



مقاله پژوهشی

بررسی اثرات هیستوفیز یولوژیک بنزوآلفاپایرن بر گناد و هورمون های تولیدمثلی
ماهی ماده هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) در شرایط آزمایشگاهی

راحله بگزاده باغان^۱، نگین سلامت^۲، احمد سواری^۳، عبدالعلی موحدی نیا^{۴*}

تاریخ دریافت: آذر ۹۶

تاریخ پذیرش: فروردین ۹۷

چکیده

هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات بنزوآلفاپایرن (BaP) بر محور هیپوفیزی-گنادی ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) بود. در این راستا غلظت های مختلف BaP (۰، ۲، ۲۰ و ۲۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) به ماهیان تزریق شد و ماهیان به مدت ۱۴ روز در شرایط آزمایشگاهی نگهداری شدند. تغییرات هورمون های ۱۷-بتا استرادیول (E2)، ۱۷-OH-پروژسترون، GTH I و GTH II در نمونه های پلاسمای خون ماهیان در روزهای ۱، ۴، ۷ و ۱۴ مورد بررسی قرار گرفت. تغییرات ساختار بافتی گناد ماهیان نیز در تیمارهای مختلف بررسی شد. با قرار گرفتن ماهیان در معرض BaP از روز چهارم کاهش های معنی داری در میزان هورمون های ۱۷-بتا استرادیول و ۱۷-OH-پروژسترون و همچنین افزایش های معنی داری در مقادیر هورمون های GTH I و GTH II در پلاسمای خون ماهیان مشاهده شد ($P < 0.05$). همچنین، تغییراتی در ساختار بافتی تخمدان ماهیان تیمار شده با BaP شامل از بین رفتن یکپارچگی بافتی، افزایش فولیکول های کروماتین-نوکلئولوس و پری نوکلئولوس، افزایش بافت همبند بینابینی و فولیکول های آترزی و کاهش فولیکول های تکامل یافته، مشاهده شد. بر اساس نتایج، کاهش میزان هورمون های استروئیدی چند روز پس از تزریق BaP نشان دهنده ویژگی های آنتی استروژنیکی این ترکیب است که با کاهش گیرنده های استروژنی (ER) اثرات خود را اعمال می کند. از طرفی، افزایش میزان هورمون های گنادوتروپینی در روز ۷ آزمایش به دلیل بازخورد منفی هورمون های استروئیدی است.

واژگان کلیدی: بنزوآلفاپایرن، تخمدان، هامور معمولی، هیستوفیزیولوژی.

۱- کارشناس ارشد بافت شناسی آبزیان، گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران.

۲- دانشیار گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران.

۳- استاد گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران.

۴- دانشیار گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه مازندران، بابل، ایران.

* نویسنده مسئول: amovahedinia@umz.ac.ir

مقدمه

آمریکا (USEPA) از بین این ترکیبات، ۱۶ ترکیب را به عنوان آلاینده در اکوسیستم‌های آبی و خشکی معرفی کرده است. بنزوالفاپایرن (BaP) یک هیدروکربن آروماتیک پنج حلقه‌ای است که در بین ۱۶ ترکیب معرفی شده توسط این آژانس دیده می‌شود (Chen et al., 2008). این ترکیب به واسطه اشتعال ناقص سوخت‌های فسیلی و مواد آلی ایجاد می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که آلاینده BaP دارای خاصیت سرطان‌زایی (Chen et al., 2008) و ایمینوتوکسیک بوده (Sun et al., 2006)، در غلظت‌های بالا خاصیت کشندگی دارد و سبب مرگ آبزیان مختلف می‌شود. این ترکیب به دلیل داشتن خاصیت چربی‌دوستی با عبور از غشای لیپیدی سلول‌ها، سبب تغییر در عملکرد سلول شده، در بسیاری از فرآیندهای زیستی بدن مانند فعالیت‌های اسمزی و فرآیندهای آنزیمی که به ساختار فیزیولوژیکی سلول‌ها وابسته‌اند، به طور مستقیم اختلال ایجاد می‌کند (Simonato et al., 2008). BaP همچنین به عنوان مختل‌کننده اندوکرینی شناخته شده است. این ترکیب به دلیل شباهت ساختاری با هورمون‌های استروئیدی از جمله ۱۷-بتا استرادیول، قادر به اتصال به

هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon;) (PAH) را می‌توان از مهم‌ترین ترکیبات موجود در نفت خام برشمرد (Lima et al., 2007). این مواد، ترکیباتی به نسبت پایدار، غیرقطبی و غیریونیزه هستند که به دلیل داشتن چگالی پایین، هنگام ورود به آب روی سطح آب به حالت شناور قرار می‌گیرند و علاوه بر این که سبب ایجاد خطرات جدی برای گونه‌های ساکن سطح آب می‌شوند، به مرور زمان با ذرات معلق از جمله پلانکتون‌های موجود در سطح دریا ترکیب و به عمق آب برده می‌شوند و سبب آسیب به موجودات کفزی نیز خواهند شد (Fowler et al., 2007). به طوری که این مواد در بدن آبزیانی مانند لابسترها، خرچنگ‌ها، نرم‌تنان و نهایتاً ماهیان تجمع می‌یابد و در زنجیره غذایی از مصرف‌کننده‌ای به مصرف‌کننده دیگر منتقل و با تجمع در بدن آبزیان و تبدیل به مواد سرطان‌زا زمینه‌ساز ایجاد صدمات و آسیب‌هایی به این موجودات می‌شوند (Miller and Olejnik, 2001).

تا به حال بیش از ۱۰۰ ترکیب هیدروکربنی آروماتیک چندحلقه‌ای شناسایی شده است که آژانس حفاظت محیط زیست

کردند. آن‌ها همچنین با بررسی ساختار مغز و به ویژه با بررسی محورهای هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد گزارش کردند که نفتالن سبب کاهش هورمون‌های جنسی شد و افزایش هورمون‌های گنادوتروپینی در این ماهیان به دلیل فیدبک منفی این هورمون‌ها بر هیپوتالاموس عنوان شد (Gesto et al., 2006).

ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*)، یکی از گونه‌های بومی و تجاری خلیج فارس است که ارزش غذایی بالایی دارد. ماهی هامور در آب‌های ساحلی تا عمق ۴۰ متری به سر می‌برد و بیشتر در بالای کف گلی سواحل و مصب رودخانه‌ها یافت می‌شود. رژیم غذایی آن‌ها گوشتخواری است و غذای اصلی آن‌ها را ماهیان کوچک از جمله کفال ماهیان و سخت‌پوستان به ویژه میگوها تشکیل می‌دهند (Kamali et al., 2006).

در نظر گرفتن رابطه دستگاه عصبی محیطی برای دریافت اطلاعات از محیط و دستگاه عصبی مرکزی برای تلفیق و تولید پیام‌ها و تاثیر بر اندام‌ها از طریق ترشحات هورمون‌ها، بحث اصلی در کنترل تولیدمثل در آبزیان است. شناخت هورمون‌ها و مکانیسم‌های فیزیولوژیکی آن‌ها به عنوان شاخصی برای

گیرنده‌های استروژنی و تداخل با هورمون‌های اندوژنی و ایجاد اختلال در سیستم اندوکرین هستند (Hirose et al., 2001). تشابه ساختاری BaP به هورمون‌های استروئیدی مانند ۱۷-بتا استرادیول و فعالیت استروژنیک آن موضوع مطالعات فراوانی به ویژه در چند دهه اخیر بوده است. Monteiro و همکاران (۲۰۰۰) در مطالعه‌ای به بررسی تاثیر برخی از ترکیبات PAH شامل بنزوآلفاپایرن، کرایزن و فنانترن بر روند استروئیدوزنز در تخمدان ماهی فلاندر (*Platichthys flesus*) پرداختند و گزارش کردند که با افزایش غلظت این ترکیبات، میزان هورمون‌های ۱۷-بتا استرادیول، ۱۷-آلفا هیدروکسی پروژسترون و آندروژن‌ها به طور معنی‌داری کاهش یافت. همچنین آن‌ها در تایید اثرات آنتی‌استروژنیکی BaP بر ماهی فلاندر نشان دادند که این ترکیب می‌تواند میزان هورمون‌های ۱۷-بتا استرادیول و ۱۷-OH-پروژسترون را حتی در غلظت‌های پایین نیز کاهش دهد (Monteiro et al., 2000). همچنین Gesto و همکاران (۲۰۰۶) کاهش قابل توجهی در سطح هورمون ۱۷-بتا استرادیول به صورت وابسته به غلظت را در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مواجهه با غلظت‌های مختلف نفتالن مشاهده

داشتند و حاوی آب دریا بودند، انتقال یافتند (۲۰ قطعه ماهی برای هر تیمار). مدت زمان ۱۰ روز برای سازگاری ماهیان با شرایط آزمایشگاهی و اجتناب از استرس‌های ناشی از جابه‌جایی بر ماهیان مورد مطالعه در نظر گرفته شد (Yin et al., 2007; Movahedinia et al., 2009).

طول مدت این آزمایش ۱۴ روز در نظر گرفته شد. میانگین دما $26/5$ درجه سانتی‌گراد، pH $7/8$ و شوری 39 گرم بر لیتر بود و همواره شرایط محیطی در طول این مدت به صورت منظم کنترل می‌شد. همچنین در مدت زمان آزمایش، غذایی به ماهیان صورت نگرفت. در این مدت به منظور جلوگیری از تجمع مواد زائد روزانه دو سوم آب وان‌ها از کف و از طریق سیفون کردن تعویض می‌شد (Movahedinia et al., 2009; Wang et al., 2011).

در این پژوهش از بنزوآلفاپایرین (BaP، Aldrich، آمریکا) به شکل گرانول‌های جامد زرد رنگ با خلوص ۹۷ درصد استفاده شد. به منظور تهیه استوک این ترکیب، غلظت‌های ۲۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از این ماده در روغن نارگیل (۱ میلی‌گرم بر ازای هر

تعیین وضعیت تولیدمثلی و مراحل جنسی، در کنار شاخص‌های بافت‌شناسی در بررسی تولید مثل ماهیان بسیار موثر است. در این راستا، هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر غلظت‌های مختلف بنزوآلفاپایرین بر هورمون‌های محور هیپوفیز-گناد شامل ۱۷-بتا استرادیول، ۱۷-OH پروژسترون و هورمون‌های گنادوتروپیک GTH I و GTH II در ماهی هامور معمولی است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به منظور بررسی تاثیر بنزوآلفاپایرین بر گناد ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) در آزمایشگاه تحقیقاتی مرکز تحقیقات شیلات بندر امام خمینی در استان خوزستان صورت پذیرفت. در این راستا ۱۰۰ قطعه ماهی هامور معمولی تهیه شده از ایستگاه تحقیقات ماهیان دریایی بندر امام خمینی، در مخازن ۶۰۰۰ لیتری و مدور که از آب دریا فیلتر و تیمار شده با اشعه ماورای بنفش (UV) پر شده بود، قرار داده شد. در ادامه، ماهیان با میانگین طولی $20/8 \pm 0/2$ سانتی‌متر و میانگین وزنی $180 \pm 7/9$ گرم و همه نابالغ جنسی، به وان‌های مجزا که گنجایش ۳۰۰ لیتر آب را

2017). سپس ماهیان بعد از به هوش آمدن، دوباره به وان‌های خود بازگردانده شدند.

برای بررسی شاخص‌های خونی، از ماهیان در روزهای ۱، ۴، ۷ و ۱۴ پس از تزریق، خون‌گیری به عمل آمد. برای خون‌گیری از ماهیان، ۳ ماهی از هر تیمار به صورت تصادفی خارج شد و پس از بیهوشی با ۲- فنوکسی اتانول (۰/۱ درصد)، خون‌گیری با استفاده از سرنگ ۲/۵ میلی‌لیتری از سیاهرگ ساقه دمی به عمل آمد. نمونه‌های خونی به میکروتیوب‌های هیپارینه مربوط به هر تیمار انتقال داده شدند (Movahedinia et al., 2011). به منظور جداسازی پلاسما، نمونه‌های خون با دور ۱۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. پس از جداسازی، پلاسما توسط سمپلر به میکروتیوب‌هایی که دارای برچسب نام تیمار و روز نمونه‌گیری بودند، منتقل شد و تا زمان آزمایش‌های هورمونی در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Taheri et al., 2015).

پس از خون‌گیری، ماهیان تشریح شدند و تخمدان آن‌ها خارج شد. سپس قطعاتی به ابعاد ۱ سانتی‌متر از تخمدان جدا و در محلول فرمالین ۱۵ درصد تثبیت شد.

کیلوگرم وزن بدن) به عنوان حلال، حل شد (Carlson et al., 2002).

تیماربندی ماهیان در وان‌ها به این صورت بود که یک گروه از ماهیان هیچ تزریقی را دریافت نکردند و به عنوان ماهیان شاهد در نظر گرفته شدند. به گروه دیگری از ماهیان به منظور بررسی اثرات احتمالی روغن نارگیل، تنها ۱mg/kg روغن نارگیل تزریق شد. به سه گروه دیگر از ماهیان به ترتیب غلظت‌های ۲، ۲۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بنزوآلفاپایرن به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، به صورت درون صفاقی تزریق شد. انتخاب غلظت‌های بنزوآلفاپایرن در مطالعه حاضر بر اساس مطالعات پیشین صورت گرفت (Khaniyan et al., 2016).

برای تزریق BaP، ابتدا ماهیان توسط تور ساچوک از وان‌های ۳۰۰ لیتری صید و بلافاصله به وان‌ی کوچک حدوداً به حجم ۳۰ لیتر که محتوی ماده بیهوشی ۲- فنوکسی اتانول ۰/۱ درصد (Merck، آلمان) منتقل شدند. بعد از بیهوشی، ماهیان از وان خارج شدند و غلظت‌های مورد نظر BaP توسط سرنگ انسولین از ناحیه بین باله‌های شکمی، به صورت درون صفاقی و آهسته به بدن ماهیان تزریق شد (AlijaniArdeshir et al.,)

آزمایشگاه) و با توجه به دستور العمل بیان شده بر روی بروشور کیت تجاری، مراحل مختلف سنجش هورمون انجام شد (Young et al., 1989; Sadeghi et al., 2015).

هورمون‌های GTH I و GTH II به روش ایمنورادیومتری کاسی (IRMA) اندازه‌گیری شدند. اساس روش IRMA به صورت غیر-رقابتی است. در این روش، آنالیت توسط دو آنتی‌بادی از طرفین پوشیده شده که یکی از این آنتی‌بادی‌ها توسط ماده رادیواکتیو نشاندار شد. در این روش به ازای هر آنالیت یک ساندویچ نشاندار تشکیل شد، بنابراین رابطه مستقیم میان آنالیت و کمپلکس رادیواکتیو برقرار بود. روش کار به این صورت بود که هورمون‌های GTH موجود در پلاسما به عنوان آنتی‌ژن به دو آنتی‌بادی زوج اختصاصی (از نوع منوکلونال موشی) متصل شد. یکی از آنتی‌بادی‌ها بر روی فاز جامد (لوله‌ها) پوشش داده شد و آنتی‌بادی دیگر به ید ۱۲۵ (ید نشاندار) متصل شد. پس از انکوباسیون، برای خارج کردن آنتی‌بادی متصل به ید ۱۲۵ لوله‌ها تخلیه و شست و شو شد. در مرحله بعد توسط شمارنده گاما، اکتیویته موجود در هر لوله اندازه‌گیری شد. این اکتیویته رابطه مستقیم با غلظت هورمون GTH نمونه‌ها دارد. نمونه‌های

مراحل عمل‌آوری نمونه‌های بافت تخمدان ماهیان، با استفاده از دستگاه پاساژ بافتی (Tissue Tek Rotary, RX-11B، ژاپن) تحت برنامه زمان‌بندی شده صورت گرفت. آب‌گیری بافت‌های تثبیت شده در سری‌های افزایشی الکل (۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد) انجام شد و نمونه‌های بافتی پس از شفاف‌سازی توسط گزیلول، پارافینه شدند. سپس از نمونه‌ها مقطعی با ضخامت ۵ میکرومتر توسط دستگاه میکروتوم (LEICA, RM2245، آلمان) تهیه و با استفاده از روش هماتوکسیلین-ائوزین رنگ‌آمیزی شد (Bancroft and Gamble, 2008; Movahedinia et al., 2012). مقاطع رنگ‌آمیزی شده سپس با استفاده از میکروسکوپ نوری (Olympus، ژاپن) مجهز به عدسی DinoLite و نرم‌افزار Dino Capture مشاهده شد و تصاویر مناسب با بزرگنمایی‌های مختلف تهیه شد.

اندازه‌گیری هورمون‌های ۱۷-بتا استرادیول و ۱۷-OH-پروژسترون با استفاده از روش رادیوایمونواسی (RIA) صورت گرفت. در این روش از کیت تجاری (Immunotech، فرانسه) استفاده شد. به این منظور پس از خروج نمونه‌های پلاسما از فریزر ۸۰- و رسیدن به حالت تعادل با درجه حرارت اتاق (محیط

نتایج

مطالعات بافتی

در ماهی‌های هامور معمولی گروه شاهد در تمام روزهای نمونه‌برداری، بافت گناد دارای ساختار طبیعی بود و تغییر عمده‌ای در ساختار بافتی این اندام مشاهده نشد. گناد در این ماهیان عمدتاً نابالغ و در مرحله پری‌ویتلوژنی بود و بیشتر فولیکول‌های مشاهده شده در مراحل کروماتین-نوکلئولوس، مرحله پری‌نوکلئولوس و مرحله وزیکول زرده بودند که توسط بافت همبند سست در کنار یکدیگر قرار گرفته بودند. تخمدان در این ماهیان اگر چه از لحاظ جنسی نابالغ بود، ولی فولیکول‌هایی در مراحل تکامل یافته‌تر مانند فولیکول‌های وزیکول زرده به فراوانی در تخمدان آن‌ها دیده شد (شکل ۱).

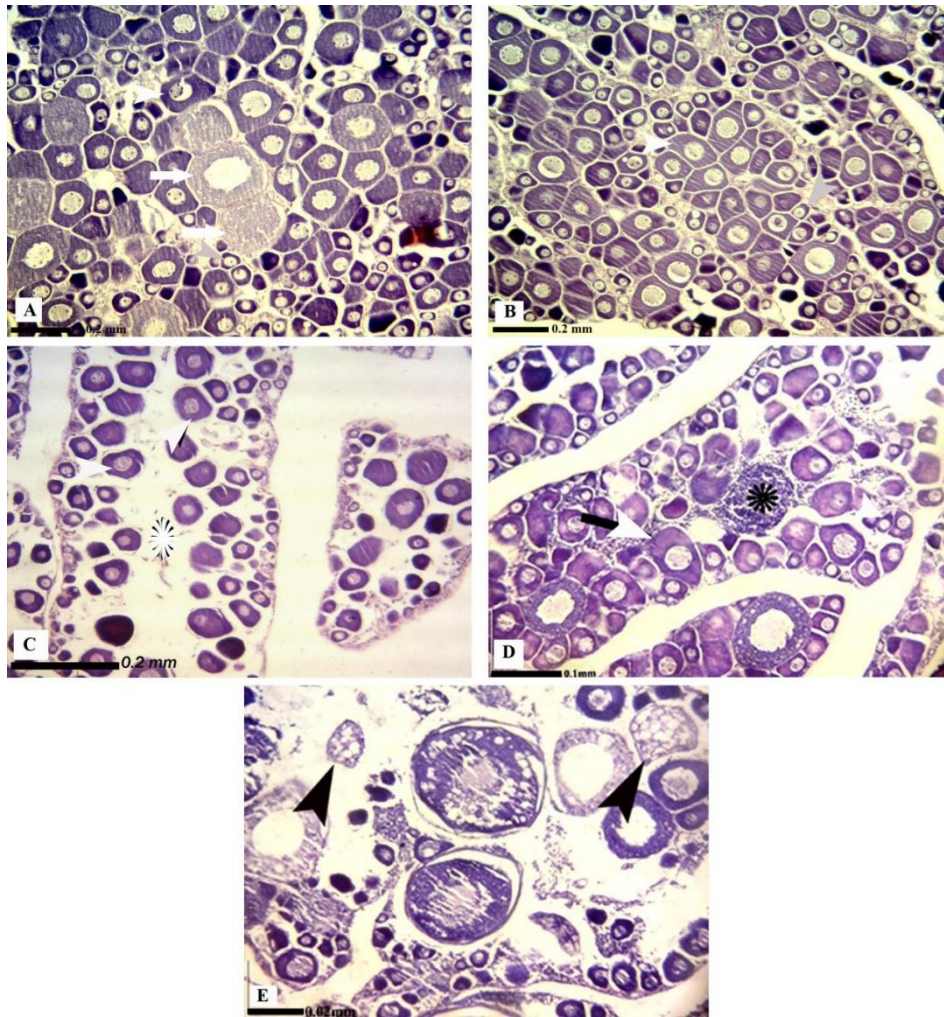
و ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم BaP تغییرات بافتی مانند بی‌نظمی در ساختار فولیکول‌ها، افزایش فولیکول‌های پری‌نوکلئولوس و کروماتین-نوکلئولوس، افزایش بافت همبند بینابینی و کاهش فولیکول‌های تکامل یافته‌تر مانند فولیکول زرده مشاهده شد. شدت این تغییرات در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم BaP بیشتر بود (شکل ۱).

مجهول با استانداردهای GTH، مورد آزمایش قرار گرفتند و غلظت نمونه‌های مجهول براساس منحنی استاندارد به دست آمد (Chouthkanthiwar et al., 2013).

داده‌های مربوط به اندازه‌گیری تغییرات هورمون‌ها در تیمارهای مختلف به صورت میانگین \pm خطای استاندارد بیان شد و برای بررسی وجود اختلاف میان داده‌ها در غلظت‌ها و روزهای مختلف، تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) با سطح اطمینان ۹۵ درصد در نرم‌افزار SPSS ۱۶ انجام شد. در صوت وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها از پس‌آزمون Tukey برای مقایسه میانگین‌ها استفاده شد. رسم نمودارها در محیط Microsoft Excel 2010 رسم شد.

قابل ذکر است که در نمونه‌های گناد اخذ شده از همه تیمارها در روز اول نمونه‌برداری نیز تغییر بافتی مشاهده نشد و ساختار بافتی گنادها در این روز مشابه گناد ماهیان گروه شاهد بود.

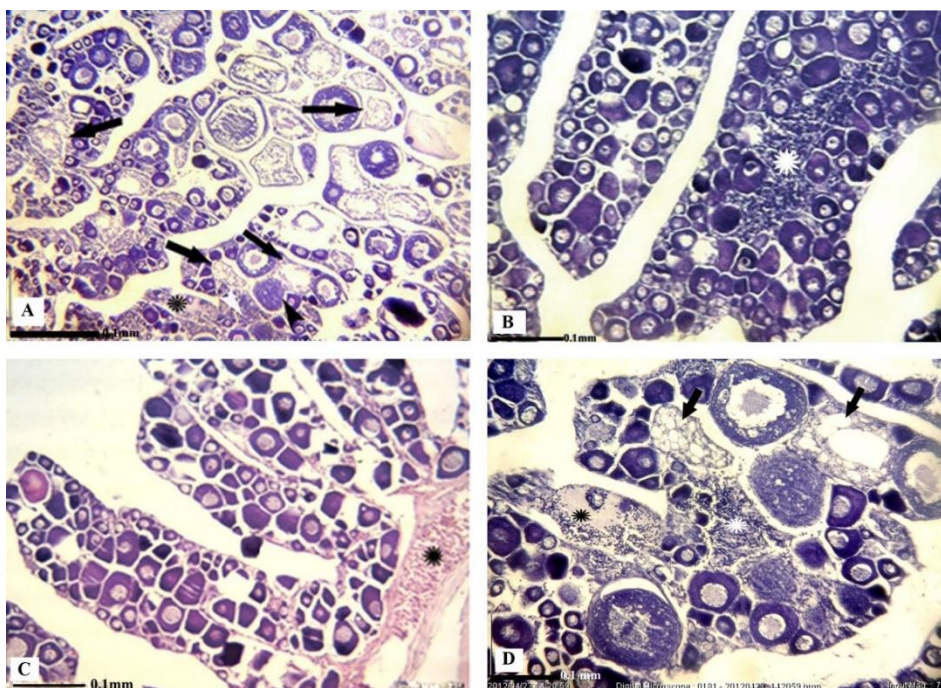
در روز چهارم نمونه‌برداری، تغییر بافتی در تیمار ۲ میلی‌گرم در کیلوگرم BaP مشاهده نشد. اما در ماهیان تیمار شده با غلظت‌های ۲۰



شکل ۱: تصاویر میکروسکوپ نوری ساختار بافتی گنادهای ماهی هامور معمولی در روز چهارم (A) تیمار شاهد؛ سر پیکان سفید فولیکول را در مرحله پری‌نوکلئولوس نشان می‌دهد. (B) تیمار شاهد؛ سر پیکان خاکستری نشان دهنده فولیکول کروماتین-نوکلئولوس است. (C) تیمار ۲ میلی‌گرم در بنزوآلفا پیرن؛ پیکان سفید فولیکول وزیکول زرده و ستاره سفید بافت همبند را نشان می‌دهد. (D) تیمار ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم بنزوآلفا پیرن؛ ستاره سیاه نفوذ لوکوسیتی را نشان می‌دهد. (E) تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم بنزوآلفا پیرن؛ سر پیکان سیاه نشان دهنده فولیکول‌های آنرزی است.

میلی گرم در کیلوگرم BaP علاوه بر این ضایعات نفوذ لوکوسیتی از جمله عمده ضایعات مشاهده شده در این روز بود (شکل ۲). باید خاطر نشان شد که ضایعات ذکر شده در تیمار ۲۰۰ میلی گرم در کیلوگرم BaP وسعت گسترده تری داشت.

وسیع ترین و بیشترین ضایعات بافتی در تمام تیمارها، در روز هفتم نمونه برداری مشاهده شد. در تیمار ۲ میلی گرم در کیلوگرم BaP افزایش فولیکول های پری ویتلوژنی و تعداد زیادی از فولیکول های آترزی شده در این روز مشاهده شد. در تیمارهای ۲۰ و ۲۰۰



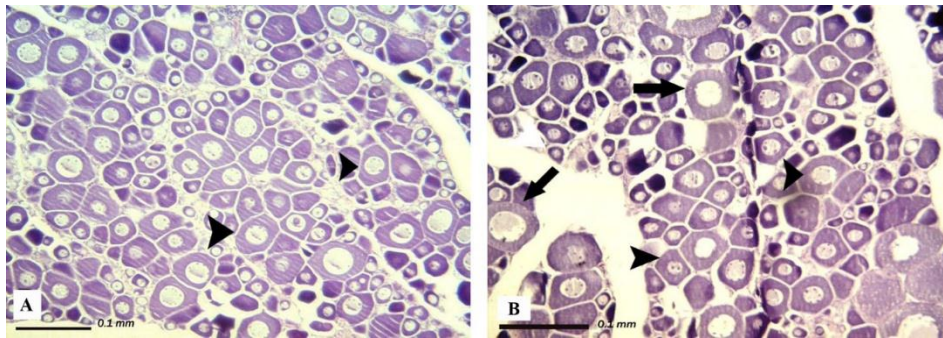
شکل ۲: تصاویر میکروسکوپ نوری ساختار بافتی گناد ماهی هامور معمولی تیمار شده با بنزوآلفاپایرن در روز هفتم نمونه برداری. (A) تیمار ۲ میلی گرم در کیلوگرم بنزوآلفاپایرن؛ پیکان سیاه فولیکول آترزی را نشان می دهد. (B) تیمار ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم بنزوآلفاپایرن؛ ستاره سفید نفوذ لوکوسیتی را نشان می دهد. (C) تیمار ۲۰۰ میلی گرم در کیلوگرم بنزوآلفاپایرن؛ ستاره سیاه خونریزی را نشان می دهد. (D) تیمار ۲۰۰ میلی گرم در کیلوگرم بنزوآلفاپایرن؛ سر پیکان سیاه نشان دهنده فولیکول در مرحله وزیکول زرده است.

این هورمون در روز اول بین گروه‌های شاهد و تیمار شده با BaP اختلاف معنی‌داری نداشت ($P > 0.05$). در چهارمین روز نمونه-برداری، میانگین غلظت هورمون ۱۷-بتا استرادیول تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های شاهد و تیمار شده با BaP وجود داشت ($P < 0.05$). کمترین میزان این هورمون در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم BaP ($0.18 \pm 0.03 \text{ ng/mL}$) مشاهده شد که با گروه‌های شاهد ($1.95 \pm 0.12 \text{ ng/mL}$) و شاهد حلال ($1.8 \pm 0.11 \text{ ng/mL}$) و سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری داشت ($P < 0.05$; شکل ۴).

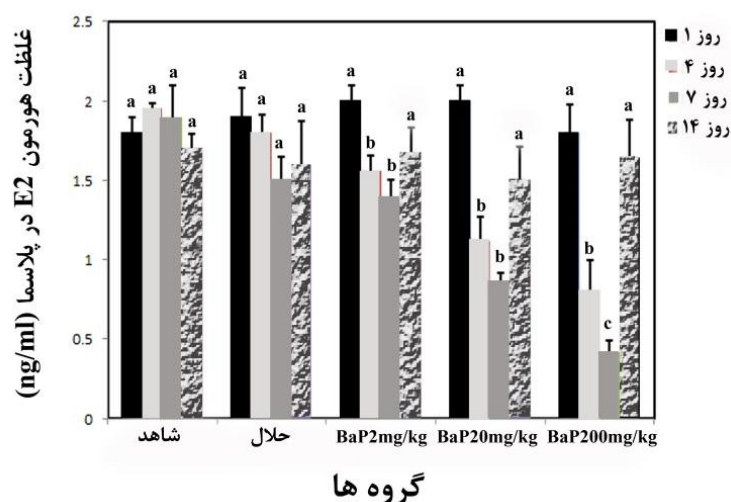
در چهاردهمین روز نمونه‌برداری، در تیمارهای ۲ و ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم BaP تنها ضایعه مشهود وجود تعدادی فولیکول‌های آترزی بود. در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم BaP وجود فولیکول‌ها آترزی و نفوذ لوکوسیتی از ضایعات قابل رویت در این روز بود (شکل ۳).

نتایج بررسی هورمون ۱۷-بتا استرادیول

نتایج مربوط به اندازه‌گیری هورمون ۱۷-بتا استرادیول در روزهای مختلف نمونه‌برداری در شکل ۴ آمده است. با توجه به شکل، غلظت



شکل ۳: تصاویر میکروسکوپ نوری ساختار بافتی گناد ماهی هامور معمولی تیمار شده با بنزوالفاپايرن در روز چهاردهم نمونه‌برداری. (A) تیمار ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم بنزوالفاپايرن؛ سر پیکان سیاه فولیکول پری‌نوکلئولوس را نشان می‌دهد. (B) تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم بنزوالفاپايرن؛ پیکان سیاه فولیکول در مرحله وزیکول زرده را نشان می‌دهد.



شکل ۴: غلظت هورمون ۱۷-بتا استرادیول (E2) در پلاسمای ماهیان هامور معمولی شاهد و تیمار شده با غلظت‌های مختلف بنزوآلفاپایرن (BaP) (میانگین \pm خطای استاندارد). حروف متفاوت روی ستون‌ها نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در هر روز نمونه‌برداری است.

با توجه به شکل ۴، میانگین غلظت ۱۷-بتا استرادیول اختلاف معنی‌داری را در روز هفتم میان گروه‌های شاهد و تیمار شده با BaP نشان داد ($P < 0.05$). به طوری که مقدار آن نسبت به شاهد در تیمارهای دیگر سیر کاهشی داشت ($P < 0.05$). بیشترین غلظت این هورمون در گروه‌های شاهد (۱/۹۰ \pm ۰/۱۱ ng/mL) و شاهد حلال (۱/۸۲ \pm ۰/۱۲ ng/mL) اندازه‌گیری شد و کمترین میزان آن در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم BaP (۰/۴۲ \pm ۰/۱ ng/mL) ثبت شد که با سایر تیمارها دارای اختلاف معنی‌داری بود ($P < 0.05$). با توجه به شکل ۴ غلظت هورمون ۱۷-بتا استرادیول در روز چهاردهم نمونه‌برداری میان گروه‌های شاهد و تیمار شده با BaP دارای تفاوت معنی‌داری نبود ($P > 0.05$). نتایج به دست آمده از سنجش میزان هورمون ۱۷-بتا استرادیول در سرم ماهیان هامور معمولی در نتیجه قرار گرفتن در معرض غلظت‌های مختلف BaP نشان داد که میزان این هورمون با افزایش غلظت BaP در مقایسه با گروه‌های شاهد و شاهد حلال در روزهای

از ۱۴ روز مواجهه ماهی با BaP در غلظت‌های ۲۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن، کاهش معنی‌داری با سایر گروه‌ها را نشان داد ($P < 0.05$).

میزان این هورمون در تیمارهای مختلف در روزهای ۴ و ۷ نسبت به روز اول کاهش یافت، به طوری که در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم BaP mg/kg در روز هفتم نمونه-برداری کاهش قابل توجهی را نسبت به سایر گروه‌ها نشان داد ($P < 0.05$). سپس میزان این هورمون در همه تیمارها در روز ۱۴ نسبت به روز ۴ روند افزایشی داشت. کمترین میزان این هورمون در روز هفتم نمونه‌برداری و در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم BaP اندازه‌گیری شد.

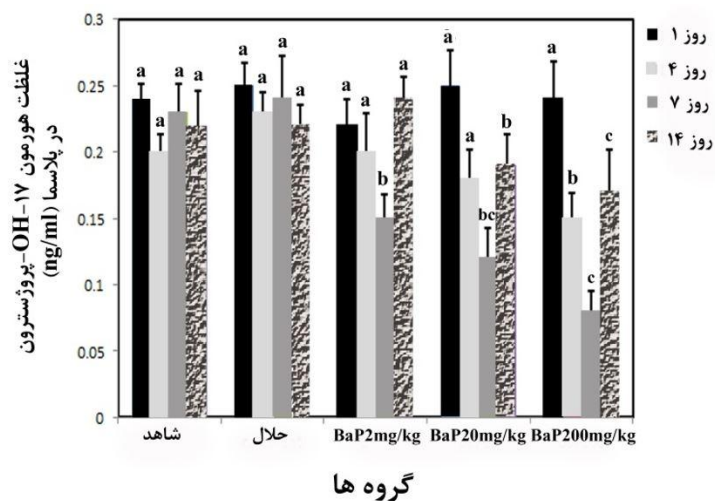
نتایج بررسی هورمون GTH I

نتایج به دست آمده از اندازه‌گیری هورمون GTH I در پلاسمای خون ماهیان هامور معمولی در روزهای مختلف نمونه‌برداری در تیمارهای مختلف در شکل ۶ آمده است. با توجه به شکل، میزان هورمون GTH I در بین گروه‌های شاهد و تیمار شده با BaP در روز اول نمونه‌برداری اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($P > 0.05$).

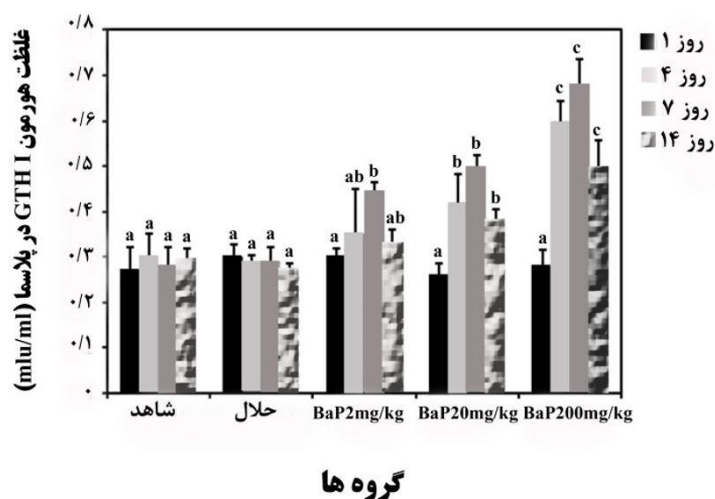
چهارم و هفتم نمونه‌برداری نسبت به روز اول کاهش یافت و حداکثر کاهش این هورمون در روز هفتم نمونه‌برداری و به ویژه در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم BaP ثبت شد. سپس در انتهای دوره (روز ۱۴) غلظت هورمون مجدداً رو به افزایش گذاشت.

نتایج بررسی هورمون ۱۷-OH-پروژسترون

نتایج مربوط به اندازه‌گیری میزان هورمون ۱۷-OH-پروژسترون در پلاسمای خون ماهیان هامور معمولی در تیمارهای مختلف در شکل ۵ آمده است. با توجه به شکل، میان غلظت این هورمون بین گروه‌های شاهد و تیمار شده با BaP در روز اول نمونه‌برداری تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$). نتایج به دست آمده از سنجش هورمون ۱۷-OH-پروژسترون در روز چهارم نمونه‌برداری با توجه به شکل ۵ حاکی از عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های شاهد و تیمار شده با BaP ($P > 0.05$) به جز تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن بود. بین میانگین غلظت این هورمون در گروه‌های شاهد و تیمار شده با BaP پس از ۷ روز مواجهه، اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ($P < 0.05$). مقادیر پلاسمایی هورمون ۱۷-OH-پروژسترون، پس



شکل ۵: غلظت هورمون ۱۷-OH-پروژسترون در پلاسمای ماهیان هامور معمولی شاهد و تیمار شده با غلظت‌های مختلف بنزوآلفاپایرن (BaP) (میانگین \pm خطای استاندارد). حروف متفاوت روی ستون‌ها نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در هر روز نمونه‌برداری است.



شکل ۶: غلظت هورمون GTH I در پلاسمای ماهیان هامور معمولی شاهد و تیمار شده با غلظت‌های مختلف بنزوآلفاپایرن (BaP) (میانگین \pm خطای استاندارد). حروف متفاوت روی ستون‌ها نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در هر روز نمونه‌برداری است.

شکل ۷ آمده است. با توجه به شکل، بین گروه‌های شاهد و تیمار شده با BaP از نظر غلظت هورمون GTH II در اولین روز نمونه‌برداری اختلاف معنی‌دار وجود نداشت ($P > 0.05$).

غلظت هورمون GTH II در روز چهارم نمونه‌برداری اختلاف معنی‌داری را بین گروه‌های شاهد و تیمار شده با BaP نشان داد ($P < 0.05$). به طوری که میزان این هورمون در ماهیان تیمار شده با BaP نسبت به گروه شاهد و شاهد حلال دارای روند صعودی بود. مقادیر این هورمون در گروه‌های شاهد و حلال تفاوت معنی‌داری با هم نداشت ($P > 0.05$). بیشترین میزان غلظت هورمون GTH II در این روز در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم BaP مشاهده شد ($P > 0.05$).

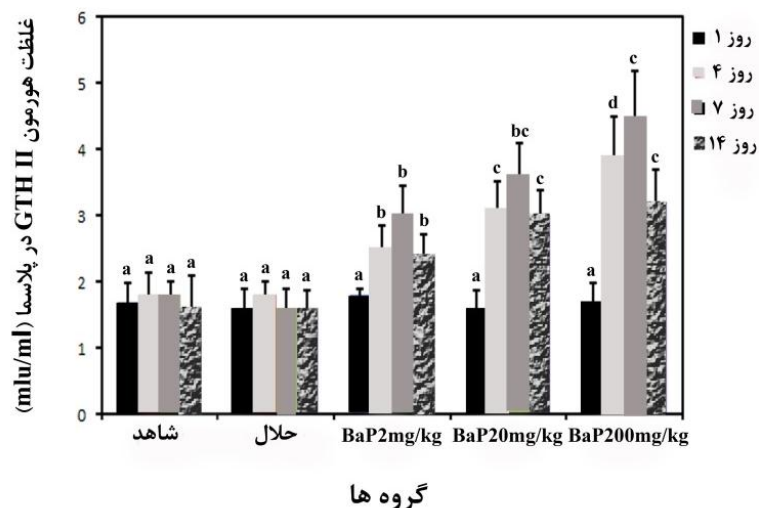
در هفتمین روز نمونه‌برداری، میانگین غلظت این هورمون در گروه‌های شاهد و تیمار شده با BaP دارای تفاوت معنی‌داری بود ($P < 0.05$). میانگین هورمون GTH II در گروه‌های شاهد و حلال از سایر تیمارها کمتر بود و تفاوت معنی‌داری با هم نداشت ($P > 0.05$). بیشترین غلظت هورمون GTH II در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم BaP پس از ۷ روز مواجهه، مشاهده شد ($P < 0.05$).

نتایج مربوط به اندازه‌گیری هورمون GTH I در پلاسمای خون ماهیان هامور معمولی در چهارمین روز نمونه‌برداری نشان داد تنها در غلظت‌های ۲۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن نسبت به سایر گروه‌ها، افزایش یافت ($P < 0.05$ ؛ شکل ۶).

در روز هفتم نمونه‌برداری، غلظت این هورمون بین گروه‌های شاهد و تیمار شده با BaP دارای تفاوت معنی‌داری بود ($P < 0.05$). با توجه به نتایج، در تیمارهای مختلف میزان هورمون GTH I در روزهای ۴ و ۷ نسبت به روز اول افزایش یافت، ولی بیشترین افزایش به ترتیب در روزهای ۷ و ۴ در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم BaP ثبت شد. سپس در تمامی تیمارهای دریافت‌کننده BaP، میزان این هورمون در روز ۱۴ روند نزولی یافت ($P < 0.05$). در روز چهاردهم بیشترین میزان این هورمون در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم BaP ثبت شد که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشت ($P < 0.05$).

نتایج اندازه‌گیری هورمون GTH II

نتایج به دست آمده از اندازه‌گیری هورمون GTH II در پلاسمای خون ماهیان هامور معمولی در روزهای مختلف نمونه‌برداری در



شکل ۷: غلظت هورمون GTH II در پلاسمای ماهیان هامور معمولی هامور معمولی شاهد و تیمار شده با غلظت‌های مختلف بنزوآلفاپایرن (BaP) (میانگین \pm خطای استاندارد). حروف متفاوت روی ستون‌ها نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در هر روز نمونه‌برداری است.

بافتی در بافت‌های مختلف آن‌ها می‌شود (Shirmohammadi et al., 2018). اطلاعات کمی درباره اثرات پاتولوژیکی ناشی از تاثیر همزمان زنبیوتیک‌ها بر اندام جنسی صورت گرفته است، با این حال گزارش‌هایی مبنی بر این که آلاینده‌های مختلف قادر به اثر بر مراحل مختلف رشد گنادی هستند و بدین ترتیب سبب اختلال در سیستم تولید مثلی شوند، وجود دارد. سرعت توزیع آلاینده‌هایی نفتی مانند BaP در بافت‌های مختلف، به سرعت جریان خون و میزان چربی در اندام‌ها و بافت‌های بدن بستگی دارد. به گونه‌ای که

در روز چهاردهم نمونه‌برداری، میزان این هورمون در پلاسمای خون ماهیان تیمار شده با BaP در هر یک از تیمارها نسبت به روز ۷ روند نزولی را نشان داد. اما همچنان از مقادیر این هورمون در گروه‌های شاهد و شاهد حلال در روز ۱۴، بیشتر بود ($P < 0.05$).

بحث

تغییرات ساختار بافتی گناد در اثر القای بنزوآلفاپایرن

قرار گرفتن موجودات آبی در معرض آلاینده‌های مختلف موجب ایجاد تغییرات

شده که در نهایت منجر به مهار رشد و تکامل فولیکول‌های تخمدانی می‌شود.

در روزهای اول نمونه‌برداری ضایعات پاتولوژیکی در بافت گناد در نتیجه القای BaP مشاهده نشد و این اندام دارای ساختار طبیعی بود. معمولاً ساختار بافتی اندام‌ها پس از گذشت مدتی از القای آلاینده‌ها یا عوامل عفونی متاثر می‌شوند و تغییر ساختار بافتی اندام‌ها آخرین پاسخ به القای استرسورها است. باکتری پس از گذشت یک دوره کمون ۶ تا ۷ روزه فعال شده، منجر به تغییر عملکرد فیزیولوژیک اندام‌ها و ساختار بافتی آن‌ها می‌شود (Ackerman and Iwama., 2001).

در مطالعه حاضر بیشترین آسیب‌های پاتولوژیک وارد شده به بافت‌ها در ماهیان تیمار شده با غلظت‌های مختلف BaP در روز ۴ و در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم BaP دیده شد و آسیب‌ها پس از روز چهارم کاهش یافت که می‌توان علت را تجزیه BaP و در نتیجه از بین رفتن اثرات تخریبی آن بر بافت گناد دانست. Schafer و Kohler (۲۰۰۹) با بررسی ساختار گناد شقایق دریایی (*Psammechinus miliaris*) تحت تاثیر PAHها بیان کردند که PAHها منجر به افزایش قابل توجه در دژنره شدن تخمک‌های

میزان تمایل این آلاینده برای تجمع در اندام‌هایی همانند گناد که میزان چربی و جریان خون بالایی دارند نیز افزایش می‌یابد که این تجمع منجر به ایجاد آسیب‌های گوناگون مانند التهاب تخمدانی و تخریب فولیکول‌های تخمدانی و آترزی می‌شود (Sun et al., 2006).

در این مطالعه، نتایج به دست آمده از بررسی تغییرات بافت گناد ماهیان هامور معمولی تحت تاثیر غلظت‌های مختلف BaP در بازه زمانی ۱۴ روزه ارتباط معنی‌داری را بین غلظت و مدت زمان القای آلاینده نشان داد. به طوری که بیشترین آسیب‌های بافتی ایجاد شده در بافت گناد از اولین روز نمونه‌برداری تا اواسط روز ۷ در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم BaP مشاهده شد. از جمله آسیب‌های بافتی ایجاد شده در روزهای دوم، چهارم و هفتم در تیمارها می‌توان به افزایش فولیکول‌های پری‌نوکلئولوس و کروماتین-نوکلئولوس، افزایش بافت همبند بینابینی و کاهش فولیکول‌های تکامل یافته مانند فولیکول وزیکول زرده، به همراه خونریزی و بی‌نظمی در ساختار گناد اشاره کرد. افزایش غلظت BaP سبب کاهش بیشتر هورمون‌های استروئیدی (۱۷-بتا استرادیول و ۱۷-OH-پروژسترون)

دژنره شدن تخمک‌ها و فولیکول‌های گنادی و افزایش بافت همبند بینابینی در فولیکول‌ها مانند آنچه در مطالعه حاضر دیده شد را در بسیاری از بی‌مهرگان و مهره‌داران آبی که در معرض PAHها بودند نیز گزارش کردند (Tay et al., 2003; Arab et al., 2004). فولیکول‌های دژنره شده همچنین در گناد صدف دو-کفه‌ای (*Mytilus edulis*) قرار گرفته در معرض مخلوطی از نفت دریای شمال، آلکیل فنل‌ها و PAHها مشاهده شد (Arab et al., 2004).

Velmurugan و همکاران (۲۰۰۷) با مطالعه بر ماهیانی که به مدت ۱۰ روز در معرض PAHها قرار داشتند، گزارش کردند که در پایان دوره آزمایش، فولیکول‌ها از نوع پری‌ویتلوژنی بوده و تعداد کثیری از فولیکول‌ها در انتهای مرحله پری نوکلئولوس بودند. نتایج مطالعه حاضر نیز هم راستا با نتایج این پژوهشگران است و کاهش چشمگیر ضایعات بافتی در گناد ماهیان متاثر شده از غلظت‌های مختلف BaP در روز ۱۴ آزمایش نشان از متابولیزه شدن این ترکیب و کاهش اثرات آن بود. وجود فولیکول‌های آترتیک فراوان (دژنره شده) از مهم‌ترین ضایعات بافتی گناد در روز هفتم در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم

پری‌ویتلوژنی و شیوع آترزی فولیکول‌ها می‌شوند. بنا بر نظر این پژوهشگران علت ایجاد فولیکول‌های تکامل نیافته با اندازه کوچک در اثر القای PAHها علاوه بر اثر مهاری این ترکیبات بر رشد تخمدانی، به دلیل کاهش سطوح هورمون‌های استروژنی است. همچنین این پژوهشگران گزارش دادند که این ترکیبات تاثیری بر فولیکول‌های تکامل یافته ندارند و فولیکول‌های تکامل نیافته به دلیل افزایش نسبت سطح به حجم آن‌ها، در برابر آلاینده‌ها از حساسیت بیشتری برخوردار هستند (Schaferand Kohler, 2009).

در مطالعه‌ای که بر ماهی کاد اقیانوس اطلس (*Gadus morhua*) صورت گرفت، بیشینه تجمع PAHها در روز چهارم ثبت شد و پس از آن میزان PAHها رو به کاهش گذاشت. دلیل اصلی این کاهش اثرات بسیاری از PAHها بعد از ۴ روز به خاطر افزایش بیوترانسفورمسیون آن‌ها و تبدیل آن‌ها به متابولیت‌های آن‌ها است. همچنین گزارش شده است که میزان PAHها بعد از یک هفته کاملاً کاهش یافت. این مطلب نشانگر توانایی بالای ماهیان در دفع یا متابولیزه کردن این ترکیبات است (Aas et al., 2000). پژوهشگران فراوانی آسیب‌های بافتی مانند

، میزان این دو هورمون در گروه‌های تیمار شده با BaP دارای کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد و شاهد حلال بود. این کاهش تا روز ۱۴ در مورد هورمون ۱۷-OH-پروژسترون وجود داشت. بیشترین کاهش سطح هر دو هورمون در ماهیانی که با BaP تیمار شده بودند در روز ۷ آزمایش و در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم BaP بود که می‌توان علت کاهش این هورمون‌ها را اثرات آنتی‌استروژنیکی بنزوالفاپایرن دانست.

Van Lipzig و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند که ترکیباتی مانند PAHها به ویژه BaP سبب فعال شدن گیرنده‌های آریل هیدروکربن (AhR) می‌شود و با کاهش گیرنده‌های استروژنی (ER) اثرات آنتی‌استروژنیکی خود را اعمال می‌کنند. گیرنده آریل هیدروکربن (AhR) منجر به فعال کردن فاکتور نسخه‌برداری آنزیم CYP1 و در برخی از گونه‌ها سبب فعال شدن آنزیم UGT می‌شود. این آنزیم‌ها نقش به‌سزایی در متابولیسم BaP داشته، مکانیسم اثر خود را از طریق سرکوب بیان ژن گیرنده‌های استروژنی (ER) اعمال می‌کنند و در نهایت سبب کاهش این گیرنده‌ها در سطح هسته سلول می‌شوند که می‌تواند دلیلی بر تأیید اثرات آنتی

BaP بود. همچنین در این تیمار میزان هورمون ۱۷-بتا استرادیول و ۱۷-OH-پروژسترون نسبت به سایر تیمارها کاهش قابل توجهی داشت که نشان دهنده ویژگی‌های آنتی‌استروژنیکی BaP است. تغییرات هورمون‌های ۱۷-بتا استرادیول و ۱۷-OH-پروژسترون

هورمون‌های استروئیدی نقش بسیار مهمی را در تولید مثل ماهیان بر عهده دارند. کاتابولیسم این هورمون‌ها در ماهیان از طریق چند مسیر مختلف کنترل می‌شود که شباهت بسیار زیادی به سایر مهره‌داران به ویژه پستانداران دارد. بسیاری از پژوهشگران بیان کرده‌اند که ترکیبات شیمیایی متفاوت سبب ایجاد اختلال در کاتابولیسم هورمون‌های استروئیدی می‌شود. بسیاری از این ترکیبات از جمله BaP تمایل به اتصال به گیرنده‌های استروژنی و یا آندروژنی دارند و اثرات خود را از این طریق اعمال می‌کنند (James, 2010).

در پژوهش حاضر، بر اساس نتایج به دست آمده از سنجش هورمون‌های ۱۷-بتا استرادیول و ۱۷-OH-پروژسترون در پلاسمای خون ماهیان هامور معمولی تیمار شده با غلظت‌های مختلف بنزوالفاپایرن، در روزهای ۱، ۴ و ۷ آزمایش مشاهده شد که با افزایش غلظت BaP

جنسی در ماهی *Micropogonias undulatus* بعد از حدود ۳ هفته، مشاهده کردند که اندازه تخمدان نسبت به گروه شاهد کاهش یافت و همچنین کاهش معنی‌داری را در غلظت هورمون ۱۷-بتا استرادیول در خون این ماهیان در هفته اول آزمایش گزارش کردند. Anderson و همکاران (۱۹۹۶) گزارش کردند که در محیط آزمایشگاه دو نوع دیوکسین TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin و 2,3,4,7,8-pentachloro dibenzofuran دارای اثرات آنتی‌استروژنیک بودند، به طوری که این ترکیبات می‌توانند برای جایگزینی با گیرنده‌های استروژنی (ER) رقابت کنند و مهم‌ترین دلیل کاهش این هورمون‌ها اثرات آنتی‌استروژنیک این ترکیبات است. Sun و همکاران (۲۰۱۱) با تاثیر دادن فنانترن به مدت ۵۰ روز بر ماهی *Sebastiscus marmoratus* کاهش معنی‌داری را در میزان هورمون‌های ۱۷-بتا استرادیول مشاهده کردند. Monteiro و همکاران (۲۰۰۰) نیز در مطالعه مکانیسم مهار استروئیدوژنز در تخمدان ماهی فلاندر تحت تاثیر ۳ ترکیب از PAHها شامل بنزوآلفاپایرن، کرایزن و فنانترن گزارش کردند که میزان هورمون‌های ۱۷-بتا استرادیول، ۱۷-

استروژنیک BaP باشد (Van Lipzig et al., 2005). در مطالعه حاضر نیز به نظر می‌رسد که افزایش میزان دو هورمون مورد مطالعه بعد از روز چهارم آزمایش به دلیل تجزیه این ماده در کبد ماهیان و در نتیجه کاهش تاثیر آن بر میزان هورمون‌ها باشد. به طور کلی مکانیسم‌های متفاوتی در ارتباط با نحوه اثر زواستروژن‌هایی مانند PAHها بر میزان هورمون‌های استروژنی مطرح شده است از جمله (۱) هیدرو کربن‌های آروماتیک توانایی بر هم زدن ساختار گیرنده‌های استروژنی را دارند که سبب ناتوانی گیرنده‌ها در شناسایی هورمون‌های استروژنی می‌شود (Stancel et al., 1995). (۲) همچنین تعدادی از PAHها سبب افزایش کاتابولیسم هورمون‌های استرادیولی توسط P450 می‌شود (Garcia et al., 1997). Arukwe (۲۰۰۱) گزارش دادند که ترکیباتی مانند ۴ نانوفنول یک ترکیب آنتی‌استروژنیک است که ساز و کاری مشابه با استروژن دارد و قادر به اتصال به گیرنده‌های ER است و سبب کاهش میزان هورمون‌های استروئیدی در مواجهه با ترکیب فوق می‌شود. Thomas و Budiantara (۱۹۹۵) با مطالعه تاثیر بنزوآلفاپایرن بر عملکرد غدد درون‌ریز

در پژوهش حاضر، بر اساس نتایج به دست آمده از سنجش هورمون‌های GTH I و GTH II در پلاسمای خون ماهیان هامور معمولی تیمار شده با غلظت‌های مختلف بنزوآلفاپايرن، در روزهای ۱، ۴، ۷ و ۱۴ آزمایش مشاهده شد که میزان این دو هورمون در گروه‌های تیمار شده با BaP نسبت به گروه شاهد به طور کلی افزایش وابسته به غلظت داشت. به عبارت دیگر، بیشترین سطح هر دو هورمون در ماهیان تیمار شده با ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم BaP در روز ۷ آزمایش مشاهده شد. افزایش در میزان دو هورمون را در تیمار-های BaP می‌توان به دلیل ترشح هورمون‌های ۱۷-بتا استرادیول و ۱۷-OH-پروژسترون دانست.

پژوهش‌ها نشان داده است که هورمون‌های استروئیدی مانند هورمون‌های ۱۷-بتا استرادیول بر میزان هورمون‌هایی که توسط محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد ترشح می‌شوند تاثیرگذار هستند و بازخوردهای منفی یا مثبت دارند (Thibaut and Porte, 2004). در مطالعه حاضر با افزایش غلظت BaP در روزهای ۴ و ۷ میزان هورمون‌های جنسی کاهش و سطح هورمون‌های گنادوتروپینی افزایش یافت که دلیل آن اثر فیدبک منفی

آلفا هیدروکسی پروژسترون و آندروژن‌ها به طور معنی‌داری با افزایش غلظت این ترکیبات کاهش می‌یابد. همچنین آن‌ها در تایید اثرات آنتی‌استروژنیکی BaP بر ماهی فلاندر نشان دادند که این ترکیب قادر به کاهش میزان هورمون‌های ۱۷-بتا استرادیول و ۱۷-OH-پروژسترون حتی در غلظت‌های پایین است (Monteiro et al., 2000).

تغییرات هورمون‌های GTH I و GTH II

عمده نوسانات هورمون‌های تولیدمثلی در ماهیان تابع نوسانات و تغییرات شرایط زیست‌محیطی است که منجر به بروز پاسخ‌های تولیدمثلی در آبزیان می‌شود (Sun et al., 2011). مواد شیمیایی گوناگون قادر هستند که به صورت مستقیم در فعالیت‌های عصبی غده هیپوتالاموس دخالت کرده، در نتیجه سبب ایجاد تغییراتی در میزان ترشح هورمون‌های آزاد کننده GnRH شده، در نهایت به نوبه خود سبب ایجاد تغییراتی در میزان ترشح هورمون‌های گنادوتروپینی (GTH) از هیپوفیز شوند که این هورمون‌ها نیز بر میزان هورمون‌های جنسی موثر است (Trudeau et al., 1993).

II بود (Gesto et al., 2006). در بسیاری از مطالعات بیان شده است که PAHها قادر به تداخل در استروئیدوژنز در گناد بوده، همچنین قادر به ایجاد تداخل در محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد از طریق ایجاد تغییرات در عملکرد سیستم‌های انتقال دهنده عصبی هستند و پس از آن هورمون‌های هیپوفیز را تحت تاثیر قرار می‌دهند (Al-Kindi et al., 2000).

Thomas و همکاران (۲۰۰۷) با بررسی اثر نفتالن به عنوان یک PAH دو حلقه‌ای و بنزوآلفاپایرن یک PAH پنج حلقه‌ای بر مغز ماهی *Ictalurus punctatus* مشاهده کردند که سطح انتقال دهنده‌های عصبی کاهش یافت و باعث افزایش در سطوح هورمون‌های گنادوتروپینی (GTH I و GTH II) شد. Sun و همکاران (۲۰۱۱) با مطالعه تاثیر غلظت‌های متفاوت فنانتین بر ماهی *Sebastiscus marmoratus* میزان هورمون‌های جنسی مانند ۱۷-بتا استرادیول و سطح هورمون‌های گنادوتروپینی (GTH I و GTH II) را طی مدت زمان ۷ روز اندازه‌گیری کردند که نشان دهنده پاسخ وابسته به غلظت هورمون‌ها به فنانتین بود. آن‌ها گزارش کردند که میزان هورمون ۱۷-بتا استرادیول با افزایش غلظت

هورمون‌های استروئیدی بر محور هیپوتالاموس است که منجر به افزایش ترشح هورمون‌های گنادوتروپینی در پاسخ به کاهش هورمون‌های استروئیدی شد.

Gesto و همکاران (۲۰۰۶) با قرار دادن ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به مدت ۱ ساعت تا چند روز در معرض غلظت‌های مختلف نفتالن، مشاهده کردند که سطوح هورمون ۱۷-بتا استرادیول به صورت وابسته به غلظت کاهش یافت که علت آن را اثرات آنتی‌استروژنیکی این ترکیب دانستند. همچنین آن‌ها با بررسی ساختار مغز و به ویژه با بررسی محورهای هیپوتالاموس-هیپوفیز-گنادی گزارش کردند که نفتالن سبب کاهش هورمون‌های جنسی شد و افزایش هورمون‌های GTH در این ماهیان را به دلیل فیدبک منفی این هورمون‌ها بر هیپوتالاموس عنوان کردند. از سوی دیگر این پژوهشگران بیان کردند که ترکیب حاضر سبب ایجاد اختلالاتی در مغز و نیز متابولیسم هورمون‌های هیپوفیزی شد. آن‌ها با بررسی میزان انتقال دهنده‌های عصبی در این محور کاهش وابسته به غلظت را مشاهده کردند و نتیجه گرفتند که کاهش ناقل‌های عصبی نیز دلیل دیگر افزایش میزان هورمون‌های گنادوتروپینی (GTH I و GTH

استروئیدی (۱۷-بتا استرادیول و ۱۷-OH-پروژسترون) چند روز پس از تزریق BaP کاهش یافت که نشان دهنده ویژگی‌های آنتی‌استروژنیکی این ترکیب است که با کاهش گیرنده‌های استروژنی (ER) اثرات خود را اعمال می‌کند و سبب کاهش هر دو هورمون می‌شود. میزان هورمون‌های گنادوتروپینی در مواجهه با BaP در روز ۷ به بیشترین میزان خود رسید که بسیاری از پژوهشگران علت این افزایش را به دلیل فیدبک منفی هورمون‌های استروئیدی می‌دانند. از سوی دیگر ترکیباتی مانند BaP سبب کاهش انتقال‌دهنده‌های عصبی در مغز به ویژه در محور هیپوفیزی-گنادی می‌شود و در نهایت بر سلول‌های ترشح‌کننده این هورمون‌ها تاثیر می‌گذارد.

فنانترن کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشت که بیشینه این کاهش در روز چهارم آزمایش بود. ولی میزان تاثیر این ترکیب بر مغز و میزان هورمون‌های GTH به صورت عکس هورمون ۱۷-بتا استرادیول بود و افزایش وابسته به غلظت را نشان داد که علت آن را به دلیل فیدبک هورمون‌ها بر یکدیگر و برآلاینده دانستند (Sunet al., 2011).

در مطالعه حاضر، اثرات بنزوالفاپایرن بر هورمون‌های استروئیدی، هورمون‌های گنادوتروپینی و ساختار بافتی گناد ماهی هامور معمولی مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج بیانگر آن بود که بیشترین تغییرات بافتی گناد در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم BaP و در روز ۷ آزمایش مشاهده شد. بر اساس نتایج، میزان هورمون‌های

منابع

- Aas E., Beyer J. and Goksoyr A. 2000.** Fixed wavelength fluorescence (FF) of bile as a monitoring tool for poly aromatic hydrocarbon exposure in fish: An evaluation of compound specificity, inner filter effect and signal interpretation. *Biomarkers*, 5(1): 9–23.
- Ackerman P.A. and Iwama G.K. 2001.** Physiological and cellular stress responses of juvenile rainbow trout to vibriosis. *Journal of Aquatic Animal Health*, 13: 173–180.
- Alijani Ardeshir R., Zolgharnein H., Movahedinia A., Salamat N. and Zabihi E. 2017.** Comparison of waterborne and intraperitoneal exposure to fipronil in the Caspian white fish (*Rutilus frisii*) on acute toxicity and histopathology. *Toxicology Reports*, 4: 348–357.
- Al-Kindi A.Y.A., Brown J.A. and Waring C.P. 2000.** Endocrine, physiological and histopathological responses of fish and their larvae to stress with emphasis on exposure to crude oil and various petroleum hydrocarbons. *Sultan Qaboos University Journal for Science*, 5: 1–30.
- Anderson M.J., Olsen H., Matsumura F. and Hinton D.E. 1996.** In vivo modulation of 17- β -estradiol- induced vitellogenin synthesis and estrogen receptor in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver cells by β -naphthoflavone. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 137(2): 210–218.
- Arab A., Lek S., Lounaci A. and Park Y. 2004.** Spatial and temporal patterns of benthic invertebrate communities in an intermittent river (North Africa). *Journal of Limnology*, 40: 317–327.
- Arukwe A. 2001.** Cellular and molecular responses to endocrine-modulators and the impact on fish reproduction. *Marine Pollution Bulletin*, 42: 643–655.
- Bancroft J.D. and Gamble M. 2008.** *Microorganisms. Theory and Practice of Histological Techniques.* Elsevier, USA. 725P.
- Carlson E.A., Li Y. and Zelikoff J.T. 2002.** Exposure of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to benzo[a]pyrene suppresses immune function and host resistance against bacterial challenge. *Aquatic Toxicology*, 56: 289–301.
- Chen J.M.H., Wong Y.S. and Tom Nora F.A. 2008.** Multi-factors on biodegradation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by *Sphingomonas* sp. a bacterial strain isolation from

- mangroves sediment. *Marine Pollution Bulletin*, 57: 695–702.
- Chouthkanthiwar V.P., Paradkar S.N., Grace S. and Nagalingam S. 2013.** Design of immunoradiometric assay for gonadotropins using a common detection antibody: An experience. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, PMID: 24359295.
- Fowler S.W., Villeneuve J.P., Wyse E., Jupp B. and De Mora S. 2007.** Temporal survey of petroleum hydrocarbons, organochlorinated compounds and heavy metals in benthic marine organisms from Dhofrar, southern Oman Baseline. *Marine Pollution Bulletin*, 54: 357–367.
- Garcia K.C., Degano M., Stanfield R.L., Scott C.A., Brunmark A., Peterson P.A., Wilson I. and Teyton L. 1997.** Structural basis of T cell recognition. *The Journal of Clinical Investigation*, 82: 1811–1817.
- Gesto M., Tintos A., Soengas J.L. and Miguez J.M. 2006.** Effects of acute and prolonged naphthalene exposure on brain monoaminergic neurotransmitters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 144: 173–183.
- Hirose T., Mortino K., Kizu R., Toriba A., Hayakawa K., Ogawa S., Inoue S., Muramatus M. and Masamune Y. 2001.** Estrogenic/ antiestrogenic activities of benzo[a]pyrene monohydroxy derivatives. *Journal of Health Science*, 47: 552–558.
- James M.O. 2010.** Steroid catabolism in marine and freshwater fish. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 127: 167–175.
- Kamali E., Dehghani R., Behzadi S. and Ejlali K. 2006.** A study on the some specials of biological javelin grunter (*Pomadasy kaakan*), tigertooth croker (*Otolithes ruber*) and orange spotted grouper (*Epinephelus coioides*) in Hormozgan waters, final report in Persian. Iranian Fisheries Research Organization. 91P.
- Khaniyan M., Salamat N., Safahieh A. and Movahedinia A. 2016.** Detection of benzo[a]pyrene-induced immunotoxicity in orange spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Environmental Toxicology*, 31(3): 329–338.
- Lima I., Moreira S.M., Osten J.R., Soares A.M. and Guilhermino L. 2007.** Biochemical responses of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* to petrochemical environmental contamination along the North-western coast of Portugal. *Chemosphere*, 66: 1230–1224.

- Miller J.S. and Olejnik D. 2001.** Photolysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water. *Water Research*, 35: 233–243.
- Monteiro P.R., Reis-Henriques M.A. and Coimbra J. 2000.** Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit in vitro ovarian steroidogenesis in the flounder *Platichthys flesus* L. *Aquatic Toxicology*, 48(4): 549–559.
- Movahedinia A., Abtahi A. and Bahmani M. 2012.** Gill histopathological lesions of the sturgeons. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 7(8): 710–717.
- Movahedinia A., Hedayati A., Safahieh A. and Savari A. 2011.** Detection of some hormonal responses of yellowfin sea bream (*Acanthopagrus latus*) in Mahshahr Creeks (North West of Persian Gulf). *World Journal of Zoology*, 6 (1): 40–46.
- Movahedinia A., Savari A., Morovvati H., Koochanin P., Marammazi G. and Nafisi M. 2009.** The effects of changes in salinity on gill mitochondria-rich cells of juvenile yellowfin seabream, *Acanthopagrus latus*. *Journal of Biological Sciences*, 9(7): 710–720.
- Sadeghi P., Kazerouni F., Savari A., Movahedinia A., Safahieh A. and Ajdari D. 2015.** Application of biomarkers in Epaulet grouper (*Epinephelus stoliczkae*) to assess chromium pollution in the Chabahar Bay and Gulf of Oman. *The Science of the Total Environment*, 518-519: 554–561.
- Schafer S. and Kohler A. 2009.** Gonadal lesions of female sea urchin (*Psammechinus miliaris*) after exposure to the polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene. *Marine Environmental Research*, 68(3): 128–136.
- Shirmohammadi M., Salamat N., Ronagh M., Movahedinia M. and Hamidian G. 2018.** Using cell apoptosis, micronuclei and immune alternations as biomarkers of phenanthrene exposure in yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 72: 37–47.
- Simonato J.D., Guedes C.L.B. and Martines C.B.R. 2008.** Biochemical, physiological, and histological changes in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69: 112–120.
- Stancel G.M., Boettgertong H.L., Chiappetta C., Hyder S.M., Kirkland J.L., Murthy L. and Loose-Mitchell D.S. 1995.** Toxicity of endogenous and environmental estrogen: What is the role of elemental interaction? *Environmental Health Perspectives*, 103: 29–33.

- Sun L., Zuo Z., Luo H., Chen M., Zhong Y., Chen Y. and Wang C. 2011.** Chronic exposure to phenanthrene influences the spermatogenesis of male *Sebastes marmoratus*: U-shaped effects and the reason for them environmental science and technology. *Environmental Science and Technology*, 45: 10212–10218.
- Sun Y., Yu H., Zhang J., Yin Y., Shi H. and Wang X. 2006.** Bioaccumulation, depuration and oxidative stress in fish *Carassius auratus* under phenanthrene expoze. *Chemosphere*, 63: 1319–1327.
- Taheri R., Salamat N. and Movahedinia A. 2015.** Using immune responses in *Euryglossa orientalis* and *Acanthopagrus latus* from Persian Gulf as indicators of environmental health. *Marine Pollution Bulletin*, 98: 47–57.
- Tay K.L., Teh S.J., Doe K., Lee K. and Jackman P. 2003.** Histopathological and histochemical biomarker responses of Baltic clam, *Macoma balthica*, to contaminated Sydney Harbour sedimental, Nova Scotia, and Canada. *Environmental Health Perspectives*, 111: 237–280.
- Thibaut R. and Porte C. 2004.** Effects of endocrine disrupters on sex steroid synthesis and metabolism pathways in fish. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 92: 484–494.
- Thomas P. and Budiantara L. 1995.** Reproductive life history stages sensitive to oil and naphtalen in Atlantic croaker. *Marine Environmental Research*, 39: 147–150.
- Thomas P., Rahman M.D., Khan I.A. and Kummer J.A. 2007.** Widespread endocrine disruption and reproductive impairment in an estuarine fish population exposed to seasonal hypoxia. *Proceedings of the Royal Society Series B*, 274: 2693–2702.
- Trudeau V.L., Murthy C.K., Habibi H.R., Sloley B.D. and Peter R.E. 1993.** Effects of sex steroid treatment on gonadotropin-releasing hormone-stimulates gonadotropin secretion from the goldfish pituitary. *Biology of Reproduction*, 48: 300–307.
- Van Lipzig M.M.H., Vermeulen N.P.E., Gusinu R., Lgler J., Frank H., Seidel A. and Meerman J.H.N. 2005.** Formation of estrogenic metabolites of benzo[a]pyren and chrysene by cytochrome P450 activity and their combined and supra-maximal estrogenic activity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19: 41–55.
- Velmurugan B., Selvanayagam M., Cengiz E.I. and Unlu E. 2007.**

Histopathology of lambda-cyhalothrin on tissues (gill, kidney, liver and intestine) of *Cirrhinus mrigala*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 24: 286–291.

Wang L., Pan L., Liu N., Liu D., Xu C. and Miao J. 2011. Biomarkers and bioaccumulation of clam *Ruditapes philippinarum* in response to combined cadmium and benzo[a]pyrene exposure. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 3407–3417.

Yin Y., Jia H., Sun Y., Yu H., Wang X., Wu J. and Xue Y.

2007. Bioaccumulation and ROS generation in liver of *Carassius auratus*, exposed to phenanthrene. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 145: 288–293.

Young G., Bjornsson B.T., Prunet P., Lin R.J. and Bern H.A. 1989. Smoltification and seawater adaptation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): Plasma prolactin, growth hormone, thyroid hormones, and cortisol. *General and Comparative Endocrinology*, 74: 335–345.



Research Paper

Study on histophysiological effects of benzo[a]pyrene on the gonad and reproductive hormones in female orange spotted grouper, *Epinephelus coioides*, under laboratory conditions

Raheleh Bagzadeh Baghan¹, Negin Salamat², Ahmad Savari³, Abdolali Movahedinia^{4,*}

Received: December 2017

Accepted: April 2018

Abstract

This study aimed to investigate the effects of benzo[a]pyrene (BaP) on pituitary-gonad axis of orange spotted grouper (*Epinephelus coioides*). Fish were injected with 0, 2, 20 and 200 mg/kg of BaP per body weight and were kept under laboratory conditions for 14 days. Plasma samples were taken at days 1, 4, 7, and 14 and changes in 17- β -Estradiol (E2), 17-OH-progesteron, GTH I and GTH II were evaluated. Alterations of gonad tissue structure also were studied in treated fish. Exposure of fish to BaP resulted in a significant decrease of 17- β -Estradiol, 17-OH-progesteron and significant increase in GTH I and GTH II plasma levels ($P < 0.05$). Also, changes were observed in the ovarian tissue of BaP exposed fish including tissue disorganization, increase in choromatin-nocleulos and prenucleulos follicles, increase in interstitial connective tissue and atretic follicles and decrease in developed follicles. Based on the results, decreases in the levels of steroid hormones several days after BaP exposure is due to antistrogenic effects of this compound that acts via decreasing in estrogenic receptors. On the other hand, the increase in GTHs, 7 days after exposure, is because of negative feedback of steroid hormones.

Key words: *Benzo[a]pyrene*, *Ovary*, *Epinephelus coioides*, *Histophysiology*.

1- M.Sc. in Histology, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran.

2- Associate Professor in Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran.

3- Professor in Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran.

4- Associate Professor in Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran.

*Corresponding Author: amovahedinia@umz.ac.ir