مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۲، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۰، ۱۵۵-۱۴۷

تاثیر علف کش آترازین برفرآیند اوئوژنز در گورخرماهی *Danio rerio*

زهره ناجی[۱*]، ناصر مهدوی شهری [۲]، فرشته قاسم زاده [۲]، داور شاهسونی [۳]، مرتضی بهنام رسولی [۲]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی تکوینی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد
۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد
۳- دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: naji_z65@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۵/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۰/۱۲

چکیده

هدف: هدف از این پژوهش مطالعه تاثیر علف کش آترازین بر فرآیند اوئوژنز در گورخر ماهی بود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش اوئوژنز در تخمدان گورخرماهی‌هایی که به مدت ۱۴ روز در معرض غلظت‌های مختلف آترازین (۱۰،۱۰۰و۱۰۰۰ میکروگرم بر لیتر) قرار گرفته بودند مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور نمونه‌ها در محلول بوئن فیکس و در پارافین قالب گیری شدند و در نهایت برش های ۵ تا ۷ میکرومتری با هماتوکسیلین - ائوزین مورد رنگ آمیزی قرار گرفتند. ارزیابی مورد نظر بر اساس مطالعات هیستوپاتولوژیکی تخمدان و بر اساس معیارهایی از جمله تعداد فولیکول‌های نارس و رسیده و قطر فولیکول‌ها انجام گرفت و اطلاعات حاصل از آزمایش توسط آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) مورد بررسی قرار گرفت. سطح معنا داری$P<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

نتایج: این مطالعات نشان داد که غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر لیتر آترازین سبب افزایش چشمگیر اووسیت‌های غیر طبیعی (آنورمال) در مقاطع تهیه شده از تخمدان می‌شود ($P<۰/۰۵$)، به علاوه مقایسه قطر فولیکول‌ها در گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری را نشان نداد.

نتیجه گیری: نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که اوئوژنز در تخمدان گورخرماهی تحت تاثیر آترازین قرار می‌گیرد و در نتیجه آن تعداد تخمک‌های غیر طبیعی افزایش می‌یابد که می‌تواند پتانسیل تولید مثلی جانور را کاهش دهد.

واژگان کلیدی: آترازین، اوئوژنز، فولیکول‌های تخمدان، گورخرماهی

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

در سال‌های اخیر تلاش‌های فراوان به منظور افزایش بهره وری کشاورزی از طریق استفاده گسترده از حشره کش ها، علف کش‌ها، قارچ کش‌ها، و آفت کش‌ها به اضافه محصولات جنبی فرآیندهای صنعتی مدرن منجر به آزاد شدن میزان قابل توجهی مواد سمی به محیط زیست شده است. ثابت شده است که این مواد تاثیرات زیادی بر روی گونه‌ها و جمعیت‌های حیات وحش دارند. بسیاری از این آلوده کننده‌های محیطی قادرند سیستم‌های درون ریز حیوانات را بر هم بزنند و همچنین بر تکوین و تولید مثل آنها موثر می‌باشند (۱). علف کش‌ها از جمله موادی هستند که سوء مصرف آن‌ها در این زمینه قابل توجه بوده است. کشور ما از جمله کشورهایی است که در آن علف کش‌ها به صورت بی رویه مورد استفاده قرار می‌گیرند، بطوریکه میزان مصرف سموم علف کش در کشور ما سالانه به طور میانگین ۱۲ میلیون کیلوگرم ذکر شده است (به طور متوسط در زراعت دنیا برای هر هکتار ۰/۸ کیلوگرم سم مصرف می‌شود که در ایران حدود هفت کیلوگرم است) (۲). لذا اقدام در جهت کاهش مصرف سموم و استفاده بهینه از نهاده‌های کشاورزی یکی از عرصه‌های مهم برای برنامه‌ریزی توسعه پایدار کشاورزی است زیرا ضرورت‌های آن ازمقتضیات توسعه و یا الزمات فنی در درون بخش کشاورزی فراتر رفته و از مسائلی چون حفاظت محیط زیست، بهداشت انسان، تأمین درآمد های ارزی برای اقتصاد ملی و توسعه پایدار، نشأت می‌گیرد (۲).

آترازین (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-s-trazine) یک علف کش شیمیایی بوده که به منظور کنترل علف‌های هرز پهن برگ در مزارع غله، ذرت، نیشکر، آناناس و دیگر محصولات کشاورزی به کار برده می‌شود. این ماده یکی از انواع علف کش‌های ترازین است که در چهل سال گذشته کاربرد وسیعی داشته است و هم اکنون نیز به مقدار زیاد در ایالات متحده آمریکا و دیگر کشورها مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳). بر طبق گزارش(USDA NASS (2008، در سال ۲۰۰۳، حدود ۲۴/۳ میلیون کیلوگرم از آترازین برای محصول ذرت در آمریکا استفاده شده است. در کشور چین این علف کش به صورت گسترده در اکثریت مزارع ذرت، گندم و سویا مورد استفاده قرار می‌گیرد و گزارش شده است که در سال ۲۰۰۸ میزان آترازین مورد استفاده در این کشور حداقل ۵۰۰۰ تن بوده است (۴). استفاده گسترده از این ماده، آن را موضوعی برای مطالعات زیست محیطی ساخته است (۵).

اثرات گزارش شده آترازین بر روی انسان و حیوانات آزمایشگاهی شامل بر هم خوردن سیستم‌های درون ریز، ایجاد آسیب‌های تخمدانی و آسیب‌های کبدی است. همچنین تاثیرات سمی این ماده بر روی سیستم عصبی، سیستم ایمنی و عملکردهای قلبی عروقی گزارش شده است (۳). امکان اثرات متقابل بین آترازین و سیستم‌های درون ریز و تولید مثلی در چندین مطالعه مورد توجه قرارگرفته است. در انسان در معرض قرارگیری طولانی مدت با این علف کش خطر ابتلا به سرطان تخمدان و سینه را افزایش می‌دهد (۶). در رت آزمایشگاهی اثر این ماده بر عملکردهای محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- گناد بررسی شده است و اخیراً حضور این ماده به عنوان عامل کاهش جمعیت‌های برخی دوزیستان معرفی شده است (۷). Hayes و همکارانش (۸) نشان دادند که آترازین سبب ایجاد هرمافرودیسم در زنوپوس می‌شود.

مطالعه بر روی تاثیرات سمی آترازین در ماهی بستگی به مقدار آن دارد و بر حسب نوع گونه و میزان آن، نتایج متفاوتی را نشان می‌دهد، بطوری که غلظت‌های کشنده این ماده در این جانور در محدوده بین ۳ تا ۴۵ میلی گرم بر لیتر گزارش شده است (۹).

در این پژوهش به منظور مطالعه تاثیرات سمی آترازین از گورخرماهی استفاده شده است. تا علاوه بر استفاده از مزیت‌های این مدل با ارزش، آن را در معرض توجه محققان ایرانی قرار دهد. گورخرماهی یا Zebrafish، با سیکل تولید مثلی کوتاه و تعداد زیاد تخم در هر خوشه یکی از بهترین سیستم‌های مهره دار در واکاوی‌های ژنتیکی است. تکوین سریع، لقاح خارجی و تخم‌های شفاف این جانور موجب محبوبیت این مدل در زیست تکوینی و جنین شناسی شده است. به علاوه بسیاری خصوصیات دیگر از قبیل شباهت ژنومی با انسان، صرفه اقتصادی و پرورش آسان، استفاده از این جانور مدل را در رشته‌های گوناگون از قبیل سم‌شناسی، رفتار شناسی و مطالعه بیماری‌ها افزایش داده است (۱۰). مهمترین مزیت استفاده از گورخرماهی به عنوان یک مدل وابسته به سم شناسی، اندازه کوچک آن است که سبب کاهش چشمگیر هزینه‌های مورد نیاز برای پرورش و نگهداری این جانور می‌شود و در نتیجه آزمون‌های سم شناسی می‌توانند در مقیاس وسیع و با قابلیت بالا انجام شوند و امکان ارزیابی چند صد ماده شیمیایی به طور همزمان وجود دارد. اندازه کوچک افراد بالغ و لارو، از طرفی میزان مواد شیمیایی و آلوده کننده مورد نیاز برای در معرض گذاری را کاهش می‌دهد و از طرف دیگر مقدار مواد آزمایشگاهی و شیمیایی لازم برای حفظ ماهی‌ها و انجام سنجش های مختلف و ارزیابی‌های بافتی را به حداقل می‌رساند و از این طریق نیز هزینه‌های بالای مطالعات سم‌شناسی را کاهش می‌دهد، به طوریکه برای مثال تمام بدن ماهی را می‌توان بر روی یک لام مشخص نمود (۱۱).

هدف از این پژوهش مشخص نمودن اثر سمی آترازین بر سیستم تولید مثلی جنس ماده گورخرماهی بر اساس مطالعات

Archive of SID
www.SID.ir

هیستولوژیکی تخمدان بود که در این تحقیق به بررسی تعداد و قطر فولیکول‌های تخمدانی و گروه بندی آنها و همچنین شمارش فولیکول‌های غیرطبیعی پرداخته شده است (۵).

مواد و روش‌ها

تهیه و نگهداری گورخرماهی: در اجرای این پژوهش، گورخر ماهی از مرکز پرورش ماهی صدف واقع در شهرستان مشهد تهیه شد. قبل از شروع آزمایش، ماهی‌ها در یک محدوده دمایی ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۴ ساعت روشنایی، ۱۰ ساعت تاریکی به مدت یک هفته نگهداری شده و با آب و هوای جدید خو گرفتند (۱۲). دمای آزمایشگاه در تمام مدت ثابت نگه‌داشته شد. ماهی‌ها سه بار در روز به میزان یک درصد وزن بدن، با آرتمیای خشک تغذیه می‌شدند و پارامترهای آب (شامل pH و دما) به صورت یک روز در میان اندازه گیری می‌شد (۱۳). همچنین به منظور اطمینان از سلامت نمونه‌ها بر روی تعدادی از آنها به طور تصادفی تست انگلی انجام شد. سپس تعداد ۱۰۰ عدد ماهی ماده به طور تصادفی انتخاب و برای آزمون در معرض گذاری با آترازین آماده شدند. وزن این افراد ۰/۱ ± ۰/۷ گرم و میانگین طول بدن از نوک پوزه تا خاستگاه باله دمی ۰/۲ ± ۳ سانتی‌متر بود و اختلاف آماری معنی‌داری در وزن و طول بدن وجود نداشت.

در معرض گذاری با آترازین: ۱۰۰ عدد ماهی به طور تصادفی در ۵ سیستم آکواریوم تقسیم شدند (آزمایش در قالب ۵ گروه شامل گروه های آزمایش ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر لیتر آترازین به علاوه گروه کنترل و شاهد انجام شد)، به طوریکه ۲۰ عدد ماهی در هر سیستم جای گرفت و آکواریوم ها با ۱۰ لیتر آب شهری پر شدند. قبل از شروع آزمایش تعداد ۵ عدد ماهی به طور آزمایشی در معرض بالاترین غلظت به کار رفته از آترازین در این تحقیق قرار گرفتند تا از عدم مرگ آور بودن این غلظت اطمینان حاصل شود.

آترازین که به صورت پودر جامد و سفید رنگ در بازار وجود دارد (CAS No.: 1912-24-9) محصول شرکت سیگما از شرکت بهارآوران مشهد خریداری شد. سپس با حل کردن این ماده در استون به نسبت یک گرم در لیتر، یک محلول ذخیره از این ماده تهیه شد. به منظور ارزیابی تاثیر این ماده بر تخمدان گورخرماهی، گروه های آزمایشی در معرض غلظت های ۱۰، ۱۰۰و ۱۰۰۰ میکروگرم بر لیتر(ppm) آترازین قرار گرفتند (۵ و ۱۴). نمونه‌های گروه کنترل در آب فاقد استن و آترازین و نمونه‌های شاهد در آب محتوی استن در غیاب آترازین (در غلظت ۱۰۰۰ میکرولیتر بر لیتر) قرار داده شدند. آزمایش به مدت ۱۴ روز (۱۴) در شرایط ثابت انجام شد (دما: ۱±۲۵، pH: ۷ -۸/۲ ، سختی: ۳۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کربنات کلسیم)، و محلول در معرض گذاری، یک روز در میان به طور کامل تعویض می‌شد. بعد از اتمام دوره آزمایش، جهت انجام مطالعات بافتی با میکروسکوپ نوری، تعداد ۱۰ عدد ماهی به طور تصادفی انتخاب و در آب صفر درجه بیهوش شدند. سر و دم نمونه‌ها حذف شده و به فیکساتور بوئن منتقل گردیدند و در ادامه مراحل آبگیری و قالب گیری انجام شد.

مطالعات آسیب شناسی بافتی: قالب‌های پارافینی در جهت عرضی و با ضخامت ۷ – ۵ میکرون برش گیری شدند. برش‌ها بر طبق موقعیت نسبی اندام مورد نظر به دیگر ساختارها استاندارد شد به طوری که قطعات تهیه شده، هر دو لب تخمدان، کبد و کیسه شنا را به طور همزمان نشان می‌دادند. ۲ قطعه جداگانه از این ناحیه برای هر نمونه آماده شد. سپس نمونه‌ها توسط روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین – ائوزین، مورد رنگ آمیزی قرار گرفتند (۱۲). سپس مقاطع تخمدان گورخر ماهی‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری و توسط بزرگ نمایی ۲۰X مورد بررسی قرار گرفتند.

تخمک گذاری در این جانور به صورت غیر همزمان بوده و تخمدان محتوی فولیکول‌های تخمدانی در مراحل مختلف تکوین است (۱۵). نمو اووسیت گورخرماهی بر اساس شکل ظاهری از چهار مرحله تشکیل شده است: مرحله اول اووسیت اولیه است که بر اساس کوچک بودن ابعاد سلول و عدم حضور واکوئل‌های ویتلینی قابل شناسایی است. مرحله دوم بیشتر در دسترس است و توسط علامت‌های آلوئولی که نشان دهنده آغاز تشکیل زرده است مشخص می‌شود. طی مرحله سوم که مرحله زرده سازی است، ابعاد تخمک افزایش می‌یابد که این افزایش به علت افزایش مقدار زرده می‌باشد. در اووسیت بالغ که مرحله چهارم است، هستک‌ها حل شده و سیتوپلاسم اووسیت مملو از اجسام زرده‌ای است. به علاوه فولیکول‌های آترتیک نیز با زونا رادیاتای شکسته و زرده باز جذب شده در مقاطع تهیه شده حضور دارند (۱۵).

بدین ترتیب تعداد فولیکول‌ها در هر مرحله شمارش شد و درصد فولیکول‌ها در هر مرحله از تکوین به عنوان درصدی از کل فولیکول‌ها بیان شد. همچنین قطر فولیکول‌ها در هر مرحله محاسبه شده و میانگین گرفته شد (۵). مقادیر بدست آمده از محاسبات در مرحله بعد مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. به علاوه به منظور تشخیص بهتر فولیکول‌ها در مراحل مختلف، برش‌های یک میکرومتری توسط دستگاه اولترامیکروتوم Leica از تخمدان تهیه شده و توسط آبی تولوئیدین رنگ آمیزی شدند.

Archive of SID

www.SID.ir

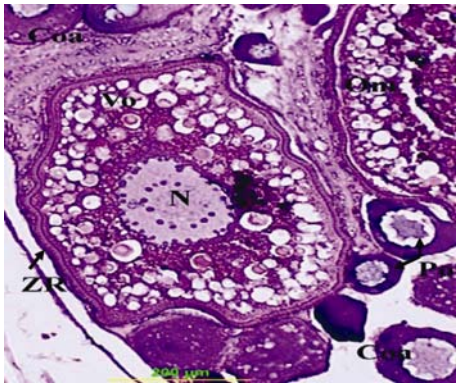
تحلیل داده های آماری: پس از شمارش تعداد فولیکول‌ها و اندازه گیری قطر آنها در مقاطع رنگ آمیزی شده با هماتوکسیلین- ائوزین، محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار گراف پد Instat و آنالیز One-way ANOVA انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون Tukey انجام شد و سطح معنا داری $P<0/05$ در نظر گرفته شد. نمودار با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم گردید. تعداد فولیکول‌ها به صورت درصدی از کل فولیکول‌ها محاسبه شد و به صورت mean ± SEM نمایش داده شد.

نتایج

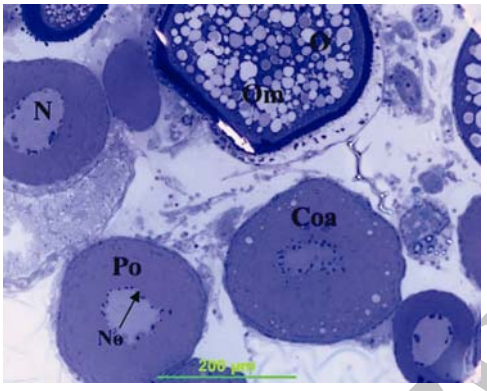
در شروع آزمایش، اووسیت‌ها در مراحل مختلف اووسیت‌های اولیه، آلوئول‌های قشری، اووسیت ویتلوژنیک و اووسیت بالغ به اضافه تعداد محدود اووسیت‌های آترتیک در تخمدان حضور داشتند. بعد از انجام آزمون در معرض گذاری که به مدت ۱۴ روز انجام شد، مقایسه درصد فولیکول‌ها در مراحل مختلف تکوین تفاوت معنی داری را در بین گروه‌ها نشان نداد، اما درصد اووسیت‌هایی که متحمل آترزیا شده بودند در ماده‌هایی که در معرض آترازین قرار گرفته بودند، بسته به میزان آترازین، نسبت به گروه کنترل بیشتر بود (تصویر انواع مختلف اووسیت ها در گروه کنترل و گروه ۱۰۰۰ میکروگرم بر لیتر آترازین در اشکال شماره ۱، ۲ و ۳ نشان داده شده است.) و این تفاوت در گروه‌های تیمار که در معرض غلظت های ۱۰۰($P<0/05$) و ۱۰۰۰ ($P<0/001$) میکروگرم بر لیتر آترازین قرار گرفته بودند معنی دار بود (شکل۴ و جدول۱).

به علاوه در گروه شاهد که در آن ماهی‌ها در معرض غلظت ۱۰۰۰ میکرولیتر بر لیتر استن قرار گرفته بودند نیز افزایش تعداد فولیکول‌های آترتیک نسبت به گروه کنترل مشاهده شد، اما این میزان معنی‌دار نبود. این موضوع نشان دهنده این مطلب است که احتمالاً استن که به عنوان حلال آترازین در آزمایشات مورد استفاده قرار می‌گیرد دارای اثر سمی است. اما به هر حال مقایسه گروه های آزمایش تیمار (با غلظت‌های ۱۰۰و۱۰۰۰ میکروگرم بر لیتر آترازین) با گروه شاهد (که آترازین را دریافت نکرده بودند و در عوض در معرض استن بودند) تفاوت معنی‌داری (به ترتیب $P<0/05$ و $P<0/001$).در درصد اووسیت‌های آترتیک مشاهده شد (شکل۴ و جدول۱). همچنین در این مطالعه مشاهده شد که اووسیت های ویتلوژنیک بسیار بیشتر از اووسیت های پیش ویتلوژنیک متحمل آترزیا شده بودند.

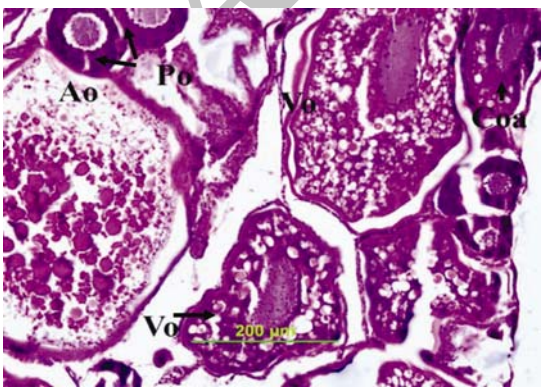
مقایسه میانگین قطر فولیکول ها در مراحل مختلف تکوین اووسیت تفاوت معنی داری را نشان نداد (شکل ۵).



شکل۱: نمای کلی از تخمدان گورخرماهی. اووسیت‌ها در مراحل مختلف تکوین در گروه کنترل. میکروسکوپ نوری، بزرگ نمایی ۲۰X ، رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین. اووسیت اولیه Po، اووسیت آلوئولی Coa، اووسیت ویتلوژنیک Vo، اووسیت بالغ Om، ناحیه شفاف ZR، هسته N.



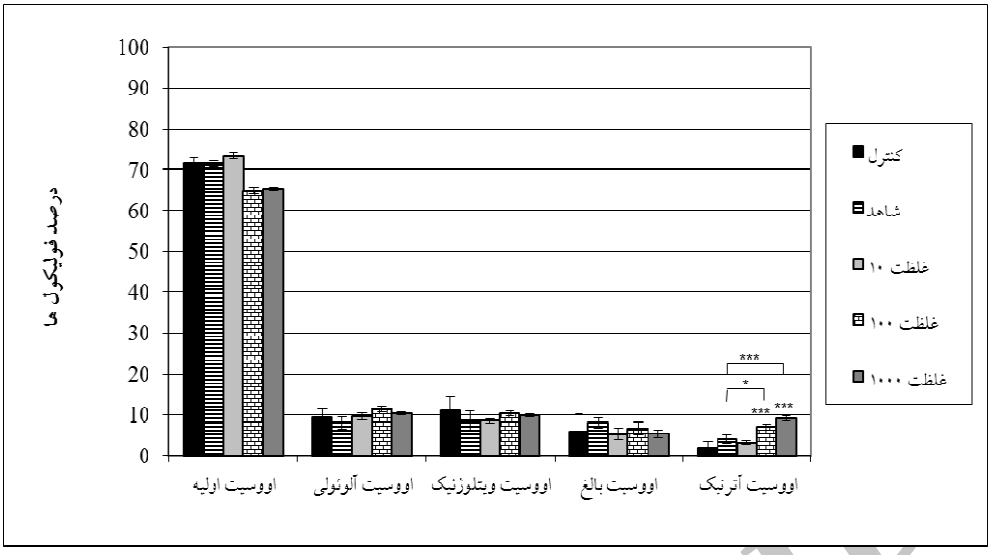
شکل۲: نمای کلی از تخمدان گورخرماهی. اووسیت ها در مراحل مختلف تکوین در گروه کنترل. میکروسکوپ نوری، بزرگ نمایی ۲۰X، رنگ آمیزی آبی تولوئیدین در برش های نازک ۱ میکرومتری که توسط دستگاه اولترامیکروتوم مدل Leica برش گیری شده است. اووسیت اولیه Po، اووسیت آلوئولی Coa، اووسیت بالغ Om، هسته N، هستک No، اووپلاسم O.



شکل۳: نمای کلی از تخمدان گورخرماهی در گروه با غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر لیتر آترازین. میکروسکوپ نوری، بزرگ نمایی ۲۰X، رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین. اووسیت اولیه Po، اووسیت آلوئولی Coa، اووسیت ویتلوژنیک Vo، اووسیت آترتیک Ao

Archive of SID

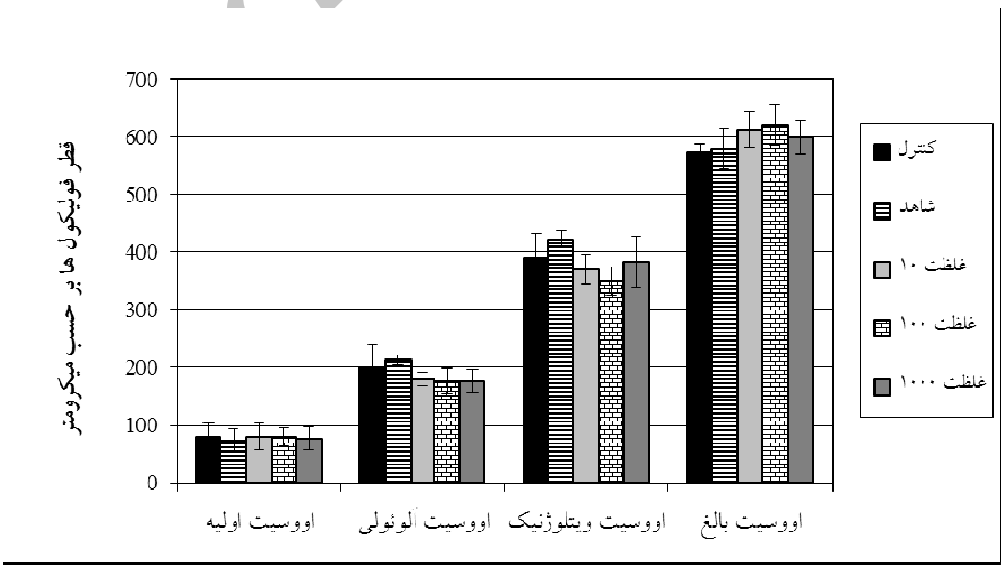
www.SID.ir



*شکل۴: درصد انواع مختلف اووسیت‌ها در تخمدان گورخرماهی که در معرض غلظت های ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بـر لیتـر آتـرازین قـرار گرفتنـد. ستاره ها تفاوت های معنی دار گروه کنترل و شاهد را با گروه های تیمار نشان می دهند. *$P<0/05$ ***$P<0/001$*

جدول ۱: میانگین درصد اووسیت ها در گروه های آزمایش، کنترل و شاهد

	کنترل	شاهد	غلظت ۱۰	غلظت ۱۰۰	غلظت ۱۰۰۰
اووسیت اولیه	۷۱/۷۸±۱/۳۰	۷۱/۶±۱/۹۳	۷۳/۴۳±۳/۳۹	۶۳/۴۹±۴/۱۲	۶۵/۵±۱/۶۸
اووسیت آلوئولی	۹/۲۹±۰/۷۴	۷/۹۸±۱/۴۶	۹/۵۷±۲/۴۶	۱۱/۲۹±۱/۱۱	۱۰/۱۹±۱/۱
اووسیت ویتلوژنیک	۱۱/۶۰±۰/۶۳	۸/۵۵±۰/۸۱	۸/۴۷±۰/۵۱	۱۰/۱۹±۱/۵۲	۹/۸۴±۰/۴۳
اووسیت بالغ	۶/۰۲±۰/۸۴	۷/۸۹±۰/۶۵	۵/۳۳±۰/۵۸	۶/۶۵±۱/۵۲	۵/۳۵±۰/۶۹
اووسیت آترتیک	۱/۸۲±۰/۳۹	۳/۹۴±۰/۳۲	۳/۱۶±۰/۴	۶/۹۳±۰/۹۹	۹/۰۸±۰/۵۲



شکل۵: مقایسه متوسط قطر (میکرومتر) انواع مختلف اووسیت ها در تخمدان گورخرماهی که در معرض غلظت هـای ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگـرم بـر لیتر آترازین قرار گرفتند.

Archive of SID
www.SID.ir

بحث

آترازین تاثیرات منفی بر عملکردهای درون ریز در مهره‌داران (۱۶) و از جمله ماهی‌ها دارد که منجر به عدم تنظیم عملکردهای تخمدانی می‌شود. غلظت آستانه این ماده که سبب القاء تاثیرات سمی بر سیستم درون ریز در ماهی می‌شود ۵ – ۱ میکروگرم بر لیتر است (۱۷). در واقع این ماده به عنوان یک بر هم زننده اندوکرینی (درون ریز) شناخته شده است که البته مانند برهم زننده‌های اندوکرینی کلاسیک، گیرنده‌های آندروژن و استروژن را تحت تاثیر قرار نمی‌دهد. مکانیسم عمل آترازین هنوز به طور کامل شناخته نشده است اما به نظر می‌رسد که این ماده فعالیت آروماتاز P450 را افزایش می‌دهد و بنابراین تولید استروژن را بالا می‌برد (۱۸). چندین مطالعه در ماهی‌ها، دوزیستان، خزندگان و پستانداران همگی پیشنهاد می‌کنند که آترازین می‌تواند سیستم طبیعی درون ریز را تغییر دهد. برای مثال در دوزیستان سطوح اندک (۲۵-۰/۱ میکروگرم بر لیتر) و یا زمان در معرض گذاری کوتاه (۴۸ ساعت) به ترتیب تعداد قورباغه‌های دوجنسی را افزایش می‌دهد (۸) و به تکوین گونادی طبیعی آسیب می‌رساند (۱۹). همچنین در مطالعه دیگر نشان داده شده است که این ماده می‌تواند غلظت هورمون‌های استروئیدی را در خون محیطی ماهی‌های در معرض قرار گرفته را تغییر دهد، به طوری که غلظت‌های سرکوب شده آندروژن‌های پلاسما و القاء استروژن بعد از ۱۷ روز در معرض گذاری با غلظت ۱۰۰۰میکروگرم بر لیتر آترازین در ماهی طلایی مشاهده شده است (۵).

در این مطالعه به بررسی بافتی تخمدان گورخر ماهی‌هایی که به مدت ۱۴ روز در معرض آترازین قرار گرفته بودند پرداخته شد و نتایج نشان داد که غلظت‌های بالای آترازین (۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر لیتر) احتمالاً سبب القاء آترزیا در تخمدان گورخر ماهی می‌شود. در همین راستا Spano و همکارانش (۵)، به مطالعه تاثیر آترازین بر روی استروئیدهای جنسی، غلظت ویتلوژنین پلاسما و تکوین گوناد در ماهی طلایی بالغ (*Carassiusauratus*) پرداختند. آنها دریافتند که غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر لیتر این ماده سبب القاء به هم ریختگی ساختاری در بیضه و بالا رفتن سطح آترزیا در تخمدان ها می شود که مشابه نتایج بدست آمده در این پژوهش است. در توافق با نتایج حاصل از این پژوهش در پژوهشی Tillitt و همکارانش (۲۰) تاثیر این ماده را بر سیستم تولید مثلی ماهی کپور (*Pimephalespromelas*) مورد مطالعه قرار داده‌اند و گزارش کرده‌اند که تولید تخم در گروه‌های تیمار که در معرض غلظت‌های جزئی آترازین (۰/۵، ۵، ۵۰ میکروگرم بر لیتر) به مدت ۱۴ و ۳۰ روز قرار گرفته بودند کاهش یافته است. به علاوه یک افزایش مرتبط با غلظت در فولیکول‌های آترتیک که می‌تواند با کاهش تولید تخم مرتبط باشد نیز گزارش شده است که مطابق نتایج حاصل از این پژوهش است. همچنین در این مقاله حضور چندین کیست تخمدانی در افراد تحت تیمار گزارش شده است که به طور معمول در مقالات مرتبط با ماهی دیده نمی‌شود. با این وجود کیست‌های تخمدانی در خوک‌هایی که مقدار کمی آترازین را دریافت کرده بودند نیز گزارش شده است (۲۱). با این حال در این پژوهش کیست تخمدانی مشاهده نشد که علت این امر می‌تواند ناشی از تفاوت روش آزمایش و همچنین متفاوت بودن گونه مورد آزمایش باشد. آترزیای فولیکولی در ماهی های ماده تیمار شده می‌تواند ناشی از یک بی‌نظمی در فرآیندهای طبیعی بلوغ اووسیت باشد.

آترزیا یک فرآیند کنترل شده هورمونی و فاسد کننده طبیعی است که برای توصیف شکست و دوباره جذب شدن گامت‌ها استفاده می‌شود و آترزیای فولیکولی یک فرآیند تخریبی است که سبب می‌شود فولیکول‌های تخمدانی مهره داران یکپارچگی خود را از دست داده و پیش از تخمک گذاری حذف شوند (۲۲). هرچند این فرآیند به عنوان یک مکانیسم طبیعی و فیزیولوژیک تعریف می‌شود (۲۳)، گزارش شده است که مکانیسم‌های آترزیا ممکن است توسط عوامل مختلفی از جمله هیپوفیز برداری، واکنش نوری، فقر غذایی، استرس‌ها و آلودگی‌ها آغاز شود (۲۴). بیان شده است که مرگ برنامه ریزی شده سلول‌های گرانولوزا که حمایت هورمونی را برای اووسیت ها فراهم می‌کنند، مکانیسم طبیعی است که توسط آن آترزیای فولیکولی تخمدانی در پستانداران، پرندگان (۲۵) و احتمالاً ماهی‌ها (۲۶) اتفاق می‌افتد. پس شاید بتوان این طور نتیجه گیری کرد که آترازین می‌تواند با تاثیر بر فرآیندهای آغازی و تنظیم کننده آترزیا بر اوئوژنز تخمدان تاثیر گذاشته و موفقیت تولید مثلی را کاهش داد. علاوه بر این هر چند در مورد مکانیسم عمل آترازین اطلاعات چندانی موجود نیست، اما Jin و همکارانش (۱۴) نشان دادند که این ماده سبب ایجاد استرس اکسیداتیو در کبد و تخمدان می‌شود و غلظت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت را تغییر می‌دهد، که این عامل خود می‌تواند سر آغاز مرگ سلولی و تخریب عملکرد آن باشد.

در پژوهش حاضر مشاهده شد که اووسیت‌های ویتلین‌دار بیشتر متحمل فرآیند آترزیا شده بودند. موافق با این نتیجه، در پژوهشی که در سال ۲۰۰۹ صورت گرفته و به مطالعه رابطه بین آترزیا و آپوپتوزیس در گورخرماهی پرداخته است، گزارش شده است که احتمال وقوع آترزیا در اووسیت ویتلوژنیک بیشتر است. دلیل آن این طور بیان شده است که چون فرآیند آترزیا در بسیاری از مهره‌داران تخم گذار یک فرآیند تجزیه پروتئولیتیک درون اووسیت است، احتمال وقوع آن در فولیکول‌های سرشار از زرده ویتلوژنیک بیشتر است (۲۷) که این استدلال می‌تواند در تفسیر نتایج مطالعه حاضر نیز مورد توجه قرار گیرد. اما به هر

www.SID.ir
Archive of SID

حال هر چند فولیکول‌های آترتیک شاخص مهم تاثیرات محیطی بر روی تخمدان ماهی‌ها هستند، مکانیسم هایی که این فرآیند را آغاز و تنظیم می‌کنند هنوز به طور کامل شناخته نشده‌اند و ارائه اطلاعات در این زمینه نیاز به مطالعات بیشتری دارد (۲۲).

همان طور که گفته شد، آترزیا فولیکولی شاخص مطالعه تاثیرات محیطی بر تخمدان ماهی است و می‌توان آن را در مطالعاتی که به بررسی تاثیرات مواد مختلف بر تخمدان ماهی پرداخته اند، مشاهده نمود. برای مثال Heiden و همکاران (۱۲) تاثیر ماده سمی 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-Dioxin را در غلظت‌های غیرکشنده بر روی تکوین تخمدان و غلظت‌های ویتلوژنین و استرادیول در گورخرماهی‌های ماده مورد بررسی قرار داده و گزارش نموده اند که این ماده سبب کاهش تولید تخم و افزایش فولیکول‌های آترتیک تخمدانی می‌شود. در همین زمینه Daouka و همکاران (۲۸) مشخص کردند که polychlorinated biphenyls (PCBs) سبب القاء آسیب تخمدانی در گورخر ماهی شده و تعداد فولیکول‌های آترتیک را افزایش می‌دهد. همچنین Dutta و همکاران (۲۹) تاثیرات غیرکشنده دیازینون را در تخمدان ماهی *Lepomismacrochirus* مورد ارزیابی بافتی قرار داده‌اند و این مطالعه نیز افزایش فولیکول‌های آترتیک را به عنوان یکی از نتایج این در معرض گذاری بیان کرده است. Mlamboa و همکاران (۳۰) تغییرات هیستولوژیکی سیستم تولید مثلی ماهی *Oreochromismossambicus* را به دنبال در معرض قرارگیری افراد با 1,1-bis (4-chlorophenyl)-2,2,2-trichloroethane (DDT) مورد مطالعه قرار داده است و به بررسی آترزیا پرداخته است، همچنین Dutta و همکاران (۳۱) با استفاده از مطالعات هیستولوژیکی تاثیر آفت کش Endosulfan را بر تخمدان *Lepomismacrochirus* مورد ارزیابی قرار داده و بیان کرده است که با افزایش غلظت این ماده، تعداد فولیکول‌های آترتیک افزایش می‌یابد.

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که اوئوژنز در تخمدان گورخرماهی احتمالاً تحت تاثیر آترازین قرار می‌گیرد و در نتیجه آن تعداد فولیکول‌های آترتیک افزایش می‌یابد که این امر می‌تواند پتانسیل تولید مثلی جانور را کاهش دهد. در نتیجه این مطالعه خطرهای تولید مثلی در معرض قرار گیری با این ماده را در جمعیت‌های ماهی نشان می‌دهد. در نهایت می‌توان این طور نتیجه گیری کرد که آلاینده‌های محیطی که هر روز بر تعداد و میزان آنها افزوده می‌شود می‌توانند تاثیرات قابل توجهی بر سلامت تولید مثلی و بقای نسل موجودات زنده داشته باشند.

تشکر و قدر دانی

مولفین مراتب تشکر و امتنان خود را از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد بخاطر تامین بخشی از هزینه‌های این پژوهش ابراز می‌نماید.

منابع

1. Cooper RL, Kavlock RJ. Endocrine disruptors and reproductive development: A weight-of-evidence overview. Journal of Endocrinology. 1997; 152: 159–566.

2. HaghySharaphy GH, Shokuh Far A. “Replacing of surgarcanes herbicide for reducing chemical poisons consumption and beneficial usu from agricultural organization in surgarcannes farms in Khuzestan”.Journal of Crop physiology. 2009; 1: 100-109.persian

3. EPA USA. Atrazine Chemical Summary.Toxicity and Exposure Assessment for Children’s Health. 2007; 1-12.

4. Song Y, Zhu LS, Xie H, Wang J, et al. Effects ofatrazine on DNA damage and antioxidative enzymes in Viciafaba. Environmental Toxicology and Chemistry. 2009; 28: 1055–1062.

5. Spano L, Tyler CR, Aerle Rv, Devos P, et al. Effects of atrazine on sex steroid dynamics, plasmavitellogenin concentration and gonad developmentin adult goldfish (Carassiusauratus). Aquatic Toxicology. 2004; 66: 369–379.

6. Kettles MA, Browning SR, Prince TS, Horstman SW. Triazine herbicide exposure and breast cancer incidence: an ecological study of Kentucky counties. Environmental Health Perspectives. 1997; 105 (11): 1222-1227.

7. Cooper RL, Stoker TE, Tyrey LM, Goldman J, et al. Atrazine disrupts the hypothalamic control of pituary-ovarian function. Toxicological Sciences. 2000; 53: 297–307.

8. Hayes TB, Collins A, Lee M, Mendoza M, et al. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine atlow ecologically relevant doses. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2002 ; 99: 5476–5480.

9. Elia AC, Waller WT, Norton SJ. Biochemical responses of bluegill sunfish (Lepomismacrochirus, Rafinesque) to atrazine induced oxidative stress. Bulletin of Environmental Contamination Toxicology. 2002; 68: 809-816

10. Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C.Thebehaviour and ecology of the zebrafish, Daniorerio.Biological Reviews. 2008; 83 (1): 13-34.

Archive of SID

www.SID.ir

11. Hill AJ, Teraoka H, Heideman W, Peterson RE. Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity.Toxicological sciences. 2005; 86 (1): 6–19.
12. Heiden TK, Carvan MJ, Hutz RJ. Inhibition of Follicular Development, Vitellogenesis, and Serum 17ß-Estradiol Concentrations in Zebrafish Following Chronic, Sublethal Dietary Exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin. Toxicological Sciences. 2006; 90(2): 490-499.
13. Lawrence C. The husbandry of zebrafish (Danio rerio): A review. Aquaculture. 2007; 269: 1–20.
14. Jin Y, Zhang X, Shu L, Chen L, et al. Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposurein adult female zebrafish (Danio rerio). Chemosphere. 2010; 78: 846–852.
15. Koc ND, Aytekin Y, Yüce R. Ovary Maturatıon Stages and Histological Investigation of Ovary of the Zebrafish (Daniorerio). Brazilian archives of biologyand technology. 2008; 51(3): 513-522.
16. Cooper RL, Laws SC, Das PC, Narotsky MG, M.Goldman J, et al. Atrazine and reproductive function: mode and mechanism studies. Birth Defects Research. 2007; 80: 98–112.
17. Suzawa M, Ingraham HA. The HerbicideAtrazine Activates Endocrine GeneNetworks via Non-Steroidal NR5A Nuclear Receptors inFish and Mammalian Cells. PLoS ONE. 2008; 3 (5): 211-217.
18. Ceh K, Majdic G. Pesticides as endocrine disruptors. Slovenian Veterinary Research. 2010; 47 (4): 163-166.
19. Tavera-Mendoza L, Ruby S, Brousseau P, Fournier M, et al. Response of the amphibian tadpole Xenopuslaevis to atrazine during sexual differentiation of the ovary. Environmental Toxicology & Chemistry. 2002; 21: 1264–1267.
20. Tillitt DE, Papoulias DM, Whyte JJ, Richter CA. Atrazine reduces reproduction in fathead minnow (Pimephalespromelas). Aquatic Toxicology. 2010; 99: 149–159.
21. Gojmerac T, Kartal B, uri S, uri M, et al. Serum biochemical changes associated with cystic ovarian degeneration in pigs after atrazine treatment.Toxicology Letters. 1996; 85: 9-15.
22. Santos HB, Sato Y, Moro L, Bazzoli N, Rizzo E. Relationship among follicular apoptosis,integrin beta1 and collagen type IV during early ovarian regression in the teleost Prochilodus argenteus after induced spawning. Cell Tissue Research. 2008; 332 (1): 159-70.
23. Wood AW, Kraak GVD. Apoptosis and ovarian function: novel perspectives from the teleosts. Biology of Reproduction. 2001; 64: 264-71.
24. Wood AW, Kraak GVD. Inhibition of apoptosis in vitellogenic ovarian follicles of rainbow trout (Oncorhynchusmykiss) by salmon gonadotrophin, epidermal growth factor and 17bestradiol.Molecular Reproduction and Development. 2002; 61: 511-8.
25. Hsueh AJW, Billig H, Tsafriri A. Ovarian follicle atresia: A hormonally controlled apoptotic process. Endocrine Reviews. 1994; 15: 707–24.
26. Janz DM, Kraak GVD. Suppression of apoptosis by gonadotropin, 17-estradiol, and epidermal growth factor in rainbow trout preovulatory ovarian follicles.General and Comparative Endocrinology. 1997; 105: 186–93.
27. Ucuncu SI, Cakıcı O. Atresia and Apoptosis in Preovulatory Follicles in the Ovary of Daniorerio (Zebrafish).Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 2009; 9: 215-21.
28. Daouka T, Larcher T, Roupsard FO, Lyphout L, et al. Long-term food-exposure of zebrafish to PCB mixtures mimicking some environmental situations induces ovary pathology and impairs reproduction ability. Aquatic Toxicology. 2011; 105: 270– 8.
29.Dutta HM, Maxwell LB. Histological examination of sublethal effects of diazinon on ovaryof bluegill, Lepomismacrochirus. Environmental Pollution. 2003; 121: 95–102.
30. Mlamboa SS, VurenaJHJv, Barnhoornb IEJ, Bornmanb MS. Histopathological changes in the reproductive system (ovaries and testes)of Oreochromismossambicus following exposure to DDT. Environmental Toxicology and Pharmacology. 2009; 28: 133–139.
31. Dutta HM, Dalal R. The Effect of Endosulfan on the Ovary of Bluegill Sunfish:AHistopathological Study (Lepomismacrochirus). International Journal of Environmental Research. 2008; 2(3): 215-224.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Research Article*
Summer 2011; 2(2): 147-155

Effects of Herbicide Atrazin on Oogenesis in Zebrafish (*Danio rerio*)

Naji Z[1]*, MahdviSHahri N[2], GHassemzadeh F[2], Shahsavani D[3], BehnamRassouli M[2]

1. M.Sc graduated student in Developmental Biology, Faculty of Sciences, Mashhad Ferdowsi University, Mashhad, Iran

2. Department of Biology, Faculty of Sciences, Mashhad Ferdowsi University, Mashhad, Iran

3. Department of Faculty of Veterinary Medicine, Mashhad Ferdowsi University, Mashhad, Iran

* Email corresponding author: naji_z65@yahoo.com

Received: 21 Aug. 2011 Accepted: 2 Jan. 2012

Abstract

Aim: The aim was to investigate the effects of atrazin herbicide on oogenesis in zebrafish.

Material and Methods: In this investigation, the oogenesis in ovary of zebrafishes exposed to various concentration of atrazin (10, 100, 1000 ppm) for 14 days were assessed. The ovary samples were fixed in Bouin's solution, mounted in parafin and cut into 5-7 µm-thick slices and then stained with Hematoxylin and Eosin (H&E). This assessment was performed based on histopathological study of ovary and the criteria such as number as well as diameter of mature and immature follicles. In addition the experimental data was analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) and significant level was set at $P < 0.05$.

Results: This study showed that the concentration of 100 and 1000 µg/l of atrazine caused a significant increase ($P < 0.05$) in atretic oocyte in the tissue sections. In addition the diameter of follicles in different groups showed no significant difference.

Conclusion: The results demonstrated that the oogenesis in ovary of zebrafish is affected by atrazin, which as a result, the numbers of atretic oocyte increased and finally can reduce the reproductive potential of the animal.

Keyword: Atrazine, Oogenesis, Ovarian follicles, zebrafish

Archive of SID

www.SID.ir