال شده و منجر به ترشح سریع کورتیزول می‌شود که به عنوان یک پاسخ اولیه جهت حفظ تعادل هموستاز در بدن عمل می‌کند (Barton et al., 2002). این یافته نشان می‌دهد که ماکا با تعدیل فعالیت محور HPI می‌تواند از شدت پاسخ استرسی بکاهد. مطالعات قبلی از جمله پژوهش Meissner و

- Barton, B.A., 2002.** Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, 42(3), 517–525. <https://doi.org/10.1093/icb/42.3.517>
- Brick, M.E. and Cech Jr, J.J., 2002.** Metabolic responses of juvenile striped bass to exercise and handling stress with various recovery environments. *Transactions of the American Fisheries Society*, 131(5), 855–864. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(2002\)131<0855:MROJSB>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(2002)131<0855:MROJSB>2.0.CO;2)
- Chakraborty, S.B., Horn, P. and Hancz, C., 2014.** Application of phytochemicals as growth-promoters and endocrine modulators in fish culture. *Reviews in Aquaculture*, 6, 1–19. <https://doi.org/10.1111/raq.12021>.
- Chang, C. H., Zhou, X.W., Wang, Y.C. and Lee, T.H., 2020.** Differential effects of hypothermal stress on lactate metabolism in fresh water- and seawater-acclimated milkfish, *Chanos chanos*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 248, 110744. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.110744>
- Citarasu, T., 2010.** Herbal biomedicines: A new opportunity for aquaculture industry. *Aquaculture International*, 18(3), 403–414. <https://doi.org/10.1007/s10499-009-9253-7>
- Farag, M. R., Alagawany, M., Taha, H.S., Ismail, T.A., Khalil, S.R. and Abou-Zeid, S.M., 2021.** Immune response and susceptibility of Nile tilapia fish to *Aeromonas hydrophila* infection following the exposure to Bifenthrin and/or supplementation with *Petroselinum crispum* essential oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 216, 112205. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112205>.
- Fischbach, F. and Zawta, B. 1992.** Age-dependent reference limits of several enzymes in plasma at different measuring temperatures. *Klin Lab*, 555–561.
- GhafariFarsani, H., Yousefi, M., Hoseinifar, S.H., Paolucci, M., Lumsangkul, C., Jaturasitha, S. and Van Doan, H., 2022.** Beneficial effects of Persian shallot (*Allium hirtifolium*) extract on growth performance, biochemical, immunological and antioxidant responses of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fingerlings. *Aquaculture*, 555, 738162. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738162>.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C. and Heo, M.S., 2011.** Herbal supplementation diets on hematology and innate immunity in goldfish against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*, 30(3), 720–726. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.11.013>
- Hu, X., Ma, W., Zhang, D., Tian, Z., Yang, Y., Huang, Y. and Hong, Y., 2025.** Application of natural antioxidants as feed additives in aquaculture: A review. *Biology*, 14, 87. <https://doi.org/10.3390/biology14010087>.
- Lawrence, C., 2007.** The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*, 269(1–4), 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.077>
- Li, Z., Gao, Q., Dong, S., Dong, K., Xu, Y., Mei, Y. and Hou, Z., 2024.** Effects of chronic stress from high stocking density in mariculture: Evaluations of growth performance and lipid metabolism of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biology*, 13, 263. <https://doi.org/10.3390/biology13040263>.

- McGowan, M.W., Artiss, J.D., Strandbergh, D.R. and Zak, B., 1983. A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clinical Chemistry*, 29, 538-542. <https://doi.org/10.1093/clinchem/29.3.538>.
- Meissner, H.O., Reich-Bilinska, H., Mscisz, A. and Kedzia, B., 2006. Therapeutic effects of pre-gelatinized *Lepidium peruvianum* Chacon (Maca): Clinical observations on its applications in the treatment of menopausal symptoms. *International Journal of Biomedical Science*, 2(3), 260-284.
- Mommsen, T.P., Vijayan, M.M. and Moon, T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 9(3), 211-268. <https://doi.org/10.1023/A:1008924418720>
- Montero, D., Robaina, L.E., Socorro, J., Vergara, J.M., Tort, L. and Izquierdo, M.S., 2001. Alteration of liver and muscle fatty acid composition in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles held at high stocking density and fed an essential fatty acid deficient diet. *Fish Physiology and Biochemistry*, 24, 63-72. <https://doi.org/10.1023/A:1011164629660>.
- Ojha, M.L., Chadha, N.K., Saini, V.P., Damroy, S., Chandraprakash, P.B. and Sawant, P.B., 2016. Growth, metabolism and haematological parameters of *Labeo rohita* (Hamilton, 1822) fingerlings fed with herbal supplemented diet. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 4(6), 357-363.
- Pastorino, P., Bergagna, S., Vercelli, C., Pagliasso, G., Dellepiane, L., Renzi, M., Barbero, R., Re, G., Elia, A. C., Dondo, A. and Barceló, D., 2022. Changes in serum blood parameters in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with diets supplemented with waste derived from supercritical fluid extraction of sweet basil (*Ocimum basilicum*). *Fishes*, 7(2), 89. <https://doi.org/10.3390/fishes7020089>
- Reitman, S. and Frankel, A.S., 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *American Journal of Clinical Pathology*, 28, 56-63. <https://doi.org/10.1093/ajcp/28.1.56>
- Safari, R., Hoseinifar, S.H., Raeisi, M., Vakili, F., Paolucci, M., Yazici, M., Van Doan, H., Azadi, H., Hoseini, M., Abdolmanafi, M. and Ghafarifarsani, H., 2025. Unveiling the role of *Alcea rosea* in modulating growth, immunity, antioxidant defenses and gene expression in zebrafish (*Danio rerio*). *Veterinary Research Communications*, 49, 105. <https://doi.org/10.1007/s11259-024-10376-7>.
- Sandoval, M., Okuhama, N.N., Angeles, F.M., Melchor, V.V., Condezo, L.A., Lao, J. and Miller, M.J., 2002. Antioxidant activity of the cruciferous vegetable Maca (*Lepidium meyenii*). *Food Chemistry*, 79(2), 207-213. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00133-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00133-4)
- Shohreh, P., Mohammadzadeh, S., Mahboub, H.H., Ebrahimi, P., Gavzan, H., Ahmadifar, M., Moghadam, M.S., El-Haroun, E., Hoseinifar, S.H., Guerreiro, I. and Paolucci, M., 2025. The role of artichoke (*Cynara scolymus*) extract in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth and digestive enzymes, effect on oxidative and immune-and antioxidant-related gene expression before and after heat stress. *Aquaculture International*, 33, 115. <https://doi.org/10.1007/s10499-024-01522-8>.

- Tintos, A., Migue, J., Mancera, J. and Soengas, J., 2006.** Development of a microtiter plate indirect ELISA for measuring cortisol in teleosts and evaluation of stress response in rainbow trout and gilthead sea bream. *Journal of Fish Biology*, 68, 251–263. <https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2006.00898.x>
- Ulloa, P.E., Medrano, J.F. and Feijoo, C.G., 2014.** Zebrafish as animal model for aquaculture nutrition research. *Frontiers in Genetics*, 5, 313. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00313>.
- Urbinati, E.C., Abreu, J.S.D., Camargo, A.C.B. and Landines, M.A., 2004.** Loading and transport stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*, Characidae) at different densities. *Aquaculture*, 229(1–4), 389–400. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00350-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00350-8).
- Yousefi, S., Hoseinifar, S.H., Paknejad, H. and Hajmoradloo, A., 2018.** The effects of dietary supplement of galactooligosaccharide on innate immunity, immune related genes expression and growth performance in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish and Shellfish Immunology*, 73, 192–196. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.12.022>
- Yuan, X.C., Chen, F., Yue, D.D., Xie, S.Q., Huang, S.J., Jin, S.Z., Chen, H.T. and Yang, Y.O., 2021.** Tea polyphenols act as a natural antihyperglycemic feed additive candidate in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquaculture Nutrition*, 27, 2712–2725. <https://doi.org/10.1111/anu.13397>
- Zha, S., Zhao, Q., Chen, J., Wang, L., Zhang, G., Zhang, H. and Zhao, B., 2014.** Extraction, purification and antioxidant activities of the polysaccharides from maca (*Lepidium meyenii*). *Carbohydrate Polymers*, 111, 584–587. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.017>

## Protective effects of maca (*Lepidium meyenii*) on stress biochemical markers in zebrafish during transportation

Safari R.<sup>1</sup>; Azadi H.<sup>1</sup>; Khajavi A.M.<sup>1</sup>; Rahbar M.<sup>1</sup>; Mortezaei F.<sup>1</sup>; Hejrati M.H.<sup>1</sup>

\*fisheriessafari@yahoo.com

1-Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

### Abstract

This study aimed to evaluate the effects of different dietary levels of maca (*Lepidium meyenii*) root powder on the biochemical indices of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to transportation stress. A total of 300 zebrafish with an average weight of  $0.29 \pm 0.01$  g was randomly divided into four groups (control and three treatments) and fed diets containing 0.5%, 1% and 2% of maca root powder per kg of feed (designated as C [control], T1, T2 and T3, respectively) for eight weeks. At the end of the experiment, the fish were subjected to a 2-hour transportation stress, after which biochemical parameters, liver enzymes and cortisol levels were assessed. The results showed that maca root powder, particularly at the 2% level, significantly reduced glucose, cortisol, triglycerides, cholesterol, lactate dehydrogenase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and alkaline phosphatase levels ( $P < 0.05$ ). Based on the findings, dietary supplementation with maca root powder, especially at 2%, can help mitigate the adverse effects of transport stress in zebrafish.

**Keywords:** Maca, Transportation stress, Biochemical indicators, Cortisol, *Danio rerio*