# تاثیر غلظت‌های زیرکشنده شیرابه فرفیون ترکمنی (*Euphorbia turcomanica*) بر برخی شاخص های بیوشیمیایی کبد ماهی آفانیوس گورخری (*Aphanius dispar*)

هما زارع[۱]، احمد نوری[۱]*، مرتضی یوسف‌زادی[۲]، مهدی بنایی[۳]

* noori@hormozgan.ac.ir

۱-دانشگاه هرمزگان، دانشکده علوم و فنون دریایی، گروه شیلات

۲-دانشگاه هرمزگان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست دریا

۳-دانشگاه صنعتی خاتم‌الانبیا(ص) بهبهان، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، گروه شیلات

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۳ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۳

## چکیده

در این مطالعه، بررسی تاثیر سمیت زیر کشنده شیرابه گیاه فرفیون ترکمنی(*Euphorbia turcomanica*) در غلظت های صفر، ۰/۰۰۵۵، ۰/۰۱۱ و ۰/۰۲۲ گرم بر لیتر بر روی برخی تغییرات شاخص های بیوشیمیایی کبد ماهی آفانیوس گورخری (*Aphanius dispar*) پس از گذشت ۱۵ و ۳۰ روز و در شرایط آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار گرفت. ابتدا مقدار میانگین (± خطای استاندارد) LC۵۰ شیرابه گیاه فرفیون ترکمنی در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به ترتیب ۰/۱۴±۰/۲۸، ۰/۰۳±۰/۱۴، ۰/۰۲±۰/۱۱، ۰/۰۳±۰/۱۹، ۰/۰۶±۰/۱۹ گرم بر لیتر بدست آمد. برخی از شاخص های بیوشیمیایی شامل مقادیر آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، لاکتات دهیدروژناز (LDH)، کراتین فسفوکیناز (CK)، و آلکالین فسفاتاز (ALP) در بافت کبد ماهیان بعد از گذشت ۱۵ و ۳۰ روز از شروع آزمایش اندازه گیری شد. تغییرات معنی-داری در سطوح آنزیم های AST، ALT، LDH، CK، و ALP درمقایسه با گروه کنترل در عصاره بافتی کبد در طول دوره آزمایش، مشاهده شد. این تغییرات به صورت افزایش معنی دار در سطوح آنزیم های AST، LDH و ALP و کاهش معنی دار در میزان فعالیت آنزیم های ALT و CK بود. همچنین روند کاهشی معنی داری در میزان پروتئین کل در عصاره بافت کبد متناسب با زمان در تماس بودن ثبت گردید. با توجه به نتایج این تحقیق، اطلاعات پایه درباره سمیت گیاه فرفیون ترکمنی بر روی ماهی آفانیوس گورخری و همچنین تعیین تاثیرات کاربرد شیرابه حاصل از این گیاه در آب به عنوان راهنما می تواند امکان پذیر باشد.

**لغات کلیدی:** آفانیوس گورخری، شیرابه فرفیون ترکمنی، غلظت زیرکشنده، آنزیم کبدی

*نویسنده مسئول

## مقدمه

مشکلات ناشی از استفاده بیش از حد از آفت‌کش‌های شیمیایی با توجه به پایداری نسبی بسیاری از آنها در طبیعت (Kumar *et al.*, 2010) و نیز تاثیر و تجمع زیستی در ارگانیسم‌های غیرهدف، سبب شده تا محققین در پی یافتن سمومی با کارایی بیشتر و امن‌تر هم از لحاظ محیطی و هم از لحاظ سمیت باشند. از اینرو، سم‌های طبیعی و گیاهی (Singh *et al.*, 2004) به ویژه استفاده از مشتقات گیاهان محلی (Tiwari & Singh, 2004; 2006; Kumar *et al.*, 2010). به دلیل ارزانتر بودن، دسترسی آسان، قابلیت تجزیه‌پذیری طبیعی، عمل برگشت‌پذیری و امن بودن هم برای انسان و هم برای محیط زیست رو به گسترش بوده و به عنوان جایگزینی مناسب برای آفت‌کش، نماتودکش، قارچ‌کش و یا حتی نرم‌تن‌کش شیمیایی در نظر گرفته می‌شوند (Singh *et al.*, 2004; Tiwari & Singh, 2004) . در حال حاضر اغلب سموم گیاهی شناخته شده متعلق به خانواده نخود یا پروانه‌آسایان (Leguminos) و زیرخانواده گل‌ارغوان (Caesalpiniaceae)، گل‌ابریشم (Mimosaceae)، پروانه‌واران (Papilionaceae) و فرفیون‌ها یا افوربیاسه (Euphorbiaceae) هستند (Fai & Fagade, 2005). گیاهان متعلق به خانواده فرفیون (Euphorbiaceae) به دلیل داشتن استرهای دی‌ترپن و تری‌ترپن، لکتین و ترکیبات آلکالوئیدی و همچنین مشتقات فوربول، تیگلیانه، دافنانه و سم‌های استردیترپن اینگنانه (Dagang *et al.*, 1992; Gundidza *et al.*, 1993) دارای ویژگی آفت-کشی است و از شیرابه و عصاره گیاهان متعلق به این خانواده در دفع آفات گیاه به ویژه لارو حشرات، نرم‌تنان در مزارع کشاورزی غرقابی و نیز کنترل بیماری‌های باکتریایی و ویروسی و قارچ‌ها در محصولات زراعی در برخی از کشورهای افریقایی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Mwine *et al.*, 2013). تاثیر سمیت حاد گونه‌های مختلف فرفیون نظیر *E. lateriflora*، *E. hyssopifolia*، *E. heterophylla*، *E. balsamifera*، و *E. hirta* بر روی گونه‌های مختلف جانوری نظیر آرتمیا و موش‌های آزمایشگاهی نشان دهنده پتانسیل بالای این گیاهان در ایجاد مسمومیت در جانوران است (Adedapo *et al.*, 2004; Rajeh *et al.*, 2012).

با توجه به ماهیت اغلب سموم و آلاینده‌های زیست محیطی، این ترکیبات به راحتی از سد دفاعی بدن آبزیان گذشته و وارد خون می‌شوند و از طریق خون به بافت‌های مختلف بدن انتقال می‌یابند. این سموم در بافت‌های مختلف بدن به ویژه در بافت کبد وارد چرخه سم‌زادیی شده و متابولیت‌های آن در نهایت از طریق سیستم صفراوی و دفعی بایستی از بدن جانوران دفع گردد. در غیر این صورت رادیکال‌های آزاد تولید شده در طی فرایند سم‌زادیی می‌تواند با ایجاد پراکسیداسیون لیپیدی غشای سلول‌ها و نیز اکسیداسیون دیگر ماکرومولکول‌های حیاتی نظیر پروتئین‌ها، لیپیدها، کربوهیدرات‌ها و DNA زمینه را برای نابودی سلول‌ها و نکروز بافت‌ها فراهم می‌کند. تغییرات بافتی کبد با آسیب‌های بافتی کلیه و آبشش مرتبط است. هر ماده سمی که وارد بدن ماهیان می‌شود جهت ذخیره‌سازی یا انتقال توسط سیستم گردش خون وارد کبد می‌شود. در صورتی که در کبد تجمع نیابد وارد صفرا شده و جهت دفع به آبشش و کلیه منتقل می‌شود. تغییرات وسیع آسیب شناسی بافت‌های کلیه و آبشش نیز موجب برهم خوردن هموستازی جانور و بروز تغییراتی در فاکتورهای بیوشیمیایی و به تبعیت از آن، کاهش توان سیستم ایمنی و بقای آبزی می‌گردد. از آنجایی که سموم در کبد جذب می‌شوند و ساخت‌وساز بسیاری از آنزیم‌ها در داخل کبد صورت می‌گیرد، در نتیجه اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها به صورت عمومی می‌تواند شاخصی برای عملکرد کبد در پاسخ به سموم، مورد استفاده قرار گیرد (Vutukuru *et al.*, 2007).

کپورداندان ماهیان یا ماهیان آفانیوس (*Aphanius*) متعلق به خانواده Cyprinodontidae هستند که به طور وسیع در مناطق مختلف از آب شیرین تا آب‌های شور

پراکنش دارند (Coad & Abdoli, 2000; Reichenbacher *et al*., 2009). منطقه پراکنش این ماهیان در طول سواحل دریای مدیترانه، دریای سرخ، خلیج فارس و دریای عربی گزارش شده است (Coad, 1998). در ایران ۷ گونه مختلف از جنس *Aphanius* وجود دارد که چهار گونه آن بومی ایران است (Hrbek *et al*., 2006). ماهی آفانیوس گورخری با نام علمی *Aphanius dispar* در ایران پراکنش زیادی دارد و در بسیاری از مطالعات فیزیولوژیک، تاکسیکولوژیک و بیولوژیک به عنوان یک گونه مناسب مورد استفاده می باشد.

هدف مطالعه حاضر بررسی تاثیر سمیت حاد و تلفات معنی دار در ماهی آفانیوس گورخری (*Aphanius dispar*) در اثر استفاده از شیرابه گیاه فرفیون ترکمنی و بررسی تغییرات سطوح برخی از آنزیم‌ها و بر مبنای میزان پروتئین کل در بافت کبد این ماهی در تماس با غلظت-های زیرکشنده شیرابه گیاه فرفیون ترکمنی می‌باشد. مقدار عددی LC۵۰-۹۶ ساعت، گیاه فرفیون ترکمنی تاکنون برای هیچ ماهی گزارش نشده است و بررسی تاثیرات سمی شیرابه این گیاه بر روی ماهی مورد ارزیابی قرار نگرفته است.

## مواد و روش‌ها

گیاه فرفیون ترکمنی (*E. turcomanica*) از منطقه کوه گنو واقع در شهر بندرعباس، استان هرمزگان جمع آوری شد. گیاهان جمع‌آوری شده به صورت کامل در سایه و در دمای اتاق به مدت یک هفته خشک گردید. سپس گیاه خشک شده توسط آسیاب برقی بصورت پودر درآورده شد. به منظور تهیه شیرابه این گیاه، پودر تهیه شده از گیاه در آب ریخته شد و سپس این مخلوط به تیمارهای آزمایشی اضافه گردید.

در هر یک از مراحل آزمایش، ماهی آفانیوس گورخری (*A. dispar*) نر و ماده از خورهای شهر بندرعباس صید و به آزمایشگاه تکثیر و پرورش آبزیان دانشکده علوم و فنون دریایی دانشگاه هرمزگان انتقال داده شد. پس از انتقال، ماهی‌ها جهت سازگاری با شرایط آزمایشگاهی (دما، ۱±۲۳/۵ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن، ۰/۱± ۴/۱۷ میلی‌گرم بر لیتر، pH، ۰/۰۳±۸/۱۲) در تانک‌های فایبرگلاس (۳۰۰ لیتری) به مدت یک هفته با تعویض روزانه ۵۰ درصد آب نگهداری شدند. در طی دوره سازگاری، ماهی‌ها با جیره تجاری مخصوص ماهی‌های آکواریوم بصورت دو بار در روز و معادل ۲ درصد وزن بدن تغذیه شدند.

در این مرحله از آزمایش، ۲۴۰ قطعه ماهی آفانیوس گورخری نر و ماده ( با میانگین وزن (± خطای استاندارد) ۰/۵۵±۲/۰۳ گرم و میانگین طول (± خطای استاندارد) ۰/۴۵±۴۷/۷ میلی‌متر)، به طور تصادفی در ۲۴ تانک فایبرگلاس ۱۰۰ لیتری در قالب ۷ تیمار آزمایشی و یک گروه شاهد، هر یک با ۳ تکرار توزیع شد. غلظت‌های صفر (گروه شاهد)، ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۲، ۴، ۶ گرم بر لیتر شیرابه گیاه فرفیون ترکمنی در نظر گرفته شد. دو روز قبل از شروع آزمایش غذادهی قطع گردید. میزان مرگ ومیر ماهی‌ها پس از گذشت ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت از آغاز آزمایش، ثبت و ماهی‌های مرده به سرعت از سیستم حذف گردید. پس از اتمام آزمایش، مقدار عددی LC۵۰ برای هر یک از زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت تماس با شیرابه گیاه فرفیون ترکمنی، برای ماهی‌های آفانیوس گورخری بر اساس آزمون آنالیز پروبیت محاسبه شد (Aydın & Köprücü, 2005).

در این مرحله، ۳۶۰ قطعه ماهی آفانیوس گورخری نر و ماده با میانگین وزن (± خطای استاندارد) ۳۹/ ± ۱/۵۸ گرم و میانگین طول (± خطای استاندارد) ۳۹/ ± ۴۳/۹۴ میلی‌متر)، به طور تصادفی در ۱۲ تانک فایبرگلاس ۱۰۰ لیتری در قالب ۳ تیمار آزمایشی و یک گروه شاهد، هر یک با ۳ تکرار توزیع و در معرض غلظت‌هایی معادل ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد مقدار سمیت LC۵۰-۹۶ ساعت شیرابه گیاه فرفیون ترکمنی که به ترتیب ۰/۰۰۵۵، ۰/۰۱۱ و ۰/۰۲۲ گرم بر لیتر بدست آمد، به مدت ۳۰ روز قرار داده

شدند. پس از گذشت ۱۵ و ۳۰ روز بعد از تماس ماهی‌ها با این گیاه، از هر تیمار ۱۲ قطعه ماهی (۴ قطعه ماهی از هر تانک) جهت مطالعات فاکتورهای بیوشیمیایی، به طور تصادفی انتخاب و صید گردید.

پس از صید ماهی‌ها و کالبدشکافی، بافت کبد ماهی-های هر تانک به طور جداگانه، تشریح و با محلول سرم فیزیولوژی، شستشو داده شد. جهت تهیه عصاره بافت کبد، از محلول بافرفسفات به نسبت حجمی ۱ به ۱۰ استفاده گردید. پس از هموژنه‌کردن بافت، محلول حاصل جهت استحصال عصاره بافت در دستگاه سانتریفیوژ (مدل Hanil، ساخت کشور ژاپن) با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه و دمای ثابت ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس مایع سطحی جهت سنجش برخی از شاخص‌های بیوشیمیایی کبد جداسازی گردید. اندازه‌گیری سطوح آنزیمی و همچنین میزان پروتئین کل عصاره بافت با استفاده از کیت‌های تهیه شده از شرکت پارس آزمون و با دستگاه اسپکتوفتومتر UV/Vis یونیکو آمریکایی مدل ۲۱۰۰ صورت گرفت. سطح پروتئین کل عصاره‌ی بافت بر اساس واکنش بایوره و در طول موج ۵۴۰ نانومتر (Shanmugam *et al.*, 2010)، سطح آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) عصاره بافت بر اساس مقدار مصرف NADPH و تبدیل آن به $NAD^+$ در طول موج ۳۴۰ نانومتر (Shanmugam *et al.*, 2010)، لاکتات دهیدروژناز (LDH)عصاره بافت براساس تبدیل پیروات به لاکتات در طول موج ۳۴۰ نانومتر (Shanmugam *et al.*, 2010)، آلکالین فسفاتاز (ALP) بر اساس تبدیل نیتروفنیل فسفات به نیتروفنول و فسفات و در طول موج ۴۰۵ نانومتر (Shanmugam *et al.*, 2010) و کراتین فسفوکیناز (CK) بر اساس تبدیل کراتین فسفات به کراتین در طول موج ۳۴۰ نانومتر تعیین و بر اساس میزان جذب نوری (OD) و فرمول ارایه شده در دستورالعمل کیت‌ها محاسبه گردید (Shanmugam *et al.*, 2010).

پس از محاسبه نرمال بودن داده‌ها با آزمون Shapiro Wilk، تجزیه و تحلیل داده‌ها به روش تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) و با استفاده از نرم افزار17 SPSS انجام و مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($\alpha$ =۰/۰۵) صورت گرفت. نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد ارائه شدند.

## نتایج

تعداد تلفات متناسب با زمان در تماس بودن با شیرابه گیاه فرفیون ترکمنی در طول ۹۶ ساعت و همچنین مقدار عددی LC۵۰ محاسبه شده پس از گذشت ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت از زمان آغاز آزمایش به ترتیب در جدول های ۱ و ۲ ارائه شده است. بر اساس نتایج بدست آمده، میزان مرگ ومیر ماهی‌ها با افزایش غلظت سم شیرابه گیاه فرفیون ترکمنی در طی آزمایش تعیین سمیت حاد بطور معنی‌داری افزایش یافت (F=۶/۹۲۶ ،df=۷ ،P<۰/۰۵)

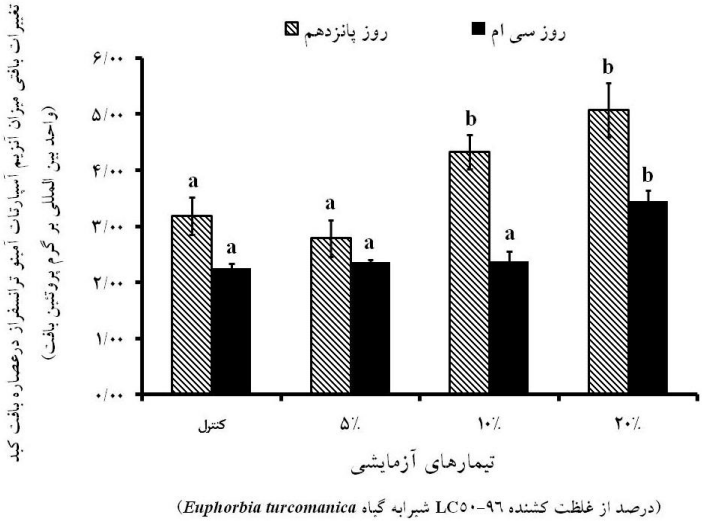
**جدول۱: تعداد تلفات ماهی آفانیوس گورخری در ارتباط با مدت زمان در تماس بودن با شیرابه گیاه فرفیون ترکمنی در طول ۹۶ ساعت**

| غلظت (گرم بر لیتر) | تعداد ماهیان تلف شده | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | زمان (ساعت) | | | | | | | |
| | ۱ | ۲ | ۴ | ۸ | ۲۴ | ۴۸ | ۷۲ | ۹۶ |
| ۶ | ۲۱ | ۹ | | | | | | |
| ۴ | ۱ | ۲۴ | ۵ | | | | | |
| ۲ | ۰ | ۴ | ۲۴ | ۲ | | | | |
| ۱ | ۰ | ۰ | ۰ | ۲۵ | ۵ | | | |
| ۰/۱ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۳ | ۳ | ۴ | ۳ |
| ۰/۰۱ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۱ | ۴ | ۲ |
| ۰/۰۰۱ | ۰ | ۰ | ۰ | ۱ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| کنترل | ۰ | ۰ | ۰ | ۱ | ۰ | ۱ | ۰ | ۰ |

**جدول۲: مقدار عددی LC۵۰-۹۶ برای ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ ساعت در معرض‌گذاری با شیرابه گیاه فرفیون ترکمنی برای ماهی آفانیوس گورخری.**

| مقدار عددی LC۵۰-۹۶ (گرم بر لیتر) | مدت زمان تماس با گیاه (ساعت) |
|---|---|
| ۰/۲۸±۰/۱۴ | ۲۴ |
| ۰/۱۹±۰/۰۶۵ | ۴۸ |
| ۰/۱۴±۰/۰۳۴ | ۷۲ |
| ۰/۱۱±۰/۰۲۲ | ۹۶ |

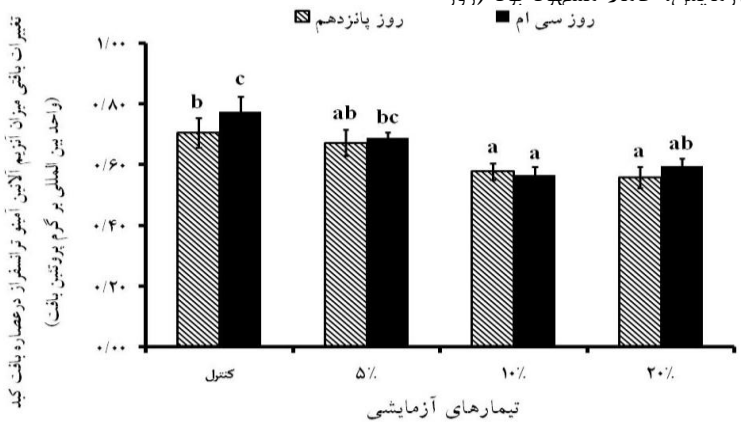
در مرحله بررسی تاثیر سمیت زیر کشنده، تغییر در سطح فاکتورهای بیوشیمیایی عصاره بافت کبد ماهی‌های تحت تیمار با شیرابه گیاه فرفیون ترکمنی و گروه شاهد (نمودار ۱ تا ۵) ارایه گردید. در این مرحله، هیچ گونه مرگ و میری در ماهی‌های تحت آزمایش مشاهده و ثبت نشد، اما ماهی‌ها در طول دوره‌ی آزمایش دچار سستی و رخوت شدند. تغییر الگوی رفتاری، افزایش مقدار موکوس جلدی، شنای نامتعادل در سطح آب، افزایش وازنش سرپوش آبششی و همچنین تغییر الگوی رنگ بدن ماهی‌ها، به خصوص در مراحل پایانی آزمایش، از مهمترین تغییرات ظاهری مشاهده شده در ماهی‌های تحت تیمار سم گیاه فرفیون ترکمنی بود. افزایش معنی‌دار سطح آنزیم آسپارتات آمینو ترانسفراز در طول دوره آزمایش در عصاره بافت کبد ماهی‌های تحت تیمار ۲۰ درصدی غلظت کشنده (LC۵۰-۹۶) مشاهده گردید (روز پانزدهم: $p<۰/۰۵$، df=۳، F=۸/۱۱۵؛ روز سی ام: $p<۰/۰۵$، df=۳، F=۱۸/۵۶۲) ( نمودار ۱).




(درصد از غلظت کشنده LC۵۰-۹۶ شیرابه گیاه *Euphorbia turcomanica*)

**نمودار ۱: تغییرات میزان آنزیم آسپارتات آمینو ترانسفراز در عصاره بافت کبد ماهی‌های تحت تیمار با غلظت‌های مختلف شیرابه گیاه فرفیون ترکمنی. حروف انگلیسی متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشند (روز پانزدهم: $p<۰/۰۵$، df=۳، F=۸/۱۱۵؛ روز سی ام: $p<۰/۰۵$، df=۳، F=۱۸/۵۶۲).**

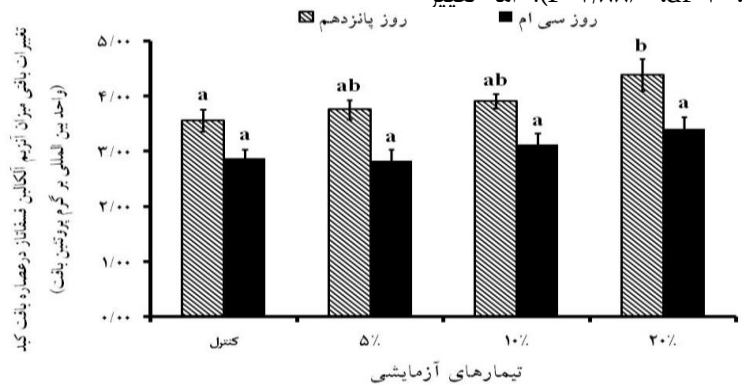
کاهش معنی دار سطح آنزیم آلانین آمینو ترانسفراز در عصاره بافت کبد ماهی های تحت تیمار با غلظت های ۱۰ و ۲۰ درصدی شیرابه گیاه فرفیون ترکمنی در مقایسه با گروه شاهد، در طول دوره آزمایش، کاملاً مشهود بود (روز پانزدهم: $p<۰/۰۵$، df=۳، F=۳/۳۲۰؛ روز سی ام: $p<۰/۰۵$، df=۳، F=۸/۸۵۷) (نمودار۲).




(درصد از غلظت کشنده ۹۶-LC۵۰ شیرابه گیاه *Euphorbia turcomanica*)

**نمودار ۲: تغییرات میزان آنزیم آلانین آمینو ترانسفراز در عصاره بافت کبد ماهی‌های تحت تیمار با غلظت‌های مختلف شیرابه گیاه فرفیون ترکمنی. حروف انگلیسی متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشند (روز پانزدهم: $p<۰/۰۵$، df=۳، F=۳/۳۲۰؛ روز سی ام: $p<۰/۰۵$، df=۳، F=۸/۸۵۷).**

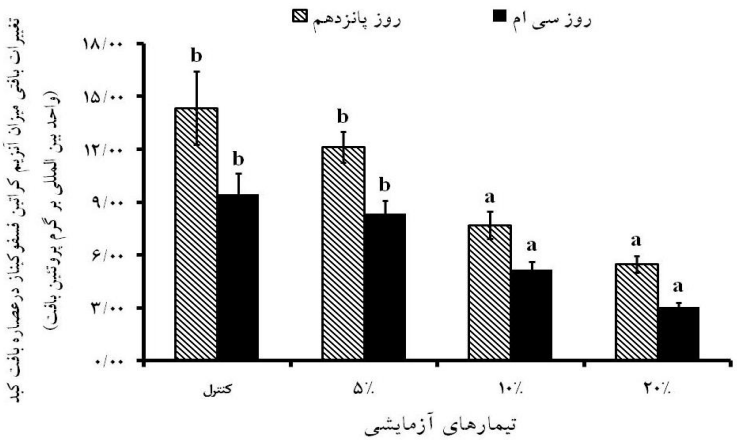
اگرچه پس از ۱۵ روز سطح آنزیم آلکالین فسفاتاز در عصاره بافت کبد ماهی های در معرض با غلظت ۲۰ درصدی شیرابه گیاه فرفیون ترکمنی به طور معنی داری افزایش یافت ($p<۰/۰۵$، df=۳، F=۲/۸۸۶)؛ اما تغییر معنی داری در سطح این آنزیم در بین ماهی های تحت تیمار و گروه شاهد پس از ۳۰ روز مشاهده نگردید (P>۰/۰۵، df=۳، F=۱/۷۷۵) (نمودار۳).




(درصد از غلظت کشنده ۹۶-LC۵۰ شیرابه گیاه *Euphorbia turcomanica*)

**نمودار ۳: تغییرات میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز در عصاره بافت کبد ماهی‌های تحت تیمار با غلظت‌های مختلف شیرابه گیاه فرفیون ترکمنی. حروف انگلیسی متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشند (روز پانزدهم: P<۰/۰۵، df=۳، F=۲/۸۸۶؛ روز سی ام: P>۰/۰۵، df=۳، F=۱/۷۷۵).**

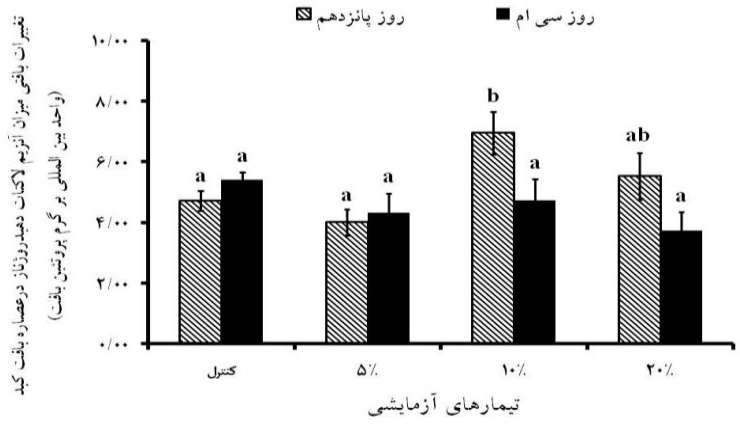
کاهش معنی دار سطح آنزیم کراتین فسفوکیناز در عصاره بافت کبد ماهی های تحت تیمار با غلظت های ۱۰ و ۲۰ درصدی غلظت کشنده (LC۵۰-۹۶) گیاه فرفیون ترکمنی در طول دوره آزمایش مشاهده شد (روز پانزدهم: $p<۰/۰۵$، df=۳، F=۱۱/۱۴۶؛ روز سی ام: $p<۰/۰۵$، df=۳، F=۱۵/۴۱۱) (نمودار۴).




(درصد از غلظت کشنده ۹۶-LC۵۰ شیرابه گیاه *Euphorbia turcomanica*)

**نمودار ۴: تغییرات میزان انزیم کراتین فسفوکیناز در عصاره بافت کبد ماهی‌های تحت تیمار با غلظت‌های مختلف شیرابه گیاه فرفیون ترکمنی. حروف انگلیسی متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشند (روز پانزدهم: $p<۰/۰۵$، df=۳، F=۱۱/۱۴۶؛ روز سی ام: $p<۰/۰۵$، df=۳، F=۱۵/۴۱۱).**

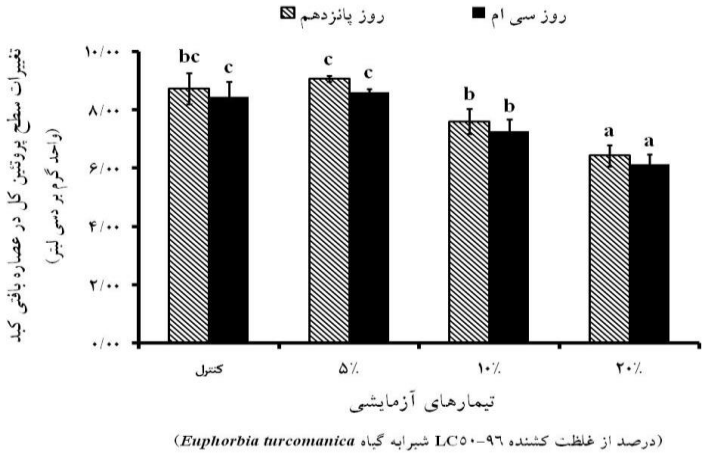
افزایش معنی دار سطح آنزیم لاکتات دهیدروژناز پس از ۱۵ روز در عصاره بافت کبد ماهی های تحت تیمار با غلظت ۱۰ درصدی از شیرابه فرفیون ترکمنی مشاهده گردید ($p<۰/۰۵$، df=۳، F=۴/۶۲۰)، اما تغییر معنی داری در سطح این آنزیم پس از ۳۰ روز، بین تیمارها مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$، df=۳، F=۱/۵۲۳) (نمودار ۵).




(درصد از غلظت کشنده ۹۶-LC۵۰ شیرابه گیاه *Euphorbia turcomanica*)

**نمودار ۵: تغییرات میزان آنزیم لاکتات دهیدروژناز در عصاره بافت کبد ماهی‌های تحت تیمار با غلظت‌های مختلف شیرابه گیاه فرفیون ترکمنی. حروف انگلیسی متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشند (روز پانزدهم: $p<۰/۰۵$، df=۳، F=۴/۶۲۰؛ روز سی ام: $p>۰/۰۵$، df=۳، F=۱/۵۲۳).**

کاهش معنی داری درسطح پروتئین کل در عصاره بافت کبد ماهی های تحت تیمار با غلظت ۲۰ درصدی از غلظت کشنده (LC۵۰-۹۶) شیرابه گیاه فرفیون ترکمنی درطول دوره آزمایش و نیز در ماهی های تحت تیمار با غلظت ۱۰ درصدی پس از ۳۰ روز کاملاً مشهود است (روز پانزدهم: P<۰/۰۵، df=۳، F=۹/۴۰۴؛ روز سی ام: P<۰/۰۵، df=۳، F=۹/۷۳۱) (نمودار ۶).




**نمودار ۶: تغییرات میزان پروتئین کل در عصاره بافت کبد ماهی‌های تحت تیمار با غلظت‌های مختلف شیرابه گیاه فرفیون ترکمنی. حروف انگلیسی متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشند (روز پانزدهم: P<۰/۰۵، df=۳، F=۹/۴۰۴؛ روز سی ام: P<۰/۰۵، df=۳، F=۹/۷۳۱).**

## بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که شیرابه گیاه فرفیون ترکمنی به شدت برای ماهی آفانیوس گورخری سمی بوده و با افزایش غلظت، مدت زمان رخداد تلفات به طور معنی دار کاهش می یابد. مقدار غلظت کشنده سموم برای ماهی ها بسیار متغیر است و به سن، وزن، جنسیت، نوع گونه، خصوصیات ژنتیکی، شرایط اقلیمی محیط، ترکیبات فرمولاسیون سم، ویژگی های فیزیکی و شیمیایی محیط زیست بستگی دارد (بنایی و همکاران، ۱۳۹۱). مقدار LC۵۰-۹۶ ساعت، شیره افوربیا تروکالی، *E. tirucalli*، برای تیلاپیای انگشت قد برابر با ۱/۲۰ میلی گرم بر لیتر بدست آمد (Akpa *et al.*, 2009)، در حالی که مقدار LC۵۰-۹۶ ساعت، گیاه *E. kamerunica* بر روی ماهی تیلاپیای انگشت قد، بسیار بالاتر و حدود ۰/۰۲۳ گرم بر لیتر گزارش گردید (Fai & Fagade, 2005).

مقدار LC۵۰ محاسبه شده پس از گذشت ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت برای عصاره آبی شیره افوربیا تروکالی بر روی ماهی *Heteropneustes fossilis* به ترتیب ۳/۴۵۰، ۲/۵۱۶، ۱/۶۲۳ و ۱/۳۱۵ میکرولیتر برلیتر (Kumar *et al.*, 2010) و همچنین مقدار LC۵۰-۲۴ ساعت پودر خشک افوربیا تروکالی برای ماهی Colisa *fasciatus* ۸/۱۴ میلی گرم بر لیتر و برای ماهی *Channa punctatus* ۹/۰۱ میلی گرم بر لیتر بدست آمد (Tiwari & Singh, 2003). مقدار ۹۶-LC۵۰ ساعت برای عصاره دانه گیاه *Moringa oleifera* بر روی ماهی کپور معمولی، ۱۲۴ میلی گرم بر لیتر گزارش شد (Kavitha *et al.*, 2012). مقدار۹۶-LC۵۰ ساعت برای عصاره آبی و اتانولی *biglobosa*

*Parkia* برای ماهی *Clarias gariepinus* به ترتیب ۲/۸ و۲/۴ میلی‌گرم بر لیتر بود (Fafioye *et al.*, 2004) و مقدار LC۵۰-۹۶ ساعت عصاره اتانولی و آبی *vinifera Raphia* برای ماهی *C. gariepinus* به ترتیب ۳/۴ و۳/۲ میلی‌گرم بر لیتر گزارش گردید (Fafioye *et al.*, 2004). نتایج حاصل از غلظت کشنده گیاه فرفیون ترکمنی در مقایسه با دیگر جنس‌های خانواده افوربیا نشان می‌دهد که فرفیون ترکمنی نسبت به دیگر جنس‌های این خانواده سمیت کمتری دارد. تفاوت در مقدار LC۵۰ بین گیاهان مختلف مورد آزمایش، ممکن است به دلیل تفاوت و یا میزان حضور ترکیبات شیمیایی سمی در بخش‌های مختلف گیاه از جمله برگ، ساقه، گل و یا سایر قسمت‌های گیاه باشد. همچنین این تفاوت در سمیت می‌تواند به حساسیت ماهی استفاده شده برای آزمایش نیز وابسته باشد (Kavitha *et al.*, 2012).

در بررسی اثر غلظت‌های زیر کشنده شیرابه گیاه فرفیون ترکمنی، مرگ ومیری در ماهی‌ها مشاهده نشد. بروز تغییرات رفتاری به وضوح در ماهی‌های تحت تیمار با شیرابه فرفیون ترکمنی، به خصوص در بالاترین غلظت مورد آزمایش (۰/۰۲۲ گرم بر لیتر) مشاهده گردید. همچنین تماس این ماهی با غلظت‌های زیر کشنده شیرابه گیاه فرفیون ترکمنی باعث تغییر معنی‌دار در سطوح آنزیم‌های مختلف کبدی و نیز میزان پروتئین کل عصاره بافت کبد می‌شود. اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی به طور عمده در تشخیص وضعیت فیزیولوژی ماهی و تعیین حالت عمومی سلامتی ماهی استفاده می‌شود. تغییرات بیوشیمیایی بافت‌های مختلف بدن، بازگوکننده تغییرات در متابولیسم و فرآیندهای بیوشیمیایی موجودات زنده است که در بروز آنها، عوامل بسیار مختلفی از جمله تماس ماهی با ترکیبات سمی گیاهان می‌تواند موثر باشد. سطح آنزیم‌ها در ماهی شاخص خوبی از استرس شدید است و اطلاعاتی از اختلال عملکرد اندام‌ها را ارائه می‌دهد (Wells *et al.*, 1986). سموم باعث اختلال در حالت فیزیولوژیکی ماهیان می‌شوند و روی سطح آنزیم‌ها تاثیر می‌گذارند و موجب تخریب اندامک‌های سلولی می‌شوند، که ممکن است افزایش یا مهار در تولید آنزیم‌ها را باعث شوند. سطح آنزیم‌های بافت، به میزان آزاد شدن این آنزیم‌ها از سلول‌های آسیب دیده، که به نوبه خود به میزان آسیبی که در حد آسیب‌های سلولی اتفاق افتاده است، وابسته می‌باشد (بنایی و همکاران، ۱۳۹۱). آنزیم LDH در سیتوپلاسم تمام سلول‌های بدن ماهی‌ها بویژه در بافت عضله اسکلتی، قلب، کبد و کلیه یافت می‌شود و در اثر بروز هرگونه آسیب به غشای سلولی، آزاد شده و سطح آن در خون افزایش می‌یابد. در شرایطی که ماهی‌ها در معرض یک عامل استرس‌زا قرار می‌گیرند، روند کاتابولیسم گلیکوژن و تغییر گلوکز به سمت تشکیل لاکتات در عضلات پیش می‌رود و این امر می‌تواند افزایش سطح این آنزیم را در پی داشته باشد (Velíšek *et al.*, 2006). افزایش معنی‌دار سطح آنزیم LDH در بافت کبد ماهی‌های تحت تیمار ۱۰ درصدی غلظت کشنده شیرابه گیاه فرفیون ترکمنی، بعد از گذشت ۱۵ روز به خوبی گویای بروز چنین وضعیتی است. آسیب‌های پاتولوژیکی وارده به کبد ناشی از سمیت و بروز شرایط هیپوکسی در خون، ممکن است مانع از فسفوریلاسیون اکسیداتیو در میتوکندری گردد که در نتیجه باعث کاهش سطح تولید آدنوزین تری فسفات می‌گردد. در نتیجه، مهار فسفوریلاسیون اکسیداتیو در پی تماس با سموم، سبب مرگ سلولی می‌شود. در چنین شرایطی دیگر اکسیداسیون دوباره نیکوتین آمید آدنین دی نوکلوئید با اکسیژن از طریق زنجیره تنفسی میسر نیست. بنابراین پیروات بوسیله‌ی نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید و طی واکنش بیوشیمیایی که بوسیله‌ی آنزیم LDH کاتالیز می‌شود، به لاکتات احیا می‌گردد. بدین ترتیب، از طریق اکسیداسیون مجدد این ترکیب (نیکوتین آمید آدنین نوکلئوتید) بوسیله‌ی لاکتات، فرایند گلیکولیز در نبود اکسیژن ادامه می‌یابد (Banaee, 2010). تغییر معنی‌دار در سطح آنزیم LDH در بافت‌های ماهیچه‌ای و کبد

ماهی *C. fasciatus* که در معرض عصاره گیاه *Nerium indicum* قرار داشته نیز مشاهده شده است (Tiwari & Singh, 2009). افزایش معنی‌دار در سطح آنزیم LDH در بافت کبد ماهی *Poecilia sphenops* که در معرض سم توفوردی قرار گرفته شده، مشاهده گردید (بنایی و همکاران، ۱۳۹۲).

آنزیم ALP در تمامی بافت‌های ماهی‌ها یافت می‌شود (Agrahari & Gopal, 2009). این آنزیم همچنین در اپی‌تلیوم مجاری صفراوی، سلول‌های کبدی و نیز در مخاط روده و کلیه‌ها نیز وجود دارد. لذا سطح این آنزیم در زمانی که انسداد مجاری صفراوی داخل و خارج کبدی، سیروزی و اختلالات کبدی رخ می دهد، به شدت افزایش می‌یابد (Banaee *et al.*, 2008). همچنین نکروز بافت کبد موجب آزاد شدن این آنزیم از سلول‌های آسیب‌دیده و در نتیجه افزایش سطح این آنزیم در خون و بافت کبد می‌گردد (El-Sayed & Saad, 2008; Saha & Kaviraj, 2009). از طرفی ممکن است سیستم فیزیولوژیک بدن در پاسخ به وجود مواد و ترکیبات سمی و به منظور غلبه کردن بر اثرات مضر و سمی این گیاه، سطح این آنزیم را در بافت کبد افزایش دهد تا از طریق واکنش‌های زیستی اثرات کشنده و مخرب این ترکیبات را خنثی کرده و در مقابل تاثیرات آن، پایداری ماهی را باعث گردد. آنزیم ALP موجود در کبد نقش مهمی در متابولیسم گلیکوژن ایفا می‌کند و می‌تواند آنزیم‌های فسفوریلاز را غیر فعال نماید و سنتز گلیکوژن را در کبد تحریک نماید. تحریک و افزایش تولید این آنزیم در کبد با تجزیه گلیکوژن جهت تامین انرژی مورد نیاز تحت شرایط استرس‌زا در ارتباط بوده و همچنین سبب کاهش نرخ فسفوریلاسیون شده و از فسفوریلاسیون اکسیداتیو در زنجیره تنفسی جلوگیری می‌نماید (Saha & Kaviraj, 2009). افزایش معنی‌دار سطح آنزیم ALP در ماهی *C. punctatus* در شرایط قرار گرفتن در معرض عصاره *M. oleifera* و افوربیا تروکالی مشاهده شد (Tiwari & Singh, 2003; 2006). در تحقیقی دیگر، افزایش در سطح آنزیم ALP در *C. gariepinus* در معرض قرار گرفته شده با عصاره آبی برگ‌های *L. alopecuroides* گزارش شد (Gabriel *et al.*, 2009) و همچنین افزایش معنی‌داری در سطح آنزیم ALP در ماهی کپور معمولی در معرض قرار گرفته شده با عصاره دانه *M. oleifera* مشاهده گردید (Kavitha *et al.*, 2012). در مطالعه حاضر، افزایش معنی‌دار در سطح آنزیم ALP در کبد ماهی‌های تحت بیشترین غلظت زیر کشنده پس از ۱۵ روز مشاهده شد. بر اساس نتایج بدست آمده، احتمالاً دلیل این افزایش سطح آنزیم، آسیب‌های وارده به کبد و نیز انسداد مجاری صفراوی در ماهی‌های تحت تیمار با شیرابه گیاه فرفیون ترکمنی می‌تواند باشد.

آنزیم CK، آنزیمی است که در ماهیچه‌های اسکلتی (Grzyb & Skorkowski, 2005)، قلب (Haagensen *et al.*, 2008) ، آبشش (Gong *et al.*, 2004)، مغز (Dickmeis *et al.*, 2001) و دیگر بافت‌های ماهی‌ها یافت می‌شود، که نقش مهمی در فسفوریلاسیون کراتین و سنتز کراتین فسفات بر عهده دارد. کراتین فسفات نیز نقش بسزایی در سنتز مجدد مولکول پرانرژی آدنوزین تری فسفات از آدنوزین دی فسفات دارد (Murray *et al.*, 2003). افزایش سطح آنزیم CK در بافت ماهیانی که در معرض ترکیبات سمی قرار می گیرند، به دلیل آسیب‌های وارده به غشاهای زیستی سلول‌ها و آزاد شدن این آنزیم می‌تواند باشد (Ozawa *et al.*, 1999). روند کاهشی سطح این آنزیم در بافت‌های بدن نیز نشان دهنده آسیب به سلول‌های تولید کننده این آنزیم و اختلال در روند سنتز این آنزیم در سلول‌ها می‌باشد. کاهش معنی‌دار سطح آنزیم CK در بافت کبد در ماهی‌های تحت تیمار ۱۰ و ۲۰ درصد غلظت کشنده در طول دوره آزمایش مشاهده شد در حالی‌که افزایش معنی‌داری در سطح آنزیم CK در ماهی کپور معمولی در معرض قرار گرفته شده با غلظت‌های حاد سم بی‌فنترین مشاهده گردید (Velišek *et al.*, 2009) و همچنین افزایش معنی‌دار سطح آنزیم CK در کبد ماهی

قزل آلای رنگین کمان، *Oncorhynchus mykiss*، در تماس با غلظت‌های زیرکشنده دیازینون مشاهده شد (بنایی و همکاران، ۱۳۹۱) که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر مغایرت داشت.

آنزیم‌های AST و ALT در بافت‌های مختلفی نظیر کبد (Srivastava *et al.*, 2004) ، قلب، ماهیچه‌های اسکلتی (Petrovic *et al.*, 1996)، کلیه، پانکراس، طحال، گلبول قرمز و آبشش (Bhattacharya *et al.*, 2008) ماهی‌ها یافت می‌شود. قسمت عمده این آنزیم‌ها در داخل سلول‌های کبدی و در میتوکندری هپاتوسیت ها قرار دارند. بنابراین هرگونه آسیب خفیف، التهاب یا نکروز سلول‌های کبد موجب آزاد شدن این آنزیم ها و افزایش سطح آن در پلاسما می‌گردد. علاوه بر بروز اختلالات کبدی، وقوع آسیب‌های شدید و بروز اختلالات در عضلات اسکلتی، نارسایی و اختلالات قلبی نیز منجر به افزایش سطح این آنزیم در پلاسما می‌گردد (Banaee *et al.*, 2008). این آنزیم‌ها نقش مهمی در مراحل نهایی تجزیه پروتئین جهت تولید آدنوزین تری فسفات ایفا می کنند (Petrovic *et al.*, 1996). به عبارت دیگر، افزایش سطح این آنزیم‌ها، نقش موثری در استفاده از اسیدهای آمینه در فرآیند اکسیداسیون یا گلیکوژنز بازی می‌کند (Rao, 2006). افزایش معنی‌دار سطح آنزیم AST در بافت کبد ماهی‌های تحت تیمار با ۱۰ و ۲۰ درصد غلظت کشنده در طول دوره آزمایش پس از ۱۵ روز مشاهده شد.

سطح آنزیم ALT در بافت کبد ماهی‌های تحت تیمار ۱۰ و۲۰ درصد غلظت کشنده در طول دوره آزمایش پس از ۳۰ روز کاهش یافت. اختلال در هموستازی سلول‌های کبدی ماهی به دلیل سمیت شیرابه گیاه فرفیون ترکمنی ممکن است نیاز به انرژی سلولی را افزایش داده باشد؛ لذا افزایش سطح آنزیم AST ممکن است نشان دهنده افزایش اکسیداسیون اسیدهای آمینه جهت تامین انرژی و تولید مولکول‌های آدنوزین تری فسفات مورد نیاز سلول‌ها برای حفظ هموستازی باشد. آسیب‌های هیستوپاتولوژیکی به بافت‌های مختلف، به ویژه بافت کبد نیز ممکن است سبب افزایش سطح این آنزیم در فضای بین سلولی و بافتی گردد. در حالی که ادامه این روند ممکن است سبب کاهش سطح این آنزیم‌ها در بافت های مختلف از جمله کبد گردد، که این امر ممکن است بیانگر آسیب وارده به سلول‌ها و یا اختلال در روند سنتز این آنزیم‌ها در سلول‌ها باشد. چنین حالتی در وضعیت آنزیم ALT دیده می شود، در حالیکه روند افزایشی در طی مدت آزمایش در سطح آنزیم AST دیده شد. افزایش در میزان آنزیم AST و همچنین آنزیم ALT در اندام‌های مختلف ماهی *C. gariepinus* هیبرید شده که در معرض عصاره آبی برگ‌های *Lepidagathis alopecuroides* قرار گرفته بود، گزارش شده است. این افزایش همچنین ممکن است به خاطر اختلال در چرخه کربس باشد (Gabriel *et al.*, 2009). افزایش سطح این آنزیم‌ها در ماهی کپور معمولی که در معرض عصاره دانه *M. oleifera* (Kavitha *et al.*, 2012) قرار داده شده بود نیز گزارش شد. همچنین وضعیتی مشابه در ماهی *C. punctatus* آب شیرین که در تماس با افوربیا تروکالی (Tiwari & Singh, 2006) بود، گزارش شد.

نتایج بیانگر کاهش میزان پروتئین بافت کبد در ماهی-های تحت تیمار با شیرابه گیاه فرفیون ترکمنی است. این کاهش ممکن است مربوط به افزایش فعالیت آنزیم‌های ترانس‌آمیناز به ویژه آنزیم AST باشد. افزایش فعالیت این آنزیم‌ها ممکن است نرخ تجزیه پروتئین ها برای تامین انرژی و بازسازی بافت‌های آسیب دیده را افزایش دهند. تجزیه پروتئین بافت‌های مختلف بدن ماهی تحت شرایط استرس‌زا ممکن است مهمترین دلیل کاهش پروتئین بافت کبد باشد. از سویی دیگر، سوء تغذیه ماهی‌ها در چنین شرایطی نیز در کاهش پروتئین ذخیره شده در بافت‌ها مؤثر است (Banaee *et al.*, 2014). کاهش پروتئین کل در ماهیان مختلفی شامل *Oreochromis mossambicus*، *O. niloticus*، *Cyrinus carpio*، *Alburnus mossulensis* و *Oncorhynchus mykiss* و نیز سخت پوست *Astacus leptodactylus*

، در معرض اندوسولفان (Banaee & Ahmadi, 2011; Kumar *et al*., 2011)، مالاتیون (Patil & David, 2008)، فن‌پروپاترین (Banaee *et al*., 2014)، دیازینون (Banaee *et al*., 2011)، لیندان (Saravanan *et al*., 2011) و سی‌پرمترین (Korkmaz *et al*., 2009) نیز گزارش شده است.

غلظت LC۵۰-۹۶ شیرابه گیاه فرفیون ترکمنی با نام علمی *Euphorbia turcomanica* برای ماهی آفانیوس گورخری (*Aphanius dispar*) میانگین (± خطای استاندارد) ۰/۰۲۲±۰/۱۱ گرم بر لیتر به دست آمد. براساس تغییرات سطوح برخی از آنزیم‌ها و میزان پروتئین کل در بافت کبد ماهی آفانیوس گورخری می‌توان اذعان داشت که سم گیاهی فرفیون ترکمنی می‌تواند علاوه بر ایجاد اختلال در واکنش‌های بیوشیمیایی، موجب بروز آسیب‌های بافت‌شناسی نیز گردد. تغییر سطح این آنزیم‌ها، می‌تواند به عنوان شاخص کلینیکی در تشخیص و تایید غیرمستقیم آسیب وارده به بافت‌های مختلف بدن به ویژه در پی مسمومیت با سم‌های گیاهی مورد استفاده قرار گیرد.

## منابع


**بنایی م.، میرواقفی ع.، سوردا گومیل آ.، رفیعی غ. و احمدی ک.، ۱۳۹۱.** مطالعه تغییرات فاکتورهای بیوشیمیایی خون و آسیب‌شناسی بافتی کبد ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در تماس با غلظت‌های زیرکشنده دیازینون. نشریه محیط زیست طبیعی، مجله منابع طبیعی ایران، ۳۱۳-۲۹۷، (۳)۶۵.

**بنایی م.، کیهانی ا. و احمدی، ک.، ۱۳۹۲.** تاثیر ۲،۴-دی کلروفنوکسی استیک اسید (۲،۴-D) بر برخی پارامترهای بیوشیمیایی و آسیب‌شناسی بافتی در آبشش و کبد ماهی مولی (*Poecilia sphenops*). مجله بهره‌برداری و پرورش آبزیان، ۱۰۵-۸۳، (۳)۲.

**Adedapo, A.A., Abatan, M.O. and Olorunsogo, O.O., 2004.** Toxic effects of some plants in the genus *Euphorbia* on haematological and biochemical parameters of rats. Veterinarski Arhiv, 74, 53-62.

**Agrahari, S. and Gopal, K., 2009**. Fluctuations of certain biochemical constituents and markers enzymes as a consequence of monocrotophos toxicity in the edible freshwater fish, *Channa punctatus*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 94, 5-9.

**Akpa, L., Ajima, M., Nwani, C. and Onu, C., 2009**. Toxic effect of *Euphorbia tirucalli* (Pencil tree) sap on *Tilapia zillii* fingerlings. Environment Conservation Journal, 10, 87-92.

**Aydın, R. and Köprücü, K., 2005**. Acute toxicity of diazinon on the common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos and larvae. Pesticide Biochemistry and Physiology, 82, 220-225.

**Banaee, M., 2010**. Influence of silymarin in decline of sub-lethal diazinon-induced oxidative stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Ph.D. Thesis, Aquaculture and Environmental Department, Natural Resource Faculty, Natural Resource and Agriculture Collage, Tehran University, Iran.

**Banaee, M. and Ahmadi, K., 2011.** Sub-lethal toxicity impacts of endosulfan on

some biochemical parameters of the freshwater crayfish (*Astacus leptodactylus*). Research Journal of Environmental Sciences, 5, 827-835.

**Banaee, M., Mirvagefei, A., Rafei, G. and Majazi Amiri, B., 2008**. Effect of sub-lethal diazinon concentrations on blood plasma biochemistry. International Journal of Environmental Research, 2, 189-198.

**Banaee, M., Sureda, A., Mirvaghefi, A. and Ahmadi, K., 2011.** Effects of diazinon on biochemical parameters of blood in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Pesticide Biochemistry and Physiology, 99, 1-6.

**Banaee, M., Sureda, A., Zohiery, F., Hagi, B.N. and Garanzini, D.S., 2014.** Alterations in biochemical parameters of the freshwater fish, *Alburnus mossulensis*, exposed to sub-lethal concentrations of Fenpropathrin. International Journal of Aquatic Biology, 2, 58-68.

**Bhattacharya, H., Xiao, Q. and Lun, L., 2008**. Toxicity studies of nonylphenol on rosy barb (*Puntius conchonious*): A biochemical and histopathological evaluation. Tissue and Cell, 40, 243-249.

**Coad, B.W., 1998.** Threatened fishes of the world: *Lebias ginaonis* (Holly, 1929) (Cyprinodontidae). Environmental Biology of Fishes, 51: 284-284.

**Coad, B.W. and Abdoli, A., 2000.** Systematics of an isolated population of tooth-carp from northern Iran (Actinopterygii: Cyprinodontidae). Zoology in the Middle East, 21, 87-102.

**Dagang, W., Sorg, B., Adolf, W., Seip, E. and Hecker, E., 1992**. Oligo- and macrocyclic diterpenes in thymelaeaceae and euphorbiaceae occurring and utilized in Yunnan (Southwest China). 2. Ingenane type diterpene esters from Euphorbia nematocypha Hand.-Mazz. Phytotherapy Research, 6, 237-240.

**Dickmeis, T., Rastegar, S., Aanstad, P., Clark, M., Fischer, N., Plessy, C., Rosa, F., Korzh, V. and Strähle, U., 2001**. Expression of brain subtype *creatine kinase* in the zebrafish embryo. Mechanisms of development, 109, 409-412.

**El-Sayed, Y.S. and Saad, T.T., 2008**. Subacute Intoxication of a Deltamethrin-Based Preparation (Butox® 5% EC) in Monosex Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* L. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 102, 293-299.

**Fafioye, O., Adebisi, A. and Fagade, S., 2004**. Toxicity of *Parkia biglobosa* and *Raphia vinifera* extracts on *Clarias*

*gariepinus* juveniles. African Journal of Biotechnology, 3, 627-630.

**Fai, P. and Fagade, S., 2005**. Acute toxicity of *Euphorbia kamerunica* on *Oreochromis niloticus*. Ecotoxicology and environmental safety, 62: 128-131.

**Gabriel, U., Obomanu, F. and Edori, O., 2009**. Haematology, plasma enzymes and organ indices of *Clarias gariepinus* after intramuscular injection with aqueous leaves extracts of *Lepidagathis alopecuroides*. African Journal of Biochemistry Research, 3, 312-316.

**Gong, H.-Y., Wu, J.-L., Huang, W.-T., Ji-Fan Lin, C. and Weng, C.-F., 2004**. Response to acute changes in salinity of two different muscle type creatine kinase isoforms, from euryhaline teleost (*Oreochromis mossambicus*) gills. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1675, 184-191.

**Grzyb, K. and Skorkowski, E.F., 2005**. Characterization of creatine kinase isoforms in herring (*Clupea harengus*) skeletal muscle. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 140, 629-634.

**Gundidza, M., Sorg, B. and Hecker, E., 1993**. A skin irritant principle from *Euphorbia matabelensis* Pax. Journal of Ethnopharmacology, 39, 209-212.

**Haagensen, L., Jensen, D.H. and Gesser, H., 2008**. Dependence of myosin-ATPase on structure bound creatine kinase in cardiac myfibrils from rainbow trout and freshwater turtle. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 150, 404-409.

**Hrbek, T., Keivany, Y. and Coad, B.W., 2006.** New species of *Aphanius* (Teleostei, Cyprinodontidae) from Isfahan Province of Iran and a reanalysis of other Iranian species. Copeia, 2006, 244-255.

**Kavitha, C., Ramesh, M., Kumaran, S.S. and Lakshmi, S.A., 2012**. Toxicity of *Moringa oleifera* seed extract on some hematological and biochemical profiles in a freshwater fish, *Cyprinus carpio*. Experimental and Toxicologic Pathology, 64, 681-687.

**Korkmaz, N., Cengiz, E., Unlu, E., Uysal, E. and Yanar, M., 2009.** Cypermethrin-induced histopathological and biochemical changes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), and the protective and recuperative effect of ascorbic acid. Environmental Toxicology and Pharmacology, 28, 198-205.

**Kumar, A., Prasad, M., Mishra, D., Srivastav, S.K. and Srivastav, A.K., 2010**. Toxicity of aqueous extract of *Euphorbia tirucalli* latex on catfish,

*Heteropneustes fossilis*. Ecotoxicology and environmental safety, 73, 1671-1673.

**Kumar, N., Antony Jesu Prabhu, P., Pal, A., Remya, S., Aklakur, M., Rana, R., Gupta, S., Raman, R. and Jadhao, S., 2011.** Anti-oxidative and immuno-hematological status of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) during acute toxicity test of endosulfan. Pesticide Biochemistry and Physiology, 99, 45-52.

**Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A. and Rodwell, V., 2003**. Harper's Illustrated Biochemistry, Twenty-Sixth Edition. Lange Medical Books/McGraw-Hill (Medical Publishing Division), New York. 420P.

**Mwine, T.J., Van Damme, P., Hastilestari, B.R. and Papenbrock, J., 2013**. Euphorbia tirucalli L.(Euphorbiacaea): the miracle tree: current status of knowledge. African natural plant products, volume II: discoveries and challenges in chemistry, health, and nutrition, 1127, 4-17.

**Ozawa, E., Hagiwara, Y. and Yoshida, M., 1999**. Creatine kinase, cell membrane and Duchenne muscular dystrophy, Muscle Physiology and Biochemistry. Springer US, pp. 143-151.

**Patil V.K. and David M., 2008.** Behaviour and respiratory dysfunction as an index of malathion toxicity in the freshwater fish, *Labeo rohita* (Hamilton). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 8, 233-237.

**Petrovic, S., Ozretiç, B. and Krajnovic-Ozretic, M., 1996**. Cytosolic aspartate aminotransferase from the grey mullet (*Mugil auratus* Risso) red muscle: Isolation and properties. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 28, 873-881.

**Rajeh, M.A.B., Kwan, Y.P., Zakaria, Z., Latha, L.Y., Jothy, S.L. and Sasidharan, S., 2012.** Acute toxicity impacts of Euphorbia hirta L extract on behavior, organs body weight index and histopathology of organs of the mice and *Artemia salina*. Pharmacognosy research, 4,170.

**Rao, J.V., 2006**. Toxic effects of novel organophosphorus insecticide (RPR-V) on certain biochemical parameters of euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 86: 78-84.

**Reichenbacher, B., Kamrani, E., Esmaeili, H.R. and Teimori, A., 2009.** The endangered cyprinodont *Aphanius ginaonis* (Holly, 1929) from southern Iran is a valid species: evidence from otolith morphology.

Environmental Biology of Fishes, 86, 507-521.

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

**Saravanan, M., Prabhu Kumar, K. and Ramesh, M., 2011.** Haematological and biochemical responses of freshwater teleost fish *Cyprinus carpio* (Actinopterygii: Cypriniformes) during acute and chronic sublethal exposure to lindane. Pesticide Biochemistry and Physiology, 100, 206-211.

**Shanmugam, S., Sathish Kumar, T. and Panneer Selvqam, K., 2010**. Laboratory Handbook on Biochemistry. Asoke K. Ghosh, PHI Learning Private Limited, M-97New Delhi-110001. 141 P.

**Singh, S.K., Yadav, R.P., Singh, D. and Singh, A., 2004**. Toxic effect of two common Euphorbiales latices on the freshwater snail *Lymnaea acuminata*. Environmental Toxicology and Pharmacology, 15, 87-93.

**Srivastava, A.S., Oohara, I., Suzuki, T., Shenouda, S., Singh, S.N., Chauhan, D.P. and Carrier, E., 2004**. Purification and properties of cytosolic alanine aminotransferase from the liver of two freshwater fish, *Clarias batrachus* and *Labeo rohita*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 137, 197-207.

**Tiwari, S. and Singh, A., 2003**. Control of common freshwater predatory fish, *Channa punctatus*, through *Nerium indicum* leaf extracts. Chemosphere, 53, 865-875.

**Tiwari, S. and Singh, A., 2004**. Piscicidal and anti-acetylcholinesterase activity of *Euphorbia royleana* stem bark extracts against freshwater common predatory fish *Channa punctatus*. Environmental Toxicology and Pharmacology, 18, 47-53.

**Tiwari, S. and Singh, A., 2006**. Biochemical stress response in freshwater fish *Channa punctatus* induced by aqueous extracts of *Euphorbia tirucalli* plant. Chemosphere, 64, 36-42.

**Tiwari, S. and Singh, A., 2009**. Changes in some biochemical parameters in the liver and muscle of *Colisa fasciatus* due to toxicity of ethanolic extract of *Nerium indicum* Mill.(*Lal Kaner*) latex. Natural Product Radiance, 8, 48-54.

**Velišek, J., Svobodova, Z. and Machova, J., 2009**. Effects of bifenthrin on some haematological, biochemical and histopathological parameters of common carp (*Cyprinus carpio* L.).

Fish Physiology and Biochemistry, 35, 583-590.

**Velíšek, J., Dobšíková, R., Svobodova, Z., Modra, H. and Luskova, V., 2006**. Effect of deltamethrin on the biochemical profile of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 76: 992-998.

**Vutukuru, S.S., Prabhath, N.A., Raghavender, M. and Yerramilli, A., 2007**. Effect of arsenic and chromium on the serum amino-transferases activity in Indian major carp, *Labeo rohita*. International journal of environmental research and public health, 4, 224-227.

**Wells, R., McIntyre, R., Morgan, A. and Davie, P., 1986**. Physiological stress responses in big gamefish after capture: observations on plasma chemistry and blood factors. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 84, 565-571.

# Effects of sub-lethal concentrations of *Euphorbia turcomanica* extract on some liver biochemical parameters of Zebra Aphanius (*Aphanius dispar*)

Zare H.[(1)]; Noori A.[(2)*]; Yousefzadi M.[(3)] ; Banaee M.[(4)]

* noori@hormozgan.ac.ir

1,2- Department of Aquaculture, Faculty of Marine Science and Technology, Hormozgan University, Iran

3- Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, Hormozgan University, Iran

4- Department of Aquaculture, Faculty of Natural Resource, Behbahan Khatam Al-anbia University of Technology, Iran

**Key words**: *Aphanius dispar*, *Euphorbia turcomanica*, Sub-lethal concentration, Hepatic enzymes

## Abstract

In the present study, effects of sub-lethal concentrations of *Euphorbia turcomanica* extract with ranging from 0.00, 0.0055 (5% of LC50), 0.011 (10% of LC50) and 0.022 (20% of LC50) g/lit were investigated over 30 days on biochemical parameters of Zebra Aphanius (*Aphanius dispar*). The average (±SE) 24, 48, 72 and 96 LC50 rates of *E. turcomanica* on fish were 0.28±0.14, 0.19±0.06, 0.14±0.03 and 0.11±0.02 g/lit, respectively. The biochemical parameters including aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), lactate dehydrogenase (LDH), creatine phosphokinase (CK), and alkaline phosphatase (ALP) activities in the liver tissue were measured after 15 and 30 days. Significant changes in AST, ALT, ALP, LDH and CK activities were observed in fish exposed to different concentrations of *E. turcomanica* extract when compared with control group. The significant increase was determined in AST, LDH and ALP while in ALT and CK, significant decrease was revealed. Also in liver total protein, a significant descending trend related to exposure time was demonstrated. In conclusion, the findings from this study provide basic information about toxicity of *E. turcomanica* extract on Zabra Aphanius, as well as developing guidelines for evaluating the effects of administration of *E. turcomanica* derivatives in water.

*Corresponding author