

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: ۴۹۱۳۸-۱۵۷۳۹

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

تاریخ پذیرش: ۵ اردیبهشت ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: ۱۸ آذر ۱۳۹۳

چکیده

افزایش ورود آلاینده‌هایی نظیر آفت‌کش‌ها می‌تواند اثرات مخربی بر اکوسیستم‌های آبی و آبزیان داشته باشد. در این تحقیق اثر دوزهای تحت کشنده (۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم در لیتر) سم اندوسولفان بر بیان ژن HSP70 و آسیب‌های بافت آبشش در بچه‌تاس ماهیان 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 نسبی HSP70-mRNA در نمونه‌های تحت تیمار در تمام روزهای مواجهه در مقایسه با گروه شاهد سم اندوسولفان به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0/05$). بیان نسبی HSP70-mRNA پاسخ وابسته به زمان را در هر 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 ($P < 0/05$) 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 ($P < 0/05$). 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: تاس ماهی ایرانی، اندوسولفان، پروتئین شوک حرارتی، بیان ژن، بافت‌شناسی.

مقدمه

اندوسولفان یکی از آفت کش‌های ارگانوکلرینی است که از طریق رواناب‌های کشاورزی وارد آب‌ها شده و با توجه به ثبات شیمیایی، تجزیه پذیری 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.*, 2015; Negro *et al.*, 2013). این سم جز سموم با سمیت شدید برای ماهیان دسته‌بندی می‌گردد (Silva *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 شده است (Akhtar *et al.*, 2012; Dong *et al.*, 2013; Crupkin *et al.*, 2015; Negro *et al.*, 2013) 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 آبرزی مورد مطالعه متفاوت است (Dorts, 2013; Bauer *et al.*, 2009; *et al.*). تغییرات بیوشیمیایی و مولکولی به‌عنوان اولین تغییرات قابل اندازه‌گیری می‌توانند اطلاعات زیادی در رابطه با اثرات تحت‌کشنده مواد تنش‌زا در موجود آبرزی موردنظر در اختیار ما قرار دهند (Rose *et al.*, 2006). مطالعات نشان داده 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).

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 زیست‌نشانگر برای هر کدام از تغییرات از جمله آلودگی با سموم به‌شمار آید (Xing *et al.*, 2003; Bauer *et al.*, 2013; Tedeschi, *et al.*, 2015). دریای خزر 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 متأسفانه 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 دریای خزر، 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). گسترده‌گی مزارع کشاورزی و باغات در سواحل دریای خزر خصوصاً 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 تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus* Borodin, 1897) از مهم‌ترین گونه‌های ماهیان خاویاری دریای خزر است که به‌دلیل صید بی‌رویه، تخریب

کشنده (۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم در لیتر) صفری و همکاران، ۱۳۹۳) شاهد برای مدت ۱۴ روز قرار گرفتند. کلیه شرایط محیطی، برای همه تانک‌ها کاملاً 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 آرتیمیا در ۲ مرحله ۸ صبح و ۱۶ تغذیه می‌شدند. تعویض آب یک روز در میان با آب حاوی غلظت مورد نظر انجام می‌شد. نمونه برداری از هر کدام از تیمارها در روزهای ۱، ۲، ۷ و ۱۴ با سه تکرار انجام شد. بچه ماهیان بعد از نمونه برداری ابتدا با استفاده از پودر گل میخک (۵/۰ گرم بر لیتر) بیهوش و کشته شدند. جهت بررسی آسیب‌های بافتی نمونه‌های بافت آبشش در فرمالین ۱۰ درصد 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 این کار 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)

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 (Kaplın 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 تاس ماهی ایرانی صورت نپذیرفته است. بنابراین تحقیق حاضر با هدف تاثیر سم اندوسولفان بر آسیب‌های بافت آبشش و بیان این ژن در تاس ماهی ایرانی صورت گرفت تا امکان در نظرگیری این پروتئین به عنوان یک زیست نشانگر در مطالعات آلودگی با این سم بررسی گردد.

مواد و روش‌ها

تیمار بندی و نمونه برداری

بچه تاس ماهیان ایرانی در وزن رهاسازی (۵-۳ گرمی) از مجتمع تکثیر و پرورش شهید رجایی- گرگان تهیه و در شرایط ونیرو (نور طبیعی و تعویض مداوم آب) به مدت ۱ هفته جهت آدپتاسیون نگهداری شدند. به منظور انجام آزمایش آلودگی ابتدا بچه ماهیان 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. تیمار بندی بر اساس روش به کار گرفته شده توسط Roy and Battacharya (2006) با کمی تغییر انجام شد، بدین منظور بچه ماهیان در معرض ۳ دوز تحت

قرار داده شد تا پارافین اضافه از روی بافت حذف شود. نمونه‌ها پس از پارافین زدایی و جایگزینی آن با زایلن به وسیله سری‌های کاهشی اتانول (۱۰۰، ۹۰ و ۷۰ درصد) آبدهی مجدد و با استفاده از محلول‌های هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی 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 میلی گرم نمونه بافت‌های کبد و آبشش هموزن شده با ازت مایع با استفاده از بیوزول و طبق دستورالعمل شرکت سازنده (Biozol-Bioflux) استخراج شد. کیفیت RNA کل با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد و مشاهده باندهای ۱۸S و ۲۸S مربوط به RNA ریپوزومی و فقدان آلودگی DNA ژنومی با استفاده از نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ (OD_{۲۶۰/۲۸۰}) نانومتر به دست 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 دیس رقیق شدند. جهت حذف هرگونه باقی مانده 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)، ۱ میکرولیتر آغازگر الیگو (۲۰-۱۸ الیگونوکلئوتید) و ۵ میکرولیتر آب دیس انجام شد. بدین منظور تیوپ‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شدند و سپس به سرعت روی یخ قرار گرفتند. ۴ میکرولیتر بافر ۵X آنزیم نسخه‌بردار معکوس، ۲ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی مولار و ۲۰ واحد آنزیم RNase inhibitor و ۱/۵ میکرولیتر آب دیس به مخلوط بالا اضافه شد. تیوپ‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفت. بلافاصله ۲۰۰ واحد آنزیم نسخه‌بردار معکوس به هر تیوپ اضافه گردید و به مدت ۱ ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند، سپس تیوپ‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید تا واکنش غیرفعال شود. به هر تیوپ ۳۸۰ میکرولیتر آب دیس اضافه شد و سپس cdNA های سنتز شده تا شروع آزمایش‌ها در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت تأیید حذف کامل آلودگی DNA، از پرایمر طراحی شده در ناحیه ۲ اگزون متوالی (exon- exon) ژن β_2m پرایمری استفاده گردید، محصول واکنش در صورت تکثیر و عدم تکثیر ناحیه اینترون به ترتیب 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).

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در بررسی بیان HSP70 در تاس ماهی ایرانی تحت تاثیر سم آندوسولفان

نام پرایمر	توالی (۵'-۳')	دمای اتصال (C°)	طول قطعه	کاربرد
Ap Hsp70q-PCRf	CGCTGGCCTTAATGTTCTCC	۵۶	۲۴۹	سنجش کمی بیان ژن
Ap Hsp70q-PCRr	GCGCTTGAACCTCTGCAATGA	۵۶		
β -actin q-PCRf	TTGCCATCCAGGCTGTGCT	۵۶	۲۱۵	ژن رفرنس (خانه دار)
β -actin q-PCRr	TCTCGGCTGTGGTGAA	۵۶		
$\beta 2m$ with intronF	GGGACTTTCCACAAAGGCTA	۶۱	۱۷۹۵	تعیین آلودگی DNA
$\beta 2m$ with intronR	CGACTGATGCTACCGGAAC	۶۱		

تجزیه و تحلیل داده‌های آنالیز کمی

qPCR

داده‌های به دست آمده جهت تعیین بیان نسبی ژن HSP70 نسبت به بتا اکتین با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 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 شاپیرو-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 یک طرفه در سطح اطمینان ۹۵ درصد صورت گرفت. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار نمایش داده شد. مقایسه میانگین بیان نسبی در بافت‌های کبد و آبشش توسط آنالیز تی (در سطح اطمینان ۹۵ درصد) انجام شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS (Version 16) انجام شد.

ارزیابی عملکرد پرایمرهای به کار رفته با

استفاده از منحنی استاندارد و واکنش qPCR

به منظور اطمینان از بهینه بودن شرایط qPCR، سری غلظت‌های مختلف (۱، ۱/۲، ۱/۵، ۱/۱۰، ۱/۲۰، 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).

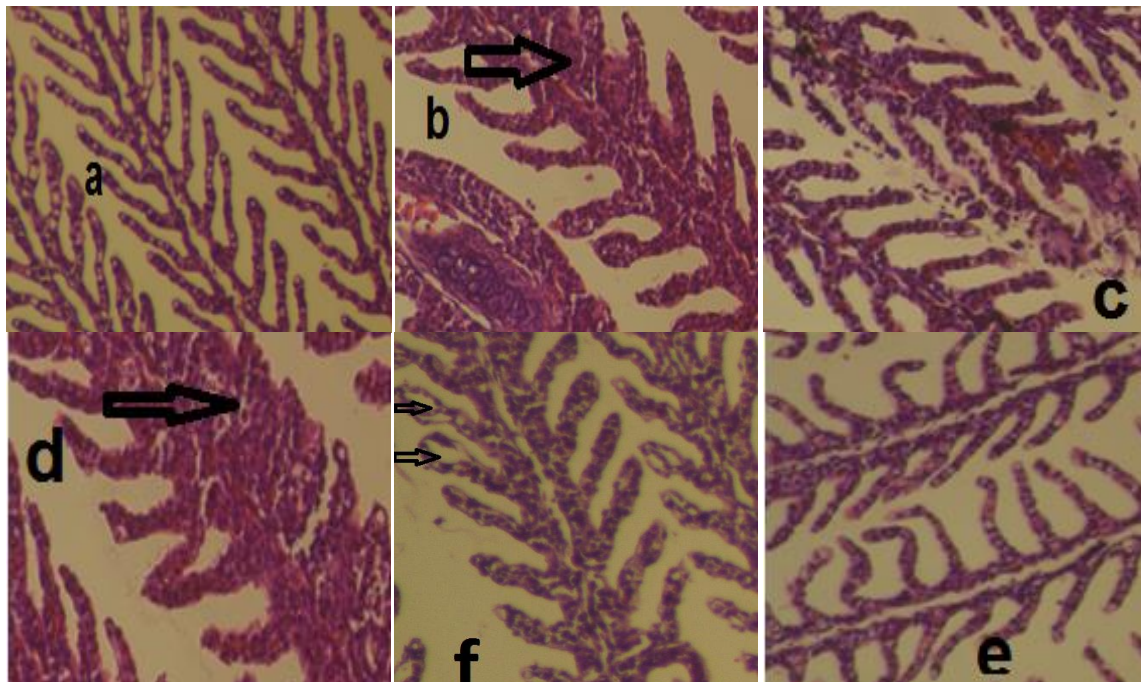
واکنش qPCR بعد از بهینه‌سازی دما و مواد مصرفی، در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با استفاده از پرایمر qPCR طراحی شده برای ژن HSP70 و پرایمر ژن رفرنس بتا اکتین توسط کیت سایر شرکت بیوپارس (دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان) در دستگاه iQ5 شرکت (BIO-RAD, USA) و با استفاده از نرم افزار بایورد iQ5 اپتیکال برای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

نتایج

مشاهدات هیستوپاتولوژیکی

تغییرات هیستوپاتولوژیکی در بافت آبشش ماهیان در گروه شاهد طی مواجهه مشاهده نشد. در ماهیان تحت تیمار 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 به طوری که شدت آسیب‌ها در ماهیان در مواجهه با دوز $40 < 20 < 10$ میکروگرم در لیتر بود (شکل ۱).

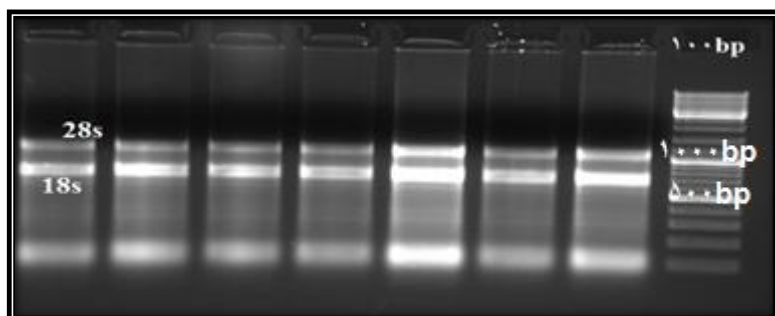


شکل ۱: عوارض بافت‌شناسی آبشش تاس‌ماهی ایرانی در مواجهه با سم اندوسولفان (رنگ آمیزی هموتوکسیلین-ائوزین) (بزرگ‌نمایی $10\times$). گروه شاهد (a)، هایپرپلازی (b)، پرخونی (c)، چسبندگی لاملاهای ثانویه (d)، خمیدگی لاملاهای ثانویه (e) و جدا شدگی اپیتلیوم (f)

بررسی کیفی و کمی RNA

نتایج کیفی RNA استخراج شده از بافت‌های کبد و آبشش تاس‌ماهی ایرانی در هر نمونه، دو باند S و $18rRNA$ 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 $2/1 - 1/8$ قرار داشت و همچنین میزان جذب در طول موج‌های ۲۳۰، ۲۴۰ و ۳۲۰ نیز بیانگر قابلیت مناسب RNA در نمونه‌های مورد بررسی بود.

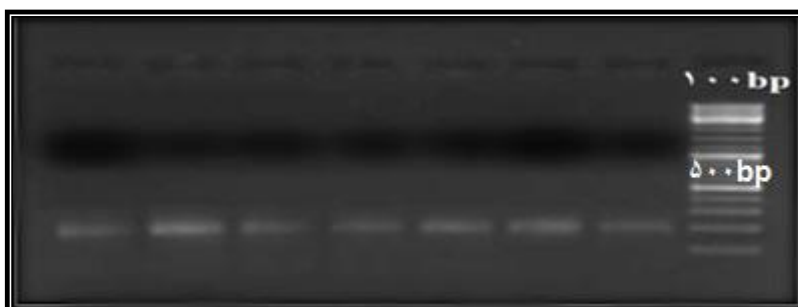


شکل ۲: کیفیت RNA استخراج شده از بافت‌های کبد و آبشش تاس‌ماهی ایرانی روی ژل آگارز ۱/۵٪ و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید. در نمونه‌های استخراج شده دوباند متعلق به ۱۸S rRNA و ۲۸S می‌باشند.

شده در ناحیه ۲ اگزون متوالی ژن 2m β ، با تکثیر محصولی به اندازه ۲۱۲، عدم تکثیر ناحیه اینترون توسط آغازگر مذکور را تایید نمود (شکل ۳).

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 ۲۱۶ bp و ۲۴۹ bp مشاهده شد. حذف آلودگی DNA، با استفاده از آغازگر طراحی



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

مواجهه با سم اندوسولفان در مقایسه با تیمار شاهد در همه غلظت‌های مورد بررسی مشاهده شد.

بررسی ثبات بیان ژن رفرنس

نتایج به دست آمده از بیان ژن بتا اکتین در تیمارهای مختلف بافت‌های آبشش و کبد اختلاف معنی‌داری را بین تیمارها نشان نداد ($P > 0/05$).

پروفایل وابسته به دوز بیان HSP70

در آبشش، در غلظت ۱۰ میکروگرم در لیتر، بیشترین میزان بیان HSP70 در روز دوم مواجهه مشاهده گردید، اما اختلاف معنی‌داری در روزهای مواجهه مشاهده نشد ($P > 0/05$). در غلظت ۲۰ میکروگرم در

بررسی بیان نسبی ژن

افزایش بیان نسبی HSP70 به بتا اکتین در بافت‌های آبشش و کبد تاس‌ماهی ایرانی در طول دوره

پروفایل وابسته به زمان بیان HSP70

در آبخش، در روز اول مواجهه اگر چه افزایش بیان نسبی HSP70 Ap بین غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در لیتر (به ترتیب ۰/۸ و ۱/۲ برابر، $P > 0/05$) مشاهده شد اما این افزایش معنی‌دار نبود، اما در دوز ۴۰ میکروگرم در لیتر افزایش معنی‌دار بیان نسبی (برابر، $P < 0/05$) مشاهده گردید. در روز دوم بیان نسبی HSP70 Ap در غلظت‌های مختلف ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم در لیتر (۱، ۱/۷ و ۳ برابر، $P < 0/05$) افزایش معنی‌داری را نشان داد. در روز چهاردهم نیز بیان نسبی HSP70 Ap در دوزهای مختلف ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم در لیتر به ترتیب (۰/۸، ۱/۵ و ۲/۳۵ برابر، $P < 0/05$) 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، $P < 0/05$) در روز دوم مشاهده شد و در روز هفتم نیز اختلاف معنی‌داری در میزان بیان در دوزهای مورد بررسی مشاهده نشد ($P > 0/05$)، در روز چهاردهم نیز اختلاف معنی‌داری در میزان بیان نسبی HSP70 Ap در تیمارهای ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در لیتر (به ترتیب ۲ و ۲/۲۵) مشاهده نشد ($P > 0/05$)، اما میزان بیان نسبی در تیمار ۴۰ میکروگرم در لیتر نسبت به دو دوز دیگر اختلاف معنی‌داری را نشان داد (۳/۱۸ برابر، $P < 0/05$) (شکل ۴ و ۵).

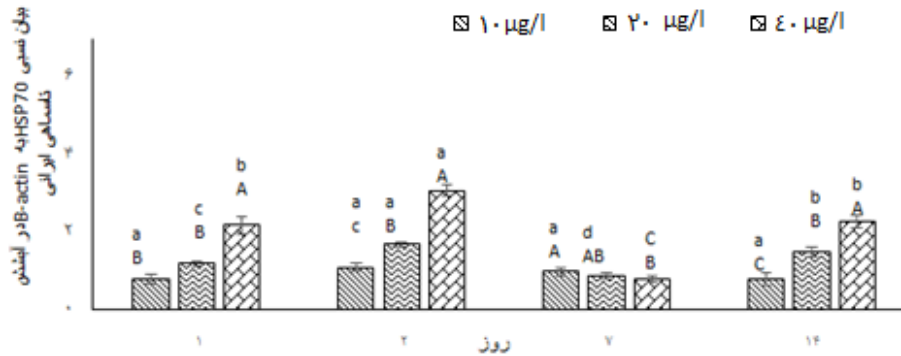
لیتر، مقدار نسبی بیان در روز اول مواجهه در مقایسه با شاهد به‌طور معنی‌داری ($P < 0/05$) ۱/۲ برابر افزایش یافت و در روز دوم این افزایش به بیشترین میزان (۱/۷ برابر، $P < 0/05$) رسید و سپس در روز هفتم به‌طور معنی‌داری (۰/۹ برابر، $P < 0/05$) کاهش یافت و در روز چهاردهم مواجهه (۱/۵ برابر، $P < 0/05$) مجدداً افزایش نشان‌داد. روند مشابهی نیز در روز اول (۲/۲ برابر، $P < 0/05$)، روز دوم (۳/۱ برابر، $P < 0/05$)، روز هفتم (۰/۸ برابر، $P < 0/05$) و روز چهاردهم (۲/۳ برابر، $P < 0/05$) در مواجهه با غلظت ۴۰ میکروگرم در لیتر مشاهده شد (شکل ۴).

بیان نسبی HSP70 در روز اول در کبد، در غلظت ۱۰ میکروگرم در لیتر در مقایسه با تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری (۱/۴ برابر، $P < 0/05$) افزایش یافت و به بیشترین میزان خود (۲/۲ برابر، $P < 0/05$) در روز دوم مواجهه رسید که این افزایش معنی‌داری نبود ($P > 0/05$). سپس در روز هفتم کاهش (۱/۹ برابر، $P < 0/05$) و در روز چهاردهم مواجهه به (۲ برابر، $P < 0/05$) افزایش یافت. در غلظت ۲۰ میکروگرم در لیتر، مقدار نسبی بیان در روز اول مواجهه در مقایسه با شاهد به‌طور معنی‌داری ($P < 0/05$) ۲/۵ برابر افزایش یافت و در روز دوم این افزایش به بیشترین میزان (۲/۷ برابر، $P < 0/05$) رسیده و سپس در روز هفتم (۲ برابر، $P < 0/05$) کاهش و سپس میزان بیان در روز چهاردهم مواجهه به (۲/۲ برابر، $P < 0/05$) رسید. روند مشابهی نیز در روز اول (۲/۶ برابر، $P < 0/05$)، روز دوم (۳/۷ برابر، $P < 0/05$)، روز هفتم (۲/۱ برابر، $P < 0/05$) و روز چهاردهم (۳/۱۸ برابر، $P < 0/05$) مواجهه با غلظت ۴۰ میکروگرم در لیتر مشاهده شد (شکل ۵).

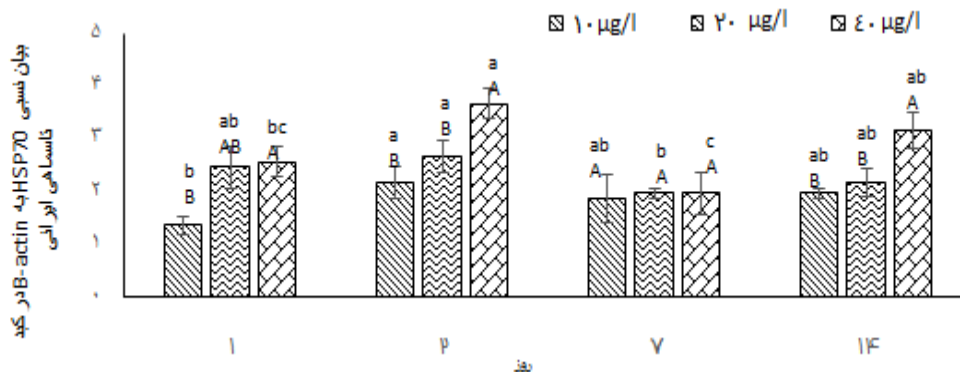
بیان وابسته به بافت HSP70 Ap

افزایش بیان HSP70 Ap 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

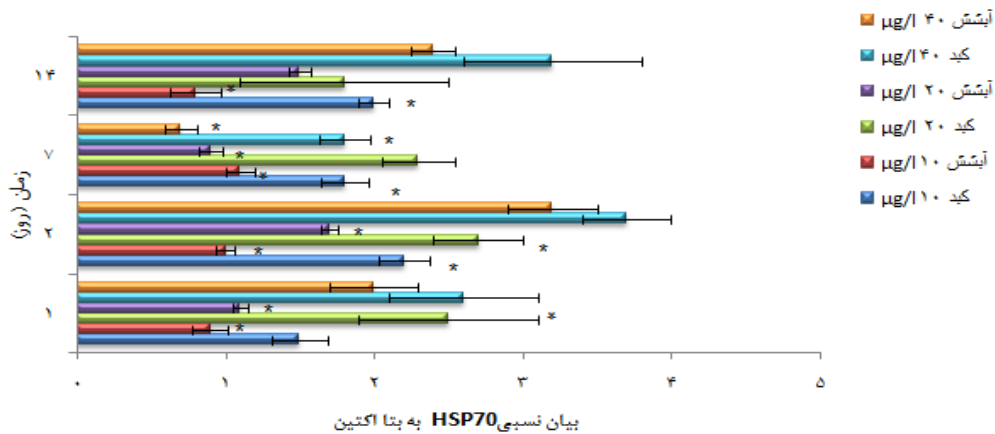
چهاردهم و غلظت ۲۰ میکروگرم در لیتر در روز چهاردهم معنی‌دار ($P < 0.05$) بود (شکل ۶).



شکل ۴: تغییرات بیان نسبی HSP70 به بتا اکتین در بافت آبشش تاس ماهی ایرانی در مواجهه ۱۴ روزه با دوزهای مختلف (۱۰، ۲۰، ۴۰ میکروگرم در لیتر) سم اندوسولفان. حروف کوچک و بزرگ اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) را در روزهای مواجهه (a-c) و دوز اندوسولفان (A-B) نشان می‌دهد.



شکل ۵: تغییرات بیان نسبی HSP70 به بتا اکتین در بافت کبد تاس ماهی ایرانی در مواجهه ۱۴ روزه با دوزهای مختلف (۱۰، ۲۰، ۴۰ میکروگرم در لیتر) سم اندوسولفان. حروف کوچک و بزرگ اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) را در روزهای مواجهه (a-c) و دوز اندوسولفان (A-B) نشان می‌دهد.



شکل ۶: تغییر میزان بیان نسبی HSP70 در بافت‌های کبد و آبشش تاس ماهی ایرانی در مواجهه ۱۴ روزه با دوزهای مختلف (۱۰، ۲۰، ۴۰ میکروگرم در لیتر) سم اندوسولفان * ($P < 0.05$):

بحث

بوم سازگان های آبی همواره دریافت کننده حجم وسیعی از آلاینده های چون آفت کش ها، فلزات سنگین، هیدروکربن های نفتی و مواد آلی ناشی از فاضلاب های خانگی، معدنی، صنعتی و کشاورزی می باشند که تعادل بوم سازگان را برهم زده و از عملکرد درست آن ممانعت به عمل می آورد (Pourang et al., 2005)، بنابراین برآورد اثرات این آلاینده ها بر بوم سازگان ها ضروری است. حساسیت به آلاینده ها در گونه های 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 اکوسیستم های آبی در سال های اخیر از سنجش کمی مقدار آلاینده در آب، رسوب و بافت ماهی به سمت سنجش های کیفی اثرات آلاینده ها بر آبزیان با استفاده از زیست نشانگرها یا بیومارکرهای مولکولی، بیوشیمیایی، خون شناسی، آنزیمی و بافتی سوق پیدا نموده است (Schelenk, 2006). شاخص های هیستوپاتولوژیکی به عنوان نشانگر زیستی در بررسی وضعیت سلامتی ماهی در معرض آلاینده های نظیر سموم و فلزات سنگین در مطالعات محیطی و آزمایشگاهی به طور وسیع مورد استفاده قرار می گیرند (De cuna et al., 2011). مطالعات انجام شده، بیشترین تجمع مواد آلاینده را در بافت های 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 می کند، بلافاصله از محیط آلوده آسیب می بیند (Da Cuna et al., 2011; Negro., 2015).

(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 آسیب های بافتی نیز در دوزهای بالاتر بیشتر بود. جداشدگی اپیتلیوم، نکروز، دژنراسیون لاملاهای ثانویه و کوتاه شدگی لاملاهای ثانویه در آبشش ماهی گوپی (*Lebistes reticulaes*) در مواجهه با سم سیفوترین (Erkmen, 2000)، کوتاه شدگی لاملاها، فیوژن و از بین رفتن کلی لاملاها در ماهی گوپی (*Poecilia reticulata*) در معرض حشره کش ارگانوفسفاته کلورپیرفوز (De Silva and Samayawardhena, 2002) و همچنین هیپرتروفی، از بین رفتن لاملاها و جمع شدن خون در ماهی *Ophiocephalus striatus* در معرض کادمیوم توسط (Bais and Lokhande, 2012)، نکروز و چماقی شدن آبشش ها، 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 می تواند به جدا شدگی اپیتلیوم تبدیل شود، این علائم در کنار سایر آسیب ها نظیر لاملاهای ثانویه می توانند به عنوان مکانیزم های دفاعی محسوب گردند. مثلا جداشدگی اپیتلیوم، مسافتی که قرار است آلودگی طی نماید تا به جریان خونی راه پیدا کند را افزایش داده (Figueiredo- Fernandes et al., 2007) و چسبندگی لاملاهای ثانویه سطح آبشش را برای تماس با آلاینده ها کاهش می دهند (Santos et al., 2012).

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 تتراکلرید کربن، نانوفنل، اکتانفل و فیتروتیون 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 حالی که 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 مواد آلی 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 در جلوگیری از دناتوره شدن پروتئین‌ها نسبت داده شود. افزایش بیان HSP70 در معرض غلظت‌های بسیار پایین‌تر از LC50 آلاینده‌های محیط‌زیستی شامل بتا نفتالون، کلرید-کادمیوم و پساب‌های کارخانه کاغذسازی در دو گونه

امروزه انواع جدیدی از زیست‌نشانگرها 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 نظر گرفته شود. ارزیابی اثر مواد آلاینده بر سیستم‌های بیولوژیکی عمدتاً 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 P450 (Colombo *et al.*, 1995)، گلوکوتیون 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 زیست‌نشانگر در ارزیابی میزان استرس به‌شمار آیند (Rupik *et al.*, 2011; Kenkel *et al.*, 2014). در بین ایزوفرم‌های مختلف پروتئین‌های شوک حرارتی، 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

کمترین میزان بیان این ژن در روز اول مشاهده شد که ممکن است به برهم 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 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 هنگ کنگی (*Crassostrea 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 به طور معنی داری ($P < 0.05$) بالاتر از آبشش بود که می‌تواند به فراهم بودن شرایط برای فعالیت پروتئین کیناز C که القاکننده بیان این ژن می‌باشد در بافت متابولیکی کبد نسبت داده شود. افزایش معنی دار بیان HSP 70 در یک اندام و عدم بیان آن در اندام‌های دیگر را می‌توان به حساسیت آن اندام به آلودگی‌ها نسبت داد که منجر به پاسخ‌های سلولی از جمله بیوستنز 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 saxatilis*) در مواجهه بیست و چهار ساعته با سم اسفنوالریت مشاهده شد در حالی که چنین تغییری در بافت‌های ماهیچه، آبشش و کلیه مشهود نبود. Eder و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعه پروتئین شوک حرارتی

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 تاس ماهی سفید (*A. transmontanus*) سطح HSP70، ۵ برابر افزایش یافت. Bruno و همکاران (۲۰۰۹) مشاهده نمودند که با افزایش دوز اسفنوالریت از ۰/۱ 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 تیمار کنترل افزایش را نشان داد، اما بیشترین میزان آن در روز دوم مواجهه مشاهده شد که این افزایش معنی دار نقش چارپرونی این پروتئین را در جلوگیری از برهمکنش نامناسب بین پروتئین‌ها (تاخوردن اشتباه و تجمع پروتئینها) آشکار می‌سازد و همچنین ممکن است این ژن از جمله ژن‌های زود هنگام 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.

۱. پور کاظمی، م.، ۱۳۸۹. تحلیلی بر وضعیت دخایر ماهیان خاویاری و تولید خاویار در کشور. انستیتو تحقیقات ماهیان خاویاری، ۳-۱۰.
۲. شریف پور، ع.، سلطانی، م.، فتح الهی، 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 ۷۰۰ صفحه.
۴. فداکار ماسوله، ف.، مجازی امیری، ب.، میرزاقفی، ع.، نعمت الهی، 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 chlororide 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 polysaccharide. *Fish and Shellfish Immunology*, 30, 729-733.
9. Bauer, M., Greenwood, S.J., Clark., K.F., Jackman, P., Fairchild, W., 2013. Analysis of gene expression in *Homarus americanus* larvae

در کبد و ماهیچه چینوک سالمون (*Oncorhynchus tshawytscha*) در مواجهه با حشره کش نورو توکسیک 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 به ترتیب در بافت‌های قلب و ماهیچه گزارش گردید و علت آن به مکانیزم آدآپتاسیون نسبت داده شد.

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

سپاسگزاری

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

منابع

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., 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), 181-186.
22. Eder, K.J., Leutenegger, C.M., Kohler, H.R., Werner, I., 2009. Effect of neurotoxic insecticides on heat shock protein and cytokine transcription in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 182-190.
23. Erkmén, 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., Freiburger, 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 Experiments. *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: Potential 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., Caaquiriborde., 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.

38. Oliveira Ribeiro, C.A., Belger, L., Pelletier, E., Rouleau, C., 2002. Histopathological evidence of inorganic mercury and methylmercury toxicity in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *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. Toxicocyt 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 topmelt. *Aquatic Toxicology*, 80, 298-308.
47. Roy, S., Bhattacharya, S., 2006. Arsenic-induced histopatolgy and synthesis of stress proteins in liver and Kidney of (*Channa Punctatus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65, 218- 229.
- 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 Safty*, 113, 87-94.

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*). *Ecotoxicol 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 Thermal 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.
48. Rupik., W., Jaslik, K., Bembenek, J., Wildlak., W., 2011. The expression patterns of heat shock proteins and their role 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-