مجله بوم شناسی آبزیان

Journal homepage: http://jae.hormozgan.ac.ir

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 6:47 +0330 on Saturday January 20th 2018

تاثیر غلظت های تحت کشنده اندوسولفان بر بیان ژن های القای هایپوکسی و فاکتور رشد اندوتلیال عروقی در بچه ماهیان تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)

حامد کلنگی میاندره *

گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

نوع مقاله:
پژوهشی

تاریخچه مقاله:
دریافت: ۹۴/۰۸/۱۵
اصلاح: ۹۴/۱۰/۱۳
پذیرش: ۹۴/۱۱/۱۳

کلمات کلیدی:
تاسماهی ایرانی
آبشش
هایپوکسی
اندوسولفان

چکیده

در این مطالعه، اثرات غلظت های تحت کشنده سم اندوسولفان بر بیان ژن های القای هایپوکسی و فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (HIF-1 α ، HIF-2 α و VEGF) در بافت آبشش تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۳۶۰ قطعه بچه تاسماهی (وزن متوسط ۰/۱۲ ±۲ گرم) در معرض غلظت های ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم در لیتر قرار گرفتند و ژن های VEGF و HIFs در ۱، ۲، ۷ و ۱۴ روز بررسی شدند. بیان نسبی ژن HIF-1 α در همه‌ی نمونه های در معرض قرار گرفته در مقایسه با گروه شاهد بیشتر بود. همچنین میزان بیان ژن HIF-1,2 α در بیشترین غلظت سم (۴۰ میکروگرم در لیتر) اختلاف معنی داری با سایر غلظت ها داشت و این اختلاف در همه‌ی روزهای نمونه برداری دیده شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که سم آندوسولفان به طور قابل توجهی باعث تحریک بیان ژن‌ها درگیر در هایپوکسی و رگ زایی در بافت آبشش می‌گردد. با توجه به نتایج می توان به تاثیر مخرب اندوسولفان بر اکوسیستم آبی بیش از گذشته پی برد، بنابراین نیاز اساسی به مدیریت موثرتر درباره به کارگیری از این آفت کش بیش از پیش احساس می شود.

مقدمــه

آفت کش ها مواد شیمیایی هستند که در حال حاضر برای کنترل آفات در بخش کشاورزی به صورت گسترده ای از آن‌ها استفاده می شود. مهمترین طبقه بندی آفت کش ها شامل ارگانوکلرین، ارگانوفسفره و کاربامات ها می باشد. ارگانوکلورین ها جزء رایج ترین آفت کش ها هستند که در محیط های مختلف، از جمله محیط های آبی، رسوبات، اتمسفر و همچنین بدن موجودات زنده گزارش شده اند (Chopra *et al*., 2011). آفت کش های ارگانوکلره شامل ترکیبات مختلف شیمیایی هستند که همه‌ی آنها شامل کربن، هیدروژن و کلراید می باشند. از جمله این گروه از آفت کش ها می توان به polychlorinated biphenyls (PCBs)، polychlorinated dibenzofurans (PCDFs)، dichlorodiphenyl trichloroethane (DDT)، توکسافنول، لیندان، دیسوفل، کلردنس و همچنین اندوسولفان اشاره کرد (Van Dyk and Pletschke, 2011).

کاربرد اندوسولفان، از بین بردن آفاتی مثل کنه ها و شته ها در محصولات کشاورزی می باشد (Wan *et al*., 2005). با توجه به مصرف بیش از حد اندوسولفان در مزارع، پس از مصرف، اندوسولفان می تواند از طریق رواناب های سطحی خود را به منابع

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: hkolangi@gau.ac.ir

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 6:47 +0330 on Saturday January 20th 2018

آبی برساند (Miglioranza *et al*., 2002) و در نهایت به محیط های آبی بزرگتر وارد شود (Chopra *et al*., 2011). بر اساس مطالعات اخیر، اثر سمی اندوسولفان بر موجودات آبی غیرهدف می تواند بسیار زیاد باشد (Carriger *et al*., 2011; Da Cun˜a *et al*., 2011).

اگرچه هنوز مکانیزم مولکولی سمیت اندوسولفان به طور کامل شناسایی نشده، اما قسمت هایی از مکانیزم اثر آن در آبزیان مشخص شده است (Pereira *et al*., 2012). از جلمه اثرات مخرب در معرض قرارگیری با اندوسولفان اثرات آن بر تخریب DNA و همچنین جهش زایی (Bajpayee *et al*., 2006)، آثار ژنوتوکسیتی (Neuparth *et al*., 2006)، آسیب های عصبی (Yavuz *et al*., 2007)، اکسیداتیو استرس ها (Tellez-Banuelos *et al*., 2009)، تغییرات بافتی در آبشش و کبد (Da Cun˜a *et al*., 2011)، و همچنین تغییر در برخی فاکتورهای خونی از جمله کورتیزول و گلوکز می باشد (Ezemonye and Ikpesu, 2011).

در ماهیان، آلاینده های موجود در محیط های آبی، اغلب توسط آبشش ها وارد بدن می شوند (Williams and Giesy 1978)، و بعد می توانند در بدن پخش و سپس در اندام های مختلف تجمع پیدا کنند (Wu *et al*., 2007). فاکتور رشد اندوتلیال عروقی[1] یک سیتوکنین پرقدرت است که باعث تسریع رگ زایی [2] و همچنین افزایش نفوذپذیری آن‌ها می شود و از این طریق نیز نقش مهمی در پاسخ به در معرض قرارگیری با آلاینده ها دارد (Thomas, 1996). اختلال در این فرآیند با توجه به شدت تاثیر آلاینده ها متفاوت است (Prozialeck *et al*., 2006). اگرچه که غشاء عروق، بافت مهمی برای تاثیر آلاینده ها می باشد اما مطالعات بسیار کمی در زمینه تعیین مکانیزم ها و تاثیرات آلاینده ها بر ژن های مرتبط با این قسمت وجود دارد. بیان VEGF از طریق عامل القاء هایپوکسی[3] تنظیم می شود (Prozialeck *et al*., 2006). HIF به طور عمده ای در تنظیم تنفس و همچنین سازگاری با شرایط کمبود اکسیژن و استرس ناشی از آن دخالت دارد (Karpinsky, 1992). HIF ترکیبی با زیر مجموعه‌های متفاوت[4] است که از مهمترین زیر واحدهای آن می‌توان به HIF-1α, -2α اشاره کرد (Wenger and Gassmann, 1997; Semenza, 1999). مطالعات نشان داده اند که HIF-1 α نقش اساسی در گرفتن اکسیژن و همچنین سازگاری با شرایط بی هوازی دارد، در حالی که HIF-2 α همین نقش را در مدت زمان طولانی‌تر ایفا می کند (Semenza, 1999; Hu *et al*., 2003; Bos *et al*., 2005; Law *et al*., 2006). برخلاف استفاده گسترده از اندوسولفان و همچنین اهمیت بالای VEGF و HIF در رگ زایی، هنوز مطالعه ای بر روی تاثیر این آفت کش بر این گروه از ژن ها انجام نشده است. در مطالعات قبلی مشخص شده است که در معرض گذاری با فلز سنگین نیکل، باعث ایجاد شرایط کم اکسیژنی و به دنبال آن افزایش بیان HIF-1 α شده است (Duyndam *et al*., 2001). این موضوع نشان دهنده این است که در معرض گذاری با فلزات باعث کاهش اکسیژن در دسترس آبزیان می شود. هدف از این مطالعه بررسی اثرات تحت حاد آفت کش اندوسولفان بر بیان ژن های درگیر در هایپوکسی و رگزایی در تاسماهی ایرانی است.

مواد و روش

پرورش و سازگاری

بچه تاسماهیان ایرانی ۲±۰/۱۲ گرمی از مجتمع تکثیر و پرورش شهید مرجانی- گرگان تهیه و در شرایط ونیرو (نور طبیعی و تعویض مداوم آب) به مدت ۲ هفته جهت سازگاری نگهداری شدند. برای انجام آزمایشات ابتدا بچه‌ماهیان به صورت تصادفی در ۱۲ مخزن (۳۰ عدد در هر مخزن) توزیع شدند. اثرات آلودگی با سم اندوسولفان بر بیان ژن های VEGF، HIF-1 α و HIF-2 α در بافت‌های آبشش در ۴ تیمار و ۳ تکرار بررسی شد. به این منظور بچه‌ماهیان در معرض ۳ دوز تحت کشنده (T1 ۱۰، T2 ۲۰ و T3 ۴۰ میکروگرم در لیتر) و شاهد برای مدت ۱۴روز قرار گرفتند. کلیه شرایط محیطی، برای همه مخازن کاملاً

[1] Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)
[2] Angeniogenesis
[3] hypoxia inducing factor (HIF)
[4] heterodimeric

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 6:47 +0330 on Saturday January 20th 2018

یکسان بود. دمای آب طی دوره به طور متوسط ۲۵ درجه سانتی‌گراد، pH ۷/۶ و اکسیژن ۷/۸ بود و طی زمان مطالعه ماهیان از بیومس آرتمیا در ۲ مرحله ۹ صبح و ۱۵ تغذیه می‌شدند. تعویض آب یک روز در میان با آب حاوی غلظت مورد نظر انجام می‌شد. نمونه‌برداری از هر کدام از تیمارها در روزهای ۱، ۲ ، ۷ و ۱۴ با سه تکرار انجام شد. بچه‌ماهیان بعد از نمونه‌برداری ابتدا با استفاده از پودر گل میخک (۰/۵ گرم بر لیتر) بیهوش و کشته شدند. جهت بررسی مولکولی، بافت آبشش (به دلیل در معرض بودن سریع‌تر نسبته به سایر بافت ها) از ماهیان جدا و بلافاصله در ازت مایع منجمد و سپس در فریزر ۸۰- درجه تا شروع آزمایش‌ها نگهداری شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA

طبق دستورالعمل شرکت سازنده، برای تخلیص RNA کل، از ۱۰۰ میلی‌گرم بافت آبشش با استفاده از بافر BIOZOL (Bioflux-Bioer) استفاده شد. کمیت و کیفیت RNA با استفاده از اسپکتروفتومتری و ژل آگارز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت. DNA یا cDNA با استفاده از RNA استخراج شده، آنزیم Reverse-Transcriptase (Fermentase, France) و پرایمرOligo-dt درحضور (Fermentase, France) , RNAse inhibitor و طبق دستورالعمل شرکت سازنده تهیه شد.

جهت انجام واکنش RT-qPCR[5] برای ژن های HIF-1 α ، HIF-2 α و VEGF از توالی های جدول (۱) استفاده شد:

جدول ۱. توالی پرایمرهای طراحی شده جهت مطالعه بیان ژن های **HIF-1 α** ، **HIF-2 α** و **VEGF**

نام پرایمر (ژن)	توالی	محصول (جفت باز)
HIF-1 α	For: ACAGAGCTGATGGGATACCAG Rev: CCTGTGATGGCTTGTCCTTT	۲۱۰
HIF-2 α	For: GAAGGTCCTGCACTGCACT Rev: CTTGGTGCACAAGTTCTGGT	۱۸۰
VEGF	For: GCCTTCATGTGTACCACTCATG Rev: GGTCTGCATTCACATGTACTGTG	۱۸۰
RPL 6	For: GAAGGTCCTGCACTGCACT Rev: CTTGGTGCACAAGTTCTGGT	۲۵۰

cDNA های سنتز شده با پرایمرهای ژن رفرنس (RPL6) و هدف با استفاده از PCR استاندارد تکثیر و ارزیابی شدند. واکنش در حجم ۱۰ میکرولیتر انجام گرفت (۲/۵ میکرولیتر cDNA (۲ نانو گرم در میکرولیتر)، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر اختصاصی پیشرو و پسرو با غلظت ۱۰ پیکومول، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (1X)، ۰/۱میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase(۵u)، ۲/۵ میکرولیتر MgCl2با غلظت (۵۰ mM) و ۰/۲ میکرولیتر dNTP با غلظت (۱۰ mM)). برنامه استفاده شده برای پرایمرها بر اساس دمای ذوب آنها تنظیم گردید (Kolangi *et al*., 2015). جهت اثبات تکثیر cDNA، محصول واکنش روی ژل آگارز ۱ ٪ الکتروفورز گردید.

برای اطمینان از بهینه بودن شرایط RT-PCR، سری غلظت‌های مختلف (۱/۵، ۱/۱۰، ۱/۲۰، ۱/۵۰، ۱/۱۰۰، ۱/۲۰۰و۱/۵۰۰) از نمونه‌های cDNA مخلوط از تیمارهای متفاوت از بافت آبشش تهیه و با هر دو پرایمر هدف و رفرنس در ۳ تکرار تکثیر شدند و منحنی استاندارد جهت تخمین کارایی (E) و تکرارپذیری آزمایش برای هر پرایمر ترسیم شد (Bustin *et al*., 2009).

واکنش RT-PCR بعد از بهینه‌سازی دما و مواد مصرفی، در حجم نهایی۲۰ میکرولیتر با استفاده از ۱ میکرولیتر پرایمرهای طراحی شده برای ژنهای HIF-1 α ، HIF-2 α و VEGF و ژن رفرنس RPL6، ۵ میکرولیتر از cDNA بافت آبشش (۳ نمونه هر تکرار با هم مخلوط می شوند)، ۳ میکرولیتر آب و ۱۰ میکرولیتر کیت سایبر بیوپارس (دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان) بر اساس دستورالعمل استاندارد: در مرحله اول واکنش RT-PCR به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴C° و با ۴۰

[5] Real Time PCR

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 6:47 +0330 on Saturday January 20th 2018

چرخه در این دما در ۳۰ ثانیه انجام شد. در مرحله بعد دما به ۵۶°C در مدت ۱۰ ثانیه کاهش یافت و پس از آن ۱۰ ثانیه در دمای° ۷۲C و در مرحله آخر به مدت ۷ دقیقه در این دما در دستگاه iQ5 شرکت بایورد و با استفاده از نرم‌افزار بایورد iQ5 اپتیکال ۶ در ۳ تکرار بیولوژیکی و ۳ تکرار تکنیکی انجام گرفت. میزان بیان ژن در دستگاه به صورت Ct ثبت شد. داده‌های به‌دست آمده جهت تعیین بیان نسبی ژن های HIF-1 α ، HIF-2 α و VEGF، نسبت به RPL6 با روش $۲^{\Delta\Delta Ct}$ مورد آنالیز قرار گرفتند.

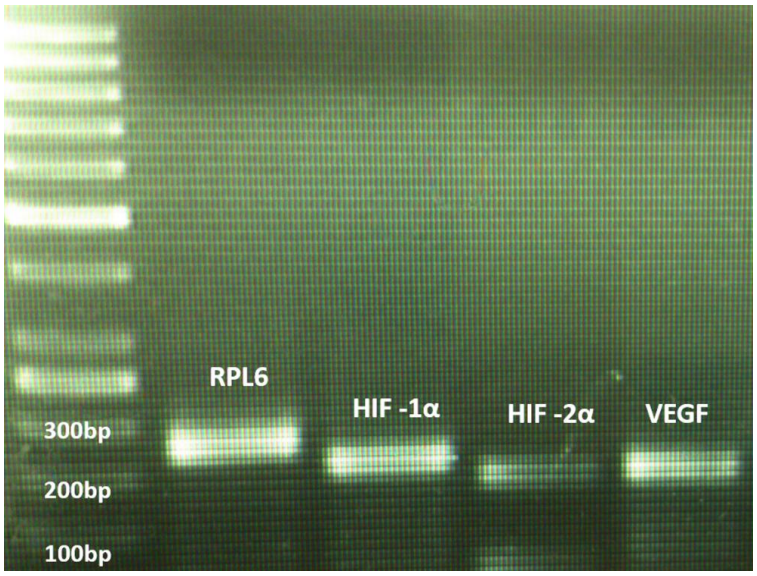
تجزیه و تحلیل آماری

آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS (Chicago, version 19) انجام گرفت. جهت مقایسه میانگین غلظت های مختلف اندوسولفان با گروه شاهد و همچنین اختلاف بین غلظت های مختلف سم در زمان های مختلف از، آزمونهای آماری ANOVA و Tukey در سطح معنی‌داری P≤ ۰/۰۵ استفاده شد.

نتایــج

تکثیر پرایمرهای اختصاصی مربوط به هر ژن به خوبی انجام شد (شکل ۱) و از لحاظ کیفیت و کمیت قابل قبول بوده به طوری که کارایی برای هر پرایمر در دامنه ۹۵-۹۹ درصد بود که نشان دهنده اتصال پرایمرهاست. در نتیجه cDNA به خوبی سنتز گردید و پرایمرهای طراحی شده به صورت صحیح قطعه مورد نظر را تکثیر نمودند.

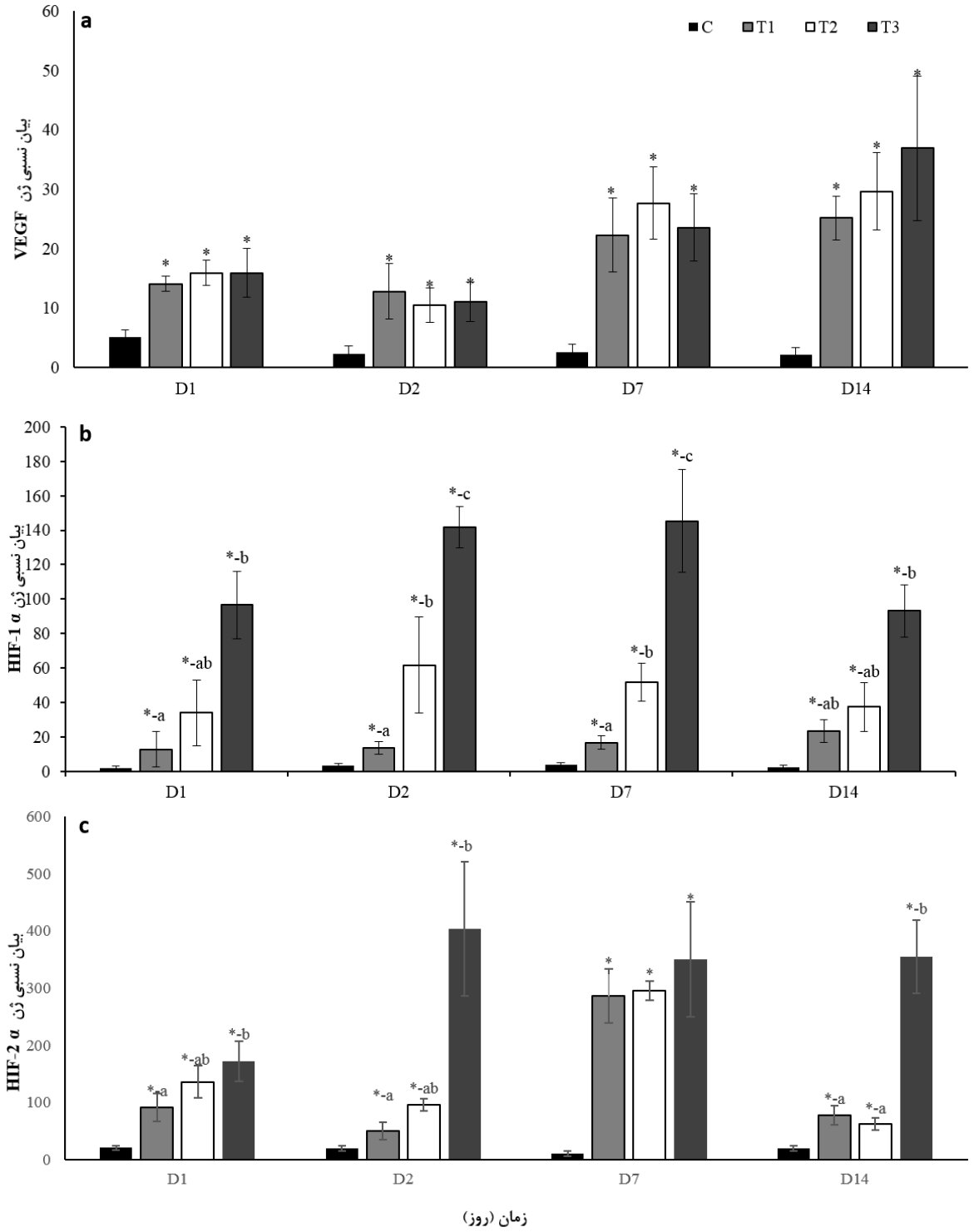
با توجه به نتایج این مطالعه، مشخص شد که در معرض قرارگیری با اندوسولفان می تواند باعث افزایش معنی دار بیان نسبی ژن VEGF در بافت آبشش تاسماهی ایرانی شود (P<۰/۰۵) به طوری که بیشترین تغییرات هم در روزهای ۷ و ۱۴ قابل مشاهده است، البته بین تیمارهای در معرض قرار گرفته با اندوسولفان اختلاف معنی داری وجود نداشت. همچنین در ژن های HIF-1 α و HIF-2 α نیز بیان نسبی در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت. مقایسه بین تیمارهای در معرض قرار گرفته با آفت کش در ژن HIF-1 α نشان داد بیشترین بیان ژن در بیشترین غلظت سم اتفاق افتاده و این اختلاف در چهار زمان نمونه برداری نیز ادامه دارد (P<۰/۰۵) ولی بین تیمارهای ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در لیتر، در روزهای اول و چهاردهم اختلاف معنی داری وجود نداشت. نتایج نشان داد در روز دوم و چهاردهم میزان بیان ژن HIF-2 α در غلظت ۴۰ میکروگرم در لیتر به طور معنی داری بیشتر از سایر گروه های در معرض قرار گرفته با سم است.



شکل ۱. تصویر محصول PCR روی ژل آگارز ۱٪

[6] BioRad iQ5 optical system software version 2

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 6:47 +0330 on Saturday January 20th 2018



شکل ۲ a، b و c- بیان نسبی ژن های HIF-1 α ، HIF-2 α و VEGF در بچه تاسماهیان ایرانی در معرض قرار گرفته با غلظت های تحت حاد اندوسولفان در روز های ۱، ۲، ۷ و ۱۴. ستاره (*) نشان دهنده اختلاف معنی دار بین شاهد و گروه های در معرض قرار گرفته است. حروف غیر مشترک نشان دهنده اختلاف معنی دار بین گروه های در معرض قرار گرفته است (P<۰/۰۵).

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 6:47 +0330 on Saturday January 20th 2018

بحث

در این مطالعه، به بررسی تاثیر غلظت های تحت حاد آفت کش اندوسولفان (۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر لیتر) در زمان های مختلف (۱، ۲، ۷ و ۱۴ روز) بر بیان ژن های VEGF، HIF-1 α و HIF-2 α در آبشش بچه تاسماهیان ایرانی پرداخته شد و تغییرات بیان نسبی ژن ها پس از در معرض قرارگیری ارزیابی گردید. با توجه به نتایج این مطالعه مشخص شد که در معرض قرارگیری بچه تاس ماهیان ایرانی با غلظت های تحت حاد سم اندوسولفان به شدت باعث تحریک بیان ژن های مرتبط با رگ زایی شده است به طوری که در بعضی موارد در بالاترین غلظت ها و در انتهای دوره بیشترین تاثیرات را بر افزایش بیان ژن‌های VEGF، HIF-1 α و HIF-2 α مشاهده می شود.

بسیاری از آلاینده هایی که در محیط های خشکی تولید می شوند از طرق مختلف از جمله زهکشی، رهاسازی مستقیم و چرخه های آب و هوایی وارد منابع آبی بزرگ از جمله دریاها و اقیانوس ها می شوند. در نتیجه می توان گفت که اکوسیستم‌های آبی به عنوان مقصد نهایی برای بسیاری از آلاینده ها مطرح است (Sumpter, 2002). آلاینده ها تعادل بوم‌سازگان را برهم زده و از عملکرد درست آن ممانعت به‌عمل می‌آورند (Pourang, *et al*., 2005)، بنابراین برآورد اثرات این آلاینده‌ها بر بوم‌سازگان‌ها ضروری است. با توجه به عملکرد متفاوت مواد شیمیایی و همچنین وضعیت فیزیولوژیک گونه های مختلف آبزی، قدرت ایجاد حساسیت مواد آلاینده متفاوت می باشد (Hedayati and Safahieh, 2011). در سال های اخیر برای تعیین تاثیرات منفی این آلاینده ها بر موجودات آبزی، عوامل مختلفی را اندازه گیری کرده اند که از جمله آن‌ها می توان به سنجش کمی مقدار آلاینده در آب، رسوب و بافت ماهی به سمت سنجش‌های کیفی اثرات آلاینده‌ها بر آبزیان با استفاده از زیست نشانگرهای مولکولی، بیوشیمیایی، خون‌شناسی، آنزیمی و بافتی اشاره کرد (Schlenk *et al*., 2002).

رگ زایی یک نیاز اساسی برای تشکیل رگ های خونی می باشد. بنابراین مستقیماً باعث افزایش اکسیژن و مواد غذایی در دسترس برای سلول ها می شود (Blagosklonny, 2004). در مورد مکانیزم عمل رگ زایی تحت تاثیر آلاینده ها قبلا مطالعات محدودی انجام شده است (Filipič *et al*., 2006; Joseph, 2009)، اما با این حال هنوز اطلاعات ما در مورد مکانیزم انجام رگ زایی کامل نیست و نتایج مطالعات گاهی اوقات با هم تضاد هایی دارند (Prozialeck *et al*., 2006).

با توجه به قابلیت عملکرد شبه استروژنی در آفت کش ها، این مواد می توانند منجر به افزایش سلول های اندوتلیالی عروق شوند، همچنین مشخص شد که در معرض گذاری با اندوسولفان می تواند منجر به تغییر رگ زایی شود (Bharathi *et al*., 2013). همچنین در مورد فلزات سنگین که بخش دیگری از آلاینده های محیط های آبی را تشکیل می دهند مشخص شده است که می توانند روی سلول های اندوتلیالی عروق تاثیر گذار باشند (Kim *et al*., 2012). VEGF و HIF از مهمترین ژن ها برای انجام فرآیند رگزایی در موجودات می باشند (Jiang and Liu, 2009).

HIF یک عامل رونویسی است که بعضی از ژن ها از جمله VEGF را فعال می کند و همچنین متابولیسم آهن و انتقال گلوکز نیز توسط آن انجام می شود (Iyer *et al*., 1998; Semenza, 2003). VEGF از دو زیر واحد ۱ و ۲ تشکیل شده است. HIF-1 α تحت تاثیر شرایط بی اکسیژنی یا کم اکسیژنی القاء می شود و گزارش شده که در سرطان های پستانداران نیز میزان بیان آن افزایش می یابد (Semenza, 2003). اگرچه مطالعاتی در زمینه پاسخ مولکولی شرایط کم اکسیژنی در آبزیان انجام گرفته (Law *et al*., 2006; Pierron *et al*., 2007; Zhang *et al*., 2009)، اما این موضوع هنوز در ماهیان خاویاری به طور کامل روشن نشده است. با توجه به زندگی در بستر و تغذیه وابسته به بستر ماهیان خاویاری، این موضوع در این ماهیان از اهمیت بیشتری برخوردار است زیرا حساسیت بیشتری نسبت به کمبود اکسیژن پیدا می کنند. نتایج این مطالعه نشان داد که در معرض قرارگیری تاسماهیان با آندوسولفان باعث افزایش معنی داری در بیان نسبی این ژن ها در اکثر زمان ها شد (شکل ۲). همان طور که از نتایج مقایسه تیمارهای در معرض قرار گرفته پیداست، غلظت های مختلف اندوسولفان بر بیان نسبی ژن ها تاثیرات متفاوتی دارد، به طوری که در بعضی از تیمارهای در معرض قرار گرفته، بیان ژن به طور معنی داری بیشتر از سایر گروه ها بود. اختلافات مشاهده شده بین HIF-1 α و HIF-2 α ممکن است به خاطر نوع سلول ها و همچنین الگوهای متفاوت

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 6:47 +0330 on Saturday January 20th 2018

این سلول ها باشد (Ratcliffe *et al*., 2007). در مطالعه دیگری که توسط Rankin و همکاران (۲۰۰۷) انجام شد پیشنهاد داده شد، HIF-1 α و HIF-2 α ممکن است اهداف رونویسی جدا داشته باشند.

همانطور که در بالا اشاره شد، HIF مهمترین عامل فعال کننده VEGF در سلول های اندوتلیالی می باشد. با توجه به نتایج این مطالعه، میزان بیان نسبی HIF1 α -2 α افزایش یافته و همچنین مقدار بیان نسبی VEGF نیز افزایش یافته است. همچنین اختلاف در میزان بیان نسبی ژن های HIF-1 α و HIF-2 α (شکل ۲) می تواند نشان دهنده ی این باشد که این دو ژن می توانند به صورت جداگانه در کنترل بیان ژن VEGF دخیل باشند (Pierron *et al*., 2007). همچنین اندوسولفان می‌تواند موجب ایجاد استرس اکسیداتیو در سلول های آبشش تاسماهی ایرانی شده باشد و موجب افزایش میزان بیان فاکتورهای رونویسی دخیل در استرس اکسیداتیو از جمله ژن VEGF و HIFs گردد. نتایج مشابه ای در ژن های HIFs و VEGF در سلول های اندوتلیالی انسانی که در معرض ۰/۱ µM کادمیوم قرار گرفته بودند مشاهده شد (Helmestam *et al*., 2010).

نتایج متضادی در مارماهی اروپایی (Anguilla anguilla) مشاهده شد (Pierron *et al*., 2007). Prozialeck و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که در معرض قراردهی با آلاینده ها می تواند منجر به کاهش فعالیت رگ زایی در موجودات شود. این نشان می‌دهد که بیان HIF و VEGF خود تحت تاثیر سایر فرآیندهای مرتبط با استرس می باشد که هنوز همه‌ی این فرآیند ها و واکنش آن‌ها روی هم به درستی شناسایی نشده است.

نتایج این مطالعه نشان داد، اندوسولفان که به عنوان یکی از پرکاربردترین آفت کش ها در بسیاری از مزارع کشاورزی استفاده می شود، باعث تغییر بیان ژن ها مهم درفرایند هایپوکسی و رگزایی یعنی HIFs و VEGF شده است و این تغییرات می تواند تاثیرات زیادی را بر تنفس و سیستم عروقی داشته باشد. تغییرات HIFs تحت تاثیر اندوسولفان که مهمترین ژن تاثیرگذار بر VEGF است، می تواند منجر به اختلال در رگزایی و به دنبال آن افزایش خطر خونریزی در تاسماهی ایرانی شود. ماهیان خاویاری از جمله گونه های در معرض خطر انقراض هستند که زندگی طولانی دارند و در معرض قرارگیری طولانی مدت با آفت کشی مثل اندوسولفان می تواند منجر به تجمع آن در بدن این ماهیان شود. نتایج این مطالعه می تواند به ارزیابی و مدیریت اثرات آلاینده ها از جمله آفت کش آندوسولفان در محیط های آبی کمک نماید.

منابــع

Bajpayee, M., Pandey, A.K., Zaidi, S., Musarrat, J., Parmar, D., Mathur, N., Seth, P.K., Dhawan, A. 2006. DNA damage and mutagenicity induced by endosulfan and its metabolites. Environmental and Molecular Mutagenesis. 47(9): 682-692.

Bharathi, S.P., Raj, H.M., Jain, S., Banerjee, B.D., Ahmed, T., Arora, V.K. 2013. Role of pesticides in the induction of tumor angiogenesis. Anticancer Research. 33(1): 231-240.

Blagosklonny, M.V. 2004. Antiangiogenic therapy and tumor progression. Cancer Cell. 5(1): 13-17.

Bos, R., Van Diest, P.J., De Jong, J.S., Van Der Groep, P., Van Der Valk, P., Van Der Wall, E. 2005. Hypoxia-inducible factor-1α is associated with angiogenesis, and expression of bFGF, PDGF-BB, and EGFR in invasive breast cancer. Histopathology. 46(1): 31-36.

Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clinical Chemistry. 55(4): 611-622.

Carriger, J.F., Hoang, T.C., Rand, G.M., Gardinali, P.R., Castro, J. 2011. Acute toxicity and effects analysis of endosulfan sulfate to freshwater fish species. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 60(2): 281-289.

Chopra, A., Sharma, M.K., Chamoli, S. 2011. Bioaccumulation of organochlorine pesticides in aquatic system -an overview. Environmental Monitoring and Assessment. 173(1): 905-916.

Da Cuna, R.H., Vazquez, G.R., Piol, M.N., Guerrero, N.V., Maggese, M.C., Nostro, F.L.L. 2011. Assessment of the acute toxicity of the organochlorine pesticide endosulfan in Cichlasoma

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 6:47 +0330 on Saturday January 20th 2018

dimerus (*Teleostei, Perciformes*). Ecotoxicology and Environmental Safety. 74(4): 1065-1073.

Duyndam, M.C., Hulscher, T.M., Fontijn, D., Pinedo, H.M., Boven, E. 2001. Induction of vascular endothelial growth factor expression and hypoxia-inducible factor 1α protein by the oxidative stressor arsenite. Journal of Biological Chemistry. 276(51): 48066-48076.

Ezemonye, L., Ikpesu, T. 2011. Evaluation of sub-lethal effects of endosulfan on cortisol secretion, glutathione S-transferase and acetylcholinesterase activities in *Clarias gariepinus*. Food and Chemical Toxicology. 49(9): 1898-1903.

Filipič, M., Fatur, T., Vudrag, M. 2006. Molecular mechanisms of cadmium induced mutagenicity. Human & Experimental Toxicology. 25(2): 67-77.

Hedayati, A., Safahieh, A. 2012. RETRACTED: Serum hormone and biochemical activity as biomarkers of mercury toxicity in the yellowfin seabream *Acanthopagrus latus*. Toxicology and Industrial Health. 28(4): 306-319.

Helmestam, M., Stavreus-Evers, A., Olovsson, M. 2010. Cadmium chloride alters mRNA levels of angiogenesis related genes in primary human endometrial endothelial cells grown in vitro. Reproductive Toxicology. 30(3): 370-376.

Hu, C.J., Wang, L.Y., Chodosh, L.A., Keith, B., Simon, M.C. 2003. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1α (HIF-1α) and HIF-2α in hypoxic gene regulation. Molecular and Cellular Biology. 23(24): 9361-9374.

Iyer, N.V., Kotch, L.E., Agani, F., Leung, S.W., Laughner, E., Wenger, R.H., Gassmann, M., Gearhart, J.D., Lawler, A.M., Aimee, Y.Y. 1998. Cellular and developmental control of O2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1α. Genes & Development. 12(2): 149-162.

Jiang, B.H., Liu, L.Z. 2009 .PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. Advances in Cancer Research. 102: 19-65.

Joseph, P. 2009. Mechanisms of cadmium carcinogenesis. Toxicology and Applied Pharmacology. 238(3): 272-279.

Karpinsky, M. 1992. Aspects of the Caspian Sea benthic ecosystem. Marine Pollution Bulletin. 24(8): 384-389.

Kim, J., Lim, W., Ko, Y., Kwon, H., Kim, S., Kim, O., Park, G., Choi, H., Kim, O. 2012. The effects of cadmium on VEGF-mediated angiogenesis in HUVECs. Journal of Applied Toxicology. 32(5): 342-349.

Kolangi Miandare, H., Jafari, O., Akbarzadeh, A. 2015. The transcription of Hypoxia-inducible factors (hif-1, hif-2) during normal development of Beluga sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1758). Journal of Aquatic Ecology. 4(4): 87-80.

Law, S.H., Wu, R.S ,.Ng, P.K., Richard, M., Kong, R.Y. 2006. Cloning and expression analysis of two distinct HIF-alpha isoforms–gcHIF-1alpha and gcHIF-4alpha–from the hypoxia-tolerant grass carp, Ctenopharyngodon idellus. BMC Molecular Biology. 7(1): 15.

Miglioranza, K.S., Sagrario, M.d.l.A.G., de Moreno, J.E.A., Moreno, V.J., Escalante, A.H., Osterrieth, M.L. 2002. Agricultural soil as a potential source of input of organochlorine pesticides into a nearby pond. Environmental Science and Pollution Research. 9(4): 250-256.

Neuparth, T., Bickham, J., Theodorakis, C., Costa, F., Costa, M. 2006. Endosulfan-induced genotoxicity detected in the Gilthead Seabream, *Sparus aurata* L., by means of flow cytometry and micronuclei assays. Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology. 76-85.

Pereira, V.M., Bortolotto, J.W., Kist, L.W., de Azevedo, M.B., Fritsch, R.S., da Luz Oliveira, R., Pereira, T.C.B., Bonan, C.D., Vianna, M.R., Bogo, M.R. 2012. Endosulfan exposure inhibits brain AChE activity and impairs swimming performance in adult zebrafish (*Danio rerio*). Neurotoxicology. 33(3): 469-475.

Pierron, F., Baudrimont, M., Gonzalez, P., Bourdineaud, J.P., Elie, P., Massabuau, J.C. 2007. Common pattern of gene expression in response to hypoxia or cadmium in the gills of the European glass eel (*Anguilla anguilla*). Environmental Science & Technology. 41(8): 3005-3011.

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 6:47 +0330 on Saturday January 20th 2018

Pourang, N., Tanabe, S., Rezvani, S., Dennis, J. 2005. Trace elements accumulation in edible tissues of five sturgeon species from the Caspian Sea. Environmental Monitoring and Assessment. 100(1): 89-108.

Prozialeck, W.C., Edwards, J.R., Woods, J.M. 2006. The vascular endothelium as a target of cadmium toxicity. Life Sciences. 79(16): 1493-1506.

Rankin, E.B., Biju, M.P., Liu, Q., Unger, T.L., Rha, J., Johnson, R.S., Simon, M.C., Keith, B., Haase, V.H. 2007. Hypoxia-inducible factor–2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo. The Journal of Clinical Investigation. 117(4): 1068-1077.

Ratcliffe, P.J. 2007. HIF-1 and HIF-2: working alone or together in hypoxia? The Journal of Clinical Investigation. 117(4): 862-865.

Schlenk, D., Giulio, R. 2002. Biochemical responses as indicators of aquatic ecosystem health. Biological Indicators of Aquatic Ecosystem Stress. pp. 13-42.

Semenza, G.L. 1999. Regulation of mammalian O2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. Annual Review of Cell and Developmental Biology. 15(1): 551-578.

Semenza, G.L. 2003. Targeting HIF-1 for cancer therapy. Nature Reviews Cancer. 3(10): 721-732.

Sumpter, J. 2002. Endocrine disruption in the aquatic environment. Endocrine Disruptors–Part II: 492-492.

Tellez-Bañuelos, M.C., Santerre, A., Casas-Solis, J., Bravo-Cuellar, A., Zaitseva, G. 2009. Oxidative stress in macrophages from spleen of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to sublethal concentration of endosulfan. Fish & Shellfish Immunology. 27(2): 105-111.

Thomas, K.A. 1996. Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. Journal of Biological Chemistry. 271(2): 603-606.

Van Dyk, J.S., Pletschke, B. 2011. Review on the use of enzymes for the detection of organochlorine, organophosphate and carbamate pesticides in the environment. Chemosphere. 82(3): 291-307.

Wan, M.T., Kuo, J.N., Buday, C., Schroeder, G., Van Aggelen, G., Pasternak, J. 2005. Toxicity of α-, β),-α+ β)-endosulfan and their formulated and degradation products to *Daphnia magna*, *Hyalella azteca*, *Oncophynchus mykiss*, *Oncophynchus kisutch*, and biological implications in streams. Environmental Toxicology and Chemistry. 24(5): 1146-1154.

Wenger, R.H., Gassmann, M. 1997. Oxygen (es) and the hypoxia-inducible factor-1. Biological Chemistry. 378(7): 609-616.

Williams, D.R., Giesy, J.P. 1978. Relative importance of food and water sources to cadmium uptake by *Gambusia affinis* (Poeciliidae). Environmental Research. 16(1-3): 326-332.

Wu, S.M., Shih, M.J., Ho, Y.C. 2007. Toxicological stress response and cadmium distribution in hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.) upon cadmium exposure. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. 145(2): 218-226.

Yavuz, Y., Yurumez, Y., Kücüker, H., Ela, Y., Yüksel, S. 2007. Two cases of acute endosulfan toxicity. Clinical Toxicology. 45(5): 530-532.

Zhang, Z., Ju, Z., Wells, M.C., Walter, R.B. 2009. Genomic approaches in the identification of hypoxia biomarkers in model fish species. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 381: S180-S187.