تاثیر آلاینده بیس فنل آ بر سطوح سلولی و مولکولی در ماهی شانک زرد باله (*Acanthopagrus latus*)

احمد نگین تاجی[۱]، بیتا ارچنگی[۱*]، عبدالعلی موحدی نیا[۱]، علیرضا صفاهیه[۱]، غلامرضا اسکندری[۲]

۱. گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
۲. پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور

چکیده

امروزه بیس فنل آ (BPA) به طور گسترده ای در تولید پلاستیکهای پلی کربناته و رزین های اپوکسی به کار می رود. حضور این ماده در فاضلاب شهری و پساب های صنعتی و ورود به اکوسیستم های آبی تاثیر زیان باری برروی موجودات آبزی می گذارد. در این مطالعه، اثر BPA بر القای ناهنجاری های هسته ای (روش تست MN) و تخریب DNA کبدی (روشDNA Unwinding Assay) در جنس نر ماهی شانک زردباله (*Acanthopagrus latus*) مورد بررسی قرار گرفته است. ماهیان طی دو هفته و به صورت تزریق درون صفاقی، غلظت های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکروگرم بر گرم وزن بدن ماهیان از BPA را به صورت محلول در روغن نارگیل دریافت نمودند. گروه کنترل حلال، تنها روغن نارگیل را دریافت کردند در حالیکه برروی ماهیان کنترل هیچگونه تزریقی صورت نگرفت. از ماهیان در روزهای ۰، ۷ و ۱۴ نمونه برداری به عمل آمد. جهت بررسی سمیت سلولی BPA، تعداد ناهنجاریهای هسته ای موجود در اریتروسیت های خون ماهیان شانک زردباله مورد ارزیابی قرار گرفت. BPA باعث القای میکرونوکلئوس در اریتروسیت های ماهیان تیمار شده در مقایسه با گروه کنترل و در روندی وابسته به دوز گردید. بعلاوه، میزان آسیبDNA کبدی ماهیان شانک زردباله به روش واسرشته کردن DNA تحت محیط قلیایی بررسی گردید. نتایج حاصل نشان دهنده کاهش میزان یکپارچگی DNA کبدی ماهیان تیمار شده با غلظت های مختلف BPA پس از ۷ و ۱۴ روز از در معرض قرار گیری در مقایسه با ماهیان کنترل بود. این روند معنی داری در هفته دوم آزمایش نیز به طور چشمگیری ادامه یافت. نتایج مطالعه حاضر مؤید پتانسیل بالای ژنوتوکسیک BPA می باشد. علاوه بر آن می توان اذعان نمود که تستهای بکار رفته در مطالعه اخیر (آزمایش میکرونوکلئوس و شکستگی رشته DNA) بیومارکرهای سلولی و مولکولی حساس و مناسبی جهت سنجش BPA محسوب می شوند.

واژگان کلیدی: بیس فنل آ، ژنوتوکسیکولوژی، تست MN، تست DNA Unwinding ، شانک زرد باله(*Acanthopagrus latus*)، خور موسی

۱. مقدمه

امروزه به اثبات رسیده است که مواد آلاینده موجود در دریا پیامد های ناگوار مختلفی در سطوح فرد، جمعیت و اکوسیستم دارند. یعنی بر عملکرد اندام‌ها، وضعیت تولیدمثل، اندازه جمعیت و در نهایت تنوع زیستی تأثیر منفی می‌گذارند (Viarengo *et al.*, 2007). بسیاری از این مواد به طور بالقوه برای موجودات آبزی سمی، ژنوتوکسیک و سرطان زا هستند (Jha, 2004). یکی از این ترکیبات، بیس فنل آ می باشد که دارای پتانسیل اختلال در سیستم اندوکرینی موجودات بوده (Kavlock *et al.*, 1996; Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009)؛ اثر استروژنیک داشته و ژنوتوکسین بودن آن نیز مشاهده شده است (Tiwari *et al.*, 2012). بیس فنل آ یک ماده شیمیایی صنعتی است که به طور گسترده ای به عنوان ماده خام اصلی در تولید پلاستیکهای پلی کربناته و رزین های اپوکسی به کار می رود. تقاضای روزافزون برای استفاده از این ماده در صنایع مختلف در کل دنیا منجر به افزایش تولید بی رویه این ماده شیمیایی گردیده است. در ایران نیز مجتمع پتروشیمی خوزستان که در کنار خورموسی احداث شده است، در حال تولید و استفاده از بیس فنل آ برای تولید محصولات پلیمری مختلف می باشد. حضور این ماده در فاضلاب شهری و پساب های صنعتی وورود به اکوسیستمهای آبی تاثیر زیانباری برروی موجودات آبزی میگذارد.

اثرات در معرض قرار گرفتن محیطی به ژنوتوکسین ها ممکن است تغییرات مستقیم در ژن ها و بیان ژن یا اثرات غیر مستقیم آلاینده ها بر فراوانی ژنی باشد (Andersonand Wild, 1994; Anderson *et al.*, 1994). قرارگرفتن موجودات آبزی در معرض آلاینده های ژنوتوکسیک باعث خطراتی برای سلامت انسان از طریق زنجیره غذایی میشود و همچنین آسیب های اکولوژیک که ممکن است منجر به جهش های قابل توارث و آسیب به تنوع ژنتیکی (درون گونه ای و بین گونه ای) و در نتیجه اثرات معنی داری در طولانی مدت بر بقای جمعیت های طبیعی داشته باشد. مطالعات اکوژنوتوکسیکولوژی شامل برهمکنش فرآیند های فیزیکی و شیمیایی با ماده ژنتیکی(DNA)، مکانیسم های پاسخ به آسیب و اثرات ثانویه شامل سرطان زایی، تراتوژنزیز (ناهنجاریهای تکاملی) و اثرات آنها بر جمعیت هاست (Thomoson *et al.*, 2005).

شانک ماهیان (Sparidae) خانواده‌ای دریایی (به ندرت لب شور و آب شیرین) بوده که در آب‌های اقیانوس اطلس، هند و آرام یافت شده و شامل ۳۳ جنس و ۱۱۵ گونه می‌باشد (Nelson, 2006). بیشتر شانک ماهیان از ماهیان خوراکی مطلوب به حساب آمده و از اهمیت تجاری قابل توجهی برخوردارند (Bauchotand Smith, 1984). خانواده شانک ماهیان دارای ۶ زیر خانواده می باشند (Orrell *et al.*, 2002). شانک زردباله*Acanthopagrus latus* (شکل ۱-۶)، گونه‌ای است که به زیرخانواده Sparinae تعلق دارد .

داشتن ارزش بالایاکولوژیکی و اقتصادی ، ویژگیهای جنسیتی ، میزان صید زیاد جهت مصرف انسانی، سازگاری آسان با شرایط اسارت، در دسترس بودن تکنولوژی پرورش (Sa et al., 2006) و داشتن میزان خون و بافت کافی جهت مطالعه، این ماهی را به گونه ای مهم در مطالعات اکوتوکسیکولوژی خلیج فارس تبدیل نموده است. یکی از زیستگاههای اصلی شانک زردباله در آبهای جنوبی کشور، منطقه خور موسی است. از اینرو ورود پساب های متنوع تاسیسات پتروشیمی به این خور می تواند منجر به مواجهه این گونه با طیف وسیعی از ترکیبات آلاینده از جمله BPA گردد. جهت ارزیابی اثرات بیس فنل آدر سطوح سلولی (سیتوتوکسیک) و مولکولی (ژنوتوکسیک) و همچنین استفاده از ماهی به عنوان

یک مدل بیولوژیکی جهت ارزیابی میزان اثرگذاری ماده مذکور در شرایط آزمایشگاهی، غلظتهای متفاوتی ازاین ماده به ماهیان شانک زردباله صید شده از خورموسی تزریق گردید و اثرات عنوان شده در این سطوح در ماهیان تیمار شده در یک دوره دو هفته ای مورد مطالعه قرار گرفت.

تاکنون هیچ گونه مطالعه ای در رابطه با تاثیرات سیتوتوکسیک یا ژنوتوکسیک BPA بر آبزیان در ایران صورت نگرفته است و مطالعه حاضر اولین تحقیق در این مورد می باشد.

۲. مواد و روش ها

جهت انجام مطالعه حاضر تعداد ۲۰۰ قطعه ماهی شانک زردباله (*Acanthopagrus latus*) ازخور های زنگی و جعفری که از انشعابات خورموسی می باشند؛ صید گردید. ماهیان صید شده درون یک تانک فایبرگلاس ۲۰۰۰ لیتری واقع در سالن تکثیر که با آب فیلتر و تیمار شده با اشعه ماوراء بنفش (UV) پر شده بود؛ به مدت یک هفته جهت حصول اطمینان از سلامت نگهداری شدند.ماهیان به طورتصادفی در۶ تانک ۳۰۰ لیتری (۱۳ قطعه ماهی درهرتانک) توزیع گردیده وبه مدت یک هفته باشرایط محیط آزمایش وتانک‌های ۳۰۰ لیتری محتوی آب دریا (شوری‰۴۸،دمای °C ۲±۲۵/۲،۸ =pH) وتحت سیکل نوری۱۲ ساعت روشنایی/تاریکی سازگاری داده شدند (Pait*et al.*,2003). پارامترهای فیزیکوشیمیایی نیزشامل دما،شوری وpH به صورت روزانه اندازه‌گیری می-شدند. در معرض گذاری ماهیان با BPA به روش تزریق درون صفاقی صورت گرفت (Pait *et al.*,2003).

به منظور تیمار نمودن ماهیان با BPA، پس از بیهوش کردن با ۲- فنوکسی اتانول ۰/۲٪ ، ماهیان ۴ تیمار با دوزهای ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکروگرم BPA به ازای هر گرم وزن بدن در طول ۲ هفته و به صورت دورن صفاقی تزریق شدند (Pait*et al.*,2003). تزریق ها در نصف دوز و دوبار در هفته انجام پذیرفت (۱۳۰-۱۰۰µl برای هر ماهی در هر تزریق).گروه کنترل حلالتنها میزان معینی (حدود ۱۳۰-۱۰۰µl) از حلال (محلول اتانول و روغن نارگیل) را دریافت کردند؛ در حالیکه بر روی ماهیان کنترل هیچگونه تزریقی صورت نگرفت.

در روز شروع آزمایش و قبل از انجام عملیات تزریق، از هر ۶ تانک یک ماهی به صورت تصادفی صید شده و پس از ثبت طول و وزن، از آن ها خونگیری به عمل آمد. نمونه روز صفر به منظور مقایسه با نمونه‌های به دست آمده از گروه‌های کنترل در پایان دوره آزمایش بود (Mollegaard *et al.*,2008). نمونه برداری از ماهیان در روزهای ۷ و ۱۴ پس از تزریق نیز انجام گرفت(McCormick *et al.*, 2005). جهت نمونه‌گیری ابتدا ماهی‌ها به وسیله ۲- فنوکسی اتانول بیهوش شدند. پس از اندازه‌گیری و ثبت وزن و طول کل، با استفاده از سرنگ ۲/۵ میلی‌لیتری تیمار شده با هپارین (۵۰۰۰ واحد بر میلی‌لیتر، ساخت آلمان) از سیاهرگ ساقه دمی آن‌ها خونگیری انجام پذیرفت. پس از خونگیری از هر ماهی و استحصال مقدار خون مورد نیاز (۲/۵ml-۲)، خون موجود در سرنگ، به آرامی به میکروتیوب های از پیش سرد شده و شماره گذاری شده منتقل می شد. نمونه‌های خون گرفته شده تا پایان خونگیری از هر ماهی و قبل از سانتریفیوژ نمودن، در همان میکروتیوب های سرد شده در کنار یخ نگهداری می‌شدند.

برای آنالیز میزان القای میکرونوکلئوس در سلول های اریتروسیت ماهیان، گسترش خونی تهیه گردید. همچنین در روزهای ۷ و ۱۴ از هر تانک ۶ قطعه ماهی صید و خونگیری شدند. لاشه هر ماهی

نیز تا هنگام کالبد شکافی و جداسازی بافت های موردنظر بر روی یخ نگهداری گردید.

به منظور تعیین میزان آسیب ژنومی (شکستگی رشته DNA)از روش آزمایش واسرشته شدن DNA تحت محیط قلیایی استفاده شد(Rao *et al*., 1996). روش واسرشته شدن DNA در محیط قلیایی، روش کمی پایش اثرات محیطی برای آشکارسازی و ارزیابی اثر مواد ژنوتوکسین و سرطان زا درسطح فرد یا موجود زنده است.در این روش محصولات نهایی، DNA تک رشته ای و دو رشته ای است که به وسیله شستشو مجموعه هیدروکسی آپاتیت از هم جدا می شوند و کمیت آنها به وسیله یک رنگ فلورسنت مختص DNA اندازه گیری می شود.

ابتدا استخراج DNA کبد ماهیان شانک زردباله به وسیله روش CTAB انجام پذیرفت (Ching *et al*., 2001). سپس، نمونه های DNA رقیق و به دو قسمت مساوی تقسیم شد. پس از این مرحله با استفاده از روش Rao و همکاران (۱۹۹۶)، که بعد از آن به وسیله Maria و همکاران (۲۰۰۲)، اصلاح شده است، میزان آسیبDNA کبدی مشخص گردید.

آنالیز داده ها

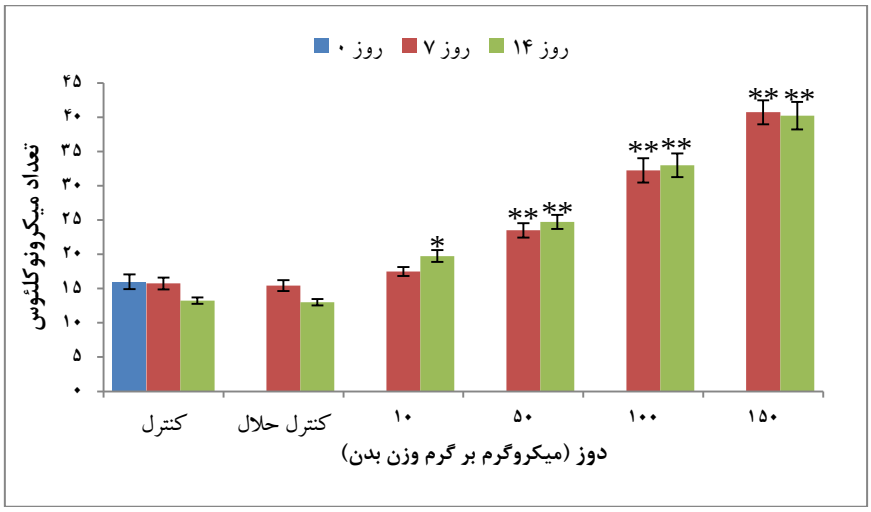
به منظور آنالیز داده های خام حاصل از پژوهش حاضر، از برنامهSPSS.۱۶ استفاده گردید. برای رسم نمودارها از نرم افزار MicrosoftExcel 2007 استفاده شد. تمامی داده‌ها به صورت میانگین ±خطایاستانداردبیانشده است. نرمالیته داده ها با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk بررسی شد و هموژن بودن واریانس داده‌ها (همگنی) با استفاده از آزمون لون در سطح ۹۵٪ صورت گرفت. ($P<0.05$). پس از حصول اطمینان از نرمال بودن داده ها، به منظور بررسی معنی داری اثر غلظت های مختلف BPA، زمان و برهمکنش غلظت و زمان، از آزمون آنالیز واریانس دو طرفه (Two-WayANOVA) استفاده شد. سپس با استفاده ازآنالیز واریانس یکطرفه (One-WayANOVA) و پس آزمون دانکنمعنی داری اختلاف میان تیمارهای مختلف مشخص گردید. به منظور مقایسه میانگین داده‌های یک تیمار در روزهای ۷ و ۱۴ با استفاده از آزمون-T Test با نمونه‌های مستقل محاسبه گردید.

۳. نتایج

القای میکرونوکلئوس در اریتروسیت های ماهی شانک زردباله در اثر غلظت های مختلف BPA

میانگین فراوانی میکرونوکلئوس در گلبول های قرمز ماهی شانک زرد باله در روزهای ۰، ۷ و ۱۴ پس از مواجهه با BPAدرشکل ۱نشان داده شده است. مقایسه آماری میانگین تعداد ریزهسته ها پس از ۲ هفته تیمار با BPA، نشان دهنده اختلاف معنی دار سطوح این آنزیم در بین گروه‌های آزمایشی می باشد. همانطور که از نمودار پیداست BPA باعث القای میکرونوکلئوس در یک رفتار وابسته به غلظت گردیده است. در پایان هفته اول به استثنای تیمار ۱۰ میکروگرم بر گرم، بقیه غلظت ها باعث افزایش معنی داری در فراوانی ریز هسته ها در مقایسه با گروه کنترل و کنترل حلال شده است ($P<0.01$). این افزایش در پایان هفته دوم نیز کاملا مشخص می باشد ($P<0.001$)به طوریکه در این زمان حتی در کمترین غلظت تزریق شده از BPA نیز افزایش معنی داری در فراوانی ریز هسته ها در مقایسه با گروه کنترل مشاهده می شود. با این حال گروه کنترل و کنترل حلال اختلاف معنی داری با یکدیگر و با نمونه روز صفر نشان نداده اند. تیمارهای یکسان در روزهای ۷ و ۱۴ نیز اختلاف معنی داری با هم نداشتند ($P>0.05$). نمونه هایی از میکرونوکلئوس ایجاد شده در اریتروسیت های ماهی شانک زردباله

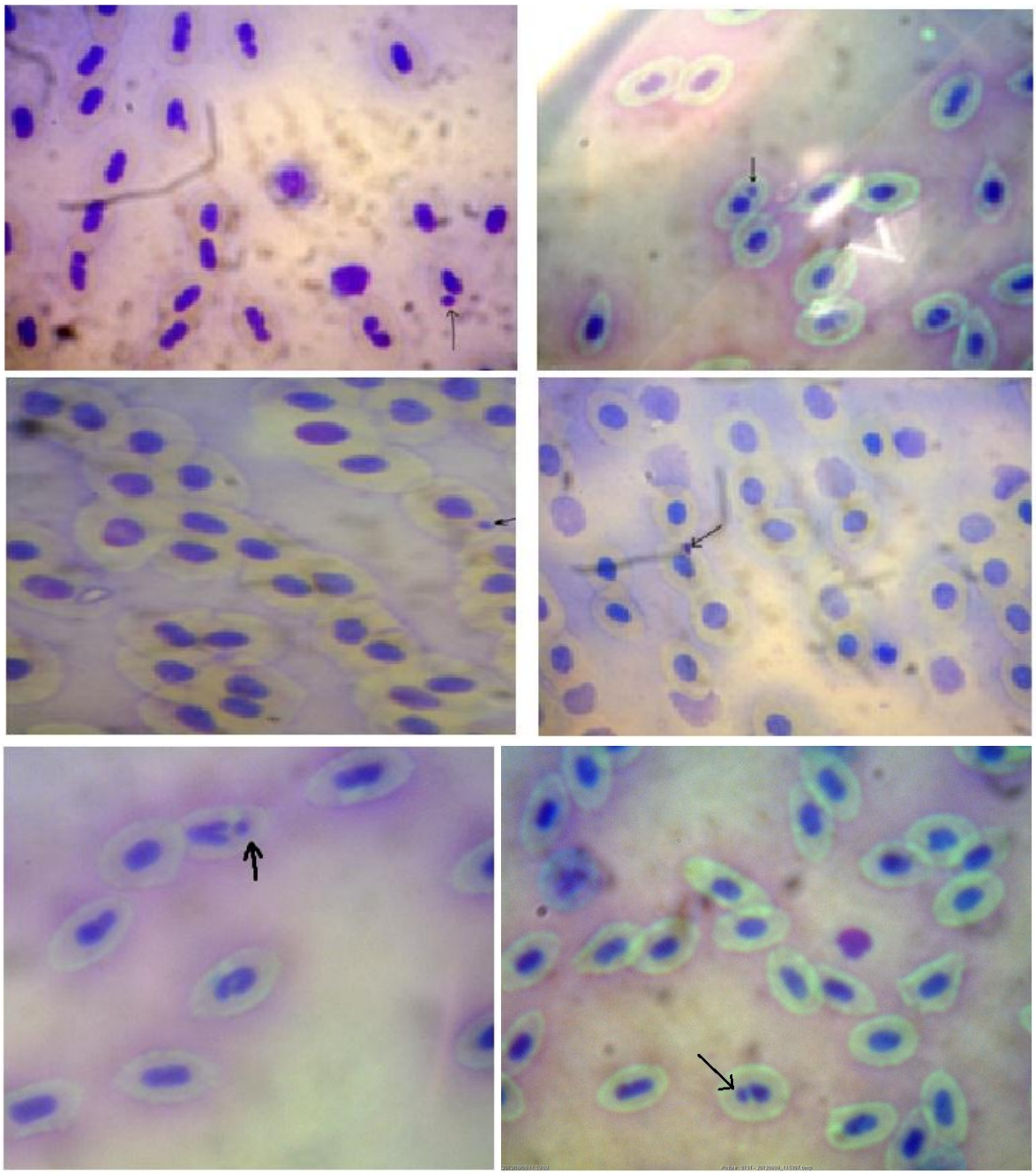
در اثر در معرض قرار گیری به BPAدر شکل ۲
نمایش داده شده است.



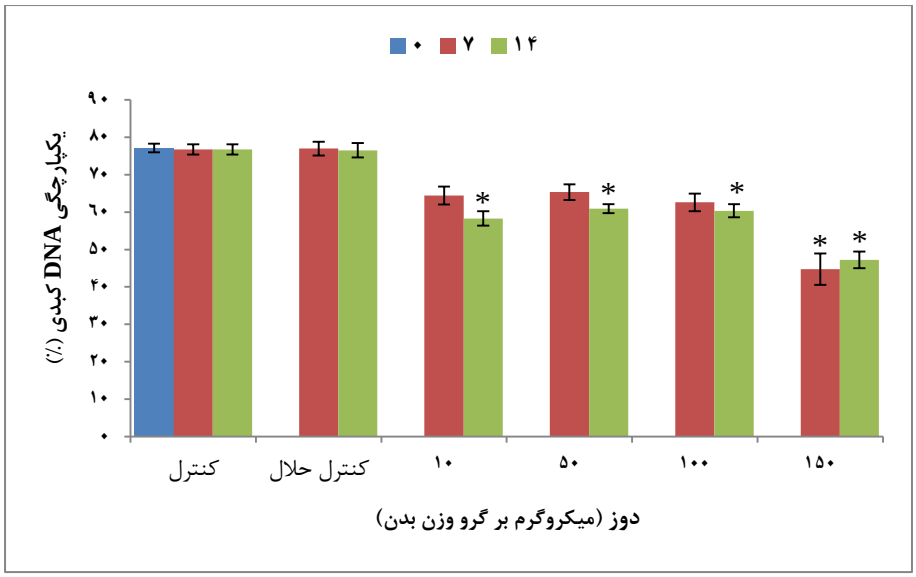
شکل ۱. میانگین فراوانی ریزهسته های القاشده در گلبول های قرمز ماهی شانک زرد باله در مواجهه با غلظت های مختلف BPA در روزهای ۷ و ۱۴ پس از در معرض قرارگیری با این ماده. (**) بیانگر اختلاف معنی دار با گروه کنترل در $P<0.001$. (*) بیانگر اختلاف معنی دار با گروه کنترل در $P<0.01$.

پاسخ ژنوتوکسیسیتی به غلظت های مختلف BPA

آسیبDNA کبدی ماهی شانک زردباله به وسیله غلظت های مختلف از BPA، پس از ۷ و ۱۴ روز از شروع در معرض قرارگیری تحت تأثیر قرار گرفت (شکل ۳). همانطور که از نمودار پیداست میزان یکپارچگی DNA کبدی ماهیان تیمار شده با غلظت های مختلف BPA پس از ۷ روز از در معرض قرار گیری در یک روند وابسته به غلظت کاهش پیدا کرد، اما این کاهش تنها در غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر گرم نسبت به گروه کنترل و کنترل حلال معنی دار بود ($P<0.05$). روند کاهشی وابسته به غلظت DNA کبدی در روز ۱۴ نسبت به گروه کنترل و کنترل حلال به طور مشخص تر در شکل ۳نشان داده شده است، به طوری که در این زمان در تمامی غلظت های تزریق شده از BPA میزان یکپارچگی DNA کبدی نسبت به گروه کنترل و کنترل حلال به طور معنی داری کاهش می یابد ($P<0.05$). از مقایسه گروه های تیمار شده با غلظت یکسان از BPA بین دو زمان نمونه برداری (۷ و ۱۴) اختلاف معنی داری در روند کاهشی یکپارچگی DNA کبدی مشاهده نشد ($P>0.05$). هر چند در روز ۱۴ کاهش بیشتری از یکپارچگی DNA نسبت به روز ۷ ثبت گردید. همچنین، اختلاف معنی داری بین نمونه های روز ۰ و گروه های کنترل و کنترل حلال مشاهده نشد ($P>0.05$).



شکل ۲. میکرونوکلئوس های القا شده در اریتروسیت های ماهیان شانک زردباله تیمار شده با دوزهای مختلف BPA. پیکانها، میکرونوکلئوس را در کنار هسته های اصلی اریتروسیت ها نشان می دهند.



شکل ۳. تغییرات یکپارچگی DNA کبدی ماهی شانک زردباله پس از گذشت ۷ و ۱۴ روز از در معرض قرارگیری با غلظت های مختلف از BPA. (*)بیانگر اختلاف معنیدار نسبت به گروه کنترل می‌باشد ($P<0.05$).

۴.بحث و نتیجه گیری

القای میکرونوکلئوس در اریتروسیت های ماهی شانک زردباله در مواجهه با BPA

با توجه به نتایج مطالعه حاضر، BPA موجب القای میکرونوکلئوس در گلبول های قرمز ماهی شانک زردباله شده است که نشان دهنده پتانسیل بالایBPA در ایجاد سمیت سیتوژنتیکی است. مطالعات متعددی نیز پیش از این درباره اثر القایی ترکیبات زنوبیوتیک بر تولید میکرونوکلئوس صورت گرفته است.Tiwariو همکاران (۲۰۱۲) با بررسی اثرات کلاستوژنیک و جهش زایی BPAبر روی موش اثبات کردند که در معرض گذاری موش های نر و ماده با BPA باعث افزایش معنی دار القای میکرونوکلئوس در اریتروسیت های موش های تیمار شده در مقایسه با گروه کنترل می گردد.

در مطالعه دیگری بر روی ماسل آبی، نشان داده شد که در معرض گذاری ماسل آبی با BPA موجب ایجاد میکرونوکلئوس در سلولهای آبشش این موجود می شود (Barsien *et al.*, 2006). همچنین،Johnson و Parry (۲۰۰۸)، با بررسی اثر القایی BPA بر ایجاد میکرونوکلئوس در رشته سلولهای لیمفوبلاستوئید انسانی و رشته سلولهای V79 همستر چینی، ثابت کردند که BPA با تغییر عملکرد میکروتوبول ها و اثر بر دوک های میتوزی باعث القای میکرونوکلئوس در یک روند وابسته به دوز می گردد.

در مطالعه ای دیگر، Teles و همکاران (۲۰۰۴)، نشان دادند که نونیل فنل باعث القای میکرونوکلئوس در گلبول های قرمز ماهی خاردار (*Dicentrarchus labrax* L) می شود. همینطور،Oliveira و همکاران (۲۰۰۷)، القای وابسته به دوز میکرونوکلئوس را در سلولهای گلبول های قرمز ماهی *Liza aurata* در مواجهه با فنانترن گزارش کردند. در مطالعه Maria و همکاران (۲۰۰۲)، افزایش وابسته به دوز القای میکرونوکلئوس در مارماهی مهاجر *Anguilla anguilla*در مواجهه با غلظت های مختلف از بنزوآلفاپایرن گزارش شده است. در مطالعه ای دیگر، افزایش معنی دار میکرونوکلئوس در گروههای تیمار شده ماهی*Dicentrarchus labrax*با فاضلاب های شهری و صنعتی در مقایسه با گروه کنترل پس از ۹۶ ساعت نیز اثبات شده است (Gravato and Santos, 2003). در مطالعه حاضر نیز همانطور که در شکل ۱ دیده می شود، BPA باعث القای میکرونوکلئوس در گلبول های قرمز ماهی شانک زرد باله پس از گذشت ۷ و ۱۴ روز از در معرض گذاری و در یک رفتار وابسته

به دوز شده است. بنابراین، القای ناهنجاری های هسته ای در اریتروسیت های ماهی شانک زردباله در اثر BPA پس از گذشت ۷ روز از در معرض گذاری نشان می دهد که ماهی شانک زردباله حساسیت بالایی نسبت به این ترکیب زنواستروژن دارد و مدل مناسبی جهت بررسی اثرات ناشی از این گونه ترکیبات می باشد.

پاسخ ژنوتوکسیسیتی ماهی شانک زردباله در مواجهه با BPA

مطالعه حاضر اولین مطالعه در زمینه بررسی آسیب ژنومی در اثر آلاینده ها با استفاده از روش واسرشته کردن DNA تحت محیط قلیایی در ایران می باشد. اگرچه بعضی از مطالعات پیشنهاد کرده اند که BPA اثر جهش زایی ندارد ولی گزارش های متعددی نیز نشان داده اند که BPA جهش های نقطه ای، شکستگی های رشته ای و آناپلوئیدی را القا می نماید (Keri *et al*., 2007). در مطالعه ای که توسط Tsutsui و همکاران (۱۹۹۸)، انجام پذیرفت؛ تیمار نمودن سلول های جنینی همستر سوریه ای با BPA منجر به القای DNA adduct شد. نتایج مطالعه حاضر، نشان دهنده کاهش میزان یکپارچگی DNA کبدی ماهیان شانک زردباله تیمار شده با غلظت های مختلف BPA پس از ۷ و ۱۴ روز از در معرض قرار گیری بود (شکل ۳). کاهش یکپارچگی DNA کبدی در کمترین غلظت از BPA تزریق شده نیز مشاهده گردید که نشان دهنده پتانسیل سرطان زایی BPA در غلظت های پایین می باشد. بیشترین کاهش در غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر گرم ثبت گردید و این نشان از اثرات مخرب مولکولی BPA با افزایش غلظت در معرض قرار گیری است. در مطالعه ای Sangai و Verma (۲۰۱۱)، کاهش وابسته به دوز DNA، RNA و پروتئین را در کبد و کلیه موش های تیمار شده از راه خوراکی با BPA، گزارش نمودند.

در معرض قرارگیری موجودات زنده با ترکیبات زنوبیوتیک منجر به تغییر شکل زیستی این ترکیبات در برخی از اندام های موجودات زنده در اثر آنزیم های فاز ۱ و ۲ و تولید متابولیت های بازفعال خواهد شد(Oliveira *et al*., 2007). برهمکنش این متابولیت های ایجاد شده با DNA بافت های درگیر، به خصوص بافت کبد به عنوان مهمترین اندام پالایشگر و سم زدا منجر به ایجاد محصول افزایشی یا گونه های بازفعال اکسیژن خواه (مسیر های چرخه اکسایش – کاهش) و در نهایت شکستگی رشته های DNA خواهد شد و یکپارچگی DNA بافت موجود در معرض را، تحت تأثیر قرار خواهد داد. آسیب به DNA به صورت مداوم در اندام ها و سلول های مختلف رخ می دهد و این نقاط صدمه دیده، به سرعت ترمیم می گردند و این فرآیندی دائمی و پویا است. بنابراین، مشاهده ضایعات DNA در اثر آلاینده های مختلف نشانگر برهم خوردن تعادل بین این دو فرآیند می باشد، که یا در اثر آسیب های زیاد وارده و یا در اثر کاهش توانایی ترمیم و اصلاح DNA، ناشی از در معرض قرار گیری با ماده آلاینده است (Vock *et al*., 1998). به عنوان مثال، Izzotti و همکاران (۲۰۰۹)، پس از در معرض گذاری موش های ماده با BPA افزایش چند برابری شکل گیری DNA adduct را در بافت های کبد و پستان موش های تیمار شده پس از گذشت ۸ روز در مقایسه با گروه کنترل اثبات کردند. همینطور، در معرض قرار گیری موش های نر و ماده با BPA، آسیب به DNA لنفوسیت های خون، افزایش سطح پلاسمایی ۸-هیدروکسی دئوکسی گوانوزین، افزایش پراکسیداسیون لیپید و کاهش فعالیت گلوتاتیون کبدی این موجود را در پی داشته است (Tiwari *et al*., 2012). آنها این آسیب مولکولی را به متابولیت های BPA که عامل استرس های اکسیداتیو می باشد، نسبت دادند. مطالعات آزمایشگاهی انجام گرفته بر روی سلول های کبدی موش و همچنین مطالعات صورت گرفته بر روی موش های زنده و ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تیمار شده با BPA در شرایط کنترل شده، نشان داده است که متابولیت مهم ایجاد شده ناشی از متابولیسم BPA، گلوکورونید می باشد (Inoue *et al*., 2001; Lindholst *et al*., 2001;

Snyder *et al*., 2000). این متابولیت فاز ۲ غالباً در کبد تولید می شود. متابولیت های مهم دیگر نیز ۸-هیدروکسی دئوکسی گوانوزین و یک مونوسولفات می باشند (Vanden Berg *et al*., 2003). مطالعات دیگر نیز نشان داده است که BPA بوسیله کاهش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی و افزایش فعالیت پراکسیداسیون لیپید، موجب تولید گونه های بازفعال اکسیژن خواه و در نتیجه عامل استرس های اکسیداتیو گردیده است (Bindhumol *et al*., 2003; Chitra *et al*., 2003).با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعات پیشین، کاهش یکپارچگی DNA کبدی ماهیان شانک زردباله تیمار شده با BPA، در مطالعه حاضر را می توان ناشی از تأثیر BPA بر آنزیم های فاز ۲ و همچنین، کاهش فعالیت آنزیم های ترمیم کننده DNA دانست.

نتایج مطالعه حاضر مؤید پتانسیل بالای ژنوتوکسیک BPA می باشد. در حقیقت BPA القا کننده قوی میکرونوکلئوس می باشد که عامل ایجاد آسیب های مخرب سلولی و مولکولی در ماهی شانک زرد باله در این پژوهش گردید. بنابراین، حضور این ترکیب در خورموسی حتی به مقدار اندک می تواند در درازمدت اثرات نامطلوبی بر آبزیان این اکوسیستم به همراه داشته باشد. بعلاوه، با توجه به این نکته که خورموسی منطقه زادآوری و نوزادگاهی بسیاری از آبزیان خلیج فارس می باشد بنابراین، عدم توجه به اثرات زیست محیطی ناشی از این گونه ترکیبات می تواند جمعیت و تنوع آبزیان خلیج فارس را تحت تأثیر قرار دهد. افزایش میکرونوکلئوس و آسیب های مولکولی در روندی وابسته به دوز در دوره زمانی کوتاه در مواجهه با BPA نشان از حساسیت بالای این فاکتورها نسبت به ترکیبات زنوبیوتیک دارد و این فاکتورها می توانند بیومارکرهای مناسبی برای بررسی وضعیت آلودگی محیط و سلامت آبزیان و خصوصاً ماهیان باشند. از طرف دیگر، اثبات شد که ماهی شانک زردباله گونه ای حساس و مناسب برای پاسخ های بیومارکری می باشد. همینطور، با توجه به عدم وجود تلفات در بین ماهیان شانک زردباله در این مطالعه در طول ۱۴ روز، می توان این ماهی را گونه ای مقاوم در برابر آلاینده ها و مدلی مناسب برای مطالعات سم شناسی آبزیان معرفی نمود.

منابع

Anderson, C. 1944. Toxicity thresholds of various substances found in industrial wastes as determined by the use of *Daphnia magna*. Sewage Works Journal 16: 1156–1165.

Anderson, S.L., Wild, G.C. 1994. Linking genotoxic responses and reproductive success in
ecotoxicology. Environmental Health Perspectives 102: 9–12.

Barsiene, J., Syvokiene, J. and Bjornstad, A. 2006. Induction of micronuclei and other nuclear
abnormalities in mussels exposed to bisphenol A, diallylphthalate and tetrabromodiphenyl ether.
Aquatic Toxicology 78: 105–108.

Bindhumol, V., Chitra, K.C. and Mathur, P.P. 2003.Bisphenol A induces reactive oxygen species
generation in the liver of male rats. Toxicology 188: 117-124.

Ching, E.W.K., Siu, W.H.L., Lam, P.K.S., Xu, L., Zhang, Y., Richardson, B.J. and Wu, R.S.S. 2001. DNA adduct formation and DNA strand breaks in green- lipped mussels (*Perna viridis*) exposed to benzo[a]pyrene: dose- and time-dependent relationships. Marine Pollution Bulletin 42:
603–610.

Chitra, K.C., Latchoumycandane, C. and Mathur, P.P. 2003. Induction of oxidative stress by
bisphenol A in the epididymal sperm of rats. Toxicology 185: 119-127.

Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A.M.,
Zoeller, R.T. and Gore, A.C. 2009. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific
statement. Endocrine Reviews 30 (4): 293-342.

Gravato, C. and Santos, M.A. 2003. Genotoxicity biomarkers association with B(a)P biotransformation in Dicentrarchuslabrax L. Ecotoxicology and Environmental Safety 55: 352-358.

Inoue, K.,Zindy, F., Randle, D.H., Rehg, J.E. and Sherr, C.J. 2001. Dmp1 is haplo-insufficient for

and 17β-estradiol. General *and Comparative* Endocrinology142: 280-288.
Møllegaard, H.S. 2008. The Effect of estrogenic compounds on smoltification and the amount of
estrogen receptors in Atlantic salmon (*SalmoSalar*).Master thesis of toxicology, Syddansk
University, Denmark 81 p.
Nelson, J.S. 2006.Fishes of the World.Wiley. USA, New Jersey, 622 p.
Oliveira, M., Pacheco, M. and Santos, M.A. 2007. Cytochrome P4501A, genotoxic and stress
responses in golden grey mullet (*Liza aurata*) following short-term exposure to phenanthrene. Chemosphere 66: 1284–91.
Orrell, T.M., Carpenter, K.E., Musick, J.A. and Graves, J.E. 2002. Phylogenetic and biogeographic
analysis of the Sparidae (Perciformes: Percoidei) from cytochrome b sequences. Copeia23: 618-
631.
Pait, A.S. and Nelson, J.O. 2003.Vitellogenesis in male *Fundulusheteroclitus* (killifish) induced by
selected estrogenic compounds. Aquatic Toxicoliogy 64: 331-342.
Rao, S.S., Neheli, T.A., Carey, J.H., Herbert, A. and Hansen, P.D. 1996. DNA alkaline unwinding
assay for monitoring the impact of environ mental genotoxins. Environmental Toxicology and Water
Quality 11: 351–354.
Sa, R., Ferreira, P. and Oliva-Teles, A. 2006.Effect of dietary protein and lipid levels on growth
nickel on glycogen reserves and protein levels in and feed utilization of white sea bream (*Diplodus*
sargus) juveniles. Aquaculture Nutrition 12: 310-321.
Sangai, N.P. and Verma, R.J. 2011.Quercetin alleviates Bisphenol A-induced changes in nucleic
acid and protein concentration in mice. ActaPoloniaePharmaceutica-Drug Research 68: 867-873.
Snyder, R.W., Maness, S.C., Gaido, K.W., Welsch, F., Sumner, S.C. and Fennell, T. R. 2000.
Toxicology and Applied Pharmacology 168, 225–234.
tumor suppression and modifies the frequencies of Arf and p53 mutations in Myc-induced
lymphomas. Genes and Development 15: 2934–2939.
Izzotti, A., Kanitz, S., D'Agostini, F.,Camoirano, A. and De Flora, S. 2009. Formation of adducts
bybisphenol A, an endocrine disruptor in DNA in vitro and in liver and mammary tissue of mice.
Mutation Research679: 28–32.
Jha, A.N. 2004.Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview. Mutation
Research 552: 1–17.
Johnson, G.E. and Parry, E.M. 2008. Mechanistic investigations of low dose exposures to the
genotoxic compounds bisphenol-A and rotenone. Mutation Research 651: 56–63.
Kavlock, R.J., Daston, G.P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L.E., Kaattari, S., Lucier, G.,
Luster, M., Mac, M.J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D.M.,
Sinks, T. and Tilson, H.A. 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental
effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. Environmental Health
Perspectives 104: 715-740.
Keri, R.A., Ho, S-M., Hunt, P.A., Knudsen, K.E., Soto, A.M. and Prins, G.S. 2007. An evaluation of
evidence for the carcinogenic activity of bisphenol A: Review. Reproductive Toxicology24: 240–
252.
Lindholst, C., Pedersen, S.N. and Bjerregaard, P. 2001. Uptake, metabolism and excretion of
bisphenol A in the rainbowtrout (*Oncorhynchusmykiss*). Aquatic Toxicology 55: 75–84.
Maria, V.L.,Correia, A.C. and Santos, M.A. 2002. *Anguilla anguilla* L. biochemical and genotoxic
responses to benzo[a]pyrene. Ecotoxicology and Environmental Safety 53: 86–92.
McCormick, S.D., ODea, M.F., Moeckel, A.M., Lerner, D.T. and Bjornsson, B.T. 2005. Endocrine disruption of parr-smolt transformation and seawater tolerance of Atlantic salmon by 4-nonylphenol

Teles, M., Pacheco, M. and Santos, M.A. 2004.*Anquillaanquilla* L. liver ethoxyresorufin O-
demethylation, glutathione S-transferase, erythrocytic nuclear abnormalities, and endocrine
responses to naphthalene and bnaphthoflavone. Ecotoxicology and Environmental Safety 55: 98-
107.
Thomoson, K.C., Wadhia, K. and Loibner, A.P. 2005. Environmental Toxicity Testing. Blackwell
Publishing Ltd, UK, Oxford, 338 p.
Tiwari, D., Kamble, J., Chilgunde, S., Patil, P., Maru, G., Kawle, D., Bhartiya, U., Joseph, L. and
Vanage, J. 2012. Clastogenic and mutagenic effects of bisphenol A: An endocrine disruptor.
Mutation Research 743: 83–90.
Tsutsui, T., Tamura, Y., Yagi, E., Hasegawa, K.,Takahashi, M. and Maizumi, N. 1998. Bisphenol-A
induces cellular transformation, aneuploidy and DNA adduct formation in cultured Syrian Hamster
Embryo cells.International Journal of Cancer 75: 290-294.
Van den Berg, M., Sanderson, T., Kurihara, N. and Katayama, A. 2003. Role of metabolism in the
endocrine-disrupting effects of chemicals in aquatic and terrestrial systems. Pure and Applied
Chemistry 75: 1917–1932.
Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E. and Koehler, A. 2007. The use of biomarkers in
biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel
organisms. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 146: 281–300.
Vock, E.H., Lutz, W.K., Hormes, P., Hoffmann, H.D. and Vamvakas, S. 1998. Discrimination
betweengenotoxicity and cytotoxicity in the induction of DNA double-strand breaks in cells treated
withetoposide, melphalan, cisplatin, potassium cyanide, Triton X-100, andgamma irradiation.
Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 413: 83–94.

Effects of Bis-Phenol A (BPA) on Cellular and Molecular Levels of YellowfinSeabream(*Acanthopagruslatus*)

A. Negintaj[1], B. Archangi*[1], A.Movahedinia[1], A.Safahieh[1], Gh.Eskandari[2]

1- Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran
2- South Iranian Aquaculture Research Center, Khuzestan, Iran

Abstract

Today, Bisphenol A is an industrial important chemical that is abundantly used as a primary raw material for the production of plastics and resin. BPA reaches the aquatic environment mainly through urban and industrial sewage effluents; thereby posing a potential threat to the organisms living in these ecosystems. In this study, effects of BPA onerythrocytic nuclear abnormalities (ENA) stimulus (MN Test) and liver DNA integrity (DNA Unwinding Assay), in male yellowfinseabream(*Acanthopagruslatus*) were investigated. For this reason, fish received intraperitoneal injections during a period of 2 weeks with 10, 50, 100 and 150 µg g^{-1} $week^{-1}$ of BPA dissolved in coconut oil.Solventcontrols received the coconut oil whereas controls were not injected. The fish were sampled on day 0, 7 and 14. In order to evaluate cytotoxicity of BPA presented in blood, the erythrocytic nuclear abnormalities (ENA) frequency in yellowfinseabrem was determined.Our results demonstrated a significant increase in fish micronuclei frequency after the treatment with bisphenol A in comparison to the control groups and in dose dependent manner. In addition, the rate of liver DNA integrity was tested using the DNA alkaline unwinding assay. Results showed a decrease in the rate of liver DNAintegrityin treated fishes after 7 and 14 days of BPA exposure in comparison to the control group.In conclusion, results of the current project indicated that BPA has highgenotoxic and/orcytogenotoxic potential.It could be concluded that Micronucleus test and DNA strand breaks can be used as sensitive cellular and molecular indicators of exposure to genotoxic BPA.

Keywords: Bis-Phenol A, Genotoxicology, MN Test, DNA Unwinding, *Acanthopagruslatus*, Musa Creek