



تأثیر شدت‌های مختلف امواج مغناطیسی ایستا بر بافت تخمدان ماهی زبرا (*Danio rerio*)

سید امیر حسین موسوی^۱، بهروز حیدری^{۱،۲*}، طوبی میرزاپور^۱، عبالمجید ولی پور^۱

^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

^۲ گروه علوم دریایی، پژوهشکده حوضه آبی دریای خزر، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

نوع مقاله:	چکیده
پژوهشی	هدف مطالعه‌ی حاضر، بررسی بافت تخمدان و روند تخمک‌گذاری ماهی زبرا تحت تأثیر شدت‌های مختلف امواج الکترومغناطیسی است. تعداد ۸۰ قطعه ماهی ماده بالغ با میانگین وزن ۰/۷ - ۰/۴ گرم انتخاب و به مدت ۷ روز و هر روز یک ساعت در معرض شدت‌های مختلف امواج الکترومغناطیسی ایستا (۲/۵، ۵ و ۷/۵ میلی تسلا) قرار گرفتند. در روز هفتم بافت تخمدان خارج شد و پس از تثبیت و قالب‌گیری، مقاطع بافتی با ضخامت ۵ میکرون تهیه گردید. نتایج نشان داد در طی تکوین اووسیت‌ها ۶ فاز قابل مشاهده می‌باشد. مقایسه اثر شدت‌های مختلف امواج مغناطیسی بر بافت تخمدان ماهی زبرا نشان داد که در شدت ۷/۵ میلی تسلا، اووسیت‌ها به فاز آترزی وارد می‌شوند. این اووسیت‌ها در صورت آزادسازی لقاح طبیعی نخواهند داشت. در شدت‌های پایین امواج مغناطیسی (۵ و ۲/۵)، بیشتر اووسیت‌ها در فازهای آلوئول‌های قشری، زرده‌سازی و رسیدگی مشاهده می‌شوند. درصد اووسیت‌های آترتیک کم بوده و در صورت تخمک‌گذاری بقیه اووسیت‌ها لقاح طبیعی خواهند داشت. به‌طور کلی احتمالاً امواج الکترومغناطیسی با شدت ۷/۵ میلی تسلا روی روند تولیدمثل ماهی زبرا تأثیر منفی دارد و باعث کاهش نرخ زادآوری می‌گردد.
تاریخچه مقاله: دریافت: ۹۹/۱۰/۱۶ اصلاح: ۹۹/۱۱/۰۵ پذیرش: ۹۹/۱۲/۰۴	
کلمات کلیدی: امواج الکترومغناطیسی بافت تخمدان فولیکول‌های تخمدانی ماهی زبرا	

مقدمه

استرس نقش مهمی بر عملکرد مهره‌داران مختلف مخصوصاً ماهی‌ها ایفا می‌کند و فعالیت‌های کبد، کلیه و اندام‌های تولیدمثلی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Aliko *et al.*, 2018). عوامل استرس‌زا بسته به شدت، طول مدت در معرض قرارگیری، ماهیت و مرحله‌ای از چرخه زندگی جانور اثرات متفاوتی بر جای می‌گذارند (Schreck, 2000; Schulte, 2014). آلودگی‌های محیطی مثل فلزات سنگین، آفت‌کش‌ها، نانوذرات (Khoshnood, 2017) و میدان مغناطیسی می‌توانند سبب بروز استرس و اختلال سیستم درون‌ریز تولیدمثلی در ماهی‌ها شده؛ رشد و نمو گامت‌ها را تحت تأثیر قرار دهند (Santini *et al.*, 2018). میدان‌هایی که توسط مگنت‌ها یا جریان‌های الکتریکی ایجاد می‌شود به‌عنوان میدان‌های الکترومغناطیسی (EMF)^۱ نامیده می‌شوند. میدان‌های الکترومغناطیسی با توجه به فرکانس به سه دسته فرکانس پایین (ELF-EMF < 300 Hz)، فرکانس متوسط (300 Hz-10 MHz) و رادیو فرکانس (10 MHz-300 GHz) تقسیم می‌شوند (Wang and Zhang, 2017). از طرفی میدان‌های

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: Bheidari@guilan.ac.ir

^۱ Electromagnetic Fields

الکترومغناطیسی با توجه به قطبیت به دو نوع میدان مغناطیسی متناوب (AC) که طی آن جهت بارهای الکتریکی یا قطبیت تغییر می‌کند و میدان مغناطیسی ایستا (DC) که نشان‌دهنده عدم تغییر جهت جریان الکتریکی و یا به عبارتی قطبیت ثابت می‌باشند، تقسیم می‌شوند (Wang and Zhang, 2017).

گونه‌ی *Danio rerio* که تحت عنوان ماهی زبرا یا ماهی گورخر^۴ شناخته می‌شود یک گونه از تیره کپور ماهیان است که بومی آب‌های آزاد جنوب آسیا (پاکستان، نپال و هند) تا جنوب شرقی آسیا (میانمار) است و به راحتی در آب‌های آرام یا راکد، مثل رودخانه‌ها، حوضچه‌ها و مزارع شالی کاری یافت می‌شود (Liew and Orbán, 2014). ماهی زبرا عضوی مشتق شده از سرده دنیونین‌ها^۵ بوده و به‌عنوان بهترین مدل مهره‌دار در بسیاری از جنبه‌های مطالعاتی نظیر زیست‌شناسی سرطان، علوم اعصاب، رفتارشناسی (Peneyra et al., 2018)، مطالعات ژنتیکی، زیست‌شناسی تکوینی و علوم شیلاتی استفاده می‌شود (Bradford et al., 2014; Ribas and Piferrer, 2014). این ماهی دارای دوره کوتاه تولیدمثل، تعداد بالای جنین‌های شفاف، رشد و نمو سریع و تولیدمثل در سراسر طول سال است و به دلیل این خصوصیات به‌عنوان یک مدل آزمایشگاهی محبوب مطرح است (Peneyra et al., 2018). دمای مناسب آب جهت رشد این ماهی در زیستگاه طبیعی معمولاً بین ۲۶ تا ۳۲ درجه سانتی‌گراد متغیر است. این ماهی در مقابل تغییرات فیزیکی- شیمیایی آب مقاوم است (Liew and Orbán, 2014; Ribas and Piferrer, 2014). نرهای بالغ بدنی کشیده‌تر و باریک‌تر دارند، رنگ شکم در آن‌ها زرد بوده و در باله‌های سینه‌ای و مخرجی بین خطوط آبی، خطوط زرد رنگ دیده می‌شود. ماده‌های این گونه اصولاً بزرگ‌تر با شکم گردتر و سفید رنگ بوده و دارای خطوط طولی نقره‌ای به جای طلایی در قسمت شکمی می‌باشند (Mayden et al., 2007).

تولیدمثل در ماهی زبرا به‌صورت ناهم‌زمان^۶ می‌باشد، بدین معنی که در درون تخمدان، فولیکول‌هایی که مراحل مختلف رشد را طی می‌کنند، دیده می‌شوند (Nagahama and Yamashita, 2008; Ribas and Piferrer, 2014). تولیدمثل ماهی زبرا از عوامل مختلف محیطی مثل دوره نوری^۷، دمای آب، pH، توپوگرافی، تراکم ماهی‌ها و حضور اقلام زیست‌محیطی طبیعی مانند گیاهان و بسترهای آبی متأثر می‌شود (Hoo et al., 2016). این ماهی تحت شرایط ایده آل در تمام طول سال عمل تولیدمثل را انجام می‌دهد و بالغین می‌توانند در فاصله هر ۷-۴ روز اقدام به تخم‌ریزی کنند (Ribas and Piferrer, 2014). لقاح در ماهی زبرا خارجی بوده و پس از گذشت ۷۲-۴۸ ساعت عمل تفریح رخ می‌دهد و مرحله لاروی به مدت دو هفته به طول می‌انجامد. در ماهی زبرا ابتدا تمام گنادها به‌عنوان تخمدان تکوین می‌یابند که در نرها پس از گذشت تقریباً ۷-۵ هفته پس از تفریح شدن، گنادها شروع به تمایز می‌کنند و پس از گذر از یک مرحله بین جنسی، سرانجام در حدود ماه سوم تکوینی به بیضه‌های نرمان تکوین می‌یابند (Spence et al., 2008; Vargas et al., 2018).

میدان‌های مغناطیسی که به محیط آبزیان القا می‌شوند، از منابع مختلفی مانند کابل برق و مخابرات زیر آب و کابل‌های گرمایش الکتریکی زیر آب تولید می‌شوند. جریان الکتریکی موجود در کابل‌ها باعث ایجاد میدان‌های مغناطیسی می‌شود که می‌تواند برای رفتار یا زنده ماندن ماهیان و بی‌مهرگان اعماق دریا خطرناک باشد (Gill and Kimber, 2005).

Sedigh و همکاران (۲۰۱۹) در طی یک مطالعه اثر شدت‌های مختلف میدان مغناطیسی ایستا را بر روی شاخص‌های تولیدمثلی ماهی زبرا بررسی کردند. Loghmannia و همکاران (۲۰۱۵) بچه ماهی‌های سفید دریای خزر را در معرض حاد و نیمه مزمن میدان مغناطیسی ایستا قرار دادند و اثر آن را روی شاخص‌های بیوشیمیایی خون و هورمون‌های بچه ماهی مورد بررسی قرار دادند. چند مطالعه‌ی دیگر اثر میدان‌های الکترومغناطیسی حاصل از کابل‌های زیر دریا را روی فیزیولوژی آبزیان مورد بررسی قرار دادند (Andrulewicz et al., 2003; Sedigh et al., 2019).

در حدود دو دهه اخیر، مطالعه میدان مغناطیسی ایستا و میدان الکترومغناطیسی با فرکانس پایین و اثر آن‌ها روی موجودات زنده بسیار مورد علاقه محققین قرار گرفته است. امروزه به دلیل اینکه استفاده از دستگاه‌هایی که بر پایه میدان الکتریکی و

² Alternative current

³ Direct current

⁴ Zebrafish

⁵ Danioninae

⁶ Asynchronous

⁷ Photoperiodic

مغناطیسی استوار هستند، نظیر سیستم‌های الکتریکی صید ماهیان، ارتباط از راه دور برای اهداف ناوبری، موقعیت‌یابی دریایی و کشتیرانی افزایش چشمگیر داشته است، انجام مطالعاتی جهت ارزیابی دقیق عملکرد آن‌ها بر فیزیولوژی ماهیان را ضروری می‌کند. در این مطالعه سعی شده است تأثیرات میدان مغناطیسی ایستا با شدت‌های مختلف تحت شرایط آزمایشگاهی بر روی شاخص تولیدمثلی ماهی زبرا و اندام تولیدمثلی ماده، طی دوره‌های زمانی کوتاه‌مدت مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

تهیه و نگهداری نمونه‌ها

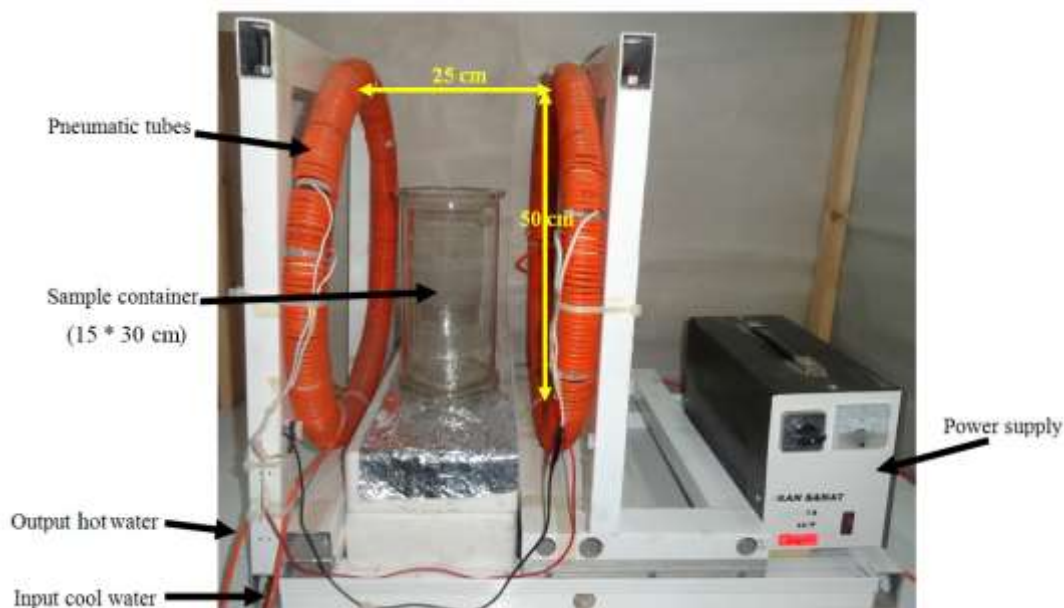
در سال ۱۳۹۵ تعداد ۳۶۰ قطعه ماهی زبرا از مرکز پرورش ماهیان زینتی (رشت، گیلان) به صورت زنده با تانک اکسیژن‌دار به کارگاه زیست‌شناسی دریا دانشکده علوم پایه دانشگاه گیلان منتقل شد. این ماهی‌ها جهت سازگاری با شرایط آزمایشگاه به مدت یک هفته در تانک شیشه‌ای ۵۰ لیتری آب شهری با دمای ۲۸-۲۶ درجه سانتی‌گراد و $\text{pH}=7$ و در دوره نوری ۱۰ ساعت روشنایی و ۱۴ ساعت تاریکی (10L/D14) نگهداری شدند. ماهی‌های نر و ماده انتخاب شده دارای میانگین سنی ۵-۳ هفته و بالغ بوده و تا پیش از انتقال به آزمایشگاه، تخم‌ریزی نداشته‌اند. تغذیه نمونه‌ها به وسیله کنستانتره بیومار ۰/۵ طی دو وعده در روز و به مقدار ۲۰ درصد وزن توده زنده (Biomass) انجام گرفت.

مواجهه نمونه‌ها با میدان مغناطیسی ایستای حاد

اساس کار سیستم امواج دهی بر پایه تئوری پیچ‌های هلمولتز (Helmholtz Coil) طراحی شد. برای این منظور دو سیم‌پیچ با آهنگ ۱۰۰۰ دور در دقیقه که در جهت مخالف هم و به صورت سری قرار گرفته‌اند، طراحی گردید (Loghmannia et al., 2015). این سیستم قادر است میدان مغناطیسی یکنواختی را در فاصله مشخصی بین دو سیم‌پیچ ایجاد کند. قطر داخلی پیچ‌ها برابر و حدود ۵۰ سانتی‌متر بود و از سیم مسی با روکش لاک (ساخت شرکت سیم لاک ایران) ساخته شده بود. طبق نظریه هلمولتز، بهترین فاصله که می‌تواند میدان مغناطیسی ایستا ایجاد کند برابر با میزان شعاع پیچ‌ها است. در مدل طراحی شده این فاصله حدود ۲۵ سانتی‌متر بود. منبع تغذیه دستگاه، برق شهری بود که به وسیله یک ترانس، جریان مستقیم (Direct Current) وارد پیچ‌ها می‌کرد تا میدان مغناطیسی ایستا بین دو پیچ حاصل شود. شدت میدان دستگاه با تغییر ولتاژ ورودی در محدوده ۱۲۰ - ۳۰ ولت، میدانی معادل ۴ تا ۱۰ میلی‌تسلا ایجاد می‌کرد. برای دستیابی به شدت‌های پایین‌تر، دستگاهی به نام رئوستا (Rheostat) در مسیر، بر روی ترانس نصب شد. با توجه به اینکه سیم‌های سازنده پیچ به واسطه استفاده طولانی‌مدت در ولتاژ بالا کارایی خود را در اثر تولید حرارت از دست می‌دهند، لذا جهت بهینه‌سازی دستگاه، در این مدل سیستم تهویه دمایی طراحی شد. برای این منظور لوله‌های پنیوماتیک^۸ (در جهت عمود بر پیچ) به دور آن پیچانده شد و یک سر آن به عنوان ورودی به منبع آب (شیر آب شهری) متصل گردید. بدین ترتیب هنگام استفاده از دستگاه، آب خنک وارد دستگاه شده و از سر دیگر لوله (خروجی) خارج می‌شد.

تعداد ۱۸۰ قطعه ماهی زبرا بالغ با نسبت جنسی ۲:۱ (تعداد ۱۰ قطعه ماهی ماده با میانگین وزنی ۰/۶-۰/۲ گرم و ۵ قطعه ماهی نر با میانگین وزنی ۰/۵-۰/۱ گرم) در ۱۲ ظرف پلاستیکی با گنجایش ۲ لیتر و هر ظرف محتوی ۱/۵ لیتر آب شهری و در شرایط دمایی ۲۸-۲۶ درجه سانتی‌گراد و $\text{pH}=7$ و در دوره نوری 10L/D14 به صورت جداگانه قرار گرفتند. ظرف‌ها تیمار بندی شدند و گروه‌ها تحت تأثیر سه دور مختلف از امواج الکترومغناطیسی به صورت حاد قرار گرفتند. برای این منظور، ۳ ظرف تحت تیمار امواج الکترومغناطیسی با شدت ۲/۵ میلی‌تسلا، ۳ ظرف تحت تیمار با شدت ۵ میلی‌تسلا و ۳ ظرف تحت تیمار با شدت ۷/۵ میلی‌تسلا به مدت ۷ روز و هر روز به مدت یک ساعت قرار گرفتند. گروه‌ها در یک ساعت مشخص از روز (ساعت ۹ صبح) در داخل یک بشر دو لیتری تحت تأثیر میدان مغناطیسی ایستا قرار گرفتند. برای هر گروه ۳ بار آزمایش تکرار شد. برای هر شدت یک ظرف نیز به عنوان کنترل بدون هیچ‌گونه میدان مغناطیسی در نظر گرفته شد.

⁸ Pneumatic



شکل ۱. دستگاه استفاده شده برای تولید میدان الکترومغناطیسی ایستا (Loghmannia et al., 2015).

بافت‌شناسی

پس از اتمام دوره آزمایش، جهت انجام مطالعات بافتی، بافت تخمدان از بدن ماهی خارج شد و در محلول فیکساتیو بوئن فیکس شد. با استفاده از درجات خلوص متفاوت الکل (۵۰٪، ۷۰٪، ۹۰٪ و ۱۰۰٪) عمل آگیری انجام شد و سپس در معرض زایلن جهت شفاف‌سازی قرار گرفتند. در مرحله حمام پارافینی، پارافین جایگزین زایلن شد و سپس قالب‌گیری انجام گردید (Shabanipour and Heidari, 2017).

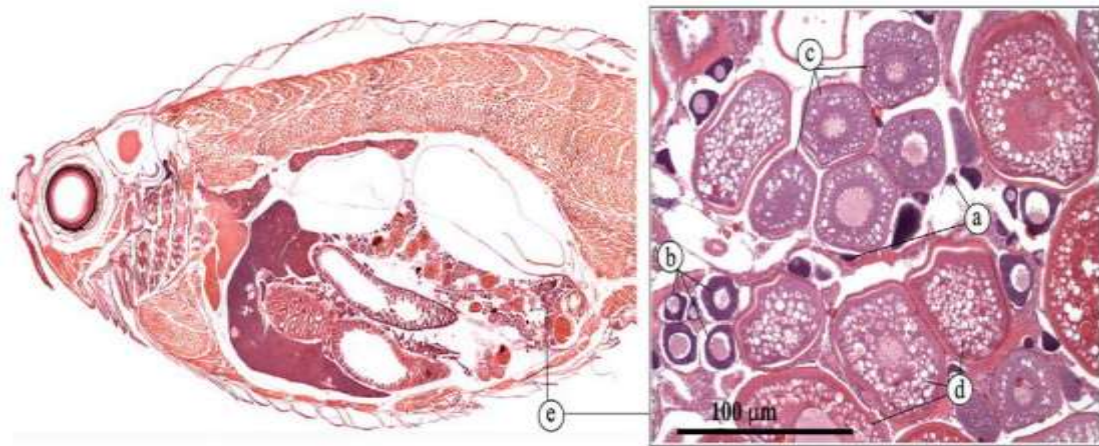
قالب‌های پارافینی بر روی دستگاه میکروتوم سوار گردید و برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرون تهیه شد. سپس برش‌های تهیه‌شده به آرامی روی سطح آب گرم با درجه حرارت ۴۰-۴۵ درجه سانتی‌گراد به منظور حذف پارافین به صورت شناور قرار داده شدند. با استفاده از چسب آلبومین نمونه‌ها بر روی لام قرار گرفت. در پایان، مقاطع با روش هماتوکسیلین-ائوزین رنگ‌آمیزی و با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند و قطر اووسیت‌ها با عدسی چشمی مدرج اندازه‌گیری شدند (Shabanipour and Heidari, 2017).

تحلیل داده‌های آماری

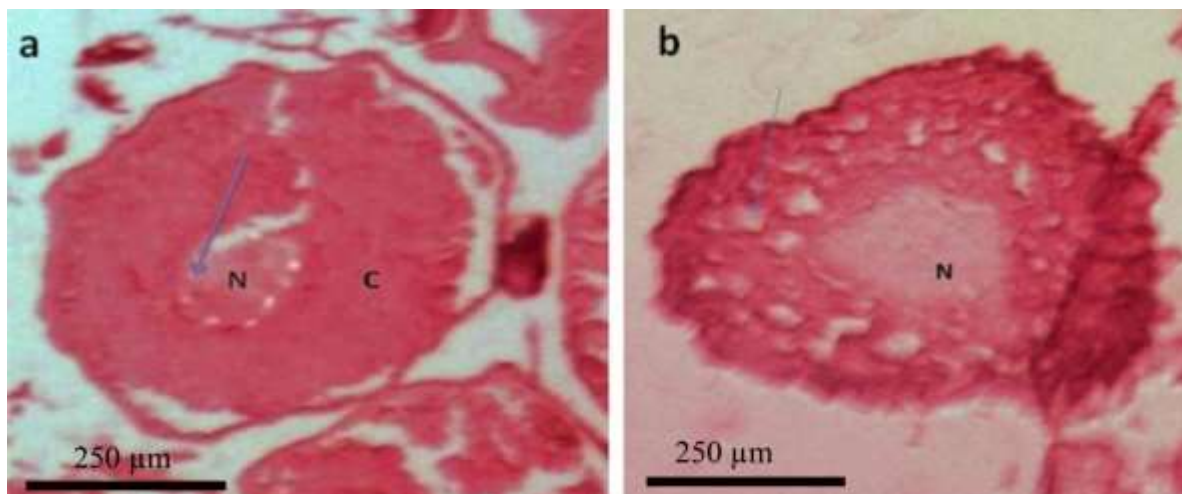
داده‌های آماری مربوط به قطر اووسیت رسیدگی و تعداد فولیکول‌های آترتیک، بر اساس میانگین \pm انحراف معیار بیان شدند. نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون Kolmogorov-Smirnov تعیین گردید. با توجه به صحت پراکندگی نرمال داده‌ها، با استفاده از آزمون ANOVA یک‌طرفه (One-way ANOVA) میزان اختلاف قطر اووسیت‌های رسیده در نمونه‌ها بررسی شد. با توجه به اختلاف معنادار به دست آمده، از پس‌آزمون Duncan به منظور مشخص نمودن معنی‌دار بودن با ضریب اطمینان ۹۵٪ در هر یک از گروه‌ها استفاده گردید. تمامی آنالیزهای آماری توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ و رسم نمودارها توسط نرم‌افزار Excel 2013 انجام گرفت.

نتایج

بررسی بافت‌شناسی بافت تخمدان (شکل ۲) ماهی زبرا نشان داد با توجه به سایز و مرحله تکوین اووسیت‌ها ۶ فاز قابل مشاهده می‌باشد که در فاز اولیه رشد سیتوپلاسم به شدت بازوفیلیک بوده و تعداد زیادی هستک در پیرامون هسته مشاهده می‌شود و میانگین قطر اووسیت‌ها بین ۰/۸ تا ۰/۱۲ میلی‌متر می‌باشد (شکل ۳a). در فاز ثانویه رشد تعداد کمی وزیکول



شکل ۲. برش طولی ماهی زبرا به همراه نمایی بزرگ‌تر از تخمدان بعد از مواجهه با میدان الکترومغناطیسی ایستا؛ (a) اووگونئوم، (b) فولیکول پیش زرده، (c) فولیکول زرده، (d) فولیکول پیش از رسیدگی، (e) تخمدان (خط مقیاس = ۱۰۰ میکرومتر).

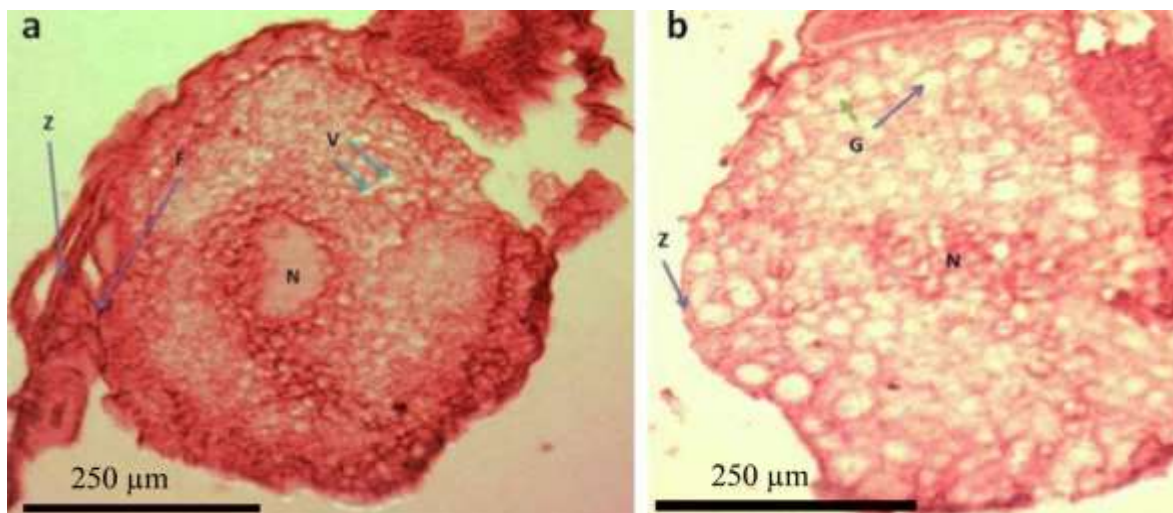


شکل ۳. (a) اووسیت ماهی زبرا که تحت تأثیر شدت‌های مختلف میدان مغناطیسی بوده در فاز اولیه رشد. به تعدد هستک‌ها در پیرامون هسته توجه شود (فلش موجود در شکل به هستک‌ها اشاره دارد). (b) اووسیت ماهی زبرا در مرحله زرده سازی تحت تأثیر شدت‌های مختلف میدان مغناطیسی. تعدادی وزیکول در سیتوپلاسم ظاهر شده است (فلش موجود در شکل به وزیکول‌های زرده اشاره دارد). حروف اختصاری در شکل‌ها به ترتیب معرف (N) هسته، (C) سیتوپلاسم می‌باشند (خط مقیاس = ۲۵۰ میکرومتر).

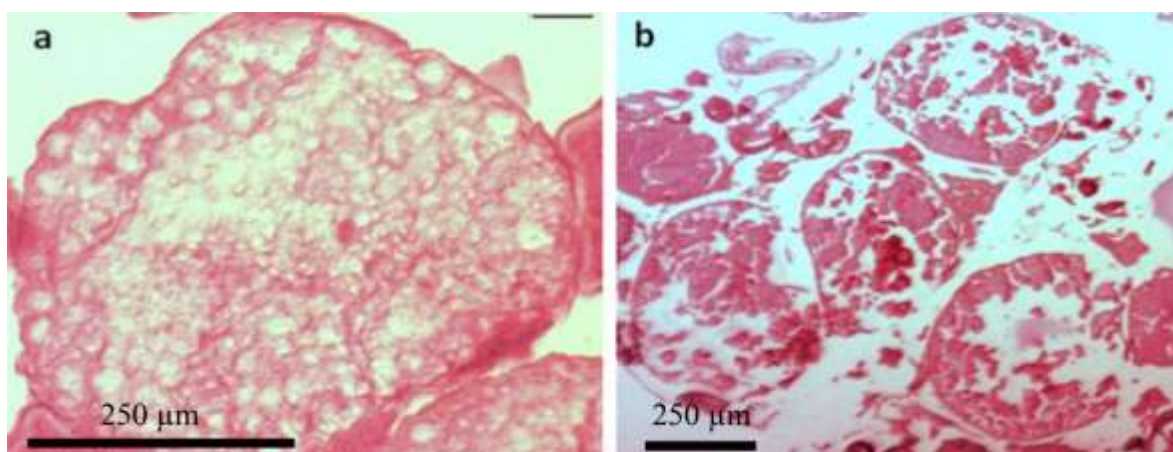
زرده‌ای در سیتوپلاسم ظاهر می‌شود. در بعضی اووسیت‌ها یک واکوئل بزرگ در کنار غشا سیتوپلاسمی قابل‌رؤیت است و سایز اووسیت‌ها افزایش یافته و میانگین قطر اووسیت‌ها بین ۰/۱۲ تا ۰/۱۶ میلی‌متر می‌باشد (شکل ۳b).

در فاز تشکیل آلونول‌های قشری، تعدادی ساختمان‌های گرانولار در اووپلاسم تکثیر شده و افزایش می‌یابند، یک غشا سلولی نازک که از مواد بازوفیلیک تشکیل شده و زونا رادیاتا نامیده می‌شود اطراف اووسیت‌ها ظاهر می‌گردد. در این مرحله هسته طویل شده و هستک‌ها به پوشش هسته‌ای فشار می‌آورند. میانگین قطر اووسیت‌ها حدود ۰/۱۶ تا ۰/۲۸ میلی‌متر می‌باشد (شکل ۴a).

در فاز زرده‌سازی تجمع بالایی از وزیکول‌های زرده‌ای در سیتوپلاسم مشاهده می‌شود. احتمالاً این افزایش به دلیل تجمع گرانول‌های پروتئینی و لیپیدی در وزیکول‌های زرده‌ای می‌باشد. در این فاز ساختارهای گرانولار که در فاز قبلی ظاهر شده بودند شکل طویل‌تری به خود می‌گیرند. میانگین قطر اووسیت‌ها به ۰/۲۸ تا ۰/۷۴ میلی‌متر می‌رسد. ضخامت زونا رادیاتا افزایش یافته و یک ظاهر مخطط پیدا می‌کند. هسته از نظر شکلی بی‌قاعده می‌شود و این امر به دلیل تجمع گلبول‌های زرده‌ای

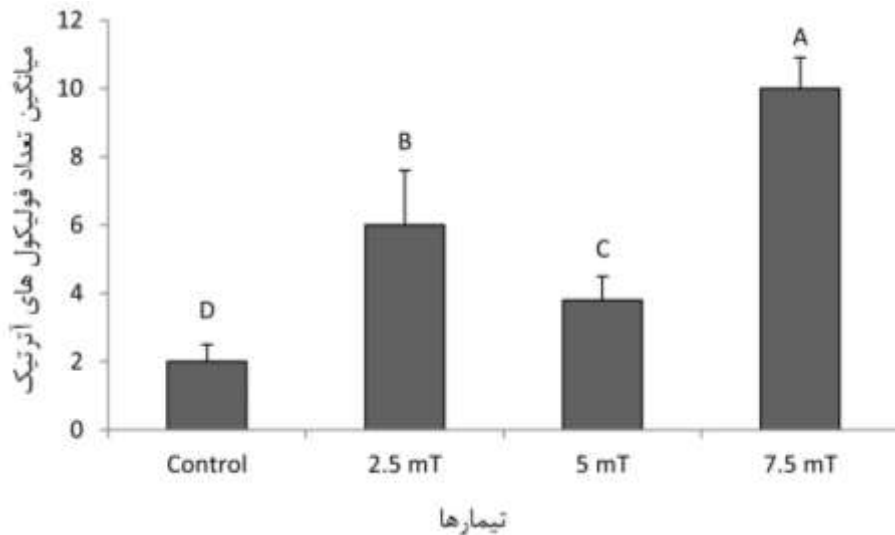


شکل ۴. (a) اووسیت ماهی زیر تحت تأثیر شدت‌های مختلف میدان مغناطیسی در مرحله تشکیل وزیکول‌های قشری، (b) اووسیت ماهی زیر که تحت تأثیر شدت‌های مختلف میدان مغناطیسی بوده در فاز زرده سازی. حروف اختصاری به ترتیب معرف (N) هسته، (G) گرانول، (Z) زونا رادیاتا، (F) لایه فولیکولار، (V) وزیکول زرده‌ای می‌باشند (خط مقیاس = ۲۵۰ میکرومتر).

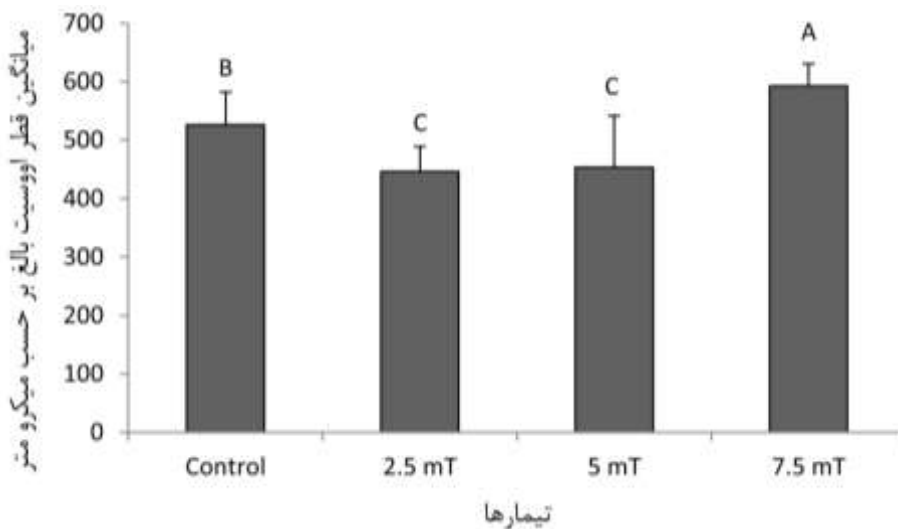


شکل ۵. (a) اووسیت ماهی زیر در مرحله بلوغ تحت تأثیر شدت‌های مختلف میدان مغناطیسی (b) اووسیت‌های ماهی زیر در مرحله آترزی تحت تأثیر شدت‌های مختلف میدان مغناطیسی (خط مقیاس = ۲۵۰ میکرومتر).

در سیتوپلاسم و مهاجرت آن‌ها از سمت آلوئول‌های قشری به سمت مرکز اووسیت می‌باشد. ضخامت سلول‌های گرانولوزایی افزایش یافته تا جایی که ظاهر لوله‌ای شکل پیدا می‌کند و هسته به شدت بازوفیل می‌گردد (شکل ۴b). در فاز بلوغ، قطر اووسیت‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش یافته، هسته شکسته شده و گلبول‌های زرده‌ای تمایل به تلفیق با یکدیگر و شکل دادن توده‌های بی‌شکل ائوزینوفیلیک دارند. میانگین قطر اووسیت‌ها به ۰/۷۴ تا ۰/۷۶ میلی‌متر می‌رسد که ماکزیمم سایز اووسیت در طی اووژنز می‌باشد (شکل ۵a)؛ و نهایتاً در فاز آترزی ساختار غشا زرده‌ای شروع به تجزیه شدن کرده و کروماتین هسته‌ها دفرمه می‌شود و وزیکول‌ها تماماً با یکدیگر ترکیب می‌شوند. غشا زرده‌ای شکسته شده و زرده جذب می‌شود (شکل ۵b). اثر شدت‌های مختلف امواج مغناطیسی حاد بر بافت تخمدان ماهی زیر نشان داد که در شدت ۷/۵ میلی تسلا، اووسیت‌ها به طور معناداری وارد فاز آترزی شده‌اند ($P < 0.05$). این در حالی است که در شدت‌های پایین امواج مغناطیسی، بیشتر اووسیت‌ها در فازهای آلوئول قشری، زرده سازی و بلوغ مشاهده شده اند و تعداد اووسیت‌های آترتیک کم بوده است. مقایسه تعداد فولیکول‌های آترتیک در شدت‌های کم و متوسط با گروه کنترل نشان می‌دهد که تعداد آن‌ها در شدت ۲/۵ میلی تسلا نسبت به نمونه کنترل افزایش معناداری داشته است. این در حالی است که در شدت ۵ میلی تسلا تفاوت معناداری گزارش نشده است (شکل ۶).



شکل ۶. سنجش میانگین تعداد فویکول‌های آرتیک در بافت تخمدان ماهی زبرا تحت تأثیر حاد شدت‌های مختلف میدان الکترومغناطیسی ایستا. حروف بالای ستون‌ها اختلاف معنادار را بیان می‌کند.



شکل ۷. سنجش میانگین اندازه قطر اووسیت‌های رسیده در بافت تخمدان ماهی زبرا تحت تأثیر حاد شدت‌های مختلف میدان الکترومغناطیسی ایستا. حروف بالای ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنادار می‌باشد.

نتایج سنجش قطر اووسیت‌های رسیده هنگام در معرض قرارگیری حاد نشان داد که تمام گروه‌های تیمار اختلاف معناداری با گروه کنترل خود دارند ($P < 0.05$) (شکل ۷). بیشترین مقدار میانگین اندازه‌گیری شده قطر اووسیت‌ها مربوط به بالاترین شدت مغناطیسی به کار رفته می‌باشد (شدت ۷/۵ میلی تسلا). کمترین میزان میانگین قطر را گروه با شدت ۲/۵ میلی تسلا از خود نشان دادند. روند تغییرات به‌گونه‌ای بود که ابتدا کاهش چشمگیر در اندازه قطر اووسیت در گروه ۲/۵ میلی تسلا نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. سپس در گروه با شدت ۵ میلی تسلا روند افزایشی در میزان قطر اووسیت آغاز گردید. این روند افزایشی در تیمار با شدت ۵ میلی تسلا نسبت به گروه تیمار با شدت ۲/۵ میلی تسلا معنادار نبود؛ اما افزایش معنی‌داری در میزان قطر اووسیت در گروه ۷/۵ میلی تسلا نسبت به گروه کنترل مشاهده شد در واقع روند افزایشی در گروه با شدت ۷/۵ میلی تسلا به بیشترین حد خود رسید، به‌طوری‌که هم نسبت به دو گروه با شدت‌های ۲/۵ و ۵ میلی تسلا و هم نسبت به گروه کنترل، اختلاف معناداری مشاهده شد ($P < 0.05$).

بحث

در مطالعه‌ی حاضر، بافت تخمدان ماهی زبرا تحت تابش شدت‌های مختلف امواج مغناطیسی ایستای حاد (۲/۵، ۵ و ۷/۵ میلی تسلا) قرار گرفت و تأثیر امواج بر اووسیت‌های داخل تخمدان مورد بررسی بافت‌شناسی واقع شد. نتایج نشان داد با توجه به سایز و مرحله تکوین اووسیت‌ها ۶ فاز قابل مشاهده می‌باشد. در مطالعاتی بر روی بافت تخمدان ماهی زبرا ۵ مرحله رشد بر اساس سایز و مرحله تکوین اووسیت‌ها تعیین گردید. در مطالعه آن‌ها مرحله اول شامل فاز اولیه رشد است که طی آن اووسیت‌ها شروع به رشد و بزرگ شدن نموده و فولیکول‌ها ظاهر می‌شوند. در این مرحله، رشد اووسیت‌ها تا مرحله پروفاز میوز اول پیش رفته و سپس متوقف می‌گردد. در مرحله دوم که مرحله آلوتول قشری نامیده می‌شود وزیکول‌های زرده‌ای حاوی پروتئین‌های زوناپلوسیدا درون اووسیت تجمع می‌یابند (Clelland and Peng, 2009; Aytekin and Yüce, 2008). طی مرحله سوم اووسیت‌ها ویتلوژنین جذب کرده و این عمل باعث افزایش اندازه فولیکول‌ها می‌گردد. بر طبق مطالعه آن‌ها اووسیت‌ها در ابتدای مرحله سوم، شایستگی پاسخ به هورمون‌های بلوغ را ندارند و این شایستگی را در انتهای مرحله سوم کسب می‌کنند به طوری که می‌توانند به هورمون‌های القایی بلوغ پاسخ دهند. بلوغ اووسیت‌ها طی مرحله چهارم رشد رخ می‌دهد و مرحله پنجم تخمک‌های رسیده آماده تخم‌ریزی می‌شوند (Clelland and Peng, 2009). طبق نتایج مطالعه حاضر تابش امواج مغناطیسی می‌تواند بسته به شدت میدان روی مدت زمان هر مرحله تأثیر بگذارد و آن‌ها را کوتاه‌تر و یا بلندتر کند. تأثیر امواج مغناطیسی بر تعداد فولیکول‌های آترزی و نیز قطر اووسیت‌ها نشان داد که عملکرد میدان مغناطیسی در شدت‌های مختلف یکسان نمی‌باشد. نتایج حاصل از تابش امواج ۷/۵ میلی تسلا بیانگر تأثیر مثبت میدان مغناطیسی بر روند ورود اووسیت‌های ماهی زبرا به فاز آترزی می‌باشد. همچنین بیشترین مقدار میانگین قطر اووسیت‌های رسیده مربوط به همین شدت از میدان مغناطیسی است که دارای اختلاف معنادار با گروه کنترل می‌باشد. این در حالی است که در شدت‌های کمتر از ۷/۵ میلی تسلا، اووسیت‌ها به مدت بیشتری در فازهای ابتدایی‌تر رشد قرار دارند و کمتر به سمت آتروفی شدن پیش می‌روند.

در مطالعه حاضر در شدت‌های ۲/۵ و ۵ تسلا کاهش چشمگیری در میانگین قطر اووسیت‌ها نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. این یافته‌ها با یافته‌های دیگران که تأثیر میدان‌های مغناطیسی با شدت‌های مختلف را بر روی بافت‌های مختلف ماهی‌ها مورد بررسی قرار داده‌اند، مطابقت دارد. به‌عنوان مثال مطالعه انجام شده توسط Lines و Kestin (۲۰۰۵) نشان می‌دهد که جریان بالای الکتریسیته، تأثیر منفی بر روی ماهیان داشته و سبب تخریب بافت‌هایی مانند روده‌ها، طحال و کیسه شنا شده و در نهایت منجر به مرگ ماهی می‌شود (Lines and Kestin, 2005). مطالعه انجام شده توسط Han و همکارانش (۲۰۱۰) در مورد اثرات میدان الکترومغناطیسی بر روی فولیکول‌های تخمدانی نشان داد که با افزایش امواج الکترومغناطیسی هسته اووسیت کوچک‌تر شده و تغییر شکل می‌دهد (Han et al., 2010). همچنین تحقیقات Roshangar و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد که قرار گرفتن در معرض امواج الکترومغناطیسی (EMF) می‌تواند منجر به تغییرات مورفولوژیکی در اووسیت و افزایش تراکم هسته‌ای سلول‌های گرانولوزا شود. نتایج پژوهش حاضر در توافق با مطالعات Nishimura و همکاران (۲۰۱۱) نشان داد قرار گرفتن در معرض EMF در درازمدت موجب کاهش ذخیره‌ای سلول‌های تخم در تخمدان‌ها شده و نهایتاً منجر به کاهش قدرت باروری می‌شود. این مطلب نشان می‌دهد که آترزی فولیکول در تخمدان‌ها با آپوپتوز سلول‌های گرانولوزا همراه است. آپوپتوز سلول‌های گرانولوزا در حضور EMF توسط Cecconi و همکاران (۲۰۰۰) گزارش شده است (Cecconi et al., 2000). مطالعات دیگری مبنی بر تأثیر شدت‌های مختلف امواج مغناطیسی بر روی قسمت‌های مختلف بدن موجودات مختلف انجام شده است. در مطالعه‌ای گزارش کرده‌اند که قرار گرفتن در معرض فرکانس ۵۰ هرتزی با شدت ۱ میلی تسلا ELF-MF به مدت ۴ ساعت به‌طور قابل توجهی با کاهش ذخیره کلسیم داخل سلولی، همراه با فعالیت متابولیسمی و تحرک پایین اسپرم در جنس نر گرازها همراه است (Bernabò et al., 2007). یافته‌های مطالعه Solek و همکاران (۲۰۱۸) نشان داد که در نتیجه تأثیر فرکانس ۱۲۰ هرتزی ELF-MF با شدت‌های ۲/۵ و ۸ میلی تسلا بر روی سلول‌های زاینده موش در مدت زمان کوتاه، کاهش پایداری، افزایش تولیدات ROS^۹ و افزایش آپوپتوز مشاهده می‌شود. مطالعه انجام شده توسط Khaki و همکاران (۲۰۰۸) نشان داد که قرار گرفتن در معرض فرکانس ۵۰ هرتزی ELF-MF با شدت ۸ میلی تسلا، قبل و بعد از تولد موجب القای آسیب سلولی از جمله اتساع میتوکندری در سلول‌های استرومال غدد پروستات موش صحرایی می‌شود. مطالعه Tenorio و

⁹ Reactive oxygen species

همکاران (۲۰۱۱) نشان داد با قرارگیری موش صحرایی در معرض فرکانس ۶۰ هرتزی ELF-MF با شدت ۱ میلی تسلا، آسیب‌های میتوکندریال در سلول‌های اسپرماتید رخ می‌دهد.

تأثیر میدان مغناطیسی همیشه به صورت منفی گزارش نشده است. نتایج مطالعه Solek و همکاران (۲۰۱۸) نشان داد، هیچ اثر قابل ملاحظه‌ای در نتیجه مواجهه با EMF (فرکانس ۵۰ هرتزی با شدت ۲/۵ میلی تسلا به مدت ۲ ساعت) بر روی عملکرد میتوکندری در سلول‌های زاینده موش مشاهده نمی‌شود. یافته‌های مطالعه Akdag و همکاران (۲۰۱۳) نشان داد که قرارگیری مژمن موش صحرایی، در مدت زمان طولانی، در معرض فرکانس ۵۰ هرتزی ELF-MF با شدت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرو تسلا در شرایط دمایی ثابت، هیچ تأثیری در میزان غلظت اسپرم و افزایش استرس اکسیداتیو نداشته و باعث افزایش فعالیت کاسپاز ۳ می‌شود. اختلاف میان یافته‌های مطالعه حاضر با مطالعه‌های دیگر می‌تواند به دلیل اختلاف در فرکانس و شدت میدان‌های انتخابی در مطالعه باشد. Valberg و همکاران (۱۹۹۷) در یکی از مطالعات خود نشان داده‌اند که از جمله مواردی که منجر به نتایج مختلفی در مطالعات مختلف می‌شوند تفاوت در رده سلولی، بافت پرتو تابی شده و مدت زمان پرتو دهی می‌باشد.

به طور کلی یافته‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهد که شدت‌های بالای میدان مغناطیسی (۷/۵ تسلا) در مدت یک هفته، بر روی اووسیت‌ها اثر منفی گذاشته و از طریق کاهش تعداد اووسیت‌های رسیده و افزایش تعداد اووسیت‌های آترزی شده می‌تواند بر باروری ماهی زبرا تأثیرگذار باشد. با توجه به اهمیت سیستم تولیدمثلی-تناسلی در بقای نسل گونه‌ها و افزایش جمعیت و پراکنش آن‌ها و نیز افزایش روزافزون استفاده از این امواج در صنعت کشتیرانی و مسیریابی دریایی، ضرورت انجام مطالعات بیشتر در این زمینه بیش از پیش احساس می‌شود.

منابع

- Akdag, M.Z., Dasdag, S., Uzunlar, A.K., Ulukaya, E., Oral, A.Y., Celik, N., Akşen, F. 2013. Can safe and long-term exposure to extremely low frequency (50 Hz) magnetic fields affect apoptosis, reproduction, and oxidative stress? *International Journal of Radiation Biology*. 89(12): 1053-1060.
- Aliko, V., Qirjo, M., Sula, E., Morina, V., Faggio, C. 2018. Antioxidant defense system, immune response and erythron profile modulation in gold fish, *Carassius auratus*, after acute manganese treatment. *Fish & Shellfish Immunology*. 76: 101-109.
- Andrulewicz, E., Napierska, D., Otremba, Z. 2003. The environmental effects of the installation and functioning of the submarine SwePol Link HVDC transmission line: a case study of the Polish Marine Area of the Baltic Sea. *Journal of Sea Research*. 49(4): 337-345.
- Aytekin, Y., Yüce, R. 2008. Ovary maturation stages and histological investigation of ovary of the Zebrafish (*Danio rerio*). *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 51(3): 513-522.
- Bernabò, N., Tettamanti, E., Pistilli, M., Nardinocchi, D., Berardinelli, P., Mattioli, M., Barboni, B. 2007. Effects of 50 Hz extremely low frequency magnetic field on the morphology and function of boar spermatozoa capacitated in vitro. *Theriogenology*. 67(4): 801-815.
- Bradford, Y.M., Toro, S., Ramachandran, S., Ruzicka, L., Howe, D.G., Eagle, A., Kalita, P., Martin, R., Taylor Moxon, S.A., Schaper, K. 2017. Zebrafish models of human disease: gaining insight into human disease at ZFIN. *ILAR Journal*. 58(1): 4-16.
- Cecconi, S., Gualtieri, G., Di Bartolomeo, A., Troiani, G., Cifone, M.G., Canipari, R. 2000. Evaluation of the effects of extremely low frequency electromagnetic fields on mammalian follicle development. *Human Reproduction*. 15(11): 2319-2325.
- Clelland, E., Peng, C. 2009. Endocrine/paracrine control of zebrafish ovarian development. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 312(1-2): 42-52.

- Gill, A.B., Kimber, J.A. 2005. The potential for cooperative management of elasmobranchs and offshore renewable energy development in UK waters. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 85(5): 1075-1081.
- Han, J., Cao, Z., Liu, X., Zhang, W., Zhang, S. 2010. Effect of early pregnancy electromagnetic field exposure on embryo growth ceasing. *Journal of Hygiene Research*. 39(3): 349-352.
- Hoo, J.Y., Kumari, Y., Shaikh, M.F., Hue, S.M., Goh, B.H. 2016. Zebrafish: a versatile animal model for fertility research. *Biomed Research International*. 2016: 1-20.
- Khaki, A.A., Khaki, A., Gharachour, L.S., Khourshidi, F., Taj, A.N., Madinei, N. 2008. Pre and post natal exposure of 50 Hz electromagnetic fields on prostate glands of rats: an electron microscopy study. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*. 6(2): 77-82.
- Khoshnood, Z. 2017. Effects of environmental pollution on fish: a short review. *Transylvanian Review of Systematical and Ecological Research*. 19(1): 49-60.
- Liew, W.C., Orbán, L. 2014. Zebrafish sex: a complicated affair. *Briefings in Functional Genomics*. 13(2): 172-187.
- Lines, J., Kestin, S. 2005. Electric stunning of trout: power reduction using a two-stage stun. *Aquacultural Engineering*. 32(3-4): 483-491.
- Loghmannia, J., Heidari, B., Rozati, S.A., Kazemi, S. 2015. The physiological responses of the Caspian kutum (*Rutilus frisii kutum*) fry to the static magnetic fields with different intensities during acute and subacute exposures. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 111: 215-219.
- Mayden, R.L., Tang, K.L., Conway, K.W., Freyhof, J., Chamberlain, S., Haskins, M., Schneider, L., Sudkamp, M., Wood, R.M., Agnew, M. 2007. Phylogenetic relationships of *Danio* within the order Cypriniformes: a framework for comparative and evolutionary studies of a model species. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*. 308(5): 642-654.
- Nagahama, Y., Yamashita, M. 2008. Regulation of oocyte maturation in fish. *Development, Growth & Differentiation*. 50: S195-S219.
- Nishimura, I., Oshima, A., Shibuya, K., Negishi, T. 2011. Lack of teratological effects in rats exposed to 20 or 60 kHz magnetic fields. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*. 92(5): 469-477.
- Peneyra, S.M., Cardona-Costa, J., White, J., Whipps, C.M., Riedel, E.R., Lipman, N.S., Lieggi, C. 2018. Transmission of *Pseudoloma neurophilia* in laboratory zebrafish (*Danio rerio*) when using mass spawning chambers and recommendations for chamber disinfection. *Zebrafish*. 15(1): 63-72.
- Ribas, L., Piferrer, F. 2014. The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research. *Reviews in Aquaculture*. 6(4): 209-240.
- Roshangar, L., Hamdi, B., Khaki, A., Rad, J.S., Soleimani-Rad, S. 2014. Effect of low-frequency electromagnetic field exposure on oocyte differentiation and follicular development. *Advanced Biomedical Research*. 2(3): 1-7.
- Santini, S.J., Cordone, V., Falone, S., Mijit, M., Tatone, C., Amicarelli, F., Di Emidio, G. 2018. Role of mitochondria in the oxidative stress induced by electromagnetic fields: focus on reproductive systems. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018:1-18.
- Schreck, C. 2000. Accumulation and long-term effects of stress in fish. *The Biology of Animal Stress*. 1: 147-158.
- Schulte, P.M. 2014. What is environmental stress? Insights from fish living in a variable environment. *Journal of Experimental Biology*. 217(1): 23-34.
- Sedigh, E., Heidari, B., Roozati, A., Valipour, A. 2019. The Effect of Different Intensities of Static Magnetic Field on Stress and Selected Reproductive Indices of the Zebrafish (*Danio rerio*)

- During Acute and Subacute Exposure. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 102(2): 204-209.
- Shabanipour, N., Heidari, B. 2017. A histological study of the zona radiata during late oocyte developmental stages in the Caspian Sea mugilid, *Liza aurata* (Risso 1810). *Journal of Morphological Sciences*. 21(4): 191-195.
- Solek, P., Majchrowicz, L., Koziowski, M. 2018. Aloe arborescens juice prevents EMF-induced oxidative stress and thus protects from pathophysiology in the male reproductive system in vitro. *Environmental Research*. 166: 141-149.
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., Smith, C. 2008. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*. 83(1): 13-34.
- Tenorio, B.M., Jimenez, G.C., Morais, R.N., Torres, S.M., Albuquerque Nogueira, R., Silva Junior, V.A. 2011. Testicular development evaluation in rats exposed to 60 Hz and 1 mT electromagnetic field. *Journal of Applied Toxicology*. 31(3): 223-230.
- Valberg, P., Kavet, R., Rafferty, C. 1997. Can low-level 50/60 Hz electric and magnetic fields cause biological effects? *Radiation Research*. 148(1): 2-21.
- Vargas, R., Mackenzie, S., Rey, S. 2018. 'Love at first sight': the effect of personality and colouration patterns in the reproductive success of zebrafish (*Danio rerio*). *PloS One*. 13(9): e0203320.
- Wang, H., Zhang, X. 2017. Magnetic fields and reactive oxygen species. *International Journal of Molecular Sciences*. 18(2175): 1-20.