Archive of SID

القای آنزیم سیتوکروم P4501A1 با بتانفتوفلاون و بررسی برخی از خصوصیات آن در فیل ماهی (*Huso huso*)

کتایون کریم‌زاده [۱]؛ علی مصطفائی [۲]؛ عباس اسماعیلی ساری [۳]؛
محمد پورکاظمی [۴] و عسکر زحمتکش [۵]
karimzadehkathy@yahoo.com

۱و۵- مرکز آموزش عالی علمی- کاربردیِ علوم و صنایع شیلاتی میرزا کوچک خان، رشت
صندوق پستی: ۳۸۳۶-۴۱۶۳۵
۲- مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه
۳ - دانشکده منابع طبیعی وعلوم دریایی نور، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
صندوق پستی: ۳۵۶-۴۶۴۱۴
۴- انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری، رشت صندوق پستی: ۳۴۶۳-۴۱۶۳۵
تاریخ ورود: فروردین ۱۳۸۳ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۸۴

چکیده

سیتوکروم P4501A1 مهمترین ایزوآنزیم سیستم مونواکسیژنازی در ماهی است که توسط ترکیبات آروماتیک چند حلقه‌ای القا می‌شود. در پژوهش حاضر تاثیر ماده بتانفتوفلاون در القای این ایزوآنزیم در فیل ماهی بررسی گردید و برخی از خواص کینیتیکی این ایزوآنزیم مورد مطالعه قرار گرفت. ماده بتانفتوفلاون به صورت داخل صفاقی به ماهیان تزریق گردید. میزان فعالیت آنزیم سیتوکروم P4501A1 از روی واکنش دی اتیلاسیون سوبسترای ۷- اتوکسی رزروفین (EROD) با روش فلورومتری و میزان نسبی پروتئین‌های القا شده با روش الکتروفورز در ژل پلی‌اکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) تعیین گردید. نتایج نشان داد که نرخ واکنش در فراکسیون میکروزومی ماهیان تیمار شده ۱۵ تا ۲۶ برابر ماهیان شاهد در شرایط مشابه آزمایش است. اپتیمم فعالیت این آنزیم در دامنه دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتیگراد قرار می‌گیرد و فعالیت آنزیم در غلظت ۱/۵۳ میکرومولار از سوبسترا و غلظت ۱۸۰ میکروگرم پروتئین میکروزومی به حداکثر می‌رسد. الگوی SDS-PAGE فراکسیون میکروزومی در ماهیان تیمار شده حضور پروتئینی را با وزن مولکولی حدود ۱±۵۸ کیلودالتون نشان می‌دهد که همان آنزیم سیتوکروم P4501A1 می‌باشد. بنابراین اثر القایی بتانفتوفلاون موجب القای ژن سیتوکروم P4501A1 و افزایش بیوسنتز این آنزیم می‌گردد که بصورت افزایش در نرخ فعالیت آنزیم در واکنش EROD نمایانگر می‌شود.

لغات کلیدی: آنزیم سیتوکروم، P4501A1، بتانفتوفلاون، فیل ماهی، *Huso huso*

www.SID.ir

www.SID.ir

مقدمه

با پیشرفت و گسترش صنعت و تکنولوژی، اکوسیستم‌های آبی بطور فزاینده‌ای در معرض ترکیبات شیمیائی مختلفی مانند دی‌فنیل‌های چند کلره (PCBs)، هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (PAHs)، دی‌اکسین‌ها و ترکیبات الکیلتین (Alkyltin) قرار گرفته‌اند. این ترکیبات در سلامت انسان و آبزیان اثرات جبران‌ناپذیری دارند (Addison, 1996 ; Sen & Arinc, 1998). هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای از آلاینده‌های آلی هستند که از پالایشگاه‌های نفت، صنایع تولید انرژی و حمل و نقل دریائی وارد اکوسیستم‌های آبی می‌شوند. ۳ - متیل کلانترن (3MC) و بتانفتوفلاون (BNF) از هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای هستند که اثرات سرطان‌زایی و جهش‌زایی آنها شناخته شده است. این ترکیبات قادرند آنزیم سیتوکروم P4501A1 را که مهمترین ایزوآنزیم سیستم سیتوکروم P450 است، در ماهیان همانند پستانداران القا نمایند (Payen *et al.*, ; Sarasquete & Senger, 2001 ; James *et al.*, 1979 ; 1987).

سیتوکروم P450 متعلق به خانواده بزرگی از آنزیم‌های اکسیژناز چند عملکردی می‌باشد که مرحله اول تغییر شکل بیوترانسفورماسیون زنوبیوتیک‌ها را بعهده دارند (Nebert & Gonzalez , 1987 ; Ioannids & Parks, 1990).

تحقیقات انجام گرفته طی ۲۰ سال گذشته، القای سیستم سیتوکروم P450 در ماهیان را نشان می‌دهد. نتایج بدست آمده، در ارزیابی منطقه مواجه شده با آلودگی و اثرات حاصله از آن اهمیت دارد و نقش مهمی در مدیریت محیط‌های زیست دریایی ایفا می‌کند. بنابراین اندازه‌گیری اکسیژنازهای چند عملکردی می‌تواند بعنوان ابزاری مهم در نظارت پیوسته آلودگی‌های شیمیایی بکار رود (Siroska & Drastichova,2004). القاپذیری این سیستم در پاسخ به تیمار با ترکیبات PAHs و PCBs در گونه‌های مختلفی از ماهیها نظیر *Gadus morhua* , *Sparus aurata* و *Rutilus rutilus* گزارش شده است (Arinc & Sen, 1993, 1994 ; Goksoyr, 1985 ; Monod *et al.*, 1987).

ماهیان خاویاری از گونه‌های حساس و با ارزش از لحاظ اقتصادی بشمار می‌روندکه ذخایر طبیعی آنها امروزه در معرض خطر جدی با آلاینده‌های شیمیایی قرار گرفته است (Kajiwara *et al.*, 2003)، لذا بررسی مکانیسم‌های متابولیسم سموم در این ماهیان از جایگاه خاصی برخوردار است.

اگر چه اندازه‌گیری مقادیر آلاینده‌ها با روشهای آنالیز دستگاهی از حساسیت زیادی برخوردارند اما به دلیل پر هزینه بودن این قبیل آنالیزها از یکطرف و در اختیار قرار نداشتن اطلاعات کافی پیرامون تاثیرات بالقوه آلاینده‌ها بر موجودات آبزی از طرف دیگر، اخیراً استفاده از سنجشهای زیستی متداول گردیده است. در این میان بیومارکرها از مهمترین ابزار شناخته شده در سنجشهای زیستی محسوب می‌شوند که کاربرد وسیعی نیز پیدا نموده‌اند. بنابراین در این پژوهش نرخ تاثیرماده بتانفتوفلاون بر فعالیت آنزیم سیتوکروم P4501A1 (بعنوان بیومارکر) فیل ماهی دریای خزر مورد مطالعه قرار گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش کار

۲۰ عدد فیل ماهی (*Huso huso*) در محدوده وزنی ۵۰۰ تا ۸۰۰ گرم و سن حدود دو سال از مجتمع تکثیر و پرورش شهید بهشتی سد سنگر واقع در استان گیلان در پائیز سال ۱۳۸۱ تأمین گردید.

کلیه آزمایشهای شیمیایی به جز تیمار ماهیان در مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه انجام شد. مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکتهای مرک، سیگما، فارماسیا و بیوسنس تهیه گردیدند.

۲۰ عدد ماهی به ۴ گروه ۵ تایی (یک گروه شاهد و سه گروه آزمون) تقسیم گردیدند و در ونیرو نگه‌داری شدند. بتانفتوفلاون (سیگما) در غلظت ۳۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در روغن ذرت آماده شد. به ازای هر کیلوگرم وزن ماهی، ۳۵ میلی‌گرم از این ماده بصورت درون صفاقی تزریق گردید. به ۳ گروه آزمون بترتیب ۳۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن ماهی طی یک روز، ۷۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن ماهی طی دو روز و ۱۰۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن ماهی طی سه روز از بتانفتوفلاون در روغن ذرت تزریق شد. گروه شاهد نیز همان حجم روغن ذرت را دریافت نمودند (Stegeman *et al.*, 1979). تیمار ماهیان در محل مجتمع تکثیر وپرورش شهید بهشتی انجام گرفت. پس از ۴۸ ساعت از آخرین تزریق، کبد ماهیان خارج گردید و توسط ازت مایع به آزمایشگاه منتقل و در همان دما تا زمان آزمایش نگهداری شد. بافت منجمد شده در بافر فسفات‌سدیم ۰/۱ مولار با pH برابر ۷/۴ حاوی کلریدپتاسیم ۱/۵ درصد (حجمی/ وزنی)، فنیل متیل سولفونیل فلوراید (PMSF) و آمینوکاپروئیک اسید ۰/۲۵ میلی‌مولار (سیگما) به کمک هاون در دمای صفر تا ۴ درجه سانتی‌گراد هموژن و یکنواخت گردید (Stegeman *et al.*, 1979). عصاره حاصله ۲۰ دقیقه در ۱۱۰۰۰xg در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد .مایع رویی جدا و ۲ ساعت در ۵۵۰۰۰xg در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل از این مرحله مجدداً در بافر فسفات به تعلیق درآمد و در همان شرایط رسوب داده شد. رسوب در حجم کمی از بافر به تعلیق درآمد. میزان فعالیت آنزیم سیتوکروم P4501A1 از روی واکنش دی‌اتیلاسیون سوبسترای ۷- اتوکسی رزروفین طبق روش بورک و مایر (Burke & Mayer, 1974) با کمی تغییرات تعیین گردید. محلول واکنش در حجم نهایی ۲ میلی‌لیتر از بافر تریس ۰/۱ مولار با pH برابر ۷/۸ حاوی ۷- اتوکسی رزروفین ۷۶/ میکرومولار، NADPH ۰/۲۴ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر فراکسیون میکروزومی (با غلظت پروتئین مشابه در گروههای آزمون و شاهد) بود. در این آزمون، از رزروفین ۰/۰۱ میلی‌مولار بعنوان استاندارد داخلی (کالیبراتور) استفاده گردید. میزان فلورسانس نسبی در طول موج برانگیختگی ۵۳۰ نانومتر و نشر ۵۸۶ نانومتر توسط دستگاه فلورومتر کانترون (BIO-TEK) اندازه‌گیری و مقادیر فعالیت آنزیم برحسب نانومول در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین میکروزومی محاسبه گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

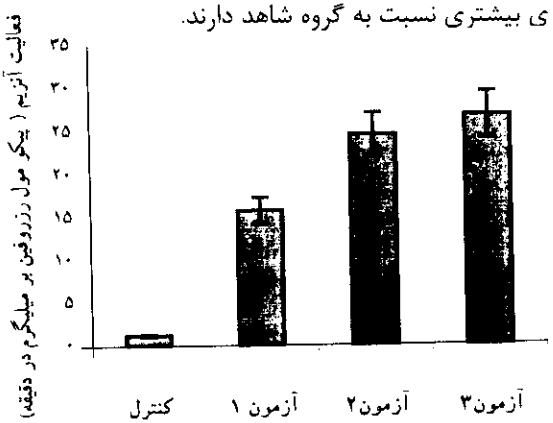
غلظت پروتئین نمونه‌های میکروزومی براساس روش لوری تعیین گردید. در این روش از آلبومین سرم گاوی (BSA :شرکت سیگما) در دامنه غلظت ۲۵ تا ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برای رسم منحنی استاندارد استفاده گردید (Lowry *et al.*, 1951).

الکتروفورز پروتئین براساس روش لاملی در ژل جداکننده ۱۱ درصد و ژل متراکم‌کننده ۴ درصد صورت گرفت (Laemmli, 1970). پس از الکتروفورز پروتئین‌های میکروزومی (با غلظت‌های مشابه در گروههای شاهد و آزمون) ژل با کوماسی آبی R-350 رنگ‌آمیزی گردید. مارکرهای وزنی مورد استفاده شامل مارکرها با وزن مولکولی پایین (فارماسیا) در محدودهٔ وزنی ۱۴ تا ۹۶ کیلودالتون بود.

داده‌ها به کمک نرم‌افزارهای Excel و SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در ابتدا مقایسه کلی میانگین چند تیمار با روش آنالیز واریانس یکطرفه و سپس مقایسه میانگین هر تیمار با میانگین تیمارهای دیگر با استفاده از آزمون چندگانه دانکن صورت پذیرفت. وجود یا عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P<0/05$) تعیین گردید.

نتایج

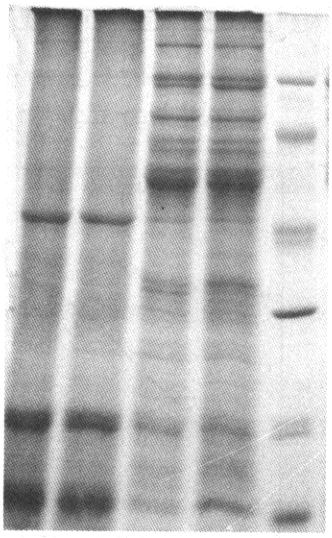
سیتوکروم P4501A1 از اکسیژنازهای چند عملکردی است که توسط انواعی از آلاینده‌های زیست محیطی القا می‌گردد. در این مطالعه تیمار فیل ماهیان دریای خزر با یک غلظت بتانفتوفلاون(۳۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن)، فعالیت این آنزیم را بیش از ۱۵ بار افزایش داد. در ماهیان تیمار شده با دو و سه غلظت متوالی این ترکیب (گروههای ۳ و ۴) میزان افزایش فعالیت آنزیم بترتیب ۲۴ و ۲۶ برابرگروه شاهد بود (نمودار ۱). مقایسه الگوی پروتئینی فراکسیون میکروزومی ماهیان تیمار شده و شاهد با روش SDS-PAGE بیانگر تفاوت‌های قابل توجهی در نوع و مقدار پروتئین‌های فراکسیون میکروزومی بود (شکل ۱). همانطور که در این شکل بوضوح مشخص است، چندین باند پروتئینی در گروه آزمون شدت رنگ‌پذیری بیشتری نسبت به گروه شاهد دارند.



نمودار ۱: تاثیر مقادیر مختلف از ماده بتا نفتوفلاون بر فعالیت آنزیم سیتوکروم P4501A1 درفیل ماهی

www.SID.ir

Archive of SID



M ۱ ۲ ۳ ٤

شکل ۱: SDS-PAGE میکروزومهای کبد فیل ماهی. مارکرهای وزنی با اوزان ١٤، ٢٠، ٣٠، ٤٥، ٦٧، ٩٦ کیلو دالتون (ستون M)، نمونه‌های تیمار شده در طی ۳ بار تزریق (ستون های ۱و۲)، نمونه‌های تیمار شده طی۲ بار تزریق (ستون ۳)، نمونه‌های کنترل (ستون ٤).

نمودار ۲ رابطه میزان دی‌اتیلاسیون سوبسترای ۷- اتوکسی رزروفین (EROD) توسط آنزیم سیتوکروم P4501A1 را نسبت به زمان نشان می‌دهد. افزایش میزان این واکنش تا ۲۰ دقیقه بصورت خطی بود و پس از آن از حالت خط مستقیم خارج گردید.

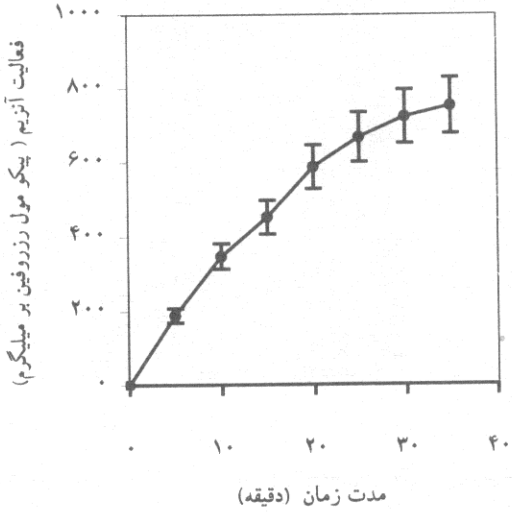
نتایج واکنش دی‌اتیلاسیون سوبسترای ۷- اتوکسی رزروفین توسط آنزیم سیتوکروم P4501A1 کبد فیل ماهی در درجه حرارت‌های مختلف ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد نشان داد (نمودار۳) که میزان فعالیت آنزیم در دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد نسبت به سایر دماها بالاتر است. بررسی‌های آماری انجام شده نیز بین میزان فعالیت آنزیم در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد اختلاف معنی‌داری با سایر دماهای شرایط آزمایش نشان می‌دهد ($P<0/05$). تأثیر غلظتهای مختلف پروتئین میکروزوم کبدی بر میزان فعالیت 7-EROD در نمودار۴ آمده است. این نتایج نشان داد که رابطه فعالیت با میزان پروتئین میکروزومی تا غلظت ۱۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در شرایط واکنش، به صورت خطی می‌باشد و پس از آن از حالت خط مستقیم خارج می‌گردد. با توجه به داده‌های آماری اختلاف معنی‌داری بین رزروفین تولیدی در غلظتهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم مشاهده نگردید.

غلظتهای مختلف سوبسترای ۷- اتوکسی رزروفین بر روی فعالیت 7-EROD آنزیم سیتوکروم P4501A1 میکروزومی در نمودار ۵ آمده است. همانگونه که این نتایج نشان می‌دهد، واکنش

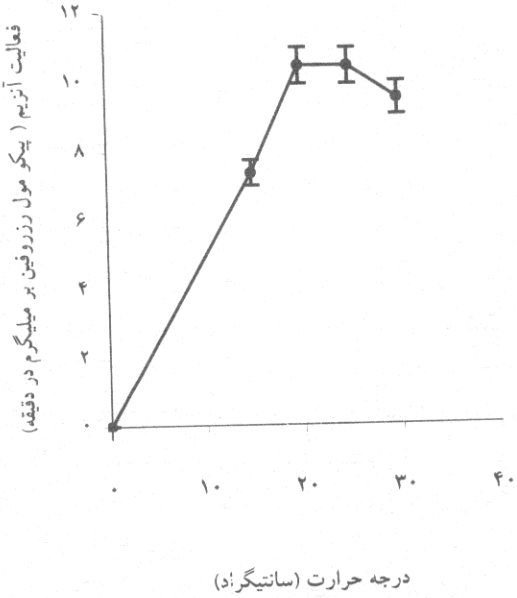
www.SID.ir

Archive of SID

دی‌اتیلاسیون در غلظت ۱/۵۳ میکرو مولار از سوبسترا اشباع می‌شود و فعالیت در غلظتهای بالاتر ۱/۵۳ میکرومولار از سوبسترا به صورت خطی افزایش نیافته و از حالت خط مستقیم خارج می‌گردد که داده‌های آماری نیز مؤید این موضوع می باشند (P<۰/۰۵).



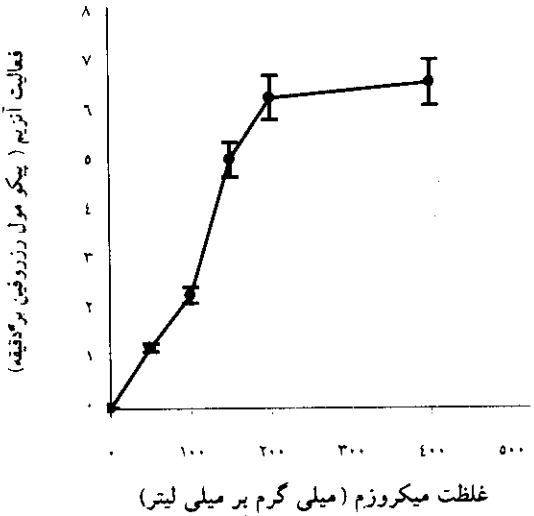
نمودار۲: تاثیر مدت زمان بر فعالیت آنزیم سیتوکروم P4501A1 درفیل ماهی



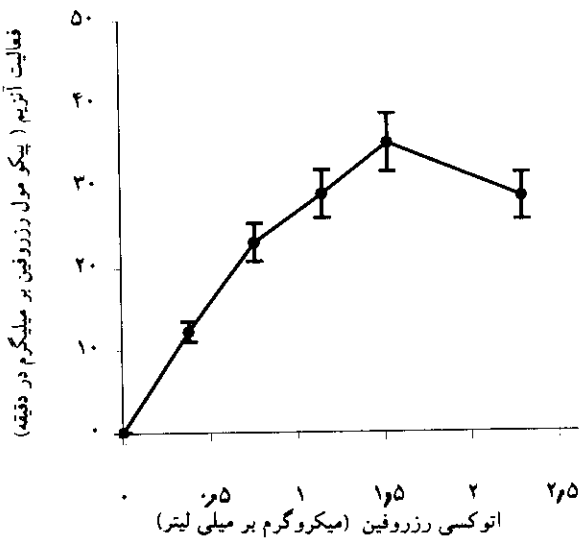
نمودار۳: تاثیر درجه حرارت بر فعالیت آنزیم سیتوکروم P4501A1 درفیل ماهی

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار۴: تاثیر غلظت پروتئین میکروزومی بر فعالیت آنزیم سیتوکروم P4501A1 درفیل ماهی



نمودار۵: تاثیر اتوکسی رزروفین بر فعالیت آنزیم سیتوکروم P4501A1 درفیل ماهی

بحث

ماهـیان خاویاری از نظر اقتصادی گونه‌های با ارزش و مهمی هستند. سیستم سیتوکروم P450 این ماهـیان همانند سایر آبزیان با انواعی از آلاینده‌های زیست محیطی القا می‌شوند. سیتوکروم P4501A1 مهمتریـن ایزوآنـزیم این سیستم در ماهی می‌باشد که انواعی از مشتقات نفتی مانند متیل کلانترن، بتا نفتوفلاون و بنزوآپایرن می توانند آنرا القا نمایند. بدین لحاظ این آنزیم نشانگر زیستی مهمی برای اطلاع از وضعیت محیط آب از نظر حضور این نوع آلاینده‌ها محسوب می‌گردد (Stegeman *et al*., 1988 ;

www.SID.ir

Archive of SID

(Goksoyr & Forlin, 1992 ; Siroska & Drastichova, 2004).

در پژوهش حاضر القای آنزیم سیتوکروم P4501A1 فیل ماهی توسط ترکیب بتانفتوفلاون مورد مطالعه قرار گرفته است و فعالیت، میزان نسبی و بعضی خصوصیات کینتیکی آنزیم القا شده با روشهای مربوطه بررسی گردید. نتایج این مطالعه نشان داد که تزریق یک غلظت بتا نفتوفلاون به ماهی فعالیت دی‌اتیلاسیون سوبسترای ۷ - اتوکسی رزروفین (7-EROD) را بیش از ۱۵ بار و تزریق دو یا سه غلظت این فعالیت را ۲۴ و ۲۶ بار افزایش می‌دهد. تحقیقات انجام شده بر روی سایر ماهیان، القاپذیری فعالیت آنزیم را نشان می‌دهد. چنانچه Stegeman و همکاران (1997). درکفشک ماهی تیمار شده (گونه *Platichthys flesus*) با ماده بتانفتو فلاون با غلظتهای ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، افزایشی حدود ۲۵ تا ۵۵ بار در فعالیت EROD در ماهیان منطقه برمودا مشاهده نمودند. فاکتور القاپذیری فعالیت دی‌اتیلاسیون سوبسترای ۷ - اتوکسی رزروفین برای مواد القا کننده ۳ - متیل کلانترن در ماهی کپور *Cyprinus carpio* و بنزوآپایرن درگونه *Sparus aurata* بترتیب با مقادیر ۲۵ و۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن برابر با ۱۰/۳ و ۵ بار گزارش شده است (Marionnet *et al* ., Arinc & Sen, 1994 ; 1997).

سیتوکروم P4501A1 فیل ماهی پروتئینی با وزن۱±۵۸ کیلودالتون می باشد که مقدار این پروتئین درفراکسیون میکروزومی کبد گروههای آزمون بارها بیش از مقدار آن در گروه شاهد بود که در الگویSDS-PAGE در شکل۱ مشاهده می‌شود. در مطالعات انجام گرفته بر روی سایرگونه‌های ماهیان القای این آنزیم محدوده وزنی مشابه‌ای را تایید می‌کند. برای مثال، القای پروتئینی با وزن حدود ۵۸ کیلو دالتون بترتیب در ماهیان اسکاپ (scup) گونه *Stenetomus crysops* و قزل‌آلای رنگین کمان (Rainbow trout) با بتا نفتوفلاون و در ماهی (gilthead seabream) با بنزوآپایرن گزارش شده است. نتایج سنجش EROD در گروههای آزمون با الگوی SDS-PAGE آنها در این مطالعه نشان می‌دهد که افزایش فعالیت سیتوکروم P4501A1 در ماهیان القا شده ناشی از افزایش بیان ژن و بیوسنتز این ایزوآنزیم است، در ضمن نتایج SDS-PAGE فراکسیون میکروزومی ماهیان القا شده حاکی از افزایش بیوسنتز مقدار پروتئین سیتوکروم P4501A1 سلولهای کبدی می‌باشد (Arinc & Sen, 1994 ; Klotz *et al*., 1987 ; Tate, 1988 ; Williams & Buhler, 1983).

بررسی برخی جنبه‌های کینتیکی آنزیم سیتوکروم P4501A1 فراکسیون میکروزومی کبد فیل ماهی در این مطالعه نشان داد که میزان فعالیت آنزیم در محدوده دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد نسبت به سایر دماها بالاتر است. در ضمن، فعالیت آنزیم در شرایط ذکر شده در غلظت ۱/۵۳ میکرومولار سوبسترای ۷ - اتوکسی رزروفین و غلظت ۱۸۰ میکروگرم پروتئین میکروزومی به حداکثر خود رسیده و از سوبسترا اشباع می‌گردد. مقادیر بالاتر از۱/۵۳ میکرومولار از سوبسترا تاثیری در افزایش نرخ فعالیت واکنش EROD نمی‌گذارد. Arinc & Sen (1993,1994) در مطالعه بر روی گونه *Sparus aurata* مقدار ۱/۵۱ میکرومولار از سوبسترا را جهت انجام واکنش EROD پیشنهاد کردند.

www.SID.ir

Archive of SID

نرخ فعالیت آنزیم در غلظتهای بالاتر از ۱/۵۳میکرو مولار از سوبسترا کاهش می‌یابد. این موضوع حاکی از اثر مهاری سوبسترای اتوکسی رزروفین بر فعالیت آنزیم است که در سایر مطالعات نیز گزارش شده است (Burke *et al*., 1977,1985). در این مطالعه که ظاهراً اولین مطالعه در زمینه القای سیتوکروم P4501A1 فیل ماهی و بررسی برخی جنبه‌های کنیتیکی این ایزوآنزیم است، تیمار ماهیان با ماده بتانفتو فلاون منجر به القاپذیری این آنزیم شد. بنابراین از درجه القاپذیزی آنزیم سیتوکروم P4501A1 که در نرخ فعالیت واکنش EROD بخوبی منعکس گردید، می‌توان بعنوان یک بیومارکر جهت سنجش اثرات ترکیبات چند حلقه‌ای و دی‌فنیل‌های چند کلره استفاده نمود.

منابع

Addison, R. F. , 1996. The use of biological effects monitoring in studies of marine pollution. Environ. Rev. Vol.4, pp.225-237.

Arinc , E. and Sen , A. , 1993. Characterization of cytochrome P450 dependent mixed-function oxidase system of gilt head seabream (*Sparus aurata,* Sparidae) liver. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 104B, pp.133-139.

Arinc, E. and Sen, A. , 1994. Effects of in vivo benzo(a) pyrene treatment on liver microsomal. mixed function oxidase activities of gilthead seabream (*Sparus aurata*).Comp. Biochem. Physiol.Vol. 107C, pp.405-414.

Burke, M.D. and Mayer, R.T. , 1974. Ethoxyresorufin: Direct flurrimetric assay of a microsomal O-dealkyation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. Drug Metabolisim and Disposition. Vol.2, No. 6, pp.583-588.

Burke, M.D. ; Prough, R.A. and Mayer, R.T. , 1977. Characteristic of a microsomal cytochrome P448 mediated reaction ehoxyresorufin o-deethylation. Drug. Metabolisim and Disposition. Vol.5, No. 1, pp.1-8.

Burke, M.D. ; Thompson, S. ; Elcombe, C. R. ; Halpert, J. ; Haaparanta, T. and Mayer, R.T. , 1985. Ethoxy, penthoxy and benzyloxyphenones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochrome P-450. Biochem. Pharmacol. Vol.34. pp.3337-3345.

Goksoyr, A., and L. Forlin., 1992. The cytochrome P450 system in fish ,aqutic toxicology and environmental monitoring.Aquat.ToxicolVol. 22., pp. 680-685.

www.SID.ir

Archive of SID

Goksoyr, A. , 1985. Purification of hepatic microsomal cytochrome P450 from β-naphtoflavone-treated Atlantic cod (*Gadus morhua*), a marine teleost fish. Bichem. biophys. Acta. Vol. 840, pp.409-417.

Ioannids , C. and Park, D.V. , 1990. The cytochrome P450 gene family of microsomal hemoproteins and role in the metabolic activation of chemicals. Drug Metab. Rev. Vol. 22, pp.1-85.

James, M.O. ; Kahn, M.A. Q. and Bend, J.R. , 1979. Hepatic microsomal mixed-function oxidase activities in several marine species common to coastal Florida. Comp. Bichem. Physiol. Vol. 62C, pp.155-164.

Kajiwara, N. ; Ueno, D. ; Monirith, I. ; Tanabe, S. ; Pourkazemi, M. and Aubrey, D. G. , 2003. Contamination by organochlorine compounds in sturgeons from Caspian sea during 2001-2002. Marine Pollution Bulletein. Vol. 46, pp.741-747.

Koltz, A.V. ; Stegeman J.J. and Walsh, C. ; 1987. An aryl hydrocarbon hydroxylating hepatic cytochrome P450 from the marine fish *Stenotomus chrysops*. Archs. Biochem. Biophys. Vol.226, pp.578-592.

Laemmli, U. K. , 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bactriophage T4. Nature Vol. 22, pp.680-685.

Lowry, O.H. ; Rosebrough, N.J. ; Farr, A.J. and Randall, R.j. , 1951. Protein measurment with the folin phenol reagent. Journal of Biol. Chem.Vol. 193, pp.265-275.

Monod, G. , Devaux, A. and Riviere, J.L. , 1987. Characterization of some monooxygenase activities soluilization of hepatic cytochrome P-450 in two species of freshwater fish, the nase (*Chonrostoma nasus*) and roach (*Rutilus rutilus*).Comp. Biochem. Physiol. Vol. 88C, pp.83-89.

Marionnet, D. ; Taysse, B. and Deschaux, P. , 1997. 3-Methylcholantheren-induced EROD activity in carp (*Cyprinus carpio*).Comp. Biochem. Biophysiol. Vol. 124, No. 2, pp.165-170.

Nebrt, D.W. and Gonzalez, F.J. , 1987. P450 genes: Structure, evolution and regulation. A. Rev. Biochem. Vol. 56, pp.945-993.

www.SID.ir

Archive of SID

Payne, J.F. ; Fancey, A. ; Rahimtula, D. and Porter, E.D. , 1987. Review and perspective on the use of mixed function oxygenase enzyme in biological monitoring. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 86C, pp.233-245.

Sarasquete, C. and Senger, H. , 2001. Cytochrome P4501A in teleostean Fishes. The science of the total environmemt. Vol. 247, pp.313-332.

Sen, A. and Arinc, E. , 1998. Prepration of highly purified cytochrome P4501A1 from leaping mullet (*Liza saliens*) liver microsomes and its biocatalytic, molecular and immunological properties. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 121 (C), pp.249-265.

Sirosoka, Z. and Drastichova, J. , 2004. Biochemical markers of aquatic environment contamination, cytochrome P450 in Fish. Areview. Acta.Vet. Brno.73, pp.123-132.

Stegeman, J.J. ; Binder, R.L. and Orren, A. , 1979. Hepatic and extrahepatic microsomal electron transport components and mixed function oxygenase in the marine fish. *Stenotomus versicolor.* Biochem. Pharmacol.Vol. 28, pp.3431-3439.

Stegeman, J.J. ; Woodin, B.R. and Goksoyr, A. , 1988. Appatent cytochrome P450 induction as an induction of exposure to environmental chemicals in the flounder *Platichthys flesus.* Mar. Ecol. Prog. Ser. Vol. 46, pp.55-60.

Stegeman, J.J. ; Woodin, B.R. ; Singh, H. ; Oleksiak, M.F. and Celander, M. , 1997. Cytochrome P450 (CYP) in tropical fishes: Catalytic Activities, Expreesion of multiple CYP Proteins and high levels microsomal P450 in liver of fishes from Bermoda.Com. Biochem. Physiol. Vol. 116C, pp.61-75.

Tate, L.G. , 1988. Characterization of phase I and phase II drug metabolism and the effect of β-naphthoflavone in the liver and posterior kidney of the cannel catfish, *Ictalurus punctatus.* Arch .environ. Contam. Toxicol.Vol. 17, pp.325-332.

Williams, D.E. and Buhler, D.R. , 1983. Comparative properties of purified cytochrome P-448 from β-naphthoflovone treated rats and rainbow trout. Comp. Biochem. Physiol. Vol.75C, pp.25-32.

www.SID.ir

Induction of Cytochrome P4501A1 by beta-naphtho flavone and determination of enzyme properties in *Huso huso*

Karimzadeh K.[1] ; Mostafaie A.[2] ; Esmaeli A.[3] ; Poorkazemi M.[4] and Zahmatkesh A.[5]

karimzadehkathy@yahoo.com

1,2- Mirza Kochak Khan Higher Education Centre, P.O.Box: 41635-3836 Rasht, Iran

2-Research Center of Medical Biology, Kermanshah University of Medical Science

3- Faculty of Natural Research and Marine science,Tarbiat Modarres University, P.O.Box: 46414-356 Tehran, Iran

4- International Sturgeon Research Institute, P.O.Box: 41635-3463 Rasht, Iran

Received: March 2004 Accepted: May 2005

Keywords: Cytochrome P4501A1, Beta-naphtho flavone, *Huso huso*, Iran

Abstract

Cytochrome P4501A1 is a major isoenzyme in fish monooxygenase system which is induced by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) compounds. In this research, the inducing effect of p-naphtoflavone and its catalytic properties was studied in *Huso huso* liver. Fish were given ip injection of p-naphthoflavone at three different doses. The enzyme activity was measured with de-ethylation of ethoxyresorufin reaction (EROD) by flourometery method and relative amount of induced proteins were determined using polyacrylamid gel electrophoresis (SDS-PAGE).

The results showed that EROD activity in the microsomal fraction of the treated fish was 15-26 folds that of the control group. Optimum activity of this enzyme was observed at 20-25 degrees centigrade. The maximum enzyme activity was seen in the precence of 180 micrograms of microsomal protein and 1.53μM of 7-ethoxyresorufin. SDS-PAGE of microsomal protein pattern in the treated fish revealed a protein with molecular mass 58±1 KDa translating to cytochrome P450IA. We conclude that the p-naphtoflovone in fish liver can induce cytochrome P450IA gene and increase its biosenthysis leading to raised enzyme activity in EROD reaction.

www.SID.ir