



بررسی القای آنزیمهای بیوترانسفورماسیون با ۳- متیل کلانترن در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

کتابون کریم زاده<sup>۱</sup>، عسکر زحمتکش<sup>۲</sup>، علی مصطفائی<sup>۳</sup>

۱: دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان

۲: مرکز آموزش عالی علمی کاربردی شیلاتی میرزا کوچک خان رشت

۳: مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

#### مقدمه

سیستم اکسیداز چند عملکردی وابسته به سیتوکروم P450 میکروزومی مسئول تغییر شکل زیستی مواد شیمیایی در مرحله اول متابولیسم می باشد. متابولیت های ایجاد شده در مرحله اول توسط آنزیم های کونژوگه کننده در مرحله دوم مانند گلوکوتایون S ترانسفراز به ترکیبات محلول تری تبدیل شده که به راحتی قادر به خروج از بدن می باشند [ ۱و ۶].

ماهیان همانند پستانداران دارای دسته ای از آنزیم های بیوترانسفورماسیون فاز اول و فاز دوم هستند که در کبد و سایر اندام ها وجود دارند. [ ۵ ] این سیستم های آنزیمی به سرعت آلاینده های شیمیایی نظیر PAHs را به ترکیبات محلول در آب که قابلیت دفع از بدن را دارند، تبدیل می کنند. لذا این تحقیق به منظور بررسی رابطه میان آلاینده های نفتی نظیر ماده ۳- متیل کلانترن با میزان فعالیت آنزیم های سیستم چند عملکردی وابسته به سیتوکروم P450 و فاز دوم متابولیسم مانند گلوکوتایون S ترانسراز در ماهی کپور معمولی انجام گرفت.

#### مواد و روشها

نمونه های کپور ماهی در محدوده وزنی ۱۵۰ تا ۲۰۰ گرم و سن حدود دو سال از مزارع پرورش ماهی واقع در استان کرمانشاه در پاییز سال ۱۳۸۱ تامین گردید. مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکتهای مرک، سیگما، فارماسیا و بیوسنس تهیه گردید. تعداد ۱۸ ماهی در ۳ گروه ۶ تایی (یک گروه کنترل و دو گروه آزمون) تقسیم گردید. ماهیان طی مدت زمان ۲۴ ساعت مورد تغذیه قرار نگرفتند.

۳ متیل کلانترن در غلظت ۲۰ و ۴۰ میلی گرم در میلی لیتر در روغن ذرت تهیه شد. به ۲ گروه آزمون به ترتیب ۲۰ و ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن ماهی در طی سه روز از ۳- متیل کلانترن در روغن ذرت به صورت درون صفاتی تزریق گردید. گروه کنترل به ازای هر کیلوگرم وزن ماهی همان حجم ( ۱ میلی لیتر به ازای هر کیلوگرم ) روغن ذرت دریافت نمودند. میزان فعالیت آنزیم سیتوکروم P450A1 از روی واکنش دی اتیلاسیون سوبسترای ۷- اتوکسی زروفین طبق روش بورک و مایر (Burke & Mayer, 1974) با کمی

تغییرات تعیین گردید. میزان فعالیت آنزیم NADPH - سیتوکروم C ردو کناز طبق روش ماسترز و همکاران (Masters,etal, 1967) تعیین گردید و مقدار فعالیت آنزیم گلوکوتایون S ترانسفراز در حضور سوبسترای ۱- کلرو ۴، ۲ دی نیتروبنزن توسط اسپکتروسکوپی به روش هبیب و جکوبای (Habige and Jakoby, 1981) اندازه گیری گردید.

#### نتایج

در این مطالعه تیمار ماهی کپور با یک و دو دوز از ماده ۳- متیل کلانترن ( ۲۰ و ۴۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن ) فعالیت این آنزیم سیتوکروم را به ترتیب حدود ۱۵ و ۲۰ برابر گروه کنترل افزایش داد. میزان فعالیت آنزیم های گلوکوتایون S ترانسفراز در این ماهیان نیز



## اولین کنفرانس ملی علوم شیلات و آبریزان ایران

۱۷-۱۹ اردیبهشت ۱۳۸۷ - لاهیجان



حدود ۱/۶ برابر افزایش نشان داد. نتایج اندازه گیری فعالیت آنزیم های NADPH - سیتوکروم C ردو کتاز و آنیلین ۴- هیدروکسیلاز میکروزوم های کبدی ماهی کپور در دو شرایط کنترل و تیمار شده در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱: مقادیر فعالیت آنزیم های بیوترانسفورماسیون کبد ماهی کپور معمولی در شرایط کنترل و تیمار شده با ترکیب 3-MC

تیمار با 3-MC	کنترل	آنزیم ها یا کسیداز چند عملکردی
۰/۰۰۴±۰/۰۲	۰/۰۰۳ ± ۰/۰۱۹	آنیلین ۴- هیدروکسیلاز
۳/۱۲±۲۶/۱	۰/۳۴±۲۳/۳۲	سیتوکروم NADPH ردکتاز P450
۰/۱۳±۲۰/۲۱	۰/۰۹±۱/۳۰	فعالیت EROD
۰/۰۳±۱/۶۱	۰/۰۰۲±۰/۰۴	فعالیت آنزیم گلوکوتایون ترانسفراز S

### بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که القای آنزیم های بیوترانسفورماسیون توسط ترکیب ۳- متیل کلاترن در ماهی کپور سبب افزایش بیان ژن و بیوستز آنزیم های اکسیژناز چند عملکردی بویژه سیتوکروم و آنزیم کونزوگه کننده گلوکوتایون S ترانسفراز می گردد. در ضمن نتایج SDS-PAGE فراکسیون میکروزومی ماهیان القا شده حاکی از افزایش بیوستز مقدار پروتئین سیتوکروم P450A1 سلولهای کبدی می باشد. بنابراین از درجه القا پذیری آنزیمهای بیوترانسفورماسیون می توان به عنوان یک بیومارکر جهت سنجش اثرات ترکیبات چند حلقه ای و دی فنیل های چند کلره استفاده نمود.

### منابع

- 1-Arinc, E. and Sen, A., 1994. Effects of in vivo benzo(a)pyrene treatment on liver microsomal mixed function oxidase activities of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 107C. pp. 405-414.
- 2-Burke, M.D. & Mayer, R.T., 1974. Direct fluorometric assay of microsomal O-dealkylation which preferentially induced by 3-methylcholantrene. *Drug. Metab. Dispos.*, 2583-588.
- 3-Habig, W. H., Pabst, M. J., Jakoby, W. B. (1974). Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249: 7130-7139.
- 4-Masters, B.S.S., Williams, C.H., Kamin, H., 1967. The preparation and properties of microsomal TPNH cytochrome c reductase from pig liver. *In Methods in Enzymology.* 10, 565-573.
- 5-Sarasquete, C. & Senger, H., 2001. Cytochrome P450A1 in teleostean Fishes. *The science of the total environment.* 247, 313-332.
- 6-Sirosoka, Z. & Drastichova, J., 2004. Biochemical markers of aquatic environment contamination, cytochrome P450 in Fish. *A review. Acta. Vet. Brno.* 73, 123-132.



اولین کنفرانس ملی علوم شیلات و آبزیان ایران

۱۷-۱۹ اردیبهشت ۱۳۸۷ - لاهیجان



## Induction Of Biotransformation Enzymes In Carp(*Cyprinus carpio*)

Karimzadeh K.1\*, Zahmatkesh A. 2, Mostafaei A3

\* Azad university branch of Lahijan. (2) Mirza Koochak Khan Higher Education Center for Fishery Science and Technology, Rasht, (3) Research center of Medical Biology, Kermanshah university of medical science.

### Abstract

The cytochrome P450- dependent mixed function oxidase system is responsible to catalyze the first step of chemical biotransformation. Chemicals were metabolized further by conjugated enzymes in phase two. In this research the inducing effects of 3 - MethylCholantheren were studied in *Cyprinus carpio* biotransformation enzymes.

Fish were received 3 - MethylCholantheren at doses about 20 and 40 mg/kg body weight/day i.p. for 3 days. There was observed a 1.6 fold increase in Gluthatione-S transferases enzyme activity in treatment fish. 3 - MethylCholantheren treatment also caused a 15-20 fold increase in 7 - Ethoxyresorufin - O -deethylase (EROD) activity of fish liver microsome.

Carp liver microsomal EROD activity was investigated with respect to substrate concentration, amount of enzyme, incubation period and temperature. SDS -PAGE of microsomal protein pattern was shown that there is a protein with molecular mass of  $58 \pm 1$  KDa. So induction effect of 3 - Methylcholantheren could be induced isoenzyme P4501A. and Gluthatione- S- tranferases and is increased the isienzyme biosynthesis.

**Key words:** mixed function oxidase, Gluthatione-S-transferases, Ethoxyresorufin - O -deethylase