



## بررسی اثر غلظت‌های متفاوت کلرید سرب بر بیان ژن‌های مؤثر

### در فاکتورهای ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

بهناز جعفری<sup>۱</sup>، امیررضا عابد علم دوست<sup>۲\*</sup>، حمید فرحمنند<sup>۳</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۲. استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۳. استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۱۷

دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۲۵

#### چکیده

سرب یکی از فلزات سنگین با اثر سمی است که در آب‌های داخلی و مخازن پرورشی یافت می‌شود و می‌تواند باعث ایجاد عفونت و بیماری‌هایی در آبزیان و انسان گردد. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر فلز سرب در بچه ماهی نوس قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و اثر آن بر بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی (MHC I، IL-6، TNF $\alpha$ ) و ژن پروتئین شوک حرارتی (HSP70) است. پس از تکثیر و پرورش ماهیان در آب فاقد سرب، بچه ماهی‌های نوس نیم گرمی در سه تیمار مختلف سرب کلرید (PbCl<sub>2</sub>) با غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵ و ۱ میکرومول بر لیتر و گروه شاهد در سه تکرار (۳۵ قطعه بچه ماهی در هر تکرار) به مدت ۹۶ ساعت در معرض قرار گرفتند. سپس نمونه‌های تصادفی در ازت مایع منجمد شد و برای آزمایش بیان ژن استفاده شدند. آزمایش بیان ژن با روش Real-time PCR و با آغازگر اختصاصی انجام شد. نتایج تحلیل داده‌ها و منحنی‌های تکثیر و ذوب نشان داد که ژن پروتئین شوک حرارتی HSP70 در دو غلظت ۰/۲۵ و یک میکرومول بر لیتر، تغییرات معنی‌داری دارد ( $P < 0/05$ ) و منحنی U شکل برعکس نشان داد که احتمالاً این امر به دلیل اثر هورموزیس سرب است. بیان ژن‌های اینترلوکین شش و MHC I در تیمار با غلظت ۱ افزایش معنی‌دار داشت ( $P < 0/05$ )، همچنین ژن TNF $\alpha$  نیز بر خلاف HSP70 افزایش داشت که نشان‌دهنده منحنی U شکل و احتمالاً اثر هورموزیس عادی است. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که سرب حتی در غلظت‌های در حدود آب آشامیدنی می‌تواند باعث تغییر بیان ژن‌های ناشی از تنش و شاخص‌های مرتبط با ایمنی گردد و اثرات آن صرفاً به مسمومیت ختم نخواهد شد.

واژگان کلیدی: قزل‌آلای رنگین‌کمان، سرب، بیان ژن، اثر هورموزیس، شاخص‌های ایمنی.



## Investigating the effect of different concentrations of lead chloride on the expression of genes effective in the immune factors of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Behnaz Jafari<sup>1</sup>, Amir Reza Abed Elmdoust<sup>2\*</sup>, Hamid Farahmand<sup>3</sup>

1. MSc. student, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

2. Assistant Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

3. Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

Received: 16-Jul-2023

Accepted: 07-Jan-2024

### Abstract

Lead is one of the heavy metals with a toxic effect found in inland waters and breeding tanks and can cause infections and diseases in aquatic animals and humans. The purpose of this study is to investigate the effect of lead metal in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and its effect on the expression of immune-related genes (MHC I, IL-6, TNF $\alpha$ ) and heat shock protein gene (HSP70). After reproduction and rearing of fishes in lead-free water, the fry (0.5 gr) was allocated to three different treatments of lead chloride (PbCl<sub>2</sub>) with concentrations (0.25, 0.5, and 1) micromole/liter and a control group in three replicates (35 fry per replicate) for 96 hours. Then random samples were frozen in liquid nitrogen and used for gene expression testing by Real-time PCR. The results revealed that the HSP70 heat shock protein gene had significant changes ( $P < 0.05$ ) in two concentrations of 0.25 and 1 micromole/liter and the reverse U-shaped curve showed that this is probably due to the effect of lead hormesis. The expression of interleukin 6 and MHC I genes had a significant increase ( $P < 0.05$ ) in concentration, and the TNF- $\alpha$  gene also increased, unlike HSP70, which indicated a U-shaped curve and probably the effect of normal hormesis. The results of this study showed that lead, even in concentrations close to drinking water, can change the expression of genes caused by stress and factors related to immunity, and its effects do not end only with poisoning.

**Keywords:** Rainbow trout, Lead, Gene expression, Hormosis effect, Immune factors

## ۱. مقدمه

سرب به‌عنوان یک فلز طبیعی توسط مسیرهای مختلفی وارد محیط‌های آبی می‌شود. پوسته زمین، پدیده‌های آب و هوایی و زمین‌شناسی و فعالیت‌های آتشفشانی از جمله منابع طبیعی به‌شمار می‌آیند، اما بیشتر سرب موجود از طریق فعالیت‌های انسانی مانند معدن، سوختن زغال سنگ، تولید سیمان و استفاده در بنزین و باتری و رنگ‌ها باعث آلودگی‌های منابع آبی می‌شوند (Nguyen *et al.*, 2021).

یکی از دلایل اصلی مسمومیت در ماهیان سرب است و از آنجا که دفع کمی دارد در بدن انباشت می‌شود و یکی از خطرناک‌ترین آلاینده‌ها به‌شمار می‌آید (Lee *et al.*, 2019). سرب می‌تواند به‌طور مستقیم از آب از طریق آبشش‌ها، رژیم غذایی و به مقدار کمتر از طریق پوست توسط آبزیان جذب شود. در شرایط عادی، سرب ناشی از آب در محدوده ۰/۰۰۰۶ تا ۰/۱۲ میلی‌گرم در لیتر در آب‌ها وجود دارد (Huseen and Mohammed, 2019).

با توجه به احتمال بالای آلودگی‌های محیطی و اثرات آن بر آب‌های داخلی کشور، احتمال مسموم شدن آبزیان در سایت‌های پرورشی و همچنین منابع آزاد و طبیعی وجود دارد. سرب می‌تواند آثار زیادی بر سیستم ایمنی ماهیان گذاشته و همچنین باعث افزایش تنش در آن‌ها شود و با توجه به پرورش گسترده قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در آب‌های داخلی و اهمیت تجاری این ماهی، بررسی پاسخ‌های ایمنی و تنش محیطی در آن دارای اهمیت زیادی است.

پروتئین‌های شوک حرارتی (HSP)، خانواده‌ای از پروتئین‌ها هستند که در پاسخ به طیف گسترده‌ای از عوامل تنش‌زای زنده و غیر زنده بیان می‌شوند که به آن‌ها پروتئین تنش نیز می‌گویند. میزان بالای آن‌ها در توالی‌های اسیدآمین و این حقیقت که پاسخ‌های تنش سلولی تقریباً در تمام جانداران توصیف شده است این پروتئین‌ها را

منحصر به‌فرد می‌سازد (Moniruzzaman *et al.*, 2020).

قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌طور کلی به یکی از گونه‌های حساس آب شیرین به فلزات شناخته شده است، به‌همین دلیل، اغلب آزمایش‌های سم‌شناسی روی این ماهی انجام می‌شود (Braunbeck *et al.*, 1992). بسیاری از مطالعات سمیت حاد را برای اندازه‌های مختلف ماهی و سختی‌های مختلف بررسی کرده‌اند. در محیط‌های آلوده به سرب احتمال قرار گرفتن همزمان در معرض سرب از طریق آب و غذا وجود دارد. در مطالعه‌ای اثر فلز سرب در دو حالت جذب مستقیم از آب و وارد شدن در جیره غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان به مدت هفت هفته بررسی شد. حداکثر غلظت مورد آزمایش از میزان LC20 طی ۹۶ ساعت گرفته شد و کمترین غلظت مورد آزمایش را در محیط‌های آلوده اندازه‌گیری کردند و برای جذب سرب از طریق غذا از کرم‌های الیگوکت استفاده کردند که تحت اثر همان مقدار سرب قرار گرفتند. نتایج این آزمایش برای اولین بار نشان داد که تجمع بالای سرب در غذا در واقع ماهی را از اثرات سرب در آب محافظت می‌کند (Ghosh *et al.*, 2021).

برای کاهش سمیت سرب، جانداران آبی، یک گروه از پروتئین‌ها به نام پروتئین شوک حرارتی را سنتز می‌کنند. بنابراین بیان این ژن مکانیسم مهمی است که به آبزیان کمک می‌کند تا با شرایط نامطلوب محیطی مانند سمیت فلزها کنار بیایند. سطح این ژن همچنین به‌عنوان یک نشانگر زیستی برای الودگی‌های آب مورد استفاده قرار می‌گیرد، بیان این ژن همچنین یک هشدار اولیه برای کاهش کیفیت آب مانند افزایش سطح اکسیژن محلول محسوب می‌شود (Zhao *et al.*, 2020).

MHC<sup>۱</sup> در بیشتر مهره‌داران، شامل پستانداران، پرندگان، خزندگان و ماهیان یافت می‌شود. ژن‌های MHC در یک منطقه از کروموزوم به نام "بازوی کوتاه" کروموزوم ۶ در انسان‌ها (و در مکانی مشابه در گونه‌های دیگر مهره‌داران) قرار دارند. ژن‌های MHC پروتئین‌هایی را در سطح سلولی کدگذاری می‌کنند که آنتی‌ژن سلول‌های T

<sup>۱</sup> Major Histocompatibility Complex

ماهیان شاهد بود (Qian *et al.*, 2020).

اینترلوکین شش (IL-6) یک سیتوکین چند منظوره است که توسط طیف گسترده‌ای از انواع سلول‌ها در مراحل اولیه عفونت تولید می‌شود، همچنین مجموعه‌ای از عملکردهای سیستم ایمنی را از طریق گیرنده‌ای متشکل از زنجیره محدود گیرنده (IL-6R) و یک مبدل سیگنال مشترک را تعدیل می‌کند، IL6 اگرچه در ابتدا به‌عنوان یک عامل تمایز سلول B توصیف شده بود، مشخص شد که IL6 تولید سلول‌های ترشح کننده آنتی‌بادی اختصاصی را افزایش می‌دهند، اما در برابر آنتی‌بادی‌های غیر اختصاصی پاسخی ندارند (Abós *et al.*, 2016). در مطالعه‌ای روی کپور معمولی گزارش شد که میزان IL-6 در معرض دوزهای مختلف سرب به‌شدت افزایش داشته است (Jing *et al.*, 2020).

فاکتور نکروز تومور (TNF) در بسیاری از پاسخ‌های ایمنولوژیک و التهابی در شرایط طبیعی یا آسیب‌شناختی نقش مهمی دارند. TNF- $\alpha$  یک واسطه کلیدی در تنظیم پاسخ التهابی است. پیش‌تر دو ژن TNF از قزل‌آلای رنگین‌کمان کلون شده و توالی آن‌ها مشخص شده است. TNF عمدتاً توسط مونوسیت‌ها، ماکروفاژهای فعال تولید می‌شود و انواع عملکردهای ایمنولوژیک را که بر التهاب و پاسخ‌های ایمنی تأثیر دارد، تنظیم می‌کند. همچنین نکروز خونریزی‌دهنده را ایجاد می‌کند، فاگوسیتوز نوتروفیل و سمیت سلولی را تقویت می‌کند، بیان بسیاری از سیتوکین‌ها از جمله اینترلوکین یک و شش را تعدیل می‌کند (Kubysheva *et al.*, 2020). مشخص شده که فلز سرب برای دهه‌ها پتانسیل آسیب و مرگ و میر در حیوانات را توسط لیپوپولی ساکارید با ترشح یا جذب فاکتور تومور نکروز TNF- $\alpha$  دارد. نمک PbCl<sub>2</sub> می‌تواند ترشح TNF- $\alpha$  را از طریق لیپوپولی ساکارید سلول‌های خون انسان افزایش دهد. همچنین مقدار بیان این ژن در انسان و سایر حیوانات و همچنین گیرنده TNF- $\alpha$  را افزایش می‌دهد (Das *et al.*, 2022). در مطالعه‌ای در خامه ماهی نیز در

هستند و نقش حیاتی در سیستم ایمنی دارند. مولکول‌های MHC روی سطح انواع مختلف سلول، از جمله سلول‌های ایمنی مانند سلول‌های T، B و سلول‌های پردازشگر آنتی‌ژن مانند ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک بیان می‌شوند. مهم‌ترین ویژگی این ترکیبات چند شکلی گسترده ژنتیکی در کلاس I و II و همچنین محصولات کدگذاری شده آن‌هاست. از cDNA یا کلون‌های ژنومی انسان، موش و سایر جانداران تصاویری از اشکال آلی و ایزوتایپ‌های این گروه آنتی‌ژن متنوع ارائه شده است (Yoshida, 2014). در تمام رده‌بندی مهره‌داران آرواره‌دار این ژن‌ها گسترش یافته و به دو گروه I و II تقسیم می‌شوند. مولکول‌های کلاس یک (I) به‌طور عمده آنتی‌ژن‌های درونی را به گیرنده‌های سلول T نشان می‌دهند و کلاس دو (II) برای نشان دادن آنتی‌ژن بیرونی به سلول‌های T کمک‌کننده مهم هستند. مولکول‌های کلاس I به‌طور کلی توسط اکثر انواع سلول‌ها از جمله در ماهیان بیان می‌شوند (Xu *et al.*, 2023).

علی‌رغم تعداد بالای توالی MHC کلاس I برای ماهیان استخوانی، تفسیر داده‌ها به‌دلیل چند شکلی آلی محدود شده بود، محققان یک مکان واحد آلی و چند شکلی منحصر به‌فرد را برای آن تعریف کردند و به این نتیجه رسیدند که تمام توالی‌های MHC کلاس I از همان مکان واحد یعنی Onmy-UBA به‌دست می‌آید. بنابراین توالی cDNA مربوط به MHC با اینکه شامل توالی‌های بسیار متفاوتی است، منحصر به یک بیان یک لوکوس از کلاس I هستند. در قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان داده شد که رونوشت‌های MHC کلاس I، یک هفته بعد از لقاح قابل شناسایی است (Fischer *et al.*, 2005). مطالعاتی که اثر اختصاصی سرب را روی شاخص MHC سنجیده باشند بسیار کم هستند. به‌عنوان مثال در مطالعه‌ای روی خامه ماهی که از مناطق آلوده به سرب در جزیره کاتوپالی<sup>۱</sup> صید شده بودند، غلظت این آلاینده در بافت‌های ماهی سنجیده شد و سطوح MHC در ماهیان آلوده‌تر حدود چهار برابر

<sup>۱</sup> Kattupalli

بر لیتر و pH برابر ۷/۵ با اضافه کردن ترکیبات تنظیم شد. سپس نمک کلرید سرب با غلظت‌های ۰، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر با ثابت حلالیت  $1/7 \times 10^{-5}$  (K<sub>SP</sub>) به آب اضافه شد. برای تعیین غلظت‌های تیمارها از مقادیر پایین تر از حداکثر مجاز در آب شرب استفاده شد که از حساسیت روش تغییر بیان ژنی برای بررسی مقادیر اندک روی سلامت ماهی بهره‌برداری شود (Mansouri et al, 2015). بنابراین در این مطالعه غلظت صفر به‌عنوان تیمار شاهد و سه تیمار دیگر به ترتیب ۰/۲۵ و ۰/۵ و ۱،۰ میکرو مول بر لیتر در نظر گرفته شد که بعد از تبدیل در ۲۰ لیتر به‌صورت زیر دسته‌بندی شدند:

۱- تیمار کنترل بدون غلظت سرب

۲- تیمار کمتر از حد آستانه LC50 با غلظت

۰/۰۱۳۹۰۵ گرم نمک سرب کلرید در ۲۰ لیتر آب

۳- تیمار برابر با حد آستانه LC50 با غلظت

۰/۰۲۷۸۱ گرم نمک سرب کلرید در ۲۰ لیتر آب

۴- تیمار بیشتر از حد آستانه LC50 با غلظت

۰/۰۵۵۶۲ گرم نمک سرب کلرید در ۲۰ لیتر آب

هر تیمار دارای سه تکرار بود و مدت زمان آزمایش ۹۶ ساعت در نظر گرفته شد. در طول مدت آزمایش تبخیر ناچیز و به دلیل عدم تعویض آب غلظت ثابت ماند. در طول مدت چهار روزه آزمایش، ماهیان دو بار با غذای آغازین سه صفر شرکت بیضا تا حد سیری غذایی و بعد از چهار روز و بدون تلفات برای نمونه‌گیری آماده شدند.

### ۳.۲. نمونه‌گیری

پس از گذشت ۹۶ ساعت برای نمونه‌گیری، ۱۲ ماهی به‌صورت تصادفی از هر مخزن صید شد و داخل فالکن قرار داده شدند، سپس نمونه‌ها به مدت یک دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و پس از بیهوشی نسبی، ماهیان بلافاصله داخل ازت مایع قرار شدند و سپس به یخچال ۸۰- درجه سانتی‌گراد در آزمایشگاه بیان ژن انتقال داده شدند. به دلیل کوچک بودن ماهیان از کل بدن به‌منظور استخراج RNA استفاده شد و بافت خاصی جداسازی نگردید.

مواجهه با سرب میزان سطوح TNF- $\alpha$  به‌صورت معنی‌داری افزایش نشان داد (Paul et al., 2014).

با توجه به موارد فوق و اهمیت فلز سرب در آبزیان، در این مطالعه اثر فلز سرب در بچه ماهی نورس قزل‌آلای رنگین‌کمان و اثر آن بر بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی (TNF $\alpha$ ، IL-6، MHC I) و ژن پروتئین شوک حرارتی (HSP70) بررسی شد تا رفتار و آثار این آلاینده فلزی با دقت بیشتری بر این ماهی که یکی از تجاری‌ترین و پر مصرف‌ترین ماهی‌ها در سطح کشور و جهان است، مشخص شود.

## ۲. مواد و روش‌ها

### ۱.۲. آماده‌سازی آزمایش

در این آزمایش، در یک طرح کاملاً تصادفی، سه غلظت مختلف سرب در مقایسه با تیمار شاهد با غلظت سرب صفر و در مجموع شامل چهار تیمار در محل آزمایشگاه بهداشت و بیماری‌های آبزیان گروه شیلات دانشگاه تهران در سه تکرار انجام شد. بدین‌منظور تعداد ۱۲ مخزن با حجم مشخص ۲۰ لیتر در نظر گرفته شد که هر کدام جداگانه در دمای ۱۳ درجه سانتی‌گراد هوادهی شدند، ۲۴ ساعت بعد از هوادهی به هر مخزن تعداد ۳۵ عدد بچه ماهی نورس ۰/۵ گرمی، که از مرکز تجاری ماهی‌سرای کرج تهیه شده بودند، معرفی و برای آزمایش آماده شدند.

### ۲.۲. تیمار آب و افزودن سرب

در مطالعه حاضر به‌منظور اطمینان از عدم وجود سرب در منبع اصلی آب برای تیمار شاهد (سرب صفر) و همچنین ساخت آب با مقادیر ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میکرو مول بر لیتر سرب، ابتدا آب با دستگاه فیلتراسیون با تکنولوژی اسمز معکوس (Aqua 56R9) تیمار شد و پس از سنجش شاخص‌های شیمیایی آب تصفیه شده و تأیید سرب صفر و اندازه‌گیری سایر شاخص‌های آب با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (PG Instruments model T9, England) ، شاخص‌های سختی (CaCO<sub>3</sub>)، قلیائیت (NaHCO<sub>3</sub>) و (KHCO<sub>3</sub>) جهت ایجاد آب با سختی و قلیائیت ۱۰۰ میلی‌گرم

## ۴.۲. استخراج RNA

برای استخراج RNA در شرایط استریل از کیت استخراج RNA محصول شرکت کیازن و براساس دستور العمل شرکت سازنده استفاده شد. سپس غلظت نمونه‌ها توسط دستگاه نانودراپ شرکت ترمو مدل ۲۰۰۰ اندازه‌گیری شد.

## ۵.۲. سنتز cDNA

برای تبدیل mRNA به DNA از روش مبتنی بر آغازگر dT استفاده شد. بدین‌صورت که مقدار یک میکروگرم از RNA به‌همراه ۰/۵ میکروگرم آغازگر dT و همچنین ۱۰

میکروگرم از مخلوط کیت rt به محلول اضافه گردید. در ادامه رونویسی در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۹۰ دقیقه انجام شد. خلاصه مراحل سنتز cDNA در جدول ۱ ارائه شده است.

## ۶.۲. طراحی آغازگر

آغازگرها با نرم‌افزار primer3 طراحی شدند و بهترین دمای ذوب آن‌ها را با انجام PCR تست تعیین شد (جدول ۲). قبل از انجام real time PCR باید آغازگرها را طبق پروتوکل شرکت سازنده با آب مقطر استریل رقیق کرده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد.

جدول ۱. ساخت cDNAها با استفاده از آغازگرهای تصادفی و Oligod T

نام ماده شیمیایی	مقدار	عملیات
RNA کل	۱ میکروگرم	
آغازگرهای تصادفی	-	
OligodT	۰/۵ میکرولیتر	
آب DEPC	تا حجم ۱۰ میکرولیتر	انکوبه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه
RT mix 2X	۱۰ میکرولیتر	انکوبه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۹۰ دقیقه

جدول ۲. نام و توالی آغازگرهای استفاده شده در این آزمایش

نام آغازگر	توالی (۳-۵)	دمای ذوب	اندازه محصول
MHC-UBA-F	CCCCTCCTCTCCAGTGACC	۶۱	۱۷۶
MHC-UBA-R	TCCACTCCTCAGGCGTCACT	۶۲	
HSP70-F	CGAGGATGGGATCTTTGAGGTG	۵۹/۵	۱۵۰
HSP70-R	TCTGGCTGATGCCTTCTGTG	۵۹/۴	
TNFa-F	TACTCAACTCTGTACGCACCG	۶۱	۱۴۶
TNFa-R	AAGCCTGTTCTCTGTGACTGTC	۶۱	
IL-6-F	CCAACAAGGAGGCATGTCTG	۵۹	۱۱۴
IL-6-R	GTGTGACAGAGGGGAGTAGGGT	۶۰	
GAPDH-F	GAGGGTCTGATGAGCACAGTTC	۵۹/۶	۱۵۰
GAPDH-R	GATGACCTTGCCGACAGCC	۶۰/۴	

لیتر آغازگر و یک میکرولیتر cDNA ژن مورد نظر بود.

این عملیات در دستگاه (Step one- USA) Real time

نمونه‌ها در Real time PCR با حجم نهایی ۱۰

میکرولیتر و شامل پنج میکرولیتر سایبر گرین، ۰/۲۵ میکرو

PCR و در ست کرال مستقل با برنامه‌دمایی مشخص و تکرار تکنیکی انجام شد (جدول ۳).

جدول ۳. عملیات بهینه Real time PCR در ۴۰ سیکل

مقدار (میکرولیتر)	غلظت نهایی	غلظت اولیه	ماده شیمیایی
۱	۱۰ نانوگرم / میکرولیتر	۱۰۰ نانوگرم / میکرولیتر	cDNA
۵	۱X	۲X	SYBR green mix
۰/۲۵	۰/۲۵	۱۰ میکرو مولار	Primer F
۰/۲۵	۰/۲۵	۱۰ میکرومولار	Primer R
۳/۵	-	-	آب دو بار تقطیر

با مقایسه میانگین‌ها و آزمون‌های معنی‌داری یک‌طرفه بررسی ( $P < 0/5$ ) و مورد تحلیل قرار گرفت.

در شکل ۲، نمودار چند برابر شدن ژن HSP70 ترسیم شده است. نتایج حاصل از غلظت‌های متفاوت سرب (کنترل، ۰/۲۵ و ۰/۵ و یک میکرو مول بر لیتر) روی بچه ماهی نارس قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمار ۹۶ ساعته بر بیان ژن HSP 70 نشان داده شده است. این نتایج حاکی از آن است که بین تیمار ۰/۲۵ و تیمار یک میکرومول تفاوت معنی‌دار وجود دارد ( $P < 0/5$ )، اما بین تیمار ۰/۲۵ و ۰/۵ و کنترل تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (نمودارهای شکل ۲).

نتایج حاصل از غلظت‌های متفاوت سرب (کنترل، ۰/۲۵ و ۰/۵ و یک) بر روی بیان ژن‌های IL-6 و MCH-I در بچه ماهی نارس قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمار ۹۶ ساعته حاکی از آن است که بین تیمار یک میکرو مول بر لیتر با بقیه غلظت‌ها اختلاف معنی‌دار وجود داشته است ( $P < 0/5$ ) اما در سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۲).

نتایج حاصل از غلظت‌های متفاوت سرب (کنترل، ۰/۲۵ و ۰/۵ و یک) روی بچه ماهی نارس قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمار ۹۶ ساعته بر بیان ژن TNF- $\alpha$  نشان می‌دهد که بیان آن در غلظت یک میکرو مول بر لیتر تنظیم مثبت داشته است. بدین‌صورت که بین تیمار یک میلی‌گرم بر لیتر با بقیه غلظت‌ها اختلاف معنی‌دار وجود دارد، در صورتی که بین تیمار ۰/۵ میکرو مول بر لیتر و گروه شاهد

نتایج به‌دست آمده با فاکتور متغیر  $C_t$  (سیکل آستانه) و با دستورالعمل چند برابر شدن نسبت به نمونه کنترل محاسبه شد. محاسبات با فرمول  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  و نسبت به نمونه‌های کنترل انجام شد (Livak et al., 2001).

## ۷.۲. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

برای بررسی نتایج Real time PCR از روش میزان تغییرات ژن در یک نمونه نسبت به نمونه Z دیگر (Fold change) استفاده شد و نتایج آن با روش تجزیه واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) ارزیابی شد و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن صورت پذیرفت. تحلیل‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد و با نرم‌افزار IBM SPSS Statistics 27.0.1 انجام شد. نتایج به‌دست آمده با ترسیم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل نسخه ۲۰۰۷ انجام شد.

## ۳. نتایج

واکنش‌های زنجیره ای پلیمرز روی پیکره همه بچه ماهی نارس ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌منظور بررسی چهار ژن TNF- $\alpha$ ، MHC I، HSP70 و IL6 در برابر تیمارهای سرب به‌صورت جداگانه انجام شد. و نمونه‌های منحنی ذوب و تکثیر و نقاط پیک و شکست آن‌ها نیز برای هر ژن ترسیم شد (شکل ۱). همچنین بررسی بیان ژن‌ها به‌صورت مقایسه ای با تیمار شاهد انجام گرفت و نتایج آن

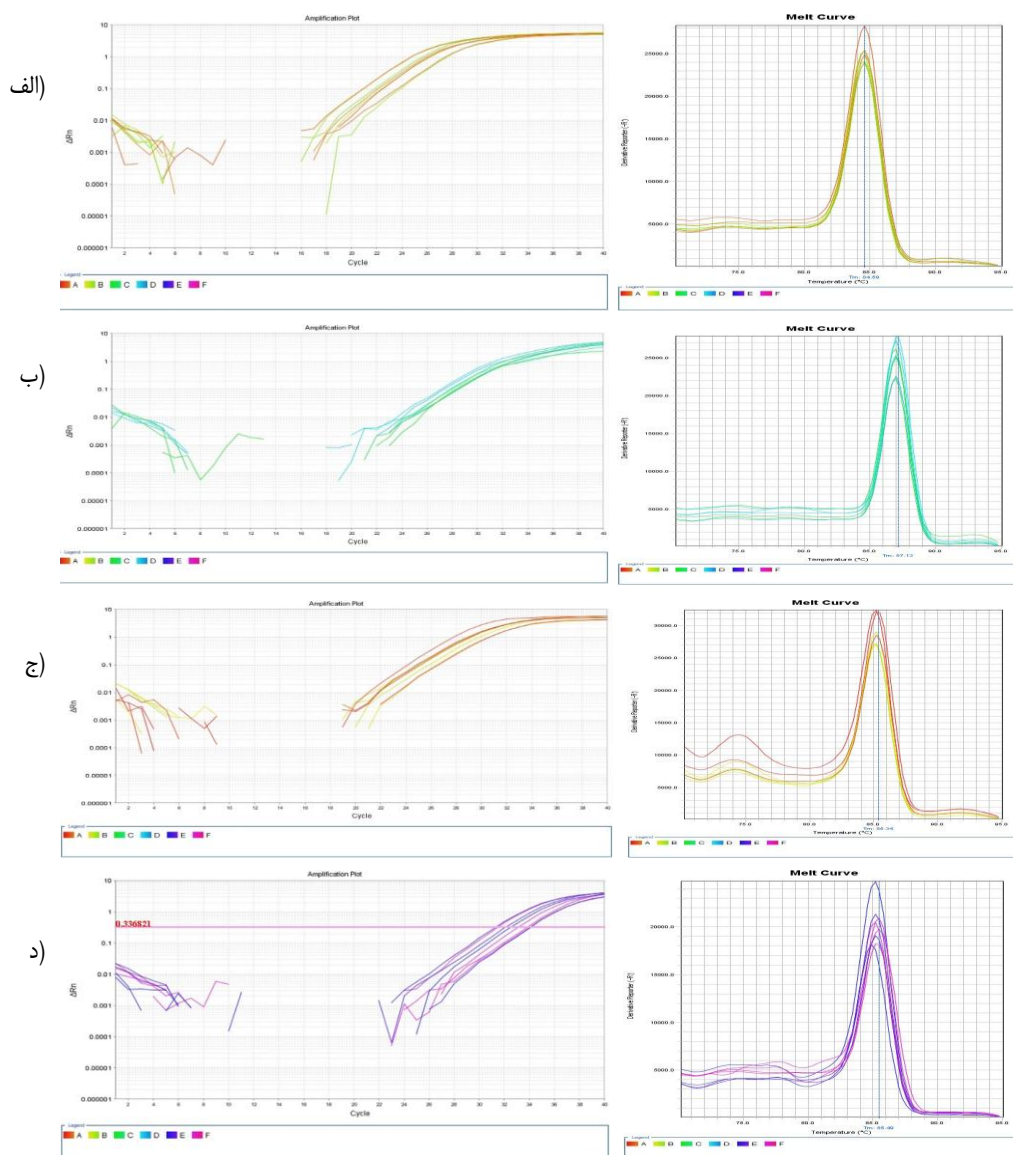
است در دوره‌های زمانی بیشتری که در داخل آب می‌مانند سمی شوند (Abedi et al., 2012).

نظریه آرنندت-شولتز یا قانون هورمسیس، اصلی زیست‌شناختی است که بیانگر آن است که غلظت‌های پایین از یک عامل تنش، اثرات مفید یا تحریک‌کننده‌ای دارد، در حالی که غلظت‌های بالا به اثرات سمی یا مهارکننده می‌انجامد. این قانون نشان می‌دهد که واکنش یک سیستم زیستی به یک محرک به شدت وابسته به غلظت آن محرک است و این رابطه خطی نیست، بنابراین دو مدل منحنی U و  $\beta$  برای آن تعریف شده است.

تفاوتی وجود ندارد ( $P > 0.05$ ). تیمار ۰/۲۵ با تمامی تیمارها تفاوت معنی‌داری از خود نشان داد (شکل ۲).

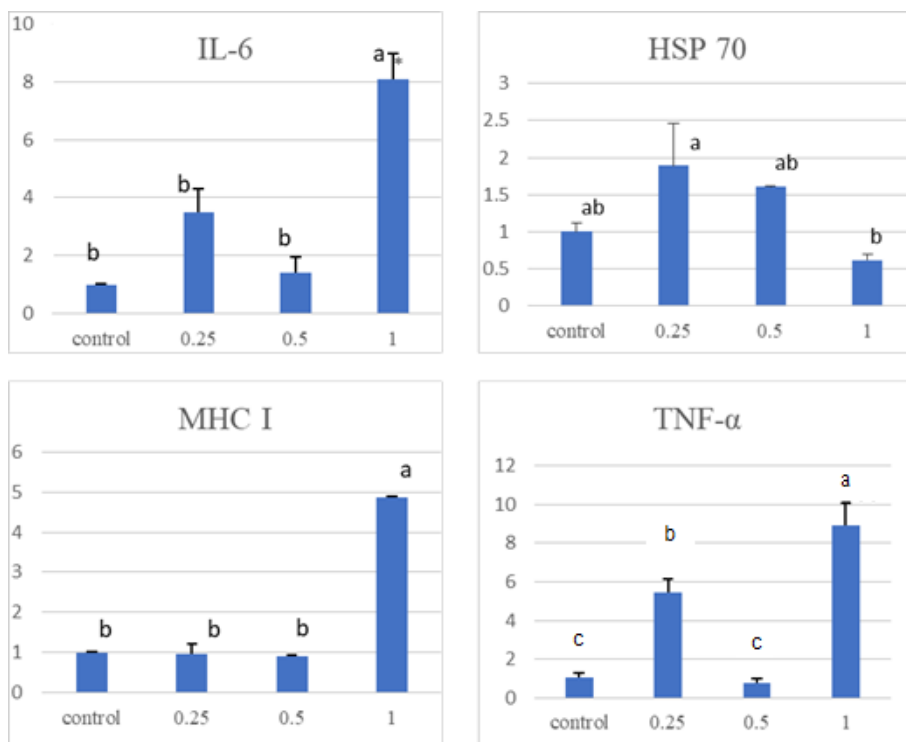
#### ۴. بحث و نتیجه‌گیری نهایی

در پژوهش انجام شده، غلظت‌های مختلف سرب کلرید به مدت ۹۶ ساعت بر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بررسی شد. البته لازم به ذکر است که علی‌رغم اینکه مقدار  $LC_{50}$  معیار مفیدی برای سمیت حاد است، لیکن بیانگر مقادیری که در زیستگاه‌های آبی بی‌خطر یا کم‌خطر هستند، نیست. مقدار مواد زائدی که تا ۹۶ ساعت سمی نیستند، ممکن



شکل ۱. منحنی‌های تکثیر ژن (سمت چپ) و تفکیک ذوب (سمت راست) ژن‌های HSP 70 (الف)، IL-6 (ب)، MCH I (ج) و TNF- $\alpha$  (د)





شکل ۲. نمودارهای بیان نسبی (RE) ژن‌های IL-6, HSP 70, MHC I و TNF-α (محور عمودی) در غلظت‌های مختلف سرب بر حسب میکرومول در لیتر (محور افقی). تفاوت معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) در هر تیمار با حروف انگلیسی متفاوت در بالای هر ستون نمایش داده شده است.

(Karatsoreos *et al.*, 2013). در رابطه با نتایج به دست آمده در این مطالعه و براساس تحلیل منحنی‌های هورموسیسی می‌توان این‌گونه استنتاج کرد که در دوزهای پایین و به زیاد کلرید سرب ژن‌های TNF-α و IL-6 بیشترین پاسخ ایمنی را ایجاد می‌کنند حال آنکه در دوزهای میانی بیشتر ژن HSP 70 این وظیفه را به عهده می‌گیرد.

بررسی‌ها روی اثر سرب خاک بر ریشه نهال گیاه باقلا و رشد آن نشان داد که HSP70 ممکن است در ترمیم پروتئین آسیب‌دیده و یا دفع پروتئین‌های دنا توره نقش داشته باشد و رفتار بیان این پروتئین یک نمودار U شکل در پاسخ به غلظت‌های مختلف سرب نمایش داده است که این رفتار در غلظت‌های پایین حاکی از آن است که احتمالاً اثر هورموسیسی در خاک حاوی سرب وجود دارد که هم‌راستا با یافته‌های ما در این مطالعه است (Wang *et al.*, 2010). در مطالعه دیگری هرچند که روند هورموسیسی مورد بررسی قرار نگرفت اما نشان داده شد که HSP70 یک نشانگر

در نمودار U شکل دوز پایین از یک عامل تنش می‌تواند اثر مفید یا تحریک‌کننده‌ای داشته باشد، پاسخ بیشینه در دوز میانی رخ می‌دهد و دوز بالایی به اثرات سمی یا مهارکننده می‌انجامد (Mattson, 2008). منحنی هورموسیسی U شکل بسته به پاسخی که اندازه‌گیری می‌شود و محدوده دوز مورد بررسی می‌تواند شکل "U" یا "U" معکوس به خود بگیرد در مطالعه حاضر نمودار بیان ژن TNF-α، IL-6 به شکل U و بیان ژن HSP 70 به شکل U برعکس است. در نمودار β یا J دوز پایین از یک عامل تنش می‌تواند اثرات مفید یا تحریک‌کننده‌ای داشته باشد، پاسخ در دوز میانی ثابت می‌شود و دوز بالایی به اثرات سمی یا مهارکننده می‌انجامد. این نمودار کمتر مشاهده می‌شود و در موارد خاص مشاهده شده است (Holladay *et al.*, 2005). دلیل این امر می‌تواند این باشد که موجودات با مجموعه‌ای از ژن‌ها با رفتار متفاوت، خود را برای سناریوهای مختلفی که ممکن است به‌عنوان عامل خطر زیستی روند حیات آن‌ها را تهدید کنند، مواجه شوند

وابسته به دوز است. افزایش غلظت سرب در دوز بالاتر احتمالاً منجر به التهاب سیستمیک میزبان شد که با افزایش تنفس و تحریک مونوسیت‌ها و ماکروفاژها منجر به تولید سیتوکین پیش التهابی مانند  $TNF-\alpha$  خواهد شد (Giri et al., 2021).

در بررسی انجام شده روی بیان ترکیبات فعال زیستی MHC، نشان داده شد که تنها غلظت بالای سرب توانست باعث ایجاد اختلاف معنی‌دار و بیان این ژن شود که می‌تواند به دلیل پاسخ‌های عفونی و یا خود ایمنی سیستم ایمنی میزبان در مواجهه با سرب باشد.

به‌طور کلی، این مطالعه نیاز به بررسی اثرات طولانی مدت آلاینده‌ها روی زیستگاه‌های آبی را برجسته می‌کند. قانون هورمسیس نشان می‌دهد که غلظت کم سرب می‌تواند اثرات تحریک‌کننده داشته باشد، در حالی که غلظت‌های بالا می‌تواند منجر به اثرات سمی بازدارنده شود. مدل منحنی U شکل در بیان ژن‌های  $TNF-\alpha$ ، HSP 70 و سیتوکین اینترلوکین-۶ مشاهده شد، که نشان می‌دهد پاسخ به شدت و غیر خطی به غلظت محرک وابسته است. برای بررسی و تحلیل بهتر این موضوع، یعنی درک کاملتر تأثیر سرب روی زیستگاه‌های آبی و اثرات بالقوه بلندمدت روی این زیستگاه‌ها و خصوصاً گونه‌های بومی، پژوهش‌های بیشتری مورد نیاز است.

زیستی مناسب برای تنش اکسیداتیو ناشی از فلزات سنگین از جمله سرب است (Rajeshkumar et al., 2013). روی موش‌های آزمایشگاهی نشان داده شد که غلظت بسیار کم نیترات سرب می‌تواند لنفوسیت‌های موش در شرایط آزمایشگاهی را فعال و سرعت سنتز DNA را افزایش دهد. همچنین گزارش شده است، سرب باعث سرکوب تولید IL-4 و افزایش سطح IL-2 می‌شود (Krocova et al., 2000). چنین نتایجی برای کلرید جیوه نیز گزارش شده است (Jiang and Möller, 1995). در مطالعه حاضر، اینترلوکین شش، که از جمله سیتوکین‌های پیش التهابی است، تا غلظت ۰/۵ بین تیمارها و گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت، اما در غلظت ۱ نتایج با یافته‌های قبلی هم‌راستا بود. همچنین رفتار این سیتوکین در دوزهای مختلف به صورت U شکل است که از ویژگی‌های وابسته به دوز غیر خطی است. این نتیجه ممکن است به دلیل مختل کردن ایمنی میزبان در دوز بالا و احتمالاً ناشی از یک اختلال هوموستازی باشد.

در مطالعه‌ای روی کپور معمولی نشان داد که استفاده از استات سرب باعث افزایش بیان ژن  $TNF-\alpha$  شده است. نتایج آن‌ها با سایر مطالعات هم‌راستا بود. در مطالعه حاضر علاوه بر تأیید یافته‌های قبلی چیدمان دوزهای سرب مورد استفاده روند هورمسیس را نیز آشکار ساخت که معرف دقت بیشتر در بررسی روند و غیر خطی بودن این رابطه

## ۵. منابع

## References

- Abedi, Z., Khalesi, M.K., Kohestan, E.S., Rahmani, H., 2012. Comparison of lethal concentrations (LC50-96 h) of CdCl<sub>2</sub>, CrCl<sub>3</sub>, and Pb (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> in common carp (*Cyprinus carpio*) and Sutchi Catfish (*Pangasius hypophthalmus*). *Iranian Journal of Toxicology* 672-680.
- Abós, B., Wang, T., Castro, R., Granja, A. G., Leal, E., Havixbeck, J., Tafalla, C., 2016. Distinct differentiation programs triggered by IL-6 and LPS in teleost IgM+ B cells in the absence of germinal centers. *Scientific Reports* 6(1), 30004. DOI: 10.1038/srep30004
- Braunbeck, T., Burkhardt-Holm, P., Gorge, G., Nagel, R., Negele, R.D., Storch, V., 1992. Rainbow trout and zebrafish, two models for continuous toxicity tests: relative sensitivity, species and organ specificity in cytopathologic reaction of liver and intestines to atrazine. *Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene* 89, 109-145.

- Das, S., Mandal, S., Dhara, H., & Chatterjee, P., 2022. Dietary amelioration of lead toxicity in fish-A review. *Indian Journal of Animal Health* 61(2), 173-189. DOI: 10.36062/ijah.2022.spl.03422
- Fischer, U., Dijkstra, J. M., Köllner, B., Kiryu, I., Koppang, E. O., Hordvik, I., Ototake, M., 2005. The ontogeny of MHC class I expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology* 18(1), 49-60. DOI: 10.1016/j.fsi.2004.05.006
- Giri, S.S., Kim, M.J., Kim, S.G., Kim, S.W., Kang, J.W., Kwon, J., Park, S.C., 2021. Role of dietary curcumin against waterborne lead toxicity in common carp *Cyprinus carpio*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 219, 112318. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2021.112318
- Ghosh, S., Debnath, S., Rout, S.K., 2021. Effects of lead (Pb) toxicity on fish: a review. *Journal of Experimental Zoology India* 24.
- Holladay, S., Ehrich, M., Gogal Jr, R., 2005. Commentary on hormetic dose-response relationships in immunology: Occurrence, quantitative features of the dose response, mechanistic foundations, and clinical implications. *Critical Reviews in Toxicology* 35(2/3), 299. DOI: 10.1080/10408440590917080
- Huseen, H.M., Mohammed, A.J., 2019. Heavy metals causing toxicity in fishes. Paper presented at the *Journal of Physics: Conference Series*.
- Jiang, Y., Möller, G., 1995. In vitro effects of HgCl<sub>2</sub> on murine lymphocytes. I. Preferable activation of CD4+ T cells in a responder strain. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 154(7), 3138-3146. DOI: 10.4049/jimmunol.154.7.3138
- Jing, H., Zhang, Q., Li, S., Gao, X.-j., 2020. Pb exposure triggers MAPK-dependent inflammation by activating oxidative stress and miRNA-155 expression in carp head kidney. *Fish & Shellfish Immunology* 106, 219-227. DOI: 10.1016/j.fsi.2020.08.015
- Karatsoreos, I.N., McEwen, B.S., 2013. Annual research review: The neurobiology and physiology of resilience and adaptation across the life course. *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 54(4), 337-347. DOI: 10.1111/jcpp.12054
- Krocova, Z., Macela, A., Kroca, M., Hernychova, L., 2000. The immunomodulatory effect (s) of lead and cadmium on the cells of immune system in vitro. *Toxicology in Vitro* 14(1), 33-40. DOI: 10.1016/S0887-2333(99)00089-2
- Kubysheva, N., Boldina, M., Eliseeva, T., Soodaeva, S., Klimanov, I., Khaletskaya, A., Ramírez-Salinas, M.A., 2020. Relationship of serum levels of IL-17, IL-18, TNF- $\alpha$ , and lung function parameters in patients with COPD, asthma-COPD overlap, and bronchial asthma. *Mediators of Inflammation*. 2020, 4652898. DOI: 10.1155/2020/4652898
- Lee, J.-W., Choi, H., Hwang, U.-K., Kang, J.-C., Kang, Y. J., Kim, K.I., Kim, J.-H., 2019. Toxic effects of lead exposure on bioaccumulation, oxidative stress, neurotoxicity, and immune responses in fish: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 68, 101-108. DOI: 10.1016/j.etap.2019.03.010
- Mansouri, B., Azadi, N., Habibi, Y., 2015. Study the concentration of heavy metals and some chemical parameters in water distribution network of Sanandaj city in 2014. *Jorjani Biomedicine Journal* 3(2), 80-88.
- Mattson, M.P., 2008. Hormesis defined. *Ageing research reviews* 7(1), 1-7. DOI: 10.1016/j.arr.2007.08.007
- Moniruzzaman, M., Das, D., Dhara, A., & Chakraborty, S. B., 2020. Enzymatic, non-enzymatic antioxidant levels and heat shock protein expression as indicators of metal induced toxicity and reproductive modulation in female Indian major carp *Cirrhinus cirrhosus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 104, 235-244. DOI: 10.1007/s00128-019-02766-z
- Nguyen, T.Q., Sesin, V., Kisiala, A., Emery, R.N., 2021. Phytohormonal roles in plant responses to heavy metal stress: Implications for using macrophytes in phytoremediation of aquatic ecosystems. *Environmental Toxicology and Chemistry* 40(1), 7-22. DOI: 10.1002/etc.4909

- Paul, N., Chakraborty, S., Sengupta, M., 2014. Lead toxicity on non-specific immune mechanisms of freshwater fish *Channa punctatus*. *Aquatic Toxicology* 152, 105-112. DOI: 10.1016/j.aquatox.2014.03.017
- Qian, B., Xue, L., Qi, X., Bai, Y., Wu, Y., 2020. Gene networks and toxicity/detoxification pathways in juvenile largemouth bass (*Micropterus salmoides*) liver induced by acute lead stress. *Genomics* 112(1), 20-31. DOI: 10.1016/j.ygeno.2019.06.02
- Rajeshkumar, S., Mini, J., Munuswamy, N., 2013. Effects of heavy metals on antioxidants and expression of HSP70 in different tissues of Milk fish (*Chanos chanos*) of Kaattuppalli Island, Chennai, India. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 98, 8-18. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2013.07.029
- Wang, C.R., Tian, Y., Wang, X. R., Yu, H. X., Lu, X. W., Wang, C., Wang, H., 2010. Hormesis effects and implicative application in assessment of lead-contaminated soils in roots of *Vicia faba* seedlings. *Chemosphere* 80(9), 965-971. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2010.05.049
- Wang, C., Tian, Y., Wang, X., Geng, J., Jiang, J., Yu, H., Wang, C., 2010. Lead-contaminated soil induced oxidative stress, defense response and its indicative biomarkers in roots of *Vicia faba* seedlings. *Ecotoxicology* 19, 1130-1139. DOI: 10.1007/s10646-010-0496-x
- Xu, C., Xue, M., Jiang, N., Li, Y., Meng, Y., Liu, W., Zhou, Y., 2023. Characteristics and expression profiles of MHC class I molecules in *Carassius auratus*. *Fish & Shellfish Immunology* 137, 108794. DOI: 10.1016/j.fsi.2023.108794
- Yoshida, R., 2014. MHC class I recognition by monocyte - macrophage-specific receptors. *Advances in Immunology* 124, 207-247. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800147-9.00007-8>
- Zhao, L., Zheng, Y.G., Feng, Y.H., Li, M.Y., Wang, G.Q., Ma, Y.F., 2020. Toxic effects of waterborne lead (Pb) on bioaccumulation, serum biochemistry, oxidative stress and heat shock protein-related genes expression in *Channa argus*. *Chemosphere* 261, 127714. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.127714