بهره‌برداری و پرورش آبزیان
جلد هفتم، شماره اول، بهار ۱۳۹۷
http://japu.gau.ac.ir

تأثیر غلظت‌های زیرکشنده آفت‌کش ارگانوفسفره دایمیتوات بر برخی پارامترهای استرس اکسیداتیو در کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

*مریم رضایی شادگان[۱]، امیر زیدی[۲] و سخاوت جوکار[۳]
[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه شیلات، دانشگاه صنعتی خاتم‌الانبیاء (ص) بهبهان گروه شیلات،
[۲]کارشناس‌ارشد آلودگی‌های محیط‌زیست، دانشگاه صنعتی خاتم‌الانبیاء (ص) بهبهان گروه محیط زیست،
[۳]دانشجوی کارشناسی‌ارشد دانشگاه صنعتی خاتم‌الانبیاء (ص) بهبهان گروه محیط زیست
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۳/۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/٤/۱۸

چکیده

آلودگی محیط‌های آبی توسط آفت‌کش‌ها، موجب تغییر در فعالیت سوخت و ساز بدن و ترکیبات بیوشیمیایی موجودات زنده آبزی می‌شود. این مطالعه به‌منظور بررسی اثر غلظت‌های زیر کشنده دایمیتوات بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو در کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان صورت گرفته است. در این مطالعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌مدت ۳۰ روز در معرض غلظت‌های ۰/ ۳٦۷۵ mg L^{-1}، ۰/۰۷۳۵ mg L^{-1} و ۰/۷۳۵۰ mg L^{-1} آفت‌کش دایمیتوات قرار گرفتند. نمونه‌برداری در روزهای ۵، ۱۵ و ۳۰ انجام گردید. شاخص‌های بیوشیمیایی، شامل آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دسموتاز، گلوتاتیون پروکسیداز و پروتین اندازه‌گیری شدند. فعالیت سوپراکسید دسموتاز در بافت کبد ماهی *Oncorhynchus mykiss* که در معرض دایمیتوات قرارگرفته تغییرات قابل‌ملاحظه‌ای در فعالیت در پایین‌ترین غلظت را نشان نداد، در حالی‌که با افزایش دوره و دوز در غلظت ۰/۳٦۷۵ mg L^{-1} و ۰/۷۳۵۰ mg L^{-1} افزایش یافته بود. سطح گلوتاتیون پروکسیداز جز در روز ۱۵، در بقیه دوره‌ها به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. فعالیت کاتالاز در روز ۱۵ افزایش قابل توجهی داشت. سطح پروتئین در همه گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت. تغییر شاخص‌های استرس اکسیداتیو در کبد ماهیان در معرض غلظت‌های زیرکشنده دایمیتوات نشان‌دهنده آسیب وارده به بافت کبد در اثر افزایش سطح رادیکال‌های آزاد می‌باشد. در میان غلظت‌ها، ۰/۷۳۵۰ mg L^{-1} و آنتی‌اکسیدان گلوتاتیون پروکسیداز بالاترین میزان را داشتند.

واژه‌های کلیدی: آنزیم گلوتاتیون پروکسیداز، رادیکال آزاد، شاخص‌های بیوشیمیایی

*مسئول مکاتبه: rezaieshadegan@gmail.com

مقدمه

آفت‌کش‌ها با هدف کنترل آفات کشاورزی عمداً در محیط‌زیست رها می‌شوند و به‌دلیل اثربخشی سریع و استفاده گسترده برای آلودگی‌های محیط‌زیست و خطرات سمی گونه‌های غیرهدف نسبت به فرایندهای بیوشیمیایی پیشرو هستند. دایمیتوات (O,O-dimethyl S-methylcarbamoylmethyl phosphorodithioate) استفاده‌ای گسترده دارد و جز حشره‌کش‌های ارگانوفسفره است که از سال ۱۹۵٦ برای مقابله با حشرات و کرم‌های حبوبات کشاورزی و گیاهان زینتی مورد استفاده بوده است. دایمیتوات در درجه اول دارای اثرات نوروتوکسیک شناخته شده است که ناشی از مهار استیل‌کولین‌استراز است و گزارش‌هایی وجود دارد حاکی از این‌که در درجه بعد سبب کاهش متابولیسم کربوهیدرات، (بگوم و همکاران، ۱۹۹۵) تغییرات هیستوپاتولوژیک (رودریگز و همکاران، ۱۹۹۸)، اختلالات تنفسی در ماهی، اختلالات غدد درون‌ریز و اثرات سرطان‌زا (روبر و همکاران، ۱۹۸٤) در موش صحرایی شده است. ماکرو مولکول‌ها نسبت به تعامل با گونه‌های واکنشی حساس‌اند زیرا سبب تهدید شدید عملکردهای طبیعی سلول می‌شود.

در متابولیت‌های تولید شده توسط سموم، یک گروه قطبی فعال مثل (OH^-) در مولکول ایجاد می‌شود که توانایی تشکیل ترکیبات مزدوج برای دفع شدن را داشته، از طرفی همین ترکیبات مستعد تبدیل شدن به رادیکال‌های آزاد اکسیژن شامل هیدروکسیل و سوپراکساید آنیون بوده که توانایی حمله و آسیب به اجزاء مختلف سلولی را داراست (فوجی و همکاران، ۱۹۸۲).

به‌طورکلی ماهی‌ها طی سه مسیر آبشش‌ها، پوست و دهان در مواجهه با سموم قرار می‌گیرند که بعد از آن این سم به سرعت توسط خون به ارگان‌های دیگر از جمله کبد و کلیه رسیده و دستخوش فرآیندهای تجزیه‌ای و متابولیسم می‌شود ولی بخشی از سموم طی فرآیندهای مذکور دچار تغییر شکل ساختاری و شیمیایی شده در پیکره موجود باقی می‌مانند (مککیم و همکاران، ۱۹۹٤).

تحت شرایط عادی، آسیب‌های وارده، توسط آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپر اکسید تام (SOD[1])، کاتالاز (CAT[2]) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPx[3]) خنثی می‌شود که به‌عنوان اولین خط دفاعی است (لیوینگستون، ۲۰۰۱). آسیب به لیپید غشاء و پراکسیداسیون چربی به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های مولکولی درگیر در مسمومیت آفت‌کش‌ها و پیش‌بینی اهمیت آن به‌عنوان یک بیومارکر برای استرس اکسیداتیو در تحقیقات مختلف نشان داده‌شده است (کاویت‌ها و همکاران، ۲۰۰۸ و بالستروس و همکاران، ۲۰۰۹). از آنجا که در محیط‌زیست آبزیان حضور ژنوتوکسین[4] یک واقعیت است تلاش برای توسعه شاخص‌های حساس به اثرات ژنوتوکسین در موجودات آبزی اهمیت بسیار بالایی دارد.

ماهی‌ها به‌عنوان بیو اندیکاتور اثرات آلاینده، نه‌تنها به‌علت سودمندی‌شان در فراهم کردن اطلاعات مربوط به نتایج سم‌شناسی موجودات مضر، بلکه برای مقایسه نتایج با انسان، مورد علاقه هستند. به‌دلیل آناتومی اساسی آن، پتانسیل بالای متابولیکی و نقش در تجمع، دگرگونی زیستی و دفع آلودگی، کبد را به‌عنوان اندام هدف برای مواد سمی در نظر می‌گیرند. از سوی دیگر سیستم عصبی به‌عنوان یک هدف مشترک برای عوامل

1- Superoxide dismutase
2- Catalase
3- Glutathione proxidase
4- Genotoxins

سمی است (تیمبرل، ۲۰۰۱). ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مهمترین گونه آزاد ماهیان پرورشی اکثر مزارع پرورش ماهیان سردآبی دنیا و تقریبا صد درصد مزارع پرورش ماهیان سردآبی ایران را بخود اختصاص می‌دهد که با توجه به ارزش اقتصادی این‌گونه و افزایش روزافزون مصرف سموم آفتکش در کشاورزی و حساسیت متفاوت ماهیان در سنین مختلف به‌این سموم ضروری است. در این تحقیق هدف بررسی تأثیر سم آفت‌کش ارگانوفسفره دایمیتوات بر روی فاکتورهای استرس اکسیداتیو در کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مطالعه گونه: ماهی قزل رنگین‌کمان (۱۰/ ۰۱ g ± ۶۵/۶۱، cm ۹۷/ ±۱۸/۶۱) جمع‌آوری شد و به‌مدت یک ماه در آزمایشگاه تکثیر و پرورش نگه‌داشته شد. در طی این دوره روزانه با غذای تجاری قزل‌آلا به‌اندازه ۲ درصد وزن بدنشان تغذیه شدند. ۲۴ ساعت قبل از آزمایش غذادهی قطع شد. کیفیت آب در پارامترهای اندازه‌گیری شده دما ۱±۱۵/۲، ۲۵/ ±۸/۰۸ PH، قلیایت $mg\ L^{-1}$ ۴۱ /۸ ± ۲۱۶/۴۳، سختی $mg\ L^{-1}$ ۱۶/۹ ± ۵۰/ ۲۱۸، اکسیژن محلول $mg\ L^{-1}$ ۴/۳±۷. دما، PH، اکسیژن محلول روزانه آنالیز می‌شدند و دوره نوری ۱۲:۱۲ بود.

طراحی آزمایش: آفت‌کش استفاده شده در این آزمایش با نام تجاری (O,O-dimethyl S-[2-(methylamino)-2-oxoethyl] LC 50 ۹۶ ساعته این آفت‌کش برای قزل رنگین‌کمان $mg\ L^{-1}$ ۷/۳۵ (جانسون و همکاران، ۱۹۸۰). که برای تعیین غلظت‌های در معرض سم مورد استفاده است سپس سه غلظت $mg\ L^{-1}$ ۰/۳۶۷۵، $mg\ L^{-1}$ ۰/۷۳۵ $mg\ L^{-1}$ ۰/۷۳۵۰ که به‌ترتیب مربوط به ۱ درصد، ۵ درصد، ۱۰ درصد LC50 می‌باشند. به‌طور تصادفی ماهیان را به تعداد ۱۲ عدد در مخازن جداگانه تقسیم‌بندی شد. گروه اول عاری از آفت‌کش بود و به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. گروه‌های ۲، ۳ و ٤ به‌مدت ۵، ۱۵، ۳۰ روز در معرض غلظت‌های انتخابی آفت‌کش موردنظر قرار گرفتند. هم‌چنین تعویض آب به‌صورت روزانه صورت گرفت (آفا و همکاران، ۱۹۸۱).

نمونه‌گیری بافت: در پایان دوره‌های ۵، ۱۵، ۳۰ روز به‌صورت تصادفی ٤ ماهی از هر مخزن انتخاب شد. بافت کبد با دقت خارج گردید با سرم فیزیولوژی شستشو داده شد و به‌سرعت در نیتروژن مایع فریز و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان آنالیز نگه‌داری شد. نمونه‌های نگه‌داری شده به نسبت ۱:۵ در ۷/٤ =PH با ۲ بافر هموژن شدند برای ۳۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ در ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. که در نهایت برای آنالیز بیوشیمیایی آن از اسپکتروفتومتر استفاده شد (مونتیرو و همکاران، ۲۰۰٦ و دی دو و همکاران، ۲۰۰٦).

پراکسیداسیون لیپیدی: پراکسیداسیون لیپیدی با اندازه‌گیری غلظت اسید تیوباربیتوریک مواد واکنشی برآورد شد (اوکاوا و همکاران، ۱۹۷۹). نمونه‌ها بعد از انکوباسیون در مخلوطی از ۸/۱ درصد سدیم سولفات، ۲۰ درصد استیک اسید (PH= ۳/۵) و ۰/۸ درصد تیوباربیتوریک اسید (PH= ۳/۵) و هموژن بافت‌ها در ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ دقیقه در یخ سرد می‌شوند و بعد با دور ٤۰۰۰ برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ می‌شوند و با حجم ۵۳۲ نانومتر ذخیره می‌شوند. سطح‌های پراکسیداسیون لیپید به‌عنوان nmol به ازای هر گرم وزن‌تر بیان می‌شود.

آنزیم سوپراکسید دسموتاز (SOD): فعالیت سوپراکسید دسموتاز (SOD) با استفاده از روش مبتنی بر توانایی آنزیم‌ها در مهار کاهش INT (iodo-p- نیترو تترازولیوم بنفش) اندازه‌گیری می‌شود و با تغییر در دانسیته نوری در ۵۰۵ نانومتر برای ۳ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد توصیف می‌شود (مککورد و همکاران، ۱۹۶۹). سنجش ترکیبی شامل ۰/۰۱ مولار بافر فسفات (pH 7.0)، زانتین اکسیداز (XOD, UL^{-1} 80) سوبسترا (۰/۰۵ میلی‌مول زانتین و ۰/۰۲۵ میلی‌مول INT) و بافت همگن در حجم کل ۱ میلی‌لیتر می‌باشد، ۱mU mg $protein^{-1}$ فعالیت‌های SOD در مو میلی‌گرم پروتئین ۱ بیان شد ۱ U از SOD معادل مقدار آنزیمی است که ۵۰ درصد نرخ رشد INT را مهار می‌کند.

آنزیم گلوتاتیون پروکسیداز (GPx): فعالیت آنزیم گلوتاتیون پروکسیداز به‌وسیله t-butylhydroperoxide در دمای ۳۷ درجه و ۳۴۰ نانومتر برای ۵ دقیقه تعیین شد (بتلر و همکاران، ۱۹۸٤). سنجش ترکیبی آن شامل ۰/۵ مولار بافر تریس (pH=8) ۰/۱ GSH و گلوتاتیون ردوکتاز (GR, 10 U mL^{-1})، ۲ میلی‌مول NADPH و ۷ میلی‌مول t-butylhydroperoxide و آب مقطر و بافت هموژن شده در حجم کل ۱ میلی‌لیتر است. یک واحد از فعالیت GPx نشان‌دهنده مقدار آنزیمی است که ۱ میلی‌مول NADPH را در هر دقیقه اکسیداز می‌کند.

آنزیم کاتالاز (CAT): فعالیت کاتالاز به وسیله نرخ تجزیه هیدروژن پراکسیداز توسط CAT در ۲۳۰ نانومتر در ۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در واکنش ترکیبی شامل ۱ مولار بافر تریس (pH=8) ۱۰ میلی‌مول آب اکسیژنه، آب مقطر و بافت هموژن شده در حجم نهایی ۱ میلی‌لیتر اندازه گرفته می‌شود. ۱ واحد از فعالیت CAT به‌عنوان مقدار آنزیمی که ۱ میلی‌مول از آب اکسیژنه را در ۱ دقیقه تجزیه می‌کند تعریف می‌شود، فعالیت‌های CAT با واحد (mU mg^{-1} protein) مورد سنجش قرار می‌گیرد (بتلر و همکاران، ۱۹۸٤).

سنجش میزان پروتئین: سطح پروتئین بافت توسط روش لوری و همکاران با استفاده از آلبومین سرم گاوی به‌عنوان استاندارد تعیین شد (بوری و همکاران، ۱۹۵۱).

تجزیه و تحلیل آماری

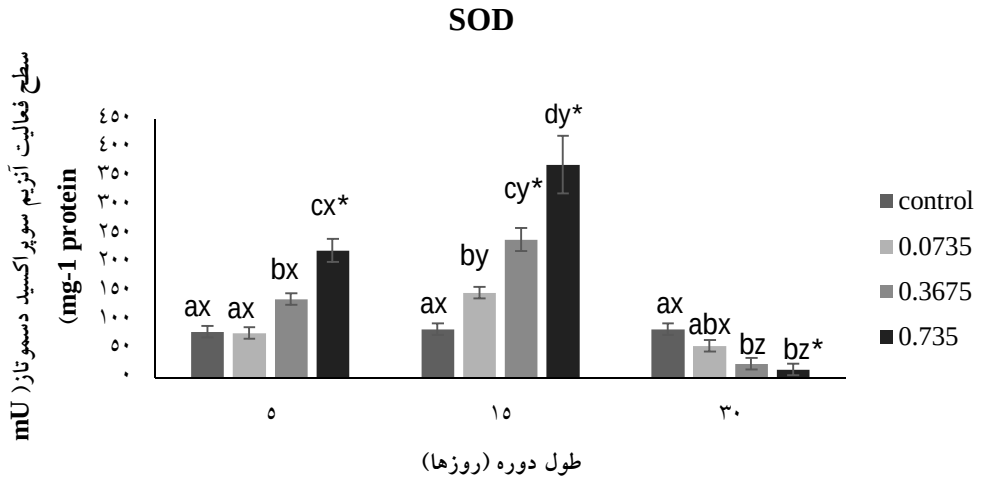
با استفاده از برنامه نرم‌افزاری SPSS 16.0 انجام شد (SPSS شرکت، شیکاگو، ایلینوی، ایالات متحده). آنالیز تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) به‌همراه تست‌های مقایسه‌ای Post Hoc LSD برای تعیین تفاوت آماری بین میانگین گروه کنترل و گروه‌های در معرض تیمار در سطح ۵ درصد انجام شد، آنالیز ضریب همبستگی پیرسون برای تعیین کمیت ارتباط بین دو متغیر استفاده شد. نتایج به‌عنوان میانگین ± خطای استاندارد بیان شد.

نتایج

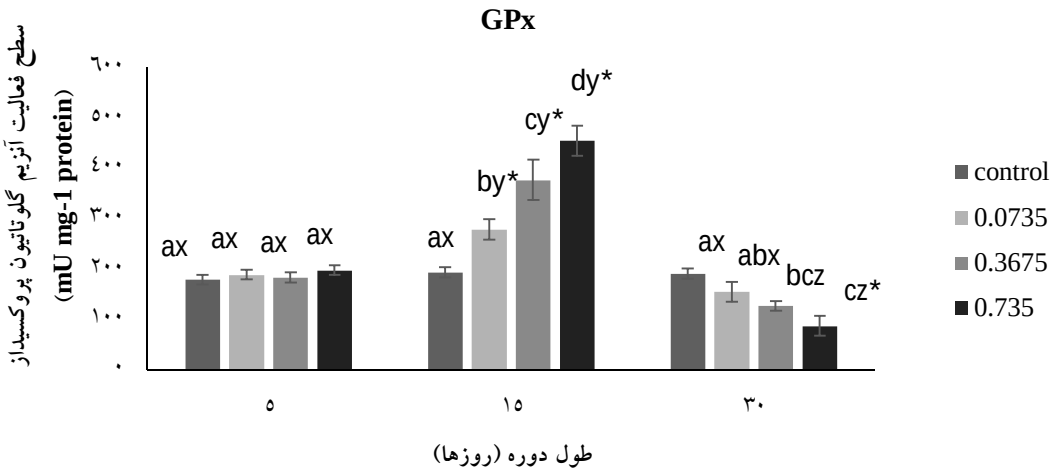
فعالیت‌های آنزیم آنتی‌اکسیدان: تغییر در فعالیت SOD در بافت کبد ماهی *O. mykiss* در معرض سطوح زیر کشنده دایمیتوات در شکل ۱ نشان داده شده است. در بافت کبد تغییرات قابل‌ملاحظه‌ای در فعالیت در پایین‌ترین غلظت وجود ندارد در حالی‌که افزایش زمان و دوز در غلظت ۰/۳٦۷۵ mg L^{-1} و ۰/۷۳۵۰ mg L^{-1} به‌ترتیب ۱۷۹ درصد و ۳٤۰ درصد مشاهده شده است ($p<۰/۰۱$) اما این فعالیت دوز را در روز ۳۰ کاهش می‌دهد. ($p<۰/۰۱$) در بافت کبد تغییر خاصی در فعالیت GPx در روز ۵ مشاهده نشده است

(p>۰۵/). دوز در روز ۱۵ افزایش می‌یابد و در روز ۳۰ به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد (p<۰۱/).

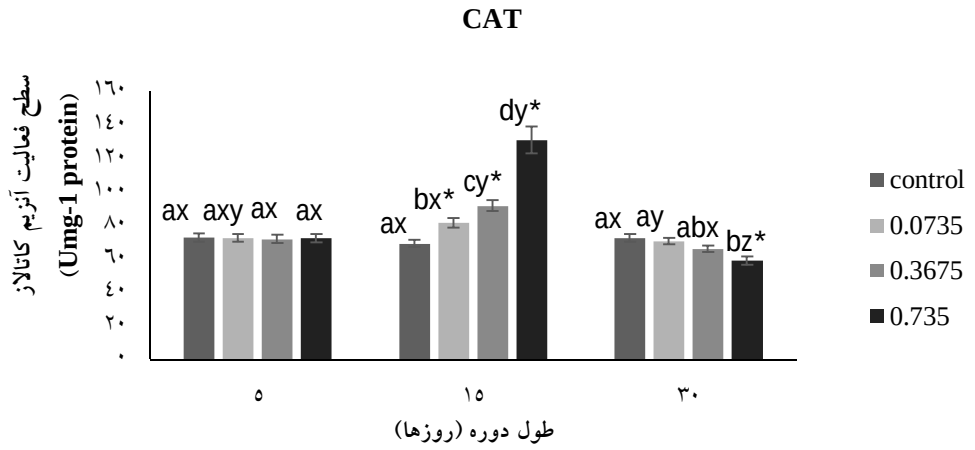
بیشترین نرخ مقایسه به‌عنوان ۱۳٤ درصد و ٥٤ درصد گزارش‌شده است. فعالیت CAT افزایش دوز را در بافت کبد در روز ۱۵ نشان می‌دهد (p<۰۱/) در حالی‌که در روز ۵ تغییر قابل‌ملاحظه‌ای مشاهده نشده است. نرخ مقایسه ۱۷ درصد و ۳۲ درصد و ۸۸ درصد برای غلظت‌های ۰/۰۷۳۵، ۰/۳٦۷۵ و ۰/۷۳۵۰ $mg\ L^{-1}$ تخمین زده‌شده است. مشاهده شده است که فعالیت CAT در سطح کنترل برای پایین‌ترین غلظت آفت‌کش کاهش می‌یابد و در روز ۳۰ به‌اندازه ۱۸ درصد بالاترین غلظت کاهش می‌یابد (p<۰۱/). در تمامی نمودارها حروف a, b, c, d تفاوت بین غلظت‌ها را نشان می‌دهد و x, y تفاوت بین دوره‌ها را نشان می‌دهد (p<۰۵/). هم‌چنین علامت ستاره در نمودارها معنی‌داری در سطح (p<۰۱/) را نشان می‌دهد.



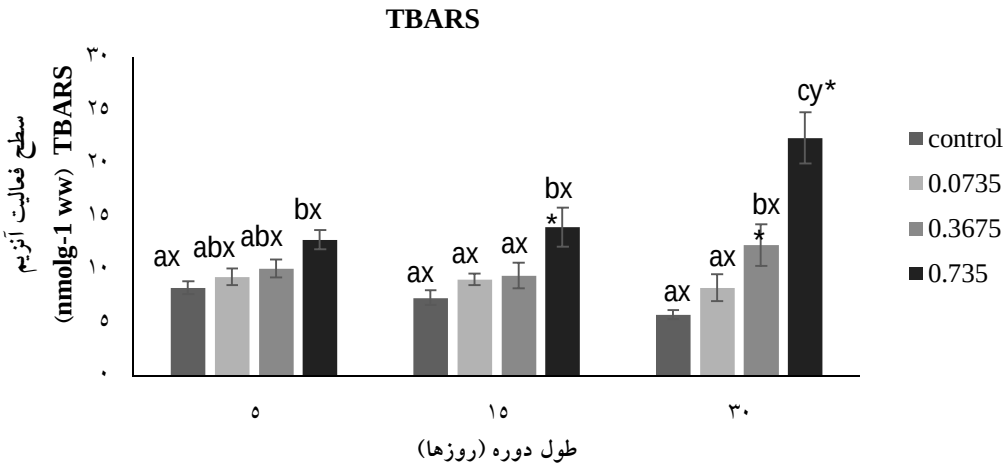
شکل ۱- تغییرات سطح فعالیت آنزیم سوپر اکسید دسموتاز SOD ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در معرض سم آفت‌کش ارگانوفسفره دایمیتوات همبستگی در سطح P<۰۵/ *معنادار است.



شکل ۲- تغییرات سطح فعالیت آنزیم گلوتاتیون پروکسیداز GPx ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در معرض سم آفت‌کش ارگانوفسفره دایمیتوات همبستگی در سطح P<۰۵/ *معنادار است.

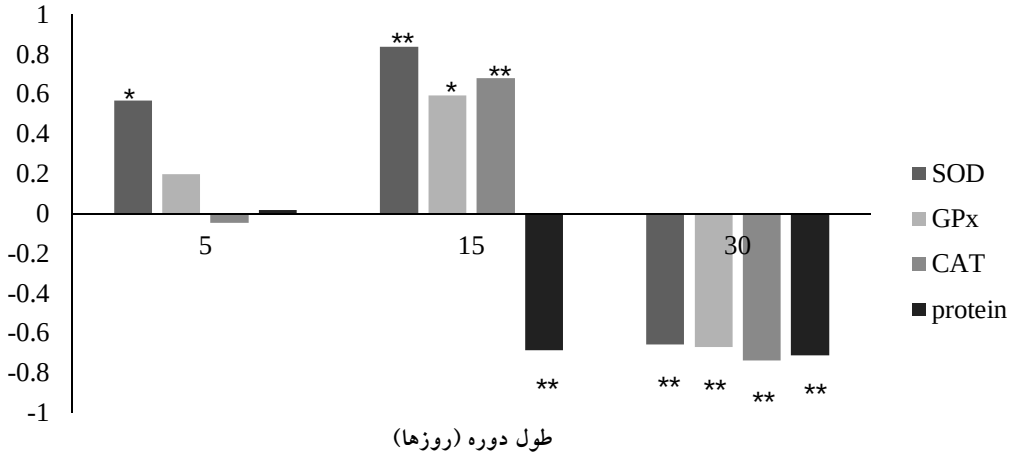


شکل ۳- تغییرات سطح فعالیت آنزیم کاتالاز CAT ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در معرض سم آفت‌کش ارگانوفسفره دایمیتوات همبستگی در سطح P<۰۵/ *معنادار است.



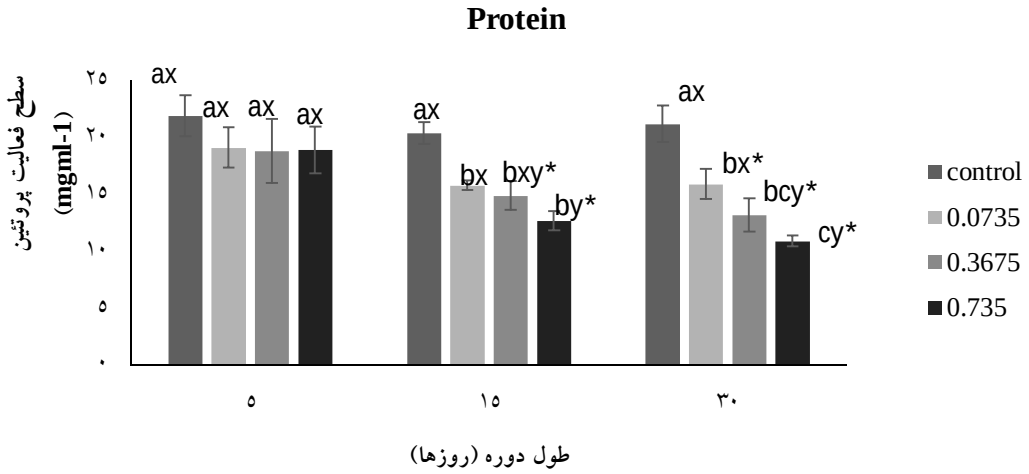
شکل ٤- تغییرات سطح فعالیت آنزیم TBARS ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در معرض سم آفت‌کش ارگانوفسفره دایمیتوات همبستگی در سطح P<۰۵/ *معنادار است.

غلظت TBARS: ضریب همبستگی پیرسون برای کسب اطلاعات از تغییر غلظت TBARS و فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان به سطح پروتئین در بافت کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان که در معرض دایمیتوات قرار گرفته باشد به‌کاربرده می‌شود. در بافت کبد غلظت TBARS در روز ۱۵ مثبت بود و در روز ۳۰ منفی هست که با SOD، GPX و فعالیت CAT همبستگی دارد در حالی‌که رابطه منفی و معنی‌داری بین غلظت TBARS و سطح پروتئین تخمین زده شد.



شکل ۵- ضریب همبستگی پیرسون بین غلظت TBARS و فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان به سطح پروتئین در بافت کبد ماهی قزل‌آلای در معرض سم آفت‌کش دایمیتوات، همبستگی در سطح P<۰/۰۵ * و P<۰/۰۱ ** معنادار است.

سطح پروتئین: سطح پروتئین در گروه کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد (شکل ٦). اما تابع زمان در تمامی غلظت‌های به‌کاربرده شده کاهش‌یافته که در روز ۱۵ و ۳۰ در بافت کبد مشاهده شد (p<۰/۰۱). (بیشترین مقدار تغییرات گزارش‌شده برای بافت کبد ٤٨ درصد بود).



شکل ٦- تغییرات سطح فعالیت پروتئین ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در معرض سم آفت‌کش ارگانوفسفره دایمیتوات، همبستگی در سطح P<۰/۰۵ * معنادار است.

بحث و نتیجه‌گیری

فعالیت آنزیم Catalase (CAT) در روز ۵ تغییر قابل ملاحظه را نشان نداد در حالی‌که در روز ۱۵ افزایش یافته بود و همچنین مشاهده شده بود که فعالیت CAT در سطح کنترل برای پایین‌ترین غلظت آفت‌کش کاهش می‌یابد و در روز ۳۰ به اندازه ۱۸ درصد با بالاترین غلظت کاهش می‌یابد. کاتالاز یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های سیستم آنتی‌اکسیدانی است که در تجزیه پراکسید هیدروژن به آب و مولکول اکسیژن برای جلوگیری از استرس اکسیداتیو و حفظ

هموستازی سلول نقش دارد، به‌طور کلی کاهش فعالیت کاتالاز منجربه افزایش تولید رادیکال سوپر اکسید و سپس پر اکسید هیدروژن می‌شود (راس و همکاران، ۲۰۰۸). در حالت طبیعی در طی متابولیسم بدن رادیکال‌های آزاد اکسیژنی تولید می‌گردد که قادرند با ماکرو مولکول‌های مهم بدن نظیر لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک واکنش دهند. در شرایط طبیعی بین تولید و حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژنی تعادل وجود دارد. عدم تعادل در این فرآیندها منجر به استرس اکسیداتیو و تغییرات پاتولوژیک در سلول‌های مختلف از طریق رادیکال‌های آزاد اکسیژنی می‌شود.

طی پژوهشی القائ دوز تحت حاد سموم آترازین و کلرپریفیوس بر بافت کبد و آبشش ماهی کپور معمولی (Cyprinus caprio) پس از گذشت ٤٠ روز باعث افزایش سطح فعالیت CAT شد و دلیل آن تحریک و تولید این آنزیم در مواجهه با افزایش مقادیر یون‌های سوپراکساید آنیون ذکر شد (ژینگ و همکاران، ۲۰۱۲).

در بافت کبد غلظت TBARS در روز ۱۵ مثبت بود و در روز ۳۰ منفی می‌باشد که با Superoxide dismutase (SOD)، Glutathione (GPX) proxidase و فعالیت CAT همبستگی دارد در حالی‌که رابطه منفی و معنی‌داری بین غلظت TBARS و سطح پروتئین تخمین زده شد. TBARS به‌عنوان نشانگر استرس اکسیداسیون آخرین محصول تجزیه لیپیدها است و افزایش سطح آن نشان‌دهنده افزایش آسیب غشای سلولی است و به‌دلیل تمایل به واکنش زیاد با گروه‌های تیول و آمین موجود در ساختار بیوشیمیایی پپتیدها، آنزیم‌ها و اسید نوکلئیک از سمیت بالایی برای سلول‌ها برخوردار می‌باشند (اوروپسا و همکاران، ۲۰۰۹).

در طی مطالعه‌ای که توسط اوروپسا و همکاران در سال ۲۰۰۹ انجام شد، مشخص گردید بالا رفتن سطح TBARS ممکن است به خاطر تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد به‌عنوان یک اکسید کننده قوی و عامل کلیدی در شروع فرایند اکسیداسیون لیپیدها باشد و همچنین تولید محصولات پراکسیداسیون لیپیدی که منجربه استرس اکسیداتیو باشد (اوروپسا و همکاران، ۲۰۰۹).

آنزیم SOD به‌عنوان اولین سد دفاع اختصاصی آنتی‌اکسیدانی در مواجهه با رادیکال‌های سوپر اکساید آنیون است. در بافت کبد تغییرات قابل ملاحظه‌ای در فعالیت SOD در در پایین‌ترین غلظت وجود نداشت در حالی‌که با افزایش زمان و دوز در غلظت $mg\ L^{-1}$ ۰/۳٦۷۵ و ۰/۷۳۵۰ $mg\ L^{-1}$ افزایشی به‌ترتیب مقادیر ۱۷۹ درصد و ۳٤۰ درصد مشاهده شد ولی فعالیت آن در روز ۳۰ کاهش یافت.

طی مطالعه‌ای که توسط ایسیک و همکاران بر روی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مواجهه با غلظت‌های ۰/۵–۱ میلی‌گرم در لیتر دیازینون در طی مدت ٢٤، ٤٨، ۷۲ ساعت با کاهش سطح SOD انجام شد، مشخص گردید که دلیل کاهش این آنزیم می‌تواند افزایش میزان رادیکال سوپراکساید آنیون حاصل از متابولیسم دایمتوات و مصرف این آنزیم در جهت حذف رادیکال سوپراکساید آنیون باشد (ایسیک و همکاران، ۲۰۰۸).

در بافت کبد تغییر خاصی در فعالیت GPx در روز ۵ مشاهده نشده است در صورتی‌که در روز ۱۵ افزایش یافت و در روز ۳۰ به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. علت کاهش فعالیت این آنزیم می‌تواند به‌این دلیل باشد که گلوتاتیون پراکسیداز آخرین آنزیمی است که وارد واکنش ضد اکسایشی می‌شود (اسچنیور و همکاران، ۲۰۰۵).

طی مطالعه‌ای که توسط هابیگ و همکاران صورت گرفت مشخص گردید که کاهش GPx احتمالا نشان‌دهنده نارسایی سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی برای مقابله با رادیکال آزاد و آسیب اکسیداتیو می‌باشد (هابیگ و همکاران، ۱۹۷٤) چون آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی که جزیی از سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی هستند به مقابله و حذف رادیکال آزاد می‌پردازد.

سطح پروتئین در گروه کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد اما تابع زمان در تمامی غلظت‌های به‌کاربرده شده کاهش‌یافته، که در روز ۱۵ و ۳۰ در بافت کبد مشاهده شد.

در طی تحیقیقی که توسط فاطما و همکاران صورت گرفت مشخص شد که با افزایش سمیت محلول کادمیوم سبب بروز رادیکال‌های آزاد می‌شود و میزان پروتئین کل به‌طور قابل توجهی کاهش یافت (ال- دمرداش و همکاران، ۲۰۰٤).

تغییر شاخص‌های استرس اکسیداتیو در کبد ماهیان در معرض غلظت‌های زیرکشنده دایمیتوات نشان‌دهنده آسیب وارده به بافت کبد در اثر افزایش سطح رادیکال‌های آزاد می‌باشد. در میان غلظت‌ها، ۰/۷۳۵۰ $mg\ L^{-1}$ و آنتی‌اکسیدان گلوتاتیون پروکسیداز بالاترین میزان را داشتند.

منابع

1. APHA-AWWA-WPCF. 1981. Standard methods for the examination of water and wastewater. APHA American Public Health Association
2. Ballesteros, M., Durando, P., Nores, M., Díaz, M., Bistoni, M., and Wunderlin, D. 2009. Endosulfan induces changes in spontaneous swimming activity and acetylcholinesterase activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). Environmental Pollution, 157(5): 1573-1580.
3. Begum, G., and Vijayaraghavan, S. 1995. Carbohydrate metabolism in hepatic tissue of freshwater catfish *Clarias batrachus* L. during dimethoate exposure. Food and chemical toxicology, 33(5): 423-426.
4. Beutler, E. 1984. Catalase. Red cell metabolism: a manual of biochemical methods, 105-106.
5. de Duve, C. 1971. Tissue fraction-past and present. The Journal of cell biology, 50(1): 20.
6. El-Demerdash, F.M., Yousef, M.I., Kedwany, F.S., and Baghdadi, H.H. 2004. Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and β-carotene. Food and chemical toxicology, 42(10): 1563-1571.
7. Fujii, Y., and Asaka, S. 1982. Metabolism of diazinon and diazoxon in fish liver preparations. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 29(4): 455-460.
8. Habig, W.H., Pabst, M.J., and Jakoby, W.B. 1974. Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. Journal of biological Chemistry, 249(22): 7130-7139.
9. Isik, I., and Celik, I. 2008. Acute effects of methyl parathion and diazinon as inducers for oxidative stress on certain biomarkers in various tissues of rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*). Pesticide Biochemistry and Physiology, 92(1): 38-42.
10. Johnson, W.W., and Finley, M.T. 1980. Handbook of acute toxicity of chemicals to fish and aquatic invertebrates: Summaries of toxicity tests conducted at Columbia National Fisheries Research Laboratory, 1965-78, US Fish and Wildlife Service.
11. Kavitha, P., and Rao, J.V. 2008. Toxic effects of chlorpyrifos on antioxidant enzymes and target enzyme acetylcholinesterase interaction in mosquito fish, *Gambusia affinis*. Environmental Toxicology and Pharmacology, 26(2): 192-198.

12. Livingstone, D. 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. Marine pollution bulletin, 42(8): 656-666.
13. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J biol Chem, 193(1): 265-275.
14. MacCord, J., and Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). J. Biol. Chem, 244: 6049-6055.
15. McKim, J.M., and Nichols, J.W. 1994. Use of physiologically based toxicokinetic models in a mechanistic approach to aquatic toxicology (Pp: 469-519). Lewis Publishing, Boca Raton FL.
16. Monteiro, D.A., De Almeida, J.A., Rantin, F.T., and Kalinin, A.L. 2006. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, Brycon cephalus, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology, 143(2): 149-141.
17. Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical biochemistry. 95(2): 358-351.
18. Oropesa, A.-L., García-Cambero, J.P., and Soler, F. 2009. Glutathione and malondialdehyde levels in common carp after exposure to simazine. Environmental toxicology and pharmacology, 27(1): 30-38.
19. Reuber, M.D. 1984. Carcinogenicity of dimethoate. Environmental research. 193(2): 193-211.
20. Rodrigues, E.d. L., Fanta, E. 1998. Liver histopathology of the fish *Brachydanio rerio* Hamilton-Buchman after acute exposure to sublethal levels of the organophosphate Dimethoate 500. Revista Brasileira de Zoologia, 15(2): 441-450.
21. Ruas, C.B.G., dos Santos Carvalho, C., de Araújo, H.S.S., Espíndola, E.L.G., Fernandes, M.N. 2008. Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metal-contaminated river. Ecotoxicology and environmental safety, 71(1): 86-93.
22. Schneider, C.D., Barp, J., Ribeiro, J.L., Belló-Klein, A., and Oliveira, A.R. 2005. Oxidative stress after three different intensities of running. Canadian journal of applied physiology, 30(6): 723-734.
23. Timbrell, J. 2001. Introduction to toxicology. CRC Press
24. Xing, H., Li, S., Wang, Z., Gao, X., Xu, S., and Wang, X. 2012. Oxidative stress response and histopathological changes due to atrazine and chlorpyrifos exposure in common carp. Pesticide biochemistry and physiology, 103(1): 74-80.