فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۳۳، جلد ۹، شماره ۲، بهار۹۵، صفحه ۲۳ تا ۳۱

بررسی اثر علف کش گلیفوزیت بر روی اووژنز و ساختار بافتی تخمدان در موش صحرایی بالغ

پریوش کریمی[۱]، حبیب اله جوهری[۲]، وحید حمایت خواه جهرمی[۳]،اسماعیل فتاحی[۴]
۱–کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم. ایران.
۲– استادیار گروه زیست شناسی، واحد داراب، دانشگاه آزاد اسلامی، داراب. ایران.Hjowhary@yahoo.co.uk
۳– استادیار گروه زیست شناسی ، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم. ایران.
٤– گروه زیست شناسی ، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل. ایران.

تاریخ دریافت:۹٤/۱۰/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۵/۲/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: گلیفوزیت با نام تجاری رانداپ به عنوان علف کشی از خانواده اسید فسفونیک(نمک آمین ایزوپروپیل) به عنوان یک سم سیستمیک برای کنترل تمام گیاهان هرز به کار می رود. در این مطالعه اثر آن بر ساختار بافتی تخمدان و اووژنز در موش صحرایی بالغ بررسی گردید.

روش کار: ۵۰ سر موش صحرایی بالغ ماده نژاد ویستار با وزن تقریبی ۱۵±۲۰۰ گرم انتخاب و به پنج گروه ۱۰ تایی در قالب گروه-های کنترل، شاهد، تجربی ۱، تجربی ۲ و تجربی ۳ تقسیم شدند. گروه کنترل هیچ گونه حلال یا دارویی دریافت نکرد. گروه شاهد روزانه یک بار ۰/۲ سی سی سرم فیزیولوژی و به گروه های تجربی ۱، ۲ و ۳ یک بار در روز به ترتیب مقادیر ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن سم گلیفوزیت رقیق شده طی ١٤ روز به صورت درون صفاقی تزریق و پس از تشریح و جداسازی تخمدان موش‌ها، مقاطع بافتی از نظر تعداد فولیکول ثانویه، گراف، جسم زرد و آترزی مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته ها: یافته های پژوهش حاضر نشان داد که گلیفوزیت گرچه بر وزن تخمدان تأثیر معنی داری نداشته است ولی تعداد فولیکول ثانویه، گراف، جسم زرد و آترزی را در مقایسه با گروه کنترل افزایش داده است(p ۰/۰۵). از طرفی فولیکول های اولیه در گروه های تجربی ۲ و ۳ افزایش معنی داری در مقایسه با گروه های شاهد و کنترل داشت(p ۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: گلیفوزیت می تواند باعث تغییراتی در تعداد فولیکول های تخمدان و ایجاد اختلال در فرآیند اووژنز گردد.

واژه های کلیدی: گلیفوزیت، اووژنز، تخمدان، موش صحرایی.

مقدمه

گلیفوزیت جزء سموم ارگانوفسفره، بی رنگ و نقطه جوش آن ۱۸۷ درجه سانتی‌گراد و نیمه عمر آن در بدن حیوانات ۱۲ ساعت می‌باشد(۶). گلیفوزیت(رانداپ) به عنوان یک علف‌کش با فرمولاسیون مایع و بی‌رنگ است که به عنوان یک سم غیرانتخابی عمومی و سیستمیک برای کنترل تمام گیاهان هرز، نازک برگ و پهن برگ(یکساله و چند ساله در باغات و زمین‌های زراعی و غیر زراعی) به صورت مایع قابل حل در آب فرموله می‌شود. رانداپ بعد از آماده سازی اثر سمی بالایی دارد و از طریق پوست جذب می‌گردد. به دلیل خصوصیات منحصر به فرد و قیمت اندک آن، موجب شده تا به صورت علف‌کشی رایج در سطح دنیا مطرح شود(۱۸). کاربرد گلیفوزیت بیشتر بر روی اندام‌های زیرزمینی و علف‌های هرز نازک برگ و پهن برگ(یک ساله و چندساله)، پیچک، تمشک وحشی، کنگر صحرایی، قیاق، بیدگیاه، سس یونجه می‌باشد و در باغات میوه و مرکبات، تاکستان ها، مزارع نیشکر، زمین‌های زراعی پس از برداشت محصول، اراضی غیرزراعی، جوی ها و کانال‌های آبیاری استفاده می‌شود(۱۸). اثرات ترکیبات ارگانو فسفره به دو صورت حاد و مزمن می‌باشد که

باعث تحریک دستگاه عصبی پاراسمپاتیک(۶) و بروز بعضی بیماری ها از جمله سرطان می‌باشد. این سم از راه تنفس، پوست و گوارش جذب می‌شود(۱۳). مطالعات نشان می‌دهند استرس اکسیداتیو نقش مهمی در پاتوژنز بیماری‌های مختلفی از قبیل سرطان، دیابت، بیماری‌های قلبی و عروقی، پارکینسون، شیزوفرنی، آترواسکلروزیس، بیماری‌های ریوی و کاتاراکت دارد(۱۶). مطالعات انجام شده تاکنون نشان داده که گلیفوزیت باعث تولید گونه های اکسیژن فعال و استرس اکسیداتیو در لنفوسیت های انسان(۱۴ ،۱۰)، سلول های پوست انسان(۹)، لنفوسیت های گاو(۱۱)، خوک بزرگ آمریکایی(۵)، موش های باردار و جنین آن(۲) و سلول-های کبدی موش صحرایی (۷) می شود. با توجه به این که تولید مثل به عنوان مهم ترین مسئله هر موجود زنده و مسئول حفظ گونه در طی نسل های متمادی است و از آن جا که جنس مونث از نظر تولید مثلی بسیار پیچیده می باشد و با این پیش بینی که تاثیر این سم می تواند باعث اختلال در فرآیند های اووژنز و تولید مثلی آن گردد، هدف ما از انجام این پژوهش بررسی اثر سم بر دستگاه تولید مثلی موش صحرایی ماده است.

مواد و روش ها

۵۰ سر موش صحرایی ماده بالغ نژاد ویستار با سن دو ماه و نیم و وزن تقریبی ۱۵±۲۰۰ گرم تهیه و در دمای ۲±۲۲ درجه سانتی گراد و رطوبت ۵۵-۵۰ درصد و دوره ی ۱۲ ساعت روشنایی و۱۲ ساعت تاریکی نگه-داری و حیوانات در ۵ گروه ۱۰ تایی شامل تجربی۱، ۲ و ۳، شاهد و کنترل تقسیم بندی شدند. گروه کنترل هیچ گونه حلال یا دارویی دریافت نکرد. گروه شاهد روزانه یک بار ۰/۲ سی سی سرم فیزیولوژی به صورت تزریق صفاقی دریافت کرد و به گروه های تجربی ۱، ۲ و ۳ یک بار در روز به ترتیب مقادیر ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن سم گلیفوزیت رقیق شده طی ۱۴ روز به طریق درون صفاقی تزریق شد.

پس از طی دوره تیمار، موش ها تشریح و تخمدان ها از بدن خارج گردید. پس از توزین تخمدان ها با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱، نمونه هادر فرمالین ۳ درصد به مدت ۴۸ ساعت تثبیت شدند. پس از گذراندن مراحل استاندارد تهیه مقاطع بافتی، آبگیری، شفاف سازی، جایگزینی و قالب گیری، از بافت تخمدان مقاطعی به ضخامت ۵ میکرو متر تهیه ود به روش هماتوکسین – ائوزین رنگ آمیزی و با میکروسکوپ نوری شمارش فولیکول های بدوی، اولیه، ثانویه، آترتیک، گراف و جسم زرد انجام شد. داده های حاصل از شمارش تعداد فولیکول ها و جسم زرد در گروه های مختلف توسط نرم افزار SPSS و از طریق آزمون ANOVA به طور جداگانه آنالیز و با یک دیگر مقایسه شدند و نمودارهای آن ها، به کمک نرم افزار Excel رسم گردیدند.

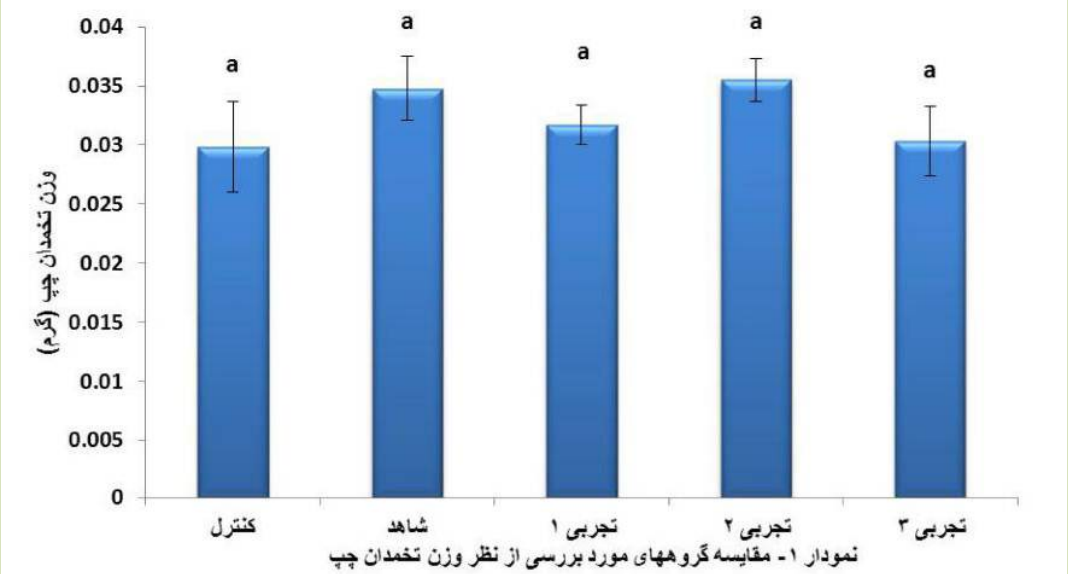
نتایج

نتایج تحقیق حاضر نشان می دهد که گلیفوزیت گرچه بر وزن تخمدان تأثیر معنی داری نداشته است ولی تعداد فولیکول ثانویه، گراف، جسم زرد و آترزی را در مقایسه با گروه کنترل افزایش داده است(p ۰/۰۵). از طرفی فولیکول های اولیه در گروه های تجربی ۲ و ۳ افزایش معنی داری در مقایسه با گروه های شاهد و کنترل دارد(p ۰/۰۵)(شکل ۱ و نمودارهای ۱-۸).

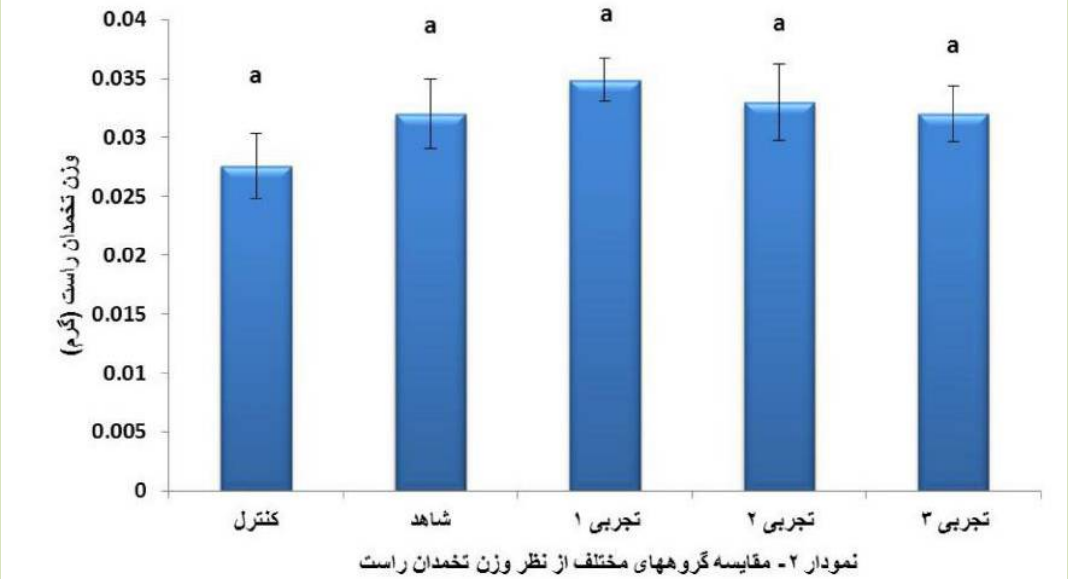
بحث و نتیجه گیری

مطالعات انجام شده تاکنون برخی از اثرات گلیفوزیت از جمله اختلال در عملکرد غدد درون ریز، عملکرد سیستم ایمنی، باروری در انسان و دیگر پستانداران، پرندگان و دوزیستان را نشان داده است(۱۵، ۱). در بررسی های دیگری که بر روی اثر گلیفوزیت و پاراکوات بر روی بیضه و تخمدان دوزیستان انجام شده بیان گردید که گلیفوزیت باعث مهار ۱۷- بتا استرادیول

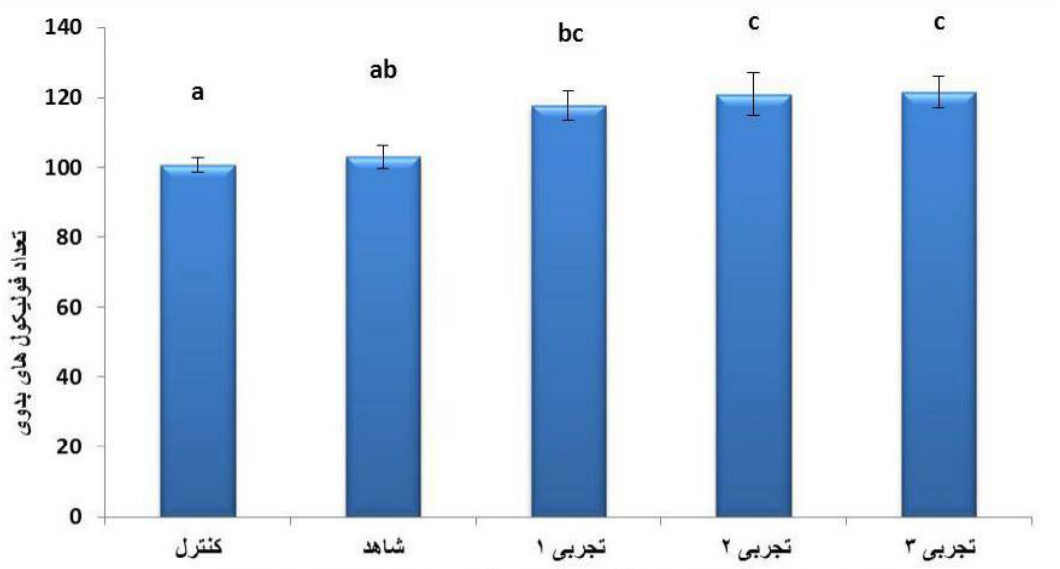
شده و در نتیجه در استروئیدوژنز نوعی اختلال ایجاد کرده که این می تواند بر اثر گونه های واکنشی اکسیژن یا همان اکسیژن فعال باشد(۱۲).



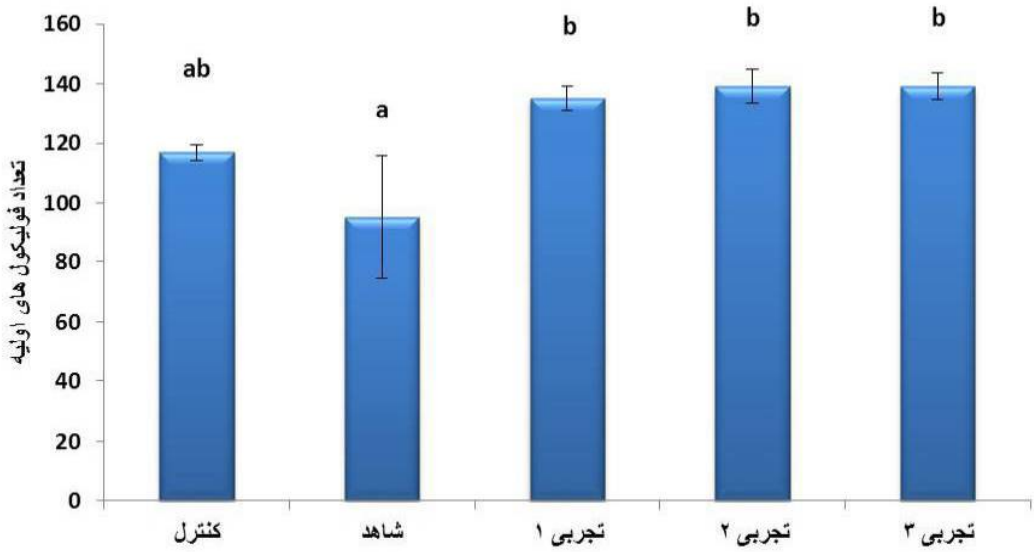
نمودار ۱- مقایسه گروههای مورد بررسی از نظر وزن تخمدان چپ



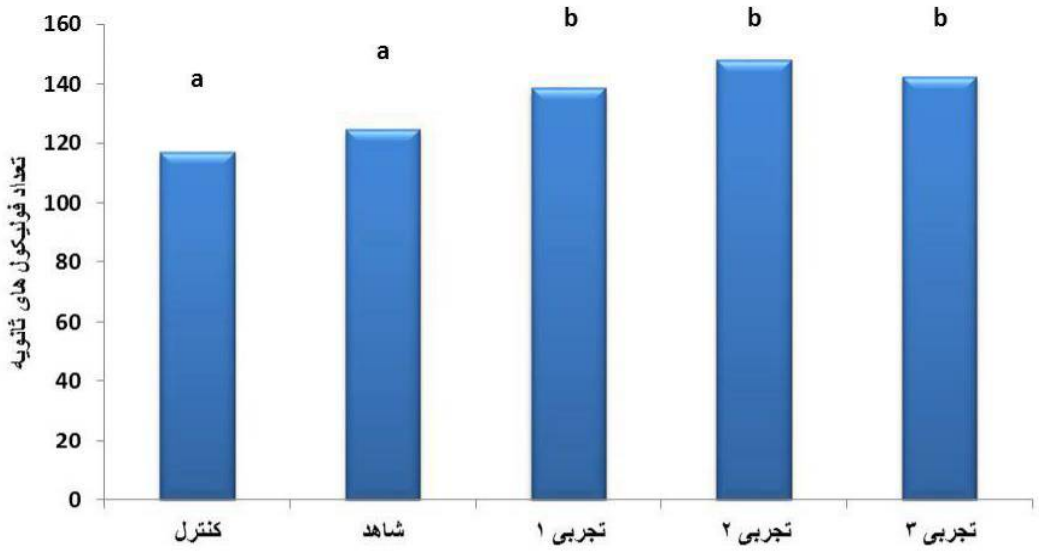
نمودار ۲- مقایسه گروههای مختلف از نظر وزن تخمدان راست



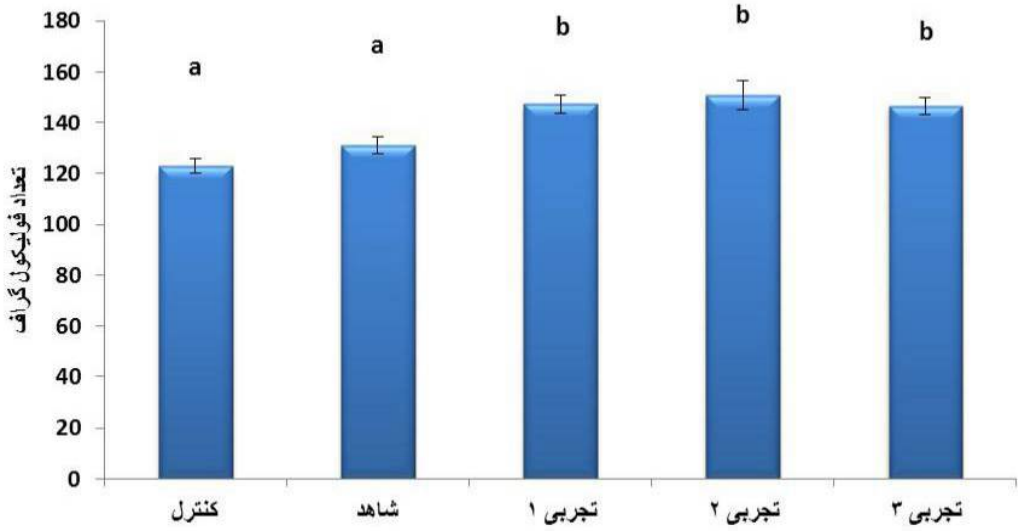
نمودار ۳- مقایسه گروههای مختلف از نظر تعداد فولیکول های بدوی (پریموردیال)



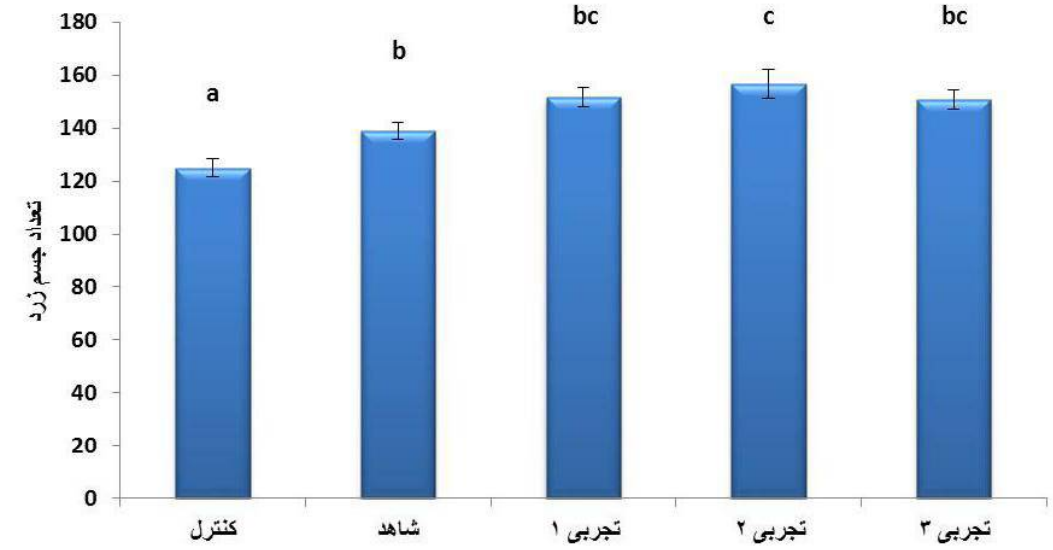
نمودار ۴ – مقایسه گروههای مختلف از نظر تعداد فولیکول های اولیه



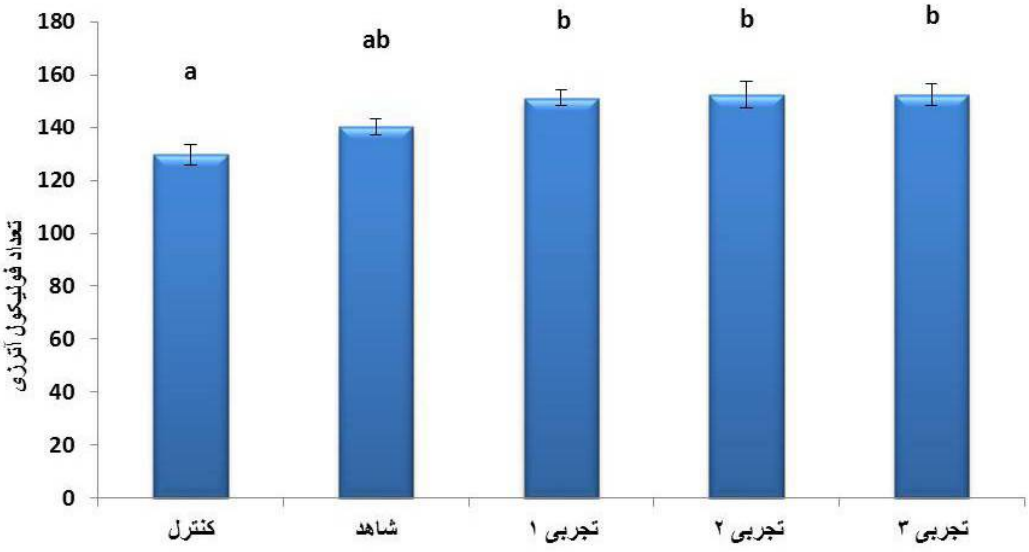
نمودار ۵– مقایسه گروههای مورد بررسی از نظر تعداد فولیکول های ثانویه



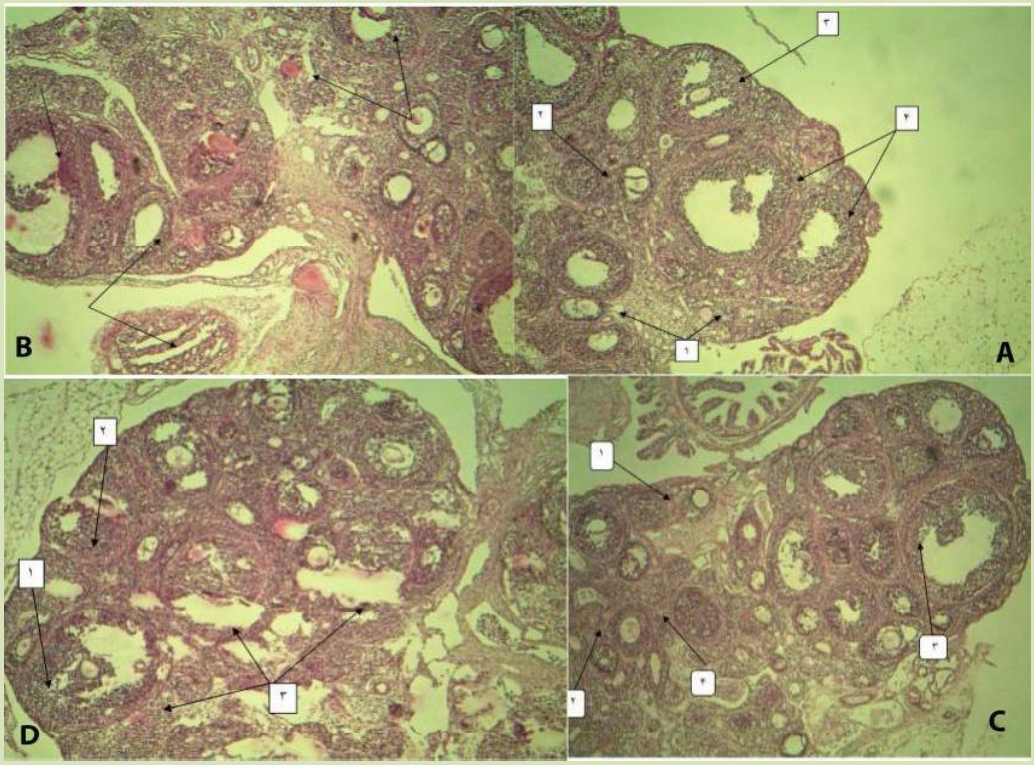
نمودار ۶– مقایسه گروههای مورد بررسی از نظر تعداد فولیکول گراف



نمودار ۷– مقایسه گروههای مورد بررسی از نظر تعداد جسم زرد



نمودار ۸. مقایسه گروههای مورد بررسی از نظر تعداد فولیکول آترزی



شکل ۱- اثر گلیفوزیت با غلظت های متفاوت بر روی بافت تخمدان بزرگنمایی X۱۰۰

A: گروه تجربی ۱(۱-ثانویه ۲- جسم زرد ۳-فولیکول گراف ۴- فولیکول آترتیک)، B:گروه تجربی ۳(قسمت های مشخص شده فولیکول های آترتیک را نشان می دهد)، C: گروه کنترل(۱ -فولیکول اولیه ۲-فولیکول ثانویه ۳-فولیکول گراف ۴- جسم زرد)، D:گروه تجربی ۲(۱-فولیکول ثانویه ۲- جسم زرد ۳- فولیکول آترتیک).

مطالعات ۲۶ ماه تغذیه مزمن در موش ها نشان داد که تیمار دوز تا ۳۱/۵ میلی گرم برکیلوگرم در روز در موش نر و ۳۴ میلی گرم بر کیلوگرم در روز در موش ماده هیچ اثر قابل توجهی در وزن بدن، وزن اندام، اندام نسبت به وزن بدن و پارامترهای هماتولوژیکی و شیمی بالینی وجود نداشته است که این نتایج با یافته های پژوهش حاضر هم خوانی دارد(۱۷). استرس اکسیداتیو ناشی از ایجاد رادیکال‌های آزاد است و میتوکندری‌ها محل اصلی تولید رادیکال‌های آزاد شناخته می‌شوند(۳). با تغییر خصوصیت سلولی، سلول های اووسیت و فولیکولی کارایی طبیعی خود را از دست می دهند. در مطالعه و بررسی آسیب سیتوژنیک DNA در گلبول قرمز ماهی قرمز که در معرض این علف کش قرار گرفتند به این نتیجه رسیدند که این علف کش بر روی ساختمان هستک ها اثر و باعث ایجاد ناهنجاری هسته ای و از بین رفتن DNA می شود(۶،۴). گلیفوزیت با اثر بر ساختار DNA و پروتئین های سلولی می تواند باعث تغییر عملکرد سلول شود. چنان که تکوین غلاف فولیکولی به طور مستقیم تحت تأثیر شاخص های مترشحه از لایه گرانولوزا صورت می گیرد، بنابر این کاهش لایه گرانولوزا می تواند رشد غلاف فولیکولی را نیز تحت تأثیر گذارد. چنان که گفته شد، آسیب های سلولی ایجاد شده با سم های علف کش به دلایل گوناگون می تواند ایجاد شود. اما این تأثیرات عمدتاً با تحت تأثیر قراردادن ساختار و عملکرد DNA است. اثر تخریبی سم گلیفوزیت بر روی بافت غدد درون ریز و دودمان

سلولی(۸)، در جهت تأیید نتیجه پژوهش حاضر بوده است. نیز با توجه به اثر احتمالی گلیفوزیت در تغییر غلظت های طبیعی گنادوتروپین ها در زمان تزریق می-توان این گونه نتیجه گرفت که با تکوین غیر طبیعی سلول های فولیکولی و کاهش ضخامت لایه گرانولوزا و غلاف فولیکولی، استروژن سازی نیز کاهش می یابد. این گروه از علف کش ها دارای خاصیت الکیلاسیون هستند، به این ترتیب که می توانند بر DNA تأثیرگذار باشند. آن ها هم چنین دارای خصوصیت الکتروفیلیک می باشند که می توانند پروتئین های سلولی و هسته آن را تحت تأثیر قرار دهند. با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق، علف کش گلیفوزیت می تواند شاخص های تولید مثلی جنس ماده را تحت تأثیر قرار دهد البته مقدار استفاده از این علف کش، نوع موجود مورد مواجهه با سم و طریقه ی جذب سم در بروز اثر، بسیار مهم است. با وجود این در تعمیم این نتایج به انسان، باید مطالعه بیشتری انجام گیرد.

منابع

1.Benachour, N., Siphatur, H., Moslemi, S. (2007). Time- and dose-dependent effects of Roundup on human embryonic and placental cells. Arch Environ Contam Toxicol, 53; 126-33.

2.Beuret, CJ., Zirulnik, F., Giménez, MS. (2005). Effect of the herbicide glyphosate on liver lipo peroxidation in pregnant rats and their fetuses. Repro Toxicol, 19(4); 501-4.

3.Cadnes, E., Davies, KJ. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and again. Free Radical Boil Med, 29(3-4); 222-230.

4.Çava , T., Könen, S. (2007). Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish(*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. Mutagenesis, 22(4); 263-268 .

5.Costa, MJ., Monteiro, DA., Oliveira-Neto, AL. (2008). Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original. Ecotoxicol, 173;153-63 .

6.De Roos, AJ., Zahm, SH., Cantor, KP. (2003). Integrative assessment of multiple pesticides as risk for non- Hodgkin.s lymphoma among men. Occupational and Environmental medicine, 60; e 11.

7.El-Shenawy, NS. (2009). Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. Environ Toxicol Phamacol, 28(3); 39-85.

8.Gasnier, C., Dumont, C., Benachour, N. (2009). Glyphosate – based toxic and endocrine disruptors in human cell line. Toxicology, 262(3); 184-191.

9.Gehin, A., Guyon, C., Nicod, L. (2006). Glyphosate-induced antioxidant imbalance in HaCaT: The protective effect of Vitamins C and E. Environmental Toxicology and Pharmacology, 22(1); 27-34.

10. Lioi, MB., Scarfi, MR., Santoro, A. (1998a). Cytogenetic damage and induction of pro-oxidant state in human lymphocytes exposed in vitro to gliphosate, vinclozolin, atrazine, and DPX-E9636. Environ Mol Mutagen, 32; 39-46.

11. Lioi, MB., Scarfi, MR., Santoro, A. Genotoxicity and oxidative stress induced by pesticide exposure in bovine lymphocyte cultures in vitro. Mutat Res, 403(1-2); 13-20.

12. Luana, Q., Ennio, M., Oretta, M. (2009). Effect of paraquat and glyphosate on steroidogenesis in gonads of frog Rana esculenta in vitro. Pesticide, 716-20.

13. Morrison, H. I., Wilkins, K., Semenciw, R., Mao, Y., Wigle, D. (1992). Herbicides and Cancer. Journal of the National Cancer Institute, 84(24); 1866–1874.

14.Pieni ek, D., Bukowska, B., Duda, W. (2004). Comparison of the effect of roundup ultra 360 SL pesticides and its active compound glyphosate on human erythrocytes. Pestic Biochem Physiol, 79;58-63.

15. Richard, S., Moslemi, S., Sipahutar, H. (2005). Differential effects of glyphosate and Roundup on human placental cells and aromatase. Environ Health Perspect, 113(6);

16. Scheffler, IE. (2000). A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. Mitochondrion, 1(1); 3-31.

17.USEPA (U.S. Environmental Protection Agency). (1992). Final drinking water criteria document for glyphosate. health and ecological criteria division. office of science and technology. office of water. Washington, D.C.

18. Williams, GM., Kroes, R., Manro, IC. (2000). Safety evaluation and risk assessment of

herbicide roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. Regulat Toxical Pharmacol, 31; 117-165 .