بیان ژن CYP1A در بافت‌های مختلف ماهی گل خورک (*Boleophthalmus dussumieri*) در حالت پایه و در مواجهه با بنزوآلفاپایرن

سید احمد قاسمی[1*]
غلامرضا عبدی[2]

۱، ۲. گروه بیوتکنولوژی پژوهشکده خلیج‌فارس، دانشگاه خلیج‌فارس، بوشهر، ایران

***مسئول مکاتبات:**
aqasemi@gmail.com

کد مقاله: ۱۳۹۹۰۲۰۸۰۳
تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۳/۳۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۳۰
این مقاله پژوهشی و برگرفته از طرح پژوهشی است.

چکیده

CYP1A یکی از آنزیم‌های مهم در متابولیسم و سم‌زدایی مواد خارج سلولی است بنابراین در این تحقیق، بیان پایه ژن CYP1A در بافت‌های ماهی گل خورک (*Boleophthalmus dussumeri*) و پس از مواجهه با بنزوآلفاپایرن بررسی گردید. بدین منظور در بهار ۱۳۹۷ از ۵ عدد ماهی گل خورک از سواحل جزیره شیف بوشهر نمونه‌برداری شد و بیان ژن CYP1A در بافت‌های مختلف این‌گونه بررسی گردید. نتایج نشان داد که حداکثر بیان CYP1A در بافت کبد بود در مقایسه بین بافتی به ترتیب کبد، کلیه، آب‌شش، قلب، مغز، روده و پوست بیشترین بیان پایه را داشتند. در مقایسه با کبد، بافت‌های کلیه، آب‌شش، قلب، مغز، روده و پوست به ترتیب ۴۹، ۴۶، ۴۰، ۳۵، ۱۱ و ۱۰ درصد از بیان کبد را داشتند. جهت بررسی واکنش فیزیولوژیکی اندام‌ها در مواجهه با بنزوآلفاپایرن، غلظت ۲۵ میکروگرم بر گرم وزن بدن بنزوآلفاپایرن به ماهیان تزریق شد و تغییرات بیان ژن‌های CYP1 پس از ۲۴ ساعت سنجش گردید. نتایج بیانگر افزایش حداکثری بیان ژن CYP1A در بافت کلیه و کبد به ترتیب معادل ۸۴/۴ و ۸۳/۲ برابر میزان پایه بود؛ مانند سایر ماهیان کبد بیشترین بیان پایه ژن CYP1A دارد الگوی نسبی تغییرات بیان ژن در بافت‌های مختلف شبیه ماهیان دیگر بود اما میزان بیان در بافت‌های مختلف غیر از کبد نسبت به مطالعات گذشته از درصد بالاتری برخوردار می‌باشند که می‌تواند به دلیل وجود آلاینده‌ی در محیط زندگی این ماهی در خلیج‌فارس باشد. به‌طورکلی میزان بیان پایه ژن CYP1A به نوع گونه و شرایط اکولوژیکی گونه وابسته است. نتایج نشان داد که بیشترین تغییرات بیان در کلیه، روده و آب‌شش رخ می‌دهد لذا تغییرات بیان ژن CYP1A در این بافت‌ها می‌تواند به‌عنوان بیومارکر استفاده گردد.

واژگان کلیدی: بیان ژن، ژن CYP1A، ماهی گل خورک، *Boleophthalmus dussumieri*، بیومارکر.

مقدمه

سیتوکروم اکسیدازها (CYP p450)، گروهی بزرگ و متنوع از هموپروتئین و شامل چندین خانواده مختلف هستند. این آنزیم‌ها دارای فعالیت منواکسیژنازی بر روی طیف وسیعی از ترکیبات درون و برون سلولی در جانوران و گیاهان هستند. در ۲۰ سال اخیر ژن‌های زیادی از اعضای این خانواده در ماهیان شناسایی‌شده است. آنزیم‌های p450 در سم‌زدایی ترکیبات خارج سلولی از قبیل داروها، مواد شیمیایی سرطان‌زا، آلاینده‌های محیطی و همچنین در متابولیسم مواد داخل سلولی از قبیل استروئیدها، چربی‌ها، ویتامین‌ها و پروستوگلندین‌ها نقش دارند (Uno *et al*., 2012; Chu *et al*., 2019).

در ماهیان خانواده CYP1 شامل چهار زیر خانواده CYP1A، CYP1B، CYP1C و CYP1D است که مسئول اکسیداسیون مواد محیطی و آلاینده‌ها هستند؛ بنابراین آن‌ها در سم‌زدایی و دفع مواد نقش اساسی دارند. در ماهیان CYP1A مهم‌ترین نقش را در متابولیسم و سم‌زدایی

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-01-21]

مواد خارج سلولی دارد، بنابراین در ماهیان به‌عنوان یک بیومارکر در محیط‌های آبی مورداستفاده قرار می‌گیرد (Jung *et al*., 2011; Dar *et al*., 2020). تاکنون توالی CYP1 در بسیاری از گونه‌های ماهیان کلون‌سازی و شناسایی گردیده است. زیر خانواده CYP1A اولین زیر خانواده از ژن‌های سیتوکروم است که در آبزیان کشف گردید. این آنزیم در سمیت‌زدایی و غیرفعال کردن مواد سمی محیطی نقش مهمی ایفاء می‌کند. آنزیم CYP1A تقریباً در تمام ارگان‌های بدن با سطح متفاوتی از میزان بیان، فعالیت دارد (Uno *et al*., 2012; Leggieri *et al*., 2019). کبد عضو اصلی برای سوخت‌وساز در بدن و سم‌زدایی می‌باشد، لیکن سم‌زدایی در روده، آبشش و کلیه نیز انجام می‌گیرد (Jonsson *et al*., 2007). مواد شیمیایی و متابولیت آن‌ها از طریق آبشش‌ها، محصولات صفراوی روده و ادرار دفع می‌گردند. سیستم سم‌زدایی برای مواد آلی چربی‌دوست در یک ماهی شامل آنزیم‌هایی هستند که از طریق متابولیسم ماده شیمیایی چربی دوست به یک متابولیت آب‌دوست از طریق سیستم بیوترانسفورماسیون، عمل می‌کنند. این سیستم شامل دو فاز بنام‌های ۱ و فاز ۲ می‌باشد. در ارتباط با سیستم بیوترانسفورماسیون، انتقال‌دهنده‌هایی وجود دارد که به‌طور فعال مواد شیمیایی یا متابولیت‌های آن‌ها را به خارج از سلول انتقال می‌دهند این انتقال دهنده‌ها در دو فاز ۰ و فاز ۳ قرارگرفته‌اند (Schlenk *et al*., 2008).

گاو ماهیان (Oxudercidae) ماهی‌های کوچکی هستند که حدوداً بین ۴ تا ۱۰ سانتیمتر طول دارند اغلب ساکن آب‌های شور و از نظر مورفولوژیکی، رفتاری و اکولوژیکی تنوع بالایی دارند. اغلب گونه‌ها شکارچی هستند و بازندگی در آب‌های ساحلی و کم‌عمق اقیانوس‌ها و دریاها سازگاری یافته‌اند (Thacker, 2003). این ماهیان متعلق به زیر خانواده Oxudercinae با ۱۰ جنس و ۳۹ گونه در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری در سواحل جزر و مدی با بستری نرم در افریقای غربی و نواحی اقیانوس هند–آرام پراکنده‌اند و معروف به گل خوک ماهیان می‌باشند (Agorreta *et al*., 2013). ماهی گل خورک (*Boleophthalmus dussumieri*) یکی از سه گونه گل خورکی است (*Periophthalmus waltoni*، *Scartelaos stenuis*) است که در خلیج‌فارس وجود دارد. این‌گونه در منطقه بین جزو مدی با وابستگی بیشتر به آب زندگی می‌کند (Abdoli, 2000; Murdy, 1989). در سال‌های اخیر این گروه از ماهیان به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان مدل آزمایشگاهی در مطالعات تطابق در شرایط یوری هالین و یوری ترمال، اکوفیزیولوژیک، تغییرات مورفولوژیکی برای سازش در شرایط خشکی، به‌عنوان بیواندیکاتور و بیومارکرهای جهت سنجش شرایط زیستی در سواحل گلی و مانگرو مورداستفاده قرارگرفته‌اند (Ansari *et al*., 2014؛ Thacker, 2003). از دلایل اهمیت گل خورک ماهیان بومی ازنظر مطالعات اکوفیزیولوژیک، اکوتوکسیکولوژیک و پاسخ‌های استرس آلاینده‌ها می‌توان به پراکنش آن‌ها در خلیج‌فارس و دریای عمان، زندگی در سواحل گلی، غیر مهاجر بودن، دارای جابجایی کم و زندگی در مناطق آلوده اشاره نمود (Ansari *et al*., 2014; Sinaei and Mashinchian, 2014).

استخراج نفت، حمل‌ونقل و تخلیه پساب از شهرهای ساحلی و پالایشگاه‌های نفتی منابع اصلی آلودگی نفتی در خلیج‌فارس هستند (Ranjbar Jafarabadi *et al*., 2017). PAHها یکی از آلاینده‌های مهم نفتی می‌باشد. این مواد به علت پتانسیل بالای سرطان‌زایی و ایجاد جهش‌های ژنی، اهمیت ویژه‌ای در مطالعات زیست‌محیطی دارند. هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (PAH) ترکیبات غیرقطعی آب‌گریزی هستند که از دو یا چند حلقه بنزنی تشکیل‌شده‌اند. کوچک‌ترین این ترکیبات نفتالن با دو حلقه و بزرگ‌ترین آن‌ها کرونن با هفت حلقه می‌باشد (Denton *et al*., 1999). بنزوآلفاپایرن یکی از ترکیبات هیدروکربن‌های آرماتیک است که سمیت بالایی برای موجودات آبزی دارد و در بسیاری از مطالعات سمیت آن به‌عنوان شاخص PAHها بررسی‌شده است (Wang *et al*., 2011).

با توجه به اهمیت ماهیان گل خورک ازنظر مطالعات اکوفیزیولوژی، اکوتوکسیکولوژی این تحقیق با هدف بررسی نقش بافت‌های مختلف در سم‌زدایی میزان بیان ژن CYP1A در اندام‌های مختلف ماهی گل خورک دوسومری در حالت پایه و پس از مواجهه با بنزوالفاپایرن انجام گردید.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-01-21]

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری ماهی گل خورک از سواحل جزیره شیف بوشهر (۲۹°۰۲'۱۴/۶" N ۵۰°۵۲'۱۸/۲" E) در فصل بهار انجام گرفت. ماهی گل خورک *Boleophthalmus dussumieri* با دست صید و سپس به آزمایشگاه انتقال داده شدند در آزمایشگاه تعداد ۵ عدد ماهی با استفاده از غلطت بالای گل میخک کشته شدند و از بافت‌های کبد، کلیه، آبشش، قلب، مغز، روده و پوست آن‌ها نمونه‌گیری انجام شد، نمونه‌های موردنظر در ازت مایع منجمد و در فریزر ۸۰- تا انجام آزمایش‌ها نگهداری شدند.

برای مواجهه کوتاه‌مدت ماهی گل خورک *B. dussumeri* با بنزوآلفاپایرن از ۳۰ قطعه ماهی استفاده گردید. تقسیم‌بندی ماهی‌ها در ۱ گروه تیمار (سه تکرار) و یک گروه شاهد انجام گرفت. شرایط نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، شوری ۳۵ گرم در لیتر و روشنایی ۱۲ ساعت انجام گرفت. برای تهیه محلول تزریق، بنزوآلفاپایرن در روغن ذرت به میزان ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر حل شد. ماهی‌ها در (۰/۲ درصد ۲-فنوکسی اتانول) بی‌هوش و مقدار موردنظر از محلول بنزوالفاپایرن برای غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر گرم وزن بدن ماهی به‌صورت داخل صفاقی، به ماهی‌ها تزریق گردید. ۲۴ ساعت پس از تزریق نمونه‌برداری صورت گرفت بدین منظور از هر تکرار دو ماهی در ۲-فنوکسی اتانول و پس از تشریح از کبد، مغز، قلب، عضله، روده، کلیه و آبشش نمونه‌برداری انجام و در ازت مایع فیکس و سپس در دمای ۸۰- نگهداری شدند.

RNA کل از ۲۰ میلی‌گرم بافت با استفاده از کیت استخراج RNA (RBC آلمان) بر اساس روش کار کیت استخراج گردید. برای رفع آلودگی احتمالی DNA ژنومی در نمونه‌ها، قبل از شستشو نمونه‌ها با استفاده از آنزیم DNase1 تیمار گردیدند. جهت اطمینان از حذف DNA، RNA تیمار شده با آنزیم DNase1 به‌عنوان الگو به همراه آغازگر ژن هدف در واکنش PCR مورداستفاده قرار گرفت. اطمینان از کیفیت مطلوب و تعیین غلظت RNA از طریق اسپکترفوتومتری (بیوفتومتر) و الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد حاصل شد. بر اساس روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز (Fermentase-France) با استفاده از ۵ میکرو لیتر از RNA تیمار شده با DNase (معادل یک میکروگرم)، 1 میکرو لیتر آغازگر الیگو dt و رندم هگزامر و ۵ میکرو لیتر آب دپس انجام شد. بدین منظور میکرو تیوپ‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شدند و سپس به‌سرعت سرد شدند. ۴ میکرو لیتر بافر آنزیم نسخه‌بردار معکوس،۲۰۰ واحد آنزیم نسخه‌برداری معکوس، ۱ میکرو لیتر dNTP ۱۰ میلی مولار و ۲۰ واحد آنزیم RNaseinhabitor و ۳ میکرو لیتر آب به مخلوط بالا اضافه شد. ابتدا ۱۰ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد 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. به‌منظور بررسی بیان ژن CYP1A در بافت‌های مختلف از روش Real-Time PCR با استفاده از یک میکرو لیتر cDNA و ۱۲/۵ میکرو لیتر مسترمیکس سایبرگرین (Cinagene)، ۱۰ پیکومول از هر پرایمر (CYP1F: AGCTTTCATTCTGGAGGTGTTGCG, CYP1R: ACTGTTCAGGAAACGCTCTGGGTT) با شرایط دمایی شامل: ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌منظور واسرشته سازی و فعال‌سازی اولیه، ۴۰ چرخه حرارتی شامل ۱۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای اتصال آغازگر و ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای بسط تنظیم گردید. ژن 18srRNA (18sF: AGGCCCTGTAATTGGAATGAGT and 18sR: GACTCTTTCGAGGCCCTGTAAT) به‌عنوان کنترل داخلی استفاده گردید. برای هر یک از نمونه‌ها، ۳ تکرار در نظر گرفته شد. کنترل منفی در واکنش، استفاده از تمامی ترکیبات واکنش به‌جز cDNA برای بررسی احتمال آلودگی نیز تهیه گردید.

تعیین کارایی هر جفت آغازگر در واکنش Real-time PCR با تهیه 4 سری رقت با سه تکرار از مخلوط cDNA و رسم منحنی استاندارد و تعیین شیب‌خط و راندمان PCR بر مبنای رابطه ۱ محاسبه گردید.

رابطه ۱:

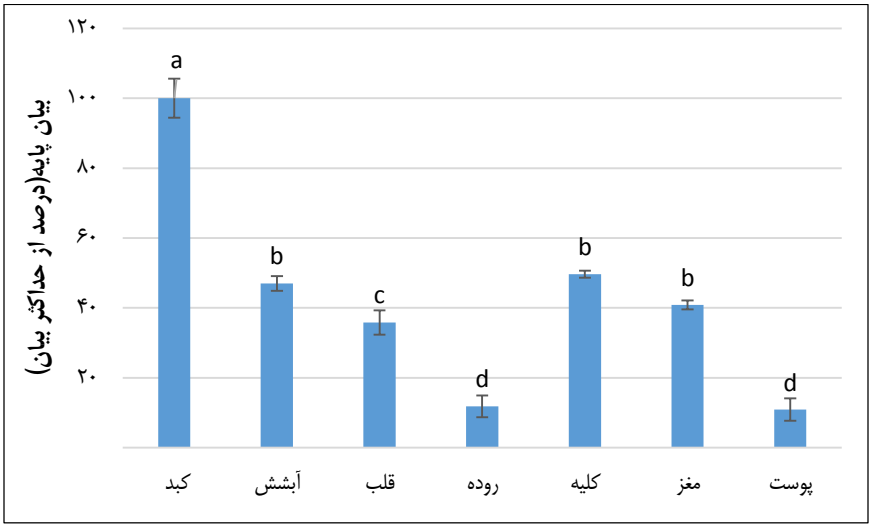
$$E\% = (10^{-1/slope} - 1) \times 100$$

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-01-21]

سپس میزان بیان بر اساس روش $2^{-\Delta CT}$ محاسبه (Livak and Schmittgen, 2001؛Pfaffl, 2001) و برحسب درصد نسبت به بیان حداکثری در کبد مقایسه گردید. آنالیز واریانس یک‌طرفه برای مقایسه بیان ژن در بافت‌های مختلف، از طریق تست دانکن در Spss16. انجام گرفت.

نتایج

در مقایسه بیان پایه ژن CYP1A بین بافت‌های مختلف در ماهی گل خورک *B. dussumeri* حداکثر بیان پایه CYP1A در بافت کبد مشاهده شد در مقایسه بین بافتی به ترتیب کبد، کلیه، آبشش، مغز، قلب، روده و پوست بیشترین بیان پایه CYP1A را داشتند. در مقایسه درصد بیان نسبت به کبد، بافت‌های کلیه، آبشش، مغز، قلب، روده و پوست به ترتیب به میزان ۴۹، ۴۶، ۴۰، ۳۵، ۱۱ و ۱۰ درصد از بیان کبد را داشتند (شکل ۱).

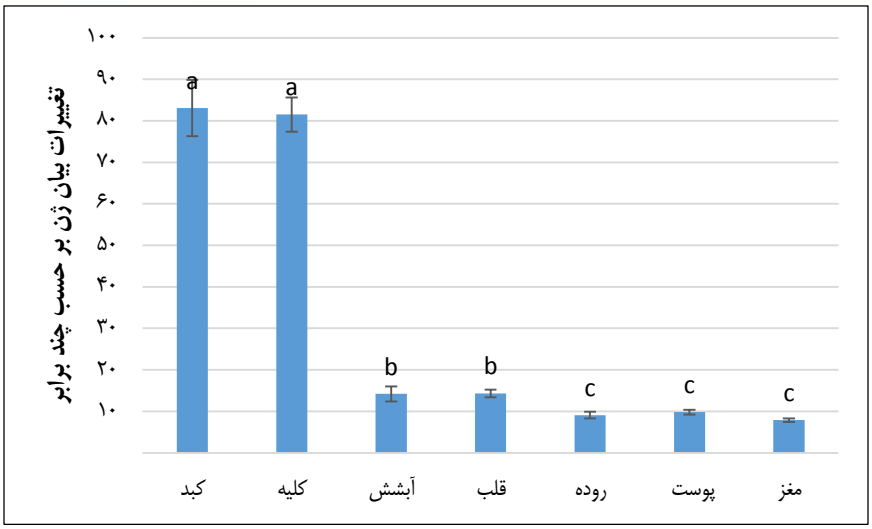


شکل ۱: بیان پایه ژن CYP1A در بافت‌های مختلف ماهی گل خورک *Boleophthalmus dussumeri* (نمونه شاهد) (سال ۱۳۹۷).

(بیان نسبی بر اساس روش $2^{-\Delta CT}$ محاسبه گردید. بیان به‌صورت درصد در هر بافت نسبت به حداکثر بیان در کبد می‌باشد. حروف متفاوت نشان دهند اختلاف معنی‌دار می‌باشد).

در تیمار ۲۵ میکروگرم بر گرم بدن ماهی با بنزوالفاپایرن پس از ۲۴ ساعت بیشترین افزایش بیان نسبت به نمونه شاهد در کبد و کلیه مشاهده گردید. در مقایسه بین بافتی بیشترین افزایش بیان به ترتیب در کبد، کلیه، آبشش، قلب، پوست، مغز، روده و مغز مشاهده گردید.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-01-21]



شکل ۲: تغییرات بیان ژن CYP1A در بافت‌های مختلف ماهی گل خورک *Boleophthalmus dussumeri* در تیمار با بنزوآلفاپایرن (سال ۱۳۹۷).

بحث و نتیجه‌گیری

در مقایسه بیان CYP1A در اندام‌های مختلف ماهی گل خورک *B. dussumeri*، حداکثر بیان پایه CYP1A در بافت کبد مشاهده و پس‌ازآن به ترتیب کلیه، آبشش، مغز، قلب، روده و پوست به ترتیب به میزان ۴۹، ۴۶، ۴۰، ۳۵، ۱۱ و ۱۰ درصد، بیشترین بیان رادارند. در مقایسه میزان بیان CYP1A در بافت‌های مختلف در ماهی گل خورک *B. dussumeri* نسبت به گل خورک والتونی (*periophthalmus waltoni*) میزان بیان پایه در اندام‌های مختلف بیشتر مشاهده گردید. به‌طوری‌که حداکثر بیان در آبشش ماهی گل خورک والتونی ۳۳ درصد بیان کبد می‌باشد ولی در گونه *B.dussumeri* بیان در کلیه به میزان تقریباً ۵۰ درصد کبد می‌باشد. مشابه این الگوی به‌دست‌آمده، در مطالعات گذشته نیز گزارش‌شده است. در ماهی (Oryzias javanicus) کبد بیشترین بیان و پس‌ازآن آبشش و روده بیان بالاتری را نشان می‌دهند و سایر اندام قلب، پوست، بال میزان بیان پایینی دارند (Rusni *et al.*, 2020). در ماهی *Poecilia vivipara* کبد بیان پایه CYP1A بیان بیشتری در مقایسه با روده و آبشش دارد به‌گونه‌ای که بیان پایه در روده و آبشش در حدود ۱۲ درصد بیان پایه کبد می‌باشد (Dorrington *et al.*, 2012). در ماهی کیلی فیش (*F. heteroclitus*) نیز کبد بیشترین حد بیان پایه CYP1A را دارد در این ماهی مقایسه بین بافتی به ترتیب کلیه، روده، قلب، آبشش، چشم، مغز، بیضه بیشترین بیان پایه از ژن CYP1A رادارند. بعد از کبد بیشترین بیان در کلیه در حد ۳۰ درصد کبد و کمترین میزان بیان در مغز و بیضه گزارش‌شده است (Zanette *et al.*, 2009). بیان پایه ژن CYP1A در کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مقایسه با آبشش به میزان ۱۰ برابر بیشتر می‌باشد (Jonsson *et al.*, 2010). در گورخر ماهی (*Danio rerio*) کبد و روده بیشترین بیان پایه CYP1A در بین اندام‌های مختلف رادارند. در میان ژن‌های CYP1، در درون یک بافت CYP1A بیان بالایی دارد (بیان پایه CYP1A در اندام‌های حفره شکمی شامل کبد، کلیه و روده بسیار بالا می‌باشد). بنابر گزارش Jönsson و همکاران (۲۰۰۷) در گورخر ماهی، ژن CYP1A در اندام‌های مختلف کبد، روده، کلیه، قلب، آبشش، چشم، مغز، تخمدان، بیضه به ترتیب بیشترین بیان را داشت. در ماهی سه خاره (*Gasterosteus aculeatus*) بیشترین و کمترین میزان بیان پایه ژن CYP1A مربوط به کبد و مغز بود و در مقایسه بین اندام‌ها به ترتیب کبد، کلیه، آبشش، مغز بیشترین بیان پایه را داشتند (Gao *et al.*, 2011). ازآنجایی‌که کبد مهم‌ترین بافت درگیر در متابولیسم زنوبیوتیک

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-01-21]

می‌باشد (Jonsson *et al.*, 2010; Rusni *et al.*, 2020). لذا در گل خورک ماهیان بیشترین میزان بیان پایه ژن CYP1A مربوط به این اندام بود. به‌طورکلی در اندام‌های حفره شکمی (کبد، روده و کلیه) میزان بیان ژن‌های CYP1 بسیار زیاد می‌باشد؛ که نقش کبد، آبشش و کلیه را در دریافت و متابولیسم مواد سمی نشان می‌دهد (Jonsson *et al.*, 2007; Dorrington *et al.*, 2012). کلیه ارگان اصلی دفعی مواد متابولیزه شده است؛ بنابراین در ارتباط مستقیم با مواد سمی و متابولیت‌های حاصل از آن‌ها می‌باشد. به همین دلیل میزان بسیار بالایی از بیان پایه ژن CYP1A را دارد؛ بنابراین کلیه در ماهی گل خورک ازنظر فیزیولوژیکی یکی از اندام‌های فعال در سم‌زدایی می‌باشد.

پس از کبد و کلیه، آبشش گل خورک ماهیان دارای بیان بالایی از ژن CYP1A بود که در ماهیان دیگر نیز ازجمله ماهی گوپی برزیلی (Dorrington *et al.*, 2012)، گورخر ماهی (Jonsson *et al.*, 2007)، کیل فیش (Zanette *et al.*, 2009)، قزل‌آلای رنگین‌کمان (Leggieri *et al.* 2019) و استیکل‌بک (Gao *et al.*, 2011) این موضوع گزارش‌شده است. آبشش اولین سد دفاعی در برابر زنوبیوتیک‌ها است بنابراین همیشه در مواجهه با مواد سمی می‌باشد. واکنش بیان ژن‌های CYP1 آبشش به مواد سمی سریع است (Rusni *et al.*, 2020). در برخی گونه‌های ماهیان و پستانداران ژن CYP1A در بافت عضله و پوست بیان می‌شود (Yengi *et al.*, 2003؛ Lee *et al.*, 2005؛ Erdogan *et al.*, 2011) درحالی‌که در برخی دیگر (*Gobiocypris rarus*) عدم بیان پایه بیان ژن CYP1A در بافت عضله و پوست گزارش‌شده است (Yuan *et al.*, 2013). در گل خورک ماهیان بیان پایه ژن CYP1A در پوست قابل‌اندازه‌گیری است. این نتایج متفاوت نشان‌دهنده وجود مکانیسم‌های متفاوت تنظیمی بیان ژن مختص هر اندام در گونه‌های مختلف است.

نتایج ما در تیمار گل خورک دوسومری با بنزوآلفاپایرن بیانگر آن است که بیشترین افزایش بیان ژن CYP1A در بافت کلیه و کبد به ترتیب ۸۴/۴ و ۸۳/۲ برابر میزان پایه بود. بافت‌های آبشش، قلب، پوست، روده و مغز به ترتیب بیشترین القاء را نشان دادند.

افزایش بیان و القا ژن‌های CYP1 بستگی به عوامل مختلفی ازجمله نوع ماده سمی، گونه ماهی، جنسیت و دما دارد. زمانی‌که از طریق بیان نسبی بافت‌های مختلف بررسی می‌گردد عامل افزایش بیان ژن به میزان بیان پایه در هر بافت بستگی خواهد داشت؛ یعنی در بافت‌های با بیان پایه پایین‌تر اثر القاء، بیشتر نمایان می‌شود. برای مثال در بافت‌های بیضه و مغز بیان بیشتری از ژن CYP1A مشاهده می‌گردد، درصورتی‌که بیان پایه در این دو بافت بسیار پایین است (Jonsson *et al.*, 2007; Zanetta *et al.*, 2009). در مطالعه حاضر باوجود بیان پایه بالا ژن CYP1A بیشتر افزایش بیان ژن در کبد اتفاق افتاد. این حالت در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت تیمار PCB126(Jonsson *et al.*, 2010) و در ماهی *Gobiocypris rarus* در مواجهه با بنزوآلفاپایرن (Yuan *et al.*, 2013) مشاهده شد. یا در ماهی سفید *Rutilus frisii kutum* بیشترین بیان در کبد و آبشش گزارش گردید (Ardeshir *et al.*, 2018). البته میزان پایه بیان ژن در سایر بافت‌های ماهی گل خورک نسبت به کبد خیلی پایین‌تر نبود، به‌عنوان‌مثال بافت‌های کلیه و آبشش ۵۰ درصد بیان کبد را داشتند اما در مطالعات دیگر این نسبت کمتر از ۱۰ درصد می‌باشد (Jonsson *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2011). عامل بعدی، نحوه انتشار و در دسترس بودن ماده سمی است (Yuan *et al.*, 2013). زمانی که ماده سمی از طریق داخل صفاقی تزریق می‌شود اندام‌های حفره شکمی درگیر می‌شوند و با توجه به نزدیکی کبد به ماده تزریقی بیشترین بیان ژن‌های CYP1 در کبد و کلیه مشاهده می‌گردد. چنانچه در مواجهه ماهی *Takifugu obscurus* با بنزونفتوفلاون (1µM) میزان بیان CYP1A در آبشش بیشتر و سریع‌تر افزایش می‌یابد و کبد دارای زمان القا دیرتری می‌باشد (Kim *et al.*, 2008) این موضوع به دلیل متابولیزه شدن ماده سمی توسط آبشش و کاهش غلظت ماده سمی واردشده به بدن می‌باشد و درنتیجه القا کمتری را در کبد ایجاد می‌کند. به همین دلیل برای القاء بیان ژن در کبد نیاز به غلظت بالاتری از ماده سمی در محیط آبی است.

ماندگاری ماده القاء کننده در بدن ماهی می‌تواند، الگوی بیان ژن‌های CYP1 را در بافت‌ها تغییر دهد. موادی مانند PCB که قابلیت متابولیزه شدن را ندارند ماندگاری و تجمع بیشتر و اثر القایی بالاتری دارند؛ درنتیجه به سراسر بدن انتشاریافته و القاء را در تمامی ارگان‌ها ایجاد می‌کند. در مقابل موادی مانند بنزوآلفاپایرن که قابلیت متابولیزه شدن را دارند (Shimada and Fujii-Kuriyama, 2004) توسط کبد و ارگان‌های

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-01-21]

سم‌زدا متابولیزه شده درنتیجه به سایر ارگان‌ها انتشار پیدا نمی‌کنند. غلظت ماده سمی از عوامل مؤثر در میزان و الگوی بیان ژن‌های CYP1 است در تزریق ۱ میلی‌گرم/کیلوگرم از بنزوآلفاپایرن در گورخر ماهی بیان ژن در کبد افزایش معنی‌داری پیدا نکرد زیرا متابولیسم این مقدار از بنزوآلفاپایرن در آب‌شش صورت می‌گیرد (Bugiak amd Weber, 2009). یا ماهی کیل فیش در تیمار ۱۵ روزه با بنزوآلفاپایرن (10µg/l)، بیان CYP1A در بافت‌های کبد، کلیه و روده افزارش نمی‌یابد؛ این به دلیل بالا بودن بیان پایه ژن CYP1A و قابلیت متابولیسم بالای بنزوآلفاپایرن توسط کبد و کلیه می‌باشد (Wang *et al.*, 2006).

علاوه بر تنوع تنظیم بیان ژن در هرگونه، تنظیم بیان ژن‌های CYP1، وابسته به هر بافت نیز وجود دارد (Zanette *et al.*, 2009; Dorrington *et al.*, 2012) همچنین هر ایزوفرم از ژن‌ها نیز در بافت خاصی بیان می‌گردد. برای مثال در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بیان پایه CYP1A1 در کبد بیشتر و CYP1A3 در کلیه بیشتر است، درحالی‌که تحت القاء زنوبیوتیک‌ها، ژن CYP1A3 در کبد بیان بسیار بیشتری را نشان می‌دهد (Jonsson *et al.*, 2010)؛ بنابراین الگوی بیانی متفاوتی از ژن‌های CYP1 در گونه‌های ماهیان در حالت عادی و وضعیت القاء وجود دارد.

نتایج ما در بیان پایه مشخص کرد که اگرچه الگوی بیان پایه ژن‌های CYP1 در ماهیان گل خورک کمی متفاوت از سایر ماهیان است اما از الگوی شبیه اکثر ماهیان پیروی می‌کند. در ماهی گل خورک کبد، آب‌شش و کلیه بیشترین نقش در سم‌زدایی رادارند همچنین بافت پوست در ماهی گل خورک در سم‌زدایی و واکنش به مواد زنوبیوتیک به‌صورت فعال عمل می‌کند. الگوی القاء بیان ژن‌های CYP1A در ماهی گل خورک دوسومری در حالت پایه و تحت تیمار بنزوآلفاپایرن، نمایش مناسبی از حضور آلاینده‌ها را نشان داد؛ بنابراین الگوی بیان ژن‌های در بافت‌های مختلف می‌تواند به‌عنوان بیومارکر بکار گرفته شود.

منابع

Abdoli, A., 2000. The inland water fishes of Iran (Iranian museum of nature and wildlife: Tehran, Iran). 378 pp.

Agorreta, A., San Mauro, D., Schliewen, U., Van Tassell, J. L., Kovačić, M., Zardoya, R. and Rüber, L., 2013. Molecular phylogenetic of Gobioidei and phylogenetic placement of European gobies. Molecular phylogenetics and evolution 69(3): 619-633.

Ansari, A. A., Trivedi, S., Saggu, S. and Rehman, H., 2014. Mudskipper: A biological indicator for environmental monitoring and assessment of coastal waters. Journal of Entomology and Zoology Studies 2014, 2 (6): 22-33

Ardeshir, R. A., Zolgharnein, H., Movahedinia, A., Salamat, N. and Zabihi, E., 2018. CYP1A gene expression as a basic factor for fipronil toxicity in Caspian kutum fish. *Toxicology reports*, *5*, pp.113-124.

Chu, P., He, L., Zhu, D., Huang, R., Liao, L., Li, Y., Zhu, Z. and Wang, Y., 2019. Identification, expression and functional characterisation of CYP1A in grass carp (Ctenopharyngodon idella). *Fish & shellfish immunology*, *95*, pp.35-43.

Dar, S. A., Chatterjee, A., Rather, M. A., Chetia, D., Srivastava, P. P. and Gupta, S., 2020. Identification, functional characterization and expression profiling of cytochrome p450 1A (CYP1A) gene in Labeo rohita against emamectin benzoate. *International Journal of Biological Macromolecules*.

Dorrington, T., Zanette, J., Zacchi, F. L., Stegeman, J. J. and Bainy, A. C. D., 2012. Basal and 3-Methylcholanthrene-Induced Expression of Cytochrome P450 1a, 1b and 1c Genes in the Brazilian Guppy, Poecilia Vivipara. *Aquatic Toxicology,* Vol.124–125: No.0: pp. 06-13.

Gao, K., Brandt, J., Goldstone, V. and Jönsson, M. E., 2011. Cytochrome P450 1a, 1b, and 1c Mrna Induction Patterns in Three-Spined Stickleback Exposed to a Transient and a Persistent Inducer. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C:* Toxicology and Pharmacology, Vol.154; No.1: pp. 42-55.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-01-21]

Jafarabadi, A. R., Bakhtiari, A. R., Aliabadian, M. and Toosi, A. S., 2017. Spatial distribution and composition of aliphatic hydrocarbons, polycyclic aromatic hydrocarbons and hopanes in superficial sediments of the coral reefs of the Persian Gulf, Iran. *Environmental Pollution*, *224*, pp.195-223.

Jönsson, M. E., Gao, K., Olsson, J. A., Goldstone, J. V. and Brandt, I., 2010. Induction Patterns of New Cyp1 Genes in Environmentally Exposed Rainbow Trout. *Aquatic Toxicology:*Vol.98(4): pp. 311-21.

Jönsson, M. E., Orrego, R., Woodin, B. R., Goldstone, J. V. and Stegeman J. J., 2007. Basal and 3,3′,4,4′,5-Pentachlorobiphenyl-Induced Expression of Cytochrome P450 1a, 1b and 1c Genes in Zebrafish. *Toxicology and Applied Pharmacology:*Vol.221(1): pp. 29-41.

Jung, J. H., Kim, M., Yim, U.H., Ha, S.Y., An, J. G., Won, J. H., Han, G. M., Kim, N. S., Addison, R. F. and Shim, W. J., 2011. Biomarker responses in pelagic and benthic fish over 1 year following the Hebei Spirit oil spill (Taean, Korea). Marine. Pollution Bulletin. 62 (8):1859–1866.

Kim, J. H., Raisuddin, S., Ki, J. S., Lee, J. S. and Han, K. N., 2008a. Molecular cloning and β-naphthoflavone-induced expression of a cytochrome P450 1A (CYP1A) gene from an anadromous river pufferfish, *Takifugu obscurus*. Marine Pollution Bulletin, 57: 433-440.

Leggieri, L. R., De Anna, J. S., Cárcamo, J. G., Cerón, G. A., Darraz, L. A., Panebianco, A. and Luquet, C. M., 2019. Gills CYP1A of Oncorhynchus mykiss as a sensitive biomarker of crude oil pollution in freshwater environments. *Environmental toxicology and pharmacology*, *67*, 61-65.

Livak, K. J. and Schmittgen, T. D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *methods*, *25*(4): 402-408.

Murdy, E. O., 1989. A taxonomic revision and cladistics analysis of the Oxudercinae gobies (Gobiidae: Oxudercinae). Rec. Aust. Mus., Suppl 11, 1–93

Pfaffl, M. W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res:Vol.29(9): ppe45.

Rusni, S., Sassa, M. and Takehana, Y., 2020. Correlation between cytochrome P450 1A (*cyp1a*) mRNA expression and ambient phenanthrene and pyrene concentration in Javanese Medaka *Oryzias javanicus*. *Fish Science*. https://doi.org/10.1007/s12562-020-01428-y

Schlenk, D., Celander, M., Gallagher, E. P., George, S., James, M., Kullman, S. W., van den Hurk, P. and Willett, K., 2008. Biotransformation in fishes. The toxicology of fishes, pp.153-234.

Shimada, T. and Fujii-Kuriyama, Y., 2004. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. Cancer Science, 95: 1–6.

Sinaei, M. and Mashinchian, A., 2014. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the coastal sea water, the surface sediment and Mudskipper Boleophthalmus dussumieri from coastal areas of the Persian Gulf: source investigation, composition pattern and spatial distribution. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, *12*(1), p.59.

Thacker, C. E., 2003. Molecular phylogeny of the gobioid fishes. Molecular Phylogenetics and Evolution, 26(3): 354-368.

Uno, T., Ishizuka, M. and Itakura, T., 2012. Cytochrome P450 (CYP) in fish. *Environmental toxicology and pharmacology*, *34*(1): 1-13.

Wang, L., Pan, L., Liu, N., Liu, D., Xu, C. and Miao, J., 2011. Biomarkers and bioaccumulation of clam Ruditapes philippinarum in response to combined cadmium and benzo [α] pyrene exposure. *Food and chemical toxicology*, *49*(12), pp.3407-3417.

Wang, L., Scheffler, B. E. and Willett, K. L., 2006. CYP1C1 Messenger RNA Expression is Inducible by Benzo[a]pyrene in Fundulus heteroclitus Embryos and Adults Toxicology Sciences, 93: 331-340.

Yuan, L., Lv, B., Zha, J., Wang, Z., Wang, W., Li, W. and Zhu, L., 2013. New cytochrome P450 1B1, 1C1, 2Aa, 2Y3, and 2K genes from Chinese rare minnow (Gobiocypris rarus): Molecular characterization, basal expression and response of rare minnow CYP1s and CYP2s mRNA exposed to the AHR agonist benzo [a] pyrene. Chemosphere, 93: 209-216.\

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-01-21]

Zanette, J., Jenny, M. J., Goldstone, J. V., Woodin, B. R., Watka, L. A., Bainy, A. C. D. and Stegeman. J. J., 2009. New Cytochrome P450 1b1, 1c2 and 1d1 Genes in the Killifish Fundulus Heteroclitus: Basal Expression and Response of Five Killifish Cyp1s to the Ahr Agonist Pcb126. *Aquatic Toxicology.* Vol.93(4): pp. 234-43.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-01-21]