تأثیر ماده شبه استروژنی ٤- نونیل فنل بر هیستوپاتولوژیک بافت تخمدان در ماهیان نابالغ کپور نژاد کوی (*Cyprinus carpio*)

پریسا امانی نژاد[۱]
همایون حسین زاده صحافی[۲*]
مهدی سلطانی[۳]
ابوالقاسم کمالی[٤]
طاهره ناجی[٥]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه شیلات، تهران، ایران
۲. موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی تهران، ایران.
۳. دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، استاد گروه بهداشت آبزیان، تهران، ایران
۴. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، استاد گروه شیلات، تهران، ایران
۵. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم داروئی، دانشیار گروه داروسازی، تهران، ایران

***مسئول مکاتبات:**
H_Hosseinzadeh@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۶/۰۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۹/۲۱
کد مقاله: ۱۳۹۶۰۴۰۵۶۰
این مقاله برگرفته ازطرح پژوهشی است.

چکیده

در این تحقیق تأثیر ماده شبه استروژنی ۴-نونیل فنل بر تغییرات آسیب‌شناسی بافت تخمدان در ماهیان نابالغ ماده کپور کوی بررسی شد. بدین منظور تعداد ۱۸۰ قطعه ماهی ماده در قالب ۵ تیمار (تیمار ۱،۲ و ۳ دوزهای ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم ۴-نونیل فنل و تیمار ۴ دوز ۲ میکروگرم ۱۷-بتااسترادیول‌به‌عنوان زنواستروژن و تیمار ۵ به‌عنوان تیمار شاهد) به همراه ۳ تکرار در خلال سه هفته به‌صورت درون صفاقی و به ازای هر گرم وزن بدن مورد تزریق قرار گرفتند. سپس در روز ۲۲ پس از بیومتری، ماهیان تشریح شده و گناد آن‌ها خارج گردید و مشخصات و وزن آن‌ها ثبت شد. مطابق باروش استاندارد بافت‌شناسی، مقاطع بافتی تهیه و تأثیرات آسیب‌شناسی بافتی بر روی بافت تخمدان با استفاده از میکروسکوپ نوری و الکترونی موردمطالعه گرفت. نتایج حاصل از بررسی میکروسکوپ نوری نشان‌دهنده بروز ناهنجاری‌های ساختاری در بافت تخمدان ماهیان ماده و نیز افزایش تعداد تخم‌های دژنره شده و فولیکول‌های‌آترزیا شده در تخمدان ماهی‌های تحت تیمار نونیل فنل، به‌ویژه در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در گرم بود که در مقایسه با ماهی‌های گروه شاهد افزایش معنی‌داری دیده شد ($P< ۰/۰۵$). نتایج مطالعات فراساختاری نیز نشان می‌دهد که بافت تخمدان در این مرحله (IV و III) حاوی تخمک‌های پری نوکلئولار و پری و تیلوژنیک (پیش زرده سازی) بوده است و لایه فولیکولی دارای ضخامت قابل‌توجهی به دلیل جذب هر چه بیشتر ویتلوژنین می‌باشد. درمجموع این نتایج نشان می‌دهد که تعداد و اندازه تخمک‌های پری‌ویتلوژنیک نسبت به سایر تیمارها افزایش‌معنی‌داری یافته است، به‌طوری‌که در تیمار ۱۰۰ میکروگرم بر گرم نونیل فنل، تغییرات هیستوپاتولوژیک با افزایش غلظت نونیل فنل، به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. در بررسی تأثیرپذیری ماهی کپور کوی در مواجهه با عوامل شبه استروژنی ثابت کرد که عوامل شبه استروژنی نظیر ۴- نونیل فنل منجر به بروز تغییرات هیستولوژیکی در بدن ماهیان می‌گردد.

واژگان کلیدی: آسیب‌شناسی بافتی، تخمدان، میکروسکوپ نوری، میکروسکوپ الکترونی، ۴-نونیل فنل، کپور کوی

مقدمه

با افزایش روزافزون کاربرد شوینده‌ها در منازل و بخش‌های گوناگون صنعتی و همچنین مواد پلاستیکی و بسته‌بندی آن‌ها، ترکیبات شبه استروژنی ۴- نونیل فنل در محیط‌های دریایی واردشده‌اند. امروزه به اثبات رسیده است که این ترکیبات (EDCs) با اثرات آسیب رساننده خود بر سیستم غدد درون‌ریز باعث افزایش مرگ‌ومیر، کاهش باروری و اختلال در فرآیندهای هورمونی در آبزیان می‌گردند (Arukwe *et al*., 1997). بسیاری از این مواد به‌طور بالقوه برای موجودات آبزی سمی، ژنوتوکسیک و سرطان‌زا هستند (Berczi and Nagy, 1998). یکی از این ترکیبات که

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

اثر استروژنیک داشته و ژئوتوکسین بودن آن نیز مشاهده‌شده است (Casini *et al*., 2000) ۴- نونیل فنل‌اتوکسیلات می‌باشد که دارای پتانسیل اختلال در سیستم آندوکرینی موجودات زنده و به‌ویژه آبزیان می‌باشد (Colburn *et al*., 1997). نونیل‌فنل برای اولین بار در سال ۱۹۴۰ تولید شد و سپس تولید و افزایش آن به‌صورت تصاعدی افزایش یافت. نونیل فنل در محیط‌های آبی در اثر تجزیه میکروبی نونیل فنل اتوکسیلات به وجود می‌آید. نونیل فنل اتوکسیلات یک آلکیل فنل اتوکسیلات (APEs) و یک سورفاکتانت غیریونی است که به‌طور گسترده در سورفاکتانت ها، رنگ‌ها، شوینده‌ها، روغن‌های روان کننده و صنایع شیمیائی و صنعتی یافت می‌شود (Soares *et al*., 2008). به‌طوری‌که میانگین غلظت ترکیب شبه استروژنی ۴- نونیل فنل در عضله و کبد کپور ماهی تالاب انزلی به ترتیب ۱/۶۵ و ۳/۰۲ میکروگرم بر گرم اندازه‌گیری شده است (Mortazavi *et al*., 2013). نونیل فنل همانند سایر آلکیل فنل ها در محیط مقاوم بوده، بسیار چربی‌دوست می‌باشد و متعاقباً می‌تواند منجر به تجمع زیستی در موجودات آبزی گردد (Snyder *et al*., 2001; Maguire, 1999). آلکیل فنل ۴- نونیل فنل (NP) یک‌شبه استروژن است و شاید یکی از بهترین EDCs های شناخته‌شده باشد (Ahel, 1994) و به دلیل شباهت ساختاری با ۱۷ -بتااسترادیول (E2)، نونیل فنل اثر این هورمون طبیعی را به‌وسیله رقابت برای اتصال به گیرنده‌های استروژن کبدی تقلید کرده و ازاین‌رو قادراست عملکرد طبیعی سیستم آندوکرینی را تحت تأثیر قرار دهد. به‌علاوه از میان ایزومرهای نونیل فنل، آستانه خطر سازی پارانونیل فنل (۴- نونیل فنل) در بیشترین سطح قرار دارد (۵ میکروگرم بر لیتر (Lee and Lee, 1996). Holdway همکاران (۲۰۰۷) در تحقیقی گزارش کردند که مواجهه از تخم‌ریزی ماهیان سبب ایجاد تغییرات در رفتارهای تولیدمثلی، کاهش هماوری، درصد لقاح و ترشح هورمون‌های جنسی می‌شود (Holdway *et al*., 2007). El-sayed و همکاران (۲۰۱۴)، نیز در تحقیقی به بررسی تغییرات آسیب‌شناسی ساختاری و عملکردی در ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) پس از مواجهه با غلظت مزمن ۴-نونیل فنل پرداختند. نتایج این بررسی کاهش شدیدی را در شاخص گنادوسوماتیک، هماوری و قطر اووسیت نشان داد. همچنین آزمایش‌های هیستولوژیکی بافت تخمدان، تغییرات واضح و معنی‌داری را در رشد اووسیت ها به دنبال تخریب گنادهای جنسی از خود نشان داد (El-sayed *et al*., 2014). در مطالعه‌ای دیگر تأثیر ۴-نونیل فنل بر روی گربه‌ماهی آفریقایی (*Clarias gariepinus*) بررسی شد و نتایج این آزمایش نشان داد که تیمارهای نونیل فنل می‌تواند به‌طور معنی‌داری سبب کاهش درصد لقاح، تخمه گشایی و هماوری شود و این در حالی بود که دوره انکوباسیون، درصد تلفات و بدشکلی جنینی به‌طور آشکاری افزایش یافت (El-sayed *et al*., 2012). Chang و همکاران (۲۰۱۳) نیز در مطالعه اثر نونیل فنل بر روی ماهی گورخری ماده (*Danio rerio*) نشان دادند که تعداد اووسیت های واردشده به مرحله شروع زرده سازی در تیمار نونیل فنل نسبت به گروه شاهد افزایش‌یافته که می‌تواند مربوط به اثر شبه استروژنی نونیل فنل در تولید زرده باشد. همچنین مشخص شد که این ترکیب می‌تواند سبب کاهش نرخ باروری، کاهش تعداد تخم‌ها در هر تخم‌ریزی و نیز کاهش وقوع عمل تخم‌ریزی شود (Chang *et al*., 2013). هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر ۴- نونیل فنل بر تغییرات هیستوپاتولوژیک بافت تخمدان با استفاده از میکروسکوپ نوری و ارزیابی روند زرده سازی و میزان اووسیت های واردشده به مرحله شروع زرده سازی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی در ماهی ماده کپور نزادکوی است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه شیلات دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، در خردادماه ۱۳۹۴ انجام پذیرفت. بدین منظور ۱۸۰ قطعه ماهی‌کپورکوی نابالغ ماده (*Cyprinus carpio*) با میانگین وزنی (۱۰±۵۰ گرم) از کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان زینتی سازمان فنی و حرفه‌ای استان تهران تهیه شدند. ماهیان به‌صورت تصادفی در ۱۸ آکواریوم ۲۰ لیتری (۱۰ ماهی در هر آکواریوم) رهاسازی شدند. طول کل و وزن بدن در ابتدای دوره ثبت گردید. جهت سازگاری ماهی‌ها به مدت ۱۰ روز در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار گرفتند. آب روزانه به میزان ۸۰ درصد تعویض و فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب (دمای ۲۵-۱۵ درجه سانتی‌گراد، سختی آب ۱۰-۵ppt و pH=۶/۸) اندازه‌گیری

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

شد. در کل دوره آزمایش هیچ‌گونه غذادهی صورت نگرفت (Arukwe *et al.*,1997; Christensen, 1999). به‌منظور مواجهه ماهی‌کپورکوی‌با ۴- نونیل فنل، از روش تزریق استفاده شد. بدین منظور پس از بیهوش کردن با ۲-فنوکسی اتانول ۰/۱٪(Merc, Germany)، ماهیان ۳ تیمار با دوزهای ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر گرم وزن بدن از ۴- نونیل فنل (Schenectady, NY, USA) با درجه خلوص ۹۵/۳٪ در خلال ۳ هفته و به‌صورت تزریق درون صفاقی تحت تزریق قرار گرفتند (Arukwe *et al.*,1997; Christensen, 1999; Yadetie *et al.*, 1999; Casini *et al.*, 2002). همچنین ماهیان ۱ تیمار دوز ۲ میکروگرم برگرم وزن بدن از ۱۷- بتااسترادیول (Sigma, USA) را به‌عنوان زنو استروژن دریافت کردند. علت استفاده از ۱۷- بتااسترادیول در این مطالعه آزمون فرضیه اثر استروژنیک نونیل فنل بود. تزریق‌ها به میزان نصف دوز و یک‌بار در هفته انجام پذیرفت. گروه شاهد الکلی تنها میزان ۰/۲ میلی‌لیتر از حلال (روغن نارگیل + اتانول) را دریافت کردند، درحالی‌که بر روی ماهیان گروه شاهد هیچ‌گونه تزریقی صورت نگرفت. در روز ۲۲ از ماهیان نمونه‌برداری به عمل آمد. جهت نمونه‌برداری، پس از بی‌هوش نمودن، طول کل و وزن بدن ثبت شد. سپس به‌منظور تشریح آن‌ها، با قراردادن برروی تشتک تشریح و ثابت کردنشان، به‌وسیله قیچی از سمت مخرج به‌طرف شکم در امتداد خط میانی برش طولی تا زیر سرپوش آبششی ایجاد شد. سپس ۲ برش عرضی یکی در ابتدا و دیگری در انتهای برش اول تا بالای خط جانبی بر برش عمود شد. سپس دو برش عرضی در بالای خط جانبی به هم وصل شد. سپس پوسته خارجی آن از اندام‌های احشایی جدا شد؛ و در این حالت با تفکیک کردن تخمدان از اندام‌های داخلی، آن را جدا کرده و در محلول فرمالین ۱۰٪ قرار داده شد. به‌منظور مطالعات بافت‌شناسی (میکروسکوپ نوری)، بافت تخمدان برداشته‌شده از ماهی‌ها به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در محلول بوئن تثبیت شدند و بعدازآن در اتانول ۷۰٪ نگه‌داری شدند. برای انجام آزمایش بافت‌شناسی تعداد ۶ نمونه (۳ نمونه از هر تکرار) از بافت به‌طور تصادفی انتخاب شد و جهت آبگیری به اتانول ۷۰٪ منتقل شدند. سپس دوباره هرکدام به مدت ۲ ساعت در اتانول ۹۰٪ و دومرتبه هرکدام به مدت یک ساعت در اتانول ۱۰۰٪ و نهایتاً ۱۲ ساعت در بوتانول نگه‌داشته شدند. سپس نمونه‌ها با استفاده از زایلن و به مدت ۳ ساعت شفاف‌سازی شدند و بعدازآن به مدت ۱۲ ساعت (به ترتیب ۲، ۲، ۲ و ۶ ساعت) در پارافین مایع (ظروف پارافین در آون با دمای حدود ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داشتند) نگهداری شدند. نمونه‌های آماده‌شده قالب‌گیری شدند و با استفاده از میکروترم برش‌های ۵ میکرومتری تهیه شد برش‌های بافتی با استفاده از اتانول ۵۰٪ و آب نیمه گرم، بازشده و بر روی لام قرار داده شدند. سپس لام ها در آون با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا پارافین اضافه دور بافت ذوب شود. سپس لام ها پارافین زدایی، آبگیری و به روش هماتوکسیلین- ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شدند (Fischer *et al.*, 2008). بعد از پایان مراحل رنگ‌آمیزی، رنگ اضافی از روی لام شسته شد و لامل با استفاده از چسب انتلان بر روی لام چسبانده شد. درنهایت آسیب‌های بافتی نمونه‌ها توسط میکروسکوپ نوری موردمطالعه قرار گرفت.

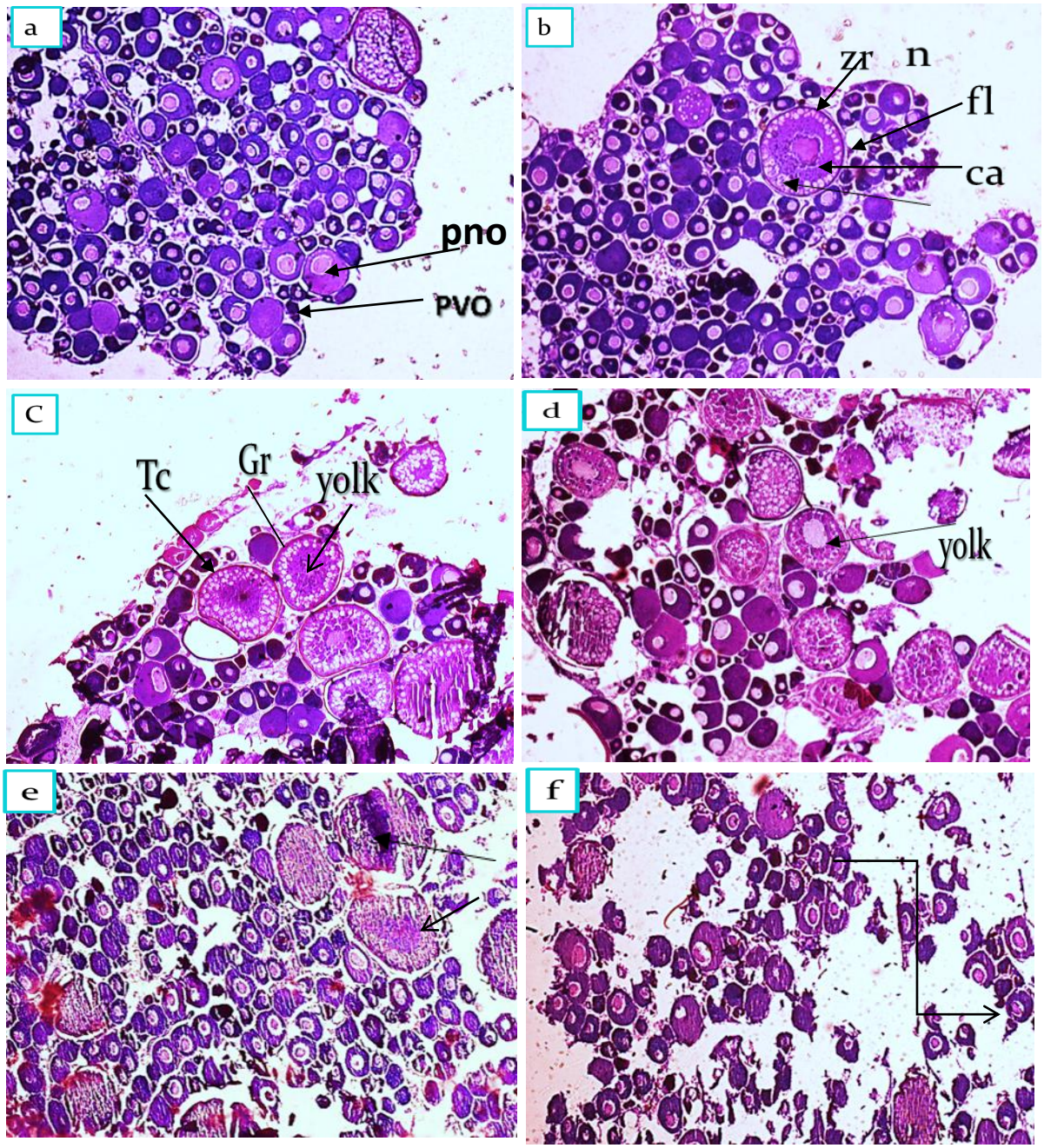
به‌منظور مطالعات بافت‌شناسی فراساختاری (میکروسکوپ الکترونی)، پس از جداسازی بافت تخمدان، از هر تخمدان تعداد ۵ عدد تخمک برداشته‌شده و تخمک‌های تازه به مدت ۳-۲ ساعت در محلول گلوتارالدئید - پارافرمالدئید ۲٪ تثبیت شدند و سپس تخمک‌ها در محلول فرمالدئید ۱۰ درصد تثبیت‌شده و آبگیری و شفاف‌سازی با پروپیلن اکساید به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. پس از قالب‌گیری و پلیمریزاسیون در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد (۷۲- ۴۸ ساعت) از نمونه‌ها توسط اولترامیکروتوم برش‌های نازک تهیه و توسط اورانیل استات ۲٪ رنگ‌آمیزی شدند. سپس ارزیابی فراساختاری تخمک‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی ترانسمیشن TEM (JEOLJEM100CX II) در ولتاژ شتاب‌دهنده ۸۰ کیلوولت (ساخت کشور آلمان) در مرکز میکروسکوپ الکترونی دانشگاه فنی و مهندسی دانشگاه تهران به دست آمد (Morrison, 1995).

نتایج

بررسی‌های بافت‌شناسی و هیستوپاتولوژیک (میکروسکوپ نوری) بافت تخمدان در ماهی‌های ماده که در معرض نونیل فنل قرار داشتند، نشان‌دهندهٔ بروز ناهنجاری‌های ساختاری در این بافت است. تعداد تخم‌های دژنره شده و فولیکول‌های آترزیا شده در تخمدان ماهی‌های تحت تیمار نونیل

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

فنل، به‌ویژه در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در گرم به‌طور معنی‌داری در مقایسه با ماهی‌های گروه شاهد افزایش‌یافته است. در این ماهی‌ها همچنین فاگوسیتوز تخم‌های دژنره شده به‌وضوح در نمونه‌های بافت‌شناسی قابل‌رؤیت است (شکل ۱).

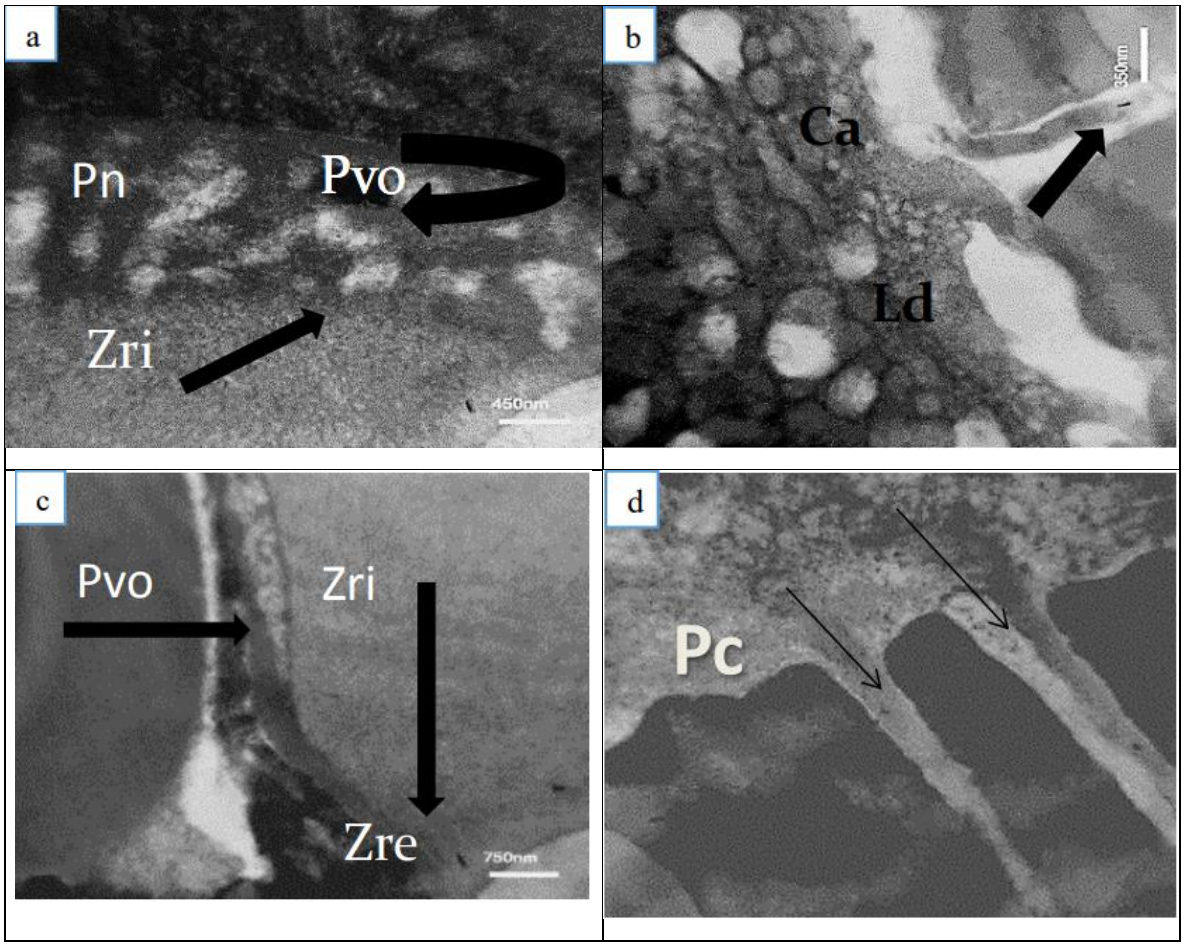


شکل ۱: بافت‌شناسی نوری تخمدان جنس ماده ماهی کپور کوی (*Cyprinus carpio*).

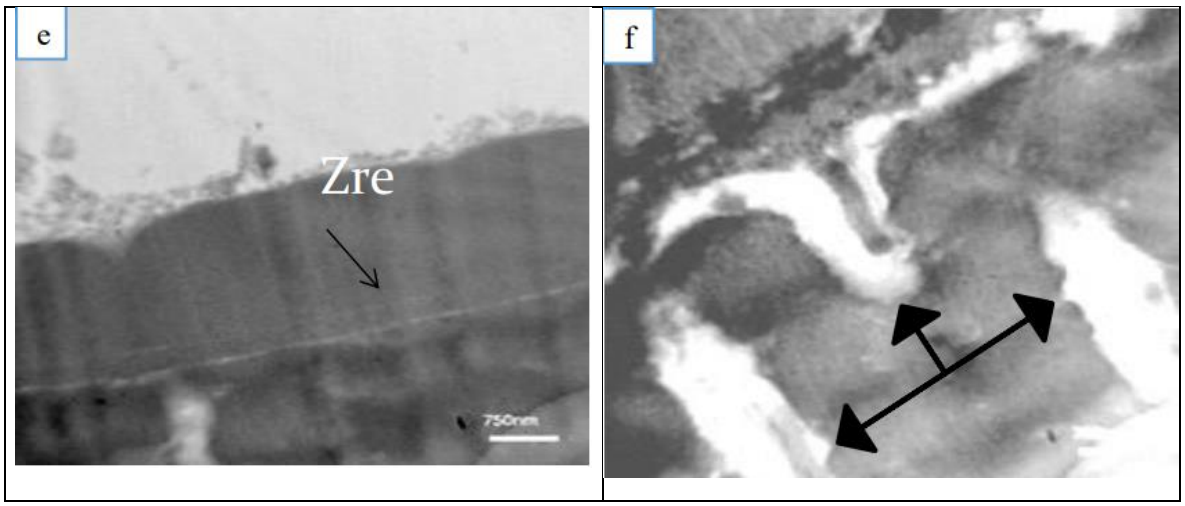
[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

(a) تخمدان گروه شاهد: تخمک پری ویتلوژنیک (Pvo)، تخمک نوکلئولار (Pn). (b) تخمدان تیمار میکروگرم ۱۷-بتااسترادیول: شامل لایه-فولیکولی (fl)، وزیکول ژرمینال (v)، زونا رادیاتا (zr)، هسته تخمک (n)، آلوئولی پلاسم (Ca). (c)(d) تخمدان تیمار ۱۰ و ۵۰ میکروگرم ۴-نونیل فنل: تخمک در مراحل مختلف زرده سازی (Yolk) و لایه فولیکولی تکا (Tc) و گرانولوزا (Gr) در بخش خارجی غشاء اووسیت. (e) (f) تخمدان تیمار ۱۰۰ میکروگرم ۴-نونیل فنل، اووسیت درحال تخریب و تخم های آترزیا شده قابل‌مشاهده است (بزرگنمایی ۱۰۰x، رنگ‌آمیزی H&E).

مطالعه فراساختاری بافت‌شناسی و هیستوپاتولوژیک (TEM) بافت تخمدان در ماهی‌های ماده که در معرض نونیل فنل قرار داشتند، نشان می‌دهد که تخمدان‌ها در این مرحله (III و IV) حاوی تخمک‌های پری نوکلئولار و پری وتیلوژنیک (پیش زرده سازی) بوده است. لایه‌های فولیکولی شامل گرانولوزا و تکا در بخش خارجی غشاء اووسیت (Zre) قرارگرفته و دارای ضخامت قابل‌توجهی به دلیل جذب هر چه بیشتر ویتلوژنین می‌باشد. کانال‌های منفذدار (Pc) در غشاء اووسیت دیده می‌شود که از طریق این کانال‌ها زرده جذب سلول اووسیت می‌گردد، به‌طوری‌که در تیمار ۵۰ میکروگرم بر گرم منجر به شکل‌گیری آبشار میکروپینوسیتوزی به‌طرف غشاء خارجی اووسیت (Zre) می‌شود. در تیمار ۱۰۰ میکروگرم بر گرم نونیل فنل، کاهش در تعداد کانال‌های ورودی و حجم ذرات زرده وارده به غشاء داخلی دیده می‌شود که نشان‌دهنده آسیب بافتی در غشاء اووسیت می‌باشد (شکل ۲).



[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]



شکل ۲: بافت‌شناسی فراساختاری تخمدان جنس ماده ماهی کپور کوی (*Cyprinus carpio*) (TEM).

(a) تخمدان گروه شاهد: دارای ساختاری طبیعی بوده و حاوی تخمک‌های پری ویتلوژنیک (Pvo) و پری نوکلئولار (Pn) و غشاء خارجی اووسیت (Zre) می‌باشد (بزرگ‌نمائی ۴۵۰x نانومتر). (b) تخمدان تیمار ۱۰ میکروگرم ۴-نونیل فنل: افزایش در تعداد و اندازه تخمک‌های پری ویتلوژنیک به همراه آلوئولی پلاسم (Ca) و قطرات چربی (Ld)، (بزرگ‌نمائی ۳۵۰x نانومتر). (c)(d) تخمدان تیمار ۵۰ میکروگرم ۴-نونیل فنل: کانال ورود ذرات پروتئینی زرده (Pc)، آبشارمیکروپینوسیتوزی به‌طرف غشاء خارجی اووسیت (Zre)(بزرگ‌نمائی ۷۵۰x نانومتر). (e)(f) تخمدان تیمار ۱۰۰ میکروگرم ۴-نونیل فنل، کاهش در تعداد کانال‌های ورودی و حجم ذرات زرده وارده به غشاء داخلی (بزرگ‌نمائی ۴۵۰x نانومتر).

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، آسیب‌های بافتی ناشی از ۴-نونیل فنل در بافت تخمدان ماهی کپور کوی نابالغ با به‌کارگیری غلظت‌های مزمن نونیل‌فنل موردبررسی قرار گرفت. بررسی‌های بافت‌شناسی و هیستوپاتولوژیک بافت تخمدان در ماهی‌های ماده که در معرض نونیل‌فنل قرار داشتند، نشان‌دهنده بروز ناهنجاری‌های ساختاری در این بافت است. تعداد و اندازه تخمک‌های پری ویتلوژنیک در تیمارهای ۱۰ و ۵۰ میکروگرم بر گرم وزن بدن نونیل فنل نسبت به تیمار شاهد در حال افزایش است و در این تیمار بیشتر اووسیت های تخمدان در حال زرده سازی (ویتلوژنز) هستند، که علت این موضوع می‌تواند اثر نونیل‌فنل بر اووسیت ها و تحریک بیان ژن ویتلوژنین و افزایش زرده سازی و رشد بیشتر فولیکول‌های تخمدان باشد. در مقابل تعداد تخم‌های دژنره شده و فولیکول‌های آترزیا شده در تخمدان ماهی‌های تحت تیمار غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر گرم وزن بدن نونیل فنل، به‌طور معنی‌داری در مقایسه با ماهی‌های گروه شاهد افزایش‌یافته است. در این ماهی‌ها همچنین فاگوسیتوز تخم‌های دژنره شده به‌وضوح در نمونه‌های بافت‌شناسی قابل‌رؤیت است (شکل ۱). بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از مطالعات آسیب‌شناسی بافت تخمدان می‌توان چنین نتیجه گرفت که تجمع نونیل فنل در غدد جنسی این ماهیان، سبب افزایش تعداد اووسیت‌های آترزیا شده، گردیده است. در اغلب تخمک‌های در مرحله زرده سازی وقوع آترزیا یا به عبارتی دژنره شدن اووسیت ها ممکن است ازنظر فیزیولوژیک امری طبیعی به نظر آید؛ اما افزایش تعداد اووسیت‌هایی که دچار آترزیا می‌شوند، ممکن است در شرایط نامساعد محیطی و فیزیولوژیکی به‌عنوان یک شاخص زیستی محسوب شوند (Mitchelmore and Rice, 2006). از مهم‌ترین مشخصه‌های این اووسیت ها که دچار آترزیا شده‌اند، می‌توان به ازهم‌پاشیدگی هسته، تجزیه و همچنین افزایش در تعداد و اندازه سلول‌های لایه فولیکولی و تغییر حالت و آبکی شدن گلبول‌های زرده و نیز تغییر رنگ محتویات سلولی اشاره

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

کرد. تغییرات دژنراتیو یا به عبارتی آترزیای اووسیت ها درنهایت منجر به مرگ سلولی، توقف فرآیند میتوز در سلول‌های فولیکولی، به‌ویژه سلول‌های لایه گرانولوزا می‌گردد. در طی آرتزیای سلولی و مرگ اووسیت ها، سلول‌های فاگوسیتوزی آن‌ها را از بین می‌برند. ازاین‌رو افزایش فاگوسیتوز اووسیت های دژنره شده، به‌ویژه در تخمدان ماهی‌هایی که در معرض غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر گرم وزن بدن نونیل فنل قرار داشته‌اند، نیز موید همین امر است که درنهایت ممکن است به کاهش هماوری این ماهی‌ها منجر گردد. از طرفی دیگر دژنرسانس سلول‌های لایه فولیکولی نیز ممکن است به کاهش سطح سنتز آستروئیدهای جنسی و تأخیر درروند بلوغ سلول‌های جنسی و نیز تحلیل تخم‌ها بیانجامد. به عبارتی کاهش سطح هورمون‌های جنسی می‌تواند موجب به تأخیر افتادن بلوغ جنسی، کاهش شاخص گنادوسوماتیک و تحلیل رفتن غدد جنسی در ماهی‌ها گردد. درنتیجه ماهی‌ها توان‌زاد آوری خود را ازدست‌داده و نسل آن‌ها در طی مدت‌زمان کوتاهی منقرض خواهد شد. به‌طوری‌که نتیجه تحقیقات صورت گرفته بر روی ماهی کپور نیز نشان می‌دهد که با افزایش غلظت نونیل فنل و نیز زمان که تماس ماهی‌ها در تخمدان این ماهی‌ها رخ می‌دهد (Dutta and Maxwell, 2003).

Holdway و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند پیش از تخم‌ریزی‌ماهیان سبب ایجاد تغییرات در رفتارهای تولیدمثلی، کاهش هماوری، درصد لقاح، زنده‌مانی و ترشح هورمون‌های EDCs جنسی می‌شوند (Holdway *et al*., 2007). El-sayed و همکاران (۲۰۱۴)، نیز در تحقیقی به بررسی تغییرات آسیب‌شناسی ساختاری و عملکردی در ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) پس از مواجهه با غلظت مزمن ۴- نونیل فنل پرداختند. نتایج این بررسی کاهش شدیدی را در شاخص گنادوسوماتیک، هماوری و قطر اووسیت نشان داد. همچنین آزمایش‌های هیستولوژیکی بافت تخمدان، تغییرات واضح و معنی‌داری را در رشد اووسیت ها به دنبال تخریب گنادهای جنسی از خود نشان داد (El-sayed *et al*.,2014). در مطالعه‌ای دیگر تأثیر ۴-نونیل فنل بر روی گربه‌ماهی آفریقایی (*Clarias gariepinus*) بررسی شد و نتایج این آزمایش نشان داد که تیمارهای نونیل فنل می‌تواند به‌طور معنی‌داری سبب کاهش درصد لقاح، تخمه گشایی و هماوری شود و این در حالی بود که دوره انکوباسیون، درصد تلفات و بدشکلی جنینی به‌طور آشکاری افزایش یافت (El-Sayed *et al*., 2012). همچنین چندین مطالعه دیگر اثرات تولیدمثلی مواجهه طولانی‌مدت با ۴-نونیل فنل (۱۰۰ میکروگرم بر لیتر) را به مدت ۱۰ تا ۱۴ روز، با کاهش رشد اووسیت ها، شاخص گنادوسوماتیک و کاهش توانایی تخمه گشایی نشان داد (Holdway *et al*., 2007). Folmar و همکاران (۲۰۰۲)، گزارش کردندکه نونیل فنل یک ماده شبه استروژنی است که منجر به مرگ ماهیان می‌شود (Folmar *et al*.,2002; Yokota *et al*., 2001; Kang *et al*., 2003; Seki *et al*., 2002). Hano و همکاران (۲۰۰۹)، در تحقیقی بیان کردند که نونیل فنل بر تخمه گشایی، زنده‌مانی و اختلال در شنای فعال مؤثر بوده و همچنین کاهش معنی‌داری در تعداد جنین‌های هچ شده در گروه‌های تحت تیمار نونیل فنل‌دیده شد (Hano *et al*., 2009). Yokota و همکاران (۲۰۰۱)، در تحقیقی بر روی ماهی مداکای ژاپنی (*Oryzias latipes*) نشان دادندکه تیمارهای (۱۸۳ میکروگرم بر لیتر)، ۴-نونیل فنل باعث کاهش در زنده‌مانی جنینی و موفقیت در شنای فعال ماهیان می‌گردد (Yokota *et al*., 2001). نتایج حاصل از مطالعه آسیب‌شناسی بافتی فراساختاری بافت تخمدان (میکروسکوپ الکترونی TEM) در ماهی‌های ماده که در معرض نونیل فنل قرار داشتند، نشان می‌دهد که تخمدان‌ها در این مرحله (III و IV) حاوی تخمک‌های پری نوکلئولارو پری‌وتیلوژنیک (پیش زرده سازی) بوده است. لایه‌های فولیکولی شامل گرانولوزا و تکا در بخش خارجی غشاء اووسیت (ZRE) قرار گرفته و دارای ضخامت قابل‌توجهی به دلیل جذب هر چه بیشتر ویتلوژنین می‌باشد. در غشاء اووسیت کانال‌های منفذدار (PC) در غشاء اووسیت دیده می‌شود که از طریق این کانال‌ها زرده جذب سلول اووسیت می‌شود. به‌طوری‌که در تیمار ۱۰۰ میکروگرم در گرم نونیل فنل، تعداد و اندازه تخمک‌های پری وتیلوژنیک نسبت به سایر تیمارها افزایش یافت (شکل ۲). بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از مطالعات آسیب‌شناسی بافت تخمدان می‌توان چنین نتیجه گرفت که تجمع نونیل فنل در غدد جنسی این ماهیان، سبب افزایش تعداد اووسیت های آترزیا شده، گردیده است، که از مهم‌ترین مشخصه‌های این اووسیت ها که دچار آترزیا شده‌اند، می‌توان به ازهم‌پاشیدگی هسته، تجزیه غشای زرده و همچنین افزایش در تعداد و اندازه سلول‌های لایه فولیکولی اشاره کرد که درنهایت منجر به مرگ سلولی، توقف فرآیند

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

میتوز در سلول‌های فولیکولی، به‌ویژه سلول‌های لایه گرانولوزا می‌گردد. در طی آرتزیای سلولی و مرگ اووسیت ها، تخمدان ماهی هایی‌که در معرض غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر گرم وزن بدن‌نونیل فنل قرار داشته‌اند، در نهایت منجر به کاهش هماوری می‌گردد. Chang و همکاران (۲۰۱۳) در مطالعه اثر نونیل فنل بر روی ماهی گورخری ماده (*Danio rerio*) نشان دادند که تعداد اووسیت های واردشده به مرحله شروع زرده سازی در تیمار نونیل فنل نسبت به گروه کنترل افزایش‌یافته که می‌تواند مربوط به اثر شبه استروژنی نونیل فنل در تولید زرده باشد. همچنین مشخص شد که این ترکیب می‌تواند سبب کاهش نرخ باروری، کاهش تعداد تخم‌ها در هر تخم‌ریزی و نیز کاهش وقوع عمل تخم‌ریزی شود (Chang *et al.*,2013). همچنین قرارگرفته در معرض غلظت‌های پایین شبه استروژن هایی نظیر نونیل فنل، می‌تواند سبب ایجاد اختلال در بلوغ غدد جنسی و همچنین ایجاد آترزیای فولیکولی در دوره طولانی‌مدت در معرض قرارگیری شود (Makynen *et al.*, 2000)، و این درحالی‌که است که غلظت‌های بسیار بالای نونیل سبب تأخیر در رشد گنادها، بلوغ جنسی و نیز افزایش میزان اووسیت هایی که دچار آترزیا شده‌اند می‌گردد (Jobling *et al.*, 2002). لازم به ذکر است که اطلاعات کمی در خصوص اثرات مزمن برخی از ترکیبات مختل‌کننده غدد درون‌ریز، در رابطه با رفتارهای تولیدمثلی و روند بلوغ جنسی در غلظت‌های زیر کشنده گزارش‌شده است (El-Sayed *et al.*, 2012). در تحقیقی که توسط El-Sayed و همکاران (۲۰۱۴) بر روی ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) انجام شد، بچه ماهیان تیلاپیای نیل در معرض دوز (۱۰۰ میکروگرم بر لیتر نونیل فنل) ۴- نونیل فنل قرار گرفتند، که نتایج این بررسی منجر به ایجاد تغییرات معنی‌دار در شاخص‌های گنادوسوماتیک، هماوری مطلق، هماوری نسبی و قطر اووسیت ها و نیز تغییرات هیستولوژیکی در عملکرد و مورفولوژی غدد جنسی بافت تخمدان در طول دوره تولیدمثلی شد. به‌طوری‌که این تغییرات همزمان با کاهش سطوح ۱۷-بتااسترادیول (E2) و ویتلوژنین پلاسما است که درنهایت از رشد غدد جنسی و رسیدگی نهایی تخمک در برخی از گونه‌ها جلوگیری می‌کند (El-Sayed *et al.*, 2014). Giesy و همکاران (۲۰۰۰)، در بررسی بر روی ماهی بالغ قنات سرچربی (*Pimephales promelas*) نشان دادند، که قرارگرفته در معرض ۴-نونیل فنل (۱/۶ تا ۰/۱۶ میکرو گرم بر لیتر) به مدت ۴۲ روز منجر به تولید تخمک‌های کمتری در مقایسه در با گروه کنترل می‌شود و این در حالی بود که غلظت (۳/۴ میکروگرم بر لیتر نونیل فنل) منجر به عدم رسیدگی تخمک‌ها شد (Giesy *et al.*, 2000). در تحقیق دیگری که توسط Lie و همکاران (۲۰۰۹)، انجام شد، پس از مواجهه با غلظت‌های مزمن آلکیل فنل کاهش معنی‌داری در شاخص گنادوسوماتیک در روغن ماهی ماده اقیانوس اطلس مشاهده شد و نیز ثابت شد که ترکیبات شبه استروژنی منجر به بروز پاسخ‌های استرس‌زا و تأخیر در بلوغ جنسی ماهیان می‌شود (Lie *et al.*,2009). همچنین Yadetie و Male (۲۰۰۲)، نشان دادند که قرار گرفتن در معرض دوز پایین آلکیل فنل، موجب بلوغ زودرس در روغن ماهی ماده اقیانوس اطلس می‌شود و این در حالی‌بودکه تأخیر در توسعه غدد جنسی دیده شد (Yadetie and Male, 2002). علاوه بر این کاهش در شاخص‌های گنادوسوماتیک و هماوری مطلق همراه با تغییرات هیستولوژیکی در بافت تخمدان کفشک ماهیان بالغ (*Solea aegyptiaca*) جمع‌آوری‌شده از آب‌های آلوده نزدیک خلیج UK که محل ورود فاضلاب‌های صنعتی و پساب‌های فاضلابی می‌باشد، دیده شد (Simpson *et al.*, 2000). Gautam و همکاران (۲۰۱۱)، نیز در تحقیقی نشان دادند که نونیل فنل موجب توسعه و رشد غدد جنسی و نیز زرده سازی تخمک‌ها در تخمدان گربه‌ماهیان پس از ۱۵، ۳۰ و ۴۵ روز در معرض گیری در دوره تولیدمثلی می‌باشد. آن‌ها پیشنهاد دادند که غلظت پایین نونیل فنل (۶۴ میکروگرم بر لیتر)، موجب بلوغ اووسیت ها و اوولاسیون می‌گردد و این در حالی است که غلظت بالای نونیل فنل (۱۶۰ میکروگرم بر لیتر) موجب تأخیر در بلوغ و رشد غدد جنسی و نیز افزایش تعداد اووسیت های آترزیا شده در دوره در معرض قرارگیری می‌شود. همچنین در مراحل رسیدگی افزایش معنی‌داری در آترتیک شدن اووسیت های مرحله ۱ و ۲ در رفتار وابسته به غلظت دیده می‌شود و این پتانسیل در غلظت‌های پایین (۶۴ میکروگرم بر لیتر) و بالای نونیل فنل(۱۶۰ میکروگرم بر لیتر) وجود دارد. نکته مهم این است که نونیل فنل می‌تواند تولید متفاوتی را در آستروئید زایی غدد جنسی و مسیرهای تنظیمی رشد که ممکن است منجر به ایجاد عدم توازن در بلوغ و رشد غدد جنسی شود، داشته باشد. هنگام بررسی تأثیر آلودگی بر موجودات زنده باید به این نکته توجه داشت که هر واکنش بیوشیمیایی که درنتیجه ورود یک آلاینده به بدن موجودات به وجود آمده باشد، جهت

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

قابل استناد بودن، لازم است تا تغییرات مورفولوژی کی را در سطح سلولی ایجاد نماید (Lauren and Hinten, 1990). تغییرات بافت‌شناسی در اثر انواع محرک‌ها و عوامل استرس‌زا ایجاد می‌شوند، که در اثر آشفتگی در سطح مولکولی سازمان‌دهی شده و در سطح سلولی اثرات آن قابل‌مشاهده است. بنابراین بررسی اثرات بافت‌شناسی می‌تواند یک نشانگر زیستی جامع در مقابل انواع استرسورها باشد که به‌صورت نسبی می‌تواند وضعیت سلامت ماهی را مشخص کند و می‌تواند تجمع بیش‌ازاندازه ماده آلاینده را در محیط‌زیست دریایی مشخص کند (Van der Belt *et al.*, 2003). تحقیق حاضر قابلیت تأثیرپذیری ماهی کپور کوی در مواجهه با عوامل شبه استروژنی را ثابت کرد و نشان داد که مواجهه این ماهی با عوامل شبه استروژنی منجر به بروز تغییرات هیستولوژیکی در بدن ماهی‌ها می‌شود. بنابراین شاخص‌های هیستوپاتولوژیک نیز می‌توانند به‌عنوان بیومارکرهایی در مطالعه اثرات غلظت‌های مزمن نونیل فنل بر ماهیان مورداستفاده قرار گیرند.

سپاس‌گزاری

از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور به دلیل حمایت مالی و نیز کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان زینتی و تمامی کسانی که درانجام مراحل مختلف این تحقیق ما را یاری نمودند، صمیمانه تقدیر و تشکر می‌نماییم.

منابع

Ahel, M., Giger, W. and Schaffner, C., 1994. Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment. II. Occurrence and transformation in rivers. Water Research, 28: 1143-152.

Arukwe, A., Förlin, L. and Goksøyr, A., 1997. Xenobiotic and steroid biotransformation enzymes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) liver treated with an estrogenic compound, 4- nonylphenol. Environmental Toxicology and Chemistry, 16(12), pp.2576-2583.

Berczi, I. and Nagy, E., 1997. Hormones as immune modulating agents. Handbook of Immune Modulating Agents. T. Krezina, Ed, pp.75-120.

Casini, S., Fossi, M.C., Mori, G. and Bjornstad, A., 2002. Vitellogenin induction in *Cyprinus carpio* treated with 17 β-estradiol and 4-nonylphenol. Environmental monitoring and assessment, 75(3), pp.235-239.

Christensen, L., 1998. The effect of 4- nonylphenol on the synthesis of vitellogenin in the flounder (*Platichthys flesus*). Aquat. Toxicol 46.211–219.

Chang, C. H., Chen, M. L., Liao, K. W., Tsai, Y. A., Mao, I. F., Wang, T. H., Hwang, S. M., Chang, Y. J. and Tsai, M. S., 2013. The association between maternal nonylphenol exposure and parity on neonatal birth weight: A cohort study in Taiwan. Chemosphere, 93(6), pp.1145-1152.

Colburn, T., Dumanoski, D. and Myers, J. P., 1997. Our stolen future. Plume Penguin Books. New York. 14: 316-320.

Dutta, H. M. and Maxwell, L. B., 2003. Histological examination of sublethal effects of diazinon on ovary of bluegill, Lepomis macrochirus. *Environmental pollution*, 121(1), pp.95-102.

El-Sayed, A. F. M.., 2014. Structural and functional effects of early exposure to 4-nonylphenol on gonadal development of Nile tilapia (Oreochromis niloticus): a-histological alterations in ovaries, fish. Physiology and biochemistry, 40, 1509-1519.

El-Sayed Ael, D., Mahmoud, U. M., Mekkawy, I. A., 2012. Reproductive biomarkers to identify Endocrine disruption in *(Clarias gariepinus)* exposed to 4-nonylphenol.Ecotoxicol Environ.78:.310-319.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

Fischer, A. H., Jacobson, K. A., Rose, J. and Zeller, R., 2008. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2008*(5), pp. 4980-4986.

Folmar, L. C., Hemmer, M. J., Denslow, N. D., Kroll, K., Chen, J., Cheek, A., Richman, H., Meredith, H. and Grau, E.G., 2002. A comparison of the estrogenic potencies of estradiol, ethynylestradiol, diethylstilbestrol, nonylphenol and methoxychlor in vivo and in vitro. *Aquatic Toxicology*, *60*(1-2), pp.101-110.

Gautam, G. J., Chaube, R. and Joy, K. P., 2011. 4-Nonylphenol Impairs Ovarian Recrudescence and Induces Atresia in the Catfish Heteropneustes fossilis. *Indian Journal of Science and Technology*, *4*(S8), pp.245-246.

Giesy, J. P., Pierens, S. L., Snyder, E. M., Miles-Richardson, S., Kramer, V. J., Snyder, S. A., Nichols, K. M. and Villeneuve, D. A., 2000. Effects of 4-nonylphenol on fecundity and biomarkers of estrogenicity in fathead minnows (Pimephales promelas). *Environmental Toxicology and Chemistry*, *19*(5), pp.1368-1377.

Hano, T., Oshima, Y., Kinoshita, M., Tanaka, M., Wakamatsu, Y., Ozato, K., Nassef, M., Shimasaki, Y. and Honjo, T., 2009. In ovo nanoinjection of nonylphenol affects embryonic development of a transgenic see-through medaka (Oryzias latipes), olvas-GFP/STII-YI strain. *Chemosphere*, *77*(11), pp.1594-1599.

Hinton, D. E. and Lauren, D. J., 1990. Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes: potential biomarkers of exposure. In: McCarthy, J.F., Shugart, L.R. (Eds.), Biomarkers of Environmental Contamination. Lewis Publishers, Florida. 17: 17–57.

Holdway, D. A., Hefferman, J. and Smith, A., 2007. Multigeneration assessment of nonylphenol and endosulfan using a model Australian freshwater fish, Melanotaenia fluviatilis. Environmental toxicology. 23: 253–262

Jobling, S., Sheahan, D., Osborne, J. A., Mathiessen, P. and Sumpter, J. P., 2002. Inhibition testicular growth inr ainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals, Environ Tox,Chem.15: 194–202.

Kang, I. J., Yokota, H., Oshima, Y., Tsuruda, Y., Hano, T., Maeda, M., Imada, N., Tadokoro, H. and Honjo, T., 2003. Effects of 4-nonylphenol on reproduction of Japanese medaka, (*Oryzias latipes*). Environ.Toxicol. Chem. 22: 2438–2445.

Lee, P. C. and Lee, W., 1996. In vivo estrogenic action of nonylphenol in immature female rats.Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 57: 341-348.

Lie, M. H., 2008. Effects of nonylphenol on cholinesterase and carboxylesterase activities in male guppies (*Poecilia reticulata*). Ecotoxicology and Environmental Safety. 71: 781786.

Maguire, R. J., 1999. Review of the persistence of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in aquatic environments. Water Quality Research Journal of Canada. 34: 37-78.

Makynen, E. A., Kahl, M. D., Jensen, K. M., Tietge, J. E., Wells, K. L., Van Der Kraak, G. and Ankley, G. T., 2000. Effects of the mammalian antiandrogen vinclozolin on development and reproduction of the fathead minnow (Pimephales promelas). *Aquatic Toxicology*, *48*(4), pp.461-475.

Mitchelmore, C. L. and Rice, C. P., 2006. Correlations of nonylphenol-ethoxylates and nonylphenol with biomarkers of reproductive function in carp (Cyprinus carpio) from the Cuyahoga River. *Science of the total environment*, *371*(1-3), pp.391-401.

Mortazavi, S., Bakhtiari, A. R., Sari, A. E., Bahramifar, N. and Rahbarizade, F., 2012. Phenolic endocrine disrupting chemicals (EDCs) in Anzali Wetland, Iran: elevated concentrations of 4-nonylphenol, octhylphenol and bisphenol A. *Marine pollution bulletin*, *64*(5), pp.1067-1073.

Morrison, G. H., Holton, M., Valaskovic, G. A., 1995. Near Field Scanning Optical Microscopy and Spectroscopy of Electronic Materials and Structures. 406: 183-189.

Seki, M., Yokota, H., Matsubara, H., Tsuruda, Y., Maeda, M., Tadokoro, H. and Kobayashi, K., 2002. Effect of ethinylestradiol on the reproduction and induction of vitellogenin and testis-ova in medaka (Oryzias latipes). *Environmental Toxicology and Chemistry*, *21*(8), pp.1692-1698.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

Simpson, M. G., Parry, M., Kleinkauf, A., Swarbreck, D., Walker, P. and Leah, R. T., 2000. Pathology of the liver, kidney and gonad of flounder (Platichthys flesus) from a UK estuary impacted by endocrine disrupting chemicals. *Marine environmental research*, *50*(1-5), pp.283-287.

Snyder, S. A., Keith, T. L., Pierens, S. L., Snyder, E.M. and Giesy, J. P., 2001. Bioconcentration of nonylphenol in fathead minnows (Pimephales promelas). *Chemosphere*, *44*(8), pp.1697-1702.

Soares, A., Guieysse, B., Jefferson, B., Cartmell, E. and Lester, J.N., 2008. Nonylphenol in the environment: a critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment international*, *34*(7), pp.1033-1049.

Van den Belt, K., Verheyen, R. and Witters, H., 2003. Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens. *Ecotoxicology and environmental safety*, *56*(2), pp.271-281.

Yadetie, F., Arukwe, A., Goksøyr, A. and Male, R., 1999. Induction of hepatic estrogen receptor in juvenile Atlantic salmon in vivo by the environmental estrogen, 4-nonylphenol. *Science of the total environment*, *233*(1-3), pp.201-210.

Yadetie, F. and Male, R., 2002. Effects of 4-nonylphenol on gene expression of pituitary hormones in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquatic Toxicology*, *58*(1-2), pp.113-129.

Yokota, H., Seki, M., Maeda, M., Oshima, Y., Tadokoro, H., Honjo, T. and Kobayashi, K., 2001. Life-cycle toxicity of 4-nonylphenol to medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, *20*(11), pp. 2552-2560.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]