Archive of SID

مجله بوم شناسی آبزیان

Journal homepage: http://jae.hormozgan.ac.ir

تغییرات هیستوپاتولوژی تخمدان ماهی گورخری (*Danio rerio*) در مواجهه با غلظت‌های تحت کشنده متیل پارابن

نسرین حسن زاده*

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

نوع مقاله:
پژوهشی

تاریخچه مقاله:
دریافت: ۹۵/۰۵/۱۴
اصلاح: ۹۵/۰۶/۱۶
پذیرش: ۹۵/۰۷/۱۵

کلمات کلیدی:
بیومارکر
سمیت
ماهی گورخری
متیل پارابن

چکیده

ترکیبات پارابن به عنوان مواد نگهدارنده‌ی آنتی باکتریال، کاربرد گسترده‌ای در تولید مواد دارویی، بهداشتی و آرایشی دارد و منجر به بروز سمیت تولید مثلی در موجودات زنده می‌شود. هدف این تحقیق کاربرد بیومارکرهای هیستوپاتولوژیک تخمدان در ارزیابی تاثیر سمیت تولید مثلی متیل پارابن در ماهی گورخری ماده است. در این مطالعه تغییرات هیستوپاتولوژی تخمدان و شاخص گنادی در ماهی گورخری پس از مواجهه ۳ هفته‌ای مزمن با غلظت‌های ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۱ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر متیل پارابن در شرایط نیمه-استاتیک بررسی شد. رنگ آمیزی تخمدان توسط هماتوکسیلین و ائوزین صورت گرفت. نتایج نشان داد که مواجهه با متیل پارابن در هیچ‌یک از تیمارها منجر به بروز تاثیر معنی‌دار در زنده‌مانی و فاکتور k نشد. همچنین در همه تیمارها کاهش شاخص گنادی و در تیمارهای با غلظت بالاتر بروز عوارض تخمدانی شامل چروکیدگی اووپلاسم، تخریب زرده اووپلاسم، التهاب گرانولوما، جدا شدن لایه سلول‌های گرانولوزا از غشای پایه و رها شدن مایع پروتئینی در فضای بینابینی تخمدان دیده شد. همچنین تعداد زیادی از اووسیت‌های ویتلوژنیک آترتیک در غلظت‌های بالاتر در تخمدان‌ها دیده شد. افزایش تعداد فولیکول‌های آترتیک در تخمدان تاثیرات منفی بر باروری خواهد داشت و بروز عوارض تخمدانی ایجاد شده، نشان می‌دهد مواجهه مزمن با غلظت‌های تحت کشنده متیل پارابن منجر به افزایش ویژگی استروژنیک تخمدان و تاثیرات غیرقابل بازگشت تولید مثلی در جنس ماده می‌شود.

مقدمــه

مسأله آلودگی محیط زیست به علت افزایش روز افزون جمعیت، تولید مواد شیمیایی متنوع، گسترش صنایع مختلف به دلیل تهدید سلامت اکوسیستم‌ها، موجودات زنده از جمله انسان، روز به روز اهمیت بیشتری پیدا می‌کند. در بین اکوسیستم‌های مختلف، اکوسیستم‌های آبی به عنوان آخرین پذیرنده آلاینده‌های مختلف و محل تجمع و ذخیره این مواد از اهمیت خاصی برخوردار هستند. به همین دلیل امروزه مطالعات سم‌شناسی اکوسیستم‌های آبی[1] در اولویت می‌باشد. از جمله اثرات قابل توجه آلاینده‌ها، که در مطالعات بوم‌سم‌شناسی[2] بیشتر مورد توجه قرار گرفته است، ایجاد اختلال در غدد درون ریز موجودات زنده،

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: nasrinhassanzadeh@gmail.com

[1] Aquatic Toxicology
[2] Ecotoxicoogy

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 11:17 +0430 on Saturday July 29th 2017

www.SID.ir

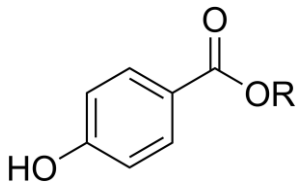
Archive of SID

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 11:17 +0430 on Saturday July 29th 2017

از جمله انسان در دو دهه گذشته با مطالعه ترکیبات مختل کننده غدد درون ریز [۳](EDCs) و تاثیرات آن، نگرانی‌هایی در مورد ناهنجاری‌های تولید مثلی[۴] به وجود آورده است (Hutchinson *et al*., 2006; Mills and Chichester, 2005).

ترکیبات مختل کننده غدد درون‌ریز، مواد شیمیایی هستند که منجر به بروز اختلال در سیستم هورمونی بدن مهره‌داران می‌شوند و شامل استروژن‌های استروئیدی طبیعی، فیتواستروژن‌ها، زنواستروژن‌ها[۵] (استروژن‌های سنتزی، آفت کش‌ها، پلاستیسایزرها، ترکیبات پارابن، ترکیبات آلکیل فنول، فلزات سنگین) هستند (Bars *et al*., 2011; Kidd *et al*., 2007; Mills and Chichester, 2005). آلاینده‌های EDCs با ایجاد تداخل در سنتز، رهاسازی، انتقال، متابولیسم، اتصال، فعال و یا غیرفعال کردن هورمون‌ها و تاثیر بر گیرنده‌های طبیعی منجر به بروز صدمات مختلفی از جمله ناهنجاری‌های تولید مثلی، انواع سرطان، دیابت، بر هم خوردن مکانیسم‌های مختلف فیزیولوژیک و ... می‌شوند (Cheshenko *et al*., 2008; Moggs, 2005; Scholz and Mayer, 2008). اختلال در ظرفیت تولید و کاهش تولید گامت‌های جنسی زنده از جمله مهمترین تاثیرات آلاینده‌های EDCs است (Liu *et al*., 2015).

پارابن‌ها از جمله آلاینده‌های زنواستروژن و پارا- هیدروکسی بنزوییک اسید[۶] هستند که به دلیل خواص آنتی باکتریایی و جلوگیری از رشد باکتری‌ها و قارچ‌ها در گروه مواد نگهدارنده[۷] طبقه بندی می شوند و ۴ استر مهم و پرکاربرد آن شامل متیل پارابن، اتیل پارابن، پروپیل پارابن و بنزیل پارابن می‌باشد. بوتیل پارابن و ایزوبوتیل پارابن نیز در این دسته قرار می‌گیرند ولی کمتر مورد استفاده قرار می گیرند (Gonzalez-doncel *et al*., 2014; Soni Taylor *et al*., 2002). شکل ۱ ساختار شیمیایی ترکیبات پارابن را نشان می‌دهد. پارابن‌ها کاربرد گسترده‌ای در تولید: نگهدارنده‌های غذایی، داروها، لوازم آرایشی، انواع کرم‌های پوستی، شامپو، کرم‌های ضد آفتاب، خوشبو کننده‌ها و صابون‌ها دارند و به دلیل قیمت ارزان و عملکرد فوق العاده آنها در جلوگیری از رشد باکتری‌ها و افزایش زمان مصرف این گونه کالاها، شرکت‌های بسیاری از این ماده در تولید محصولات خود استفاده می‌کنند. بر طبق آمار، پارابن‌ها در بیش از ۹۰ درصد محصولات آرایشی و بهداشتی وجود دارند (Scialli, 2011; Soni Taylor *et al*., 2002). تاثیر ترکیبات مختلف پارابن به ویژگی‌های فیزیکی و ساختار شیمیایی آن بستگی دارد (Soni *et al*., 2005). جایگزینی گروه‌های شیمیایی مختلف سبب بروز تغییراتی در حلالیت و طیف اثر میکروبی پارابن‌ها می‌شود. همچنین با افزایش طول زنجیره آلکیلی، حلالیت در آب کاهش و حلالیت در روغن‌ها و حلال‌های آلی افزایش می‌یابد. طیف اثر ضدمیکروبی این مواد نیز با افزایش طول زنجیره آلکیلی افزایش می‌یابد. برای رسیدن به اثر محافظتی بیشتر و طیف اثر وسیع‌تر، معمولاً از ترکیب چند نوع پارابن در فرمولاسیون نگهدارنده‌ها استفاده می‌شود (Alslev *et al*., 2005).



شکل ۱. ساختار شیمیایی پارابن‌ها

مطالعات قبلی نشان می‌دهد با مصرف محصولات غذایی و استفاده از محصولات بهداشتی و آرایشی حاوی پارابن، این ماده پس از جذب پوستی و ورود به بدن، از طریق خون و مایعات میان بافتی جذب شده و در نهایت توسط کربوکسی استرازهای کبدی متابولیزه و از طریق ادرار دفع می‌شود. میزان نفوذ پوستی و در نتیجه فراهمی زیستی[۸] پارابن در بدن بستگی به نوع پارابن (طول زنجیره آلکیل بیشتر، جذب بیشتر)، پایه محصول (درصد فاز چرب به فاز آبی) و مواد فعال سطحی[۹] به کار برده شده در

3 Endocrine Disruption Compounds
4 Reproductive Anomalies
5 Xenoestrogen
6 p-hydroxybenzoic acid ester
7 Preservative
8 Bioavailability
9 Surfactant

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 11:17 +0430 on Saturday July 29th 2017

آن دارد (Soni *et al*., 2005). در کاربردهای موضعی بخشی از پارابن که وارد بافت پوست و لایه زیرین پوست می‌شود، توسط ۴-کربوکسی استراز پوست به پاراهیدروکسی بنزوئیک اسید و آلکیل مربوطه متابولیزه می شود. کربوکسی استرازهای بافت‌های زیرین پوست بر پارابن‌هایی با زنجیره کوتاه‌تر موثرتر بوده درحالی که پارابن‌هایی با زنجیره آلکیلی بلندتر توسط کربوکسی استرازهای کراتینوسیت تجزیه می‌شوند. اما مطالعات جدید نشان می‌دهد که بخشی از پارابن جذب شده در بافت‌های بدن، بدون هیدرولیز توسط استرازهای کبدی در بدن باقی مانده و به دلیل شباهت ساختاری ویژه با استروژن، با تحریک گیرنده استروژن[10] ER منجر به تولید و ترشح بیشتر استروژن می‌گردد (Bjerregaard *et al*., 2003) .افزایش ترشح این هورمون در جنس نر منجر به کاهش تعداد اسپرم و افزایش ناباروری می‌شود و در دراز مدت می تواند بقاء و پایداری یک جمعیت را در معرض خطر قرار دهد (Barse *et al*., 2010; Janjua *et al*., 2007; Oishi, 2002). همچنین افزایش غیرطبیعی بیوسنتز هورمون استروژن در جنس ماده نیز اختلالات غیرطبیعی تخمدانی و عدم تعادل در هورمون‌های جنسی استروئید را منجر می‌شود (Bhatia *et al*., 2015). به دلیل پراکنش وسیع پارابن‌ها در محیط آبی، آبزیان در معرض مواجهه با مقادیر زیادی از این آلاینده قرار می‌گیرند. امروزه تغییر در تعادل جمعیت‌های نر و ماده آبزیان مختلف به دلیل کاهش قدرت باروری و اختلال در تولیدمثل طبیعی منجر به کاهش جمعیت‌ها و خطر انقراض برخی از گونه‌ها شده است (Luna and Coady, 2016). بنابراین درک مکانیسم و میزان سمیت آلاینده‌های مختلف در آبزیان بسیار ضروری می‌باشد.

ماهی گورخری یک مدل اکولوژیک جذاب و کارآمد برای غربالگری آلاینده‌ها و مکانیسم تاثیر آنها است. ماهی گورخری *Danio rerio* گونه‌ای از ماهیان آب شیرین مناطق حاره از خانواده ماهیان کپور (Cyprinidae) و یک ماهی آکواریومی معروف است که به عنوان گونه مدل اکولوژیک، کاربرد گسترده‌ای در مطالعات علمی دارد و مدل مناسبی برای مطالعات سم‌شناسی مهره‌داران و بوم‌سم‌شناسی جهت تعیین تاثیر مواد شیمیایی در بقاء، رشد و تولید مثل به شمار می‌رود (Baumann *et al*., 2014; Van den Bulck *et al*., 2011). همچنین این ماهی به دلیل حساسیت بالا به مواد زنواستروژن در مراحل اولیه زندگی و تولید مثل بالا می‌تواند به عنوان یک مدل ارگانیسمی ایده‌آل برای ارزیابی خطرات محیط زیستی ناشی از ترکیبات مختل کننده غدد درون ریز در گونه‌های آبزی برای تعیین فعالیت شیمیایی، تعیین آستانه اثر و مطالعه مکانیسم عمل این ترکیبات مورد استفاده قرار گیرد. با استفاده از ماهی گورخری در مطالعه آلاینده‌های EDCs و انجام آزمون مواجهه مزمن با آلاینده‌ها در غلظت کم و در زمان طولانی، می‌توان مکانیسم تاثیر سمیت این آلاینده‌ها بر تولید مثل را بررسی کرد (Brannen *et al*., 2010; Selderslaghs *et al*., 2009).

از طرف دیگر بافت‌شناسی[11] گناد، ابزاری ارزشمند و کارآمد برای بررسی تاثیرات آلاینده‌های مختل کننده غدد درون‌ریز در ماهی گورخری است. آلاینده‌ها با ایجاد تغییرات ملکولی جزئی و ایجاد اختلال هورمونی با تاثیر بر سطوح مختلف سلول، بافت، اندام، مرفولوژی و ... می‌تواند تاثیرات مخرب را به وضوح آشکار سازند. وقوع تاثیرات هیستوپاتولوژیک به خصوص در گنادها می‌تواند در پیش‌بینی و توان تولید مثل موجودات تحت مطالعه در شرایط آزمایشگاهی کمک زیادی نماید. ایجاد تغییرات مرفولوژیک در ساختار و کارکرد گنادها می‌تواند منجر به عدم کارآیی آنها در تولیدمثل شده که در نهایت منجر به تاثیر مخرب بر جمعیت موجودات می‌شود. به همین دلیل امروزه برای مطالعات سم‌شناسی آلاینده‌های EDCs در محیط‌های آبی، استفاده از ابزار هیستوپاتولوژی گناد جهت بررسی مکانیسم تاثیر این ترکیبات در ماهیان مدل بسیار مرسوم می‌باشد (Hutchinson *et al*., 2006). لذا هدف این تحقیق بررسی تاثیر سمیت متیل پارابن به عنوان یکی از ترکیبات پرمصرف در صنایع آرایشی و بهداشتی بر ماهی مدل گورخری در شرایط مواجهه مزمن است. استفاده و تفسیر تغییرات هیستوپاتولوژیک در تخمدان ماهی مدل می‌تواند بیومارکر مناسبی برای تفسیر نحوه تاثیر متیل پارابن بر تولید مثل جنس ماده باشد.

مواد و روش‌ها

[10] Estrogen Receptor
[11] Histology

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 11:17 +0430 on Saturday July 29th 2017

تهیه و نگهداری ماهی گورخری

در این تحقیق حدود ۴۰۰ قطعه ماهی ماده گورخری حدود ۳ ماهه از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان زینتی تهران تهیه شد. این ماهی‌ها در ۴ آکواریوم ۸۰ لیتری با سیستم هوادهی ممتد و فیلترینگ به مدت ۲ هفته به منظور سازگاری با شرایط آزمایشگاهی نگهداری شدند. آب ذخیره آکواریوم‌ها مدام با یک پمپ هوادهی شده و با تعبیه یک سیستم چرخشی و عبور دائمی آب از یک منبع حاوی آندزیت و زئولیت سختی آب کاهش یافت. شرایط آب آکواریوم برای نگهداری ماهیان به شرح زیر بود: درجه حرارت ۰/۵± ۲۷ درجه سانتیگراد، سختی آب ۱۸۱ میلی‌گرم بر لیتر، pH ۷/۳±۰/۲۵، اکسیژن محلول> ۹ میلی‌گرم بر لیتر، آمونیاک < ۰/۰۷ ، نیتریت ۱-۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر و نیترات ۱۱-۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر. همچنین تنظیم نور به صورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی اجرا شد. تنظیم درجه حرارت آب آکواریوم از طریق قرار دادن یک بخاری آبی و تنظیم دمای ۲۷ درجه سانتیگراد انجام شد. ماهی‌ها روزانه ۳ مرتبه با غذای Flake و بیومار به اندازه ۳٪ وزنشان تغذیه شدند و در پایان هر روز غذای اضافی و زائدات کف آکواریوم به روش سیفون از آکواریوم حذف شد.

شرایط مواجهه مزمن

۴ غلظت غیرکشنده متیل پارابن شامل ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۱ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر بر اساس مطالعات قبلی تعیین دوز کشندگی ترکیبات پارابن انتخاب شده (Boberg *et al*., 2010) و برای هر غلظت دو تکرار در نظر گرفته شد. سپس ۲۵ قطعه ماهی در هر یک از تکرارها در آکواریوم‌های ۱۰ لیتری قرار داده شد و به مدت ۳ هفته در مواجهه مزمن با متیل پارابن قرار گرفتند. به منظور تهیه دوزهای مختلف، استاندارد متیل پارابن (CAS No: 99-76-3) تهیه شده از شرکت Fluka با کمک حلال اتانول در غلظت‌های مختلف تهیه شد. روش مواجهه در این تحقیق به روش نیمه استاتیک انجام شد. به طوری‌که یک روز در میان حدود ۸۰٪ از آب هر آکواریوم تخلیه شده و با آب‌گیری دوباره از تانک ذخیره، غلظت مورد نظر از متیل پارابن به آکواریوم‌ها اضافه شد. تیمارهای کنترل مثبت با دو غلظت ۰/۱ و ۱۰ نانوگرم بر لیتر ۱۷- بتا استرادیول (E2)، کنترل منفی یا حلال با غلظت اتانول ۱٪ و کنترل غذا نیز بر اساس روش استاندارد سازمان همکاری توسعه اقتصادی در نظر گرفته شد (Guidelines, OECD, 2010). در مجموع تعداد ۱۴ آکواریوم در این بخش استفاده شد.

بررسی شاخص گنادی (GSI)

برای بررسی فاکتور شاخص گنادی (GSI) از هر تیمار ۳ ماهی انتخاب شد. برای بی هوشی، ماهی‌ها در ظرف محتوی یخ قرار داده شدند. پس از اطمینان از بی‌هوشی کامل، وزن ماهی، طول کل و طول چنگالی ماهی اندازه‌گیری و ثبت شد. در ادامه ماهی بر روی یک سطح صاف از ناحیه سر و دم ثابت شد و سپس با استفاده از ابزار جراحی با باز کردن پوسته شکمی ماهی، امحاء و احشاء به طور کامل خارج شد. با جدا کردن تخمدان ماهی ماده و ثبت وزن آن، با استفاده از فرمول ذیل، شاخص گنادی محاسبه شد (Bhatia *et al*., 2013).

شاخص گنادی= [وزن کل بدن (گرم)/ وزن تخمدان (گرم)]× ۱۰۰.

بررسی بافت‌شناسی تخمدان

در این بخش از ۲ تکرار هر تیمار، ۳ ماهی ماده با اندازه تقریبی یکسان انتخاب و بعد از جدا کردن کل تخمدان، از بوئن به عنوان عامل تثبیت کننده استفاده شد، سپس با اتانول ۷۰ درصد تا خروج کامل فیکساتیو، مرحله آبگیری انجام شد. بعد از آبگیری، قالب‌گیری با پارافین Merck انجام گرفت و توسط میکروتوم برش‌های ۴ میکرومتری از بلوک‌ها تهیه و به روش هماتوکسیلین- ائوزین رنگ‌آمیزی انجام شد (Khodabandeh and Abtahi, 2006). بعد از رنگ-آمیزی، لام‌ها توسط چسب هیستولوژی مونتاژ شده و با میکروسکوپ نوری مطالعه و عکس‌برداری شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 11:17 +0430 on Saturday July 29th 2017

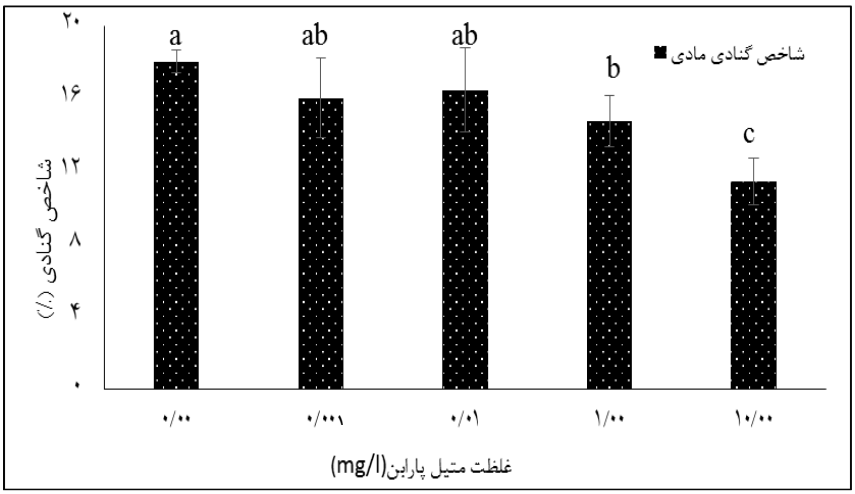
نتایـج

میانگین کلی وزن، طول و درصد شاخص گنادی در ماهی ماده گورخری در تیمارهای مختلف در جدول ۱ ارائه شده است. حروف متفاوت لاتین نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف است ($p\leq0.05$).

جدول ۱ میانگین وزن و طول بدن و شاخص گنادی ماهی ماده گورخری در ۴ تیمار کنترل غذا، کنترل حلال اتانول، کنترل استرادیول و تیمار متیل پارابن در ۴ غلظت را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که وزن بدن ماهی گورخری ماده در تیمارهای مختلف کاهش معنی داری یافته است. همچنین بررسی شاخص گنادی تحت تاثیر ۳ تیمار مختلف نشان داد که شاخص گنادی کاهش معنی داری یافته است و بیشترین شاخص گنادی در تیمار کنترل دیده شد. مقایسه کلی شاخص گنادی ماده در ۳ تیمار و نمونه کنترل (Cf) و کنترل حلال (Cs) در شکل ۲ ارائه شده است. تغییرات شاخص گنادی در غلظت‌های مختلف متیل پارابن در شکل ۲ ارائه شده است. شاخص گنادی ماده در تیمار متیل پارابن با افزایش غلظت کاهش یافته است، به طوری‌که در غلظت ۱۰ mg/l به کمترین مقدار نسبت به نمونه کنترل رسیده است. شکل ۳ نتایج هیستوپاتولوژی تخمدان ماهی در مواجهه با غلظت های مختلف متیل پارابن را نشان می‌دهد.

جدول ۱. میانگین کلی وزن، طول و شاخص گنادی ماهی گورخری در تیمارهای مختلف

تیمار	کنترل	کنترل (منفی) حلال	کنترل (مثبت) استرادیول	تیمار متیل پارابن
وزن بدن (g)	^{a}۴۷/۰۳±۰/۰۱	^{b}۴۴/۱۰±۰/۰۲۴	^{c}۴۴/۰۸±۰/۰۰۲	^{d}۴۳/۲۱±۰/۰۴۸
طول بدن (mm)	^{b}۳۳/۲۴±۱/۲۸	^{b}۳۳/۳۳±۴/۶۲	^{a}۳۶/۵۲±۳/۸۱	^{a}۳۶/۲۰±۶/۱۴
GSI (%)	^{a}۱۸/۰۳±۰/۶۳	^{a}۱۸/۲۶±۱/۵۷	^{b}۱۳/۷۳±۱/۷۱	^{b}۱۳/۳۲±۰/۹۷



شکل ۲. تغییرات شاخص گنادی در غلظت‌های مختلف تیمار متیل پارابن

بحث

بررسی و مقایسه تغییر درصد شاخص گنادی تیمار متیل پارابن در غلظت‌های مختلف شامل ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۱ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر در جنس ماده نیز نشان داد که مواجهه با این ترکیب منجر به کاهش معنی دار شاخص گنادی در مقایسه با نمونه کنترل می‌شود. مطالعات در زمینه مواجهه موش با آلاینده‌های مختل کننده سیستم درون‌ریز بدن نشان داده است که این آلاینده‌ها با تاثیر بر سنتز هورمون‌های متابولیسمی مثل لپتین (LPT) منجر به تغییر در متابولیسم چربی، گلیکوژن و قند در بدن می‌شود و با تاثیر بر میزان سوخت و ساز متابولیکی بدن موجود زنده منجر به چاقی می‌شود که تاثیر این عامل می‌تواند

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 11:17 +0430 on Saturday July 29th 2017

در کاهش شاخص گنادی موثر باشد. مطالعات آلاینده‌های EDCs تاثیر این مواد در تنظیمات متابولیکی که ممکن است منجر به چاقی و یا دیابت شود را نشان داده است (Gray, 2006). مطالعات دیگر ایجاد سندروم متابولیک به علت تخریب متابولیسم چربی و گلیکوژن در مواجهه با این گروه از آلاینده‌ها را اثبات کرده است (Migliarini *et al*., 2011). از طرف دیگر عدم بلوغ اووسیت‌ها در تخمدان نیز کاهش وزن گنادها را در پی خواهد داشت. دو عامل افزایش وزن بدن و کاهش وزن گنادها دلایل مناسبی برای کاهش شاخص گنادی در تیمارهای مختلف متیل پارابن است.

در مطالعه تاثیر مواجهه مزمن سایر ترکیبات پارابن اعم از بوتیل پارابن (Alslev *et al*., 2005). در ماهی قزل آلا و پروپیل پارابن در ماهی مداکا کاهش در شاخص گنادی تخمدان نشان داده شده است (González-doncel *et al*., 2014). نتایج بررسی تاثیر ۴ دوز مختلف از تیمار متیل پارابن بر بافت شناسی تخمدان ماهی گورخری نشان داد که این تیمار در کمترین دوز تاثیری بر تخمدان ایجاد نمی‌کند و تنها عارضه موجود در این تیمار وجود تعداد کمی فولیکول آترتیک در بافت تخمدانی بود، که در نمونه کنترل نیز پدیده آترزیا[12] با شدت ناچیزی دیده شد. فولیکول آترتیک از نظر جنسی غیر بارور است و نقشی در تولید مثل جانور ماده ایفا نمی‌کند (Ucuncu and Cakici, 2009). وقوع آپوپتوزیز در سلول گرانولوزای تخمدان منجر به آترزیای تخمدانی می‌شود. آترزیا در ماهیان استخوانی (مرگ برنامه ریزی شده سلول‌های گرانولوزا) به عنوان مهمترین شاخص مواجهه با آلاینده‌های EDCs در تخمدان است. آترزیا یک فرایند کنترل شده هورمونی است که برای توصیف و باز جذب شدن گامت‌ها استفاده می‌شود. آترزیای تخمدان یک فرآیند تخریبی است که منجر به حذف تخمک از چرخه تولید مثلی می‌شود. تغییر در ساختار و کارکرد سلول‌های گرانولوزا و کاهش در مقدار بیوسنتز استرادیول علت اصلی آترزیای تخمدان است. فولیکول آترتیک دچار هایپرتروفی و یا هایپرپلازی در لایه گرانولوزا است و یکپارچگی خود در ناحیه غشای فولیکول و اووپلاسم را از دست می‌دهد (Lubzens *et al*., 2010)

تیمار با دوزهای بالاتر عوارض زیادی را در تخمدان ایجاد کرد. وجود آترزیای وسیع تخمدانی، تشکیل کیست تخمدان (Fc)[13] متشکل از توده‌ای شامل لایه نازک سلول‌های تکا و فرم فشرده سلول‌های گرانولوزا، افزایش کنترل شده سلول های قابل تکثیر در پاسخ به ترکیب متیل پارابن به صورت هایپرپلازی سلول‌های گرانولوزا و وجود مایع پروتئینی رها شده در بافت بینابینی و التهاب گرانولوما[14] (GI) در شکل ۳ قابل مشاهده است. همچنین در برش عرضی تخمدان در این تیمارها مجددا ، فولیکول‌های آترتیک، هایپرپلازی در سلول‌های گرانولوزای اطراف فولیکول و چروکیدگی در غشای اطراف اووپلاسم تشخیص داده شد. در تیمار ۱۰ میلیگرم بر لیتر متیل پارابن، عوارضی وسیع‌تری اعم از خونریزی و تخریب شدید تخمدان، التهاب گرانولوما، انقباض اووپلاسم، وقوع فولیکول آترتیک و هایپرپلازی لایه گرانولوزا را ایجاد کرد. به طور کلی کاهش شاخص گنادی به همراه وقوع پدیده آترزیای تخمدانی در مواجهه با متیل پارابن نشان دهنده تاثیرات استروژنیک این آلاینده بر جنس ماده است. اما تاثیر استروژنیک مواجهه با این ترکیب منجر به افزایش باروری جنس ماده نمی‌شود. زیرا این آلاینده با القای تولید ویتلوژنین در مقادیری بیشتر از مقدار نرمال آن منجر به افزایش بیش از حد اووسیت‌ها در مرحله ویتلوژنیک شده و از بلوغ تخمک و ورود به مرحله بعد از ویتلوژنیک جلوگیری می‌کند (Alslev *et al*., 2005; Barse *et al*., 2010). مواجهه مزمن با پارابن‌های استروژنیک منجر به شکل‌گیری تخمک‌های هایپواستروژنیک در تخمدان می شود. عدم تعادل هورمونی در مواجهه با آلاینده‌های استروژنیک می‌تواند عوارض بافتی بی‌شماری را در گنادهای جنسی ایجاد کند (Bhatia *et al*., 2014).

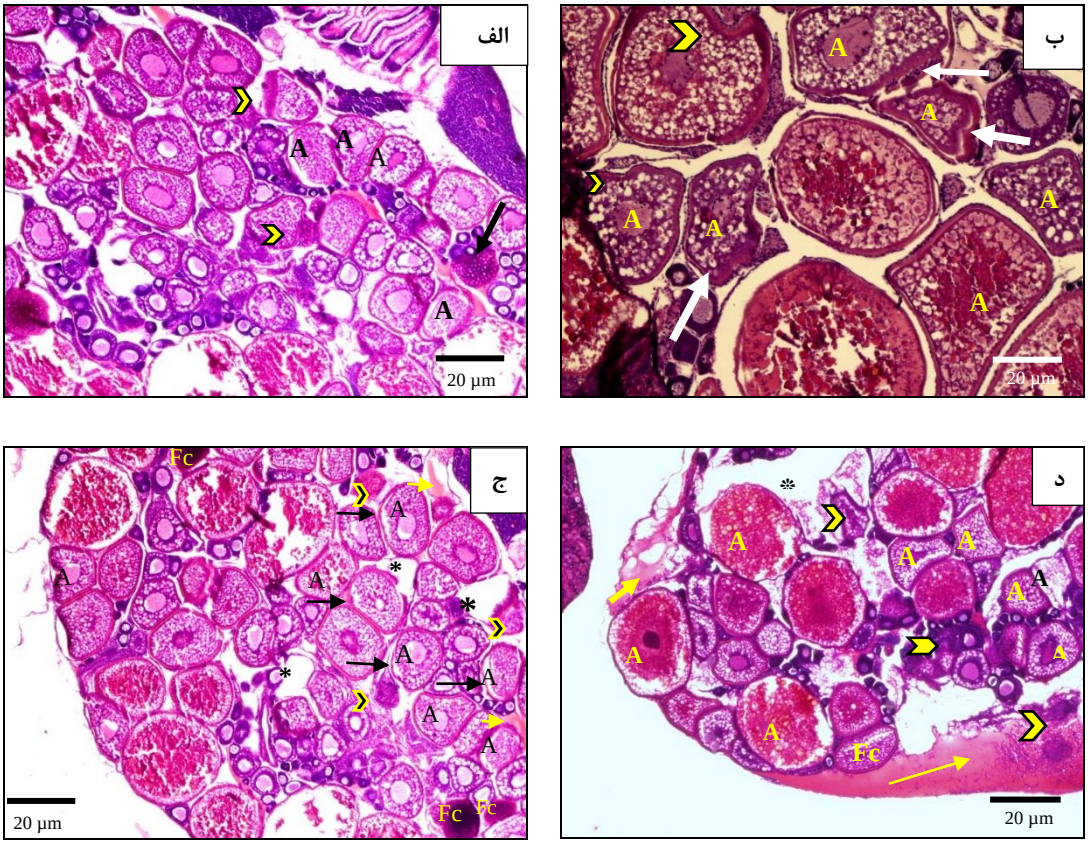
جدول ۲ خلاصه ای از عوارض بافت شناسی تخمدان ماهی گورخری در مواجهه با غلظت های مختلف از متیل پارابن را نشان می‌دهد.

[12] Atresia
[13] Folicular Cyst
[14] Granoluma Inflammation (GI)

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 11:17 +0430 on Saturday July 29th 2017



شکل ۳. الف- برش طولی تخمدان ماهی گورخری، تیمار ۰/۰۰۱ میلی‌گرم بر لیتر، (فلش سیاه رنگ= کیست تخمدان ؛ پیکان زرد = هایپرپلازی سلول گرانولوزا؛ A= فولیکول آترتیک)؛ **ب**- برش عرضی تخمدان ماهی گورخری، تیمار ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر، (فلش سفید رنگ= هایپرپلازی سلول‌های گرانولوزا؛ پیکان زرد = چروکیدگی غشای اووپلاسم)؛ **ج**- برش طولی تخمدان ماهی گورخری، تیمار ۱میلی‌گرم بر لیتر، (Fc= کیست تخمدانی ؛ A= فولیکول آترتیک؛ علامت *= نواحی فاقد سلولی؛ فلش سیاه = جدا شدن لایه گرانولوزا از غشای پایه؛ فلش زرد= تراکم مایع پروتئینی؛ پیکان سیاه= التهاب گرانولوما (GI)؛ **د**- برش عرضی تخمدان ماهی گورخری، تیمار ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر، (Fc= کیست تخمدانی ؛ A= فولیکول آترتیک؛ فلش زرد= خونریزی وسیع؛ پیکان زرد= التهاب گرانولوما (GI).

جدول ۲. خلاصه ای از عوارض هیستوپاتولوژیک مشاهده شده در بافت تخمدان ماهی گورخری در مواجهه با غلظت های مختلفی از متیل پارابن. عدم وجود عارضه (-)، عارضه کم (+)، عارضه متوسط (++)، عارضه زیاد (+++).

نوع عارضه	تیمار متیل پارابن (میلی گرم بر لیتر)				
	کنترل	۰/۰۰۱	۰/۰۱	۱	۱۰
کیست تخمدان	-	+	+	+	++
هایپرپلازی سلول گرانولوزا	-	+	++	+++	+++
چروکیدگی غشای اووپلاسم	-	-	++	+	++
التهاب گرانولوما	-	-	-	+-	+
وجود مایع پروتئینی بین بافتی	-	-	-	+	++
وجود آترزیای تخمدانی	-	+	+	++	+++
خونریزی بین بافتی	-	-	-	-	+++

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 11:17 +0430 on Saturday July 29th 2017

نتایج این مطالعه تشکیل فولیکول‌های آترتیک بی‌شمار در تخمدان ماهی تحت تیمار با متیل پارابن را به خوبی نشان داد. رها شدن مواد پروتئینی در همه سطوح تیمار در تخمدان نشان‌دهنده تولید پروتئین‌های مختلف و از جمله ویتلوژنین است. وجود مایع پروتئینی در فضای میان بافتی تخمدان منجر به اختلال در فشار اسمزی اووسیت‌های مختلف و در نتیجه انقباض و یا انبساط آن‌ها می‌شود (Gray, 2006). در غلظت‌های بالاتر تیمار متیل پارابن، تشدید عوارض بافتی تخمدان منجر به خونریزی شدید و تخریب برخی از قسمت‌های تخمدان شده است. وقوع همزمان فولیکول های آترتیک همراه با خونریزی وسیع در سطح تخمدان از یک طرف و افزایش مایع پروتئینی ویتلوژنین در بافت بینابینی تخمدان نشان دهنده عوارض شدید در تیمار ١٠ میلی‌گرم بر لیتر متیل پارابن در این مطالعه است که خود نشان دهنده غیر قابل برگشت بودن عوارض تخمدانی و تاثیر بر باروری ماهی‌های ماده مواجه شده می‌باشد.

بر مبنای نتایج به دست آمده می توان گفت حتی مواجهه با غلظت های کم متیل پارابن منجر به بروز عوارض غیرقابل بازگشتی در تخمدان ماهی ماده می‌شود که مهمترین آن وقوع فولیکول‌های آترتیک است که نمی‌تواند نقشی در تولید مثل جنس ماده ایفا کند و منجر به کاهش قدرت باروری می‌گردد. با توجه به مصرف فراوان ترکیبات پارابن در طیف وسیعی از محصولات مصرفی و جذب و تجمع آن در بدن موجودات زنده و با توجه به عوارض ایجاد شده این آلاینده در تخمدان ماهی مدل می‌توان گفت پارابن‌ها از جمله آلاینده‌هایی هستند که به طور مستقیم کاهش باروری را در موجودات زنده منجر می‌شوند. لذا مواجهه کمتر با پارابن‌ها از طریق استفاده از محصولات عاری از ترکیبات پارابن در پیشگیری از وقوع چنین عوارضی می تواند مناسب باشد.

منابـع

Alslev, B., Korsgaard, B., Bjerregaard, P. 2005. Estrogenicity of butylparaben in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* exposed via food and water. Aquatic Toxicology. 72: 295-304.

Bars, R., Broeckaert, F., Fegert, I., Gross, M., Hallmark, N., Kedwards, T., Galay-burgos, M. 2011. Science based guidance for the assessment of endocrine disrupting properties of chemicals. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 59(1): 37-46.

Barse, A.V, Chakrabarti, T., Ghosh, T.K., Pal, A.K., Kumar, N., Raman, R.P., Jadhao, S.B. 2010. Vitellogenin induction and histo-metabolic changes following exposure of *Cyprinus carpio* to methyl paraben. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 23(12): 1557-1565.

Baumann, L., Knörr, S., Keiter, S., Nagel, T., Rehberger, K., Volz, S., Braunbeck, T. 2014. Persistence of endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*) after discontinued exposure to the androgen 17β-trenbolone. Environmental toxicology and chemistry / SETAC. 33(11): 2488-96.

Bhatia, H., Kumar, A., Chapman, J.C., McLaughlin, M.J. 2015. Long-term exposures to di-n-butyl phthalate inhibit body growth and impair gonad development in juvenile Murray rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*). Journal of Applied Toxicology. 35: 806-816.

Bhatia, H., Kumar, A., Du, J., Chapman, J., McLaughlin, M.J. 2013. Di-n-butyl phthalate causes antiestrogenic effects in female murray rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*). Environmental Toxicology and Chemistry. 32(10): 2335-2344.

Bhatia, H., Kumar, A., Ogino, Y., Gregg, A., Chapman, J., McLaughlin, M.J., Iguchi, T. 2014. Di-n-butyl phthalate causes estrogenic effects in adult male Murray rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*). Aquatic Toxicology. 149: 103-115.

Bjerregaard, P., Andersen, D.N., Pedersen, K.L., Pedersen, S.N. 2003. Estrogenic effect of propylparaben (propylhydroxybenzoate) in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* after exposure via food and water. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. 136*:* 309-317.

Boberg, J., Taxvig, C., Christiansen, S., Hass, U. 2010. Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites. Reproductive Toxicology. 30(2): 301-312.

Brannen, K.C., Panzica-Kelly, J.M., Danberry, T.L., Augustine-Rauch, K.A. 2010. Development of a zebrafish embryo teratogenicity assay and quantitative prediction model. Birth Defects Research. Part B, Developmental and Reproductive Toxicology. 89(1): 66-77.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 11:17 +0430 on Saturday July 29th 2017

Cheshenko, K., Pakdel, F., Segner, H., Kah, O., Eggen, R.I.L. 2008. Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish. General and comparative endocrinology. 155: 31-62.

Gonzalez-doncel, M., Garcia-maurino, J.E., San, L., Beltrán, E.M., Sastre, S., Fernández, C. 2014. Embryonic exposure of medaka (*Oryzias latipes*) to propylparaben: Effects on early development and post-hatching growth. Environmental Pollution. 184: 360-369.

Gray, L.E. 2006. Chronic di-n-butyl phthalate exposure in rats reduces fertility and alters ovarian Function during pregnancy in female long evans hooded rats. Toxicological Sciences. 93(1): 189-195.

Guideline, P.B.T. 2010. OECD guideline for the testing of chemicals. The Hershberger. 601 p.

Hutchinson, T.H., Ankley, G.T., Segner, H., Tyler, C.R. 2006. Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as" signposts," not" traffic lights," in risk assessment. Environmental Health Perspectives. 114(1): 106-113.

Janjua, N.R., Mortensen, G.K., Andersson, A.M., Kongshoj, B., Skakkebæk, N.E., Wulf, H.C. 2007. Systemic uptake of diethyl phthalate, dibutyl phthalate, and butyl paraben following whole-body topical application and reproductive and thyroid hormone levels in humans. Environmental Science and Technology. 41(15): 5564-5570.

Khodabandeh, S., Abtahi, B. 2006. Effects of sodium chloride, formalin and iodine on the hatching success of common carp, *Cyprinus carpio*, eggs. Journal of Applied Ichthyology. 22(1): 54-56.

Kidd, K.A., Blanchfield, P.J., Mills, K.H., Palace, V.P., Evans, R.E., Lazorchak, J.M., Flick, R.W. 2007. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. Proceedings of the National Academy of Sciences. 104(21): 8897-8901.

Liu, J., Lu, G., Xie, Z., Zhang, Z., Li, S., Yan, Z. 2015. Occurrence, bioaccumulation and risk assessment of lipophilic pharmaceutically active compounds in the downstream rivers of sewage treatment plants. Science of the Total Environment. 511: 54-62.

Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., Cerda, J. 2010. Oogenesis in teleosts: how eggs are formed. General and Comparative Endocrinology. 165(3): 367-89.

Luna, L.G., Coady, K. 2016. Ecotoxicology and Environmental Safety Quanti fi cation of X . laevis vitellogenin by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Ecotoxicology and Environmental Safety. 124: 296-302.

Migliarini, B., Piccinetti, C.C., Martella, A., Maradonna, F., Gioacchini, G., Carnevali, O. 2011. Perspectives on endocrine disruptor effects on metabolic sensors. General and Comparative Endocrinology. 170(3): 416-23.

Mills, L.J., Chichester, C. 2005. Review of evidence: are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations. Science of the Total Environment. 343(1): 1-34.

Moggs, J.G. 2005. Molecular responses to xenoestrogens: mechanistic insights from toxicogenomics. Toxicology. 213(3): 177-193.

Oishi, S. 2002. Effects of propyl paraben on the male reproductive system. Food and Chemical Toxicology. 40(12): 1807-1813.

Scholz, S., Mayer, I. 2008. Molecular biomarkers of endocrine disruption in small model fish. Molecular and cellular Endocrinology. 293(1): 57-70.

Scialli, A.R. 2011. Reproductive effects of the parabens. Reproductive Toxicology. 32: 138-140.

Selderslaghs, I.W.T., Van Rompay, A.R., De Coen, W., Witters, H.E. 2009. Development of a screening assay to identify teratogenic and embryotoxic chemicals using the zebrafish embryo. Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.). 28(3): 308-320.

Soni, M.G., Carabin, I.G., Burdock, G.A. 2005. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). Food and Chemical Toxicology. 43: 985-1015.

Soni Taylor, S., Greenberg, N., Burdock, G.M. 2002. Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature. Food and Chemical Toxicology. 40*:* 1335-1373.

Ucuncu, S.I., Cakici, O. 2009. Atresia and apoptosis in preovulatory follicles in the ovary of *Danio rerio* (Zebrafish). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 9: 215-221.

Van den Bulck, K., Hill, A., Mesens, N., Diekman, H., De Schaepdrijver, L., Lammens, L. 2011. Zebrafish developmental toxicity assay: A fishy solution to reproductive toxicity screening, or just a red herring. Reproductive Toxicology. 32(2): 213-219.

www.SID.ir