

مقاله پژوهشی

بررسی بیان ژن متالوتیونین در بافت کبد تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) پس از مواجهه با فلز کادمیم محلول در آب

علی صادق‌پور^۱، شهلا جمیلی^{۲*}، حسین خارا^۳، علی ماشینچیان^۴، شیرین جمشیدی^۵

تاریخ دریافت: خرداد ۹۹

تاریخ پذیرش: شهریور ۹۹

چکیده

برای بررسی اثر کادمیم در تغییر بیان ژن متالوتیونین به عنوان نشانگر زیستی، سه تیمار آزمایشی با غلظت‌های ۲۰۰ (تیمار اول)، ۴۰۰ (تیمار دوم) و ۸۰۰ (تیمار سوم) میکروگرم در لیتر کادمیم و یک تیمار شاهد (بدون کادمیم)، هر یک با سه تکرار در نظر گرفته شد. در پایان دوره ۱۴ روزه تیمار با کادمیم محلول در آب، میزان بیان ژن متالوتیونین در بافت کبد تاس‌ماهی ایرانی بررسی شد. استخراج RNA از بافت کبد انجام شد، cDNA ساخته شد و صحت بیان و تغییرات بیان ژن به ترتیب با روش کیفی RT-PCR و روش کمی Real Time PCR بررسی شد. پس از بررسی‌های آماری، نتایج بیان ژن متالوتیونین نشان داد که افزایش غلظت کادمیم در تیمارها به تغییرات بیان ژن متالوتیونین در بافت کبد تاس‌ماهی ایرانی منجر شد و در غلظت ۲۰۰ میکروگرم در لیتر افزایش معنی‌داری را در بیان ژن متالوتیونین نشان داد ($P < 0.05$). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که تغییرات بیان در ژن متالوتیونین تاس‌ماهی ایرانی می‌تواند به عنوان نشانگر زیستی مواجهه با فلز سنگین کادمیم در غلظت ۲۰۰ میکروگرم در لیتر مطرح باشد. اما به طور کلی، همیشه افزایش کادمیم محلول در آب منجر به افزایش بیان ژن در بافت کبد تاس‌ماهی ایرانی نخواهد شد و احتمالاً مکانیسم‌های دیگری در حمل این فلز در بدن تاس‌ماهی ایرانی دخیل باشند.

واژگان کلیدی: متالوتیونین، کادمیم، بیان ژن، تاس‌ماهی ایرانی.

- ۱- دانشجوی دکتری زیست‌شناسی دریا، گروه زیست‌شناسی دریا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
- ۲- دانشیار موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.
- ۳- دانشیار گروه شیلات، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران.
- ۴- استادیار گروه زیست‌شناسی دریا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
- ۵- استادیار گروه ژنتیک، موسسه تحقیقات بین‌المللی تاس‌ماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران.

* نویسنده مسئول: shalajamili45@yahoo.com

مقدمه

می‌شوند و می‌توانند با تاثیر در سطوح مختلف زنجیره‌های غذایی روی گونه‌های در معرض، پیامدهایی داشته باشند. کادمیم از عناصر سمی زنبیوتیک (Xenobiotic) است که هیچ گونه اثر زیستی مثبتی در موجودات زنده نداشته و زیان‌آور باشد. طبق تخمین سالانه، ۳۰۳ تن کادمیم محلول از رودخانه‌ها و نیز ۴۰۵ تا ۷۰۸ تن کادمیم محلول به صورت معلق از اتمسفر وارد اقیانوس‌ها می‌شود که بیشتر این مقادیر با منشا انسانی هستند (Neff, 2002). جانداران هنگامی که در معرض فلزات هستند مکانیسم‌های دفاعی متفاوتی برای حفاظت خود در برابر اثرات منفی این یون‌ها و ترکیبات آن‌ها دارند. متالوتیونین یکی از مکانیسم‌هایی است که در پاسخ به فلزات سنگین در جانوران القا می‌شود. متالوتیونین به عنوان جاذب فلزات سنگین مانند کادمیم، سرب و جیوه و فلزات سنگین ضروری مثل مس و روی می‌تواند به عنوان نشانگر زیستی مورد استفاده قرار بگیرد (Ivankovic et al., 2005). متالوتیونین‌ها نقش مهمی در فرآیندهای حفاظت سلولی در برابر عوامل مضر (فلزات، رادیکال‌های آزاد و غیره) و مکانیسم‌های کنترل کننده رشد، تمایز و تکثیر سلولی دارند. با توجه به اهمیت

بررسی انواع نشانگرهای زیستی در تعیین سطح آلاینده‌ها و نوع آن‌ها و همچنین مطالعه تاثیر زیستی و اکولوژیکی آن‌ها و نیز تعیین سطح سلامت اکوسیستم‌های دریایی در طرح‌های پایش زیست‌محیطی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. امروزه ابزارها و روش‌های مختلفی همچون نشانگرهای زیستی (Biomarkers)، زیست‌نشانگرها (Bioindicators) و غیره برای پایش سطح آلاینده‌های محیطی یا اثرات ناشی از آن‌ها بر گونه‌های زیستی و حتی در مقیاس اکوسیستم‌ها به کار می‌رود. متالوتیونین‌ها از جمله نشانگرهای زیستی هستند که برای مطالعه آلاینده‌های فلزات سنگین به کار می‌روند (Vardy et al., 2012). استفاده از نشانگرهای زیستی مطمئن‌ترین روشی است که می‌تواند اطلاعات قابل قبولی را در مورد میزان دسترسی آلاینده‌ها و اثر احتمالی آن‌ها را در اختیار قرار دهد (Amiard et al., 2006). فلزات سنگین از عوامل آلوده کننده اصلی برای موجودات آبی به ویژه ماهی‌ها هستند. این فلزات از راه‌های متفاوتی مانند پساب‌های صنعتی، معادن، فاضلاب‌های شهری، فعالیت‌های کشاورزی و آلودگی هوا (باران) وارد محیط‌های دریایی

تاثیرگذاری کادمیم بر روی ماهیان انجام شده است. در سال ۲۰۱۳، Zahedi و همکاران تاثیر کادمیم با غلظت ۰/۶۸ میلی‌گرم در لیتر را روی تاس‌ماهی ایرانی برای روزهای اول، هفتم و چهاردهم مورد آزمون قرار دادند و مشاهده کردند که در بافت‌های کلیه و آبشش میزان کادمیم در گروه‌های تیمار نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد و میزان آن در کلیه در انتهای دوره از اندام‌های دیگر بیشتر بود. میزان کورتیزول و گلوکز خون در روزهای ۷ و ۱۴ در ماهیان تیمار شده به صورت معنی‌داری متفاوت از شاهد بود که این نشان دهنده وارد آمدن استرس به جانور است. علاوه بر این بسیاری از شاخص‌های بیوشیمیایی خون جانور هم دستخوش تغییرات معنی‌دار شد که نشان دهنده تاثیرات مخرب این فلز روی جانور با گذشت زمان بود. از طرفی پژوهش‌های بسیار زیادی وجود دارد که تاثیرات مواجهه فلز کادمیم با آبی را در سطوح مختلف مثل آسیب بافتی، تغییرات شاخص‌های خونی، تغییرات آنزیمی و بیوشیمیایی خون، تغییرات هورمونی و تولیدمثلی، رشد، آسیب غدد فوق کلیوی و اختلال در تنظیم اسمزی گزارش و اثبات شده است (Reid and McDonald, 1988; Miliou et al., 1998; Lizardo-Dault et

سمیت‌زدایی متالوتیونین، می‌توان این پروتئین‌ها را به عنوان زیست‌نشانگر آلودگی فلزات در محیط زیست در نظر گرفت. از طرف دیگر مقایسه بین مقدار فلزات سنگین و متالوتیونین اندازه‌گیری شده نه تنها از جنبه‌های سم‌شناسی محیطی مفید است، بلکه از دیدگاه بیوشیمیایی نیز حائز اهمیت است، زیرا امکان درک بهتر عملکرد متالوتیونین‌ها را در یک موجود زنده فراهم می‌آورد.

تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)

از ماهیان بسیار با ارزش و اقتصادی دریای خزر است. در سال‌های گذشته جمعیت و ذخایر این ماهیان در سواحل ایرانی به مراتب بیشتر از گونه‌های دیگر و حتی تاس‌ماهی روس (*Acipenser gueldenstaedtii*) شده است (کیوان، ۱۳۸۲). در حال حاضر وضعیت تاس‌ماهی ایرانی به دلیل کاهش شدید ذخایر در طبقه‌بندی اتحادیه بین‌المللی حفاظت از گونه‌ها و طبیعت (IUCN International Union for Conservation of Nature) از در معرض خطر (Endangered: EN) به شدیداً بحرانی (Critically Endangered: CR) تغییر یافته است که نیاز به قوانین سختگیرانه بیشتر برای حفاظت از آن را نشان می‌دهد (CITES, 2020). مطالعات فراوانی در سال‌های اخیر روی

است که به درک بهتر پیوستگی فیزیولوژی با استرس‌های محیطی، سازگاری و تغییرات در سطح سلولی طی قرارگیری در معرض این عنصر کمک می‌کند.

مواد و روش‌ها

تهیه و نگهداری ماهیان

مطالعه حاضر در بخش تکثیر و پرورش مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان خاویاری دکتر یوسف‌پور (سیاهکل) انجام شد. در این مطالعه ۲۴ قطعه تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) جوان یک ساله با وزن تقریبی ۳۰۰ گرم به صورت تصادفی انتخاب شد. ماهیان در ۴ حوضچه ۵۰۰ لیتری توزیع (۶ قطعه ماهی در هر تیمار) و به مدت ۱۵ روز با شرایط آزمایشگاهی سازگار شدند. کلیه شرایط شامل غذادهی، هوادهی و مقدار آب حوضچه برای تمام ماهیان یکسان در نظر گرفته شد.

تیمار بندی و نمونه برداری

در این مطالعه از روش Roy و Bhattacharya (۲۰۰۶) برای محاسبه میزان کادمیم استفاده شد. بر این اساس از LC₅₀ کادمیم که در مطالعات Mirzaee و همکاران (۲۰۰۳) برای تاس‌ماهی ایرانی ۴۰۰۰ میکروگرم در لیتر به دست آمده بود، استفاده شد. برای

al., 2007; Akhtar et al., 2012; Crupkin et al., 2013; Dong et al., 2013; Negro, 2015). در این میان، از این تغییرات می‌توان به عنوان نشانگری برای نشان دادن در معرض بودن جانور آبی با فلز سمی کمک گرفت. تغییرات در سطح مولکولی مثل تغییر در سطح پروتئین‌های حامل فلزات مثل پروتئین متالوتیونین، HSP70 و P450 می‌تواند به عنوان نشانگر مواجهه تلقی شود. به عنوان مثال صفری و همکاران در سال ۱۳۹۳ تاثیرات سه غلظت ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم در لیتر را بر روی تغییرات بیان ژن P450 در تاس‌ماهی ایرانی مورد آزمایش قرار دادند و افزایش بیان این ژن را در کبد و آبشش ثبت کردند. از طرفی گزارش‌های زیادی درباره وجود فلز کادمیم در آب خزر و یا بافت گوشت ماهی بیشتر از حد استاندارد وجود دارد که لزوم پرداختن به موضوع تاثیرگذاری فلز کادمیم بر بیان ژن‌های نشانگر از جمله متالوتیونین را قوی‌تر می‌کند (سعیدی و همکاران، ۱۳۸۷؛ نصرالله‌زاده ساروی و همکاران، ۱۳۹۳؛ سینکا کریمی و همکاران، ۱۳۹۴).

هدف از انجام این پژوهش بررسی میزان سطح بیان ژن متالوتیونین با قرارگیری تاس‌ماهی ایرانی در معرض فلز سنگین کادمیم

آلمان) انجام شد. به این ترتیب که بافت پس از یخ‌زدایی داخل هاون کوبیده شد و بافر لیز کننده (Lysis Buffer) کیت روی آن ریخته شد. بقیه مراحل طبق دستور العمل کیت بدون اندکی تغییر انجام شد و در انتها از بافر رقیق کننده (Elution Buffer) کیت برای شستشوی RNA از روی ژل، استفاده شد. برای سنجش کمیت RNA استخراج شده از بررسی غلظت بافر لیز کننده در جذب ۲۶۰ نانومتر استفاده شد و برای بررسی کیفیت آن از بررسی محلول حاوی RNA روی ژل یک درصد استفاده شد. همچنین برای بررسی خلوص RNA استخراج شده، نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ با استفاده از دستگاه نانودراپ (Nanodrop 1000، Thermo Fisher، امریکا) برای هر نمونه مورد بررسی قرار گرفت. حذف DNA با استفاده از آنزیم DNase موجود در کیت انجام شد تا اختلالی در واکنش ارزیابی بیان ژن صورت نپذیرد.

برای ساخت cDNA (Complementary DNA) مقدار یک میکروگرم از RNA استخراج شده با استفاده از کیت حاوی آنزیم رونوشت معکوس (Reverse Transcriptase) و با حضور آغازگر یونیورسال oligo dt و بر اساس دستور العمل کیت سازنده (Roche، آلمان) در

تیمار بندی‌های اصلی از نمک کلرید کادمیم در سه غلظت تحت کشنده ۲۰۰ (تیمار ۱)، ۴۰۰ (تیمار ۲) و ۸۰۰ میکروگرم در لیتر (تیمار ۳) استفاده شد و یک تیمار هم به عنوان شاهد (بدون کلرید کادمیم) در نظر گرفته شد.

آزمایش به شیوه ساکن با تجدید محلول انجام شد و آب حوضچه‌ها هر دو روز یک بار تعویض و غلظت مورد نظر دوباره ساخته شد تا کاهش غلظت فلز پس از غذادهی به حداقل برسد و از آلودگی آب در اثر غذای اضافی ممانعت شود. ماهیان به مدت ۱۴ روز در معرض تیمارها قرار گرفتند.

نمونه برداری در روز چهاردهم انجام شد. برای این منظور بچه ماهیان با استفاده از پودر گل میخک (۰/۵ گرم در لیتر) بیهوش شدند. سپس بافت کبد آن‌ها جدا و بلافاصله در ازت مایع منجمد شد. نمونه‌ها تا شروع آزمایش‌های بعدی در فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج و ارزیابی کمیت و کیفیت RNA و ساخت cDNA

استخراج RNA از حدود ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت فریزر شده کبد در دمای -۸۰ درجه سانتی‌گراد توسط کیت ستون‌دار (QIAGEN،

شماره بازیابی KP164837 توسط نرم افزار Primer 3 طراحی شد و مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱). برای کنترل اختصاصی بودن آغازگرها برای تاس ماهیان، این آغازگرها با استفاده از برنامه Primer-Blast چک شدند. شناسایی اولیه ژن با استفاده از PCR سنتی (Conventional PCR) در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf، آلمان) در واکنش‌های ۱۰ میکرولیتری که شامل ۵ میکرولیتر از بافر مستر میکس PCR قرمز رنگ (Ampliqon، دانمارک) ۰/۳ میکرولیتر از آغازگرهای چپ و راست (۱۰ پیکومول در میکرولیتر)، ۴/۴ آب مقطر دیونیزه شده و ۱ میکرولیتر از محصول به دست آمده از واکنش ساخت cDNA بود، انجام شد.

دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد و در انتها آنزیم در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه غیرفعال شد.

طراحی آغازگر برای بررسی ژن متالوتیونین و شناسایی اولیه این ژن

آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن بتا اکتین تاس ماهی ایرانی بر اساس مطالعه Gilannejad و همکاران (۲۰۱۹) طراحی شد (جدول ۱). آغازگرهای به کار رفته برای ژن متالوتیونین تاس ماهی ایرانی نیز با استفاده از مناطق مشابه mRNA این ژن در تاس ماهی سفید (*Acipenser transmontanus*) با شماره بازیابی KP164836 و تاس ماهی دریاچه‌ای (*Acipenser fulvescens*) با

جدول ۱: ویژگی‌های آغازگرهای طراحی شده

ژن	کد بانک ژن	نام آغازگر	توالی آغازگر	اندازه قطعه (bp)	کارایی (٪) آغازگر
بتا اکتین	KF766533.1	β -actin	F: CCATCCTTCTTGGGTATGGA R: GCCAGGGTACATGGTGGTAC	۱۴۳	۹۹/۹۸
متالوتیونین	KP164836 KP164837	metal	F: ATGGATCCGCAATCTTGAC R: GGTGGCTCCCCCTTTGCA	۱۶۴	۹۹/۸۷

شاهد منفی قرار داده شد: ۱) شاهد منفی اول که شامل تمام موارد غیر از الگو بود و ۲) شاهد منفی دوم که شامل RNA استخراج شده بدون طی کردن مرحله ساخته شدن cDNA بود و این شاهد به منظور ردیابی احتمالی آلودگی به DNA ژنومی در نظر گرفته شد. بعد از آماده‌سازی نمونه‌ها واکنش Real-time PCR (Bio Rad, CFX96، امریکا) انجام شد. در آنالیز کمی Real-time PCR بر اساس چرخه‌های آستانه (Ct) از نمونه‌های مورد آزمایش (تیمارهای قرار گرفته در معرض کادمیم با غلظت‌های متفاوت) با نمونه‌های شاهد (شاهد منفی) با استفاده از رابطه ۱ نسبت ژن هدف به مرجع (R) محاسبه شد (Livak and Schmittgen, 2001).

رابطه ۱:

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

تجزیه و تحلیل آماری

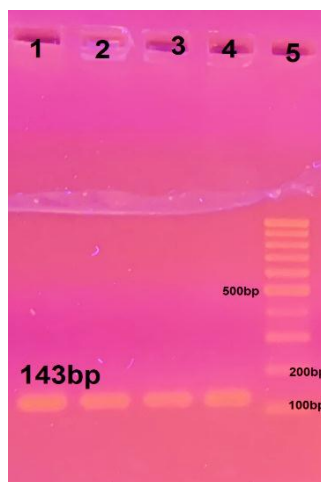
برای آزمودن نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگوروف اسمیرنوف (-Kolmogorov Smirnov) استفاده شد. برای مقایسه بین تیمارها از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و برای مقایسه میانگین بین تیمارها از پس‌آزمون توکی در

برنامه حرارتی مورد استفاده برای تکثیر ژن عبارت بود از: ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه حرارتی شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد در ۳۰ ثانیه، الحاق در دمای ۶۲-۵۴ درجه سانتی‌گراد در ۳۰ ثانیه و واسرشته‌سازی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد در ۲۰ ثانیه. گسترش انتهایی نیز در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد در ۵ دقیقه بود.

بررسی کمی بیان ژن متالوتیونین

برای بررسی میزان بیان ژن متالوتیونین و مقایسه آن از روش کمی Real-time PCR استفاده شد. به این ترتیب که ابتدا نمونه‌ها در پلیت ۹۶ خانه‌ای آماده‌سازی شدند. در این واکنش از روش کمی (Quantitative Method) بر اساس SYBR Green استفاده شد. مواد به کار رفته در هر واکنش شامل یک میکرولیتر cDNA الگوی به دست آمده از یک میکروگرم RNA (تولید شده توسط آنزیم Reverse Transcriptase)، آغازگرهای مستقیم و معکوس هر کدام با غلظت ۰/۲۵ میکرومولار، ۱۰ میکرو لیتر مخلوط Premix EX Syber Green، ۰/۵ میکرو لیتر Rox Reference Dye و ۹/۷ میکرو لیتر آب مقطر تزریقی بود. برای هر سری واکنش دو گروه

شکل‌های ۲ و ۳ نتایج RT-PCR ژن‌های بتا اکتین و متالوتیونین را در نمونه‌های کبد تاس‌ماهیان ایرانی در تیمارهای مختلف کادمیم نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود ژن بتا اکتین در کبد تاس‌ماهیان ایرانی به عنوان کنترل داخلی و ژن متالوتیونین به عنوان ژن هدف که بررسی بیان آن مورد نظر بود، تکثیر شدند. آغازگرهای مربوط به ژن بتا اکتین قطعه ۱۴۳ بازی و آغازگرهای مربوط به ژن متالوتیونین قطعه ۱۶۴ بازی را تکثیر کردند.



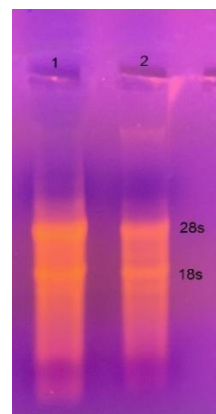
شکل ۲: باند تکثیر شده (RT-PCR) ژن کنترل داخلی بتا اکتین. ردیف ۱: ژن بتا اکتین در تیمار شاهد؛ ردیف ۲: ژن بتا اکتین در تیمار ۱ (۲۰۰ میکروگرم در لیتر)؛ ردیف ۳: ژن بتا اکتین در تیمار ۲ (۴۰۰ میکروگرم در لیتر)؛ ردیف ۴: ژن بتا اکتین در تیمار ۳ (۸۰۰ میکروگرم در لیتر)؛ ردیف ۵: نردبان (نشانه مولکولی) ۱۰۰kb.

سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. محاسبات آماری در نرم‌افزار SPSS 18 انجام شد. نمودار نیز در برنامه Graph Pad Prism 6 رسم شد.

نتایج

بررسی کمی و کیفی RNA استخراج شده

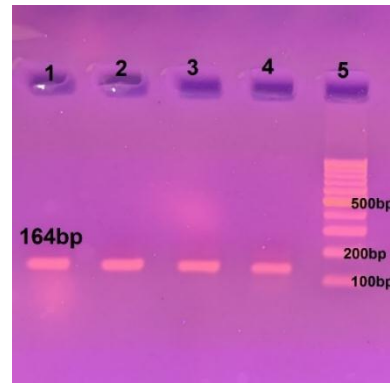
نسبت شدت جذب در نمونه‌های RNA استخراج شده از کبد تاس‌ماهیان ایرانی تیمار شده با غلظت‌های مختلف کادمیم در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر بین ۱/۸ تا ۲ بود که بیانگر کیفیت قابل قبول RNA استخراج شده است. ضمناً شکل ۱ نشان دهنده کیفیت مناسب RNA استخراج شده روی ژل آگارز ۱ درصد بود که باندهای ۲۸S و ۱۸S با کیفیت بالا در ژل قابل مشاهده است.



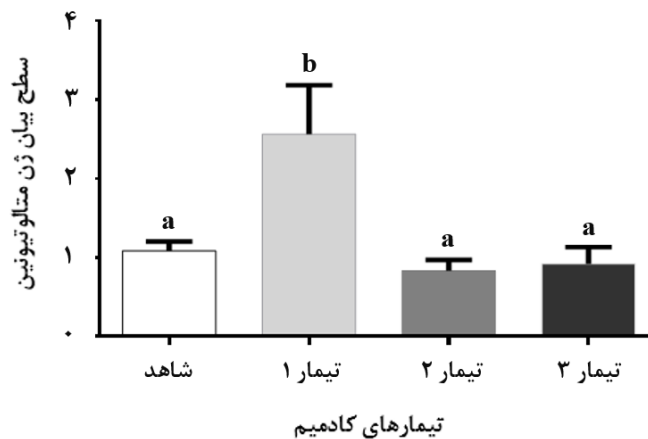
شکل ۱: دو نمونه از RNA استخراج شده کبد تاس‌ماهی ایرانی روی ژل آگارز ۱ درصد

بررسی بیان ژن متالوتیونین نسبت به ژن کنترل داخلی بتا اکتینین

شکل ۴ تغییرات سطح بیان ژن متالوتیونین را به عنوان نشانگر زیستی در تاس ماهی ایرانی در تیمارهای کادمیم نسبت به شاهد نشان می‌دهد. بیشترین میزان بیان ژن متالوتیونین ($2/56 \pm 0/61$) در تیمار ۱ (۲۰۰ میکروگرم در لیتر) مشاهده شد که با تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌دار داشت ($P < 0/05$). تفاوت معنی‌داری در بیان ژن متالوتیونین بین تیمارهای ۲ ($0/83 \pm 0/13$) و ۳ ($0/91 \pm 0/21$) و شاهد (۱) دیده نشد ($P > 0/05$).



شکل ۳: باند تکثیر شده (RT-PCR) ژن متالوتیونین. ردیف ۱: ژن متالوتیونین در تیمار شاهد؛ ردیف ۲: ژن متالوتیونین در تیمار ۱ (۲۰۰ میکروگرم در لیتر)؛ ردیف ۳: ژن متالوتیونین در تیمار ۲ (۴۰۰ میکروگرم در لیتر)؛ ردیف ۴: ژن متالوتیونین در تیمار ۳ (۸۰۰ میکروگرم در لیتر)؛ ردیف ۵: نردبان (نشانگر مولکولی) ۱۰۰kb.



شکل ۴: سطوح بیان ژن متالوتیونین در تیمارهای مختلف کادمیم در تاس ماهی ایرانی (میانگین ± خطای استاندارد). تیمار ۱: ۲۰۰ میکروگرم در لیتر کادمیم؛ تیمار ۲: ۴۰۰ میکروگرم در لیتر کادمیم؛ تیمار ۳: ۸۰۰ میکروگرم در لیتر کادمیم؛ حروف متفاوت روی نمودار نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P < 0/05$).

بحث

را در یک موجود زنده فراهم می‌آورد. از آنجایی که تاس‌ماهی ایرانی یکی از ماهیان با ارزش شیلاتی برای تولید خاویار و همچنین تولید گوشت خوراکی با کیفیت است و ذکر این نکته که این ماهی از سطوح بالای زنجیره غذایی تغذیه می‌کند، وجود کادمیم به عنوان یک فلز سنگین غیرضروری، منجر به تغییرات تولید متالوتیونین در کبد تاس‌ماهی ایرانی می‌شود. مطالعات انجام شده بر میزان تاثیرگذاری فلزات روی بیان ژن متالوتیونین تاس‌ماهیان (*Acipenseridae*) بسیار کم است. در مطالعاتی که روی تاس‌ماهی آتلانتیک (*Acipenser oxyrinchus*) و دو گونه *Acipenser brevirostrum* و *Scaphirhynchus platyrhynchus* انجام شد، نشان داده شد که تاس‌ماهیان جز حساس‌ترین ماهیان به افزایش میزان فلز مس هستند (Dwyer et al., 2005; Vardy et al., 2014). در مطالعه Doering و همکاران (۲۰۱۵) در تاس‌ماهی سفید مشاهده کردند که افزایش میزان کادمیم از ۰/۱ میکروگرم در لیتر تا ۳۰ میکروگرم در لیتر موجب افزایش بیان ژن متالوتیونین شد. اما بالاتر از این مقدار یعنی ۱۰۰ میکروگرم در لیتر نه تنها باعث افزایش بیشتر بیان ژن نشد، بلکه موجب کاهش آن شد.

پژوهش حاضر اولین مطالعه روی تاثیرپذیری ژن متالوتیونین تاس‌ماهی ایرانی مواجهه شده با کادمیم است. این مطالعه نشان داد که کادمیم به عنوان یک فلز سمی، منجر به افزایش معنی‌دار بیان ژن در تیمار ۲۰۰ میکروگرم در لیتر شد. این تغییر بیان ژن متالوتیونین در کبد تاس‌ماهی ایرانی احتمالاً برای دفع آلودگی فلزی بوده است. در مطالعه حاضر، از بین تغییرات تولید ژن متالوتیونین در سه تیمار ۱ تا ۳ تنها در تیمار ۱ که میزان فلز کادمیم ۲۰۰ میکروگرم در لیتر بود به میزان معنی‌داری افزایش بیان نشان داد و در تیمار ۲ (۴۰۰ میکروگرم در لیتر) و ۳ (۸۰۰ میکروگرم در لیتر) با وجود افزایش میزان کادمیم، در میزان تولید ژن متالوتیونین نسبت به تیمار شاهد تغییر معنی‌داری دیده نشد. با توجه به اهمیت سمیت‌زدایی متالوتیونین، می‌توان پروتئین متالوتیونین را به عنوان زیست‌نشانگر آلودگی فلزات در محیط زیست در نظر گرفت. از طرف دیگر مقایسه بین مقدار فلزات سنگین و متالوتیونین اندازه‌گیری شده نه تنها از جنبه‌های سم‌شناسی محیطی مفید است، بلکه از دیدگاه بیوشیمیایی نیز حائز اهمیت است، زیرا امکان درک بهتر عملکردهای متالوتیونین‌ها

آن‌ها علت این امر را کافی نبودن متالوتیونین برای حمل فلز سمی، قادر نبودن اتصال پروتئین به فلز یا نسبت پاسخ کمتر در زمانی که جانور در معرض میزان فلز زیاد قرار می‌گیرد، عنوان کردند (Doering et al., 2015). همچنین مطالعه مشابهی بر روی تاس‌ماهی دریاچه‌ای نشان داد که تغییرات غلظت کادمیم هیچ تاثیری معنی‌داری روی بیان ژن متالوتیونین نداشت (Doering et al., 2015). در سال‌های ۲۰۱۱، ۲۰۱۲ و ۲۰۱۴ مطالعات Vardy و همکاران نشان داد که تاس‌ماهی سفید در مراحل ابتدایی زندگی حساسیت بیشتری به افزایش فلز مس، کادمیم و روی در آب داشتند. تاثیرپذیری متفاوت از فلز در مراحل مختلف زندگی جانور آبی در مطالعات دیگری نیز مانند مطالعه Dwyer و همکاران (۲۰۰۵) بر روی نمایندگانی از راسته کپورماهی‌شکلان (Cypriniformes) همچون ماهی مینوی سر چربی (*Pimephales*, Fathead Minnows) از خانواده کپورماهیان، در مقایسه با خانواده‌های دیگر مانند تاس‌ماهیان و خانواده دافنی‌ها (*Daphniidae*)، دیده شده است. عدم تغییر معنی‌داری در بیان ژن متالوتیونین با افزایش میزان کادمیم آب در تیمارهای ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم در لیتر در مطالعه حاضر،

همچنین کاهش بیان ژن متالوتیونین همراه با افزایش فلز کادمیم در تاس‌ماهی سفید (Doering et al., 2015) با وجود انتظار افزایش بیان آن، یا معنی‌دار نبودن میزان بیان ژن متالوتیونین با افزایش کادمیم در تاس‌ماهی دریاچه‌ای (Doering et al., 2015) می‌تواند نشان دهنده این موضوع باشد که پروتئین متالوتیونین برای حمل فلز کافی نیست یعنی افزایش بیشتر فلز در محیط جانور منجر به بیان بیشتر پروتئین متالوتیونین نمی‌شود که علت آن می‌تواند این موضوع باشد که این پروتئین در تاس‌ماهیان قادر به حمل فلز در مقادیر بالا نیست و شاید مکانیسم پیچیده دیگری در این گروه از ماهیان برای مقابله با افزایش فلز سمی وجود دارد. در سال ۲۰۱۷ Wahid و همکاران در مارماهی باتلاقی (*Monopterus albus*) تایید میزان بیان ژن متالوتیونین را بر اساس غلظت کادمیم در آب بالادست و پایین‌دست رودخانه مورد آزمایش قرار دادند و دریافتند که غلظت کادمیم در بالادست و پایین‌دست متناسب با میزان بیان ژن متالوتیونین نیست. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که این نشانگر برای مواجهه مارماهی باتلاقی با فلز کادمیم نشانگر مناسبی نیست (Wahid et al., 2017). با این وجود، ممکن است یک پاسخ حداقلی در مقابل

متالوتیونین در تاس‌ماهی ایرانی شد، ولی در غلظت‌های بالاتر کادمیم میزان تولید پروتئین متالوتیونین متناسب با افزایش غلظت نبود است. بر اساس نتایج مشابه به دست آمده در برخی تاس‌ماهیان دیگر و در این مطالعه به نظر می‌رسد مکانیسم کاهش خطر ناشی از تعدیل فلزات سمی علاوه بر تولید متالوتیونین از روند دیگری که هنوز در تاس‌ماهیان شناسایی نشده است، تبعیت کند یا پروتئین متالوتیونین قادر به اتصال به فلز نیست و یا برای حمل کافی نیست.

تشکر و قدردانی

از مدیریت بخش تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری دکتر یوسف‌پور سیاهکل و همین‌طور آزمایشگاه ژنتیک موسسه تحقیقات بین‌المللی تاس‌ماهیان دریای خزر به جهت همکاری و فراهم‌سازی امکان انجام آزمایش‌های مولکولی سپاسگزاری می‌گردد.

افزایش میزان فلز کادمیم در آب ایجاد شود که دست کم در یکی از تیمارهای مطالعه حاضر (تیمار ۱ با ۲۰۰ میکروگرم در لیتر کادمیم) دیده شد. بنابراین تغییرات افزایش کادمیم در آب تا میزان ۲۰۰ میکروگرم در لیتر می‌تواند منجر به افزایش بیان ژن متالوتیونین در تاس‌ماهی ایرانی شود. اما میزان این افزایش پروتئین متالوتیونین متناسب با افزایش فلز در آب در غلظت‌های بالاتر تایید نشد و بر اساس مطالعاتی که برای تاس‌ماهیان دیگر انجام شد (صفری و همکاران، ۱۳۹۳)، عدم تناسب بیان پروتئین متالوتیونین با غلظت فلز کادمیم ممکن است به توانایی عدم اتصال پروتئین به فلز، کافی نبودن پروتئین متالوتیونین برای حمل فلز و پاسخ کمتر زمانی که جانور با میزان زیادی از فلز در محیط روبرو می‌شود، مربوط باشد.

در مجموع، غلظت ۲۰۰ میکروگرم در لیتر از کادمیم در آب منجر به افزایش بیان ژن

منابع

- سعیدی م.، جمشیدی ا. و عابسی ع. ۱۳۸۷. بررسی آلودگی فلزات سنگین سرب، نیکل، روی، مس و کادمیم در رسوبات جنوبی دریای خزر در استان مازندران. چهارمین همایش زمین‌شناسی کاربردی و محیط زیست. دانشگاه آزاد اسلامی واحد اسلامشهر. ۸ص (CAGE04_124).
- سینکا کریمی م.ح.، دنیوی ر. و صادقی باجگیران س. ۱۳۹۴. تعیین حد مجاز مصرف ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) از نظر فلزات سرب و کادمیم در سواحل جنوبی دریای مازندران. مجله علوم پزشکی زانکو، ۱۶(۴۹): ۳۲-۴۳.
- صغری ر.، کلنگی میاندره ح. و جعفرنوده ع. ۱۳۹۳. بررسی بیان ژن P450 در بافت‌های کبد
- 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.
- Amiard J.C., Amiard-Triquet C., Barka S., Pellerin J. and Rainbow P.S. 2006.** Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 76(2): 160–202.
- CITES. 2020.** Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES). Retrieved May 18, 2020, from <http://www.cites.org>.
- 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.
- و آبشش تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus* Borodin, 1897) در معرض کلرید کادمیوم. نشریه پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی، ۲(۳): ۴۳-۵۸.
- کیوان ا. ۱۳۸۲.** ماهیان خاویاری ایران، سیستماتیک، بیولوژی، تکثیر مصنوعی، ارزیابی و ترمیم ذخایر، بهره‌برداری. انتشارات نقش مهر. ۴۲۴ص.
- نصرالله‌زاده ساروی ح.، نجف‌پور ش.، رضایی م. و سلیمانی رودی ع. ۱۳۹۳. مطالعات تغییرات زمانی- مکانی فلزات سنگین (روی، مس، نیکل، کادمیم و جیوه) در آب سواحل ایرانی حوزة جنوبی دریای خزر. مجله زیست‌شناسی دریا، ۶(۲۱): ۱-۱۲.

- Doering J.A., Beitel S.C., Eisner B.K., Heide T., Hollert H., Giesy J.P., Hecker M. and Wiseman S.B. 2015.** Identification and response to metals of metallothionein in two ancient fishes: White sturgeon (*Acipenser transmontanus*) and lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*). *Comparative Biochemistry and Physiology (C)*, 171: 41–48.
- Dong M., Zhu L., Shao B., Zhu S., Wang J., Xie H., Wang J. and Wang F. 2013.** The effects of endosulfan on cytochrome P450 enzymes and glutathione S-transferase in zebrafish (*Danio rerio*) livers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 92: 1–9.
- Dwyer F.J., Hardesty D.K., Henke C.E., Ingersoll C.G., Whites D.W., Augspurger T., Canfield T.J., Mount D.R. and Mayer F.L. 2005.** Assessing contaminate sensitivity of endangered and threatened aquatic species. Part III. Effluent toxicity tests. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48: 174–183.
- Gilannejad N., Paykan Heyrati F. and Martinez-Rodriguez G. 2019.** Molecular basis of the digestive functionally in developing Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) larvae: Additional clues for its phylogenetics status. *Journal of Comparative Physiology (B)*, 189: 367–383.
- Ivankovic D., Pavicic J., Erk M., Filipovic-Marijic V. and Raspor B. 2005.** Evaluation of the *Mytilus galloprovincialis* Lam. digestive gland metallothionein as a biomarker in a long-term field study: Seasonal and spatial variability. *Marine Pollution Bulletin*, 50(11): 1303–1313.
- Livak K.J. and Schmittgen T.D. 2001.** Analysis of relative gene expression data using real-Time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Lizardo-Dault H.M., Bains O.S., Singh C.R. and Kennedy C.J. 2007.** Biosynthetic capacity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) interrenal tissue after cadmium exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 52: 66–90.
- Miliou H., Zaboukas N. and Moraitou Apostolopoulou M. 1998.** Biochemical composition, growth and survival of the guppy, *Poecilia reticulata*, during chronic sub-lethal exposure to calcium. *Archives Environmental Contamination and Toxicology*, 35: 58–63.
- Mirzaee M., Nezami S. and Mehdinejad K. 2003.** The toxicity of Heavy Metals on Persian Sturgeon. MS.c. Thesis, Islamic Azad University. 100 p.

- Neff J.M. 2002.** Bioaccumulation in Marine Organisms. Elsevier, Netherlands. 452P.
- Negro C.L. 2015.** Histopathological effects of endosulfan to hepatopancreas, gills and ovary of the freshwater crab *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda: Trichodactylidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113: 87–94.
- Reid S.D. and McDonald D.G. 1988.** Effects of Cd, Cu, and low pH on fluxes in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 45: 244–253.
- Roy S. and Bhattacharya S. 2006.** Arsenic-induced histopathology and synthesis of stress proteins in liver and kidney of (*Channa punctatus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65: 218–229.
- Vardy D.W., Oellers J., Doering J.A., Hollert H., Giesy J.P. and Hecker M. 2012.** Sensitivity early life stages of white sturgeon, rainbow trout and fathead minnow to copper. *Ecotoxicology*, 22: 139–147.
- Vardy D.W., Santore R., Ryan A., Giesy J.P. and Hecker M. 2014.** Acute toxicity of copper lead, Cadmium and zinc to early life stages of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) in laboratory and Columbia River water. *Environment Science and Pollution Research*, 21: 8176–8187.
- Vardy D.W., Tompsett A.R., Sighrdson J.I., Doering J.A., Zhang X., Giesy J.P. and Hecker M. 2011.** Effects of subchronic exposure of early life stages of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) to copper, cadmium and zinc. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30: 2487–2505.
- Wahid M., Prasarnpun M. and Yimtragool S.N. 2017.** Cadmium accumulation and metallothionein gene expression in the liver of swamp eel (*Monopterus albus*) collected from the Mae Sot District, Tak Province, Thailand. *Genetics and Molecular Research*, 16(3): 1–14 (gmr16039748).
- Zahedi S., Mirvaghefi A., Rafati M. and Mehrpoosh M. 2013.** Cadmium accumulation and biochemical parameters in juvenile Persian sturgeon, *Acipenser persicus*, upon sublethal cadmium exposure. *Comparative Clinical Pathology*, 22: 805–813.



Research Paper

Evaluation of metallothionein gene expression in liver tissue of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) after exposure to water-soluble cadmium

Ali Sadeghpour¹, Shahla Jamili^{2*}, Hossein Khara³, Ali Mashinchian⁴, Shirin Jamshidi⁵

Received: June 2020

Accepted: September 2020

Abstract

To evaluate the effect of cadmium on metallothionein gene expression changes as a biomarker, three experimental treatments including 200 (first treatment), 400 (second treatment) and 800 (third treatment) $\mu\text{g/L}$ and a control (without cadmium) were considered with three replications. After 14 days' period treatment with water soluble cadmium, the expression of metallothionein gene was investigated in the liver tissue of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). RNA extraction in liver tissue and cDNA synthesis were performed and the accuracy of gene expression and expression changes were evaluated by qualitative RT-PCR and quantitative Real Time PCR methods, respectively. Results of metallothionein gene expression after statistical analysis showed that the increasing cadmium concentration led to changes in metallothionein gene expression in the liver tissue of Persian sturgeon and at a concentration of 200 $\mu\text{g/L}$ showed a significant increase in metallothionein gene expression ($P < 0.05$). Therefore, it can be concluded that changes in metallothionein gene expression in Persian sturgeon can be considered as a biomarker of exposure to cadmium heavy metal at a concentration of 200 $\mu\text{g/L}$. But, in general, an increase in water-soluble cadmium does not always lead to an increase in gene expression in the liver tissue of Persian sturgeon, and probably, other mechanisms are involved in the transport of this metal in the body of Persian sturgeon.

Key words: *Metallothionein, Cadmium, Gene Expression, Persian Sturgeon.*

1- Ph.D. Student in Marine Biology, Department of Marine Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2- Association Professor in Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

3- Association Professor in Department of Fisheries, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.

4- Assistant Professor in Department of Marine Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

5- Assistant Professor in Department of Genetics, International Sturgeon Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.

*Corresponding Author: shalajamili45@yahoo.com