ژنتیک نوین
دوره هشتم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۲
صفحه ۱۳۸-۱۳۱

Downloaded from mg.genetics.ir at 14:39 +0430 on Friday June 18th 2021

رد یابی تغییرات بیان ژن ویتلوژنین در کبد تاسماهی ایرانی نابالغ در مواجهه با ماده شبه استروژنی نونیل فنل

Detection of vitellogenin gene expression changes in liver of juvenile Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) exposed with nonylphenol Xenoestrogen compound

شیرین جمشیدی[۱]، محمدرضا کلباسی[*۲]، مجید صادقی‌زاده[۳]، محمدعلی یزدانی‌ساداتی[۴]

۱،۲و۳- دانشجوی دکتری، دانشیار و استاد دانشگاه تربیت مدرس
۴- استادیار مرکز بین‌المللی تحقیقات ماهیان خاویاری گیلان، رشت، ایران

Jamshidi SH[1], Kalbassi MR[*2], Sadeghizadeh M[3], Yazdani Sadati M[4]

1,2,3. PhD Student, Associate Professor and Professor, University of Tarbiat Modares, Iran
4. Assistant Professor of Shahid Dadman International sturgeon fishes institute of Gilan, ,Rasht, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: kalbassi_m @modares.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۱/۴/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۱/۸)

چکیده

مطالعه حاضر با استفاده از تکنیک‌های RT-cPCR و همچنین RT-qPCR، اثرات نونیل فنل برتغییرات بیان ژن ویتلوژنین کبد تاسماهی ایرانی نابالغ را ثابت کرد. برای مطالعه بیان ژن ویتلوژنین و ژن 18s rRNA به عنوان کنترل، کبد تاس ماهیان جوان ایرانی که با ۱۷ بتا استرادیول (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در هفته) و نونیل فنل(با غلظت‌های ۱، ۱۰،۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بر وزن بدن در هفته) در ۳ تکرار متوالی هر هفته یکبار تیمار شده بودند، مورد استفاده قرار گرفت. القا بیان ژن ویتلوژنین نسبت به ژن 18s rRNA در تمامی گروه‌هایی که در معرض قرار گرفته بودند؛ معنی‌دار بوده است. بر این اساس، نسبت ژن ویتلوژنین به ژن 18s rRNA در گروهی که۱۷ بتا استرادیول دریافت کرده بودند؛۲/۴۸± ۹/۹۵ بوده است.آنالیز آماری نشان داد تمامی گروه‌هایی که با نونیل فنل تیمار شده بودند، روی بیان ژن ویتلوژنین تاثیرات معنی دار داشته‌اند. این نتایج اولین گزارش در مورد خطرات تاثیر مواد شبه استروژنی بر روی ماهی خاویاری ایرانی است و کارایی ژن ویتلوژنین به عنوان بیو مارکر زیستی در مواجهه با مواد شبه استروژنی در ماهی مذکور را تایید نمود.

واژه‌های کلیدی

بیان ژن،
تاسماهی ایرانی،
نونیل فنل،
ویتلوژنین،
18S rRNA

Downloaded from mg.genetics.ir at 14:39 +0430 on Friday June 18th 2021

مقدمه

ماهی خاویاری ایرانی جز خانواده ای از ماهیان می‌باشد که سابقه ثبت فسیل‌های آنها به دوران ابتدایی ژوراسیک بر می‌گردد. به خانواده Acipenseridae فسیل زنده هم اطلاق می‌شود (et al. Billard et al. 2000; Bahmani 2001). تاس ماهی ایرانی در دریای خزر و به ویژه در قسمت شمالی آن یافت می‌شود، متاسفانه جمعیت‌های این ماهی امروزه به خاطر عوامل آنتروپولوژیکی چون ساخت سدها، آلودگی آبها و صید بی‌رویه برای گوشت و تولید خاویار، کاهش یافته است (Asadi et al. 2006a; Asadi et al. 2006b). پس حفظ این گونه ارزشمند ویژه منطقه‌ای (Endemic) نیازمند درک عوامل تاثیرگذار طبیعی یا انسانی است که با دید دقیق‌تر به محیط زیست جانور و توسط اندازه‌گیری‌های زیست‌شناسی مولکولی و شیمیایی روی محیط زیست جانور وفیزیولوژی آن قابل رد یابی است. هورمون تولیدمثلی در جنس ماده ۱۷ بتا استرادیول است.استروژن‌های طبیعی برای رشد و توسعه جنسی جانور ماده و رسیدگی آن ضروری و نقش اساسی در عملکرد حیاتی رسیدگی تخمک دارند (Arukwe and Goksoyr 2000). در انسان در معرض قرار گرفتن با استروژن‌های محیطی باعث افزایش سرطان‌های مربوط به اندام های جنسی نظیر سرطان پستان، پروستات، تخمدان، رحم و بیضه شده است (Høyer et al. 1998; Miller and Sharpe 1998). امروزه به استروژن‌های محیطی (زنو استروژن‌ها یا شبه استروژن ها) توجه ویژه‌ای شده است زیرا که می‌توانند نقش هورمون‌های استروژنی طبیعی را بازی کنند و روی عملکرد غدد درون‌ریز در انسان و حیات‌وحش تاثیر بگذارند. خاصیت چربی دوستی و مقاومت در محیط، این مواد و محصولات حاصل از تخریب آنها باعث شده خیلی از آنها در طبیعت جمع شده و بزرگنمایی زیستی داشته باشند. دامنه وسیعی از مواد شمیایی ساخت بشر به محیط‌های آبی آزاد می‌شوند که شامل حشره‌کش‌های ارگانو کلرایدی، بی‌فنیل‌های پلی کلرینه (PCBs)، سورفکتانت‌ها، امولسی فایرها و دیگر مواد شیمیایی مثل فیتواستروژن‌ها و مایکواستروژن‌ها می‌باشند (Lindholst 2003; Langston et al. 2005). آلکیل فنل‌ها بطور وسیعی در بسیاری از صنایع از جمله سورفکتانت‌ها و همچنین در صنایع پلاستیک سازی به عنوان آنتی اکسیدان مصرف می‌شوند. گزارش شده که این مواد از پلاستیک‌ها به درون غذا در زمان فرآیند غذا و بسته‌بندی آن آزاد می‌شوند (Naylor 1992a; Naylor 1992b). نونیل فنل محصول غالب خیلی از این آلکیل فنل هاست که در محیط زیست دریایی یافت می‌شود. این مونومر در خیلی از محصولات شامل دترجنت ها، پلاستیک ها، امولسی فایرها، حشره کش‌ها یافت می‌شوند (et Ahel al. 1994a; Ahel et al. 1994b). تحقیقات نشان داده که وجود نونیل فنل به همراه دیگر تخریب کننده‌های سیستم غدد داخلی در محیط زیست می‌تواند تولید ویتلوژنین و برخی از پدیده‌های دیگر را مثل اختلال رشد لوله‌های اسپرمی (Jobling et al. 1996)، کاهش زنده ماندن اسپرماتوزوآ (Kawana et al. 2003)، گسترش اندام جنسی بینابینی نر- ماده (Gray and Metcalf 1997)، کاهش نسبت جنسی نر (Lindholst et al. 2000) را منجر شود. مقالات بسیاری از سال‌های گذشته وجود دارد که فعالیت استروژنی نونیل فنل را توضیح می دهند (Sonnenschein and Soto 1998; Sumpter 1998; Servos 1999). هم ۱۷ بتا استرادیول و هم ترکیبات زنو استروژن ها به گیرنده های استروژنی چسبیده و منجر به تحریک تولید برخی از پروتئین ها از طریق بیان ژن ها و ترجمه آنها میشوند Arukwe (and Goksoyr 2003). یکی از اثرات ترکیبات شبه استروژنی، تخریب سیستم غدد درون ریز و فرآیند توسعه آن می‌باشد. ویتلوژنین از جمله پروتئین‌هایی است که توسط تاثیر استروژن های تولید شده از لایه‌های فولیکولی تخمک برروی کبد تولید شده و توسط پلاسما حمل شده و در تخمک ذخیره‌سازی می شود. پروتئین زرده نقش تغذیه‌ای برای تخمک را بازی می‌کند (Arukwe 2002). القا ساخت این پروتئین و mRNA ژن آن در خارج از فصل تولید مثلی و همچنین در ماهیان جوان و ماهیان نر نشان دهنده نشانگر زیستی برای مواجه جانور با عوامل شبه استروژنی می باشد. هدف از این مطالعه چگونگی تاثیر یکی از مونومرهای مواد تخریب کننده غدد درون ریز در ماهی خاویاری ایرانی و ردیابی اثرات آن می‌باشد.

Downloaded from mg.genetics.ir at 14:39 +0430 on Friday June 18th 2021

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

در این تحقیق ۶ تیمار متفاوت به شرح زیر بر روی تاس ماهیان جوان ایرانی یکساله در مرکز تکثیر و پرورش شهید دادمان گیلان، انجام شد: ۱- کنترل منفی اول شامل ماهیان تزریق شده با روغن بادام زمینی (به عنوان ماده ناقل روغنی که می‌بایست خاصیت تغذیه‌ای داشته باشد) به میزان دو میلی‌لیتر بر کیلوگرم وزن ماهی در هفته ۲- کنترل منفی دوم شامل ماهیان بدون هیچگونه تزریق ۳- کنترل مثبت شامل ماهیان تزریق شده با ۵ میلی گرم برکیلوگرم هورمون ۱۷ بتا استرادیول ۴- تیمار اصلی اول شامل ماهیان تزریق شده با یک میلی گرم بر کیلو گرم وزن ماهی نونیل فنل (Sigma Aldrich) ۵- تیمار اصلی دوم شامل ماهیان تزریق شده با ده میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن ماهی نونیل فنل ۶- تیمار اصلی سوم شامل ماهیان تزریق شده با صد میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن ماهی نونیل فنل. هر تیمار در تانک‌های مجزای ۵۰۰ لیتری با سه تکرار انجام پذیرفت. مواد مورد استفاده در تیمارهای اصلی در دو میلی‌لیتر روغن بادام زمینی (به ازای کیلوگرم وزن ماهی) محلول ودر زمان‌های موردنظر تزریق شد. تزریق‌ها در روز صفر، هفتم، چهاردهم پس از وزن کردن ماهی انجام شده و ۷۲ ساعت پس از تزریق آخر، بافت کبد به منظور آزمایش‌های مولکولی برداشته شده و در نیتروژن مایع ذخیره‌سازی شد.

استخراج RNA و ساخت cDNA

استخراج RNA کل از حدود صد میلی‌گرم از بافت کبد نمونه های تیمار شده توسط کیت استخراج RNA شرکت (Roche,Germany) انجام شد. بافت پس از یخ‌زدایی داخل هاون هموژن شده و بافر لیز کننده کیت روی آن ریخته شد. بقیه مراحل طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت استخراج RNA انجام پذیرفت. کیفیت RNA کل با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد و مشاهده باندهای ۱۸s و ۲۸s مربوط به RNA ریبوزومی انجام پذیرفت. غلظت نمونه‌های RNA با استفاده از سنجش میزان جذب آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر سنجیده شد. نسبت جذب در طول موجهای ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر نانودراپ (NanoDrop, Thermo Scientific, 1000) برای عدم آلودگی با مواد فنلی و پروتئین، تعیین شد. این کیت حاوی آنزیم DNase بود که برای حذف DNA از محصول استخراج RNA بکار برده شد. ساخت cDNA با استفاده از یک میکرو گرم RNA و با استفاده از آنزیم Reverse transcriptase (Roche, Germany) در حضور آغازگر یونیورسال oligo dt و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

طراحی آغازگرهای مناسب ژن ویتلوژنین و شناسایی اولیه این ژن با استفاده از Conventional PCR (cPCR)

آغازگرهای مورد استفاده برای ژن ویتلوژنین از مناطق مشابه mRNA بیان شده در ماهی خاویاری سفید (*Acipenser transmontano*) با شماره بانک ژنی (U00455)، ماهی *Acanthogobius flaviamanus* با شماره بانک ژنی (AB088473)، ماهی *Pimephales promelas* با شماره بانک ژنی (AF130354)، ماهی کپور معمولی(*Cyprinus carpio*) با شماره بانک ژنی(AF414432)، ماهی گورخری (*Danio reio*) با شماره بانک ژنی(AF406784) با استفاده از برنامه GenRunner طراحی شد و جهت کنترل اختصاصی بودن آغازگرها از برنامه primer-Blast استفاده شد (جدول۱).

شناسایی اولیه ژن *Vtg* با استفاده از PCR معمولی برای این ژن در دستگاه ترموسایکلر Genius در واکنش های ۲۵ ماکرولیتری که شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر 10x PCR، dNTPs (۱۰ میلی‌مولار)، نیم ماکرولیتر از هر کدام از آغازگرها (با غلظت ۲۰ پیکو مول بر ماکرولیتر)، *Taq* DNA پلی‌مراز به مقدار ۰/۱۲۵ میکرولیتر (با غلظت5 unit/µl)، $MgCl_2$ (۵۰ میلی‌مولار) ۰/۷۵ میکرولیتر، ۰/۵ میکرولیتر از cDNA کامل ساخته شده در مرحله قبل و در نهایت رساندن به حجم ۲۵ ماکرولیتر با آب دیونیزه بود. برنامه حرارتی مورد استفاده برای تکثیر این ژن عبارت از: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل حرارتی شامل واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، الحاق در دمایی۶۰ درجه سانتی‌گراد ۱۵ ثانیه برای ژن ویتلوژنین و گسترش (دمای۷۲ درجه سانتی‌گراد) ۳۰ ثانیه، گسترش انتهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد ۵ دقیقه بود. محصولات بدست آمده در واکنش PCR با استفاده از کیت High pure PCR purification کیت شرکت Roche خالص سازی شد تا خالص سازی منجر به حذف آلودگی

Downloaded from mg.genetics.ir at 14:39 +0430 on Friday June 18th 2021

جدول۱- ژن مورد بررسی، آغازگر طراحی شده واندازه قطعه تکثیر شده

ژن مورد بررسی	اسم آغازگر و توالی آن	اندازه قطعه تکثیر شده
Vtg-Real time PCR	VtgRF:5′-GCACCAGCTCACTCCATTCAA-3′ VtgRR:5′-CCTCCAAAACAAGCTTCTGCC-3′	74 bp
18S rRNA (internal control)	18S rRNAF: 5′-CTTTCGAGGCCCTGTAATTG-3′ 18S rRNAR: 5′-ACCGCGGCTGCTGGCACCAG-3′	89 bp

هایی نظیر آغازگرها، بافرها و dNTPs شود. در انتها محصولات واکنش PCR جهت سنجش صحت عملکرد آغازگرها روی ژل ۱/۵ درصد آگارز برده شد.

کلونینگ ژن ویتلوژنین

به منظور تکثیر محصول خالص سازی شده، از کلونیگ قطعه تکثیر شده در باکتری *E.coli*، از کیت کلونینگ (TA cloning vector, Fermentas) و دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. مراحل کلونینگ به طور خلاصه شامل اتصال (Ligation) محصول خالص شده ژن ویتلوژنین به وکتور pTZ57R/T، انتقال قطعه متصل شده به وکتور به باکتری مستعد (competent cell) (مرحله Transformation) و تکثیر باکتری حاوی کلون (غربال گری کلون های آبی وسفید) بروی محیط کشت آگار بود. پس از کشت آگار، یک کشت مجدد مایع به همراه آنتی بیوتیک تهیه و به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شد. سپس با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (Intron Biotechnology,Inc) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده پلاسمید نو ترکیب استخراج شد.

واکنش کمی PCR (RT-qPCR)

برای بررسی میزان بیان ژن های ویتلوژنین و مقایسه آنها از روش کمی Real-time PCR استفاده شد. بدین منظور آغازگرهای طراحی شده بر اساس توالی‌های ژن‌های ویتلوژنین موجودات دیگر، مورد استفاده قرار گرفتند. نمونه‌ها در پلیت‌های ۹۶ خانه ای آماده‌سازی شدند. در این واکنش از روش Syber Green استفاده شد. در هر واکنش مواد ذیل اضافه شد: الگو که شامل cDNA حاصل از یک میکروگرم RNA است که با آنزیم Reverse transcriptase تبدیل به cDNA شده است (۱ µl). این الگو به نسبت یک به ده توسط بافر آنزیم ترانسکریپتاز رقیق شد. آغازگر های مستقیم و معکوس هرکدام با غلظت ۰/۲۵ میکرومولار، مخلوط Premix Ex Syber Green به میزان ۱۰ µl، Rox reference dye به میزان ۰/۵ µl و مابقی آب تزریقی. برای هر سری واکنش دو سری کنترل منفی قرار داده شد: ۱- کنترل منفی اول که شامل تمام موارد بالا به غیر از الگو می باشد. ۲- کنترل منفی دوم که شامل RNA استخراج شده بدون طی مرحله cDNA سازی است و این کنترل به منظور ردیابی احتمالی آلودگی به DNA ژنومی می باشد. واکنش در دستگاه ABI Biosystem 7500 انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری

در آنالیز کمی Real-time PCR بر اساس سیکل های آستانه (Ct) از نمونه‌های مورد آزمایش (تیمارهای در معرض قرار گرفته با نونیل فنل با غلظت‌های متفاوت، تیمار در معرض قرار گرفته با هورمون استروژن، تیمار بدون تزریق) با نمونه های شاهد (کنترل منفی تزریق شده با ناقل) و با استفاده از فرمول ΔΔCt، نسبت ژن هدف به ژن مرجع با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$R=2^{-\Delta\Delta Ct}$$

جهت محاسبات آماری از برنامه SPSS نسخه ۱۸ استفاده شد. چون داده‌ها نرمال نبودند از آزمون غیرپارامتریک Kruskal Wallis استفاده شد. در مرحله بعد برای تشخیص اختلاف بین گروه‌های مورد مطالعه از آزمون Mann-Whitney استفاده شد. نتایج به شکل میانگین± خطای معیار میانگین (SEM) نشان داده شده است. نمودارهای مورد لزوم توسط نرم افزار GraphPad prism 5 ترسیم شد.

Downloaded from mg.genetics.ir at 14:39 +0430 on Friday June 18th 2021

نتایج و بحث

نتایج کیفی و کمی RNA استخراج شده

شکل ۱ نتایج حاصل از استخراج RNA روی بافت کبد در نمونه های تیمار را نشان می دهد. باند های ۲۸S، ۱۸Sو ۵S به خوبی در شکل قابل مشاهده است. نسبت شدت جذب RNA استخراج شده در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر بین ۲/۰۰-۱/۸ بوده است که نشان دهنده کیفیت قابل قبول برای RNA استخراج شده وعدم آلودگی با مواد فنلی و پروتئینی می باشد. همچنین کمیت RNA استخراج شده با جذب ۲۶۰ نانومتر توسط نانودراپ بین ۱۰۵۰- ۳۹۰ نانوگرم بر ماکرولیتر برای کل نمونه‌ها بدست آمد.

نتایج کلونینگ ژن ویتلوژنین

شکل ۲- الف، ۲- ب نتایج حاصل از واکنش RT-cPCR روی ژن‌های18S rRNA و Vtg برای شناسایی این ژن‌ها و همچنین میزان تاثیرگذاری نونیل فنل در بیان این ژن در ماهی خاویاری ایرانی را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود قطعات ۸۹ بازی ژن 18S rRNA در شکل۲- الف به عنوان کنترل داخلی و قطعه ۷۴ بازی ژن ویتلوژنین در شکل۲- ب تکثیر شده است. قطعه ۷۴ بازی کلون شده در وکتور TA که با آغازگرهای یونیورسال مورد خوانش قرار گرفته بودند (شکل۴)؛ در بانک ژنی به نام ژن ویتلوژنین تاسماهی ایرانی ثبت شد. شماره باز یابی JX۲۴۴۸۹۲ مربوط به ژن ویتلوژنین تاسماهی ایرانی می‌باشد.

نتایج بررسی تغییرات بیان ژن *Vtg*

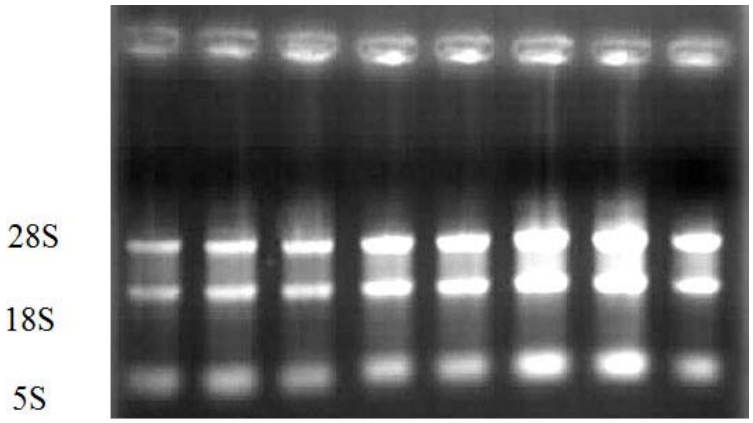
نمودار شکل۳ نشان دهنده تغییرات سطح بیان نسبت به نمونه های کنترل می‌باشد؛ همانطور که از نتایج آنالیز آماری برمی‌آید میزان بیان ژن ویتلوژنین با سطح معنی‌داری (P = ۰/۰۰) در تیمار های ۱۷ بتا استرادیول افزایش نشان داده است. اما سطح بیان این ژن با سطح معنی‌داری (P<۰/۰۵) در تیمار های ۱،۱۰، ۱۰۰ نونیل فنل، افزایش نشان داده است.

تغییرات سطح بیان ژن ویتلوژنین به عنوان بیو مارکر زیستی در ماهی خاویاری ایرانی نشان می‌دهد که میزان بیان در تیمار ۱۷ بتا استرادیول به عنوان کنترل مثبت ۲/۴۸± ۹/۹۵، تیمار۱۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم وزن بدن نونیل فنل در هفته؛ ۳۵ /۰± ۲/۸۵، تیمار ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در هفته نونیل فنل؛ ۰/۳۷±۰/۰۳، تیمار یک میلی‌گرم بر وزن بدن نونیل فنل در هفته ۰/۰۳± ۰/۰۷ بوده است (نتایج بر اساس میانگین ± SEM نشان داد ه شده است).

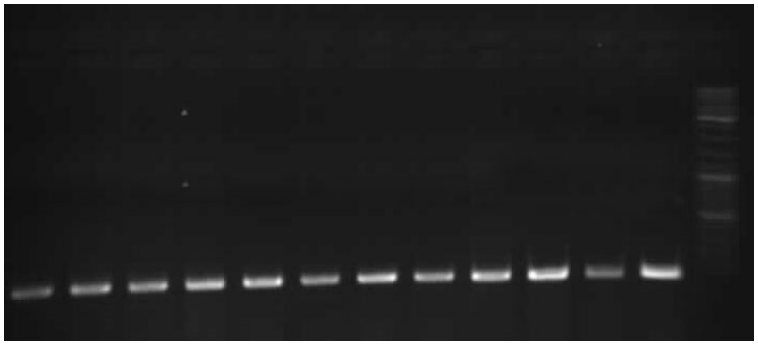
تحقیق حاضر اولین مطالعه روی قابلیت تاثیر پذیری تاسماهی ایرانی در مواجهه با عوامل شبه استروژنی می‌باشد. این مطالعه نشان داد که عوامل مذکور منجر به بروز تغییرات فیزیولوژیک در بدن ماهی می‌شود که با ردیابی ژن *Vtg* و تغییرات بیان آن قابل ردیابی است.

نونیل فنل به عنوان یکی از مونومرهای حاصل از مواد دترجنت، امولسی فایرها، پلاستیک‌ها است که در بسیاری از صنایع شیمیایی و پلاستیکی و کارخانجات سموم کشاورزی و ضایعات و پساب-های خانگی، کشاورزی و صنعتی یافت می‌شود. گزارشات اخیر حاکی از وجود مقادیر قابل توجهی از ترکیبات مذکور در اکوسیستم‌های آبی دریای خزر می‌باشد (Mortazavi et al. 2012) آنجایی که ماهی خاویاری دریای خزر یکی از ماهیان با ارزش شیلاتی برای پرورش جهت استحصال خاویار و هم حفظ ذخایر این ماهی با اهمیت می‌باشد و با ذکر این نکته که این ماهی یکی از ماهیان قرار گرفته در قسمت های بالای زنجیره غذایی می‌باشد لذا توجه به مسئله آلودگی دریا و تاثیر آن روی سیستم تولید مثلی موجودات آبزی و حفظ حیات آنها ضروری می‌باشد. همانطور که پیشتر ذکر شد علاوه بر اهمیت تولید نابهنگام ویتلوژنین در زمان در مواجهه با عوامل شبه استروژنی به عنوان بیومارکر، اثرات زیاد شدن این مواد در مختل کردن رشد لوله های اسپرمی (Jobling et al. 1996)، کاهش زنده ماندن اسپرماتوزوآ (Kawana et al. 2003)، گسترش اندام جنسی بینابینی نر- ماده (Gray and Metcalfe 1997)، کاهش نسبت جنسی نر (Naylor et al. 1992) که در نهایت منجر به کاهش جمعیت های مختلف وانقراض نسل جانور می شود؛ نیزاز اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. این مطالعه نشان داد که ترکیبات شبه استروژنی نونیل فنل منجر به القا نابهنگام بیان ژن ویتلوژنین در کبد ماهیان جوان که هنوز وارد سیکل تولید مثلی نشده اند؛ شده است. مطالعه‌ای در چین روی ماهی خاویاری چینی *Acipenser sienensis* با غلظت‌های متفاوت نونیل فنل نشان داد که این ماهی با تمامی غلظت ها در معرض قرار گرفته تاثیر می‌پذیرد و منجر به بیان نابهنگام ژن ویتلوژنین در ماهی خاویاری چینی

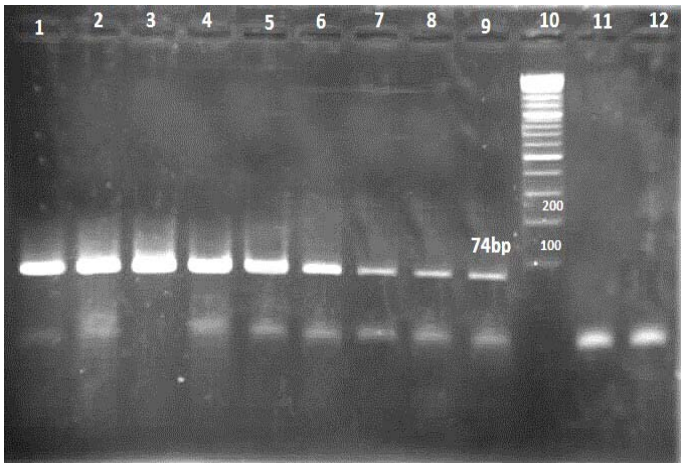
Downloaded from mg.genetics.ir at 14:39 +0430 on Friday June 18th 2021



شکل۱- RNA استخراج شده از بافت کبد ماهیان در معرض قرار گرفته با نونیل فنل.

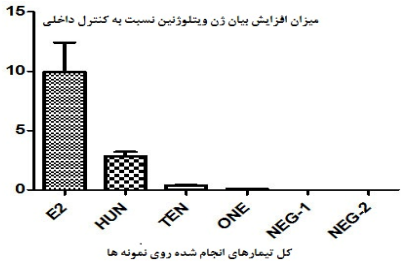


شکل۲- الف- قطعه ۸۹ بازی تکثیر شده ژن ۱۸S rRNAحاصل از RT-cPCR روی بافت کبد تاسماهی ایرانی پس از مواجهه با نونیل فنل (غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم).

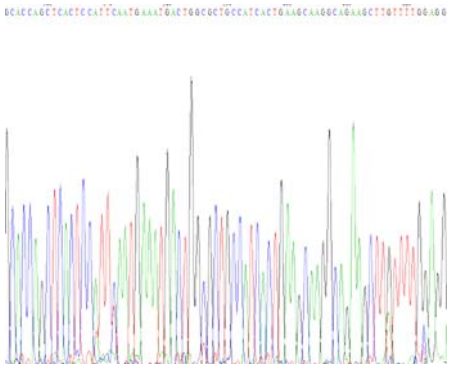


شکل۲- ب- قطعه ۷۴ بازی تکثیر شده ژن ویتلوژنین حاصل از RT-cPCR روی بافت کبد ماهیان خاویاری ایرانی در معرض قرار گرفته با نونیل فنل-به ترتیب از چپ به راست ردیف اول تا چهارم ژن ویتلوژنین تکثیر شده تحت تاثیرغلظت ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن نونیل فنل ؛ردیف پنجم تانهم ژن ویتلوژنین تکثیر شده تحت تاثیرغلظت ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن نونیل فنل؛ردیف دهم نشانگر مولکولی؛ ردیف یازدهم کنترل منفی شامل تمام مواد Conventional PCR به غیر از الگو؛ردیف دوازدهم شامل تمام مواد cPCR وبه جای cDNA از RNA استخراج شده برای ردیابی آلودگی به DNA استفاده شده است که عدم تکثیر قطعه مورد نظر در کنترل منفی نشان دهنده صحت واکنش زنجیره پلی‌مراز بوده است.

Downloaded from mg.genetics.ir at 14:39 +0430 on Friday June 18th 2021



شکل۳- نمودار نسبت بیان ژن ویتلوژنین به کنترل 18 s rRNA در تیمارهای متفاوت نونیل در ماهی خاویاری ایرانی. همانطور که مشاهده می شود در تیمار ۱۷ بتا استرادیول در سطح معنی داری صد درصد ($P = ۰/۰۰$) وتیمار ۱،۱۰و۱۰۰میلی گرم بر کیلوگرم نونیل فنل نسبت افزایش بیان ژن ویتلوژنین در سطح معنی داری ۹۵ درصد اطمینان ($P < ۰/۰۵$) قابل توجه بوده است (E2: ۱۷ بتا استرادیول، HUN: تیمار ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم در هفته، TEN: تیمار ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم در هفته، ONE: تیمار یک میلی گرم بر کیلو گرم در هفته، NEG-1: تیمار کنترل منفی تزریق با ماده ناقل، NEG-2: تیمار کنترل منفی بدون تزریق).



شکل۴- قطعه ۷۴ بازی کلون شده در وکتور TA، قسمتی از ژن ویتلوژنین که در واکنش Real time PCR مورد استفاده قرار گرفت.

جوان شده است (Zhang et al. 2005). در مطالعه ای در قزل آلای رنگین کمان با تاثیر نوع دیگری از عوامل استروژنی مثل zeranenol با غلظت های متفاوت نشان داده شد که این ماده منجر به بیان زود هنگام ژن ویتلوژنین و زونا رادیاتا شده است (Arukwe et al. 2002). در مطالعه ای در سال ۱۹۹۸ خاصیت استروژنی موادی چون نونیل فنل، بیس فنل، دی بوتیل فتالات (DBP)، بوتیل بنزیل فتالات (BBP)، روی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با کنترل مثبت هایی مثل ۱۷ بتا استرادیول، اتینیل استرادیول توسط روش الایزامورد آزمون قرار گرفت و نتایج بیانگر این بود که نونیل فنل و بیس فنل خاصیت استروژن زایی بالایی در مقایسه با دو ماده ذکر شده دیگر دارند (Christiansen et al. 1998). در بررسی دیگر که روی همین گونه در دوزهای متفاوت بیس فنل انجام شده نشان داده است که با گذشت زمان بدن جانور قابلیت دفع سم را در دوزهای پایین را داشته است ولی در دوزهای بالا قابلیت دفع سم حتی با گذشت زمان مختل شده است (Lindholst et al. 2000).در مطالعه‌ای در ماهی آزاد قهوه ای (*Salmo trutta*) روی خاصیت استروژن زایی مواد سنتتیک مثل اتینیل استرادیول در درجه حرارت‌های متفاوت نشان داده شد که این ماده شبه استروژنی در درجه حرارت‌های بالاتر خاصیت استروژنی بیشتری داردکه این مطالعه اثرات عوامل فیزیکوشیمیایی طبیعت را بر خاصیت استروژن زایی مواد شبه استروژنی نشان می دهد (Körner et al. 2008).

از جمله نتایج دیگر این بررسی، تعیین توالی قسمتی از ژن ویتلوژنین در تاسماهی ایرانی می‌باشد که بصورت اختصاصی برای این گونه در بانک ژنی NCBI مورد ثبت قرار گرفت. استفاده از توالی ژنی مذکور در آینده جهت توسعه مطالعات مربوط به تاثیرات مواد شبه استروژنی در این ماهی حائز اهمیت خواهد بود.

نتایج بررسی حاضر مبین آن است که مواد استروژنی و شبه استروژنی قابلیت تحریک بیان ژن ویتلوژنین را در ماهی خاویاری داشته اند. به طوری که هورمون ۱۷ بتا استرادیول به عنوان کنترل مثبت (در سطح معنی‌داری ۱۰۰ درصد) و تیمار های نونیل فنل (در سطح معنی داری ۹۵ درصد) قادر به تحریک تولید و بیان ژن ویتلوژنین بوده‌اند و بنابراین تغییرات ژن ویتلوژنین می‌تواند به عنوان نشانگر زیستی برای ردیابی تاثیر عوامل استروژنی و شبه استروژنی در تاسماهی ایرانی مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

از مدیریت بخش تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید دادمان گیلان به جهت همکاری در فراهم‌سازی امکانات این پروژه در مدت زمان تیمار ها و همچنین آزمایشگاه ژنتیک دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس به جهت همکاری و فراهم‌سازی امکان انجام آزمایش های مولکولی و دانشکده علوم دریایی تربیت مدرس به جهت تامین بودجه سپاسگزاری می‌شود.

Downloaded from mg.genetics.ir at 14:39 +0430 on Friday June 18th 2021

منابع

Ahel M, Giger W, Koch M (1994a) Behavior of alkylphenol polyethoxylate surfacants in the aquatic environment. I. Occurrence and transformation in sewage treatment. Water Research 28:1131-1142.

Ahel M, Giger W, Schaffner C (1994b) Behavior of alkylphenol polyethoxylate surfacants in the aquatic environment. II. Occurrence and biotransformation in rivers. Water Research 28:1143-1152.

Arukwe A, Goksoyr A (2003) Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. Comparative Hepatology [online] 2:4.

Arukwe A, Kullman SW, Berg K, Goksoyr A, Hinton DE (2002) Molecular cloning of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggshell *zona radiata* protein complementary DNA: mRNA expression in17b-estradiol- and nonylphenol-treated fish. Comparative Biochemistry and Physiology Part B 132: 315-326.

Asadi F, Masoudifard M, Vajhi A, Lee K, Pourkabir M, Khazraeinia P (2006a) Serum biochemical parameters of *Acipenser persicus*. Fish Physiology and Biochemistry 32:43-47.

Asadi F, Hallajian A, Pourkabir M, Asadian P, Jadidizadeh F (2006b) Serum biochemical parameters of *Huso huso*. Comparative Clinical Pathology 15:245-248.

Bahmani M, Kazemi R, Donskaya P (2001) A comparative study of some hematological features in young reared sturgeons (*Acipenser persicus* and *Huso huso*). Fish Physiology and Biochemistry 24:135- 140.

Billard R, Lecointre G (2001) Biology and conservation of sturgeon and paddlefish. Reviews in Fish Biology and Fisheries 10:355-39.

Christiansen LB, Pedersen KL, Korsgaard B, Bjerregaard P (1998) Estrogenicity of xenobiotics in rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)* using *in vivo* synthesis of vitellogenin as a biomarker. Marine Environmental Research 46: 137-140.

Gray MA, Metcalfe CD (1997) Induction of testis–ova in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to *p*-nonylphenol. Environmental Toxicology and Chemistry 16:1082-1086.

Høyer AP, Grandjean P, Jørgensen T, Brock JW, Hartvig HB, (1998) Organochlorine exposure and risk of breast cancer. Lancet 352:1816-1820.

Islinger M, Pawlowski S, Hollert H, Volkl A, Braunbeck T (1999) Measurement of vitellogenin mRNA expression in primary cultures of rainbow trout hepatocytes in non-radioactive dot blot/RNase protein-assay. Science of the Total Environment 233:109-122.

Jobling S, Sheahan D, Osborne JA, Mathiessen P, Sumpter JP (1996) Inhibition of testicular growth in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. Environmental Toxicology and Chemistry pp. 194-202.

Kawana R, Strussmann CA, Hashimoto S (2003) Effect of *p*-nonylphenol on sperm motility in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Fish Physiology and Biochemistry 28:213-214.

Körner O, Kohno S, Schönenberger R, Suter MJF Knauer K, Guillette Jr, Burkhardt-Holma P(2008). Water temperature and concomitant waterborne ethinylestradiol exposure affects the vitellogenin expression in juvenile brown trout (*Salmo trutta*). Aquatic Toxicology 90:188-196.

Langston WJ, Burt GR, Chesman BS, Vane CH (2005): Partitioning, bioavailability and effects of oestrogens and xeno-estrogens in the aquatic environment. Journal of Marine Biology Association of United Kingdom 85: 1-31.

Larkin P, Knoebl I, Denslow ND (2003) Differential gene expression analysis in fish exposed to endocrine disrupting compounds. Comparative Biochemistry Physiology Biology 136:149-161.

Lindholst C, Pedersen KL, Pedersen SN (2000) Estrogenic response of bisphenol A in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic Toxicology 48: 87-94.

Miller WR, Sharpe RM (1998) Environmental Estrogens and Human Reproductive Cancers. Endocrine related Canser 5: 69-96.

Mortazavi S, Riyahi Bakhtiari A, Esmaili Sari A, Bahramifar N, Rahbarizade F (2012) Phenolic endocrine disrupting chemicals (EDCs) in Anzali Wetland, Iran: Elevated concentrations of 4-nonylphenol, octhylphenol and bisphenol A. Marine Pollution Bulletin 64:1067-1073.

Naylor CG (1992a) Environmental fate of alkylphenol ethoxylates. Soap /Cosmetics /Chemical Specialties 27-32.

Naylor CG, Mieure JP, Adams WJ, Weeks JA, Castaldi FJ, Ogle LD, Romano RR (1992b) Alkylphenol ethoxylates in the environment. Journal of the American Oil Chemists' Society 69:695-703.

Servos MR (1999) Review of the aquatic toxicity, estrogenic responses and bioaccumulationof alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates. Water Quality Research Journal of Canada 34:123-177.

Sonnenschein C, Soto AM (1998) An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 65:143-150.

Sumpter JP (1999) Xenoendocrine disrupters environmental impacts. Toxicology Letter 102-103:337-342.

Zhang Z, Hu J, An W,Jin F, An L, Tao S, Chen J (2005)Induction of vitellogenin mRNA in juvenile Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis* Gray)treated by 17-ß estradiol and 4-nonylphenol. Environmental Toxicology and Chemistry 24:1944-1950.