



دانشگاه گنبد کاووس

نشریه "پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی"

دوره دوم، شماره چهارم، زمستان ۹۳

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

تغییرات بیان ژن‌های فاکتورهای القای هایپوکسی (*hif-2α*, *hif-1α*) و فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (*vegf*) تحت تأثیر کلرید کادمیوم ($CdCl_2$) در تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus* Borodin, 1897)

مهتاب نیک‌نژاد^{۱*}، علی شعبانی^۲، حامد کلنگی میاندره^۲، رقیه صفری^۲

^۱دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

^۲دانشیار گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

^۳استادیار گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ ارسال: ۹۳/۱۱/۲۷ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۱

چکیده

کادمیوم یکی از مهمترین آلاینده‌هایی محسوب می‌شود که میزان آن در دریای خزر رو به افزایش است. کادمیوم فلزی غیرضروری است که نقش مهمی در واکنش‌های بیوشیمیایی بدن موجودات زنده ایفا نمی‌کند. این عنصر اثرات آلاینده‌گی بیشتری نسبت به سایر فلزات سنگین دارد و حتی در غلظت‌های پایین می‌تواند سبب مسمومیت موجودات آبی گردد. این تحقیق با هدف بررسی اثرات کلرید کادمیوم بر میزان بیان ژن‌های القای هایپوکسی (*hif-2α*, *hif-1α*) و فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (*vegf*) در تاس‌ماهی ایرانی (*A. persicus*) انجام شد. با استفاده از روش سایبرگرین تغییرات در بیان ژن‌های *hif-2α*, *hif-1α* و *vegf* در بافت آبشش تاس‌ماهی ایرانی با استفاده از روش Real time PCR با قرارگیری در معرض غلظت‌های مختلف کلرید کادمیوم (۲۰۰ و ۸۰۰ میکرومول) بررسی شد. نتایج نشان داد با افزایش غلظت کادمیوم، میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه افزایش پیدا کرد. بنابراین می‌توان گفت کادمیوم از جمله عواملی است که بر بیان ژن‌های القای هایپوکسی (*hifs*) تأثیرگذار است و باعث افزایش مکانیسم رگ‌زایی (آنژیوژنیز) می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: عوامل القای هایپوکسی، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی، کادمیوم، تاس‌ماهی ایرانی

*نویسنده مسئول: nik_mahtab@gmail.com

مقدمه

با توجه به رشد روز افزون جمعیت و صنعتی شدن طی ۴۰ سال گذشته به‌ویژه در ۱۰ سال اخیر میزان آلودگی‌های دریای خزر افزایش یافته است (Pourang *et al.*, 2003). از آنجا که دریای خزر محیطی بسته است، آلودگی‌هایی که از حوضه ساحلی وارد دریا می‌شود در آن تجمع پیدا می‌کند (Ballschmiter *et al.*, 1983). آلودگی‌های شیمیایی دریای خزر به‌طور عمده مربوط به تراوش از چاه‌های نفت و فاضلاب‌های ناشی از فعالیت‌های شهری است که به رودها و سپس دریا ریخته می‌شود (Karpinsky, 1992). آلاینده‌های فلزات سنگین به خاطر قدرت آلایندگی دارای اهمیت ویژه‌ای می‌باشند، چرا که این فلزات تجزیه نشده بلکه فقط ترکیبات شیمیایی آنها تغییر پیدا می‌کند. در نهایت این فلزات در آب، رسوبات و موجودات دریایی تجمع پیدا می‌کنند (DHI, 2001). در میان فلزات سنگین، کادمیوم یکی از آلوده‌کننده‌های مهم محیط‌های آبی محسوب می‌شود که در مقادیر بحرانی و خطرناک در منابع آبی یافت می‌شود. کادمیوم فلزی غیرضروری است که نقشی در واکنش‌های بیوشیمیایی بدن موجودات زنده ایفا نمی‌کند، بنابراین اثرات آلایندگی بیشتری نسبت به سایر فلزات سنگین دارد و می‌تواند سبب مسمومیت موجودات آبی حتی در غلظت‌های پایین شود، به‌طوری که کادمیوم به‌عنوان یکی از سمی‌ترین آلاینده‌های آب معرفی شده است (Witeska, 2001; Sikorska and Wolnicki, 2006; GT Wilson, 1992). کادمیوم از طریق آب یا غذا وارد بدن ماهی می‌شود و اعتقاد بر این است آلودگی با این فلز بافت‌هایی نظیر ماهیچه، پوست و به‌طور عمده اندام‌های آبشش، کبد و کلیه را درگیر می‌نماید (Sobha *et al.*, 2007). بر اساس منابع علمی تماس با غلظت‌های متفاوت این فلز در ماهیان موجب اثرات آسیب‌شناسی، تغییرات آنزیمی، تغییرات فراسنجه‌های خون‌شناسی، رفتاری، ژنتیکی در گونه‌های مختلف آبریان می‌گردد (Smet and Blust, 2001; Waisberg *et al.*, 2003; Faucher *et al.*, 2008; Suresh *et al.*, 2010; Joseph and Raj, 2011; *al.*, 2009; Cambier *et al.*, 2010). که از این تغییرات می‌توان به عنوان نشانگر زیستی به منظور بررسی وجود آلاینده‌ها استفاده نمود (Oliveira *et al.*, 1995). اعتقاد بر این است که تغییرات ناشی از کادمیوم می‌تواند سطوح hif-1 α را تحت تأثیر قرار دهد.

عوامل القای هایپوکسی (hifs) از دو زیرواحد α و β تشکیل شده است. اشکال فرم‌های نوع آلفا شامل hif-1 α ، hif-2 α و hif-3 α بوده و نوع بتا در واقع همان‌هایی هستند که پیش‌تر با عنوان ARNT خوانده می‌شدند (Gu *et al.*, 1998; Wiesener *et al.*, 1998). شکل بتا علاوه بر نقشی که در سیگنال‌دهی در شرایط کمبود اکسیژن دارد، باعث بیان ژن در سلول‌ها به واسطه قرارگیری در معرض دیوکسین‌ها و دیگر آلوده‌کننده‌های هیدروکربنی می‌شود. hif-1 β در همه سلول‌ها یافت می‌شود اما hif-1 α در شرایط اکسیژن نرمال به میزان خیلی کم وجود دارد. به‌طور ویژه hif-1 α یک تنظیم‌کننده مهم برای پاسخ در برابر شرایط

هایپوکسی شامل تکامل رگ‌های خونی و گلبول‌های قرمز است (Semenza, 2004; Nikinmaa and Rees, 2005).

در شرایط اکسیژنی نرمال، پروتئین hif بیان نشده و به صورت غیرفعال بوده و به سرعت در مسیر تخریب پروتئوزومی قرار می‌گیرد. ولی در شرایط حاد اکسیژنی عوامل القای کمبود اکسیژنی در سلول تجمع یافته و در نهایت با تشکیل باند بین hif-1 α و hif-2 β بیان پروتئین های hifs صورت می‌گیرد (Maxwell et al., 1999; Ohh et al., 2000; Ivan et al., 2001; Masson et al., 2001).

مطالعات متعددی نشان می‌دهد که hif-1 α بیان بیش از ۹۰ ژن از جمله vegf را فعال می‌کند (Semenza, 2004). از این رو همبستگی بالایی بین افزایش بیان پروتئین vegf با پروتئین hif-1 گزارش شده است (Zamudio et al., 2007). فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (vegf) یکی از مهمترین عوامل تحریک آنژیوژنیز است که از دست دادن حتی یک آلل در جنین باعث مرگ می‌شود که نقش مهم آن را در توسعه و تمایز سیستم عروقی نشان می‌دهد (Carmeliet and Collen, 1999). درجه‌ای از هایپوکسی که موجب بیان vegf می‌شود مشخص نیست و به‌طور چشمگیری بین گونه‌های حیوان (Zwemer et al., 2007) و انواع بافت (Tang et al., 2010) متفاوت است.

دریای خزر جایگاه چهار گونه مهم ماهیان خاویاری است که در خزر جنوبی تاس‌ماهی ایرانی (*A. persicus*) بیشترین فراوانی را دارد (Khodorevskaya et al., 1997). صید ماهیان خاویاری طی سال‌های اخیر کاهش چشم‌گیری داشته است این کاهش ناشی از فشار صیادی، تخریب زیستگاه، ساخت سد در مسیر رودها، آلودگی آب‌ها و رسوبات است که در مجموع مهاجرت و تولیدمثل و سلامتی این ماهیان را با اختلال مواجه می‌کند (Billard and Lecointre, 2007). در این میان به نظر می‌رسد که آلودگی‌های فلزات سنگین یکی از مهمترین عوامل تأثیرگذار بر ماهیان خاویاری می‌باشد (Agusa et al., 2007). بنابراین تحقیق حاضر به بررسی بیان پروتئین‌های hifs و vegf تحت تأثیر فلز سنگین کادمیوم صورت گرفت تا امکان در نظرگیری این پروتئین‌ها به‌عنوان یک بیومارکر در مطالعات آلودگی با این فلز بررسی گردد.

مواد و روش‌ها

پرورش و آداپتاسیون: بچه تاس‌ماهیان ایرانی ۵ 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 آداپتاسیون نگهداری شدند. بر اساس LC₅₀ به‌دست آمده برای این گونه، در معرض فلز سنگین کادمیوم (4000 $\mu\text{g l}^{-1}$) (Mirzaee, 2003)، با دو دوز مختلف LC₅₀ 0/۰۵ و LC₅₀ 0/۲ و کنترل، برای مدت ۱۴ روز قرار گرفتند. کلیه شرایط محیطی، فاکتورهای آب به‌طور روزانه اندازه‌گیری شدند. تعویض آب نیز به صورت یک روز

در میان انجام شد و غذادهی تا در حد نگهداری با بیومس آرتمیا انجام گرفت. نمونه‌برداری از هر کدام از تیمارها در روزهای ۱، ۷ و ۱۴ با سه تکرار انجام شد. بچه ماهیان بعد از نمونه‌برداری ابتدا با استفاده از پودر گل میخک بیهوش و کشته شدند.

نمونه‌برداری از بافت: بلافاصله بعد از کشتن ماهی‌ها آبشش آنها به‌منظور بررسی سطوح بیان hif-1 α ، hif-2 α ، vegf-mRNA به‌سرعت، به‌طور جداگانه در ازت مایع قرار گرفته و بعد به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل و تا شروع آزمایشات مولکولی نگهداری شدند.

تخلیص RNA و ساخت cDNA: RNA کل از ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه بافت آبشش با استفاده از BIOZOL (Bioflux-Bioer) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. کمیت و کیفیت RNA با استفاده از اسپکتروفتومتری و ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام شد. رشته اول 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.

طراحی آغازگر جهت انجام واکنش RT-qPCR: جهت ارزیابی بیان ژن از آغازگرهای ژن هدف (vegf، hif-1 α ، hif-2 α) و رفرنسی (RPL6) که قبلاً توسط (کلنگی و همکاران، ۲۰۱۳) طراحی و مورد ارزیابی قرار گرفته و اختصاص به گونه تاس‌ماهی ایرانی دارد مورد استفاده گردید.

جدول ۱- پرایمرهای به کار برده شده در انجام qPCR

نام پرایمر	توالی	طول باند
ESPA For	GAAGGTCCTGCACTGCACT	180
ESPA Rev	CTTGGTGCACAAGTTCTGGT	
HIF1 For	ACAGAGCTGATGGGATAACCAG	210
HIF1 Rev	CCTGTGATGGCTTGTCCTTT	
VEGF For	GCCTTCATGTGTACCACTCATG	180
VEGF Rev	GGTCTGCATTCACATGTACTGTG	
RPL6 F	GTGGTCAAACCTCCGCAAGA	250
RPL6 R	GCCAGTAAGGAGGATGAGGA	

cDNAهای ساخته شده از نمونه‌های تحت تیمار با آغازگرهای طراحی شده برای RT-PCR: cDNAهای ساخته شده از نمونه‌ها با آغازگرهای ژن و هدف طراحی شده برای ریل تایم PCR با استفاده از PCR استاندارد تکثیر شد. واکنش در حجم ۱۰ میکرولیتر با استفاده از ۲/۵ میکرولیتر رشته اول cDNA (۲ نانوگرم در میکرولیتر)، ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر اختصاصی پیشرو و پسرو با غلظت ۱۰ پیکومول، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (1X)، ۰/۱ میکرولیتر آنزیم TaqDNA Polymerase (۵u)، ۲/۵ میکرولیتر با غلظت (۵۰ mM) و ۰/۲ میکرولیتر dNTP با غلظت (۱۰ mM)، تحت شرایط دمایی ۹۴

درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای annealing پرایمر مورد بررسی به مدت ۱۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در ادامه ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، به منظور دناتوره شدن، اتصال آغازگر و بسط انجام شد. جهت اثبات تکثیر cDNA، محصول واکنش روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید.

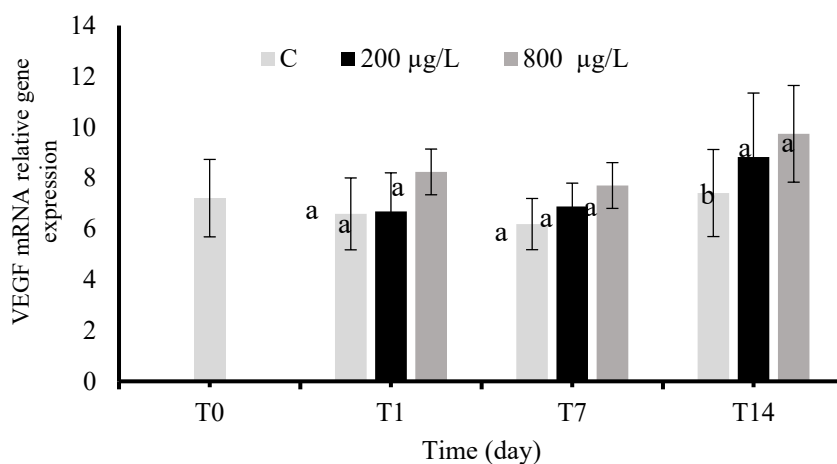
ارزیابی عملکرد آغازگرهای به کار رفته با استفاده از منحنی استاندارد: به منظور اطمینان از بهینه بودن شرایط RT-PCR، سری غلظت‌های مختلف (۱/۵، ۱/۱۰، ۱/۲۰، ۱/۵۰، ۱/۵۰۰) از نمونه‌های cDNA مخلوط از تیمارهای متفاوت از بافت آبشش تهیه و با هر دو پرایمر هدف و رفرنس در ۳ تکرار تکثیر شدند و منحنی استاندارد جهت تخمین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

واکنش RT-PCR: واکنش RT-PCR بعد از بهینه‌سازی دما و مواد مصرفی، در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با استفاده از ۱ میکرولیتر آغازگرهای طراحی شده برای ژن‌های *hif-1α*، *hif-2α*، *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 چرخه در این دما در ۳۰ ثانیه انجام شده است. 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 نرم‌افزار بایورد iQ5 اپتیکال ۱ در ۳ تکرار بیولوژیکی و ۳ تکرار تکنیکی انجام شد. میزان بیان ژن در دستگاه به صورت Ct ثبت شد. داده‌های به دست آمده جهت تعیین بیان نسبی ژن‌های *vegf*، *hif-2α*، *hif-1α* نسبت به *RPL6* با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ مورد آنالیز قرار گرفتند. کارایی برای هر پرایمر ارزیابی شد، دامنه آن حدود ۹۵-۹۹ درصد بود که نشان دهنده اتصال پرایمرهاست. سطوح بیان *hif-1* و *hif-2* تحت تیمارهای مختلف استفاده از تجزیه واریانس یک‌طرفه به حالت طبیعی درآمدند و سپس از آزمون Tukey برای تحلیل‌های چند مقایسه‌ای استفاده شد.

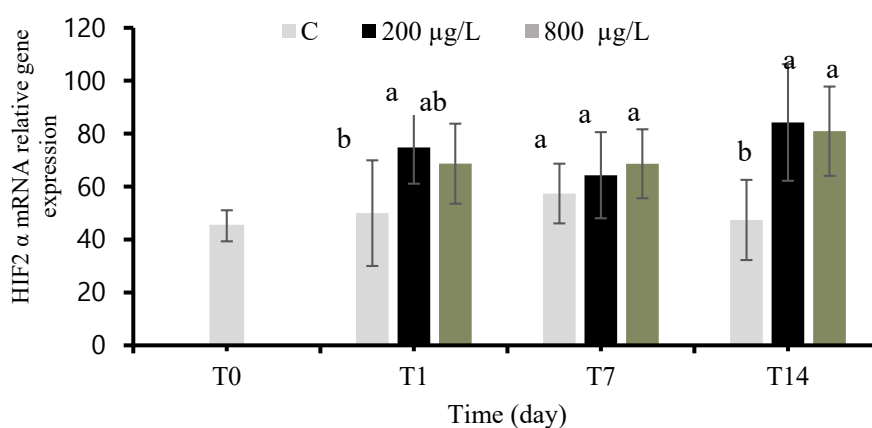
نتایج

در مطالعه حاضر بیان نسبی ژن‌های *hif-1α*، *hif-2α* و *vegf* تحت تأثیر غلظت‌های مختلف کلرید کادمیوم بررسی و ارزیابی شد و نتایج به دست آمده با استفاده از ژن *RPL6*، به عنوان ژن مرجع عادی‌سازی شد. اثرات، روی بیان ژن‌های تاس‌ماهی ایرانی در شکل ۱-۳ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که بیان ژن *vegf* در گروه‌های زمانی ۱ و ۷ نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است اما این افزایش غیر معنی‌دار بوده است ($P>0.05$). در روز ۱۴ به طور معنی‌دار افزایش داشته است ($P<0.05$) (شکل ۱). با

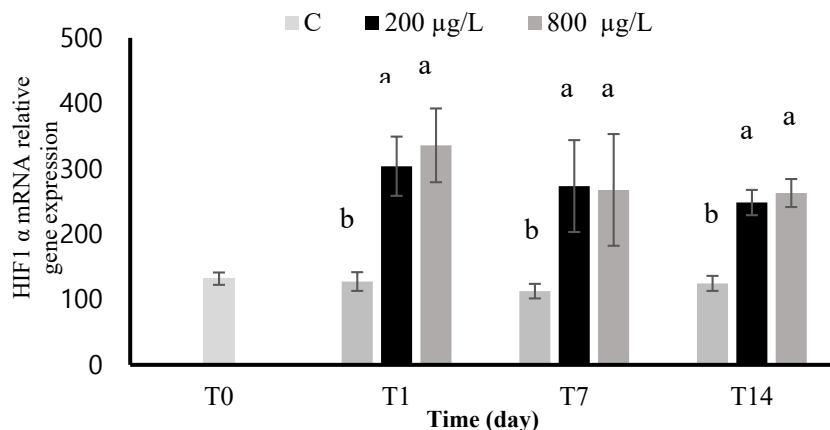
توجه به نمودار بیان ژن $hif-1\alpha$ در همه گروه‌های در معرض کادمیوم در روزهای ۱ و ۷ و ۱۴ به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد ($P < 0.05$) (شکل ۲). سطوح بیان ژن $hif-2\alpha$ بعد از قرارگیری در معرض غلظت‌های مختلف $CdCl_2$ در روزهای ۱ و ۱۴ به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد ($P < 0.05$)، اما در روز هفتم اختلاف معنی‌داری بین گروه تیمار شده با گروه کنترل نبود ($P > 0.05$) (شکل ۳).



شکل ۱- بیان نسبی ژن $vegf$ تحت غلظت‌های مختلف کلرید کادمیوم



شکل ۲- بیان نسبی ژن $hif-2\alpha$ تحت غلظت‌های مختلف کلرید کادمیوم



شکل ۳- بیان نسبی ژن *hif-1α* تحت غلظت‌های مختلف کلریدکادمیوم

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بیان ژن‌های *vegf*, *hif-1α* و *hif-2α* تحت تأثیر کلریدکادمیوم در ماهی قره‌برون در همه زمان‌ها نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است. از جمله پروتئین‌های کلیدی حساس به کاهش اکسیژن فاکتور القای هایپوکسی *hif-1* می‌باشند که در سال ۱۹۹۲ توسط سمنزا و وانگ کشف شد (Ke and Costa, 2006).

hif-1 به‌عنوان یک فاکتور رونویسی تقریباً در همه انواع سلولی یافت می‌شود و به‌وسیله میزان اکسیژن تنظیم و موجب بیان صدها ژن می‌شود (Koçak and Akçıl, 2006). به نظر می‌رسد که تغییرات ناشی از کادمیوم می‌تواند سطوح *hif-1α* را تحت تأثیر قرار دهد. شواهد به‌دست آمده نشان می‌دهد سمی بودن کادمیوم بر اندام‌هایی مانند کبد، ریه و اندام‌های خون‌ساز تأثیرگذار است (Höfer and Diel, 2009; Eteng *et al.*, 2008). در مطالعات مشخص شده است که کادمیوم با مهار فعالیت آنزیم‌ها و مولکول‌های ضد اکسایشی موجب اختلال در عملکرد دستگاه دفاعی آنتی‌اکسیدانی و ایجاد استرس اکسایشی می‌شود (Panjehpour and Bayesteh, 2008). از طرف دیگر، افزایش میزان تولید Reactive oxygen (ROS) species می‌تواند موجب افزایش فعالیت *hif-1α* شود (Rana, 2008). با توجه به موارد ذکر شده انتظار می‌رود کادمیوم با ایجاد استرس اکسایشی موجب افزایش سطوح پروتئین *hif-1α* شده که این انتظار با داده‌های به‌دست آمده در این پژوهش همخوانی دارد. تحقیقات نشان می‌دهد کادمیوم با توقف بیان ژن اریتروپویتین موجب وخیم شدن آنمی در بیماران کم خون می‌شود و از آنجایی که القای هایپوکسیک اریتروپویتین به فاکتور القای هایپوکسی وابسته است، می‌توان حدس زد که کادمیوم می‌تواند فعالیت هایپوکسیک *hif-1* را متوقف کند (Köhl *et al.*, 2006).

پژوهشگران بر این باورند که کادمیوم ممکن است موجب جلوگیری از فعالیت هایپوکسیک hif-1 و در نتیجه توقف بیان بیشتر ژن‌های القای هایپوکسی مانند ژن EPO شود. آنها نشان داده‌اند کادمیوم می‌تواند باعث تخریب پروتئازوم پروتئین hif-1 و کاهش بیان ژن‌های القایی هایپوکسی تحت موقعیت‌های هایپوکسیک و از سوی دیگر، از طریق یک مسیر حساس به اکسیژن وابسته به ردوکس موجب توقف القای هایپوکسیک hif-1 α شود (Chun *et al.*, 2000).

کادمیوم عنصری بسیار سمی است که باعث تغییرات مورفولوژیکی و ساختار غیرطبیعی در رگ‌های خونی می‌گردد. مطالعات محدودی درباره اثرات کادمیوم روی سلول‌های اندوتلیال و رگ‌زایی وجود دارد. در مطالعات نشان داده شده است که کادمیوم بیان vegf را افزایش می‌دهد و در نهایت ممکن است روی رگ‌زایی تأثیر داشته باشد (Shen *et al.*, 2003). همچنین گزارش شده است که با در معرض قرار دادن سلول‌های اندوتلیال سیاهرگ بندنافی انسانی (HUVECs) در غلظت‌های تحت کشنده کادمیوم به‌طور قابل توجهی شکل‌گیری لوله مه‌ار می‌شود که نشان می‌دهد کادمیوم به‌طور مستقیم روی سلول‌های اندوتلیال عمل می‌کند (Woods *et al.*, 2008). در مطالعه کیم و همکاران (Kim *et al.*, 2011) اثرات و مکانیسم‌های کادمیوم در سلول‌های اندوتلیال HUVECs در انسان به‌وسیله در معرض قرارگیری سلول‌ها با غلظت‌های متفاوت کلرید کادمیوم (2.5-40 μ m) تخمین زده شد. غلظت‌های پایین کادمیوم باعث افزایش شکل‌گیری لوله در HUVECs می‌شود. کادمیوم در غلظت‌های و میکرومول باعث افزایش ترشح vegf و فعالیت گیرنده vegfr-2 می‌شود که اشاره به این دارد کادمیوم روی رشد رگ‌های خونی اثرگذار است. در غلظت‌های بالا کادمیوم باعث آسیب سلول‌ها، در هم گسیختگی ساختار لوله و مانع از بیان vegf و فعالیت vegfr-2 می‌شود.

در مطالعات انجام شده توسط هلمستان و همکاران (Helmestan *et al.*, 2010)، با بررسی اثرات کادمیوم روی بیان ژن vegf در سلول‌های HEECs (سلول‌های آندومتريال انسانی) دریافتند که کادمیوم بیان mRNA دو ژن مهم رگ‌زایی یعنی vegf و plgf را تغییر می‌دهد در نتیجه کادمیوم ممکن است رگ‌زایی آندومتريال را تحت تأثیر قرار دهد. گزارشات دیگر اشاره به این دارد که اتصالات سلولی-سلولی اندوتلیال ممکن است در طول قرار گرفتن در معرض کادمیوم مختل شود (Jacquill *et al.*, 2006). علاوه بر این قرار گرفتن در معرض کادمیوم مزمن در آب آشامیدنی گوسفندان باعث گسترش تکثیر سلول‌های اندوتلیال عروقی شد (Stoev *et al.*, 2003). این مطالعات نقش برجسته آندوتلیوم را تحت اثرات کادمیوم نشان می‌دهد. تحقیقات در راستای این موضوع مهم است زیرا رگ‌زایی نقش مهمی را در واکنش‌های هموستاتیک هنگام قرار گرفتن در معرض سموم ایفا می‌کند و اختلالات آنژیوژنیز ممکن است در طیف وسیعی از پروسه‌های آسیب‌شناسی ناشی از سم درگیر شود (Prozialeck *et al.*, 2006). همان‌طور که قبلاً ذکر شد تغییر در عروق خونی به‌وسیله قرارگیری در معرض کادمیوم

باعث بیماری‌های مختلف می‌شود و باعث یک طیف وسیعی از اثرات پاتولوژیک در انسان و حیوانات می‌شود. علاوه بر این کادمیوم باعث آسیب سلول‌های اندوتلیال عروقی از طریق تغییر در سطوح mRNA و بیان پروتئین و همچنین تغییرات مورفولوژیکی می‌گردد. با این حال مکانیسم‌های مولکولی اثرات کادمیوم در سلول‌های اندوتلیال هنوز به درستی شناخته شده نیست.

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که کلرید کادمیوم سطح بیان ژن‌های درگیر در هایپوکسی (hifs) و رگ‌زایی (vegf) را تغییر می‌دهد. مهمترین اثر کلرید کادمیوم تغییر در سطح بیان hif-1a بوده که نقش تنظیم کننده مؤثر در از همه مهمتر ما اثر را روی hif-1 بیان ژن vegf دارد و در نهایت می‌تواند در مکانیسم رگ‌زایی اختلال ایجاد نماید و خطر ابتلا به خونریزی را افزایش دهد. ماهیان خاویاری جزء گونه‌های در معرض خطر هستند. از آنجایی که آنها زندگی بسیار طولانی دارند و در بالاترین قسمت زنجیره غذایی قرار دارند بنابراین ممکن است مقدار زیادی کادمیوم را در طول عمر خود در بدن انباشته نمایند. لذا با توجه به خطرات احتمالی حضور کادمیوم در محیط طبیعی انتظار می‌رود که پایش و بررسی مدون و منظمی در محیط زیست این گونه با ارزش صورت پذیرد.

منابع

- Agusa T., Kunito T., Tanabe S., Pourkazemi M., Aubrey D. 2007. Concentrations of trace elements in muscle of sturgeons in the Caspian Sea. *Marine Pollutant Bulletin*, 49: 789-800.
- Ballschmitter K., Buchert H., Scholz C., Zell M. 1983. Baseline studies of global pollution: 5. The pattern of pollution by chlorinated hydrocarbons in the Caspian sea; *Fres Z AnliChemistry*, 316: 242-246.
- Billard R., Lecointre G. 2001. Biology and conservation of sturgeon and paddlefish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10: 355-392.
- Bustin A.S., Benes V., Garson J.A., Healmans J., Huggett J., Kubista M., Muller R., Nolaan T., Pfaffl M., Shipley G., Vandesompele J., Wittwer C.T. 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55 (4): 611-622.
- Cambier S., Gonzalez P., Durrieu G., Bourdineaud J.P. 2010. Cadmium-induced genotoxicity in Zebrafish at environmentally relevant doses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(3): 312-319.
- Chun Y.S., Choi E., Kim G.T., Choi H., Kim C.H., Lee M.J., Kim M.S., Park J.W. 2000. Cadmium Blocks Hypoxia-inducible Factor (hif)-1-mediated Response to Hypoxia by Stimulating the Proteasome-dependent Degradation of hif-1a. *European Journal of Biochemistry*, 267(13): 4198-4204.
- DHI. 2001. *Bioresources*. 37 p, <http://www.dhi.dk/News/Tacis-CaspianSea/TDA>.

- Eteng M.U., Onwuka F.C., Umoh I.B., Abolaji A.O. 2008. Transgenerational effects of cadmium toxicity on gonadal steroid levels and reproductive outcome of Wistar Rats. *Journal of Applied Sciences Research*, 4(7): 925-928.
- Faucher K., Fichet D., Miramand P., Lagardère J.P. 2008. Impact of chronic cadmium exposure at environmental dose on escape behavior in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.; Teleostei, Moronidae). *Environmental Pollution*, 151(1): 148-157.
- GT Wilson R.W. 1992. Trace elements and organic compounds in the spring River basin of southeastern Kansas. U.S. Fish and Wildlife Service. Contaminant Report No. R6/505M/91. Manhattan, KS, 60.
- Gu Y.Z., Moran S.M., Hogenesch J.B., Wartman L., Bradfield C.A. 1998. Molecular characterization and chromosomal localization of a third-class hypoxia inducible factor subunit, hif-3, *Gene Expression*, 7: 205-213.
- Helmestan 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*, pp: 370-376.
- Höfer N., Diel P., Wittsiepe J., Wilhelm M., Gisela G.H., Degen G.H. 2009. Dose and Route-dependent Hormonal Activity of the Metalloestrogen Cadmium in the Rat Uterus. *Toxicology Letters*, 191 (2-3): 123-131.
- Ivan M., Kondo K., Yang H., Kim W., Valiando J., Ohh M., Salic A., Asara J.M., Lane W.S., Kaelin W.G. 2001. HIF-targeted for VHL mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science*, 292: 464-468.
- Jacquillet G., Barbier O., Cougnon M., Tauc M., Namorado M.C., Martin D., Reyes J.L., Poujeol P. 2006. Zinc protects renal function during cadmium intoxication in the rat. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 290: 127-137.
- Joseph B., Raj S.J. 2011. Impact of pesticide toxicity on selected biomarkers in fishes. *International Journal of Zoological Research*, 7(2): 212-220.
- Karpinsky M.G. 1992. Aspects of the Caspian Sea benthic ecosystem. *Marine Pollution Bulletin*, 24: 389-394.
- 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.
- Ke Q., Costa M. 2006. Hypoxia-Inducible Factor-1(hif-1). *MolPharmacol*, 70(5): 1469-1480.
- Khodorevskaya R.P., Zhuravleva O.L., Vlasenko A.D. 1997. Present in the Caspian Sea basin. *Environmental Biology of Fishes*, 48: 209-219.
- Koçak M., Akçıl E. 2006. The Effects of Chronic Cadmium Toxicity on the Hemostatic System. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 35(6): 411-416.

- Köhl R., Zhou J., Brüne B. 2006. Reactive Oxygen Species Attenuate Nitric-oxide-mediated Hypoxia-inducible Factor-1 α Stabilization. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(8): 1430-1442.
- Kolangi-Miandare H., Farahmand H., Akbarzadeh., Ramezanpoor S., Kaiya H., Miyazato M., Rytönen K.T, Nikinmaa M. 2013. Developmental transcription of gene putatively associated with growth in two sturgeon species of different growth rate, *General and Comparative Endocrinology*, pp: 41-47.
- Masson N., Willam C., Maxwell P.H., Pugh C.W., Ratcliffe P.J. 2001. Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolylhydroxylation. *European Molecular Biology Organization Journal*, 20: 5197-5206.
- Maxwell P.H., Wiesener M.S., Chang G.W., Clifford S.C., Vaux E.C., Cockman M.E. 1999. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, 399(6733): 271-5.
- Mirzaee M. 2003. The toxicity of heavy metals on Persian sturgeon .MS.c. Thesis of fisheries. Islamic Azad University, Lahijan Branch. 100 p. (In Persian)
- Nikinmaa M., Rees B.B. 2005. Oxygen-dependent gene expression in fishes. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 288: 1079-1090.
- Ohh M., Park C.W., Ivan M., Hoffman M.A., Kim T.Y., Huang L.E., Pavletich N., Chau V., Kaelin W.G. 2000. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nature Cell Biology*, 2: 423-427.
- Oliveira R., Fernandes L.N., Cavalho C.S., Cardoso R.I., Turcatti N.M. 1995. Acute effect of inorganic mercury on olfactory epithelium of *Trichomycterus brasiliensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 31: 104-109.
- Panjehpour M., Bayesteh M. 2008. The Cytotoxic Effects of Cadmium Chloride on the Human Lung Carcinoma (Calu-6) Cell Line. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 3(2): 113-117.
- Pourang N., Tanabe S., Rezvani S., Dennis J.H. 2003. Trace elements accumulation in edible tissues of five sturgeon species from the Caspian Sea. *Environmental Monitoring and Assessment*, 100 (1-3): 89-108.
- Prozialeck W.C., Edwards J.R., Woods J.M. 2006. The vascular endothelium as a target of cadmium toxicity. *Life Science*, 79: 1493-1506.
- Rana S.V. 2008. Metals and Apoptosis: Recent Developments. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 22(4): 262-284.
- Semenza G.L. 2004. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda, Maryland)*, 19: 176-182.
- Shen M., Gao J., Li J., Su J. 2009. Effect of Ischaemic exercise training of anormal limb on angiogenesis of a pathological Ischaemic limb in rabbits. *Clinical Science*, 117: 10-28.

- Sikorska J., Wolnicki J. 2006. Cadmium toxicity to Rudd (*Scardinius erythrophthalmus* (L) larvae after short-term exposure. Archive of Polish Fisheries, 14: 15-27.
- Smet H., Blust R. 2001. Stress responses and changes in protein metabolism in common carp *Cyprinus carpio* during Cadmium exposure. Ecotoxicology and Environmental Safety, 48: 225-262.
- Sobha K., Poornima A., Harini P., Veeraiah K. 2007. A study on biochemical changes in the fresh water fish. *Catla catla* exposed to the heavy metal toxicant cadmium chloride. Kathmanda University Journal of Science, Engineering and Technology, 1(4): 1-11.
- Stoev S.D., Grozeva N., Simeonov R., Borisov I., Hubenov H., Nikolov Y., Tsaneva M., Lazarova S. 2003. Experimental cadmium poisoning in sheep. Experimental and Toxicological Pathology, 55: 309-314.
- Suresh N. 2009. Effect of cadmium chloride on liver, spleen and kidney melano macrophage centres in *Tilapia mos sambica*. Journal of Environmental Biology, 30(4): 505-508.
- Waisberg M., Joseph P., Hale Beyersmann D. 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. Toxicology, 192(2-3):95-117.
- Wiesener M.S., Turley H., Allen W.E., Willam C., Eckardt K.U., Talks K.L., Wood S.M., Gatter K.C., Harris A.L., Pugh C.W., Ratcliffe P.J., Maxwell P.H. 1998. Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: Characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1. Blood Journal, 92: 2260-2268.
- Witeska M. 2001. Changes in the common carp blood cell picture after acute exposure to cadmium. Acta Zoological Lituanica, 11(4): 366-371.
- Woods J.M., Leone M., Klosowska K., Lamar P.C., Shaknovsky T.J., Prozialeck W.C. 2008. Young skeletal muscle in humans. Journal of Applied Physiology, 98: 315-323.
- Zamudio S., Wu Y., Ietta F., Rolfo A., Cross A., Wheeler T., Post M., Illsley N.P., Caniggia I. 2007. Human placental hypoxia-inducible factor-1 expression correlates with clinical outcomes in chronic hypoxia in vivo. American Journal of Pathology, 170: 2171-2179.