

تأثیر علف کش آترازین بر فرآیند اوئوژنز در گورخرماهی *Danio rerio*زهرة ناجی^{۱*}، ناصر مهدوی شهری^۲، فرشته قاسم زاده^۳، داور شاهسونی^۴، مرتضی بهنام رسولی^۲

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی تکوینی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد

۳- دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: naji_z65@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۰/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۵/۳۰

چکیده

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

مواد و روش‌ها: در این پژوهش اوئوژنز در تخمدان گورخرماهی‌هایی که به مدت ۱۴ روز در معرض غلظت‌های مختلف آترازین (۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر لیتر) قرار گرفته بودند مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور نمونه‌ها در محلول بیون فیکس و در پارافین قالب گیری شدند و در نهایت برش های ۵ تا ۷ میکرومتری با هماتوکسیلین - اتوزین مورد رنگ آمیزی قرار گرفتند. ارزیابی مورد نظر بر اساس مطالعات هیستوپاتولوژیکی تخمدان و بر اساس معیارهایی از جمله تعداد فولیکول‌های نارس و رسیده و قطر فولیکول‌ها انجام گرفت و اطلاعات حاصل از آزمایش توسط آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) مورد بررسی قرار گرفت. سطح معنا داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج: این مطالعات نشان داد که غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر لیتر آترازین سبب افزایش چشمگیر اووسیت‌های غیر طبیعی (آنورمال) در مقاطع تهیه شده از تخمدان می‌شود ($P < 0.05$)، به علاوه مقایسه قطر فولیکول‌ها در گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری را نشان نداد.

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

واژگان کلیدی: آترازین، اوئوژنز، فولیکول‌های تخمدان، گورخرماهی

مقدمه

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

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

اثرات گزارش شده آترازین بر روی انسان و حیوانات آزمایشگاهی شامل بر هم خوردن سیستم‌های درون ریز، ایجاد آسیب‌های تخمدانی و آسیب‌های کبدی است. همچنین تاثیرات سمی این

ماده بر روی سیستم عصبی، سیستم ایمنی و عملکردهای قلبی عروقی گزارش شده است (۳). امکان اثرات متقابل بین آترازین و سیستم‌های درون ریز و تولید مثلی در چندین مطالعه مورد توجه قرار گرفته است. در انسان در معرض قرارگیری طولانی مدت با این علف‌کش خطر ابتلا به سرطان تخمدان و سینه را افزایش می‌دهد (۶). در رت آزمایشگاهی اثر این ماده بر عملکردهای محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد بررسی شده است و اخیراً حضور این ماده به عنوان عامل کاهش جمعیت‌های برخی دوزیستان معرفی شده است (۷). Hayes و همکارانش (۸) نشان دادند که آترازین سبب ایجاد هرمافرودیسیم در زنبوس می‌شود.

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

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

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

۸/۲ - pH: ۷، سختی: ۳۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کربنات کلسیم، و محلول در معرض گذاری، یک روز در میان به طور کامل تعویض می‌شد. بعد از اتمام دوره آزمایش، جهت انجام مطالعات بافتی با میکروسکوپ نوری، تعداد ۱۰ عدد ماهی به طور تصادفی انتخاب و در آب صفر درجه بیهوش شدند. سر و دم نمونه‌ها حذف شده و به فیکساتور بوئن منتقل گردیدند و در ادامه مراحل آبیگری و قالب گیری انجام شد.

مطالعات آسیب شناسی بافتی: قالب‌های پارافینی در جهت عرضی و با ضخامت ۷ - ۵ میکرون برش گیری شدند. برش‌ها بر طبق موقعیت نسبی اندام مورد نظر به دیگر ساختارها استاندارد شد به طوری که قطعات تهیه شده، هر دو لب تخمدان، کبد و کیسه شنا را به طور همزمان نشان می‌دادند. ۲ قطعه جداگانه از این ناحیه برای هر نمونه آماده شد. سپس نمونه‌ها توسط روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین، مورد رنگ آمیزی قرار گرفتند (۱۲). سپس مقاطع تخمدان گورخر ماهی‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری و توسط بزرگ نمایی $\times 20$ مورد بررسی قرار گرفتند.

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

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

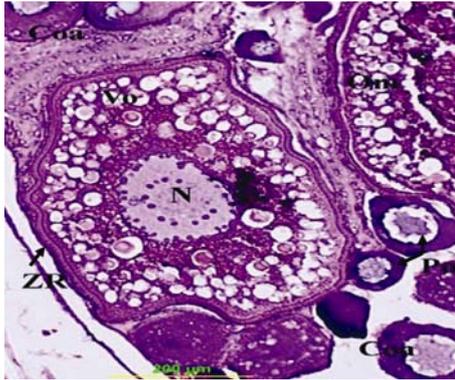
هیستولوژیکی تخمدان بود که در این تحقیق به بررسی تعداد و قطر فولیکول‌های تخمدانی و گروه بندی آنها و همچنین شمارش فولیکول‌های غیرطبیعی پرداخته شده است (۵).

مواد و روش‌ها

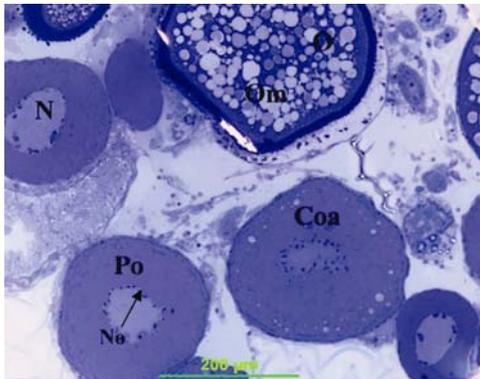
تهیه و نگهداری گورخرماهی: در اجرای این پژوهش، گورخر ماهی از مرکز پرورش ماهی صدف واقع در شهرستان مشهد تهیه شد. قبل از شروع آزمایش، ماهی‌ها در یک محدوده دمایی 1 ± 25 درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۴ ساعت روشنایی، ۱۰ ساعت تاریکی به مدت یک هفته نگهداری شده و با آب و هوای جدید خو گرفتند (۱۲). دمای آزمایشگاه در تمام مدت ثابت نگه‌داشته شد. ماهی‌ها سه بار در روز به میزان یک درصد وزن بدن، با آرتمیای خشک تغذیه می‌شدند و پارامترهای آب (شامل pH و دما) به صورت یک روز در میان اندازه گیری می‌شد (۱۳). همچنین به منظور اطمینان از سلامت نمونه‌ها بر روی تعدادی از آنها به طور تصادفی تست انگلی انجام شد. سپس تعداد ۱۰۰ عدد ماهی ماده به طور تصادفی انتخاب و برای آزمون در معرض گذاری با آترازین آماده شدند. وزن این افراد 0.1 ± 0.07 گرم و میانگین طول بدن از نوک پوزه تا خاستگاه باله دمی 3 ± 0.2 سانتی‌متر بود و اختلاف آماری معنی‌داری در وزن و طول بدن وجود نداشت.

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

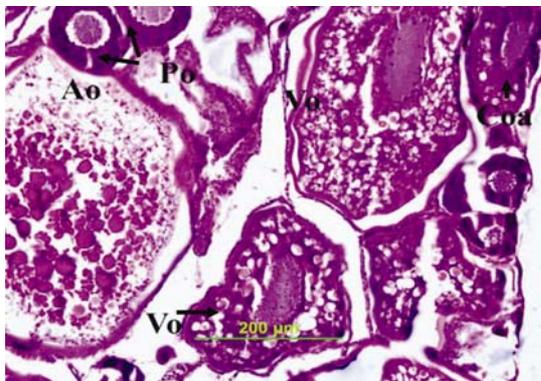
آترازین که به صورت پودر جامد و سفید رنگ در بازار وجود دارد (CAS No.: 1912-24-9) محصول شرکت سیگما از شرکت بهارآوران مشهد خریداری شد. سپس با حل کردن این ماده در استون به نسبت یک گرم در لیتر، یک محلول ذخیره از این ماده تهیه شد. به منظور ارزیابی تأثیر این ماده بر تخمدان گورخرماهی، گروه‌های آزمایشی در معرض غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰ میکروگرم بر لیتر (ppm) آترازین قرار گرفتند (۵ و ۱۴). نمونه‌های گروه کنترل در آب فاقد استن و آترازین و نمونه‌های شاهد در آب محتوی استن در غیاب آترازین (در غلظت ۱۰۰۰ میکرولیتر بر لیتر) قرار داده شدند. آزمایش به مدت ۱۴ روز (۱۴) در شرایط ثابت انجام شد (دما: 1 ± 25 ،



شکل ۱: نمای کلی از تخمدان گورخرماهی. اووسیت‌ها در مراحل مختلف تکوین در گروه کنترل. میکروسکوپ نوری، بزرگ نمایی $20\times$ ، رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین. اووسیت اولیه *Po*، اووسیت آلئولی *Coa*، اووسیت ویتلوژنیک *Vo*، اووسیت بالغ *Om*، ناحیه شفاف *ZR* هسته *N*



شکل ۲: نمای کلی از تخمدان گورخرماهی. اووسیت‌ها در مراحل مختلف تکوین در گروه کنترل. میکروسکوپ نوری، بزرگ نمایی $20\times$ ، رنگ آمیزی آبی تولوئیدین در برش‌های نازک 1 میکرومتری که توسط دستگاه اولترامیکروتوم مدل *Leica* برش‌گیری شده است. اووسیت اولیه *Po*، اووسیت آلئولی *Coa*، اووسیت بالغ *Om*، هسته *N*، هسته *No* اووپلاسم *O*



شکل ۳: نمای کلی از تخمدان گورخرماهی در گروه با غلظت 1000 میکروگرم بر لیتر آترازین. میکروسکوپ نوری، بزرگ نمایی $20\times$ ، رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین. اووسیت اولیه *Po*، اووسیت آلئولی *Coa*، اووسیت ویتلوژنیک *Vo*، اووسیت آترتیک *Ao*

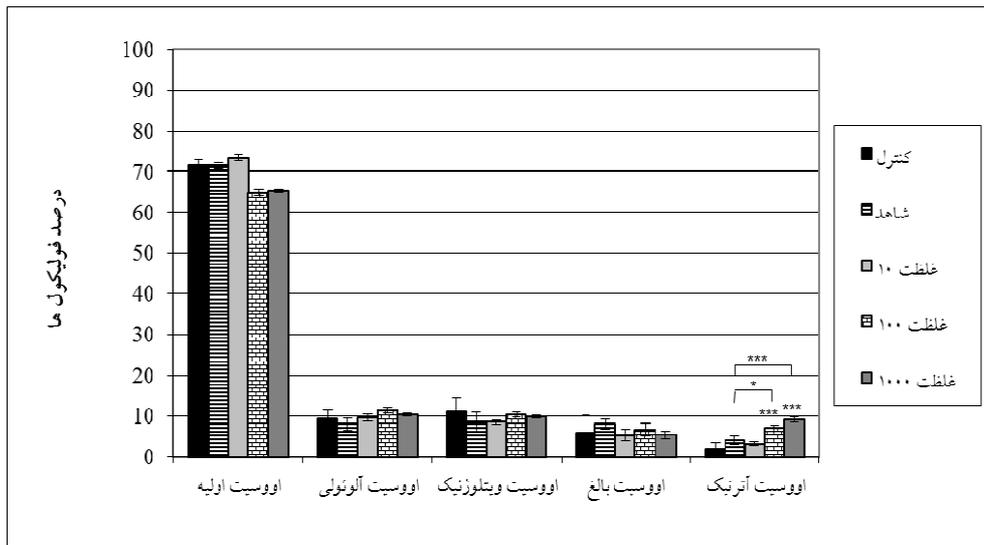
تحلیل داده‌های آماری: پس از شمارش تعداد فولیکول‌ها و اندازه‌گیری قطر آنها در مقاطع رنگ آمیزی شده با هماتوکسیلین-ائوزین، محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار گراف پد *Instat* و آنالیز *One-way ANOVA* انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون *Tukey* انجام شد و سطح معناداری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد. نمودار با استفاده از نرم‌افزار *Excel* رسم گردید. تعداد فولیکول‌ها به صورت درصدی از کل فولیکول‌ها محاسبه شد و به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ نمایش داده شد.

نتایج

در شروع آزمایش، اووسیت‌ها در مراحل مختلف اووسیت‌های اولیه، آلئول‌های قشری، اووسیت ویتلوژنیک و اووسیت بالغ به اضافه تعداد محدود اووسیت‌های آترتیک در تخمدان حضور داشتند. بعد از انجام آزمون در معرض‌گذاری که به مدت 14 روز انجام شد، مقایسه درصد فولیکول‌ها در مراحل مختلف تکوین تفاوت معنی‌داری را در بین گروه‌ها نشان نداد، اما درصد اووسیت‌هایی که متحمل آترتیا شده بودند در ماده‌هایی که در معرض آترازین قرار گرفته بودند، بسته به میزان آترازین، نسبت به گروه کنترل بیشتر بود (تصویر انواع مختلف اووسیت‌ها در گروه کنترل و گروه 1000 میکروگرم بر لیتر آترازین در اشکال شماره ۱، ۲ و ۳ نشان داده شده است). و این تفاوت در گروه‌های تیمار که در معرض غلظت‌های 100 ($P < 0.05$) و 1000 ($P < 0.001$) میکروگرم بر لیتر آترازین قرار گرفته بودند معنی‌دار بود (شکل ۴ و جدول ۱).

به علاوه در گروه شاهد که در آن ماهی‌ها در معرض غلظت 1000 میکروگرم بر لیتر آترازین قرار گرفته بودند نیز افزایش تعداد فولیکول‌های آترتیک نسبت به گروه کنترل مشاهده شد، اما این میزان معنی‌دار نبود. این موضوع نشان دهنده این مطلب است که احتمالاً استن که به عنوان حلال آترازین در آزمایشات مورد استفاده قرار می‌گیرد دارای اثر سمی است. اما به هر حال مقایسه گروه‌های آزمایش تیمار (با غلظت‌های 100 و 1000 میکروگرم بر لیتر آترازین) با گروه شاهد (که آترازین را دریافت نکرده بودند و در عوض در معرض استن بودند) تفاوت معنی‌داری (به ترتیب $P < 0.05$ و $P < 0.001$) در درصد اووسیت‌های آترتیک مشاهده شد (شکل ۴ و جدول ۱). همچنین در این مطالعه مشاهده شد که اووسیت‌های ویتلوژنیک بسیار بیشتر از اووسیت‌های پیش ویتلوژنیک متحمل آترتیا شده بودند.

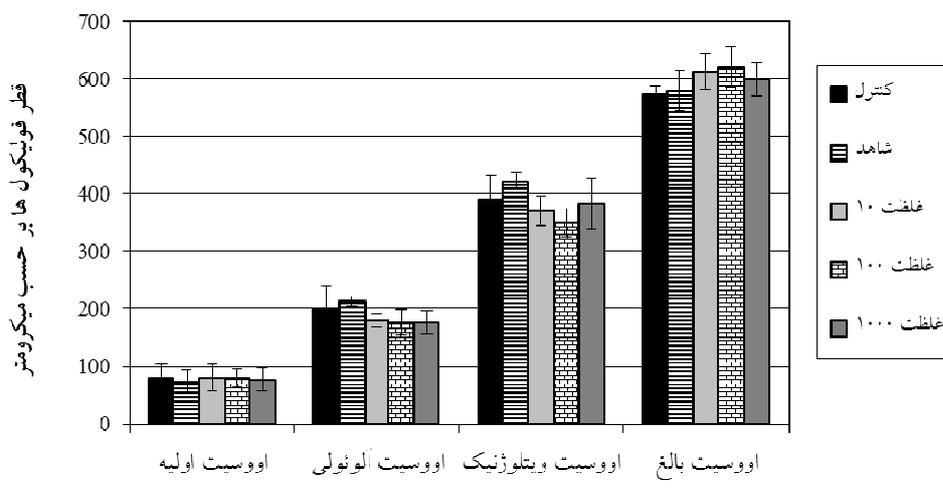
مقایسه میانگین قطر فولیکول‌ها در مراحل مختلف تکوین اووسیت تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (شکل ۵).



شکل ۴: درصد انواع مختلف اووسیت‌ها در تخمدان گورخرماهی که در معرض غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر لیتر آترازین قرار گرفتند. ستاره‌ها تفاوت‌های معنی‌دار گروه کنترل و شاهد را با گروه‌های تیمار نشان می‌دهند. * $P < 0.05$ ، ** $P < 0.01$ ، *** $P < 0.001$

جدول ۱: میانگین درصد اووسیت‌ها در گروه‌های آزمایش، کنترل و شاهد

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



شکل ۵: مقایسه متوسط قطر (میکرومتر) انواع مختلف اووسیت‌ها در تخمدان گورخرماهی که در معرض غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر لیتر آترازین قرار گرفتند.

بحث

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

در این مطالعه به بررسی بافتی تخمدان گورخر ماهی‌هایی که به مدت ۱۴ روز در معرض آترازین قرار گرفته بودند پرداخته شد و نتایج نشان داد که غلظت‌های بالای آترازین (۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر لیتر) احتمالاً سبب القاء آترازین در تخمدان گورخر ماهی می‌شود. در همین راستا Spano و همکارانش (۵)، به مطالعه تاثیر آترازین بر روی استروئیدهای جنسی، غلظت ویتلوژنین پلازما و تکوین گوناد در ماهی طلائی بالغ (*Carassius auratus*) پرداختند. آنها دریافتند که غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر لیتر این ماده سبب القاء به هم ریختگی ساختاری در بیضه و بالا رفتن سطح آترازین در تخمدان‌ها می‌شود که مشابه نتایج بدست آمده در این پژوهش است. در توافق با نتایج حاصل از این پژوهش در پژوهشی Tillitt و همکارانش (۲۰) تاثیر این ماده را بر سیستم تولید مثلی ماهی کپور (*Pimephales promelas*) مورد مطالعه قرار داده‌اند و گزارش کرده‌اند که تولید تخم در گروه‌های تیمار که در معرض غلظت‌های جزئی آترازین (۵، ۵۰، ۵۰۰ میکروگرم بر لیتر) به مدت ۱۴ و ۳۰ روز قرار گرفته بودند کاهش یافته است. به علاوه یک افزایش مرتبط با غلظت در فولیکول‌های آترتیک که می‌تواند

با کاهش تولید تخم مرتبط باشد نیز گزارش شده است که مطابق نتایج حاصل از این پژوهش است. همچنین در این مقاله حضور چندین کیست تخمدانی در افراد تحت تیمار گزارش شده است که به طور معمول در مقالات مرتبط با ماهی دیده نمی‌شود. با این وجود کیست‌های تخمدانی در خوکه‌هایی که مقدار کمی آترازین را دریافت کرده بودند نیز گزارش شده است (۲۱). با این حال در این پژوهش کیست تخمدانی مشاهده نشد که علت این امر می‌تواند ناشی از تفاوت روش آزمایش و همچنین متفاوت بودن گونه مورد آزمایش باشد. آترزیای فولیکولی در ماهی‌های ماده تیمار شده می‌تواند ناشی از یک بی‌نظمی در فرآیندهای طبیعی بلوغ اووسیت باشد.

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

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

تشکر و قدر دانی

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

منابع

1. Cooper RL, Kavlock RJ. Endocrine disruptors and reproductive development: A weight-of-evidence overview. *Journal of Endocrinology*. 1997; 152: 159–566.
2. HaghySharaphy GH, Shokuh Far A. “Replacing of surgarcanes herbicide for reducing chemical poisons consumption and beneficial usu from agricultural organization in surgarcannes farms in Khuzestan”. *Journal of Crop physiology*. 2009; 1: 100-109.persian
3. EPA USA. Atrazine Chemical Summary.Toxicity and Exposure Assessment for Children’s Health. 2007; 1-12.
4. Song Y, Zhu LS, Xie H, Wang J, et al. Effects of atrazine on DNA damage and antioxidative enzymes in *Vicia faba*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2009; 28: 1055–1062.
5. Spano L, Tyler CR, Aerie Rv, Devos P, et al. Effects of atrazine on sex steroid dynamics, plasmavitellogenin concentration and gonad development in adult goldfish (*Carassius auratus*). *Aquatic Toxicology*. 2004; 66: 369–379.
6. Kettles MA, Browning SR, Prince TS, Horstman SW. Triazine herbicide exposure and breast cancer incidence: an ecological study of Kentucky counties. *Environmental Health Perspectives*. 1997; 105 (11): 1222-1227.
7. Cooper RL, Stoker TE, Tyrey LM, Goldman J, et al. Atrazine disrupts the hypothalamic control of pituitary-ovarian function. *Toxicological Sciences*. 2000; 53: 297–307.
8. Hayes TB, Collins A, Lee M, Mendoza M, et al. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002 ; 99: 5476–5480.
9. Elia AC, Waller WT, Norton SJ. Biochemical responses of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*, Rafinesque) to atrazine induced oxidative stress. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology*. 2002; 68: 809-816
10. Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*. 2008; 83 (1): 13-34.

حال هر چند فولیکول‌های آترتیک شاخص مهم تاثیرات محیطی بر روی تخمدان ماهی‌ها هستند، مکانیسم‌هایی که این فرآیند را آغاز و تنظیم می‌کنند هنوز به طور کامل شناخته نشده‌اند و ارائه اطلاعات در این زمینه نیاز به مطالعات بیشتری دارد (۲۲). همان‌طور که گفته شد، آترزیا فولیکولی شاخص مطالعه تاثیرات محیطی بر تخمدان ماهی است و می‌توان آن را در مطالعاتی که به بررسی تاثیرات مواد مختلف بر تخمدان ماهی پرداخته‌اند، مشاهده نمود. برای مثال Heiden و همکاران (۱۲) تاثیر ماده سمی 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-Dioxin را در غلظت‌های غیرکشنده بر روی تکوین تخمدان و غلظت‌های ویتلوژنین و استرادیول در گورخرماهی‌های ماده مورد بررسی قرار داده و گزارش نموده‌اند که این ماده سبب کاهش تولید تخم و افزایش فولیکول‌های آترتیک تخمدانی می‌شود. در همین زمینه Daouka و همکاران (۲۸) مشخص کردند که polychlorinated biphenyls (PCBs) سبب القاء آسیب تخمدانی در گورخر ماهی شده و تعداد فولیکول‌های آترتیک را افزایش می‌دهد. همچنین Dutta و همکاران (۲۹) تاثیرات غیرکشنده دیازینون را در تخمدان ماهی *Lepomis macrochirus* مورد ارزیابی یافتی قرار داده‌اند و این مطالعه نیز افزایش فولیکول‌های آترتیک را به عنوان یکی از نتایج این در معرض گذاری بیان کرده است. Mlamboa و همکاران (۳۰) تغییرات هیستولوژیکی سیستم تولید مثلی ماهی *Oreochromis mossambicus* را به دنبال در معرض قرارگیری افراد با 1,1-bis (4-chlorophenyl)-2,2,2-trichloroethane (DDT) مورد مطالعه قرار داده است و به بررسی آترزیا پرداخته است، همچنین Dutta و همکاران (۳۱) با استفاده از مطالعات هیستولوژیکی تاثیر آفت کش Endosulfan را بر تخمدان *Lepomis macrochirus* مورد ارزیابی قرار داده و بیان کرده است که با افزایش غلظت این ماده، تعداد فولیکول‌های آترتیک افزایش می‌یابد.

نتیجه گیری

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

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

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

Naji Z^{1*}, MahdviSHahri N², GHassemzadeh F², Shahsavani D³, BehnamRassouli M²

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

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

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

* Email corresponding author: naji_z65@yahoo.com

Received: 21 Aug. 2011

Accepted: 2 Jan. 2012

Abstract

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

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

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

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

Keyword: Atrazine, Oogenesis, Ovarian follicles, zebrafish