بررسی تاثیر تخریبی سم دیازینون بر ساختار بیضه ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*) با استفاده از تکنیک کشت بافت (در شرایط *In Vitro*)

فاطمه فداکارماسوله*[1]، باقر مجازی‌امیری[2]، علیرضا میرواقفی[3] و محمدعلی نعمت‌الهی[4]

[1] دانش آموخته کارشناسی ارشد شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران

[2] استاد دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران

[3] دانشیار دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران

[4] استادیار دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۱۲/۲۰، تاریخ تصویب: ۱۳۹۰/۳/۱۰)

چکیده

ماهی سفید دریای خزر یکی از ماهیان اقتصادی حوزه‌ی جنوبی دریای خزر است که همه ساله جهت تخمریزی به رودخانه‌های حوزه جنوبی این دریا وارد می‌شود و در این حین با انواع آلاینده‌های صنعتی و کشاورزی روبرو می‌شود. در این مطالعه جهت بررسی چگونگی روند تولید اسپرم (اسپرماتوژنز) مولدین نر ماهی سفید در آب‌های آلوده، اقدام به کشت بافت بیضه‌این ماهیان تحت تماس با غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از سم دیازینون به مدت ۳ و ۶ روز در شرایط *In Vitro* گردید. میزان ضایعات وارده بر بافت بیضه و کاهش روند اسپرماتوژنز با افزایش غلظت و افزایش زمان تماس سم با بافت بیشتر شده به طوری که در غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در ششمین روز پس از کشت تعداد بسیار زیادی از سلول‌های جنسی نکروز یافته و روند اسپرماتوژنز در بافت متوقف گردید. از آنجایی که تولید مثل موفق ماهیان در گرو کیفیت و کمیت مناسب گامت‌های مولدین است، ادامه‌ی روند آلودگی در طی سال‌های متمادی جمعیت این ماهیان را با تهدید جدی مواجه خواهد ساخت.

واژه‌های کلیدی: ماهی سفید، دیازینون، دریای خزر، بیضه، کشت بافت

* نویسنده مسئول: تلفن: ۰۹۱۱-۱۳۹۷۲۰۷ فاکس: ۰۲۶۱-۲۲۲۴۰۲۴ E-mail: sh.fadakar@gmail.com

مقدمه

دیازینون یکی از سموم ارگانو فسفره‌ای است که در فعالیت های کشاورزی و خانگی برای کنترل حشرات مورد استفاده می گیرد. این سم به علت توزیع گسترده در محیط آبی، قادر به اثرگذاری وسیع در جانداران غیر هدف از قبیل بی مهرگان، پستانداران، پرندگان و ماهی‌ها می‌باشد(Castano, 1986;). تماس ماهی‌ها با دوزهای تحت کشنده‌ی دیازینون، موجب کم خونی (Anees, 1978)، کاهش DNA، RNA و میزان پروتئین کبد (Ansari and Kumar, 1988) تاثیر بر سیستم عصبی، ایجاد ناهنجاری در آبشش، افزایش میزان ماکروفاژ و تاثیر بر رفتارهای تولید مثلی است (Dutta *et al*., 2003).

غلظت دیازینون در رود خانه‌های استان مازندران (حوزه آمل) ۱/۱۴ میکروگرم در میلی‌لیتر اندازه‌گیری شده است که البته با گذشت زمان و تغییر شرایط فیزیکو شیمیایی آب کاهش می‌یابد.

ماهیان مولد سفید دریای خزر اواخر زمستان مهاجرت خود را جهت تخمریزی به رودخانه‌ها آغاز کرده و پس از گذراندن مدتی به بلوغ جنسی کامل رسیده و قابلیت تخمریزی خواهند یافت. از آنجایی که ورودی اکثر آلاینده‌های اکوسیستم خزر رودخانه بوده و با توجه به اثرات نامطلوب دیازینون بر فرآیند تولید مثلی جانوران بالاخص ماهیان، توجه به فیزیولوژی تولید مثلی این ماهیان مهم اقتصادی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

امروزه در مطالعات آسیب شناسی، جهت اجتناب از تماس مستقیم ماهیان با آلاینده‌ها از تکنیک کشت بافت، بعنوان ابزار ی کار آمد در ارزیابی تاثیر آلاینده‌ها بر بافت‌های مختلف استفاده می‌شود (Magwood and George, 1996; Castano *et al*., 2003) و در این ارتباط بافت گناد ماهی قطع و تحت شرایط آزمایشگاهی (*In vitro*) انکوبه می‌شود (Miura *et al*., 1991; Yazawa *et al*., 2002; Song and Gutzeit, 2003).

تا کنون مطالعات متعددی در زمینه آسیب پذیری بافت تولید مثلی جانوران صورت گرفته است و به طور کلی کاهش راندمان تولید مثلی را گزارش کرده‌اند. در این مطالعه نیز سعی شد به بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیکی بیضه ماهی سفید تحت تاثیر غلظت‌های مختلف از سم دیازینون پرداخته شود.

مواد و روش‌ها

دو ماهی سفید نری که در مرحله ۴ رسیدگی جنسی قرار داشتند در بدو ورود شان به رودخانه شیرود در زمستان ۸۷ صید شد و پس از انتقال به آزمایشگاه شیلات دانشگاه تهران و سپری شدن استرس حمل و نقل به مدت ۱ هفته جهت کشت بافت با پودر گل میخک ۱ به ۵۰۰۰ بیهوش شدند.

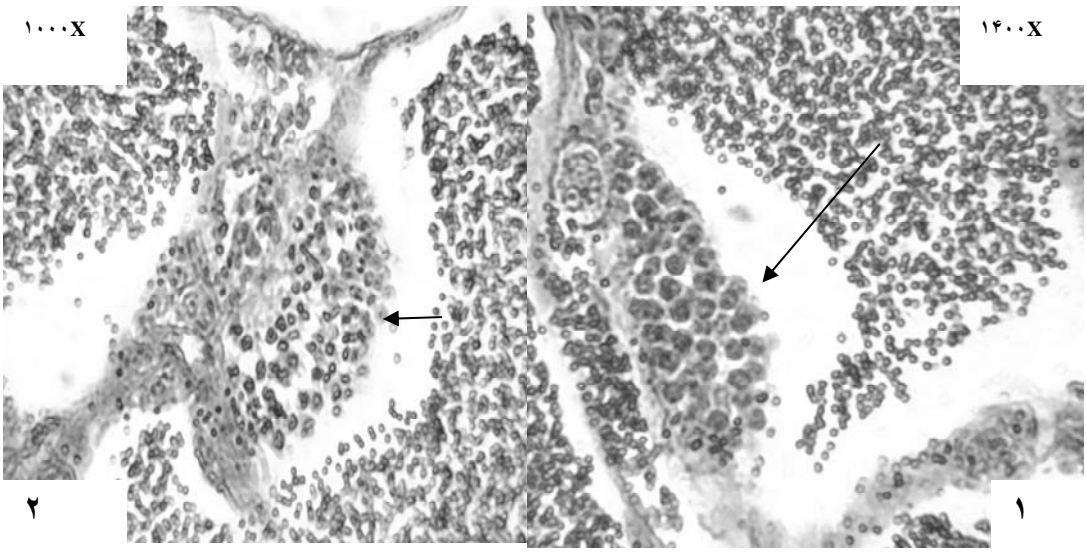
به منظور کشت بافت در شرایط *in vitro*، بیضه ماهی به قطعات ۶ الی ۲۰ میلی گرمی برش داده شد و داخل ظرف های ۲۴ چاهکه مخصوص کشت بافت (NUNCE, Denmark) که هر کدام از چاهک ها حاوی ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت L_15 (Gibco, USA) و بافر HEPES (Merck, Germany) با غلظت ۱۰ میلی مولار (pH:7.5) و آنتی بیوتیک‌های پنی سیلین $۱۰۰۰۰ UL^{-1}$ و استرپتومایسین ۱۰۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (Gibco, USA) بود منتقل شدند (Yamauchi *et al*., 2007; Mojazi Amiri *et al.,* 1999).

سم دیازینون نیز با غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه و پس از فیلتر کردن با فیلتر سر سرنگی ۰/۲ میکرون (Wattman) به چاهکهای ظروف کشت اضافه شد. گروه‌های کنترل در این آزمایش، بافت‌های بیضه کشت داده شده در L-15 بدون هیچ گونه تماس با آلاینده‌ها بود. نمونه‌ها در انکوباتور مرطوب °C ۱۲ به مدت ۶ روز انکوبه شدند.

به منظور مقایسه تغییرات بافت شناسی و بررسی اثرات مدت زمان تماس با آلاینده‌های مورد نظر در قطعات بیضه، هر کدام از تیمارهای مورد نظر به دو دسته تقسیم شد و دسته اول پس از گذشت ۳ روز، دسته دوم پس از ۶ روز، جهت مطالعات بافت شناسی با میکروسکوپ نوری در محلول بوئن فیکس شدند. پس از انجام مراحل تهیه اسلایدهای بافت‌شناسی، لام‌های تهیه شده با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی و با استفاده از میکروسکوپ نوری به بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیک پرداخته شد.

نتایج

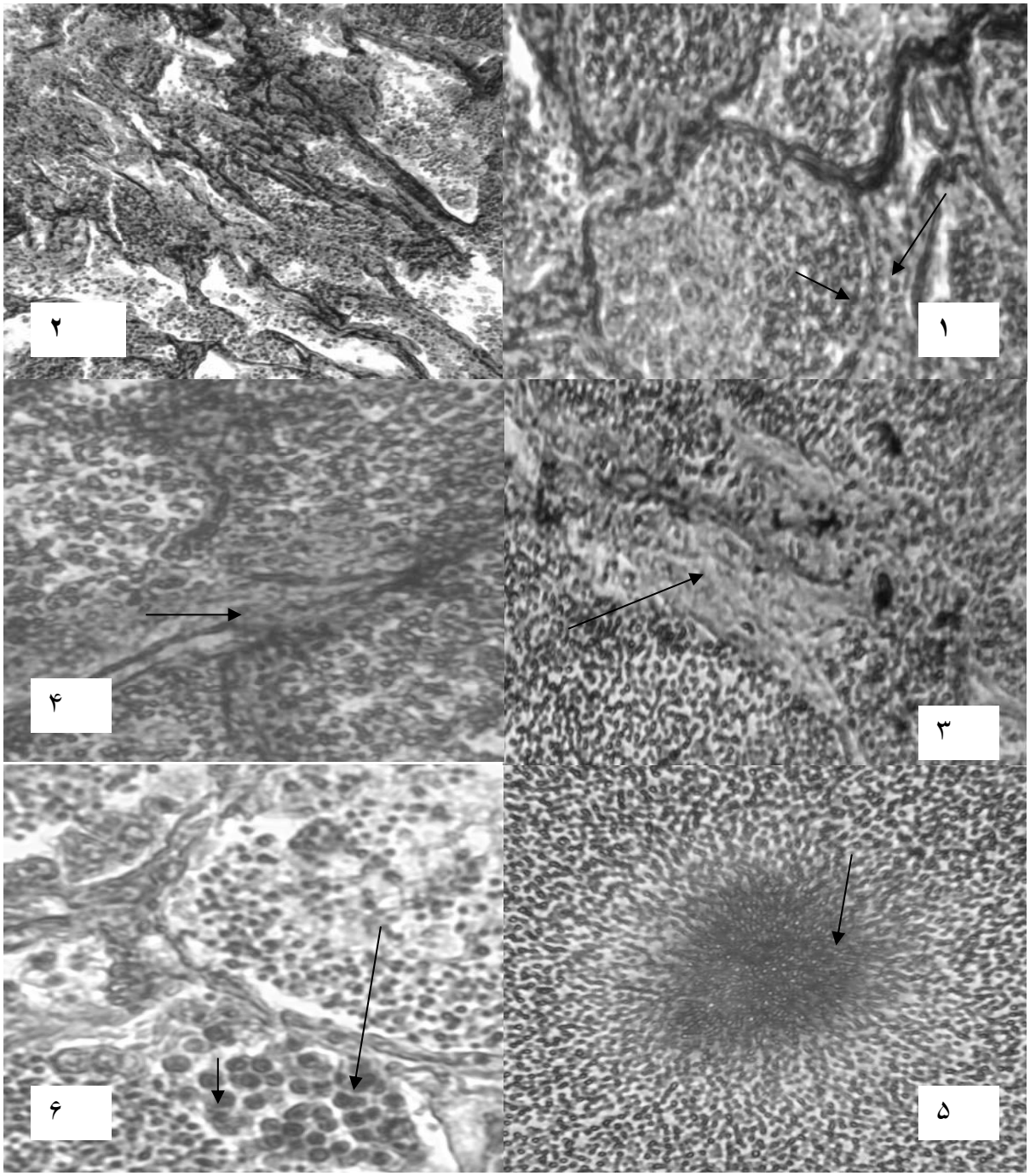
با بررسی بافت‌های کشت داده شده تحت تاثیر سطوح مختلف از سم دیازینون توقف نسبی اسپرماتوژنز با افزایش غلظت سم مشاهده شد. بطوری که با افزایش سطح آلاینده تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی ثانویه که تقسیم نشده‌اند نسبت به گروه شاهد (شکل ۱) بیشتر شد. در تیمارهای شاهد نیز ادامه روند اسپرماتوژنز و تقسیم سلولی کاملا مشهود بود. تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در تیمارهای ۲۰۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به ترتیب بیشتر از تیمار ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در لیتر بود که حاکی از عدم انتقال تقسیم سلولی به مراحل بعدی طی فرآیند اسپرماتوژنز می‌باشد.



شکل۱- ادامه روند اسپرماتوژنز و تقسیم سلول‌های اسپرماتوگونی در تیمارهای شاهد، (۱) روز سوم؛ (۲) روز ششم، پیکان بزرگ: سلول‌های اسپرماتوسیت؛ پیکان کوچک: سلول‌های اسپرماتید

به جهت کاهش تعداد اسپرماتوگونی‌های ثانویه در بافت‌های کشت داده شده در تیمار ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، تعداد اسپرماتوسیت‌های مشاهده شده در این تیمار نسبت به تیمارهای ۱۰۰و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به جهت افزایش تعداد تقسیم سلول‌های اسپرماتوگونی بیشتر می‌باشد.

تخریب و اضمحلال سلولی در اسپرماتوگونی‌های اولیه، از هم گسیختگی و ساختارهای لوبولی نا منظم و حرکت دیواره لوبولی و نکروز در اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتیدها نیز با افزایش غلظت آلاینده مشهود است (شکل ۲).



شکل۲- کاهش قطر دیواره لوبولی تحت تاثیر۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (بزرگنمایی۸۰۰ X) (۱) و از بین رفتن شکل لوبول ها تحت تاثیر۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر دیازینون (بزگنمایی۴۰۰ X) (۲) طی روز سوم پس از کشت؛. اضمحلال سلولی (۳) و از هم گسیختگی دیواره لوبولی (۴) تحت تاثیر۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر دیازینون در روز سوم؛ جمع شدن اسپرماتوزوئیدها (۵) و اسپرماتوسیت‌ها، اسپرماتیدها و اسپرماتوزوآهای نکروزیافته (۶) تحت تیمار۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر دیازینون در روز هشتم (سیاه شدن هسته سلول‌ها نشانه نکروز سلول می‌باشد؛ بزرگنمایی ۱۰۰۰ X).

بحث و نتیجه‌گیری

دیازینون قادر به تجمع در بافت ماهیچه، کبد، گناد و آبشش می‌باشد (Sapozhnikova *et al*., 2004) و از این طریق بر هوموستازی، تولید مثل، رشد و یا رفتار ماهیان تاثیر گذار است (Abadin *et al*., 2009).

بررسی های انجام شده روی بیضه ماهی سفید نر تحت اثر غلظت‌های مختلف از دیازینون نشان دهنده بروز آسیب های هیستوپاتولوژیکی است که با افزایش غلظت آلاینده در بافت مشهود تر بوده است. به طوری که با افزایش غلظت این سم بر ضایعات وارده بر ساختمان لوبول ها افزوده شده و در نهایت به مرگ سلول‌های جنسی و توقف فرآیند اسپرماتوژنز انجامیده است (شکل ۲- ۵ و ۲-۶)

افزایش مدت زمان تماس بافت بیضه با آلاینده نیز تغییرات ساختاری و آسیب های سلولی وارد بر بافت بیضه را تشدید کرده است.

کلاسترهای سالم و بی نقص حاوی اسپرماتوسیت‌ها در گروه شاهد نسبت به سایر تیمارها به مراتب بیشتر بوده که نشانه‌ی ادامه روند مطلوب تقسیم سلولی در مقایسه با سطوح دیگر است (شکل ۱) به طوری که با افزایش غلظت آلاینده تاثیر آن بر جلوگیری از تبدیل اسپرماتوگونی‌ها به اسپرماتوسیت و اسپرماتیدها بیشتر شده است (شکل ۲).

پژوهش‌های متعددی مبنی بر میزان تاثیر گذاری سم دیازینون بر وضعیت تولید مثلی ماهیان گزارش شده است و همگی تاثیرات سوء این سم را در پیشرفت فرآیند تولید مثلی تاکید کرده‌اند. کاهش قطر لومن، کاهش قطر لوله‌های اسپرم بر و کاهش قطر اسپرماتوگونی‌ها تحت تماس مستقیم ماهی *Lepomis macrochirus* با ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر سم دیازینون گزارش شده است (Dutta *et al*., 2003).

تاثیرات مخرب دیازینون بر ماهی سالمون، تخریب ژنتیکی، تغییر رفتار های تولید مثلی و کاهش تولید مایع اسپرمی در غلظت‌هایی حدود ۳۰۰ هزار قسمت در تریلیون گزارش شده است (Cox, 2000).

بروز ناهنجاری‌های ساختاری، از بین رفتن مجاری اسپرم بر و بافت بینابینی، تخریب سلول‌های لایدیگ و آتروفی سلول‌های بافت بیضه از مهمترین تغییرات ساختاری ثبت شده در ماهیان کپور (*Cyprinus carpio*) در معرض سم دیازینون است (Banai *et al*., 2009).

نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر نیز بر تغییرات مخرب بر بافت بیضه ماهی سفید تحت اثر سم دیازینون تاکید دارد.

اضمحلال سلولی و از بین رفتن شکل طبیعی سلول‌های جنسی به طوری که قابلیت شناسایی آن‌ها را مشکل می‌سازد از جمله ضایعات مشهود در بافت‌های آلوده شده است که با افزایش غلظت دیازینون بروز آن‌ها به مراتب بیشتر می‌شود. از طرفی بروز نکروز در هسته سلول‌های جنسی خصوصا در اسپرماتوسیت‌ها نیز از جمله ضایعات شایع در بافت‌های آلوده به دیازینون می‌باشد.

علاوه بر تماس مستقیم سموم بر بافت تولید مثلی، دیازینون و سایر ترکیبات ارگانو فسفره قادر به‌ایجاد آسیب در مکانیزم‌های فیزیولوژیکی تولید مثل (Arcand-Hoy and Benson, 1998) از طریق اختلال در محور HPG [1] و تولید هورمون‌های گنادوتروپینی نیز می‌باشد به طوری که بر رشد و توسعه‌ی گنادها از طریق اثر بر روند سنتز، ذخیره‌سازی، رهاسازی، انتقال، متابولیسم، فعالیت و یا حذف هورمون‌های داخلی دخالت دارند (Kavloock *et al*., 1996; Maxwell and Dutta, 2005).

از آن جایی که سلول‌های جنسی اجزاء اساسی در فرآیند اسپرماتوژنز می باشند، کاهش تعداد و کیفیت آنها در تولید اسپرماتوزوآهای سالم و بی نقص تاثیر گذار خواهد بود. کاهش تولید اسپرم سالم و فعال در قابلیت باروری مولدین نر نیز تاثیر بسزایی خواهد داشت. مسلما

1- Hypothalamic- Pituitary-gonad

بروز چنین تغییراتی در بافت بیضه از کیفیت و باز ماندگی محصولات جنسی خواهد کاست و در مجموع قابلیت های باروری ماهیان نر کاهش خواهد یافت.

از آن جایی که ماهیان مولد ماده نیز از تاثیرات نامطلوب آلاینده‌ها در طی فرآیند رشد و نمو خود مستثنی نخواهند بود (Dutta and Maxwell, 2003)، کاهش همزمان کیفیت و کمیت گامت‌های تولیدی توسط مولدین نر و ماده می تواند بر میزان تولید مثل و بقای بچه ماهیان آثار منفی بر جا گذاشته و ادامه‌ی این روند بر نسل آینده ماهیان سفید دریای خزر نیز تاثیر گذار خواهد بود.

بنابر این تاثیرات عمده مستقیم و یا غیر مستقیم آلاینده‌های محیط‌های آبی بر بیضه ماهیان، به کاهش و یا توقف رشد و توسعه اسپرماتوزوئیدها خواهد انجامید. از اینرو تلاش برای جلوگیری از ایجاد آلودگی بیشتر در محیط آبی و مدیریت سازمان یافته در استفاده مناسب از سموم ارگانوفسفره در مزارع کشاورزی جهت کاهش حجم آلاینده‌های ورودی به اکوسیستم رودخانه‌ها و نهایتا دریای خزر امری ضروری در بازسازی و حفظ ذخایر این ماهیان ارزشمند خواهد بود.

References

- Abadin, H., Todd, D., Wohlers, D., Hard, C, M., 2009. Priority data needs for Diazinon. Syracuse Research Corporation. 75 p.
- Anees, M.A., 1978. Hepatic pathology in a freshwater teleost *Channa punctatus* (Bloch) exposed to sublethal and chronic levels of three organophosphorous insecticides. Bulletin Environmental Contamination and Toxicology. 19, 524–527.
- Ansari, B.A., Kumar, K., 1988. Diazinon toxicity on protein and nucleic acid metabolism in the liver of Zebra fish, *Brachydanio rerio* (Cyprinidae). Scientific Total Environment. 76**,** 63–68.
- Arcand-Hoy, L, D., Benson, W, H., 1998. Fish reproduction: an ecologically relevant indicator of endocrine disruption. Environ Sci Technol, 17:49 – 57.
- Banai, M., Mirvaghefi, A.R., Ashouri, R., 2009. Effect of sublethal concentration of diazinon on histopathological changes of male carp (*Cyprnius carpio)* testis. Lagoons conference in Azad university of Ahvaz. 127 p.
- Castano, A., Bols, N.C., Braunbeck, T., Dierick, P., Halder, M., Isomaa, B., Kawahara, K., Lee, L. E. J., Mothersill, C., Pärt, P., Repetto, G., Sintes, J.R., Rufli, H., Smith, R., Eisler, R., 1986. Diazinon hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. U.S. Fish and Wildlife Service, U.S., 85,1–38.
- Cox, J., 2000. Diazinon use threatens Salmon survival, http://www.pesticide.org.
- Dutta, H.M., Maxwell, L., 2003. Histological examination of sublethal effects of Diazinon on ovary of Bluegill, *Lepomis macrochirus*. Environmental Pollution. 121, 95–102.
- Kavlock, R, J., Daston, G, P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L. E., Kaattari, S., 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the USEPA-sponsored workshop. Environ Health Perspect, 104:715 –40.
- Magwood, S., George, S., 1996. In vitro alternatives to whole animal testing, comparative cytotoxicity studies of divalent metals in established cell lines derive from tropical and temperate water fish species in a neutral red assay. Marine Environmental Research. 42, 37-40.
- Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H., Nagahama, Y., 1991. Hormonal induction of all stages of spermatogenesis *in vitro* in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). National Academic Science. USA 88, 5774–5778.
- Mojazi Amiri, B., Maebayashi, M., Adachi, S., Moberg, G.P., Doroshov, S.I., Yamauchi, K., 1999. *In vitro* steroidogenesis by testicular fragments and ovarian follicles in a hybrid sturgeon (Bester). Fish Physiology and Biochemistry. 21, 1-14.

- Sapozhnikova, Y., Bawardi, O., Schlenk, D., 2004. Pesticides and PCBs in sediments and fish from the Salton Sea, California, USA. Chemosphere. 55, 797–809.
- Song, M., Gutzeit, H.O., 2003. Primary culture of medaka (*Oryzias latipes*) testis: a test system for the analysis of cell proliferation and differentiation. Cell Tissue Research. 313,107–115.
- Yamauchi, S., Miura, C., Ito, A., Agusa, T, Iwata, H., Tanabe, S., Tuyen, B, C., Miura, T., 2007. Effect of lead, molybdenum, rubidium, arsenic and organ chlorines on spermatogenesis in fish: Monitoring at Mekong Delta area and in vitro experiment, Aquatic Toxicology, 83: 43-51.
- Yazawa, T., Yamamoto, T., Jin Y., Abe, S. Follicle-stimulating hormone is indispensable for the last spermatogonial mitosis preceding meiosis initiation in newts (*Cynops pyrrhogaster*). Biological Reproduction, 66, 14–20.

A Study on Toxic Effects of Diazinon on the Caspian Kutum (*Rutilus Frisii* Kutum) Testis Using *in Vitro* Tissue Culture

F. Fadakar Masouleh[*1], B. Mojazi Amiri[2], A. Mirvaghefi[3] and M. A. Nematollahi[4]
[1] MSc, Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, I.R. IRan
[2] Prof. Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, I.R. IRan
[3] Associate Prof. Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, I.R. IRan
[4] Assistant Prof. Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, I.R. IRan
(Received: 10 March 2010, Accepted: 31 May 2011)

Abstract
Caspian kutum is one of the most commercial fishes that migrates for spawning from the Caspian Sea to the rivers each year. Consequently, it can be exposed to several agricultural and industrial pollutants. In this study, to estimate the fish spermatogenesis in polluted waters, the direct effect of diazinon were investigated using *in vitro* testis culture of the Caspian kutum with 10, 100 and 200 µg/ ml concentrations for 3 and 6 days. With increase of diazinon concentrations and exposed time, harmful effects of diazinon on spermatogenesis and testis structure increased. The inhibition of spermatogenesis and necrotic germ cells were more visible in 200 µg/ ml in 6th day. Since, appropriate quality and quantity of gametes can verify the successful reproduction in fish, water pollution over consecutive years can be a serious threat on kutum populations.

Keywords: Caspian kutum, Diazinon, Caspian Sea, Testis, Tissue culture

*Corresponding author: Tel: +98 9111397207 ,Fax: +98 2612224024 , E-mail: sh.fadakar@gmail.com