اثر غلظت‌های تحت‌کشنده دیازینون بر بیان ژن آروماتاز (*cyp19a*) در جنس ماده ماهی گورخری (*Danio rerio*)

- **معصومه درویشی***: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- **رقیه صفری**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- **علی شعبانی**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- **سیدحسین حسینی‌فر**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹۸

چکیده

سم دیازینون یک سم پرکاربرد در کشاورزی است و می‌تواند به‌عنوان یک خطر برای تولیدمثل آبزیان به‌شمارآید. در این تحقیق تأثیر دوزهای تحت‌کشنده سم دیازینون بر بیان ژن آروماتاز (Cyp19a) در جنس ماده ماهی گورخری (*Danio rerio*) بررسی شد. بدین منظور ۶۰۰ قطعه بچه‌ماهی گورخری با میانگین وزنی ۰/۰۱±۰/۱۵ گرم در قالب ٤ گروه آزمایشی (یک گروه شاهد و ۳ تیمار با ۳ تکرار) به‌مدت یک‌ماه در مواجه با غلظت‌های ۰/۸، ۱/٦ و ۳/۲ میلی‌گرم بر لیتر سم دیازینون قرار گرفتند. در انتهای دوره از بافت گناد نمونه‌برداری و استخراج RNA انجام شد. برای سنتز cDNA از کیت Superscript RTase استفاده شد و cDNA حاصله با استفاده از پرایمرهای ژن آروماتاز و ژن بتا اکتین به‌عنوان ژن رفرنس در Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. ارزیابی بیان ژن آروماتاز در تیمارهای ۰/۸، ۱/٦ و ۳/۲ میلی‌گرم بر لیتر سم دیازینون الگوی کاهشی وابسته به دوز را نشان داد و میزان بیان ژن آروماتاز به‌ترتیب ۰/۹۸، ۰/۹۰ و ۰/۷۰ برابر گروه شاهد بود، اما این کاهش معنی‌دار نبود. نتایج مطالعه حاضرنشان می‌دهد که سم دیازینون می‌تواند اثر منفی بر تکامل رسیدگی جنسی در جنس ماده ماهی زبرا داشته باشد.

کلمات کلیدی: دیازینون، آروماتاز، بیان ژن، ماهی زبرا

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: M_darvishi_m71@yahoo.com

(DOI): 10.22034/aej.2020.120810

مقدمه

آلودگی منابع آبی به‌دلیل تخلیه آب کشاورزی، خطری بزرگ برای تولیدمثل آبزیان به‌شمار می‌رود. مواد تخریب‌کننده غدد درون‌ریز (Endocrine Disrupting Chemical, EDC) به‌عنوان مواد شیمیایی هستند که عملکرد غدد درون‌ریز را تغییر می‌دهند (Mckinlay و همکاران، ۲۰۰۸). سورفکتانت‌های غیریونی از جمله نونیل‌فنل، آلکین فنل، بیس فنل، قارچ‌کش‌ها، حشره‌کش ددت، فاضلاب‌های صنعتی، جیوه و اتیلن استرادیول از مواد شیمیایی موجود در محیط می‌باشند که می‌توانند مشکلات تولیدمثلی شدیدی در ماهیان ایجاد نمایند (Larkin و همکاران، ۲۰۰۳). آفت‌کش‌ها موادی هستند که جهت از بین بردن گروه معینی از موجودات زنده تهیه و طراحی شده‌اند. اگرچه سمیت این مواد انتخابی و مربوط به گونه خاصی از جانداران است، اما معمولاً در سایر گونه‌ها نیز مسمومیت‌های خفیف ایجاد می‌کنند. یکی از آفت‌کش‌های ارگانوفسفره سم دیازینون است که یک مایع قهوه‌ای کم‌رنگ تا تیره و استرتیو فسفریک اسید می‌باشد. عملکرد این حشره‌کش ارگانوفسفره غیرسیستمیک به عنوان یک مهارکننده استیل کولین استراز (AchE) شناخته شده است. ورود دیازینون به آب‌های سطحی و قرار گرفتن ماهیان در معرض آن حتی در دوزهای پایین منجر به کاهش رشد و توان تولیدمثلی و بقای بی‌مهرگان آبزی در ماهی‌ها، دوزیستان، پرندگان و پستانداران می‌شود (Eisler، ۱۹۸۶؛ Dutta و Arends، ۲۰۰۳). استروژن‌ها در طیف گسترده‌ای از عملکرد فیزیولوژیکی از جمله واکنش‌های ایمنی، سیستم عصبی مرکزی و رشد طبیعی سلول‌های سوماتیک نقش مهمی بر عهده دارند (Filby و Tyler، ۲۰۰۵؛ Gustafsson، ۲۰۰۳). سنتز استرادیول از آندروژن در بافت‌های گناد و عصبی به‌وسیله سیتوکروم P450 آروماتاز (*CYP*) کدگذاری شده توسط ژن *cyp19* انجام می‌شود. *CYP19* که اغلب تحت عنوان P450 آروماتاز شناخته می‌شود یک آنزیم استروئیدوژنیک بسیار مهم است که مرحله تبدیل آندروژن‌ها به استروژن‌ها را کاتالیز می‌کند. مغز و گناد اندام‌هایی هستند که بالاترین فعالیت آروماتاز را دارند. ژن کدکننده آروماتاز، *CYP19* می‌باشد و به فوق خانواده ژنی سیتوکروم P450 تعلق دارد. mRNA آروماتاز در اندام و بافت‌های مختلف بیان می‌شود و عوامل گوناگونی بر بیان و فعالیت آن مؤثر می‌باشند (Carreau و همکاران، ۲۰۰۲). *CYP19A1* mRNA در درجه اول در گناد بیان می‌گردد و نقش مهمی را در تمایز جنسی و رشد تخمک‌ها برعهده دارد، درحالی‌که *CYP19A2* mRNA در ابتدا در مغز بیان می‌شود (Barney و همکاران، ۲۰۰۸). با این‌حال با توجه به تکثیر ژنوم در طول تکامل، ماهیان استخوانی از جمله ماهی گورخری حاوی جفت ژن‌های آروماتاز *CYP19A1* و *CYP19A2* است. بیان مناسب ژن‌های مرتبط با این آنزیم‌ها برای تولیدمثل و تمایز جنسیت در اکثر مهره‌داران حیاتی است (Trant و همکاران، ۲۰۰۱). شواهد نشان می‌دهد که آروماتاز (*CYP19a1a*) mRNA در ماهیان و خزندگان قبل از تمایز جنسیت بیان می‌گردد (Fernandino و همکاران، ۲۰۰۸) و استروئیدهای جنسی نقش مهمی را در تمایز جنسی ماهیان در مراحل بسیار ابتدایی زندگی ایفا می‌نمایند. تغییرات سطوح استرادیول در هنگام تمایز جنسیت به‌طور مستقیم با تغییرات بیان آروماتاز در گناد ارتباط دارد. قرار گرفتن در معرض استروژن‌های محیطی در ارگانیسم‌های تخم‌گذار مانند ماهی گورخری، واکنش مولکولی ایجاد می‌کند که از طریق اتصال به گیرنده استروژن (ER) منجر به افزایش تولید استروژن و سپس سنتز پروتئین پیش‌ساز تخمک (vtg) می‌شود (Jobling و همکاران، ۲۰۰۶). هورمون استرادیول جهت تحریک کبد برای تولید ویتلوژنین باید به‌مقدار کافی در تخمدان تولید شود که کاهش آن منجر به اختلال در رشد و فرآیند ویتلوژنزیز می‌شود. در حقیقت آلاینده‌ها بیان ژن‌های مسیر استروئیدوژنیک را تحت تاثیر قرار می‌دهند (Trickler و همکاران، ۲۰۱۴). مطالعات مختلفی در رابطه با تأثیر آلاینده‌ها بر فعالیت تولیدمثل و غدد درون‌ریز از جمله تأثیر دیفنوکونازول (Teng و همکاران، ۲۰۱۸)، BPSIP (۴- هیدروکسی فنیل ۴- ایزوپروکسی فنیل سولفون) (Lee و همکاران، ۲۰۱۸)، کلرید باریوم (Kwon و همکاران، ۲۰۱۶) و پلی‌برومینو دی‌فنیل‌اتر (PBDEs) بر ماهی گورخری صورت گرفته است. گونه گورخری به جهت سهولت و هزینه نگه‌داری پایین، باروری بالا، در دسترس بودن کامل توالی ژنوم و دستکاری راحت به‌عنوان یک سیستم مدل بیولوژیکی در مطالعات استفاده می‌شود (درویشی و صفری، ۱۳۹۷). از آن‌جایی که آبزی‌پروری ما در معرض خطر آلودگی‌های زیست محیطی موثر بر غدد درون‌ریز قرار گرفته و به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم بر عملکرد ماهی از طریق کاهش هورمون‌های استروئیدی جنسی، باروری و کیفیت تخمک تاثیر می‌گذارند، نیاز به بررسی تأثیر آفت‌کش دیازینون بر بیان ژن آروماتاز (*Cyp19a*) ضروری می‌نماید. این مطالعه روی جنس ماده ماهی گورخری (*Danio rerio*) در مدت ۳۰ روز انجام شد.

مواد و روش‌ها

بچه‌ماهیان گورخری با سن حدود ۲ و نیم ماهه و میانگین وزنی ۰/۱۵±۰/۰۱ گرم جهت بررسی بیان ژن p450 آروماتاز از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان زینتی شصت‌کلا خریداری و به مرکز تحقیقات آبزی‌پروری شهیدفضلی‌برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان منتقل شدند. بعد از گذشت ۲ هفته سازگاری ماهی با شرایط آزمایشگاهی، بچه‌ماهیان گورخری ماده که براساس ویژگی‌های ظاهری از جنس نر جدا و با تراکم ۴۵ عدد در آکواریوم‌های ۲۵۰ لیتری که ۲۵ لیتر از آن به‌وسیله آب شهری کلرزدایی شده آبگیری شده بودند به‌صورت ۴ تیمار و ۳ تکرار در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد

(DOI): 10.22034/aej.2020.120810

به‌مدت ۳۰ روز تا رسیدن به بلوغ در شرایط طبیعی نگه‌داری شدند. در طول دوره انجام تحقیق، ماهی‌ها با غذای بیومار فرانسه غذادهی شدند. میزان LC۵۰ سم دیازینون پس از انجام تست، ۱۶ میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آمد. میزان ۰، ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد LC50 به‌ترتیب صفر میلی‌گرم بر لیتر (گروه شاهد)، ۰/۸، ۱/۶ و ۳/۲ میلی‌گرم بر لیتر (تیمارها) محاسبه و در روز اول دوره به درون آب تزریق شد. تعویض سم هر ۴۸ ساعت یک‌بار بود که تا ۹۰ درصد آب تخلیه و مجدد آب به‌همراه سم تجدید می‌شد (Di Giulio و Hinton، ۲۰۰۸). استوک سم دیازینون با غلظت ۱ گرم بر لیتر تهیه شد. به‌عبارتی هر ۱ سی‌سی از این محلول حاوی ۱ میلی‌گرم ماده مؤثره بود. در پایان دوره، از کل بافت گناد ماهی‌های ماده به تعداد ۹ عدد از هر تیمار (۳ عدد از هر تکرار) به‌منظور بررسی ژن آروماتاز (Cyp19a) در شرایط استریل و آزمایشگاهی نمونه‌برداری انجام و به‌صورت مخلوط با هم به‌داخل تیوپ ریخته شدند. تیوپ‌های حاوی نمونه تا زمان استخراج RNA در فریزر ۸۰-درجه نگه‌داری شدند. جهت استخراج RNA از پروتکل کیت بایوزول طبق دستورالعمل شرکت سازنده (Biozol- Bioflux- Bioer) و سنتز cDNA از کیت SuPrimeScrip RT Premix براساس روش پیشنهادی شرکت استفاده شد. طراحی پرایمر ژن cyp19a و بتا اکتین (ژن رفرنس) به‌ترتیب با کد دسترسی AF226620.1 و NM_001020492.2 موجود در بانک ژن (NCBI) با استفاده از نرم‌افزار پرایمر ۳ انجام گرفت (جدول ۱) (Chen و Chan، ۲۰۱۶).

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

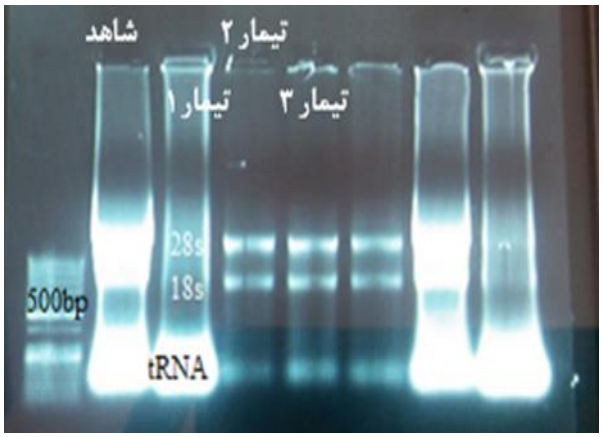
بافت	کد دسترسی	کارایی پرایمر	دمای اتصال (°C)	توالی (´۳-´۵)	نام پرایمر
گناد	NM-131154	٪۹۸	۶۰	CCGTTCTTATGGCAGGTGAT TTGTGTGGTCGATGGTGTCT	Cyp19a q-PCRF Cyp19a q-CRR
گناد	AF057040	٪۹۹	۶۰	AGCAGATGTGGATCAGCAAG TACCTCCCTTTGCCAGTTTC	β- actin q-PCRF β- actin q-PCRR

برای اطمینان از صحت آغازگرها و cDNA سنتز شده، قبل از انجام Real time PCR، PCR معمولی در دستگاه PCR تحت شرایط دمایی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۵۶ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و در ادامه ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، به‌منظور دناتوره شدن، اتصال آغازگر و بسط انجام شد. جهت اثبات تکثیر cDNA، محصول واکنش روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید (Hwang و همکاران، ۲۰۱۰). واکنش qPCR (Real time PCR) بعد از بهینه‌سازی دما و مواد مصرفی، در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با استفاده از آغازگرهای طراحی‌شده برای ژن *cyp19a* و ژن رفرنس بتااکتین توسط کیت سایبر بیوپارس (دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان) در دستگاه iQ5 شرکت بایورد و با استفاده از نرم‌افزار بایورد iQ5 اپتیکال (BioRad iQ5 optical system software version 2) برای بافت گناد در ۴ تکرار تکنیکی انجام شد (Chen و Zhang، ۲۰۱۸).

آنالیز آماری: تغییرات نسبی بیان ژن *cyp19a* با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه (Livak و Schmittgen، ۲۰۰۱) و نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون شیپیرو- ویلک تست شد. آزمون لون نیز جهت بررسی برابری واریانس‌ها مورد استفاده قرار گرفت. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد. آنالیز داده‌ها توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه در سطح اطمینان ۹۵٪ با استفاده از نرم‌افزار SPSS (Version 16) انجام شد.

نتایج

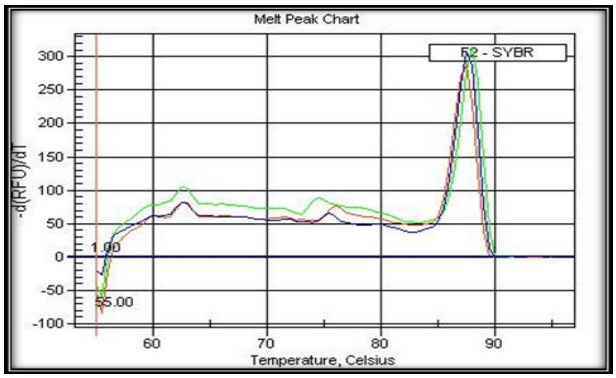
از لحاظ کمی و کیفی RNA استخراج‌شده موردارزیابی قرار گرفت. اعداد به‌دست‌آمده از سنجش کمی RNA با استفاده از دستگاه نانوفتومتر در محدوده ۱/۸ تا ۲/۲ قرار داشتند که بیان‌کننده غلظت مناسب RNA جهت سنتز cDNA است. در بررسی کیفی RNA ها با استفاده از ژل الکتروفورز وجود ۲ باند مشخص ۱۸S و ۲۸S نشان‌دهنده کیفیت مناسب RNA می‌باشد (شکل ۱). cDNA سنتز شده با پرایمر β-actin طراحی شده برای این‌گونه تست و مشاهده باند در ۱۱۶ bp سنتز صحیح cDNA را تأیید نمود (شکل ۲).



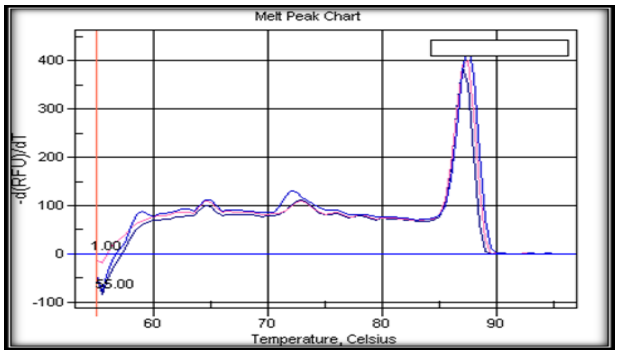
شکل ۱: کیفیت RNA استخراج‌شده از گناد ماهی گورخری روی ژل آگارز ۱/۵٪ و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید. در نمونه‌های استخراج‌شده دوباند متعلق به ۱۸S rRNA و ۲۸S می‌باشند.

(DOI): 10.22034/aej.2020.120810

شکل ۲: محصول تکثیر cDNA های سنتز شده با آغازگر (β -actin) به عنوان ژن رفرنس در بافت گناد ماهی گورخری جهت اثبات سنتز صحیح cDNA پس از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵٪ و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید. مارکر bp100

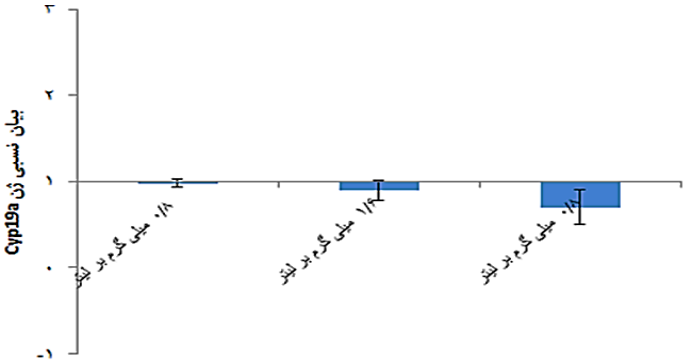


شکل ۳: منحنی ذوب ترسیم‌شده برای آغازگر βactin



شکل ۴: منحنی ذوب ترسیم‌شده برای آغازگر *Cyp19a*

بررسی عملکرد اختصاصی آغازگرها از طریق منحنی ذوب انجام و پیک مشاهده‌شده در منحنی ذوب آغازگرها برای هر محصول، بیانگر وجود یک محصول ویژه و تکثیر اختصاصی است(شکل ۳ و ۴). ارزیابی بیان‌ژن (*CYP19a*) در مواجهه ۳۰ روزه با سم دیازینون در تیمار ۰/۸، ۱/۶ و ۳/۲ میلی‌گرم بر لیتر سم به‌ترتیب ۰/۹۸، ۰/۹۰ و ۰/۷۰ کاهش بیان را نسبت به گروه شاهد نشان داد. این ارقام اختلاف معنی‌داری را در بیان ژن آروماتاز در گروه‌های تیمار شده با سم دیازینون نسبت به گروه شاهد نشان ندادند ($P\geq 0/05$). هر چند که با افزایش میزان سم، میزان بیان ژن آروماتاز کاهش بیش‌تری پیدا می‌کرد (شکل ۵).



شکل ۵: تغییرات نسبی بیان ژن آروماتاز (*Cyp19a*) در بافت گناد ماهی گورخری در مواجهه ۳۰ روزه با دوزهای مختلف سم دیازینون

بحث

استروئیدهای جنسی نقش مهمی در تمایز جنسی، بلوغ جنسی و رفتارهای مختلف ماده در رابطه با تولیدمثل بازی می‌کنند (Liley و Stacey، ۱۹۸۳؛ Devlin و Nagahama، ۲۰۰۲). اختلالات در استروئیدهای جنسی ممکن است تأثیر قابل‌توجهی بر موفقیت باروری داشته باشد. تغییرات در غلظت استروئید جنسی پلاسما ممکن است ناشی از چندین مکانیسم عمل مختلف ازجمله اثرات مستقیم بر آنزیم‌های استروئیدوژنیک نظیر آروماتاز یا تغییرات غیرمستقیم مرتبط با حلقه‌های بازخورد تغییریافته باشد (Uchida و همکاران، ۲۰۰۴؛ Fenske و Segner، ۲۰۰۴؛ Mills و Chichester، ۲۰۰۵). در مطالعه حاضر ارزیابی بیان ژن (*CYP19a*) در جنس ماده ماهی گورخری نشان داد که مواجهه ۳۰ روزه با سم دیازینون موجب کاهش بیان این ژن می‌شود، اما این کاهش بیان در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه شاهد ندارد ($P\geq 0/05$). هر چند که این کاهش وابسته به دوز می‌باشد. در مطالعه‌ی Yu و همکاران (۲۰۱۴) نشان داده شد که قرار گرفتن طولانی‌مدت ماهی گورخری در معرض پلی‌برومینو دی فنیل اتر (PBDEs) موجب تغییر سطح هورمون‌های جنسی پلاسما و کاهش تولید تخمک و تغییرات رشد گنادی، هم‌چنین رونویسی ژن‌های درگیر در مسیر استروئیدوژنز می‌شود. این نتایج نشان می‌دهد که مسیر استروئیدوژنیک می‌تواند یک هدف برای PBDE به‌عنوان یک تخریب کننده غدد درون‌ریز بوده و موجب اختلال در سیستم تولیدمثلی گردد. در مطالعه آن‌ها در جنس ماده گورخری سطح استرادیول پلاسما به‌طور قابل‌توجهی کاهش یافت. با افزایش دوز آلاینده، میزان هورمون استرادیول، بیان ژن‌های *CYP19a*، گیرنده استروژنی آلفا و ویتلوژنین به‌طور قابل‌توجهی کاهش یافت. از آن‌جایی که نقش *CYP19* در مسیر استروئیدی تبدیل تستوسترون به استرادیول می‌باشد می‌توان دریافت که کاهش غلظت بیان ژن *CYP19* می‌تواند کاهش تولید استرادیول در حضور PBDE را توجیه نماید و از آن‌جایی که

(DOI): 10.22034/aej.2020.120810

رونویسی ژن ویتلوژنین وابسته به غلظت استرادیول است، کاهش غلظت ویتلوژنین در ماده‌ها می‌تواند نتیجه غلظت پایین استرادیول و کاهش بیان گیرنده‌های استروژنی آلفا در نظر گرفته شود. در مطالعه‌ای که Kwon و همکاران (۲۰۱۶) بر اثرات کلریدباریوم روی تولیدمثل، هورمون‌های استروئید جنسی و رونویسی ژن‌های محور هیپوتالاموس هیپوفیز- گناد در ماهی گورخری انجام دادند، تولید تخمک به‌طور قابل‌توجهی کاهش یافت و قرار گرفتن مولدین در معرض کلریدباریم منجر به کاهش تخم‌ریزی شد. در ماهی‌های ماده کاهش قابل‌توجه سطح هورمون استرادیول همراه با کاهش مقادیر بیان ژن *CYP19a* مشاهده شد. علاوه بر این غلظت تستوسترون پس از مواجهه با این آلاینده به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. این نتیجه با کاهش بیان تنظیم ژن *bhsd17* همراه بود که نقش مهمی در بیوسنتز تستوسترون دارد. هم‌چنین در نرها قرار گرفتن در معرض کلریدباریم موجب افزایش غلظت استرادیول و افزایش بیان *CYP19a* گردید. این نتایج بیانگر این است که کلریدباریم می‌تواند رونویسی ژن و تولید هورمون محور HPG را به شکل وابسته به جنس انجام دهد که می‌تواند اثرات نامطلوب بر تولیدمثل و نتایج حاصله داشته باشد. در گذشته مطالعات مختلف نشان داد که قرار گرفتن در معرض آفت‌کش‌های اکتیل فنل (OP) باعث افزایش فعالیت آنزیم P450 می‌شود (Husoy و همکاران، ۱۹۹۶؛ Dong و همکاران، ۲۰۱۳). Faheem و همکاران (۲۰۱۷) مشاهده کردند غلظت زرده در ماهی (*Catla catla*) پس از قرار گرفتن در معرض بیسفنل- A (BPA) افزایش یافت. افزایش رونویسی ژن‌های مرتبط استروئیدوژنز (Steroidogenic acute regulation protein) *StAR* و *CYP19a* را نشان‌دهنده افزایش استروئیدوژنز و افزایش تبدیل هورمون تستوسترون به استروژن دانستند. Lee و همکاران (۲۰۱۸) نیز اثرات مواجهه ماهی گورخری با BPSIP (۴-هیدروکسی‌فنیل ۴-ایزوپروکسی فنیل سولفون) را بررسی کرده و در ماهی‌های ماده، افزایش قابل توجهی در غلظت استرادیول و تستوسترون همراه با افزایش معنی‌دار ژن‌های *cyp17* و *cyp19a* مشاهده شد. *Cyp17* مسئول تبدیل پروژسترون به آندروستندیون است (Hinfray و همکاران، ۲۰۱۱). *βhsd17* یک آنزیم اولیه است که تبدیل آندروستندیون به تستوسترون را کاتالیز می‌کند. *Cyp19* در مرحله نهایی تبدیل تستوسترون به استرادیول دخالت دارد. در حقیقت این آلاینده اثر افزایش بیان ژن‌های مسیر استروئیدوژنیک را نشان داد. Hinfray و همکاران (۲۰۰۶) در مطالعه خود نشان دادند که عمده بیان ژن *CYP19b* در مغز بوده، درحالی‌که در سطح تخمدان *CYP19a* بیش‌تر بیان می‌گردد. هم‌چنین نشان دادند که در ماهی گورخری در سن بالا، درمان استرادیول هیچ تأثیری بر بیان فعالیت آروماتاز در مغز نداشته درحالی‌که در مرحله لاروی، استرادیول به‌شدت باعث بیان *CYP19b* می‌شود. در تخمدان نیز استرادیول باعث مهار کامل بیان هر دو *CYP19a* و *CYP19b* شد. Yu و همکاران در سال (۲۰۱۴) تأثیر پلی‌برومینو دی فنیل اتر (PBDEs) بر تولیدمثل ماهی گورخری را در بیش از دو نسل مورد بررسی قراردادند که در جنس ماده قرار گرفتن در معرض مخلوط PBDE DE-71 منجر به تولید استرادیول پایین‌تر و مهار mRNA ژن آروماتاز سیتوکروم P450 شد. در نرها نیز قرار گرفتن در معرض DE-71 منجر به تولید بیش‌تر تستوسترون و افزایش بیان ژن آروماتاز گردید. اثرات قرار گرفتن در معرض بنزوفنون- ۳ بر اختلال غدد درون‌ریز و تولیدمثل در ماهی مداکا ژاپنی (*Oryzias latipes*) توسط Kim و همکاران (۲۰۱۴) بررسی شد و نتایج نشان داد که پس از ۱۴ روز مواجهه ماهیان بزرگ‌سال غلظت تستوسترون پلاسما در جنس نر به‌طور قابل توجهی افزایش یافت. نسبت استرادیول به تستوسترون در هر دو جنس نر و ماده معنی‌دار بود. هم‌چنین کلیت تنظیم مقادیر استروئیدوژنیک گنادی مثل *StAR*، *CYP11a*، *CYP17*، *hsd3b*، *hsd17b3*، *CYP19* مشاهده شد. مشاهدات به وضوح نشان می‌دهد که تعادل غدد درون‌ریز و عملکرد تولیدمثل در ماهی می‌تواند تحت‌تأثیر قرار گرفتن در معرض بنزوفنون- ۳ باشد. Baatrup و Henriksen (۲۰۱۵) در مطالعه خود نشان دادند که رفتارهای تولیدمثلی در جنس نر ماهی گورخری پس از درمعرض قرارگیری با ethinylestradiol α -۱۷(EE2) تغییری نکردند. هم‌چنین بیان ژن‌های گیرنده‌های استروژن و آندروژن تحت‌تأثیر قرار نگرفتند و فقط کاهش بیان ژن آروماتاز مشاهده شد. در مقابل تقریباً تمام عناصر رفتارهای خشن ماده‌ها به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای مختل شدند، با وجود این‌که این ماده‌ها هرگز در معرض EE2 قرار نگرفته بودند، این عمل به احتمال زیاد ناشی از تفاوت در مورفولوژی نر، فرومون و یا برخی از مکانیسم‌های غیرقابل تشخیص دیگر است. Teng و همکاران (۲۰۱۸) نیز مشاهده کردند که قرار گرفتن در معرض دیفنوکونازول موجب تغییرات قابل‌ملاحظه در شاخص سمیت و تغییرات پاتولوژیک در بافت‌ها و سطوح هورمون استروئیدی در ماهی گورخری می‌شود. آزمایشات RT-PCR بیش‌تر تأیید کرد که دیفنوکونازول به‌طور قابل توجهی موجب تحریک بیان *lhr*، *hsd3b*، *hsd11b*، *cyp19a* در تخمدان و *star*، *cyp19a*، *cyp3c1* در بیضه و ژن‌های *ERα* در مجاری ادرار می‌شود. با توجه به این‌که اثرات آلاینده‌ها به نوع و غلظت آلاینده، گونه‌مورد بررسی و جنسیت آن بستگی دارد، تغییرات بیان ژن *CYP19a* در مطالعه حاضر در جنس ماده ماهی گورخری در مواجه با تیمارهای تحت‌کشنده دیازینون نسبت به گروه شاهد با وجود این‌که کاهش وابسته به‌دوزی را نشان داد، معنی‌دار نبود. از آن‌جایی‌که آروماتاز فرآیند تبدیل تستوسترون به استرادیول را کاتالیز می‌کند، این کاهش بیان می‌تواند منجر به کاهش تولید هورمون استرادیول و یا افزایش هورمون تستوسترون

(DOI): 10.22034/aej.2020.120810

در جنس ماده گردد که نیاز به مطالعه و بررسی بیش‌تر دارد.

منابع

۱. **درویشی، م. و صفری، ر.، ۱۳۹۷.** ماهی گورخری (*Danio rerio*) به عنوان مدل ژنوتوکسیکولوژی. مجله آبزیان زینتی. سال ۵، شماره ۴، صفحات ۲۳ تا ۳۴.

۲. **Baatrup, E. and Henriksen, P.G., 2015.** Disrupted reproductive behavior in unexposed female zebrafish *(Danio rerio*) paired with males exposed to low concentrations of ۱۷α-ethinylestradiol. Aqua Toxico. Vol. ۱٦۰, pp: ۱۹۷-۲۰٤.

۳. **Barney, M.L.; Patil, J.G.; GunasekERα, R.M. and Carter, C.G., 2008.** Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in the common carp (*Cyprinus carpio*): sexual dimorphism and onset of ontogenic expression. GenERαl and Compar Endocri. Vol. 156, No. 3, pp: 499-508.

۴. **Carreau, S.; Bourguiba, S.; Lambard, S.; GalERαud Denis, I.; Genissel, C. and Levallet, J., 2002.** Reproductive system: aromatase and estrogens. Molecul and Cellul Endocri. Vol. 193. No. 1-2. pp: 137-143.

۵. **Chen, M.; Zhang, J.; Pang, S.; Wang, C.; Wang, L.; Sun, Y. and Liang, Y., 2018.** Evaluating estrogenic and anti-estrogenic effect of endocrine disrupting chemicals (EDCs) by zebrafish embryo-based vitellogenin 1 (vtg1) mRNA expression. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. Vol. 204, pp: 45-50.

۶. **Chen, Y.Y. and Chan, K.M., 2016.** Regulation of vitellogenin (vtg1) and estrogen receptor (er) gene expression in zebrafish (*Danio rerio*) following the administration of Cd2+ and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Chemosphere. Vol. 147, pp: 467-476.

۷. **Devlin, R.H. and Nagahama, Y., 2002.** Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. Aqua. Vol. 208, No. 3-4, pp: 191-364.

۸. **Di Giulio, R.T. and Hinton, D.E., 2008.** The Toxicology of Fishes. Taylor & Francis Group pp:1101.

۹. **Dong, M.; Zhu, L.; Shao, B.; Zhu, S.; Wang, J.; Xie, H. and Wang, F., 2013.** The effects of endosulfan on cytochrome P450 enzymes & glutathione S-trans fERαses in zebrafish livers. Ecotoxi and Environ Safe. Vol. 92, pp: 1-9.

۱۰. **Dutta, H.M. and Arends, D., 2003.** Effects of endosulfan on brain acetylcholinestERαse actiVtgy in juvenile bluegill sunfish. Environ Research. Vol. 91, No. 3, pp: 157-162.

۱۱. **Eisler, R., 1986.** Diazinon hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A Synoptic review. Fish & Wildl Service. 85 p.

۱۲. **Faheem, M.; Khaliq, S. and Lone, K.P., 2017.** Disruption of the Reproductive Axis in Freshwater Fish, *Catla catla*, After Bisphenol-A Exposure. Zoological Science. Vol. 34, No. 5, pp: 438-444.

۱۳. **Fenske, M. and Segner, H., 2004.** Aromatase modulation alters gonadal differentiation in developing zebrafish (*Danio rerio*). Aquatic Toxico. Vol. 67, No. 2, pp: 105-126.

۱۴. **Fernandino, J.; Hattori, R., Shinoda, T.; Kimura, H.; Strobl-Mazzulla, P.; Strüssmann, C. and Somoza, G., 2008.** Dimorphic expression of dmrt1 and cyp19a1 during early gonadal development in pejerrey, Odontesthes bonariensis. Sexual Develop. Vol. 2, No. 6, pp: 316-324.

۱۵. **Filby, A.L. and Tyler, C.R., 2005.** Molecular characterization of estrogen receptors 1, 2a, and 2b and their tissue and ontogenic expression profiles in fathead minnow. Biol Reprod. Vol. 73, No. 4, pp: 648-662.

۱۶. **Gustafsson, J.A., 2003.** What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen 400 ignaling. Trends Pharmacol Sci. Vol. 24, No. 9, pp: 479-485.

۱۷. **Hinfray, N.; Baudiffier, D.; Leal, M.C.; Porcher, J.M.; Aït-Aïssa, S.; Le Gac, F.; Schulz, R.W. and Brion, F., 2011.** Characterization of testicular expression of P450 17α-hydroxylase, 17,20-lyase in zebrafish and its perturbation by the pharmaceutical fungicide clotrimazole. GenERαl and Compar Endocri. Vol. 174. No. 3. pp: 309-317.

۱۸. **Hinfray, N.; Palluel, O.; Turies, C.; Cousin, C.; Porcher, J.M. and Brion, F., 2006.** Brain and gonadal aromatase as potential targets of endocrine disrupting chemicals in a model species, the zebrafish (*Danio rerio*). Environ Toxico. Vol. 21, No. 4, pp: 332-337.

۱۹. **Husoy, A.M.; Myers, M.S. and Goksoyr, A., 1996.** Cellular localization of cytochrome P450 (CYPlA) induction and histology in Atlantic cod (*Gadus morhua L)* and European flounder (*Platichthys flesus*) after environmental exposure to contaminants by caging in Sarrfiorden, Norway. Aqua Toxico. Vol. 36, No. 1-2, pp: 53-74.

۲۰. **Hwang, D.S.; Lee, K.W.; Han, J.; Park, H.G.; Lee, J.; Lee, Y.M. and Lee, J.S., 2010.** Molecular characterization and expression of vitellogenin (Vg) genes from the cyclopoid copepod, Paracyclopina nana exposed to heavy metals. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. Vol. 151, No. 3, pp: 360-368.

۲۱. **Jobling, S.; Williams, R.; Johnson, A.; Taylor, A.; Gross Sorokin, M.; Nolan, M.; Tyler, C.R.; van Aerle, R.; Santos, E. and Brighty, G., 2006.** Predicted exposures to steroid estrogens in U.K. rivers correlate with widespread sexual disruption in wild fish populations. Environ Health Perspect. Vol. 114, No. (Suppl 1), pp:32-39.

۲۲. **Kim, S.; Jung, D.; Kho, Y. and Choi, K., 2014.** Effects of benzophenone-3 exposure on endocrine disruption and reproduction of Japanese medaka -A two genERαtion exposure study. Aqua Toxico. Vol. 155, pp: 244-252.

۲۳. **Kwon, B.; Ha, N.; Jung, J.; Kim, P.G.; Kho, Y.; Choi, K. and Ji, K., 2016**. Effects of Barium Chloride Exposure on Hormones and Genes of the Hypothalamic-Pituitary-Gonad Axis, and Reproduction of Zebrafish (*Danio rerio*). Bull of Environ Contamin and Toxico. Vol. 96, No. 3, pp: 341-346.

۲۴. **Larkin, P.; Knoebl, I. and Denslow, N.D., 2003.** Differential gene expression analysis in fish exposed to endocrine disrupting compounds. Compar Biochem and Physio. Vol. 136, No. 2, pp: 149-161.

۲۵. **Lee, J.; Park, N.Y.; Kho, Y. and Ji, K., 2018.** Effects of 4 Hydroxyphenyl 4-Isopropoxyphenylsulfone Exposure on Reproduction and Endocrine System of Zebrafish. Environ Sci & Techno. Vol. 52, No. 3, pp: 1506-1513.

۲۶. **Liley, N.R. and Stacey, N.E., 1983.** Hormones, pheromones, & reproductive behavior in fish. Fish Physio. Vol. 9, pp:1-63.

۲۷. **Livak, K.J. and Schmittgen, T.D., 2001.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR&the$^{۲-\Delta\Delta ct}$ method. Methods. Vol. 25, No. 4, pp:402-408.

۲۸. **McKinlay, R.; plant, J.A.; Bell, J.N.B. and Voulvoulis, N., 2008.** Endocrine disrupting pesticides: Implications for risk assessment. Environmental International. Vol. 34, No. 2, pp :168-183.

۲۹. **Mills, L. and Chichester, C., 2005.** Review of evidence: are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? Sci of the Total Enviro. Vol. 343, No. 1-3, pp: 1-34.

۳۰. **Srivastava, A.K.; Mirshra, D.; Shrivastava, S.; Srivastav, S.k. and Srivastav, A.A., 2010.** Acute toxicity and behavioural responses of *Heteropneutes fossilis* to an organophosphate insecticide, dimethoate. Inter Journal of Pharma and Bio Sci. Vol. 1. No. 4. pp: 359-363.

۳۱. **Teng, M.; Qi, S.; Zhu, W.; Wang, Y.; Wang, D.; Dong, K. and Wang, C., 2018.** Effects of the bioconcentration and parental transfer of environmentally relevant concentrations of difenoconazole on endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*). Environ Poll. Vol. 233, pp: 208-217.

۳۲. **Trant, J.M.; Gavasso, S.; Ackers, J.; Chung, B.C. and Place, A.R., 2001.** Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (*CYP19a* and *CYP19b*) in zebrafish fry (*Danio rerio*). Journal of Experimental Zoology Part A: Eco Gene and Physio. Vol. 290, No. 5, pp: 475-483.

۳۳. **Trickler, W.J.; Guo, X.; Cuevas, E.; Ali, S.F.; Paule, M.G. and Kanungo, J., 2014.** Ketamine attenuates cytochrome p450 aromatase gene expression and estradiol-17β levels in zebrafish early life stages. Journal of Appli Toxico. Vol. 34, No. 5, pp:480-488.

۳۴. **Uchida, D.; Yamashita, M.; Kitano, T. and Iguchi, T., 2004.** An aromatase inhibitor or high water tempERαture induce oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase actiVtgy in the gonads of genetic female zebrafish during sex reversal. Compar Biochem and Physio Part A: Molecu & Inte Physio. Vol. 137. No. 1. pp: 11-20.

۳۵. **Yu, L.; Liu, C.; Chen, Q. and Zhou, B., 2014.** Endocrine disruption and reproduction impairment in zebrafish after long-term exposure to DE-71. Environ Toxico and Chem. Vol. 33, No. 6, pp: 1354-1362.

(DOI): 10.22034/aej.2020.120810

Effects of sublethal concentration of diazinon on the expression of aromatase (*CYP 19a*) gene in females Zebrafish (*Danio rerio*)

- **Masomeh Darvishi*:** Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
- **Roghieh Safari:** Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
- **Ali Shabani:** Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
- **Seyed Hossein Hoseinifar:** Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Received: March 2020 Accepted: June 2020

Key words: Diazinon, aromatase, Gene expression, Zebrafish

Abstract

Diazinon is a commonly used poison in agriculture and can be considered a risk for the reproduction of aquatic animals. This study investigated the effect of sub lethal concentration of diazinon on the expression of aromatase (*CYP 19a*) gene in zebrafish females (*Danio rerio*). For this study, 600 fish with average weight of 0.15±0.1 g divided in 4 groups with 3 replicates were exposed to concentrations of 0.8, 1.6 and 3.2 mg/ liter of diazinon for 1 month and compared to control group. At the end of trial, samplings were done from gonad tissue and RNA extracted. For cDNA synthesis, the Superscript RTase kit was used and Real Time PCR was done aromatase and beta-actin genes. Evaluation of aromatase gene expression in the diazinon-treated groups, 0.8, 1.6 and 3.2 mg/l, showed a dose dependent decrease and aromatase genes expression were 0.98, 0.90 and 0.70 respectively, but was not significant. The results showed that diazinon may have a negative effect on sex development in zebrafish females.

* Corresponding Author's email: M_darvishi_m71@yahoo.com