

مقاله پژوهشی

## بیان ژن CYP1A و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ماهی زروک (*Scatophagus argus*) به عنوان نشانگر زیستی آلاینده‌های نفتی

احمد قاسمی<sup>۱\*</sup>، سپیده حسین‌جان‌زاده<sup>۲</sup>

DOI: 10.22124/japb.2022.21777.1458

تاریخ پذیرش: خرداد ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: بهمن ۱۴۰۰

### چکیده

ارزیابی و پایش اثرات آلاینده‌ها در محیط زیست نیازمند تعیین یک نشانگر مناسب است. در این پژوهش کارایی بیان ژن CYP1 و شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی به عنوان نشانگر زیستی آلاینده‌های نفتی در ماهی زروک (*Scatophagus argus*) در سه ایستگاه (اسکله صلح‌آباد، جفره و بندرگاه) در شهر بوشهر و نمونه‌های شاهد بررسی شد. بیان ژن CYP1A در کبد در تمامی مناطق اختلاف معنی‌داری با نمونه‌های شاهد داشت. بیشترین میزان بیان ژن CYP1 در ایستگاه صلح‌آباد اندازه‌گیری شد. بیان ژن CYP1A در آبشش ماهی‌های زروک نسبت به نمونه‌های شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد. بیشترین و کمترین میزان بیان ژن CYP1A در آبشش به ترتیب در نمونه‌های صلح‌آباد و بندرگاه مشاهده شد. میزان آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز بافت کبد در ایستگاه‌های جفره و صلح‌آباد از نمونه‌های گروه شاهد و بندرگاه به طور معنی‌داری کمتر بود ( $P < 0.05$ ). اما میزان پراکسیداسیون چربی و گلووتاتیون اس-ترانسفراز با میزان هیدروکربن‌های نفتی همبستگی مستقیمی داشت ( $R = 0.96$ ;  $P < 0.05$ ). با توجه به ارتباط بین بیان ژن CYP1A و شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی با میزان آلاینده‌ها می‌توان بیان ژن CYP1A و شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی را به عنوان نشانگر زیستی مناسبی برای آلاینده‌های PAH در این گونه استفاده کرد.

**واژگان کلیدی:** ماهی زروک، *Scatophagus argus*، نشانگر زیستی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، بوشهر.

- ۱- استادیار گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران.
- ۲- دانشجوی کارشناسی ارشد شیلات، گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

\* نویسنده مسئول: [aqasemi@gmail.com](mailto:aqasemi@gmail.com)

## مقدمه

مواد سمی را نشان می‌دهد (Van Der Oost et al., 2003).

امروزه میزان بیان ژن آنزیم‌هایی که در پاسخ به مواد آلاینده در سطح سلولی تغییر می‌کند، به طور گسترده به عنوان نشانگر زیستی محیطی بهینه‌سازی شده‌اند و ویژگی‌های آنها به عنوان یک ابزار تشخیصی بحث می‌شود. در ماهیان ایزوآنزیمی از سیتوکروم P450 که قابلیت بالایی در پاسخ به آلاینده‌ها دارد، شامل خانواده CYP1 است که چندین ژن کد کننده آنزیم دارد. در این میان آنزیم‌های CYP1A1 و CYP1A2 بهترین پاسخ را به PAHها (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) دارند. مطالعات زیادی افزایش سطح پروتئین CYP1A را در گونه‌های مختلفی از ماهیان که در معرض مواد آلاینده نفتی قرار داشتند، نشان می‌دهند (Van De Oost et al., 2003; Santana et al., 2018).

ماهیان برای خنثی کردن آثار سمی رادیکال‌های آزاد، سیستم آنتی‌اکسیدانی موثری دارند. از مهم‌ترین آنزیم‌های سمیت‌زدایی ROSها (Reactive Oxygen Species)، در ماهیان می‌توان به سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و پراکسیداز (POD)

دریاها مکانی برای بسیاری از آلودگی‌های صنعتی و شهری هستند و محیط ساحلی در معرض‌ترین اکوسیستم دریای است. در این محیط گونه‌های دریایی به واسطه فعالیت‌های انسانی به طور فزاینده‌ای در معرض آلودگی‌های شیمیایی (فلزات سنگین، روغن، هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای و غیره) قرار می‌گیرند. آلاینده‌ها در بافت‌های آنها تجمع می‌یابند و سبب تغییر در شرایط زیستی این موجودات می‌شوند و تولیدمثل و رشد آنها را تحت تاثیر قرار می‌دهند. (Hassanin et al., 2012). بیشتر مطالعاتی که در زمینه آلودگی محیط زیست انجام می‌گیرد شامل آنالیزهای شیمیایی است که فقط درباره حضور مواد آلاینده است. اگر چه آنالیزهای شیمیایی می‌تواند مقادیر زیادی از آلودگی‌ها را به طور دقیق اندازه‌گیری کند اما این آنالیزها قادر به تعیین پتانسیل فعالیت آنها در موجودات نیستند. نشانگرهای زیستی می‌توانند این خلاء را پر کنند. نشانگرهای زیستی پاسخی به القای حضور گروه خاصی از آلاینده‌ها است که دارای خاصیت سمیت هستند این گروه از نشانگرها پاسخ قابل اندازه‌گیری از واکنش موجودات به

اشاره کرد. سوپراکسید دیسموتاز تجزیه آنزیماتیک  $O_2^-$  را به  $H_2O_2$  تامین می‌کند و کاتالاز نیز  $H_2O_2$  را به  $O_2$  و آب تبدیل می‌کند. سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز اولین خط آنزیمی دفاع آنتی‌اکسیدانی هستند (Abele et al., 2017). این آنزیم‌ها با کاهش دادن سطوح  $O_2^-$  و  $H_2O_2$ ، نقش مهمی در جلوگیری از تولید یون هیدروکسیل دارند. تغییرات ایجاد شده در سطح آنزیم‌های اکسیداتیو استرس می‌تواند در بدن ماهی‌ها به عنوان شاخص مورد استفاده قرار گیرد (Faheem and Lone, 2018; Santana et al., 2018). اگرچه کبد دارای دفاع آنتی‌اکسیدانی قوی است، اما تولید بیش از حد ROS و اختلال در این دفاع (مهار فعالیت‌های آنزیمی) می‌تواند باعث اکسیداسیون مولکول‌های زیستی شود. گلووتاتیون اس-ترانسفراز (GST) متعلق به یک خانواده از آنزیم‌های محلول در آب است که مسئول عملکردهای مختلفی مانند حمل و نقل درون سلولی، بیوسنتز و مهم‌تر از آن ترکیب کردن گلووتاتیون با مواد سمی است. اگرچه فعالیت GST غیرقابل پیش‌بینی توصیف نمی‌شود (Hellou et al., 2012)، اما به دلیل نقش مهمی که در سم‌زدایی PAHs، محصولات استرس اکسیداتیو مشتق شده از اکسیداسیون لیپید، اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها دارد، به عنوان یک نشانگر زیستی در بسیاری از مطالعات سم‌شناسی استفاده شده است (Van De Oost et al., 2003).

پراکسیداسیون لیپیدی (LPO) مجموعه‌ای از واکنش‌های زنجیره‌ای ناشی از رادیکال‌های آزاد مانند رادیکال هیدروکسیل است که می‌توانند منجر به از دست دادن یکپارچگی غشا و آسیب ثانویه به DNA و پروتئین‌ها، از طریق تشکیل ترکیب اضافی با آلدئیدهای سمی تولید شده از پراکسیدهای لیپیدی شوند. به این دلایل LPO به عنوان نشانگر زیستی مهمی در استرس اکسیداتیو شناخته می‌شود. مالون دی‌آلدئید مهم‌ترین محصول جانبی پراکسیداسیون چربی در سلول‌ها به شمار می‌رود. افزایش میزان مالون دی‌آلدئید در سلول به منزله یک نشانگر در ماهیان سنجش می‌شود (Agrahari et al., 2007).

تاثیر آنتاگونیستی و سینرژیستی آلاینده‌ها با انجام آنالیزهای شیمیایی در موجودات قابل بررسی نیست، از این رو نشانگرهای زیستی به منزله ابزاری حساس برای تعیین سریع آثار زیان‌آور آلاینده‌ها در آبزیان به کار می‌رود (Van Der Oost et al., 2003). با این وجود نشانگر ویژه‌ای برای اندازه‌گیری آثار مخرب

### مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری ماهی زروک (*Scatophagus argus*) از سه منطقه در اطراف شهر بوشهر شامل اسکله صلح‌آباد (N ۲۸° ۵۸' ۴۲/۳" و E ۲۸° ۵۵' ۲۵/۷" N) جفره (E ۵۰° ۵۱' ۰۳/۷" و N ۴۹° ۱۴/۹" N) و بندرگاه (E ۵۰° ۴۸' ۲۵/۰" و N ۲۸° ۴۹' ۱۴/۹" N) در تابستان انجام گرفت. از هر منطقه ۳ قطعه ماهی با وزن حدود ۵۰ گرم صید شد و از کبد و آبشش قطعه‌ای از بافت جدا شد و در محلول نگهداری RNAlater (Qiagen، آلمان) تثبیت شد. یک گروه شاهد شامل ۵ عدد ماهی زروک صید شده از بندرگاه به مدت یک ماه در آب شور بدون آلودگی (تهیه شده با نمک کورال) نگهداری شد. پس از این زمان از کبد و آبشش ۳ ماهی نمونه‌گیری شد و بخشی از نمونه در محلول RNAlater و بخشی در نیتروژن مایع تثبیت شد. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه پژوهشکده خلیج فارس تا زمان سنجش آنزیمی در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. همزمان با نمونه‌گیری از ماهیان، از رسوبات منطقه ساحلی نیز نمونه‌برداری شد و نمونه‌ها در ظرف‌های شیشه‌ای تیره در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل شدند.

عوامل محیطی معرفی نشده است که این مشکل را می‌توان با به کارگیری مجموعه‌ای وسیع‌تر از نشانگرهای بیوشیمیایی و مولکولی حل کرد.

در مطالعات میدانی که مخلوطی از ترکیبات آلاینده وجود دارد، نیاز به استفاده از نشانگر زیستی چندگانه برای ارزیابی اثرات این آلودگی‌ها بر موجودات است. ارزیابی اکوسیستم‌های دریایی یک جنبه مهم برای حفاظت از محیط زیست است و از نشانگرهای زیستی برای ایجاد ارتباط بین غلظت آلاینده‌ها و اثرات آنها در موجودات زنده استفاده می‌شود. پاسخ‌های زیستی مانند نشانگرهای زیستی می‌توانند به تجزیه و تحلیل یک محیط به عنوان یک پاسخ اولیه از ورود اکوسیستم‌ها به شرایط حاد کمک کنند.

مطالعات گذشته ارتباط بین میزان القای ژن در ماهی زروک (*Scatophagus argus*) با میزان بنزوالفایبرن را نشان داده‌اند (قاسمی، ۱۳۹۲). در این مطالعه با اندازه‌گیری میزان بیان ژن CYP1A و شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی در نمونه‌های به دست آمده از محیط‌های آلوده و غیرآلوده، کارایی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به عنوان نشانگر زیستی برای بررسی سلامت اکوسیستم ساحلی سنجش شد.

### اندازه‌گیری هیدروکربن‌های نفتی

برای استخراج هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای از دستگاه استخراج سوکسله و برای اندازه‌گیری میزان کل PAH از دستگاه کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنجی MS-GC (9933, Varian, امریکا) استفاده شد. با این دستگاه ترکیبات پس از جداسازی با استفاده از طیف‌سنج جرمی شناسایی شدند. تجزیه‌گر جرمی که برای آنالیز نمونه‌ها استفاده شد از نوع تله یونی II (Saturn II) بود.

### اندازه‌گیری شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی

برای اندازه‌گیری شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی ۲۰۰ میلی‌گرم از نمونه‌های کبد در آزمایشگاه وزن و با استفاده از ۱ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات سرد شستشو شدند. نمونه‌ها با قرار گرفتن روی ظرف یخ و افزودن بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار (pH ۴/۷) به نسبت ۵:۱ با استفاده از دستگاه هموژنایزر هموژن شدند. محلول به دست آمده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با ۱۲۰۰۰ دور دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. از لایه رویی برای سنجش آنزیم‌های سیتوسولی استفاده شد (Oliveira et al., 2010; Regoli et al., 2011).

سنجش آنزیم گلوکوتاتیون اس- ترانسفراز (GST) بر اساس روش Habig و همکاران (۱۹۷۴) انجام شد. ۱ میلی‌لیتر محلول واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار، EDTA ۱ میلی‌مولار، GSH ۲۰ میلی‌مولار و CDNB ۲۰ میلی‌مولار بود. واکنش با اضافه کردن ۲۰ میکرولیتر از عصاره بافتی شروع شد. تغییرات جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر به مدت ۵ دقیقه خوانده شد و میزان GST به صورت نانومول در هر میلی‌گرم پروتئین گزارش شد.

برای سنجش آنزیم کاتالاز (CAT) بافت کبد از روش Goth (۱۹۹۱) استفاده شد. بر اساس این روش هر چقدر میزان فعالیت آنزیم CAT در سرم بیشتر باشد جذب نوری نمونه‌های تیمار نسبت به گروه شاهد در طول موج ۴۱۰ نانومتر کاهش می‌یابد. در این روش هر واحد فعالیت آنزیمی برابر است با مقدار آنزیمی که بتواند ۱ میلی‌مول آب اکسیژنه را طی مدت زمان ۱ دقیقه به آب تبدیل کند. فعالیت آنزیم سوپراکسیداز دیسموتاز (SOD) بر اساس روش McCord و Fridovich (۱۹۶۹) اندازه‌گیری شد. این روش بر پایه اکسیداسیون پیروگالول است. پس از واکنش، جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر

نانومتر خوانده شد و نتایج بر حسب میلی‌مول مالون دی‌آلدئید بر گرم پروتئین بیان شد.

#### اندازه‌گیری بیان ژن

به منظور بررسی الگوی بیان با روش Real-time PCR طراحی آغازگرها با نرم‌افزار Primer 3 Web (v.4.0.0) بر اساس توالی ژن‌های CYP1A (XM\_046386899.1) طراحی شد. در این پژوهش، ژن خانه‌دار 18S rRNA به عنوان کنترل داخلی برای نرمال‌سازی داده‌ها استفاده شد (جدول ۱). استخراج RNA کل از ۲۰ میلی‌گرم بافت با استفاده از کیت استخراج RNA (RBC، آلمان) انجام شد. آلودگی احتمالی DNA ژنومی در مرحله قبل از شستشو با استفاده از آنزیم DNase1 انجام شد.

اندازه‌گیری شد. در این روش کاهش جذب نوری در دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. بر اساس سنجش انجام شده، ۱ واحد فعالیت آنزیمی SOD برابر است با مقدار آنزیمی که موجب مهار ۵۰ درصدی اتواکسیداسیون پیروگالول شود. میزان پراکسیداسیون چربی کبد بر اساس روش (Ringwood et al., 2003) اندازه‌گیری شد. به محلول پروتئینی استخراج شده تری‌کلرواستیک اسید ۱ درصد و تیوباربیتوریک اسید ۰/۶ درصد اضافه شد و سپس در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸۰ دقیقه انکوبه شد. نمونه‌ها پس از سرد شدن در مجاورت یخ، در ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. سپس جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۳۵

جدول ۱: ویژگی‌های آغازگرهای مورد استفاده برای اندازه‌گیری بیان ژن با استفاده از Real-time PCR

ژن (کد بانک ژنی)	نام آغازگر	توالی آغازگر (5-3)	طول محصول PCR (bp)	دمای ذوب (°C)
<b>18S rRNA</b> <b>Housekeeping gene</b> <b>(MH423481.1)</b>	18S F1	AGGCCCTGTAATTGGAATGAGT	۲۶۶	۶۰
	18S R	TTTTCAAAGTAAACGCTTCGGA		
<b>CYP1A</b> <b>(XM-046386899.1)</b>	ART F	CAGTGATGAGTTTGGTCAAGTGG	۲۵۷	۶۰
	ART R	TCTCATCTGACACCTGGACGTTA		

تکرار از مخلوط cDNA و رسم منحنی استاندارد، تعیین شیب خط و بازده PCR (E) بر مبنای رابطه ۱ محاسبه شد. سپس میزان بیان بر اساس روش  $2^{-\Delta CT}$  محاسبه شد (Livak and Schmittgen, 2001).

رابطه ۱:

$$E (\%) = [(10^{1/Slope} - 1) \times 100]$$

Slope: شیب خط.

### تجزیه و تحلیل‌های آماری

نرمال بودن و همگنی واریانس داده‌ها به ترتیب با استفاده از آزمون‌های کولموگروف-اسمیرنوف و Levene سنجش شد. مقایسه میانگین شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی در ایستگاه‌های مختلف با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) در نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام و در صورت وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها، آزمون تکمیلی Tukey HSD برای گروه‌بندی میانگین‌های دارای اختلاف معنی‌دار استفاده شد. همچنین برای بررسی ارتباط بین میزان هیدروکربن‌های نفتی و شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی از همبستگی پیرسون اسپیرمن استفاده شد.

برای اطمینان از حذف DNA، RNA تیمار شده با آنزیم DNase1 به عنوان الگو به همراه آغازگر ژن در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. اطمینان از کیفیت مطلوب و تعیین غلظت RNA از طریق اسپکتروفوتومتری و الکتروفورز روی ژل آگارز به دست آمد. واکنش ساخت cDNA با استفاده از کیت (سیناژن، ایران) انجام شد. به منظور بررسی بیان ژن CYP1A در بافت‌های مختلف، روش Real-time PCR با استفاده از ۱ میکرولیتر cDNA و ۱۲/۵ میکرولیتر Sybr Green Master Mix (Ampliqon، دانمارک)، ۱۰ پیکومول از هر آغازگر (جدول ۱) با شرایط دمایی شامل ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به منظور واسرشته‌سازی و فعال‌سازی اولیه، ۴۰ چرخه حرارتی شامل ۱۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای اتصال آغازگر و ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای بسط تنظیم شد. برای هر یک از نمونه‌ها، سه تکرار در نظر گرفته شد. شاهد منفی در واکنش، با استفاده از تمامی ترکیبات واکنش به جز cDNA برای بررسی احتمال آلودگی نیز تهیه شد.

تعیین کارایی هر جفت آغازگر در واکنش Real-time PCR با تهیه ۴ سری رقت با سه

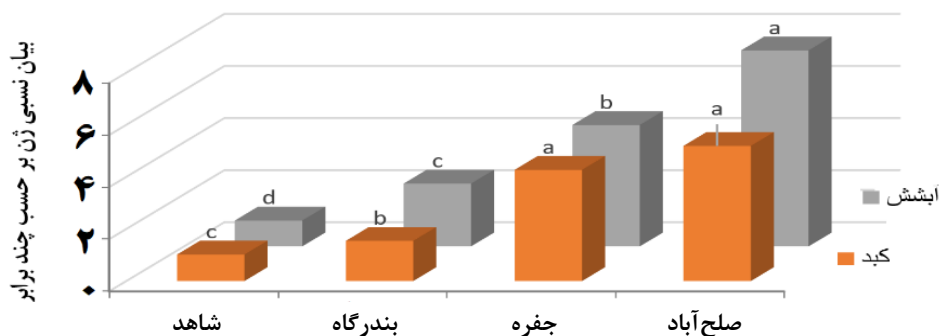
## نتایج

بیان بالاتری را نسبت به نمونه‌های بندرگاه نشان دادند ( $P < 0/01$ ). بیان ژن CYP1A در آبشش ماهی‌های زروک نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0/01$ ). همچنین افزایش میزان بیان ژن در سه منطقه نمونه‌برداری اختلاف معنی‌داری با یکدیگر داشتند. بیشترین میزان بیان ژن CYP1A در آبشش ماهی زروک در نمونه‌های اسکله صلح‌آباد مشاهده شد و کمترین میزان بیان این ژن در آبشش نمونه‌های منطقه بندرگاه مشاهده شد ( $P < 0/01$ ; شکل ۱).

نتایج اندازه‌گیری سطوح هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی در جدول ۲ نشان داده شده است. بیشترین سطح هیدروکربن‌های آروماتیک در ایستگاه صلح‌آباد و جفره مشاهده شد.

اندازه‌گیری بیان ژن‌های CYP1A در آبشش و کبد نمونه‌های صید شده ماهی زروک سه اسکله صلح‌آباد، جفره و بندرگاه نسبت به نمونه‌های شاهد انجام گرفت. تمامی مناطق افزایش معنی‌داری از بیان ژن CYP1A را نسبت به نمونه‌های شاهد نشان دادند (شکل ۱). در مقایسه سه منطقه، نمونه‌های بندرگاه دارای کمترین میزان بیان ژن در هر دو بافت آبشش و کبد بودند و نمونه‌های اسکله صلح‌آباد و جفره بیشترین بیان ژن را نشان دادند.

مقایسه بیان ژن CYP1A در کبد در تمامی مناطق اختلاف معنی‌داری با شاهد داشت. در بین مناطق میزان بیان در نمونه‌های اسکله صلح‌آباد و جفره معنی‌دار نبود، اما هر دو منطقه



شکل ۱: مقایسه بیان ژن CYP1A در بافت‌های آبشش و کبد ماهی زروک در نمونه‌های محیطی (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد). حروف غیرمشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در هر بافت است ( $P < 0/05$ ).



جدول ۲: میانگین شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی و میزان هیدروکربن‌های نفتی در بافت کبد ماهی زروک در ایستگاه‌های مختلف نمونه‌برداری (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد)

GST ( $\mu\text{mol CDNB}/\text{min.mg}$ Protein)	LPO ( $\mu\text{mol MDA}/\text{mg}$ Protein)	( $\mu\text{mL}$ ) CAT	( $\mu\text{mL}$ ) SOD	(ng/g) PAH	ایستگاه
۲/۳۳ $\pm$ ۰/۳۸ <sup>d</sup>	۵۵/۰۹ $\pm$ ۱/۷۰ <sup>c</sup>	۴۳/۰۹ $\pm$ ۰/۴۵ <sup>b</sup>	۳/۸۰ $\pm$ ۰/۱۹ <sup>c</sup>	۰/۰۰ <sup>d</sup>	شاهد
۵/۲۲ $\pm$ ۰/۳۵ <sup>c</sup>	۶۷/۹۹ $\pm$ ۲/۰۰ <sup>b</sup>	۴۳/۵۰ $\pm$ ۰/۵۱ <sup>b</sup>	۳/۹۲ $\pm$ ۰/۱۳ <sup>c</sup>	۳۳/۹۸ $\pm$ ۱/۳۷ <sup>c</sup>	بندرگاه
۸/۸۲ $\pm$ ۰/۷۷ <sup>b</sup>	۸۵/۴۵ $\pm$ ۲/۸۷ <sup>a</sup>	۳۴/۹۱ $\pm$ ۰/۹۱ <sup>a</sup>	۳/۱۹ $\pm$ ۰/۰۵ <sup>b</sup>	۶۸۵/۰۰ $\pm$ ۱۹/۹۷ <sup>b</sup>	جفره
۱۲/۴۳ $\pm$ ۰/۵۲ <sup>a</sup>	۷۸/۳۳ $\pm$ ۲/۴۸ <sup>a</sup>	۳۳/۴۷ $\pm$ ۰/۳۲ <sup>a</sup>	۲/۶۵ $\pm$ ۰/۳۱ <sup>a</sup>	۹۲۱/۰۷ $\pm$ ۵۵/۵۷ <sup>a</sup>	صلح آباد

حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در هر ستون است ( $P < 0/05$ ).

PAHs: هیدروکربن‌های نفتی؛ SOD: سوپراکسید دیسموتاز؛ GST: گلوکوتایون اس- ترانسفراز؛ CAT: کاتالاز؛ LPO: پراکسیداسیون لیپیدی.

داده شده است. بر اساس این نتایج بین تمام ایستگاه‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). همچنین تمام ایستگاه‌ها سطح پراکسیداسیون چربی بالاتری را نسبت به نمونه‌های شاهد نشان دادند. بیشترین پراکسیداسیون چربی در ایستگاه جفره مشاهده شد. نتایج به دست آمده از بررسی همبستگی نشان داد که در ایستگاه‌های مختلف همبستگی مثبتی بین میزان هیدروکربن‌های نفتی و پراکسیداسیون لیپیدی، گلوکوتایون اس- ترانسفراز و بیان ژن CYP1A وجود داشت، اما همبستگی منفی را با میزان کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز نشان داد (جدول ۳).

نتایج بررسی شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی در بافت کبد ماهی زروک در ایستگاه‌های مختلف در جدول ۲ ارائه شده است. بر اساس نتایج، میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز بافت کبد در ایستگاه‌های جفره و صلح‌آباد از گروه شاهد و بندرگاه به طور معنی‌داری کمتر بود ( $P < 0/05$ ). سطوح آنزیم گلوکوتایون اس- ترانسفراز کبدی در تمام ایستگاه‌ها نسبت به نمونه‌های شاهد افزایش نشان داد. همچنین سطوح این آنزیم بین ایستگاه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری داشت ( $P < 0/05$ ). بیشترین سطح این آنزیم در نمونه‌های ایستگاه صلح‌آباد مشاهده شد. نتایج بررسی پراکسیداسیون چربی کبد در بین ایستگاه‌های مورد مطالعه در جدول ۲ نشان

جدول ۳: همبستگی بین میزان هیدروکربن‌های نفتی در محیط و میزان شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی در کبد ماهی زروک

مقدار P	ضریب همبستگی	شاخص‌ها
۰/۰۳	-۰/۹۷	SOD و PAHs
۰/۰۲	-۰/۹۸	CAT و PAHs
۰/۰۳	۰/۸۴	MDA و PAHs
۰/۰۱	۰/۹۶	GST و PAHs
۰/۰۲	۰/۹۵	CYP1A و PAHs

### بحث

به ترتیب صلح‌آباد، جفره و بندرگاه بودند که با نتایج Bagheri و همکاران (۲۰۱۴) مطابقت دارد و به نظر می‌رسد که میزان آلاینده‌ها در حال افزایش باشند. میزان بیان ژن CYP1A در بافت‌های آبشش و کبد در ماهی زروک به صورت نسبی در سه منطقه و نمونه‌های شاهد با یکدیگر مقایسه شد. نتایج بیشترین میزان بیان ژن CYP1A را در کبد و آبشش در اسکله صلح‌آباد نشان داد. همچنین نتایج بیانگر آن است که میزان بیان ژن‌های CYP1A با مقدار هیدروکربن‌های نفتی در محیط همبستگی مثبت دارد ( $R=0/95$ ). در کفال‌ماهی چشم قرمز (*Liza haematocheila*) بیان ژن CYP1A در کبد ماهیان جمع‌آوری شده از مناطق دارای ترکیبات نفتی بیشتر از بافت‌های

هدف اصلی اکوتوکسیکولوژی پیش‌بینی اثرات آلودگی بر موجودات زنده و اقدامات موثر برای جلوگیری و مقابله با هر گونه اثر مضر آنها بر اکوسیستم‌ها است. رویکردهای کلاسیک، بر تعیین مقدار پروتئین و اندازه‌گیری آنزیم‌ها تحت تاثیر سمیت مواد تمرکز داشت. اما در دهه اخیر تغییرات سطح mRNA بسیاری از ژن‌ها و آنزیم‌هایی که وابسته به مقادیر آلاینده‌ها هستند به عنوان نشانگر مولکولی مورد توجه قرار گرفت. در مطالعه حاضر نیز بیان ژن CYP1A در ماهی زروک به عنوان نشانگر زیستی آلودگی در سه اسکله صلح‌آباد، جفره و بندرگاه با میزان آلودگی PAH متفاوت، انتخاب شد. بررسی میزان هیدروکربن‌های نفتی در رسوبات ایستگاه‌های مورد مطالعه نشان داد که آلوده‌ترین ایستگاه‌ها

دیگر گزارش شد (An et al., 2011). در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) الگوی بیان ژن‌های CYP1 در آبشش مرتبط با میزان آلاینده‌ها در محیط بود، اما در کبد میزان بیان ژن‌های CYP1 در حد بالایی نبود (Jonsson et al., 2010). در ماهی گوپی برزیلی (*Poecilia vivipara*) میزان بیان ژن‌های CYP1 کبد در مناطق مانگرو دارای آلاینده بیشتر بود، اما در آبشش میزان بیان ژن‌های CYP1A و 1C بیشتر از کبد بود (Dorrington et al., 2012). در ماهی *Barbus graellsii* میزان فعالیت EROD (-Ethoxyresorufin-O-deethylase) همبستگی مثبت داشته و هر دوی این شاخص‌ها با میزان آلاینده‌های محیطی رابطه مستقیم داشتند (Quiros et al., 2007). در مطالعه حاضر تغییرات میزان بیان ژن CYP1A در آبشش بیشتر از کبد بود. اما میزان بیان ژن در کبد در حالت پایه و حالت القا به وسیله بنزوآلفاپایرن در شرایط آزمایشگاهی بیشتر از آبشش بود. کبد عضو اصلی متابولیسم هیدروکربن‌های نفتی است، در نتیجه بیان بالایی از ژن CYP1A را نشان می‌دهد. در بیشتر ماهیان نیز همین الگو مشاهده می‌شود. اما در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (Jonsson et al., 2010) و گوپی برزیلی (Dorrington et al., 2012) بیان ژن‌های CYP1 در آبشش نسبت به کبد بالاتر بود. کمی افزایش بیان ژن در کبد به دلیل متابولیسم شدن سریع هیدروکربن‌های نفتی توسط آبشش است (Jonsson et al., 2010). وجود ترکیبات آلاینده در محیط آبی باعث القای ژن‌های CYP1 در بافت‌های در معرض آب می‌شود (Smolowitz et al., 1992). بنابراین، در بافت آبشش که در معرض مستقیم آلاینده است القای بیشتر ژن مشاهده می‌شود.

گلوکوتایون اس- ترانسفراز (GST) که یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های مرحله دوم بیوترانسفورماسیون است، به عنوان نشانگر در موجودات آبی استفاده می‌شود (Livingstone, 1998). در این مطالعه اختلاف معنی‌داری در میزان این آنزیم بین مناطق مختلف نمونه‌برداری با نمونه‌های شاهد مشاهده شد. همچنین افزایش GST همبستگی بالایی با میزان آلاینده هیدروکربنی در رسوبات مناطق مورد مطالعه داشت. گلوکوتایون اس- ترانسفراز با افزودن گروه‌های GSH به ترکیبات هیدروکربنی، افزایش قابلیت حلالیت متابولیت‌ها در آب و کمک به دفع راحت‌تر آنها، باعث

در موجود زنده می‌تواند سلول‌ها را از آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد مصون نگه دارد. از این رو، به نظر می‌رسد افزایش این آنزیم در مطالعه حاضر نشان دهنده توانایی انطباق‌پذیری ماهیان زروک با استرس‌های محیطی باشد.

مالون دی‌آلدئید به عنوان یکی از مهم‌ترین نشانگرهای زیستی و یک شاخص کلی برای میزان پراکسیداسیون لیپیدی در موجودات است (Santana et al., 2018). افزایش میزان MDA بافت کبد در ایستگاه‌های صلح‌آباد و جفره که دارای میزان بالای هیدروکربن‌های نفتی بودند، مشاهده شد. در مطالعه محیطی Bagheri و همکاران (۲۰۱۴) بر ماهی کفال در ایستگاه نخل تقی افزایش پراکسیداسیون چربی مشاهده شد که این افزایش را نتیجه بالا بودن میزان آلاینده‌ها و عدم توانایی ماهی در مقابله با آلاینده‌ها عنوان کردند. ترکیبات نفتی سبب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و کاهش فعالیت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی و در نتیجه افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و ایجاد استرس اکسیداتیو بیشتری در مقایسه با بقیه تیمارها شده است. پراکسیداسیون چربی نشان دهنده عدم توانایی سیستم آنتی‌اکسیدانی جاندار برای حذف رادیکال‌های آزاد است (Santana et al., 2018).

سم‌زدایی می‌شود. بنابراین، افزایش این آنزیم در پاسخ به حضور آلاینده‌ها و سم‌زدایی رخ می‌دهد (Faheem and Lone, 2018). در بسیاری از مطالعات گذشته افزایش فعالیت GST کبد در مواجهه با آلاینده‌ها گزارش شده است (Santana et al., 2018). در مطالعه Bagheri و همکاران (۲۰۱۴) اختلاف معنی‌داری از فعالیت گلوکوتاتیون اس-ترانسفراز در ماهی کفال بین ایستگاه شاهد و ایستگاه‌های جفره و صلح‌آباد گزارش شد. همچنین در مطالعه‌ای که در کفال ماهیان *Mugil cephalus* و *Liza aurata* سواحل دریای سیاه در ترکیه در سه سال متوالی انجام شد، در میزان فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون اس-ترانسفراز کبدی در ایستگاه‌های آلوده نسبت به ایستگاه شاهد افزایش دو تا چهار برابری مشاهده شد. افزایش میزان فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون اس-ترانسفراز کبد و آبشش در تمام ایستگاه‌ها نسبت به ایستگاه شاهد گزارش شد (Bagheri et al., 2014). از آنجا که سیستم آنتی‌اکسیدانی مکانیسم دفاعی موثری در برابر رادیکال‌های آزاد اکسیژنی به شمار می‌رود، افزایش در القای این آنزیم‌ها نشان دهنده سازگاری ماهی نسبت به شرایط استرسی در استرس‌های کوتاه مدت و بلند مدت است (Almeida et al., 2010). افزایش فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون اس-ترانسفراز

در مجموع، بیان ژن سیتوکروم اکسیداز (CYP) در کبد و آبشش ارتباط مستقیمی با میزان آلاینده‌های هیدروکربنی داشت. این آنزیم به وسیله این نوع آلاینده‌ها القا می‌شود. آنزیم گلوکوتایون اس- ترانسفراز نقش حذف رادیکال‌های آزاد را دارد که در نتیجه ارتباط مستقیمی با انواع آلاینده‌ها دارد. در این مطالعه از سیتوکروم اکسیداز A به عنوان یک نشانگر اختصاصی آلاینده‌های هیدروکربنی استفاده شد و همچنین آنزیم GST همبستگی بالایی با آلاینده‌های هیدروکربنی داشت. اما الزاماً افزایش آن به واسطه آلاینده‌های هیدروکربنی نیست زیرا تحت تاثیر فلزات سنگین نیز تغییر می‌کند. پراکسیداسیون چربی یک شاخص نهایی است که نشان دهنده اثر بلند مدت آلاینده‌ها در محیط است. نتایج این مطالعه، همچنین نشان داد که ماهی زروک توانایی مقابله با میزان بالای آلاینده‌ها را نداشت، زیرا در ایستگاه‌های با آلودگی بالا، میزان پراکسیداسیون چربی بالایی مشاهده شد. به طور کلی می‌توان بیان ژن CYP1A، GST و پراکسیداسیون چربی را به عنوان شاخص آلاینده‌های هیدروکربنی در این گونه معرفی کرد.

سوپراکسید و پراکسید به وسیله آنزیم‌های کاتالاز (CAT) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) احیا می‌شوند. افزایش این آنزیم‌ها نقش حفاظتی برای جاندار دارد. آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز از آنزیم‌های کلیدی در سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی در رابطه با تبدیل رادیکال‌های آزاد  $H_2O_2$  به آب و اکسیژن هستند (Abele et al., 2017). در این مطالعه در ایستگاه‌های صلح‌آباد و جفره میزان کمتری از این دو آنزیم در کبد وجود داشت. آنزیم‌های SOD-CAT از اولین آنزیم‌هایی هستند که در استرس اکسیداتیو افزایش می‌یابند. اما در بسیاری از مطالعات کاهش بیان کاتالاز گزارش شده است (Sayeed et al., 2003; Faheem et al., 2012; Chitra and Maiby 2014; Chitra and Sajitha, 2014; Faheem and Lone, 2018). ممکن است دلیل کاهش سطح این آنزیم در ایستگاه‌های آلوده‌تر از دست دادن فعالیت آنزیمی به دلیل سطح بالای ROSها باشد (Pigeolet et al., 1990). کاهش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌تواند ناشی از تلاش سلول برای مواجهه با افزایش سطح پراکسیداسیون لیپیدها باشد.

## منابع

- مطالعات و همکاری‌های علمی بین‌المللی. ۱۳۶ص.
- قاسمی ا. ۱۳۹۲.** بررسی امکان استفاده از میزان بیان ژن سیتوکروم P450 به عنوان شاخص آلاینده‌های نفتی. گزارش نهایی طرح مرکز
- Abele D., Vazquez-Medina J.P. and Zenteno-Savin T. 2017.** Introduction to oxidative stress in aquatic ecosystems. P: 1–5. In: Abele D., Vazquez-Medina J.P. and Zenteno-Savin T. (Eds.). *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems*. John Wiley and Sons, UK.
- Bagheri D., Amiri B., Poorbagher H., Farahmand H. and Bargahi A. 2014.** Antioxidant responses, lipid peroxidation and blood aminotransferase activity in *Liza persicus* in the northern Persians Gulf (Case study: The Boushehr Province). *Journal of Fisheries*, 67(3): 329–345.
- Agrahari S., Pandey K.C. and Gopal K. 2007.** Biochemical alteration induced by monocrotophos in the blood plasma of fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88(3): 268–272.
- Chitra K.C. and Maiby S. 2014.** Oxidative stress of bisphenol-A and its adverse effects on liver of freshwater fish *Oreochromis mossambicus*. *International Journal of Scientific Research*, 3(7): 221–224.
- Almeida J.R., Oliveira C. and Gravato C. 2010.** Linking behavioural alterations with biomarkers responses in the European seabass *Dicentrarchus labrax* L. exposed to the organophosphate pesticide fenitrothion. *Ecotoxicology*, 19: 1369–1381.
- Chitra K.C. and Sajitha R. 2014.** Effect of bisphenol-A on the antioxidant defense system and its impact on the activity of succinate dehydrogenase in the gill of freshwater fish, *Oreochromis mossambicus*. *Cell and Tissue Research*, 14(2): 4219–4226.
- An L., Hu J., Yang M., Zheng B., Wei A., Shang J. and Zhao X. 2011.** CYP1A mRNA expression in redeye mullets (*Liza haematocheila*) from Bohai Bay, China. *Marine Pollution Bulletin*, 62: 718–725.
- Dorrington T., Zanette J., Zacchi F.L., Stegeman J.J. and Bainy A.C.D. 2012.** Basal and 3-methylcholanthrene-induced expression of cytochrome P450 1A, 1B and 1C genes in the Brazilian guppy, *Poecilia vivipara*.

- Aquatic Toxicology, 124-125: 106–113.
- Faheem M. and Lone K.P. 2018.** Oxidative stress and histopathologic biomarkers of exposure to bisphenol-A in the freshwater fish *Ctenopharyngodon idella*. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 53: 1–9.
- Faheem M., Sulehria A. Q. K., Tariq M., Khadija I. and Saeed M. 2012.** Effect of sub-lethal dose of cadmium chloride on biochemical profile and catalase activity in freshwater fish *Oreochromis niloticus*. Biologia (Pakistan), 58(1-2): 73–78.
- Goth L. 1991.** A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. Clinical Chemical Acta, 196(2-3): 143–151.
- 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.
- Hassanin A.A.I., Kaminishi Y., Funahashi A. and Itakura T. 2012.** Cytochrome P450 1C1 complementary DNA cloning, sequence analysis and constitutive expression induced by benzo-a-pyrene in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquatic Toxicology, 109: 17–24.
- Hellou J., Ross N.W. and Moon T.W. 2012.** Glutathione, glutathione S-transferase and glutathione conjugates, complementary markers of oxidative stress in aquatic biota. Environmental Science and Pollution Research, 19: 2007–2023.
- Jonsson M.E., Gao K., Olsson J.A., Goldstone J.V. and Brandt I. 2010.** Induction patterns of new CYP1 genes in environmentally exposed rainbow trout. Aquatic Toxicology, 98: 311–321.
- Livak K.J. and Schmittgen T.D. 2001.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. Methods, 25(4): 402–408.
- Livingstone D.R. 1998.** The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: Quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. Comparative Biochemistry and Physiology (A), 120(1): 43–49.
- McCord J.M. and Fridovich I. 1969.** Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). Journal of Biological Chemistry, 244(22): 6049–6055.
- Oliveira M., Ahmad I., Maria V., Pacheco M. and Santos M. 2010.** Antioxidant responses versus DNA damage and lipid peroxidation in

golden grey mullet liver: A field study at Ria de Aveiro (Portugal). Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 59(3): 454–463.

- Pigeolet E., Corbisier P., Houbion A., Lambert D., Michiels C., Raes M., Zachary M.D. and Remacle J. 1990.** Glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. Mechanisms of Ageing and Development, 51(3): 283–297.
- Quiros L., Pina B., Sole M., Blasco J., Lopez M.A., Riva M. C., Barcelo D. and Raldua D. 2007.** Environmental monitoring by gene expression biomarkers in *Barbus graellsii*: Laboratory and field studies. Chemosphere, 67: 1144–1154.
- Regoli F., Bocchetti R. and Filho D.W. 2011.** Spectrophotometric assays of antioxidants, in oxidative stress in aquatic ecosystems. P: 367–380. In: Abele D., Vazquez-Medina J.P. and Zenteno-Savin T. (Eds.). Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems. John Wiley and Sons, UK.
- Ringwood A., Hoguet J., Keppler C., Gielazyn M., Ward B. and Rourk A. 2003.** Cellular biomarkers (lysosomal destabilization, glutathione and lipid peroxidation) in three common estuarine species: A methods handbook. Marine Resources Research Institute, USA. 46P.
- Santana M.S., Sandrini-Neto L., Neto F.F., Oliveira Ribeiro C.A., Di Domenico M. and Prodocimo M.M. 2018.** Biomarker responses in fish exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): Systematic review and meta-analysis. Environmental Pollution, 242: 449–461.
- Sayeed I., Parvez S., Pandey S., Bin-Hafeez B., Haque R. and Raisuddin S. 2003.** Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. Ecotoxicology and Environmental Safety, 56(2): 295–301.
- Smolowitz R.M., Schultz M.E. and Stegeman J.J. 1992.** Cytochrome P4501a induction in tissues, including olfactory epithelium, of topminnows (*Poeciliopsis* spp) by waterborne benzo[a]pyrene. Carcinogenesis, 13: 2395–2402.
- Van der Oost R., Beyer J. and Vermeulen N.P.E. 2003.** Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environmental Toxicology and Pharmacology, 13: 57–149.





Research Paper

## CYP1A gene expression and antioxidant enzymes in green scat (*Scatophagus argus*) as PAHs biomarker

Ahmad Ghasemi<sup>1\*</sup>, Sepideh Hoseinjanzade<sup>2</sup>

DOI: 10.22124/japb.2022.21777.1458

Received: February 2022

Accepted: June 2022

### Abstract

Monitoring of the pollutant effects in the biological environment requires the identification of a suitable biomarker. In this study, the efficacy of the expression of the CYP1 gene and the antioxidant enzymes in the *Scatophagus argus* were studied as biomarker of oil pollutants at three stations (Bandargah, Solhabad and Jofreh) and the control samples. CYP1A gene expression in liver was significantly different from control samples in all regions. The highest CYP1 gene expression was measured in Solhabad station. CYP1A gene expression in the gills of green scat fish showed a significant increase compared to control samples. The highest and lowest CYP1A gene expression was observed in the gills in Solhabad and Bandargah samples, respectively. The amount of superoxide dismutase and catalase of liver tissue in Jofrah and Solhabad stations were significantly lower than the control ( $P < 0.05$ ). In contrast, the rate of lipid peroxidation and GST were directly correlated with the amount of polycyclic aromatic hydrocarbons ( $P < 0.05$ ,  $R = 0.96$ ). Due to the relationship between CYP1A gene expression and antioxidant markers and the level of contamination, CYP1A gene expression and antioxidant markers can be used as a suitable biomarker for PAH contaminants in this species.

**Key words:** *Green Scat Fish*, *Scatophagus argus*, *Biomarkers*, *Antioxidant Enzyme*, *Bushehr*.

1- Assistant Professor in Department of Biotechnology, Persian Gulf Institute, Persian Gulf University, Bushehr, Iran.

2- M.Sc. Student in Fisheries, Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

\*Corresponding Author: [aqasemi@gmail.com](mailto:aqasemi@gmail.com)

