اثر دوزهای تحت کشنده سم اندوسولفان بر بیان ژن HSP70 و آسیب‌های بافت آبشش در تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus* Borodin, 1897)

رقیه صفری*[۱]، علی شعبانی[۱]، ساناز رمضانپور[۲]، حامد کلنگی میاندره[۱]

۱- گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران، صندوق پستی: ۱۵۷۳۹-۴۹۱۳۸

۲- گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران: صندوق پستی: ۱۵۷۳۹-۴۹۱۳۸

تاریخ دریافت: ۱۸ آذر ۱۳۹۳ تاریخ پذیرش: ۵ اردیبهشت ۱۳۹۴

چکیده

افزایش ورود آلاینده‌هایی نظیر آفت‌کش‌ها می‌تواند اثرات مخربی بر اکوسیستم‌های آبی و آبزیان داشته باشد. در این تحقیق اثر دوزهای تحت‌کشنده (۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم در لیتر) سم اندوسولفان بر بیان ژن HSP70 و آسیب‌های بافت آبشش در بچه‌تاس‌ماهیان ایرانی در مواجهه چهارده روزه مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور نمونه‌برداری از بافت کبد و آبشش در روزهای اول، دوم، هفتم و چهاردهم انجام گرفت. نتایج نشان داد که در بافت‌های کبد و آبشش بیان نسبیHSP70 -mRNA در نمونه‌های تحت تیمار در تمام روزهای مواجهه در مقایسه با گروه شاهد سم اندوسولفان به‌طورمعنی‌داری افزایش یافت (P <۰/۰۵). بیان نسبی HSP70 -mRNA پاسخ وابسته به زمان را درهر دو بافت مورد مطالعه بعد از مواجهه با این سم نشان داد. روند مشابهی در تمام دوزهای مورد مطالعه در دو بافت مورد بررسی مشاهده شد. افزایش معنی‌داری (P<۰/۰۵) در روز دوم مواجهه، سپس کاهش در روز هفتم و افزایش مجدد در روز چهاردهم مشاهده شد. اگرچه در این مطالعه افزایش بیان نسبی HSP70 -mRNA در هر دو بافت مورد مطالعه مشاهده شد، اما بیان نسبی آن به‌طور معنی‌داری در بافت کبد از بافت آبشش بالاتر بود (P <۰/۰۵). همچنین بیان نسبی HSP70 -mRNA در تمام روزهای مواجهه در دوزهای بالاتر مقادیر بالاتری را نشان داد. مطالعات بافت‌شناسی آبشش نیز نشان داد که شدت آسیب‌ها در تمام غلظت‌ها تا روز هفتم مواجهه افزایش یافت و در روز چهاردهم مواجهه، تغییری در میزان آسیب‌های بافتی نسبت به روز هفتم مشاهده نشد. شدت تغییرات از روند وابسته به دوز تبعیت می‌کرد و نمونه‌های تیمار شده با ۴۰ میکروگرم در لیتر اندوسولفان علائم آسیب را شدیدتر از دوزهای دیگر نشان دادند که با مطالعات ژنتیکی انجام شده مطابقت دارد.

کلمات کلیدی: تاس‌ماهی ایرانی، اندوسولفان، پروتئین شوک حرارتی، بیان ژن، بافت‌شناسی.

* عهده‌دار مکاتبات (✉). rsafari@gau.ac.ir

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1394.9.2.7.2]

مقدمه

اندوسولفان یکی از آفت‌کش‌های ارگانوکلرینی است که از طریق رواناب‌های کشاورزی وارد آب‌ها شده 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 می‌نماید (Akhtar *et al*., 2012; Crupkin *et al*., 2013; Negro *et al*., 2015). این سم جز سموم با سمیت شدید برای ماهیان دسته‌بندی می‌گردد (Silva Barni *et al*., 2014). در مطالعات مواجهه آبزیان با غلظت‌های متفاوت این سم پاسخ‌های متعددی از جمله آسیب‌های بافتی، تغییرات آنزیمی، تغییرات پارامترهای خون‌شناسی، ژنتیکی، رفتاری، تولیدمثلی و حتی مرگ در گونه‌های مختلف گزارش شده‌است (Akhtar *et al*., 2012; Dong *et al*., 2013; Crupkin *et al*., 2013; Negro *et al*., 2015) که از این تغییرات می‌توان به‌عنوان نشانگرهای زیستی به‌منظور بررسی وجود آلاینده‌ها استفاده نمود (Oliveira, *et al*., 2002). شدت و مدت این پاسخ‌ها تحت تاثیر غلظت، زمان و گونه آبزی مورد مطالعه متفاوت است (Dorts, *et al*., 2009; Bauer *et al*., 2013). تغییرات بیوشیمیایی و مولکولی به‌عنوان اولین تغییرات قابل اندازه‌گیری می‌توانند اطلاعات زیادی در رابطه با اثرات تحت کشنده مواد تنش‌زا در موجود آبزی موردنظر در اختیار ما قرار دهند (Rose *et al*., 2006). مطالعات نشان‌داده است که سلول در پاسخ به تنش‌هایی هم‌چون دمای بالا، فلزات سنگین و سموم، گروهی از پروتئین‌ها را سنتز می‌کنند که معروف‌ترین نوع آنها، پروتئین‌های شوک حرارتی (Heat Shock Protein) می‌باشد (Dorts *et al*., 2009; Tedeschi *et al*., 2015). انواع مختلفی از HSP وجود دارد که HSP70 معروف‌ترین نوع آنها می‌باشد. ژن HSP70 در شرایط بدون تنش نیز بیان می‌شود، ولی در شرایط تنش میزان بیان ژن این پروتئین افزایش می‌یابد و با اتصال به پروتئین‌های هدف به حفظ ساختار آنها کمک می‌نماید. بنابراین تغییر میزان بیان آن می‌تواند به‌عنوان یک زیست نشانگر برای هر کدام از تغییرات از جمله آلودگی با سموم به‌شمار آید (Xing *et al*., 2003; Bauer *et al*., 2013; Tedeschi, *et al*., 2015). دریای‌خزر به‌جهت دارا بودن شرایط خاص، منابع طبیعی غنی (زیستی و معدنی) و نقش ژئوپولیتیکی آن در منطقه، یک اکوسیستم منحصر به فرد محسوب می‌گردد، اما متاسفانه هر ساله چندین میلیون مترمکعب فاضلاب‌های خانگی، صنعتی و کشاورزی حاوی انواع آلاینده‌ها وارد آن می‌گردد. از این رو مطالعات متعددی در مورد وضعیت آلودگی دریای‌خزر، تاثیر آلاینده‌ها در تغییرات رفتاری، فیزیولوژیکی و در سطوح مولکولی در آبزیان این ذخیره آبی صورت گرفته است (Parizanganeh *et al*., 2009; Wang, *et al*., 2008; Shariati, *et al*., 2009؛ فداکار ماسوله و همکاران، ۱۳۹۰). گستردگی مزارع کشاورزی و باغات در سواحل دریای خزر خصوصا منطقه گرگان و دشت مقدار مصرف آفت‌کش‌هایی هم‌چون اندوسولفان را بالا برده، همچنین گزارشات متعددی توسط سازمان حفاظت محیط زیست و شبکه‌های دامپزشکی مبنی بر ریختن سم اندوسولفان به کانال‌ها جهت صید آبزیان ارائه گردیده است (شریف‌پور و همکاران، ۱۳۸۴). در این بین تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus* Borodin, 1897) از مهم‌ترین گونه‌های ماهیان خاویاری دریای‌خزر است که به‌دلیل صید بی‌رویه، تخریب

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1394.9.2.7.2]

زیستگاه آنها به جهت ساخت سدها و آلودگی آب و رسوبات، ذخیره آن در حال کاهش است و افزایش نسل این گونه تا حدود زیادی از طریق تکثیر مصنوعی صورت می‌گیرد (Kaplin and Selivano, 1995 و پورکاظمی، ۱۳۸۹). تاکنون بررسی تاثیر انواع مختلفی از آلاینده‌ها بر پارامترهای بیوشیمیایی و بافت‌شناسی و بیان ژن‌ها در برخی از گونه‌های ماهیان صورت گرفته است، اما در مورد اثر سم اندوسولفان بر بیان ژن HSP70 و آسیب‌های بافتی آبشش مطالعه‌ای در تاس‌ماهی ایرانی صورت نپذیرفته است. بنابراین تحقیق حاضر با هدف تاثیر سم اندوسولفان بر آسیب‌های بافت آبشش و بیان این ژن در تاس‌ماهی ایرانی صورت گرفت تا امکان در نظرگیری این پروتئین به‌عنوان یک زیست نشانگر در مطالعات آلودگی با این سم بررسی گردد.

مواد و روش‌ها

تیماربندی و نمونه‌برداری

بچه تاس‌ماهیان ایرانی در وزن رهاسازی (۵-۳ گرمی) از مجتمع تکثیر و پرورش شهید مرجانی-گرگان تهیه و در شرایط ونیرو (نور طبیعی و تعویض مداوم آب) به مدت ۱ هفته جهت آداپتاسیون نگهداری شدند. به‌منظور انجام آزمایش آلودگی ابتدا بچه‌ماهیان به صورت تصادفی در ۱۲ حوضچه (۳۰ عدد در هر تانک) توزیع شدند. اثرات آلودگی با سم اندوسولفان بر آسیب شناسی بافت آبشش و نیز بیان ژن HSP70 در بافت‌های کبد و آبشش در ۴ تیمار و ۳ تکرار بررسی شد. تیماربندی بر اساس روش به‌کار گرفته شده توسط Roy and Battacharya (2006) با کمی تغییر انجام شد، بدین منظور بچه‌ماهیان در معرض ۳ دوز تحت کشنده (۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم در لیتر)(صفری و همکاران، ۱۳۹۳) شاهد برای مدت ۱۴روز قرار گرفتند. کلیه شرایط محیطی، برای همه تانک‌ها کاملا" یکسان بود. دمای آب طی دوره به طور متوسط ۲۳ درجه سانتی‌گراد،pH ۷/۵ و اکسیژن ۷/۹ میلی گرم در لیتر بود و طی زمان مطالعه ماهیان از بیومس آرتمیا در ۲ مرحله ۸ صبح و ۱۶ تغذیه می‌شدند. تعویض آب یک روز در میان با آب حاوی غلظت مورد نظر انجام می-شد. نمونه‌برداری از هر کدام از تیمارها در روزهای ۱، ۲ ، ۷و ۱۴ با سه تکرار انجام شد. بچه‌ماهیان بعد از نمونه‌برداری ابتدا با استفاده از پودر گل میخک (۰/۵ گرم بر لیتر) بیهوش و کشته شدند. جهت بررسی آسیب‌های بافتی نمونه‌های بافت آبشش در فرمالین ۱۰درصد و جهت بررسی مولکولی بافت کبد و آبشش ماهیان جدا و بلافاصله در ازت مایع منجمد و سپس در فریزر ۸۰- درجه تا شروع آزمایش‌ها نگهداری شدند.

بررسی آسیب‌های بافتی

بافت‌های آبشش تثبیت شده در فرمالین ۱۰ درصد پس از ۲۴ ساعت به الکل ۷۰ درصد منتقل شد. سپس آب‌گیری با افزایش اتانول (۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰ و ۱۰۰ درصد) انجام و در ادامه در زایلن وارد شدند. تمامی این مراحل توسط دستگاه پاساژ بافت تحت برنامه تعریف شده برای این‌کار صورت گرفت. بافت‌ها سپس با پارافین (دمای ذوب ۵۸-۵۶ درجه سانتی‌گراد) بر روی قالب‌های تیشوتک قالب‌گیری و پارافینه شدند (Figueiredo- Fernandes *et al*., 2007). از قالب‌های پارافینه با استفاده از دستگاه میکروتوم برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرومتر تهیه و پس از قرار دادن بر روی لام، به مدت ۰/۵ ساعت در آون (۶۰ درجه سانتی‌گراد)

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1394.9.2.7.2]

قرار داده شد تا پارافین اضافه از روی بافت حذف شود. نمونه‌ها پس از پارافین‌زدایی و جایگزینی آن با زایلن به‌وسیله سری‌های کاهشی اتانول (۱۰۰، ۹۰و ۷۰ درصد) آبدهی مجدد و با استفاده از محلول‌های هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. بافت‌های تهیه شده مجدداً به آون منتقل شده تا خشک شوند. در نهایت با استفاده از چسب هیستوفلوید بر روی لام‌های تهیه شده لامل چسبانده شد (Fanta *et al.*, 2003). سپس اسلایدهای تهیه شده از بافت‌ها توسط میکروسکوپ اینورت (مدل نیکون TS100) مورد مطالعه قرار گرفت و عکس‌هایی با بزرگ‌نمایی (۱۰X) از نمونه‌ها تهیه شد و تصاویر به صورت کیفی بررسی گردید.

استخراج RNA، سنتز و بررسی cDNA سنتز شده

RNA کل از ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه بافت‌های کبد و آبشش هموژن شده با ازت مایع با استفاده از بیوزول و طبق دستورالعمل شرکت سازنده (Biozol-Bioflux-Bioer) استخراج شد. کیفیت RNA کل با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵درصد و مشاهده باندهای ۱۸ S و ۲۸ S مربوط به RNA ریبوزومی و فقدان آلودگی DNA ژنومی با استفاده از نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ ($OD_{۲۶۰/۲۸۰}$) نانومتر به‌دست آمده از دستگاه نانوفتومتر (IMPLEN-P100) انجام گردید. غلظت نمونه‌های RNA با استفاده از سنجش میزان جذب آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه نانوفتومتر انجام شد و سپس به غلظت ۵۰۰ نانوگرم در میکرولیتر با استفاده از آب دپس رقیق شدند. جهت حذف هرگونه باقی‌مانده DNA ژنومی در نمونه‌های RNA، تیمار DNase I انجام شد و سپس ساخت رشته اول cDNA بر اساس روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز (Fermentase- France) با استفاده از ۵ میکرولیتر از RNA تیمار شده با DNase I (غلظت ۵۰۰ نانوگرم)، ۱میکرولیتر آغازگر الیگو dt (۲۰-۱۸ الیگونوکلئوتید) و ۵ میکرولیتر آب دپس انجام شد. بدین منظور تیوپ‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شدند و سپس به‌سرعت روی یخ قرار گرفتند. ۴ میکرولیتر بافر ۵X آنزیم نسخه‌بردار معکوس، ۲ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی مولار و ۲۰ واحد آنزیم RNase inhabitor و ۱/۵ میکرولیتر آب دپس به مخلوط بالا اضافه شد. تیوپ‌ها به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور قرارگرفت. بلافاصله ۲۰۰ واحد آنزیم نسخه بردار معکوس به هر تیوپ اضافه گردید و به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند، سپس تیوپ‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید تا واکنش غیرفعال شود. به هر تیوپ ۳۸۰ میکرولیتر آب دپس اضافه شد و سپس cDNA های سنتز شده تا شروع آزمایش‌ها در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت تائید حذف کامل آلودگی DNA، از پرایمر طراحی شده در ناحیه ۲ اگزون متوالی (exon- exon) ژن β_2m پرایمری استفاده گردید، محصول واکنش درصورت تکثیر و عدم تکثیر ناحیه اینترون به‌ترتیب در ۱۷۹۵ و ۲۱۲ جفت باز مشاهده شد، که عدم تکثیر ناحیه اینترون توسط پرایمرهای مذکور نشان‌دهنده عدم آلودگی با DNA است (Safari *et al.*, 2014).

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1394.9.2.7.2]

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در بررسی بیانHSP70 در تاس‌ماهی ایرانی تحت تاثیرسم آندوسولفان

نام پرایمر	توالی (´۳-´۵)	دمای اتصال (°C)	طول قطعه	کاربرد
Ap Hsp70q-PCRF	CGCTGGCCTTAATGTTCTCC	۵۶	۲۴۹	سنجش کمی بیان ژن
Ap Hsp70q-PCRR	GCGCTTGAACTCTGCAATGA	۵۶		
β- actin q-PCRF	TTGCCATCCAGGCTGTGCT	۵۶	۲۱۵	ژن رفرنس (خانه دار)
β- actin q-PCRR	TCTCGGCTGTGGTGAA	۵۶		
β*2m* with intronF	GGGACTTTCCACAAAGGCTA	۶۱	۱۷۹۵	تعیین آلودگی DNA
β*2m* with intronR	CGACTGATGCTACCGGAACT	۶۱		

ارزیابی عملکرد پرایمرهای به‌کار رفته با استفاده ازمنحنی استاندارد و واکنش qPCR

به‌منظور اطمینان از بهینه بودن شرایط qPCR، سری غلظت‌های مختلف (۱، ۱/۲، ۱/۵، ۱/۱۰، ۱/۲۰ و ۱/۵۰) از نمونه‌های cDNA مخلوط ۵۰ نمونه از تیمارهای متفاوت از هر دو بافت تهیه و با هر دو پرایمر هدف و رفرنس در ۳ تکرار تکثیر شدند و منحنی استاندارد جهت تخمین کارایی (E) و تکرار پذیری آزمایش برای هر پرایمر ترسیم شد (Bustin *et al*., 2009).

واکنش qPCR بعد از بهینه‌سازی دما و مواد مصرفی، در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با استفاده از پرایمر qPCR طراحی شده برای ژن HSP70 و پرایمر ژن رفرنس بتا اکتین توسط کیت سایبر شرکت بیوپارس (دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان) در دستگاه iQ5 شرکت(BIO-RAD, USA) و با استفاده از نرم‌افزار بایوردiQ5 اپتیکال برای بافت‌های کبد و آبشش در ۳ تکرار بیولوژیکی و ۳ تکرار تکنیکی انجام شد. از آن‌جایی‌که در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد محصول غیراختصاصی و دایمر مشاهده نشد، این دما به‌عنوان دمای واکنش در نظر گرفته شد.

تجزیه و تحلیل داده‌های آنالیز کمی qPCR

داده‌های به‌دست آمده جهت تعیین بیان نسبی ژن HSP70 نسبت به بتا اکتین با روش $^{-\Delta\Delta Ct}$ ۲ با کمک نرم افزار REST (Pfaffl *et al*., 2002) مورد آنالیز قرار گرفت و سپس نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولوموگروف- اسمیرنوف و شیپیرو- ویلک تست شد و آزمون لون نیز جهت بررسی برابری واریانس‌ها مورد استفاده قرار گرفت. آنالیز داده‌های مربوط به بیان نسبی ژن HSP70 نسبت به بتا اکتین در طی دوره مواجهه با غلظت‌های مختلف اندوسولفان و همچنین اثر غلظت‌های مورد مطالعه در هر روز مواجهه توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه در سطح اطمینان ۹۵ درصد صورت گرفت. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار نمایش داده شد. مقایسه میانگین بیان نسبی در بافت‌های کبد و آبشش توسط آنالیز تی (در سطح اطمینان۹۵ درصد) انجام شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS (Version 16) انجام شد.

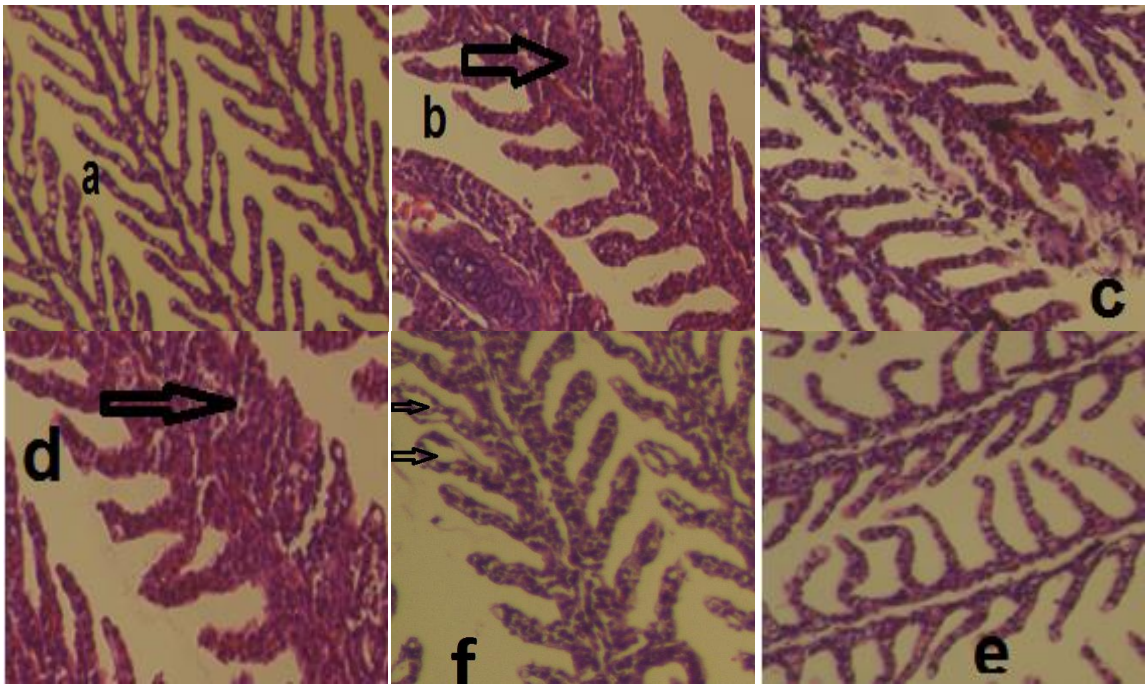
[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1394.9.2.7.2]

نتایج

مشاهدات هیستوپاتولوژیکی

تغییرات هیستوپاتولوژیکی در بافت آبشش ماهیان درگروه شاهد طی مواجهه مشاهده نشد. در ماهیان تحت‌تیمار با غلظت‌های تحت کشنده سم اندوسولفان در روزهای اول و دوم مواجهه، تغییرات آسیب‌شناسی چشم‌گیری مشاهده نشد، در روز هفتم آسیب‌هایی نظیر هایپرپلازی، چسبندگی لاملاهای ثانویه، خمیدگی لاملاهای ثانویه، جدا شدگی اپیتلیوم و پرخونی در آبشش‌ها مشاهده شد که شدت این آسیب‌ها در روز چهاردهم نسبت به روز هفتم تغییرات چندانی را نشان نداد. در بررسی کیفی شدت تغییرات، روند وابسته به دوز مشاهده شد که در دوز بالاتر برخی آسیب‌ها شدت بیشتری را نشان می‌داد به‌طوری‌که شدت آسیب‌ها در ماهیان در مواجهه با دوز ۴۰>۲۰>۱۰ میکروگرم در لیتر بود (شکل ۱).

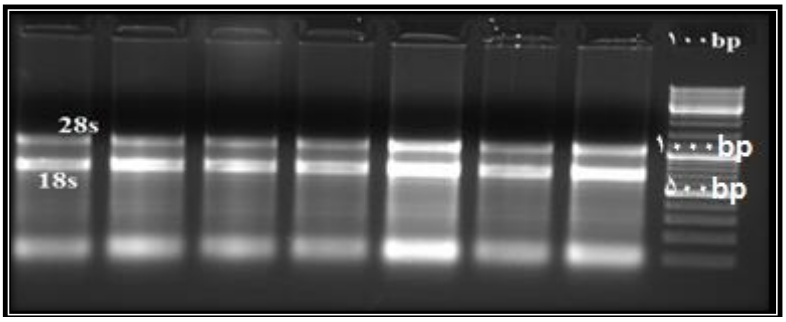


شکل۱: عوارض بافت‌شناسی آبشش تاس‌ماهی ایرانی در مواجهه با سم اندوسولفان (رنگ‌آمیزی هموتوکسیلین- ائوزین) (بزرگ‌نمایی X۱۰).
گروه شاهد (a)، هایپرپلازیا (b)، پرخونی (c)، چسبندگی لاملاهای ثانویه(d)، خمیدگی لاملاهای ثانویه (e) و جدا شدگی اپیتلیوم (f)

بررسی کیفی و کمی RNA

نتایج کیفی RNA استخراج شده از بافت‌های کبد و آبشش تاس‌ماهی ایرانی در هر نمونه، دو باند S ۱۸rRNA و ۲۸S را با وضوح بالا نشان داد (شکل ۲). نسبت شدت جذب در نمونه‌های RNA استخراج شده در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر در محدوده ۲/۱ -۱/۸ قرار داشت و همچنین میزان جذب در طول موج‌های ۲۳۰، ۲۴۰و ۳۲۰ نیز بیانگر قابلیت مناسب RNA در نمونه‌های مورد بررسی بود.

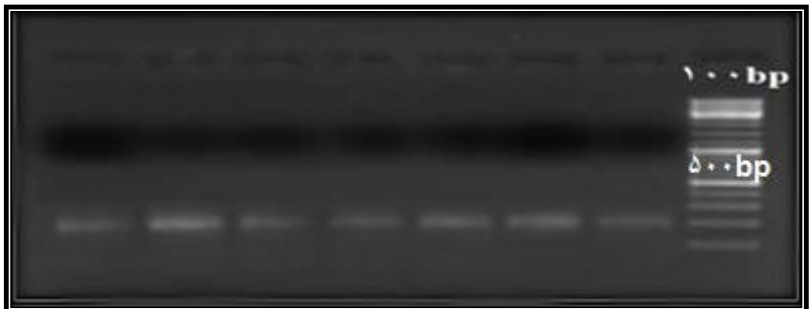
[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1394.9.2.7.2]



شکل ۲: کیفیت RNA استخراج شده از بافت‌های کبد و آبشش تاس‌ماهی ایرانی روی ژل آگارز ۱/۵٪ و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید. در نمونه‌های استخراج شده دوباند متعلق به ۱۸S rRNA و ۲۸S می‌باشند.

بررسی cDNA سنتز شده

cDNA سنتز شده با پرایمرهای β -actin و qHSP70 طراحی شده برای این گونه تست شد و به ترتیب باندهایی در bp ۲۱۶ و bp ۲۴۹ مشاهده شد. حذف آلودگی DNA، با استفاده از آغازگر طراحی شده در ناحیه ۲ اگزون متوالی ژن β 2m، با تکثیر محصولی به اندازه ۲۱۲، عدم تکثیر ناحیه اینترون توسط آغازگر مذکور را تایید نمود (شکل۳).



شکل ۳: محصول تکثیر cDNAهای سنتز شده با آغازگر β 2m -intron (۲۱۲ bp) در تاس‌ماهی ایرانی پس از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵٪ و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید. مارکر ۱۰۰ bp

بررسی ثبات بیان ژن رفرنس

نتایج به‌دست آمده از بیان ژن بتا اکتین در تیمارهای مختلف بافت‌های آبشش و کبد اختلاف معنی‌داری را بین تیمارها نشان نداد (P>۰/۰۵).

بررسی بیان نسبی ژن

افزایش بیان نسبی HSP70 به بتا اکتین در بافت‌های آبشش و کبد تاس‌ماهی ایرانی در طول دوره مواجهه با سم اندوسولفان در مقایسه با تیمار شاهد در همه غلظت‌های مورد بررسی مشاهده شد.

پروفایل وابسته به دوز بیان HSP70

در آبشش، در غلظت ۱۰ میکروگرم در لیتر، بیشترین میزان بیانHSP70 در روز دوم مواجهه مشاهده گردید، اما اختلاف معنی‌داری در روزهای مواجهه مشاهده نشد (P>۰/۰۵). در غلظت ۲۰ میکروگرم در

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1394.9.2.7.2]

لیتر، مقدار نسبی بیان در روز اول مواجهه در مقایسه با شاهد به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) ۱/۲ برابر افزایش یافت و در روز دوم این افزایش به بیشترین میزان (۱/۷ برابر، P<۰/۰۵) رسید و سپس در روز هفتم به‌طور معنی‌داری (۰/۹ برابر، P<۰/۰۵) کاهش یافت و در روز چهاردهم مواجهه (۱/۵ برابر، P<۰/۰۵) مجدداً افزایش نشان‌داد. روند مشابهی نیز در روز اول (۲/۲ برابر، P<۰/۰۵)، روز دوم (۳/۱ برابر، P<۰/۰۵)، روز هفتم (۰/۸ برابر، P<۰/۰۵) و روز چهاردهم (۲/۳ برابر، P<۰/۰۵) در مواجهه با غلظت ۴۰ میکروگرم در لیتر مشاهده شد (شکل۴).

بیان نسبی HSP70 در روز اول در کبد، در غلظت ۱۰ میکروگرم در لیتر در مقایسه با تیمار شاهد به طور معنی‌داری (۱/۴ برابر، P<۰/۰۵) افزایش یافت و به بیشترین میزان خود (۲/۲ برابر، P<۰/۰۵) در روز دوم مواجهه رسید که این افزایش معنی‌داری نبود (P>۰/۰۵). سپس در روز هفتم کاهش (۱/۹ برابر، P<۰/۰۵) و در روز چهاردهم مواجهه به (۲ برابر، P<۰/۰۵) افزایش یافت. در غلظت ۲۰ میکروگرم در لیتر، مقدار نسبی بیان در روز اول مواجهه در مقایسه با شاهد به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) ۲/۵ برابر افزایش یافت و در روز دوم این افزایش به بیشترین میزان (۲/۷ برابر، P<۰/۰۵) رسیده و سپس در روز هفتم (۲ برابر، P<۰/۰۵) کاهش و سپس میزان بیان در روز چهاردهم مواجهه به (۲/۲ برابر، P<۰/۰۵) رسید. روند مشابهی نیز در روز اول (۲/۶ برابر، P<۰/۰۵)، روز دوم (۳/۷برابر، P<۰/۰۵)، روز هفتم (۲/۱ برابر، P<۰/۰۵) و روز چهاردهم (۳/۱۸ برابر، P<۰/۰۵) مواجهه با غلظت ۴۰ میکروگرم در لیتر مشاهده شد (شکل ۵).

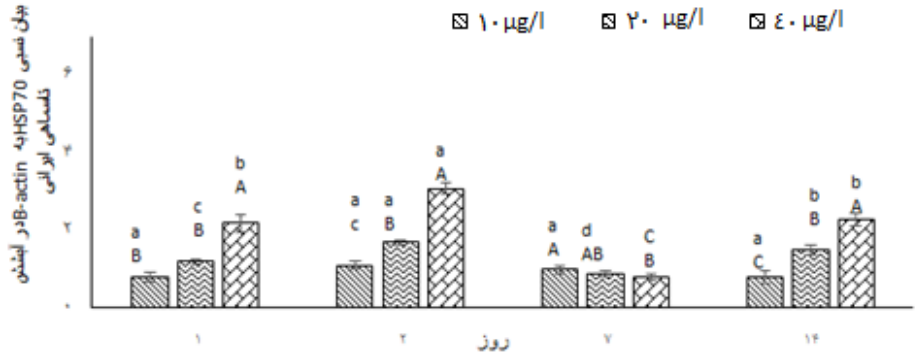
پروفایل وابسته به زمان بیان HSP70

در آبشش، در روز اول مواجهه اگر چه افزایش بیان نسبی HSP70 *Ap* بین غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در لیتر (به‌ترتیب ۰/۸ و ۱/۲ برابر، P>۰/۰۵) مشاهده شد اما این افزایش معنی‌دار نبود، اما در دوز ۴۰ میکروگرم در لیتر افزایش معنی‌دار بیان نسبی (۲/۲۵ برابر، P<۰/۰۵) مشاهده گردید. در روز دوم بیان نسبی HSP70 *Ap* در غلظت‌های مختلف ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم در لیتر (۱، ۱/۷و ۳ برابر، P<۰/۰۵) افزایش معنی‌داری را نشان داد. در روز چهاردهم نیز بیان نسبی HSP70 *Ap* در دوزهای مختلف ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم در لیتر به‌ترتیب (۰/۸، ۱/۵و ۲/۳۵ برابر، P<۰/۰۵) افزایش یافت. روند مشابهی در بافت کبد نیز مشاهده شد. در روز اول، اگر چه بین میزان نسبی بیان در دوزهای ۱۰ و ۴۰ میکروگرم در لیتر اختلاف معنی‌داری مشاهده شد، ولی میزان بیان در این تیمارها با تیمار ۲۰ میکروگرم در لیتر اختلافی را نشان نداد. همچنین افزایش معنی‌دار بیان نسبی HSP70 *Ap* بین دوزهای ۱۰ و ۴۰ میکروگرم در لیتر (۲/۲ و ۳/۷ برابر، P<۰/۰۵) در روز دوم مشاهده شد و در روز هفتم نیز اختلاف معنی‌داری در میزان بیان در دوزهای مورد بررسی مشاهده نشد (P>۰/۰۵)، در روز چهاردهم نیز اختلاف معنی‌داری در میزان بیان نسبی HSP70 *Ap* در تیمارهای ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در لیتر (به‌ترتیب ۲ و ۲/۲۵) مشاهده نشد (P>۰/۰۵)، اما میزان بیان نسبی در تیمار ۴۰ میکروگرم در لیتر نسبت به دو دوز دیگر اختلاف معنی‌داری را نشان داد (۳/۱۸ برابر، P<۰/۰۵) (شکل۴ و ۵).

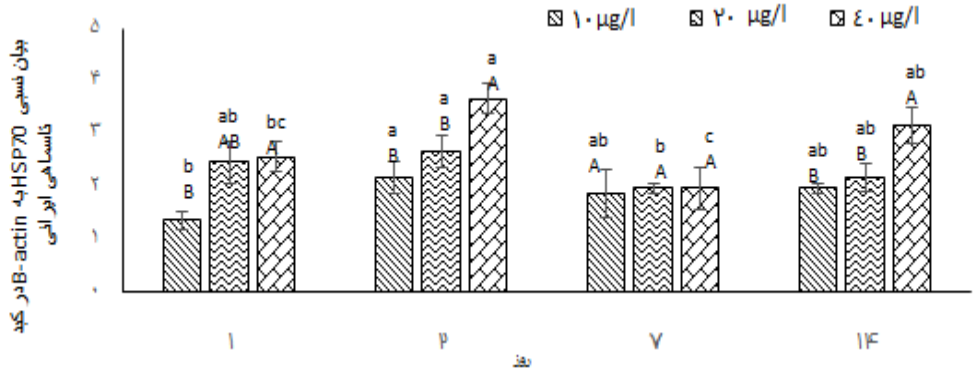
[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1394.9.2.7.2]

بیان وابسته به بافت *Ap* HSP70

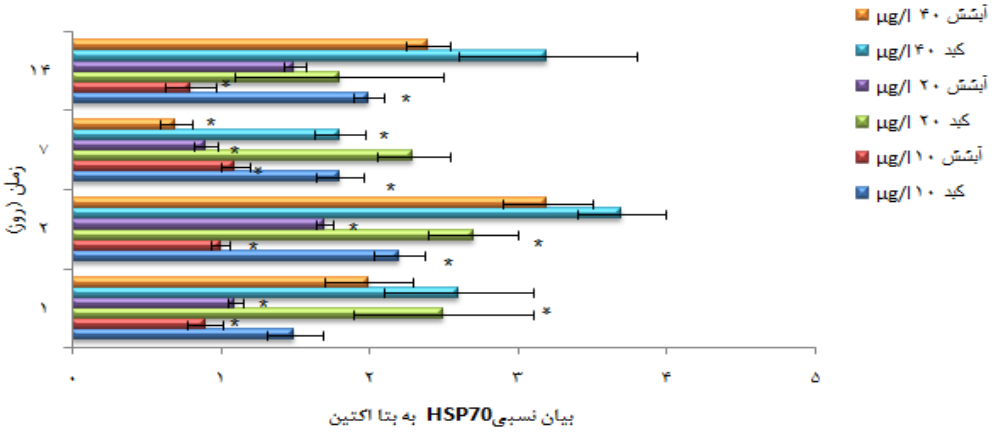
افزایش بیان *Ap* HSP70 در طول دوره مواجهه در بافت کبد نسبت به بافت آبشش در همه غلظت‌ها به جز غلظت ۴۰ میکروگرم در لیتر در روزهای اول، دوم و چهاردهم و غلظت ۲۰ میکروگرم در لیتر در روز چهاردهم معنی‌دار($P<۰/۰۵$) بود (شکل ۶).



شکل۴: تغییرات بیان نسبی HSP70 به بتا اکتین در بافت آبشش تاس‌ماهی ایرانی در مواجهه ۱۴ روزه با دوزهای مختلف (۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم در لیتر) سم اندوسولفان. حروف کوچک و بزرگ اختلاف معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) را در در روزهای مواجهه (a-c) و دوز اندوسولفان (A-B) نشان می‌دهد.



شکل۵: تغییرات بیان نسبی HSP70 به بتا اکتین در بافت کبد تاس‌ماهی ایرانی در مواجهه ۱۴ روزه با دوزهای مختلف (۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم در لیتر) سم اندوسولفان. حروف کوچک و بزرگ اختلاف معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) را در روزهای مواجهه (a-c) و دوز اندوسولفان (A-B) نشان می‌دهد.



شکل۶: تغییر میزان بیان نسبی HSP70 در بافت‌های کبد و آبشش تاس‌ماهی ایرانی در مواجهه ۱۴ روزه با دوزهای مختلف (۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم در لیتر) سم اندوسولفان * : ($P<۰/۰۵$)

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1394.9.2.7.2]

بحث

بوم‌سازگان‌های آبی همواره دریافت‌کننده حجم وسیعی از آلاینده‌هایی چون آفت‌کش‌ها، فلزات سنگین، هیدروکربن‌های نفتی و مواد آلی ناشی از فاضلاب‌های خانگی، معدنی، صنعتی و کشاورزی می‌باشند که تعادل بوم‌سازگان را برهم زده و از عملکرد درست آن ممانعت به‌عمل می‌آورد (Pourang *et al*., 2005)، بنابراین برآورد اثرات این آلاینده‌ها بر بوم‌سازگان‌ها ضروری است. حساسیت به آلاینده‌ها در گونه‌های مختلف و حتی در یک گونه مشخص نیز بسته به اندازه، سن، شرایط گونه و شرایط محیط آزمایش متفاوت است (Hedayati and Safahieh, 2011). پایش اکوسیستم‌های آبی در سال‌های اخیر از سنجش کمی مقدار آلاینده در آب، رسوب و بافت ماهی به سمت سنجش‌های کیفی اثرات آلاینده‌ها بر آبزیان با استفاده از زیست نشانگرها یا بیومارکرهای مولکولی، بیوشیمیایی، خون‌شناسی، آنزیمی و بافتی سوق پیدا نموده است (Schelenk, 2006). شاخص‌های هیستوپاتولوژیکی به‌عنوان نشانگر زیستی در بررسی وضعیت سلامتی ماهی در معرض آلاینده‌هایی نظیر سموم و فلزات سنگین در مطالعات محیطی و آزمایشگاهی به‌طور وسیع مورد استفاده قرار می‌گیرند (De cuna *et al*., 2011). مطالعات انجام شده، بیشترین تجمع مواد آلاینده را در بافت‌هایی نظیر آبشش، کلیه، کبد، پوست و ماهیچه نشان داده است (Jayakumar and Paul, 2006; Negro., 2015). آبشش اولین اندامی است که به جهت موقعیت قرار گرفتن، ساختار بسیار منشعب و در نتیجه سطح وسیع آن همراه با حجم زیاد آبی که از آن عبور می‌کند، بلافاصله از محیط آلوده آسیب می‌بیند (Da Cuna *et al*., 2011; Negro., 2015). در مطالعه حاضر خمیدگی لاملاهای ثانویه، هایپرپلازیا، چسبندگی لاملاهای ثانویه، جدا شدگی اپیتلیوم و پرخونی در آبشش تحت تاثیر سم اندوسولفان بویژه در روزهای هفتم و چهاردهم مشاهده شد که شدت این تغییرات و آسیب‌های بافتی نیز در دوزهای بالاتر بیشتر بود. جداشدگی اپیتلیوم، نکروز، دژنرسانس لاملاهای ثانویه و کوتاه‌شدگی لاملاهای ثانویه در آبشش ماهی گوپی (*Lebistes reticulaes*) در مواجهه با سم سیفونترین (Erkmen, 2000)، کوتاه‌شدگی لاملاها، فیوژن و از بین‌رفتن کلی لاملاها در ماهی گوپی (*Poecilia reticulate*) در معرض حشره‌کش ارگانوفسفاته کلورپیرفوز (De Silva and Samayawardhena, 2002) و همچنین هیپرتروفی، از بین‌رفتن لاملاها و جمع شدن خون در ماهی *Ophiocephalus striatus* در معرض کادمیوم توسط (Bais and Lokhande, 2012)، نکروز و چماقی شدن آبشش‌ها، هایپرپلازیا در بافت آبشش خرچنگ آب شیرین در مواجهه با سم آندوسولفان (Negro, 2015) گزارش شده است. گزارشات نشان داده است که ادم اولین آسیبی است که در معرض آلودگی ایجاد شده و با افزایش شدت می‌تواند به جدا شدگی اپیتلیوم تبدیل شود، این علائم در کنار سایر آسیب‌ها نظیر لاملاهای ثانویه می توانند به عنوان مکانیزم‌های دفاعی محسوب گردند. مثلا جداشدگی اپیتلیوم، مسافتی که قرار است آلودگی طی نماید تا به جریان خونی راه پیدا کند را افزایش داده (Figueiredo- Fernandeset *et al*., 2007) و چسبندگی لاملاهای ثانویه سطح آبشش را برای تماس با آلاینده‌ها کاهش می‌دهند (Santos *et al*., 2012).

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1394.9.2.7.2]

امروزه انواع جدیدی از زیست نشانگرها در سطح مولکولی در جهت ارزیابی مخاطرات زیست‌محیطی در سال‌های اخیر مطرح شده‌اند. در سطح مولکولی تغییرات ژنتیکی (تغییر در بیان، عملکرد و تنظیم ژنی) و تغییرات سطوح پروتئینی در موجودات می‌تواند به‌عنوان شاخص مواجهه با آلودگی در نظرگرفته شود. ارزیابی اثر مواد آلاینده بر سیستم‌های بیولوژیکی عمدتا با آنالیزهای بیوشیمیایی، بافت‌شناسی و رفتارشناسی انجام می‌گیرد، اما اندازه‌گیری بیان ژن می‌تواند تکنیکی موثر در بررسی تاثیر این مواد باشد، به‌ویژه اگر مولکول مورد بررسی قسمتی از مکانیزم دفاعی، ترمیمی و یا سم‌زدایی سلول باشد که از آن جمله می‌توان به متالوتیونین‌ها (Chan, 1995) ، آنزیم سیتوکروم P۴۵۰ (Colombo *et al*., 1995)، گلوتاتیون S-ترانسفراز (Ahmad *et al*., 2004)، سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) (Pandey *et al*., 2003) و پروتئین‌های شوک حرارتی (HSP 70) (Duffy *et al*., 1999) اشاره نمود. پروتئین‌های شوک حرارتی کاندیدی مناسب به‌عنوان زیست نشانگر در ارزیابی میزان استرس به‌شمار آیند (Rupik *et al*., 2011; Kenkel *et al*., 2014). در بین ایزوفرم‌های مختلف پروتئین‌های شوک‌حرارتی، پروتئین شوک حرارتی ۷۰، پروتئینی است که غالباً به‌دنبال ورود آلودگی‌ها افزایش بیان پیدا می‌کند (Dong *et al*., 2013). شدت پاسخ پروتئین‌های شوک حرارتی با توجه به گونه مورد بررسی، نوع و غلظت آلاینده و مدت مواجهه با آلاینده و بافت‌های مختلف متفاوت است (Dorts *et al*., 2009; Bao *et al*., 2011; Bauer *et al*., 2013).

در مطالعه حاضر تغییرات میزان بیان mRNA پروتئین شوک حرارتی در مواجهه با سم اندوسولفان نشان داد که این پروتئین می‌تواند به‌عنوان نشانگر زیستی آلودگی با سم اندوسولفان مد نظر قرار گیرد. مطالعات نشان داده که مواجهه با برخی مواد آلی نظیر تتراکلریدکربن، نانوفنل، اکتافنل و فنیتروتیون سبب کاهش بیان (Lee *et al*., 2006; Rhee *et al*., 2009) و برخی دیگر نظیر بیس فنل سبب افزایش بیان HSP70 می‌شود (Rhee *et al*., 2009)، در حالی‌که مواجهه با اکثر فلزات سنگین افزایش بیان HSP70 را نشان داده است (Gupta *et al*., 2009; Cui *et al*., 2010; Rajeshkumar *et al*., 2011)، چنین مشاهداتی نشان می‌دهد که احتمالاً در القا بیان ژن پروتئین شوک حرارتی تحت تاثیر موادآلی مختلف حالت انتخابی وجود دارد. Korkea-acho و همکاران (۲۰۰۸) کاهش بیان این ژن در مواجهه با برخی مواد را به کاهش بیان رسپتورهای ریانودین کانال‌های کلسیمی شبکه اندوپلاسمیک و Waisberg و همکاران (۲۰۰۳) افزایش بیان این ژن را به فسفریله کردن فاکتورهای رونویسی در محل پروموتور و یا راه انداز ژن مورد نظر نسبت دادند.

بیشتر آفت‌کش‌ها در طبیعت چربی‌دوست می‌باشند، به‌راحتی به داخل سلول نفوذ کرده و ممکن است با هسته آبگریز پروتئین‌ها تداخل پیدا کنند و منجر به دناتوره شدن پروتئین‌ها گردند. مطالعه حاضر بیان وابسته به دوز این پروتئین را در بافت‌های آبشش و کبد تاس‌ماهی ایرانی در مواجهه با سم اندوسولفان نشان داد که می‌تواند به نقش این پروتئین درجلوگیری از دناتوره شدن پروتئین‌ها نسبت داده شود. افزایش بیان HSP70 در معرض غلظت‌های بسیار پایین‌تر از LC50 آلاینده‌های محیط‌زیستی شامل بتا نفتافلاون، کلرید-کادمیوم و پساب‌های کارخانه کاغذسازی در دو گونه

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1394.9.2.7.2]

از آزادماهیان مشاهده شده است (Vijaian *et al.*, 1998). Koehler و همکاران (۲۰۰۱) نیز با افزایش آلاینده‌های محیطی از میزان کم به متوسط، افزایش میزان HSP70 کبدی و روند کاهشی میزان HSP70 را با افزایش شدت زیاد آلودگی مشاهده و گزارش نمودند این پروتئین‌ها در دوزهای پایین آلودگی افزایش بیان می‌یابند. Bruno و همکاران (۲۰۰۶) گزارش نمودند که با افزایش دو برابری پساب، در تاس‌ماهی سفید (*A. transmontaus*) سطح HSP70، ۵ برابر افزایش یافت. Bruno و همکاران (۲۰۰۹) مشاهده نمودند که با افزایش دوز اسفنوالریت از ۰/۰۱ به ۰/۱ میزان HSP70 از ۱/۸ به ۲ برابر، HSP90 از ۲ به ۴ برابر و HSP60 از ۴/۵ به ۵ برابر افزایش یافت. Jiang و همکاران (۲۰۱۲) میزان بیان HSP70 تحت تاثیر غلظت‌های ۰/۱، ۱ و ۵ میکروگرم در لیتر میکروسیستین LR بررسی و بیشترین میزان بیان آن را در ۵ میکروگرم در لیتر مشاهده نمودند.

در این مطالعه اگر چه میزان نسبی mRNA پروتئین شوک حرارتی در تمام روزهای آزمایش نسبت به تیمارکنترل افزایش را نشان داد، اما بیشترین میزان آن در روز دوم مواجهه مشاهده شد که این افزایش معنی‌دار نقش چاپرونی این پروتئین را درجلوگیری از برهمکنش نامناسب بین پروتئین‌ها (تاخوردن اشتباه و تجمع پروتئینها) آشکار می‌سازد و همچنین ممکن است این ژن از جمله ژن‌های زودهنگام بوده که القاکننده بیان ژن‌های دیگر باشد. کاهش مشاهده شده در روزهای هفتم و چهاردهم می‌تواند به آسیب بافت آبشش و کبد در اثر ورود اندوسولفان و خاموش شدن ژن نسبت داده شود. در حقیقت علائم بافتی مشاهده شده خود مکانیزم دفاعی در معرض آلاینده می‌باشند.

کمترین میزان بیان این ژن در روز اول مشاهده شد که ممکن است به بر هم کنش این پروتئین با هورمون کورتیزول نسبت داده شود. تعدیل و کاهش بیان HSP70 در سطوح بالای کورتیزول توسط Celi و همکاران (۲۰۱۲) گزارش شده است. افزایش بیان ژن پروتئین حرارتی در روزهای اولیه و سپس کاهش بیان آن توسط Cui و همکاران (۲۰۱۰) در خرچنگ شناگر (*Portunus trituberculatus*)، Fu و همکاران (۲۰۱۱) در اویستر هنگ‌کنگی (*Crassostra hongkongensis*) و Jing و همکاران (۲۰۱۳) در ماهی کپور (*Tanichthys albonubes*) گزارش و به عنوان نوعی مکانیسم دفاعی ابتدایی جهت جلوگیری از دناتوره شدن پروتئین‌ها بیان شده است.

در مطالعه حاضر اگر چه بیان HSp70 در هر دو بافت کبد و آبشش افزایش را نشان داد، اما میزان بیان آن در کبد به‌طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) بالاتر از آبشش بود که می‌تواند به فراهم بودن شرایط برای فعالیت پروتئین کیناز C که القا کننده بیان این ژن می‌باشد در بافت متابولیکی کبد نسبت داده شود. افزایش معنی‌دار بیان HSP 70 در یک اندام و عدم بیان آن در اندام های دیگر را می‌توان به حساسیت آن اندام به آلودگی‌ها نسبت داد که منجر به پاسخ‌های سلولی از جمله بیوسنتز پروتئین گردیده که می‌تواند بیانگر نقش ژنتیک در بیان ژن در بافت‌های مختلف باشد (Rao *et al.*, 2003; Fu *et al.*, 2009). افزایش بیان ژن‌های HSP 70 و HSP 90 در بافت‌های کبد و طحال ماهی باس راه‌راه (*Morone saxtalis*) در مواجهه بیست و چهار ساعته با سم اسفنوالریت مشاهده شد در حالی‌که چنین تغییری در بافت‌های ماهیچه، آبشش و کلیه مشهود نبود. Eder و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعه پروتئین شوک حرارتی

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1394.9.2.7.2]

در کبد و ماهیچه چینوک سالمون (*Oncorhynchus tshawytscha*) در مواجهه با حشره‌کش نوروتوکسیک مشاهده نمودند که ماهیچه‌ها حساسیت بالاتری نسبت به سم کلروپیریفوز و کبد حساسیت بیشتری به سم اسفنوالریت دارند و تاکید نمودند که بیان HSP در این بافت‌ها می‌تواند به عنوان شاخص مفید و بسیار حساس سلولی به دوزهای تحت کشنده آلودگی باشد. براساس یافته‌های Xing و همکاران (۲۰۱۳) بیشترین و کمترین میزان بیان HSP70 در کپور معمولی در معرض سموم آترازین و کلروپیروفوز به‌ترتیب در بافت‌های قلب و ماهیچه گزارش گردید و علت آن به مکانیزم آداپتاسیون نسبت داده شد.

نتایج نشان داد که پاسخ بیولوژیک یک جانور به استرس از سطح مولکولی آغاز شده و در سطوح بعدی ادامه می یابد که موید نتایج Sepulveda (۲۰۰۴) است که با افزایش زمان مواجهه به‌ترتیب تغییرات در سطوح بیوشیمیایی، سلولی، بافت، دستگاه، موجود، جمعیت و اکوسیستم توسعه می‌یابد. در نتیجه پارامترهای بیوشیمیایی و بافت‌شناسی می‌توانند به‌عنوان شاخص موثری در مانیتورینگ تغییرات اکوتوکسیکولوژی محسوب گردند.

سپاسگزاری

این مطالعه قسمتی از طرح پژوهشی مصوب دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان می‌باشد. بدین‌وسیله از حامی مالی و زحمات کارشناسان آزمایشگاههای دانشکده شیلات و محیط‌زیست قدردانی به‌عمل می‌آید.

منابع

۱. پورکاظمی، م.، ۱۳۸۹. تحلیلی بر وضعیت دخایر ماهیان خاویاری و تولید خاویار در کشور. انستیتو تحقیقات ماهیان خاویاری، ۳-۱۰.

۲. شریف‌پور، ع.، سلطانی، م.، فتح اللهی، ب.، ۱۳۸۴. مطالعه آثار کشندگی و هیستوپاتولوژیک ناشی از سم آندوسولفان در ماهی کپور معمولی (Cyprinus carpio). مجله منابع طبیعی ایران. ۲، ۳۷۳-۳۸۱.

۳. صفری، ر.، شعبانی، ع.، رمضانپور، س. س.، کلنگی، ح. ۱۳۹۳. بررسی بیان ژن HSP70 در بافت‌های کبد و آبشش تاسماهی ایرانی در معرض اندوسولفان. طرح تحقیقاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۷۰ صفحه.

۴. فداکار ماسوله، ف.، مجازی امیری، ب.، میرزاقفی، ع.، نعمت اللهی، م. ع.، ۱۳۹۰. بررسی اثرات مس و کادمیوم بر پارامترهای حرکتی اسپرم ماهی سفید دریای خزر(*Rutilus frissi kutum*). نشریه شیلات. مجله منابع طبیعی ایران، ۱، ۷۴- ۶۵.

5. 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.
6. Akhtar, M.S. Pal., A.K., Sahu, N.P, Alexander, C., 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.
7. Bais, U.E., Lokhande, M.V., 2012. Effect of cadmium choloride on histopathological changes in the freshwater fish Channa (*Ophiocephalus striatus*). International Journal of Zoological Research, 8(1), 23-32.
8. Bao, Y., Wang, Q., Liu, H., Lin, Z., 2011. A small HSP group gene of bloody clam (*Tegillarca granosa*) involved in the immune response against *vibrio parahaemolyticus* and lipo polysaccaride. Fish and Shellfish Immunology, 30, 729-733.
9. Bauer, M., Greenwod, S.J., Clark., K.F., Jackman, P., Fairchild, W., 2013. Analysis of gene expression in Homarus americanus larvae

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1394.9.2.7.2]

19. Dong, M., Zhu, L., Shao, B., Zhu, Sh., Wang, J., Xie, H., Wang, J., Wang, F., 2013. The effects of endosulfan on cytochrome P450 enzymes and glutathione S-transferase in zebrafish (*Danio rerio*) livers. Ecotoxicology and Environmental Safty, 92, 1-9.
20. Dorts, J., Silvestre, F., Tu, H.T., Tyberghein, A.E. Phuong N.T., Kestemont, P., 2009. Oxidative stress protein 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.
21. Duffy, L.K., Scofiled, T., Patton, M., Bowyer, R.T., 1999. Comparative baseline levels of mercury, hsp70 and hsp90 in subsistence fish from the Yukon- Kushkokwim delta region of Alaska. Comparative Biochemistry and Physiology, 124(2), 181-186.
22. Eder, K.J., Leutenegger, C.M., Kohler, H.R., Werner, I., 2009. Effect of neurotoxic insecticides on heat shoch protein and cytokine transcription in Chinook salmon (*Onchorhyncus tshawytscha*). Ecotoxicology and Environmental Safety, 72, 182-190.
23. Erkmen, B., Caliskan, M., Yerli, S.V., 2000. Histopathological effects cyphenothrin gills of *Lepistes reticulates*. Veterinary and Human Toxicology, 42, 5-7.
24. Fanta, E., Rios, F.S. Romao, S. Vianna, A., Freiberger, S., 2003. Histopathology of the fish Corydoras paleatus contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. Ecotoxicology and Environmental Safety, 54 , 119-130.
25. Figueiredo- Fernandes, A., Ferreira-Cadoso, J.-V., Garcia-Santos, S., Monteiro, S.M., Carrola, J., Matos, P., Fontainhas-Fernandes, A., 2007. Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), exposed to waterborne copper. Pesquisa Veterinaria Brasileria, 27(3), 103-109.
26. Fu, D., Chen, J., Zhang, Y., Yu, Z., 2011. Cloning and expression of a heat shock protein 90 gene in the haemocytes of *Crassostrea hongkongensis* under osmotic stress and bacterial challenge. Fish and Shellfish Immunology, 31,118-125.
27. Gupta, S.C., Sharma, A., Mirshra, M., Mishra, R.K., Chowdhuri, D.K., 2010. Heat shock proteins in toxicology: How close and How far. Life Science, 86, 377- 384.
28. Hedayati, A., Safahieh, A., 2011. Serum hormone and biochemical activity as biomarkers of mercury pollution in yellowfin exposed to sublethal concentration of endosulfan during metamorphosis. Comparative Biochemistry and physiology, 8, 300-308.
10. Bruno, J., Osachoff, H., Skirrow, R., 2006. Gene expression profiles of columbia river white sturgeon exposed to two industrial effluents. Sturgeon Contaminants Working Group. 21 p.
11. 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 Expriments. Clinical Chemistry, 55(4), 611-622.
12. Celi, M., Vazzana, M., Sanfratello, M.A., 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.
13. Chan, K.M., 1995. Methalothionin: Potentital biomarker for monitoring heavy metal pollution in fish around Hong Kong. Marine Pollution Bulletin, 31, 411-415.
14. Colombo, A., Bonfanti, P., Orsi, F., Camatini, M., 2003. Developmental effects of endocrine disturbing chemicals in wildlife and humans. Environment Health Prespect, 101, 378-384.
15. Crupkin, A.C., Caaiquiriborde., P., Mendieta, J., Panzeri, A.M., Ballesteros., M., 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.
16. Cui, Z., Liu, Y., Luan, W., Li, Q., Wu, D., Wang, Sh., 2010. Molecular cloning and characterization of a heat shock protein 70 gene in swimming crab (*Portunus trituberculatus*). Fish and Shellfish Immunology, 28, 56-64.
17. Da Cuna, R.H., Vazquez., G.R., Piol, M.N., Guerrero, N.V., Maggese, M.C., Nostro, F.L., 2011. Assessment of the acute toxicity of organochlorine pesticide endosulfan in Cichlasoma dimerus. Ecotoxicology and Environmental Safety, 74, 1056-1073.
18. De Silva, P.M.C.S., Samayawardhena, L.A., 2002. Low concentrations of lorsban in water result in far reaching behavioral and histological effects in early life stages in guppy Ecotoxicology and Environmental Safety, 53, 248-254.

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1394.9.2.7.2]

seabream (*Acanthopagrus latus*). Toxicology and Industrial Health, 28, 306-319.
29. Jayakumar, P., Paul, V.I., 2006. Pattern of cadmium accumulation in selected tissues of the cat fish (*Clarias batrachus*) exposed to sublethal concentration of cadmium chloride. Veterinarski Archive, 76(2), 167-177.
30. Jiang, J., Shi, Y., Shan, Z., Yang, L., Wang, X., Shi, L., 2012. Bioaccumulation, oxidative stress and hsp70 expression in (*Cyprinus carpio*) exposed to microcystin-LR under laboratory conditions. Comparative Biochemistry and Physiology, 155(3), 483-490.
31. Jing, J., Liu, H., Chen, H., Hu, S., Xiao, K., Ma, X., 2013. Acute effect of copper and cadmium exposure on the expression of heat shock protein 70 in the Cyprinidae fish (*Tanichthys albonubes*). Chemosphere, 91(8), 1113-1122.
32. Kaplin, P.A., Selivanov, A.O., 1995. Recent coastal evolution of the Caspian sea as a natural model for coastal responses to the possible acceleration of global sea-level rise. Marine Geology, 124, 161-175.
33. Kenkel, C.D., Sheridan, C., Leal., M.C., Bhagooli, R., Castillo, K.D., Kurata., N., McGinty, E., Goulet, T.L., Matz, M.V., 2014. Diagnostic gene expression biomarkers of coral thermal stress. Marine Ecology Research, 14, 667-6780
34. Koehler, H.R., Bartussek, C., Eckwert, H., Farian, K., Graenzer, S., Knigge, T., Kuunz, N., 2001. The hepatic stress protein (hsp70) response to interacting abiotic parameters in fish exposed to various levels of pollution. Journal of Aquatic Ecosystem Stress Recovery, 8, 261-279.
35. Korkea-acho, T.L., Vehnianinen, E.R., Kukkonen, J.V.K., Taskinen, J. 2008. The effects of trated effluents on the intensity of papullomatosis and HSP70expression in roach. Exotoxicology and Environmental Safty. 70, 462-488.
36. Lee, S.M., Lee, S.B., Park, C.H., Choi, J., 2006. Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in (*Chironomus tentas*) larvae exposed to various environmental pollutants: a potential biomarker of fresh water monitoring. Chemosphere, 65, 1074-1081.
37. Negro, C.L., 2015. Histopathological effects of endusolfan to hepatopancreas, gills and ovary of the fresh water crab *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda: Trichodactylidae). Ecotoxicology and Environmental Saftey, 113, 87-94.
38. Oliveira Ribeiro, C.A., Belger, L., Pelletier, E., Rouleau, C., 2002. Histopathological evidence of inorganic mercury and methylmercury toxicity in Arctic charr (*Salvelinus alpines*). Environmental Research, 90(3), 217-225.
39. Parizanganeh, V., Lakhan C., Jalalian., H., 2007. A geochemical and statistical approach for assessing heavy metal pollution in sediments from the Southern Caspian coast. International Journal of Environmental Science and Technology, 4(3), 351-358.
40. 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.
41. Pfaffl, M.W., Horgan, G.H., Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST) for group wide comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Research, 30(9), 36.
42. Pourang, N., Tanabe, S., Rezvani, S., Dennis, H., 2005. Trace elements accumulation in edible tissues of five sturgeon species from the Caspian Sea. Environmental Monitoring and Assessment, 100, 89-108.
43. Rajeshkumar, S., Munuswamy, N., 2011. Impact of metals on histopathology and expression of HSP 70 in different tissues of Milk fish (*Chanos chanos*) of Kaattuppalli Island.Chemosphere, 83(4), 415-421.
44. Rao, J.V., Rani, C.H., Kavitha, P., Rao, R.N., Madhavendra, S.S., 2003. Toxicocity of chlorpyrifos to the fish (*Oreochromis mossambicus*). Bulltin of Environmental Contamination and Toxicology, 70, 985-992.
45. Rhee, J.S., Raisuddin, Sh., Lee, K.W., Seo, J.S., Ki, J.S., Kim, I.Ch., 2009. Heat shock protein (Hsp) gene responses of intertidal copepod (*Tigriopus japonicus*) to environmental toxicants. Comparative Biochemistry and Physiology, 149,104-112.
46. Rose, W.L., Nisbet, R.M., Green, P.G., Norris, S., Fan, T., Smith, E.H., Cherr, G.N., Anderson, S.L., 2006. Using an integrated approach to link biomarker responses and physiological stress to growth impairment of cadmium-exposed larval topsmelt. Aquatic Toxicology, 80, 298–308.
47. Roy, S., Bhattacharya, S., 2006. Arsenic-induced histopatology and synthesis of stress proteins in liver and Kidney of (*Channa Punctatus*). Ecotoxicology and Environmental Safety, 65, 218- 229.

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1394.9.2.7.2]

48. Rupik., W., Jaslik, K., Bembenek, J., Wildlak., W., 2011. The expression patterns of heat shock proteins and their rote during vertebrate's development. Comparative Biochemistry Physiology. A, 159, 349-366.
49. Safari, R., Shabani, A., Ramezanpour, S., Imanpour, M. R. 2014. Alternations of heat shock proteins (hsp70) gene expression in Persian sturgeon (Acipenser persicus) exposed to cadmium chloride. IJFS,13 (4), 979-997.
50. Santos, R.F.B., Dias, H.M., Fujimoto, R.Y., 2012. Acute toxicity and histopathology in ornamental fish amazon blue spotted corydora (Corydoras melanistius) exposed to formalin. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 84(4), 1001-1007.
51. Schlenk, D., Di Giulo, R.T., 2002. Biochemical responses as indicators of aquatic ecosystem health. In Adams,S.M.(ed). Biological indicators of aquatic ecosystem stress. AFS. Bethesda, 14-17.
52. Sepúlveda, S., Gallagher, E.P., Wieser, C.M., Gross, T.S. 2004. Reproductive and biochemical biomarkers in largemouth bass sampled downstream of a pulp and paper mill in Florida. Ecotoxicology and Environmental Safety. 57 (3), 431-440.
53. Shariati, F., Esmaili Sari, A., Mahinchian, A., Pourkazemi, M., 2011. Metallothionein as potential biomarker of cadmium exposure in Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*). Biological Trace Element Research. 143, 281-
54. Silva Barni., M.F., Gonzales, M., Miglioranza, K.S.B., 2014. Assessment of persistent organic pollutants accumulation and lipid peroxidation in two reproductive stages of wild silverside (*Odontesthes bonariensis*). Ecotoxicolal Environmental Healthy, 1, 9943-45.
55. Tedeschi, J.N., Kennington, W.J., Berry, O., Whiting, S., Meekan, M., Mitchell, N.J., 2015. Increased expression of Hsp70 and Hsp90 mRNA as biomarkers of thermal stress loggerhead turtle embryos (*Caretta caretta*). Journal of Termal Biology, 47, 42-50.
56. Vijayan, M.M., Pereria, C., Kruzynski, G., Iwama, G.K., 1998. Sublethal concentrations of contaminant induce the expression of hepatic heat shock protein 70 in two salmonids. Aquatic Toxicology, 40, 101-108.
57. Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B., Beyersmann, D., 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium. Toxicology, Vol. 192, pp. 95-117.
58. Wang, W., Batterman, S., Chernyak, S., Nriagu, A., 2008. Concentrations and risks of organic and metal contaminants in Eurasian caviar. Ecotoxicology and Environmental Safety, 71(1), 138-148.
59. Xing, H., Li, Sh., Wang, X., Gao, X., Xu, Sh., Wang, X., 2013. Effects of atrazine and chlorpyrifos on the mRNA levels of HSP70 and HSC70 in the liver, brain, kidney and gill of Common carp (*Cyprinus carpio*). Chemosphere, 90(3), 910-916.

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1394.9.2.7.2]