مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال چهارم، شماره سوم، پیاپی پانزدهم، زمستان ۱۳۹۴ (۱۱-۱)

اثرات فلز سرب بر پروفایل آنزیمی در برخی بافت‌ها و انتخاب شاخص مناسب در ماهی سفیدک سیستان (*Schizothorax zarudnyi*)

هاشم خندان بارانی[۱*]، محدثه میری[۲]، حسینعلی دهمرده[۳]

۱. مربی، گروه شیلات، پژوهشکده تالاب بین المللی هامون، دانشگاه زابل

۲. **محدثه میری**، مربی و عضو هیأت علمی، پژوهشکده تالاب بین‌المللی هامون، دانشگاه زابل

۳. کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۶/۶ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۱۰/۲۸)

چکیده

آلودگی یک مشکل جهانی با عواقب بسیار خطرناک است. فلزات سنگین یک گروه مهم از این آلاینده‌ها هستند که در اثر فعالیت‌های انسانی و منابع طبیعی وارد اکوسیستم‌های آبی می‌شوند و سلامت جانوران و سیستم را تحت تأثیر قرار می‌دهند. در مطالعه حاضر به بررسی اثر غلظت تحت کشنده فلز سرب (۳۰ روز تحت غلظت ۳ میلی‌گرم بر لیتر) بر فعالیت آنزیم‌های استیل‌کولین‌استراز (AChE)، آلکالین‌فسفاتاز (ALP)، آلانین-آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) و لاکتات دهیدروژناز (LDH) در بافت مغز، آبشش، عضله و کبد ماهی سفیدک سیستان پرداخته شد. نتایج نشان داد سرب می‌تواند فعالیت آنزیم استیل-کولین‌استراز را در آبشش و مغز به طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد مهار کند (p□۰/۰۵). فعالیت آنزیم آلانین‌آمینوترانسفراز در کبد و عضله به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر سرب افزایش یافت (p□۰/۰۵). افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز در کبد و مغز مشاهده شد (p□۰/۰۵). همچنین فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و لاکتات دهیدروژناز تنها در کبد ماهیان قرار گرفته در معرض سرب به طور معنی‌داری افزایش نشان داد (p□۰/۰۵). از این رو قرار گرفتن ماهی سفیدک در معرض سرب منجر به برهمکنش بین فلز و سیستم بیولوژیک ماهی سفیدک شد که نتیجه آن تغییر فعالیت آنزیم‌ها در بافت‌های بدن ماهی بود. فعالیت آنزیم‌ها تحت تأثیر سرب از الگوی کاهشی و افزایشی یکسانی پیروی نکرده و بسته به نوع آنزیم و بافت نتایج متفاوتی مشاهده شد. بنابراین پایش پروفایل آنزیمی در بافت‌های بدن ماهی سفیدک جهت تشخیص سلامتی این ماهی خوراکی و اندام‌های معیوب به علت حضور سرب در محیط مفید می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آلودگی، فلزات سنگین، ماهی سفیدک سیستان، آنزیم‌های بافتی.

* نویسنده مسؤول: E-mail: hashem.barani@UOZ.ac.ir

Effects of lead (heavy metal) on profile enzyme in some tissues and selection of acceptable indices of snow trout (*Schizothorax zarudnyi*)

H. Khandan Barani[1*], M. Miri[2], H. A. Dahmardeh[3]

*1. -Instructor, Department of Fisheries, International Hamoon Wetland Research Institute, University of Zabol

2. -Instructor, Department of Fisheries, International Hamoon Wetland Research Institute, University of Zabol.

3. Former M. Sc. Student, Department of Fisheries, faculity of Natural Resources, University of Zabol

(Received: Aug. 28, 2015 - Accepted: Jan. 18, 2016)

Abstract

Pollution is a world problem with serious consequences. Heavy metals are an important group of these contaminants and enter aquatic ecosystems from anthropogenic and natural sources and animal health and systems are affected. In this study, the effect of lead exposure (3 mg/l concentration, 30 days) on activity of tissue enzymes, including acetyl cholinesterase, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP) and lactate dehydrogenase (LDH) In liver, gills, brain and muscle were studied in Snow trout (*Schizothorax zarudnyi*). The results showed that lead caused a significant inhibition of acetyl cholinesterase in the gills and brain as compared to control group (p□ 0/05). The activity of ALT was increased significantly in the liver and brain homogenates following lead acetate exposure (p□ 0/05). A significant increase in AST activity was observed in the liver and brain (p□ 0/05). Moreover, LDH and ALP activity were increased significantly following lead acetate exposure only in the liver (p□ 0/05). According to this, lead exposure in Snow trout leads to interactions between these metal and biological systems, which could affect metabolic enzyme activities in some tissues.The enzyme activity by lead did not follow the same pattern of increase or decrease and different results were based on enzymes and tissue. Therefore, monitoring of enzymatic profiles in tissues of Snow trout could be useful for identification of overall fish health and organ dysfunction following lead exposure.

Keywords: Pollution, Heavy metals, Snow trout, Tissue enzymes.

مقدمه

امروزه در سراسر جهان ورود ترکیبات آلاینده به محیط زیست رو به افزایش بوده و مشکلات زیادی را برای سلامت موجودات زنده و اکوسیستم‌های طبیعی به ویژه محیط‌های آبی به دنبال داشته است. یک گروه مهم از این آلاینده‌ها فلزات سنگین هستند که به علت پایداری، سمیت و تمایل به تجمع زیستی به عنوان یک خطر برای سلامتی انسان و اکوسیستم‌ها مطرح بوده و آلودگی ناشی از این عناصر به طور جدی مورد توجه قرار گرفته است (Rainbow, 2002). فلزات سنگین دارای ساختار پیچیده‌ای بوده و فعالیت طبیعی سلول‌ها را در بدن جانوران مختل می‌کنند که این امر خود پاسخ‌های متفاوت فیزیولوژیک و بیوشیمیایی را در بدن جانور به دنبال دارد (Gagnon *et al*., 2006). سرب از جمله فلزات سنگین زنوبیوتیک است و به علت اثرات سمی مانند اختلالات عصبی، کلیوی، کبدی، سیستم ایمنی و خونی به خوبی شناخته شده است و آلودگی ناشی از آن بسیار پایدار و فراگیر بوده است (Cory-Slechta, 1995; Moussa & Bashandy, 2008). این فلز می‌تواند در بافت‌های مختلف آبزیان از جمله ماهیان تجمع کرده که نتایج فیزیولوژیک نامطلوب متعددی را در این آبزیان به دنبال دارد (Dai *et al*., 2009).

تغییر فعالیت آنزیم‌ها در آبزیان بویژه ماهیان تحت تأثیر آلاینده‌های محیطی به عنوان نشانگرهای بیوشیمیایی حساس در مطالعات سم شناسی مورد توجه هستند و یکی از استراتژی‌ها و پارامترهای مهم در ارزیابی کیفیت و وجود ترکیبات سمی در محیط بوده و اطلاعات مفیدی را در مورد سلامت محیط فراهم می‌کنند (Brewer *et al*., 2001; Velmurugan *et al*., 2008; Beninca *et al*., 2011). فاکتورهایی همچون حساسیت، ارزان بودن و سهولت آنالیزها و اهمیت اکولوژیک باعث شده که مطالعه آنزیم‌ها افزایش یافته و تبدیل به فاکتورهای مهمی در ارزیابی‌های سمی–اکولوژیک شوند (Nunes, 2011). استیل کولین استراز (AChE)، آلکالین‌فسفاتاز (ALP)، آلانین‌آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارتات-آمینوترانسفراز (AST) و لاکتات دهیدروژناز (LDH) از جمله مهمترین آنزیم‌هایی هستند که نقش بسیار مهمی در فرآیندهای متابولیک بدن و سلامت ماهیان داشته و به عنوان نشانگر زیستی مناسب در مطالعات سم شناسی معرفی شده‌اند (Boge *et al*., 1992 Saenz *et al*., 2010; Beninca *et al*., 2011 Senger *et al*.,2011;).

ماهی سفیدک سیستان از گونه‌های بسیار مهم و ارزشمند کپورماهیان بوده و منحصراً در حوضه آبریز منطقه سیستان وجود دارد و از نظر شیلاتی و بوم شناختی در منطقه از اهمیت زیادی برخوردار است و تلاش‌های گسترده‌ای در جهت بازسازی ذخایر و پرورش این گونه به منظور تولید گوشت در حال انجام است. در سال‌های اخیر زیستگاه این ماهی بومی تحت تأثیر افزایش ورود فاضلاب‌های منابع انسانی در اثر توسعه نسبی روستاها در منطقه و خصوصیات زمین شناختی در معرض خطر گسترش آلودگی‌ها به ویژه فلزات قرار داشته به‌طوری‌که میزان سرب و کادمیوم در این مخازن فراتر از استاندارد سازمان بهداشت جهانی گزارش شده است (Rajaei *et al*., 2010). لذا احتمال تجمع فلزات (از جمله سرب) در اثر تماس طولانی و ایجاد مسمومیت در این ماهی مهم و کم نظیر زیاد بوده و ممکن است فرآیند بازسازی و پرورش آن با اختلال روبرو شود. بر این اساس در مطالعه حاضر تغییرات احتمالی فعالیت آنزیم‌های بافتی مهم شامل آنزیم AChE، ALT، AST، ALP و LDH در مغز، آبشش، کبد و عضله بدن ماهی سفیدک سیستان در اثر قرار گرفتن در معرض سرب بررسی شد تا پاسخ فیزیولوژیک خاص گونه، نحوه عملکرد سرب و تغییرات فعالیت آنزیمی مناسب به عنوان نشانگر زیستی نشان‌دهنده آلودگی ناشی از وجود سرب مشخص شده و در ارزیابی سلامت جانور و محیط مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر در پژوهشکده تالاب بین‌المللی هامون (دانشگاه زابل) انجام شد. ماهیان سفیدک سیستان از کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان گرمابی زهک (وابسته به اداره کل شیلات سیستان) تهیه و به آزمایشگاه پژوهشکده منتقل شدند. برای انجام این آزمایش از ۶۰ قطعه ماهی سفیدک با میانگین وزن ۹/۲±۷۵ گرم استفاده شد. ماهیان جهت سازگاری با شرایط جدید و رفع استرس به مدت دو هفته نگهداری شدند. در طول دوره آزمایش ماهیان دو بار در روز با غذای تجاری (پروتئین ۳۶٪، کربوهیدرات ۳۳٪، چربی ۱۱٪، رطوبت ۸/۵٪، خاکستر ۸٪ و فیبر ۳٪) تا حد سیری غذادهی شدند و روزانه (دوبار) کار سیفون کردن باقیمانده‌های غذا و سایر مواد زائد انجام شد. همچنین در طول این مدت ماهیان از نظر سلامتی مورد بررسی قرار گرفته و سلامتی آنها مورد تایید قرار گرفت. پس از پایان دوره سازگاری ماهیان به طور تصادفی در دو گروه اصلی (هر گروه با سه تکرار و ۱۰ عدد ماهی برای هر تکرار) قرار گرفتند. گروه اول تحت شرایط نرمال (بدون افزودن سرب) نگهداری و به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شدند. گروه دوم به مدت ۳۰ روز در معرض غلظت تحت کشنده سرب (۳ میلی‌گرم در لیتر) قرار گرفتند. غلظت تحت کشنده معادل۱۰٪ غلظت نیمه کشنده (LC50) در نظر گرفته شد (Goida *et al*., 2013). برای تعیین غلظت نیمه‌کشنده فلز سرب از دستورالعمل O.E.C.D در شرایط ساکن آب و روش آماری Probit Analysis در نرم‌افزار TOXSTAT استفاده شد. در این آزمایش از استات سرب (Pb(CH3COO)2) به عنوان ماده مؤثر استفاده گردید (Baghshani & Shahsavani, 2013). آب مخازن برای حفظ غلظت مورد نظر سرب هر دو روز یک بار تعویض گردید (Richetti *et al*., 2011). در طول دوره آزمایش سنجش پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب شامل دما، اکسیژن محلول، pH و سختی کل آب به صورت روزانه انجام شده و بترتیب ۱±۲۴ درجه سانتی‌گراد، ۰/۵±۶/۵ میلی‌گرم بر لیتر، ۰/۳±۷/۵ و ۱۸±۱۹۴ میلی‌گرم در لیتر ثبت شد. این شرایط محیطی برای تمام تیمارها یکسان بود.

آماده سازی بافت‌ها

در پایان دوره آزمایش از هر گروه به طور تصادفی ۹ قطعه ماهی (۳ قطعه از هر تکرار) جهت گرفتن بافت انتخاب شدند و از هر کدام بافت مغز، کبد، آبشش و عضله جدا گردید. بافت‌های جدا شده بر روی یخ به کمک بافر فسفات (100Mm, pH: 7.2) حاوی ۰/۰۵ درصد ترایتون و به کمک دستگاه هموژنایزر همگن‌سازی شدند. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و عصاره رویی حاصل جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم جدا و تا زمان سنجش در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تعیین میزان فعالیت آنزیم‌ها

عصاره بافت‌ها جهت سنجش آنزیم‌های بافتی شامل استیل‌کولین‌استراز، آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP) مورد آنالیز قرار گرفتند. سنجش آنزیم استیل‌کولین‌استراز به روش المن (Ellman *et al*., 1961) و با استفاده از کیت Abcam و آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP) نیز با استفاده از کیت‌های تجاری شرکت پارس آزمون و بر اساس دستورالعمل کیت انجام شد (Shahsavani *et al*., 2010).

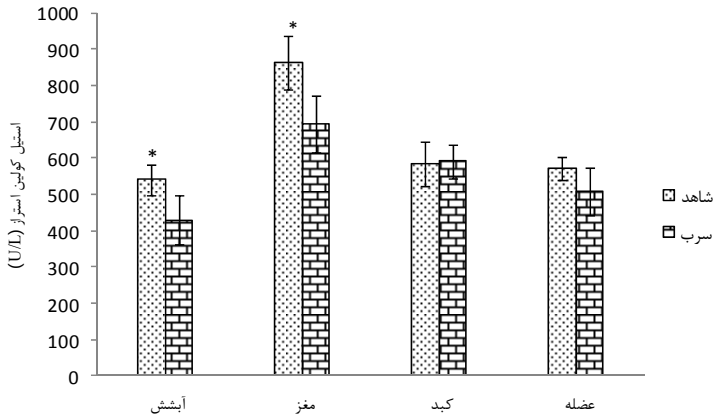
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

ابتدا همگن بودن داده‌ها با آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد و پس از اطمینان از همگن بودن، تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون T-test انجام شد و p□۰/۰۵ به عنوان مرز استنتاج

آماری در نظر گرفته شد. برای انجام کلیه آنالیزهای آماری فوق از نرم‌افزار SPSS(16) استفاده گردید.

نتایج

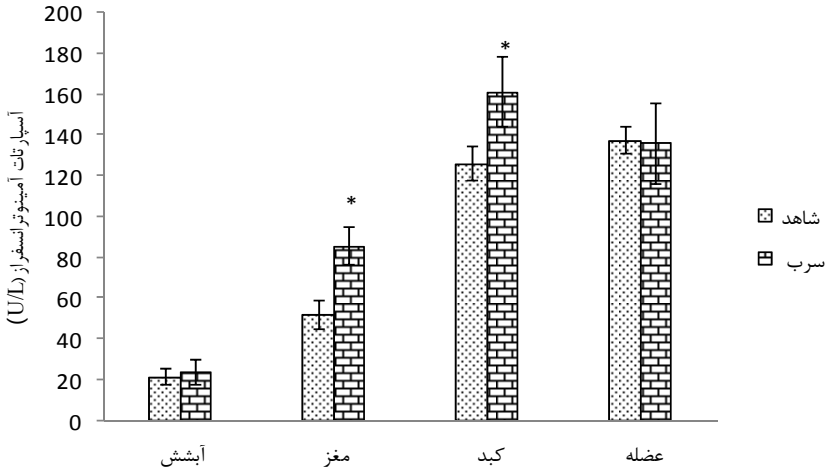
اثر سرب بر آنزیم استیل‌کولین‌استراز در بافت‌های مختلف ماهی سفیدک سیستان نشان داد که سرب توانسته است به طور معنی داری فعالیت استیل-کولین‌استراز را در بافت مغز و آبشش نسبت به گروه شاهد کاهش دهد (p□۰/۰۵) و در سایر بافت‌ها از این نظر بین دو گروه تفاوت معنی داری مشاهده نشد (نمودار ۱). فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز تحت تأثیر فلز سرب در بافت کبد و عضله ماهیان تحت تأثیر سرب به طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش یافت (p□۰/۰۵) و در سایر بافت‌ها بین دو گروه از نظر این آنزیم تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (نمودار ۲). فعالیت آنزیم آسپارتات ترانسفراز در کبد و مغز ماهیان قرار گرفته در معرض سرب نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت (p□۰/۰۵) (نمودار ۳). در ارتباط با آنزیم آلکالین فسفاتاز میزان فعالیت آن در گروه قرار گرفته در معرض سرب تنها در کبد به طور معنی داری افزایش نشان داد (p□۰/۰۵) و در مورد سایر بافت‌ها بین دو گروه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (نمودار ۴). آنزیم لاکتات دهیدروژناز نیز در بافت کبد ماهیان قرار گرفته در معرض سرب نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌دار افزایش یافت (p□۰/۰۵) (نمودار ۵).



نمودار ۱. اثر سرب بر فعالیت آنزیم استیل‌کولین‌استراز در بافت‌های مختلف بدن ماهی سفیدک سیستان
علامت ستاره (*) نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار گروه تحت تأثیر فلز سرب با گروه شاهد است.

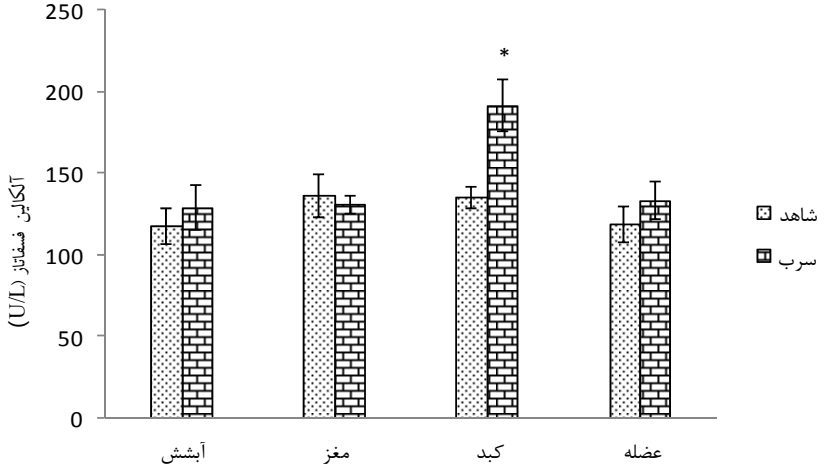
نمودار ۲. اثر سرب بر فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز در بافت‌های مختلف بدن ماهی سفیدک سیستان

علامت ستاره (*) نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار گروه تحت تأثیر فلز سرب با گروه شاهد است.



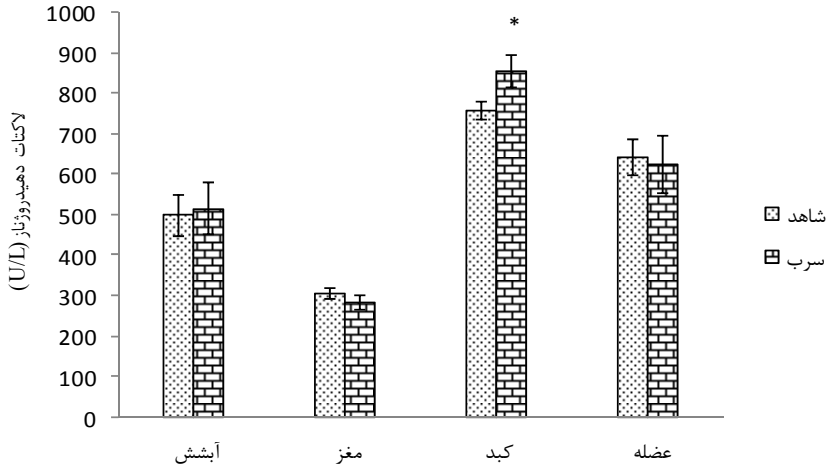
نمودار ۳. اثر سرب بر فعالیت آنزیم آسپارتات آمینو ترانسفراز در بافت‌های مختلف بدن ماهی سفیدک سیستان

علامت ستاره (*) نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار گروه تحت تأثیر فلز سرب با گروه شاهد است.



نمودار ۴. اثر سرب بر فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در بافت‌های مختلف بدن ماهی سفیدک سیستان

علامت ستاره (*) نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار گروه تحت تأثیر فلز سرب با گروه شاهد است.



نمودار ۵. اثر سرب بر فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در بافت‌های مختلف بدن ماهی سفیدک سیستان

علامت ستاره (*) نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار گروه تحت تأثیر فلز سرب با گروه شاهد است.

بحث و نتیجه گیری

آنزیم‌ها برای متابولیسم طبیعی سلول‌ها و سلامتی جانور ضروری هستند و همچنین به عنوان نشانگرهای بیوشیمیایی حساس در هنگام مواجهه با شرایط خطرناک محیطی در ماهیان مورد توجه بوده و پارامترهای مهمی در ارزیابی کیفیت محیطی و وجود ترکیبات سمی هستند (Das *et al*., 2004; Yildirim *et al*., 2006; Gabriel *et al*., 2012). مطالعات متعددی تغییر پارامترهای بیوشیمیایی را در بافت‌های بدن و خون ماهیان مختلف در اثر مواجهه با فلزات سنگین گزارش کرده‌اند (Baghshani & Shahsavani, 2013). در مطالعه حاضر نیز اثر سرب بر فعالیت برخی آنزیم‌های مهم در بافت‌های بدن ماهی سفیدک سیستان مورد مطالعه قرار گرفت. ارزیابی اثر فلز سنگین سرب بر فعالیت آنزیم استیل‌کولین‌استراز نشان داد که غلظت تحت کشنده مورد استفاده برای این فلز باعث کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم استیل‌کولین‌استراز در مغز و آبشش ماهی سفیدک شد. Richetti *et al*. (2011) نیز در مطالعه خود نشان دادند که فعالیت استیل-کولین‌استراز تحت تأثیر سرب در مغز ماهی زبرا به طور معنی‌داری کاهش یافته است که با مطالعه حاضر همخوانی دارد. مطابق با نتایج مطالعه حاضر کاهش فعالیت این آنزیم تحت تأثیر فلزات سنگین در مطالعات دیگر نیز به ثبت رسیده است (Gill *et al*., 1991; De Lima *et al*., 2013). این در حالی است که برخی مطالعات دیگر افزایش فعالیت آنزیم استیل‌کولین را تحت تأثیر فلزات سنگین در گونه‌های مختلف ماهیان (Romani *et al*., 2003; Sant'Anna *et al*., 2011; Gioda *et al*., 2013) و یا عدم تأثیر گذاری فلز (Nemcsok *et al*., 1981; Corsi *et al*., 2004) گزارش کرده‌اند. با توجه به این تفاوت‌های مشاهده شده در پاسخ استیل‌کولین‌استراز نسبت به فلزات سنگین در گونه‌های مختلف می‌توان پاسخ معین گونه‌ای را در برهمکنش استیل‌کولین و فلزات و نوع بافت تحت تأثیر پیشنهاد کرد. کاهش فعالیت آنزیم استیل‌کولین در اثر سرب در مطالعه حاضر را می‌توان به توانایی اتصال این فلز به گیرنده‌های استیل‌کولین و بلوکه شدن اتصال استیل‌کولین و گیرنده‌هایش نسبت داد (Bainy *et al*., 2006). شواهد نشان می‌دهد که فلزات سنگین فرآیند بعد از ترجمه پروتئین که یک مرحله اساسی برای حاصل شدن فعالیت آنزیم می‌باشد را تحت تأثیر قرار می‌دهند. یک عمل نسبت شده به فلزات این است که فلزات مستقیماً با گروه‌های عملکردی پروتئین مانند ایمیدازول، سولفیدریل و کربوکسیل ترکیب شده و فعالیت کاتالیزوری آنزیم به خطر افتاده و در نهایت فعالیت آنزیم مختل می‌شود (Najimi *et al*., 1997) همچنین برخی مطالعات پیشنهاد کرده‌اند که در فرآیند مهار فعالیت آنزیم استیل‌کولین به وسیله فلزات سنگین ایجاد اختلال در متابولیسم یا فیزیولوژی بافت در اثر مسمومیت با فلز نسبت به اثر مستقیم فلز بر گیرنده‌های استیل کولین بیشتر مؤثر می‌باشد و به طور غیر مستقیم در فعالیت آنزیم استیل‌کولین در بافت تأثیر دارند (Richetti *et al*., 2011; De Lima *et al*., 2013).

آنزیم‌های AST و ALT به طور گسترده‌ای در بافت‌های مختلف بدن جانوران وجود داشته و نقش مهمی در متابولیسم کربوهیدرات‌ها و آمینواسیدها دارند. این دو آنزیم به طور متداول جهت تشخیص آسیب بافت‌های ماهیان شامل کبد، آبشش، مغز و عضله مورد استفاده قرار می‌گیرند (Neff, 1985; De La Torre *et al*., 2000; Baghshani & Shahsavani, 2013). در مطالعه حاضر سرب باعث افزایش آنزیم AST در همه بافت‌ها نسبت به گروه شاهد شد و این افزایش در بافت کبد و مغز معنی‌دار بود. همچنین فعالیت آنزیم ALT نیز در کبد و عضله

به طور معنی‌داری افزایش نشان داد. افزایش فعالیت این آمینوترانسفرازها احتمالاً به علت نقش آن‌ها در فراهم آوردن شرایط لازم و کافی جهت فرآیند گلوکونئوژنز و تامین انرژی مورد نیاز جانور در شرایط استرس ناشی از فلزات سنگین بوده و یا می‌تواند به علت آسیب بافتی ناشی از مسمومیت با فلز باشد. در طول دوره استرس ماهیان برای کاهش اثرات سم در بدن نیازمند به صرف انرژی بیشتر هستند. AST و ALT نقش مهمی در متابولیسم پروتئین و آمینواسیدها و فعالیت ترانس‌آمینازها دارند (Atli *et al*., 2006) و افزایش ترانس‌آمینازها یک مکانیسم ایمنی بوده که در مراحل اولیه استرس رخ می‌دهد (Lin *et al*., 1997). افزایش فعالیت این دو آنزیم در بافت کبد ناشی از مسومیت با سرب در ماهی کپور معمولی (Baghshani & Shahsavani, 2013) و تیلاپیا (Dai *et al*., 2009) نیز گزارش شده است که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد. افزایش فعالیت این دو آنزیم به علت مسمومیت با کادمیوم و مس در بافت مغز، آبشش و عضله گربه ماهی آفریقایی نیز ثبت شده است (Velmurugan *et al*., 2008). این در حالی است که Gill *et al.* (1991) کاهش فعالیت این آنزیم‌ها را در بافت کبد، آبشش و کلیه در ماهی*Barbus conchonius* به علت مسمومیت با کادمیوم گزارش کردند. Oner *et al.* (2009) نشان دادند که مسمومیت با فلزات سنگین اگر چه باعث افزایش فعالیت AST در کبد ماهی تیلاپیا شد ولی فعالیت آنزیم ALT در اثر مسمومیت کاهش یافت. لذا با توجه به این نتایج می‌توان بر اساس نوع گونه، فلز و بافت مورد مطالعه نتایج متفاوتی را انتظار داشت.

ALP یک آنزیم متصل به غشا است که منجر به تسریع هیدرولیز یک گروه گسترده از سوبسترای فسفومونواسترها می‌شود و همچنین در شکل گیری استخوان‌ها نقش مهمی دارد (Molina *et al*., 2005). این آنزیم به عنوان یک بیومارکر خوب در مطالعات سم‌شناسی معرفی شده است (Boge *et al*., 1992). در مطالعه حاضر اگر چه سرب باعث افزایش فعالیت این آنزیم در اکثر بافت‌ها شد اما تنها در کبد این تغییر معنی‌دار بود. افزایش این آنزیم احتمالاً یک نوع سازگاری در مقابل سمیت فلزات سنگین می‌باشد. مطابق با نتایج مطالعه حاضر افزایش فعالیت این آنزیم در آبشش، کبد و گنادهای ماهی *Puntius conchonius* به علت مسمومیت با جیوه گزارش شده است (Gill *et al*., 1990). همچنین در ماهی کپور نیز افزایش فعالیت این آنزیم در آبشش و کلیه به علت مواجهه با سرب به ثبت رسیده است (Baghshani & Shahsavani, 2013). Atli & Canli (2007) افزایش فعالیت ALP را تحت تأثیر روی، کادمیوم و مس به ویژه در کبد ماهی تیلاپیا گزارش کردند این در حالی است که Dai *et al.* (2009) کاهش فعالیت آنزیم ALP را به علت قرار گرفتن در معرض سرب در کبد و کلیه ماهی تیلاپیا گزارش کردند که با مطالعه حاضر همخوانی ندارند. علاوه بر این اثر بازدارندگی فلزات سنگین بر فعالیت این آنزیم در نرمتنان نیز گزارش شده است (Gonzalez de Canales & Sarasquete, 1990).

آنزیم LDH به‌عنوان یک آنزیم ترمینال در فرایند گلیکولیز بی‌هوازی در مهره داران عمل می‌کند و در ماهیان جهت تشخیص آسیب بافتی به کار می‌رود (Neff, 1985). در مطالعه حاضر افزایش فعالیت این آنزیم در کبد نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت. مطالعات نتایج متفاوتی را در فعالیت این آنزیم بسته به گونه ماهی، بافت و نوع آلاینده گزارش کرده‌اند. Baghshani & Shahsavani (2013) افزایش فعالیت LDH را تحت تأثیر سرب در کبد ماهی کپور معمولی گزارش کردند. همچنین افزایش فعالیت این آنزیم در بافت کبد، آبشش و قلب ماهی کپور معمولی تحت مسمومیت با آلاینده‌های از قبیل آمونیاک (Abbas, 2006) و مس (Toth *et al*., 1996) ثبت

شده است. این در حالی است که مس باعث کاهش فعالیت این آنزیم در کبد ماهی *Sparus auratus* شده است (Antognelli *et al*., 2003). کاهش معنی‌دار فعالیت این آنزیم نیز در بافت کلیه ماهی تیلاپیا در اثر سرب ثبت شده است در حالی که فعالیت آنزیم مذکور در اثر سرب در کبد افزایش یافته بود (Dai *et al*., 2009). افزایش فعالیت این آنزیم احتمالاً ناشی از تخریب بافت و کاهش میزان اکسیژن و در نتیجه تغییر مسیر گلیکولیز از حالت هوازی به بی‌هوازی در بافت بوده است (Calbreath, 1992).

در مطالعه حاضر بیشتر تغییرات معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های متابولیک در کبد مشاهده شد. کبد بویژه در شرایط نیمه حاد به عنوان بافت هدف در مسمومیت با سرب عمل کرده و تجمع این فلز در کبد باعث تغییرات ساختاری، بیوشیمیایی و بافتی می‌شود (Mudipali, 2007). فعالیت متابولیک زیاد در این ارگان و نقش مهم آن در دفع مواد سمی بدن را می‌توان در تغییر فعالیت بیشتر آنزیم‌ها در این بافت مؤثر دانست. همچنین اختلافات (تناقض‌های) مشاهده شده از اثر فلزات سنگین بر فعالیت آنزیم (های) بافتی در گونه‌های مختلف بافتی می‌تواند به علت تفاوت در گونه، نوع ماده اثر کننده، دوز و زمان در معرض قرار گرفتن و یا سایر عوامل ناشناخته باشد.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر فلز سرب باعث اختلال عملکرد طبیعی ارگان‌های مختلف بدن در ماهی سفیدک سیستان شد زیرا توانست فعالیت آنزیمی را در برخی بافت‌ها تحت تأثیر قرار دهد. فعالیت آنزیم‌ها تحت تأثیر سرب از الگوی کاهشی و افزایشی یکسانی پیروی نکرده و بسته به نوع آنزیم و بافت نتایج متفاوتی مشاهده شد. بنابراین پایش پروفایل آنزیمی در بافت‌های بدن ماهی سفیدک جهت تشخیص سلامتی این ماهی خوراکی و اندام‌های معیوب به علت حضور سرب در محیط مفید می‌باشد. همچنین جهت بررسی آلودگی ناشی از سرب تغییر فعالیت آنزیم استیل‌کولین‌استراز در بافت مغز و آبشش و تغییر فعالیت آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP) در بافت کبد برای ماهی سفیدک سیستان مناسب است. البته تحقیقات بیوشیمیایی و سم‌شناسی گسترده‌تری جهت درک درست از اساس مولکولی تغییرات آنزیم‌های بافتی ناشی از سرب نیاز است.

سپاسگزاری

این مقاله نتیجه انجام یک طرح پژوهشی بوده است که با حمایت پژوهشکده تالاب بین‌المللی هامون (دانشگاه زابل) انجام شده است. لذا نگارندگان بر خود لازم می‌دانند تا از همکاری و مساعدت‌های ریاست محترم پژوهشکده تالاب هامون، جناب آقای دکتر قرایی نهایت تشکر و قدردانی را داشته باشند. همچنین از جناب آقای حیدری مسئول محترم آزمایشگاه گروه شیلات به دلیل همکاری صمیمانه در انجام این طرح، کمال تشکر را داریم.

REFERENCES

Abbas, H.H.; (2006). Acute toxicity of ammonia to common carp fingerling (*Cyprinus carpio*) at different pH levels. Pakistan journal of biological science; 9: 2215-2221.

Antognelli, C.; Romani, R.; Baldracchini, F.; De Santis, A.; Andreani, G.; Talesa, V.; (2003). Different activity of glyoxalase system enzymes in specimens of *Sparus auratus* exposed to sublethal copper concentrations. Chemico-Biological Interactions; 142: 297-305.

Atli, G.; Alptekin, O.; Tukel, S.; Canli, M.; (2006). Response of catalase activity to Ag^{+}, Cd^{2+}, Cr^{6+}, Cu^{2+} and Zn^{2+} in five

tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. Comparative Biochemistry and Physiology; 143: 218-224.

Bainy, A. C. D.; de Medeiros, M. H. G.; Mascio, P. D.; de Almeida, E. A.; (2006). In vivo effects of metals on the acetylcholinesteras e activity of the *Perna perna* mussel's digestive gland. Biotemas; 19: 35-39.

Baghshani, H.; Shahsavani, D.; (2013). Effects of lead acetate exposure on metabolic enzyme

activities in selected tissues of common carp (*Cyprinus carpio*). Comparative Clinical Pathology; 22: 903-907.

Beninca, C.; Ramsdorf, W.; Vicari, T.; de OliveiraRibeiro, C.A.; de Almeida, M.Z.; Silva de Assis, H.C.; (2011) Chronic genetic damages in *Geophagus brasiliensis* exposed to anthropic impact in Estuarine Lakes at Santa Catarina Coast–Southern of Brazil. Environmental Monitoring and Assessment; 184(4): 2045-2056.

Boge, G.; Leydet, M.; Houvet, D.; (1992). The effects of hexavalent chromium on the activity of alkaline phosphatase in the intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic Toxicology; 23: 247-260.

Brewer, S.K.; Little, E.E.; De Lonay, A.J.; Beauvais, S.L.; Jones, S.B.; Ellersieck, M.R.; (2001).Behavioral dysfunctions correlate to altered physiology in rainbow trout (*Oncorynchus mykiss*) exposed to cholinesterase-inhibiting chemicals; 40: 70-76.

Corsi, I.; Bonacci, S.; Santovito, G.; Chiantore, M.; Castagnolo, L.; Focardi, S.; (2004). Cholinesterase activities in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*: tissue expression and effect of $ZnCl_2$ exposure. Marine Environmental Research; 58: 401-406.

Cory-Slechta, D.; (1995). Relationships between lead-induced learning impairments and changes in dopaminergic, cholinergic, and glutamatergic neurotransmitter system functions. Annual Review of Pharmacology and Toxicology; 35: 391-415.

Dai. W.; Fu. L.; Du, H.; Jin, C.; Xu, Z.; (2009). Changes in growth performance, metabolic enzyme activities, and content of Fe, Cu, and Zn in liver and kidney of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to dietary Pb. Biological Trace Element Research;128: 176-183.

Das, P.C.; Ayyappan, S.; Das, B.K.; Jena, J.K.; (2004). Nitrite toxicity in Indian major carps: sublethal effect on selected enzymes in fingerlings of *Catla catla*, *Labeo rohita* and *Cirrhinos mrigala*. Comparative Biochemistry and Physiology; 138: 3-10.

De La Torre, F.R.; Salibian, A.; Ferrari, L.; (2000). Biomarkers assessment in juvenile *Cyprinus carpio* exposed to waterborne cadmium. Environmental Pollution; 109: 277-282.

De Lima, D.; Roque, G.M.; de Almeida, E.A.; (2013). In vitro and in vivo inhibition of acetylcholinesterase and carboxylesterase by metals in zebrafish (*Danio rerio*). Marine Environmental Research; 91: 45-51.

Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres, V. J.; (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology; 7: 88-95.

Gabriel, U.U.; Akinrotimi, O.A.; Ariweriokuma, V.S.; (2012). Changes in metabolic enzymes activities in selected organs and tissue of *Clarias gariepinus* exposed to cypermethrin. Chemical Engineering; 1: 25-30.

Gagnon, A.; Jumarie. C.; Hontela, A.; (2006). Effects of Cu on plasma cortisol and cortisol secretion by adrenocortical cells of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquatic Toxicology; 78: 59-65

Gill, T.S.; Tewari, H.; Pande, J.; (1990). Use of the fish enzyme system in monitoring water quality: effects of mercury on tissue enzymes. Comparative Biochemistry and

Physiology; 97: 287-292.

Gill, T.S.; Tewari, H.; Pande, J.; (1991). In vivo and in vitro effects of cadmium on selected enzymes in different organs of the fish Barbus conchonius Ham. (*rosy barb*). Comparative Biochemistry and Physiology; 100: 501-505.

Gioda, C.R.; Loro, V.L.; Pretto, A.; Salbego, J.; Dressler, V.; Flores, E.M.M.; (2013). Sublethal Zinc and copper exposure affect acetyl cholinesterase activity and accumulation in different tissues of *Leporinus obtusidens*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology; 90: 12-16.

Gonzalez de Canales, M.L.; Sarasquete, M.C.; (1990). Hydrolytic enzymes of the digestive tract in clams *Ruditapes decussates* and *Ruditapes philippinarum*. Scientia Marina; 54: 89-93.

Lin, L.; Yang, Y.J.; Yang, S.S.; Leu, M.L; (1997). Aluminium utensile contribute to aluminium accumulation in patients with renal disease. American Journal of idney Diseases; 30: 653-658.

Molina, R.; Moreno, I.; Pichardo, S.; Jos, A.; Moyano, R.; Monterde, J.G.; Camean, A.; (2005). Acid and alkaline phosphatase activities and pathological changes induced in Tilapia fish (*Oreochromis sp.*) exposed subchronically to microcystins from toxic cyanobacterial blooms under laboratory conditions. Toxicon; 46: 725-735.

Mudipali, A.; (2007). Lead hepatotoxicity and potential health effect. Indian Journal of Medical Research; 126: 518-527.

Moussa, S.A.; Bashandy, S.A.; (2008). Biophysical and biochemical changes in the blood of rats exposed to lead toxicity. Romanian Journal of Biophysics; 18: 123-133.

Najimi, S.; Bouhaimi, A.; Daubèze, M.; Zekhnini, A.; Pellerin, J.; Narbonne, J.F.; *et al.*; (1997). Use of acetylcholinesterase in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of pollution in Agadir marine bay (South of Morocco). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology; 58: 901-908.

Neff, J.M.; (1985). Use of biochemical measurements to detect pollutantmediated damage to fish. In: Cardwell RD, Purdy R, Bahner RC (eds) Aquatic Toxicology and Hazard ssessment: Seventh Symposium, Philadelphia, pp 155–183.

Nemcsok, J.; Benedezky, I.; Borors, L.; Asztalos, B.; Orbain, L.; (1981). Subcellular localiza-tion of transamination enzymes in fishes and their significance in the detection of water pollution. Acta Biologica Szegediensis; 27: 9-15

Nunes, B.; (2011). The use of cholinesterases in ecotoxicology. Reviews Environmental Contamination and Toxicology; 212: 29-59.

Oner, M.; Atli, G.; Canli, M.; (2009). Effects of metal (Ag, Cd, Cr, Cu, Zn) exposures on some enzymatic and non-enzymatic indicators in the liver of *Oreochromis niloticus*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology; 82: 317-321.

Rainbow, P.S.; (2002). Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? Environmental Pollution; 120: 497-507.

Rajaei, Q.; Jahantigh, H.; Mir, A.; Hesari Motlagh, S.; Hasanpour, M.; (2012). Evaluation of concentration of heavy metals in Chahnimeh water reservoirs of Sistan-va-Baloochestan. Mazandaran University Medicine Scince; 22: 105-112.

Richetti, S.K.; Rosemberg, D.B.; Ventura-Lima, J.; Monserrat, J.M.; Bogo, M.R.; Bonan, C.D.; (2011). Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. Neuro Toxicology; 32: 116-122.

Romani, R.; Antognelli, C.; Baldracchini,

F.; Santis, A.; Isani, G.; Giovannini, E.; Rosi, G.; (2003). Increased acetylcholinesterase activities in specimens of *Sparus auratus* exposed to sublethal copper concentrations. Chemico-Biological Interactions; 145: 321-329.

Saenz, L.A.; Seibert, E.L.; Zanette, J.; Fiedler, H.D.; Curtius, A.J.; Ferreira, J.F.; (2010). Biochemical biomarkers and metals in Perna perna mussels from mariculture zones of Santa Catarina, Brazil. Ecotoxicology and environmental safety; 73: 796-804.

Shahsavani, D.; Mohri, M.; Kanani, H.G.; (2010). Determination of normal values of some blood serum enzymes in *Acipenser stellatus Pallas*. Fish Physiology and Biochemistry; 36: 39-43.

Sant'Anna, M. C. B.; de Matas Soares, V.; Seibt, K.J.; Ghisleni, G.; Rico, P.E.; Rosemberg, B.D.; de Oliveira, J.R.; Schroder, N.; Bonan, C.D.; Bogo, R.M.; (2011). Iron exposure modifies acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*) tissues: distinct susceptibility of tissues to iron overload. Fish Physiology Biochemistry; 37: 573-581.

Senger, M.R.; Seibt, K.J.; Ghisleni, G.C.; Dias, R.D.; Bogo, M.R.; Bonan, C.D.; (2011). Aluminum exposure alters behavioral parameters and increases acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*) brain. Cell Biology and Toxicology; 27:199-205.

Toth L.; Juhasz, M.; Varga, T.; Csikkel-Szolnoki, A.; Nemcsok, J.; (1996). Some effects of $CuSO_4$ on carp. Environmental Science and Health; 31: 627-635.

Velmurugan, B.; Selvanayagam, M.; Cengiz, E.I.; Uysal, E.; (2008). Levels of transaminases, alkaline phosphatase, and protein in tissues of *Clarias gariepienus* fingerlings exposed to sublethal concentrations of cadmium chloride. Environmental Toxicology; 23: 672-678.

Yildirim, M.Z.; Benli, K.C.; Selvi, M.; Ozkul, A.; Erko, F.; Kocak, O.; (2006). Acute toxicity behavioural changes and histopathological effects of deltamethrin on tissues (gills, liver, brain, spleen, kidney, muscle, skin) of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. Environmental Toxicology; 21: 614-620.