شیلات، مجله منابع طبیعی ایران

دوره ۶۹، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۵

صفحات ۴۵۱-۴۴۳

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

*فرشته اسفندیار[۱]، فرید فیروزبخش*[۲]، حسین رحمانی[۳]، خسرو جانی‌خلیلی[۴]*

*۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد بوم شناسی آبزیان، 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 می شود. هدف از این مطالعه تعیین اثر غلظت‌های تحت کشنده (۰/۱، ۰/۰۵ و ۰/۰۲میلی‌گرم بر لیتر) کلرپیریفوس بر فعالیت آنزیم‌های کبدی و آنزیم‌های اکسیداتیو ( سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز) ماهی کپور معمولی (*Cprinus carpio*) در روزهای ۱، ۷، ۱۴ و ۲۱ بعد از تماس با آفت‌کش می‌باشد. میزان LC50 96 سم کلرپیریفوس برای کپور ماهیان ۵۱۶/ میلی گرم 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 آسپارتات‌آمینوترنسفراز (AST) و آلانین آمینوترنسفراز (ALT) نشان دادند ($P$<۰/۰۵). 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 سوپراکسید دیسموتاز (SOD) نیز بطور معنی‌داری بیشتر بود ($P$<۰/۰۵). علاوه بر این اثر متقابل زمان و غلظت سم بر روی فعالیت آنزیم‌های CAT, SOD و AST مشاهده شد ($P$<۰/۰۵). 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.

* نویسنده مسوول: تلفن: ۹۸۱۱۳۳۸۲۲۵۶۵+ ایمیل: f.firouzbakhsh@sanru.ac.ir

## ۱. مقدمه

حشره‌کش‌های ارگانوفسفره گروه عمده‌ایی 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).

کلرپیریفوس {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 کولین استراز در سیستم عصبی جانوران است و سبب توقف فعالیت بیولوژیکی آنزیم کولین استراز 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 پایانه-های سیناپسی سمپاتیک و پاراسمپاتیک و در نتیجه، تجمع نروترنسمیتر استیل‌کولین در سیناپس‌های عصبی و تحریک بیش از حد گیرنده‌های کولینرژیک نیکوتینی و موسکارینی است (Shadnia *et al*., 2005; Civen *et al*., 1997). 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 لیپیدها باعث صدمه به غشاء سلولی و مرگ سلول می-شوند (Rauen *et al*., 1999). اثرات مضر احتمالی ترکیبات ROS از طریق سیستم حمایتی آنتی اکسیدانت 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، قابل القاء 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، آلکالین‌فسفاتاز و آسپارتات‌آمینوترانسفراز می‌باشند (Purgholam *et al*., 2001; Khoshbavar Rostami *et al*., 2006; Ciesieslski and Loomis, 1994; USEPA, 1993; Banaee *et al*., 2008). آزادسازی آنزیم‌های پلاسما می‌تواند به‌وسیله آسیب‌های کبد، کلیه و طحال باشد و افزایش بسیاری از آنزیم‌ها در پلاسما به دلیل نکروز 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 کلرپیریفوس و آترازین فعالیت اسیدفسفاتاز، سوپراکسیددیسموتاز، آلکالین‌فسفاتاز و پمپ سدیم-پتاسیم ATPase در ماهی کپور معمولی کاهش یافته است. از طرف دیگر، در مطالعه اثرکلرپیریفوس 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*.,

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

## ۲. مواد و روش‌ها

در هریک از مراحل آزمایش، ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) با میانگین وزنی ۱۰±۴۵ 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 ۲۵±۱°C، اکسیژن محلول mg/lit ۶/۰۸، سختی ۳۹۳/۰۹ ppm، شوری ۰/۴ ds/m و pH۰/۴±۸) 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 کلرپیریفوس 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 غلظت-های ۰/۳، ۰/۳۷، ۰/۴۳، ۰/۵۱ و ۰/۶میلی‌گرم بر لیتر و گروه کنترل انجام شدند.

$$X = \frac{\log C_n - \log C_1}{n-1}$$ 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 ($C_2$= Antilog(Log$C_1$+X))، $C_3$= غلظت در تیمار سوم ($C_3$= AntiLog (Log$C_2$+X))

### ۲.۲. آزمایش سمیت تحت حاد

به منظور انجام آزمایش سمیت تحت حاد، تعداد ۱۸۰ عدد ماهی در۱۲ 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 $LC_{50}$ ($LC_{50}$= ۰/۵۱۶) سم کلرپیریفوس 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 سانتی گراد نگهداری شدند.

### ۳.۲. اندازه‌گیری آنزیم‌های کبدی

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

### ۴.۲. اندازه‌گیری آنزیم‌های اکسیداتیو

آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز نیز با استفاده از کیت شرکت Zelbio و دستگاه الایزا 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 کلرپیریفوس انجام گردید، برای مقایسه آنزیم‌ها از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا 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.

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

| تیمارهای تحت آزمایش | روزهای آزمایش | میانگین فعالیت آنزیم (U/L)ALT | میانگین فعالیت آنزیم (U/L)AST | میانگین فعالیت آنزیم (U/L)ALP |
|---|---|---|---|---|
| شاهد | ۱ | $^{A}$۷۲/۳۲±۸/۸۰$^{b}$ | $^{A}$۲۰/۵۱±۳/۴۲$^{a}$ | $^{A}$۱۴۵۱/۵۰±۲۱۶/۱۲$^{a}$ |
| | ۷ | $^{A}$۷۳/۳۱±۹/۲۷$^{a}$ | $^{A}$۲۳/۱۱±۳/۶۶$^{a}$ | $^{A}$۱۲۵/۹۰±۱۲۹/۲۲$^{a}$ |
| | ۱۴ | $^{A}$۸۰/۵۰±۱۱/۳۶$^{a}$ | $^{A}$۲۱/۵۶±۲/۷۴$^{a}$ | $^{A}$۱۳۱۴±۲۲۵/۱۸$^{a}$ |
| | ۲۱ | $^{A}$۹۴/۴۱±۱۶/۸۱$^{a}$ | $^{A}$۱۹/۶۹±۳/۹۷$^{a}$ | $^{A}$۱۳۹۵/۹±۱۱۵/۱۳$^{a}$ |
| ۰/۰۲ mg/l | ۱ | $^{A}$۳۳/۳۸±۴/۸۱$^{a}$ | $^{A}$۲۲/۵±۴/۰۹$^{ab}$ | $^{A}$۲۸۳۳/۷±۲۸۷/۹۹$^{a}$ |
| | ۷ | $^{AB}$۵۴/۵۳±۱۳/۶$^{a}$ | $^{B}$۴۵/۰۱±۶/۱۷$^{b}$ | $^{A}$۲۵۱۳/۸±۶۶۹/۲۸$^{a}$ |
| | ۱۴ | $^{BC}$۷۱/۴۷±۱۱/۵۹$^{a}$ | $^{AB}$۳۵/۹۳±۷/۳۶$^{a}$ | $^{A}$۲۲۷۱±۳۵۶/۲۳$^{a}$ |
| | ۲۱ | $^{C}$۹۷/۶۵±۲۴/۳۱$^{a}$ | $^{AB}$۳۷/۰۲±۱۱$^{ab}$ | $^{A}$۱۷۳۰/۴±۲۱۶۲$^{a}$ |
| ۰/۰۵ mg/l | ۱ | $^{A}$۳۷/۶۲±۶/۹۶$^{a}$ | $^{A}$۳۱/۹۲±۳/۳۴$^{bc}$ | $^{AB}$۲۹۷۰/۱±۱۷۲۹/۲$^{a}$ |
| | ۷ | $^{B}$۶۶/۲۳±۱۱/۲۶$^{a}$ | $^{A}$۴۶/۶۹±۶/۸۳$^{b}$ | $^{B}$۶۱۰۴/۸±۱۶۶۸/۲$^{b}$ |
| | ۱۴ | $^{BC}$۷۹/۷۰±۱۸/۶۹$^{a}$ | $^{A}$۵۱/۸۴±۱۳/۵۳$^{b}$ | $^{A}$۲۴۵۰/۷±۱۰۵۷$^{a}$ |
| | ۲۱ | $^{C}$۱۰۲/۵±۱۵/۳۱$^{a}$ | $^{A}$۴۷/۴۹±۱۷/۸۴$^{b}$ | $^{A}$۳۰۲۳/۱±۸۵۵/۹۹$^{b}$ |
| ۰/۱ mg/l | ۱ | $^{A}$۳۶/۶۹±۶/۴۹$^{a}$ | $^{A}$۳۶/۲۶±۹/۲۸$^{c}$ | $^{B}$۵۱۶۱/۶±۱۹۲۲/۷$^{b}$ |
| | ۷ | $^{B}$۵۷/۵۶±۳/۴۶$^{a}$ | $^{AB}$۵۲/۱۲±۱۶/۰۳$^{b}$ | $^{B}$۳۱۲۸/۵±۱۹۱۲/۵۲$^{a}$ |
| | ۱۴ | $^{B}$۷۲/۹۱±۸/۵۷$^{a}$ | $^{B}$۶۳/۸۴±۵/۵۸ $^{b}$ | $^{A}$۲۰۴۶/۶±۶۱۸/۳۴$^{a}$ |
| | ۲۱ | $^{C}$۹۹/۴۵±۱۴/۳۳$^{a}$ | $^{AB}$۵۷/۳۱±۱۰/۹۲$^{b}$ | $^{A}$۲۳۲۰/۹±۳۶۷/۹۷$^{ab}$ |

❖ (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

بر اساس نتایج LC50 96h سم کلرپیریفوس بر روی ماهیان کپور معمولی ۰/۵۱۶ میلی‌گرم بر لیتر محاسبه گردید. فعالیت آنزیم آلانین‌آمینوترانسفراز 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 ($P$<۰/۰۵). در هر چهار دوره نمونه‌برداری بیشترین سطح آسپارتات‌آمینوترانسفراز (AST) در تیمار ۰/۱ مشاهده شده است و بطور کلی با افزایش غلظت سم، سطح AST روند افزایشی داشته است ($P$<۰/۰۵). در روزهای هفتم، چهاردهم و بیست و یکم آزمایش بیشترین میزان آلکالین‌فسفاتاز در تیمار ۰/۰۵ میلی-گرم 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 ($P$<۰/۰۵). به علاوه افزایش مدت زمان آزمایش نیز سبب افزایش فعالیت آنزیم AST و ALT در تیمارهای در معرض کلرپیریفوس شده است.

براساس نتایج حاصل از این پژوهش، میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز 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 ($P$<۰/۰۵). 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 ($P$<۰/۰۵). گذشت زمان سبب افزایش معنی‌داری در سطح سوپراکسید-دیسموتاز و کاتالاز در تیمارهای در معرض کلرپیریفوس شده است. همچنین اثر متقابل زمان و غلظت بر روی فعالیت آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز، سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز مشاهده شده است ($P$<۰/۰۵).

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

| تیمارهای تحت آزمایش | روزهای آزمایش | میانگین فعالیت آنزیم SOD (U/ml) | میانگین فعالیت آنزیم CAT (U/ml) |
|---|---|---|---|
| شاهد | ۱ | $^{A}$۱۲/۲۳±۰/۱۱$^{a}$ | $^{A}$۱۸/۹۹±۰/۹۳$^{a}$ |
| | ۷ | $^{A}$۱۲/۸۷±۰/۳۰$^{a}$ | $^{A}$۱۷/۳۵±۲/۰۱$^{a}$ |
| | ۱۴ | $^{A}$۱۲/۵۷±۰/۴۴$^{a}$ | $^{A}$۱۶/۸۷±۱/۵۹$^{a}$ |
| | ۲۱ | $^{A}$۱۲/۷۰±۰/۴۸$^{a}$ | $^{A}$۱۷/۳±۰/۶۵$^{a}$ |
| ۰/۰۲ mg/l | ۱ | $^{A}$۱۲/۴۶±۱/۰۲$^{a}$ | $^{A}$۱۹/۹۱±۰/۵۷$^{a}$ |
| | ۷ | $^{AB}$۱۲/۶۸±۰/۸۲$^{a}$ | $^{A}$۱۸/۱۴±۱/۳۹$^{a}$ |
| | ۱۴ | $^{B}$۱۴/۲۸±۰/۸۵$^{b}$ | $^{A}$۲۴/۳۶±۵/۲۷$^{ab}$ |
| | ۲۱ | $^{C}$۱۶/۶±۰/۶۷$^{b}$ | $^{A}$۲۲/۹۷±۴/۴۵$^{ab}$ |
| ۰/۰۵ mg/l | ۱ | $^{A}$۱۱/۹۲±./۷۱$^{a}$ | $^{A}$۲۲/۳۲±۳/۱۱$^{a}$ |
| | ۷ | $^{A}$۱۲/۰۷±۱/۹۴$^{a}$ | $^{A}$۲۳/۱۴±۴/۷۸$^{a}$ |
| | ۱۴ | $^{A}$۱۳/۸۶±۰/۶۴$^{b}$ | $^{AB}$۲۷/۲۸±۳/۰۹$^{b}$ |
| | ۲۱ | $^{B}$۱۶/۴۸±۱/۱۸$^{b}$ | $^{B}$۲۹/۸۴±۱/۴$^{b}$ |
| ۰/۱ mg/l | ۱ | $^{A}$۱۲/۷±۰/۲۶$^{a}$ | $^{A}$۲۷/۳۱±۳/۱۹$^{b}$ |
| | ۷ | $^{A}$۱۲/۷۴±۰/۴۷$^{a}$ | $^{A}$۲۲/۹۷±۶/۱۰$^{a}$ |
| | ۱۴ | $^{A}$۱۳/۷۹±۰/۴۱$^{b}$ | $^{A}$۳۰/۱۸±۵/۶۶$^{b}$ |
| | ۲۱ | $^{B}$۱۶/۶۲±۱/۳۳$^{b}$ | $^{B}$۴۱/۰۵±۷/۳۰$^{c}$ |

❖ (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.

## ۴. بحث و نتیجه‌گیری

### ۱.۴. 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 گروه‌های 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 یافته‌های 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 نتایج حاضر با تحقیق آنها همسو نبود. در مطالعه Archana و همکاران (۲۰۱۱) مشاهده شده که افزایش غلظت متیل پاراتیون سطح کاتالاز در آبشش گوپی (*Poecilia reticulate*) 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 Zikic 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 به‌تدریج افزایش یافت که یافته‌های حاضر با نتایج آنها مطابقت دارد. با توجه به نتایج این مطالعه احتمالاً تجویزکلرپیریفوس باعث افزایش رادیکال‌های آزاد سوپراکسید در سرم ماهی کپور معمولی شده و در نتیجه منجر به استرس اکسیداتیو می‌شوند. زیرا آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان یکی

از خطوط دفاعی مهم بدن در مقابله با استرس اکسیداتیو می‌باشند. در میان این آنزیم‌ها سوپراکسید-دیسموتاز و کاتالاز نقش مهمی در برداشت رادیکال-های 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 آنزیم-ها در بافت‌ها واکنش نشان دهد (Ceriello, 1996). مطالعات نشان داده است که افزایش میزان آنیون سوپراکسید و پراکسیدهیدروژن در سلول‌ها به ترتیب باعث القای بیان آنزیم سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز می‌شود (Meilhac, 2010; Marrotte, 2010). آنزیم سوپراکسیددیسموتاز باعث تبدیل آنیون سوپراکسید به پراکسیدهیدروژن می‌شود و کاتالاز با تبدیل کردن پراکسیدهیدروژن به آب اثرات سمی آن را خنثی می‌کند (Turrens, 1984; Hsieh, 1998).

## ۲.۴. آنزیم‌های کبدی

بین فعالیت آنزیم‌های AST، ALT و ALP و سم کلرپیریفوس 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. درحالیکه اثر متقابل غلظت و زمان فقط در فعالیت آنزیم AST مشاهده شد.

آنزیم آسپارتات‌آمینوترانسفراز (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 گلوکوژنز بازی می‌کند (Rao, 2006).

تماس ماهیان با سموم مختلف سبب افزایش فعالیت آنزیم آسپارتات‌آمینوترانسفراز آنها می شود. به عنوان مثال می توان به افزایش این آنزیم ناشی از سم دیازینون در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) (Banaee *et al*., 2012)، مولدین نر ماهی سفید (*Rutilus kutum*) (Mohhamadnezhad Shamoshaki *et al*., 2013) و ماهی کپور معمولی (Banaee *et* ، 2008 *al*., 2008) اشاره کرد. همچنین در پژوهشی که توسط Ali و همکارن (۲۰۱۴) انجام شده بود، نشان داد که تماس علف‌کش با قزل‌آلای‌رنگین‌کمان، افزایش فعالیت آنزیم‌های آسپارتات‌آمینوترانسفراز و آلانین-آمینوترانسفراز باعث می‌شود.

از آنجایی‌که آفت‌کش‌ها در کبد جذب می‌شوند و ساخت و ساز تمام آنزیم‌ها مثل آلکالین‌فسفاتاز در داخل کبد صورت می‌گیرد، در نتیجه اندازه‌گیری فعالیت آلکالین‌فسفاتاز سرم به صورت عمومی می‌تواند به‌عنوان 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 آلکالین‌فسفاتاز در بیماری-های 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 (۲۰۰۵) اعلام کردند که کلرپیریفوس در غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد $LC_{50}$ در طی ۱۵ روز سبب افزایش فعالیت آلکالین‌فسفاتاز در *Channa punctatus* شده بود که یافته‌های حاضر همسو با آن تحقیق می‌باشد. بر اساس گزارش Kaya و همکاران (۲۰۱۴)، فعالیت آلکالین-فسفاتاز ماهی کپور معمولی توسط فوزانول افزایش یافته بود که نتایج حاضر با یافته‌های آنها همخوانی دارد. Luscova و همکاران (۲۰۰۲) تاثیر دیازینون را بر ماهی کپور معمولی بررسی کرده و نشان دادند که فعالیت آلکالین‌فسفاتاز بدون تغییر باقی مانده است. همچنین افزایش فعالیت این آنزیم ناشی از سم دیازینون در مولدین نر ماهی سفید (*Rutilus kutum*) (Mohhamadnezhad Shamoshaki *et al*., 2013) و کپور معمولی (Banaee *et al*., 2012) به اثبات رسیده است.

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

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

# 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 reticulate*. *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., Myrvaqefy, 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, SL., 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, RJ. 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, Sandieogo, 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. Scien*ce 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, AM., 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., Esmaeili, 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 endothelialcells: 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., Qiyou, 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.