



دانشگاه گنبد کاووس

نشریه "پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی"

دوره ششم، شماره دوم، تابستان ۹۷

<http://jair.gonbad.ac.ir>

## بررسی اثر غلظت تحت کشنده کادمیوم بر میزان بیان ژن سیتوکروم P<sub>450</sub> (CYP1A) در بافت‌های کبد و آبشش بچه‌ماهی کپور معمولی *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758

صدیقه نمرودی<sup>۱</sup>، سهراب بوذرپور<sup>۲\*</sup>، محمد هرسیج<sup>۳</sup>، حامد پاک‌نژاد<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup>دانش‌آموخته کارشناسی ارشد زیست دریا، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران

<sup>۲</sup>استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران

<sup>۳</sup>استادیار گروه شیلات، دانشکده شیلات، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران

<sup>۴</sup>استادیار گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی

و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ ارسال: ۹۶/۵/۷؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۸/۳

### چکیده

آلودگی‌های دریایی یکی از معضلات عمده سلامت ماهیان و انسان می‌باشد. یکی از این عناصر آلوده کننده کادمیوم است که نقش بسزایی در ایجاد آلودگی‌های دریایی دارد. لذا در این مطالعه به بررسی اثر سمیت تحت کشنده یون کادمیوم بر میزان بیان ژن سیتوکروم P<sub>450</sub> (ژن حساس به آلودگی) در بافت‌های کبد و آبشش بچه ماهی کپور معمولی (*C. carpio*) در شرایط آزمایشگاه پرداخته شد. پس از قرارگیری بچه‌ماهی کپور معمولی در مجاورت کادمیوم با غلظت (۵۰/۱LC) نمونه‌گیری در روزهای ۱ و ۷ و ۱۴ از کبد و آبشش انجام شد و میزان بیان ژن P<sub>450</sub> در این بافت‌ها با روش Real-time-PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد کادمیوم به‌طور معنی‌داری بیان ژن P<sub>450</sub> در بافت کبد را افزایش داد و بیان ژن P<sub>450</sub> در آبشش در روز اول و چهاردهم در مواجهه با کادمیوم به‌طور معنی‌داری افزایش داشت. میزان نسبی بیان این ژن در کبد در مواجهه با کادمیوم در مقایسه با آبشش در روز چهاردهم به‌طور معنی‌داری بالاتر بود. کادمیوم بیان ژن P<sub>450</sub> را در این بافت‌ها افزایش داد.

واژه‌های کلیدی: *C. carpio*، نشانگر زیستی، آلودگی‌های دریایی، کلرید کادمیوم

\*نویسنده مسئول: [so.boozarpour@gmail.com](mailto:so.boozarpour@gmail.com)

## مقدمه

آبزیان به دلیل جایگاه خاص در رژیم غذایی انسان، از اهمیت بالایی برخوردارند و به همین جهت، حفظ و کنترل کمی و کیفی آن‌ها برای انسان نقش حیاتی دارد. در عصر حاضر با گسترش مراکز صنعتی و شهری در سواحل دریا، تردد کشتی‌ها، حفاری‌ها و تاسیسات استخراج نفت و گاز از حاشیه و بستر دریاها، تولیدات نفتی، سموم کشاورزی و بازگشت پساب‌ها به دریاها از طریق رودخانه‌ها عوامل اصلی آلاینده محیط آبزیان به‌شمار می‌آیند. در ترکیب شیمیایی این پساب‌ها، فلزات سنگین، شاخص‌ترین و خطرناک‌ترین اجزایی هستند که با افزایش غلظت آن‌ها در آب دریا مشکلات غیر قابل جبرانی به محیط زیست آبزیان وارد می‌کنند.

در قانون آب سالم که توسط سازمان حفاظت محیط زیست ایالات متحده مطرح شده است، ۱۲۶ اولویت آلاینده آب در ۱۰ گروه دسته‌بندی شده‌اند. از آلاینده‌های گروه فلزات سنگین که سمیت بیشتری دارند می‌توان به کادمیوم، کروم، جیوه، سرب، نیکل، قلع اشاره نمود. برخی از این فلزات از آلاینده‌های مهم آب دریا می‌باشند (Imami Rad *et al.*, 2011). منشاء ورود کادمیوم به اکوسیستم‌های آبی، جاری شدن پساب صنعتی کارخانه‌ها و پساب کشاورزی حاوی کودهای شیمیایی فسفره با میزان کادمیوم بالا در حوضه آبریز رودخانه‌ها می‌باشد. بیشتر کادمیوم ورودی به آب به سرعت جذب مواد معلق در آب می‌شوند و پس از انتشار در اکوسیستم، طعمه آبزیان می‌شود. کادمیوم با ورود به بدن موجودات زنده و تجمع در بافت‌های مختلف باعث بیماری‌های مهلکی می‌گردد (Dinarwand and Zargari, 2012). در خلیج گرگان، غلظت کادمیوم در نمونه‌های آب، ۶۱-۹۷ میکرو گرم برلیتر برآورد شده است (Saghali *et al.*, 2013). باتوجه به قانون ۱۰۵۳ موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران حداکثر مقدار مجاز کادمیوم در آب ۰/۰۰۳ میلی گرم برلیتر می‌باشد، کادمیوم موجود در آب دریای خزر ۲۰ تا ۳۰ برابر اندازه مجاز است.

ارزیابی میزان سمیت فلزات سنگین در آبزیان می‌تواند در آزمایشگاه و در محیط طبیعی انجام شود. سنجش‌های فیزیکی و شیمیایی فقط اطلاعات محدودی درباره حالت فلز و سطح آلودگی اکوسیستم به ما می‌دهد، در صورتی که مطالعات پایش زیستی اطلاعات بیشتری را در مورد سطح تجمع زیستی و اثرات سمی به وجود آمده ناشی از مواد مختلف ارائه می‌کند. برای بررسی وضعیت فیزیولوژیکی جانداران آبی و اثرات ثانویه آلاینده‌ها و نیز به منظور ارزیابی سلامتی آن‌ها از نشانگرهای زیستی استفاده می‌شود (Hedayati *et al.*, 2012). نشانگرهای زیستی پارامترهای شناسایی یک اثر در یک ارگانیسم می‌باشند که می‌تواند بیانگر تغییرات فیزیولوژیک، بیوشیمی و بافت‌شناسی حاصل از مواد شیمیایی و آلاینده‌های محیط زیست که در سطح سلولی، جمعیتی و حتی اکوسیستمی ایجاد شده در موجودات باشد.

به عبارتی هر گونه تغییر بیوشیمیایی، ژنتیکی، ایمنی و... که بتواند در یک نمونه بیولوژیک سنجیده شود را می توان به عنوان نشانگر زیستی معرفی نمود (Fasl-Bahar, 2013). موجودات زنده در شرایط نامساعد محیطی مکانیسم های متعدد سلولی را برای سازش به کار می گیرند (Sarmadian, 2014). برخی مولکول ها قسمتی از مکانیسم دفاعی، ترمیمی و یا سم زدایی سلول می باشند که از آن جمله می توان به متالوتیونین ها (Chan, 1995)، پروتئین های شوک حرارتی HSP<sub>70</sub> (Duffy *et al.*, 1999)، گلو تاتیون S-ترانسفراز (Ahmad *et al.*, 2004)، سوپراکسید دیسموتاز SOD (Pandey *et al.*, 2003)، کاتالاز (Lam, 2009) و آنزیم های سیتوکروم P<sub>450</sub> (Itakura *et al.*, 2005) اشاره کرد. آنزیم های سیتوکروم P<sub>450</sub> بزرگترین خانواده با بیش از ۲۷۰ عضو هستند، که آن ها را به صورت مخفف CYP<sub>450</sub> یا CYP نمایش می دهند. هر خانواده دارای زیر مجموعه و ایزوفرم های متعددی می باشد که دارای عملکردهای متنوع می باشند (El-garj and Wajidi, 2012). ایزوفرم CYP1A نسبت به سایر ایزوفرم های CYP واکنش بیشتری نسبت به آلاینده ها دارند (Kroon *et al.*, 2017).

از آنجا که آنزیم های سیتوکروم P<sub>450</sub> نقش مهمی در خنثی سازی و دفع مواد سمی در جانداران خصوصاً مهره داران ایفا می کنند، لذا بیان این ژن در بافت کبد از سایر بافت ها بیشتر می باشد. با این حال بیان آن در بافت های مختلفی از جمله آبشش، کلیه و روده مشاهده شده است (El-garj and Wajidi, 2012). این آنزیم ها با ورود آلاینده ها به بدن، القاء شده و بدین ترتیب موجب افزایش حلالیت آلاینده ها در آب و در نتیجه دفع آن ها از بدن می شوند (Chraghy *et al.*, 2012) با توجه به اهمیت سمیت کادمیوم در جانوران آبی، در این مطالعه از بیان ژن P<sub>450</sub> به عنوان نشانگر زیستی جهت بررسی اثر کادمیوم در بافت های کبد و آبشش بچه ماهی کپور معمولی استفاده گردید.

## مواد و روش ها

**تهیه ماهی و تیمارها:** از مرکز تحقیقات تکثیر و پرورش ماهی کردکوی تعداد ۱۰۰ قطعه بچه ماهی کپور (*C. carpio*) (۸ تا ۱۰ گرمی) تهیه و جهت سازگاری با محیط آزمایشگاه، به مدت دو هفته در آزمایشگاه نگهداری شد. از آنجایی که میزان غلظت LC<sub>50</sub> کادمیوم برای بچه کپور ماهیان  $4/64 \text{ mg/l}^{-10}$  گزارش شده است (Mekkawy *et al.*, 2012)، برای تهیه محلول با غلظت (LC<sub>50</sub> ۰/۱) به ازای هر لیتر آب ۹۰۰۰ میکروگرم از کلرید کادمیوم [Cd Cl<sub>2</sub>(2.5)H<sub>2</sub>O] محصول شرکت مرک آلمان، استفاده شد. ۵۰ قطعه بچه ماهی در تانک حاوی محلول کادمیوم با غلظت (LC<sub>50</sub> ۰/۱) رها سازی شد و ۵۰ قطعه دیگر در تانک شاهد رها سازی شد. ماهیان به مدت چهارده روز در معرض کادمیوم قرار گرفتند.

**نمونه‌گیری:** نمونه‌گیری با سه تکرار در سه تیمار (روزهای ۷، ۱ و ۱۴) انجام شد، ماهی‌ها پس از صید با استفاده از گل میخک بیهوش و کشته شدند و به‌منظور بررسی سطوح بیان ژن P<sub>450</sub> بافت کبد و آبشش آن‌ها به‌سرعت جدا شده، در ازلت مایع و سپس در فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

**استخراج RNA:** پس از اتمام کار نمونه‌گیری، استخراج RNA از ۵۰ میلی‌گرم نمونه بافت کبد، آبشش با استفاده از کیت استخراج RNA، Tripure (Roche آلمان) و طبق دستورالعمل شرکت انجام شد. کیفیت RNA با استفاده از ژل آگارز ۱٪ و مشاهده باندهای ۱۸s و ۲۸s مربوط به RNA ریبوزومی و همچنین با استفاده از بررسی نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ nm به ۲۸۰ nm توسط دستگاه اسپکتروفتومتر به‌دست آمد. علاوه براین، غلظت نمونه‌های RNA با سنجش میزان جذب آن در طول موج ۲۶۰ nm تعیین گردید.

**ساخت cDNA:** برای ساخت رشته اول cDNA براساس روش پیشنهادی شرکت Genet bio از RNA تیمار شده با DNaseI و آغازگر الیگو dT (۲۰-۱۸ الیگو نوکلئوتید) تیمار شده با آب DEPC استفاده شد. پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر ژن P<sub>450</sub> و  $\beta$ -actin (به‌عنوان ژن مرجع) در کپور معمولی توسط نرم‌افزار Gene Runner طراحی شد (جدول ۱) و اختصاصی بودن آن‌ها با استفاده از برنامه Primer-BLAST تأیید گردید.

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در بررسی اثر غلظت تحت کشنده کادمیوم بر میزان بیان ژن سیتوکروم P<sub>450</sub> (CYP1A) در بافت‌های کبد و آبشش بچه‌ماهی کپور معمولی (*C. carpio*).

| نام ژن تکثیر شونده | شماره دسترسی در NCBI | توالی (۵'-۳')                                                                     | طول قطعه (bp) |
|--------------------|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| P450               | AB048939.1           | F 5'-GCT GAG AGA AAA GAT CGG AAT GGA-3'<br>R 5'-AGA CGT ACA GTG AGG AAT GGT GA-3' | ۱۳۶           |
| B-actin            | M24113.1             | F 5'-TCT TGG GTA TGG AGT CTT GCG-3'<br>R 5'-GTC AGC AAT GCC AGG GTA CA-3'         | ۱۳۷           |

**واکنش Real-time-PCR:** سپس واکنش کمی (qPCR) با رنگ فلورسنت Sybergreen برای بررسی بیان ژن P<sub>450</sub> در تیمارهای روزهای ۱، ۷، ۱۴ در بافت‌های کبد و آبشش با پرایمرهای اختصاصی ژن‌های P<sub>450</sub> و  $\beta$ -actin در ۲ تکرار تکنیکی انجام گردید.

**تجزیه و تحلیل داده‌ها:** داده‌های به‌دست آمده جهت تعیین بیان نسبی ژن P<sub>450</sub> نسبت به ژن  $\beta$ -actin با روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  با استفاده از فرمول‌های ۲ تا ۴ محاسبه گردید.

$$\Delta Ct = Ct - \text{کنترل ژن} \quad \text{(فرمول ۲)}$$

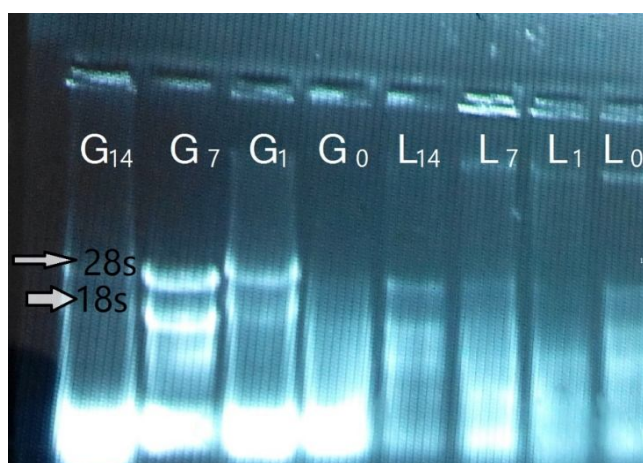
$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct_{\text{تیمار بدون تیمار}} \quad (\text{فرمول ۳})$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (\text{فرمول ۴})$$

آنالیز نسبت بیانی در بافت‌های کبد و آبشش در مقایسه با شاهد توسط آزمون T در سطح اطمینان ۹۵ درصد با استفاده از نرم افزار SPSS-15 و همین‌طور به کمک برنامه REST انجام شد. میزان بیان ژن P450 در تیمارهای مختلف بافت‌های کبد و آبشش با استفاده از نرم‌افزار Excell-2013 رسم گردید.

### نتایج

پس از استخراج کل RNA از بافت‌های کبد و آبشش ماهی‌های کپور معمولی تیمار شده با (LC ۵۰/۱) کلرید کادمیوم، کیفیت آن با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱٪ بررسی و باندهای ۱۸s و ۲۸s مربوط به RNA ریبوزومی مشاهده گردید (شکل ۱)

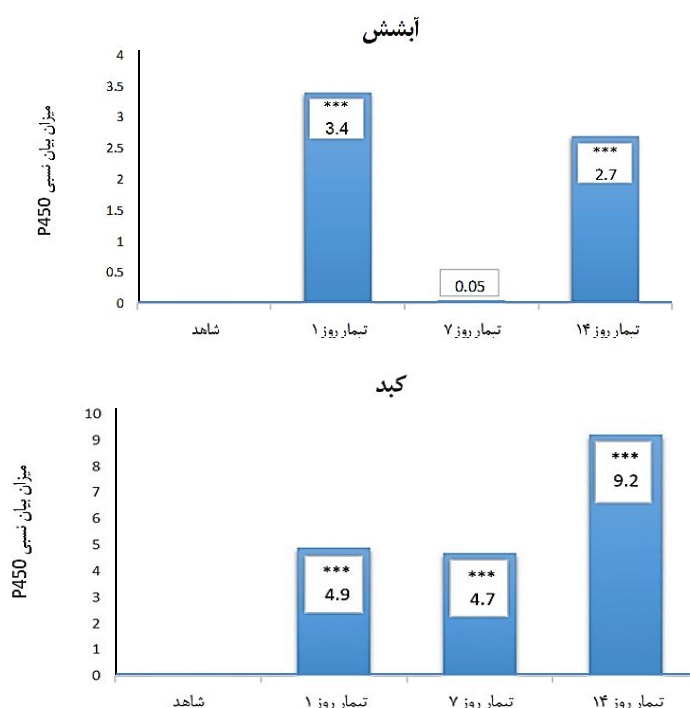


شکل ۱- بررسی کیفیت RNA استخراج شده با الکتروفورز ژل آگاروز ۰/۱٪ نمونه‌های کبد بچه‌ماهی کپور معمولی (*C. carpio*)، L<sub>0</sub> (شاهد)، L<sub>1</sub> (روز اول)، L<sub>7</sub> (روز هفتم)، L<sub>14</sub> (روز چهاردهم) و نمونه‌های آبشش. G<sub>0</sub> (شاهد)، G<sub>1</sub> (روز اول)، G<sub>7</sub> (روز هفتم)، G<sub>14</sub> (روز چهاردهم).

همچنین کیفیت RNA استخراج شده با بررسی نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ (OD ۲۶۰/۲۸۰) نشان داد که نمونه‌ها از لحاظ عدم آلودگی پروتئینی در وضعیت مناسبی می‌باشند. میزان جذب RNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر به‌طور میانگین حدود ۱/۲۷۰ می‌باشد که بیانگر این است که غلظت RNA در نمونه‌ها حدود ۵۰/۸ ng/μl باشد.

پس از سنتز cDNA به منظور بررسی اختصاصی بودن پرایمرها منحنی ذوب آنها رسم گردید و نتایج بیانگر اختصاصی بودن پرایمرهای مورد استفاده بود به‌طوری‌که تنها در منحنی ذوب یک پیک مشاهده گردید. همچنین منحنی استاندارد به‌منظور کارایی Real-time PCR برای هر یک از ژن‌ها رسم گردید.

آنالیز داده‌ها با نرم‌افزار Rest و نرم‌افزار SPSS در تمام موارد نتایج مشابهی داشت. نتایج نشان داد که در بافت کبد بیان نسبی ژن  $P_{450}$  پس از مواجهه یک روزه با کادمیوم در مقایسه با شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ( $p < 0.05$ ). این افزایش بیان در روزهای هفتم و چهاردهم نیز مشاهده گردید ( $p < 0.05$ ). در بافت آبشش بیان نسبی ژن  $P_{450}$  در روز اول مواجهه با کادمیوم در مقایسه با شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ( $p < 0.05$ ) ولی در روز هفتم مقدار بیان نسبی نسبت به روز اول کاهش یافت ( $p < 0.05$ ). با این حال با شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ( $p > 0.05$ ). از سوی دیگر، بیان نسبی  $P_{450}$  در بافت آبشش در روز چهاردهم به‌طور معنی‌داری افزایش نشان داد ( $p < 0.05$ ) که این افزایش بیان، مشابه روز اول تیمار با کادمیوم در بافت آبشش بود (شکل ۲).



شکل ۲- منحنی افزایش بیان ژن  $P_{450}$  در بافت کبد و آبشش بچه‌ماهی کپور معمولی (*C. carpio*) پس از ۱، ۷، ۱۴ روز مواجهه با کادمیوم.

## بحث و نتیجه گیری

توسعه فعالیت‌های کشاورزی و صنعتی راه ورود آلاینده‌های زیادی را به دریاها هموار کرده است که نتیجه آن آلوده شدن آبزیان و متعاقب آن انسان می‌باشد. از مهمترین آلاینده‌های وارد شده به آب دریاها، فلزات سنگین بویژه کادمیوم است. برخی از مواد موجود در اندام‌های موجودات زنده طی فرآیندهایی باعث کاتالیز آلاینده‌ها و محلول ساختن مواد بالقوه خطرناک و زائد در آب و در نتیجه دفع آن‌ها می‌شوند یکی از این مواد سیتوکروم P<sub>450</sub> می‌باشد. این آنزیم مسئول متابولیسم اکسیداتیو ترکیباتی چون پروستاگلاندین‌ها، اسیدهای چرب، متابولیت‌های گیاهی، استروئیدها و همچنین مواد شیمیایی سرطان‌زا و آلاینده‌های زیست‌محیطی است (Norman and Henry, 2014).

مطالعه حاضر افزایش بیان ژن P<sub>450</sub> را در بافت کبد ماهی کپور معمولی در مواجهه با کادمیوم نشان داد. هاردینگهام و همکاران (Hardingham *et al.*, 1997) بیان نمودند که کادمیوم می‌تواند به‌طور غیرمستقیم با فعال‌سازی پروتئین‌کینازهایی که موجب افزایش بیان ژن‌ها (فسفریلاسیون انواع فاکتورهای رونویسی) می‌شوند اثر خود را اعمال کند، بدین طریق منجر به افزایش بیان ژن P<sub>450</sub> می‌شوند. در مطالعات متفاوت، گزارش‌های متعددی از القاء یا عدم القاء ایزوفرم CYP1A در حضور آلاینده‌های متفاوت در کبد ماهی ارائه شده است (Deér *et al.*, 1998; Goksøyr and Husøy, 1998 ; Van der Weiden *et al.*, 1994) امکان القاء ژن P<sub>450</sub> را در حضور سموم مشخص<sup>۲</sup> در کبد کپور معمولی بررسی کردند و در همه تیمارها بجز تیمارهای PCB<sub>(153)</sub> و OCDD القاء ژن P<sub>450</sub> را مشاهده کردند.

مشاهده افزایش بیان ژن P<sub>450</sub> در اولین روز مواجهه با کادمیوم، در مطالعه حاضر می‌تواند به‌علت هجوم مقدار زیادی یون کادمیوم، موجب اختلال در قابلیت نفوذپذیری غشاء سلول‌های بافت‌های در معرض آلودگی (کبد و آبشش) گردد (Lee and Stuebing, 1990). این امر موجب می‌شود یون‌های کادمیوم از طریق کانال‌های کلسیم وارد سیتوزول شده و بدین طریق منجر به افزایش بیان ژن P<sub>450</sub> شوند.

کاهش میزان آنزیم سیتوکروم در هفتمین روز تیمار در بافت آبشش با کادمیوم می‌تواند ناشی از برقراری تعادل یونی جدید در اثر سازگاری با شرایط باشد (Huang *et al.*, 2014). احتمالاً در طی تیمار ۷ روزه، میزان ورود کلسیم به سلول به‌علت هجوم یون‌های کادمیوم به کانال‌های کلسیمی کاهش می‌یابد، این امر موجب آزاد شدن یون‌های کلسیم از ذخایر سلولی شده، تا میزان یون کلسیم سیتوزولی به حد طبیعی خود برسد، افزایش یون کلسیم به‌طور طبیعی موجب بسته شدن کانال‌های کلسیمی و در نتیجه کاهش ورود کادمیوم و پیرو آن کاهش بیان ژن P<sub>450</sub> می‌گردد (Ortega *et al.*, )

1. PCB<sub>(118,126,153)</sub>، PnCDD، PnCDF، OCDF، OCDD، TCDD، TCDF، HxCDD

(2014). مطالعات مختلف آسیب‌های سلولی مقاطع زمانی مختلف را عامل موثری در کاهش بیان ژن P<sub>450</sub> می‌داند (Softeland *et al.*, 2010). ولی مطالعات بافت‌شناسی انجام گرفته، آسیب‌های سلولی یکسانی را در روز ۷ و ۱۴ پس از تیمار نشان داده‌اند (Namroodi *et al.*, 2016). لذا این موضوع نمی‌تواند دلیلی بر کاهش بیان در روز هفتم باشد. جاوا و همکاران (Gaoa *et al.*, 2011) در مطالعه‌ای نشان دادند که بیان ژن P<sub>450</sub> در بافت آبشش ماهی آبنوس تیمار شده با آلاینده‌های PCB<sub>126</sub> و ایندیگو پس از حدود ۹ تا ۶ ساعت به حداکثر بیان خود می‌رسد. بیان این ژن پس از یک روز تیمار کاهش یافته، به‌طوری‌که در روز ۹ مواجهه با آلاینده ایندیگو بیان ژن P<sub>450</sub> در حد نمونه شاهد گزارش گردید. این مشاهدات هم راستا با نتایج حاصل از مطالعه حاضر می‌باشد و کاهش بیان در آبشش پس از ۷ روز مواجهه با کادمیوم را توجیه می‌کند. کادمیوم بر محتوای آنزیم P<sub>450</sub>، با توانایی تحریک یا مهار ایزوفرم‌های مختلف P<sub>450</sub> مرتبط است. با توجه به اینکه بیان ایزوفرم‌های متفاوت P<sub>450</sub> وابسته به غلظت و زمان مواجهه است (Plewka *et al.*, 2004)، کاهش بیان ایزوفرم CYP1A در بافت آبشش پس از ۷ روز تیمار با کادمیوم احتمالاً به علت کاهش غلظت کادمیوم و عدم اثر بر بیان این ایزوفرم در بافت آبشش بوده است. با این حال جاوا و همکاران (Gaoa *et al.*, 2011)، همچنین افزایش بیان ایزوفرم CYP1B1 در بافت آبشش ماهی آبنوس تیمار شده با PCB<sub>126</sub> را چندین برابر تیمار ۳ ساعته در طول تیمار ۹ روزه گزارش دادند. این امر حاکی از این است که در روز ۷ مواجهه با کادمیوم، ایزوفرم‌های دیگری می‌توانند در مقابله با سمیت کادمیوم اثرگذار باشند.

افزایش بیان مجدد ژن P<sub>450</sub> در روز چهاردهم در بافت آبشش، احتمالاً به‌علت کاهش میزان یون کلسیم ذخیره سلولی در طی روزهای ۷ تا ۱۴ است، زیرا کاهش Ca<sup>+</sup> منجر به باز شدن کانال‌های کلسیمی و در نتیجه افزایش ورود کادمیوم به سلول‌های آبشش می‌باشد، که می‌تواند منجر به افزایش بیان مجدد ایزوفرم CYP1A P<sub>450</sub> گردد. صفری و همکاران (Safari *et al.*, 2014) در تحقیقی با بررسی میزان بیان ژن P<sub>450</sub> در بافت‌های کبد و آبشش تاس‌ماهی ایرانی در معرض کلرید کادمیوم نتایج مشابهی را در غلظت‌های ۴۰۰ میکروگرم در لیتر و ۸۰۰ میکروگرم در لیتر برای بافت آبشش در روزهای ۷ تا ۱۴ گزارش نمودند.

بیان نسبی P<sub>450</sub> در روز ۱۴ تیمار با کادمیوم به‌طور معنی‌داری نسبت به روز اول تیمار با آن در بافت کبد افزایش نشان داد. این تفاوت احتمالاً بیانگر این است که میزان کادمیوم در بافت کبد در روز ۱۴ مواجهه، بیشتر از روز اول مواجهه باشد. آنالیز داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS نشان داد، میزان بیان نسبی ژن P<sub>450</sub> در کبد ماهی کپور معمولی در مواجهه با کادمیوم در روز چهاردهم به‌طور معنی‌داری بالاتر از آبشش است. این مشاهده یک بار دیگر نشان می‌دهد که کبد ماهی کپور نقش مؤثرتری در سم‌زدایی دارد.

با توجه به نتایج حاصل به نظر می‌رسد ایزوفرم CYP1A<sub>P450</sub> در بافت کبد ماهی کپور معمولی نشانگر زیستی مناسبی است، با این حال به نظر می‌رسد ایزوفرم‌های دیگری برای بررسی آلودگی در آبشش ماهی کپور معمولی مناسبتر از CYP1A باشند. لذا پیشنهاد می‌گردد که سایر ایزوفرم‌های P<sub>450</sub> در بافت‌های ماهی کپور نیز برای ارزیابی وجود آلودگی استفاده شود.

### تشکر و قدردانی

بدینوسیله از گروه زیست‌شناسی و گروه شیلات دانشگاه گنبد کاووس و دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، که در به انجام رسیدن این تحقیق همکاری نمودند تشکر و قدردانی می‌گردد.

### منابع

- Ahmad I., Pacheco M., Santos M.A. 2004. Enzymatic and nonenzymatic antioxidants as an adaptation to Phagocyte-induced damage in (*Anguilla anguilla*). Following in situ harbor water exposure. *Ecotoxicology and Environment Safety*, 57: 290-302.
- Chan K.M. 1995. Methalothionin: Potentital biomarker for monitoring heavy metal Pollution in fish around Hong Kong. *Marine Pollution Bulletin*, 31: 411-415.
- Chraghy M., Spargham A., Zaboli A. 2012. Cytochrome P<sub>450</sub> and Its Role in Toxicity. In: *The First National Conference on Environmental Conservation and Planning*, pp:18-18. (In Persian).
- Deér K.A., Banka L., Nemcsók J., Ábrahám M. 1998. Effects of  $\beta$ -naphthoflavone and cadmium on inducibility of CYT P<sub>450</sub> monooxygenases in fresh water fishes. *Pathophysiology*, 5(1): 95-96.
- Dinarwand K., Zargari M. 2012. Rare elements, cancer and health. *Feyz-Journal of Kashan University of Medical Sciences*, 16(7): 773-774. (In Persian).
- Duffy L.K., Scofield T., Patton M., Bowyer R.T. 1999. Comparative baseline levels of mercury, HSP70 and HSP90 in subsistence fish from the Yukon-Kuskokwim delta region of Alaska. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 124(2): 181-189.
- El-garj F., Wajidi M. 2012. The Cytochrome P<sub>450s</sub>. *Asia-Pacific Journal of Molecoelar Biology and Biotechnology*, 21(2): 37-41.
- Fasl-Bahar S.h. 2013. Application of biological markers and their types. *Marine Science and Technology Journal*, 70: 24-31. (In Persian).
- Fisher M.A., Mehne C., Means, J.C. Ide C.F. 2006. Induction of CYP1A mRNA in Carp (*Cyprinus carpio*) from the Kalamazoo River Polychlorinated Biphenyl-Contaminated Superfund Site and in a Laboratory Study. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 50: 14-22.

- Gaoa K., Brandta I., Goldstoneb J., Jönssona M. 2011. Cytochrome P<sub>450</sub> 1A, 1B, and 1C mRNA induction patterns in three-spined stickleback exposed to a transient and a persistent induce. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology*, 154(1): 42–55.
- Goksøyr A., Husøy A.M. 1998. Immunochemical approaches to studies of CYP1A localization and induction by xenobiotics in fish. *Fish Ecotoxicology*, 86: 165–202.
- Hardingham GE., Chawla S., Johnson C.M., Bading H., 1997. Distinct Functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *MRC Laboratory of Molecular Biology*, 357: 260–265.
- Hedayati S.A., Jahanbakhshi AS., Ghadiri Ramasei F. 2012. Aquatic toxicity. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. Gorgan, Iran. 210 P. (In Persian).
- Huang G.Y., Ying G.G., Liang Y.Q., Liu S.S., Liu U.S. 2014. Expression patterns of metallothionein, cytochrome P<sub>450</sub>1A and vitellogenin genes in western mosquitofish (*Gambusia affinis*) in response to heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 105: 97–102.
- Imami Rad A., Chobkar N., Hosseini Sh. 2011. Environmental pollution and its control strategies with emphasis on new processes. Tehran, University Jihad, Amir Kabir Industrial Complex. Tehra, Iran. 202 P. (In Persian).
- Itakura T., Elkady M., Mitsu R., Kaminishi Y. 2005. Complementary DNA cloning and constitutive expression of cytochrome P<sub>450</sub> 1c1 in the gills of carp (*Cyprinus carpio*). *Environmental Sciences: an International Journal of Environmental Physiology and Toxicology*, 12(2): 111–120.
- Kroon F, Streten C, Harries S. 2017. A protocol for identifying suitable biomarkers to assess fish health: A systematic review. *PLOS ONE*, 12(4): 1–43.
- Lam P. 2009. Use of biomarkers in environmental monitoring. *Ocean & Coastal Management*, 52: 348–354.
- Lee Y.H., Stuebing R.B. 1990. Heavy metal contamination in the river toad, *Bufo Juxtasper* (Inger), near a copper mine in east Malaysia. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 45(2): 272–279.
- Mekkawy I.A.A., Mahmoud U.M., Wassif E.T., Naguib M. 2012. Protective Roles of Tomato Paste and Vitamin E on Cadmium-induced Histological and Histochemical Changes of Liver of *Oreochromis niloticus*. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 7: 240–265.
- Namroodi S., Boozar pour S., Harsij M., Kolangi Miandare H. 2016. The effects of sublethal concentrations of cadmium on liver and gill of (*Cyprinus carpio*). *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 5(3): 65–78. (In Persian).
- Norman A., Henry H. 2014. Hormones. Academic Press; 3 edition. 430 P.

- Ortega P., Custódio M.R., Zanotto F.P. 2014. Characterization of cadmium plasma membrane transport in gills of a mangrove crab *Ucides cordatus*. *Aquatic Toxicology*, 157: 21-29.
- Pandey S., Parvaz S., Sayeed I., Haque R., Bin-Hafeez B., Raisuddin S. 2003. Biomarker of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallage attu*. *The Science of the Total Environmental*, 309: 105-115.
- Plewka A., Plewka D., Nowaczyk G., Brzóska MM., Kamiński M., Moniuszko-Jakoniuk J. 2004. Effects of chronic exposure to cadmium on renal cytochrome P<sub>450</sub>-dependent monooxygenase system in rats. *Archives of Toxicology*, 78(4): 194-200.
- Safari R., Shabany A., Ramazanipour S., Kolangi H. 2014. The effect of sublethal pesticide endosulfan on HSP<sub>70</sub> gene expression and gill tissue damage in the Persian sturgeon, (*Acipenser persicus* Borodin, 1897). *Journal of Aquaculture Development*, 9(2): 65-80. (In Persian).
- Saghali M., Baqraf R., Patimar R., Hosseini SA., Baniemam M. 2013. Determination of heavy metal (Cr, Zn, Cd and Pb) concentrations in water, sediment and benthos of the Gorgan Bay (Golestan province, Iran). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 13(2): 449-455.
- Sarmadian S. 2014. Investigation of metallutinin gene expression as a cadmium exposure biomarker in oyster *Crassostrea sp.* MSc thesis, Marine Science and Technology University of Khorramshahr, Faculty of Marine Sciences, Khorramshahr, Iran.
- Softeland L., Holen E., Olsvik P.A. 2010. Toxicological application of primary hepatocyte cellcultures of Atlantic cod (*Gadus morhua*), effects of BNF, PCDD and Cd. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 151: 401-411.
- Van der Weiden M., AVries LP., Fase K., Celander M., Seinen W., Van Den Berg M. 1994. Relative potencies of polychlorinated dibenzo-P-dioxins (PCDDS), dibenzofurans (PCDFS) and biphenyls (PCBS), for cytochrome P<sub>450</sub> 1A induction in the mirror carp (*Cyprinus carpio*). *Environmental Health Perspectives*, 29(3-4): 163-182.

