

بررسی تاثیر تخریبی سم دیازینون بر ساختار بیضه ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*) با استفاده از تکنیک کشت بافت (در شرایط *In Vitro*)

فاطمه فداکارماسوله^{۱*}، باقر مجازی امیری^۲، علیرضا میرواقفی^۳ و محمدعلی نعمت‌الهی^۴

^۱ دانش آموخته کارشناسی ارشد شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران

^۲ استاد دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران

^۳ دانشیار دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران

^۴ استادیار دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۱۲/۲۰، تاریخ تصویب: ۱۳۹۰/۳/۱۰)

چکیده

ماهی سفید دریای خزر یکی از ماهیان اقتصادی حوزه‌ی جنوبی دریای خزر است که همه ساله جهت تخم‌ریزی به رودخانه‌های حوزه جنوبی این دریا وارد می‌شود و در این حین با انواع آلاینده‌های صنعتی و کشاورزی روبرو می‌شود. در این مطالعه جهت بررسی چگونگی روند تولید اسپرم (اسپرماتوزن) مولدین نر ماهی سفید در آب‌های آلوده، اقدام به کشت بافت بیضه این ماهیان تحت تماس با غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از سم دیازینون به مدت ۳ و ۶ روز در شرایط *In Vitro* گردید. میزان ضایعات وارده بر بافت بیضه و کاهش روند اسپرماتوزن با افزایش غلظت و افزایش زمان تماس سم با بافت بیشتر شده به طوری که در غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در ششمین روز پس از کشت تعداد بسیار زیادی از سلول‌های جنسی نکرور یافته و روند اسپرماتوزن در بافت متوقف گردید. از آنجایی که تولید مثل موفق ماهیان در گرو کیفیت و کمیت مناسب گامت‌های مولدین است، ادامه‌ی روند آلودگی در طی سال‌های متمادی جمعیت این ماهیان را با تهدید جدی مواجه خواهد ساخت.

واژه‌های کلیدی: ماهی سفید، دیازینون، دریای خزر، بیضه، کشت بافت

مقدمه

(Miura et al., 1991; Yazawa et al., 2002;)
(Song and Gutzeit, 2003).

تا کنون مطالعات متعددی در زمینه آسیب پذیری بافت تولید مثلی جانوران صورت گرفته است و به طور کلی کاهش راندمان تولید مثلی را گزارش کرده‌اند. در این مطالعه نیز سعی شد به بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیکی بیضه ماهی سفید تحت تاثیر غلظت‌های مختلف از سم دیازینون پرداخته شود.

مواد و روش‌ها

دو ماهی سفید نری که در مرحله ۴ رسیدگی جنسی قرار داشتند در بدو ورود شان به رودخانه شیروود در زمستان ۸۷ صید شد و پس از انتقال به آزمایشگاه شیلات دانشگاه تهران و سپری شدن استرس حمل و نقل به مدت ۱ هفته جهت کشت بافت با پودر گل میخک ۱ به ۵۰۰۰ بیهوش شدند.

به منظور کشت بافت در شرایط *in vitro* بیضه ماهی به قطعات ۶ الی ۲۰ میلی گرمی برش داده شد و داخل ظرف های ۲۴ چاهکه مخصوص کشت بافت (NUNCE, Denmark) که هر کدام از چاهک ها حاوی ۱ میلی لیتر از محیط کشت L₁₅ (Gibco, USA) و بافر HEPES (Merck, Germany) با غلظت ۱۰ میلی مولار (pH:7.5) و آنتی بیوتیک‌های پنی سیلین ۱^{۰۰۰۰} UL⁻¹ و استرپتومایسین ۱۰۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر (Gibco, USA) بود منتقل شدند (Yamauchi et al., 2007;) (Mojazi Amiri et al., 1999).

سم دیازینون نیز با غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تهیه و پس از فیلتر کردن با فیلتر سر سرنگی ۰/۲ میکرون (Wattman) به چاهک‌های ظروف کشت اضافه شد. گروه‌های کنترل در این آزمایش، بافت‌های بیضه کشت داده شده در L-15 بدون هیچ گونه تماس با آلاینده‌ها بود. نمونه‌ها در انکوباتور مرطوب ۳۰°C به مدت ۶ روز انکوبه شدند.

دیازینون یکی از سموم ارگانو فسفره‌ای است که در فعالیت های کشاورزی و خانگی برای کنترل حشرات مورد استفاده می گیرد. این سم به علت توزیع گسترده در محیط آبی، قادر به اثرگذاری وسیع در جانداران غیر هدف از قبیل بی مهرگان، پستانداران، پرندگان و ماهی‌ها می‌باشد (Castano, 1986; تماس ماهی‌ها با دوزهای تحت کشنده‌ی دیازینون، موجب کم خونی (Anees, 1978)، کاهش DNA, RNA و میزان پروتئین کبد (Ansari and Kumar, 1988) تاثیر بر سیستم عصبی، ایجاد ناهنجاری در آبشش، افزایش میزان ماکروفاژ و تاثیر بر رفتارهای تولید مثلی است (Dutta et al., 2003).

غلظت دیازینون در رودخانه‌های استان مازندران (حوزه آمل) ۱/۱۴ میکروگرم در میلی لیتر اندازه گیری شده است که البته با گذشت زمان و تغییر شرایط فیزیکی شیمیایی آب کاهش می‌یابد.

ماهیان مولد سفید دریای خزر اواخر زمستان مهاجرت خود را جهت تخم‌ریزی به رودخانه‌ها آغاز کرده و پس از گذراندن مدتی به بلوغ جنسی کامل رسیده و قابلیت تخم‌ریزی خواهند یافت. از آنجایی که ورودی اکثر آلاینده‌های اکوسیستم خزر رودخانه بوده و با توجه به اثرات نامطلوب دیازینون بر فرآیند تولید مثلی جانوران بالاخص ماهیان، توجه به فیزیولوژی تولید مثلی این ماهیان مهم اقتصادی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

امروزه در مطالعات آسیب شناسی، جهت اجتناب از تماس مستقیم ماهیان با آلاینده‌ها از تکنیک کشت بافت، بعنوان ابزاری کار آمد در ارزیابی تاثیر آلاینده‌ها بر بافت‌های مختلف استفاده می‌شود (Magwood and George, 1996; Castano et al.,) (2003) و در این ارتباط بافت گناد ماهی قطع و تحت شرایط آزمایشگاهی (*In vitro*) انکوبه می‌شود

نتایج

با بررسی بافت‌های کشت داده شده تحت تاثیر سطوح مختلف از سم دیازینون توقف نسبی اسپرماتوژنز با افزایش غلظت سم مشاهده شد. بطوری که با افزایش سطح آلاینده تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی ثانویه که تقسیم نشده‌اند نسبت به گروه شاهد (شکل ۱) بیشتر شد. در تیمارهای شاهد نیز ادامه روند اسپرماتوژنز و تقسیم سلولی کاملاً مشهود بود. تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در تیمارهای ۲۰۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به ترتیب بیشتر از تیمار ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود که حاکی از عدم انتقال تقسیم سلولی به مراحل بعدی طی فرآیند اسپرماتوژنز می‌باشد.

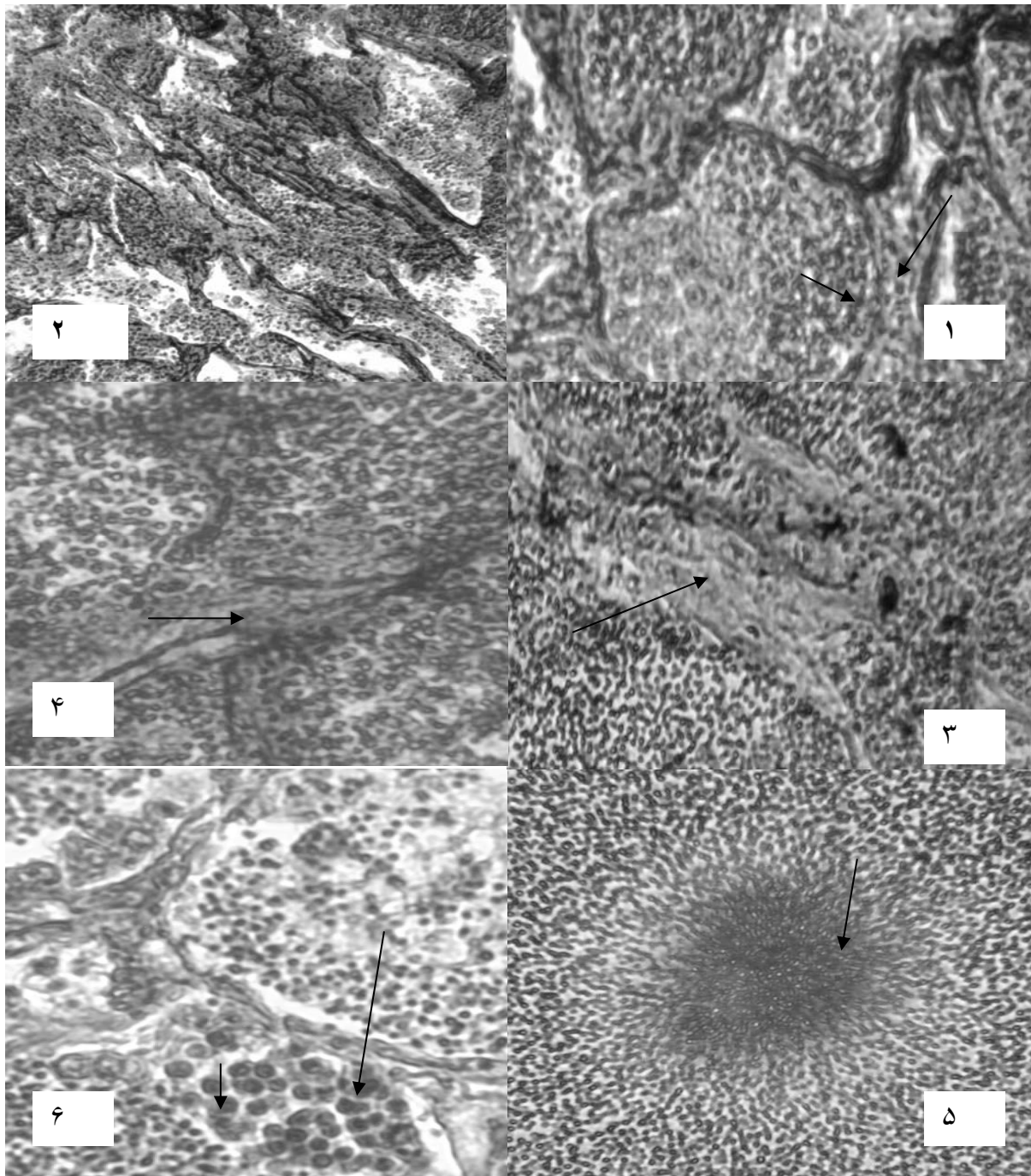
به منظور مقایسه تغییرات بافت شناسی و بررسی اثرات مدت زمان تماس با آلاینده‌های مورد نظر در قطعات بیضه، هر کدام از تیمارهای مورد نظر به دو دسته تقسیم شد و دسته اول پس از گذشت ۳ روز، دسته دوم پس از ۶ روز، جهت مطالعات بافت شناسی با میکروسکوپ نوری در محلول بوئن فیکس شدند. پس از انجام مراحل تهیه اسلایدهای بافت‌شناسی، لام‌های تهیه شده با همتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی و با استفاده از میکروسکوپ نوری به بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیک پرداخته شد.



شکل ۱- ادامه روند اسپرماتوژنز و تقسیم سلول‌های اسپرماتوگونی در تیمارهای شاهد، (۱) روز سوم؛ (۲) روز ششم، پیکان بزرگ: سلول‌های اسپرماتوسیت؛ پیکان کوچک: سلول‌های اسپرماتید

تخریب و اضمحلال سلولی در اسپرماتوگونی‌های اولیه، از هم گسیختگی و ساختارهای لوبولی نامنظم و حرکت دیواره لوبولی و نکروز در اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتیدها نیز با افزایش غلظت آلاینده مشهود است (شکل ۲).

به جهت کاهش تعداد اسپرماتوگونی‌های ثانویه در بافت‌های کشت داده شده در تیمار ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، تعداد اسپرماتوسیت‌های مشاهده شده در این تیمار نسبت به تیمارهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به جهت افزایش تعداد تقسیم سلول‌های اسپرماتوگونی بیشتر می‌باشد.



شکل ۲- کاهش قطر دیواره لوبولی تحت تاثیر ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر (بزرگنمایی ۸۰۰ X) (۱) و از بین رفتن شکل لوبول ها تحت تاثیر ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر دیازینون (بزرگنمایی ۴۰۰ X) (۲) طی روز سوم پس از کشت: اضمحلال سلولی (۳) و از هم گسیختگی دیواره لوبولی (۴) تحت تاثیر ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر دیازینون در روز سوم؛ جمع شدن اسپرمتوزوئیدها (۵) و اسپرمانوسیتها، اسپرمتیدها و اسپرمتوزوآهای نکروز یافته (۶) تحت تیمار ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر دیازینون در روز هشتم (سیاه شدن هسته سلولها نشانه نکروز سلول می باشد؛ بزرگنمایی ۱۰۰۰ X).

بحث و نتیجه‌گیری

دیازینون قادر به تجمع در بافت ماهیچه، کبد، گناد و آبشش می‌باشد (Sapozhnikova et al., 2004) و از این طریق بر هوموستازی، تولید مثل، رشد و یا رفتار ماهیان تاثیر گذار است (Abadin et al., 2009).

بررسی‌های انجام شده روی بیضه ماهی سفید نر تحت اثر غلظت‌های مختلف از دیازینون نشان دهنده بروز آسیب‌های هیستوپاتولوژیکی است که با افزایش غلظت آلاینده در بافت مشهود تر بوده است. به طوری که با افزایش غلظت این سم بر ضایعات وارده بر ساختمان لوبول‌ها افزوده شده و در نهایت به مرگ سلول‌های جنسی و توقف فرآیند اسپرماتوزنز انجامیده است (شکل ۲-۵ و ۲-۶).

افزایش مدت زمان تماس با آلاینده نیز تغییرات ساختاری و آسیب‌های سلولی وارد بر بافت بیضه را تشدید کرده است.

کلاسترهای سالم و بی نقص حاوی اسپرماتوسیت‌ها در گروه شاهد نسبت به سایر تیمارها به مراتب بیشتر بوده که نشانه‌ی ادامه روند مطلوب تقسیم سلولی در مقایسه با سطوح دیگر است (شکل ۱) به طوری که با افزایش غلظت آلاینده تاثیر آن بر جلوگیری از تبدیل اسپرماتوگونی‌ها به اسپرماتوسیت و اسپرماتیدها بیشتر شده است (شکل ۲).

پژوهش‌های متعددی مبنی بر میزان تاثیر گذاری سم دیازینون بر وضعیت تولید مثلی ماهیان گزارش شده است و همگی تاثیرات سوء این سم را در پیشرفت فرآیند تولید مثلی تاکید کرده‌اند. کاهش قطر لومن، کاهش قطر لوله‌های اسپرم بر و کاهش قطر اسپرماتوگونی‌ها تحت تماس مستقیم ماهی *Lepomis macrochirus* با ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر سم دیازینون گزارش شده است (Dutta et al., 2003).

تاثیرات مخرب دیازینون بر ماهی سالمون، تخریب ژنتیکی، تغییر رفتارهای تولید مثلی و کاهش تولید مایع

اسپرمی در غلظت‌هایی حدود ۳۰۰ هزار قسمت در ترلیون گزارش شده است (Cox, 2000).

بروز ناهنجاری‌های ساختاری، از بین رفتن مجاری اسپرم بر و بافت بینابینی، تخریب سلول‌های لایدیگ و آتروفی سلول‌های بافت بیضه از مهمترین تغییرات ساختاری ثبت شده در ماهیان کپور (*Cyprinus carpio*) در معرض سم دیازینون است (Banai et al., 2009).

نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر نیز بر تغییرات مخرب بر بافت بیضه ماهی سفید تحت اثر سم دیازینون تاکید دارد.

اضمحلال سلولی و از بین رفتن شکل طبیعی سلول‌های جنسی به طوری که قابلیت شناسایی آن‌ها را مشکل می‌سازد از جمله ضایعات مشهود در بافت‌های آلوده شده است که با افزایش غلظت دیازینون بروز آن‌ها به مراتب بیشتر می‌شود. از طرفی بروز نکروز در هسته سلول‌های جنسی خصوصا در اسپرماتوسیت‌ها نیز از جمله ضایعات شایع در بافت‌های آلوده به دیازینون می‌باشد.

علاوه بر تماس مستقیم سموم بر بافت تولید مثلی، دیازینون و سایر ترکیبات ارگانو فسفره قادر به ایجاد آسیب در مکانیزم‌های فیزیولوژیکی تولید مثل (Arcand- Hoy and Benson, 1998) از طریق اختلال در محور HPG^۱ و تولید هورمون‌های گنادوتروپینی نیز می‌باشد به طوری که بر رشد و توسعه‌ی گنادها از طریق اثر بر روند سنتز، ذخیره‌سازی، رهاسازی، انتقال، متابولیسم، فعالیت و یا حذف هورمون‌های داخلی دخالت دارند (Kavloock et al., 1996; Maxwell and Dutta, 2005).

از آن جایی که سلول‌های جنسی اجزاء اساسی در فرآیند اسپرماتوزنز می‌باشند، کاهش تعداد و کیفیت آنها در تولید اسپرماتوزوآهای سالم و بی نقص تاثیر گذار خواهد بود. کاهش تولید اسپرم سالم و فعال در قابلیت باروری مولدین نر نیز تاثیر بسزایی خواهد داشت. مسلما

1- Hypothalamic- Pituitary-gonad

بنابر این تاثیرات عمده مستقیم و یا غیر مستقیم آلاینده‌های محیط‌های آبی بر بیضه ماهیان، به کاهش و یا توقف رشد و توسعه اسپرماتوزوئیدها خواهد انجامید. از اینرو تلاش برای جلوگیری از ایجاد آلودگی بیشتر در محیط آبی و مدیریت سازمان یافته در استفاده مناسب از سموم ارگانوفسفره در مزارع کشاورزی جهت کاهش حجم آلاینده‌های ورودی به اکوسیستم رودخانه‌ها و نهایتاً دریای خزر امری ضروری در بازسازی و حفظ ذخایر این ماهیان ارزشمند خواهد بود.

بروز چنین تغییراتی در بافت بیضه از کیفیت و باز ماندگی محصولات جنسی خواهد کاست و در مجموع قابلیت‌های باروری ماهیان نر کاهش خواهد یافت. از آن جایی که ماهیان مولد ماده نیز از تاثیرات نامطلوب آلاینده‌ها در طی فرآیند رشد و نمو خود مستثنی نخواهند بود (Dutta and Maxwell, 2003)، کاهش همزمان کیفیت و کمیت گامت‌های تولیدی توسط مولدین نر و ماده می‌تواند بر میزان تولید مثل و بقای بچه ماهیان آثار منفی بر جا گذاشته و ادامه‌ی این روند بر نسل آینده ماهیان سفید دریای خزر نیز تاثیر گذار خواهد بود.

References

- Abadin, H., Todd, D., Wohlers, D., Hard, C, M., 2009. Priority data needs for Diazinon. Syracuse Research Corporation. 75 p.
- Anees, M.A., 1978. Hepatic pathology in a freshwater teleost *Channa punctatus* (Bloch) exposed to sublethal and chronic levels of three organophosphorous insecticides. Bulletin Environmental Contamination and Toxicology. 19, 524–527.
- Ansari, B.A., Kumar, K., 1988. Diazinon toxicity on protein and nucleic acid metabolism in the liver of Zebra fish, *Brachydanio rerio* (Cyprinidae). Scientific Total Environment. 76, 63–68.
- Arcand-Hoy, L, D., Benson, W, H., 1998. Fish reproduction: an ecologically relevant indicator of endocrine disruption. Environ Sci Technol, 17:49 – 57.
- Banai, M., Mirvaghefi, A.R., Ashouri, R., 2009. Effect of sublethal concentration of diazinon on histopathological changes of male carp (*Cyprnius carpio*) testis. Lagoons conference in Azad university of Ahvaz. 127 p.
- Castano, A., Bols, N.C., Braunbeck, T., Dierick, P., Halder, M., Isomaa, B., Kawahara, K., Lee, L. E. J., Mothersill, C., Pärt, P., Repetto, G., Sintes, J.R., Rufli, H., Smith, R., Eisler, R., 1986. Diazinon hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. U.S. Fish and Wildlife Service, U.S., 85,1–38.
- Cox, J., 2000. Diazinon use threatens Salmon survival, <http://www.pesticide.org>.
- Dutta, H.M., Maxwell, L., 2003. Histological examination of sublethal effects of Diazinon on ovary of Bluegill, *Lepomis macrochirus*. Environmental Pollution. 121, 95–102.
- Kavlock, R, J., Daston, G, P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L. E., Kaattari, S., 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the USEPA-sponsored workshop. Environ Health Perspect, 104:715 –40.
- Magwood, S., George, S., 1996. In vitro alternatives to whole animal testing, comparative cytotoxicity studies of divalent metals in established cell lines derive from tropical and temperate water fish species in a neutral red assay. Marine Environmental Research. 42, 37-40.
- Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H., Nagahama, Y., 1991. Hormonal induction of all stages of spermatogenesis *in vitro* in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). National Academic Science. USA 88, 5774–5778.
- Mojazi Amiri, B., Maebayashi, M., Adachi, S., Moberg, G.P., Doroshov, S.I., Yamauchi, K., 1999. *In vitro* steroidogenesis by testicular fragments and ovarian follicles in a hybrid sturgeon (Bester). Fish Physiology and Biochemistry. 21, 1-14.

- Sapozhnikova, Y., Bawardi, O., Schlenk, D., 2004. Pesticides and PCBs in sediments and fish from the Salton Sea, California, USA. *Chemosphere*. 55, 797–809.
- Song, M., Gutzeit, H.O., 2003. Primary culture of medaka (*Oryzias latipes*) testis: a test system for the analysis of cell proliferation and differentiation. *Cell Tissue Research*. 313,107–115.
- Yamauchi, S., Miura, C., Ito, A., Agusa, T, Iwata, H., Tanabe, S., Tuyen, B, C., Miura, T., 2007. Effect of lead, molybdenum, rubidium, arsenic and organ chlorines on spermatogenesis in fish: Monitoring at Mekong Delta area and in vitro experiment, *Aquatic Toxicology*, 83: 43-51.
- Yazawa, T., Yamamoto, T., Jin Y., Abe, S. Follicle-stimulating hormone is indispensable for the last spermatogonial mitosis preceding meiosis initiation in newts (*Cynops pyrrhogaster*). *Biological Reproduction*, 66, 14–20.

A Study on Toxic Effects of Diazinon on the Caspian Kutum (*Rutilus Frisii Kutum*) Testis Using *in Vitro* Tissue Culture

F. Fadakar Masouleh^{*1}, B. Mojazi Amiri², A. Mirvaghefi³ and M. A. Nematollahi⁴

¹ MSc, Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, I.R. IRan

² Prof. Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, I.R. IRan

³ Associate Prof. Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, I.R. IRan

⁴ Assistant Prof. Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, I.R. IRan

(Received: 10 March 2010, Accepted: 31 May 2011)

Abstract

Caspian kutum is one of the most commercial fishes that migrates for spawning from the Caspian Sea to the rivers each year. Consequently, it can be exposed to several agricultural and industrial pollutants. In this study, to estimate the fish spermatogenesis in polluted waters, the direct effect of diazinon were investigated using *in vitro* testis culture of the Caspian kutum with 10, 100 and 200 µg/ml concentrations for 3 and 6 days. With increase of diazinon concentrations and exposed time, harmful effects of diazinon on spermatogenesis and testis structure increased. The inhibition of spermatogenesis and necrotic germ cells were more visible in 200 µg/ml in 6th day. Since, appropriate quality and quantity of gametes can verify the successful reproduction in fish, water pollution over consecutive years can be a serious threat on kutum populations.

Keywords: Caspian kutum, Diazinon, Caspian Sea, Testis, Tissue culture

*Corresponding author: Tel: +98 9111397207 ,Fax: +98 2612224024 , E-mail: sh.fadakar@gmail.com