

اثر دوره‌های مختلف بهبودی بر برخی شاخص‌های آنزیم بافتی کبد و آبشش و فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در اثر غلظت تحت کشنده آمونیاک

* هاشم خندان بارانی^۱، حسینعلی دهمرده^۲ و محمدرضا حیدری^۲

^۱ پژوهشکده تالاب بین‌المللی هامون، دانشگاه زابل، زابل، ایران

^۲ گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۳؛ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۲/۱۳

چکیده

آمونیاک از مهمترین ترکیبات سمی نیتروژنی است که مشکلی جدی در محیط زیست و صنعت آبزی پروری به حساب می‌آید. تحقیق حاضر جهت بررسی اثر غلظت تحت کشنده آمونیاک (۰/۹۹ میلی گرم در لیتر) بر فعالیت آنزیم‌های بافت کبد و آبشش و برخی فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون و توانایی بهبودی ماهی کپور معمولی انجام گرفت. تعداد ۸۰ ماهی با میانگین وزنی $50 \pm 4/5$ گرم به‌طور تصادفی در چهار تیمار (هر تیمار شامل ۲۰ ماهی) تقسیم بندی شدند: ۹۶ ساعت در معرض آمونیاک، ۹۶ ساعت تحت تاثیر آمونیاک و گذراندن ۲۴ ساعت دوره بهبودی، ۹۶ ساعت تحت تاثیر آمونیاک و گذراندن ۷ روز دوره بهبودی و گروه شاهد. از هر تیمار برای سنجش فاکتورهای بیوشیمیایی و آنزیمی نمونه‌های بافت و خون جداسازی شد. نتایج نشان داد که آمونیاک باعث افزایش معنی‌دار آنزیم‌های AST، ALP و LDH در هر دو بافت شده است ($P < 0/05$) ولی افزایش معنی‌داری در ALT در این دو بافت مشاهده نشد ($P > 0/05$). بعد از هفت روز بهبودی فعالیت تمام آنزیم‌ها به‌طور معنی‌داری در آبشش کاهش یافت و به گروه شاهد رسید. در کبد نیز این روند در ارتباط با دو آنزیم AST و LDH مشاهده شد ولی ALP پس از هفت روز بهبودی هنوز به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه شاهد بود. همچنین آمونیاک باعث کاهش معنی‌دار میزان پروتئین در سرم شد در حالی که میزان کورتیزول و گلوکز افزایش یافت. میزان همه این فاکتورها پس از هفت روز دوره بهبودی به حالت نرمال بازگشت. بنابراین آمونیاک سبب تغییر در فعالیت آنزیم‌های متابولیک در بافت و برخی فاکتورهای بیوشیمیایی در سرم خون کپور معمولی می‌شود که با ایجاد شرایط مناسب می‌توان شاهد روند بهبودی در این گونه بود.

واژه‌های کلیدی: آلودگی نیترا، آنزیم‌های متابولیک بافتی، کپور معمولی، مسمومیت

مقدمه

آمونیاک از مهمترین و خطرناکترین ترکیبات نیتروژنی است که در محیط به ویژه آب یافت می‌شود. این ماده به‌عنوان ترکیب سمی با اثرات مخرب شامل ایجاد اختلال در عمل سیستم عصبی، تنفسی و کبدی به خوبی شناخته شده است (Benli و

همکاران، ۲۰۰۸؛ Cooper و Plum، ۱۹۸۷). آمونیاک از طریق فاضلاب‌های شهری، صنعتی و کشاورزی وارد منابع آبی می‌شود (Randall و Tsui، ۲۰۰۲) و به‌عنوان یک آلاینده مطرح بوده و با توجه به وسعت و منابع متعدد پخش کننده این آلاینده، ورود و انتشار این ماده به محیط زیست از طریق منابع مختلف امری اجتناب ناپذیر است. آمونیاک همچنین در صنعت

* نویسنده مسئول: hashem_barani@yahoo.com

عملکرد غیرطبیعی متابولیک مورد استفاده قرار می‌گیرد. سلول‌های بدن دارای آنزیم‌های خاصی هستند که در متابولیسم و فعالیت‌های اختصاصی آن سلول نقش دارند. وقتی که سلول دچار آسیب می‌شود غشاء سلول دیگر قادر به نگهداری این آنزیم‌ها نخواهد بود و این آنزیم‌ها وارد مایع میان بافتی و خون می‌شوند و نشانگر ضایعات بافتی هستند (Casillas و همکاران، ۱۹۸۳). فعالیت‌های آنزیمی به‌عنوان نشانگرهای بیوشیمیایی حساس نیز در هنگام مواجهه با شرایط خطرناک محیطی در ماهیان مورد توجه بوده و پارامترهای مهمی در ارزیابی کیفیت محیطی و وجود ترکیبات سمی می‌باشند (Velmurugan و همکاران، ۲۰۰۸). تغییر فعالیت آلانین آمینو ترانسفراز (ALT)، آسپاراتات آمینو ترانسفراز (AST)، آلکالین فسفاتاز (ALP) و لاکتات دهیدروژناز (LDH) نشان‌دهنده آسیب بافت‌های کبد، کلیه، آبشش و ماهیچه است و در ماهیان مختلف که در معرض سموم مختلف قرار گرفته‌اند گزارش شده است (Gabriel و همکاران، ۲۰۱۲؛ Yildirim و همکاران، ۲۰۰۶؛ Das و همکاران، ۲۰۰۴).

در مطالعات بهبودی (Recovery) به بررسی امکان ترمیم و برگشت‌پذیری تغییرات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی ایجاد شده در اثر عوامل محیطی در بدن جانور به حالت اولیه پرداخته می‌شود. این گونه مطالعات به دانستن پایه و اساس مکانیسم‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک متداول در بدن جانور کمک می‌کند و غالباً منجر به روشن شدن یک سری توانایی‌های متابولیک بالقوه در بدن جانوران می‌شود. توانایی بهبودی در گونه‌های مختلف در ارتباط با عوامل سمی متفاوت مورد توجه قرار گرفته است. Chandravathy و Reddy (۱۹۹۴) یک روند بهبودی و ترمیم را در میزان پروتئین و آمینو اسیدهای آزاد در ماهی *Anabas scandens* بعد از قرار گیری در معرض نیترات سرب گزارش کردند، همچنین نشان

آبزی پروری نیز به‌عنوان یک مشکل جدی مورد توجه است. این ماده عمده ترین ترکیب نیتروژنی دفعی (۸۰-۶۰ درصد) ماهیان است که از کاتابولیسم آمینواسیدها، پورین‌ها و پریمیدین‌ها حاصل می‌شود (Salin و Williot، ۱۹۹۱) و همواره می‌تواند در شرایط پرورشی متراکم و حمل و نقل باعث تلفات شود. این ماده به دو شکل در آب وجود دارد شکل یونی (NH_4^+) که برای آبزیان خطرناک نبوده و شکل مولکولی (NH_3) که زیانبار و سمی است. سمیت آمونیاک به این واقعیت نسبت داده می‌شود که به علت حلالیت در چربی غشاء به آسانی می‌تواند در سراسر آبشش منتشر شود اما شکل یونی (NH_4^+) نمی‌تواند از غشاء آبشش به راحتی عبور کند (Svobodova و همکاران، ۱۹۹۳). غلظت مزمن آمونیاک در آب NH_3 ۲/۴ mg/l برآورد شده است (Thurston و همکاران، ۱۹۸۴) که باعث تغییرات بیوشیمیایی و ساختاری در بدن ماهیان می‌شود و غلظت‌های بالاتر (حاد) این ماده در محیط (NH_3 ۶۴/۷-۹/۴ mg/l) باعث تشنج و مرگ ماهیان و سایر آبزیان می‌شود. مطالعات زیادی به بررسی اثر سمیت حاد و مزمن آمونیاک در گونه‌های مختلف پرداخته‌اند (خضرائی نیا و همکاران، ۱۳۷۹؛ بنی هاشمی و همکاران، ۱۳۹۲؛ Benli و همکاران، ۲۰۰۸؛ Lemarie و همکاران، ۲۰۰۴؛ Dosdat و همکاران، ۲۰۰۳؛ Weinstein و Kimmel، ۱۹۹۸؛ Knoph و Thorud، ۱۹۹۶؛ Tomasso، ۱۹۹۴؛ Russo و Thurston، ۱۹۹۱).

آمونیاک سبب استرس در ماهیان می‌شود (Kucuk و Hargreaves، ۲۰۰۱) و می‌تواند باعث تغییر میزان فاکتورهای متابولیک، هورمون‌ها (مانند کورتیزول) (Silberman و همکاران، ۲۰۰۲) و فعالیت آنزیم‌ها شود (Romi و همکاران، ۲۰۰۶) که این عوامل نقش مهمی در فیزیولوژی و رشد جانور دارند. همچنین آنزیم‌شناسی در مطالعات آسیب‌های سلولی و

دادند که میزان فعالیت آنزیم فسفوریلاز در بافت کبد و ماهیچه به طور آهسته به حالت اولیه برگشته است. توانایی بازیابی فاکتورهای بیوشیمیایی در گونه *Oreochromis mossambicus* نیز پس از ۷ روز دوره بهبودی گزارش شده است (Roa, ۲۰۰۶). در ماهی کپور معمولی نیز برگشت فعالیت برخی آنزیم‌های بافتی به حالت اولیه و ترمیم بافت آبشش پس از ۷ روز بهبودی، بعد از قرار گرفتن در معرض سم تربوتیلازین ثبت شده است (Mikulikova و همکاران، ۲۰۱۳). در مطالعه Blahova و همکاران (۲۰۱۴) نیز توانایی بهبود و بازیابی برخی فاکتورهای خونی و بیوشیمیایی ماهی کپور معمولی در مقابل آفت کش آترازین نشان داده شده است که نشان دهنده پتانسیل بالای بهبودی این ماهی در برابر سموم است.

در ارتباط با اثر آمونیاک بر ماهی کپور معمولی بیشتر به تعیین LC50، اثر بر ساختار بافتی و فعالیتی آنزیمی در سرم خون پرداخته شده و به توانایی بهبودی تغییرات ایجاد شده در مقابل این ماده کمتر توجه شده است. بنابراین در این مطالعه با توجه به گسترش جهانی و اهمیت ماهی کپور معمولی در صنعت آبی پروری به بررسی فعالیت آنزیم‌های بافتی شامل اسپاراتات امینوترانسفراز (ASP)، آلانین ترانسفراز (ALT)، آلکالین فسفاتاز (ALP) و لاکتات دهیدروژناز (LDH) در بافت کبد و آبشش و برخی فاکتورهای بیوشیمیایی در سرم خون (شامل گلوکز، کورتیزول، پروتئین کل و آلبومین) بعد از ۹۶ ساعت قرار گیری در معرض آمونیاک و توانایی ترمیم و برگشت پذیری این فاکتورها پس از انتقال به شرایط نرمال (دوره بهبودی، ۲۴ ساعت و هفت روز) پرداخته شد.

مواد و روش کار

طراحی آزمایش و نمونه‌گیری: این تحقیق در دی ماه

سال ۱۳۹۳ در آزمایشگاه پژوهشکده تالاب بین‌المللی هامون (دانشگاه زابل) انجام شد. به این منظور تعداد ۸۰ قطعه ماهی کپور معمولی با میانگین وزن $50 \pm 4/5$ گرم از کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان گرمابی زهک (وابسته به اداره کل شیلات سیستان) به آزمایشگاه منتقل شدند. ماهیان جهت سازگاری با شرایط جدید و رفع استرس به مدت دو هفته نگهداری شدند و در این مدت ماهیان از نظر سلامتی مورد بررسی قرار گرفته و سلامتی آنها مورد تایید قرار گرفت و جهت آزمایشات به آکواریوم‌های ۶۰ لیتری منتقل شدند.

در طول دوره آزمایش میزان آمونیاک در حد غلظت تحت کشنده (کمتر از ۰/۹۹ میلی‌گرم در لیتر) انتخاب گردید که این غلظت بر اساس یک سری آزمایشات اولیه محاسبه گردید. برای این منظور از محلول NH_4Cl استفاده و به تدریج به آب اضافه شد (Das و همکاران، ۲۰۰۴؛ Emerson و همکاران، ۱۹۷۵). با توجه به مطالعات فیزیولوژیک، pH در میزان $8 \pm 0/5$ تثبیت شد (خضرائی و همکاران، ۱۳۷۹؛ Metwally و Wafeek، ۲۰۱۴؛ Chezhian و Senthamil selvan، ۲۰۱۲) تنظیم pH با استفاده از اسید کلریدریک (HCl) و هیدروکسید سدیم (NaOH) انجام گرفت (Randall و Tsui، ۲۰۰۲). همچنین در طول این مدت دما 20 ± 3 درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول 6 ± 1 میلی‌گرم در لیتر و سختی آب ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر کربنات کلسیم ثابت نگه داشته شد. میزان آمونیاک و pH آب آکواریوم‌ها ۳ بار در روز به ترتیب به وسیله دستگاه فتومتر (Palintest 8000) و pH متر (WTW/ Multiline P4) اندازه‌گیری و تنظیم شدند. میزان غذادهی ماهیان نیز دو بار در روز به میزان ۲ درصد وزن بدن انجام پذیرفت. تعویض آب و خارج کردن مواد زاید باقیمانده هم به صورت روزانه صورت گرفت و در هر مرحله تا ۳۰ درصد آب از کف آکواریوم‌ها تعویض

شد و در طول دوره بهبودی میزان آمونیاک مولکولی کمتر از ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر ثبت گردید.

برای انجام این تحقیق چهار تیمار در نظر گرفته شد: تیمار اول که ۹۶ ساعت در معرض آمونیاک قرار گرفتند، تیمار دوم ۹۶ ساعت تحت تاثیر آمونیاک بودند و سپس به آب تازه منتقل شدند و ۲۴ ساعت در این شرایط جهت گذراندن دوره بهبودی باقی ماندند، تیمار سوم نیز ۹۶ ساعت تحت تاثیر آمونیاک بوده و جهت گذراندن ۷ روز دوره بهبودی به آب تازه منتقل شدند و تیمار چهارم تحت شرایط نرمال بوده و به‌عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شدند. سپس از هر تیمار ماهیان به‌طور تصادفی انتخاب شده و به سرعت خونگیری انجام و کبد (هیپاتوپانکراس) و کلیه آنها جدا شد و نمونه‌های بافت و سرم خون به‌منظور سنجش فعالیت آنزیم‌ها و فاکتورهای بیوشیمیایی خونی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام مراحل بعدی ذخیره شدند.

آنالیز و اندازه‌گیری شاخص‌های خونی: جهت سنجش آنزیم‌های بافتی شامل آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP) و لاکتات دهیدروژناز (LDH) نمونه‌های بافتی تهیه شده سریعاً با سرم فیزیولوژیک شستشو و به دقت توزین و با نسبت ۱ به ۱۰ در بافر فسفات همورنه شدند و ۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند (Akagi و Voegborlo, ۲۰۰۷) و عصاره رویی جهت سنجش آنزیم‌های مورد نظر جداسازی شد.

برای سنجش میزان فاکتورهای بیوشیمیایی در سرم خون، از هر ماهی از محل ساقه‌دمی خونگیری انجام شد. سرم بلافاصله با قرار دادن نمونه‌های خون در دستگاه میکروسانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه و مدت ۱۵ دقیقه جدا و در فریزر نگهداری شدند.

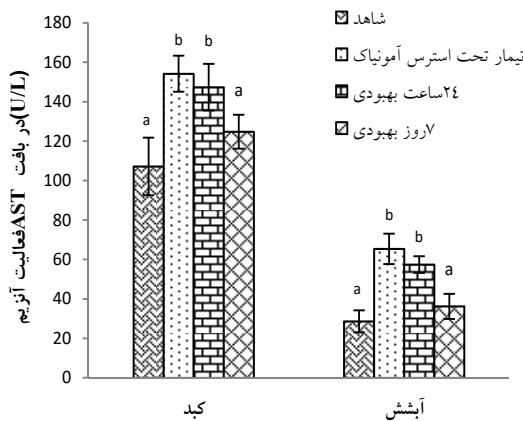
مقادیر آنزیم‌ها، گلوکز و پروتئین کل توسط دستگاه اتوالایزر مدل (Selectra-PRO) ساخت کشور هلند و کیت‌های تجاری و براساس دستورالعمل کیت مورد سنجش قرار گرفتند (Abdel-Hakim و همکاران، ۲۰۱۰). مقادیر هورمون کورتیزول نیز با استفاده از دستگاه ایزاریدر اندازه‌گیری شد (Gomes و همکاران، ۲۰۰۶).

روش‌های آماری مورد استفاده: تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 انجام پذیرفت. در ابتدا با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov نرمال بودن داده‌ها مورد تایید قرار گرفت. با استفاده از آزمون واریانس یک طرفه (One Way Anova) تیمارهای مختلف با یکدیگر مقایسه شده و در صورت اختلاف معنی‌دار بودن ($P < 0.05$) توسط آزمون توکی از هم جدا شدند. سپس با استفاده از نرم‌افزار (Excel 2010) نمودارها رسم گردید.

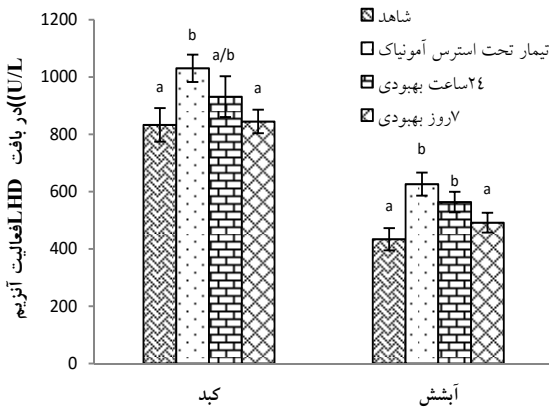
نتایج

تغییرات آنزیمی: اثرات آمونیاک بر فعالیت چهار آنزیم بافتی در شکل‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ نشان داده شده است. با توجه به نمودار ۱ مشاهده می‌شود اگر چه آمونیاک باعث افزایش فعالیت آنزیم ALT در کبد و آبشش شده است اما نسبت به گروه شاهد این افزایش معنی‌دار نمی‌باشد ($P > 0.05$). در نمودار ۲ مشاهده می‌شود که آمونیاک باعث افزایش معنی‌دار آنزیم AST در هر دو بافت کبد و آبشش شده است ($P < 0.05$) و ۲۴ ساعت بعد از انتقال ماهیان به آب تمیز (فاقد آمونیاک) هنوز میزان آنزیم در حد بالایی است اما بعد از هفت روز دوره بهبودی در هر دو بافت آنزیم به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است و به گروه شاهد نزدیک شده است. نمودار ۳ نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم ALP در هر دو بافت در اثر آمونیاک به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است ($P < 0.05$). در

بهبودی هنوز به طور معنی داری بالاتر از گروه شاهد به طور معنی داری نسبت به تیمار تحت استرس آمونیاک است ($P < 0/05$). در نمودار ۴ نیز مشاهده می شود که اثر آمونیاک بر آنزیم LDH نیز معنی دار بوده است ($P < 0/05$) و سبب افزایش فعالیت در هر دو بافت شده است و پس از هفت روز دوره بهبودی فعالیت این آنزیم در هر دو بافت کاهش یافته و به حد گروه شاهد رسیده است.



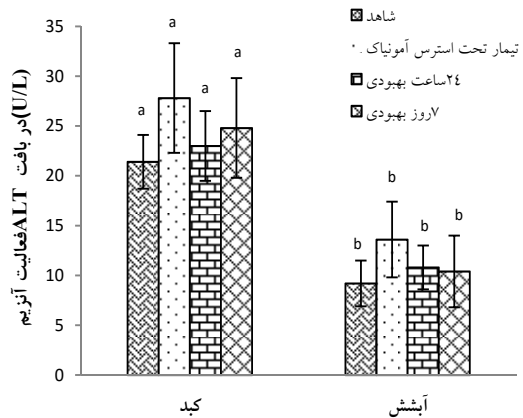
شکل ۲- اثر آمونیاک (۰/۹۹ میلی گرم بر لیتر NH_3) بر فعالیت آنزیم آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) در بافت کبد و آبشش کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)



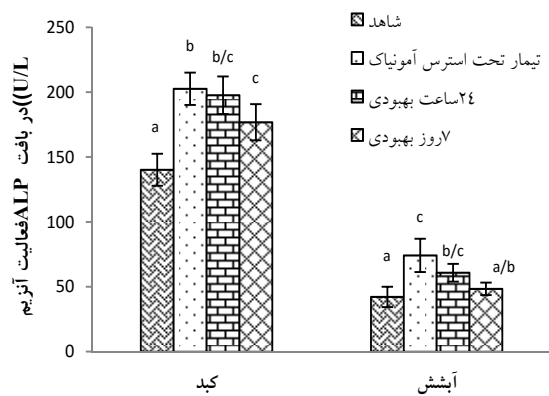
شکل ۴- اثر آمونیاک (۰/۹۹ میلی گرم بر لیتر NH_3) بر فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) در بافت کبد و آبشش کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

یک آورده شده است. میزان گلوکز در گروه تحت استرس $85/2 \pm 5/2 \text{ mg/dl}$ به طور معنی داری بالاتر از

آبشش فعالیت این آنزیم پس از ۲۴ ساعت بهبودی به طور معنی داری نسبت به تیمار تحت استرس آمونیاک کاهش یافته است ($P < 0/05$) اما هنوز نسبت به گروه شاهد به طور معنی داری بالاتر می باشد و پس از هفت روز بهبودی به گروه شاهد رسیده است. در کبد نیز فعالیت این آنزیم بعد از انتقال به آب تمیز اگر چه روند کاهشی نشان داده ولی پس از هفت روز



شکل ۱- اثر آمونیاک (۰/۹۹ میلی گرم بر لیتر NH_3) بر فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) در بافت کبد و آبشش کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)



شکل ۳- اثر آمونیاک (۰/۹۹ میلی گرم بر لیتر NH_3) بر فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) در بافت کبد و آبشش کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون: نتایج میانگین تغییرات فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون در جدول

تفاوت آن با گروه شاهد معنی‌دار نبود ($P > 0/05$). میزان پروتئین کل ($4/48 \pm 0/19$ g/dl) و آلبومین ($0/51 \pm 0/1$ g/dl) در سرم گروه تحت استرس به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد بود ($P < 0/05$) و غلظت شان پس هفت روز دوره بهبودی به حد نرمال (قبل از استرس) رسید و تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد مشاهده نشد ($P > 0/05$).

گروه کنترل بود ($10/42 \pm 10/74$ mg/dl) ($P < 0/05$) و بعد از هفت روز بهبودی کاهش یافته و تفاوت معنی‌داری را با گروه شاهد نشان نداد ($P > 0/05$). کورتیزول نیز در اثر استرس به‌طور معنی‌داری در گروه تحت استرس ($41/8 \pm 3/07$ ng/ml) بالاتر از گروه شاهد بود ($32/64 \pm 2/01$ ng/ml) ($P < 0/05$) و در طی ۲۴ ساعت دوره بهبودی به‌طور معنی‌دار کاهش یافت ($35/2 \pm 2/97$ mg/dl) ($P < 0/05$) و

جدول ۱- تغییرات میانگین ($SD \pm$) فاکتورهای بیوشیمیایی سرم در ماهی کپور معمولی قرار گرفته در معرض آمونیاک و دوره بهبودی

تیمار	گلوکز (mg/dl)	کورتیزول (ng/ml)	پروتئین کل (g/dl)
گروه شاهد	$85/2 \pm 5/02^a$	$32/64 \pm 2/01^a$	$0/54 \pm 0/45^c$
۹۶ ساعت قرار گرفته در معرض آمونیاک	$104/74 \pm 10/42^b$	$41/8 \pm 3/07^b$	$4/48 \pm 0/19^a$
۲۴ ساعت دوره بهبودی	$100/06 \pm 4/9^b$	$35/2 \pm 2/97^a$	$4/64 \pm 0/25^{ab}$
۷ روز دوره بهبودی	$102/4 \pm 5/9^a$	$36/2 \pm 2/85^a$	$0/28 \pm 0/45^{bc}$

بحث

مطالعات مختلف در ارتباط با ماهیان مختلف نشان داده است که آلاینده‌های مختلف باعث تغییر فاکتورهای بیوشیمیایی از جمله آنزیم‌ها در بافت‌ها و خون ماهی می‌شوند. تغییرات در برخی آنزیم‌ها در پاسخ به آلاینده‌ها می‌تواند به عنوان یک ابزار هشدار دهنده اولیه آلودگی محیط آبی مفید باشد (Velmurugan و همکاران، ۲۰۰۸).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که فعالیت آنزیم ALT و AST در هر دو بافت کبد و آبشش در تیمار قرار گرفته در معرض آمونیاک نسبت به گروه شاهد افزایش یافت به طوری که در مورد آنزیم ALT افزایش فعالیت نسبت به گروه شاهد معنی‌دار نبوده ولی در ارتباط با آنزیم AST این افزایش فعالیت معنی‌دار بوده است. Peyghan و Azary (۲۰۰۲) نیز عدم افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم ALT را در سرم خون کپور معمولی قرار گرفته در معرض آمونیاک گزارش کردند که با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی

دارد. این در حالی است که افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم ALT در بافت‌های بدن ماهی *Cirrhinus mrigala* ناشی از مسمومیت با آمونیاک نشان داده شده است (Das و همکاران، ۲۰۰۴). در ارتباط با آنزیم AST افزایش فعالیت این آنزیم در بافت کبد، کلیه و آبشش ماهی کپور معمولی و تیلاپیا در حضور کادمیوم، سرب و آمونیاک (Abbas، ۲۰۰۶؛ De Smet و Blust، ۲۰۰۱) گزارش شده است. افزایش فعالیت این آمینوترانسفرازها احتمالاً به علت نقش آنها در فراهم آوردن شرایط لازم و کافی جهت فرآیند گلوکونئوژنز و تامین انرژی مورد نیاز جانور در شرایط استرس ناشی از آمونیاک می‌باشد. AST و ALT آنزیم‌های درگیر با گلوکونئوژنز آمینواسیدها بوده و بر روی فعالیت‌های ترانس‌آمینازها موثرند. افزایش ترانس‌آمینازها یک مکانیسم ایمنی است که در مراحل اولیه استرس رخ می‌دهد (Lin و همکاران، ۱۹۹۷). همچنین افزایش این آنزیم‌ها می‌تواند

نشان‌دهنده آسیب بافتی نیز باشد (Jency و همکاران، ۱۹۹۲).

فعالیت آنزیم AST در طول دوره بهبودی در این مطالعه به‌طور آهسته کاهش یافت به‌طوری‌که پس از ۲۴ ساعت هنوز به‌طور معنی‌داری از گروه شاهد بالاتر بود ولی پس از هفت روز دوره بهبودی در کبد و آبشش به حد گروه شاهد رسید. Mikulikova و همکاران (۲۰۱۳) و Roa (۲۰۰۶) نیز با مطالعه اثر دو آفت کش متفاوت به‌ترتیب بر روی ماهی کپور معمولی و *Oreochromis mossambicus* برگشت فعالیت آنزیم AST (کمی با تاخیر) را به حالت طبیعی در دوره بهبودی هفت روزه گزارش کرده‌اند که این موارد نشان‌دهنده پتانسیل بازسازی بافت ماهیان است. از این‌رو کاهش نیاز به انرژی به علت حذف عامل استرس‌زا و پیشرفت بازسازی بافتی کاهش میزان آنزیم AST را در این مطالعه توجیه می‌کند.

نتایج این مطالعه نشان داد که آنزیم ALP به‌طور معنی‌داری در آبشش و کبد در گروه تحت آمونیاک نسبت به گروه شاهد افزایش یافته است. Abbas (۲۰۰۶) نیز افزایش فعالیت این آنزیم را در سرم خون کپور معمولی به علت حضور آمونیاک در محیط گزارش کرده است که با مطالعه حاضر همخوانی دارد. این در حالی است که کاهش فعالیت این آنزیم در اثر مسمومیت حاد با آمونیاک در آبشش ماهی *Cirrhinus mrigala* نشان داده شده است (Das و همکاران، ۲۰۰۴). این تفاوت‌های مشاهده شده در ارتباط با فعالیت متفاوت آنزیم (های) بافتی می‌تواند به علت تفاوت در گونه ماهی، نوع ماده اثرکننده، دوز و زمان در معرض قرار گرفتن و یا سایر عوامل ناشناخته باشد. Gaudet و همکاران (۱۹۷۵) علت افزایش این آنزیم را در اثر مسمومیت با آلاینده‌ها به آسیب بافتی

و وجود گلبول‌های قرمز خون آسیب دیده در بافت نسبت داده‌اند. از این رو آسیب و خونریزی بافت کبد و آبشش در اثر آمونیاک (ناجی و همکاران، ۱۳۸۸؛ بنی‌هاشمی و همکاران، ۱۳۹۲؛ Benli و همکاران، ۲۰۰۸) می‌تواند حضور بیشتر این آنزیم را توجیه کند. در مطالعه حاضر میزان این آنزیم بعد از قرارگیری ماهیان در آب فاقد آمونیاک جهت طی دوره بهبودی (۲۴ ساعت و هفت روز) روند کاهشی نشان داد به‌طوری‌که در آبشش با گروه کنترل تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد ولی در کبد به حد گروه شاهد نرسید و هنوز به طور معنی‌داری بالاتر بود که احتمالاً به علت کوتاه بودن دوره بهبودی بوده است.

فعالیت آنزیم LDH در مطالعه حاضر در اثر مسمومیت با آمونیاک در هر دو بافت کبد و آبشش به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش یافت که این افزایش با تخریب بافتی و کاهش میزان اکسیژن و در نتیجه تغییر مسیر گلیکولیز از حالت هوازی به بی‌هوازی در ارتباط است (Rajamanickam و Muthuswamy، ۲۰۰۸) اگر چه در مطالعه حاضر فعالیت این آنزیم در هر دو بافت افزایش یافت اما در مطالعه Peyghan و Azary Takamy (۲۰۰۲) تغییر معنی‌داری را در فعالیت این آنزیم در سرم خون ماهی کپور معمولی تحت استرس آمونیاک گزارش نکردند. به طور کلی مطالعات نتایج متفاوتی را در فعالیت این آنزیم گزارش کرده‌اند به‌عنوان مثال افزایش فعالیت LDH در کبد ماهی کپور معمولی تحت مسمومیت با مس ثبت شده است (Toth و همکاران، ۱۹۹۶) در حالی که مس باعث کاهش فعالیت این آنزیم در کبد ماهی *Sparus auratus* شده است (Antognelli و همکاران، ۲۰۰۳). از این رو نوع گونه ماهی، بافت و ماده آلاینده در فعالیت آنزیم LDH موثر هستند.

فعالیت این آنزیم بعد از هفت روز دوره بهبودی توانست به حالت اولیه (نزدیک به گروه شاهد) برگردد. روند بهبودی ضایعات ایجاد شده در بافت‌های ماهی کپور معمولی پس از یک دوره بهبودی توسط Mikulikova و همکاران (۲۰۱۳) نیز گزارش شده است. بهبود بافت‌ها و افزایش میزان اکسیژن به علت ترمیم آبشش می‌تواند کاهش فعالیت این آنزیم را در دوره بهبودی توجیه کند.

میزان پروتئین کل در مطالعه حاضر به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد کاهش یافت. Das و همکاران نیز کاهش معنی‌دار میزان پروتئین کل را در ماهی *Cirrhinus mrigala* به علت اثر آمونیاک گزارش کرد که با مطالعه حاضر همخوانی دارد. Vani و همکاران (۲۰۱۲) نیز کاهش معنی‌دار این فاکتور را در ماهی *Catla catla* به علت مسمومیت ناشی از Cypermethrin گزارش کردند و علت کاهش این فاکتور را تخریب و اختلال در عملکرد کبد و کلیه ناشی از مسمومیت بیان کردند. نتایج نشان داد که پس از هفت روز بهبودی این فاکتور به حالت نرمال رسید که این امر احتمالاً به علت برگشت و بهبود عملکرد اندام‌های تحت تاثیر آمونیاک به حالت طبیعی (قبل از مسمومیت) در نتیجه انتقال به آب تازه و ایجاد شرایط مناسب (حذف آمونیاک) روی داده است.

میزان گلوکز در سرم خون ماهی کپور بعد از قرار گیری در معرض آمونیاک در این مطالعه به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه شاهد بود. افزایش گلوکز سرم خون در اثر استرس ناشی از آمونیاک در ماهی تیلاپیا (Metwally و Wafeek، ۲۰۱۴) و Red drum (Thomas و همکاران، ۱۹۹۹) گزارش شده است. مطالعات نشان داده که آمونیاک باعث افزایش کاتکولامین‌ها و فعال شدن گلیکوژنولیز و

گلیکوژنولیز می‌شود که نتیجه آن افزایش گلوکز می‌باشد (Metwally و Wafeek، ۲۰۱۴؛ Tomasso و همکاران، ۱۹۸۱). میزان گلوکز پس از انتقال به آب تمیز توانست به آرامی به حالت قبل از استرس نزدیک شود به طوری که در ۲۴ ساعت بعد انتقال به آب تمیز هنوز به طور معنی‌داری کاهش نیافته بود اما پس از هفت روز به‌طور معنی‌داری نسبت به مراحل قبل کاهش یافت. احتمالاً این روند کاهش گلوکز در ارتباط با تغییرات نیاز بدن ماهی به انرژی در اثر تغییر شرایط محیطی (حذف آمونیاک) بوده است.

میزان کورتیزول نیز در مطالعه حاضر به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه شاهد بود. تغییرات میزان کورتیزول به‌عنوان شاخص استرس در ماهیان مورد مطالعه قرار گرفته است. کورتیزول نقش مهمی در برخی فرآیندهای فیزیولوژیک از قبیل تعادل کربوهیدرات‌ها، نقل و انتقال آمینو اسیدها و اسیدهای چرب از ذخیره سلولی و گلوکوژنولیز دارد (Goss و Wood، ۱۹۸۸). افزایش کورتیزول به علت وجود آمونیاک در ماهی گلدفیش (Sinha و همکاران، ۲۰۱۲) و تیلاپیا (Metwally و Wafeek، ۲۰۱۴) نیز گزارش شده است که با مطالعه حاضر همخوانی دارد. رها سازی کورتیزول از بافت کلیوی در شرایط استرس زا معمولاً جهت سازگاری با این شرایط صورت می‌گیرد (Chezhian و Senthamil Selvan، ۲۰۱۲). میزان این هورمون پس از ۲۴ ساعت دوره بهبودی به طور معنی‌داری کاهش یافت و میزان این هورمون به حد گروه شاهد و قبل از استرس رسیده است. بر طرف شدن عامل استرس و به تعادل رسیدن ترکیبات متابولیک بدن در طول دوره بهبودی می‌تواند در کاهش این هورمون موثر بوده باشد.

نتیجه گیری

ماهی کپور به عنوان یک گونه خوراکی مهم در سراسر جهان مورد توجه بوده و پرورش داده می شود. آمونیاک یکی از مشکلات جدی در شرایط پرورش در صنعت آبزی پروری است و باعث یک سری تغییرات در فاکتورهای بیوشیمیایی، هورمون ها و آنزیم ها در ماهیان مختلف می شود. در مطالعه حاضر مشاهده شده که وجود آمونیاک در محیط توانست باعث تغییر آنزیم های متابولیک در بافت کبد و آبشش و برخی فاکتورهای بیوشیمیایی در سرم خون ماهی کپور معمولی شود. همچنین نتایج نشان داد که در طول هفت روز بهبودی فعالیت این آنزیم ها و فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون به حالت اولیه بر

می گردد که حاکی از پتانسیل بالقوه بهبودی این ماهی می باشد. از این رو پیشنهاد می شود که پایش و بررسی پروفایل آنزیمی در بافت کبد و آبشش ماهی کپور می تواند جهت شناسایی سلامت ماهی و عدم عملکرد عادی بافت ها در مسمومیت با آمونیاک مفید باشد. اگر چه مطالعات بیوشیمیایی و سم شناسی بیشتری جهت شناخت بهتر اساس مولکولی این تغییرات آنزیمی در اثر آمونیاک نیاز است.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این پژوهش از جناب آقای مهندس نجفی کارشناس اداره کل شیلات سیستان که در انجام این تحقیق همکاری داشته اند کمال تشکر را دارند.

منابع

- بنی هاشمی، ا.، خارا، ح.، پژند، ذ.، رهاننده، م.، ۱۳۹۲. اثرات هیستولوژیکی آمونیاک در آبشش، کبد و کلیه بچه تاسماهی ایرانی *Acipenser persicus* پاتوبیولوژی مقایسه ای، سال ۱۰، شماره ۳، صفحه های ۹۲۲ تا ۹۸۳.
- خضرائی نیا، پ.، پیغان، ر.، آذری تاکامی، ق.، ۱۳۷۹. بررسی تغییرات برخی آنزیم های سرمی، اووره و کلسترول خون ماهی کپور معمولی در مسمومیت تجربی حاد با آمونیاک. مجله دامپزشکی دانشگاه تهران، سال ۵، شماره ۳، صفحه های ۲۳ تا ۲۹.
- ناجی، ط.، خارا، ح.، رستمی، م.، نصیری، ا.، ۱۳۸۸. بررسی اثر سمیت آمونیاک بر بافت کبد ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). علوم و تکنولوژی محیط زیست، سال ۱۱، شماره ۱، صفحه های ۱۳۱ تا ۱۴۸.
- Abbas, H.H., 2006. Acute toxicity of ammonia to common carp fingerling (*Cyprinus carpio*) at different pH levels. *Pakistan Journal of Biological Science* 9, 2215-2221.
- Abdel-Hakim, N.F., Lashin, M.E., Al-Azab, A.D.A.M., and Ashry, A.M., 2010. Effect of fresh or dried garlic as a natural feed supplement on growth performance and nutrients utilization of the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Egypt Journal of Aquatic Biology and Fisheries* 14, 19-38.
- Antognelli, C., Romani, R., Baldracchini, F., De Santis, A., Andreani, G., and Talesa, V., 2003. Different activity of glyoxalase system enzymes in specimens of *Sparus auratus* exposed to sublethal copper concentrations. *Chemico-Biological Interactions* 142, 297-305.
- Benli, A.C.K., Koksall, G., and Ozkul, A., 2008. Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Effects on gill, liver and kidney histology. *Chemosphere* 72, 1355-1358.
- Blahova, J., Modra, H., Sevcikova, M., Marsalek, P., Zelnickova, L., Skoric, M., and Svobodova, Z., 2014. Evaluation of biochemical, haematological, and histopathological responses and recovery ability of Common Carp (*Cyprinus carpio*) after Acute Exposure to Atrazine Herbicide. *BioMed Research International* P, 1-8.

- Casillas, E., Meyers, M., and Ames, W., 1983. Relationship of serum chemistry values to liver and kidney histopathology in English sole (*Parophrys vetulus*) after acute exposure to carbon tetrachloride. *Aquatic Toxicology* 3, 61–78.
- Chandravathy, M.V., and Reddy S.L.N., 1994. In vivo recovery of Protein metabolism in gill and brain of a fresh water fish, *Anabas Scandens* after exposure to lead nitrate. *Journal of Environmental Biology* 15, 75-82.
- Chezian, A., and Senthamil Selvan, D., 2012. Hormonal responses in fresh water fish *Cyprinus carpio* var. *Communis* (Linnaeus, 1758) exposed to ammonia toxicity. *International Journal of Environmental Biology* 2, 142-145.
- Cooper, A.J.L., Plum, F., 1987. Biochemistry and physiology of brain ammonia. *Physiological Reviews* 67, 440-519.
- Das, P.C., Ayyappan S., Das, B.K., and Jena, J.K., 2004. Nitrite toxicity in Indian major carps: sublethal effect on selected enzymes in fingerlings of *Catla catla*, *Labeo rohita* and *Cirrhinos mrigala*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 138, 3-10.
- De Smet, H., and Blust, R., 2001. Stress responses and changes in protein metabolism in carp *Cyprinus carpio* during cadmium exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 48, 255–262.
- Dosdat, A., Ruyet, J.P., Coves, D., Dutto, G., Gasset, E., Roux, A., and Lemarie, G., 2003. Effect of chronic exposure to ammonia on growth, food utilization and metabolism of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquatic Living Resources* 16, 509–520.
- Emerson, K.R., Russo, R.C., Lund, R.E., and Thurston, R.V., 1975. Aqueous ammonia equilibrium. Calculations: effect of pH and temperature. *Fisheries Research. Board of Canada* 32, 2377-2383.
- Gabriel, U.U., Akinrotimi, O.A., and Ariweriokuma, V.S., 2012. Changes in metabolic enzymes activities in selected organs and tissue of *Clarias gariepinus* exposed to cypermethrin. *Journal of Chemical Engineering* 1, 25-30.
- Gaudet, M., Racicot, J.G., and Leray, C., 1975. Enzyme activities of plasma and selected tissues in rainbow trout, *Salmo gairdneri Richardson*. *Journal of Fish Biology* 7, 505–512.
- Gomes, L.C., Chagas, E.C., Brinn, R.P., Roubach, R., Coppati, E.C., and Baldisserotto, B., 2006. Use of salt during transportation of air breathing pirarucu juveniles (*Arapaima gigas*) in plastic bags. *Aquaculture* 256, 521–528.
- Goss, G.G., and Wood, C.M., 1988. The effects of acid and acid/aluminum exposure on circulating plasma cortisol level and other blood parameter in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Fish Biology* 32, 63-76.
- Jeney, G., Nemcsok, J., Jeney, Z., and Olah, J., 1992. Acute effect of sublethal ammonia concentrations on common carp (*Cyprinus carpio* L.). II. Effect of ammonia on blood plasma transaminases (GOT, GPT), GIDH enzyme activity, and ATP value. *Aquaculture* 104, 9-156.
- Hargreaves, J.A., and Kucuk, S., 2001. Effects of unionized ammonia fluctuation on juvenile hybrid striped bass, channel catfish and blue tilapia. *Aquaculture* 195, 163-181.
- Knoph, M.B., and Thorud, K., 1996. Toxicity of ammonia to Atlantic salmon (*Salmo salar*) in seawater-effects on plasma osmolality, ion, ammonia, urea and glucose levels and hematological parameters *Comparative Biochemistry and Physiology* 113, 375–381.
- Lemarie, G., Dosdat, A., Coves, D., Dutto, G., Gasset, E., and Ruyet, J.P., 2004. Effect of chronic ammonia exposure on growth of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). Juveniles. *Aquaculture* 229, 471–491.
- Lin, L., Yang, Y.J., Yang, S.S., and Leu, M.L., 1997. Aluminium utensile contribute to aluminium accumulation in patients with renal disease. *American Journal of Kidney Diseases* 30, 653-658.

- Metwally, M.A.A., and Wafeek M., 2014. Effect of Ammonia Toxicity on Carbohydrate Metabolism in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). World Journal of Fish and Marine Sciences 6, 252-261.
- Mikulikova, I., Modra, H., Blahova, J., Kruzikova, K., Marsalek, P., Bedanova, I., and Svobodova, Z., 2013. Recovery ability of common carp (*Cyprinus carpio*) after a short-term exposure to terbuthylazine. Polish Journal of Veterinary Sciences 16, 17-23.
- Peyghan, R., and Azary Takamy, G., 2002. Histopathological, serum enzyme, cholesterol and urea changes in experimental acute toxicity of ammonia in common carp *Cyprinus carpio* and use of natural zeolite for prevention. Aquaculture International 10, 317-325.
- Rajamanickam, V., and Muthuswamy, N., 2008. Effect of heavy metals induced toxicity on metabolic biomarkers in common carp (*Cyprinus Carpio*). Journal Science and Technology 2, 192-200.
- Randall, D.J., and Tsui, T.K.N., 2002. Ammonia toxicity in fish. Marine. Pollution. Bulletin 45(1-12), 17-23.
- Roa, J.V., 2006. Biochemical alterations in euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus* exposed to sub-lethal concentrations of an organ phosphorus insecticide, Monocrotophos. Chemosphere 65, 1814-1820.
- Romi, D., Indraneel, S., Suman, P., Arindam, B., and Gaurisankar, S., 2006. Immunosuppression, hepatotoxicity and depression of antioxidant status by arecoline in albino mice. Toxicology 227, 94-104.
- Russo, R.C., and Thurston, R.V., 1991. Toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to fishes. In: Brune, E., Tomasso, J.R. (Eds.), Aquaculture and Water Quality. WAS Publication, Baton Rouge, USA pp, 58-89.
- Salin, D., and Williot, P., 1991. Acute toxicity of ammonia to Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). In: Williot, P. (Ed.). Cemagref Publication, Acipenser pp, 153-167.
- Silberman, D.M., Wald, M., and Genaro, A.M., 2002. Effects of chronic mild stress on lymphocyte proliferative response. Participation of serum thyroid hormones and corticosterone. International Immunopharmacology 2, 487-497.
- Sinha, A.K., Liew, H.J., Diricx, M., Kumar, V., Darras, V.M., Blust, R., and De Boeck, G., 2012. Combined effects of high environmental ammonia, starvation and exercise on hormonal and ion-regulatory response in goldfish (*Carassius auratus* L.). Aquatic Toxicology 114-115, 153-164.
- Svobodova, Z., Lloyd, R., and Machova, J., 1993. Ammonia. Water quality and fish health. EIFAC Technical Paper 54, 11-16.
- Thomas, P.M., Pankhurst, N.W., and Bremner, H.A., 1999. The effect of stress and exercise on post-mortem biochemistry of Atlantic salmon and rainbow trout. Fish Biology 54, 1177-1196.
- Thurston, R.V., Russo, R. J., Luedtke, C.E., Smith, E.L., Meyn, C., Chakoumakos, K.C., Wang, and Brown, C.J.D., 1984. Chronic toxicity of ammonia to rainbow trout. Transactions of the American Fisheries Society 113, 56-73.
- Tomasso, J.R., Davis, K.B., and Simco, B.A., 1981. Plasma corticosteroid dynamics in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) exposed to ammonia and nitrite. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 38, 1106-1112.
- Tomasso, J.R., 1994. Toxicity of nitrogenous wastes to aquaculture animals. Reviews in Fisheries Science 2, 291-314.
- Toth, L., Juhasz, M., Varga, T., Csikkel-Szolnoki A., and Nemcsok, J., 1996. Some effects of CuSO4 on carp. Environmental Science and Health 31, 627-635.
- Vani, T., Saharan, N., Roy, S.D., Ritesh Ranjan, A.K., and Kumar, G.M.S., 2012. Alteration in haematological and biochemical parameters of Catla catla exposed to sub-lethal concentration of cypermethrin. Fish Physiology Biochemistry 38, 1577-1584.

- Velmurugan, B., Selvanayagam, M., Cengiz, E.I., and Uysal, E., 2008. Levels of transaminases, alkaline phosphatase, and protein in tissues of *Clarias gariepienus* fingerlings exposed to sublethal concentrations of cadmium chloride. *Environmental Toxicology* 23, 672–678.
- Voegborlo, R.B., and Akagi, H., 2007. Determination of mercury in fish by coldvapour atomic absorption spectrometry using an automatic mercury analyzer. *Food Chemistry* 100, 853–858.
- Weinstein, D.I., and Kimmel, E., 1998. Behavioral response of carp (*Cyprinus carpio* L.) to ammonia stress. *Aquaculture* 165, 81–93.
- Yildirim, M.Z., Benli, K.C., Selvi, M., Ozkul, A., Erko, F., and Kocak, O., 2006. Acute toxicity behavioural changes and histopathological effects of deltamethrin on tissues (gills, liver, brain, spleen, kidney, muscle, skin) of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Environmental Toxicology* 21, 614-620.