شیلات، مجله منابع طبیعی ایران

دوره ۶۹، شماره ۱، بهار ۱۳۹۵

صفحات ۹۹-۸۹

اثر سم مالاتیون بر شکستگی DNA در بافت کبد و آبشش ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده از روش میانگین وزنی

حامد غفاری فارسانی[۱]، هادی پورباقر[۲]*، حمید فرحمند[۳]

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

۲. دانشیار، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

۳. استاد، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۶/۲۱ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۱/۳۰

چکیده

این مطالعه به منظور بررسی تأثیر سم مالاتیون بر شکستگی DNA در بافت کبد و آبشش ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. این آزمایش به مدت نه روز با چهار تیمار سم یعنی غلظت‌های ۰ (کنترل)، ۰/۰۲۵، ۰/۰۵ و ۰/۰۷۵ میلی‌گرم بر لیتر و سه تکرار اجرا شد. نمونه‌گیری از کبد و آبشش در روزهای اول، پنجم و نهم صورت گرفت و نمونه‌های موردنظر پس از جداسازی در میکروتیوپهای حاوی الکل نگهداری شدند. استخراج DNA براساس دستورالعمل موجود در کیت Cinapure DNAانجام گرفت و سپس با ژل الکتروفورز ران شد و در پایان با دستگاه ژل داک عکسبرداری شد. درصد شکستگی DNA با استفاده از میانگین وزنی تعیین گردید. بر طبق نتایج اثر غلظت سم و زمان و اثر متقابل زمان- غلظت بر روی سطح آسیب DNA در بافت کبد و آبشش بین تیمارهای مختلف کاملاً معنی‌دار بود. بیشترین آسیب در بافت کبد در غلظت ۰/۰۷۵ و آبشش در غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر و هر دو بافت در روز نهم دیده شد که به دلیل عدم سازوکارهایی در هر دو بافت برای ترمیم آسیب وارد شده توسط سم و مقابله با آن می‌باشد. همچنین بیشترین میزان آسیب DNA در بافت کبد مشاهده شد. بنابراین شکستگی DNA می‌تواند روش مناسبی برای تشخیص آسیبهای ژنتیکی ناشی از آلاینده‌های محیطی استفاده شود و بعنوان یک نشانگر زیستی در مطالعات اکوتوکسیکولوژی مورد استفاده قرار بگیرد.

واژگان کلیدی: مالاتیون، شکستگی DNA، میانگین وزنی، ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

* نویسنده مسئول مکاتبه

Email: poorbagher@ut.ac.ir

۱. مقدمه

با توسعه بخش کشاورزی و گسترش سطح زیر کشت، مصرف سموم کشاورزی رو به افزایش است که این سموم از طرق مختلفی (بارندگی، روان آبها، زه‌کشی و غیره) وارد اکوسیستمهای آبی می‌شوند (Pandrangi *et al*., 1995). در نتیجه باقیمانده‌ی این آفت‌کشها و یا متابولیتهای حاصل از آنها می‌تواند اثرات و صدمات پیش بینی نشده‌ای را بر روی موجودات غیر هدف داشته باشد (Garaj-Vrhovac and Zeljezic, 2000). این سموم بر ساختار فیزیولوژیک و بیوشیمیایی ماهیها آسیب می رساند و در نهایت می‌تواند به طور غیر مستقیم از طریق زنجیره غذایی بر انسان نیز اثر گذار باشند (Pandrangi *et al*., 1995).

مصرف چشمگیر و قابلیت دسترسی بالای کشاورزان به سموم ارگانوفسفره و همچنین عدم دقت کشاورزان در بکاربری دوزهای توصیه شده توسط کارخانه سازنده سم، باعث افزایش نگرانی نسبت به اثرات سمی آن گردیده است. خاطر نشان می‌گردد یک چهارم مصرف این سموم مربوط به کشورهای درحال توسعه است (Jeyaratnam, 1990). این سموم به طرق مختلفی وارد رودخانه‌ها شده و مخاطراتی را برای موجودات آبزی و نهایتاً به علت مصرف انسانی ماهی قزل‌آلا آلودگی آن به سم، سلامت بشر را به مخاطره انداخته است. مالاتیون (S-(1, 2-dicarboethoxyethyl) O, O-dimethyl phosphorodithioate) یکی از حشره‌کشهای پر مصرف در ایران می‌باشد (یادگاریان و همکاران، ۱۳۸۳). مالاتیون جز سموم ارگانوفسفره است و از طریق مهار آنزیم کولین استراز منجر به اختلال در سیستم عصبی می‌شود (Kumar *et al*., 2010). سموم کشاورزی توانایی ایجاد سمیت ژنتیکی دارند به این معنی که به طور مستقیم یا غیر مستقیم باعث تخریب ماده ژنتیکی می‌شوند (Baorong *et al*., 2010).

سموم ارگانوفسفره داری ترکیبی ژنوتوکسیک هستند که توانایی تخریب DNA را داشته و می‌تواند ناشی از آسیبDNA، شکستگیهای یک یا دو رشته DNA، تغییر یا حذف بازها، ترکیبات اضافی DNA و یا اتصال عرضی بین رشته DNA - DNA و یا DNA- protein باشد. این تخریب در نتیجه‌ی اثر متقابل آفت‌کشها و یا متابولیتهای حاصل از آن است (Mitchelmore and Chipman, 1998). حشره-کشهای ارگانوفسفره قادر به تولید رادیکال‌های آزاد و اختلال در سیستمهای آنتی اکسیدانی در بدن هستند. در شرایط طبیعی بین تولید و حذف رادیکالهای آزاد تعادل وجود دارد. عدم تعادل در این فرآیندها موجب استرس اکسیداتیو می‌گردد. افزایش استرس اکسیداتیو گلوتاتیون بافتی را تخلیه کرده و به افزایش رادیکالهای آزاد منجر می‌شود. رادیکالهای آزاد به دلیل تمایل به جذب الکترون می‌توانند به ماکرو مولکولهای مهم بدن از جمله پروتئینها، چربیها و DNA آسیب برسانند (Michiels *et al*., 1994).

امروزه موجودات بسیاری بعنوان شاخص زیستی در محیطهای دریایی بکار گرفته می‌شوند. ماهیان یکی از مهمترین موجودات آبزی می‌باشند که به علت ارزش اقتصادی و حساسیت در مقابل آلاینده‌ها از اهمیت خاصی برخوردار هستند و برای آزمایشات اکوتوکسیکولوژیک در بعد وسیعی از آنها استفاده می‌شود (Piri Zirkoohi and Ordog, 1997). آبشش بدلیل اپی‌تلیوم ویژه و ارتباط مستقیم آن با محیط پیرامون، مهمترین اندامی است که تنظیم اسمزی در آن صورت می‌گیرد (Lin *et al*., 2003). کبد ماهی شاخص حساس آلودگی محیط بوده و به دلیل تجمع زیستی فوق العاده نسبت به سایر بافتهای بدن، اکثر مطالعات اخیر برای تعیین آلودگی، بر این اندام متمرکز شده است (Safahieh *et al*., 2011). شکستگی DNA به عنوان یک بیومارکر آلودگیهای محیطی در ماهی و دیگر گونه‌های آبزی در نظر گرفته شده است و توجه زیادی را به خود جلب کرده است (Benton *et al*., 2001). وقتی که شکستگی DNA ترمیم نشود، می‌تواند به صورت آسیب دیده خود را در مواد ژنتیکی حفظ کرده و در نهایت بیماریهای ناشی از آلودگیهای ژنتیکی را ایجاد نماید (Kurelec, 1993).

از آنجا که بسیاری از آلاینده‌های زیست محیطی بعنوان جهش‌زا شناخته می شوند، سنجش آسیب ژنتیکی ناشی از آنها را می‌توان بعنوان یک بایومارکر ژنوتوکسیک مناسب در نظر گرفت که بوسیله آن تغییرات اکوسیستمهای آبی به سرعت

تشـــخیص داده شـــده و از تأثیرات مخرب آن قبل از اینکـه غیر قـابـل کنترل شـــود جلوگیری می‌شـــود. بـایومارکرهای مولکولی دارای مزیتهایی می‌باشـــند از جمله اینکه در آنها مشـکلات جداسازی و اندازه‌گیری فعـالیـت آنزیم وجود نـدارد، بعلاوه پـاســـخها در این سطوح پائین سریعتر قابل مشاهده می‌باشند و هر چه به سطوح بالاتر بیولوژیکی نزدیکتر شویم، اختصاصیت پاسـخها نسـبت به انواع عوامل تنش‌زا کمتر می‌شـود (Mosesso *et al*., 2008).

روشـــهـای مختلفی برای تعیین میزان تخریب ماده ژنتیکی وجود دارد که می‌توان آزمون ســـنجش ریز هســـتـه، آزمون کامت، تبادل کروماتید خواهری، تغییرات کروموزومی، شـکسـتگی رشـته DNA را نام برد. در بین روشـهای مختلف آزمون کامت سریع، کم هزینه و بسیار حساس می‌باشد و به کمک آن می‌توان آســـیبهای ایجاد شـــده در DNA را در تک رشـــته DNA مشـاهده نمود اما شـکستگی رشته DNA یا الکتروفورز ژل آگاروز می‌توان هر دو رشـــته DNA را بررسـی کرد. در نتیجه DNA آسـیب دیده از هسته خارج شـده و به سـمت آند (قطب مثبت) مهاجرت می‌کند. هرچه میزان آسـیب وارده به DNA بیشـتر باشـد، میزان DNA جا به جا شده هم بیشتر خواهد بود و در ضـمن درخشـانتر نیز دیده می‌شـود (Lee and Steinert, 2003).

اطلاعـات کمی در رابطه با ســـمیت ژنتیکی مـالاتیون بر روی مـاهیـان وجود دارد بـا این حـال مطالعاتی در زمینه آسـیب DNA تحت تاثیر سـموم کشـاورزی و سـایر آلاینده‌ها صـورت گرفته از جمله تاثیر سـم سـوین بر شکستگی DNA در بافت کبد و کلیه و آبشش ماهی آفانیوس (*Aphanius sophiae*) (نـدائی و همکـاران، ۱۳۹۲)، تـاثیر مواد ضـــدعفونی کننـده بر آب دریـاچـه‌ای تیمـار شـــده در شـــرایط آزمایشـــگاهی بر روی ســـلولهای DNA گلبول قرمز مـاهـی کـپـور مـعـمـولـی (*Cyprinus carpio*) (Buschini *et al*., 2004)، تـاثیـر آفـت‌کـش کلرپیریفوس بر آســـیـب DNA خون گربـه مـاهی (*Channa punctatus*) (Ali *et al*., 2008)، اثرات ژنوتوکســـیک ســـم ســـایپرمترین و دیازینون بر روی ماهیان جوان تیلاپیا (Henao *et al*., 2005) می‌توان اشـاره کرد. هدف از این مطالعه تعیین شـکسـتگی DNA با استفاده از روش میانگین وزن دهی در بافت کبد و آبشـش با اسـتفاده از الکتروفورز ژل آگاروزکه این امکـان را می‌دهـد تـا ارزیابی نســـبتاً ســـریع از شـکسـتگی DNA برای سـنجش اثرات ژنوتوکسیک ســـم مـالاتیون در غلظتهـای پایین صـــورت گیرد و بـــررســـی مـــاهـــی قـــزل‌آلای رنـــگـــیـــن کمان(*Oncorhynchus mykiss*) به عنوان شـاخص آلودگی آب توســـط آفـت‌کشـــها در شـــرایط بهینه آزمایشگاهی بررسی خواهد شد.

۲. مواد و روشها

تعـداد ۳۶ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان با وزن ۱۰ ±۷۰ گرم (میـانگین ± SD) پس از یـک هفته سـازگاری داخل ظروف پلاسـتیکی ۵۰۰ لیتری نگهـداری شـــدنـد و طی این مـدت غذادهی با جیره غـذایی پلت روزانه و حدود ۲٪ وزن بدن انجام شـــد. طی دوره آزمـایش مـاهی‌ها با غذای تجاری به میزان ۲٪ وزن بدن در روز تغذیه شـدند. ماهیها ۲۴ سـاعت قبل از شـروع آزمایشـها به تانکهای ۷۰ لیتری حاوی آب عاری از کلر و هوادهی شـــده منتقل و تغذیه آنها قطع گردید.

انـدازه‌گیری فـاکتورهای فیزیکوشـــیمیایی آب بطور روزانه انجام گرفت به طوری که، دمای آب (°C) ۲± ۱۸، پـی اچ ۰/۴±۷/۲ و اکســـیـژن مـحـلـول ۰/۲±۶/۷۴ میلی‌گرم بر لیتر و ســـختی آب $CaCO_3$ ۱۶±۱۸۵ میلی‌گرم بر لیتر بود.

فاکتورهای فیزیکوشـیمیایی آب مورد اسـتفاده در کارگاه دما توسـط دماسـنج، پی اچ با دستگاه قابل حمل سنجش پی اچ (مدل تی اس) و اکسیژن محلول با دسـتگاه دیجیتال اندازه‌گیری اکسـیژن اندازه‌گیری شدند.

آزمایش با چهار تیمار و ســـه تکرار با غلظتهای تحت کشـنده سـم مالاتیون (شاهد، ۰/۰۲۵ ، ۰/۰۵ ، ۰/۰۷۵ میلی‌گرم بر لیتر) طراحی گردیـد. در روزهای ۱، ۵ و ۹ پس از غوطه‌وری سم در آب از ماهیان جهت تهیه بافت، ابتدا ماهیان را به‌طور تصـادفی با ساچوک برداشـته و در داخل تشـت پلاستیکی ۵ لیتری دارای ۲۰۰ ppm مـاده بیهوش‌کننـده گـل میخک بیهوش کرده و سـپس از ماهیها جهت بررسـی شـکسـتگی

DNA از اندام کبد و آبشش نمونه برداری صورت گرفت. نظر به اینکه مالاتیون دوام زیادی نداشته در آب تجزیه می‌شود برای مدت طولانی‌تری مطالعه طراحی نشد. این آزمایش با انتخاب ۱۹- ۳۸ و ۵۷ درصد از غلظت سمیت کشنده استفاده شد.

بافتهای کبد و آبشش پس از هر بار نمونه‌گیری از بدن ماهی خارج گردید و در الکل ۹۶٪ نگهداری شد. نمونه استخراج DNA طبق دستورالعمل کیت DNA Cinnapure انجام گرفت و ژل حاوی DNA بر روی دستگاه الکتروفورز ران شده و در دستگاه ژل داکیومنتیشن قرار داده شد. برای بدست آوردن میزان شکستگی تصاویر در فتوشاپ سیاه سفید و بعد Invert شدند و گراف تراکم پیکسل حاصل از غلظت DNA در نرم افزار ImageJ بدست آمد. در نهایت درصد شکستگی بر طبق روش میانگین وزنی محاسبه گردید.

داده های استخراج شده از میانگین وزنی به منظور بررسی اثر دوز و زمان بر روی شکستگی DNA در بافتهای مورد بررسی با استفاده از ANOVA دو طرفه آنالیز گردیدند و از توکی نیز به منظور بررسی اثر متغیرهای سم و زمان مورد بررسی در ارتباط با بافت کبد و آبشش استفاده شد. طرح آزمایش به صورت کاملا تصادفی و نمونه های به تیمارهای آزمایشی به صورت تصادفی اختصاص داده شده بودند. برای میانگین وزنی به هر یک از سه قسمت ژل یک ضریب داده شد. منطقه اول که به چاهک ژل نزدیک بود ضریب ۱ داده شد. مناطق دو و سوم که دورتر از ژل بودند بترتیب ضرایب ۲ و ۳ داده شدند. مناطق نزدیکتر به چاهک الکترولیز ضرایب کمتری داشت زیرا حاکی از DNA بزرگتر (کمتر خرد شده) بودند. برای محاسبه میانگین وزنی از فرمول زیر استفاده گردید.

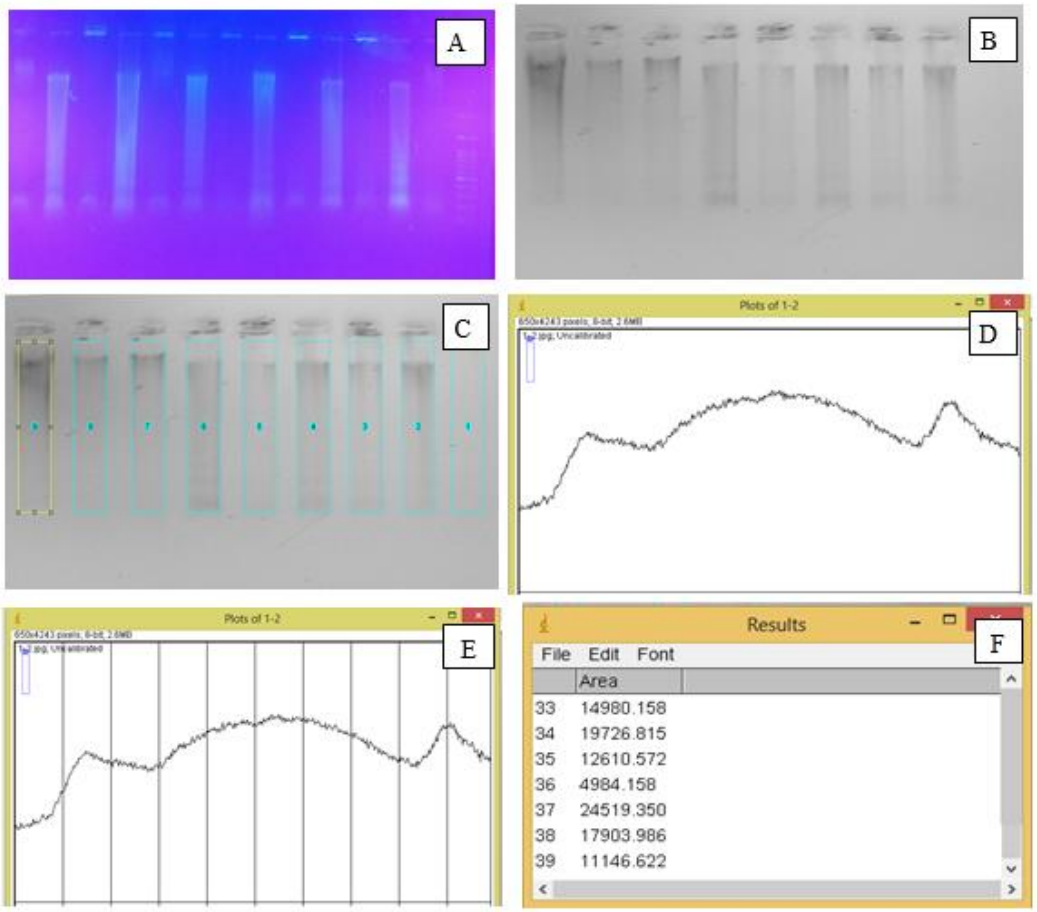
$$\overline{x} = \frac{\sum_{i=1}^{n} w_i x_i}{w_i}$$

که در این فرمول w_i وزن داده شده به قسمت i ژل، x_i سطح زیر گراف برای قسمت i ژل میباشد.

آزمایش دارای طرح کاملا تصادفی بود. اثر غلظتهای مختلف مالاتیون و زمان بر شکستگی DNA کبد و آبشش با استفاده از آنالیز واریانس دو طرفه بررسی گردید، که برای هر بافت جداگانه انجام شد. پیش از انجام آزمایش نرمال بودن داده ها با آزمون شاپیرو-ویلک و همگنی واریانس بین تیمارها با استفاده از آزمون لوین بررسی گردید. با استفاده از آزمون توکی، اختلاف معنی دار بین سطوح فاکتورها بررسی گردید. تمام آنالیزهای آماری با R ورژن 3.2.2 و بسته stats انجام گردید.

۳. نتایج

نمونه استخراج DNA طبق دستورالعمل موجود در کیت Cinnapure DNA به دور از هرگونه آلودگی بین نمونه‌ای انجام گرفت و پس از اینکه ژل حاوی DNA بر روی دستگاه الکتروفورز ران شده برای عکسبرداری در دستگاه ژل داکیومنتیشن (IN GENIUS) قرار داده شد (شکل ۱ A). پس از تهیه عکس برای بدست آوردن میزان شکستگی در مرحله اول تصاویر در فتوشاپ بصورت سیاه سفید و بعد Invert شدند (شکل ۱ B) و در مرحله دوم از نرم‌افزار ImageJ استفاده شد ابتدا تصاویر اسمیر حاصل از DNA به نرم افزار ImageJ ارسال شده(شکل ۱ C) و گراف تراکم پیکسل حاصل از غلظت DNA بدست آمد (شکل ۱ D). در میانگین وزنی سطح زیر گراف به ۱۰ قسمت تقسیم شده و مساحت هریک از ۱۰ قسمت بدست آمد (شکل E۱). در نهایت درصد شکستگی بر طبق روش میانگین وزنی محاسبه گردید (شکل ۱ F).



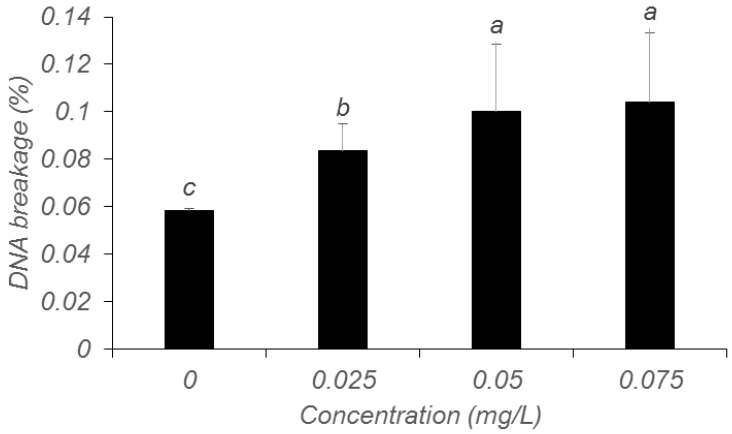
شکل ۱- تصاویر مولکولی درصد شکستگی DNA با استفاده از روش میانگین وزنی. A: عکس ژل، B: تصویر Invert با استفاده از فتوشاپ، C: وارد کردن عکس ژل به داخل ImageJ و بدست آوردن مساحت هر باند ژل، D: گراف تراکم پیکسل حاصل از غلظت DNA، E: تقسیم زیر خط منحنی به ده قسمت با استفاده از یک ماکرو، F: بدست آوردن مساحت ناحیه زیر خط منحنی با استفاده از ابزار در ImageJ.

تجزیه واریانس دوطرفه تفاوت معنی‌داری بین میزان درصد شکستگی DNA نمونه‌های بافت کبد که در معرض سم مالاتیون قرار گرفتند با گروه شاهد نشان داد. همچنین زمان و اثر متقابل غلظت-زمان اثر بسیار معنی داری بر میزان درصد شکستگی DNA داشت (جدول ۱). براساس ارزش F از تجزیه واریانس دوطرفه زمان اثر قوی تری در میزان شکستگی DNA از سایر عوامل داشت.

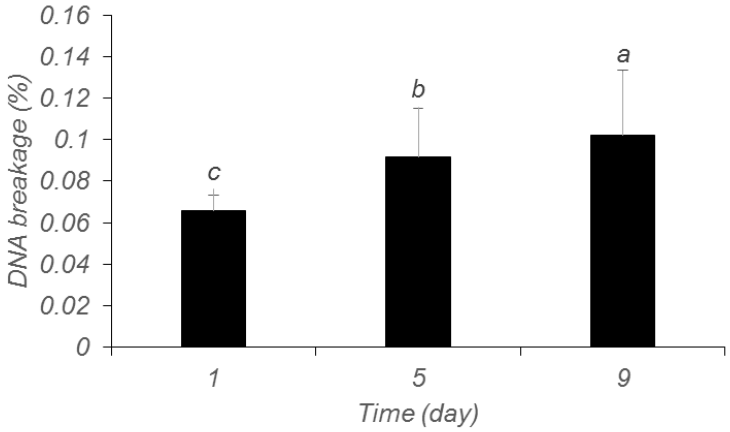
جدول ۱- تجزیه واریانس دوطرفه برای بررسی اثر غلظت سم مالاتیون و زمان بر شکستگی DNA در بافت کبد ماهی قزل‌آلای رنگین کمان با استفاده از روش میانگین وزنی

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	P
غلظت	۰/۰۱۲	۳	۰/۰۰۴	۱۹۷/۸۴۳	< ۰/۰۰۱
زمان	۰/۰۰۸	۲	۰/۰۰۴	۲۱۲/۲۲۹	< ۰/۰۰۱
غلظت × زمان	۰/۰۰۵	۶	۰/۰۰۱	۴۵/۰۸۲	< ۰/۰۰۱
خطا	۰/۰۰۰	۲۴	۱/۹۷E-۰/۰۰۵		
کل	۰/۲۹۵	۳۶			

همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود با افزایش غلظت سم میزان شکستگی DNA بیشتر شد که بیشترین آسیب در غلظت ۰/۰۷۵ مشاهده می‌شود.



شکل ۲- روند تغییرات در میزان شکستگی DNA در دوزهای مختلف سم طی غلظت در بافت کبد.



شکل ۳- روند تغییرات در میزان شکستگی DNA در زمانهای مختلف در بافت کبد.

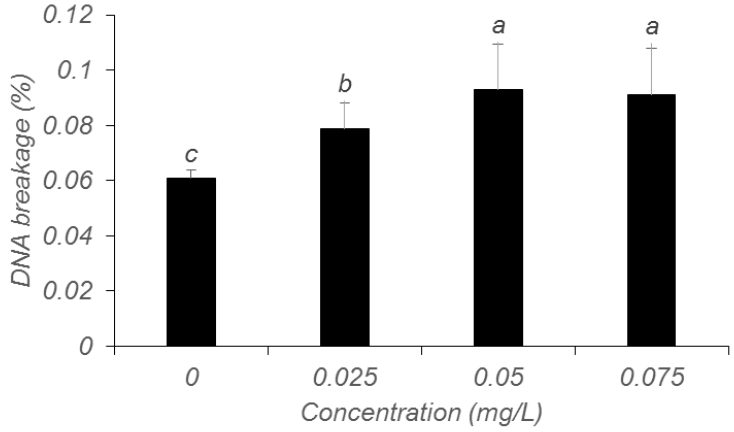
همچنین در شکل ۳ مشاهده می‌شود که با افزایش مدت زمان ماهیان در معرض سم میزان شکستگی DNA افزایش پیدا کرد که در روز نهم بیشترین آسیب دیده شد. زمان و میزان شکستگی بافت کبد دارای رابطه معنی‌داری می‌باشند. میزان آسیب DNA در همه زمانها در میزان شکستگی DNA دیده شده است. نتایج بدست آمده از آزمون توکی نیز حاکی از وجود تفاوت معنی‌داری در سطح آسیب DNA سلولهای کبد در هریک از زمانهای مختلف می‌باشد.

غلظت و میزان شکستگی بافت کبد دارای تاثیر معنی-داری می‌باشند.

تجزیه واریانس دوطرفه نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین میزان درصد شکستگی DNA بافت آبشش در معرض سم مالاتیون با گروه شاهد وجود دارد. همچنین زمان و اثر متقابل غلظت-زمان اثر بسیار معنی داری بر میزان درصد شکستگی DNA داشت (جدول ۲). براساس ارزش F از تجزیه واریانس دوطرفه غلظت اثر قویتری در میزان شکستگی DNA از سایر عوامل داشت.

جدول ۲. تجزیه واریانس دوطرفه اثر غلظت سم مالاتیون و زمان بر شکستگی DNA آبشش ماهی قزل‌آلای رنگین کمان با استفاده از روش میانگین وزنی

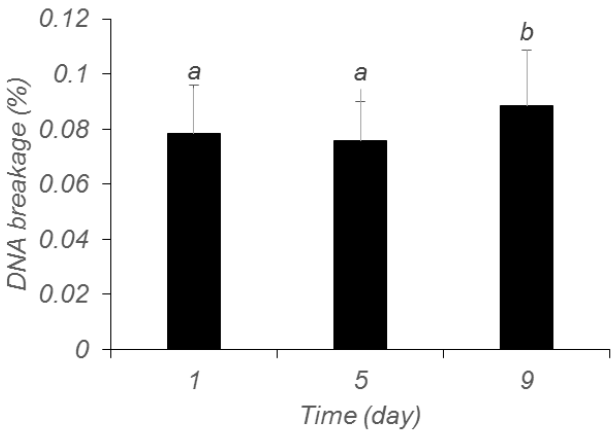
منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	P
غلظت	۰/۰۰۶	۳	۰/۰۰۲	۳۹/۴۹۱	< ۰/۰۰۱
زمان	۰/۰۰۱	۲	۰/۰۰۱	۱۰/۹۱۲	< ۰/۰۰۱
غلظت × زمان	۰/۰۰۳	۶	۰/۰۰۰	۱۰/۰۳۸	< ۰/۰۰۱
خطا	۰/۰۰۱	۲۴	۴/۹۳E-۰۰۵		
کل	۰/۲۴۷	۳۶			



شکل ۴- روند تغییرات در میزان شکستگی DNA در دوزهای مختلف سم طی غلظت در بافت آبشش.

همانطور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود با افزایش غلظت سم میزان شکستگی DNA بیشتر شد که بیشترین آسیب در غلظت ۰/۰۵ مشاهده می‌شود اما تفاوت معنی‌داری با غلظت ۰/۰۷۵ نشان نداد. نتایج حاصل از آزمون توکی نشان داد که اثر غلظت بر روی میزان شکستگی DNA، اثر معنی‌داری در سطح آسیب DNA سلولهای آبشش در معرض غلظتهای مختلف سم در طی زمان داشته است.

همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود با افزایش مدت زمان در معرض ماهیان با سم میزان شکستگی DNA افزایش پیدا کرده که در روز نهم بیشترین آسیب دیده شد البته روز پنجم از روز اول میزان شکستگی کمتر می‌باشد اما تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند. نتایج حاصل از آزمون توکی نشان می‌دهد که اثر مدت زمان مواجهه با سم بر روی میزان آسیب DNA در تیمارهای مورد بررسی در بافت آبشش کاملاً معنی‌دار بوده است.



شکل ۵. روند تغییرات در میزان شکستگی DNA طی زمان در بافت آبشش.

۴. بحث

مطالعه حاضر نشان داد که سطح آسیب DNA در دو بافت کبد و آبشش متفاوت است. به گونه‌ای که بیشترین آسیب در بافت کبد در غلظت ۰/۰۷۵ و آبشش در غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر و هر دو بافت در روز نهم دیده شد. Nwani و همکاران (۲۰۱۰) در مطالعات خود در ماهی *Channa punctatus* در مواجهه با آفت‌کش کربوسولفان ذکر کردند که تفاوت در سطح آسیب DNA بین دو بافت را می‌توان به علت تنوع در تعداد نواحی پایدار بازی که در DNA بافتهای مختلفت متغیر است و همچنین مختلف بودن سطوح پایه آسیب DNA بین انواع سلولها که به علت متنوع بودن فعالیت سیستم ترمیم برشی، فعالیت متابولیک، میزان آنتی اکسیدانها و یا دیگر عوامل ایجاد می‌شود، مرتبط دانست. مطالعات Guilherm و همکاران (۲۰۱۰) بر روی ماهی *Anguila anguila* پس از مواجهه با آفت‌کش رانداپ گلی فسات نشان داد که تفاوت سطح آسیب ژنومی بین بافتی تحت تاثیر عواملی مثل نوع گونه، نوع و غلظت سم و زمان مواجهه با سم دارد و انواع مختلف سلولی در بافتهای مختلف بر حسب مواد آلاینده حساسیتهای متفاونی نسبت به آسیب DNA دارند. بنابراین بافتهای مختلف ماهی ظرفیتهای متفاوتی در نگهداری و تجمع سموم در خود دارند. بالاتر بودن میزان آسیب در بافت کبد را می‌توان به ظرفیت بالای آن در تجمع آلاینده‌ها نسبت داد (Ahmed *et al*., 2013). همچنین این را می توان به ویژگی این بافت در تجمع مواد ژنوبیوتیک و مکان اصلی برای تجزیه سموم نسبت داد. بالاتر بودن سطح آسیب در بافت کبد نشان دهنده حساسیت بالاتر این بافت در زمانهای مختلف نسبت به سم مالاتیون و کاندید نمودن آن به عنوان بیومارکر این سم در این ماهی باشد (Banu *et al*., 2001)، که این نتایج مشابه نتایج Ahmed (۲۰۱۳) می‌باشد. Ali و همکاران با مقایسه دو بافت آبشش و لنفوسیت دریافتند که بیشترین میزان آسیب DNA در بافت آبشش می‌باشد به این خاطر که آبشش اندامی است که بصورت پیوسته و مستقیم در ارتباط با مواد شیمیایی محلول می‌باشد و باعث آسیب DNA می‌شود (Ali *et al*., 2008).

مدت زمان مواجهه با سم اثر معنی‌داری بر روی روند تغییرات در آسیب DNA در بافتهای مورد بررسی داشته است بطوریکه با افزایش دوره مواجهه شاهد تغییراتی در میزان آسیب DNA در هر دو بافت بودیم. نتایج نشان می‌دهد که میزان آسیب DNA در هر دو بافت در روز ۹ افزایش یافته است که احتمال می‌رود که سم مالاتیون در دوزها و زمان مورد بررسی باعث ایجاد پاسخهای آداپتاسیونی نشده و آسیب ناشی از آن مورد ترمیم و دفع مسمومیت قرار نگرفته است که با نتایج مطالعه Henao و همکارانش (۲۰۰۵) روی ماهی تیلاپیا در مواجهه با آفت‌کش سایپرمترین و دیازینون در تضاد است. همچنین در مطالعه‌ای که Sharma و همکاران (۲۰۰۷) بر روی ماهی *Mystus vittatus* انجام دادند بیشتریم میزان آسیب DNA در همه بافتها یک روز پس از مواجهه با

سم مشاهده شد و همچنان که آزمایش ادامه یافت میزان آسیب تا روز هفتم به صورت واضحی کاهش یافت. دو پدیده ترمیم در شکستگی ایجاد شده و از بین رفتن سلولهایی که آسیب زیادی به آنها وارد شده است می‌تواند به مرور زمان باعث کاهش سطح آسیب گردند (Banu *et al.*, 2001). مطالعه‌ای که Aramphongphan و همکاران (۲۰۰۹) انجام دادند نشان داد که میزان آسیب DNA در بافت‌های مختلف متفاوت است و بیشترین آسیب در بافت کبد و پس از ۹۶ ساعت مواجهه با آلاینده مشاهده شد و میزان آسیب در بافت آبشش در زمان کوتاهتری خود را نشان داد.

نتایج نشان می‌دهد که آسیب DNA در دو بافت کبد و آبشش ماهی با افزایش غلظت میزان شکستگی معنی‌دار بوده است اما تفاوت چندانی بین تیمارها مشاهده نمی‌شود و این شاید به این دلیل باشد که اختلاف میان دوزهای مختلف سم آنقدر زیاد نبوده که بتواند سبب ایجاد پاسخ‌های متفاوت گردد. این نتایج با مطالعات Sharma (۲۰۰۷) مشابه است که اختلاف معنی‌داری در میزان آسیب DNA همزمان با افزایش غلظت آفت‌کش اندوسولفان* مشاهده کرد. نتایج مطالعه حاضر با نتایج Bony و همکاران (۲۰۰۸) در تضاد است که افزایش غلظت در میزان آسیب DNA در بررسی آفت‌کش وینیارد بدست آوردند معنی‌دار نبوده است.

مطالعات قبلی در مورد اثرات مواد شیمیایی روی شکستگی دو رشته ای sDNA مبادرت به سنجش شکستگی DNA یا به طور توصیفی به تبیین آسیب یافت شده در رشته DNA نموده است (Black *et al.* 1996). همچنین اخیراً مطالعه‌ای بصورت کمی بر روی شکستگی DNA در ماهی آفانیوس انجام شده است (Poorbagher *et al.*, 2016).

در مطالعه‌ای دیگر Alidoust Salimi و همکاران (۱۳۹۱) اختلاف معنی‌داری در تخریب DNA در مدت چهار روز گزارش کردند که نتایج نشان داد میزان آسیب DNA در نمونه‌های در معرض مالاتیون به طور معنی‌داری بیش‌تر از گروه شاهد است و افزایش غلظت به طور معنی‌داری بر میزان تخریب DNA تاثیر داشته است بطوریکه در روز چهارم بیشترین آسیب مشاهده شد که با مطالعه حاضر مطابقت دارد. در مطالعه حاضر در بالاترین غلظت بیشتریت آسیب DNA دیده شد که با نتایج Kumar و همکاران (۲۰۱۰) مطابقت دارد، آنها نیز اختلاف معنی‌داری در میزان تخریب DNA بین گروه شاهد و تیمارهای در معرض مالاتیون در ماهی *Channa punctatus* مشاهده کردند.

در مطالعات ندایی و همکاران (۱۳۹۲) که تاثیر سم سوین بر روی ماهی آفانیوس انجام شد نتایج نشان داد که اثر زمان بر روی سطح کاملاً معنی‌دار بود و درصد شکستگی DNA با افزایش غلظت سم رابطه معنایی نداشت. بیشترین آسیب در بافت آبشش و کبد در روز نهم مشاهده شد که با افزایش غلظت و مدت زمان میزان آسیب DNA افزایش یافت. همچنین بیشترین میزان آسیب DNA در بافت کبد مشاهده شد که با بعضی از نتایج ما در تضاد هست در مطالعات ما زمان و غلظت هر دو معنی‌دار بود و با بعضی از مطالعات ما مطابقت داشت که با افزایش دوز درصد شکستگی DNA افزایش یافت و بیشترین آسیب در بافت کبد مشاهده شد.

مطالعه حاضر نشان می‌دهد که روش میانگین وزنی می‌تواند برای کمیت شکستگی رشته DNA استفاده شود. ژل الکتروفورز روش حساسی برای تشخیص شکستگی دو رشته DNA در غلظت‌های پایین سم مالاتیون در آبهای سطحی می‌باشد. همچنین این مطالعه نشان داد که ماهی قزل‌آلای رنگین کمان این پتانسیل را دارد که به عنوان یک بیواندیکاتور برای تشخیص مقادیر کم سم مالاتیون در آبهای جاری نزدیک مزارع کشاورزی استفاده شود.

بنابراین می‌توان اینگونه بیان کرد که مطالعه شکستگی DNA علاوه بر یک رشته DNA از دو رشته DNA اطلاعات کاملی به ما می‌دهد. همچنین روش بسیار کم هزینه و ساده می‌باشد و می‌توان در مطالعات سم‌شناسی ژنتیکی و پایش زیستی استفاده کرد همچنین شاخص خوبی برای شناسایی آلاینده‌ها در بوم‌سازگانهای آبی خواهد بود. محدودیتهای مطالعه

[1] Endosoulphan

انجام شـده شامل مدت زمان کوتاه و تعداد کم عوامل و عدم ارزیابی DNA احتمالی می‌باشد.

پیشـنهاد می‌شـود مطالعات بیشـتری در این زمینه صـورت بگیرد که مشـخص شـود آیا ماهی قزل‌آلای رنگین کمان توانایی ترمیم شـکسـتگی DNA را در مـدت زمـان طولانی دارد تا به عنوان نشانگر مالاتیون در آب سطحی استفاده شود.

References

Ahmed, M.K., Kundu, G.K., Al-Mamun, M.H., Sarkar, S.K., Akter, M.S., and Khan, M. S., 2013. Chromium (VI) induced acute toxicity and genotoxicity in freshwater stinging catfish, *Heteropneustes fossilis*. *Journal of Ecotoxicology and environmental safety*, 92, 64-70

Ali, D., Nagpure, N.S., Kumar, S., Kumar, R., and Kushwaha, B., 2008. Genotoxicity assessment of acute exposure of chlorpyrifos to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Journal of Chemosphere*, 71(10), 1823-1831.

Alidoust Salimi, P., Mozdarani, H., Mashynchiyan Moradi, A., Ghavam Mostafavi, P., Alidoust Salimi, M., 2012. The study on genetic toxicity of malathion in common carp (*Cyprinus carpio*) by alkaline comet assay. Special Issue of 12th Iranian Genetics Congress.

Aramphongphan, A., Laovitthayanggoon, S., and Himakoun, L., 2009. Snakehead-fish cell line, SSN-1 (*Ophicephalus striatus*) as a model for cadmium genotoxicity testing. *Journal of Toxicology in Vitro*, 23(5), 963-968.

Baorong, G., Ling, L., Qiujin, Z., Bijin, Z., 2010. Genotoxicity of the pesticide Dichlorvos and Herbicide Butachlor on Rana zhenhaiensis Tadpoles. *Journal of Asian Herpetological Research*. 1(2), 118-122.

Banu, B.S., Danadevi, K., Rahman, M.F., Ahuja, Y.R. and Kaiser, J., 2001. Genotoxic effect of monocrotophos to sentinel species using comet assay. *Food and Chemical Toxicology*, *39*(4), pp.361-366.

Benton, J.M., Malott, M.L., Trybula, J., Dean, D.M., Guttman, S.H.I., 2001. Genetic effects of mercury contamination on aquatic snail populations: Allozyme genotypes and DNA strand brakage. *Journal of Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(3), 584-589.

Black, M.C., Ferrell, J.R., Horning, R.C., Martin, L.K., 1996. DNA strand breakage in freshwater mussels (*Anodonta grandis*) exposed to lead in the laboratory and field. *Environmental Toxicology Chemistry*, 15, 802-808.

Bony, S., Gillet, C., Bouchez, A., Margoum, C. and Devaux, A., 2008. Genotoxic pressure of vineyard pesticides in fish: field and mesocosm surveys. *Aquatic Toxicology*, *89*(3), 197-203.

Buschini, A., Martino, A., Gustavino, B., Monfrinotti, M., Poli, P., Rossi, C., Santoro, M., Dörr, A., Rizzoni, M., 2004. Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization. *Journal of Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 557(2), 119-129.

Davies, P.E., Cook, L.S.J., 1993. Catastrophic macroinvertebrate drift and sublethal effects on brown trout, *Salmo trutta*, caused by cypermethrin spraying on a Tasmanian stream *Aquatic Toxicology*, 27, 201-224.

Garaj-Vrhovac, V., Zeljezic, D., 2000. Evaluation of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides using single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay Pesticide genotoxicity revealed by comet assay. *Journal of Mutation Research*, 469, 279-285.

Guilherme, S., Gaivao, I., Santos, M.A. and Pacheco, M., 2010. European eel (Anguilla anguilla) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup®—a glyphosate-based herbicide. *Mutagenesis*, 25(5), pp.523-530.

Henao, B., Palacio, J.A., Camargo, M., 2005. Evaluación genotóxica de los plaguicidas Cipermetrina y Diazinón en *Tilapia Roja* (Oreochromis sp.). *Journal of Actualidades Biológicas*, 27(82), 43-55.

Jeyaratnam, J., 1990. Acute pesticide poisoning: a major global health problem, World Health *Statistics Quarterly*, 43(3), 139–144.

Jin, Y., Zheng, S., Pu, Y., Shu, L., Sun, L., Liu, W., Fu, Z., 2011. Cypermethrin has the potential to induce hepatic oxidative stress, DNA damage and apoptosis in adult zebrafish (*Danio rerio*), Chemosphere, 82, 398-404.

Kienzler, A., Bony, S., Devaux, A., 2013. DNA repair activity in fish and interest in ecotoxicology: *A review Aquatic Toxicology*, 134, 47-56.

Kumar, A., Sharma, B., Pandey, R.S., 2008. Cypermethrin and λ-cyhalothrin induced alterations innucleic acids and protein contents in a freshwater fish, *Channa punctatus. Fish Physiology Biochemistry*, 34, 331-338.

Kumar, R., Nagpure, N.S., Kushwaha, B., Srivastava, S.K., Lakra, W.S., 2010. Investigation of the Genotoxicity of Malathion to Freshwater Teleost Fish *Channa punctatus* (Bloch) Using the Micronucleus Test and Comet Assay. *Journal of* Archives of Environmental *Contamination and*

Toxicology, 58, 123-130.
Kurelec, B., 1993. The genotoxic disease syndrome. *Journal of Marine Environmental Research*, 35(4), 341-343.
Lee, R.F., Steinert, S., 2003. Use of single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Journal of Mutation research*. 544, 43-64.
Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O., and Remacle, J., 1994. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Journal of Free Radical Biology and Medicine*, 17(3), 235-248.
Mitchelmore, C.L., Chipman, J.K., 1998. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Journal of Mutation research*, 399, 135-14.
Mosesso, P., Angeletti, D., Pepe, G., Pretti, C., Nascetti, G., Bellacima, R., and Jha, A.N., 2012. The use of cyprinodont fish, Aphanius fasciatus, as a sentinel organism to detect complex genotoxic mixtures in the coastal lagoon ecosystem. *Journal of Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 742(1), 31-36.
Nedaei, S.H., Poorbagher, H., Eagderi, S., Farahmand, H., 2013. The effects of Sevin pesticide on DNA breakage and liver, kidney and gill of *Aphanius vladykovi*. MSc thesis, Tehran University. 102 pages.
Nwani, C.D., Lakra, W.S., Nagpure, N.S., Kumar, R., Kushwaha, B. and Srivastava, S.K., 2010. Mutagenic and genotoxic effects of carbosulfan in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Food and Chemical Toxicology*, *48*(1), pp.202-208.
Poorbagher, H., Nasrolah Pourmoghadam, M., Eagderi, S., Farahmand, H., 2016. Estimating the DNA strand breakage using a fuzzy inference system and agarose gel electrophoresis, a case study with toothed carp *Aphanius sophiae* exposed to cypermethrin. *Journal of Ecotoxicology*. DOI: 10.1007/s10646-016-1647-5.
Pandrangi, R., Petras, M., Ralph, S. and Vrzoc, M., 1995. Alkaline Single Cell Gel (Comet) Assay and Genotoxicity Monitoring Using Bulheads and Carp. *Journal of Environmental and Molecular Mutagenesis*, 26, 345-356.
Piri Zirkoohi, M., and Ordog, V., 1997. Effect of some pesticides commonly used in Agriculture on Aquatic food chain. Thesis for Ph.D. degree submitted to the academy of agricultural sciences Budapest- Hungary, pp:1-31.
Safahieh, A., Hedayati, A., Savari, A., and Movahedinia, A., 2011. Effect of sublethal dose of mercury toxicity on liver cells and tissue of yellowfin seabream. *Journal of Toxicology and Industrial Health*: 0748233711416951.
Sharma, S., Nagpure, N.S., Kumar, R., Pandey, S., Srivastava, S.K., Singh, P.J., and Mathur, P.K., 2007. Studies on the genotoxicity of endosulfan in different tissues of fresh water fish *Mystus vittatus* using the comet assay. *Journal of Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 53(4), 617-623.
Yadegariyan, L., Amini Ranjbar, G.H., Ismaili, S., Haji Razzagh, N., Ahghar, A., Darwish Kazem, F., 2004. Evaluation of organophosphorus pesticides residue concentrations in the Neka and Namakabroud rivers. The first National Conference on the Development of Industrial Vegetable Fertilizer and pesticides. Tehran.