



## بررسی بیان ژن‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در حضور غلظت‌های تحت کشنده سم اندوسولفان در ماهی گورخری (*Danio rerio*)

فاطمه کیاپور<sup>۱</sup>، علی شعبانی<sup>۲\*</sup>، رقیه صفری<sup>۳</sup>

تاریخ پذیرش: مرداد ۹۷

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۹۷

### چکیده

در این مطالعه اثر غلظت‌های تحت کشنده سم اندوسولفان (۰، ۱۶، ۳۲ و ۶۴ میکروگرم بر لیتر) بر بیان ژن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز) در ماهی گورخری در بازه زمانی چهارده روزه مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور نمونه‌برداری از هر تیمار در روزهای اول، دوم، هفتم و چهاردهم انجام شد. پس از استخراج RNA از کبد و سنتز cDNA، سنجش بیان ژن‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی با استفاده از روش Real Time PCR انجام شد. نتایج در بازه‌های زمانی مختلف، افزایش بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه در نمونه‌های تحت تیمار با اندوسولفان را در مقایسه با گروه شاهد نشان داد ( $P < 0.05$ ). بیان هر دو ژن در ۲۴ ساعت اول دارای بیشترین افزایش نسبی در مقایسه با زمان‌های دیگر بود و این روند در هر سه غلظت مورد مطالعه مشاهده شد. همچنین بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه در تمام روزهای مواجهه روند وابسته به غلظت را نشان داد. نتایج این مطالعه حاکی از این است که تغییرات بیان ژن آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز می‌تواند به عنوان شاخص موثری در بررسی تغییرات بوم‌شناسی محسوب شود.

### واژگان کلیدی: اندوسولفان، شاخص‌های استرس، بیان ژن، ماهی گورخری.

- ۱- کارشناس ارشد گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
  - ۲- دانشیار گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
  - ۳- استادیار، گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
- \* نویسنده مسئول: [ali\\_shabany@yahoo.com](mailto:ali_shabany@yahoo.com)

## مقدمه

آفت‌کش‌ها مواد شیمیایی هستند که در حال حاضر برای کنترل آفات در بخش کشاورزی به صورت گسترده‌ای از آن‌ها استفاده می‌شود. مهم‌ترین طبقه‌بندی آفت‌کش‌ها شامل ارگانوکلرین، ارگانوفسفره و کاربامات است. ارگانوکلرین‌ها 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; Shukla et al., 2017). اندوسولفان یکی از آفت‌کش‌های ارگانوکلرینی است که از طریق رواناب‌های کشاورزی وارد اکوسیستم آبی می‌شود و با توجه به ثبات شیمیایی، تجزیه‌پذیری ضعیف و افزایش قدرت تجمع زیستی در بدن موجودات زنده از جمله آبزیان، ضایعات مختلفی را در اندام‌ها ایجاد می‌کنند (Akhtar et al., 2012; Crupkin et al., 2013; Kim et al., 2014; Negro, 2015; Gerber et al., 2016). این آفت‌کش جزء سموم با سمیت شدید برای ماهیان دسته-بندی می‌شود (Silva Barni et al., 2014). از جمله اثرات مخرب قرارگیری در معرض اندوسولفان، تخریب DNA و همچنین جهش‌زایی (Bajpayee et al., 2006) استرس‌های اکسیداتیو (Tellez-Banuelos et al., 2009)، تغییر در برخی شاخص‌های خونی از جمله کورتیزول و گلوکز (Ezemonye and Ikpesu, 2011)، آسیب‌های بافتی، تغییرات آنزیمی، رفتاری، تولیدمثلی و حتی مرگ در گونه‌های مختلف گزارش شده است (Waisberg et al., 2003; Joseph and Raj, 2011; Sassi et al., 2013). از این تغییرات می‌توان به عنوان نشانگرهای زیستی به منظور بررسی وجود آلاینده‌ها استفاده کرد (Oliveira Ribeiro et al., 2002). شدت و مدت این پاسخ‌ها تحت تاثیر غلظت، زمان و گونه آبی مورد مطالعه متفاوت است (Dorts et al., 2009; Bauer et al., 2013). در سال‌های اخیر تغییرات آنزیمی به عنوان نشانگر آلودگی اکوسیستم‌های دریایی بسیار مورد استفاده قرار گرفته است. همه موجودات زنده دارای سیستم‌های محافظت کننده در مقابل واکنش‌های رادیکال-های آزاد هستند که از آن جمله می‌توان به آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و استرس اکسیداتیو اشاره کرد (Bahorun et al., 2006; Halliwell and Gutteridge, 2007; Pacher et al., 2007; Valko et al., 2007; Braz-Mota et al., 2018).

این سیستم‌های محافظت کننده قادر هستند در شرایط طبیعی بین تولید و حذف گونه‌های فعال اکسیژنی تعادل ایجاد کنند. اختلال در این فرآیند منجر به برهم خوردن سیستم هومئوستاز بدن و ایجاد استرس اکسیداتیو در سلول‌های مختلف موجودات زنده می‌شود (Burgos-Aceves et al., 2018). آنزیم‌های کاتالاز (Cat) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) از مهم‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی هستند که در بافت کبد بیشترین میزان فعالیت را دارند و به نظر می‌رسد دلیل اهمیت این آنزیم‌ها، به خاطر جایگاه ویژه واکنش‌های اکسیدانی چندگانه و حداکثر تولید رادیکال‌های آزاد در این اندام باشد. از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، اولین سد دفاعی موجودات از جمله آبزیان در شرایط استرس است و ارزیابی آن می‌تواند در بررسی وضعیت سیستم ایمنی به کار برده شود (Bahorun et al., 2006). در زمینه اثر آلاینده‌ها بر آنزیم‌ها و بیان ژن‌های مرتبط با استرس مطالعاتی صورت گرفته است که از آن جمله می‌توان به مطالعه Nwani و همکاران (۲۰۱۵) بر روی گربه‌ماهی افریقایی (*Clarias garipinus*)، Husak و همکاران (۲۰۱۶) بر روی ماهی قرمز (*Carassius auratus*) و همکاران

(۲۰۱۷) بر روی ماهی تیلپیا (*Oreochromis niloticus*)، Shukla و همکاران (۲۰۱۷) بر روی ماهی گورخری (*Danio rerio*)، Wang و همکاران (۲۰۱۸) بر روی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) و Safari (۲۰۱۸) بر روی ماهی گورخری اشاره کردند که افزایش معنی‌داری در نتایج این مطالعات به دست آمد. اما در زمینه اثرات مواجهه با غلظت‌های تحت کشنده سم آندوسولفان بر بیان ژن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در ماهی گورخری به عنوان یک گونه مدل، مطالعه‌ای صورت نگرفته است. بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی موارد مذکور صورت گرفت.

#### مواد و روش‌ها

##### تهیه و نگهداری ماهیان

در مطالعه حاضر ۶۰۰ قطعه بچه ماهی گورخری (*Danio rerio*) از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان زینتی شصت‌کلا (گرگان) تهیه و به سالن آبی پروری شهید ناصر فضلی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شد. ماهی‌ها در شرایط ونیرو (با آب کلرزدایی شهر) به مدت ۲ ماه جهت رسیدن به

کبد از ماهیان جدا و بلافاصله در ازت مایع منجمد شد و سپس در فریزر ۸۰- درجه تا شروع آزمایش‌ها نگهداری شد.

**استخراج RNA، ساخت cDNA و اندازه‌گیری بیان ژن**

به منظور ارزیابی میزان سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (Cat)، استخراج RNA با استفاده از کیت RiboEX (GeneAll، کره جنوبی) و طبق دستور العمل شرکت سازنده انجام گرفت. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتری (WPA-S2000-UV/VIS، Biochrom، انگلستان) و الکتروفورز ژل آگارز (۱ درصد) و با استفاده از رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید سنجیده شد. برای حذف هر گونه باقی‌مانده DNA ژنومی در نمونه‌های RNA، تیمار DNase I (Fermentaz، فرانسه) انجام شد و ساخت cDNA با استفاده از کیت (Daejeon) SuPrimeScript RT Premix (کره جنوبی) بر اساس روش پیشنهادی شرکت سازنده انجام شد. سپس cDNA ساخته شده تا شروع آزمایش‌ها در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. واکنش qPCR بعد از بهینه‌سازی دما و مواد مصرفی، در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با استفاده از آغازگرهای qPCR

اندازه مطلوب ( $0.3 \pm 0.05$  گرم) برای جداسازی بافت، نگهداری شدند.

برای انجام آزمایش ابتدا بچه ماهیان به صورت تصادفی در ۱۲ آکواریوم (۵۰ قطعه در هر آکواریوم با ۲۵ لیتر آب) توزیع شدند. ماهیان در معرض غلظت‌های ۱۶، ۳۲ و ۶۴ میکروگرم در لیتر آندوسولفان (کپاپور، ۱۳۹۷) و شاهد به مدت ۱۴ روز قرار گرفتند (هر تیمار با سه تکرار). کلیه شرایط محیطی، برای همه آکواریوم‌ها کاملاً یکسان بود. دمای آب طی دوره آزمایش به طور متوسط ۲۵ درجه سانتی-گراد، pH ۷/۶ و اکسیژن ۷/۸ میلی‌گرم در لیتر بود. طی زمان مطالعه ماهیان با جیره تجاری (بیومار، فرانسه) در زمان‌های ۸ صبح، ۱۱ صبح و ۱۵ بعد از ظهر تغذیه می‌شدند. تعویض آب یک روز در میان به میزان ۹۰ درصد حجم آب آکواریوم با آب حاوی غلظت‌های مورد نظر سم انجام می‌شد.

#### نمونه‌برداری

نمونه‌برداری از هر یک از تیمارها به تعداد ۲۱ قطعه ماهی (۷ قطعه از هر تکرار) در روزهای ۱، ۲، ۷ و ۱۴ انجام شد. ماهیان بعد از نمونه‌برداری ابتدا با استفاده از پودر گل میخک (۰/۵ گرم بر لیتر) بیهوش و کشته شدند. بافت

طراحی شده برای ژن‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (Cat) و آغازگر ژن مرجع بتا-اکتین ( $\beta$ -actin) طبق روش Safari (۲۰۱۸) (جدول ۱) توسط کیت سایبر گرین (بیوپارس، ایران) در دستگاه IQ5 (BIO-RAD، آمریکا) و با استفاده از نرم‌افزار Optical Bio Rad IQ5 برای هر نمونه در سه تکرار تکنیکی انجام شد. کارایی آغازگرهای مورد مطالعه با استفاده از منحنی استاندارد سری غلظت‌های مختلف (۱/۱۰، ۱/۲۰، ۱/۵۰، ۱/۱۰۰ و ۱/۲۰۰ میکروگرم) از cDNA مخلوط نمونه‌ها از تیمارهای متفاوت از بافت کبد محاسبه شد (جدول ۱).

تجزیه و تحلیل داده‌های کمی **Real Time PCR**

داده‌های به دست آمده برای تعیین بیان نسبی ژن‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (Cat) نسبت به بتا-اکتین با روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  مورد آنالیز قرار گرفت و پس از بررسی نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولوموگروف-اسمیرنوف و شپیرو-ویلیک، آزمون لون برای بررسی برابری واریانس‌ها مورد استفاده قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به بیان نسبی ژن‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز نسبت به بتا-اکتین در طی دوره مواجهه با سم اندوسولفان توسط آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه در سطح اطمینان ۹۵ درصد صورت گرفت. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار نمایش داده شد.

جدول ۱: مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در بررسی بیان ژن‌های Cat و SOD در ماهی گورخری تحت تاثیر سم اندوسولفان (Safari, 2018)

نام پرایمر	توالی (۳´-۵´)	دمای اتصال (C°)	کارایی پرایمر (%)
SOD q-PCRF	GGGTGGCAATGAGGAAAG	۶۰	۹۹
SOD q-PCRR	GCCCACATAGAAATGCACAG		
Cat q-PCRF	GCATGTTGGAAAGACGACAC	۶۰	۹۹
Cat q-PCRR	GTGGATGAAAGACGGAGACA		
$\beta$ - actin q-PCRF	AGCAGATGTGGATCAGCAAG	۶۰	۹۹
$\beta$ - actin q-PCRR	TACCTCCCTTGCCAGTTTC		

ای حدود ۹۵-۹۹ درصد نشان داد که نشان دهنده اتصال صحیح آغازگرها است.

## نتایج

### بررسی کیفی و کمی RNA

نتایج به دست آمده از بررسی کیفی RNA استخراج شده از ماهی گورخری مواجه شده با سم اندوسولفان در هر نمونه، دو باند 18S و 28S rRNA را با وضوح بالا نشان داد. نسبت شدت جذب در نمونه‌های RNA استخراج شده در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر در محدوده ۱/۸-۲/۱ قرار داشت و همچنین میزان جذب در طول موج‌های ۲۳۰، ۲۴۰ و ۳۲۰ نانومتر نیز بیانگر قابلیت مناسب RNA در نمونه‌های مورد بررسی بود (شکل ۱).

### بررسی cDNA ساخته شده

cDNA ساخته شده با آغازگر بتا-اکتین طراحی شده برای ماهی گورخری امتحان شد و مشاهده باند ۲۱۶bp ساخت صحیح cDNA را تایید کرد (شکل ۲).

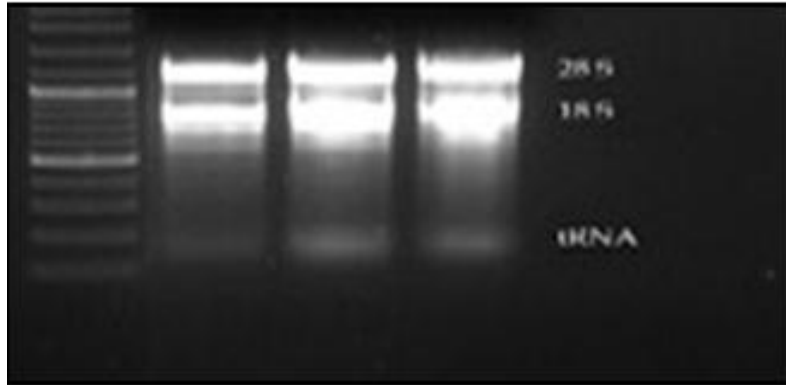
### ارزیابی عملکرد آغازگرهای به‌کاررفته در

#### Real Time PCR

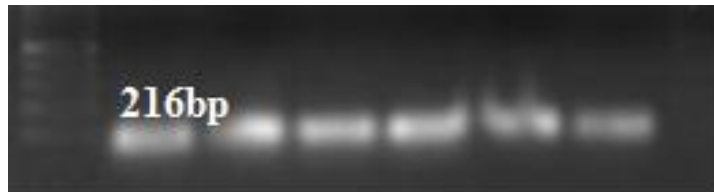
ترسیم منحنی استاندارد برای تخمین کارایی آغازگرها و تکرارپذیری آزمایش دامنه-

### نتایج ارزیابی بیان ژن‌ها

نتایج ارزیابی بیان ژن‌های کاتالاز (Cat) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در ماهی گورخری مواجه شده با سم اندوسولفان را نسبت به تیمار شاهد نشان داد ( $P < 0.05$ ). ارزیابی بیان ژن SOD نشان داد که بیان ژن در ۲۴ ساعت مواجهه به ترتیب به ۱۶/۱۶، ۲۱/۲ و ۲۹/۷ برابر گروه شاهد در غلظت‌های ۱۶، ۳۲ و ۶۴ میکروگرم در لیتر رسید و بعد از آن در روزهای دوم، هفتم و چهاردهم کاهش معنی‌داری را نشان داد ( $P \leq 0.05$ ). در بررسی بیان ژن Cat، در غلظت ۱۶ میکروگرم بر لیتر، بیشترین بیان این ژن را در ۲۴ ساعت اول مواجهه نشان داد (۹/۳ برابر؛  $P \leq 0.05$ ) و کاهش در میزان بیان از روز دوم مشاهده شد. روند کاهش مشابهی در غلظت‌های ۳۲ و ۶۴ میکروگرم در لیتر نیز مشاهده شد (جدول‌های ۲ و ۳).



شکل ۱: کیفیت RNA استخراج شده از کبد ماهی گورخری روی ژل آگارز ۱ درصد و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید



شکل ۲: محصول تکثیر cDNAهای ساخته شده با آغازگر بتا-اکتین در ماهی گورخری پس از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید

جدول ۲: تغییرات نسبی بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در بافت کبد ماهی گورخری در مواجهه ۱۴ روزه با غلظت‌های مختلف سم اندوسولفان (میانگین  $\pm$  انحراف معیار؛ n=۳)

غلظت (میکروگرم در لیتر)	روز اول	روز دوم	روز هفتم	روز چهاردهم
۱۶	۱۶/۱۶ $\pm$ ۳/۴۰ <sup>Ba</sup>	۹/۷۰ $\pm$ ۲/۲۰ <sup>Ab</sup>	۳/۲۹ $\pm$ ۱/۴۸ <sup>Bc</sup>	۱/۸۰ $\pm$ ۰/۷۲ <sup>Bc</sup>
۳۲	۲۱/۲۰ $\pm$ ۲/۳۵ <sup>Aa</sup>	۳/۹۶ $\pm$ ۰/۴۲ <sup>Bb</sup>	۲/۸۰ $\pm$ ۰/۴۷ <sup>Bb</sup>	۲/۱۰ $\pm$ ۰/۴۶ <sup>Ab</sup>
۶۴	۲۹/۷۰ $\pm$ ۷/۷۸ <sup>Aa</sup>	۹/۰۳ $\pm$ ۱/۴۰ <sup>Ab</sup>	۵/۸۵ $\pm$ ۱/۱۹ <sup>Ab</sup>	۲/۴۸ $\pm$ ۰/۹۷ <sup>Ac</sup>

حروف کوچک متفاوت، اختلاف معنی‌دار را در هر ردیف و حروف بزرگ متفاوت، اختلاف معنی‌دار را در هر ستون نشان می‌دهند ( $P < 0.05$ ).

جدول ۳: تغییرات نسبی بیان ژن کاتالاز (Cat) در بافت کبد ماهی گورخری در مواجهه ۱۴ روزه با غلظت‌های مختلف سم اندوسولفان (میانگین  $\pm$  انحراف معیار؛ n=۳)

غلظت (میکروگرم در لیتر)	روز اول	روز دوم	روز هفتم	روز چهاردهم
۱۶	۹/۳۰ $\pm$ ۱/۲۲ <sup>Ba</sup>	۶/۰۸ $\pm$ ۱/۹۲ <sup>Ba</sup>	۷/۲۰ $\pm$ ۲/۹۰ <sup>Ba</sup>	۶/۲۵ $\pm$ ۱/۵۷ <sup>Ba</sup>
۳۲	۲۱/۹۰ $\pm$ ۵/۳۰ <sup>Aa</sup>	۱۱/۲۲ $\pm$ ۳/۵۰ <sup>Aa</sup>	۵/۹۰ $\pm$ ۱/۹۰ <sup>Bb</sup>	۵/۲۹ $\pm$ ۰/۶۹ <sup>Bb</sup>
۶۴	۲۲/۳۸ $\pm$ ۱/۸۰ <sup>Aa</sup>	۱۳/۲۰ $\pm$ ۲/۶۰ <sup>Ab</sup>	۱۳/۶۰ $\pm$ ۴/۸۰ <sup>Ab</sup>	۱۳/۵۰ $\pm$ ۲/۳۰ <sup>Ab</sup>

حروف کوچک متفاوت، اختلاف معنی‌دار را در هر ردیف و حروف بزرگ متفاوت، اختلاف معنی‌دار را در هر ستون نشان می‌دهند ( $P < 0.05$ ).

می‌کنند (Winston and Di Giulio, 1991).

## بحث

بیشترین میزان افزایش این آنزیم‌ها در روز اول مشاهده شد که حاکی از این است که پاسخ آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به آلاینده‌ها یکی از سریع‌ترین پاسخ‌ها به استرس محیطی است (Hansen et al., 2006). افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در ماهی کاراسید (*Brycon cephalus*) مواجه شده با سم متیل پاراتیون (Monteiro et al., 2006)، ماهی گورخری در مواجهه با آترازین (Jin et al., 2010)، بچه فیل ماهی (*Huso huso*) در معرض فاز محلول نفت خام (Khoda Bakhsh et al., 2014)، ماهی قره-برون (*Acipenser persicus*) در مواجهه با کادمیوم (Safari, 2015)، ماهی تیلاپیا در معرض مخلوط غلف‌کش‌ها (Jonsson et al., 2017)، ماهی گورخری در مواجهه با کادمیوم (Safari, 2018)، ماهی گورخری در معرض

مطالعات زیادی در رابطه با تاثیر آلاینده‌ها بر سیستم‌های زیستی با تجزیه و تحلیل‌های بیوشیمیایی، بافت‌شناسی و رفتارشناسی انجام شده است، اما اندازه‌گیری بیان ژن می‌تواند تکنیکی موثر در بررسی تاثیر این مواد باشد. به ویژه اگر مولکول مورد بررسی قسمتی از مکانیزم دفاعی، ترمیمی و یا سم‌زدایی سلول باشد (Varanka et al., 2001; Franco et al., 2006; Hou et al., 2013). مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر سم اندوسولفان بر بیان ژن-های آنتی‌اکسیدانی انجام شد و افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در تیمارهای آلوده با سم اندوسولفان در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد که نشان می‌دهد این آنزیم‌ها از سیستم‌های دفاعی بدن هستند و با کاهش میزان اکسیداسیون لیپید، در مقابل استرس اکسیداتیو از بدن محافظت



مشاهده نشد. در مطالعه Sarkar و همکاران (۲۰۱۴)، مواجهه ماهی گورخری با غلظت پایین آرسنیک منجر به افزایش بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز شد، ولی در غلظت‌های بالاتر آرسنیک منجر به غیرفعال شدن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و در نهایت به از بین رفتن آن‌ها منجر شد. در مطالعه (Bautista et al., 2018) نیز تاثیر آترازین در ماهی گورخری منجر به سرکوب فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز در گنبد جنس نر شد. احتمال دارد شاخص‌هایی مثل عملکرد طبیعی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، واکنش تخصصی آنزیم‌ها در برابر انواع خاص آلاینده‌ها، اثرات عوامل محیطی بر فرآیندهای اکسیدی (Winston and Di Giulio, 1991)، جنسیت (Winzer et al., 2001)، واکنش‌های سریع، فازهای واکنش حاد و سازگاری آنتی‌اکسیدان‌ها در برابر آلودگی و بروز واکنش آنتی‌اکسیدانی در اندام هدف از دلایل به دست آمدن این نتایج باشد (Keramati, 2009).

نتایج مطالعه حاضر افزایش بیان نسبی ژن‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز را در ماهی گورخری تحت تیمار با غلظت‌های مختلف اندوسولفان (۱۶، ۳۲ و ۶۴ میکروگرم سداکسان (Yao et al., 2018)، کپور سرگنده (*Aristichthys nobilis*) در مواجهه با نیتريت (Lin et al., 2018) و کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در مواجهه با علف‌کش‌های حاوی مزوتریون (Wang et al., 2018) مشاهده شد.

کاهش بیان ژن‌های مورد بررسی از روز دوم به بعد می‌تواند به تجمع بالای رادیکال‌های سوپراکسید نسبت داده شود که این تجمع مانع از فعالیت بالای این آنزیم‌ها می‌شود. این پاسخ دوگانه افزایشی-کاهشی به آلاینده‌ها، علاوه بر عواملی مانند غلظت و مدت زمان قرار گرفتن در معرض آلاینده می‌تواند به گونه ماهی بستگی داشته باشد (Jin et al., 2012; Celi et al., 2010). همچنین این مطالعه روند وابسته به غلظت بیان ژن‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز را نشان داد که در تطابق با مطالعات Safari (۲۰۱۵) در ماهی قره‌برون، Safari (۲۰۱۸) در ماهی گورخری و Kim و همکاران (۲۰۱۰) در ماهی بادکنکی (*Takifugu obscurus*) است. اما در تاثیر سم دیازینون بر میزان فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی کاتالاز در بافت کبد ماهی کلمه (*Rutilus rutilus*)، ارتباط خاصی بین غلظت‌های مورد آزمایش سم دیازینون و تغییرات آنزیم کاتالاز

در لیتر) در مقایسه با گروه شاهد نشان داد. بیان هر دو ژن در هر سه غلظت مورد مطالعه در ۲۴ ساعت اول افزایش و سپس کاهش یافت. همچنین بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه در تمام روزهای مواجهه روند وابسته به غلظت را نشان داد و با افزایش غلظت افزایش یافت. این نتایج حاکی از این است که تغییرات بیان ژن آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز می‌تواند به عنوان اولین شاخص قابل اندازه‌گیری و نشانگر زیستی در پایش تغییرات بوم‌شناسی مورد استفاده قرار گیرد.

## منابع

- در ماهی گورخری (*Danio rerio*). پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۴۹ص.
- Akhtar M.S., Pal A.K., Sahu N.P., Alexander C. and Gupta S.K. 2012.** Effect of dietary pyridoxine on growth and biochemical responses of *Labeo rohito* fingerlings exposed to endosulfan. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 103: 23–30.
- Bahorun T., Soobrattee M.A., Luximon-Ramma V. and Aruoma O.I. 2006.** Free radicals and antioxidants in cardiovascular health and disease. *Internet Journal of Medical Update*, 1: 1–17.
- Bajpayee M., Pandey A.K., Zaidi S., Musarrat J., Parmar D., Mathur N., Seth P.K. and Dhawan A. 2006.** DNA damage and mutagenicity induced by endosulfan and its metabolites. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 47(9): 682–692.
- Bauer M., Greenwod S.J., Clark K.F., Jackman P. and Fairchild W. 2013.** Analysis of gene expression in *Homarus americanus* larvae exposed to sublethal concentration of endosulfan during metamorphosis. *Comparative Biochemistry and Physiology D*, 8: 300–308.
- Bautista F.E.A., Junior A.S., Corcini C.D., Acosta I.B., Caldas S.S., Primel E.G. and Zanette J. 2018.** The herbicide atrazine affects sperm quality and the expression of antioxidant and spermatogenesis genes in zebrafish testes. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 206: 17–22.
- Braz-Mota S., Campos D.F., MacCormack T.J., Duarte R.M., Val A.L. and Almeida-Val A.L. 2018.** Mechanisms of toxic action of copper and copper nanoparticles in two Amazon fish species: Dwarf cichlid (*Apistogramma agassizii*) and cardinal tetra (*Paracheirodon axelrodi*). *Science of the Total Environment*, 630: 1168–1180.
- Burgos-Aceves M.A., Cohen A., Smith Y. and Faggio C. 2018.** MicroRNAs and their role on fish oxidative stress during xenobiotic environmental exposures. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148: 995–1000.
- Celi M., Vazzana M., Sanfratello M.A. and Parrinello N. 2012.** Elevated cortisol modulate Hsp70 and Hsp90 gene expression and

- protein in sea bass head kidney and isolated leukocytes. *General and Comparative Endocrinology*, 175(3): 424–431.
- Chopra A., Sharma M.K. and Chamoli S. 2011.** Bioaccumulation of organochlorine pesticides in aquatic system- An overview. *Environmental Monitoring and Assessment*, 173(1): 905–916.
- Crupkin A.C., Caaquiriborde P., Mendieta J., Panzeri A.M., Ballesteros M. and Menone M. 2013.** Oxidative stress and genotoxicity in the South American cichlid, *Australoheros facetus*, after short-term sublethal exposure to endosulfan. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 105: 102–110.
- Dorts J., Silvestre F., Tu H.T., Tyberghein A.E., Phuong N.T. and Kestemont P. 2009.** Oxidative stress otein carbonilation and heat shock proteins in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) following exposure to endosulfan and deltamethrin. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 28(2): 302–310.
- Ezemonye L. and 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.
- Franco J.L., Trivella D.B.B., Trevisan R., Dinslaken D.F., Marques M.R.F., Bairy A.C.D. and Dafre A.L. 2006.** Antioxidant status and stress proteins in the gills of the brown mussel *Perna perna* exposed to zinc. *Chemico-Biological Interactions*, 160: 232–240.
- Gerber R., Smit N.J., Van Vuren J.H., Nakayama S.M., Yohannes Y.B., Ikenaka Y., Ishizuka M. and Wepener V. 2016.** Bioaccumulation and human health risk assessment of DDT and other organochlorine pesticides in an apex aquatic predator from a premier conservation area. *Science of the Total Environment*, 550: 522–533.
- Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. 2007.** *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, UK. 896P.
- Hansen B.H., Romma S., Garmo S.A., Olsvik P.A. and Andersen R.A. 2006.** Antioxidative stress proteins and their gene expression in brown trout (*Salmo trutta*) from three rivers with different heavy metal levels. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 143: 263–274.
- Hou Y.J., Zhao Y.Y., Xiong B., Cui X.S., Kim N.H., Xu Y.X. and Sun S.C. 2013.** Mycotoxin-

containing diet caused oxidative stress in the mouse. PLoS ONE, 8: 1–7.

- Husak V.V., Mosiichuk N.M., Maksymiv I.V., Storey J.M., Storey K.B. and Lushchak V.I. 2016.** Oxidative stress responses in gills of goldfish, *Carassius auratus*, exposed to the metribuzin-containing herbicide Sencor. Environmental Toxicology and Pharmacology, 45: 163–169.
- Jin Y., Zhang X., Shu L., Chen L., Sun L., Qian H., Liu W. and Fu Z.h. 2010.** Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). Chemosphere, 78: 846–852.
- Jonsson C.M., Arana S., Ferracini V.L., Queiroz S.C., Clemente Z., Vallim J.H., Maia A.D. and De Moura M.A. 2017.** Herbicide mixtures from usual practice in sugarcane crop: Evaluation of oxidative stress and histopathological effects in the tropical fish *Oreochromis niloticus*. Water, Air and Soil Pollution, 1(9): 228–332.
- Joseph B. and Raj S.J. 2011.** Impact of pesticide toxicity on selected biomarkers in fishes. International Journal of Zoological Research, 7(2): 212–220.
- Keramati V. 2009.** Effect of diazinon on the activity of antioxidant enzymes catalase in liver tissue of word fish (*Rutilus rutilus*). M.Sc. Thesis, Islamic Azad University, Iran. 100P.
- Khoda Bakhsh A., Jamili S., Motalebi A., Mashin Chiyan Moradi A. and Saravi H. 2014.** The effect of crude oil phase on the rate of antioxidant enzymes changes in infant fillet *Huso huso*, height finger as an oil pollution biomarker. Aquaculture Development Journal, 1: 46–57.
- Kim J.H., Rhee J.S., Lee J.S., Dahms H.U., Lee J., Han K.N. and Lee J.S. 2010.** Effect of cadmium exposure on expression of antioxidant gene transcripts in the river pufferfish, *Takifugu obscurus* (Tetraodontiformes). Comparative Biochemistry and Physiology C, 152(4): 473–479.
- Kim S., Jung D., Kho Y. and Choi K. 2014.** Effects of benzophenone-3 exposure on endocrine disruption and reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*)- A two generation exposure study. Aquatic Toxicology, 155: 244–252.
- Lin Y., Miao L.H., Pan W.J., Huang X., Dengu J.M., Zhang W.X., Ge X.P., Liu B., Ren M.C., Zhou Q.L., Xie J., Pan L.K. and Xi B.W. 2018.** Effect of nitrite exposure on the antioxidant enzymes and glutathione system in the liver of bighead carp,

- Aristichthys nobilis*. Fish and Shellfish Immunology, 76: 126–132.
- Monteiro D.A., De Almeida J.A., Rantin F.T. and Kalinin A.L. 2006.** Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). Comparative Biochemistry and Physiology C, 143(2): 141–149.
- Negro C.L. 2015.** Histopathological effects of endosulfan to hepatopancreas, gills and ovary of the fresh water crab (*Zilchiopsis collastinensis*). Ecotoxicology and Environmental Safety, 113: 87–94.
- Nwani C.D., Ifo C.T., Nwamba H.O., Ejere V.C., Onyishi G.C., Oluah S.N., Ikwuagwu O.E. and Odo G.E. 2015.** Oxidative stress and biochemical responses in the tissues of African catfish *Clarias gariepinus* juvenile following exposure to primextra herbicide. Drug and Chemical Toxicology, 38(3): 278–285.
- Oliveira Ribeiro C.A., Belger L., Pelletier E. and Rouleau C. 2002.** Histopathological evidence of inorganic mercury and methylmercury toxicity in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). Environmental Research, 90(3): 217–225.
- Pacher P., Beckman J.S. and Liaudet L. 2007.** Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. Physiological Reviews, 87: 315–424.
- Safari R. 2015.** Toxic effects of cadmium on antioxidant defense systems and lipid peroxidation in *Acipenser persicus* (Borodin, 1897). International Journal of Aquatic Biology, 3(6): 425–432.
- Safari R. 2018.** Study of stress related genes in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to cadmium chloride. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. 60P.
- Sarkar S., Mukherjee S., Chattopadhyay A. and Bhattacharya S. 2014.** Low dose of arsenic trioxide triggers oxidative stress in zebrafish brain expression of antioxidant genes. Ecotoxicology and Environmental Safety, 107: 1–8.
- Sassi A., Darias M.J., Said K., Messaoudi I. and Gisbert E. 2013.** Cadmium exposure affects the expression of genes involved in skeletogenesis and stress response in gilthead sea bream larvae. Fish Physiology and Biochemistry, 39(3): 649–659.
- Shukla S., Jhamtani R.C., Dahiya M.S. and Agarwal R. 2017.** Oxidative injury caused by individual and combined exposure of neonicotinoid, organophosphate and herbicide in zebrafish. Toxicology Reports, 4: 240–244.

- Silva Barni M.F., Gonzales M. and Miglioranza K.S.B. 2014.** Assessment of persistent organic pollutants accumulation and lipid peroxidation in two reproductive stages of wild silverside (*Odontesthes bonariensis*). *Ecotoxicol Environmental Healthy*, 99: 43–45.
- Tellez-Banuelos M.C., Santerre A., Casas-Solis J., Bravo-Cuellar A. and Zaitseva G. 2009.** Oxidative stress in macrophages from spleen of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to sublethal concentration of endosulfan. *Fish and Shellfish Immunology*, 27(2): 105–111.
- Valko M., Leibfritz D., Moncola J., Cronin M.T.D., Mazur M. and Telser J. 2007.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39: 44–84.
- Varanka Z., Rojik I., Varanka I., Nemcsok J. and Abraham M. 2001.** Biochemical and morphological changes in carp (*Cyprinus carpio*) liver following exposure to copper sulfate and tannic acid. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 128: 467–477.
- Waisberg M., Joseph P., Hale B. and Beyersmam D. 2003.** Molecular and cellular mechanisms of cadmium. *Toxicology*, 192: 95–117.
- Wang C., Harwood J.D. and Zhang Q. 2018.** Oxidative stress and DNA damage in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to the herbicide mesotrione. *Chemosphere*, 193: 1080–1086.
- Winston G.W. and Di Giulio R.T. 1991.** Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*, 19: 137–161.
- Winzer K., Winston G.W., Becker W., Van Noorden C.J.F. and Koehler A. 2001.** Sex-related responses to oxidative stress in primary cultured hepatocytes of European flounder (*Platichthys flesus*). *Aquatic Toxicology*, 52: 143–155.
- Yao H., Yu J., Zhou Y., Xiang Q and Xu C. 2018.** The embryonic developmental effect of sedaxane on zebra fish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 197: 1–27.



Research Paper

**Study of catalase and superoxide dismutase genes expression in presence of sublethal doses of endosulfan poison in zebrafish (*Danio rerio*)**

Fatemeh Kiapour<sup>1</sup>, Ali Shabani<sup>\*2</sup>, Roghieh Safari<sup>3</sup>

Received: May 2018

Accepted: August 2018

**Abstract**

In this study, the effect of sublethal doses of endosulfan poison (16, 32 and 64µg/L) was investigated on the expression of antioxidant enzyme genes (catalase and superoxide dismutase) in zebrafish (*Danio rerio*) during 14 days. For this purpose, sampling was done from each treatment on days 1, 2, 7 and 14 after exposure. RNA was extracted from liver, cDNA was synthesized and antioxidant enzyme gene expression was evaluated using Real-time PCR. The results of different time intervals showed an increase in the relative expression of studied genes in the endosulfan treated samples compared to the control group ( $P < 0.05$ ). The expression of both genes had the highest relative increase in the first 24 hours compared to other times and this trend was observed in all three doses of the study. Similarly, the relative expression of the studied genes showed a dose-dependent trend in all days of exposure. The results of this study indicated that changes in the gene expression of SOD and Cat enzymes can be considered as an effective indicator in ecotoxicology studies.

**Key words:** *Endosulfan, Stress Indices, Gene Expression, Zebrafish.*

1- M.Sc. in Department of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources, Gorgan, Iran.

2- Associate Professor in Department of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources, Gorgan, Iran.

3- Assistant Professor in Department of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources, Gorgan, Iran.

\*Corresponding Author: [ali\\_shabany@yahoo.com](mailto:ali_shabany@yahoo.com)