



دانشگاه گنبد کاووس

نشریه "پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی"

دوره دوم، شماره سوم، پاییز ۹۳

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

بررسی بیان ژن P450 در بافت‌های کبد و آبشش تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus* Borodin, 1897) در معرض کلرید کادمیوم

رقیه صفری*^۱، حامد کلنگی میاندره^۱، علی جعفر نوده^۲

^۱استادیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

^۲دانشجوی دکتری دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ ارسال: ۹۳/۱۱/۱۹ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۲۴

چکیده

در این مطالعه بیان ژن P450 در بچه‌ماهیان تاس‌ماهی ایرانی در مواجهه چهارده روزه با غلظت‌های تحت-کشنده (۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم در لیتر) کادمیوم مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور نمونه‌برداری از بافت‌های کبد و آبشش در روزهای اول، دوم، هفتم و چهاردهم انجام شد. نتایج نشان داد که در بافت‌های کبد و آبشش بیان نسبی mRNA-P450 در نمونه‌های تحت تیمار در تمام روزهای مواجهه در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت ($P < 0.05$). بیان نسبی mRNA-P450 پاسخ وابسته به زمان را در هر دو بافت بعد از مواجهه با کلرید کادمیوم نشان داد. روند مشابهی در تمام غلظت‌های مورد مطالعه در دو بافت مورد بررسی مشاهده شد. اگرچه در این مطالعه افزایش بیان نسبی mRNA-P450 در هر دو بافت مورد مطالعه مشاهده شد، اما بیان نسبی آن به‌طور معنی‌داری در بافت کبد از بافت آبشش بالاتر بود ($P < 0.05$). بیان نسبی mRNA-P450 در تمام روزهای مواجهه نیز در غلظت‌های بالاتر مقادیر بالاتری را نشان داد.

واژه‌های کلیدی: تاس‌ماهی ایرانی، کلرید کادمیوم، P450، بیان ژن

*نویسنده مسئول: rsafari@gau.ac.ir

مقدمه

افزایش ورود آلاینده‌هایی نظیر فلزات سنگین می‌تواند اثرات مخربی بر آبزیان، اکوسیستم‌های آبی و به‌طور غیرمستقیم بر زندگی انسان داشته باشد. کادمیوم یکی از سمی‌ترین فلزات سنگین است که از طریق منابعی نظیر صنایع الکترونیک، سوخت‌های فسیلی و کودهای شیمیایی به محیط زیست افزوده می‌شود (Shahratash *et al.*, 2010). این عنصر با توجه به ثبات شیمیایی، تجزیه‌پذیری ضعیف و افزایش قدرت تجمع زیستی در بدن موجودات زنده، ضایعات مختلفی را در اندام‌ها ایجاد می‌نماید (Ling *et al.*, 2009). بنابراین به‌نظر می‌رسد اشکال مختلف کادمیوم (محلول و رسوب) می‌تواند بر موجودات آبی تأثیرگذار باشد. با توجه به اینکه تاس‌ماهی ایرانی به‌عنوان یک گونه گوشت‌خوار بوده و به‌ویژه در سنین ابتدایی رشد بیشتر غذای خود را از کف دریا تأمین می‌نماید، از این رو احتمال تجمع آلاینده‌های موجود در رسوبات در بدن این موجود وجود دارد که در کنار مواجهه مستقیم موجب تغییرات رفتاری، فیزیولوژیکی و در سطوح مولکولی خواهد شد.

بررسی‌های مختلفی در رابطه با میزان کادمیوم در آب و رسوبات دریای خزر انجام شده است (Mora and Sheikholeslami, 2002; Pourang *et al.*, 2005). طبق برآورد آیتی در سال ۲۰۰۳، سالانه ۱۴۱۳۱۱ کیلوگرم کادمیوم از رودخانه‌ها وارد این دریا می‌گردد که رودخانه ولگا در روسیه بیشترین سهم را دارا می‌باشد. همچنین مرکز منطقه‌ای کنترل آلودگی دریای خزر^۱ (CRTC) در سال ۲۰۰۳، مقدار کادمیوم وارد شده به دریا ناشی از صنایع در باکو و منطقه ماخاچکاله را به ترتیب ۵۶۴۰ و ۱۰۰۰ کیلوگرم در سال برآورد نمود (Shariati *et al.*, 2011). اما گزارش مستندی از میزان این فلز در آب دریای خزر موجود نیست. میزان این فلز در بدن تاس‌ماهی ایرانی ۰/۲۵ میکروگرم بر گرم (Agusa *et al.*, 2004)، رسوبات سواحل جنوبی دریای خزر حدود ۱/۵-۱ میکروگرم بر گرم (Sohrabi *et al.*, 2010) و (Parizanganeh *et al.*, 2007) و خاویار تاس‌ماهی حدود ۲/۴ میکروگرم بر گرم (Wang *et al.*, 2008) گزارش شده است.

در مطالعات مواجهه آبزیان با غلظت‌های متفاوت این فلز آسیب‌های بافتی، تغییرات آنزیمی، تغییرات پارامترهای خون‌شناسی، ژنتیکی، رفتاری، تولیدمثلی و حتی مرگ در گونه‌های مختلف گزارش شده است (Dong *et al.*, 2013; Akhtar *et al.*, 2012; Crupkin *et al.*, 2013; Negro *et al.*, 2015) که از این تغییرات می‌توان به‌عنوان نشانگرهای زیستی به‌منظور بررسی وجود آلاینده‌ها استفاده نمود. شدت و مدت این پاسخ‌ها تحت تأثیر غلظت، زمان و گونه آبی مورد مطالعه متفاوت است (Bauer *et al.*, 2013) (Dorts *et al.*, 2009). تغییرات مولکولی به‌عنوان اولین تغییرات قابل اندازه‌گیری می‌توانند اطلاعات زیادی در رابطه با اثرات تحت کشنده مواد تنش‌زا در موجود آبی مورد نظر در اختیار ما قرار دهند (Rose *et al.*

1. Caspian Regional Thematic Centers for Pollution Control

(al., 2006). پروتئین‌هایی هم‌چون Hsp70، متالوتیونین‌ها و آنزیم سیتوکروم اکسیداز P450 می‌توانند به عنوان نشانگرهای مولکولی آلودگی در سطح ژنوم یا پروتئین بررسی شوند (Dong et al., 2013; Bruno et al., 2006; Chan et al., 1995; Tedeschi et al., 2015). سیتوکروم اکسیداز P450 جز اولین آنزیم‌هایی است که در فاز اول پاسخ به آلاینده‌ها تولید می‌شود (Siroka and Drastichova, 2004). این پروتئین در شرایط بدون تنش نیز بیان می‌شود ولی در معرض آلاینده‌های مختلف از جمله فلزات سنگین میزان بیان ژن آن تغییر می‌نماید که این تغییرات بیان می‌تواند به‌عنوان بیومارکر آلودگی محسوب گردد (Korashy and El-kadi, 2005; Sheader et al., 2006; Softeland et al., 2010). هر ساله چندین میلیون مترمکعب فاضلاب‌های خانگی، صنعتی و کشاورزی حاوی انواع آلاینده‌ها وارد دریای خزر می‌گردد. تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus* Borodin, 1897) از مهم‌ترین گونه‌های ماهیان خاویاری دریای خزر است که به‌دلیل صید بی‌رویه، تخریب زیستگاه آنها به‌جهت 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 (Pourkazemi, 2000). تاکنون بررسی تأثیر انواع مختلفی از آلاینده‌ها بر پارامترهای بیوشیمیایی و بافت‌شناسی و بیان ژن‌ها در برخی از گونه‌های ماهیان صورت گرفته است، اما در مورد اثر فلز سنگین کادمیوم بر بیان ژن P450 در تاس‌ماهی ایرانی تحقیقی صورت نپذیرفته است. بنابراین تحقیق حاضر با هدف تأثیر کلرید کادمیوم بر بیان این ژن صورت گرفت تا امکان در نظرگیری این پروتئین به‌عنوان یک زیست‌نشانگر در محیط‌های آلوده با این فلز سنگین بررسی گردد.

مواد و روش‌ها

تیمار بندی و نمونه برداری: 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 یک هفته جهت آداپتاسیون نگهداری شدند. به‌منظور انجام آزمایش آلودگی ابتدا بچه‌ماهیان به صورت تصادفی در ۱۲ حوضچه (۳۰ عدد در هر تانک) توزیع شدند. تیمار بندی بر اساس روش به‌کار گرفته شده توسط روی و باتاچاریا (Roy and Battacharya, 2006)، با کمی تغییر انجام شد. بدین منظور بر اساس LC_{50} به‌دست آمده برای این گونه در معرض فلز سنگین کلرید کادمیوم ($CdCl_2$ ، مرک آلمان) ($4000 \mu g/l$) (Mirzaee, 2003)، ماهیان در مواجهه با ۳ غلظت تحت‌کشنده (۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم در لیتر) و شاهد برای مدت ۱۴ روز قرار گرفتند. کلیه شرایط محیطی، برای همه تانک‌ها کاملاً یکسان بود. دمای آب طی دوره به‌طور متوسط ۲۳ درجه سانتی‌گراد، پی‌اچ ۷/۵ و اکسیژن ۷/۹ بود و طی زمان مطالعه ماهیان از بیومس آرتمیا در ۲ مرحله ۸ صبح و ۱۶ تغذیه می‌شدند. نمونه‌برداری از هر کدام از تیمارها در روزهای ۱، ۲، ۷ و ۱۴ با سه تکرار انجام شد. بچه‌ماهیان بعد از نمونه‌برداری ابتدا با استفاده

از پودر گل میخک (۵/۰ گرم بر لیتر) بیهوش و کشته شدند. جهت بررسی مولکولی بافت کبد و آبشش ماهیان جدا و بلافاصله در ازت مایع منجمد و سپس در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا شروع آزمایش‌ها نگهداری شدند.

استخراج RNA: 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 ۱/۵٪ 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 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 باقی‌مانده DNA ژنومی در نمونه‌های RNA، به هر نمونه یک واحد DNase I، یک میکرولیتر بافر DNase I و ۱۰ واحد آنزیم RNase inhibitor اضافه گردید. ۱/۷۵ میکرولیتر آب دیس (تا رسیدن به حجم ۹ میکرولیتر) به هر تیوپ اضافه شد. تیوپ‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس یک میکرولیتر EDTA ۲۵ میلی‌مولار به هر تیوپ اضافه و در دمای ۶۵ درجه به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد.

سنتز و بررسی cDNA سنتز شده: 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 dt (۲۰-۱۸ الیگونوکلوئید) 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 میلی‌مولار 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 شدند 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 شدند. جهت تأیید حذف کامل آلودگی DNA، از پرایمر طراحی شده در ناحیه دو 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 می‌شود، که عدم تکثیر ناحیه اینترون توسط پرایمرهای مذکور نشان‌دهنده عدم آلودگی با DNA است. به منظور طراحی پرایمر ژن P450، توالی

بررسی بیان ژن P450 در بافت‌های کبد و آبشش تاس‌ماهی ایرانی....

شناسایی شده ژن مذکور در گونه‌های مختلف تاس‌ماهیان شامل توالی نسبی در تاس‌ماهی چینی (A. *sinensis*) (JN 5647452) به طول ۱۷۸۱ جفت‌باز و تاس‌ماهی سفید (*A. schrenckii*) (JX0139352) به طول ۵۵۵ جفت‌باز با استفاده از نرم‌افزار مولتی‌الاین (Corpet, 1988) مورد مقایسه قرار گرفت و بر اساس نواحی حفاظت‌شده و یکسان بین گونه‌های مختلف، نسبت به طراحی آغازگر ژن مورد نظر با طول ۲۳۷ جفت‌باز با نرم‌افزار پرایمر ۳ اقدام گردید، آغازگر به‌دست آمده با نرم‌افزار الیگو ۵ نیز مورد بررسی قرار گرفت، هم‌چنین اختصاصی بودن آغازگر، با استفاده از برنامه پرایمر بلاست (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/Primer-blast) کنترل گردید.

واکنش qPCR بعد از بهینه‌سازی دما و مواد مصرفی، در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با استفاده از پرایمر ریل‌تایم طراحی شده برای ژن P450 و پرایمر ژن رفرنس بتا اکتین توسط کیت سایبر شرکت بیوپارس (دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان) در دستگاه IQ5 شرکت بایورد و با استفاده از نرم‌افزار بایورد iQ5 اپتیکال برای بافت‌های کبد و آبشش در ۳ تکرار بیولوژیکی و ۳ تکرار تکنیکی انجام شد. از آنجایی‌که در دمای ۵۶ درجه محصول غیراختصاصی و دایمر مشاهده نشد، این دما به‌عنوان دمای واکنش در نظر گرفته شد.

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در بررسی بیان P450 در تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) تحت تأثیر کلرید کادمیوم.

نام پرایمر	توالی (۵′-۳′)	دمای اتصال (C°)	طول قطع	کاربرد
AP P450-PCRF	GTCATCTGTGCCATGTGCTT	۵۶	۲۳۷	ریل تایم
AP P450-PCRR	TCTTGTCGAAGGAGCGGTAG	۵۶		
β - actin q-PCRF	TTGCCATCCAGGCTGTGCT	۵۶	۲۱۵	ژن مرجع (خانه‌دار)
β - actin q-PCRR	TCTCGGCTGTGGTGAA	۵۶		
β 2m with intronF	GGGACTTTCCACAAAGGCTA	۶۱	۱۷۹۵	تعیین آلودگی DNA
β 2m with intronR	CGACTGATGCTACCGGAACT	۶۱		

تجزیه و تحلیل داده‌های آنالیز کمی qPCR: نتایج ارزیابی عملکرد آزمایش qPCR با استفاده از منحنی استاندارد ژن‌های مورد نظر و مرجع ترسیم و همچنین عملکرد اختصاصی آغازگرها از طریق منحنی ذوب بررسی شد.

داده‌های به‌دست آمده جهت تعیین بیان نسبی ژن P450 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 شیبپرو-ویلیک تست شد و آزمون لون نیز جهت بررسی

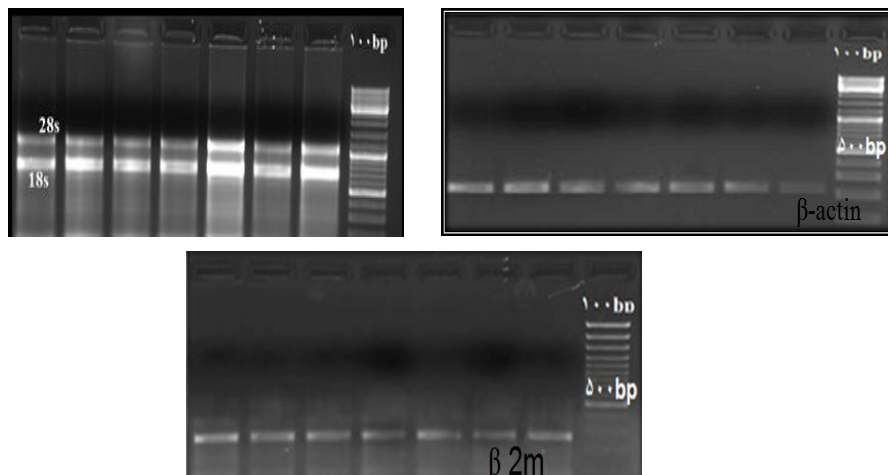
برابری واریانس‌ها مورد استفاده قرار گرفت. آنالیز داده‌های مربوط به بیان نسبی ژن P450 نسبت به بتا اکتین در طی دوره مواجهه با غلظت‌های مختلف کلرید کادمیوم و همچنین اثر غلظت‌های مورد مطالعه در هر روز مواجهه توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه در سطح اطمینان ۹۵٪ صورت گرفت. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد. نتایج به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار نمایش داده شد. مقایسه میانگین بیان نسبی در بافت‌های کبد و آبشش توسط آنالیز تی (در سطح اطمینان ۹۵٪) انجام شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (Version 16) انجام شد.

نتایج

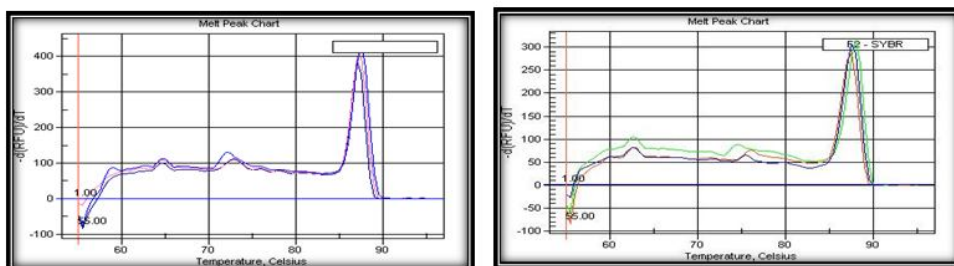
بررسی کیفی و کمی RNA و بررسی cDNA سنتز شده: نتایج کیفی RNA استخراج شده از بافت‌های کبد و آبشش تاس‌ماهی ایرانی در هر نمونه، دو باند rRNA S ۱۸ و S ۲۸ را با وضوح بالا نشان داد (شکل ۱). نسبت شدت جذب در نمونه‌های RNA استخراج شده در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر در محدوده ۱/۸-۲/۱ قرار داشت و همچنین میزان جذب در طول موج‌های ۲۳۰، ۲۴۰ و ۳۲۰ نیز بیانگر قابلیت مناسب RNA در نمونه‌های مورد بررسی بود. cDNA سنتز شده با پرایمرهای β -actin و P450 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 شده در ناحیه ۲ اگزون متوالی ژن β 2m، با تکثیر محصولی به اندازه ۲۱۲ bp، عدم تکثیر ناحیه اینترون توسط آغازگر مذکور را تایید نمود.

نتایج ارزیابی عملکرد آزمایش qPCR با استفاده از منحنی استاندارد ترسیم شده برای ژن‌های مورد نظر و مرجع میزان R^2 را، حدود ۰/۹۹ و شیب خط را حدود ۳/۳- نشان داد. عملکرد اختصاصی آغازگرها از طریق منحنی ذوب بررسی شد که پیک مشاهده شده در منحنی ذوب آغازگر برای هر محصول، بیانگر وجود یک محصول ویژه و تکثیر اختصاصی است (شکل ۲).

بررسی بیان ژن P450 در بافت‌های کبد و آبشش تاس‌ماهی ایرانی....



شکل ۱- محصول تکثیر cDNAهای سنتز شده با آغازگرهای β -actin، β 2m و کیفیت RNA استخراج شده از بافت‌های کبد و آبشش تاس‌ماهی ایرانی در نمونه‌های استخراج شده دوباند متعلق به 18S و 28S می‌باشند (روی ژل آگارز ۱/۵٪ و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید)



شکل ۲- منحنی ذوب ترسیم شده از غلظت‌های سریالی برای آغازگر β -actin (شکل راست) و منحنی ذوب ترسیم شده از غلظت‌های سریالی برای آغازگر P450 (شکل چپ).

بررسی بیان نسبی ژن P450 در بافت‌های کبد و آبشش: در آبشش، در غلظت 200 $\mu\text{g/l}$ ، بیشترین میزان بیان P450 در روز دوم مواجهه مشاهده گردید، اما اختلاف معنی‌داری در روزهای مواجهه مشاهده نشد ($P > 0.05$). در غلظت 400 $\mu\text{g/l}$ ، مقدار نسبی بیان در روز دوم مواجهه در مقایسه با شاهد به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) برابر 3/11 برای افزایش یافت و در روز دوم این افزایش به حداکثر میزان 4/42 برابر، رسید و سپس در روز هفتم به‌طور معنی‌داری (2/47 برابر، $P < 0.05$) کاهش یافته و در روز چهاردهم مواجهه (3/77 برابر، $P < 0.05$) مجدداً افزایش را نشان داد. روند مشابهی نیز در روز اول (5/85 برابر، $P < 0.05$)، روز دوم (7/93 برابر، $P < 0.05$)، روز هفتم (2/21 برابر، $P < 0.05$) و روز چهاردهم (6/11)

برابر، $P < 0/05$) در مواجهه با غلظت $800 \mu\text{g/l}$ مشاهده شد (جدول ۲). در کبد، در غلظت $200 \mu\text{g/l}$ ، بیان نسبی P450 در روز اول در مقایسه با تیمار شاهد به طور معنی‌داری ($P < 0/05$) افزایش یافت و به ماکزیمم میزان خود ($5/72$ برابر، $P < 0/05$) در روز دوم مواجهه رسید که این افزایش معنی‌داری نبود ($P > 0/05$). سپس در روز هفتم کاهش ($4/94$ برابر، $P < 0/05$) و در روز چهاردهم مواجهه به ($5/2$) برابر، $P < 0/05$) افزایش یافت. در غلظت $400 \mu\text{g/l}$ ، مقدار نسبی بیان در روز اول مواجهه در مقایسه با شاهد به‌طور معنی‌داری ($P < 0/05$) $6/5$ برابر افزایش یافت و در روز دوم این افزایش به حداکثر میزان ($7/02$ برابر، $P < 0/05$) رسیده و سپس در روز هفتم ($5/2$ برابر، $P < 0/05$) کاهش و سپس میزان بیان در روز چهاردهم مواجهه به ($5/85$ برابر، $P < 0/05$) رسید. روند مشابهی نیز در روز اول ($6/75$ برابر، $P < 0/05$)، روز دوم ($9/75$ برابر، $P < 0/05$)، روز هفتم ($5/33$ برابر، $P < 0/05$) و روز چهاردهم ($8/26$ برابر، $P < 0/05$) مواجهه با غلظت $800 \mu\text{g/l}$ مشاهده شد (جدول ۳).

در آبشش، در روز اول مواجهه اگر چه افزایش بیان نسبی P450 بین غلظت‌های $200 \mu\text{g/l}$ و $400 \mu\text{g/l}$ (به‌ترتیب $2/21$ و $3/11$ برابر، $P > 0/05$) مشاهده شد اما این افزایش معنی‌دار نبود، اما در غلظت $800 \mu\text{g/l}$ افزایش معنی‌دار بیان نسبی ($5/85$ برابر، $P < 0/05$) مشاهده گردید. در روز دوم بیان نسبی P450 در غلظت‌های مختلف $200 \mu\text{g/l}$ ، $400 \mu\text{g/l}$ و $800 \mu\text{g/l}$ ($2/73$ ، $4/42$ و $7/93$ برابر، $P < 0/05$) افزایش معنی‌داری را نشان داد. در روز هفتم اختلاف معنی‌دار بین غلظت‌های $200 \mu\text{g/l}$ و $800 \mu\text{g/l}$ ($P < 0/05$) مشاهده شد. در روز چهاردهم نیز بیان نسبی P450 در غلظت‌های مختلف $200 \mu\text{g/l}$ ، $400 \mu\text{g/l}$ و $800 \mu\text{g/l}$ (به‌ترتیب $2/21$ ، $3/77$ و $6/11$ برابر، $P < 0/05$) افزایش یافت. روند مشابهی در بافت کبد نیز مشاهده شد. در روز اول و دوم اگر چه بین میزان نسبی بیان در دوزهای $400 \mu\text{g/l}$ و $800 \mu\text{g/l}$ اختلاف معنی‌داری مشاهده شد، ولی میزان بیان در این تیمارها با تیمار $200 \mu\text{g/l}$ اختلافی را نشان نداد. در روز هفتم نیز اختلاف معنی‌داری در میزان بیان در غلظت‌های مورد بررسی مشاهده نشد ($P > 0/05$)، در روز چهاردهم نیز اختلاف معنی‌داری در میزان بیان نسبی P450 در تیمارهای $200 \mu\text{g/l}$ و $400 \mu\text{g/l}$ (به‌ترتیب $5/2$ و $5/85$) مشاهده نشد ($P > 0/05$)، اما میزان بیان نسبی در تیمار $800 \mu\text{g/l}$ نسبت به دو غلظت دیگر اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($8/26$ برابر، $P < 0/05$) (جدول ۲ و ۳). افزایش بیان P450 در طول دوره مواجهه در بافت کبد نسبت به بافت آبشش در همه غلظت‌ها به جز غلظت 800 میکروگرم در لیتر در روزهای اول، دوم و چهاردهم و غلظت 400 میکروگرم در لیتر در روز چهاردهم معنی‌دار ($P < 0/05$) بود (جدول ۲).

بررسی بیان ژن P450 در بافت‌های کبد و آبشش تاس‌ماهی ایرانی....

جدول ۲- تغییرات بیان نسبی P450 در بافت آبشش تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) در مواجهه ۱۴ روزه با دوزهای مختلف (۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم در لیتر) کلرید کادمیوم. حروف کوچک و بزرگ اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) را در هر ردیف (a-c) و ستون (A-B) نشان می‌دهد.

غلظت / روز	اول	دوم	هفتم	چهاردهم
۲۰۰ میکروگرم در لیتر	۲/۲۱±۰/۳۲۵ ^{aB}	۲/۷۳±۰/۲۶ ^{aC}	۲/۶±۰/۲۸۶ ^{aB}	۲/۲۱±۰/۴۵۵ ^{aC}
۴۰۰ میکروگرم در لیتر	۳/۱۱±۰/۱۴ ^{cB}	۴/۴۲±۱/۵۶ ^{aB}	۲/۴۷±۰/۲۲ ^{aB}	۳/۷۷±۰/۳۱۲ ^{bB}
۸۰۰ میکروگرم در لیتر	۵/۸۵±۰/۷۷ ^{bA}	۷/۹۳±۰/۳۹ ^{aA}	۲/۲۱±۰/۲۶ ^{aB}	۶/۱۲±۰/۳۹ ^{bA}

جدول ۳- تغییرات بیان نسبی P450 در بافت کبد تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) در مواجهه ۱۴ روزه با غلظت‌های مختلف (۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم در لیتر) کلرید کادمیوم. حروف کوچک و بزرگ اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) را در هر ردیف (a-c) و ستون (A-B) نشان می‌دهد. * : معنی داری اختلاف بیان بافت کبد با بافت آبشش در همان غلظت و روز را نشان می‌دهد ($P < 0.05$).

غلظت / روز	اول	دوم	هفتم	چهاردهم
۲۰۰ میکروگرم در لیتر	^b _B * ۳/۷۷±۰/۹۸۶	^a _B * ۵/۷۲±۰/۷۸	^{ab} _A * ۴/۹۴±۱/۱۴	^{ab} _B * ۵/۲±۰/۲۶
۴۰۰ میکروگرم در لیتر	^{ab} _{AB} * ۶/۵±۱/۴	^a _B * ۷/۰۲±۰/۷۸	^b _A * ۵/۲±۰/۲۶	^{ab} _B * ۵/۸۵±۰/۶۵
۸۰۰ میکروگرم در لیتر	^{bc} _A ۶/۷۵±۰/۷۸	^a _A ۹/۷۵±۰/۷۲۸	^c _A * ۵/۳۳±۰/۹۸۸	^{ab} _A ۸/۲۶±۰/۹۱

بحث و نتیجه‌گیری

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). در سال‌های اخیر پایش اکوسیستم‌های آبی از سنجش کمی مقدار آلاینده در آب، رسوب و بافت ماهی به سمت سنجش‌های کیفی اثرات آلاینده‌ها بر آبزیان با استفاده از زیست‌نشانگرها یا بیومارکرها مولکولی، بیوشیمیایی، خون‌شناسی، آنزیمی و بافتی سوق پیدا نموده است (Schelenk, 2006). در سطح مولکولی تغییرات ژنتیکی (تغییر در بیان، عملکرد و تنظیم ژنی) و تغییرات سطوح پروتئینی در موجودات نیز می‌تواند به‌عنوان شاخص مواجهه با آلودگی در نظر گرفته شود، به‌ویژه اگر مولکول مورد بررسی قسمتی از مکانیزم دفاعی، ترمیمی و یا سم‌زدایی سلول باشد که از آن جمله می‌توان به متالوتیونین‌ها (Chan, 1995)، گلوکاتیون S-ترانسفراز (Ahmad et al., 2004)، سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) (Pandey et al., 2003) پروتئین‌های شوک حرارتی (HSP 70) (Duffy et al., 1999) و آنزیم سیتوکروم P450 (Colombo et al., 2003) اشاره نمود. آنزیم سیتوکروم P450 نوعی هموپروتئین است که در سطح بالایی در کبد وجود دارد ولی در بافت‌های دیگر نظیر آبشش، کلیه، روده نیز گزارش شده است (Siroka and Drasticheva, 2004; Itakura et al., 2005). در یوکاریوت‌ها این پروتئین با غشا شبکه اندوپلاسمیک و میتوکندری در ارتباط می‌باشد. این آنزیم جز آنزیم‌هایی اکسایشی است که در فاز اول متابولیسم آلاینده‌ها تولید می‌گردد

(Siroka and Drasticheva, 2004) و میزان آن متأثر از گونه مورد بررسی، جنسیت، نوع و غلظت و مدت مواجهه با آلاینده و حتی بافت مورد بررسی می‌باشد (Kim *et al.*, 2010; Rees *et al.*, 2003; Miranda *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2014).

در مواجهه با غلظت‌های مورد بررسی کلرید کادمیوم، ماهیان رفتارهای غیرطبیعی به فرم بی‌قراری و شنای غیرعادی نشان دادند. اگر چه ماهیان تحت تیمار آلودگی در مراحل اولیه (تا روز چهارم مواجهه) تا حدودی از خوردن غذا اجتناب نمودند، اما بعد از آن، به تدریج شروع به گرفتن غذا نمودند. در طول آزمایش تغییر رفتاری در گروه شاهد مشاهده نشد. همچنین مرگ و میری در طی دوره مواجهه در گروه‌های شاهد و تحت تیمار آلودگی مشاهده نگردید.

مطالعه حاضر بیان وابسته به دوز P450 را در هر دو بافت آبشش و کبد بعد از مواجهه با کلرید کادمیوم نشان داد و با افزایش غلظت میزان این آنزیم در بافت‌های مذکور افزایش را نشان داد. گزارشات متفاوتی از تغییرات افزایشی یا کاهش‌ی بیان ژن P450 در گونه‌های مختلف آبزیان در مواجهه با آلاینده‌های آلی، آفت‌کش‌ها و فلزات سنگین (Zhang *et al.*, 2012; Dong *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2008; Dong *et al.*, 2013) ارائه شده است. دونگ و همکاران (Dong *et al.*, 2009) افزایش بیان P450 را در مواجهه با سم اندوسولفان با افزایش غلظت از $1 \mu\text{g/l}$ به $10 \mu\text{g/l}$ مشاهده نمودند. ژانگ و همکاران (Zhang *et al.*, 2012) در بررسی بیان P450 در مواجهه ۴ روزه با کادمیوم افزایش دو برابری بیان ژن را در غلظت‌های $10 \mu\text{g/l}$ نسبت به $1 \mu\text{g/l}$ در روز دوم مواجهه گزارش نمودند. نایر و همکاران (Nair *et al.*, 2013) افزایش بیان از ۱ به $1/5$ و سپس $1/8$ برابری P450 را در مواجهه با کادمیوم با افزایش غلظت از ۲ به ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر و کاهش بیان 50% از ۱ به $0/5$ برابر با افزایش ۱۰۰ برابری غلظت بیس فنل A و نونیل فنل مشاهده نمودند. بسیاری از مواد آلاینده نظیر فلزات سنگین و سموم با تولید گونه‌های فعال اکسیژن، اثرات سمی بر سلول‌ها گذاشته و موجب نابودی مولکول‌های زیستی نظیر پروتئین، لیپید و DNA می‌گردند. اولین واکنش سلول به این شرایط تنش‌زا و استرسی تولید یکسری آنزیم‌های اکسایشی نظیر P450 و آنتی‌اکسیدانتی می‌باشد که در صورت ادامه یافتن شرایط تنش منجر به مختل شدن متابولیسم طبیعی و نهایتاً مرگ سلول می‌گردد. به نظر می‌رسد تغییر بیان P450 در مواجهه با فلزات سنگین از طریق فاکتور رونویسی آریل هیدروکربن رسپتور (AHR) انجام می‌گردد. فلز کادمیوم از ورود کلسیم خارج سلولی، به جهت داشتن بار مشابه، به داخل سلول جلوگیری نموده، در نتیجه اندامک‌هایی چون میتوکندری و شبکه اندوپلاسمی به این کمبود کلسیم سیتوپلاسمی، واکنش داده و با آزاد کردن کلسیم سعی در جبران این کمبود می‌نمایند و به این ترتیب کلسیم داخل سلولی با فعال کردن پروتئیناز k موجب فسفریله شدن فاکتورهای رونویسی در محل پروموتور و یا راه‌انداز این ژن و افزایش بیان آن می‌گردند (Waisberg *et al.*, 2003). از آنجا که

هیچ شباهت ساختاری بین فلزات سنگین و لیگاندهای آریل هیدروکربن رسپتور وجود ندارد، احتمالاً بیان P450 در مواجهه با فلزات سنگین از طریق فعال کردن لیگاندهای خارجی AHR انجام می‌گردد (Kim *et al.*, 2008; Korashy and Elkali, 2005). همچنین این عنصر از طریق ایجاد کمپلکس باعث تأثیر بر ساختار برخی پروتئین‌ها، بیان برخی ژن‌ها، از بین رفتن پروتئین‌های انتقالی هم‌چون Na^+ ATPase /K⁺ و یا حتی مرگ سلول می‌گردد (Sobha *et al.*, 2007).

در این مطالعه اگر چه میزان نسبی P450 در تمام روزهای آزمایش نسبت به تیمارکنترل افزایش را نشان داد، اما بیشترین میزان آن در روز دوم مواجهه مشاهده شد که تأیید کننده این است که این آنزیم جز اولین محصولات متابولیتی آلاینده‌ها می‌باشد. همچنین ممکن است این ژن از جمله ژن‌های زود هنگام بوده که القاء کننده بیان ژن‌های دیگر باشد. کاهش مشاهده شده در روزهای بعدی (هفتم و چهاردهم) می‌تواند به آسیب سلول‌های بافت آبشش و کبد در اثر ورود کادمیوم و خاموش شدن این ژن نسبت داده شود. سوفتلندس و همکاران (Softeland *et al.*, 2010) کاهش بیان این ژن را در ماهی *Gambusia affinis* را به آسیب سلولی ناشی از سمیت بالای کادمیوم نسبت دادند. هاونگ و همکاران (Haung *et al.*, 2014) افزایش بیان P450 در بافت کبد در مواجهه با سرب تا روز سوم و سپس کاهش بیان آن را در مواجهه در مدت زمان طولانی‌تر تا روز هشتم را به مکانیسم سازگاری نسبت داد. در مطالعه حاضر اگر چه بیان P450 در هر دو بافت کبد و آبشش افزایش را نشان داد، اما میزان بیان آن در کبد به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) 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. بیان P450 در بافت‌های کبد، آبشش، کلیه و پوست ماهی بادکنکی (*Takifugu obscurus*) بررسی و مشاهده شد که علی‌رغم بالابودن میزان بیان این ژن در بافت‌های کبد و آبشش، میزان بیان آن در سایر بافت‌ها قابل چشم‌پوشی می‌باشد چرا که این بافت‌ها در متابولیسم مواد آلاینده در ماهی نقش چندانی ندارند (Kim *et al.*, 2006; Miranda *et al.*, 2008). بالابودن میزان بیان P450 در بافت کبد به نقش متابولیسمی کبد نسبت داده می‌شود و آبشش نیز 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). نتایج نشان داد که پاسخ بیولوژیک در سطح مولکولی از ابتدایی‌ترین پاسخ‌ها به تغییر شرایط محیطی می‌باشند که موید نتایج سپولدا (Sepulveda, 2005) است که با افزایش زمان مواجهه به ترتیب تغییرات در سطوح بیوشیمیایی، سلولی، بافت، دستگاه، موجود، جمعیت و اکوسیستم توسعه می‌یابد. نتایج مطالعه نشان داد که تغییرات این آنزیم می‌تواند به‌عنوان نشانگر زیستی آلودگی با کلرید کادمیوم مد نظر قرار گیرد.

منابع

- Agusa T., Kunito T., Tanabe S., Pourkazemi M., Aubrey D. 2004. Concentrations of trace elements in muscle of sturgeons in the CasPian Sea. *Marine Pollutant Bulletin*, 49: 789-800.
- 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.
- 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.
- Bauer M., Greenwood S.J., Clark K.F., Jackman P., Fairchild W. 2013. Analysis of gene expression in *Homarus americanus* larvae exposed to sublethal concentration of endosulfan during metamorphosis. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 8: 300-308.
- 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.
- Chan K.M. 1995. Methalothionin: Potential biomarker for monitoring heavy metal Pollution in fish around Hong Kong. *Marine Pollution Bulletin*, 31: 411-415.
- 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.
- Corpet 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nuclueic Acids Research*, 16(22): 10881-10890.
- 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.
- 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.
- 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 Safety*, 92: 1-9.
- 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.

- 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.
- Hedayati A., Safahieh A. 2011. Serum hormone and biochemical activity as biomarkers of mercury pollution in yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*). *Toxicology and Industrial Health*, 28: 306-319.
- Huang G.Y., Ying G.G., Liang Y.Q., Liu S.S., Liu U.S. 2014. Expression patterns of metallothionein, cytochrome P4501A and vitellogenin genes in western mosquitofish (*Gambusia affinis*) in response to heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 105: 97–102.
- Itakura T., Elkady M., Mitsu R., Kaminishi Y. 2005. Complementary DNA cloning and constitutive expression of cytochrome P450 1a1 in the gills of carp (*Cyprinus carpio*). *Environmental Science*, 12(2): 111-120.
- Korashy H.M., El-Kadi A.O.S. 2005. Regulatory mechanisms modulating the expression of cytochrome P450 1A1 gene by heavy metals. *Toxicological Science*, 88: 39–51.
- Kim J.H., Raisuddin S., Ki J.S., Lee J.S., Han K.N. 2008. Molecular cloning and benzo[a]pyrene-induced expression of a cytochrome p450 1A (CYP1A) gene from an anadromous river Pufferfish (*Takifugu obscurus*). *Marine Pollution Bulletin*, 57: 433–440.
- Kim J.H., Rhee J.S., Lee J.S., Dahms H.U., Lee J., Han K.N., Lee J.S. 2010. Effect of cadmium exposure on expression of antioxidant gene transcripts in the river Pufferfish, *Takifugu obscurus* (Tetraodontiformes). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 15: 473–479.
- Ling X.P., Zhu J.Y., Haung L. and Huang H.Q. 2009. Proteomic changes in response to acute cadmium toxicity in gill tissue of *Paralichthys olivaceus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 27: 211-218.
- Miranda C.L., Chung W.G., Wang-Buhler J.L., Musafia-Jeknic T., Baird W.M., Buhler D.R. 2006. Comparative in vitro metabolism of benzo[a]pyrene by recombinant zebrafish CYP1A and liver microsomes from beta-naphthoflavone-treated rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, 80:101–108.
- Mirzaee M. 2003. The toxicity of heavy metals on Persian sturgeon. MSc. Thesis of fisheries. Islamic Azad University, Lahijan Branch. 100 P. (In Persian).
- Mora S., Sheikholeslami M.R. 2002. ASTP: Contaminant Screening Programme. Final Report: Interpretation of Caspian Sea Seiment Data. Caspian Environment Programme. Taken <http://www.caspianenvironment.org/librep/elibrary/astp.htm>.
- Negro C.L. 2015. Histopathological effects of endosulfan to hepatopancreas, gills and ovary of the fresh water crab *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda: Trichodactylidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113: 87-94.
- Naira P.M.G., Park S.Y., Choia J. 2013. Characterization and expression of cytochrome P450 cDNA (CYP9AT2) in *Chironomus riparius* fourth instar larvae

- exposed to multiple xenobiotics. *Environmental toxicology and Pharmacology*, 36: 1133–1140.
- 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.
- 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.
- 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 Acid Research*, 30(9):36.
- 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.
- Pourkazemi M., Skibinski D.O.F., Beardmore J.A. 2000. A Preliminary study on Phylogenetic relationship between five sturgeon species in Iranian coastline of the Caspian Sea. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 2(1):1-12. (In Persian).
- 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.
- Rees C.B., McCormick S.D., Vanden Heuvel J.P., Li W. 2003. Quantitative PCR analysis of CYP1A induction in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquatic Toxicology*, 62: 67–78.
- Roy S., Bhattacharya S. 2006. Arsenic-induced histopathology and synthesis of stress Proteins in liver and Kidney of (*Channa Punctatus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65: 218- 229.
- Schelenk D. 2006. Mechanisms of stereoselective sulfoxidin and toxicity of organophosphate, fenthion, in three species. *Marine Environment Research*, 62: 30-39.
- Sepulveda M.S. 2005. Biomarkers of exposure and effects: I. Molecular biomarkers. Perdue University.
- Siroka Z., Drastichova J. 2004. Biochemical Markers of Aquatic Environment Contamination – Cytochrome P450 in Fish. A Review. *ACTA VET. BRNO*, 73: 123-132.
- Shahratash M., Mohsenzadeh S., Mohabatjar H. 2010. Calcium-induced genotoxicity detected by the random amplification of Polymorphism DNA in the maize seeding roots. *Journal of Cell and Molecular Research*, 2(1): 42-48.

- 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(1): 281-291.
- Shader D.L., Williams T., Lyons B.P., Chipman J.K. 2006. Oxidative stress response of European flounder (*Platichthys flesus*) to cadmium determined by custom cDNA microarray. Marine Environment Research, 62: 33-44.
- Sohrabi T., Ismaili A., Nabavi M.B. 2010. Distribution and normalization of some metal in surface sediments from south Caspian Sea. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 85: 502-508.
- 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. Journal of Science Engineering and Technology, 1(5): 1-11.
- Softeland L., Holen E., Olsvik P.A. 2010. Toxicological application of primary hepatocyte cellcultures of Atlantic cod (*Gadus morhua*), effects of BNF, PCDD and Cd. Comparative Biochemistry and Physiology, 151; 401-411.
- 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*), 47: 42-50.
- Waisberg M., Joseph P., Hale B., Beyersmann D. 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium. Toxicology, 192: 95-117.
- 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.
- Zhang L., Gan J., Ke Ch., Liua X., Zhao J., You L., Yu J., Wu H. 2012. Identification and expression Profile of a new cytochrome P450 isoform (CYP414A1) in the hePatopancreas of Venerupis (Ruditapes) Philippinarum exposed to benzo[a]pyrene, cadmium and copper. Environmental toxicology and Pharmacology, 33: 85-91.