مطالعه شاخص‌های استرس و برخی از آنزیم‌های خون بچه ماهیان سفید خزر (*Rutilus frisii kutum*) تحت تأثیر سم دیازینون

- **نعیمه فکری***: واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران صندوق پستی: ۷۷۵-۱٤۱۵۵
- **شهلا جمیلی**: واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران صندوق پستی: ۷۷۵-۱٤۱۵۵
  مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران صندوق پستی: ۱٤۱۵۵-٦۱۱٦
- **محمود رامین**: مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران صندوق پستی: ۱٤۱۵۵-٦۱۱٦
- **علیرضا ولی‌پور**: پژوهشکده آبزی‌پروری آبهای داخلی، بندر انزلی صندوق پستی: ٦٦
- **عباسعلی زمینی**: دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، صندوق پستی: ۱٦۱٦

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۰

چکیده

دیازینون آفت‌کشی ارگانوفسفره است که مصارف زیادی در کشاورزی و خانگی دارد و برای کنترل حشرات در خاک، گیاهان، میوه و سبزیجات مورد استفاده قرار می‌گیرد. سموم ممکن است تغییرات سیتوپاتولوژیکی و رفتاری زیادی را در ماهی و دیگر ارگانیسم های آبزی بوجود آورند. بیشتر مطالعات سم دیازینون روی تأثیر آن بر تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژی متمرکز شده‌اند و کمتر به نوسانات هماتولوژیک پرداخته‌اند. در این تحقیق اثر سم دیازینون روی آنزیم کولین استراز، لاکتات دهیدروژناز، گلوکز و کورتیزول بچه ماهی سفید بررسی گردید. به این منظور ۱۲۰ عدد بچه ماهی با میانگین (± انحراف معیار) وزن (۱±۱۱) گرم در ٤ تیمار و ۳ تکرار در نظر گرفته شد. با توجه به اینکه غلظت LC_{50} این سم در آزمایشات قبلی تعیین گردیده بود، مقادیر (۲۵، ۵۰ و ۷۵) درصد از غلظت کشنده سم دیازینون ٦۰ درصد بعنوان تیمارهای مختلف این آزمایش انتخاب گردید. برای اضافه کردن سم، یک محلول استاندارد با غلظت‌های ٦ سی‌سی، ۱۲ سی‌سی و ۱۸ سی‌سی تهیه و میزان ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد از غلظت کشنده دیازینون را محاسبه کرده و توسط پیپت مدرج به وان‌های۱۰۰ لیتری حاوی ماهی اضافه گردید. مطالعه فاکتورهای استرس و آنزیمی در معرض سم در غلظت‌های یاد شده از LC_{50} نشان داد که مقادیر شاخص‌های استرس (گلوکز و کورتیزول) در گروه آزمایشی بیشتر از گروه کنترل بود ($P<0.05$). تفاوت معنی‌دار آماری از لحاظ لاکتات دهیدروژناز در بین گروه آزمایشی و کنترل قابل مشاهده نبود ($P>0.05$). همچنین مقدار آنزیم کولین استراز بطور معنی‌داری کمتر از گروه شاهدگردید ($P<0.05$).

کلمات کلیدی: ماهی سفید، *Rutilus frisii kutum*، دیازینون، استرس، آنزیم

*پست الکترونیکی نویسنده مسئول: naiemefekri@gmail.com

مقدمه

دیازینون یکی از مهمترین آفت‌کش‌های ارگانوفسفره می‌باشد که به منظور کنترل حشرات در خاک، گیاهان، میوه و محصولات زراعی دیگر استفاده می‌شود (۱۵). اگر چه دیازینون بسرعت تجزیه می‌شود ولی تحت شرایط خاص، پایین بودن دما، رطوبت پایین، قلیائیت بالا و فقدان فعالیت تجزیه میکروبی می‌تواند تا شش ماه و حتی بیشتر از نظر زیستی در خاک فعال باقی بماند (۲۰). دیازینون از نوع آفت‌کشهای ارگانوفسفره است (۳۷) که معمولاً از طریق زهکش مزارع کشاورزی وارد آبهای سطحی و حتی زیرزمینی می‌گردد (۳۹). مکانیزم آثار سمی دیازینون مانند سایر سموم ارگانو فسفر، موجب مهار شدن کلیه آنزیم‌ها بویژه استیل کولین استراز می‌گردد (۶، ۲۲، ۲۳ و ۴۰). حساسیت ویژه ماهی به دیازینون تا حدود زیادی به قابلیت‌های جذب، مهار استیل کولین استراز و دفع مواد سمی بوسیلهٔ ماهی بستگی دارد (۳۴). دیازینون از طریق باند شدن با آنزیم‌های عصبی استیل کولین استراز و بلوکه نمودن آن سبب اسپاسم عضلانی در جانوران می‌گردد مقدار LC_{50} دیازینون بسیار متغیر است و به سن، وزن، جنسیت موجود و شرایط اقلیمی محیط بستگی دارد. دوزهای تحت کشنده دیازینون ممکن است منجر به کاهش رشد و توان تولید مثلی و بقای بی‌مهرگان آبزی و همچنین کاهش توان زادآوری، تأخیر در بلوغ جنسی، اختلال در تغذیه و افت وزن بدن و نیز ناهنجاری‌های عصبی و رفتاری در ماهی‌ها، دوزیستان، پرندگان و پستانداران می‌گردد (۲۰ و ۱۸). استرس به شرایط محیطی گفته می‌شود که تعادل دینامیک با هموستازی جانور در نتیجه عمل محرک‌های خارجی که عوامل استرس‌زا نامیده می‌شوند برهم زده شود (۴۷). استرس نوعی تهدید برای تعادل یا هموستازی بدن است و پاسخ به استرس وابسته به کیفیت، شدت و مدت زمان اثر عامل استرس‌زا و موقعیت ارگانیزم است. استرس اثرات منفی روی سیستم بدن دارد. یکی از شاخص‌های مهم و قابل اطمینان در بررسی وضعیت سلامتی و فیزیولوژی ماهیان سنجش پارامترهای خون آنهاست که از تغذیه، عوامل محیطی و سن نیز اثر می‌پذیرد (۲۱). گلوکز و کورتیزول شاخص‌های مناسب فیزیولوژیک جهت بررسی رخداد استرس در ماهیان می‌باشند و به هنگام وقوع استرس مقادیر آنها افزایش می‌یابد (۱۳ و ۴۱). کورتیزول مهمترین کورتیکوستروئید فعال از نظر بیولوژیکی در خون ماهیان استخوانی و خاویاری محسوب می‌شود (۲۵). بیوشیمی خون ماهیان راهکار مناسبی برای ارزیابی بیولوژی و پاتولوژی ماهیان محسوب می‌شود (۱۹ و ۳۰) که از این جمله می‌توان به مطالعه اثر دیازینون بر برخی شاخص‌های خونی و بیوشیمیایی تاسماهی روسی (چالباش) (*Acipener guldentadit*) توسط سلطانی و خوشباور رستمی (۱۳۸۱) و تأثیر دیازینون را در خصوصیات بیوشیمیایی پلاسمای خون ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) توسط luskova و همکاران (۲۰۰۲) اشاره کرد.

هدف از این تحقیق، بررسی شاخص‌های استرس شامل: گلوکز و کورتیزول خون و برخی آنزیم‌ها مانند کولین استراز و لاکتات دهیدروژناز، تحت تأثیر سم دیازینون روی ماهی سفید و مقایسه آن با گروه شاهد می‌باشد.

مواد و روشها

۱۲۰ عدد بچه ماهی سفید با میانگین (± انحراف معیار) وزن (۱±۱۱) گرمی از استخر واقع در مرکز تکثیر و پرورش ایستگاه تحقیقاتی شیلاتی سفید رود صید و به سالن واقع در همان مرکز منتقل گردیدند و در ۱۲ وان ۱۰۰ لیتری فایبرگلاس که از قبل شستشو و ضدعفونی گردیده بودند، نگهداری شدند. سپس به مدت یک هفته به منظور سازگاری با کیفیت آب ماهیان تغذیه شدند. آزمایشات بصورت ساکن (Static) بود که در آن محلول آزمایش در طول انجام آزمایش تغییر نکرده و کاملاً ثابت بود. برای تهیه هر غلظت یک استوک یک میلی‌گرم در لیتر تهیه گردید. بدین منظور ۱ سی‌سی از سم را در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر از آب مقطر حل کرده و استوک ۱ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد (۴). براساس فرمول $c_1v_1=c_2v_2$ میزان ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد از LC_{50} (۰/۳۴ میلی‌گرم در لیتر) دیازینون را محاسبه کرده و حجمی از محلول پایه (استوک) به میزان این غلظت، توسط پیپت مدرج برداشته و به وان حاوی ماهی اضافه گردید. این آزمایش براساس دستورالعمل OECD و در قالب یک طرح کاملاً تصادفی در ۴ تیمار و ۳ تکرار انجام پذیرفت که در تیمار شاهد هیچ سمی اضافه نگردید. غلظت سم در این آزمایش معادل $\frac{1}{4}$ ، $\frac{2}{4}$ و $\frac{3}{4}$ مقدار سمیت LC_{50} ۹۶ ساعته دیازینون (۰/۳۴ میلی‌گرم در لیتر) برای بچه ماهی سفید در نظر گرفته شد. ماهی‌ها به مدت ۷ روز در معرض سم قرار گرفتند و پس از گذشت این مدت، با پودر گل میخک بیهوش شده و سپس خونگیری بعمل آمد. خونگیری از طریق سوراخ کردن سرخرگ یا

سیاهرگ دمی صورت می‌گیرد.

به منظور مطالعات بیوشیمیایی، سرم خون را جدا کرده و با استفاده از روش آنزیمی DGKC (استاندارد انجمن بیوشیمیایی آلمان) و دستگاه اسپکتروفتومتر، آنزیم کولین استراز و آنزیم لاکتات دهیدروژناز اندازه‌گیری شد. تعیین مقادیر هورمونهای کورتیزول با استفاده از دستگاه اتوماتیک گاماکانتر و بکارگیری کیت هورمونی برحسب نانومول در دسی لیتر با روش RIA (Radioimmunoassay) انجام گردید (۷). اندازه‌گیری گلوکز سرم خون با روش آنزیماتیک و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ۵۴۶ نانومتر انجام پذیرفت. میزان گلوکز برحسب میلی‌گرم در دسی لیتر محاسبه گردید.

به منظور بررسی توزیع نرمال داده‌ها از آزمون Kolmogorov-smirnov استفاده شد. در صورت نرمال بودن داده‌ها به منظور مقایسه آماری بین گروه‌ها در تیمارها از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه (Oneway ANOVA) و پس از انجام آزمون Test of Homogeneity test of variances جهت مقایسه میانگین گروه‌ها با یکدیگر از آزمون دانکن استفاده شد. در صورت نرمال نبودن داده‌ها برای مقایسه تیمارها از آزمون Kruskal-Wallis استفاده شده است. همچنین به منظور بررسی ضریب همبستگی داده‌ها از آزمون Pearson استفاده شد.

نتایج

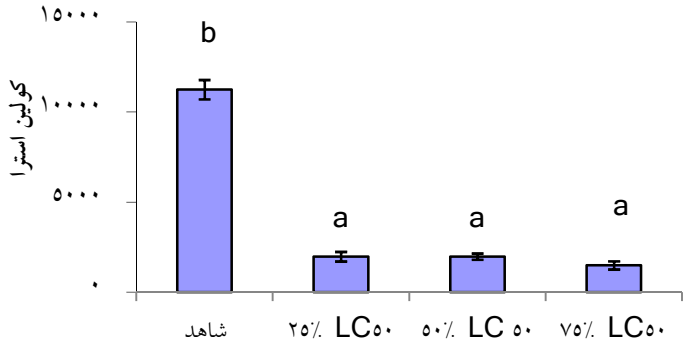
نتایج بدست آمده از اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی خون در گروه آزمون و شاهد نشان داد که مقدار آنزیم کولین استراز بطور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد گردید ($P<0.05$). در حالیکه مقادیر گلوکز و کورتیزول بعنوان شاخص‌های استرس در گروه آزمایشی بیشتر از گروه کنترل مشاهده شد ($P<0.05$). تفاوت معنی‌داری از لحاظ لاکتات دهیدروژناز در بین گروه آزمایشی و کنترل قابل مشاهده نبود ($P<0.05$).

در نمودار ۱ مقادیر دیازینون در ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد از LC_{50} با میانگین ۱۹۸۰±۲۶۵/۷۵، ۱۹۸۲/۵±۱۷۴/۸۶ و ۱۴۹۳/۱۲±۲۲۵/۵ اختلاف معنی‌دارآماری با گروه شاهد با میانگین ۱۱۲۴۳/۳۳±۵۳۹/۲۱ از نظر میزان آنزیم استیل کولین استراز داشتند که این امر نشان‌دهنده‌ی آن است که دیازینون بر تولید این آنزیم اثر سمی و مهارکنندگی داشته است.

در نمودار ۲ افزایش مقادیر گلوکز در تیمارهای ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد از LC_{50} نسبت به شاهد نشان‌دهنده‌ی بروز یک عامل استرس شدید بود که در اثر تأثیر دیازینون بر ماهیان مورد آزمایش وارد شده است. بیشترین مقدار گلوکز در تیمار ۷۵ درصد با میانگین ۵۱/۶۲±۹/۳۰ و کمترین مقدار گلوکز در تیمار شاهد با میانگین ۲۴/۸۳±۲/۶۰ مشاهده شده و میزان گلوکز در مقدار ۷۵ درصد LC_{50} با شاهد اختلاف معنی‌دار آماری داشته است ($P<0.05$).

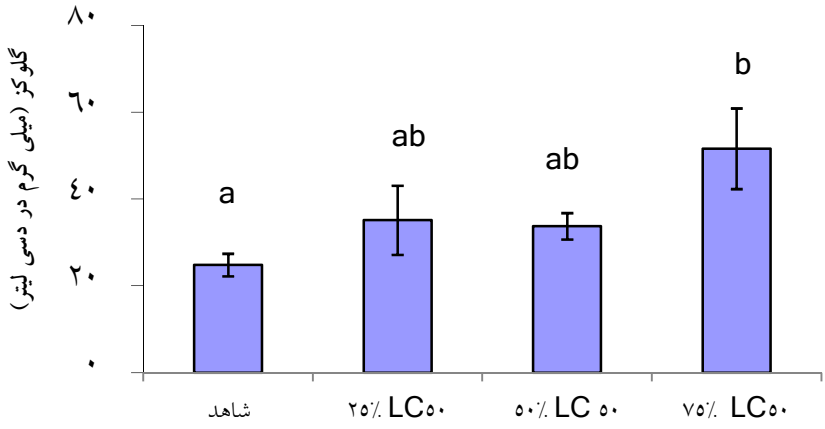
در نمودار ۳ افزایش مقادیر کورتیزول نیز که یکی از شاخص‌های استرس در موجودات زنده می‌باشد نشان‌دهنده‌ی تأثیرات منفی و سمی دیازینون بر ماهیان مورد آزمایش می‌باشد. بطوریکه مقادیر کورتیزول در غلظت‌های ۵۰ و ۷۵ درصد LC_{50} بیشتر از گروه شاهد و ۲۵ درصد LC_{50} می‌باشد و میزان کورتیزول در مقدار ۵۰ درصد با میانگین ۹۶/۷۵±۱۶/۱۲ نسبت به گروه شاهد با میانگین ۳۳/۵±۱۰/۳۹ اختلاف معنی‌دار آماری داشته است ($P<0.05$).

در نمودار ۴ میزان آنزیم لاکتات دهیدروژناز در خون بچه ماهیان شاهد و تیمارها اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد ($P>0.05$). اما میزان آنزیم لاکتات دهیدروژناز خون بچه ماهیان در مقدار ۷۵ درصد با میانگین۲۱۹۶/۶۲±۴۲۲/۹۱ کاهش یافته و کمتر از مقدار ۲۵ و ۵۰ درصد LC_{50} و شاهد بترتیب با میانگین ۳۲۴۱/۸۷±۶۲۱/۰۹، ۳۳۷۲/۵±۱۷۴/۸۶ و ۳۳۶۱/۶۶±۶۶۳/۸۷ بوده است ($P<0.05$).

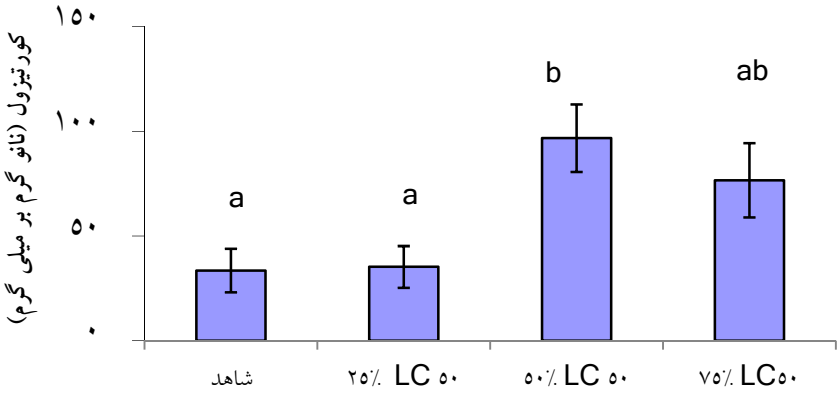


مقادیر غلظت **LC50** (درصد)

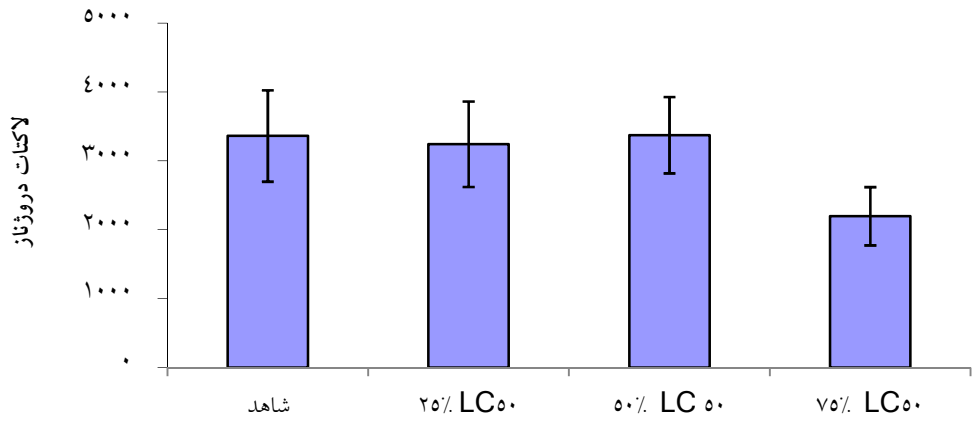
نمودار ۱: مقایسه میزان انزیم کولین استرا در شاهد و تیمارهای مختلف (±SE)



نمودار ۲: مقایسه میزان گلوکز در خون بچه ماهیان شاهد و تیمارهای مختلف (±SE)

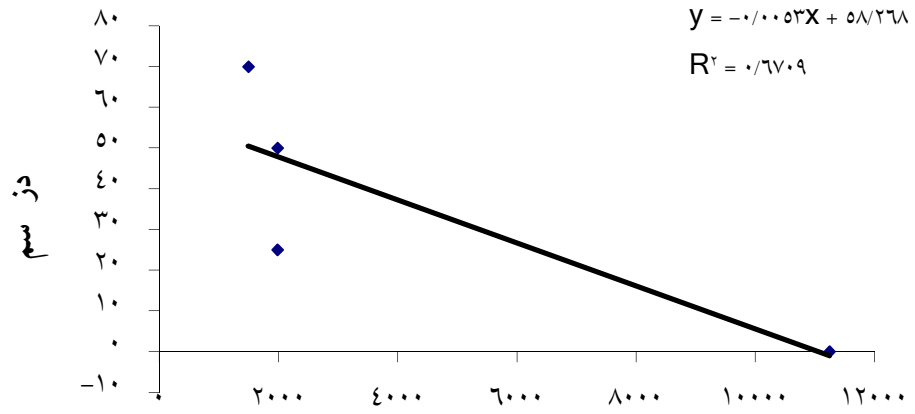


نمودار ۳: مقایسه میزان کورتیزول در خون بچه ماهیان شاهد و تیمارهای مختلف (±SE)

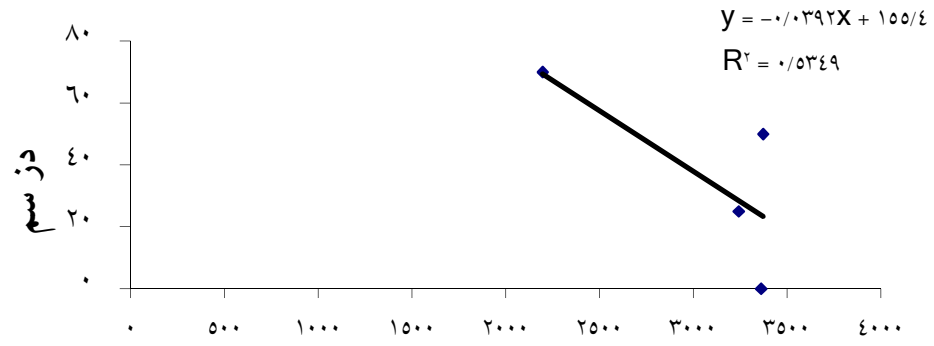


نمودار٤: مقایسه میزان آنزیم لاکتات دهیدروژناز در شاهد و تیمارهای مختلف (±SE)

براساس آزمون ضریب همبستگی پیرسون (Pearson correlation) به منظور بررسی میزان همبستگی بین دزهای مختلف و میزان آنزیم‌های کولین استراز (r = - 0.819) و لاکتات دهیدروژناز (r = - 0.731) در خون بچه ماهیان، همبستگی معکوس (براساس تعداد نمونه‌های مورد بررسی n=4) مشاهده گردید. نمودارها نشان می‌دهند که با افزایش میزان در سم دیازینون آنزیم‌های کولین استراز و لاکتات در خون بچه ماهیان کاهش می‌یابند. همچنین به منظور بررسی میزان همبستگی بین دوزهای مختلف و میزان گلوکز (r=0.894) و کورتیزول (r=80) در خون بچه ماهیان، همبستگی مثبت و مستقیم مشاهده شد. یعنی با افزایش دز سم میزان گلوکز و کورتیزول در خون بچه ماهیان افزایش یافت.

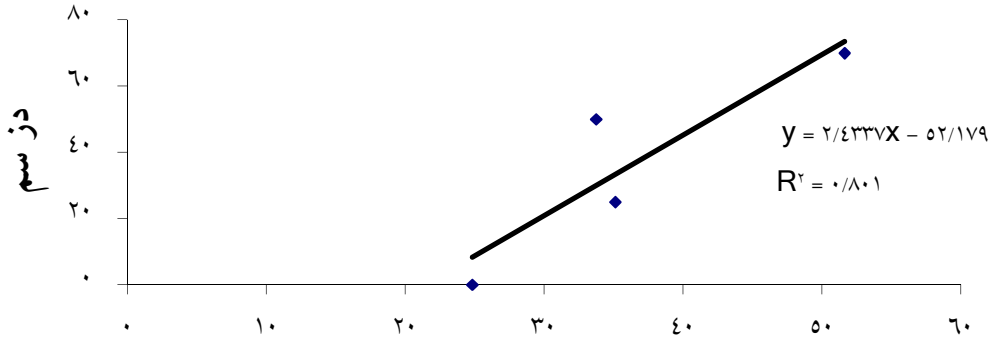


نمودار ۵: بررسی ضریب همبستگی پیرسون بین دز سم دیازینون و میزان آنزیم کولین استراز



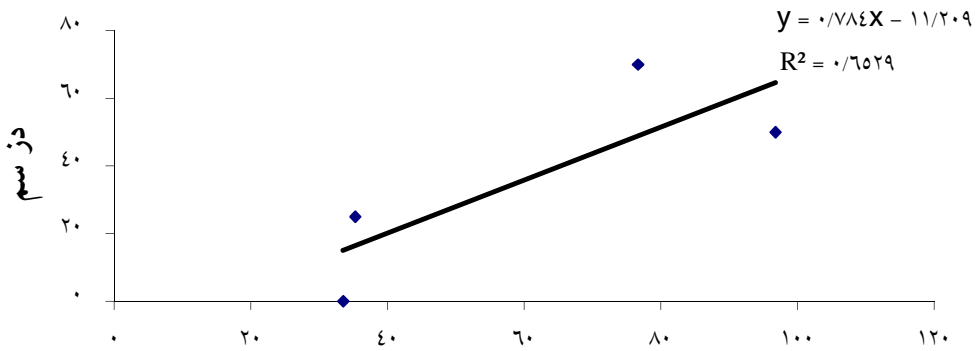
میزان آنزیم لاکتات دهیدروژناز (U/L)

نمودار ٦: بررسی ضریب همبستگی پیرسون بین دز سم دیازینون و میزان آنزیم لاکتات دهیدروژناز



میزان گلوکز (mg/dL)

نمودار۷: بررسی ضریب همبستگی پیرسون بین دز سم دیازینون و میزان گلوکز



میزان کورتیزول (ng/mL)

نمودار ۸: بررسی ضریب همبستگی پیرسون بین دز سم دیازینون و میزان کورتیزول

بحث

تغییرات عمده فاکتورهای بیوشیمیایی خون بچه ماهیان سفید در معرض دیازینون شامل کاهش معنی‌دار آنزیم کولین استراز و افزایش معنی‌دار در میزان گلوکز و کورتیزول خون و تغییرات در میزان لاکتات دهیدروژناز می‌باشد. استیل کولین مهمترین واسط شیمیایی است که از نرون‌های آکسون‌ها ترشح می‌شود واسط شیمیایی پس از انتقال پیام تحریک عصبی بایستی به فوریت از بین برود وگرنه تحریک پیوسته ادامه پیدا می‌کند؛ لذا وظیفه آنزیم استیل کولین استراز این است که پس از تحریک عصبی، استیل کولین را تجزیه کند. از آنجایی که سموم فسفره از نظر ساختمانی شباهت زیادی به سوبسترای طبیعی یعنی استیل کولین دارند (۲۵ و ۳۳) آنزیم فوق را مهار می‌نمایند و باعث می‌شوند که این آنزیم نتواند پس از تحریک عصبی در محل سیناپسها استیل کولین را تجزیه نماید، در نتیجه تحریک عصبی ادامه پیدا می‌کند که ادامه تحریک انقباض ماهیچه‌های مربوط را به دنبال داشته و در نهایت فلج و مرگ را سبب می‌شود. یکی از روش‌های تشخیص مسمومیت‌های ناشی از سموم فسفره بویژه مسمومیت مزمن اندازه‌گیری مقدار آنزیم استیل‌کولین استراز خون فرد مزمن است (۱). بنابراین بین آنزیم کولین استراز و غلظت سم و همچنین مدت زمان قرارگیری در معرض سم ارتباط معنی‌داری وجود دارد. کاهش معنی‌دار آنزیم کولین استراز در ماهی (*Oncorhynchus mykiss*)، ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) و گورخر ماهی (*Brachydanio rerio*) که در معرض دیازینون قرار داشتند گزارش شده است (۶، ۱۰ و ۲۹).

گلوکز یکی دیگر از فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون است که می‌تواند بعنوان یکی از شاخص‌های مهم در تعیین وضعیت فیزیولوژیک ماهی بکار رود. سطوح گلوکز پلاسما می‌تواند اطلاعات با ارزشی درباره مدت و شدت پاسخ استرس در دسترس قرار دهد (۳۵). با افزایش مصرف گلوکز و متابولیت‌های دیگر در بعضی گونه‌ها ذخایر گلیکوژن چربی کاهش می‌یابد و احتمالاً پروتئین‌ها برای تأمین انرژی شکسته می‌شوند (۹ و ۴۶). اگرچه افزایش گلوگز تا حدی مربوط به دستکاری استرس است اما می‌تواند اختلاف معنی‌دار با شاهد بدلیل اثرات سم باشد (۴۵) که در اثر تأثیر دیازینون بر ماهیان مورد آزمایش وارد شده است. افزایش گلوکز خون در ماهی (*Heteropneustes foillis*)، (*Cyprinus carpio*) و (*Oncorhynchus mykiss*) که در معرض cypermethrin، سولفات مس، اسید تانیک و دیازینون قرار داشتند، گزارش شده است (۹، ۱۰ و ۳۶). القای استرس اکسیداتیو در خون و بسیاری از اندام‌ها بعد از قرار گرفتن در معرض ارگانو فسفره‌ها در مقالات زیادی شرح داده شده است. اطلاعات موجود این نظر را که القای استرس اکسیداتیو و تغییر در متابولیسم گلوکز در سلولهای کبدی، بعد از قرار گرفتن در معرض سموم فسفره با هم مربوط هستند را حمایت می‌کند. مسیرهای گلیکوژنولیز و گلوکونئوژنز کبدی برای تولید گلوکز بیشتر و تأمین منبع انرژی برای فعالیت آنتی‌اکسیدانت‌های سلولی در برابر رادیکال‌های آزاد فعال شده توسط القای ارگانو فسفره‌ها تحریک می‌شوند (۴۷). تحت شرایط استرس‌زا، کاتکول آمین با تأثیر بر کبد سبب القاء گلیکولیز یا گلیکو نئوژنزیز می‌شود که این امر منجر به متابولیزه شدن گلوکز گشته و در نتیجه میزان گلوکز سرم افزایش می‌یابد (۸ و ۳۸). دیازینون نیز مانند سایر سموم ارگانو فسفره، آزادسازی گلوکز را از کبد به خون از طریق فعال‌سازی گلیکوژنولیز و گلوکونئوژنز بعنوان یک مکانیسم سم‌زدایی برای غلبه بر استرس سمی القا شده با دیازینون افزایش می‌دهد. مطالعات قبلی نیز دلیلی بر این مطلب هستند که ترکیبات ارگانوفسفره قادرند قند خون را افزایش دهند (۴۳، ۴۴، ۴۸ و ۴۹).

کورتیزول مهمترین هورمون کورتیکو استروئیدی می‌باشد که هورمونی فعال و اصلی در ماهیان استخوانی محسوب می‌شود (۲۵). کورتیزول از جمله مهمترین فاکتورها در ارزیابی بروز پاسخ ماهیان نسبت به آن محسوب می‌گردد. افزایش معنی‌دار مقادیر کورتیزول که یکی از شاخص‌های استرس در موجودات زنده می‌باشد نشان‌دهنده تأثیرات منفی و سمی دیازینون بر ماهیان مورد آزمایش است. سطوح کورتیزول در ماهیان بطور روزانه و فصلی و همچنین در بین گونه‌ها تغییرات و نوساناتی را نشان می‌دهد (۱۱، ۱۴ و۳۴) تحت شرایط استرس (ACTH) Adrenocortocotropic Hormone مترشحه از هیپوتالاموس به قسمت قدامی کلیه وارد و با تحریک سلولهای بین کلیوی سبب ترشح کورتیزول می‌شود (۲۷). سطح کورتیزول پلاسما بطور معمول بعنوان شاخصی از میزان تحمل استرس برای ماهی استفاده می‌شود (۱۲). Leonardi و همکاران (۲۰۰۳) مشاهده نمودند که نوکلئوتیدهای جیره سطوح کوتیزول سرم قزل‌آلای رنگین کمان سالم را بعد از ۹۰ تا ۱۲۰ روز تغذیه و ماهیان عفونی شده با ویروس نکروز لوزالمعده را کاهش دادند. این کاهش استرس مرتبط با نوکلئوتیدهای جیره منجر به افزایش مقاومت به بیماری برای ماهیان شد. اگر چه کورتیزول از جمله هورمون‌هایی است که بنظر می‌رسد نقش مهمی را در رشد ماهیان ایفا می‌نماید، افزایش بیش از حد طبیعی آن منجر به کاهش رشد می‌گردد. بطوریکه بررسی‌های انجام شده بر روی گربه ماهی (*Chetalurus punctatus*) و قزل‌آلای رنگین کمان نشان می‌دهد که ارتباط مستقیمی بین کورتیزول و تغییرات

ایجاد شده بر روی رشد وجود دارد (۱۶). افزایش کورتیزول موجب افزایش میزان متابولیسم چربی در بدن ماهی شده و موجب افزایش تجزیه چربی و آزاد شدن FfA در پلاسما می‌گردد و با افزایش اکسیداسیون اسیدهای چرب منجر به تشدید متابولیت‌ها می‌شود. تجزیه چربی‌ها و اکسیداسیون اسیدهای چرب در سلولها منجر به تکثیر سیستم متابولیکی در زمان بی‌غذایی، استرس و مهاجرت طولانی شده و از FfA برای ایجاد انرژی استفاده می‌کند (۳).

آنزیم لاکتات دهیدروژناز دارای پنج ایزو آنزیم مختلف است و عمل آن تسریع واکنش‌های تبدیل L-لاکتات وپیروات است. LDH در سیتوپلاسم تمامی بافت‌های بدن یافت می‌شود. اما غلظت‌های بالاتر آن در بافت‌های کبدی، قلبی و ماهیچه‌های اسکلتی و غلظت‌های پایین‌تر در بافت‌های پانکراس، کلیه معده و گلبولهای قرمز دیده می‌شود (۲۴ و ۳۶). تغییرات مقادیر آنزیم لاکتات دهیدروژناز در معرض دیازینون می‌تواند ناشی از تجمع دیازینون در بافت پارانشیم کبدی و در نتیجه ایجاد اختلال در سنتز آنزیم LDH دانست (۲۹). تغییرات این آنزیم در ماهی‌های مختلف مانند (*Channa punctatus*) و (*Oreochromis mossambicus*) که در معرض سموم ارگانوفسفره قرار داشتند گزارش شده است (۵ و ۳۶).

دیازینون و متابولیت‌های آن پس از ورود به بدن و عبور از سدهای بیولوژیک بدن با ایجاد اختلالات فیزیولوژیکی بطور مستقیم و غیرمستقیم بر ماهی تأثیر می‌گذارد. تغییرات عمده فاکتورهای بیوشیمیایی خون بچه ماهیان سفید در معرض دیازینون بیانگر آثار مضر این ترکیب ارگانوفسفره در ایمنوفیزیولوژی ماهی دارد. بنابراین با توجه به استفاده قابل توجه دیازینون در مزارع کشاورزی شمال کشور و مجاورت آنها با محل‌های رهاسازی این ماهیان، حداقل احتمال بروز استرسهای شدید پس از در معرض قرارگیری بچه ماهیان رها شده و در نتیجه بروز تلفات ناشی از عوامل ثانویه پاتوژن وجود دارد. لذا با توجه با این امر و گزارش دیگر محققین توصیه می‌شود پیش از مصرف هر گونه سم دفع آفات نباتی به پیامدهای مخرب زیست‌محیطی آن و احتمال نابودی آبزیان ساکن در بوم‌سازگان‌های نزدیک مزارع کشاورزی توجه شود. زیرا در غیر این صورت باید شاهد تشدید روند نابودی ماهی‌های بومی و تجاری در روند اختلالات فیزیولوژیک آنها بود.

تشکر و قدردانی

از کلیه همکاران بخش تکثیر و پرورش ایستگاه تحقیقاتی شیلاتی سفیدرود که در انجام این تحقیق ما را یاری نمودند، صمیمانه سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

۱-خانجانی، م. و پورمیرزا، ع.ا.، ۱۳۸۰. سم شناسی. انتشارات دانشگاه بوعلی سینا همدان. ۲۲۵ صفحه.

۲- سلطانی، م. و خوشباور رستمی، ح.ع.، ۱۳۸۱. مطالعه اثر دیازینون بر برخی شاخص‌های خونی و بیوشیمیایی تاسماهی روسی (*Acipenser gulenstadi*). مجله علوم و فنون دریایی ایران، سال اول، شماره ۴، صفحات ۶۵ تا ۷۵.

۳-غفوری صالح، س.؛ جمیلی، ش. و عباسی، ف.، ۱۳۸۷. بررسی اثرات فیزیولوژیکی استرس بر ترکیبات عضله و تغییرات هورمون کورتیزول در ماهی سوف در دیای خزر (*Stizostedion lucioperca*). مجله پژوهش و سازندگی، شماره ۷۹، صفحات ۸۷ تا ۹۴.

4-Adyin, R. and Kopruca, K., 2005. Acute toxicity of diazinon on the common carp (*Cyprinus carpio*) embryos and larvae. Pestic. Biochem. Phys., Vol. 82, No. 3, pp.220-225.

5-Agrahari, S., Pandey, K.C. and Gopal, K., 2007. Biochemical alteration induced by monocrotophos in the blood plasma of fish (*Channa punctatus*). Pestic. Biochem. Phys., 268-272.

6-Ansari, B.A., Aslam, M. and Kumar, K., 1987. Diazinon toxicity activites of acetyl-cholinesterease and phosphatase the nervous tissue of zebra fish (*Brachydanio rerio*) (Cyprinidae). Acta Hydrochim. Hydrobiol., 15:301–305.

7-Avella, M., Young, G., Prunet, P. and Schreck, C.B., 1990. Plasma prolactin and cortisol concentrations during salinity challenges of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) at smolt and post-smolt stages. Aquaculture, 91:359-372.

8-Axelord, J. and Resine, T.D., 1984. Stress hormones: Their interaction and regulation. Science, 224:452-459.

9-Banaee, M., Mirvaghefei, A.R., Rafei, G.R. and Majazi Amiri, B., 2008 Effect of sublethal diazinon concentration on blood plasma biochemistry, Int. J. Envir. Res., pp.189-198.

10-Banaee, M., Sureda, A., Mirvaghefi, A.R. and Ahmadi, K., 2011. Effects of diazinon on biochemical parameters of blood in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss)*. Pestic. Biochem. Phys., 99:1-6.

11-Barton, B.A., Schreck, C.B., Ewing, R.D., Hemmingsen, A.R., and Patino, R., 1985. Changes in plasma cortisol during stress and smoltification

in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Gen. Com. Endocrinol. 59:468-471.

12-Barton, B.A., 2002. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. Integr. Com. Biol., 42:517–525.

13-Bayunova, L., Barannikova, I. and Semenkova, T., 2002. Sturgeon stress reactions in aquaculture. J. Appl. Ichthyol., 18:397-404.

14-Bry, C., 1982. Daily variations in plasma cortisol levels of individual female rainbow trout *Salmo gairdneri*; Evidence for a postfeeding peak in well-adapted fish. Gen. Comp. Endocrinal. 48:462-468.

15-Coppage, D.C. and Matthews, E., 1974. Short term effects of organophosphate pesticide on cholinesterases of estuarine fishes and pink shrimp. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 32:483–488.

16-Davis, K.B., Torrance, P., Parker, N.C. and Suttle, M.A., 1985. Growth, body composition and hepatic tyrosine aminotransferase activity in cortisol fed channel cat fish (*Ictalurus punctatus*). J. Fish Biol., 27:177–184.

17-Deutsche Gesellschaft fur klinische Chemie Empfehlungen der deutschen Gesellschaft fur Klinische Chemic (DGKC), 1972. Standardisierung von Methoden zur Bestimmung von Enzymakivitaten in biologischen Flussigkeiten. Z Klin chem Klin Biochem., 10:92-182.

18-Dutta, H.M. and Arends, D., 2003. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. Envir. Res., 91:157-162.

19-Edsall, C., 1999 . A blood chemistry profile for lake trout. Animal Health.11. pp.81-86.

20-Eisler, R., 1986. Diazinon hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review. US Fish and Wildlife Service, U.S Dep. Int., Washington DC, USA. 85:1–38.

21-Fanouraki, E., Divanach, P. and Pavlidis, M., 2007. Baseline values for acute and chronic stress indicators in sexually immature red porgy (*Pagrus pagrus*). Aquaculture. 265:294–304.

22-Goodman, L.R., Hansen, D.J., Coppage, D.L., Moore, J.C. and Matthews, E., 1979. Diazinon chronic toxicity and brain acetylcholinesterase inhibition the sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*). 108:479-488.

23-Hamm, J.T., Wilson, B.W. and Hinton, D.E., 1998. Organophosphate-induced acetylcholine-sterase inhibition and embryonic retinal cell necrosis in vivo in the teleost (*Oryzias latipes*). Neurotoxicology, 19: 853-870.

24-Hasnain, H., 2005. Ontogenetic changes and developmental adjustments in lactat dehy-drogenase isozymes of an obligate air-breathing fish (*Channa punctatus*) during deprivation of air access. Com. Biochem. Phy. part B: Biochem. Molecu. Biol., 140:271-278.

25-Idler, D.R. and Truscott, B., 1972. Steroids in Nonmammalian Vertebrates. Academic Press. NewYork, USA.

26-Keizer, J., Agostino, G.D., Nagel, R., Volpe, T., Gnemid, P. and Vittozzi, l., 1995. Enzymological difference of AChE and diazinon hepatic metabolism: correlation of *in vitro* data with selective toxicity of diazinon to fish species. Sci. Total Envir., 171:213-220.

27-Kubilay, A. and Ulukay, G., 2002. The effect of acute stress on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Turk. J. Zool., 26:249-254.

28-Leonardi, M., Sandino, A.M. and Klempau, A., 2003. Effect of a nucleotide-enriched diet on the immune system, plasma cortisol levels and resistance to infectious pancreatic necrosis (IPN) in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Bull. Europ. Ass. Fish Pathol., 23:52–59.

29-Luskova, V., Svoboda, M. and Kolarova, J., 2002. The effect of diazinon on blood plasma biochemistry in carp (*Cyprinus carpio*). Acta Vet. Brno, 71:117–123.

30-Manera, M. and Britti, D., 2006. Assessment of bloodchemistry normal ranges in rainbow trout. Fish. Biol., 69:1435-1448.

31-OECD (Organization Economic coopration Development), 2001. Guideline for testing of chemicals. No. 210. Section 2. Effect on biotic system divection. pp.1-39.

32-Oh, H.S., Lee, S.K., Kim Y.H. and Roh, J.K., 1991. Mechanism of selective toxicity of diazinon to killifish (*Oryzias latipes*) and loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). Aquat. Toxicol. Risk Ass., 14: 343-353.

33-Pan, G. and Dutta, H.M., 1998. The inhibition of brain acetycholinesrerase activity of juvenile largemouth bass, *Micropterrus salmoides* by sub-lethal concentrations of diazinon. Envir. Res., 79:133-137.

34-Pickering, A.D. and Christis, A.A., 1981. Changes in the concentration of plasma cortisol and thyroxine during sexual matureation of the hatchery-reared brown trout (*Salmo trutta* L) Gen. Com. Endocrinol., 44:487-496.

35-Pottinger, T.G., 1998. Changes in blood cortisol, glucose and lactate in carp retained in anglerkeepnets. J. Fish Biol., 53:728-742.

36-Rao, J.V., 2006. Toxic effects of novel organophosphorus insecticide (RPR-V) on certain biochemical parameters of euryhaline fish (*Oreochromis mossambicus*). Pestic. Biochem. Phys., 86:78-84.

37-Robert, T.R. and Hutson, D.H., 1998. Metabolic pathways of Agrochemicals, Part 2: Insecticides and Fungicides. The Royal Sco. Chem., Cambridge, UK. 1475P.

38-Rottland, J. and Tort, L., 1997. Cortisol and glucose responses after acute stress by net handling in the sparid red poorgy previously subjected to crowding stress. J. Fish Biol., 51:21-28.

39-Saha, S. and Kaviraj, A., 2009. Effects of cypermethrin on some biochemical parameters and its amelioraction through dietary supplementation of ascorbic acid in freshwater catfish (*Heteropneustes fossilis*). Chemosphere, 74:1254-1259.

40-Sastry, K.V. and Sharma, K., 1980. Diazinon effect on the activities of brain enzymes from *Opiocephalus punctatus*) Channa. Bull. Environ. Contaim. Toxicol., 50:578-585.

41-Scherek, C.B., Contreas-Sanches, W. and Fitzpatrick, M.I., 2001. Effects of stress on fish reproduction, gamete quality and progeny. Aquaculture, 197:3-24.

42-Sohrabi, T., Hosseini, A. and Talebi, Kh., 2001. Tailwater quality changes in the rice-paddies of Guilan and Foumanta. L. Sci. and Tech. Agric. and Nat. Resour., Vol. 5, No. 1. Isfahan Univsity Technology, Isfahan, Iran.

43-Sweilum, M.A., 2006. Effect of sublethal toxicity of some pesticides on growth parameters, haematological properties and total production of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) and water quality of ponds. Aquac. Res., 37:1079–1089.

44-Teimouri, F., Amirkabirian, N., Esmaily, H., Mohammadirad, A., Aliahmadi, A. and Abdollahi, M., 2006. Alteration of hepatic cells glucose metabolism as non-cholinergic detoxication mechanism in counteracting diazinon-induced oxidative stress. Toxicol. Environ. Health., 25:697-703.

45-Toal, D.G., Afonso, L.O.B. and Iwama, G.K., 2004. Stress response of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to chemical cues released from stressed conspecifics. Fish Phy. Biochem., 30:103-108.

46-Velisek, J., Dobsikova, R., Svobodova, Z., Modra, H. and Luskova, V., 2006. Effects of deltmethrin on the biochemical profile of common carp (*Cyprinus carpio* L). Bull. Eviron. Con. Toxicol., 76:992-998.

47-Wendelaar Bonga, S. E. 1997. The stress response in fish. Phy. Rev., 77:591-625.

48-Yamamoto, T., Egashira, T., Yoshida, T. and Kuroiwa, Y., 1982. Increase of adrenal weight in rats by the repeated administration of fenitrothion. Toxicol. Lett., 11:187-191.

49-Zama, D., Meraihi, Z., Boubekri, N., Amrani, A., Tebibel, S. and Baali, N., 2005. Assessment of the changes in some diagnostics enzymes parameters in wistar albino rats treated with pesticides during gestation. Sci. Technol., 23:51-56.

Effect of diazinon on stress factors and some blood insides of kutum (*Rutilus frissi kutum*)

- **Naieme Fekri*:** Science and Research Branch, Islamic Azad University, P.O.Box: 14155-775 Tehran, Iran
- **Shahla Jamili:** Science and Research Branch, Islamic Azad University, P.O.Box: 14155-775 Tehran, Iran
  Iranian Fisheries Research Organization, P.O.Box: 14155-6116 Tehran, Iran
- **Mahmode Ramin:** Iranian Fisheries Research Organization, P.O.Box: 14155-6116 Tehran, Iran
- **Alireza Valipour:** Inland Water Aquaculture Research Center, P.O.Box: 66
- Bandar Anzali, Iran
- **Abasali Zmini:** Department of Natural Resources, Islamic Azad University Branch, Lahijan Branch, P.O.Box: 1616 Lahijan, Iran

Received: October 2011 Accepted: March 2012

Keywords: *Rutilus frisii kutum*, Diazinon, Stress, Enzyme

Abstract

Diazinon is an organophosphate pesticide that is widely used in agriculture and household for controlinf of soil insects, plants, fruits and vegetables. Toxics may create cytopathology and behavioral changes in fishes and other aquatic organisms. A further study on the effects of the pesticide diazinon has been focused more on physiological and biochemical changes and very rare on hematologic fluctuations. For this reason, 120 kutum with average weight of (11±1g) were selected in 4 treatments with 3 replicates. The LC50 concentration of the toxin was determined in previous experiments (25, 50 and 75%) of the lethal concentration of diazinon 60% were considered for this experiment. For adding the toxic, a standard solution with 6^{cc}, 12^{cc} and 18^{cc} concentration used with 25, 50 and 75% of LC50 was calculated and with a pipet added to 100lit tub with fish. Stress factors, cortisol and glucose were statistically ($P<0.05$) increased in higher levels of diazonon. There was no significant difference in terms of lactate Dehydrogenase between experimental groups and control ($P>0.05$). Level of cholinesterase in experimental groups were significantly lower than the control ($P <0.05$).

*Corresponding author's email: naiemefekri@gmail.com