



تأثیر غلظت‌های تحت‌کشنده اندوسولفان بر بیان ژن‌های القای هایپوکسی و فاکتور رشد اندوتلیال عروقی در بچه ماهیان تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)

حامد کلنگی میاندره*

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

نوع مقاله:	چکیده
پژوهشی	در این مطالعه، اثرات غلظت‌های تحت‌کشنده سم اندوسولفان بر بیان ژن‌های القای هایپوکسی و فاکتور رشد اندوتلیال عروقی ($HIF-1 \alpha$ ، $HIF-2 \alpha$ و VEGF) در بافت آبشش تاسماهی ایرانی (<i>Acipenser persicus</i>) مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۳۶۰ قطعه بچه تاسماهی (وزن متوسط 0.12 ± 0.02 گرم) در معرض غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم در لیتر قرار گرفتند و ژن‌های VEGF و HIFs در ۱، ۲، ۷ و ۱۴ روز بررسی شدند. بیان نسبی ژن $HIF-1 \alpha$ در همه‌ی نمونه‌های در معرض قرار گرفته در مقایسه با گروه شاهد بیشتر بود. همچنین میزان بیان ژن $HIF-1,2 \alpha$ در بیشترین غلظت سم (۴۰ میکروگرم در لیتر) اختلاف معنی‌داری با سایر غلظت‌ها 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 رگ‌زایی در بافت آبشش می‌گردد. با توجه به نتایج می‌توان به تأثیر مخرب آندوسولفان 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 می‌شود.
تاریخچه مقاله: دریافت: ۹۴/۰۸/۱۵ اصلاح: ۹۴/۱۰/۱۳ پذیرش: ۹۴/۱۱/۱۳	
کلمات کلیدی: تاسماهی ایرانی آبشش هایپوکسی اندوسولفان	

مقدمه

آفت‌کش‌ها مواد شیمیایی هستند که در حال حاضر برای کنترل آفات در بخش کشاورزی به صورت گسترده‌ای از آن‌ها استفاده می‌شود. مهمترین طبقه بندی آفت‌کش‌ها شامل ارگانوکلرین، ارگانوفسفره و کاربامات‌ها می‌باشد. ارگانوکلورین‌ها جزء رایج‌ترین آفت‌کش‌ها هستند که در محیط‌های مختلف، از جمله محیط‌های آبی، رسوبات، اتمسفر و همچنین بدن موجودات زنده گزارش شده‌اند (Chopra et al., 2011). آفت‌کش‌های ارگانوکلره شامل ترکیبات مختلف شیمیایی هستند که همه‌ی آنها شامل کربن، هیدروژن و کلراید می‌باشند. از جمله این گروه از آفت‌کش‌ها می‌توان به polychlorinated biphenyls (PCBs)، polychlorinated dibenzofurans (PCDFs)، dichlorodiphenyl trichloroethane (DDT)، توکسافنول، لیندان، دیسوفل، کلردنس و همچنین آندوسولفان اشاره کرد (Van Dyk and Pletschke, 2011). کاربرد آندوسولفان، از بین بردن آفاتی مثل کنه‌ها و شته‌ها در محصولات کشاورزی می‌باشد (Wan et al., 2005). با توجه به مصرف بیش از حد آندوسولفان در مزارع، پس از مصرف، آندوسولفان می‌تواند از طریق رواناب‌های سطحی خود را به منابع

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

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 Cunha *et al.*, 2011).

اگرچه هنوز مکانیزم مولکولی سمیت اندوسولفان به طور کامل شناسایی نشده، اما قسمت هایی از مکانیزم اثر آن در آبیان مشخص شده است (Pereira *et al.*, 2012). از جمله 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 Cunha *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^۱ یک سیتوکینین پر قدرت است که باعث تسریع رگ زایی^۲ و همچنین افزایش نفوذپذیری آن ها 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 تأثیر آلاینده ها متفاوت است (Prozialeck *et al.*, 2006). اگرچه که غشاء عروق، بافت مهمی برای تأثیر آلاینده ها می باشد اما مطالعات بسیار کمی در زمینه تعیین مکانیزم ها و تأثیرات آلاینده ها بر ژن های مرتبط با این قسمت وجود دارد. بیان VEGF از طریق عامل القاء هایپوکسی^۳ 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 مجموعه های متفاوت^۴ است که از مهمترین زیر واحدهای آن می توان به HIF-1 α ، -2 α اشاره کرد (Wenger and Gassmann, 1999; Semenza, 1999). مطالعات نشان داده اند که HIF-1 α نقش اساسی در گرفتن اکسیژن و همچنین سازگاری با شرایط بی هوای دارد، در حالی که HIF-2 α همین نقش را در مدت زمان طولانی تر 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 HIF و VEGF در رگ زایی، هنوز مطالعه ای بر روی تأثیر 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 آبیان می شود. هدف از این مطالعه بررسی اثرات تحت حاد آفت کش اندوسولفان بر بیان ژن های درگیر در هایپوکسی و رگ زایی 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 بچه ماهیان 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 بافت های آبشش در ۴ تیمار و ۳ تکرار بررسی شد. به این منظور بچه ماهیان در معرض ۳ دوز تحت کشنده (۱۰، ۲۰، ۴۰ T3 میکروگرم در لیتر) و شاهد برای مدت ۱۴ روز قرار گرفتند. کلیه شرایط محیطی، برای همه مخازن کاملاً

¹ Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

² Angiogenesis

³ hypoxia inducing factor (HIF)

⁴ heterodimeric

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 آرتیمیا 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 نسبت به سایر بافت‌ها) 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 پرایمر Oligo-dt در حضور RNase inhibitor (Fermentase, France) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده تهیه شد.

جهت انجام واکنش RT-qPCR^۵ برای ژن‌های HIF-1 α ، HIF-2 α و VEGF از توالی‌های جدول (۱) استفاده شد:

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

نام پرایمر (ژن)	توالی	محصول (جفت باز)
HIF-1 α	For: ACAGAGCTGATGGGATACCAG Rev: CCTGTGATGGCTTGTCTTT	۲۱۰
HIF-2 α	For: GAAGGTCCTGCACTGCACT Rev: CTTGGTGCACAAGTTCTGGT	۱۸۰
VEGF	For: GCCTTCATGTGTACCACTCATG Rev: GGTCTGCATTACATGTACTGTG	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 (۱X)، ۰/۱ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (۵۰ mM)، ۲/۵ میکرولیتر MgCl₂ با 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، ۱/۲۰۰، ۱/۵۰۰ و ۱/۱۰۰۰) 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 نهایی ۲۰ 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 می‌شوند)، 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 ۹۴°C و با ۴۰

⁵ Real Time PCR

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 ۷۲°C و در مرحله آخر به مدت ۷ دقیقه در این دما در دستگاه iQ5 شرکت بایورد و با استفاده از نرم افزار بایورد iQ5 اپتیکال ۶ در ۳ تکرار بیولوژیکی و ۳ تکرار تکنیکی انجام گرفت. میزان بیان ژن در دستگاه به صورت Ct ثبت شد. داده های به-به دست آمده جهت تعیین بیان نسبی ژن های HIF-1 α ، HIF-2 α و VEGF، نسبت به RPL6 با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 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 معنی داری $P \leq 0/05$ استفاده شد.

نتایج

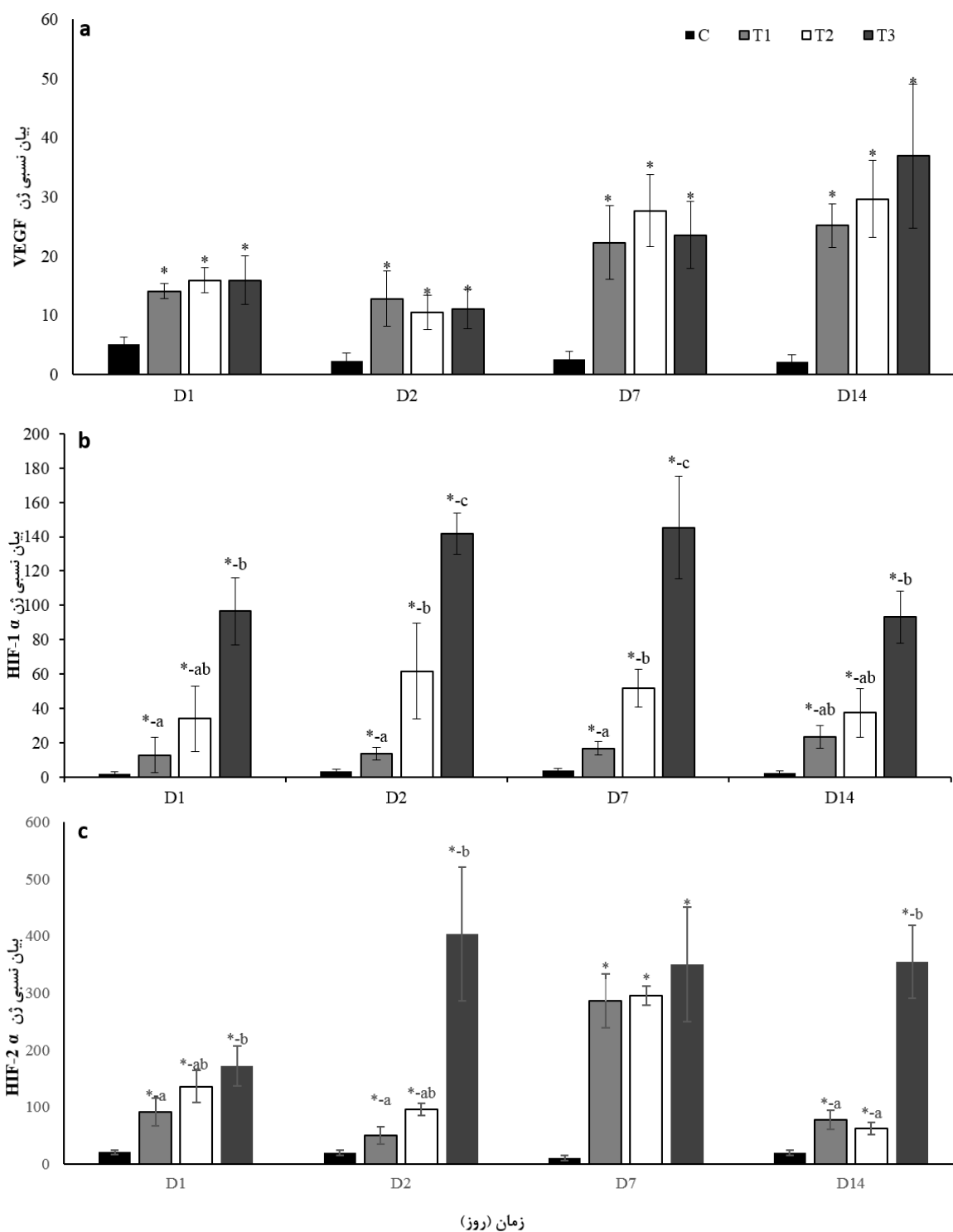
تکثیر پرایمرهای اختصاصی مربوط به هر ژن به خوبی انجام شد (شکل ۱) و از لحاظ کیفیت و کمیت قابل قبول بوده به طوری که کارایی برای هر پرایمر در دامنه ۹۵-۹۹ درصد بود که نشان دهنده اتصال پرایمرهاست. در نتیجه cDNA به خوبی سنتز گردید و پرایمرهای طراحی شده به صورت صحیح قطعه مورد نظر را تکثیر نمودند.

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 ($P < 0/05$) 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 ($P < 0/05$) 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



شکل ۲ a، b و c- بیان نسبی ژن های $HIF-1 \alpha$ ، $HIF-2 \alpha$ 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 ($P < 0.05$).

بحث

در این مطالعه، به بررسی تاثیر غلظت های تحت حد 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 حد 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 ژن های 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 اکوسیستم های آبی به عنوان مقصد نهایی برای بسیاری از آلاینده ها مطرح است (Sumpter, 2002). آلاینده ها تعادل بوم سازگان را برهم زده و از عملکرد درست آن ممانعت به عمل می آورند (Pourang, et al., 2005). بنابراین برآورد اثرات این آلاینده ها بر بوم سازگان ضروری است. با توجه به عملکرد متفاوت مواد شیمیایی و همچنین وضعیت فیزیولوژیک گونه های مختلف آبی، 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 آبی، عوامل مختلفی را اندازه گیری کرده اند که از جمله آن ها می توان به سنجش کمی مقدار آلاینده در آب، رسوب و بافت ماهی به سمت سنجش های کیفی اثرات آلاینده ها بر آبیان با استفاده از زیست نشانگرهای مولکولی، بیوشیمیایی، خون شناسی، 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 قبلاً 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 رگ زایی 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 آبیان 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 اندوسولفان 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

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

همانطور که در بالا اشاره شد، HIF مهمترین عامل فعال‌کننده VEGF در سلول‌های اندوتلیالی می‌باشد. با توجه به نتایج این مطالعه، میزان بیان نسبی α HIF1-2 و افزایش یافته و همچنین مقدار بیان نسبی VEGF نیز افزایش یافته است. همچنین اختلاف در میزان بیان نسبی ژن‌های α HIF-1 و α HIF-2 (شکل ۲) می‌تواند نشان‌دهنده‌ی این باشد که این دو ژن می‌توانند به صورت جداگانه در کنترل بیان ژن VEGF دخیل باشند (Pierron *et al.*, 2007). همچنین اندوسولفان می‌تواند موجب ایجاد استرس اکسیداتیو در سلول‌های آبشش تاسماهی ایرانی شده باشد و موجب افزایش میزان بیان فاکتورهای رونویسی دخیل در استرس اکسیداتیو از جمله ژن VEGF و HIFs گردد. نتایج مشابه‌ای در ژن‌های HIFs و VEGF در سلول‌های اندوتلیالی انسانی که در معرض $0/1 \mu\text{M}$ کادمیوم قرار گرفته بودند مشاهده شد (Helgestam *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 آلاینده‌ها می‌تواند منجر به کاهش فعالیت رگ‌زایی در موجودات شود. این نشان می‌دهد که بیان HIF و VEGF خود تحت تاثیر سایر فرآیندهای مرتبط با استرس می‌باشد که هنوز همه‌ی این فرآیندها و واکنش آن‌ها روی هم به درستی شناسایی نشده است.

نتایج این مطالعه نشان داد، اندوسولفان که به عنوان یکی از پرکاربردترین آفت‌کش‌ها در بسیاری از مزارع کشاورزی استفاده می‌شود، باعث تغییر بیان ژن‌ها مهم در فرآیند هایپوکسی و رگ‌زایی یعنی HIFs و VEGF شده است و این تغییرات می‌تواند تاثیرات زیادی را بر تنفس و سیستم عروقی داشته باشد. تغییرات HIFs تحت تاثیر اندوسولفان که مهمترین ژن تاثیرگذار بر VEGF است، می‌تواند منجر به اختلال در رگ‌زایی و به دنبال آن افزایش خطر خونریزی در تاسماهی ایرانی شود. ماهیان خاویاری از جمله گونه‌های در معرض خطر انقراض هستند که زندگی طولانی دارند و در معرض قرارگیری طولانی مدت با آفت‌کشی مثل اندوسولفان می‌تواند منجر به تجمع آن در بدن این ماهیان شود. نتایج این مطالعه می‌تواند به ارزیابی و مدیریت اثرات آلاینده‌ها از جمله آفت‌کش اندوسولفان در محیط‌های آبی کمک نماید.

منابع

- 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-1 α 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., Hellems, 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*

- 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 1 α 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 1 α (HIF-1 α) and HIF-2 α 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 1 α . *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.

- 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.
- Sumpster, 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., Kücük, 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.