

## بررسی اثرات غلظت‌های تحت‌کشنده کلرپیریفوس بر فعالیت آنزیم‌های سرمی و برخی شاخص‌های استرس اکسیداتیو ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

فرشته اسفندیار<sup>۱</sup>، فرید فیروزبخش<sup>۲\*</sup>، حسین رحمانی<sup>۳</sup>، خسرو جانی‌خلیلی<sup>۴</sup>

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد بوم‌شناسی آبریان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

۲. دانشیار گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

۳. دانشیار گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

۴. دانشجوی دکتری شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۳/۱ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۱۱/۱۷

### چکیده

کلرپیریفوس یک آفت‌کش ارگانوفسفره است که به‌طور گسترده به‌عنوان کنترل‌کننده آفات در مزارع کشاورزی استفاده می‌شود. هدف از این مطالعه تعیین اثر غلظت‌های تحت‌کشنده (۰/۱، ۰/۰۵ و ۰/۰۲ میلی‌گرم بر لیتر) کلرپیریفوس بر فعالیت آنزیم‌های کبدی و آنزیم‌های اکسیداتیو (سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز) ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در روزهای ۱، ۷، ۱۴ و ۲۱ بعد از تماس با آفت‌کش می‌باشد. میزان LC50 96 سم کلرپیریفوس برای کپور ماهیان ۵۱۶/۱ میلی‌گرم در لیتر بدست آمده است. نتایج حاضر حاکی از آن است که ماهیان تماس یافته با سم کلرپیریفوس در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری در فعالیت آسپارات‌آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) نشان دادند ( $P < 0/05$ ). همچنین فعالیت آلکالین فسفاتاز (ALP) در غلظت‌های بالای کلرپیریفوس (۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر) افزایش یافته و در روزهای اول و هفتم آزمایش، بیشترین سطح فعالیت در این غلظت‌ها مشاهده شد. فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (CAT) و سوپراکسیددیسموتاز (SOD) نیز بطور معنی‌داری بیشتر بود ( $P < 0/05$ ). علاوه بر این اثر متقابل زمان و غلظت سم بر روی فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و AST مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). بطور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که افزایش مدت تماس ماهی کپور معمولی با سم کلرپیریفوس در غلظت‌های ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های کبدی و آنزیم‌های اکسیداتیو ماهی می‌شود.

واژگان کلیدی: کلرپیریفوس، کپور معمولی، آنزیم‌های کبدی، آنزیم‌های اکسیداتیو، سمیت.

## ۱. مقدمه

لیپیدها باعث صدمه به غشاء سلولی و مرگ سلول می‌شوند (Rauen *et al.*, 1999). اثرات مضر احتمالی ترکیبات ROS از طریق سیستم حمایتی آنتی‌اکسیدانت سلولی شامل آنزیم‌هایی مانند سوپراکسیددیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) خنثی می‌شود (Salehi *et al.*, 2010). مجموعه آنزیمی سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز اولین خط دفاعی سلول در برابر سمیت ناشی از رادیکال‌های آزاد می‌باشد. آنزیم SOD باعث تبدیل رادیکال سوپراکسید به  $H_2O_2$  می‌شود (Abbasnezhad *et al.*, 2009) و خصوصیت مهم آن، قابل‌القاء بودن تحت شرایط استرس اکسیداتیو می‌باشد (Oruc and Usta, 2007).

تحقیقات محققین نشان داده است از جمله فاکتورهای موجود در سرم خون که میزان آنها در اثر سموم مختلف دچار تغییر می‌گردد آنزیم‌هایی از قبیل لاکتات دهیدروژناز، کولین‌استراز، آلکالین فسفاتاز و اسپاراتات‌آمینوترانسفراز می‌باشند (Purgholam *et al.*, 2001; Khoshbavar Rostami *et al.*, 2006; Ciesielski and Loomis, 1994; USEPA, 1993; Banaee *et al.*, 2008). آزادسازی آنزیم‌های پلاسما می‌تواند به وسیله آسیب‌های کبد، کلیه و طحال باشد و افزایش بسیاری از آنزیم‌ها در پلاسما به دلیل نکرورز کبدی خواهد بود (Banaee *et al.*, 2008).

باید اذعان نمود که در بعضی موارد آفت‌کش‌ها اثرات مخرب بیشتری روی موجودات غیر هدف (آبزیان) نسبت به موجودات هدف (آفات) داشته که این خود در حساسیت بالاتر و مرگ و میر سریع‌تر و بیشتر آبزیان نهفته است. طیف وسیعی از اثرات متفاوت برای ترکیبات ارگانوفسفره گزارش شده است. در مطالعه Wang و همکاران (۲۰۱۳) مشخص شد که با افزایش غلظت سموم کلریپیریفوس و آترازین فعالیت اسیدفسفاتاز، سوپراکسیددیسموتاز، آلکالین فسفاتاز و پمپ سدیم-پتاسیم ATPase در ماهی کپور معمولی کاهش یافته است. از طرف دیگر، در مطالعه اثر کلریپیریفوس و مالاتیون بر سیستم دفاعی و آنتی-اکسیدانی در *Oxya chinensis*، افزایش آنزیم‌های SOD و CAT در غلظت‌های پایین‌تر و کاهش آنها در غلظت‌های بالاتر گزارش شده است (Haihua *et al.*,

حشره‌کش‌های ارگانوفسفره گروه عمدۀایی از حشره‌کش‌های شیمیایی هستند که امروزه در جهان به‌طور گسترده استفاده می‌شوند. این گروه از حشره-کش‌ها علاوه بر استفاده در مزارع کشاورزی و باغات، در مناطق مسکونی نیز برای کنترل آفات، حفاظت از بهداشت عمومی، صنعت و دامپزشکی نیز کاربرد دارد (Bonilla *et al.*, 2008; Hoffman *et al.*, 2006). سموم ارگانوفسفره به‌طور عمومی سمیت بالایی دارند و مهم‌ترین عامل بیماری و مرگ و میر ناشی از مسمومیت‌ها در کشورهای جهان سوم هستند (Peter and Cherian, 2000).

کلریپیریفوس {O,O-diethyl O-3,5,6-Trichloro-2-pyridylphosphorothioate} با نام تجاری دورسبان Dursban EC40.8% حشره‌کش و کنه‌کش تماسی، گوارشی و تنفسی است که از طریق ریشه و برگ گیاهان جذب می‌شود. توانایی این سم در مهار آنزیم کولین‌استراز در سیستم عصبی جانوران است و سبب توقف فعالیت بیولوژیکی آنزیم کولین‌استراز شده و در نتیجه اختلال در سیستم عصبی مرکزی و مرگ آنها را به دنبال دارد (Farrell and Brauner, 2014). مکانیسم شناخته شده ارگانوفسفره‌ها مهار آنزیم استیل‌کولین‌استراز در پایانه‌های سیناپسی سمپاتیک و پاراسمپاتیک و در نتیجه، تجمع نوروترنسمیتر استیل‌کولین در سیناپس‌های عصبی و تحریک بیش از حد گیرنده‌های کولینرژیک نیکوتینی و موسکارینی است (Shadnia *et al.*, 1997; Civen *et al.*, 2005). اثرات مخرب ترکیبات ارگانوفسفره به این موارد محدود نمی‌شوند، بلکه تاثیرات غیرکولینرژیکی مانند آسیب به غشاهای سلول، تولید رادیکال آزاد و اختلال در سیستم آنتی‌اکسیدانی نیز مشاهده شده است (Zhang and Sultatos, 2005). یکی از مکانیسم‌هایی که بسیار مورد توجه قرار گرفته است، تولید رادیکال‌های آزاد توسط این ترکیبات و به دنبال آن تغییر در سیستم آنتی‌اکسیدانی سلول و پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء می‌باشد (Saulsbury *et al.*, 2009).

تحقیقات نشان داده حشره‌کش‌های ارگانوفسفره موجب افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) شده و رادیکال‌های اکسیژن فعال با پراکسیداسیون

## ۲.۲. آزمایش سمیت تحت حاد

به منظور انجام آزمایش سمیت تحت حاد، تعداد ۱۸۰ عدد ماهی در ۱۲ آکواریوم به حجم ۷۰ لیتر آب (هر آکواریوم ۱۵ عدد)، در سه گروه تیماری بر اساس غلظت‌های  $\frac{1}{5}$ ،  $\frac{1}{10}$  و  $\frac{1}{20}$  از  $LC_{50} = 0.516$  سم کلریپریفوس و یک گروه شاهد با سه تکرار به مدت ۲۱ روز صورت پذیرفت و پس از گذشت ۱، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز پس از مواجهه ماهی‌ها با سم، ۹ ماهی از هر تیمار (۳ ماهی از هر تکرار) به‌طور تصادفی صید و پس از بیهوشی با پودر گل میخک، خون‌گیری از آنها صورت گرفت. لوله‌های حاوی نمونه خون سریعاً به آزمایشگاه منتقل و پس از سانتریفوژ ۳۵۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه، سرم آنها جدا شد. سپس سرم خون به ویال‌های ۱ میلی‌لیتری منتقل و تا زمان آزمایش در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

## ۳.۲. اندازه‌گیری آنزیم‌های کبدی

آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز، آسپارات-آمینوترانسفراز با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون و طبق روش Reitman-Frankel در طول موج ۵۰۵ نانومتر و آلکالین فسفاتاز با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون و طبق روش DGKC (استاندارد انجمن بیوشیمی آلمان) و در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

## ۴.۲. اندازه‌گیری آنزیم‌های اکسیداتیو

آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز نیز با استفاده از کیت شرکت Zelbio و دستگاه ایزا در طول موج ۴۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شدند.

## ۵.۲. تجزیه و تحلیل آماری

با توجه به شرایط آزمایش که در زمان‌ها و غلظت‌های مختلف سم کلریپریفوس انجام گردید، برای مقایسه آنزیم‌ها از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. برای مقایسه بین تیمارهای مورد آزمایش نیز از آنالیز واریانس یک طرفه و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد در نرم‌افزار SPSS 16 انجام شد.

2011). بنابراین با توجه به مطالب ذکر شده هدف از مطالعه حاضر، بررسی سمیت تحت حاد کلریپریفوس بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو و آنزیم‌های کبدی نظیر ALT، AST و ALP در ماهی کپور معمولی می‌باشد.

## ۲. مواد و روش‌ها

در هر یک از مراحل آزمایش، ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) با میانگین وزنی  $45 \pm 10$  گرم از یک کارگاه تکثیر و پرورش خصوصی واقع در شهرستان ساری خریداری و به سالن آکواریم دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انتقال داده شد. پس از انتقال، ماهی‌ها جهت سازگاری با شرایط آزمایشگاهی (دما  $25 \pm 1^\circ C$ ، اکسیژن محلول  $mg/lit$  ۶/۰۸، سختی  $ppm$  ۳۹۳/۰۹، شوری  $ds/m$  ۰/۴ و  $pH$   $8 \pm 0/4$ ) به مدت ۷ روز در تانک‌های ونیرو با تعویض روزانه ۱۰ درصدی آب نگهداری شدند. در طی دوره سازگاری، ماهی‌ها با جیره غذایی پلت (شرکت بهدانه) به صورت دو بار در روز و به اندازه ۲٪ وزن بدن تغذیه شدند.

## ۱.۲. تعیین سمیت حاد

آزمایش تعیین سمیت حاد و مقدار عددی  $LC_{50}$  براساس روش استاندارد (OECD, 1992) و بصورت استاتیک انجام گرفت. به منظور تعیین  $LC_{50}$  96 سم کلریپریفوس بر روی بچه ماهی کپور، تیمار و تکرارهای مختلف در نظر گرفته شدند که بر اساس محاسبه لگاریتمی (رابطه ۱-۱) و تکرار مجدد آزمایشات، تیمارهای نهایی برای سم ۵ تیمار و یک شاهد بدست آمدند. سپس آزمایشات نهایی با غلظت‌های ۰/۳، ۰/۳۷، ۰/۴۳، ۰/۵۱ و ۰/۶ میلی‌گرم بر لیتر و گروه کنترل انجام شدند.

$$X = \frac{\log C_n - \log C_1}{n - 1} \quad \text{رابطه ۱-۱}$$

$C_1$  = غلظت در تیمار اول،  $C_n$  = غلظت در تیمار آخر،  $X$  = قدر نسبت لگاریتمی،  $C_2$  = غلظت در تیمار دوم ( $C_2 = \text{Antilog}(\text{Log}C_1 + X)$ )،  $C_3$  = غلظت در تیمار سوم ( $C_3 = \text{AntiLog}(\text{Log}C_2 + X)$ )

جدول ۱- تاثیرات غلظت‌های کلریپریفوس در زمان‌های مختلف بر آنزیم‌های کبدی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

میانگین فعالیت آنزیم (U/L)ALP	میانگین فعالیت آنزیم (U/L)AST	میانگین فعالیت آنزیم (U/L)ALT	روزهای آزمایش	تیمارهای تحت آزمایش
A <sub>1451/50±216/12a</sub>	A <sub>20/51±3/42a</sub>	A <sub>72/32±8/80b</sub>	۱	شاهد
A <sub>125/90±129/22a</sub>	A <sub>23/11±3/66a</sub>	A <sub>73/31±9/27a</sub>	۷	
A <sub>1314±225/18a</sub>	A <sub>21/56±2/74a</sub>	A <sub>80/50±11/36a</sub>	۱۴	
A <sub>1395/9±115/13a</sub>	A <sub>19/69±3/97a</sub>	A <sub>94/41±16/81a</sub>	۲۱	
A <sub>2833/7±287/99a</sub>	A <sub>22/5±4/09ab</sub>	A <sub>33/38±4/81a</sub>	۱	۰/۰۲ mg/l
A <sub>2513/8±669/28a</sub>	B <sub>45/01±6/17b</sub>	AB <sub>54/53±13/6a</sub>	۷	
A <sub>2271±356/23a</sub>	AB <sub>35/93±7/36a</sub>	BC <sub>71/47±11/59a</sub>	۱۴	
A <sub>1730/4±2162a</sub>	AB <sub>37/02±11ab</sub>	C <sub>97/65±24/31a</sub>	۲۱	
AB <sub>2970/1±1729/2a</sub>	A <sub>31/92±3/34bc</sub>	A <sub>37/62±6/96a</sub>	۱	۰/۰۵ mg/l
B <sub>6104/8±1668/2b</sub>	A <sub>46/69±6/83b</sub>	B <sub>66/23±11/26a</sub>	۷	
A <sub>2450/7±1057a</sub>	A <sub>51/84±13/53b</sub>	BC <sub>79/70±18/69a</sub>	۱۴	
A <sub>3023/1±855/99b</sub>	A <sub>47/49±17/84b</sub>	C <sub>102/5±15/31a</sub>	۲۱	
B <sub>5161/6±1922/7b</sub>	A <sub>36/26±9/28c</sub>	A <sub>36/69±6/49a</sub>	۱	۰/۱ mg/l
B <sub>3128/5±1912/52a</sub>	AB <sub>52/12±16/03b</sub>	B <sub>57/56±3/46a</sub>	۷	
A <sub>2046/6±618/34a</sub>	B <sub>63/84±5/58b</sub>	B <sub>72/91±8/57a</sub>	۱۴	
A <sub>23220/9±367/97ab</sub>	AB <sub>57/31±10/92b</sub>	C <sub>99/45±14/33a</sub>	۲۱	

(Mean ± SD) ❖

❖ حروف کوچک انگلیسی نشان‌دهنده وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار در یک روز نمونه‌برداری در غلظت‌های مختلف و حروف بزرگ انگلیسی نشان‌دهنده وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار در یک تیمار در روزهای مختلف می‌باشد.

### ۳. نتایج

نیز سبب افزایش فعالیت آنزیم AST و ALT در تیمارهای در معرض کلریپریفوس شده است.

بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش، میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز سرم ماهیان کپور معمولی در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف نشان داد که در روزهای اول و بیست و یکم بیشترین سطح فعالیت این آنزیم در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر و در روز چهاردهم در تیمار ۰/۰۲ میلی‌گرم بر لیتر و در روز هفتم در تیمار شاهد مشاهده گردید ( $P < 0.05$ ). بیشترین سطح فعالیت کاتالاز در روزهای اول و هفتم به ترتیب در تیمارهای ۰/۱ و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر و در روزهای چهاردهم و بیست و یکم در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). گذشت زمان سبب افزایش معنی‌داری در سطح سوپراکسید-دیسموتاز و کاتالاز در تیمارهای در معرض کلریپریفوس شده است. همچنین اثر متقابل زمان و غلظت بر روی فعالیت آنزیم‌های اسپاراتات آمینوترانسفراز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز مشاهده شده است ( $P < 0.05$ ).

بر اساس نتایج LC50 96h سم کلریپریفوس بر روی ماهیان کپور معمولی ۰/۵۱۶ میلی‌گرم بر لیتر محاسبه گردید. فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز سرم ماهیان کپور در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف نشان داد که در روزهای اول، هفتم و چهاردهم آزمایش بیشترین میزان این آنزیم در تیمار شاهد و در روز بیست و یکم در تیمار ۰/۰۵ مشاهده گردید ( $P < 0.05$ ). در هر چهار دوره نمونه‌برداری بیشترین سطح اسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) در تیمار ۰/۱ مشاهده شده است و بطور کلی با افزایش غلظت سم، سطح AST روند افزایشی داشته است ( $P < 0.05$ ). در روزهای هفتم، چهاردهم و بیست و یکم آزمایش بیشترین میزان آلکالین فسفاتاز در تیمار ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر و در روز اول در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شده است. در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر با گذشت زمان کاهش فعالیت این آنزیم مشاهده شده است ( $P < 0.05$ ). به علاوه افزایش مدت زمان آزمایش

جدول ۲- تاثیرات غلظت‌های متفاوت کلرپیریفوس در زمان‌های مختلف بر آنزیم‌های اکسیداتیو ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

میانگین فعالیت آنزیم (U/ml) CAT	میانگین فعالیت آنزیم (U/ml) SOD	روزهای آزمایش	تیمارهای تحت آزمایش
A <sub>18/99±0/93</sub> <sup>a</sup>	A <sub>12/23±0/11</sub> <sup>a</sup>	۱	شاهد
A <sub>17/35±2/01</sub> <sup>a</sup>	A <sub>12/87±0/30</sub> <sup>a</sup>	۷	
A <sub>16/87±1/59</sub> <sup>a</sup>	A <sub>12/57±0/44</sub> <sup>a</sup>	۱۴	
A <sub>17/3±0/65</sub> <sup>a</sup>	A <sub>12/70±0/48</sub> <sup>a</sup>	۲۱	
A <sub>19/91±0/57</sub> <sup>a</sup>	A <sub>12/46±1/02</sub> <sup>a</sup>	۱	۰/۰۲ mg/l
A <sub>18/14±1/39</sub> <sup>a</sup>	AB <sub>12/68±0/82</sub> <sup>a</sup>	۷	
A <sub>24/36±5/27</sub> <sup>ab</sup>	B <sub>14/28±0/85</sub> <sup>b</sup>	۱۴	
A <sub>22/97±4/45</sub> <sup>ab</sup>	C <sub>16/6±0/67</sub> <sup>b</sup>	۲۱	
A <sub>22/32±3/11</sub> <sup>a</sup>	A <sub>11/92±/71</sub> <sup>a</sup>	۱	۰/۰۵ mg/l
A <sub>23/14±4/78</sub> <sup>a</sup>	A <sub>12/07±1/94</sub> <sup>a</sup>	۷	
AB <sub>27/28±3/09</sub> <sup>b</sup>	A <sub>13/86±0/64</sub> <sup>b</sup>	۱۴	
B <sub>29/84±1/4</sub> <sup>b</sup>	B <sub>16/48±1/18</sub> <sup>b</sup>	۲۱	
A <sub>27/31±3/19</sub> <sup>b</sup>	A <sub>12/7±0/26</sub> <sup>a</sup>	۱	۰/۱ mg/l
A <sub>22/97±6/10</sub> <sup>a</sup>	A <sub>12/74±0/47</sub> <sup>a</sup>	۷	
A <sub>30/18±5/66</sub> <sup>b</sup>	A <sub>13/79±0/41</sub> <sup>b</sup>	۱۴	
B <sub>41/05±7/30</sub> <sup>c</sup>	B <sub>16/62±1/33</sub> <sup>b</sup>	۲۱	

❖ (Mean ± SD)

❖ حروف کوچک انگلیسی نشان‌دهنده وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار در یک روز نمونه‌برداری در غلظت‌های مختلف و حروف بزرگ انگلیسی نشان‌دهنده وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار در یک تیمار در روزهای مختلف می‌باشد.

نتایج حاضر با تحقیق آنها همسو نبود. در مطالعه Archana و همکاران (۲۰۱۱) مشاهده شده که افزایش غلظت متیل پاراتیون سطح کاتالاز در آبشش گوبی (*Poecilia reticulata*) را افزایش داده و سطح کلرپیریفوس در کبد و مغز بالا رفته و همچنین متیل پاراتیون و کلرپیریفوس سطح سوپراکسیددیسموتاز را در مغز و کبد افزایش داده است. در این راستا Ziki و همکاران (۲۰۰۱) نیز فعالیت سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز را در اریتروسیت‌ها و پلاسمای ماهی قرمز (*Carassius auratus gibelio*) در معرض کادمیوم بررسی کردند و نشان دادند که فعالیت سوپراکسید-دیسموتاز در سلول‌های قرمز خون در ابتدا روند کاهشی و سپس افزایشی داشت. همچنین فعالیت کاتالاز در اریتروسیت‌ها به تدریج افزایش یافت که یافته‌های حاضر با نتایج آنها مطابقت دارد. با توجه به نتایج این مطالعه احتمالاً تجویز کلرپیریفوس باعث افزایش رادیکال‌های آزاد سوپراکسید در سرم ماهی کپور معمولی شده و در نتیجه منجر به استرس اکسیداتیو می‌شوند. زیرا آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان یکی

## ۴. بحث و نتیجه گیری

### ۱.۰۴ آنزیم‌های اکسیداتیو

نتایج نشان داد که بین فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT، AST، ALT و ALP و سم کلرپیریفوس ارتباط معنی‌داری وجود دارد. تجویز این سم باعث افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های نامبرده در سرم ماهی کپور معمولی در مقایسه با گروه-های کنترل گردید. همچنین اثر متقابل غلظت و زمان در فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و AST مشاهده شده است. Oruç و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که مصرف کلرپیریفوس، فعالیت سوپراکسیددیسموتاز را در تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) افزایش داده ولی تغییری در فعالیت کاتالاز ایجاد نکرده که یافته-های حاضر از نظر افزایش فعالیت سوپراکسیددیسموتاز با نتایج این تحقیق مشابهت دارد. در مقابل در پژوهشی که توسط Wang و همکاران (۲۰۱۳) انجام شده بود فعالیت سوپراکسیددیسموتاز در طحال و کلیه قدامی کپور معمولی با افزایش غلظت سم کاهش یافته که

Banaee et al., 2008) و ماهی کپور معمولی (2013) و همچنین در پژوهشی که توسط Ali و همکاران (2014) انجام شده بود، نشان داد که تماس علف‌کش با قزل‌آلای رنگین‌کمان، افزایش فعالیت آنزیم‌های آسپاراتات‌آمینوترانسفراز و آلانین-آمینوترانسفراز باعث می‌شود.

از آنجایی که آفت‌کش‌ها در کبد جذب می‌شوند و ساخت و ساز تمام آنزیم‌ها مثل آلکالین فسفاتاز در داخل کبد صورت می‌گیرد، در نتیجه اندازه‌گیری فعالیت آلکالین فسفاتاز سرم به صورت عمومی می‌تواند به عنوان شاخصی برای عملکرد کبد در پاسخ به سموم، مورد استفاده قرار گیرد (Poet, 2003). آلکالین-فسفاتاز در کبد به وسیله سلول‌های پوششی و مجاری کوچک صفراوی تولید و در تمام بدن یافت می‌شود (Pagana, 1998). مقدار آلکالین فسفاتاز در بیماری‌های کبدی و استخوانی در سرم خون افزایش می‌یابد (Mohamadiha, 1998) که این افزایش احتمالاً ناشی از کولستاز و توقف ترشح اسیدهای صفراوی است (Mojabi, 2000). Jaroli و Sharma (2005) اعلام کردند که کلریپیریفوس در غلظت‌های 10، 20 و 30 درصد LC<sub>50</sub> در طی 15 روز سبب افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز در *Channa punctatus* شده بود که یافته‌های حاضر همسو با آن تحقیق می‌باشد. بر اساس گزارش Kaya و همکاران (2014)، فعالیت آلکالین-فسفاتاز ماهی کپور معمولی توسط فوزانول افزایش یافته بود که نتایج حاضر با یافته‌های آنها همخوانی دارد. Luscova و همکاران (2002) تاثیر دیازینون را بر ماهی کپور معمولی بررسی کرده و نشان دادند که فعالیت آلکالین فسفاتاز بدون تغییر باقی مانده است. همچنین افزایش فعالیت این آنزیم ناشی از سم دیازینون در مولدین نر ماهی سفید (*Rutilus kutum*) (Mohammadnezhad Shamoshaki et al., 2013) و کپور معمولی (Banaee et al., 2012) به اثبات رسیده است.

اختلاف نتایج تغییرات آنزیمی در مطالعات مختلف احتمالاً ناشی از اختلاف نژاد و گونه ماهی، وزن ماهی، مقدار و زمان مواجهه با ماده سمی، شرایط فیزیکی و شیمیایی آب می‌باشد. بعلاوه، میزان تاثیر سم در یک گونه از ماهی می‌تواند تحت تاثیر فاکتورهای مختلف فردی و محیطی قرار گیرد. در

از خطوط دفاعی مهم بدن در مقابله با استرس اکسیداتیو می‌باشند. در میان این آنزیم‌ها سوپراکسید-دیسموتاز و کاتالاز نقش مهمی در برداشت رادیکال‌های آزاد دارند و بطور هماهنگ عمل می‌کنند (Ceriello, 1996). هنگام بروز استرس اکسیداتیو، بدن می‌تواند با مکانیسم‌های مختلفی، از جمله افزایش بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و در نتیجه فعالیت آنزیم‌ها در بافت‌ها واکنش نشان دهد (Ceriello, 1996). مطالعات نشان داده است که افزایش میزان آنیون سوپراکسید و پراکسید هیدروژن در سلول‌ها به ترتیب باعث القای بیان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز می‌شود (Meilhac, 2010; Marrotte, 2010). آنزیم سوپراکسید دیسموتاز باعث تبدیل آنیون سوپراکسید به پراکسید هیدروژن می‌شود و کاتالاز با تبدیل کردن پراکسید هیدروژن به آب اثرات سمی آن را خنثی می‌کند (Turrens, 1984; Hsieh, 1998).

#### ۲.۴. آنزیم‌های کبدی

بین فعالیت آنزیم‌های ALT، AST و ALP و سم کلریپیریفوس ارتباط معنی‌داری وجود دارد. به طوری که تجویز این سم باعث افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های نامبرده در سرم ماهی کپور معمولی در مقایسه با گروه‌های کنترل شده است. در حالیکه اثر متقابل غلظت و زمان فقط در فعالیت آنزیم AST مشاهده شد.

آنزیم آسپاراتات‌آمینوترانسفراز (AST) و آلانین-آمینوترانسفراز (ALT) نقش مهمی در مراحل نهایی تجزیه پروتئین جهت تولید ATP ایفا می‌کند (Petrovic et al., 1996). به عبارت دیگر، افزایش سطح فعالیت این آنزیم‌ها، نقش موثری در استفاده از اسیدهای آمینه در فرآیند اکسیداسیون یا گلوکوزنز بازی می‌کند (Rao, 2006).

تماس ماهیان با سموم مختلف سبب افزایش فعالیت آنزیم آسپاراتات‌آمینوترانسفراز آنها می‌شود. به عنوان مثال می‌توان به افزایش این آنزیم ناشی از سم دیازینون در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (Banaee et al., 2012) (Mojabi et al., 2012) مولدین نر ماهی سفید (*Rutilus kutum*) (Mohammadnezhad Shamoshaki et al., 2013) و کپور معمولی (Banaee et al., 2012) اشاره کرد.

کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز که در مطالعه حاضر مشاهده شده، می‌تواند نوعی پاسخ دفاعی در مقابل استرس اکسیداتیو ایجاد شده در برابر سم باشد.

نهایت می‌توان عنوان نمود که افزایش سطح آنزیم‌های کبدی (ALP، ALT و AST) در سرم خون را به دلیل اثرات مخرب سم بر کبد و تخریب آن ذکر کرد. همچنین افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

## References

- Abbasnezhad, M., Jafari, M., Asgari, A., Hajihoseini, R., Hajigholamali, M., Salehi, M., 2009. The study regarding effect of paraoxon on oxidative stress index in kidney tissue of rats. *Journal of Mazandaran University of Medical Science* 19, 17-26.
- Ali, M., ghiasi, F., Badakhshan, M., 2014. Acute effects of combined herbicides (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) and (2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid) on blood factors and ALT and AST liver enzymes in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Iranian Journal of Health and Environment* 7, 95-104. (In Persian)
- Archana, A., Vimal, M., Priyanka, P., 2011. Effect of methyl parathion and chlorpyrifus on certain biomarkers in various tissues of guppy fish, *Poecilia reticulata*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 101, 132-141.
- Banaee, M., Mirvagefei, A.R., Rafei, G.R., MajaziAmiri, B., 2008. Effect of sub-lethal diazinon concentration on blood plasma biochemistry. *International Journal of Environmental Research* 2, 189-198.
- Banaee, M., Myrvagefy, A., Anthont sorda, G., Rafeie, Q., 2012. Change in blood biochemical parameters and Histopathology of the liver rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in contact with the Sublethal concentrations of diazinon. *Iranian journal of natural Resources* 65, 297-313. (In Persian)
- Bonilla, E., Hernandez, F., Corte, S.L., Mendoza, M., Mejla, J., Carrillo, E., 2008. Effects of the Insecticides Malathi and Diazinon on the Early Oogenesis in Mice in Vitro. *Environmental Toxicology* 23, 240-245.
- Ceriello, A., dello Russo, P., Amstad P., Cerutti, P., 1996. High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells in culture. Evidence linking hyperglycemia and oxidative stress. *Diabetology* 45, 471-7.
- Civen, M., Brown, C.B., Morin, R.J. 1977. Effects of organophosphate insecticides on adrenal cholesteryl ester and steroid metabolism. *Biochemical Pharmacology*, 26: 1901-1907.
- Farrell, A., Branner, C., 2014 *Organic chemical Toxicology of Fishes* Academic Press, Sandiego, USA, 543 p.
- Garfitt, S.J., Jones, K., Mason, H.J., Cocker, J., 2002. Exposure to the organophosphate diazinon: data from a humavolunteer study with oral and dermal doses. *Toxicology Letters* 134, 105-113.
- Haihua, w., Rui, Z., Jinyu, L., Yaping, G., Enbo, M., 2011. Effects of Malation and Chlorpyrifos on Acetylcholinesterase and antioxidant defense system in *Oxya Chinensis* (Thunberg). *Chemosphere* 83, 599-604.
- Hoffman, U., Papendrof, T., 2006. Organophosphate poisonings with parathion and diamethoate. *Intensive Care Medicine* 32, 464-468.
- Hsieh, Y., Guan, Y., T.U, C., Bratt, P.J., Angerhofer, A., Lepock, J.R., 1998. Probing the active site of human manganese superoxide dismutase: the role of glutamine 143. *Biochemistry* 37, 4731-4739.
- Jaroli, D.P., Sharma. B.L. 2005. Effect of Organophosphate Insecticide on the Organic Constituents in Liver of *Channa punctatus*. *Asian Journal. Exp. Science* 21, 121-129.
- Kaya, H., ŞanverÇelik, E., Yılmaz, S., Tulgar, A., Akbulut, M., Demir, N., 2014. Hematological, serum biochemical, and immunological responses in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to phosalone. *Comparative Clinical Pathology*, 89, 46-53.
- Khoshbavar rostami, H., Soltani, M., 2006. Study of some hematological and serum biochemical factors Beluga (*Huso huso*) after long-term exposure to the pesticide diazinon. *Journal of Fisheries of Iran* 5: 53-66.
- Luscova, V., Svoboda, M., Kolarova, J., 2002. The effect of diazinon on blood plasma biochemistry in Common carp (*Cyprinus carpio*). *Acta Veterinaria Brno* 71, 117-123.
- Marrotte, E.J., Chen, D.D., Hakim, J.S., Chen, A.F., 2010. Manganese superoxide dismutase expression in endothelial progenitor cells accelerates wound healing in diabetic mice. *Journal Clin Invest* 120, 4207-19.
- Meilhac, O., Zhou, M., Santanam, N., Parthasarathy, S., 2000. Lipid peroxides induce expression of catalase in cultured vascular cells. *Journal Lipid Research* 41, 1205-1213.
- Mohamadiha, H., 1998. *Clinical biochemistry*. Tehran University Press, second edition, 826 p.
- Mohammadnezhad shamoshaky, M., Sultani, M., Sharif pour, A., Emanpour, M., 2012. The effect of acute organophosphate of diazinon on activity of some enzymes in the blood serum of adult males (*Rutilus frisii kutum*). *Veterinary Journal* 8, 96-97. (In Persian)
- Mojabi, A. 2000). *Veterinary clinical biochemistry*. Nourbakhsh Publication. Tehran, Iran.
- Oruc, E.O., Usta, D., 2007. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. *Environment Toxicology Pharmacology* 23, 48-55.

- Oruç, E.O., 2010. Oxidative stress, steroid hormone concentrations and acetylcholinesterase activity in *Oreochromis niloticus* exposed to chlorpyrifos. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 96: 160-166.
- Pagana, A., Deska, K., 1998. Mosby's Manual of Diagnostic and Laboratory Tests. Saint Louis: Mosby, Inc. 1166 p.
- Peter, J.V., Cherian, A.M., 2000. Organic insecticides. *AnaesthInte Care* 28, 11-21.
- Petrovic, S., Ozretic, B., Krajnovic-Ozretic, M. 1996. Cytosolic aspartate aminotransferase from grey mullet (*Mugil auratus risso*) red muscle: Isolation and properties. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 28, 873-881.
- Poet, T.S., Wu H., Kousba, A.A., Timchalk C. 2003. In vitro rat hepatic and intestinal metabolism of the organophosphate pesticides Chlorpyrifos and diazinon. *Toxicology Science*, 72, 193-200.
- Purgholam, R., Esmaili, F., Farhumand, L., Soltani, M., Yousefi, P., Mehdad, H., 2001. Evaluation of blood characteristics of grass carp (*Ctenopharygondon idella*) after exposure to organophosphate diazinon. *Journal of Fisheries of Iran* 2, 1-18.
- Rao, J.V., 2006. Toxic effects of novel organophosphorus insecticide (RPR-V) on certain biochemical parameters of euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 86, 78-84.
- Rauen, U., Polzar, B., Stephan, H., Mannherz, G., De Groot, H., 1999. Cold induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *Federation of American Societies for Experimental Biology* 13: 155-168.
- Salehi, M., Jafari, M., Asgari, A., SalehMoghaddam, M., Salimian, M., Abbasnejad, M., 2010. Study of Diazinon Effect on Antioxidant Enzymes and Lipid Peroxidation in Rat's Brain. *Razi Journal Medical Sciences* 17, 15-23. (In Persian)
- Saulsbury, M.D., Heyliger, S.O., Wang, K., Johnson D.J., 2009. Chlorpyrifos induces oxidative stress in oligodendrocyte progenitor cells. *Toxicology* 259: 1- 9.
- Shadnia, S.H., Azizi, E., Hosseini, R., Khoei, S., Fouladdel, S.H., Pajoumand, A., 2005. Evaluation of oxidative stress and genotoxicity in organophosphorus insecticide formulators. *Human and Experimental Toxicology* 24: 439- 445.
- Turrens, J.F., Crapo, J.D., and Freeman, B.A., 1984. Protection against oxygen toxicity by intravenous injection of liposome-entrapped catalase and superoxide dismutase. *J Clin. Invest* 73. 87-95.
- USEPA., 1993. Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. 4rd Ed. Environmental Protection Agency, Environmental Monitoring and Support Laboratory, Cincinnati, OH. EPA, 273 p.
- Wang, X., Houjuan, X., Yan, J., Hongda, W., Gang, S., Qiyu, X., Shiwen, X., 2013. Accumulation, histopathological effects and response of biochemical markers in the spleens and head kidneys of common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos. *Food and Chemical Toxicology* 62:148-158.
- Zhang, H.X., Sultatos L.G., 2005. Biotransformation of the organophosphorus insecticides parathion and methyl effects of black tea extract. *Clinica Chimical Acta* 358: 131-138.
- Zikic, R.V., Stajn, A.S., Pavlovic, S.Z., Ognjanovic, B.I., and Saicic, Z.S., 2001. Activities of Superoxide Dismutase and Catalase in Erythrocytes and Plasma Transaminases of Goldfish (*Carassius auratus gibelio* bloch.) Exposed to Cadmium. *Physiology Research* 50, 105-111.