دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال نوزدهم، شماره ۵، صفحه ۷۹۸ - ۷۸۷ (آذر و دی ۱۳۹۵)

Iran South Med J 2016; 19(5): 787-798

اثرات ترکیب بنزو–آ– پایرن بر میزان فعالیت آنزیم اتوکسی رزورفین– او– د اتیلاز و آسیب‌های ژنومی در ماهی جاوا مداکا (*Oryzias javanicus*)

دارا باقری [۱*]، جیرو کویاما [۲]

[۱] گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج‌فارس، بوشهر، ایران
[۲] مرکز آموزش و تحقیقات منابع دریایی و محیط زیست، دانشکده شیلات، دانشگاه کاگوشیما، ژاپن

(دریافت مقاله: ۹۴/۶/۱۹- پذیرش مقاله: ۹۴/۸/۲۶)

چکیده

زمینه: بنزو- آ- پایرن یک ترکیب هیدروکربنه حلقوی چند زنجیره معطر با وزن مولکولی بالا بوده که اثرات سرطان‌زایی بالایی دارد. لذا هدف این مطالعه بررسی اثرات ترکیب بنزو- آ- پایرن بر القاء فعالیت آنزیم EROD کبدی و شکست رشته‌های DNA کبد در ماهی مداکا است.

مواد و روش‌ها: ۲۳ عدد ماهی مداکا پس از انتقال به آکواریوم‌های ۱۰ لیتری به مدت ۷ روز در چهار گروه شامل گروه کنترل، با غلظت کم (۰/۵ میکروگرم در لیتر)، غلظت متوسط (۱/۵ میکروگرم در لیتر) و غلظت بالا (۵ میکروگرم در لیتر) به روش سمی استاتیک در معرض ترکیب بنزو-آ- پایرن قرار گرفتند. در روز هفتم نمونه‌برداری از کبد ماهیان انجام شده و بخشی از نمونه‌ها بلافاصله هموژن شدند و برای سنجش آنزیم EROD مورد استفاده قرار گرفت. قسمت دیگر از نمونه‌های کبدی پس از انتقال به فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد جهت سنجش میزان یکپارچگی ساختار DNA مورد استفاده قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون دانکن انجام شد. سطح اعتماد ۵ درصد ($P<0/05$) به عنوان سطح معنی‌داری آماری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: افزایش معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم EROD بین تیمارهای آزمایش نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. هرچند ماهی‌هایی که در معرض بیشترین غلظت (۵ میکروگرم در لیتر) بنزو- آ- پایرن قرار گرفته بودند، میزان شکستگی DNA بالاتری داشتند با این حال تفاوت معنی‌داری در میزان شکستگی رشته‌های DNA در بین تیمارهای مورد مطالعه نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: ترکیب بنزو- آ- پایرن سبب افزایش فعالیت آنزیم EROD کبدی از آنزیم‌های فاز I سیستم سم‌زدایی ترکیبات هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای در ماهیان مداکا می‌گردد. با این حال به نظر می‌رسد ماهیان مداکا دارای مکانیسم‌های ترمیمی و جلوگیری کننده از شکست رشته‌های DNA هستند.

واژگان کلیدی: بنزو- آ- پایرن، ماهی مداکا، آنزیم EROD، یکپارچگی ساختار DNA

* بوشهر، گروه شیلات دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه خلیج فارس

E-mail: dara.bagheri@pgu.ac.ir

مقدمه

ماهیان در سطوح مختلف زنجیره غذایی بوم سازگان‌های آبی حضور داشته و نقش مهمی در امنیت غذایی انسان دارند. در چند قرن اخیر با صنعتی شدن کشورها، آلاینده‌های زیادی از طریق روان آب‌های مختلف وارد بوم سازگان‌های آبی شدند. یکی از مهم‌ترین منابع آلاینده‌ساز در اکوسیستم‌های آبی آلاینده‌های نفتی می‌باشند. نفت خام مخلوطی پیچیده شامل ده‌ها هزار ترکیب مختلف می‌باشد؛ ترکیبات هیدروکربنه عمده‌ترین ترکیب نفتی به شمار می‌روند و بیش از ۷۵ درصد نفت خام را تشکیل می‌دهند (۱). این هیدروکربن‌ها شامل ترکیبات اشباع شده نظیر آلکان‌ها و آلکان‌های حلقوی، آلفین‌های غیراشباع، ترکیبات منو و پلی‌آروماتیک و ترکیبات قطبی می‌باشند. هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای به علت حضور در ترکیبات نفتی، زغال سنگ و روغن‌های موتور از مهم‌ترین آلاینده‌های محیطی به شمار می‌روند (۲ و ۳). در این میان هیدروکربن‌های آروماتیک تک حلقه‌ای مانند بنزن، تولوئن و فنل و همچنین هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (PAHs) به علت اثرات ژنوتوکسیک و جهش‌زایی دارای تأثیرات جدی و دراز مدتی بر محیط زیست می‌باشند (۴). جذب ترکیبات هیدروکربنه محلول در آب توسط آبزیان می‌تواند منجر به ایجاد پاسخ‌های فیزیولوژیکی متعددی شود (۵). از آنجا که مواد شیمیایی دارای پتانسیل ژنوتوکسیک با اتصال به مولکول‌های DNA سبب ایجاد انواعی از تغییرات زیستی نظیر تخریب عملکرد آنزیمی، اختلال در متابولیسم عمومی، سمیت سلولی، اخلال در سیستم ایمنی، آسیب به سیستم تولید مثل ، بازدارندگی رشد و سرطان در ماهی می‌شوند (۶)، لذا امروزه از پاسخ‌های فیزیولوژیک آبزیان جهت بررسی اثرات آلاینده‌ها بر ماهیان در بوم سازگان‌های آبی استفاده می‌شود.

دگرگونی زیستی و متابولیسم ترکیبات هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی اغلب از طریق گیرنده‌های آریل هیدروکربنه و آنزیم‌های خانواده سیتوکروم انجام می‌شود. القاء آنزیم‌های فاز یک سیستم سم‌زدایی در ماهیان به ویژه آنزیم CYP1A1 و آنزیم EROD به عنوان شاخص در معرض آلاینده قرار گرفتن ماهیان به ویژه در مورد هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای به شمار می‌رود (۴ و ۷). سیتوکروم P450 اضافه کردن اکسیژن به مواد را کاتالیز کرده که در این فرایند اکسیژن مولکولی را به یک ترکیب حد واسط رادیکال آزاد تبدیل می‌کند که از نظر تعداد الکترون و واکنش‌پذیری معادل با یک اتم اکسیژن است. در اغلب موارد ترکیبات الکترون دوست ایجاد شده در اثر سیستم سم‌زدائی فاز I قادر به ایجاد پیوند کووالانسی با ترکیبات نوکلئوفیلی نظیر DNA و RNA می‌باشند (۸).

ترکیب هیدروکربن آروماتیک حلقوی بنزو آ پایرن به‌عنوان یک ترکیب جهش‌زا در مهره‌داران به شمار می‌رود. توانایی این ترکیب در تغییر ساختار DNA مدت‌ها پیش مورد تأئید قرار گرفته است (۹). بنزو آ پایرین یک ترکیب شیمیایی ژنوتوکسیک بوده که قادر به القاء آنزیم‌های فاز I سیستم سم‌زدایی سلولی می‌باشد که در فرایند شکسته شدن تولید متابولیت‌های فعال می‌کند که می‌توانند سبب تخریب DNA شوند (۱۰). چندین مطالعه، القاء فعالیت آنزیم‌های سیتوکروم P450 به ویژه زیر خانواده CYP1A را در آبزیانی که در معرض آلاینده‌هایی نظیر PAHs و PCBs قرار گرفته‌اند، تأئید کرده‌اند (۱۳-۱۱). ناهنجاری‌های ساختاری DNA، شکستگی و تک رشته‌ای شدن

DNA، نیز از عمده‌ترین اختلالات ایجاد شده در اثر حضور آلاینده‌ها بوده و به عنوان آسیب‌های مستعد سرطان‌زایی به شمار می‌روند (۱۴). از این رو بررسی تغییرات ساختار DNA و هسته سلول در آبزیان یک ابزار مناسب و یکی از نشانگرهای مفید در ارزیابی اثرات ژنوتوکسیک مزمن آلاینده‌های محیطی به منظور بررسی حضور آلاینده‌ها در محیط به شمار می‌رود.

میزان فعالیت آنزیم CYP1A به طور مستقیم و یا از طریق سنجش فعالیت کاتالیزی آنزیم EROD قابل اندازه‌گیری است. تکنیک‌های مختلف بیوشیمیایی با مکانیسم‌های متفاوت در شرایط مختلف جهت سنجش میزان شکست رشته‌های DNA در آبزیان مورد استفاده قرار می‌گیرد که از جمله این تکنیک‌ها می‌توان به کامت اسی (comet assay) و واسرشته سازی قلیایی (DNA alkaline unwinding assay) و جداسازی با هیدروکسی آپاتیت اشاره نمود.

ماهی *Oryzias javanicus* یک ماهی آب‌های لب شور است که بومی نواحی Malay Peninsula تا قسمت‌های ساحلی جاکارتا در قسمت غربی دریای جاوه بوده و در لایه‌های سطحی آب زیست می‌کند. اندازه این ماهی حداکثر به ۴ سانتی‌متر رسیده و فاقد ارزش اقتصادی می‌باشد. به علت توانایی بالای این ماهی در تحمل شوری‌های مختلف و نیز دوره بلوغ جنسی سریع (حدود ۱۰۰ روز) یکی از گزینه‌های مهم در انجام مطالعات سم‌شناسی آبزیان و نیز پایش محیطی اکوسیستم‌های آبی به شمار می‌رود (۱۵).

هدف مطالعه حاضر بررسی اثرات ترکیب هیدروکربنه بنزو آ پایرن بر تغییرات نشانگرهای زیستی(از جمله آنزیم EROD) در مواجهه با آلاینده‌های شیمیایی است. همچنین نشانگر تأثیرپذیری (یکپارچگی ساختار DNA کبدی) ماهی از آلاینده‌ها، به عنوان محل اصلی متابولیسم ترکیبات زنوبایوتیک در مهره‌داران و ماهیان از جمله ماهی جاوا مداکا به منظور بررسی امکان استفاده از این نشانگرها در شرایط طبیعی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

طرح آزمایش

این آزمایش در آزمایشگاه مرکز تحقیقات منابع دریایی و محیط زیست دانشکده شیلات دانشگاه کاگوشیما ژاپن انجام گردید. در این مطالعه ۲۳ ماهی جاوا مداکا به مدت هفت روز در آکواریوم‌های ۱۰ لیتری، دمای ثابت ۲۶ درجه سانتی‌گراد، شوری ۳۵ گرم در لیتر، شرایط نور طبیعی و هوادهی مداوم در معرض چهار تیمار آزمایشی شامل گروه کنترل، غلظت پایین (۰/۵ میکروگرم در لیتر)، متوسط (۱/۵ میکروگرم در لیتر) و بالا (۵ میکروگرم در لیتر) به روش Semi-static (در این روش آب محیط نگهداری ماهیان به صورت دوره‌ای تعویض می‌گردد) در معرض ترکیب بنزو- آ- پایرن قرار داده شدند. از آنجا که میزان حلالیت ترکیب بنزو- آ- پایرن در آب کم است از حلال DMSO برای حل کردن بنزو- آ- پایرن در آب استفاده گردید. گروه کنترل نیز به اندازه سایر تیمارها (۱۲ میکرولیتر) DMSO دریافت کرد. تعویض آب در روز سوم انجام گردید. همچنین ماهیان در طی دوره آزمایش غذادهی نشدند.

استخراج و سنجش ترکیب بنزو-آ-پایرن

نمونه‌برداری از آب تیمارهای آزمایشی جهت سنجش میزان غلظت ترکیب بنزو- آ- پایرن، با دو تکرار در روز اول، روز سوم و روز هفتم قبل و بعد از تعویض آب انجام گردید. بنزو- آ- پایرن حل شده در آب با استفاده از حلال های دی کلرومتان و ان هگزان استخراج شد

(۱۶). در نهایت یک میکرو لیتر بنزو- آ- پایرن استخراج شده به دستگاه (Agilent 7683B automatic sampler)GC-MS تزریق شد.

نمونه‌برداری از ماهیان

نمونه‌برداری از کبد ماهیان در روز هفتم پس از بیهوش کردن ماهیان انجام گرفت. بلافاصله پس از نمونه‌برداری یک قسمت از کبد ماهیان (شامل ۵-۴ عدد) به آرامی با استفاده از بافر فسفات سرد شستشو و به منظور سنجش میزان شکستگی DNA در فریزر ۸۰- نگهداری شد. همچنین بخشی از بافت کبد پس از هموژن شدن با دستگاه هموژنایزر دستی در بافر کلرید پتاسیم برای سنجش میزان فعالیت آنزیم EROD مورد استفاده قرار گرفت.

سنجش آنزیم EROD

در روز هفتم ماهیان هر تیمار تشریح و نمونه‌برداری از کبد ماهیان بر روی یخ انجام شد. سه تا پنج عدد کبد هر کدام با وزن حدود پنج میلی‌گرم پس از شستشو در بافر کلرید پتاسیم ۱/۱۵ درصد که دارای ۲۰ درصد گلیسیرین بود شستشو و هموژن شدند. نمونه‌های هموژن شده به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۲۵۰۰ دور در دقیقه سانترفیوژ شده و لایه‌رویی برای سنجش میزان آنزیم EROD مورد استفاده قرار گرفت. سنجش آنزیم EROD با استفاده از روش Eggens ML and Galgani (۱۷) با تغییرات جزئی انجام شد. به طور خلاصه ۲۵ میکرولیتر بافت هموژن شده در پلیت فلورسنس ۹۶ خانه ریخته شده و سپس ۳۰۰ میکرولیتر محلول اتوکسی رزورفین ۲ میکرو مولار به هر چاهک اضافه شد، واکنش کاهش اتوکسی رزورفین با اضافه شدن ۱۰ میکرولیتر NADPH دو میلی‌مولار آغاز شد. میزان رزورفین تشکیل شده در واکنش به مدت ۶۰ دقیقه و در فواصل ۱۰ دقیقه‌ای در طول موج‌های برانگیختگی (Excitation) ۵۳۰ و بازنشر (Emission) ۵۸۵ نانومتر با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر مدل MTP 32(Corona Electric ،Ibaraki ،Japan) به دست آمد. از ترکیب رزورفین به عنوان استاندارد برای محاسبه میزان فعالیت ویژه آنزیم EROD استفاده شد. نتایج بر اساس واحد نانو مول در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

یکپارچگی ساختار رشته‌های DNA

یکپارچگی ساختار DNA می‌تواند تحت تأثیر ترکیبات ژنوتوکسیک قرار گیرد. تعیین میزان شکست DNA با استفاده از روش Alkaline unwinding assay مورد سنجش قرار گرفت (۱۸). Alkaline unwinding assay یکی از حساس‌ترین تکنیک‌ها برای سنجش میزان تخریب DNA به شمار می‌رود. اساس این تکنیک جدا شدن رشته‌های DNA با بکارگیری هیدروکسی آپاتیت و اتصال رنگ فلورسنس اختصاصی به رشته‌های DNA می‌باشد، هرچه میزان شکستگی تک رشته‌های DNA بیشتر باشد اتصال بیشتری با رنگ فلورسانس در مقایسه با رشته‌های DNA کامل ایجاد می‌شود. میزان غلظت DNA دو رشته‌ای و تک رشته‌ای را با استفاده از خاصیت اتصال رنگ فلورسنس Hoechst به DNA در طول موج‌های (ex)۳۶۰ و (em)۴۵۰ نانومتر به دست آمد.

میزان آسیب‌پذیری DNA با استفاده از رابطه ذیل محاسبه و براساس F values بیان شد.

F=ds/(ds+ss)

F=ds/(ds+ss)

که در این رابطه ds میزان فلورسنس ایجاد شده در محلول حاوی DNA دو رشته‌ای و ss میزان فلورسنس ایجاد شده ناشی از محلول DNA تک رشته‌ای استخراج شده می‌باشد.

سنجش پروتئین

میزان پروتئین کل با استفاده از کیت تجاری بیو- راد (BioRad ،Hercules ،USA) ساخت کشور امریکا انجام گردید. از سرم آلبومین گاوی به عنوان استاندارد استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

ابتدا میزان نرمال بودن داده‌ها و همگنی واریانس به ترتیب با استفاده از آزمون کولموگروف- اسمیرنوف (Kolmogrov-smirnov) و آزمون لون (Leven test) مورد سنجش قرار گرفت. وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای آزمایشی از نظر شکستگی DNA، تغییرات آنزیم EROD کبدی با استفاده از آنالیز واریانس ANOVA مورد بررسی قرار گرفت و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن (Duncan) (α=۰/۰۵) استفاده گردید (۱۹). نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شد. تمامی آزمون‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۹ انجام شد ونمودارها با استفاده نرم‌افزار Excel رسم گردید.

یافته‌ها

غلظت بنزو- آ- پایرن محلول در آب تیمارهای آزمایشی

تفاوت معنی‌داری در میزان شوری و اکسیژن محلول و سایر فاکتورهای فیزیکوشیمی در بین تیمارهای مورد بررسی مشاهده نشد. میزان بنزو-آ-پایرن محلول در آب گروه‌های آزمایشی در جدول ۱ نشان داده شده است. بر این اساس در ابتدای حل نمودن ترکیب بنزو-آ-پایرن در گروه کنترل غلظت بنزو-آ- پایرن کمتر از سطح قابل سنجش بود (یک نانوگرم در لیتر)، در حالی که در سایر تیمارها میزان حلالیت این ترکیب در آب تیمارهای آزمایشی در روز حل کردن ترکیب بنزو-آ-پایرن به ترتیب ۲۰۷/۶۷، ۸۴۱/۸۲، ۳۱۲۰/۷۷ نانو گرم در لیتر به دست آمد. در روز سوم و پس از تعویض آب تیمارهای آزمایشی بار دیگر اقدام به سنجش میزان بنزو-آ- پایرن موجود در آب گردید. در انتهای روز سوم و هفتم قبل از تعویض آب، میانگین سطح بنزو-آ- پایرن در تیمارهای آزمایشی به ترتیب به ۱۲/۳۵، ۲۷/۰۵، ۷۰/۷ نانوگرم در لیتر کاهش پیدا کرد.

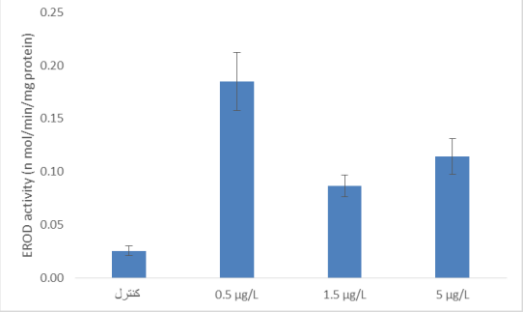
از میانگین هندسی برای تعیین متوسط غلظت بنزو-آ-پایرن محلول در آب تیمارهای مورد مطالعه استفاده گردید. بر این اساس میانگین غلظت این ترکیب در تیمارهای مورد مطالعه به ترتیب ۴۸/۵، ۱۵۰/۸، ۴۶۹/۵ نانوگرم در لیتر به دست آمد (جدول ۱).

جدول ۱) میانگین غلظت بنزو-آ-پایرن محلول در آب تیمارهای مورد آزمایش (نانوگرم در لیتر)

تیمارهای آزمایشی	میانگین غلظت بعد از حل کردن بنزو-آ-پایرن	میانگین غلظت قبل از تعویض آب و نمونه برداری	میانگین هندسی
غلظت کم	۲۰۷/۶۷	۱۲/۳۵	۴۸/۵
غلظت متوسط	۸۴۱/۸۲	۲۷/۰۵	۱۵۰/۸
غلظت بالا	۳۱۲۰/۷۷	۷۰/۷	۴۶۹/۵

فعالیت آنزیم EROD

میزان فعالیت آنزیم EROD کبدی ماهیان مداکا در تیمارهای مورد مطالعه در نمودار ۱ نشان داده شده است. نتایج حاصله مشخص ساخت که ترکیب بنزو-آ- پایرن قادر به القاء شدید در میزان فعالیت آنزیم EROD کبدی در ماهیان مداکا است. کمترین میزان فعالیت آنزیم EROD در گروه کنترل مشاهده شد (۰۲۵۴/±۰۰۴۶/ نانو مول در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین)، در حالی که گروه ماهیانی که در معرض ترکیب بنزو-آ-پایرن با غلظت کم (۴۸/۵ نانو گرم در لیتر) قرار گرفته بودند، بیشترین میزان فعالیت آنزیم EROD را نشان دادند (۱۸۴/±۰۲۷/). تفاوت معنی‌داری بین میزان فعالیت آنزیم EROD کبدی در گروه کنترل با سایر گروه‌های آزمایشی مشاهده شد (P<۰/۰۵). تفاوت معنی‌داری بین میزان فعالیت آنزیم EROD کبدی در ماهیانی که در معرض ۴۸/۵ نانوگرم در لیتر بنزو-آ-پایرن قرار گرفته بودند با تیمارهای با سطوح بالاتر این ترکیب مشاهده شد (نمودار ۱).

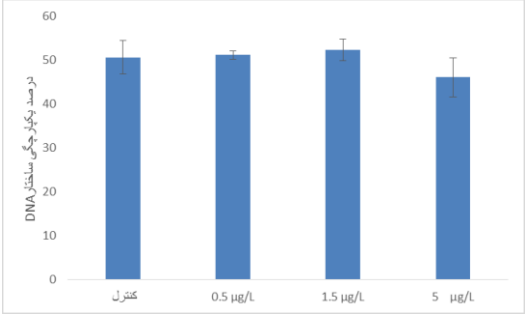


نمودار ۱) فعالیت آنزیم EROD کبدی (نانومول در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) ماهیان مداکا در معرض بنزوا پایرن (میانگین± انحراف معیار)

Fig.1) Liver EROD activity (nmol resorfin/min/mgPr) in medaka fish exposed to Benzo (a) pyrene (Min ± SD)

یکپارچگی ساختار DNA

میزان یکپارچگی ساختار DNA در نمودار ۲ نشان داده شده است. نتایج حاصل از بررسی شکستگی DNA در تیمارهای مورد مطالعه نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین گروه کنترل با سایر گروه‌ها وجود ندارد، با این حال کمترین میزان یکپارچگی ساختار DNA در ماهیانی که در معرض بیشترین میزان بنزو-آ-پایرن قرار داشتند، مشاهده می‌گردد (نمودار ۲).



نمودار ۲) یکپارچگی ساختار DNA کبدی (٪) ماهیان مداکا در معرض بنزو ا پایرن (میانگین± انحراف معیار)

Fig.2) Liver DNA integrity (%) in medaka fish exposed to Benzo (a) pyrene (Min ± SD)

بحث

آلاینده‌های ناشی از فعالیت‌های صنایع نفت و گاز علاوه بر انسان‌ها تأثیرات زیادی بر محیط زیست و آبزیان دارند (۲۰). در این مطالعه، نشانگرهای زیستی در سطوح مولکولی و آنزیمی در کبد ماهیان مداکا که در معرض ترکیب بنزو آ پایرن به عنوان یکی از آلاینده‌های صنایع نفت و گاز قرار گرفته بودند به منظور تعیین و پایش اثرات این آلاینده بر ماهیان مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج حاصل از این مطالعه اثرات بیولوژیکی این آلاینده در تیمارهای آلوده نسبت به گروه کنترل را نشان داد. در این بخش نتایج به دست آمده مورد بحث و بررسی قرار می‌گیرد.

غلظت بنزو-آ- پایرن محلول در آب تیمارهای آزمایشی

در این مطالعه سه سطح آلاینده برای تعیین میزان اثر ترکیب بنزو-آ- پایرن بر القاء فعالیت آنزیم EROD و نیز یکپارچگی ساختار DNA مورد بررسی قرار گرفت، به ترتیب ۰/۵، ۱/۵ و ۵ میکروگرم در لیتر، بنزو-آ- پایرن پس از حل شدن در DMSO به آب آکواریوم‌ها اضافه گردید. سپس نمونه‌برداری از آب جهت سنجش میزان بنزو-آ- پایرن حل شده در آب انجام شد. نتایج نشان داد که این ترکیب در آب به‌طور کامل حل نشده است. علاوه بر این سنجش میزان بنزو-آ- پایرن محلول در تیمارهای آزمایشی نشان داد که میزان این ترکیب در آب با گذشت زمان کاهش پیدا می‌کند (جدول ۱). به طور کلی ترکیبات هیدروکربن‌های حلقوی معطر با وزن مولکولی بالا نظیر بنزو آ پایرن دارای حلالیت بسیار پایینی در آب بوده و بیشتر تمایل به حفظ حالت چربی خود دارند (۲۱). این ترکیبات عمدتاً آب گریز بوده و به سرعت جذب ترکیبات و ذرات معلق در آب می‌گردند. بیشترین میزان حلالیت این ترکیب در حالت عادی و بدون استفاده از حلال در آب کمتر از ۱/۶ میکروگرم در لیتر می‌باشد (۲۱). هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای تمایل به اتصال به ذرات آلی نظیر جلبک‌ها، ذرات مدفوع آبزیان و یا ترکیبات آبی محلول در آب دارند. علاوه بر این هیدروکربن‌های نفتی موجود در بوم سازگان‌های آبی می‌توانند از طریق فرآیندهای تبخیر، انتشار، اکسیداسیون نوری و نیز تجزیه‌های بیولوژیکی تجزیه و حذف گردند (۲۴-۲۲). این امر در مناطق گرمسیری به علت شدت بیشتر نور خورشید، درجه حرارت بالاتر و نیز وقوع متعدد طوفان بالاتر می‌باشد (۲۵). به همین دلایل میزان ترکیب بنزو-آ- پایرن سنجیده شده در تیمارهای آزمایشی پس از حل کردن و نیز در زمان تعویض آب کاهش یافته است.

فعالیت آنزیم EROD

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، سطوح آنزیم EROD کبدی در تمامی تیمارها در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت. اما این افزایش در گروه ماهیانی که در معرض غلظت کمتر بنزو-آ- پایرن قرار داشتند بیشتر از تیمارهای با غلظت بالا بود. از آنجا که القاء آنزیم سیتوکروم P4501A در ماهیان نیز همانند سایر مهره‌داران توسط گیرنده‌های آریل هیدروکربنه سلول انجام می‌گیرد (۲۶)، به نظر می‌رسد در تیمارهایی که غلظت آلاینده‌های محیطی بالا بوده و میزان فعالیت آنزیم EROD کمتر از سطح پیش‌بینی شده است می‌تواند ناشی از آسیب به گیرنده‌های آریل هیدروکربنه درون سلولی مسئول القاء ژن‌های بیان کننده این آنزیم باشند (۲۷).

در مطالعه‌ای که در محیط کشت بر روی تیره سلولی H4IIE انجام شده است، مشخص شده که تأثیر بنزو-آ- پایرن بر القاء فعالیت آنزیم EROD به شدت وابسته به غلظت این ترکیب بوده و با افزایش میزان غلظت بنزو-آ-پایرن کاهش شدیدی در میزان فعالیت آنزیم EROD ایجاد می‌گردد (۲۸)؛ این محققین حداقل غلظت مؤثر بنزو-آ-پایرن برای القاء آنزیم EROD را $۳/۱۸\times۱۰^{-۴}$ میکرومول عنوان ساختند. همچنین در مطالعه دیگری که بر روی تیره سلولی ماهی قزال‌آلای رنگین کمان (RTL-W1) انجام گردید، مشخص شد که افزایش غلظت بنزوا پایرن می‌تواند منجر به کاهش میزان فعالیت آنزیم EROD گردد و پاسخ القایی آنزیم EROD نسبت به ترکیب بنزو-آ-پایرن به‌طور معکوس وابسته به غلظت بود (۲۹). سطوح آنزیم EROD کبدی در مار ماهی *Anguilla anguilla* پس از دو ساعت که در معرض ۰/۹ و ۲/۷ میلی‌مول ترکیب بنزو آ پایرین قرار داشتند افزایش معنی‌داری داشت؛ با این حال پس

از گذشت ۷۲ ساعت از در معرض قرارگیری میزان فعالیت این آنزیم کاهش یافت (۱۰).

القاء معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم EROD کبدی در ماهی *Dorosoma cepedianum* در تزریق دوزهای بالاتر از ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم بنزو-آ-پایرن مشاهده شد (۳۰). پس از دو هفته مواجهه با ترکیب بنزو آ پایرین، ماهیان جوان توربوت (*Scophthalmus maximus*) به مدت ۱۶ روز در معرض آب سالم نگهداری شدند. بیشترین سطوح ترکیب بنزو آ پایرن در گوشت ماهی در روز اول مواجهه با آب سالم مشاهده شد و سطح این ترکیب در روز ۱۶ به سطح غیرقابل اندازه‌گیری رسید. همچنین تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل و گروهی که در معرض بنزو آ پایرن قرار داشتند از نظر آنزیم EROD و سیتوکروم مشاهده نشد، در حالی که تزریق داخل صفاقی بنزو آ پایرین سبب القاء آنزیم EROD شد (۳۱). اضافه شدن ترکیب بنزو ا پایرن به جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان سبب افزایش میزان فعالیت آنزیم EROD کبدی به میزان ۷ برابر سطح گروه کنترل در روز سوم آزمایش شد، اما با گذشت ۲۸ روز از آزمایش سطح فعالیت آنزیم تا سطح گروه کنترل کاهش پیدا کرد (۳۲). تزریق داخل صفاقی ترکیب بنزو-آ-پایرن در ماهی *Solea ovata* منجر به افزایش میزان فعالیت آنزیم EROD و همچنین آسیب‌های سلولی شد. وجود همبستگی مثبت بین افزایش آنزیم EROD و نیز آسیب‌های سلولی نشان دهنده اهمیت بالای این آنزیم در مطالعات سم‌شناسی محیطی در آبزیان است (۳۳). با توجه به مطالعات انجام شده توسط سایر محققین و همچنین مطالعه حاضر به نظر می‌رسد که با افزایش غلظت بنزو-آ- پایرن و نیز افزایش مدت زمان در معرض قرارگیری، میزان فعالیت آنزیم EROD در کبد ماهی کاهش می‌یابد که نشان دهنده کاهش توانایی ماهی در سم زدایی بنزو-آ- پایرن می‌باشد.

یکپارچگی ساختار DNA

مارکرهای مولکولی، نشان دهنده آسیب به ژنوم ماهی، دارای اهمیت بالایی در بررسی اثرات آلاینده‌ها بر شایستگی بقاء ماهیان می‌باشند (۳۴). در مطالعه حاضر تفاوت معنی‌داری در میزان یکپارچگی ساختار DNA کبدی بین ماهیان مداکا مورد مطالعه مشاهده نشد (نمودار ۲). در مطالعه‌ای که بر روی ماهی *Liza aurata* انجام شده مشخص شده است که تغییر در یکپارچگی ساختار DNA می‌تواند به بافت مورد مطالعه نیز بستگی داشته باشد، به طوری که کاهش معنی‌داری در یکپارچگی ساختار DNA در بافت کلیه ماهی *Liza aurata* در ایستگاه آلوده نسبت به ایستگاه کنترل مشاهده شده است (۳۵). در حالی که تفاوت معنی‌داری در یکپارچگی ساختار DNA در بافت کبد ماهیان *Liza aurata* در بین ایستگاه‌های مورد مطالعه مشاهده نشده است (۳۶).

بررسی تأثیر بنزو آ پایرین بر شکستگی رشته‌های DNA در شرایط آزمایشگاهی روی صدف *Perna viridis* نشان داد که این ترکیب هیدروکربنه حلقوی باعث تغییرات معنی‌داری در شکستگی رشته‌های DNA هپاتوپانکراس این صدف می‌گردد (۳۷).

کاهش معنی‌داری در میزان یکپارچگی DNA سلول‌های خونی مارماهی *Anguilla anguilla* ۸ ساعت تا ۱۴۴ ساعت پس از مواجهه با بنزو آ پایرین مشاهده می‌شود، اما با افزایش زمان این میزان به سطح گروه کنترل کاهش می‌یابد (۱۰). این محققین افزایش آسیب‌های DNA را از ۸ تا ۱۶ ساعت بعد از مواجهه با آلاینده گزارش دادند. این امر نشان دهنده توانایی ترکیبات هیدروکربن‌های حلقوی در القاء آسیب در DNA می‌باشد. ترمیم آسیب‌های وارده پس از ۲۴

ساعت مواجه آغاز شده و در نهایت پس از ۲۱۶ ساعت مواجهه تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی با گروه کنترل مشاهده نشد که نشان دهنده توانایی مارماهی در ترمیم آسیب‌های وارده به DNA می‌باشد. در حالی که در مطالعه‌ای که روی ماهی *Lepomis auratus* انجام شده تفاوت معنی‌داری در شکست رشته‌های DNA کبدی در بین ایستگاه‌های آلوده نسبت به ایستگاه کنترل مشاهده شد (۳۸). اضافه شدن ترکیب بنزواپایرن در جیره غذایی در روزهای آغازین آزمایش منجر به افزایش آسیب‌های ژنومی در ماهی قزل‌آلا شده است، اما با گذشت زمان به مدت ۵۰ روز تفاوت معنی‌داری در میزان آسیب‌های ژنومی خون ماهی ایجاد نکرد (۳۲).

این محققین، القاء آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در بدن ماهی را عامل کاهش میزان آسیب‌های ژنومی دانستند. لذا با توجه به نتایج مطالعه حاضر و مطالعات سایر محققین عدم تفاوت در میزان یکپارچگی ساختار DNA بین تیمارهای مورد مطالعه با تیمار کنترل احتمالاً می‌تواند ناشی از کارایی بالای مکانیسم ترمیمی DNA در کبد ماهی مداکا پس از مواجهه دراز مدت با آلاینده‌ها باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان دادکه غلظت ترکیب بنزو آ پایرن در آب با گذشت زمان به شدت کاهش می‌یابد. همچنین ترکیب بنزو آ پایرن سبب القاء میزان فعالیت آنزیم اتوکسی رزورفین- او- د اتیلاز در کبد ماهی جاوا مداکا می‌گردد. نتایج نشان داد که میزان یکپارچگی ساختار DNA احتمالاً در اثر کارایی بالای مکانیسم‌های ترمیم DNA کبد ماهی جاوا مداکا بین تیمارهای مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری ندارد.

سپاس و قدردانی

کلیه هزینه‌های این طرح توسط مرکز تحقیقات و آموزش منابع طبیعی و محیط زیست دریایی، دانشگاه کاگوشیمای ژاپن تأمین شده است. بدین‌وسیله نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را اعلام می دارند.

تضاد منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

1.OSPAR. Guidelines for Monitoring the Environmental Impact of Offshore Oil and Gas Activities. London: Oslo and Paris Commissions, 2004, 19.
2.Mudzinski SP. Effects of benzo [a] pyrene on concanavalin A-stimulated human peripheral blood mononuclear cells in vitro: inhibition of proliferation but no effect on parameters related to the G1 phase of the cell cycle. Toxicol Appl Pharmacol 1993; 119(2): 166-74.
3.Samanta SK, Singh OV, Jain RK. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. Trends Biotechnol 2002; 20(6): 243-8.
4.Martínez-Gómez C, Vethaak A, Hylland K, et al. A guide to toxicity assessment and monitoring effects at lower levels of biological organization following marine oil spills in European waters. ICES J Mar Sci 2010; 67: 1105-18.
5.National Research Council N. Oil in the Sea III: Inputs, Fates and Effects. Washington: National Academy of Sciences, 2003, 265.
6.Ohe T, Watanabe T, Wakabayashi K. Mutagens in surface waters: a review. Mutat Res 2004; 567(2-3): 109-49.
7.Stephensen E, Adolfsson-Erici M, Celander M, et al. Biomarker responses and chemical analyses in fish indicate leakage of polycyclic

aromatic hydrocarbons and other compounds from car tire rubber. Environ Toxicol Chem 2003; 22(12): 2926-31.
8.Batel R, Bihari N, Kurelec B, et al. DNA damage benzo [α] pyrene in the liver of mosquito fish *Gambusia affinis*. Sci Total Environ 1985; 41(3): 275-83.
9.Hogan ME, Dattagupta N, Whitlock JP Jr. Carcinogen-induced alteration of DNA structure. J Biol Chem 1981; 256(9): 4504-13.
10.Maria VL, Correia AC, Santos MA. *Anguilla anguilla* L. Biochemical and Genotoxic Responses to Benzo [a] pyrene. Ecotoxicol Environ Saf 2002; 53(1): 86-92.
11.Larsen HE, Celander M, Goksøyr A. The cytochrome P450 system of Atlantic salmon *(Salmo salar)*: II. Variations in hepatic catalytic activities and isozyme patterns during an annual reproductive cycle. Fish Physiol Biochem 1992; 10(4): 291-301.
12.Bucheli TD, Fent K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. Crit Rev Environ Sci Technol 1995; 25(3): 201-68.
13.Goksøyr A. Cytochrome P450 in marine mammals: isozyme forms, catalytic functions, and physiological regulations. Develop Mar Biol 1995; 4: 629-39.
14.Emmanouil C, Sheehan T, Chipman J. Macromolecule oxidation and DNA repair in mussel *(Mytilus edulis L.)* gill following exposure to Cd and Cr (VI). Aquat Toxicol 2007; 82(1): 27-35.
15.Cheikyula JO, Koyama J, Uno S. Comparative study of bioconcentration and EROD activity induction in the Japanese flounder, red sea bream, and Java medaka exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. Environ Toxicol 2008; 23(3): 354-62.
16.Song JY, Nakayama K, Kokushi E, et al. Effect of heavy oil exposure on antibacterial activity and expression of immune-related genes in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Environ Toxicol Chem 2012; 31(4): 828-35.
17.Eggens ML, Galgani F. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in flatfish: fast determination with a fluorescence plate-reader. Mar Environ Res 1992; 33(3): 213-21.
18.Rao S, Nehell T, Carey J, et al. DNA alkaline unwinding assay for monitoring the impact of environmental genotoxins. Environ Toxicol Water Qual 1996; 11(4): 351-4.
19.Quinn GP, Keough MJ. Experimental design and data analysis for biologists. Cambridge University Press, 2002, 537.
20.Dobaradaran S, Mohamadzadeh F. Servey of the oil and gas pollutant impacts on the human and environment. Iran South Med J 2014; 17(1): 85-98. (Persian)
21.Neff JM. Bioaccumulation in marine organisms: effect of contaminants from oil well produced water. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science, 2002, 452.
22.Li H, Boufadel MC. Long-term persistence of oil from the Exxon Valdez spill in two-layer beaches. Nat Geosci 2010; 3(12): 96-9.
23.Boufadel MC. Exxon Valdez Trustee Council Project No. 11100836. 2011.
24.Hayes MO, Michel J. Factors determining the long-term persistence of Exxon Valdez oil in gravel beaches. Mar Pollut Bull 1999; 38(2): 92-101.
25.Uno S, Koyama J, Kokushi E, et al. Monitoring of PAHs and alkylated PAHs in aquatic organisms after 1 month from the Solar I oil spill off the coast of Guimaras Island, Philippines. Environ Monit Assess 2010; 165(1-4): 501-15.
26.Sadar MD, Ash R, Sundqvist J, et al. Phenobarbital induction of CYP1A1 gene expression in a primary culture of rainbow trout hepatocytes. J Biol Chem 1996; 271(30): 17635-43.
27.Whyte JJ, Jung RE, Schmitt CJ, et al. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. Crit Rev Toxicol 2000; 30(4): 347-570.
28.Bosveld AT, de Bie PA, van den Brink NW, et al. In vitro EROD induction equivalency factors for the 10 PAHs generally monitored in risk assessment studies in The Netherlands. Chemosphere 2002; 49(1): 75-83.
29.Bols NC, Schirmer K, Joyce EM, et al. Ability of polycyclic aromatic hydrocarbons to induce 7-ethoxyresorufin-o-deethylase activity in a trout liver cell line. Ecotoxicol Environ Saf 1999; 44(1): 118-28.
30.Levine SL, Oris JT, Wissing TE. Comparison of P-450A1 monooxygenase induction in gizzard shad (*Dorosoma cepedianum*) following intraperitoneal injection or continuous waterborne-exposure with benzo [a] pyrene: Temporal and dose-dependent studies. Aquat Toxicol 1994; 30(1): 61-75.
31.Boleas S, Fernandez C, Beyer J, et al. Accumulation and effects of benzo (a) pyrene

on cytochrome P450 1A in waterborne exposed and intraperitoneal injected juvenile turbot *(Scophthalmus maximus)*. Mar Environ Res 1998; 46(1): 17-20.

32.Curtis LR, Garzon CB, Arkoosh M, et al. Reduced cytochrome P4501A activity and recovery from oxidative stress during subchronic benzo [a] pyrene and benzo [e] pyrene treatment of rainbow trout. Toxicol Appl Pharmacol 2011; 254(1): 1-7.

33.Au D, Zhou B, Lam P. Relationship between ultrastructural changes and EROD activities in liver of fish exposed to benzo [a] pyrene. Environ Pollut 1999; 104(2): 235-47.

34.Moore MN, Depledge MH, Readman JW, et al. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. Mut Res Fundam Mol Mech Muta 2004; 552(1): 247-68.

35.Oliveira M, Ahmad I, Maria VL, et al. Monitoring pollution of coastal lagoon using *Liza aurata* kidney oxidative stress and genetic endpoints: an integrated biomarker approach. Ecotoxicology 2010; 19(4): 643-53.

36.Oliveira M, Ahmad I, Maria VL, et al. Antioxidant Responses Versus DNA Damage and Lipid Peroxidation in Golden Grey Mullet Liver: A Field Study at Ria de Aveiro (Portugal). Arch Environ ContamToxicol 2010; 59(3): 1-10.

37.Ching EW, Siu WH, Lam PK, et al. DNA adduct formation and DNA strand breaks in green-lipped mussels (*Perna viridis*) exposed to benzo [a] pyrene: dose-and time-dependent relationships. Mar Pollut Bull 2001; 42(7): 603-10.

38.Everaarts JM, Shugart LR, Gustin MK, et al. Biological markers in fish: DNA integrity, hematological parameters and liver somatic index. Mar Environ Res 1993; 35(1): 101-7.

Original Article

Effects of Benzo (a) Pyrene on Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) Activity and Genomic Damage in Java Medaka (*Oryzias Javanicus*)

D. Bagheri [1*], J. Koyama [2]

[1] Fisheries Department, School of Agriculture and natural Resources, Persian Gulf University, Bushehr, Iran
[2] Education and Research Center for Marine Resources and Environment, School of Fisheries, Kagoshima University, Japan

(Received 10 Sep, 2015 Accepted 17 Nov, 2015)

Abstract

Background: Benzo[a] pyrene (BaP) is a high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) that have high carcinogenic effects. So, the aim of this study was to assess the effects of benzo [a] pyrene (BaP) on liver EROD enzyme activity induction and liver DNA breakage in Java Medaka.

Materials and Methods: twenty three Java Medaka were transferred to 10 L glass aquarium and exposed to benzo [a] pyrene concentrations of 0.5 µg/L (Low concentration), 1.5 µg/L (median concentration), 5 µg/L and 0 µg/L (DMSO solvent control), with semi-static renewal technique during 7 days. Fish liver biopsy was performed in seventh day and a part of the samples was immediately homogenized and were used to measure EROD enzyme activity. Another part of the liver samples were transferred to -20 °C to use for DNA integrity assay. Data were analyzed by using ANOVA and Duncan tests. The p value ≤ 0.05 was considered as a level of statistical significance.

Results: A significant increase in EROD anzyme activity was observed between the experimental treatments compared to the control group. Although the fishes that exposed to the highest concentration (5 micrograms per liter) of Benzo[a] pyrene had higher DNA breakage. Nevertheless, there was no significant difference between the treatment groups compared to the control group.

Conclusion: benzo[a]pyrene combination increased hepatic EROD activity, the enzyme in the initial phase of PAH detoxification, in Java Medaka. However, it seems that Java Medaka fish have a DNA repair and preventive mechanisms from liver DNA breakage.

Key words: Benzo [a] pyrene, Medaka fish, EROD enzyme, DNA integrity

Cite this article as: Bagheri D, Koyama J. Effects of Benzo (a) Pyrene on Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) Activity and Genomic Damage in Java Medaka (Oryzias Javanicus). Iran South Med J 2016; 19(5): 787-798.

Copyright © 2016 Bagheri, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

**Address for correspondence:* Fisheries Department, School of Agriculture and natural Resources, Persian Gulf University, Bushehr, Iran. E-mail: dara.bagheri@pgu.ac.ir