



مطالعه هیستوفیزیولوژیک و هیستومتریک تخمدان در دو ماهی شانک زردباله (*Acanthopagrus latus*) و کفشک راست‌گرد (*Euryglossa orientalis*) در خور موسی

خدیدجه خلیفی^۱، عبدالعلی موحدی‌نیا^{۲*}، نگین سلامت^۱، امیر پرویز سلاطی^۳

^۱گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران

^۲گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

^۳گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران

چکیده

نوع مقاله:

پژوهشی

مطالعه حاضر با هدف بررسی هیستوفیزیولوژیک محور هیپوفیز-گنادی ماهیان شانک زردباله (*Acanthopagrus latus*) و کفشک راست‌گرد (*Euryglossa orientalis*) جمع‌آوری شده از خور موسی انجام شد. بدین منظور ۱۲۰ قطعه ماهی از ایستگاه‌های پتروشیمی، جعفری، مجیدیه، غزاله و زنگی واقع در خور موسی و ایستگاه گناوه (ایستگاه شاهد) جمع‌آوری شد. جهت سنجش هورمونی، خون‌گیری از ساقه دم ماهیان و جداسازی پلاسمای خون انجام شد. سپس ماهیان تشریح شده و نمونه‌هایی از بافت تخمدان آن‌ها برداشته و در محلول فرمالین تثبیت و پس از طی مراحل پاساژ بافتی، مقاطع توسط رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-انوزین رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. فاکتورهای هیستومتری از قبیل قطر فولیکول، قطر اووسیت، ضخامت بافت همبندی و تنوع فولیکولی نیز محاسبه شد. میزان هورمون‌های ۱۷-بتاسترادیول و تستوسترون با استفاده از روش IRMA سنجیده شد. در تخمدان هر دو گونه ماهی در گنادوتروپینی GTHI و GTHII با استفاده از روش IRMA سنجیده شد. در تخمدان هر دو گونه ماهی در ایستگاه‌های مختلف آترزی فولیکول‌ها، بی‌نظمی و به‌هم‌ریختگی بافتی، افزایش فولیکول‌ها در مرحله کروماتین نوکلئولوس و پری‌نوکلئولوس، افزایش ضخامت بافت همبند بینابینی و کاهش فولیکول‌های تکامل‌یافته‌تر مانند فولیکول آلوتول قشری مشاهده گردید. نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان هورمون‌های گنادی ۱۷-بتاسترادیول و تستوسترون نشان داد که غلظت این دو هورمون در ایستگاه‌هایی که تخمدان بیشترین تغییرات بافتی را داشته، به کمترین میزان خود رسیده است. درحالی‌که غلظت هورمون‌های GTHI و GTHII در بالاترین میزان بود.

کلمات کلیدی:

۱۷-بتاسترادیول

تستوسترون

تخمدان

خور موسی

شانک زردباله

کفشک

مقدمه

توسعه و گسترش قابل‌توجه صنایع، کشاورزی و تجارت با افزایش روز افزون تخلیه مواد شیمیایی به محیط‌های آبی و اثرات زیان‌آور ناشی از این مواد بر موجودات آبی همراه بوده است. مواد شیمیایی از منابع مختلفی به محیط‌زیست وارد شده، سپس از طریق فاضلاب‌ها، باران و آب‌های زیر زمینی، در سرتاسر ستون آب و رسوبات زیرین پراکنده می‌شوند. موجودات زنده مورد

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: amovahedinia@umz.ac.ir

استفاده جهت تغذیه ماهیان، از طریق تماس با آب یا رسوب و یا مواد غذایی، آلوده می‌شوند. ماهیان از طریق تغذیه از این مواد غذایی آلوده و نیز از طریق تماس سطوح پوستی و تنفسی با آب آلوده، این آلاینده‌ها را دریافت می‌کنند. سرانجام این مواد در سراسر بدن ماهی پخش شده و برخی از این مواد شیمیایی به مکان اصلی عملکرد خود دست یافته و اثرات سمی خود را ایجاد می‌کنند (Di Giulio and Hinton, 2008).

مطالعات میکروسکوپی بافتی و فیزیولوژیکی فراوانی در زمینه تأثیر آلاینده‌های مختلف بر سیستم اندوکرینی ماهیان توسط محققین متعددی انجام شده است (Karels et Anderson et al., 1996b; Anderson et al., 1996a; Khaniyan et al., 2016; al., 2001). ترکیبات مخرب سیستم اندوکرینی (EDCs)¹ به دلیل طیف وسیع، پایداری زیاد در محیط، تنوع اثرات از سطح مولکولی تا سطح سلولی و فیزیولوژیک از اهمیت زیادی برخوردارند (Anderson et al., 1996a). طیف وسیعی از ترکیبات شیمیایی مصنوعی و طبیعی جزء EDC ها طبقه‌بندی می‌شوند. اثرات این مواد شامل تغییرات جزئی تا تغییرات دائم از قبیل تمایز جنسی غیرطبیعی همراه با اندام‌های جنسی ماده یا نر شده، تغییر رفتارهای جنسی، تغییر سیستم ایمنی، ایجاد سرطان و تومور است (Anderson et al., 1996a).

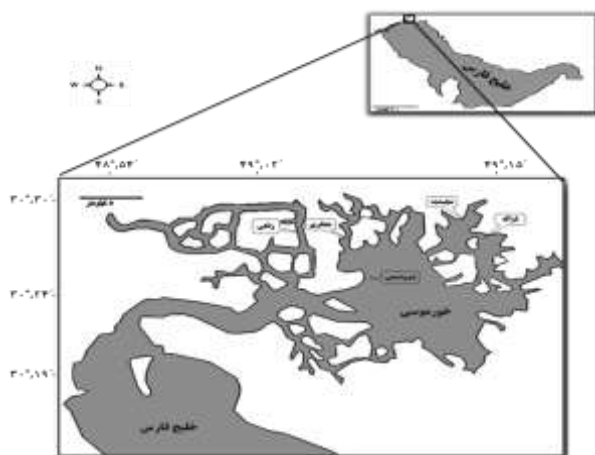
تحقیقات بیانگر این نکته می‌باشند که آلاینده‌ها می‌توانند بر روی مراحل مختلف رشد گنادی در ماهیان تأثیر گذاشته و به این ترتیب باعث ایجاد اختلال در عملکرد سیستم تولیدمثلی شوند. تخریب فولیکول‌های تخمدانی که شامل آترزی و التهاب تخمدانی هستند در بسیاری از مطالعات مورد توجه قرار گرفته است (Spies et al., 1996).

خور موسی از جمله اکوسیستم‌هایی می‌باشد که به دلیل مجاورت با صنایع مختلف و عدم توجه کافی به مسائل زیست‌محیطی دستخوش جنبه‌های منفی تکنولوژی مدرن گردیده است. اهمیت این خور نه تنها از لحاظ وجود تأسیسات بندری و مجتمع‌های پتروشیمی، بلکه به دلیل ارزش اکولوژیک خوریات منطقه می‌باشد. ظرفیت این اکوسیستم نیز مانند تمامی خورها و منابع آبی، برای پذیرش تغییرات محدود بوده و در صورتی که میزان تخریب از سرعت بازسازی طبیعی بیشتر شود، سلامت خوریات این منطقه به طور جدی مورد تهدید قرار می‌گیرد. به علت خطرات بالایی که آلاینده‌ها برای سلامت اکوسیستم منطقه دارا هستند، به دست آوردن برآوردی از میزان آلودگی آبیان به ویژه ماهیان منطقه به این نوع آلاینده‌ها بسیار مهم است. ماهی شانک زردباله (*Acanthopagrus latus*) از گونه‌های مهم و تجاری خلیج فارس محسوب می‌شود. این ماهی در نزدیک کف ساکن بوده و محیط‌زیست آن، آب‌های کم‌عمق (۵۰ متری) می‌باشد (Hesp et al., 2004). ماهی کفشک راست‌گرد (*Euryglossa orientalis*) مانند سایر ماهیان کفشک برای زندگی در کف بسترها سازگاری دارند. غالباً دریازی بوده و در مصب‌ها دیده می‌شوند و گونه‌های اندکی از آن‌ها در آب‌های شیرین یافت می‌شوند. بیشتر در اعماق ۲۰۰-۱۰ متر زندگی می‌کنند. این ماهیان دو جنسی بوده (جنس نر و ماده جدا می‌باشد) و در مناطق دور از ساحل تخم‌ریزی و اکثراً تخم‌های پلاژیک تولید می‌کنند (Randal and Hoover, 1995). تحقیق حاضر با هدف بررسی تغییرات هیستوفیزیولوژیک محور هیپوفیز-گنادی شامل تغییرات ساختار بافتی تخمدان و نیز تغییرات هورمون‌های گنادی (۱۷-بتاسترادیول و تستوسترون) و هیپوفیزی (GTHI و GTHII) در ماهیان شانک زردباله و کفشک راست‌گرد جمع‌آوری شده از ایستگاه‌های نمونه‌برداری مختلف در خور موسی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از ماهیان مورد مطالعه در ابتدای فصل پاییز و در پنج ایستگاه در خور موسی شامل خورهای مجیدیه، غزاله، پتروشیمی، جعفری و زنگی انجام شد (شکل ۱). نمونه‌هایی از گونه‌های ماهیان مورد مطالعه، به عنوان شاهد از بندر گناوه جهت مقایسه با ایستگاه‌های مورد مطالعه جمع‌آوری شد.

¹ Endocrine disrupting compounds



شکل ۱. نقشه‌ی منطقه‌ی مورد مطالعه

از هر ایستگاه ۱۰ عدد ماهی شانک زردباله ماده و ۱۰ عدد ماهی کفشک راست‌گرد ماده توسط تور ترال صید گردید. حتی- المقذور سعی شد ماهی‌ها هم‌اندازه باشند. در هر بار نمونه‌برداری پس از بی‌هوش کردن ماهیان، وزن هر ماهی به وسیله ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ گرم و طول کل بدن با استفاده از تخته بیومتری با دقت ۱ میلی‌متر اندازه‌گیری و ثبت می‌گردید.

پس از بی‌هوش کردن ماهی، خون‌گیری توسط سرنگ ۲/۵ میلی‌لیتری تیمار شده با هپارین و از سیاهرگ ساقه دمی به عمل آمد. جهت خون‌گیری از ماهیان، ابتدا سرنگ با زاویه حدود ۳۰ درجه و در امتداد انتهای باله مخرجی (کمی جلوتر از باله دمی و موازی با خط جانبی و کمی پایین‌تر از آن) وارد بدن ماهی و با ایجاد خلأ در سرنگ، خون‌گیری انجام شد (Movahedinia et al., 2011). سپس خون به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شد. جهت تهیه پلاسمای نمونه‌های خون با دور ۱۰۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و نمونه‌های پلاسمای توسط سمپلر به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری جدید منتقل شدند. در نهایت میکروتیوب‌های حاوی پلاسمای به تفکیک نام ماهی و ایستگاه نمونه‌برداری در تانک ازت به آزمایشگاه انتقال یافت و تا زمان سنجش هورمون‌ها در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

پس از انجام خون‌گیری محوطه شکمی ماهیان با احتیاط باز و نمونه‌هایی از ابتدا، انتها و وسط تخمدان ماهیان برداشته شد. تمام نمونه‌های بافتی برداشته شده با ذکر کد نام ماهی و ایستگاه نمونه‌برداری در ظروف شیشه‌ای درب دار، جهت تثبیت در محلول فرمالین بافر ۱۵ درصد قرار داده شد. کلیه مراحل پاساژ بافتی به صورت اتوماتیک و با استفاده از دستگاه پاساژ بافتی یا هیستوکینت (مدل RX- 11B, Tissue tek rotary, Japan) در آزمایشگاه بافت‌شناسی انجام شد.

پس از انتهای مراحل پاساژ بافتی، نمونه‌های بافتی توسط قالب‌های آلومینیومی لوکهارت، قالب‌گیری و با استفاده از دستگاه میکروتوم (مدل LEICA- RM2245)، برش‌هایی با ضخامت ۵-۶ میکرومتر از بلوک‌های حاوی نمونه‌های بافتی تهیه شد. مقاطع بافتی سپس با استفاده از رنگ‌آمیزی معمولی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شدند (Movahedinia et al., 2012). مقاطع بافتی رنگ‌آمیزی شده با استفاده از میکروسکوپ نوری Olympus و با بزرگنمایی‌های متفاوت بررسی و تصاویر مناسب توسط دوربین نصب شده بر روی میکروسکوپ Dinolite Digital Microscope و سیستم رایانه‌ای متصل به دوربین مجهز به نرم‌افزار Dino capture تهیه و ذخیره شد.

مطالعه هیستومتریکی شامل اندازه‌گیری پارامترهایی از قبیل قطر فولیکول‌ها و اووسیت‌ها و همچنین ضخامت بافت همبندی حفاصل فولیکول‌ها به کمک نرم‌افزار Dino capture انجام شد. با توجه به اینکه فراوان‌ترین نوع فولیکول‌ها در بافت تخمدان هر دو گونه در مرحله کروماتین نوکلئولوس و پری نوکلئولوس دیده شد، محاسبه قطر فولیکول‌ها و اووسیت‌ها به صورت میانگینی از این دو مرحله بود. تنوع فولیکولی بافت تخمدان هر دو نوع ماهی نیز شمارش شد و مورد تجزیه و تحلیل آماری

قرار گرفت. به این منظور ۵ نمونه از هر یک از گونه‌های ماهیان از هر ایستگاه و ۵ مقطع از هر نمونه و ۵ میدان دید میکروسکوپی از هر مقطع مطالعه شده انتخاب و پارامترهای مذکور در آن‌ها محاسبه و تعیین شد.

سنجش هورمونی

تعیین مقادیر هورمون ۱۷-بتا استرادیول به روش رادیوایمونواسی (RIA) با استفاده از دستگاه گاما کانتر و به کارگیری کیت هورمونی شرکت (DRG, USA) به انجام رسید. به طوری که مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از ردیاب حاوی ید نشاندار (ید-۱۲۵) و مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از آنتی پلازما به ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه افزوده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۰-۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس به میزان ۰/۵ سی سی محلول رسوب‌دهنده محتوی گاماگلوبین در سدیم آزاد به آن اضافه شد. مخلوط حاصل، پس از ۲۰-۱۵ دقیقه نگهداری در دمای اتاق در ۱۵۰۰ دور سانتریفوژ شد و میزان حضور ید ۱۲۵ توسط دستگاه گاما کانتر برای مدت زمان یک دقیقه سنجیده شد. با تقسیم نمودن مقادیر حاصل (پس از کسر مقدار حاصل از محلول غیر اختصاصی) بر مقادیر به دست آمده از محلول استاندارد، نتایج برحسب واحد نانوگرم بر میلی‌لیتر (ng/ml) بیان شد که جهت اطمینان از آن‌ها هر تست سه بار تکرار گردید (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995).

برای سنجش سطوح هورمون تستوسترون نیز از کیت (DRG USA) با ردیاب حاوی ید نشاندار (ید ۱۲۵) به روش RIA با دستگاه گاما کانتر استفاده شد (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995).

هورمون‌های GTHI و GTHII به روش IRMA اندازه‌گیری شدند. بدین منظور جهت سنجش این هورمون‌ها از کیت IBL Immuno-biological Laboratories, Hamburg Germany استفاده شد (Breton *et al.*, 1998). اساس روش IRMA به صورت غیررقابتی و ساندویچی است؛ یعنی آنالیت توسط دو آنتی‌بادی ساندویچ شده که یکی از این آنتی‌بادی‌ها توسط ماده رادیواکتیو نشاندار می‌شود. در این مطالعه به ازای هر آنالیت یک ساندویچ نشاندار تشکیل شده، لذا رابطه مستقیم میان آنالیت و کمپلکس رادیواکتیو برقرار بود. روش کار به این صورت است که، هورمون‌های GTH موجود در پلازما به عنوان آنتی‌ژن به دو آنتی‌بادی زوج اختصاصی (از نوع منوکلونال موشی)، متصل می‌شود. یکی از آنتی‌بادی‌ها بر روی فاز جامد (لوله‌ها) پوشش داده و آنتی‌بادی دیگر به ید-۱۲۵ (ید نشاندار) متصل شد. پس از انکوباسیون، برای خارج کردن آنتی‌بادی متصل به ید-۱۲۵ لوله‌ها تخلیه و شست‌وشو شد. در مرحله بعد توسط شمارنده گاما، اکتیویته موجود در هر لوله اندازه‌گیری گردید. این اکتیویته رابطه مستقیم با غلظت هورمون GTH نمونه‌ها دارد. نمونه‌های مجهول با استانداردهای GTH، مورد آزمایش قرار گرفت و غلظت نمونه‌های مجهول بر اساس منحنی استاندارد به دست آمد.

آنالیز آماری

داده‌های مربوط به پارامترهای هیستومتری شامل قطر فولیکول‌ها، قطر اووسیت‌ها، ضخامت بافت همبند بینابینی و تنوع فولیکولی و نیز سطوح هورمون‌های ۱۷-بتا استرادیول، تستوسترون، GTHI و GTHII ماهیان ایستگاه‌های مختلف به صورت میانگین \pm خطای استاندارد بیان شد. وجود اختلاف میان داده‌ها با استفاده از آزمون One-way ANOVA و پس از آزمون توکی (Tukey) در نرم‌افزار SPSS16 تعیین شد. اختلاف در سطح اطمینان بالای ۹۵٪ ($P < 0.05$) پذیرفته شد. در نهایت نمودارها در محیط Microsoft Office Excel 2010 ترسیم شدند.

نتایج

زیست‌سنجی

نتایج مربوط به بیومتری ماهیان (۱۰ عدد از هر یک از گونه‌های ماهیان) شامل میانگین طول و وزن آن‌ها به همراه انحراف معیار در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱. نتایج زیست‌سنجی ماهیان به تفکیک گونه ماهی و ایستگاه نمونه‌برداری (میانگین \pm انحراف معیار)

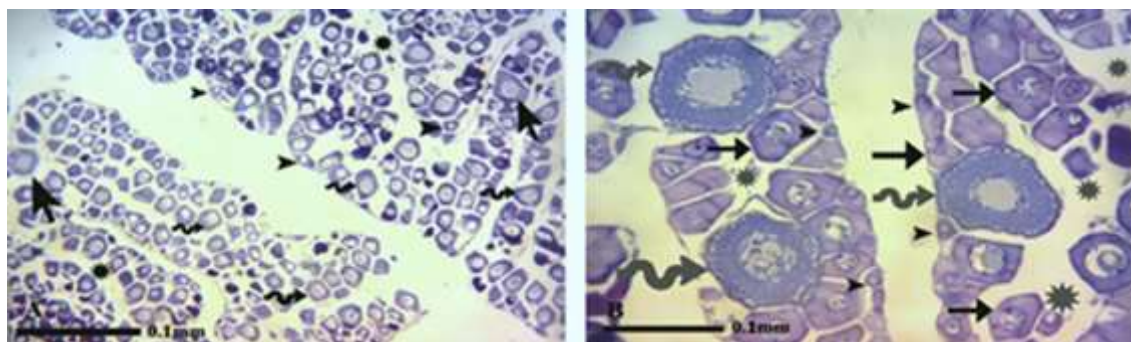
گناوه	زنگی	غزاله	مجیدیه	جعفری	پتروشیمی		
۲۷/۸ \pm ۳/۹	۲۷/۹ \pm ۴/۴	۲۹/۱ \pm ۵/۶	۲۶/۸ \pm ۱/۵	۲۸/۳ \pm ۳/۳	۲۷/۵ \pm ۱/۲	طول	شانک
						(cm)	زردباله
۱۹۶/۱ \pm ۲۶/۳	۱۷۸/۷ \pm ۲۱/۳	۲۰۰/۱ \pm ۲۲/۳	۱۸۸/۵ \pm ۹/۲۳	۱۹۸/۱ \pm ۱۹/۶	۱۹۰/۵ \pm ۱۳/۷	وزن	
						(g)	
۴۰/۱ \pm ۱/۹	۳۷/۸ \pm ۶/۴۳	۳۹/۳۲ \pm ۳/۵۹	۴۰/۳۲ \pm ۹/۷۸	۳۸/۷۱ \pm ۵/۲۱	۳۹/۱۶ \pm ۳/۷۲	طول	کفشک
						(cm)	راست‌گرد
۵۴۲/۶ \pm ۷/۳	۵۱۷/۸ \pm ۱۶/۳	۵۴۳/۳ \pm ۸/۱۳	۵۳۷/۳ \pm ۴/۷۱	۵۲۹/۱ \pm ۸/۲۱	۵۳۵ \pm ۴/۸۹	وزن	
						(g)	

بافت‌شناسی

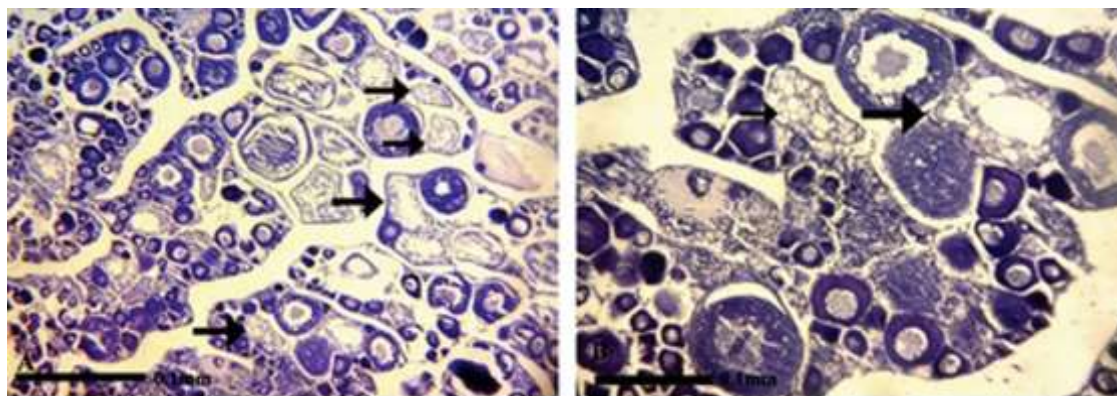
مقاطع بافتی تخمدان ماهیان ایستگاه شاهد دارای ساختار طبیعی بود. گناد در هر دو گونه این ماهیان عمدتاً نابالغ و در مرحله پری‌ویتلوژنی و اکثر فولیکول‌های مشاهده شده در مراحل کروماتین نوکلئولوس، پری‌نوکلئولوس و آلوئول قشری بودند که توسط بافت همبند سست در کنار یکدیگر قرار گرفته بودند (شکل ۲، A و B). در حالی که در تخمدان دو گونه ماهی مورد مطالعه ایستگاه پتروشیمی تغییرات بافتی نظیر آترزی فولیکول‌ها (شکل ۳، A و B)، افزایش فولیکول‌های پری‌نوکلئولوس، افزایش بافت همبند بینابینی (شکل ۴، A و B) و کاهش فولیکول‌های تکامل‌یافته‌تر مانند فولیکول‌های آلوئول قشری مشاهده شد. این ضایعات در بافت تخمدان ماهیان شانک زردباله و کفشک راست‌گرد ایستگاه زنگی بسیار اندک بود. تغییرات بافت تخمدان ماهی شانک زردباله ایستگاه جعفری فراوان و بسیار مشابه ایستگاه پتروشیمی بود. در حالی که ضایعات بافت تخمدان ماهی کفشک راست‌گرد در ایستگاه‌های مجیدیه و غزاله به ضایعات ایستگاه پتروشیمی نزدیک‌تر بود و تغییرات بافت تخمدان این ماهیان در ایستگاه جعفری نسبتاً اندک بود.

هیستومتری

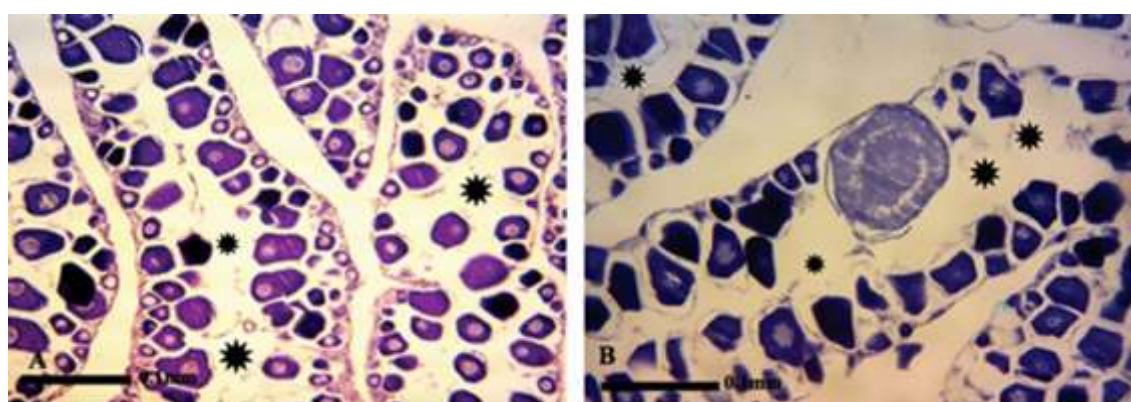
بررسی‌های هیستومتری فاکتورهایی از قبیل قطر فولیکول، قطر اووسیت، فواصل بافت همبندی و تنوع فولیکول‌ها در دو گونه مورد مطالعه در ایستگاه‌های مختلف، در مقایسه با ماهیان ایستگاه شاهد، نتایج متفاوتی را نشان داد. با توجه به شکل ۵ نتایج مربوط به میانگین قطر فولیکول‌ها در ماهیان شانک زردباله و کفشک راست‌گرد ایستگاه‌های مختلف خور موسی تفاوت معنی‌دار نشان نداد ($p > 0.05$). بر اساس شکل ۶ نتایج مربوط به اندازه‌گیری میانگین قطر اووسیت تخمدان ماهیان شانک زردباله و کفشک راست‌گرد نیز در ایستگاه‌های مختلف اختلاف معنی‌دار نشان نداد ($P > 0.05$).



شکل ۲. ساختار طبیعی بافت تخمدان A، ماهی شانک زردباله: فولیکول در مرحله کروماتین نوکلئولوس (رأس پیکان سیاه)، فولیکول در مرحله پری‌نوکلئولوس (پیکان مارپیچ)، فولیکول در مرحله آلوئول قشری (پیکان سیاه) و بافت همبند بینابینی (ستاره سیاه) (H&E; $\times 290$). B، ماهی کفشک راست‌گرد: فولیکول در مرحله کروماتین نوکلئولوس (رأس پیکان سیاه)، فولیکول در مرحله پری‌نوکلئولوس (پیکان سیاه)، فولیکول در مرحله آلوئول قشری (پیکان مارپیچ) و بافت همبند بینابینی (ستاره خاکستری) (H&E; $\times 725$).



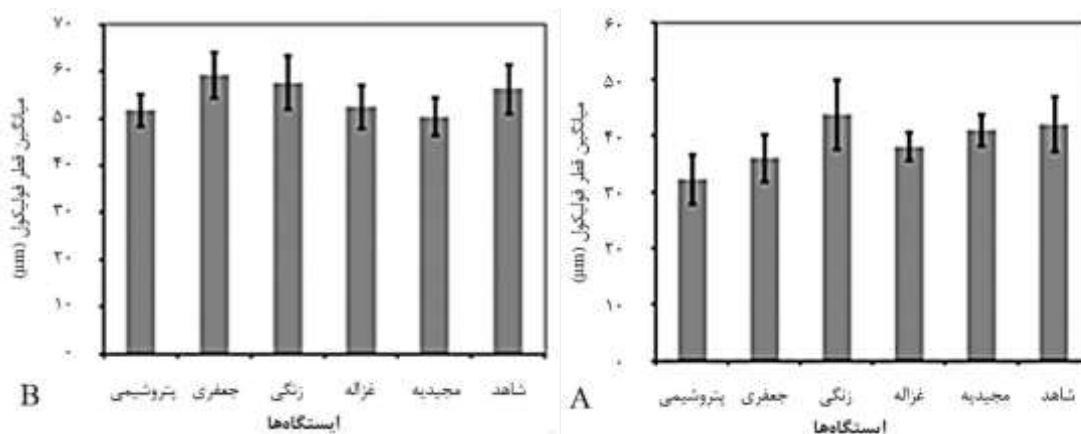
شکل ۳. فولیکول‌های آترزی شده در تخمدان ماهی شانک زردباله (A) و ماهی کفشک راست گرد (B). پیکان‌های سیاه رنگ فولیکول‌های آترزی شده را نشان می‌دهد (H&E; ×725).



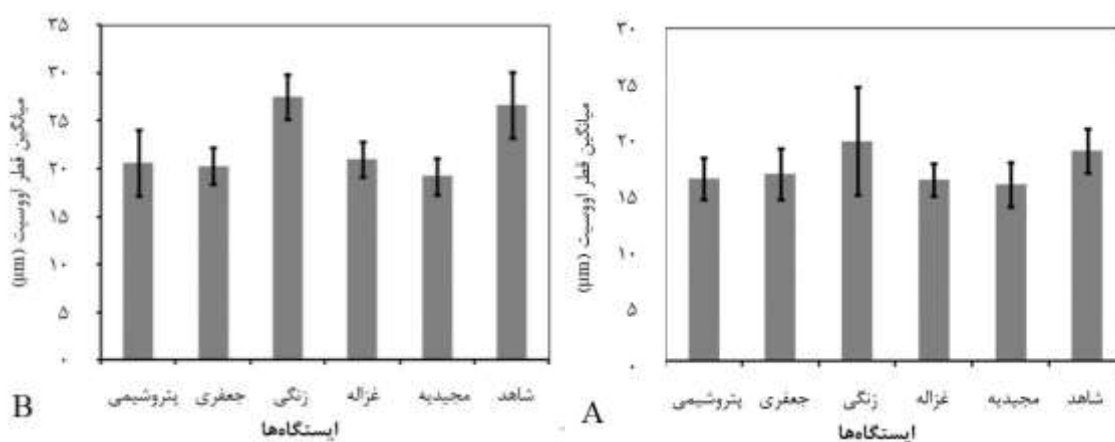
شکل ۴. توسعه بافت همبند بینابینی در تخمدان ماهی شانک زردباله (A) و ماهی کفشک راست گرد (B). ستاره‌های سیاه افزایش فضای بافت همبند بین فولیکول‌ها را نشان می‌دهد (H&E; ×725).

نتایج هیستومتری مربوط به اندازه بافت همبند بینابینی برای هر دو ماهی شانک زردباله و کفشک راست گرد نشان داد که بیشترین میزان بافت همبند در ماهیان ایستگاه پتروشیمی و کمترین آن مربوط به ایستگاه زنگی بود. هر چند که در سایر ایستگاه‌ها الگوی تغییرات متفاوت دیده شد. این الگو برای ماهی شانک زردباله به صورت پتروشیمی ≤ جعفری < مجیدیه ≤ غزاله < زنگی و برای ماهی کفشک راست گرد پتروشیمی ≤ مجیدیه ≤ غزاله < جعفری ≤ زنگی بود. شکل ۷ نتایج مربوط به اندازه‌گیری بافت همبند بینابینی در تخمدان ماهیان ایستگاه‌های مختلف را نشان می‌دهد.

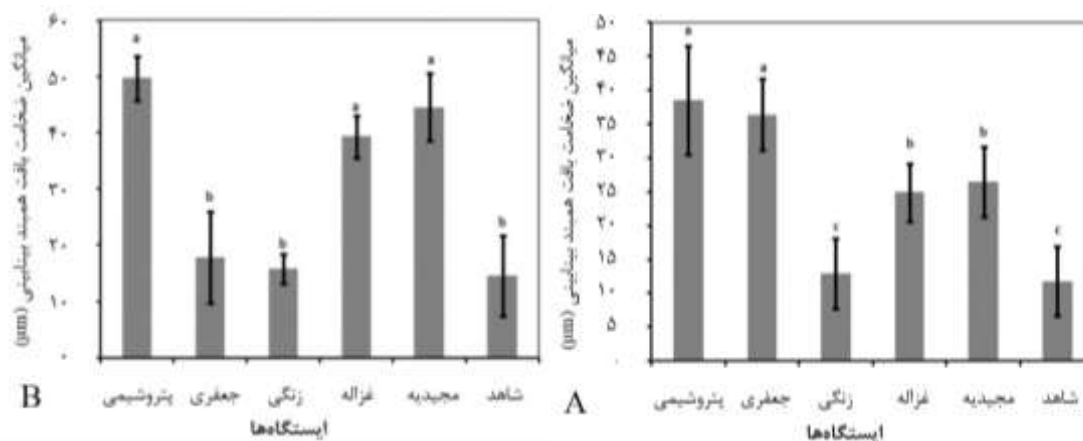
نتایج محاسبه تعداد و تنوع فولیکولی (فولیکول‌های کروماتین نوکلئولوس، پری نوکلئولوس، آلئول قشری و آترزی شده) در تخمدان گونه‌های مورد مطالعه در ایستگاه‌های مختلف الگوهای متفاوتی را نشان داد (شکل ۸). با توجه به نتیجه آزمون واریانس یک طرفه میان انواع فولیکول‌ها در تخمدان هر دو گونه در همه ایستگاه‌ها اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ($p < 0.05$). نتایج تعداد فولیکول‌های نارس کروماتین نوکلئولوس در تخمدان ماهی شانک زردباله در ایستگاه‌های پتروشیمی و جعفری با اختلاف معنی‌داری از سایر ایستگاه‌ها بیشتر بود ($p < 0.05$); در حالی که تعداد این فولیکول‌ها در سایر ایستگاه‌ها تفاوت معنی‌داری نشان نداد. بیشترین تعداد فولیکول‌های کروماتین نوکلئولوس در تخمدان ماهی کفشک راست گرد بدون وجود اختلاف معنی‌دار ($P > 0.05$)، به ترتیب در ایستگاه‌های پتروشیمی، مجیدیه و غزاله مشاهده شد؛ در حالی که کمترین تعداد این نوع فولیکول‌ها در ایستگاه‌های زنگی و جعفری مشاهده شد؛ هر چند که اختلاف معنی‌داری بین این دو ایستگاه وجود نداشت ($P > 0.05$).



شکل ۵. میانگین قطر فولیکول‌ها در (A) تخمدان ماهی شانک زردباله و (B) تخمدان ماهی کفشک راست‌گرد بر حسب میکرومتر.

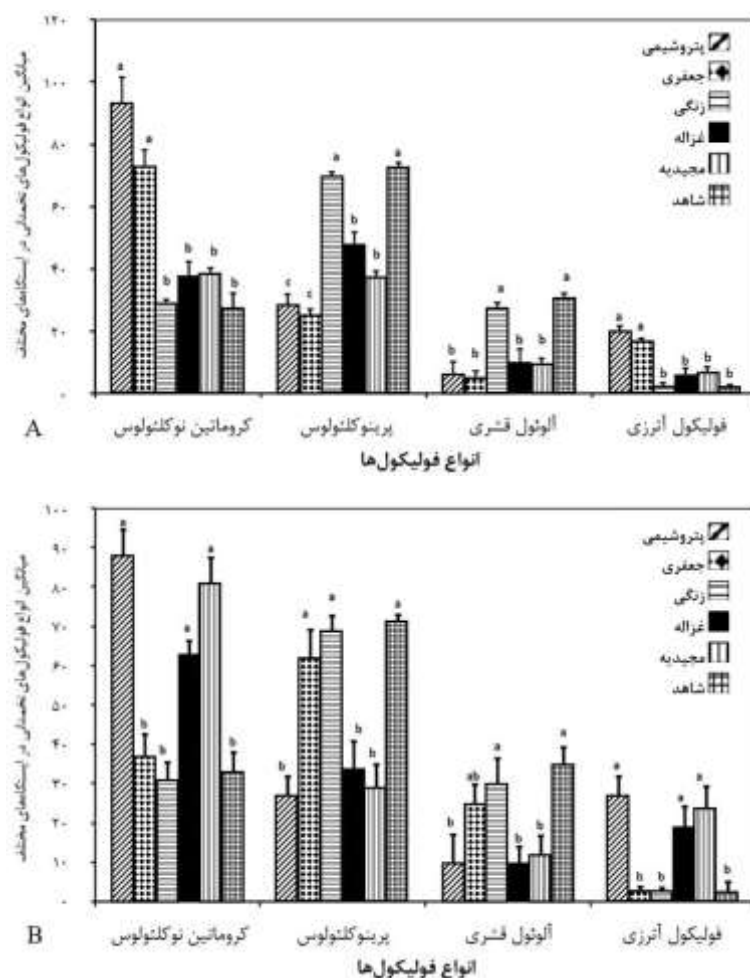


شکل ۶. میانگین قطر اووسیت‌ها در (A) تخمدان ماهی شانک زردباله و (B) تخمدان ماهی کفشک راست‌گرد بر حسب میکرومتر.



شکل ۷. میانگین ضخامت بافت همبند بینابینی در (A) تخمدان ماهی شانک زردباله و (B) تخمدان کفشک راست‌گرد بر حسب میکرومتر.

فراوانی فولیکول‌های پری‌نوکلئولوس در تخمدان ماهی شانک زردباله در ایستگاه‌های زنگی و شاهد با اختلاف معنی‌داری بیش از سایر ایستگاه‌ها بود ($P < 0.05$). کمترین تعداد این فولیکول‌ها بدون اختلاف معنی‌دار در ایستگاه‌های پتروشیمی و جعفری دیده شد ($P > 0.05$). در تخمدان ماهی کفشک راست‌گرد بیشترین تعداد فولیکول‌های پری‌نوکلئولوس بدون وجود اختلاف معنی‌دار در ایستگاه‌های شاهد، زنگی و جعفری ($P > 0.05$) و کمترین تعداد در ایستگاه‌های پتروشیمی، مجیدیه و غزاله مشاهده شد، هر چند که بین این ایستگاه‌ها نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$).



شکل ۸. تعداد و تنوع انواع فولیکول‌ها در (A) تخمدان ماهی شانک زردباله و (B) تخمدان ماهی کفشک راست‌گرد.

تعداد فولیکول‌های آئوئول قشری در ماهی شانک زردباله در کلیه ایستگاه‌ها بسیار پایین بود هرچند که تعداد این نوع فولیکول‌ها در ایستگاه‌های شاهد و زنگی بدون وجود اختلاف معنی‌دار بیشتر از سایر ایستگاه‌ها بود ($p>0.05$). سایر ایستگاه‌ها باهم اختلاف معنی‌داری نشان ندادند ($p>0.05$). تعداد فولیکول‌های آئوئول قشری در ماهی کفشک راست‌گرد در همه ایستگاه‌ها بیش از ماهی شانک زردباله بود. برای این نوع ماهی نیز بیشترین تعداد این فولیکول‌ها بدون وجود اختلاف معنی‌دار در ایستگاه‌های شاهد و زنگی مشاهده شد ($p>0.05$). سایر ایستگاه‌ها باهم اختلاف معنی‌دار نشان ندادند ($p>0.05$). تعداد این فولیکول‌ها در ایستگاه جعفری نیز با هیچ‌کدام از ایستگاه‌ها اختلاف معنی‌دار نداشت ($p>0.05$).

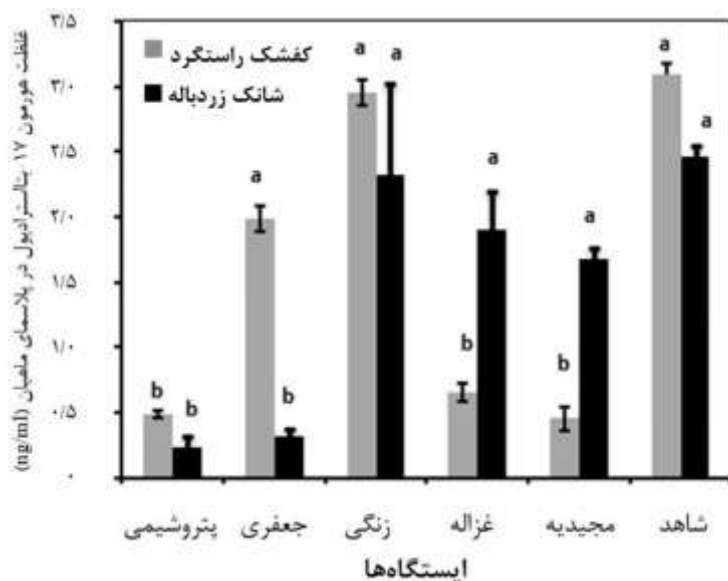
بیشترین و کمترین تعداد فولیکول‌های آنرژی شده در ماهیان شانک زردباله و کفشک راست‌گرد به ترتیب در ایستگاه پتروشیمی و زنگی مشاهده شد. این نوع فولیکول‌ها در ماهیان شانک زردباله ایستگاه جعفری با ایستگاه پتروشیمی تفاوت معنی‌دار نداشتند ($p>0.05$) و در ماهی کفشک راست‌گرد عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین ایستگاه‌های پتروشیمی، مجیدیه و غزاله مشاهده شد ($p>0.05$).

نتایج هورمونی

بر اساس نتایج مربوط به اندازه‌گیری هورمون ۱۷-بتااسترادیول در پلازما ماهی شانک زردباله، کمترین غلظت این هورمون در ایستگاه‌های پتروشیمی و جعفری بدون وجود اختلاف معنی‌دار بین این دو ایستگاه مشاهده شد ($P>0.05$). درحالی‌که بیشترین غلظت این هورمون مربوط به پلازما ماهیان ایستگاه زنگی بود که اختلاف معنی‌داری با ایستگاه شاهد نداشت.

($P>0.05$). مقدار هورمون ۱۷-بتاسترادیول در ماهیان شانک زردباله در ایستگاه‌های غزاله و مجیدیه نیز اختلاف معنی‌داری با یکدیگر و همچنین ایستگاه زنگی نشان نداد ($P>0.05$) (شکل ۹).

نتایج آنالیز هورمون ۱۷-بتاسترادیول در پلاسمای ماهی کفشک راست‌گرد نشان داد که بیشترین غلظت این هورمون در ماهیان ایستگاه‌های زنگی و جعفری وجود دارد. بدون اینکه اختلاف معنی‌داری بین غلظت هورمون در این ایستگاه‌ها با یکدیگر و با ایستگاه شاهد مشاهده شود ($P>0.05$). در صورتی که کمترین غلظت این هورمون در ماهیان ایستگاه‌های پتروشیمی، مجیدیه و غزاله دیده شد. لازم به ذکر است که بین این ایستگاه‌ها نیز اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد ($P>0.05$) (شکل ۹).



شکل ۹. غلظت هورمون ۱۷-بتاسترادیول برحسب ng/ml در پلاسمای ماهیان شانک زردباله و کفشک راست‌گرد در ایستگاه‌های مختلف.

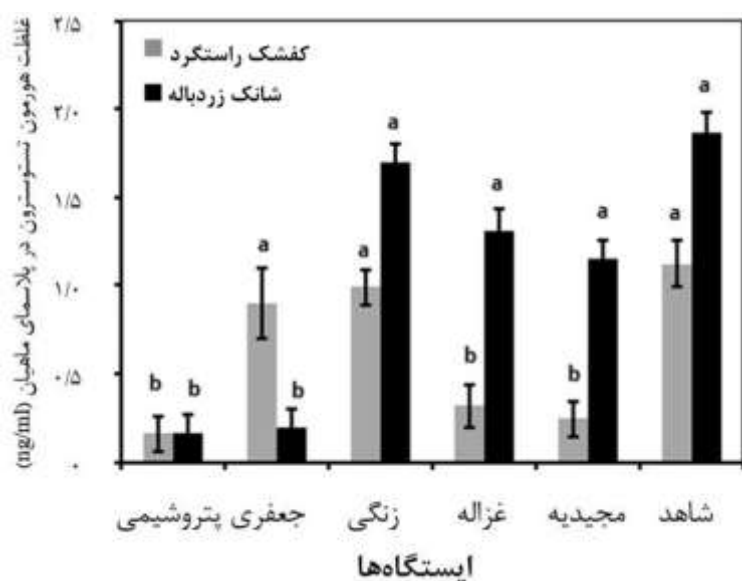
نتایج آنالیز هورمون تستوسترون، مشابه هورمون ۱۷-بتاسترادیول بود. به این صورت که کمترین غلظت این هورمون در پلاسمای ماهی شانک زردباله بدون وجود اختلاف معنی‌دار ($P>0.05$) در ماهیان ایستگاه‌های پتروشیمی و جعفری مشاهده شد. غلظت این هورمون در ماهیان شانک زردباله ایستگاه‌های زنگی، غزاله و مجیدیه تفاوت معنی‌داری با یکدیگر و همچنین با ماهیان ایستگاه شاهد نشان نداد ($P>0.05$) (شکل ۱۰).

مطابق با نتایج آنالیز هورمون تستوسترون در پلاسمای ماهی کفشک راست‌گرد، بیشترین غلظت این هورمون در ماهیان ایستگاه‌های زنگی و جعفری مشاهده شد بدون اینکه اختلاف معنی‌داری بین غلظت هورمون در این ایستگاه‌ها با یکدیگر و با ایستگاه شاهد مشاهده شود ($P>0.05$). در صورتی که کمترین غلظت این هورمون در ماهیان ایستگاه‌های پتروشیمی، مجیدیه و غزاله دیده شد. لازم به ذکر است که اختلاف معنی‌داری بین این ایستگاه‌ها وجود نداشت ($P>0.05$) (شکل ۱۰).

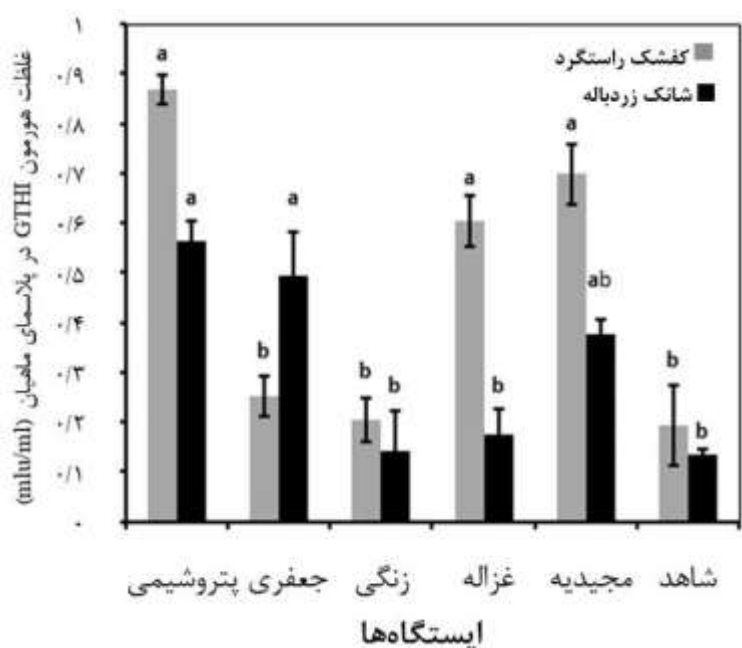
بر اساس نتایج، آنالیز هورمون GTHI در پلاسمای ماهی شانک زردباله نشان داد که بالاترین غلظت این هورمون در ماهیان ایستگاه‌های پتروشیمی و جعفری اندازه‌گیری شد. در حالی که اختلاف معنی‌داری بین این دو ایستگاه وجود نداشت ($P>0.05$). پایین‌ترین سطوح این هورمون نیز در ایستگاه‌های زنگی و غزاله ثبت شد که اختلاف معنی‌داری میان این ایستگاه‌ها با یکدیگر و با ایستگاه شاهد نیز دیده نشد ($P>0.05$). لازم به ذکر است که غلظت این هورمون در ایستگاه مجیدیه با هیچ‌یک از ایستگاه‌های مذکور اختلاف معنی‌دار نداشت ($P>0.05$) (شکل ۱۱).

نتایج آنالیز هورمون GTHI در پلاسمای ماهی کفشک راست‌گرد در ایستگاه‌های مختلف، بیشترین غلظت این هورمون را به ترتیب در ماهیان ایستگاه‌های پتروشیمی، مجیدیه و غزاله نشان داد. هرچند که بین این سه ایستگاه اختلاف معنی‌داری دیده

نشد ($P>0.05$). غلظت این هورمون در ماهیان ایستگاه‌های زنگی و جعفری با اختلاف معنی‌داری کمتر از سه ایستگاه مذکور بود ($P<0.05$) ولی تفاوت معنی‌داری با ایستگاه شاهد نداشتند ($P>0.05$) (شکل ۱۱).



شکل ۱۰. غلظت هورمون تستوسترون برحسب ng/ml در پلاسما ماهیان شانک زردباله و کفشک راستگرد در ایستگاه‌های مختلف.

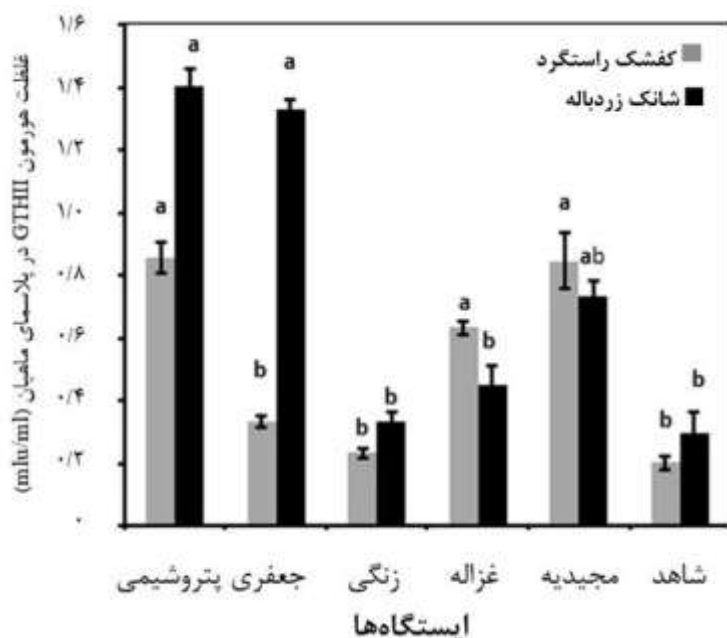


شکل ۱۱. غلظت هورمون GTHI برحسب mlu/ml در پلاسما ماهیان شانک زردباله و کفشک راستگرد در ایستگاه‌های مختلف.

نتایج آنالیز هورمون GTHII نیز مشابه با هورمون GTHI بود. بیشترین غلظت این هورمون در ماهیان شانک زردباله در ایستگاه‌های پتروشیمی و جعفری ثبت شد که میان آن‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P>0.05$). پایین‌ترین سطوح این هورمون نیز در ماهیان شانک زردباله در ایستگاه‌های زنگی و غزاله ثبت شد که اختلاف معنی‌داری میان این ایستگاه‌ها با یکدیگر و با ایستگاه شاهد دیده نشد ($P>0.05$). لازم به ذکر است که غلظت این هورمون در ایستگاه مجیدیه با هیچ‌یک از ایستگاه‌های مذکور اختلاف معنی‌دار نداشت ($P>0.05$) (شکل ۱۲).

در ماهیان کفشک راستگرد آنالیز هورمون GTHII نیز نتایج مشابه آنالیز هورمون GTHI را نشان داد. ماهیان ایستگاه‌های پتروشیمی، مجیدیه و غزاله بالاترین غلظت این هورمون را داشتند، هرچند که بین این سه ایستگاه اختلاف معنی‌داری دیده

نشد ($P > 0.05$). غلظت این هورمون در ماهیان ایستگاه‌های زنگی و جعفری بدون اختلاف معنی‌داری با یکدیگر و ایستگاه شاهد ($P < 0.05$) کمتر از سه ایستگاه مذکور بود (شکل ۱۲).



شکل ۱۲. غلظت هورمون GTHIII بر حسب mlu/ml در پلاسمای ماهیان شانک زردباله و کفشک راست‌گرد در ایستگاه‌های مختلف

بحث

در این مطالعه، نتایج حاصل از بررسی تغییرات بافت تخمدان ماهی شانک زردباله و کفشک راست‌گرد در ایستگاه‌های مختلف خور موسی نیز وجود ضایعاتی نظیر افزایش فولیکول‌های کروماتین نوکلئولوس و پری‌نوکلئولوس، افزایش فولیکول‌های آترزی شده، افزایش ضخامت بافت همبند بینابینی، تغییر تنوع فولیکولی در تخمدان، کاهش فولیکول‌های تکامل‌یافته مانند فولیکول‌هایی در مراحل آلوتول قشری و زرده سازی اولیه، به همراه بی‌نظمی در ساختار تخمدان را نشان داد. تحقیقات متعدد نشان داده‌اند که این ضایعات، آسیب‌های پاتولوژیکی در پاسخ به دامنه وسیعی از آلاینده‌ها مانند فلزات سنگین مختلف، ترکیبات آروماتیک چندحلقه‌ای، سیانید، فنول و آفت‌کش‌ها می‌باشند (Das and Baruah, 2002; Deshmukh and Kulkarni, 2005; Gaber and Gaber, 2006).

Abdel-Gaber و همکاران (۲۰۱۵) در مطالعه تأثیرات آلودگی کانال El-rahway مصر بر فاکتورهای خونی و بافت تخمدان، بیضه، معده و روده ماهی *Clarias gariepinus* و مقایسه آن با ماهیان صید شده از رود نیل (به عنوان ماهیان شاهد)، تغییرات بافتی مختلفی از قبیل افزایش تعداد فولیکول‌های آترزی شده، افزایش از هم پاشیدگی و جذب مجدد اووسیت‌ها در مراحل مختلف رشد، کاهش توان زرده سازی در اووسیت‌ها، کاهش اندازه فولیکول‌ها، نکرورز انعقادی زوناردیاتا در اووسیت‌های بزرگ و تشکیل واکوئل‌های بزرگ آبکی در زرده را در بافت تخمدان ماهیان صید شده از کانال El-rahway گزارش کردند.

Mohamed (۲۰۰۹) در طی مطالعه اثرات آلودگی دریاچه کوران مصر بر بافت‌های مختلف از جمله تخمدان ماهیان *Tilapia zillii*، *Solea vulgaris* عوارضی همچون آترزی فولیکول‌ها، کاهش تکامل فولیکول‌ها و به هم ریختگی بافتی را مشاهده کردند. Banayi و همکاران (۲۰۱۳) ماهی کپور معمولی *Cyprinus carpio* را در معرض غلظت‌های تحت کشنده ۶۰ و ۱۲۰ میکروگرم بر لیتر دیازینون (نوعی آفت‌کش که به طور وسیع در کشاورزی و منازل از آن استفاده می‌شود) در دوره ۳۰ روزه قرار دادند. بررسی بافت تخمدان این ماهی‌ها نشان داد که مواجهه با این غلظت‌های دیازینون سبب افزایش تعداد اووسیت‌های آترزی شده بود. از مهم‌ترین مشخصات این اووسیت‌ها، می‌توان به از هم پاشیدگی هسته، تجزیه غشا زرده، افزایش در تعداد و

اندازه سلول‌های لایه فولیکولی و تغییر حالت و آبکی شدن گلبول‌های زرده و نیز تغییر رنگ محتویات سلولی اشاره کرد. این محققین همچنین اظهار داشتند که آترزی اووسیت‌ها در نهایت منجر به مرگ سلولی، توقف فرایند میتوز در سلول‌های لایه فولیکولی، به ویژه سلول‌های لایه گرانولوزا می‌گردد. در طی آترزی سلولی و مرگ اووسیت‌ها، سلول‌های فاگوسیتوزی، آن‌ها را از بین می‌برند. از این رو افزایش فاگوسیتوز اووسیت‌های دژنره شده به ویژه در تخمدان ماهی‌هایی که در تماس با غلظت $\mu\text{g/l}$ ۱۲۰ دیازینون قرار داشته‌اند تأییدکننده همین امر است که در نهایت ممکن است به کاهش هم‌آوری این ماهی‌ها منجر شود.

یکی از مهم‌ترین ضایعات تخمدانی مشاهده شده در تحقیق حاضر آترزی فولیکول‌ها بود. آترزی فولیکولی یک فرایند تخریبی است که سبب می‌شود فولیکول‌های تخمدانی مهره‌داران یکپارچگی خود را از دست داده و پیش از تخم‌گذاری حذف شوند (Santos et al., 2008). هرچند که این فرایند به عنوان یک مکانیسم طبیعی و فیزیولوژیک تعریف می‌شود (Santos et al., 2008)، اما گزارش شده که مکانیسم‌های آترزی ممکن است توسط عوامل مختلف از جمله هیپوفیزبرداری، واکنش نوری، فقر غذایی، استرس‌ها و آلودگی‌ها آغاز شود (Wood and Kraak, 2002). لازم به ذکر است که آترزی فولیکول‌های تخمدانی در پستانداران و پرندگان و احتمالاً ماهی‌ها یک مکانیسم طبیعی است که در نتیجه مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول‌های گرانولوزا که حمایت هورمونی را برای اووسیت‌ها فراهم می‌کنند، ایجاد می‌شود (Wood and Kraak, 2002).

Nagi و همکاران (۲۰۱۱)، اووژنز در تخمدان گورخر ماهی *Danio rerio* که به مدت ۱۴ روز در معرض علف‌کش آترازین قرار گرفته بودند را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داد که درصد اووسیت‌های آترزی شده در ماده‌هایی که در معرض آترازین قرار گرفته بودند، بسته به غلظت آترازین نسبت به گروه شاهد بیشتر بود و این تفاوت در گروه‌های تیمار که در معرض غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر لیتر آترازین قرار گرفته بودند، معنی‌دار بود ($P > 0.05$). این محققین علت این تغییر در ساختار بافتی تخمدان را به خاصیت آنتی‌استروژنی و برهم زنده اندوکرینی آترازین نسبت می‌دهند که با ایجاد تداخل در فرایند سنتر هورمون‌های جنسی، رشد اووسیت‌ها را با مشکل مواجه می‌کند. همچنین درصد اووسیت‌های آترتیک در این مطالعه در اووسیت‌های ویتلوزنیک بیش از اووسیت‌های پیش ویتلوزنیک بود و دلیل آن این‌گونه عنوان شد که فرایند آترزی در بسیاری از مهره‌داران تخم‌گذار یک فرایند تجزیه پروتئولیتیک درون اووسیت است و احتمال وقوع آن در زرده ویتلوزنیک بیشتر است. مقایسه قطر فولیکول‌ها در مراحل مختلف تکوین در گروه‌های شاهد و تیمارها تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ($P < 0.05$). Bias و Magar (۲۰۱۳) نیز نوعی ماهی آب شیرین با نام علمی *Channa punctatus* را تحت غلظت‌های زیرکشنده مالاتیون در بازه زمانی ۴ روزه قرار دادند. در مقاطع بافتی تخمدان این ماهی عوارضی از قبیل به هم‌ریختگی بافت تخمدان، نکروز لایه‌های فولیکولی و از بین رفتن فولیکول‌ها دیده شد. مختل‌کننده‌های اندوکرینی شیمیایی قادرند که به طور مستقیم در فعالیت‌های غده هیپوتالاموس دخالت کنند و در نتیجه سبب ایجاد تغییراتی در میزان ترشح هورمون‌های آزادکننده گنادوتروپین (GnRH) و در نهایت تغییر میزان ترشح هورمون‌های گنادوتروپینی (GTH) از هیپوفیز شوند که این هورمون‌ها نیز به نوبه خود بر هورمون‌های استروئیدی (جنسی) مؤثر می‌باشند (Karels et al., 2001).

در مطالعه حاضر، غلظت این هورمون‌ها در ایستگاه‌های نمونه‌برداری مختلف در پلاسمای ماهیان شانک زردباله و کفشک راست‌گرد با شدت ضایعات بافتی ایجادشده در تخمدان ماهیان رابطه مستقیمی را نشان داد. در ایستگاه‌هایی نظیر ایستگاه پتروشیمی که بافت تخمدان هر دو نوع ماهی بیشترین ضایعات را نشان داد، این هورمون‌ها دارای کمترین سطوح پلاسمایی بودند. درحالی‌که در ایستگاهی مانند ایستگاه زنگی که تخمدان ماهیان مورد مطالعه کمترین عوارض را نشان داد سطوح پلاسمای این هورمون‌ها نیز بالا و نزدیک به ماهیان شاهد بود. ارتباط مستقیم میان کاهش سطوح هورمون‌های گنادی و افزایش عوارض پاتولوژیکی بافت تخمدان در مطالعه Zarei و همکاران (2012) نیز گزارش شده است. این محققین با تزریق درون صفاقی غلظت‌های مختلف از بنزوآلفا پابرن به ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) در مدت زمان ۱۴ روزه بیشترین ضایعات پاتولوژیکی تخمدان و پایین‌ترین سطوح هورمون‌های ۱۷-بتاسترادیول و تستوسترون را توأمأ در تیمارهایی که بالاترین غلظت از این ماده را دریافت کرده بودند مشاهده کردند و علت این امر را به تأثیرات آنتی‌استروژنی این آلاینده نسبت دادند.

تحقیقات متعددی در مورد کاهش سطوح استرادیول در پلاسمای موجودات قرار گرفته در معرض آلاینده‌ها هم در محیط (Hirose *et al.*, 2001) و هم در آزمایشگاه (Monteiro *et al.*, 2000) به ثبت رسیده است. در بسیاری از این مطالعات انجام شده کاهش سطوح آنزیم آروماتاز (آنزیم مسئول کاتالیز فرایند تبدیل تستوسترون به استرادیول) در مواجهه با زنبوبیوتیک‌ها، دلیل کاهش هورمون ۱۷-بتاسترادیول ذکر شده است. Hecker و همکاران (۲۰۰۷)، میزان تغییرات فاکتورهای نظیر فعالیت آنزیم آروماتاز، سائز گناد و نیز سطوح هورمون‌های ۱۷-بتاسترادیول، تستوسترون، ۱۱-کتوتستوسترون در جنس نر و ماده ماهی سیم (*Abramis brama*) را در رودخانه الب آلمان بررسی کردند. نتایج این محققین نشان داد که به دلیل آلودگی‌های مختلف این رودخانه پارامترهای مذکور در مقایسه با مطالعات قبلی روی این ماهی، در سطح پایین‌تری قرار داشتند.

تحقیقات دیگر، دلیل کاهش غلظت هورمون‌های جنسی نظیر ۱۷-بتاسترادیول و تستوسترون در مواجهه ماهی با آلاینده‌های آلی را تداخل این آلاینده‌ها با گیرنده‌های هورمونی و بر هم زدن ساختار گیرنده‌ها در اندام‌های هدف اعلام کردند (Thomas and Budianatra, 1995). همچنین به نظر می‌رسد تمایل زیاد آلاینده‌ها به رسپتورهای استروئیدی و قابلیت اتصال به آن‌ها از مهم‌ترین دلایل نوسانات هورمونی باشد (James, 2010). از طرفی مطالعات نشان داده‌اند که هورمون ۱۷-بتاسترادیول از طریق تأثیر بازدارنده بر بروز پدیده آپوتوز (مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی) در نگه‌داری و حفظ سلامت فولیکول‌ها مؤثر است. بنابراین کاهش این هورمون به نوبه خود باعث کاهش فعالیت فولیکول‌ها و افزایش فولیکول‌های آترزی شده می‌شود (Bone and Moore, 2008).

Kohler و Schaffer (۲۰۰۹)، با بررسی گناد شقایق دریایی (*Psammechinus miliaris*) تحت تأثیر آلاینده‌های هیدروکربنی بیان کردند که این ترکیبات منجر به افزایش قابل توجه دژنراسیون اووسیت‌های پری‌ویتلوژنی و شیوع آترزی فولیکول‌ها می‌شوند. بنابر نظر این محققین علت ایجاد فولیکول‌های تکامل نیافته با اندازه کوچک در اثر القاء ترکیبات هیدروکربنی، اثر مهاری این ترکیبات بر رشد تخمدانی و همچنین کاهش سطوح هورمون‌های استروژنی عنوان شد. در مطالعه Janz و Yoo (۲۰۰۳) در آمریکا روی گربه ماهی کله گاوی (*Ameiurus melas*) و نوعی خورشید ماهی (*Lepomis macrochirus*)، تأثیر روی و کادمیوم بر تولیدمثل ماهی بررسی شد. در این ماهیان غلظت تستوسترون به طور معنی‌داری در خورشید ماهی ماده جمع‌آوری شده از خور تار، در زمستان کاهش یافته بود. سطح تستوسترون در ماهی ماده در فصل تولیدمثل که در معرض فلزات سنگین قرار گرفته بود، با ماهیان شاهد اختلاف معنی‌داری داشت. Monteiro و همکاران (۲۰۰۰) در مطالعه مکانیسم مهار استروئیدوژنز در تخمدان ماهی (*Platichthys flesus*) تحت تأثیر سه آلاینده به نام‌های بنزوآلفا پیرن، کرایزن و فناترن گزارش کردند که میزان هورمون‌های ۱۷-بتاسترادیول، ۱۷-آلفا هیدروکسی پروژسترون و آندروژن‌ها به طور معنی‌داری با افزایش غلظت این ترکیبات کاهش می‌یابد.

در پژوهش حاضر، بر اساس نتایج به دست آمده از سنجش هورمون‌های GTHI و GTHII در پلاسمای خون ماهیان ایستگاه‌های مختلف خور موسی مشخص گردید که به طور کلی میزان این دو هورمون در ایستگاه‌هایی نظیر ایستگاه پتروشیمی در هر دو گونه ماهی بالاترین غلظت را داشتند. به عبارتی دیگر در کلیه ایستگاه‌ها غلظت هورمون‌های GTHI و GTHII با غلظت هورمون‌های ۱۷-بتاسترادیول و تستوسترون رابطه عکس نشان داد. به طوری‌که در ایستگاه‌هایی که کمترین سطوح هورمون‌های گنادی دیده شد، بالاترین غلظت هورمون‌های گنادوتروپیک ثبت شد. تحقیقات نشان می‌دهد که هورمون‌های استروئیدی از جمله ۱۷-بتاسترادیول بر میزان هورمون‌هایی که توسط محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد ترشح می‌شود تأثیرگذار است و دارای بازخوردهای منفی یا مثبت می‌باشند (Thibaut and Porte, 2004). در مطالعه حاضر در ایستگاه‌هایی که میزان هورمون‌های جنسی کاهش یافته بود، سطح هورمون‌های گنادوتروپینی افزایش یافت که دلیل آن کاهش اثر فیدبک منفی هورمون‌های استروئیدی بر هیپوتالاموس بود که منجر به افزایش ترشح هورمون‌های گنادوتروپینی در پاسخ به کاهش هورمون‌های استروئیدی شد.

Bagzade Baghan و همکاران (۲۰۱۴) با تأثیر بنزوالفاپایرن (BaP) به عنوان یک آلاینده غیرعفونی و باکتری *Vibrio alginolyticus* به عنوان آلاینده عفونی، بر ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) در دوره ۱۴ روزه، بالاترین غلظت هورمون‌های GTHI و GTHII را در تیمار توأم باکتری و بالاترین غلظت (BaP) یافتند. نتایج این محققین نشان داد که در تیمار مذکور غلظت هورمون‌های استروئیدی ۱۷-بتاسترادیول و ۱۷-OH-پرورسترون به کمترین سطح خود رسیده بود. این محققین بالا رفتن سطوح هورمون‌های گنادوتروپینی را اثر فیدبک منفی هورمون‌های گنادی بر هیپوفیز گزارش نمودند. سموم و آفت‌کش‌های مختلف می‌توانند با ایجاد اختلال در عملکرد نوروترنسمیترها و همچنین فعالیت غده هیپوفیز به طور مستقیم فعالیت غده جنسی را مهار نمایند. در واقع آلاینده‌ها با تأثیر گذاشتن بر سلول‌های گنادوتروپ هیپوفیز در سنتز و ترشح گنادوتروپین نیز اختلال ایجاد می‌نمایند که این امر به نوبه خود می‌تواند فرایند گامتوزن و سنتز هورمون‌های جنسی را در ماهی‌ها مختل نماید (Breton et al., 1998). Thomas و Khan (۲۰۰۱) با تأثیر آلاینده‌های نفتی بر ماهی (*Ictalurus punctatus*) و بررسی مغز این ماهی مشاهده کردند که سطح انتقال‌دهنده‌های عصبی کاهش یافته و باعث افزایش سطح هورمون‌های GTHI و GTHII شده بود.

Gesto و همکاران (۲۰۰۶)، با قرار دادن ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به مدت یک ساعت تا چند روز در معرض غلظت‌های مختلف نفتالین مشاهده کردند که سطوح هورمون ۱۷-بتاسترادیول به صورت وابسته به دوز کاهش یافت که علت آن را اثرات آنتی استروژنیکی این ترکیب عنوان نمودند. این محققین بیان کردند که نفتالین سبب کاهش هورمون‌های جنسی و افزایش هورمون‌های GTH در این ماهیان شده است. آنها افزایش هورمون‌های GTH را به دلیل اثر فیدبک منفی هورمون‌های استروئیدی بر هیپوتالاموس و نیز ایجاد اختلالاتی در مغز و متابولیسم هورمون‌های هیپوفیزی در معرض این آلاینده گزارش کردند. Sun و همکاران (۲۰۱۱) در بررسی تأثیرات فناترن بر محور هیپوفیز-گنادی ماهی ماده *Sebastiscus marmoratus*، در بازه زمانی ۷ روزه کاهش سطح هورمون ۱۷-بتاسترادیول و افزایش سطح هورمون‌های گنادوتروپینی را گزارش نمودند. این محققین علت این تغییرات را، خاصیت آنتی استروژنی فناترن و نیز اثر فیدبک منفی سطح ۱۷-بتاسترادیول بر هورمون‌های GTH دانستند. به‌طور کلی به نظر می‌رسد آلاینده‌های مختلف می‌توانند با تأثیر بر فعالیت مغز، هیپوتالاموس و هیپوفیز و نیز با برهم زدن سطح هورمون‌های جنسی، سطح این هورمون‌ها را تغییر دهند.

نتایج نشان داد که بیشترین تعداد فولیکول‌های نارس کروماتین‌نوکلئولوس و آترزی شده و همچنین بیشترین ضخامت بافت همبند بینابینی در ایستگاه‌های پتروشیمی و جعفری مشاهده شد. کمترین سطح هورمون‌های ۱۷-بتاسترادیول و تستوسترون و بالاتری رین غلظت هورمون‌های GTHI و GTHII نیز بدون وجود اختلاف معنی‌دار در این دو ایستگاه ثبت شد ($P > 0.05$). بنابراین بر اساس نتایج هیستومتریک و هورمونی مشاهده شده در ماهی شانک زردباله در ایستگاه‌های مختلف مطابق با الگوی زیر بود: پتروشیمی < جعفری < مجیدیه < غزاله < زنگی.

با توجه به مجاورت ایستگاه پتروشیمی با کارخانه‌های کلرآلکالی و صنایع پتروشیمی، میزان زیادی از پساب‌های متعلق به این کارخانه‌ها به این بخش از خور موسی تخلیه می‌شود. پیش از این نیز در مطالعات متعددی منبع اصلی آلودگی خور موسی، تخلیه پساب صنایع پتروشیمی گزارش شده بود و مقدار آلاینده‌ها در اطراف این کارخانه‌ها مقادیر بالایی را نشان داده است (Abdollah pour, 2010; Assar, 2009; Babadi, 2010; Faghiri, 2009). مشاهده بیشترین تغییرات بافتی در تخمدان و تغییرات هورمونی پلاسمای ماهی شانک زردباله در ایستگاه پتروشیمی نیز احتمالاً به دلیل آلودگی قابل‌توجه این ایستگاه توسط پسماند کارخانه‌های اطراف می‌باشد. هرچند که اطلاعات دقیقی در مورد مقدار دقیق انواع آلاینده‌ها در بخش‌های مختلف خور موسی در دست نیست و تنها می‌توان به مطالعات محدودی که در ارتباط با اندازه‌گیری برخی آلاینده‌ها مانند جیوه وجود دارد، بسنده نمود. بر اساس مطالعات Babadi (۲۰۱۰)، بیشترین مقدار جیوه در خور پتروشیمی ثبت شد و علت آن تخلیه پساب‌های پتروشیمی ذکر شد.

نزدیکی خور جعفری به خور پتروشیمی و دریافت بخش وسیعی از آلاینده‌ها از طریق این فاصله اندک و نیز با توجه به متحرک بودن ماهی و جابه‌جایی میان خورهای نزدیک سبب شده که نمونه‌های تخمدان و پلاسمای ماهیان شانک زردباله جمع‌آوری شده از ایستگاه جعفری نیز مانند ایستگاه پتروشیمی و بدون اختلاف معنی‌دار با آن، دارای بیشترین تغییرات بافتی و نوسانات هورمونی باشد ($P>0.05$). از طرفی Abdollah pour (۲۰۱۰) نیز گزارش نمود که خور جعفری تا حدود زیادی توسط خروجی صنایع پتروشیمی آلوده می‌شود. Assar (۲۰۰۹) با بررسی میزان غلظت جیوه در آب‌خورهای جعفری، غزاله و زنگی، بیشترین مقدار جیوه را در خور جعفری مشاهده نمود و علت آن را مجاورت با واحد کلر آلکالی بیان کرد.

از طرفی اگرچه میزان غلظت هورمون‌های GTHI و GTHII در نمونه‌های پلاسمای ماهیان شانک زردباله مربوط به ایستگاه مجیدیه با ایستگاه‌های پتروشیمی و جعفری اختلاف معنی‌دار نشان نداد ($P>0.05$)، ولی مقدار تغییرات بافتی تخمدان و نیز میزان هورمون‌های گنادی ۱۷-بتااسترادیول و تستوسترون در این ایستگاه به طور معنی‌داری از دو ایستگاه پتروشیمی و جعفری کمتر بود ($P<0.05$). به‌طور کلی در بسیاری از فاکتورهای هیستومتریکی بررسی شده در تخمدان ماهی شانک زردباله اختلاف معنی‌داری بین ایستگاه‌های مجیدیه و غزاله مشاهده نشد ($P>0.05$). همچنین ماهیان شانک زردباله ایستگاه زنگی و غزاله به ترتیب سطوح نسبتاً طبیعی هورمونی (بالاترین سطح غلظت هورمون‌های گنادی و پایین‌ترین سطح هورمون‌های گنادوتروپینی) و کمترین ضایعات تخمدانی را نشان دادند. تغییرات اندک بافتی و هورمونی ماهیان ایستگاه شانک زردباله خورهای مجیدیه و غزاله نشان‌دهنده کمتر بودن غلظت کلی آلاینده‌های موجود در این خورها می‌باشد. خورهای مجیدیه و غزاله از جمله خورهای انتهایی در منطقه خور موسی بوده و احتمالاً جریان‌های آبی حاوی آلاینده‌ها کمتر به این خورها راه می‌یابند. با توجه به اینکه ماهی شانک زردباله یک ماهی متحرک بوده و در نزدیکی کف ساکن است و از نظر عادات غذایی گوشت‌خوار بوده و اصولاً از سخت‌پوستان، نرم‌تنان، خارپوستان و کرم‌ها تغذیه می‌کند، به نظر می‌رسد که تغییرات محور هیپوفیز-گنادی این گونه بیشتر متأثر از بار آلودگی آب بخش‌های مختلف خور موسی باشد.

نتایج نشان داد که بیشترین تغییرات هیستومتریکی تخمدان، کمترین غلظت هورمون‌های ۱۷-بتااسترادیول و تستوسترون و بالاترین سطوح هورمون‌های گنادوتروپینی ماهیان کفشک راست‌گرد مربوط به ایستگاه پتروشیمی، مجیدیه و غزاله بود ($P>0.05$). بنابراین الگوی شدت تغییرات در این ماهی در ایستگاه‌های مختلف به ترتیب زیر بود: پتروشیمی ≤ مجیدیه ≤ غزاله < جعفری ≤ زنگی. پس از خور پتروشیمی بیشترین تغییرات پاتولوژیکی و هورمونی ماهی کفشک راست‌گرد به ترتیب در خورهای مجیدیه و غزاله مشاهده شد و میانگین فاکتورهای هیستومتریکی تخمدان و غلظت هورمون‌های گنادی و گنادوتروپینی این دو خور با خور پتروشیمی تفاوت معنی‌داری نداشت ($P>0.05$). Abdollah pour (۲۰۱۰) و Babadi (۲۰۱۰) گزارش نمودند که با توجه به وجود اسکله‌ی صادرات نفت و تردد کشتی‌ها در این خور، آلودگی نفتی این خور و اندازه‌گیری مقادیر بالای جیوه امری قابل توجه است. از طرفی رسوبات جمع‌آوری شده از این خور سیاه و چسبنده بود که حاکی از وجود نفت در رسوبات این ایستگاه بوده است. بنابراین فراوانی ضایعات پاتولوژیکی در این خور طبیعی به نظر می‌رسد. علت تشابه تغییرات بافتی و هورمونی محور هیپوفیز-گنادی ماهیان کفشک راست‌گرد ایستگاه غزاله به ایستگاه مجیدیه، مجاورت این دو خور به یکدیگر می‌باشد. در گزارش Babadi (۲۰۱۰) نیز وضعیت تجمع جیوه در رسوبات خور غزاله مشابه رسوبات خور مجیدیه بود. لازم به ذکر است خورهای مجیدیه و غزاله از جمله خورهای انتهایی در منطقه خور موسی بوده که تبادلات کمتری با آب‌های آزاد دارند. درحالی‌که خورهای پتروشیمی، جعفری و زنگی به خلیج‌فارس نزدیک‌تر می‌باشند. همچنین احتمال دارد که جریان‌ات جزر و مدی در این منطقه، آب و مواد آلاینده را به سمت خورهای انتهایی جابه‌جا نماید و با توجه به راکد بودن آب زمان بیشتری جهت ته‌نشین شدن رسوبات معلق فراهم شود.

میانگین تغییرات پاتولوژیکی، هیستومتری و هورمونی تخمدان ماهیان کفشک راست‌گرد در ایستگاه‌های جعفری و زنگی بسیار پایین بود و اختلاف معنی‌داری بین این دو ایستگاه مشاهده نشد ($P>0.05$) که احتمالاً به دلیل وابستگی زیاد این گونه به بستر و تغذیه از موجودات بنتیک می‌باشد. از طرفی اگرچه خور جعفری در نزدیکی خور پتروشیمی و در مجاورت کارخانه

کلرآکالی قرار دارد، ولی بنا به گزارش Abdollah pour (۲۰۱۰) و Babadi (۲۰۱۰)، میزان آلودگی‌هایی نظیر جیوه در رسوبات خور جعفری کمتر از سایر خورها و تقریباً همسان با خور زنگی است.

به نظر می‌رسد تحلیل و ارزیابی نتایج حاصل از تغییرات محور هیپوفیز-گنادی ماهی کفشک راست‌گرد بدون در نظر گرفتن ارتباط معنی‌دار موجود میان میزان آلودگی رسوب ایستگاه‌ها و بیولوژی این‌گونه امکان‌پذیر نباشد. ماهیان کفزی به دلیل سازگاری با بستر و وابستگی تغذیه‌ای به موجودات کفزی پتانسیل بیشتری برای تجمع و انتقال آلاینده‌ها دارند (McConnaughey and Smith, 2000). کفشک ماهیان از ماهیان کم‌تحرک و ساکن بستر هستند که به طور مداوم در تماس مستقیم با رسوبات بستر می‌باشند و از موجودات کفزی ساکن بستر تغذیه می‌کنند. بنابراین، در صورت آلودگی رسوبات امکان انتقال آلاینده‌ها به این ماهی‌ها بسیار محتمل است (McConnaughey and Smith, 2000).

منابع

- Abdel-Gaber, R., Garhy, M., Morsy, K. 2015. Prevalence and Intensity of Helminth Parasites of African Catfish *Clarias gariepinus* in Lake Manzala, Egypt. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 6: 464-469.
- Abdollah pour, F. 2010. Comparative study of heavy metals (Cd, Cu, Ni, Pb) accumulation in deposits and fish species of Musa Creeks. MSc thesis, Khorramshahr University of Marine Science and Technology. (in Persian)
- Anderson, M.J., Miller, M.R., Hinton, D.E. 1996a. In vitro modulation of 17 β -estradiol induced vitellogenin synthesis: effects of cytochrome P4501A1 inducing compounds on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver cells. *Aquatic Toxicology*. 34: 327-350.
- Anderson, M.J., Olsen, H., Matsumura, F., Hinton, D.E. 1996b. In vivo modulation of 17 β -estradiol induced vitellogenin synthesis and estrogen receptor in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver cells by b-naphthoflavone. *Toxicologic and Applied Pharmacology*. 137: 210-218.
- Assar, M. 2009. Accumulation of mercury and methyl mercury in *Pennahiam acrophthalmus* in Musa Creeks, MSc thesis, Khorramshahr University of Marine Science and Technology. (in Persian)
- Babadi, S. 2010. Bioaccumulation of mercury in some tissues of *Acanthopagrus latus*: In vivo and In vitro study, MSc thesis, Khorramshahr University of Marine Science and Technology. (in Persian)
- Bagzade Baghan, R., Salamat, N., Savari, A., Movahedinia, A. 2014. The changes of gonadal parameters in orange spotted grouper *Epinephelus coioides* affected by benzo (a) pyrene and *Vibrio alginolyticus*. M.Sc. Thesis. Khorramshahr University of Marine Science and Technology. (in Persian)
- Banayi, M., Mirvaghefi, A., Ahmadi, K., Ashori, R. 2013. The effect of diazinon on histopathological changes of testis and ovaries of common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Marine Biology*. 12:14-25. (in Persian)
- Bone, Q., Marshall, N.B., Blaxter, J.H.S. 1995. *Biology of fishes*, 2nd ed. Blackie Academic & Professional. London. 332 p.
- Bone, Q., Moore, R. 2008. *Biology of fishes*, 3rd ed. Taylor & Francis. New York. 478 p.
- Breton, B., Govoroun, M., Mikolajczyk, T. 1998. GTH I and GTH II Secretion Profiles during the Reproductive Cycle in Female Rainbow Trout: Relationship with Pituitary Responsiveness to GnRH-A Stimulation. *General and Comparative Endocrinology*. 111(1): 38-50.
- Das, M., Baruah, B.K. 2002. Histopathological changes in ovary of fish *Heteropneustes fossilis* exposed to paper mill effluent. *Aquaculture*. 3: 29-32.
- Deshmukh, S., Kulkarni, K.M. 2005. Effect of cadmium chloride on gonads of the fish *Channa orientalis* (Sch.). *Indian Journal of Environment and Ecoplanning*. 10: 239-245.
- Di Giulio, R.T., Hinton, D.E. 2008. *The Toxicology of Fishes*. CRC Press.
- Faghiri, A. 2009. Using of *Crassostrea gigas* for biomonitoring of heavy metals (Hg, Cu, Pb) in Musa Creeks, MSc thesis. Khorramshahr University of Marine Science and Technology. (in Persian)

- Gaber, H.S., Gaber, S.A. 2006. The effect of water quality of lake Quaran on liver and gonads of *Oreochromis aureus* (L) and *Tilapia zilli* (GEV.) Egyptian Journal of Aquatic Research. 32: 335-349.
- Gesto, M., Tintos, A., Soengas, J.L., Miguez, J.M. 2006. Effects of acute and prolonged naphthalene exposure on brain monoaminergic neurotransmitters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comparative Biochemistry and Physiology. 144 (2): 173-183.
- Hecker, M., Thomas Sanderson, J., Karbe, L. 2007. Suppression of aromatase activity in populations of bream (*Abramis brama*) from the river Elbe, Germany. Chemosphere. 66: 542-552.
- Hesp, S.A., Potter, I.C., Hall, N.G. 2004. Reproductive biology and protandrous hermaphroditism in *Acanthopagrus latus*. Environmental Biology of Fishes, 70: 252-272.
- Hirose, T., Mortino, K., Kizu, R., Toriba, A., Hayakawa, K., Ogawa, S., Inoue, S., Muramatus, M., Masamune, Y. 2001. Estrogenic/antiestrogenic activities of benzo[a]pyrene monohydroxy derivatives. Journal of Health Science. 47(6): 552-558.
- James, M.O. 2010. Steroid catabolism in marine and freshwater fish. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 127 (3-5): 167- 175.
- Karels, A., Markkula, E., Oikari, A. 2001. Reproductive, biochemical, physiological, and population responses in perch (*Perca fluviatilis* L.) and roach (*Rutilus rutilus* L.) downstream of two elemental chlorine-free pulp and paper mills. Environmental Toxicology and Chemistry. 20(7): 1517-1527.
- Khan, I.A., Thomas, P. 2001. Disruption of neuroendocrine control of luteinizing hormone secretion by aroclor 1254 involves inhibition of hypothalamic tryptophan hydroxylase activity. Biology of Reproduction. 64(3): 955-964.
- Khaniyan M., Salamat N., Safahieh A., Movahedinia A. 2016. Detection of benzo[a]pyrene-induced immunotoxicity in orange spotted grouper (*Epinephelus coioides*). Environmental Toxicology. 31(3): 329-38.
- McConnaughey, R.A., Smith, K.R. 2000. Associations between flatfish abundance and surficial sediments in the eastern Bering Sea Can. Journal of Fish Aquatic Science. 57: 2410-2419.
- Magar, R.S., Bias, U.E. 2013. Histopathological impact of malathion on the ovary of the fresh water fish *Channa punctatus*. International Research Journal of Environment Sciences. 2(3): 59-61.
- Mohamed, F.A.S. 2009. Histopathological studies on *Tilapia zillii* and *Solea vulgaris* from Lake Qarun, Egypt. World Journal of Fish and Marine Science. 1(1): 29-39.
- Monteiro, P.R.R., Reis-Henriques, M.A., Coimbra, J. 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbon sin hibit in vitro ovarian steroidogenesis in the founder (*Platichthys flesus*). Aquatic Toxicology. 48: 549-559.
- Movahedinia, A., Hedayati, A., Safahieh, A., Savari, A. 2011. Detection of some hormonal responses of yellowfin Sea Bream (*Acanthopagrus latus*) in Mahshahr Creeks (North West of Persian Gulf). World Journal of Zoology. 6(1): 40-46.
- Movahedinia, A., Abtahi, A., Bahmani, M. 2012. Gill histopathological lesions of the sturgeons. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances. 7(8): 710-717.
- Nagi, Z., Mahdavi Shahri, N., Ghasemzadeh, F., Behnam Rasooli, M., Shahsavani, D. 2011. The effects of atrazine on oogenesis in *Danio rerio*. MSc thesis. University of Mashhad. (in Persian)
- Randall, J.E., Hoover, J.P. 1995. Coastal fishes of Oman. University of Hawaii press. 438 p.
- Santos, J.E., Padilha, G.E.V., Bomcompagni-Junior, O., Santos, G.B., Rizzo, E., Bazzoli, N. 2008. Ovarian follicle atresia is mediated by heterophagy, autophagy, and apoptosis in *Prochilodus argenteus* and *Lepronus taeniatus* (Teleostei: Characiformes). Theriogenology. 70: 1449-1460.
- Schafer, S., Kohler, A. 2009. Gonadal lesions of female sea urchin (*Psammechinus miliaris*) after exposure to the polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene. Marine Environmental Research. 68(3): 128-136.
- Spies, R.B., Stegeman, J.J., Hinton, D.E. Woodin, B., Smolowitz, R., Okihiro, M., Shea, D. 1996. Biomarkers of hydrocarbon exposure and sublethal effects in embiotocid fishes from a natural petroleum seep in the Santa Barbara Channel. Aquatic Toxicology. 34: 195-219.
- Sun, L., Zuo, Z., Luo, H., Chen, M., Zhong, Y., Chen, Y., Wang, C. 2011. Chronic Exposure to Phenanthrene Influences the Spermatogenesis of Male *Sebastes marmoratus*: U-Shaped

- Effects and the Reason for Them Environmental Science and Technology. Environmental Science and Technology. 45(23): 10212-10218.
- Thibaut, R., Porte, C. 2004. Effects of endocrine disrupters on sex steroid synthesis and metabolism pathways in fish. Journal Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 92(5): 485-494.
- Thomas, P., Budiantara, L. 1995. Reproductive life history stages sensitive to oil and naphtalen in Atlantic croaker. Marine Environmental Research. 39(1): 147-150.
- Ulloa-Aguirre, A., Midgley, A.R., Beitins, I.Z., Padmanabhan, V. 1995. Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. Endocrine Reviews. 16(6): 765-787.
- Wood, A.W., Van Der Kraak, G. 2002. Inhibition of apoptosis in vitellogenic ovarian follicles of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by salmon gonadotrophin, epidermal growth factor and 17b-estradiol. Molecular Reproduction and Development. 61: 511-518.
- Yoo, J.L., Janz, D.M. 2003. Tissue-specific HSP70 levels and reproductive physiological responses in fishes inhabiting a metal-contaminated creek. Archive of Environmental Contamination and Toxicology. 45: 110-120.
- Zarei, M., Salamat, N., Nabavi, M., Safahieh, A., Ghanemi, K. 2012. Tissue accumulation of benzo [a] pyrene (BaP) and its histopathological alternations in kidney and gonad of orange spotted grouper (*Epinephelus coioides*). M.Sc. Thesis. Khoramshahr University of Marine Science and Technology. (in Persian)