



DNA methylation in liver and ovary tissues of Caspian Kutum broodstock and embryos (*Rutilus Kutum*) under genistein and β -sitosterol exposures

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Mohammadrezaei D.^{*1} PhD,
Mojazi Amiri B.² PhD,
Nematollahi M.A.² PhD

How to cite this article

Mohammadrezaei D, Mojazi Amiri B, Nematollahi M A. DNA methylation in liver and ovary tissues of Caspian Kutum broodstock and embryos (*Rutilus Kutum*) under genistein and β -sitosterol exposures. Journal of Fisheries Science and Technology. 2018;7(3):223-229.

¹Fisheries Department, Natural Resources & Environmental Faculty, Malayer University, Malayer, Iran

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

*Correspondence

Address: Fisheries Department, Malayer University, 4 Kilometer of Malayer-Arak Road, Malayer, Iran.
Postal Code: 6571995863
Phone: +98 (81) 32355330
Fax: +98 (81) 32355330
d.mrezaei@malayeru.ac.ir

Article History

Received: September 23, 2017

Accepted: August 23, 2018

ePublished: September 22, 2018

ABSTRACT

Aims A wide range of chemical endocrine disrupters modifies DNA methylation. Like a weak class of estrogens, phytoestrogens can affect aquatic animal reproduction and disturb the structure of endocrine systems.

Materials & Methods In order to study the epigenetic effects of genistein and β -sitosterol, 49 female adults (for about 21 days) and fertilized eggs (until hatching time) of Kutum's exposed to 3 different levels of genistein and β -sitosterol (10, 50, 500ng/l). At the end, the liver, the ovaries, and embryos were sampled and methylation-sensitive amplified polymorphism (MSAP) was used to evaluate the level of DNA methylation.

Findings According to result the fish exposed to high level of β -sitosterol shown hypo DNA methylation in the liver. Compared with control, both of these compounds could effect on the ovary and embryos DNA methylation pattern. The result showed, whole genome methylation had a different pattern in the liver, ovary, and embryos, which treated by 500ng/l of β -sitosterol.

Conclusion Methylation change pattern can be changed depends on the type of tissue and structure and level of the phytoestrogen compounds. According to this study, genistein and β -sitosterol could affect reproduction and embryo development by changing molecular indices. It seems that these compounds could affect the endocrine system of *Kutum* and reduce reproduction performance of *Kutum* in the long period.

Keywords Caspian kutum; DNA Methylation; Genistein; β -Sitosterols

CITATION LINKS

[1] How to interpret Methylation Sensitive Amplified ... [2] In vivo steroid metabolism in embryonic and newly hatched steelhead trout ... [3] Epigenetic mechanisms and cancer: An interface between ... [4] Global and cyp19a1a gene specific DNA ... [5] Reprogramming the maternal zebrafish genome after ... [6] Bisphenol A in oocytes leads to growth suppression ... [7] A review of phytoestrogens: Their occurrence and fate ... [8] Soy, phytoestrogens and their impact on reproductive ... [9] Estrogenic and anti-estrogenic effects of wood extractives present in pulp and paper mill effluents ... [10] The phytoestrogen genistein affects zebrafish ... [11] Reproductive consequences of exposure to waterborne phytoestrogens ... [12] Genistein exerts estrogen-like effects in male mouse ... [13] DNA methylation status of cyp17-II gene correlated ... [14] Application of DNA methyltransferases in ... [15] Genomic DNA methylation: The mark and its ... [16] Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in ... [17] Effects of the isoflavones genistein and equol on the ... [18] Development of morphology in hatchery-reared ... [19] Study of anaesthetic effects of clove oil ... [20] Environmental induced methylation changes associated with ... [21] Methylation changes associated with early maturation ... [22] Genome-wide DNA methylation analysis reveals phytoestrogen ... [23] Functional role of AhR in the expression of toxic ... [24] Expression of some genes involved in epigenetic in breast ... [25] DNA methylation levels in the 5' flanking region ... [26] Assessing the sensitivity of different life stages for sexual disruption in ... [27] Evidence of gender-and tissue-specific promoter ... [28] Global genomic methylation levels in the liver and gonads of the ... [29] Patterns of DNA methylation in animals ... [30] Modulation of DNA methylation machineries ... [31] The implications for aquaculture practice of epigenomic programming of components of the endocrine system ... [32] Investigations on biotransformation (mixed function oxygenase activities) in ... [33] Does DNA methylation regulate metamorphosis? the case ... [34] Global DNA methylation in gonads of adult zebrafish ... [35] Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity ... [36] Effects of atrazine and chlorpyrifos on DNA methylation in ...

متیلاسیون DNA در بافت‌های کبد و تخمدان مولدین ماده و جنین ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus kutum*) در معرض جنیستئین و بتاسیتوسترول

داود محمدرضائی * PhD

گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

باقر مجازی‌امیری PhD

گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

محمدعلی نعمت‌الهی PhD

گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

چکیده

اهداف: دامنه وسیعی از ترکیبات شیمیایی برهم زننده اندوکراینی می‌توانند منجر به تغییر متیلاسیون DNA شوند. فیتواستروژن‌ها به‌عنوان ترکیبات استروژنی ضعیف می‌توانند بر عملکرد تولیدمثلی یا ساختار سیستم غدد درون‌ریز آبزیان تأثیرگذار باشند.

مواد و روش‌ها: به‌منظور بررسی اثرات اپی‌ژنتیکی جنیستئین و بتاسیتوسترول بر متیلاسیون DNA، ۴۹ عدد مولد ماده ماهی سفید به‌مدت ۲۱ روز و همچنین تخم لقاح‌یافته ماهی سفید تا زمان تفریح، در معرض سه سطح جنیستئین و سه سطح بتاسیتوسترول با غلظت‌های ۰، ۵۰ و ۵۰۰ نانوگرم بر لیتر قرار گرفتند. از بافت‌های تخمدان و کبد ماهیان مولد و نیز لاروهای تازه تفریح‌شده در پایان آزمایش نمونه‌برداری و DNA آنها جداسازی شد. در این مطالعه به‌منظور بررسی متیلاسیون در هر یک از بافت‌ها از تکنیک MSAP استفاده شد.

یافته‌ها: بالاترین نرخ متیلاسیون DNA در بافت کبد و در ماهیان در معرض بتاسیتوسترول مشاهده شد. در تخمدان و جنین ماهیان نیز حضور هر دو ترکیب در محیط آبی در مقایسه با شاهد توانست بر الگوی متیلاسیون DNA تأثیرگذار باشد. بررسی نتایج نشان می‌دهد که متیلاسیون کل ژنوم در پاسخ به حضور هر دو ترکیب در محیط آزمایش در بافت‌های کبد، تخمدان و جنین تغییر می‌نماید. **نتیجه‌گیری:** الگوی تغییر متیلاسیون بسته به نوع بافت و ترکیب فیتواستروژنی متفاوت است. بنابراین جنیستئین و بتاسیتوسترول قادر به تغییر شاخص‌های مولکولی در مولدین و جنین هستند. بنابراین حضور این ترکیبات با غلظت‌های ذکرشده در رودخانه‌های منتهی به دریای خزر می‌تواند در درازمدت بر عملکرد تولیدمثلی ماهی سفید تأثیر منفی داشته باشد.

کلیدواژه‌ها: ماهی سفید، متیلاسیون DNA، جنیستئین و بتاسیتوسترول‌ها

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۷/۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۶/۰۱

*نویسنده مسئول: d.mrezaei@malayeru.ac.ir

مقدمه

اپی‌ژنتیک مجموعه تغییرات در ساختارهای کروماتینی است که به‌طور تجمعی الگوهای متفاوتی از بیان و خاموشی ژن را در ژنوم ایجاد نموده، که طی تقسیمات میوزی و میتوزی منتقل می‌شود^[1]. اپی‌ژنتیک در واقع تغییر میتوزی یا میوزی قابل توارث در عملکرد یک ژن بدون تغییر در توالی آن ژن است^[2]. مکانیزم‌های اپی‌ژنتیکی اساساً فرایندهای بیولوژیکی رونویسی و نسخه‌برداری را تغییر می‌دهند و نقش حیاتی در تنظیم پاسخ‌های ارگانیسم‌ها به آلاینده‌ها دارند^[3]. متیلاسیون DNA در جوامع زیستی یک شاخص اپی‌ژنتیکی بسیار خوب در نظر گرفته می‌شود^[4]. قرارگرفتن در معرض استروژن‌های ضعیف مثل بیس‌فنل A (BPA) می‌تواند سبب تغییر الگوی متیلاسیون شود^[4]. تغییر در سطح متیلاسیون در ماهیان استخوانی مثل ماهی گورخری (*Danio rerio*)، بلوگیل (*Lepomis macrochirus*)، تیلپایی نیل (*Oreochromis niloticus*) و سی‌روف (*Sebastiscus marmoratus*) در پاسخ به برهم‌زننده‌های

سیستم غدد درون‌ریز بیان شده است^[5, 6].

فیتواستروژن‌ها ترکیبات مشتق‌شده گیاهی هستند که به‌طور طبیعی در محیط‌های آبی وجود دارند. این ترکیبات می‌توانند به‌عنوان برهم‌زننده‌های هورمونی عمل نموده و سبب اختلال در عملکرد تولیدمثلی ارگانیسم‌های آبی شوند^[7]. در این میان جنیستئین و بتاسیتوسترول (اصلی‌ترین استرول گیاهی محصول عمده کارخانه خمیر و کاغذسازی) از ترکیبات گیاهی مهمی هستند که می‌توانند در فرآیند تولیدمثلی اختلال ایجاد کنند^[8, 9].

بررسی اثر تخریبی فیتواستروژن‌ها روی DNA سلول‌های لنفوسیتی موش نشان داد که جنیستئین در غلظت میکرومولار سبب تشکیل ریزهسته‌ها، شکست DNA، تخریب آن و تغییر در الگوی متیلاسیون می‌شود^[10, 11]. الگوی متیلاسیون DNA ممکن است تحت تأثیر مواد غذایی، شرایط محیطی تنش‌زا یا قرارگرفتن در معرض برهم‌زننده‌های سیستم غدد درون‌ریز تغییر کند^[1, 12]. دما، مرحله تکاملی، تنظیم رشد و رسیدگی جنسی، قرارگرفتن در معرض آلاینده‌ها، شرایط زیست و مهاجرت، جنس و تغییر شکل نیز بر متیلاسیون DNA اثرگذار هستند^[13]. متیلاسیون DNA بیشتر در جزایر CPG اتفاق می‌افتد یعنی مناطقی که سیتوزین کنار گوانین قرار گرفته است^[14]. گروهی از آنزیم‌های انتقال‌دهنده گروه متیل یا DNA-متیل ترانسفرازها (DNMTs) با استفاده از S-آدنوزیل‌متیونین (SAM) به‌عنوان کوآنزیم، مسئول متیله‌کردن بازهای سیتوزین هستند^[15]. در سطح DNA تنها یک بخش سیتوزینی توسط DNA-متیل ترانسفراز متیله می‌شود که این سطح بین افراد گونه متفاوت است^[1].

در بسیاری از کشورها غلظت فیتواستروژن‌ها در محیط‌های آبی مختلف در دامنه‌ای از ۳ نانوگرم بر لیتر تا ۴۳ میکروگرم بر لیتر گزارش شده است، در حالی که غلظت‌های یک‌نانوگرم بر لیتر می‌تواند اثرات نامطلوبی بر عملکرد سیستم غدد درون‌ریز ماهیان داشته باشد^[16, 17]. با توجه به صنعتی‌شدن کشور و ورود انواع فاضلاب‌ها و رواناب‌های صنعتی (از جمله کارخانه کاغذسازی مازندران)، کشاورزی و انسانی به رودخانه‌های حوزه جنوبی دریای خزر به‌ویژه رودخانه تجن، وجود و افزایش انواع فیتواستروژن‌ها را در این رودخانه محتمل می‌سازد. ماهی سفید (*Rutilus kutum*) از گونه‌های رودکوچ و اقتصادی دریای خزر بوده، که طی ماه‌های اسفند و فروردین برای تکمیل فرآیند تولیدمثلی وارد رودخانه‌های منتهی به دریای خزر می‌شوند^[18]. در طی این مدت مولدین با ترکیبات و آلاینده‌های مختلفی از جمله فیتواستروژن‌ها مواجه خواهند شد، که هر کدام از این مواد می‌تواند بر عملکرد تولیدمثلی ماهیان در معرض و در درازمدت بر ساختار جمعیتی آنها اثرات منفی داشته باشد. از این‌رو تحقیق حاضر چگونگی اثر برخی از این فیتواستروژن‌ها را بر شاخص‌های تولیدمثلی ماهی سفید مهاجر به رودخانه را بررسی نموده است.

مواد و روش‌ها

تهیه مولدین و لاروها: ۴۹ عدد مولد ماده ماهی سفید با میانگین وزن 15 ± 68 گرم، از رودخانه شیرو در شهرستان تنکابن ($36^{\circ} 51'$ N، $50^{\circ} 47'$ E) توسط تور پرتابی در اوایل بهار صید شدند. مولدین پس از ۴۸ ساعت سازگاری در آب شیرین کنار رودخانه، به‌ازای هر حوضچه فایبرگلاسی ۷ مولد به تانک‌های ۳۰۰ لیتری آب شیرین منتقل شدند. مولدین در هر تانک به‌طور مجزا در معرض ۳ سطح جنیستئین و ۳ سطح بتاسیتوسترول با غلظت‌های ۰، ۵۰ و ۵۰۰ نانوگرم بر لیتر (سیگماآلدريج؛ آلمان) قرار گرفتند. به‌منظور

EcoRI، ۱ واحد MspI (HpaII)، ۵ پیکومول آدپتور EcoRI، ۵۰ پیکومول آدپتور HpaII و ۰/۴ واحد T4 DNA لیگاز انجام شد. در پایان نمونه‌ها در دو مرحله PCR شدند:

واکنش زنجیره پلیمرز پیش‌انتخابی (Preselective PCR): با استفاده از ۳ میکرولیتر محلول لایگیشن در حجم ۱۲ میکرولیتر حاوی ۰/۵ میکرولیتر برای هر یک از پرایمرهای EcoRI و HpaII/MspI، ۲ میکرولیتر آب استریل و ۶ میکرولیتر میکس انجام شد (شرایط PCR: ۹۵°C برای ۳ دقیقه، ۲۵ چرخه ۹۵°C برای ۳۰ ثانیه، ۸۵°C برای ۵۰ ثانیه، ۷۲°C برای ۲ دقیقه و مرحله نهایی ۷۲°C برای ۱۰ دقیقه).

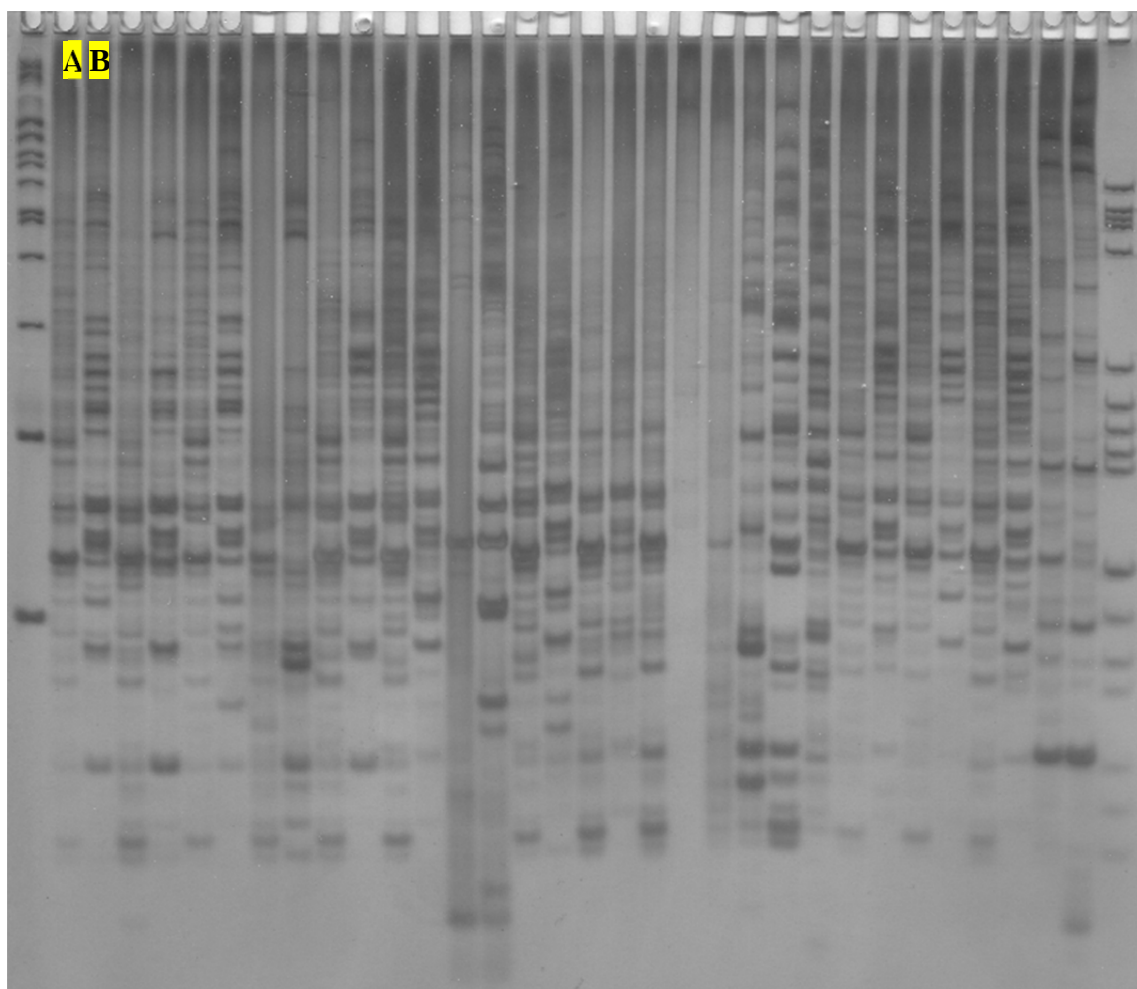
واکنش زنجیره پلیمرز انتخابی (Selective PCR): در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از ۵ میکرولیتر محلول رقیق‌شده ۱:۱۰ محلول preselective PCR انجام شد. در این مرحله از پرایمرهای EcoRI-AAG، HpaII/MspI-TC، EcoRI-ACT و HpaII/MspI-TC استفاده شد [21]. PCR حاوی ۰/۸ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای انتخابی، ۴/۳ میکرولیتر آب استریل و ۷/۵ میکرولیتر میکس DNA (شرایط PCR: ۹۴°C برای ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه ۹۴°C برای ۳۰ ثانیه، ۶۰°C برای ۳۰ ثانیه، ۷۲°C برای یک دقیقه و مرحله نهایی ۷۲°C برای ۱۰ دقیقه).

شکل ۱ عکس نمونه‌های آزمایشی برش خورده توسط آنزیم‌های HpaII (A) و MSPI (B) بارگذاری شده روی ژل پلی‌اکریل‌آمید را نشان می‌دهد.

اطمینان از وجود غلظت‌های واقعی ترکیبات فیتواستروئیدی در تانک در طول دوره آزمایش، آب تانک‌ها هر ۴۸ یک‌بار ۱۰۰٪ تعویض و غلظت جنیستئین و بتاسیتوسترول هر تیمار به آن افزوده شد.

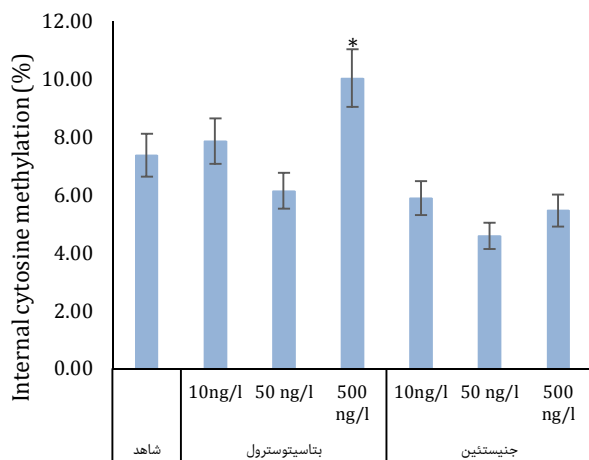
پس از ۲۱ روز در معرض قرارگیری، از هر تیمار ۳ مولد به‌طور تصادفی به‌منظور بررسی سطح اثر ترکیبات و غلظت‌های تعیین‌شده در تحقیق انتخاب شد [11]. مولدین به‌وسیله گل میخک با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بیهوش و از تخمدان و کبد ماهیان برای بررسی وضعیت متیلاسیون نمونه‌برداری شد [19]. نمونه‌های جنین ماهی نیز به‌مدت هفت روز در معرض غلظت‌های مشابه مولدین قرار گرفته و بلافاصله بعد از تفریخ از آنها نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها در ازلت مایع قرار داده شد و به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۸۰°C- تا زمان استخراج DNA نگهداری شدند.

آماده‌سازی نمونه‌ها: برای بررسی متیلاسیون سیتوزین ژنومی در مکان‌های CCGG نمونه‌های متفاوت، از تکنیک MSAP بیان‌شده توسط موران و همکاران [20] با اندکی اصلاح استفاده شد. بدین‌منظور، DNA بافت‌های تخمدان و کبد لاروها به روش فنول-کلروفرم استخراج شد [4]. کیفیت DNA استخراج‌شده روی ژل آگاروز ۱٪ توسط الکتروفورز افقی بررسی و تایید شد. برای هر نمونه ۵۰۰ نانوگرم از DNA به‌طور جداگانه با ترکیب هر دو آنزیم EcoRI/HpaII و EcoRI/MspI دایجست (Digest) و لایگیت (Ligate) شدند. واکنش با حجم نهایی ۱۱ میکرولیتر شامل ۵ واحد

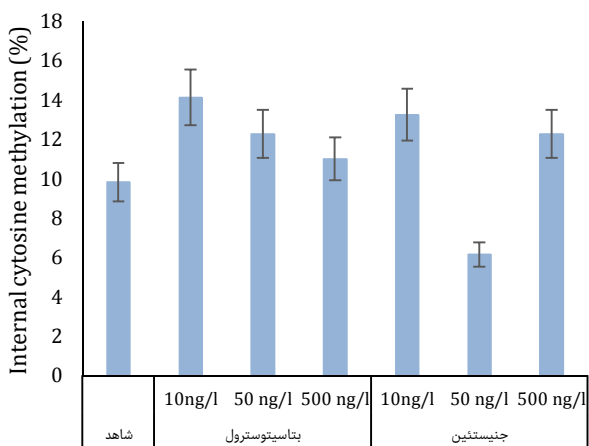


شکل ۱ نمونه‌های آزمایشی برش خورده توسط آنزیم‌های HpaII (A) و MSPI (B) بارگذاری شده روی ژل پلی‌اکریل‌آمید

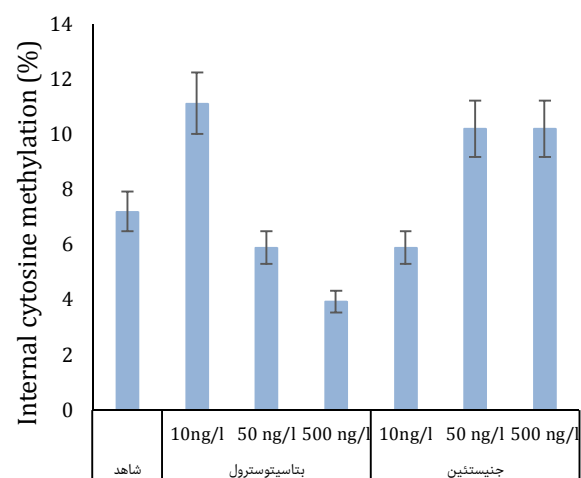
بوده و افزایش غلظت منجر به وقوع هیپرمیتلاسیون در جنین‌های در معرض شد. این اختلاف در غلظت ۱۰ نانوگرم بر لیتر در مقایسه با گروه شاهد مشاهده نشد (نمودار ۳).



نمودار ۱) مقایسه الگوی متیلاسیون سیتوزین داخلی در بافت کبد ماهیان در معرض غلظت‌های متفاوت بتاستوتسترول و جنیستئین



نمودار ۲) مقایسه الگوی متیلاسیون سیتوزین داخلی در بافت تخمدان ماهیان در معرض غلظت‌های متفاوت بتاستوتسترول و جنیستئین



نمودار ۳) مقایسه الگوی متیلاسیون سیتوزین داخلی در جنین در معرض غلظت‌های متفاوت بتاستوتسترول و جنیستئین

تجزیه و تحلیل داده‌ها: در پایان کلیه نمونه‌های PCR روی ژل پلی‌اکریل‌آمید الکتروفورز قرار داده شدند. پس از پایان الکتروفورز، ژل‌ها اسکن و توسط نرم‌افزار PyELph1.4 کدگذاری شده و به‌وسیله بسته MSAP نرم‌افزار R 2.15.2 آنالیز شدند. هر نمونه براساس دستورالعمل زیر امتیازدهی شد: وجود هر دو آنزیم (۱/۱) بیان‌گر وضعیت عدم متیله‌شدن؛ وجود یکی از آنزیم‌ها (۱/۰ یا ۰/۱) نشان‌دهنده وضعیت متیله‌شدن و عدم وجود هیچ‌کدام از آنزیم‌ها بیان‌گر هیپرمیتلاسیون (افزایش میزان متیلاسیون) است.

یافته‌ها

ترکیب پرایمرهای مورد استفاده در آنالیز ۲۱ تیمار با MSAP در کل ۵۱ لوکوس ایجاد کرد که ۴۹ عدد آن متعلق به لوکوس حساس به متیلاسیون (MSL) بودند. در این بررسی فراوانی پلی‌مورفیک MSL ۹۶٪ و شاخص تنوع شانون 1.087 ± 0.176 به دست آمد. طبق آنالیز نتایج، مهم‌ترین تغییر (بالا ۱۰٪) در متیلاسیون سیتوزین داخلی دیده شد. این الگو بیان می‌کند که طی دوره در معرض قرارگیری، متیلاسیون سیتوزین داخلی در مقایسه با سایر وضعیت‌ها افزایش یافته است. با این وجود تفاوت در میزان متیلاسیون کل ژنوم در بین گروه اندک و معنی‌دار نبود ($p > 0.05$). هرچند طبق نتایج حاصل از آنالیز داده‌های ژنتیکی در ماهیان در معرض بتاستوتسترول و جنیستئین الگوهای متفاوتی از متیلاسیون با توجه به نوع بافت مشاهده شد.

نتایج تاثیر جنیستئین و بتاستوتسترول بر تغییر الگوی متیلاسیون کبد مولدین در معرض در نمودار ۱ ذکر شده است. طبق نمودار در گروه در معرض بتاستوتسترول، هیپرمیتلاسیون بافت کبدی در تیمار ۵۰۰ نانوگرم بر لیتر مشاهده شد، در صورتی که در سایر تیمارها در مقایسه با گروه شاهد تغییر اندکی در الگوی متیلاسیون مشاهده شد، که به لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری را نشان نداد.

بر این اساس هیپرمیتلاسیون بافت کبد در مقایسه با گروه شاهد در ماهیان در معرض غلظت محیطی ۵۰۰ نانوگرم بر لیتر بتاستوتسترول دیده شد. در بررسی اثر جنیستئین بر تغییر الگوی متیلاسیون مولدین در معرض مشاهده شد که این ترکیب در مقایسه با گروه شاهد سبب کاهش میزان متیلاسیون (هیپومیتلاسیون) در بافت کبد ماهیان مواجه‌شده با غلظت‌های محیطی جنیستئین شده است (نمودار ۱).

بررسی متیلاسیون کل DNA در بافت تخمدان مولدین در معرض غلظت‌های محیطی بتاستوتسترول و جنیستئین تغییر الگوی متیلاسیون را در گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه شاهد نشان داد (نمودار ۲). در گروه آزمون مواجه‌شده با بتاستوتسترول، افزایش متیلاسیون در غلظت‌های پایین مشاهده شد در حالی که با افزایش غلظت محیطی بتاستوتسترول میزان متیلاسیون نیز کاهش یافت. در گروه‌های آزمایشی در معرض جنیستئین تفاوتی در میزان متیلاسیون مشاهده شد (نمودار ۲).

تجزیه آماری داده‌های به‌دست‌آمده از مطالعه میزان متیلاسیون در بافت تخمدان اختلاف معنی‌داری را بین تیمارها نشان داد ($p < 0.05$). بررسی الگوی متیلاسیون در جنین‌های در معرض دو ترکیب فیتواستروئیدی تفاوت الگوی متیلاسیون در دو ترکیب را نشان داد (نمودار ۳). در گروه آزمایشی در معرض بتاستوتسترول سطح متیلاسیون در مقایسه با گروه شاهد با افزایش غلظت محیطی کاهش نشان داد. به این ترتیب که در تیمار ۱۰ نانوگرم بر لیتر هیپرمیتلاسیون و در تیمار ۵۰۰ نانوگرم بر لیتر هیپومیتلاسیون دیده شد. این الگو در گروه آزمایشی در معرض جنیستئین تفاوت

کرده‌اند؛ به‌طور مثال در ماهی سه‌خاره (*Gasterosteus aculeatus*) در معرض ۱۰۰ نانوگرم بر لیتر تیمار استرادیول، متیلاسیون کل ژنوم در ماهیان افزایش یافته است [25, 28].

براساس نتایج مطالعه حاضر، جنین‌ها بسته به نوع ترکیب فیتواستروژنی و مکانیزم عمل آنها الگوهای متفاوتی از متیلاسیون را نشان دادند. به‌نظر می‌رسد بتاسیتوسترول به‌عنوان آلاینده سبب کاهش سطح متیلاسیون در مقایسه با گروه شاهد شده باشد. این روند در جنین‌های در معرض جنیستئین متفاوت بوده و با افزایش غلظت محیطی این ترکیب سطح متیلاسیون افزایش یافت. پیش از این برخی مطالعات بروز دمتیلاسیون را در مراحل ابتدایی زندگی تحت تاثیر آلاینده‌ها بیان کرده‌اند [29, 30]. دوران جنینی دوره حساسی نسبت به وقوع متیلاسیون است زیرا ترکیبات موجود در محیط آبی یا زرده می‌توانند در مراحل ابتدایی تقسیم سلول‌ها؛ بلاستولا و گاسترولا؛ اثرگذار باشند [31]. آلورو و همکاران [6]، تغییر الگوهای متیلاسیون DNA در دوره جنینی ماهی قزل‌آلا، سرکوب رشد و تغییر پاسخ استرسی روی بچه ماهی قزل‌آلا، بیان ژن *ویتلین* و ژن‌های دخیل در فرآیند رشد تحت تاثیر BPA موجود تخم را بیان کردند. با توجه به داده‌های حاصل از بررسی الگوی متیلاسیون در بافت‌های مختلف و جنین ماهی سفید دریای خزر استنباط می‌شود که وقوع متیلاسیون در بافت‌های مختلف یکسان نبوده و هر بافت در مواجهه با تغییر محیط بیرونی خود رفتار متفاوتی را نشان می‌دهد. این تفاوت می‌تواند ناشی از فرآیندهای بیوشیمیایی رخ داده در هر بافت باشد [23]. موران و همکاران [20] اهمیت نوع بافت انتخاب‌شده را به‌دلیل تفاوت‌های زیاد در الگوی متیلاسیون در بافت‌های مختلف بیان کردند که نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه نیز آن را تایید می‌نماید. تفاوت متیلاسیون در بین بافت‌های مختلف قبلاً توسط محققین دیگر بیان و سطح متیلاسیون پایین‌تر در بافت کبد ذکر شده است [25, 28]. همچنین تغییر الگوی متیلاسیون کل ژنوم در طی تکامل نیز در ماهی گورخری بیان شده است [32]. در یک مطالعه دیگر [33] تفاوت الگوی متیلاسیون را در لارو و بافت ماهی بالغ لامپری دریایی (*Petromyzon marinus*) گزارش کرد.

در میان بافت‌های مورد بررسی در این مطالعه بیشترین میزان متیلاسیون در بافت تخمدان مولدین در معرض ترکیبات فیتواستروژنی دیده شد. چنین روندی در تخمدان ماهی گورخری در معرض BPA گزارش شده است. در ماهی گورخری، در مواجهه با ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BPA، سطح متیلاسیون نسبت به دوزهای بالاتر بیشتر بود که این تفاوت ناشی از اثرات وابسته به غلظت BPA بیان شده است [34]. روندی که در تیمارهای بتاسیتوسترول مشاهده شد. با توجه به اثرات بتاسیتوسترول روی سطح اتوکسی رزوروفین آ دی اتیلاز (EROD) و نقش این ترکیب فیتواستروژنی در ایجاد رادیکال‌های آزاد، بتاسیتوسترول در سطح کم توانسته بر DNA ماهی سفید دریای خزر تاثیر بگذارد و الگوی متیلاسیون را در این ماهی تغییر دهد. دخالت چرخه کاتالیزی CYP1A در شکل‌گیری رادیکال‌های آزادی نظیر سوپراکسید (O_2)، رادیکال هیدروکسیل (OH) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در مراحل ابتدایی زندگی تحت تاثیر دیوکسین بیان شده است [35]. نتایج مشابهی در خصوص افزایش متیلاسیون کل ژنوم در سایر ماهیان در معرض آلاینده‌های مختلف بیان شده است [4, 25, 28]. سینگ و همکاران [36] افزایش متیلاسیون در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) که ۴۰ روز در معرض آفت‌کش قرار داشت را بیان کرد و عنوان نمود این افزایش بعد از ۴۰ روز در مقادیر بالای آفت‌کش شروع به کاهش

طبق مطالعات، ترکیبات شبه‌هورمونی قادر به تغییر نرخ متیلاسیون در DNA هستند [22]. متیلاسیون DNA بخشی از مکانیزم‌های سازگاری به تغییر شرایط محیطی است و با غیرفعال‌سازی بیان یک ژن در ارتباط است [4]. نتایج تحقیق حاضر تغییر الگوی متیلاسیون کبد مولدین در معرض بتاسیتوسترول را نشان داد. بافت کبد قابلیت سم‌زدایی و توانایی انباشت آلاینده‌های مختلف را داشته و در بیش‌تر فرآیندهای متابولیسمی بدن مشارکت دارد. بنابراین کبد و ترکیبات بیوشیمیایی آن به‌عنوان اولین بافت هدف در بررسی اثرات افزایش غلظت محیطی یک آلاینده در نظر گرفته می‌شوند. مواجهه مولدین ماده ماهی سفید دریای خزر با غلظت ۵۰۰ نانوگرم بر لیتر بتاسیتوسترول نیز نشان داد که کبد در حضور این ترکیب دچار برخی تغییرات در مسیرهای بیوشیمیایی سلولی شده که منجر به افزایش نرخ متیلاسیون شده است. بنابراین بروز هیپرمتیلاسیون در این تیمار بیانگر تغییر الگوی متیلاسیون در این بافت در مقایسه با سایر گروه‌های آزمایشی است. نتایج مشابهی از متیلاسیون کبد در بسیاری از گونه‌های ماهیان در معرض آلاینده‌های مختلف (شبه‌هورمون‌های شیمیایی و فلزات سنگین) گزارش شده است که علت آن دخالت ترکیبات شبه‌هورمونی در مسیر سنتز آنزیم‌های آروماتازی و هورمون‌های استروئیدی و همچنین تاثیر مستقیم بر عناصر گیرنده‌های استروژنی داخل ژنوم و در نهایت تغییر الگوی متیلاسیون بیان شده است [23].

بررسی اثر جنیستئین بر تغییر الگوی متیلاسیون در بافت کبد مولدین در معرض نشان داد که این ترکیب، الگوی متیلاسیون DNA را با کاهش میزان متیلاسیون (هیپومتیلاسیون) تحت تاثیر قرار داده است. کاهش سطح متیلاسیون توسط برخی ترکیبات فیتواستروژنی ناشی از تغییر برخی فرآیندهای تولیدمثلی نظیر زرده‌سازی پیش از این بیان شده است. ترکیبات فلاونوئیدی با کاهش بیان DNA متیل‌ترانسفرازها در سلول سبب کاهش نرخ متیلاسیون می‌شوند البته این مکانیزم تحت تاثیر غلظت این ترکیبات است [24]. به‌طور مثال در ماهیان گورخری نر و ماده قرارگرفته در معرض ترکیبات شبه‌هورمونی، افزایش بیان ژن *ویتلین* سبب زرده‌سازی و در نتیجه کاهش متیلاسیون ناشی از بیان آن شده است [25].

طبق نتایج به‌دست آمده حضور ترکیبات فیتواستروژنی سبب افزایش سطح متیلاسیون در تخمدان ماهیان در معرض شد. به‌صورت طبیعی با توسعه تکامل تخمدان از مرحله دوم تا چهارم، متیلاسیون در تخمدان کاهش می‌یابد ولی در مرحله پنجم با تغییر بیان ژن سیتوکروم P450 (CYP)، میزان متیلاسیون افزایش می‌یابد [13]. لیو و همکاران [4] تغییر سطح متیلاسیون در تخمدان مولدین در معرض BPA به مدت ۳۵ روز را در ماهی قنات چینی (*Gobiocypris rarus*) گزارش کردند. این تغییر سطح متیلاسیون را به میزان بیان CYP19a نسبت دادند و بیان کردند که متیلاسیون DNA ممکن است، رونویسی CYP19 در تخمدان را کنترل نماید [26]. مطالعات وجود ارتباط منفی بین بیان CYP19a و سطح متیلاسیون DNA در ماهیان را بیان کرده‌اند [26]. به نظر می‌رسد استروژن‌ها الگوی متیلاسیون پروموتور مسئول ژن‌های *Era* و *آروماتاز* تخمدانی را تغییر می‌دهند [27]. غلظت‌های محیطی ترکیبات مختلف فیتواستروژنی، میزان فعالیت آروماتازی اندازه‌گیری‌شده در تخمدان را تغییر می‌دهند. برخی مطالعات، هیپرمتیلاسیون در گناد ماهیان در معرض استرادیول را بیان

- steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). Gen Comp Endocrinol. 1996;102(2):197-209.
- 3- Herceg Z, Vaissière T. Epigenetic mechanisms and cancer: An interface between the environment and the genome. Epigenetics. 2011;6(7):804-19.
- 4- Liu Y, Yuan C, Chen S, Zheng Y, Zhang Y, Gao J, et al. Global and cyp19a1a gene specific DNA methylation in gonads of adult rare minnow *Gobiocypris rarus* under bisphenol A exposure. Aquat Toxicol. 2014;156:10-6.
- 5- Potok ME, Nix DA, Parnell TJ, Cairns BR. Reprogramming the maternal zebrafish genome after fertilization to match the paternal methylation pattern. Cell. 2013;153(4):759-72.
- 6- Aluru N, Leatherland JF, Vijayan MM. Bisphenol A in oocytes leads to growth suppression and altered stress performance in juvenile rainbow trout. PLoS One. 2010;5(5):e10741.
- 7- Liu ZH, Kanjo Y, Mizutani S. A review of phytoestrogens: Their occurrence and fate in the environment. Water Res. 2010;44(2):567-77.
- 8- Cederroth CR, Zimmermann C, Nef S. Soy, phytoestrogens and their impact on reproductive health. Mol Cell Endocrinol. 2012;355(2):192-200.
- 9- Orrego R, Guchardi J, Krause R, Holdway D. Estrogenic and anti-estrogenic effects of wood extractives present in pulp and paper mill effluents on rainbow trout. Aquat Toxicol. 2010;99(2):160-7.
- 10- Sassi-Messai S, Gibert Y, Bernard L, Nishio S, Ferri Lagneau KF, Molina J, et al. The phytoestrogen genistein affects zebrafish development through two different pathways. PLoS One. 2009;4(3):e4935.
- 11- Stevenson LM, Brown AC, Montgomery TM, Clotfelter ED. Reproductive consequences of exposure to waterborne phytoestrogens in male fighting fish *Betta splendens*. Arch Environ Contam Toxicol. 2011;60(3):501-10.
- 12- Strauss L, Mäkelä S, Joshi S, Huhtaniemi I, Santti R. Genistein exerts estrogen-like effects in male mouse reproductive tract. Mol Cell Endocrinol. 1998;144(1-2):83-93.
- 13- Ding Y, He F, Wen H, Li J, Ni M, Chi M, et al. DNA methylation status of cyp17-II gene correlated with its expression pattern and reproductive endocrinology during ovarian development stages of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Gene. 2013;527(1):82-8.
- 14- Jeltsch A, Jurkowska RZ, Jurkowski TP, Liebert K, Rathert P, Schlickenrieder M. Application of DNA methyltransferases in targeted DNA methylation. Appl Microbiol Biotechnol. 2007;75(6):1233-40.
- 15- Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: The mark and its mediators. Trends Biochem Sci. 2006;31(2):89-97.
- 16- Kuster M, Azevedo DA, López de Alda MJ, Aquino Neto FR, Barceló D. Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil). Environ Int. 2009;35(7):997-1003.
- 17- Kiparissis Y, Balch GC, Metcalfe TL, Metcalfe CD. Effects of the isoflavones genistein and equol on the gonadal development of Japanese medaka *Oryzias latipes*. Environ Health Perspect. 2003;111(9):1158-63.
- 18- Jafari M, Kamarudin MS, Saad CR, Arshad A, Oryan Sh, Bahmani M. Development of morphology in hatchery-reared *Rutilus frisii kutum* larvae. Eur J Sci Res. 2009;38(2):296-305.
- 19- Sharifpour E, Soltani M, Abdolhay H, Ghayumi R.

مطالعه حاضر نشان داد که هر دو ترکیب فیتواستروژنی با رفتار نسبتاً متفاوتی قادر به تغییر الگوی متیلاسیون در مولدین و جنین ماهی سفید دریای خزر هستند. این امر ناشی از تفاوت در نوع عملکرد آنها در سطح سلولی بیان شده است^[4]. غلظت بافتی سوپسترا یا تولید واکنش‌های ترانس‌متیلاسیون؛ اس-آدنوزینیل‌متیونین (SAM) و اس-آدنوزیل‌هوموسیستئین (SAH) به ترتیب سبب کاهش سطح متیلاسیون می‌شوند، بنابراین مکانیزم تغییر سطح متیلاسیون DNA ممکن است بین ترکیبات مختلف، متفاوت باشد^[25].

از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به کم‌بودن مولدین و جنین ماهی در شرایط طبیعی اشاره نمود که سبب کاهش حجم نمونه‌برداری می‌شود. از سوی دیگر کیفیت متغیر مواد مورد نیاز برای بررسی متیلاسیون انجام چنین مطالعاتی را با چالش فراوان روبه‌رو می‌سازد. بررسی سطوح متیلاسیون ناشی از سایر آلاینده‌های رایج در منابع آبی نظیر سموم و فلزات سنگین نیز می‌تواند در سنجش سطح تاثیرگذاری این ترکیبات در سطح مولکولی مفید واقع شود.

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد هر دو ترکیب جنیستئین و بتاسیتوسترول توانسته‌اند در بافت‌های مختلف بر الگوی متیلاسیون DNA تاثیرگذار باشند. البته شدت این تاثیرگذاری در بافت‌های مختلف با توجه به عملکردهای آنها متفاوت بوده است. از سوی دیگر اثرات وابسته به غلظت هر دو ترکیب نیز بر این تغییر الگو تاثیر گذاشته و سبب تغییر الگوی متیلاسیون شده است. بنابراین حضور این ترکیبات در محیط‌های آبی می‌تواند با ایجاد اختلال در فرآیندهای سلولی و مولکولی نسل این ماهی را در معرض خطر قرار دهد. بررسی‌های بیشتر در سطوح مولکولی و روی شاخص‌های دیگر می‌تواند در درک بهتر این فرآیند مفید باشد.

تشکر و قدردانی: بدین‌وسیله نویسندگان مراتب تشکر و سپاسگذاری خود را از زحمات مهندس خسروپانی و کلیه پرسنل مجتمع تکثیر و پرورش ماهی شهید رجایی ساری (سمسکنده) به‌ویژه مهندس مخدومی و مهندس موسوی اعلام می‌دارند.

تأییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشد.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: داود محمدرضائی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۵۰٪)؛ باقر مجازی/امیری (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر کمکی/نگارنده بحث (۳۰٪)؛ محمدعلی نعمت‌الهی (نویسنده سوم)، روش‌شناس/تحلیلگر آماری (۲۰٪)

منابع مالی: تحقیق حاضر با حمایت مالی وزارت علوم و تحقیقات و فناوری (۸۹۶۱-۱۳۹۲/۳/۲۵) و دانشگاه تهران صورت پذیرفت.

منابع

- 1- Fulneček J, Kovařík A. How to interpret Methylation Sensitive Amplified Polymorphism (MSAP) profiles?. BMC Genet. 2014;15:2.
- 2- Yeoh CG, Schreck CB, Fitzpatrick MS, Feist GW. In vivo steroid metabolism in embryonic and newly hatched

- 28- Aniagu SO, Williams TD, Allen Y, Katsiadaki I, Chipman JK. Global genomic methylation levels in the liver and gonads of the three-spine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) after exposure to hexabromocyclododecane and 17-beta oestradiol. *Environ Int.* 2008;34(3):310-7.
- 29- Head JA. Patterns of DNA methylation in animals: An ecotoxicological perspective. *Integr Comp Biol.* 2014;54(1):77-86.
- 30- Dasmahapatra AK, Khan IA. Modulation of DNA methylation machineries in Japanese rice fish (*Oryzias latipes*) embryogenesis by ethanol and 5-azacytidine. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2016;179:174-83.
- 31- Li M, Leatherland JF. The implications for aquaculture practice of epigenomic programming of components of the endocrine system of teleostean embryos: Lessons learned from mammalian studies. *Fish Fish.* 2013;14(4):528-53.
- 32- Pluta HJ. Investigations on biotransformation (mixed function oxygenase activities) in fish liver. In: Braunbeck T. *Fish: Ecotoxicology and ecophysiology: Proceedings of an international symposium, Heidelberg, September 1991.* Braunbeck T, Hanke W, Segner H, editors. British Columbia: VCH; 1993.
- 33- Covelo-Soto L, Saura M, Morán P. Does DNA methylation regulate metamorphosis? the case of the sea lamprey (*Petromyzon marinus*) as an example. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2015;185:42-6.
- 34- Liu Y, Zhang Y, Tao S, Guan Y, Zhang T, Wang Z. Global DNA methylation in gonads of adult zebrafish *Danio rerio* under bisphenol A exposure. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2016;130:124-32.
- 35- Whyte JJ, Jung RE, Schmitt CJ, Tillitt DE. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit Rev Toxicol.* 2000;30(4):347-570.
- 36- Xing H, Wang C, Wu H, Chen D, Li S, Xu S. Effects of atrazine and chlorpyrifos on DNA methylation in the brain and gonad of the common carp. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2015;168:11-9.
- Study of anaesthetic effects of clove oil (*Eugenia caryophyllata*) in common carp (*Cyprinus carpio*) under various pH and temperature condition. *Iran Sci Fish J.* 2003;11(4):59-74. [Persian]
- 20- Morán P, Marco-Rius F, Megías M, Covelo-Soto L, Pérez-Figueroa A. Environmental induced methylation changes associated with seawater adaptation in brown trout. *Aquaculture.* 2013;392-395:77-83.
- 21- Morán P, Pérez-Figueroa A. Methylation changes associated with early maturation stages in the Atlantic salmon. *BMC Genet.* 2011;12:86.
- 22- Sato N, Yamakawa N, Masuda M, Sudo K, Hatada I, Muramatsu M. Genome-wide DNA methylation analysis reveals phytoestrogen modification of promoter methylation patterns during embryonic stem cell differentiation. *PLoS One.* 2011;6(4):e19278.
- 23- Mimura J, Fujii-Kuriyama Y. Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2003;1619(3):263-8.
- 24- Mohammadain Shahrabaki F, Mahmoudi M, Mirzaee MR, Khoshdel AR, Sheikh Fathollahi M, Zinodini N, et al. Expression of some genes involved in epigenetic in breast cancer cell lines: The effect of Quercetin. *J Fasa Univ Med Sci.* 2015;5(3):413-24. [Persian]
- 25- Strömqvist M, Tooke N, Brunström B. DNA methylation levels in the 5' flanking region of the vitellogenin I gene in liver and brain of adult zebrafish (*Danio rerio*)--sex and tissue differences and effects of 17alpha-ethinylestradiol exposure. *Aquat Toxicol.* 2010;98(3):275-81.
- 26- Liney KE, Jobling S, Shears JA, Simpson P, Tyler CR. Assessing the sensitivity of different life stages for sexual disruption in roach (*Rutilus rutilus*) exposed to effluents from wastewater treatment works. *Environ Health Perspect.* 2005;113(10):1299-307.
- 27- Contractor RG, Foran CM, Li S, Willett KL. Evidence of gender-and tissue-specific promoter methylation and the potential for ethinylestradiol-induced changes in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) estrogen receptor and aromatase genes. *J Toxicol Environ Health A.* 2004;67(1):1-22.