تأثيرات ۳ ـ متيل كلانترن بر فعاليت اكسيدازهاي چندعملكردي ميكروزومي كبد ماهي قره برون (*Acipenser persicus*)

كتايون كريم زاده[۱]، علي مصطفايي[۲]، عباس اسماعيلي ساري[۳]*، محمد پوركاظمي[٤]، عسگر زحمتكش[٥]

۱- دانشجوي دكتراي بيولوژي دريا, واحد علوم وتحقيقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامي، تهران، ايران
۲- استاديار، مركز تحقيقات بيولوژي پزشكي، دانشگاه علوم پزشكي كرمانشاه، كرمانشاه، ايران
۳- دانشيار، گروه محيط زيست، دانشكده منابع طبيعي و علوم دريايي، دانشگاه تربيت مدرس, نور، ايران
٤- دانشيار، انستيتو بين المللي ماهيان خاوياري، رشت، ايران
٥- دانشجوي دكتري شيلات، دانشكده منابع طبيعي و علوم دريايي، دانشگاه تربيت مدرس، نور، ايران

چكيده

سيستم اكسيداز چند عملكردي وابسته به سيتوكروم P٤٥٠ ميكروزومي مسؤول بيوترانسفورماسيون مواد شيميايي در مرحله اول سوخت و ساز (متابوليسم) است. در پژوهش حاضر تأثيرات ماده ۳ـ متيل كلانترن در القاي فعاليت آنزيمهاي سيستم چند عملكردي در ماهي قره برون بررسي شد.

ماده ۳ ـ متيل كلانترن به صورت داخل صفاقي طي دو دوز۲۰ و ٤۰mg/kg وزن بدن در۳ روزمتوالي به ماهيان تزريق شد. در ماهيان تيمار شده با اين تركيب، در ميزان فعاليت آنزيمهاي آنيلن ٤ـ هيدروكسيلاز و NADPH ـ سيتوكروم C ردوكتاز تغييرات معناداري مشاهده نشد. اما در ميزان فعاليت واكنش دي اتيلاسيون سوبسترای ۷ ـ اتوكسي رزروفين، افزايشي حدود ۲۰ تا ۲۵ برابر در ماهيان تيمارشده مشاهده شد ($P<0/05$). ميزان فعاليت واكنش دي اتيلاسيون سوبسترای ۷ ـ اتوكسي رزروفين نيز در حضور مقادير مختلف از سوبسترا و ميكروزوم، در زمانها و دماهای متفاوت بررسي گرديد.

الگوی SDS -PAGE جدا شده ميكروزومي در ماهيان تيمار شده پروتييني در موقعيت ۵۸±1kD را نشان می‌دهد كه نمايانگر ايزوآنزيم سيتوكروم P٤٥۰1A است. تأثيرات القايي ۳ ـ متيل كلانترن به القای ژن ايزوآنزيم سيتوكروم P٤٥۰1A و افزايش بيوسنتز آن منجر می‌شود.

كليدواژگان: سيستم اكسيداز چند عملكردي، اتوكسي رزوروفين دي اتيلاز، سيتوكروم P٤٥۰1A و ماهي قره‌برون *Acipenser persicus*

۱- مقدمه

سيتوكروم P٤٥۰ متعلق به خانواده بزرگي از آنزيمهای اكسيژناز چند عملكردي است كه مرحله اول تغيير شكل (بيوترانسفورماسيون) زنوبيوتيكها را بر عهده دارد. اين دسته از آنزيمها قادرند در متابوليسم اكسايشي طيف وسيعي از سوبستراها، مانند داروها و

* نويسندۀ مسؤول مقاله: تلفن: ۳-۰۱۲۲٦۲٥۳۱۰۱، E-mail: abbasesmaili sari@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

آلاینده‌های شیمیایی و نیز ترکیبات آندوژن مانند استروییدها، اسیدهای چرب و پروستاگلاندینها شرکت کنند[۱].

با توجه به وابستگی تکاملی و تشابه در توالی اسیدهای آمینه، تاکنون تعداد بسیاری از ایزوآنزیمهای سیتوکروم P۴۵۰ شناخته شدند[۲]. یکی از زیر خانواده‌های این آنزیم که دارای اهمیت زیادی است، سیتوکروم P۴۵۰۱A است. این آنزیم در بیوترانسفورماسیون (تغییرات بیوشیمیایی) زنوبیوتیکها مانند دی اکسینها، فورانها، دی فینلهای چند کلره و هیدروکربنهای آروماتیک چند حلقه‌ای نقش مهمی دارند [۳، ۴]. این ایزوآنزیم از ویژگی القاپذیری زیادی نسبت به آلاینده‌های شیمیایی برخوردار است، القا پذیری آن در ماهیان نیز مشاهده شده است[۲].

براساس تحقیقات انجام شده طی ۲۰ سال اخیر، میزان آنزیم سیتو کروم P۴۵۰۱A در ماهیان مناطق آلوده نسبت به مناطق غیرآلوده افزایش یافته است. این پدیده می‌تواند بیانگر قابلیت القاپذیری این آنزیم باشد[۵]. بنابراین امروزه از قابلیت القاپذیری سیتوکروم P۴۵۰۱A در ماهیان به وسیله ترکیبات زنوبیوتیک و نیز فعالیت آنزیمهای وابسته به آن، آریل هیدروکربن هیدرولاز و ۷- اتوکسی رزروفین ـ دی‌اتیلاز (EROD)، برای نظارت پیوسته زیستی آلاینده‌های زیست محیطی استفاده می‌شود[۶،۲]. القای فعالیتهای سیستم اکسیدازهای چند عملکردی میکروزومی در پاسخ به تیمار با ترکیبات آروماتیک چند حلقه‌ای نیز در ماهیان مشاهده شده است. در ماهی اسکیت (*Raja erinacea*) تیمار با ترکیب ۳- متیل کلانترن افزایش حدود ۱۸-۱۵ برابر در فعالیت بنزوآپایرن هیدرولاز وابسته به سیستم مونواکسیژنازی منجر گردید[۵]. افزایش حدود ۵-۳ برابر در فعالیتEROD در پاسخ به تیمار با ترکیب بنزوآپایرن نیز در ماهی سیم دریا (*Sparrus aurata*) گزارش شده است[۵].

۳- متیل کلانترن به ترکیبات آروماتیک چند حلقه‌ای (PAHs) تعلق دارد. این دسته از ترکیبات در موجودات زنده باعث بروز جهش و سرطان می‌شوند. سیستم مونواکسیژنازی سیتوکروم P۴۵۰، اولین سیستم آنزیمی مداخله کننده در متابولیسم این قبیل ترکیبات شناخته شده است[۴]. این سیستم در مقابل آلاینده‌های شیمیایی عکس‌العمل نشان می‌دهد و میزان پاسخ به وسیله فعالیت آنزیمهای وابسته به سیستم مونواکسیژنازی سیتوکروم P۴۵۰ اندازه‌گیری می‌شود؛ بنابراین، سنجش فعالیت سیستم آنزیمی مذکور با استفاده از روش EROD منعکس کننده وضعیت آلاینده‌های آلی در اکوسیستمهای آبی به شمار می رود.

ماهیان خاویاری از گونه‌های حساس و با ارزش از نظر اقتصادی به شمار می‌روند که امروزه ذخایر طبیعی آنها در معرض خطر جدی با آلاینده‌های شیمیایی است[۷]. شایان ذکر است بررسی مکانیسمهای متابولیسم سموم در این ماهیان دارای جایگاه خاصی است. بنابراین تحقیق حاضر به منظور بررسی رابطه میان آلاینده‌های نفتی مانند ماده ۳- متیل کلانترن با میزان فعالیت آنزیمهای سیستم چندعملکردی وابسته به سیتوکروم P۴۵۰ در ماهی قره برون انجام شد.

۲- مواد و روش‌کار

۲-۱- نمونه‌های ماهی

نمونه‌های ماهی قره برون در محدوده وزنی ۶۰۰-۹۰۰g با سن حدود دو سال از مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی استان گیلان در بهار ۱۳۸۱ تهیه شد.

۲-۲- آزمایشهای شیمیایی

تمام آزمایشهای شیمیایی بجز تیمار ماهیان در مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه انجام شد. مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکتهای مرک[1]، سیگما[2]، فارماسیا[3] و بیوسنس[4] تهیه گردید.

1. Merck
2. Sigma
3. Pharmacia
4. Biosence

Archive of SID
www.SID.ir

۲-۲-۱- تيمار ماهيان با ۳- متيل كلانترن

تعداد ۱۸ ماهی در ۳ گروه ٦ تايی (يک گروه کنترل و دو گروه آزمون) تقسيم شدند. ماهيان طی ٢٤ ساعت تغذيه نشدند. ۳- متيل کلانترن در غلظت ۲۰ و٤٠mg/mL در روغن ذرت تهيه شد, سپس به ۲ گروه آزمون بترتيب ۲۰ و٤٠mg/kg وزن ماهی طی سه روز از ۳- متيل کلانترن در روغن ذرت به صورت درون صفاقی تزريق گرديد. گروه کنترل به ازای هر کيلوگرم وزن ماهی همان حجم (۱mL به ازای هر کيلو گرم) روغن ذرت دريافت کردند[۸].

۲-۲-۲- تهيه فراکسيون ميکروزومي کبد

پس ازسپری شدن ٤٨ ساعت از آخرين تزريق، کبد ماهيان (تيمار شده وکنترل) خارج گرديد؛ سپس به وسيله ازت مايع به مرکز تحقيقات بيولوژی پزشکی کرمانشاه منتقل و در همان دما تا زمان آزمايش نگهداری شدند (در اين وضعيت امکان استفاده از کبد ماهيان برای سنجش اين آنزيم به مدت ۷ ماه وجود دارد). برای تهيه جدا شدن ميکروزمی، بافت منجمد شده در بافرفسفات سديم pH ۰/۱M برابر ۷/٤ حاوی کلريد پتاسيم۱/۵۱٪ (حجمی/ وزنی)، فنيل ميتل سولفونيل فلوراياد (PMSF) و آمينوکاپروييک اسيد۰/۲۵mm به کمک هاون در دمای ۰ -٤°C هموژن و يکنواخت گرديد. عصاره حاصل۲۰ در ۱۱۰۰۰xg در دمای ٤°C به وسيله دستگاه گريز از مرکز با دور بالا (مدل سيگما) جداسازی شد. رسوب حاصل از اين مرحله دوباره در بافر فسفات به تعليق در آمد و در همان وضعيت رسوب داده شد. آنگاه رسوب در حجم کمی از بافر به تعليق در آمد[۸].

۲-۲-۳- تعيين غلظت پروتيين

به منظور تعيين غلظت پروتيين نمونه‌های ميکروزومی، از روش لوری[1] [۹] استفاده شد. در اين روش از آلبومين سرم گاوی (BSA) در دامنه غلظت ۲۵ -۳۰۰µg/mL برای رسم منحنی استاندارد استفاده گرديد.

۲-۲-٤- سنجش فعاليتNADPHـ سيتوکروميC ردوکتاز

ميزان فعاليت آنزيم NADPH ـ سيتوکروم C ردوکتاز طبق روش ماسترز[2] و همکاران [۱۰] تعيين شد. محلول واکنش در حجم نهايی ۳mL از بافرتريس ۰/۱M با pH برابر ۷/۵ حاوی ۰/۱mM سيتوکروم C، ۲۰۰µL جدا شده ميکروزومی (با غلظت پروتيين مشابه در گروههای آزمون و کنترل) بود. ميزان جذب در طول موج ۵۵۰nm در مدت ۱ تا ۲ دقيقه به وسيله اسپکتروفتومتر (مدل کانترون) اندازه‌گيری شد. ضريب خاموشی سيتوکروم C برابر ۱۹/۱ m/M.Cm می‌باشد.

۲-۲-۵- سنجش فعاليت آنيلين ٤- هيدروکسيلاز

ميزان فعاليت آنزيم آنيلين ٤- هيدروکسيلاز در ميکروزومهای کبدی ماهی قره برون براساس روش ايمايی[3][۱۱] انجام شد. مخلوط واکنش شامل بافر تريس- اسيد کلردريک با pH برابر ۷/۵ حاوی آنيلين هيدروکلراید ۵mM، هيدروکسيد کومن ۳۰mM و۰/۳µL تری کلرو اسيد استيک بود. پس از جداسازی، ۱mL کربنات سديم و۱mL محلول فنلی به مايع رويی حاصل از جداسازی افزوده گرديد و ميزان جذب در طول موج ٦۳۰nm ثبت شد. در اين روش ميزان فعاليت آنزيم از مقدار پارا آمينو فنل توليد شده اندازه‌گيری گرديد.

۲-۲-٦- سنجش فعاليت سيتوکروم P٤٥٠١A با روش فلورومتري

فعاليت آنزيم سيتوکروم P٤٥٠١A از واکنش دی اتيلاسيون سوبسترای ۷- اتوکسی رزوفين طبق روش بورک[4] و همکاران [۱۲] با کمی تغييرات تعيين شد. محلول واکنش در حجم

1. Lowry

2. Masters and *et al*
3. Imai
4. Burke and *et al*

Archive of SID
www.SID.ir

نهایی ۲mL با فرتریس ۰/۱M با pH برابر ۷/۸ حاوی اتوکسی رزروفین ۰/۷٦μM، ۰/۲٤mM NADPH، ۵۰μL جدا شده میکروزومی (با غلظت پروتیین مشابه در گروههای آزمون و کنترل) بود. میزان فلورسانس نسبی در طول موج برانگیختگی ۵۳۰nM و نشر ۵۸٦nM به وسیله دستگاه فلوریمتر (مدل کانترن Bio-TEK) اندازه‌گیری و مقادیر فعالیت آنزیم بر حسب mol/mg پروتیین میکروزومی محاسبه شد.

۲-۲-۷- الکتروفورز در ژل پلی‌اکریل آمید SDS - PAGE

الکتروفورز پروتیین براساس روش لاملی[1] [۱۳] صورت گرفت. پس از الکتروفورز پروتیینهای میکروزومی، رنگ آمیزی ژل باکوماسی ۳۵۰ - R انجام شد. مارکرهای وزنی مورد استفاده شامل مارکرهایی با وزن مولکولی پایین (فارماسیا) در محدوده وزنی ۱٤– ۹٦kD بود.

۲-۲-۸- روش آماري

تجزیه و تحلیل داده‌ها براساس نرم افزارهای Excel و SPSS انجام شد. بنابراین برای مقایسه میانگین ۲ تیمار از آزمون t و برای مقایسه کلی میانگین چند تیمار از روش آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شد. مقایسه میانگین هر تیمار با میانگین تیمارهای دیگر به کمک آزمون چندگانه دانکن صورت پذیرفت. وجود یا نبود اختلاف معنادار میان میانگینها در سطح اطمینان ٪۹۵ (P<۰/۰۵) تعیین گردید.

۳- نتایج

سیتوکروم PA501A از اکسیژنازهای چند عملکردی است که به وسیله انواعی از آلاینده‌های زیست محیطی القا می‌شود. در این مطالعه تیمار ماهی قره برون با یک و دو دوز از ماده ۳- متیل کلانترن (۲۰ و۴۰mg به ازای هر کیلوگرم وزن) فعالیت این آنزیم را بترتیب حدود ۲۰ و ۲۵ برابر گروه کنترل افزایش داد (نمودار۱). براساس بررسیهای آماری میانگین رزروفین تولید شده در قره برون کنترل ۱/۱٦pMol/mg پروتیین در دقیقه و میانگین رزروفین تولید شده قره‌برونهای تیمار شده با یک و دو دوز متوالی از ۳–متیل کلانترن بترتیب ۱۹/۸۲ و۲٤/٦۸pMol/mg پروتیین در دقیقه به دست آمد. براساس آزمونهای آماری اختلاف معناداری بین میانگینهای نمونه‌های تیمار شده با نمونه کنترل وجود دارد (P<۰/۰۵).

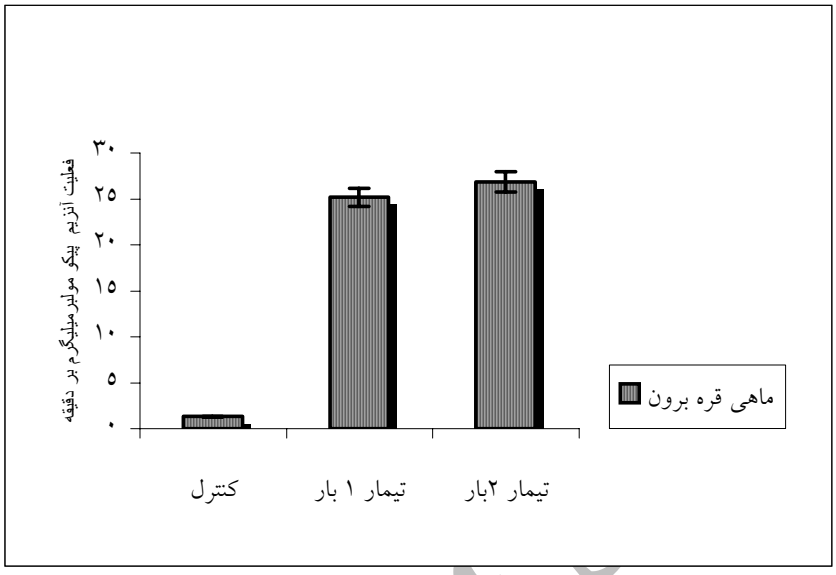
مقایسه الگوی پروتیینی جدا شده میکروزومی ماهیان تیمار شده و کنترل با روش SDS-PAGE بیانگر تفاوتهای قابل توجه در نوع و مقدار پروتیینهای فراکسیون میکروزمی بود (شکل ۱). با توجه به شکل، چندین باند پروتیینی در گروه آزمون شدت رنگ پذیری بیشتری نسبت به گروه کنترل دارد. این تفاوت به خصوص در مورد پروتیینهای موجود در موقعیتهای وزنی ٥٦–۵۸kD قابل توجه است.

رابطه میزان دی اتیلاسیون سوبسترای ۷– اتوکسی رزروفین (EROD) به وسیله آنزیم سیتوکروم P٤٥٠A نسبت به زمان در نمودار ۲ آمده است. نظر به داده‌های به دست آمده در مورد ماهی قره برون، بیشترین میزان فعالیت آنزیم در مدت زمان ۳۰ دقیقه می‌باشد. با توجه به نمودار، افزایش فعالیت تا ۲۰ دقیقه اول به صورت خطی بوده و بتدریج از حالت خطی خارج شد.

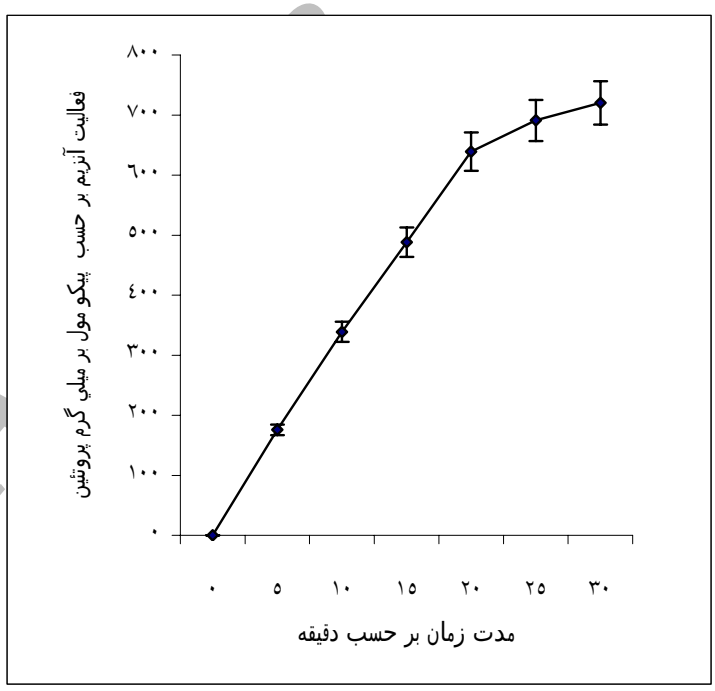
نمودار۳ نتایج تأثیر دما بر میزان فعالیت آنزیم در واکنش EROD در ماهی قره برون را نشان می‌دهد. میزان فعالیت آنزیم با افزایش دما زیاد می‌شود به طوری که در دمای ۲۵°C به بیشترین مقدار خود می‌رسد. بررسی آماری انجام شده نیز نشان دهندهٔ اختلاف معنادار بین میزان فعالیت آنزیم در دمای ۲۵°C با دیگر دماهای شرایط آزمایش است (P<۰/۰۵).

1. Laemmli

Archive of SID
www.SID.ir

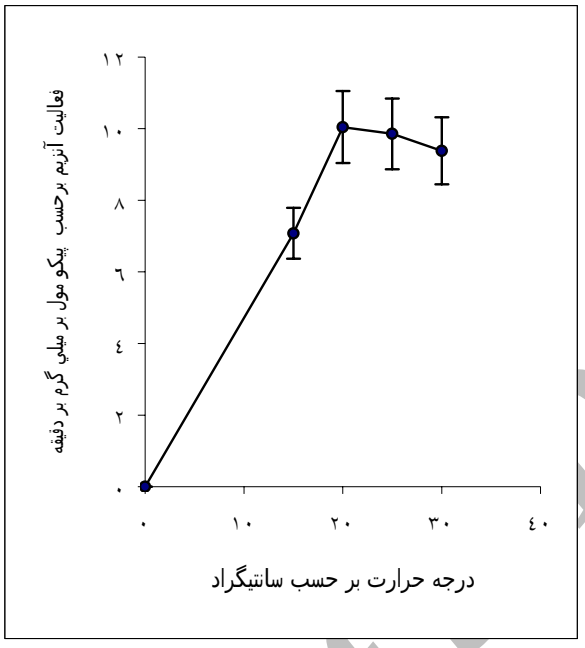


نمودار۱ تأثیر دوزهای مختلف از ماده ۳- متیل کلانترن بر فعالیت آنزیم سیتوکروم P۴۵۰۱A در ماهی قره برون

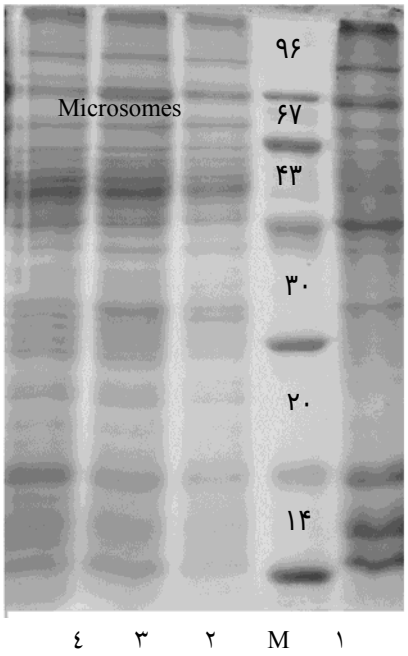


نمودار۲ تأثیر مدت زمان بر فعالیت آنزیم سیتوکروم P۴۵۰۱A در واکنش EROD

www.SID.ir



نمودار۳ تأثیر درجه حرارت بر فعالیت آنزیم سیتوکروم P٤٥۰۱A در واکنش EROD



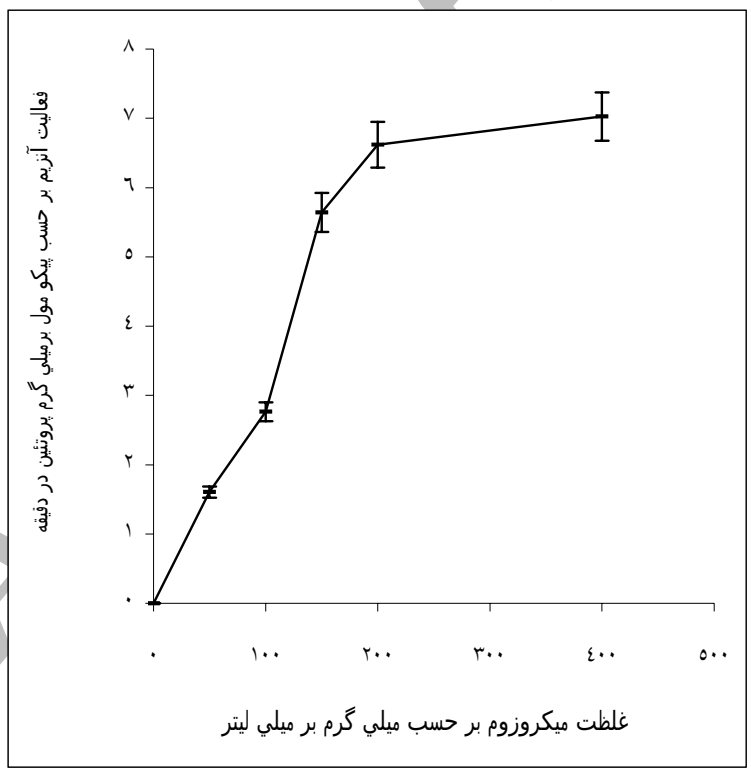
شکل۱ SDS-PAGE فراکسیون میکروزومی ماهی قره برون میکروزوم نمونه‌های تیمار نشده (ستون۱)، نمونه‌های ۱ بار تزریق (ستون۲)، نمونه‌های ۲ بار تزریق (ستونهای ۳و٤)،مارکرهای وزنی (ستون M) با وزنهای مولکولی ١٤، ۲۰، ۳۰، ٤۳، ٦۷، ۹٦kD است.

Archive of SID
www.SID.ir

براساس نتایج تأثیر غلظتهای مختلف پروتیینهای میکروزومی بر میزان فعالیت این آنزیم، با افزایش غلظت میکروزوم، میزان فعالیت آنزیم نیز زیاد می‌شود. اگرچه در غلظت ٤٠٠µg از پروتیین میکروزومی فعالیت آنزیم به حداکثر می‌رسد، اما با توجه به داده‌های آماری در غلظتهای میکروزومی ۲۰۰ و µg ٤٠٠, اختلاف معناداری بین مقادیر رزروفین تولید شده وجود ندارد (P<۰/۰۵) (نمودار٤).

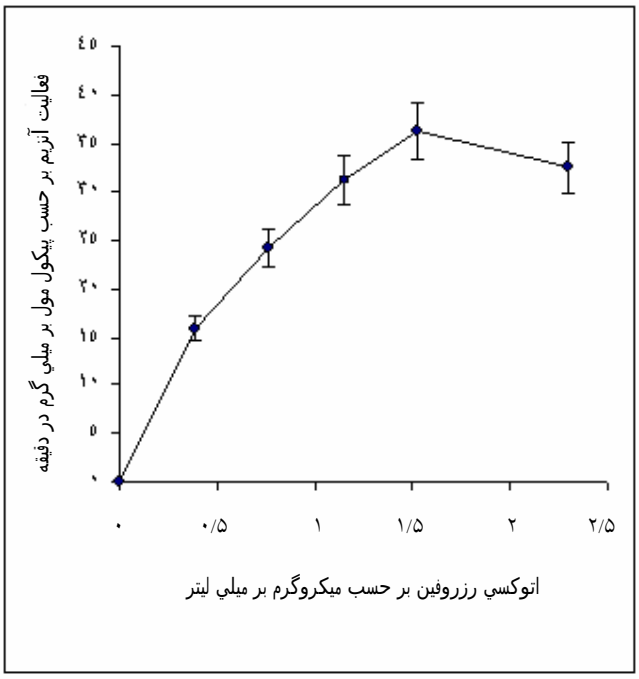
نتایج حاصل از تأثیر غلظتهای مختلف سوبسترای ۷- اتوکسی رزروفین بر فعالیت آنزیم سیتوکروم P٤٥٠١A در ماهی قره برون در نمودار ۵ آمده است. این نمودار نشان می‌دهد با افزایش غلظت سوبسترا، میزان فعالیت آنزیم در واکنش EROD افزایش پیدا می‌کند و حداکثر فعالیت آنزیم در غلظت ۱/۵۳µM مشاهده می‌شود که داده‌های آماری نیز بیانگر این موضوع است (P<۰/۰۵).

نتایج اندازه‌گیری فعالیت آنزیمهای NADPH- سیتوکروم C ردوکتاز وآنیلین ٤-هیدرکسیلاز میکروزومهای کبدی ماهی قره برون در دو وضعیت کنترل و تیمار شده در جدول ۱ آمده است. با توجه به نتایج، اختلاف معناداری در میزان فعالیت این دو آنزیم در دو وضعیت مذکور مشاهده نمی‌شود (P<۰/۰۵).



نمودار٤ تأثیر غلظت پروتئین میکروزوم بر فعالیت آنزیم سیتوکروم P٤٥٠١A درواکنش EROD

www.SID.ir



نمودار۵ تأثير غلظت اتوكسي رزروفين بر فعاليت آنزيم سيتوكروم P٤٥٠١A درواكنش EROD

جدول۱ مقادير فعاليت آنزيمهاي اكسيداز چند عملكردي ميكروزومي كبد ماهي قره برون در شرايط كنترل و تيمار شده با تركيب ۳-MC

آنزيمها يا اكسيداز چند عملكردي	كنترل	تيمار با ۳-MC
آنيلين ٤-هيدروكسيلاز	۰/۰۱۹ ±۰/۰۰۳	۰/۰۲±۰/۰۰٤
NADPH-سيتوكروم P٤٥٠ ردكتاز	۲۳/۳ ۲±/۳٤	۲٦/۱ ±۳/۱۲
فعاليت EROD	۱/۳۰ ± ۰/۰۹	۲۵/۲۱± ۰/۱۳

٤- بحث

مطالعات انجام شده تاكنون نشان می‌هد كه ماهيان به تركيبات القا كننده سيتوكروم P٤٥٠١A مانند ۳- متيل كلانترن وبتانفتوفلاون پاسخ می‌دهند. اين پاسخ به افزايش ميزان اين آنزيم منجر می‌شود [۱] در مطالعه حاضر تيمار ماهی قره برون با ۳- متيل كلانترن باعث القا فعاليتEROD در ميكروزومهای كبدی گرديد.

در اين پژوهش القای آنزيم سيتوكروم P٤٥٠١ A۱ ماهی قره برون به وسيله تركيب ۳- متيل كلانترن بتانفتوفلاون انجام شد. فعاليت، ميزان نسبی و بعضی خصوصيات كينتيكی آنزيم القا شده با روشهای مربوط بررسی گرديد. براساس نتايج اين مطالعه، تزريق يک دوز ۳- متيل كلانترن به ماهی فعاليت دی‌اتيلاسيون سوبسترای ۷- اتوكسی رزوروفين (7-EROD) را حدود ۲۰ بار و تزريق دو دوز اين فعاليت را ۲۵ بار افزايش می‌دهد. تحقيقات انجام شده روی ديگر ماهيان، القاپذيری فعاليت آنزيم را نشان می‌دهد. استگمن[1] و همكاران نيز در ماهيان تيمار شده

1. Stegeman and *et.al.*

Archive of SID
www.SID.ir

(گونه‌های: *Kyphosus Petronrtopan cruentatus*, *secatris*) با ماده بتا نفتوفلاون با دوزهای ۵۰–۱۰۰mg/kg وزن بدن ماهیان، افزایشی حدود ۵۵–۲۵ بار در فعالیت EROD در ماهیان منطقه برمودا مشاهده کردند[۸]. عامل القاپذیری فعالیت دی‌اتیلاسیون سوبسترای ۷– اتوکسی رزروفین برای مواد القا کننده ۳– متیل کلانترن در کپور ماهیان *Cyprinus* (*carpio*) وبنزو آپایرن در گونه *Sparus aurata* بترتیب با دوزهای ۲۵ و ۳۰mg/kg وزن بدن برابر با ۵ و ۱۰/۳ بار گزارش شده است[۵، ۱۳].

سیتوکروم P۴۵۰۱A ماهی قره‌برون پروتیینی با وزن ۵۸±1kD است که مقدار این پروتیین در جدا شده میکروزومی کبد گروههای آزمون بارها بیش از مقدار آن در گروه کنترل بود (شکل۱). البته مطالعات انجام گرفته روی دیگر گونه‌های ماهیان, القای این آنزیم را در محدوده وزنی مشابه تأیید می‌کند. برای مثال، القای پروتیینی با وزن حدود ۵۸kD بترتیب در ماهیان اسکاپ(*Stenotomus chrtsops*) و قزل‌الای رنگین کمان (*Onchorhynchous mykiss*) با بتا نفتوفلاون و در ماهی سیم دریا (*Sparrus aurata*) با بنزو آپایرن گزارش شده است [٤، ٦، ١٤، ١٥]. نتایج سنجش EROD در گروههای آزمون با الگوی SDS-PAGE آنها در این مطالعه نشان می‌دهد که افزایش فعالیت سیتوکروم P۴۵۰۱A در ماهیان القا شده ناشی از افزایش بیان ژن و بیوسنتز این ایزوآنزیم است. در ضمن نتایج SDS-PAGE فراکسیون میکروزومی ماهیان القا شده بیانگر افزایش بیوسنتز چندین پروتیین دیگر غیر از سیتوکروم P۴۵۰۱A سلولهای کبدی است.

بررسی برخی جنبه‌های کینتیکی آنزیم سیتوکروم P۴۵۰۱A فراکسیون میکروزومی کبد ماهی قره‌برون در این مطالعه نشان داد که میزان فعالیت آنزیم در محدوده دمای ۲۰–۲۵°C نسبت به دماهای دیگر بالاتر است. در ضمن، فعالیت آنزیم در شرایط مذکور شده (مواد وروشها) در غلظت ۱/۵۳µM سوبسترای ۷– اتوکسی رزروفین و غلظت ۱۵۰µg پروتیین میکروزومی به حداکثر خود می‌رسد و در غلظتهای بالاتر سوبسترا کاهش می‌یابد. این موضوع بیانگر اثر مهاری سوبسترای اتوکسی رزروفین بر فعالیت آنزیم است که در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است [۸،۱۳ ۵]. مطالعه سیستم آنزیمی سیتوکروم P۴۵۰۱A در ماهی قره برون نشان داد که فعالیت EROD در نمونه‌های تیمار شده دارای قابلیت القاپذیری است. بنابراین می‌توان از روش سنجش فعالیتEROD به عنوان یک بیومارکر در ارزیابی آثار آلاینده‌های آلی بر محیطهای زیست دریایی در برنامه‌های مونیتورینگ آلاینده‌ها استفاده کرد. پژوهش حاضر می‌تواند زمینه ساز ادامه و تکمیل مطالعات بعدی درخصوص کاربرد بیومارکرها و موارد مشابه با آن باشد.

۵- منابع

[1] Addison R. F.; "The use of biological effects monintoring in studies of marine pollution"; *Environ. Rev.;* 1996; 4: 225-237.

[2] Arinc E., Sen, A.; "Effects of in vivo benzo (a) pyrene treatment on liver microsomal. mixedfunction oxidase activities of gilthead seabream (*Sparus aurata)"; Comp. Biochem. Physiol;* 1994; 107C: 405-414.

[3] Burke M. D., Mayer, R. T.; "Direct flurometric assay of microsomal O-dealkylation which preferentially induced by 3-methylcholantrene"; Drug. Metab. Dispos.; 1974; 2583-588.

[4] Goksoyr A.; "Purification of hepatic microsomal cytochrome P450 from ß-naphthoflovone-treated Atlantic Cod, *Gadus* morhua amrine teleost fish"; *Biochem. Biophys. Acta*; 1985; 84: 409-417.

[5] Imai Y., Ito, A., Sato. R.; "Evidence for biochenically different types of vesicles in the hepatic microsomal fraction"; *J. Biochem;* 1966; 60: 417-428.

Archive of SID
www.SID.ir

[6] Kajiwara N., Ueno D., Monirith I., Tanabe S., Pourkazemi M., Aubrey D. G.; "Contamination hy organochlorine compounds in sturgeons from Caspian sea during 2001-2002"; *Marine Pollution Bulletein*; 2003; 46: 741-747.

[7] Laemmli U. K.; "Cleavageof structural proteins during the assembly of the head of bactriophage T_4"; Nature; 1970; 227: 680-684.

[8] Lowry O. H., *et al.;* "Protein mesearment with the Folin phenol reagent"; *J. Biol.Chem.*; 1951; 193: 265-275.

[9] Masters B. S. S., Williams, C.H., Kamin, H.; The prepration and proprties of microsomal TPNH cytochromec reductase from pig liver; In Methods in Enzymology; 1967; 10: 565-573.

[10] Morinmet D., Taysse, B., Deschaux, P.; "3-Methylcholantheren-induced EROD activity in carp (*Cyprinus carpio)*"; *Comp. Biochem. Biophysiol.*; 1999; 124(2): 165-170.

[11] Oritz demontellano P. R.; "Structure, mechanisim and inhibition of cytochrome P450"; *Drug. Metab. Dispos*; 1995; 23: 1181-1187.

[12] Stegeman J. J., Woodin, B. R., Singh, H., Oleksiak M. F., Celander, M.; "Cytochrome P450 (CYP) in tropical fishes: Catalytic Activities, Expreesion of multiple CYP Proteins and high levels microsomalP450 in liver of fishes from Bermoda"; *Com. Biochem. Biophysiol.*; 1997; 116C: 61-75.

[13] Sarasquete C., Senger H.; Cytochrome P4501A in teleostean Fishes. The Science of the Total Environmemt; 2001; 247: 313-332.

[14] Sen A., Arinc, E.; "Prepration of highly purified cytochrome P4501A1from leaping mullet (*Liza saliens)* liver microsomes and its biocatalytic, molecular and immunological properties"; *Comp. Biochem. Physiol*; 1998; 121 (C): 249-265.

[15] Sirosoka Z., Drastichova J.; "Biochemical markers of aquatic environment contamination, cytochrome P450 in Fish"; *A review. Acta. Vet. Brno*; 2004; 73: 123-132.

[16] Williams D. E., Buchler D. R.; "Comparative properties of purified cytochrome P-448 from β-napthflovone treated rats and rainbow trout; *Comp. Biochem. Physiol.*; 1983; 75C: 25-32.

Archive of SID

www.SID.ir