ژنتیک نوین
دوره دهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۴
صفحه ۴۵۴-۴۵۱

تاثیر سایپرمترین بر شکستگی DNA در کبد ماهی گورخری صوفیا (*Aphanius sophiae*) تحت شرایط غذایی متفاوت

Effects of cypermethrin on DNA breakage in the liver of Zebrafish (*Aphanius sophiae*) under different nutritional status

مریم نصراله پورمقدم[۱]، هادی پورباقر*[۲]، سهیل ایگدری[۳]

۱- **به ترتیب** دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار، استادیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران

Nasrollah Pourmoghadam M[1], PoorBagher H[*1], Eagderi S[1]

1. Graduated MSc Student, Associate Professor, Assistant Professor, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: poorbagher@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۲۲- تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۱۸)

چکیده

سایپرمترین یکی از موثرترین سموم پایرتروییید است که به آسانی وارد اکوسیستم‌های آبی می‌شود. در مطالعه حاضر، اثر دفعات غذادهی بر سمیت سایپرمترین در ماهی گورخری صوفیا (*Aphanius sophiae*) مورد بررسی قرار گرفت. پس از سپری شدن ۱۴ روز از قرارگیری ماهیان در تیمارهای مختلف شامل عدم حضور سم و غذادهی هر سه روز یک‌بار فقط در نوبت صبح، عدم حضور سم و غذادهی هر روز در دو نوبت صبح و عصر، حضور سم و غذادهی هر سه روز یک‌بار فقط در نوبت صبح و غذادهی هر روز در دو نوبت صبح و عصر به همراه حضور سم، استخراج DNA از بافت کبد انجام شد. سپس شکستگی DNA بعد از الکتروفورز در ژل آگارز با استفاده از روش کنترل منطق فازی بررسی شد. نتایج نشان داد فاکتورهای سم و دفعات غذادهی دارای اثر بسیار معنی‌داری بر شکستگی DNA هستند.

واژه‌های کلیدی

سایپرمترین
شکستگی DNA
ماهی گورخری صوفیا
منطق فازی

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-16]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.16.6]

سایپرمترین یکی از موثرترین سموم پایرتروییید است (Bradbury and Coats 1989) که به آسانی وارد آب‌های طبیعی می‌شود و به‌طور معمول دارای نیمه‌عمر حدود دو هفته می‌باشد (Velmurugan et al. 2006). برای کنترل آفات پنبه، میوه و محصولات گیاهی به صورت محلول یا پودر مورد استفاده قرار می‌گیرد. در مهره‌داران و بی‌مهرگان به‌طور عمده بر سیستم عصبی اثر می‌گذارد و سبب افزایش تکانه‌های عصبی در اندام‌های حسی می‌شود (Vijverberg and Van den Bercken 1990). تحقیقات نشان داده که سایپرمترین مهارکننده آنزیم ATPase می‌باشد، این عمل به ویژه در ماهیان و حشرات آبزی که این آنزیم در آن‌ها علاوه بر فراهم کردن انرژی برای انتقال فعال در مکان‌های تبادل اکسیژن نیز حضور دارد حائز اهمیت می‌باشد و اختلال سطوح تنفسی نشان داده که سایپرمترین ذاتا برای موجودات آبزی سمیت بیشتری دارد (Siegfried 1993). بنابراین بررسی اثرات زیان‌بار این حشره‌کش بر ماهیان و اکوسیستم لازم است.

ماهی گورخری یکی از مدل‌های مهم در بررسی ژنتیک، زیست-شناسی تکاملی و فیزیولوژی اعصاب است (Amsterdam and Hopkins 2006) و رنگ‌آمیزی زیبا و اندازه کوچک آن‌ها را به عنوان یک ماهی آکواریومی محبوب تبدیل کرده‌است. این ماهی، کوچک و مقاوم بوده و به آسانی و با هزینه کم می‌تواند در آزمایشگاه نگه‌داری شود.

گزارشاتی که در دسترس است اکثرا سمیت سایپرمترین را بر بخش‌های مختلف بدن بررسی کرده‌است (Ayoola 2008; Caliskan 2003)، اما مطالعه‌ای درمورد کنش متقابل سایپرمترین با عواملی نظیر دفعات غذادهی در ماهی و بررسی تاثیر آن بر شکستگی DNA انجام نشده‌است. هدف مطالعه حاضر، بررسی تاثیر متقابل سم سایپرمترین با دفعات غذادهی برشکستگی DNA در کبد ماهی گورخری صوفیا می‌باشد، ضمن آن‌که این اطلاعات می‌تواند دیدگاه جدیدی نسبت به مکانیسم سم‌شناسی سایپرمترین و تاثیر متقابل آن با فاکتورهای دیگر از جمله دفعات غذادهی فراهم کند.

نمونه‌برداری در رودخانه شور اشتهارد (35° 50'N و 51° 19'E) در تیرماه سال ۱۳۹۲ صورت پذیرفت. جهت انجام آزمایش ۴ عدد آکواریوم با حجم آبی حدود ۱۰ لیتر تحت شرایط دمایی ۱± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و هوادهی منظم قرار گرفتند. غلظت ۰/۰۲ میکروگرم بر لیتر سایپرمترین با حل کردن مقدار مناسب در آب و با در نظر گرفتن درصد ماده موثره آن، تهیه شد. پس از سازگاری ماهیان با شرایط آزمایشگاه، چهار تیمار شامل عدم حضور سم و غذادهی هر سه روز یک‌بار فقط در نوبت صبح، عدم حضور سم و غذادهی هر روز در دو نوبت صبح و عصر، حضور سم و غذادهی هر سه روز یک‌بار فقط در نوبت صبح و غذادهی هر روز در دو نوبت صبح و عصر به همراه حضور سم آماده شد و در هر آکواریوم ده عدد ماهی با وزن متوسط ۰/۶ گرم و میانگین طولی ۳/۳ سانتی‌متر معرفی شد و در مورد هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. ماهیان با استفاده از غذای دستی (Biomar ®) تغذیه شدند.

پس از سپری شدن ۱۴ روز، اقدام به سنجش میزان شکستگی DNA در کبد شد. بافت‌های کبد سه ماهی در هر تیمار پس از بیهوشی در پودر گل میخک، استخراج و تا زمان استخراج DNA در اتانول ۹۶ درصد نگه‌داری شد. نخست ۲۵ تا ۵۰ میلی‌گرم از نمونه‌ها با ۱۰۰ میکرولیتر بافر پروتئاز مخلوط و ۵ میکرولیتر پروتئیناز به آن‌ها اضافه شد. سپس درون دستگاه بن‌ماری (Eppendorf AG, Termomixer comfort, Made in Germany) در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک تا ۳ ساعت قرار گرفتند. پس از هموژن شدن نمونه‌ها، با استفاده از کیت شرکت سیناژن بر اساس دستورالعمل این شرکت، DNA استخراج شد (Piridugahe et al. 2011).

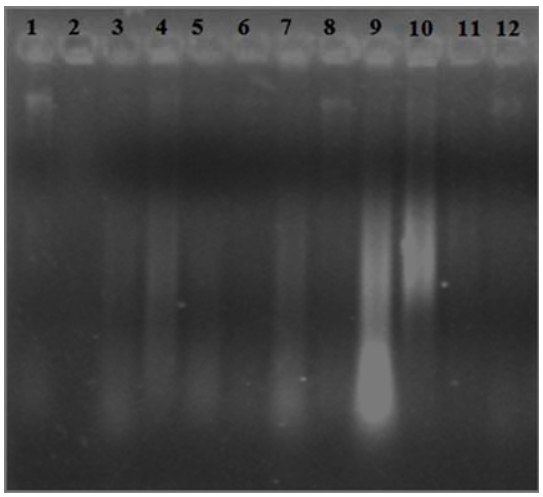
جهت کمی سازی smear حاصل از حرکت DNA روی ژل آگارز و تعیین درصد میزان شکستگی DNA از روش کنترل منطق فازی[1] استفاده شد (Bojadziev and Bojadziev 2007). برای این منظور دو عامل فاصله DNA حرکت کرده روی ژل از مبدا (چاهک ژل) و درصد DNA مد نظر قرار گرفت. برای این منظور الکتروفوروگرام به نرم‌افزار ImageJ منتقل شد. سپس منحنی[2] شدت پیکسل‌ها به‌دست آمد. سطح زیر منحنی به ۱۰ قسمت تقسیم شد. هرچه مقدار DNA در قسمت‌های دورتر از مبدا حرکت (چاهک) باند قرار داشت، مقدار شکستگی بیشتر فرض

[1] Fuzzy logic control
[2] Curve

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.16.6]

شد. مساحت زیر منحنی برای هر یک از ۱۰ قسمت با نرم‌افزار ImageJ به‌دست آمده و بر حسب درصدی از مساحت کل زیر منحنی محاسبه شد. تابع عضویتی[1] یکسان برای دو متغیر ورودی[2] فاصله DNA از مبدا حرکت و درصد DNA در هر یک از ۱۰ قسمت باند الکتروفورز و همچنین خروجی[3] درصد شکستگی تعریف شد. قوانین کنترل تعیین شد و براساس آن جدول تصمیم[4] با استفاده از درصد DNA و محل قرار گیری آن درصد از DNA تعریف شد. از اشتراک دو قانون (مینیمم مقدار) برای کنترل تابع عضویت خروجی استفاده شد. برای فازی زدایی[5] تابع عضویت خروجی از روش فازی زدایی ارتفاع[6] استفاده شد.

برای ارزیابی اثر سم و دفعات غذادهی بر روی درصد شکستگی DNA در کبد از ANOVA دو طرفه (Quinn and Keough 2002) استفاده شد. برای این منظور نرم‌افزار SPSS 17 مورد استفاده قرار گرفت. نرمال بودن داده‌ها و همگنی واریانس با آزمون‌های Kolmogorov-Smirnov و Levene آزمون شد.



شکل ۱- تصویر میزان شکستگی DNA در ژل آگارز یک درصد. باند۱، ۲ و ۳) عدم حضور سم و غذادهی هر سه روز یک‌بار فقط در نوبت صبح؛ باند ۴، ۵ و ۶) عدم حضور سم و غذادهی هر روز در دو نوبت صبح و عصر؛ باند ۷، ۸ و ۹) حضور سم و غذادهی هر روز در دو نوبت صبح و عصر؛ باند ۱۰، ۱۱ و ۱۲) حضور سم و غذادهی هر سه روز یک‌بار فقط در نوبت صبح.

[1] Membership function
[2] Input
[3] Output
[4] Decision table
[5] Defuzzification
[6] Height defuzzification method

بررسی نتایج حاصل از آنالیز تجزیه واریانس دوطرفه نشان داد فاکتورهای سم و دفعات غذادهی دارای اثر بسیار معنی‌داری بر شکستگی DNA هستند. دفعات غذادهی و غلظت سم بیشتر میزان شکستگی DNA را افزایش داد در حالی‌که اثر متقابل معنی‌داری بین دو فاکتور غلظت سم و دفعات غذادهی دیده نشد. نتایج نشان داد که سایپرمترین حتی در غلظت کم، سبب آسیب DNA در کبد ماهی گورخری صوفیا می‌شود. نتایج مشابه نیز در گونه‌های دیگر یافت شده‌است. Patel et al. (2006) گزارش کردند که حشره‌کش سایپرمترین سبب آسیب DNA در اندام‌های حیاتی موش مانند مغز، کبد و کلیه می‌شود. به‌طور مشابه Mukhopadhyay et al. (2004) نشان دادند بین افزایش دوز سایپرمترین و میزان آسیب DNA رابطه مستقیمی وجود دارد. مجموعه فعالیت آنزیمی که در سلول بر روی مواد آلاینده اتفاق می‌افتد، به‌صورتی است که سعی در سم‌زدایی آلاینده وارد شده یا مشتقات آن دارد و در ماهیان کبد اندام مهمی است که در این رابطه اهمیت زیادی دارد و اگر سیستم دفاعی نتواند با آلاینده مقابله کند آسیب سلولی ایجاد می‌شود (Saleha Banu et al. 2001). این آسیب شامل شکستگی رشته و بازهای آلی و تغییر نوکلئوتیدها به‌خصوص در جایگاه‌هایی با محتوای گوانین بالا می‌باشد (Bennett 2001).

نتایج نشان داد که افزایش غذادهی سبب افزایش شکستگی DNA شد. از آنجاکه با افزایش دفعات غذادهی و تجمع غذا در محیط و آلودگی آب، اکسیژن محلول کاهش می‌یابد لذا در این حالت با کاهش اکسیژن تاثیر سم افزایش می‌یابد (Koskela 2002). در نتیجه حضور ماهی گورخری صوفیا در محیط‌های یوتروفیک سبب افزایش تاثیر سایپرمترین می‌شود. در این راستا، اطلاعات یافت شده چهارچوب مهمی برای درک بهتر تغییرات ساختاری DNA در مطالعات آینده با تاکید بر تنوع مواد شیمیایی که سبب تنش در سیستم‌های بیولوژیکی می‌شوند، فراهم می‌کند. در نتیجه، این روش با استفاده از مقدار کمی بافت می‌تواند شاخصی مناسب در توسعه نشانگرهای حساس در ارزیابی خطر در جمعیت‌های انسانی و حیوانی ارائه دهد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.16.6]

منابع

Ayoola SO (2008) Toxicity of Glyphosate Herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juvenile. African Journal of Agricultural 3: 825-834.

Amsterdam A, Hopkins N (2006) Mutagenesis strategies in zebrafish for identifying genes involved in development and disease. Trends in Genetics 22: 473-478.

Bennett MR (2001) Reactive oxygen species and death: oxidative DNA damage inatherosclerosis. Circulation Research 88: 648-650.

Bojadziev G, Bojadziev M (2007) Fuzzy logic for business, finance and management, 2nd ed. World Scientific 232 p.

Bradbury SP, Coats JR (1989) Comparative toxicology of phyrethroid insecticides, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology pp: 133-177.

Caliskan M, Erkmen B, Yerli SV (2003) The effects of zeta cypermethrin on the gills of common guppy (*Lebistes reticulatus*). Environmental Toxicology and Pharmacology 14: 117-120.

Kloke JD, McKean JW (2012) Rfit: rank-based estimation for linear models. R Journal 4: 57-64.

Koskela J, Pirhonen J, Jobling M (1997) Effect of low temperature on feed intake, growth rate and body composition of juvenile Baltic salmon. Aquaculture International 5: 479-487.

Mukhopadhyay I, Chowdhuri DK, Bajpayee M, Dhawan A (2004) Evaluation of *in vivo* genotoxicity of cypermethrin in *drosophila melanogaster* using thealkaline comet assay. Mutagenesis 19: 85-90.

Quinn GP, Keough MJ (2002) Experimental design and data analysis for biologists. Cambridge University Press. Cambridge 537 p.

Patel S, Pandey AK, Bajpayee M, Parmar D, Dhawan A (2006) Cypermethrin induced DNA damage in organs and tissues of the mouse: Evidence from thecomet assay. Mutation Research 607:176-183.

Piridugahe H, Pourfarzi F, Valinezhad Z (1390) Evaluation of three methods for extraction of DNA in human serum samples. Journal of Medical Sciences Arak 14: 44-48.

R Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, vienna, Austria. URL http://www.R-project.org/.

Saleha Banu B, Danadevi K, Rahman MF, Ahuja YR, Kaiser J (2001) Genotoxic effect of monocrotophos to sentinel species using cometassay. Food and Chemical Toxicology 39: 361-366.

Siegfried BD (1993) Comparative toxicity of pyrethroid insecticides to terrestrial and aquaticinsects. Environmental Toxicology and Chemistry 12: 1683-1689.

Vijverberg HPM, Bercken J (1990) Neurotoxicological effects and the mode of action of pyrethroid insecticides. Critical Reviews in Toxicology 21: 105-126.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-16]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.16.6]