



تأثیر کلرید کادمیوم بر رسیدگی جنس ماده ماهی گورخری (*Danio rerio*) با استفاده از نشانگر زیستی ویتلوژنین و آسیب شناسی بافت تخمدان

نسرین حسن زاده*

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

| نوع مقاله: | چکیده |
|--|--|
| پژوهشی | هدف این مطالعه بررسی تغییر در شاخص گنادی (GSI)، تغییرات تولید ویتلوژنین و هیستوپاتولوژی در تخمدان ماهی گورخری به عنوان گونه‌ای الگو، در غلظت‌های غیرکشنده ۰/۰۰۲، ۰/۰۲، ۰/۲، ۲ و ۲۰ میکروگرم بر لیتر کلرید کادمیوم در مواجهه ۲۱ روزه است. نتایج نشان داد که مواجهه با کلرید کادمیوم در هیچ یک از تیمارها منجر به بروز تأثیر معنی‌دار در زنده‌مانی و بقاء ماهی‌ها نشد. اما فاکتور شاخص گنادی و غلظت ویتلوژنین در کل بدن هموژن شده ماهی در همه تیمارها با افزایش غلظت کلرید کادمیوم کاهش معنی‌داری یافت. تغییرات هیستوپاتولوژی تخمدان شامل افزایش فولیکول‌های آترتیک، کاهش اووسیت‌های ویتلوژنیک، خون‌ریزی، پرخونی، چین خوردگی غشای برخی از اووسیت‌ها، هایپرتروفی سلول‌های گرانولوزا، رها شدن مایع پروتئینی در فضای بینابینی تخمدان و کاهش تشکیل گرانول‌های زرده در اووسیت‌های ویتلوژنیک بود که این تغییرات می‌تواند نشان دهنده اختلال در تولید مثل ماهی ماده باشد. در این مطالعه افزایش فولیکول آترتیک و کاهش بیومارکر پروتئینی ویتلوژنین پلاسما منجر به بروز تأثیرات منفی در باروری ماهی شده و مواجهه مزمن با غلظت‌های غیرکشنده کلرید کادمیوم منجر به بروز تأثیرات آنتی استروژنیک و تأثیرات غیرقابل برگشت در تولید مثل ماهی ماده شد. |
| تاریخچه مقاله: دریافت: ۹۶/۰۲/۱۶ اصلاح: ۹۶/۰۴/۰۳ پذیرش: ۹۶/۰۶/۱۳ | |
| کلمات کلیدی: کلرید کادمیوم تخمدان ماهی گورخری ویتلوژنین | |

مقدمه

امروزه آلودگی اکوسیستم‌های آبی به عنوان آخرین پذیرنده آلاینده‌ها در کره زمین و محل تجمع و ذخیره این مواد از اهمیت خاصی برخوردار است، به طوری که بررسی تأثیرات آلاینده‌ها بر آبریان در ابعاد مختلف در رشته بوم‌شناسی آبی^۱ مورد بررسی قرار می‌گیرد. به همین دلیل امروزه مطالعات سم‌شناسی اکوسیستم‌های آبی در اولویت می‌باشد (Echols *et al.*, 2014). از جمله اثرات قابل توجه آلاینده‌ها، که در مطالعات بوم‌شناسی^۲ بیشتر مورد توجه قرار گرفته است، ایجاد اختلال در غدد درون ریز موجودات زنده، از جمله انسان است که در دو دهه گذشته با مطالعه ترکیبات مختل کننده غدد درون ریز^۳ (EDCs) و تأثیرات آن، نگرانی‌هایی در مورد ناهنجاری‌های تولید مثلی^۴ به وجود آورده است (Hutchinson *et al.*, 2000; Tokumoto *et al.*, 2005).

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

¹ Aquatic Ecotoxicology

² Ecotoxicology

³ Endocrine Disruption Compounds

⁴ Reproductive Anomalies

ترکیبات مختل‌کننده غدد درون‌ریز، مواد شیمیایی هستند که منجر به بروز اختلال در سیستم هورمونی بدن مهره‌داران می‌شوند (Bars *et al.*, 2011; Migliarini *et al.*, 2011). اختلال در ظرفیت تولیدمثل و کاهش تولید گامت‌های جنسی زنده از جمله مهمترین تاثیرات آلاینده‌های (EDCs) است. کاهش ظرفیت تولیدمثل جانداران آبی یکی از مهمترین اثرات زیان‌بار مواد آلاینده‌ای است که توسط انسان به محیط زیست وارد می‌شود (Martino-Andrade and Chahoud, 2010).

کادمیوم به عنوان یک فلز سنگین، از جمله آلاینده‌های غیرآلی است که با دارا بودن خاصیت اختلال در سیستم درون‌ریز بدن موجودات زنده منجر به بروز عوارض تولیدمثل زیادی نیز می‌گردد. به دلیل رهاسازی کادمیوم از منابع متنوع و فراوان، پراکنش این آلاینده در محیط‌های آبی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Kumar and Singh, 2010; Karlsson-Norrgren and Runn, 1985; Radhakrishnan and Hemalatha, 2010). نیمه عمر طولانی این عنصر، عدم دفع از بدن موجودات زنده و حضور بلند مدت آن در بدن، منجر به بروز صدمات بیولوژیکی فراوانی می‌گردد. از جمله صدمات ناشی از کادمیوم می‌توان به بروز صدمات کبدی، کلیوی، تنفسی، سرطان‌زایی و صدمات تولید مثل اشاره نمود. تا کنون مطالعات مختلفی در مورد مکانیسم تاثیر سمیت تولیدمثل کادمیوم بر آبزیان صورت گرفته است. مطالعات مختلف نشان داده اند که کادمیوم از طریق افزایش گونه فعال اکسیژن^۱ (ROS)، پراکسیداسیون چربی^۲ (LPO)، تغییر در سیستم آنتی‌اکسیدانی، تخریب DNA^۳، مرگ برنامه ریزی شده سلولی^۴ و تغییر در بیان ژنوم اندام‌های تولیدمثل قادر است منجر به بروز عوارض تولید مثل گردد (Haux *et al.*, 1988; Canapa *et al.*, 2007; Bertin and Averbeck, 2006). تولیدمثل آبزیان خصوصاً جنس نر و تغییرات پاتولوژیک بیضه از فراوانی نسبی بیشتری برخوردار بوده است (Bertin and Averbeck, 2006; Eidem *et al.*, 2006; Foote, 1999). امروزه در رشته سم‌شناسی از جمله گونه‌های مدل کاربردی در مطالعات سم‌شناسی تولیدمثل می‌توان به ماهی گورخری (*Danio rerio*) اشاره نمود. ماهی گورخری یک مدل اکولوژیک جذاب و کارآمد برای غربالگری آلاینده‌ها و مکانیسم تاثیر آنها است. ماهی گورخری 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 مناسب برای مطالعات سم‌شناسی مهره‌داران و بوم‌شناسی جهت تعیین تاثیر مواد شیمیایی در بقاء، رشد و تولید مثل است (Baumann *et al.*, 2014; van der Oost *et al.*, 2003). همچنین این ماهی به دلیل حساسیت بالا به مواد زئواستروژن^۵ در مراحل اولیه زندگی و تولید مثل بالا می‌تواند به عنوان یک مدل ارگانسمی ایده‌آل برای ارزیابی خطرات محیط زیستی ناشی از ترکیبات مختل‌کننده غدد درون‌ریز در گونه‌های آبی برای تعیین فعالیت شیمیایی، تعیین آستانه اثر و مطالعه مکانیسم عمل این ترکیبات مورد استفاده قرار گیرد. (Selderslaghs *et al.*, 2010; Brannen *et al.*, 2009). امروزه در سم‌شناسی، بررسی تاثیر سمیت تولیدمثل آلاینده‌های مختل‌کننده غدد درون‌ریز با ابزارهای مختلفی انجام می‌شود.

استفاده از نشانگر زیستی ویتلوژنین^۶ (Vtg) کاربرد زیادی در ارزیابی سریع آلودگی ترکیبات مختل‌کننده غدد درون‌ریز در اکوسیستم‌های آبی دارد. ویتلوژنین، پیش‌ماده سنتز زرده تخم است که در کبد موجود ماده در شرایط کنترلی حضور استروژن سنتز می‌شود و از طریق جریان خون وارد تخمدان می‌شود. استفاده از این بیومارکر، روشی سریع و قابل اطمینان است چرا که مقدار ویتلوژنین تولید شده رفتاری وابسته به دوز آلاینده‌های (EDCs) را بروز خواهد داد. به همین دلیل کمیت اندازه‌گیری شده ویتلوژنین، بیومارکر مناسبی برای تعیین مقدار و غلظت آلاینده‌های استروژنیک و آنتی‌استروژنیک خواهد بود (Holbech *et al.*, 2001; Nilsen *et al.*, 2004). در مطالعات سم‌شناسی، ارزیابی هیستولوژی گناد (مورفولوژی گناد و توسعه گامت‌ها) و شاخص بدنی گنادها برای تعیین تاثیرات غیر قابل برگشت آلاینده‌های مختل‌کننده هورمونی بسیار ارزشمند است. بافت‌شناسی^۷ گناد، ابزاری ارزشمند و کارآمد برای بررسی تاثیرات آلاینده‌های مختل‌کننده غدد درون‌ریز در ماهی گورخری

³ Reactive oxygen species

² Lipid Peroxidation

³ DNA damage

⁴ Apoptosis

⁵ Xenoestrogen

⁶ Vitellogenine

⁷ Histology

است. آلاینده‌ها با ایجاد تغییرات ملکولی جزئی و ایجاد اختلال هورمونی با تاثیر بر سطوح مختلف سلول، بافت، اندام، مرفولوژی و ... می‌توانند تاثیرات مخربی را سبب شوند. وقوع تاثیرات هیستوپاتولوژیک به خصوص در گنادها می‌تواند در پیش‌بینی و توان تولیدمثل موجودات تحت مطالعه در شرایط آزمایشگاهی کمک زیادی نماید (Hutchinson et al., 2006). لذا هدف این تحقیق بررسی تاثیر سمیت کلرید کادمیوم به عنوان یک آلاینده مهم بر ماهی مدل گورخری در شرایط مواجهه مزمن است. استفاده و تفسیر تغییرات هیستوپاتولوژیک در تخمدان ماهی مدل همراه با سنجش پروتئین ویتلوژنین می‌تواند بیومارکر مناسبی جهت تاثیر کلرید کادمیوم بر تولید مثل جنس ماده باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه و نگهداری ماهی گورخری

در این تحقیق حدود ۴۰۰ قطعه ماهی ماده گورخری تقریباً 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 به طور مداوم هوادهی شد و با تعبیه 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 27 ± 0.5 درجه سانتیگراد، سختی آب ۱۸۱ میلی‌گرم بر لیتر، $7/3 \pm 0.25$ pH، اکسیژن محلول < 9 میلی‌گرم بر لیتر، آمونیاک > 0.07 ، نیتريت $1-25$ میلی‌گرم بر لیتر و نیترات $11-2$ 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 فضولات کف آکواریوم به روش سیفون از آکواریوم حذف شد.

شرایط مواجهه مزمن

۵ غلظت غیرکشنده نمک کلرید کادمیوم شامل 0.02 ، 0.02 ، 0.2 ، 2 و 20 میلی‌گرم بر لیتر بر اساس مطالعات قبلی تعیین غلظت کشندگی کادمیوم انتخاب (Chouchene et al., 2011) و برای هر غلظت دو تکرار در نظر گرفته شد. سپس ۲۵ عدد ماهی در هر یک از تکرارها در آکواریوم‌های ۱۰ لیتری قرار داده شد و به مدت ۳ هفته در مواجهه مزمن با کلرید کادمیوم قرار گرفتند. به منظور تهیه غلظت‌های مختلف، استاندارد کلرید کادمیوم (CAS No: 10108-64-2) تهیه شده از شرکت Sigma-Aldrich با کمک حلال اتانول در غلظت‌های مختلف تهیه شد. روش مواجهه در این تحقیق به روش نیمه استاتیک^۱ انجام شد. به طوری که یک روز در میان حدود ۸۰٪ از آب هر آکواریوم تخلیه و با آب‌گیری دوباره از تانک ذخیره، غلظت مورد نظر از کادمیوم به آکواریوم‌ها اضافه شد. تیمارهای کنترل مثبت با دو غلظت 0.1 و 10 نانوگرم بر لیتر 17 - بتا استرادیول (E_2)، کنترل منفی یا حلال با غلظت اتانول 1 ٪ و کنترل غذا نیز بر اساس روش استاندارد سازمان همکاری توسعه اقتصادی در نظر گرفته شد (Guideline et al., 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 بی‌هوشی، 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 و ثبت وزن آن، با استفاده از فرمول ذیل، شاخص گنادی محاسبه شد (Bhatia et al., 2013).

$$\text{شاخص گنادی} = \left[\frac{\text{وزن کل بدن (گرم)}}{\text{وزن تخمدان (گرم)}} \right] \times 100.$$

¹ Semi-static

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 آبیگری انجام شد. بعد از آبیگری، قالب‌گیری با پارافین Merck انجام شده و توسط میکروتوم برش‌های ۴ میکرومتری از بلوک‌ها تهیه شد و به روش هماتوکسیلین-آئوزین رنگ‌آمیزی انجام شد (Khodabandeh and Abtahi, 2006). بعد از رنگ‌آمیزی، لام‌ها توسط چسب هیستولوژی مونتاز شده و با میکروسکوپ نوری مطالعه و عکس‌برداری شدند.

بررسی نشانگر زیستی ویتلوژنین

به دلیل اندازه کوچک ماهی و حجم کم پلاسمای این ماهی، سنجش ویتلوژنین بر طبق روش (Brion *et al.*, 2002) در کل بدن همگن شده^۱ (WBH) انجام شد. در این روش پس از جدا کردن ماهی‌ها از تیمارهای مختلف و بی‌هوش کردن آن‌ها، با قرار دادن ماهی‌ها در تانک ازت مایع، انجماد سریع انجام شد و نمونه‌ها تا زمان آنالیز در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. برای آماده‌سازی نمونه‌ها در هر تیمار، ۳ عدد ماهی وزن شده و دو برابر وزن ماهی، حلال (۲PBS، ۳BSA، ۱٪ و ۴PMSF میلی مولار) اضافه شد و با همگن‌کننده^۵ به طور کامل همگن شد. برای جلوگیری از تجزیه پروتئین، کل این مراحل در ظرف محتوی یخ انجام شد. سپس این ترکیب در سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰g، به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ و محلول بالایی جمع‌آوری و در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. سنجش ویتلوژنین با استفاده از دستگاه الیزا (ELISA)^۶ مدل elx800 و با کمک کیت اختصاصی ویتلوژنین تهیه شده از شرکت Cusabio انجام شد. این کیت حاوی استانداردهای ویتلوژنین با غلظت ۲۰۰-۱۲۵ نانوگرم بر لیتر است. روش کار مطابق با دستورالعمل استفاده از کیت اختصاصی سنجش ویتلوژنین انجام شد (جدول ۱).

جدول ۱. دستورالعمل استفاده از کیت اختصاصی سنجش ویتلوژنین در ماهی گورخری

| مراحل | دستورالعمل تعیین مقدار ویتلوژنین با کیت الیزا |
|-------|--|
| ۱ | آماده کردن معرف و نمونه‌ها طبق دستورالعمل |
| ۲ | تعیین حفره شاهد بدون هر نوع محلول |
| ۳ | اضافه کردن ۵۰ μl محلول استاندارد یا نمونه به هر حفره |
| ۴ | اضافه کردن ۵۰ μl Conjugate به هر حفره (به جز حفره شاهد) |
| ۵ | قرار دادن در انکوباتور به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد |
| ۶ | شستشوی حفره‌ها با محلول شستشو (۳ مرتبه) |
| ۷ | اضافه کردن ۵۰ μl HPR -Avidin به هر حفره (به جز حفره شاهد) |
| ۸ | قرار دادن در انکوباتور به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد |
| ۹ | شستشوی حفره‌ها با محلول شستشو (۳ مرتبه) |
| ۱۰ | اضافه کردن ۵۰ μl سوبسترا A و ۵۰ μl سوبسترا B به هر حفره |
| ۱۱ | قرار دادن در انکوباتور به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد (محافظت از نور) |
| ۱۲ | اضافه کردن ۵۰ μl Stop solution به هر حفره |
| ۱۳ | قرائت با الیزا در طول موج ۴۵۰ نانومتر کمتر از ۱۰ دقیقه |

¹ Whole Body Homogenization

² Phosphate Buffer Saline

³ Bovine Serum Albumin

⁴ Phenylmethylsulfonyl Fluorid

⁵ Homogenizer

⁶ Enzyme-linked immunosorbent assay

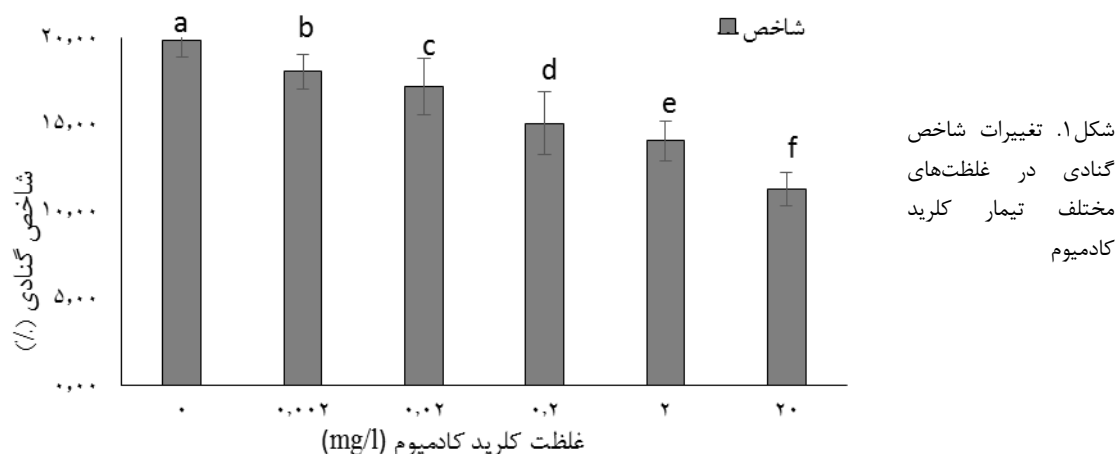
نتایج

میانگین کلی وزن، طول و درصد شاخص گنادی در ماهی ماده گورخری در تیمارهای مختلف در جدول ۲ ارائه شده است. حروف متفاوت لاتین نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف است ($p \leq 0.05$).

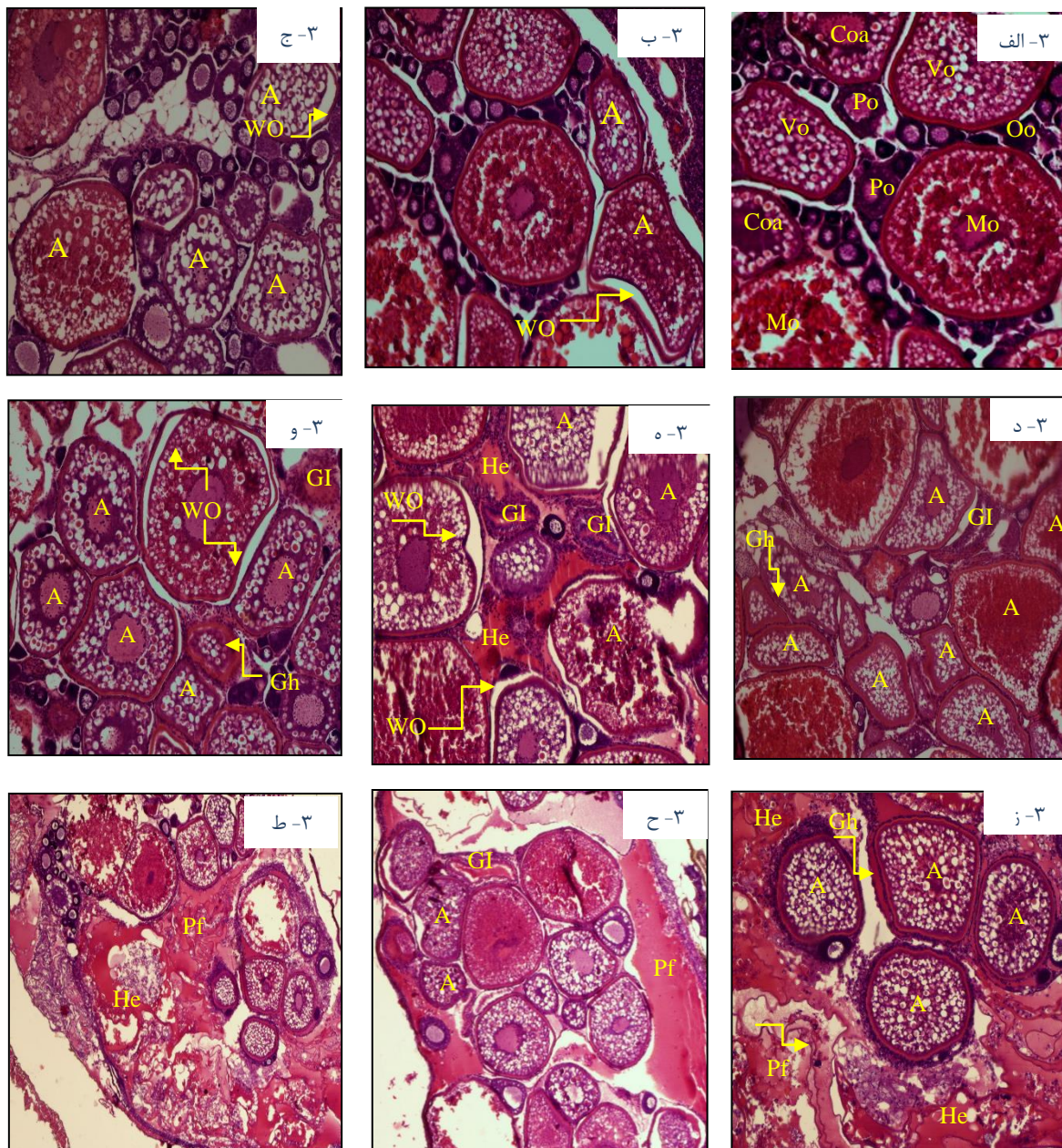
جدول ۲. میانگین کلی وزن، طول و شاخص گنادی ماهی گورخری در تیمارهای مختلف

| تیمار | کنترل | کنترل حلال | کنترل (+) استرادیول | کلرید کادمیوم |
|--------------|------------------|------------------|---------------------|------------------|
| وزن بدن (g) | $46/01 \pm 0/01$ | $45/58 \pm 0/02$ | $45/01 \pm 0/02$ | $43/44 \pm 0/04$ |
| طول بدن (mm) | $36/24 \pm 1/28$ | $36/33 \pm 4/62$ | $36/52 \pm 3/81$ | $36/20 \pm 6/14$ |
| GSI (%) | $19/84 \pm 0/83$ | $19/06 \pm 2/01$ | $16/83 \pm 2/51$ | $15/13 \pm 0/97$ |

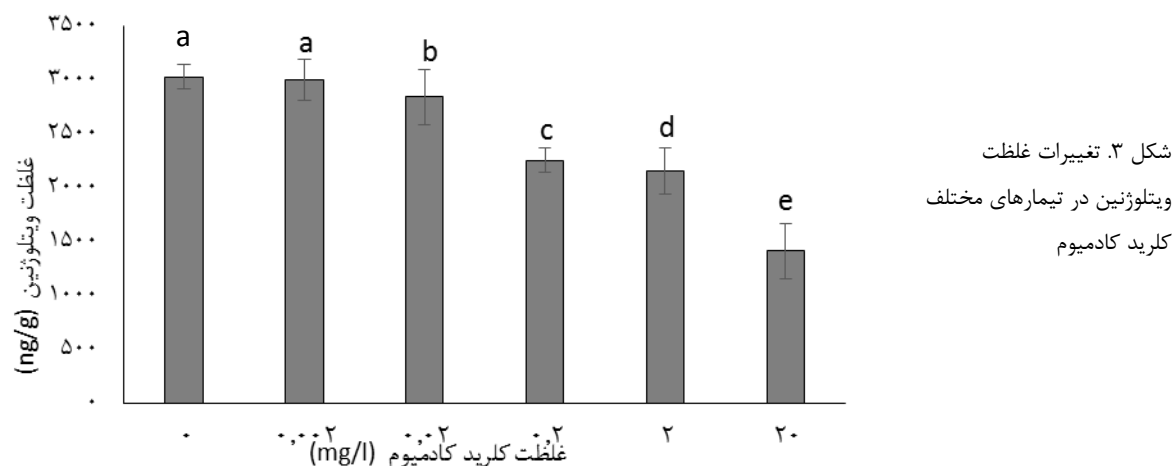
جدول ۲ میانگین وزن و طول بدن و شاخص گنادی ماهی ماده گورخری در ۵ تیمار کنترل غذا، کنترل حلال اتانول، کنترل استرادیول و تیمار کلرید کادمیوم در ۵ غلظت را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که وزن بدن ماهی گورخری ماده در تیمارهای مختلف کاهش معنی‌داری یافته است. بررسی شاخص گنادی تحت تاثیر تیمارهای مختلف نشان داد که شاخص گنادی کاهش معنی‌داری یافته است و بیشترین شاخص گنادی در تیمار کنترل دیده شد. مقایسه کلی شاخص گنادی تخمدان در ۵ تیمار و نمونه کنترل در شکل ۱ ارائه شده است. شکل ۱ نشان می‌دهد که شاخص گنادی تخمدان در تیمار کلرید کادمیوم با افزایش غلظت کاهش معنی‌داری یافته است، به طوری که در غلظت ۲۰ mg/l به کمترین مقدار خود نسبت به نمونه کنترل رسیده است.



تاثیر تیمار کلرید کادمیوم بر وقوع عوارض هیستوپاتولوژی تخمدان ماهی گورخری در شکل ۲ نشان داده شده است. تغییرات غلظت پروتئین ویتلوژنین در تیمارهای مختلف کلرید کادمیوم در ماهی ماده گورخری نسبت به نمونه کنترل در شکل ۳ ارائه شده است. همان‌گونه که شکل نشان می‌دهد مواجهه با غلظت‌های کمی از کادمیوم منجر به بروز تفاوت معنی‌دار آماری در غلظت ویتلوژنین نمی‌شود و این در حالی است که غلظت‌های بالاتر کلرید کادمیوم منجر به کاهش معنی‌دار پروتئین ویتلوژنین در ماهی می‌شود.



شکل ۲. عوارض هیستوپاتولوژی تخمدان ماهی گورخری در مواجهه با کلرید کادمیوم در تیمارهای مختلف در زمان ۲۱ روز. (H&E, 40X). الف: تیمار کنترل، ب: غلظت ۰/۰۲ mg/l، ج: غلظت ۰/۰۲ mg/l، د: غلظت ۰/۲ mg/l، ه: غلظت ۲ mg/l، ز-ح-ط: در نمونه کنترل: اووگونیم (Oo)، اووسیت اولیه (Po)، اووسیت کورتیکال (Coa)، اووسیت ویتلوژنیک (Vo)، اووسیت بالغ (Mo). عوارض در تیمارها شامل: فولیکول آترتیک (A)، هموراژ و پرخونی (He)، التهاب گرانولوما (GI)، هایپرتروفی سلول‌های گرانولوزا (Gh)، چین خوردگی غشای اووسیت (WO)، رها شدن ترکیبات پروتئینی در بافت تخمدان (Pf).



جدول ۳. خلاصه ای از عوارض هیستوپاتولوژیک مشاهده شده در بافت تخمدان ماهی گورخری در مواجهه با غلظت‌های مختلفی از کلرید کادمیوم. عدم وجود عارضه (-)، عارضه کم (+)، عارضه متوسط (++)، عارضه زیاد (+++).

| تیمار کلرید کادمیوم (میلی گرم بر لیتر) | | | | | کنترل | نوع عارضه |
|--|-----|-----|------|-------|-------|--------------------------------------|
| ۲۰ | ۲ | ۰/۲ | ۰/۰۲ | ۰/۰۰۲ | | |
| +++ | +++ | ++ | + | + | - | وجود آترزیای تخمدانی |
| +++ | +++ | ++ | + | - | - | کاهش اووسیت ویتلوژنیک |
| +++ | ++ | ++ | ++ | + | - | چین خوردگی غشای اووپلاسم |
| +++ | + | + | - | - | - | هموراژ و پرخونی |
| +++ | ++ | + | - | - | - | وجود مایع پروتئینی بین بافتی |
| + | + | + | + | - | - | کاهش گرانول زرده در اووسیت ویتلوژنیک |
| +++ | ++ | - | - | - | - | خونریزی بین بافتی |

از جمله بیشترین عارضه تخمدانی مشاهده شده تحت تاثیر تیمار کادمیوم وجود فولیکول‌های آترتیک و پدیده آترزیای تخمدانی^۱ است که در غلظت‌های مختلف ایجاد شده است. خونریزی شدید بافت تخمدان و متلاشی شدن فولیکول‌های تخمدانی در بالاترین غلظت از تیمار کادمیوم نیز دیده شد. سایر عوارض شامل ایجاد التهاب گرانولوما^۲، چین خوردگی غشای اووپلاسم^۳، هموراژ^۴ و پرخونی^۵ تخمدان، وجود مایع پروتئینی^۶ بین بافتی در تخمدان و هایپرتروفی سلول‌های گرانولوزا^۷ در غلظت‌های مختلف دیده شد. جدول ۳ خلاصه ای از عوارض بافتی تخمدان ماهی گورخری در مواجهه با غلظت‌های مختلف کلرید کادمیوم را نشان می‌دهد.

بحث

با بررسی دقیق نتایج این مطالعه، مواجهه ماهی گورخری با غلظت‌های غیر کشنده نمک کلرید کادمیوم کاهش شاخص گنادی تخمدان، کاهش پروتئین ویتلوژنین و افزایش فولیکول‌های آترتیک مشاهده شد. مطالعات نشان می‌دهد که کادمیوم به عنوان

¹ Ovary Atresia

² Granuloma Inflammation (GI)

³ Wrinkled Ooplasm (WO)

⁴ Hemorrhage (He)

⁵ Hyperemia

⁶ Proteinase Fluid (Pf)

⁷ Granulosa cell Hypertrophy (Gh)

یک آلاینده آنتی استروژنیک با تاثیر بر فرآیند اووژنز و بلوغ تخمدان از طریق ایجاد صدمات بافتی به سلول‌های اندوتلیال تخمدانی منجر به کاهش وزن تخمدان می‌گردد (Thompson and Bannigan, 2008). بازداری رشد تخمدان به دلیل فعالیت ضد استروژنی این آلاینده در نهایت منجر به کاهش وزن تخمدان در آبزیان می‌شود. تا کنون مطالعات بررسی تاثیر کادمیوم بر تخمدان در موجودات مختلف اعم از خرچنگ (Rodríguez *et al.*, 2000)، جوندگان (Rehm and Institute-fcrf, 1988)، ماهی (Karlsson-Norrgren and Runn, 1985) و سایر آبزیان (Revathi *et al.*, 2011; Pierron *et al.*, 2008) نیز کاهش شاخص‌گذاری را نشان داده است. سایر مطالعات، ایجاد سندروم متابولیک به علت تخریب متابولیسم چربی و گلیکوژن در مواجهه با آلاینده‌های مختل‌کننده غدد درون‌ریز از جمله کادمیوم که منجر به تغییر وزن بدن موجودات زنده می‌گردد را نیز نشان داده‌اند، که این موضوع تاثیر زیادی در کاهش شاخص‌گذاری خواهد داشت (Migliarini *et al.*, 2011).

در موجودات ماده ویتلوژنین (Vtg) پیش ماده سنتز پروتئین زرده تخمک با نام ویتلین است که انرژی لازم برای ذخایر غذایی دوران جنینی را فراهم می‌کند. ویتلوژنین یک گلیکوفسفوپروتئین با لیگاندهای فراوان عناصر روی و کلسیم است که در کبد سنتز شده و از طریق جریان خون وارد تخمدان می‌شود. مواجهه با کادمیوم در ماهیان استخوانی منجر به تجمع این آلاینده در کبد و کلیه این ماهیان می‌شود. ماهیان استخوانی در مواجهه با کادمیوم استراتژی‌های مختلفی برای متابولیسم کردن آن در کبد اعمال می‌کنند که هر یک از این مکانیسم‌ها می‌تواند به صورت بالقوه بر تولید ویتلوژنین در کبد دخالت داشته و رشد تخمدان را مختل نماید (Povlsen *et al.*, 1990). به طور کلی در مهره‌داران تولید ویتلوژنین تحت کنترل مسیر گیرنده‌های استروژن است و هر عامل موثر بر این گیرنده‌ها بر میزان سنتز ویتلوژنین موثر است (Matozzo *et al.*, 2008). کادمیوم به عنوان یک آلاینده مختل‌کننده غدد درون‌ریز از راه‌های مختلفی تولید و سنتز ویتلوژنین را مختل می‌کند. کادمیوم با تاثیر بر غده هیپوفیز و ایجاد اختلال در ترشح گنادوتروپین‌ها از غده هیپوفیز، در سنتز و رهاسازی هورمون استروژن به عنوان یک عامل مهم در تولید ویتلوژنین اختلال ایجاد می‌کند (Murphy *et al.*, 2005). این آلاینده با ایجاد اختلال در محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد (HPG)^۱ به طور همزمان منجر به بروز اختلال در گیرنده‌های استروژن و بازداری آنزیم‌های مسئول در تولید استروژن، تاثیر بر ترشح گنادوتروپین‌ها و در ادامه تاثیر بر تولید و رهاسازی ویتلوژنین می‌گردد (Tilton *et al.*, 2003). مطالعات مختلف نشان می‌دهد که کادمیوم از طریق ایجاد اختلال در فعالیت آنزیم آروماتاز از طریق تغییر در بیان ژن آنزیم P-450 سنتز هورمون استروژن در سلول‌های گرانولوزای تخمدان در موجودات ماده را کاهش می‌دهد که این کاهش استروئیدوژنز همزمان با اختلال در گیرنده‌های استروژن منجر به کاهش سنتز ویتلوژنین نیز می‌گردد (Das and Mukherjee, 2013). کاهش سنتز ویتلوژنین در جنس ماده منجر به کاهش مقدار گرانول‌های زرده و کاهش اووسیت‌های ویتلوژنیک در تخمدان می‌شود که این موضوع خود عدم بلوغ به هنگام فولیکول‌ها را در پی خواهد داشت که این امر در نهایت منجر به بروز اختلالات تولید مثلی در جنس ماده نیز می‌گردد. همچنین کاهش مقدار استروژن در بافت تخمدان منجر به بروز تغییراتی در پارانشیم تخمدان از جمله پرخونی و هموراژ می‌گردد که این عارضه در سایر مطالعات بافت‌شناسی تخمدان و بیضه مورد مواجهه با کادمیوم نیز اثبات شده است و در این مطالعه نیز چنین عوارض بافتی در تخمدان دیده شد (Thompson and Bannigan, 2008; Rehm and Institute-fcrf, 1988).

همچنین در برخی از مطالعات مشخص شده است که مواجهه با کادمیوم منجر به افزایش مقدار متالوتیونین متصل شده با عنصر روی در کبد نیز می‌شود. افزایش تولید متالوتیونین در کبد پس از مواجهه با کادمیوم و مصرف بیشتر عنصر روی منجر به کاهش محتوای روی در کبد و اختلال در سنتز پروتئین ویتلوژنین می‌شود. ویتلوژنین یک پروتئین سنتز شده در کبد جانداران است که لیگاندهای فراوانی برای اتصال با عنصر روی و کلسیم نیز دارد. کاهش مقدار عنصر روی در کبد نیز یکی از عواملی است که منجر به کاهش سنتز ویتلوژنین می‌گردد (Povlsen *et al.*, 1990; Chouchene *et al.*, 2011).

فعالیت آنتی استروژنی کادمیوم به طور همزمان با تاثیر بر سنتز استروژن از راه‌های مختلف و در ادامه کاهش سنتز ویتلوژنین در نهایت منجر به بروز عوارض بافت‌شناسی بر تخمدان می‌شود. در این مطالعه وقوع آترزیا در تخمدان از جمله مهمترین عوارض بافتی مشاهده شده بود. آترزیا یک فرآیند تخریب‌کننده و بازجذب فولیکولی و در واقع به نوعی مرگ برنامه‌ریزی

¹ Hypothalamus-Pituitary-Gonadal

شده سلول‌های تخمدانی است. این پدیده از جمله رخدادهای نرمال فیزیولوژیک است که اغلب در اووسیت‌های ویتلوژنیک و در شرایط طبیعی به تعداد کم در تخمدان رخ می‌دهد. افزایش آترتیک به ویژه در مراحل پایانی تکامل اووسیت نشان دهنده یک حادثه پاتولوژیک به دلیل مواجهه با برخی از آلاینده‌های تخریب کننده هورمون‌های درون ریز است. امروزه در مطالعات سم شناسی نوین، وجود فولیکول‌های آترتیک بی‌شمار در واقع بیومارکر مواجهه با آلاینده‌های مختل کننده غدد درون‌ریز است. در این مطالعه افزایش فولیکول‌های آترتیک به ویژه در غلظت‌های بالاتر کادمیوم در تخمدان به دلیل کاهش سنتز استروژن و کاهش مقدار ویتلوژنین ایجاد شده است. کاهش سنتز ویتلوژنین در کبد و به دنبال آن کاهش مقدار آن در تخمدان، مانع از رشد کامل و بلوغ طبیعی اووسیت‌های ویتلوژنیک و تبدیل آنها به اووسیت بالغ می‌گردد که این امر افزایش آترزیای عمومی در بافت تخمدان را در پی خواهد داشت (Thompson and Bannigan, 2008; Kumar and Singh, 2010). در این مطالعه تخریب کامل بافت تخمدان در بالاترین غلظت مواجهه با کادمیوم به دلیل کمبود پروتئین ویتلوژنین به عنوان عامل اصلی در حفظ ساختار و کارکرد تخمدان مشاهده شد. همچنین کاهش گرانول‌های زرده در اووسیت‌های تخمدانی نیز منجر به بروز آترزیای تخمدان می‌شود (Pierron *et al.*, 2008). مکانیسم ملکولی مسئول در القای سمیت تولید مثلی کادمیوم هنوز ناشناخته است اما کادمیوم با تغییر در سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در تخمدان منجر به کاهش گلوکوتائین و سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و تغییر در ساختار غشای سلولی از طریق پراکسیداسیون چربی (LPO) می‌شود. کاهش ضخامت دیواره اووسیت، وقوع نکروز در فولیکول‌ها و ایجاد چین خوردگی در غشای برخی از اووسیت‌های تخمدانی اغلب به دلیل تاثیرات پراکسیداسیون چربی در غشای دیواره‌ها رخ می‌دهد (Yang *et al.*, 2012). در این تحقیق نیز عوارض فوق در بافت تخمدان مشاهده شد. کادمیوم با القای استرس اکسیداتیو و تغییر در سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی بدن موجود زنده منجر به بروز تغییرات در ساختار غشای سلول‌ها از طریق پراکسیداسیون چربی می‌گردد، که در بافت تخمدان این عوارض و تاثیرات به صورت چین خوردگی در غشای نرمال¹ فولیکول‌های ویتلوژنیک دیده می‌شود.

در این مطالعه مواجهه ماهی ماده با کادمیوم به طور هم‌زمان منجر به کاهش درصد شاخص گنادی، کاهش پروتئین ویتلوژنین به عنوان یک عامل مهم در روند بلوغ اووسیت‌های تخمدانی و بروز عوارض بافتی فراوان از جمله آترزیای تخمدانی شد. افزایش تعداد فولیکول‌های آترتیک در تخمدان کاهش موفقیت تولید مثلی جنس ماده را در پی خواهد داشت. مجموعه تاثیرات تولید مثلی مشاهده شده در این مطالعه به دلیل سمیت آنتی‌استروژنی کادمیوم در جنس ماده است.

بر مبنای نتایج به دست آمده می‌توان گفت حتی مواجهه با غلظت‌های غیر کشنده کادمیوم منجر به بروز عوارض غیر قابل بازگشتی در تخمدان ماهی می‌شود که در نهایت مشکلات تولید مثلی را ایجاد خواهد کرد.

به طور کلی، کادمیوم عنصری است که در بدن هیچ نوع نقش فیزیولوژیک ندارد اما با ورود به بدن و تجمع در بافت‌های مختلف از جمله کبد و کلیه منجر به بروز پدیده تجمع پذیری زیستی، القای استرس اکسیداتیو و سمیت تولید مثلی می‌شود. مواجهات مزمن در بازه زمانی طولانی مدت با کادمیوم، عوارض گسترده‌تری را نیز در پی خواهد داشت. امروزه به دلیل تولید، مصرف و انتشار فراوان عنصر کادمیوم در کره زمین و ورود آن به اکوسیستم‌های آبی، طیف گسترده‌ای از آریزان در مواجهه مستقیم با این آلاینده قرار دارند که این موضوع می‌تواند صدمات جبران ناپذیری را از نظر تولید مثلی بر پیکره محیط‌های آبی وارد نماید. امروزه کادمیوم به عنوان یک آلاینده مهم با القای سمیت تولید مثلی در محیط‌های آبی پایداری، دوام و بقا موجودات زنده را به خطر انداخته است. لذا کنترل ورود این آلاینده به محیط‌های آبی از جمله اولویت‌های مهم در مدیریت این آلاینده می‌باشد.

منابع

- Bars, R., Broeckart, F., Fegert, I., Gross, M., Hallmark, N., Kedwards, T., Lewis, D., O'Hagan, S., Panter, G.H., Weltje, L., Weyers, A. 2011. Science based guidance for the assessment of endocrine disrupting properties of chemicals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 59(1): 37-46.

¹ Membrane folding

- Baumann, L., Knörr, S., Keiter, S., Nagel, T., Rehberger, K., Volz, S., Oberrauch, S., Schiller, V., Fenske, M., Holbech, H., Segner, H. 2014. Persistence of endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*) after discontinued exposure to the androgen 17 β -trenbolone. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 33(11): 2488-96.
- Bertin, G., Averbeck, D. 2006. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie*. 88:1549-1559.
- 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.
- 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.
- Brion, F., Nilsen, B.M., Eidem, J.K., Goksøyr, A., Porcher, J.M. 2002. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21(8): 1699-708.
- Canapa, A., Barucca, M., Gorbi, S., Benedetti, M., Zucchi, S., Biscotti, M.A., Olmo, E., Nigro, M., Regoli, F. 2007. Vitellogenin gene expression in males of the Antarctic fish *Trematomus bernacchii* from Terra Nova Bay (Ross Sea): A role for environmental cadmium. *Chemosphere*. 66: 1270-1277.
- Chouchene, L., Banni, M., Kerkeni, A., Saïd, K., Messaoudi, I. 2011. Cadmium-induced ovarian pathophysiology is mediated by change in gene expression pattern of zinc transporters in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemico-Biological Interactions*. 193(2):172-179.
- Das, S., Mukherjee, D. 2013. Effect of cadmium chloride on secretion of 17 β -estradiol by the ovarian follicles of common carp, *Cyprinus carpio*. *General and Comparative Endocrinology*. 181: 107-114.
- Echols, B.S., Smith, A.J., Gardinali, P.R., Rand, G.M. 2014. Acute aquatic toxicity studies of Gulf of Mexico water samples collected following the Deepwater Horizon incident. *Chemosphere*. 120: 131-137.
- Eidem, J.K., Kleivdal, H., Kroll, K., Denslow, N., van Aerle, R., Tyler, C., Panter, G., Hutchinson, T., Goksøyr, A. 2006. Development and validation of a direct homologous quantitative sandwich ELISA for fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin. *Aquatic Toxicology*. 78(2): 202-206.
- Foote, R.H. 1999. Cadmium affects testes and semen of rabbits exposed before and after puberty. *Reproductive Toxicology*. 13: 269-277.
- Guideline, P.B.T. 2010. OECD guideline for the testing of chemicals. The Hershberger. 601 p.
- Haux, C., Björnsson, B.T., Förlin, L., Larsson, Å., Deftos, L.J. 1988. Influence of cadmium exposure on plasma calcium, vitellogenin and calcitonin in vitellogenic rainbow trout. *Marine Environmental Research*. 24: 199-202.
- Holbech, H., Andersen, L., Petersen, G.I., Korsgaard, B., Pedersen, K.L., Bjerregaard, P. 2001. Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & Pharmacology*. 130(1): 119-131.
- Hutchinson, T.H., Ankley, G.T., Segner, H. and Tyler, C.R. 2006. Monograph Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as “ signposts ,” not “ traffic lights ,” in risk assessment. *Environmental Health Perspectives*. 106: 106-114.
- Hutchinson, T.H., Brown, R., Brugger, K.E., Campbell, P.M., Holt, M., Länge, R., McCahon, P., Tattersfield, L.J., van Egmond, R. 2000. Research ecological risk assessment of endocrine disruptors review. *Environmental Health Perspectives*. 108(11): 1007-1014.
- Karlsson-Norrgren, L., Runn, P. 1985. Cadmium dynamics in fish: pulse studies with 109Cd in female zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Journal of Fish Biology*. 27: 571-581.
- 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.
- Kumar, P. & Singh, A., 2010. Cadmium toxicity in fish: An overview. *GERF Bulletin of Biosciences*, 1: 41-47.
- Martino-Andrade, A.J., Chahoud, I. 2010. Reproductive toxicity of phthalate esters. *Molecular*

- Nutrition & Food Research. 54: 148-157.
- Matozzo, V., Gagné, F., Marin, M.G., Ricciardi, F., Blaise, C. 2008. Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: A review. *Environment International*. 34: 531-545.
- 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.
- Murphy, C.A., Rose, K.A., Thomas, P. 2005. Modeling vitellogenesis in female fish exposed to environmental stressors: Predicting the effects of endocrine disturbance due to exposure to a PCB mixture and cadmium. *Reproductive Toxicology*. 19: 395-409.
- Nilsen, B.M., Berg, K., Eidem, J.K., Kristiansen, S.I., Brion, F., Porcher, J.M., Goksøyr, A. 2004. Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 378(3): 621-33.
- van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology*. 13(2): 57-149.
- Pierron, F., Baudrimont, M., Dufour, S., Elie, P., Bossy, A., Baloche, S., Mesmer-Dudons, N., Gonzalez, P., Bourdineaud, J.P., Massabuau, J.C. 2008. How cadmium could compromise the completion of the European eel's reproductive migration. *Environmental Science and Technology*. 42: 4607-4612.
- Povlsen, A.F., Korsgaard, B., Bjerregaard, P. 1990. The effect of cadmium on vitellogenin metabolism in estradiol-induced flounder (*Platichthys flesus* (L.)) males and females. *Aquatic Toxicology*. 17: 253-262.
- Radhakrishnan, M.V., Hemalatha, S. 2010. Sublethal toxic effects of cadmium chloride to liver of Freshwater Fish *Channa striatus* (Bloch.). *Zoologica*. 2(1): 54-56.
- Rehm, S., Waalkes, M.P. 1988. Cadmium-induced ovarian toxicity in hamsters, mice, and rats. *Fundamental and Applied Toxicology*. 10(4): 635-647.
- Revathi, P., Arockia Vasanthi, L., Munuswamy, N. 2011. Effect of cadmium on the ovarian development in the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 74(4): 623-629.
- Rodríguez, E.M., López Greco, L.S., Fingerman, M. 2000. Inhibition of ovarian growth by cadmium in the fiddler crab, *Uca pugilator* (Decapoda, Ocypodidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 46: 202-206.
- Selderslaghs, I.W., 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*. 28(3): 308-20.
- Thompson, J., Bannigan, J. 2008. Cadmium: Toxic effects on the reproductive system and the embryo. *Reproductive Toxicology*. 25: 304-315.
- Tilton, S.C., Foran, C.M., Benson, W.H. 2003. Effects of cadmium on the reproductive axis of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*. 136: 265-276.
- Tokumoto, T., Tokumoto, M., Nagahama, Y. 2005. Induction and inhibition of oocyte maturation by EDCs in zebrafish. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 3(1): 69-73
- Yang, S., Zhang, Z., He, J., Li, J., Zhang, J., Xing, H., Xu, S. 2012. Ovarian toxicity induced by dietary cadmium in hen. *Biological Trace Element Research*. 148: 53-60.