

## اثر بوتاکلر به عنوان برهم زننده‌ی اندوکرینی بر مراحل رسیدگی تخمک در ماهی حوض (*Carassius auratus*)

فاطمه نظر حقیقی<sup>۱</sup>، بهروز حیدری<sup>۲\*</sup> و مریم اقدامی<sup>۳</sup>

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، ([hiva582005@yahoo.com](mailto:hiva582005@yahoo.com))

۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، ([Bheidari@guilan.ac.ir](mailto:Bheidari@guilan.ac.ir))

۳- دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات تهران، ([Eghdamimary@yahoo.com](mailto:Eghdamimary@yahoo.com))

### چکیده

امروزه سیستم تولید مثلی ماهیان به عنوان یک مدل با ارزش جهت بررسی اثرات قابل توجه ترکیبات برهم زننده اندوکرینی مورد توجه قرار گرفته است. در این مطالعه به بررسی اثرات بوتاکلر به عنوان ترکیب شیمیایی نزدیک به استروژن‌ها که با تقلید عمل آن‌ها می‌تواند بر سیستم تولید مثلی ماهی حوض اثرات مخربی داشته باشد، پرداخته شده است. بدین منظور ماهیان به مدت ۲۸ روز در معرض بوتاکلر ۶۰٪ به میزان  $0.28 \mu\text{l/l}$  قرار داده شدند. سپس بافت تخمدان در بونن فیکس شد و پس از طی مراحل معمول بافت‌شناسی، برش‌های ۶ میکرونی تهیه و به روش همانوکسیلین-اتوزین رنگ آمیزی شد. مشاهده بافت‌ها با میکروسکوپ نوری نشان داد در تخمدان شاهد از ۱۲۰۰ اووسیت شمارش شده اکثریت ۶۳ درصدی اووسیت‌ها در مرحله‌ی نابالغ قرار گرفته‌اند، در حالیکه شمارش ۱۲۰۰ اووسیت از تیمار بوتاکلر نشان داد که ۳۲/۵ درصد اووسیت‌ها در مرحله نابالغ و ۳۳/۴ درصد اووسیت‌ها در مرحله بلوغ قرار گرفته‌اند. وجود ۱۹.۷ درصدی اووسیت‌های درحال زوال (آترتیک) در تیمار بوتاکلر نسبت به میزان ۳.۸ درصدی آن در تیمار شاهد قابل توجه بود. تغییرات پاتولوژیکی عمده از جمله چسبندگی فولیکول‌های تخمدانی، دژنره شدن هسته آنها، به درون کشیدگی سیتوپلاسم اووسیت‌ها، تجمع پروتوپلاسم، به درون کشیدگی پروتوپلاسم و روال اووسیت‌ها در تیمار بوتاکلر قابل مشاهده بود. بانوجیه به داده‌های آماری و مشاهدات بافتی، بنظر می‌رسد بوتاکلر بعنوان برهم زننده نورواندوکرینی سبب افت‌های زرده‌ساری و زردی سریع‌تر به مرحله زرده‌سازی و نیز اثرات مخرب بافتی و کاهش کیفیت اووسیت‌ها می‌گردد.

کلمات کلیدی: بوتاکلر، برهم زننده‌ی اندوکرینی، گلدفیش

## مقدمه

شواهد نشان می دهد بسیاری از جانداران آبی مقدار قابل توجهی از ترکیبات شیمیایی سنتزی و طبیعی را به عنوان برهم زننده های اندوکرینی (EDCs) دریافت می کنند که می توانند تهدیدکننده سلامت دستگاه تولیدمثلی جمعیت ماهیان باشند (Hiramatsu *et al.*, 2006). با توجه به این که اکثر زمین های کشاورزی در مسیر رودخانه ها واقع شدند، زهاب آلوده شده توسط آفت کش ها می تواند بر تولید مثل و خصوصیات فیزیولوژیکی ماهی هایی که برای تخم ریزی به رودخانه ها مهاجرت می کنند تأثیرگذار باشد (Esmaily, 2002). به همین دلیل سیستم تولید مثلی ماهیان به عنوان یک مدل با ارزش جهت بررسی اثرات ترکیبات برهم زننده اندوکرینی مانند آفت کش ها مورد توجه قرار گرفته است. (Nicolas, 1999). سم بوتاکلر یا علف کش ماچتی از جمله سموم کشاورزی پرمصرف جهت مبارزه با علفهای هرز مزارع برنج در استان گیلان است (خارا و همکاران، 1387). در این مطالعه به بررسی اثر بلند مدت بوتاکلر بر اختلالات اندوکرینی مراحل رسیدگی تخمک با استفاده از مشاهدات بافت شناسی تخمدان بعنوان در دسترس ترین شاخص زیستی میزان اثر آلاینده ها پرداخته شده است.

## مواد و روش کار

جهت انجام این مطالعه، نمونه گیری از ماهی حوض در مرداد 1391 از یکی از استخرهای پرورشی حومه رشت انجام گرفت و نمونه های ماهی (وزن  $100/97 \pm 31/47$  g و طول  $19/14 \pm 2/23$  cm) به آکواریوم های 70 لیتری حاوی آب چاه در آزمایشگاه بیولوژی دریا دانشکده علوم پایه دانشگاه گیلان انتقال یافتند. بعد از سازگاری نمونه ها با شرایط آزمایشگاهی به آکواریوم منتقل شدند. تعداد نمونه ها در هر آکواریوم 12 قطعه و آب آکواریوم ها هر سه روز یکبار تعویض و ماهی ها توسط غذای آماده تغذیه می شدند. طی دوره آزمایش دما ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) و pH هر روز کنترل شدند. در این آزمایش بوتاکلر به میزان  $0.28 \mu\text{l/l}$  طی مدت 15 روز به آکواریوم حاوی ماهی حوض اضافه گردید. لازم بذکر است که همزمان با تعویض آب، هر سه روز یکبار، مقدار فوق مجدداً به محیط آکواریومی اضافه می شدند. به منظور بررسی های بافتی تخمدان ماهی برداشته شد و در محلول بوئن به مدت 24 تا 48 ساعت فیکس گردید. سپس نمونه ها تا انجام سایر مراحل بافت شناسی به الکل 70% منتقل گردید. پس از انجام مراحل معمول بافت شناسی (آبگیری، شفاف سازی، نفوذ پارافین، قالب گیری) برش هایی با ضخامت 6 میکرون از بافت تهیه و با روش هماتوکسیلین-ئوزین رنگ آمیزی شد. اسلایدهای تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی و به کمک دوربین دیجیتال از مقاطع بافتی تخمدان شاهد و ضایعات ایجاد شده در تیمار بوتاکلر عکسبرداری شد. همچنین مطالعات آماری از طریق شمارش 1200 اووسیت در هریک از تخمدان های شاهد و تیمار بوتاکلر و محاسبه میانگین درصد اووسیت های موجود در مراحل اصلی تخمدانی (نابالغ، ابتدای بلوغ و پیشرفته بلوغ) و در حال زوال انجام گردید. آنالیز و رسم نمودار توسط نرم افزار SPSS 18.0 انجام شد.

## نتایج و بحث

پس از انجام آزمایش و بررسی میکروسکوپی لام های تهیه شده از مقاطع مختلف تخمدانی نتایج نشان داد که در تخمدان شاهد از 1200 اووسیت شمارش شده اکثریت 63 درصدی اووسیت ها در مرحله ی نابالغ (18% ابتدایی، 30.5% پیش هسته اولیه، 14.5% پیش هسته پیشرفته)، 19.3% در مرحله ابتدای بلوغ و 7% در مرحله بلوغ کامل قرار گرفته در حالیکه شمارش 1200 اووسیت از تیمار بوتاکلر نشان داد که 32/5 درصد اووسیت ها در مرحله نابالغ و 33/4 درصد اووسیت ها در مرحله ابتدای بلوغ (15.3% واکوئل قشری و 18.1% زرده سازی کامل) و 14.4% در مرحله بلوغ کامل قرار گرفته است. وجود 19.7 درصدی اووسیت های در حال زوال (آترتیک) در تیمار بوتاکلر نسبت به میزان 3.8 درصدی آن در تیمار شاهد قابل توجه بود. براساس بررسی آماری تعداد اووسیت های قرار گرفته در

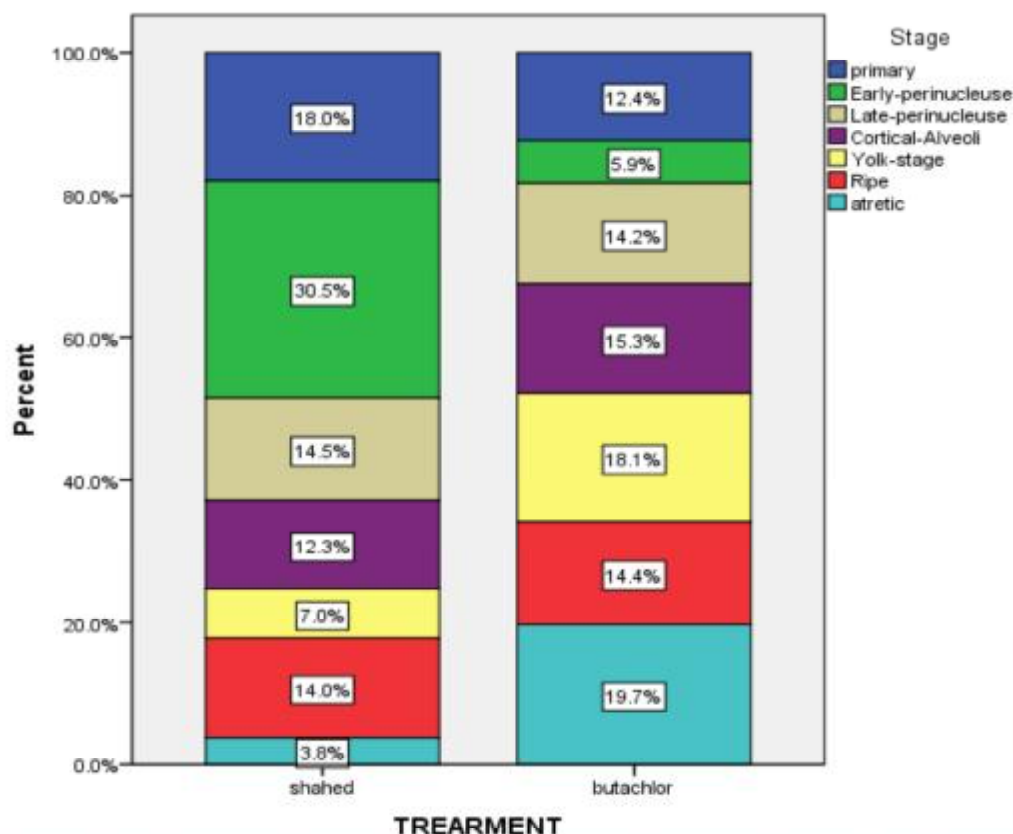
مرحله پیش هسته اولیه در تخمدان شاهد نسبت به تیمار بوتاکلر تفاوت معناداری نشان می دهد. این تفاوت در اووسیت های درحال زوال نیز قابل مشاهده است (شکل 1). در تیمار بوتاکلر عوارض بافتی متعددی شامل چسبندگی فولیکول های تخمدانی، به درون کشیدگی سیتوپلاسم اووسیت ها، وجود اووسیت های بدون هسته، تجمع پروتوپلاسم، به درون کشیدگی پروتوپلاسم و نیز اووسیت های درحال زوال از عمده عوارض قابل ذکر بود (شکل 2).

تاکنون مطالعات مختلف در جهان راجع به میزان سموم کشاورزی در اکوسیستم های آبی و اثرات آنها بر جانوران آبی صورت گرفته است. بسیاری از ترکیبات شیمیایی تولید شده در قرن اخیر توانایی تأثیر بر سیستم نورواندوکرینی مهره داران را که تنظیم کننده فرآیندهای حیاتی مانند، رشد، متابولیسم و تولید مثل می باشد را دارا هستند (Hiramatsuet *et al.*, 2006)، بوتاکلر دارای ترکیب شیمیایی نزدیک به استروژن ها می باشد، به طوری که می تواند بر سیستم تولید مثلی ماهیان اثرات مخربی داشته باشد (Lasheidaniet al., 2008). بررسی ها نشان داده که قرارگیری در معرض EDC ها می تواند میزان استروئیدهای جنسی را تغییر دهد و از این طریق بر کیفیت تخم ها در طول گامتوزنر تاثیر گذارد. در مطالعه اثر بوتاکلر بر ماهی گورخری نر و ماده مشخص شد که این ترکیب با غلظت  $100 \mu\text{g/L}$  در نرها سبب بالارفتن سطح ویتلوژنین در پلاسمای خون شده درحالیکه در ماده ها تفاوت معناداری مشاهده نشد (Chang *et al.*, 2013). در مطالعه پیش رو تعداد اووسیت های وارد شده به مرحله زرده سازی یا ابتدای بلوغ در تیمار بوتاکلر نسبت به شاهد افزایش یافته که می تواند مربوط به اثر شبه استروژنی بوتاکلر در تولید زرده باشد. همچنین مشخص شد که این ترکیب سبب کاهش نرخ باروری، کاهش تعداد تخم ها در هر تخم ریزی و نیز کاهش وقوع عمل تخم ریزی می گردد (Chang *et al.*, 2013). از این رو وجود اووسیت های با اشکال غیر نرمال بویژه مشاهده تعداد بیشتر اووسیت های در حال زوال در این مطالعه نیز می تواند حاکی از اثر نامطلوب آلاینده بوتاکلر بر عملکرد اندام تولیدمثلی در گلدفیش باشد.

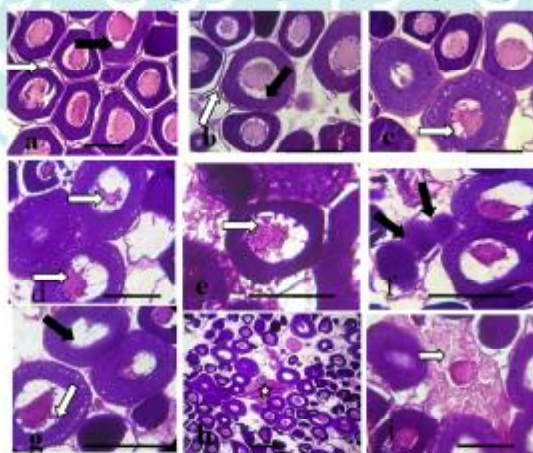
همایش ملی علوم جانوران آبی

رشت، دانشگاه گیلان

شهریور ۱۳۹۲



شکل ۱ - ارتباط بین میانگین درصد هریک از مراحل رسیدگی اووسیت در تیمار شاهد و بوتاکلر.



شکل ۲ تخمدان تیمار بوتاکلر: (a) اووسیت های در مرحله پیش هسته پیشرفته با سیتوپلاسم به درون کشیده شده (پیکان سفید) و هسته های با پروتوپلاسم به درون کشیده شده (پیکان تیره)، (b) اووسیت های در مرحله واکوئل قشری دارای هسته های با پروتوپلاسم تجمع یافته (پیکان سفید)، (c) اووسیت های در مرحله پیش هسته اولیه با پروتوپلاسم تجمع یافته، (d) اووسیت های بهم چسبیده (پیکان تیره)، (e) اووسیت های در مرحله واکوئل قشری دارای هسته های با پروتوپلاسم تجمع یافته (پیکان سفید) و اووسیت با هسته تحلیل رفته (پیکان تیره)، (f) تخمدان تیمار بوتاکلر با اووسیت های در مرحله واکوئل قشری و یک اووسیت در حال زوال در مرکز تصویر (ستاره)، (g) اووسیت در حال زوال یا آترتیک (پیکان سفید)، خط مقیاس - 100  $\mu$ m.

## منابع

خارا ح، آملی سالار ج، مظلومی ح، نظامی ش، زلفی نژاد ک، خداپرست س.ج، حسن ج، اکبرزاده امیر، محمدی سجاد، پورقلی س، احمدنژاد م، احمدزاده ت، قلی پور ز، تقی زاده م، 1387، بررسی و اندازه گیری فصلی سموم کشاورزی (هینوزان، ماچتی و دیازینون) در آب رودخانه اشک (شرق گیلان)، مجله علوم زیستی واحد لاهیجان، سال دوم، (1)، 29-43.

Changa, J., Liub, Sh., Zhouc, Sh., Wanga, M., Zhub, G. 2013. Effects of butachlor on reproduction and hormone levels in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Experimental and Toxicologic Pathology*. 65: 205–209.  
Esmaily Sari, A. 2002. *Pollutants, Health and Standards in the Environment*. Mehr Pub. Iran. 1st Edn.

Hiramatsu, N., Matsubara, T., Fujita, T., Sullivan, C.V., Hara, A., 2006, Multiple piscine vitellogenins: Biomarkers of fish exposure to estrogenic endocrine disruptors in aquatic environments, *Marine Biology*, 149:35-47.

Lasheidani, M.F., Balouchi, S.N., Keyvan, A., Jamili, S., Falakrou, K., 2008, Effects of butachlor on density, volume and number of abnormal sperms in Caspian Kutum (*Rutilus frisii kutum*, Kamenskii 1901), *Research Journal of Environmental Sciences*, 2 (6): 474-482.

Nicolas, J.M., 1999, Vitellogenesis in fish and the effects of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminants, *Aquat.Toxicol.*, 45: 77–90.

همایش ملی علوم جانوران آبی

رشت، دانشگاه گیلان

شهریور ۱۳۹۲

Surf and download all data from SID.ir: [www.SID.ir](http://www.SID.ir)

Translate via STRS.ir: [www.STRS.ir](http://www.STRS.ir)

Follow our scientific posts via our Blog: [www.sid.ir/blog](http://www.sid.ir/blog)

Use our educational service (Courses, Workshops, Videos and etc.) via Workshop: [www.sid.ir/workshop](http://www.sid.ir/workshop)