تاثیر غلظت‌های تحت کشنده دیازینون بر بیان ژن ویتلوژنین در جنس ماده ماهی گورخری (*Danio rerio*)

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

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۷

چکیده

در این تحقیق تأثیردوزهای مختلف سم دیازینون بر بیان ژن ویتلوژنین (Vtg) درجنس ماده ماهی گورخری (*Danio rerio*) بررسی شد. تعداد ۶۰۰ قطعه بچه‌ماهی گورخری با میانگین وزنی ۰/۰۱±۰/۱۵ گرم در ٤ تیمار و ۳ تکرار به‌مدت یک ماه تحت تاثیر سه دوز سم ۰/۸، ۱/٦ و ۳/۲ میلی‌گرم بر لیتر و تیمار شاهد قرار گرفتند. در انتهای دوره جهت مطالعات ژنتیکی از کبد نمونه‌برداری و استخراج RNA انجام شد. برای سنتز cDNA از کیت Superscript RTase استفاده شد و cDNA حاصله با استفاده از پرایمرهای ژن‌های مذکور و ژن بتا اکتین به‌عنوان ژن رفرنس در Real Time PCR استفاده شد. ارزیابی بیان ژن ویتلوژنین کاهش بیان را در گروه‌های تیمار شده با سم دیازینون نسبت به گروه شاهد نشان داد. در گروه‌های تیمار شده با سم دیازینون (۰/۸، ۱/٦ و ۳/۲ میلی‌گرم بر لیتر) میزان بیان ژن ویتلوژنین به‌ترتیب ۰/۹، ۰/٦۹ و ۰/۳۹ برابر گروه شاهد بود که الگوی کاهشی وابسته به دوزی را نشان می‌دهد (P<۰/۰۵). نتایج مطالعه حاضرنشان می‌دهد که سم دیازینون می‌تواند اثر منفی بر رشد و تکامل سلول‌های جنسی در جنس ماده ماهی زبرا داشته باشد.

کلمات کلیدی: ویتلوژنین، دیازینون، بیان ژن، ماهی گورخری

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: fisheriessafari@yahoo.com

مقدمه

امروزه انسان عامل اصلی تخریب محیط زیست می‌باشد چرا که اکثر آلاینده‌ها توسط فعالیت‌های انسان به‌وجود آمده‌اند. سموم ارگانو فسفره در سطح گسترده‌ای در کشاورزی و حتی امور خانگی برای کنترل حشرات استفاده می‌شود، با این‌که بوم‌سازگان‌های آبی محل و هدف استفاده این سموم نیستند، اما مطالعات پایشی شواهدی از حضور آن‌ها و متابولیت‌های آن‌ها را در محیط‌های آبی به‌ویژه آب‌های سطحی را نشان می‌دهند (Van Der Geest و همکاران، ۱۹۹۷). سم دیازینون، یکی از این سمومی است که به‌عنوان آفت‌کش در باغات و زمین‌های کشاورزی کشور به‌ویژه در منطقه استان گلستان استفاده می‌گردد. در گستره وسیعی از آبزیان ازجمله ماهیان، پستانداران و بی‌مهرگان آبزی تاثیرات مخربی به‌جا می‌گذارد (Kuivila و Foe، ۱۹۹۵). هم‌چنین گزارشاتی از استفاده از این سم در صید غیرمجاز آبزیان وجود دارد. سنجش مقدار آلاینده‌ها در آب، رسوب و بافت آبزیان قدمت طولانی دارد اما در سال‌های اخیر پایش اکوسیستم‌های آبی از سنجش کمی به سمت سنجش‌های کیفی اثرات آلاینده‌ها بر آبزیان و اکوسیستم‌های آبزیان سوق پیدا نموده است (Pereira و همکاران، ۲۰۰۶). با پیشرفت علم استفاده از گونه‌های ویژه‌ای از موجودات زنده به‌عنوان بیواندیکاتور یا پایش‌گر زیستی محیط‌های آبی که توانایی تجمع آلاینده‌ها را در بافت‌های خود دارند رواج گرفت ولی استفاده از آن‌ها با محدودیت‌هایی همراه است (Marin و Matozzo، ۲۰۰۴). به مرور زمان استفاده از زیست‌نشانگرها جهت ارزیابی اکوسیستم‌های آبی مورد توجه قرار گرفت. تغییرات پارامترهای خون‌شناسی، رفتاری، ژنتیکی و تولیدمثلی که در تماس با غلظت‌های مختلف آلاینده‌ها رخ می‌دهد می‌تواند به‌عنوان زیست‌نشانگر یا بیومارکر مورد بررسی قرار گیرند (Schelenk، ۲۰۰۶). تولیدمثل ماهی یکی از حساس‌ترین شاخص‌های مواجهه با آلاینده‌های شیمیایی است که از اثرات آلاینده‌ها بر آن می‌توان به تغییر رفتارهای جنسی، کاهش باروری، کاهش قابلیت تخم‌گشایی و زنده ماندن نتاج اشاره کرد (جمشیدی و همکاران، ۱۳۹۲). آلاینده‌ها می‌توانند با تأثیر بر سیستم اندوکرین موجب تغییرات سطوح هورمون‌های استروئیدی، استروژن‌ها و اندروژن‌ها شده که این فاکتورها می‌توانند به‌عنوان نشانگر زیستی مواجهه با آلاینده‌ها درنظر گرفته شود. مواد برهم زننده غدد داخلی می‌توانند با اتصال به گیرنده‌های هورمونی مسیرهای علائم سلولی را تحت تاثیر قرار دهند (Soto و همکاران، ۱۹۹۵). روش‌های سلولی و مولکولی جدید محققین را قادر ساخته تا مکانیسم‌های جدید نحوه عمل هورمون‌های تولیدمثلی طبیعی و تخریب‌کننده‌های سیستم غدد درون‌ریز مثل استروژن‌های مصنوعی و استروژن‌های تولیدشده به دست انسان را مورد ارزیابی قرار دهند. در حقیقت در سطح مولکولی تغییرات DNA، تغییرات ژنتیکی (تغییر در بیان، عملکرد و تنظیم ژنی)، تغییرات سطوح پروتئینی و تغییرات متابولیکی در موجودات می‌تواند به‌عنوان شاخص مواجهه با آلودگی درنظر گرفته شود. مطالعات زیادی در زمینه اثرات آلاینده‌ها در سطح مولکولی بر بیان ژن‌های مرتبط با تولیدمثل در مواجهه با آلاینده در آبزیان صورت گرفته است که از آن جمله می‌توان به اثر آلاینده بیس فنل ایزو پروکسی فنیل سولفون (Lee و همکاران، ۲۰۱۸)، میکروسیستین (Hou و همکاران، ۲۰۱۵)، تتراکلرودی‌بنزو پی‌دیوکسین (Chen و Chan، ۲۰۱۶)، کلرید باریم (Kwon و همکاران، ۲۰۱۶) ودی‌فنیل‌اتر (Yu و همکاران، ۲۰۱۶) بر بیان ژن‌های محور هیپوتالاموس، هیپوفیز وگناد در ماهی زبرا اشاره نمود. در زمینه اثرات آلودگی با دوزهای تحت‌کشنده سم دیازینون در بیان ژن ویتلوژنین در ماهی گورخری (*Danio rerio*) انجام نشده است بنابراین مطالعه حاضر باهدف بررسی پارامترهای مذکور صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها

ماهی: در این آزمایش جهت بررسی بیان ژن ویتلوژنین، بچه ماهیان گورخری ماده با سن حدود ۲ ماه از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان زینتی شصت‌کلا خریداری و به مرکز تحقیقات آبزی‌پروری شهیدفضلی‌بر آبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شدند. ماهیان برای سازگاری با شرایط آزمایشگاهی به‌مدت ۲ هفته در آکواریوم‌ها پرورش و نگه‌داری شدند. بعد از ۲ هفته ماهی‌ها با تراکم ۴۵ عدد در هر آکواریوم شیشه‌ای ۲۵۰ لیتری که ۲۵ لیتر از آن آبگیری شده بود به‌طور تصادفی در ۴ تیمار و ۳ تکرار رهاسازی شدند. به‌منظور هوادهی آکواریوم‌ها از سنگ هوا و تنظیم دمای آب در ۲۶ درجه سانتی‌گراد از هیتر برقی استفاده شد. میانگین pH آب ۸/۳ بود. برای تغذیه ماهی‌ها از غذای بیومار (فرانسه) استفاده شد که مقدار آن براساس ۴-۳ درصد میانگین وزنی ماهی محاسبه و در ۵ الی ۶ نوبت به‌طور روزانه غذادهی شدند.

مشخصات تیمارها و مدت انجام تحقیق: در روز اول شروع تحقیق تزریق سم درون آب انجام شد و هر ۴۸ ساعت یک‌بار تا حدود ۹۰ درصد از آب آکواریوم تعویض و سم تجدید شد. در پایان دوره (روز ۳۰ام) نمونه‌برداری از کبد و گناد انجام گرفت. میزان LC۵۰ برای سم دیازینون پس از انجام تست LC۵۰، ۱۶میلی‌گرم بر لیتر درنظر گرفته شد که میزان ۰، ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد از LC۵۰ مورد نظر برای تیمارها استفاده شد. تیمار اول: ۰ میلی‌گرم بر لیتر، تیمار دوم: ۵ درصد LC۵۰= ۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر، تیمار سوم: ۱۰ درصد LC۵۰= ۱/۶ میلی‌گرم بر لیتر و تیمار چهارم: ۲۰ درصد LC۵۰= ۳/۲ میلی‌گرم بر لیتر.

نمونه‌برداری: در پایان دوره پس از بی‌هوشی، از بافت کبد ماهی‌های ماده به‌منظور بررسی ژن ویتلوژنین نمونه‌برداری و هر کدام به

تیوپ‌های جداگانه منتقل شدند و بلافاصله در مخزن ازت قرار گرفتند. در پایان نمونه‌برداری تیوپ‌های حاوی نمونه تا زمان استخراج RNA در فریزر ۸۰ـ نگه‌داری شدند.

استخراج RNA: به‌منظور استخراج RNA از پروتکل کیت بایوزول طبق دستورالعمل شرکت سازنده (Biozol- Bioflux- Bioer) استفاده شد و نمونه‌ها در فریزر ۸۰- قرار گرفتند. کمیت و کیفیت RNA استخراجی با استفاده از اسپکتروفتومتری و ژل آگاروز انجام شد.

سنتز cDNA: برای سنتز cDNA از کیت Superscript RTase استفاده شد. بدین‌صورت که ۵ میکرولیتر از RNA که قبلا آماده شده بود به‌همراه ۱ میکرولیتر آغازگر الیگو به‌تیوپ‌های جدیداضافه و با آب عاری از نوکلئاز به حجم ۱۰ میکرولیتر رسید. سپس بر روی بلوک حرارتی در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه انکوبه گردید و بعد از آن بر روی یخ انتقال داده شد. ۱۰ میکرولیتر مسترحاوی آنزیم ریورس ترانسکریپتاز به آن اضافه و در نهایت با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ دقیقه و ۷۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد. سپس محلول حاوی c DNA به حجم ۲۰ میکرولیتر به دمای ۸۰- منتقل شد.

واکنش Real_time PCR: واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز کمی با استفاده از کیت سایبر شرکت بیوپارس (دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی) در دستگاه iQ5 شرکت (BIO-RAD, USA) در ۴ تکرار تکنیکی در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از ۱۰ میکرولیتر بافر سایبرگرین، ۱ میکرولیتر آغازگر پیش‌رو ژن هدف و رفرنس (۱۰ پیکومول)، ۱ میکرو لیتر آغازگر پس‌رو ژن هدف و رفرنس (۱۰ پیکومول)، ۲/۸ میکرولیتر آب مقطر، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم تگ پلیمراز (۵ U) و ۵ میکرولیتر cDNA رقیق‌شده (۲ نانوگرم در میکرولیتر) در دمای اتصال ۵۸ درجه سانتی‌گراد انجام شد (جدول ۱).

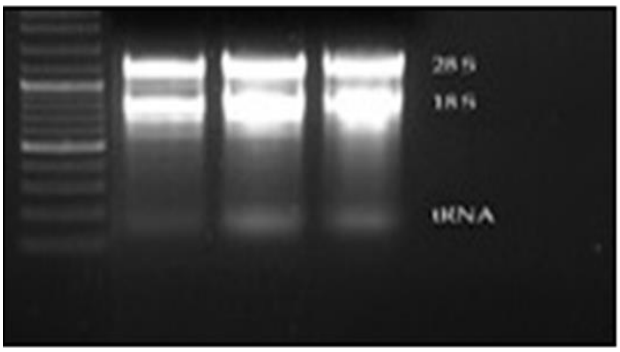
جدول ۱: مشخصات پرایمرهای مورداستفاده در این مطالعه

دمای اتصال (°C)	توالی (´۳-´۵)	نام پرایمر
۵۸	GCCAAAAAGCTGGGTAAACA	Vtg1 q-PCRF
	AGTTCCGTCTGGATTGATGG	Vtg1 q-PCRR
۵۸	AGCAGATGTGGATCAGCAAG	β- actin q-PCRF
	TACCTCCCTTTGCCAGTTTC	β- actin q-PCRR

تجزیه و تحلیل داده‌های آنالیز کمی qPCR: تغییرات نسبی بیان ژن‌های ویتلوژنین، گیرنده استروژن آلفا و cyp19a با استفاده از روش $\Delta\Delta Ct$ محاسبه گشت که در آن $\Delta\Delta Ct$ برابراست با ΔCt ژن هدف منهای ΔCt کالیکراتور $[\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Target\ gene} -$ $\Delta Ct_{calibrator}$، ΔCt ژن هدف برابر است با مقدار Ct ژن هدف منهای Ct ژن رفرنس $\Delta Ct_{Target\ gene} = Ct_{target\ gene} -$ $Ct_{refrence\ gene}]$ و ΔCt کالیبراتور برابر است با ΔCt ژن هدف هر نمونه منهای ΔCt نمونه شاهد (Livak و Schmittgen، ۲۰۰۱). سپس نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولوموگروف- اسمیرنوف و شیپیرو- ویلک تست شد و آزمون لون نیز جهت بررسی برابری واریانس‌ها مورد استفاده قرار گرفت. آنالیز داده‌های توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه در سطح اطمینان ۹۵ ٪ صورت گرفت. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد. نتایج به‌صورت میانگین±انحراف معیار نمایش داده شد آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (Version 16) انجام شد.

نتایج

نتایج ارزیابی کیفی و کمی RNA: از لحاظ کمی و کیفی RNA استخراج‌شده مورد ارزیابی قرار گرفت اعداد به‌دست آمده از سنجش RNA 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 S ۱۸ و S ۲۸ نشان‌دهنده کیفیت مناسب RNA است (شکل ۱).



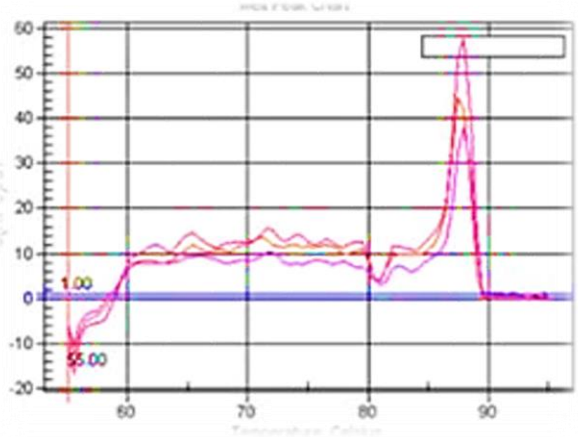
شکل ۱: کیفیت RNA استخراج‌شده از گناد و کبد ماهی گورخری روی ژل آگارز ۱/۵٪ و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید. در نمونه‌های استخراج شده دوباند متعلق به S ۱۸ rRNA و S ۲۸ می‌باشند.

ارزیابی عملکرد آغازگرهای به‌کاررفته در qPCR: ترسیم منحنی استاندارد جهت تخمین کارایی آغازگرها و تکرارپذیری آزمایش دامنه‌ای حدود ۹۹-۹۵ درصد نشان داد که نشان‌دهنده اتصال صحیح آغازگرهاست.

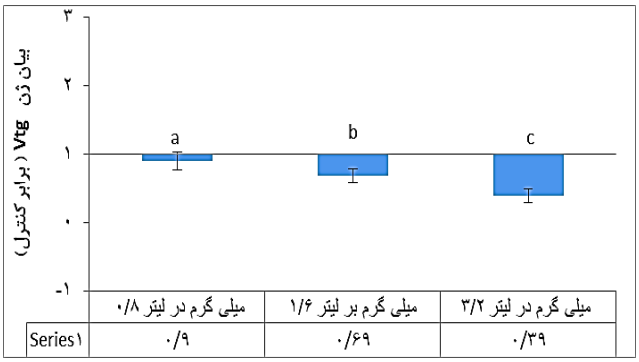
نتایج بررسی عملکرد اختصاصی آغازگرها از طریق منحنی ذوب: پیک مشاهده شده در منحنی ذوب آغازگر برای هر محصول، بیانگر وجود یک محصول ویژه و تکثیر اختصاصی است (شکل ۲).

ارزیابی بیان ژن زرده‌سازی (Vitellogenin): ارزیابی بیان ژن (Vtg) نیز کاهش بیان این ژن را در گروه‌های تیمار شده با سم دیازینون نسبت به گروه شاهد نشان داد. هم‌چنین در گروه‌های تیمار شده با سم دیازینون (۰/۸، ۱/۶ و ۳/۲ میلی‌گرم بر لیتر) میزان بیان ژن به‌ترتیب ۰/۹، ۰/۶۹ و ۰/۳۹ برابر گروه شاهد بود که الگوی کاهشی

وابسته به دوزی را نشان می‌دهد. اختلاف معنی‌داری در میزان بیان در هر سه گروه تیمار شده نیز مشاهده شد (P<۰/۰۵) (شکل۳).



شکل۲:منحنی‌ذوب ترسیم‌شده‌از غلظت‌های سریالی برای آغازگر Vtg



شکل ۳. تغییرات نسبی بیان ژن ویتلوزنین (Vtg) در بافت کبد ماهی زبرا در مواجهه ۳۰ روزه با دوزهای مختلف سم دیازینون

حروف کوچک اختلاف معنی‌دار(P< ۰/۰۵) بین تیمارها را نشان می‌دهد.

بحث

در ماهی‌ها، تولیدمثل به‌وضوح توسط محور HPG تنظیم شده است (Sofikitis و همکاران، ۲۰۰۸). بنابراین، موادشیمیایی که در هر سطح از این محور عمل می‌کنند می‌توانند اثرات نامطلوب بر تولیدمثل داشته باشند (Hilscherova و همکاران، ۲۰۰۴). کیفیت آب عامل مهمی برای توسعه و تولیدمثل موفقیت‌آمیز ماهی به‌شمار می‌رود. هنگامی‌که کیفیت آب به‌علت موادشیمیایی نظیر آلاینده‌های تغییر کند، ساختار بافت‌شناختی حیات‌آبزی به‌شدت تحت‌تاثیر قرار می‌گیرد. سم دیازینون توانایی تجمع در بافت ماهیچه، کبد، گناد و آبشش را دارد و از این طریق می‌تواند بر هوموستازی، تولیدمثل، رشد و یا رفتار ماهیان تاثیر بگذارد. هر چند بخش عمده این سم وارد شده به بدن از طریق سم‌زدایی در کبد از بدن دفع می‌شود ولی بخشی از آن نیز ممکن است در بافت‌های مختلف بدن ازجمله غدد جنسی تجمع پیدا کرده و با تاثیر بر سلول‌های غدد جنسی سبب بروز ضعف و کاهش توان تولیدمثلی در آبزیان گردد. در مهره‌داران تخم‌گذار ویتلوژنزیز رویدادی ضروری است که رشد تخمک را از طریق ویتلوژنین قادر می‌سازد. سنتز ویتلوژنین به‌طور طبیعی به تنظیم استرادیول وابسته به‌تنظیم گیرنده‌استروژنی آلفا(ERα)در کبد ماده همراه است(Bowman و همکاران، ۲۰۰۲؛ Lange و همکاران، ۲۰۰۳؛ Davis و همکاران، ۲۰۰۸). بیان ژن‌های ویتلوژنین وابسته به مرحله رسیدگی جنسی و نوع بافت است و عملکرد اصلی آن‌ها تامین مواد مغذی برای رشد تخمک در ماده‌های بالغ می‌باشد (Kobayashi و همکاران، ۲۰۰۵؛ Marin و همکاران، ۲۰۰۴؛ Henry، ۲۰۰۹) . تمام رویدادهایی که بر ویتلوژنیز تاثیر می‌گذارند می‌توانند موفقیت کلی تولیدمثل را تحت تاثیر قرار دهند. ویتلوژنین در کبد یک پروتئین پیش‌ماده تخمک است که در ماده‌ها بیان می‌شود و معمولاً نمی‌تواند توسط نرها بیان شود. اما در حضور مواد شیمیایی تخریب‌کننده غدد درون‌ریز استروژنی (EDC)، بیان ژن‌های دخیل در سیکل تولیدمثلی ازجمله ویتلوژنین می‌تواند در نرها القا شود که در این‌صورت می‌تواند به‌عنوان نشانگر مولکولی برای مواد استروژنیک استفاده شود (Marin و Matozzo، ۲۰۰۴؛ Thomas و همکاران، ۲۰۰۷؛ Ankley و همکاران، ۲۰۰۸؛ Park و همکاران، ۲۰۱۰). 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 تاثیر قابل توجهی 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 تغییر یافته باشد (Uchida و همکاران، ۲۰۰۴؛ Mills و Chichester، ۲۰۰۵). آلاینده‌ها در طبیعت عموماً مشابه یا بر خلاف هورمون‌ها عمل می‌کنند که در هر دوصورت، تاثیر منفی بر حیات وحش می‌گذارند. مواد آلاینده شبه استروژنی در جنس ماده مانع زرده‌سازی و در جنس نر به‌عنوان تحریک‌کننده تولید زرده به‌شمار می‌آیند. در مطالعه حاضر ارزیابی بیان ژن ویتلوژنین در این تحقیق نشان داد که مواجهه ۳۰ روزه با سم دیازینون کاهش بیان را در گروه‌های تیمار شده با سم دیازینون نسبت به گروه شاهد نشان داد. در گروه‌های تیمار شده با سم دیازینون (۰/۸، ۱/۶ و ۳/۲ میلی‌گرم بر لیتر)میزان بیان‌ژن ویتلوژنین به‌ترتیب ۰/۹، ۰/۶۹و ۰/۳۹ برابر گروه شاهد بود که الگوی کاهشی وابسته به دوزی را نشان می‌دهد (P<۰/۰۵). هم‌راستا با نتایج این مطالعه Chang و همکاران (۲۰۱۳) پس از یک دوره ۳۰ روزه مواجهه ماهی گورخری با آلاینده

بوتاکلر تریتمنت، نشان دادند که میزان باروری کاهش یافته است. هم‌چنین قرارگیری کوتاه‌مدت در معرض ۱۰۰ میکروگرم در لیتر موجب کاهش سطح پلاسمایی تستسترون و استرادیول شد که این کاهش می‌تواند به‌دلیل مهار استروئیدوژنز گناد به‌وسیله بوتاکلر یا از طریق بازخورد منفی در محور هیپوتالاموس هیپوفیز برای کاهش سنتز گنادوتروپین‌ها یا کاهش میزان کلسترول برای استروئیدوژنز باشد. در مطالعه Yu و همکاران (۲۰۱۴) نشان داده شد که قرار گرفتن طولانی مدت ماهی گورخری در معرض پلی برومینو 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 تخریب‌کننده غدد درون‌ریز بوده و موجب اختلال در سیستم تولیدمثلی گردد. در مطالعه آن‌ها در جنس ماده زبرا سطح استرادیول پلاسما به‌طور قابل توجهی کاهش یافت. با افزایش دوز آلاینده، میزان هورمون استرادیول، بیان ژن‌های CYP19a، گیرنده استروژنی آلفا و ویتلوزنین به‌طور قابل توجهی کاهش یافت. از آن‌جایی‌که 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 آن‌جایی‌که 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. Chen و Chan (۲۰۱۶) نیز بیان ژن ویتلوژنین و گیرنده استروژنی در ماهی گورخری در مواجهه با کادمیوم و تتراکلرودی بنزو پی دیوکسین (TCDD) مطالعه و اثرات مهاری کادمیوم بر بیان ویتلوژنین در سلول‌های کبدی ماهی گورخری مشاهده کرده و نشان دادند که اثر مهاری بیان ژن ویتلوژنین احتمالاً به‌علت اثر مهاری بیان ژن گیرنده استروژنی آلفا و تغییر ساختاری پروموتور این دو ژن می‌باشد. Korkmaz و Dönmez (۲۰۱۷) اثرات دیازینون بر استرادیول، ویتلوژنین پلاسما و آسیب‌شناسی بافت کبد و گناد ماهی کپور نر و ماده را مطالعه و پاسخ‌های متفاوتی در سطوح استرادیول و ویتلوژنین در جنس‌های نر و ماده مشاهده کردند. از آن‌جاکه آروماتاز مسئول تبدیل هورمون مردانه (تستسترون) به هورمون زنانه (استرادیول) است (Hong و همکاران، ۲۰۰۷)، افزایش استرادیول در نرها می‌تواند ناشی از افزایش فعالیت آروماتاز باشد. در گذشته مطالعات مختلف نشان داد که قرارگرفتن در معرض آفت‌کش‌های اکتیل فنل (OP) باعث افزایش فعالیت آنزیم P450 می‌شود (Husoy و همکاران، ۱۹۹۶؛ Dong و همکاران، ۲۰۱۳). هم‌چنین افزایش میزان استرادیول در جنس نر، افزایش سنتز ویتلوژنین را به‌همراه دارد. سطح ویتلوژنین در نرهای کپورمعمولی پس از ۷ روز و در غلظت بالای دیازینون افزایش پیدا کرد، درصورتی‌که در غلظت پایین هیچ‌گونه تغییری مشاهده نشد. این عمل احتمالاً ناشی از عدم دسترسی سطوح استرادیول برای رسیدن به آستانه انتقالی برای القاء سنتز ویتلوژنین در نرها می‌باشد (Solé و همکاران، ۲۰۰۳). کاهش ویتلوژنین در جنس ماده می‌تواند به جهت اثر منفی دیازینون بر روی گیرنده‌های استرادیول هپاتوسیت باشد که منجر به اختلال در سنتز ویتلوژنین شوند (Arnold و همکاران، ۱۹۹۶). یکی از دلایل ممکن برای کاهش سطح ویتلوژنین در ماده‌ها می‌تواند با بازخورد منفی ترشح گنادوتروپین مرتبط باشد. Chen و همکاران (۲۰۱۸) با استفاده از داده‌های بیان ژن ویتلوژنین اثرات استروژنیک برخی از موادشیمیایی را بررسی و مشاهده کردند که بیان ویتلوژنین جنین ماهی گورخری می‌تواند به‌عنوان یک شاخص برای ارزیابی اثرات استروژنیکی ترکیبات خاص استفاده شود. با توجه به این نتایج و مطالعات صورت گرفته مواجهه شدن ماهی گورخری‌ها با سم دیازینون باعث کاهش بیان ژن‌های مرتبط با رشد اووسیت و یتلوژنین گردید. در واقع، ماهی‌ها پس از قرار گرفتن در معرض یک آلاینده، بخش قابل توجهی از انرژی دریافتی از طریق غذا را صرف برقراری هوموستازی و حفظ تعادل فیزیولوژیکی خود در جهت مقابله با پیامدهای ناخواسته ورود سم به بدن خود می‌نمایند. از سویی دیگر کاهش اشتهای این ماهی‌ها و هم‌چنین ایجاد تغییر در توانایی یافتن و گرفتن غذا ناشی از تاثیر سم دیازینون بر حواس بویایی و چشایی و نیز بلوکه نمودن فعالیت استیل کولین استراز نیز موجب افزایش وخامت وضعیت فیزیولوژیکی این ماهی‌ها می‌شود. در نتیجه انرژی کم‌تری جهت رشد و تکامل غدد جنسی و هم‌چنین تولید سلول‌های جنسی اختصاص خواهد یافت و کاهش رشد غدد جنسی آن‌ها در تماس با سم دیازینون امری طبیعی خواهد بود.

منابع

۱. **جمشیدی، ش.؛ کلباسی، م.ر.؛ صادقی‌زاده، م. و یزدانی ساداتی، م.ع.، ۱۳۹۲.** تاثیر نونیل فنل بر تغییرات بیان ژن‌های ویتلوژنین و زوناپلوسیدا ۳،۱ در بافت‌های کبد، طحال، آبشش و عضله تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*). علوم و فنون شیلات. دوره ۲، شماره ۲، صفحات ۱ تا ۱۰.

۲. **Ankley, G.T.; Miller, D.H.; Jensen, K.M.; Villeneuve, D.L. and Martinovic, D., 2008.** Relationship of plasma sex steroid concentrations in female fathead minnows to reproductive success and population status. Aquatic toxicology. Vol. 88, No. 1, pp: 69-74.

۳. **Arnold, H.: Pluta H.J. and Braunbeck, T., 1996.** Sublethal Effects of Prolonged Exposure to Disulfoton in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): Cytological Alterations in the Liver by a Potent Acetylcholine Esterase Inhibitor. Ecotoxicology and Environmental Safety. Vol. 34, No. 1, pp: 43-55.

Axis & Reproduction of Zebrafish. Bulletin of environmental contamination and toxicology. Vol. 96, No. 3. pp: 341-346.

۲۰. **Lange, I.G.; Hartel, A. and Meyer, H.H., 2003.** Evolution of oestrogen functions in verte-brates. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology. Vol. 83. pp: 1-5.

۲۱. **Lee, J.; Park, N.Y.; Kho, Y. and Ji, K., 2018.** Effects of 4 Hydroxyphenyl 4-Isopropoxyphenylsulfone (BPSIP) Exposure on reproduction and endocrine system of Zebrafish. Environ science & technology. Vol. 52, No. 3, pp: 1506-1513.

۲۲. **Liley, N.R. and Stacey, N.E., 1983.** Hormones, pheromones, and reproductive behavior in fish. Fish Physiology. 9 p.

۲۳. **Livak, K.J. and Schmittgen, T.D., 2001.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $^{2}-\Delta\Delta Ct$ method. Methods. Vol. 25, No. 4, pp: 402-408.

۲۴. **Marin, M.G. and Matozzo, V., 2004.** Vitellogenin induction as a biomarkerof exposure to estrogenic compounds in aquatic environments. Marine Pollution Bulletin. Vol. 48, No. 9, pp: 835-539.

۲۵. **Mills, L. and Chichester, C., 2005.** Review of evidence: are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? Science of the Total Environment. Vol. 343. pp: 1-3.

۲۶. **Park, C.B.; Aoki, J.; Lee, J.S.; Nagae, M.; Lee, Y.D.; Sakakura, Y.; Hagiwara, A. and Soyano, K., 2010.** The effects of 17β-estradiol on various reproductive parameters in the hermaphrodite fish Kryptolebias marmoratus. Aquatic toxicology. Vol. 96, No. 4, pp: 273-279.

۲۷. **Pereira, R.; Pereira, M.L.; Ribeiro, R. and Goncalve, F., 2006.** Tissue and hair residues and histopathology in wild rats (*Rattus rattus*) and Algerian mice (*Mus spretus*) from and abandoned mine area (Southeast Portugal). Environmental Pollution. Vol. 139, No. 3, pp: 561-575.

۲۸. **Schelenk, D., 2006.** Mechanisms of sterioselective sulfoxidin and toxicity of organophosphate, fenthion, in three species. Marine Environment Research. 62 p.

۲۹. **Sofikitis, N.; Giotitsas, N.; Tsounapi, P.; Baltogiannis, D.; Giannakis, D. and Pardalidis, N., 2008.** Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. The J of steroid biochemistry and molecular biology. Vol. 109, pp: 3-5.

۳۰. **Solé, M.; Raldua, D.; Piferrer, F.; Barceló, D. and Porte, C., 2003.** Long-term exposure effects in vitellogenin, sex hormones, and biotransformation enzymes in female carp in relation to a sewage treatment works. Ecotoxicology and Environmental Safety. Vol. 56, No. 3, pp: 373-380.

۳۱. **Soto, A. M., Sonnenschein, C., Chung, K. L., Fernandez, M. F., Olea, N., Serrao, F. O. 1995.** The E- SREEN assay as a tool to identifyestrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. Environmental Health Persp. Vol. 103. No. 7. pp: 113-122.

۳۲. **Thomas, P.; Tubbs, C.; Berg, H. and Dressing, G., 2007.** Sex steroid hormone receptors in fish ovaries. The Fish Oocyte. Springer Netherlands.

۳۳. **Uchida, D.; Yamashita, M.; Kitano, T. and Iguchi, T., 2004.** An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex reversal. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. Vol. 137, No. 1, pp: 11-20.

۳۴. **Van Der Geest, H.G.; Stuijfzand, S.C.; Krak, M.H.S. and Admiral, W., 1997.** Impact of diazinon calamity in 1996 on the aquatic macroinvertebrates in the river Mesue. The Netherlands J of Aquatic Ecol. Vol. 30, No. 4, pp: 327-330.

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. Environmental toxicology and chemistry. Vol. 33, No. 6, pp: 1354-1362.

۳۶. **Yu, M.; Zhang, X.; Guo, L.; Tian, H.; Wang, W. and Ru, S., 2016.** Anti estrogenic effect of semicarbazide in female zebrafish and its potential mechanisms. Aquatic Toxicology. 170 p.

۴. **Bowman, C.J.; Kroll, K.J.; Gross, T.G. and Denslow, N.D., 2002.** Estradiol-induced geneexpression in largemouth bass (Micropterus salmoides). Mol. Cell. Endocrinol. Vol. 196. pp: 1-2.

۵. **Chang, J.; Liu, S.; Zhou, S.; Wang, M. and Zhu, G., 2013.** Effects of butachlor on reproduction and hormone levels in adult zebrafish (*Danio rerio*). Experimental and toxicologic pathology. Vol. 65, No. 1, pp: 1-2.

۶. **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 (*Danio rerio*) embryo-based vitellogenin 1 (vtg1) mRNA expression. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. 204 p.

۷. **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 Cd^{2+} & 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Chemosphere. 147 p.

۸. **Davis, L.K.; Pierce, A.L.; Hiramatsu, N.; Sullivan, C.V.; Hirano, T. and Grau, E.G., 2008.** Gender-specific expression of multiple estrogen receptors, growth hormonereceptors, insulin-like growth factors and vitellogenins, and effects of 17 beta-estradiol in the male tilapia (*Oreochromis mossambicus*). General and comparative endocrinology. Vol. 156, No. 3, pp: 544-551.

۹. **Devlin, R.H. and Nagahama, Y., 2002.** Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. Aquaculture. Vol. 208, pp: 3-4.

۱۰. **Dong, M.; Zhu, L.; Shao, B.; Zhu, S.; Wang, J.; Xie, H. and Wang, F., 2013.** The effects of endosulfan on cytochrome P450 enzymes and glutathione S-transferases in zebrafish (*Danio rerio*) livers. Ecotoxicology and Environmental Safety. Vol. 92. pp: 1-9.

۱۱. **Henry, T.B.; McPherson, J.T.; Rogers, E.D.; Heah, T.P.; Hawkins, S.A.; Layton, A.C. and Sayler, G.S., 2009.** Changes in the relative expression pattern of multiple vitellogenin genes in adult male and larval zebrafish exposed to exogenous estrogens. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. Vol. 154, No. 1, pp: 119-126.

۱۲. **Hilscherova, K.; Jones, P.D.; Gracia, T.; Newsted, J.L.; Zhang, X.; Sanderson, J.T.; Yu, R.M.; Wu, R.S. and Giesy, J.P., 2004.** Assessment of the effects of chemicals on the expression of ten steroidogenic genes in the H295R cell line using real-time PCR. Toxicological Sciences. Vol. 81, No. 1, pp: 78-89.

۱۳. **Hong, Y.; Yu, B.; Sherman, M.; Yuan, Y.C.; Zhou, D. and Chen, S., 2007.** Molecular Basis for the Aromatization Reaction and Exemestane-Mediated Irreversible Inhibition of Human Aromatase. Molecular Endocrinology. Vol. 21, No. 2. pp: 401-414.

۱۴. **Hou, J.; Li, L.; Wu, N.; Su, Y.; Lin, W.; Li, G. and Gu, Z., 2015.** Reproduction impairment and endocrine disruption in female zebrafish after long-term exposure to MC-LR: a life cycle assessment. Environmental Pollution. 208 p.

۱۵. **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. Aquatic Toxicology. Vol. 36. No. 53. pp: 111-127.

۱۶. **Kobayashi, K.; Tamotsu, S.; Yasuda, K. and Oishi, T., 2005.** Vitellogenin immune histochemistry in the exposed to17b-estradiol&p-nonylphenol liver the testis of the medaka Oryzias latipes. Zool. Sci. Vol. 22, No. 4, pp: 453-461.

۱۷. **Korkmaz, C. and Dönmez, A.E., 2017.** Effects of Diazinon on 17β-estradiol, Plasma Vitellogenin and Liver and Gonad Tissues of Common Carp (*Cyprinus carpio*). Turkish J of Fisheries and Aquatic Sciences. Vol. 17, No. 3, pp: 629-640.

۱۸. **Kuivila, K.M. and Foe, C.G., 1995.** Concentrations, transport and biological effects of dormant spray pesticides in the San Francisco Estuary California. Environmental Toxicology and Chemistry. Vol. 14. No. 7. pp: 1141-1150.

۱۹. **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