

بررسی تاثیر مزمن آلاینده بوتاکلر بر روی شاخص‌های آسیب‌شناسی بافت کلیه و عضله در ماهی قرمز (*Carassius auratus*)

• محمود زارعی امامزاده هاشمی

دانشجوی کارشناسی ارشد بوم‌شناسی دریا،

دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه مازندران

• حسن تقوی جلودار (نویسنده مسئول)

گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه مازندران، بابل، ایران

• فاطمه نظر حقیقی

دکتری بوم‌شناسی دریا، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴-۰۸-۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵-۰۲-۳۰

Email: taghavi25@yahoo.com



چکیده

بررسی آسیب‌ها و تغییرات بافت شناختی به منظور تخمین تاثیرپذیری موجودات زنده از مواد و آلاینده‌های شیمیایی اهمیت زیادی برخوردار است. این تحقیق به منظور ارزیابی تغییرات هیستوپاتولوژیکی عضله و کلیه ماهی حوض *goldfish* (*Carassius auratus*) در مواجهه با آلاینده آلی بوتاکلر در سال ۱۳۹۳ به اجرا در آمده است. بدین منظور ۳۲ قطعه ماهی گلد فیش بالغ تهیه و در ۴ آکواریوم (۸ قطعه ماهی در هر آکواریوم) در معرض سه غلظت زیرکشنده آلاینده بوتاکلر ۶۰ درصد به میزان ۰/۱، ۰/۱۴ و ۰/۲۸ میلی‌لیتر بر لیتر و یک آکواریوم شاهد به مدت دو هفته، قرار گرفتند. سپس، از هر تیمار ۶ قطعه ماهی به صورت تصادفی انتخاب شد، بخش میانی هر دو کلیه و نیز بافت عضله از بخش زیرین باله پشتی آن‌ها جدا شد. بافت‌ها در محلول بوئن فیکس شد و پس از طی مراحل بافت‌شناسی، برش‌های ۶ میکرونی تهیه و با روش هماتوکسیلین-ئوزین رنگ‌آمیزی شد. یافته‌های بافتی در این پژوهش دال بر تغییر پاتولوژیکی نظیر افزایش مراکز ملانوماکروفاژ، چروکیدگی گلمرول‌ها و اتساع فضای بومن، کاهش یا انسداد فضای ادراری، اتساع مویرگ‌های گلمرولی، ضخیم شدن غشاء پایه گلمرولی، دژنراسانس سلول‌های ادراری و جدا شدن سلول‌ها از غشاء پایه، نفوذ لکوسیت‌ها، خونریزی و نکروز لوله‌های ادراری در کلیه بود. همچنین با افزایش غلظت بوتاکلر در تیمارهای مختلف وسعت و شدت ضایعات افزایش نشان داد. علاوه تغییر پاتولوژیکی بافتی از قبیل تغییرات در خطوط، هسته، تورم ابری، دژنراسانس هیالین، دژنراسانس دانه‌ای و نکروز در بافت عضلانی مشاهده شد که بیشترین شدت تخریب در غلظت ۰/۲۸ میلی‌لیتر بر لیتر بود.

کلمات کلیدی: آسیب‌های بافتی، ماهی گلدفیش، غلظت تحت‌کشنده، کلیه، عضله

• Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 114 pp: 89-99

Histopathological changes of kidney and muscle in goldfish (*Carassius auratus*) following exposure to Butachlor

By: Zarei, M., Marine Ecology Graduate Student, Faculty of Marine Biology Sciences, University of Mazandaran.

Taghavi Jelodar, H., Faculty of Marine Biology, College of Marine Sciences, University of Mazandaran, Babolsar,

Mazandaran. Nazarhaghighi, F., Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.

Received: 2015-11-10

Accepted: 2016-05-19

Email: a.pirestani@khuisf.ac.ir

In order to determine the damage and histological alteration, evaluation of the effects of materials and chemical contaminants on organisms, is important. The present study reports an overall assessment of histopathological changes in kidney and muscle of goldfish in exposure to Butachlor. The experiment was carried out in 1393. For this purpose, 32 adult fish supply and 4 aquariums (8 fish per tank) were exposed to different concentrations of pollutants: sub-lethal concentrations of 0.1, 0.14 and 0.28 ml butachlor 60% per liter and a control aquarium for two weeks. Then, 6 pieces was randomly selected from each treatment, the center of both kidneys and muscle tissues were removed from the bottom of the dorsal fin. At the end of the exposing period, the muscles below the dorsal fin were removed and fixed by bouins solution, processed, sectioned at 6 μ thickness and further stained by Hematoxylin-Eosin general method. Histological findings in this study indicated pathological changes such as increase in Melanomacrophage centers, glomeruli shrinkage and Bowman's space expansion, reduction or blockage of the urinary tract, glomerular capillary dilation, thickening of the glomerular basement membrane, degeneration of urinary cells and separation from cell membrane, permeation of leukocytes, bleeding of urinary tubules in kidney and necrosis. Increasing the concentrations of butachlor in different treatments led to the increased extent and severity of lesions. Based on the histological study, histopathological changes in muscle, such as changes in striation, nuclear changes, cloudy swelling, hyaline degeneration, granular degeneration and necrosis were observed. The most damage was observed at the concentration of 0.28 ml/l.

Keyword: Tissue Damage, Goldfish, Sublethal Concentration, Kidney, Muscle

مقدمه

معمولا سموم و آفات کش ها در درجه نخست به منظور حفظ و سلامت انسان و بوم سازگان بکار گرفته می شوند، اما فقط یک درصد از آن ها جهت بهبود بکار می روند و ۹۹ درصد وارد بوم سازگان شده و باعث آلودگی می گردند (۳۴). یکی از روش های استاندارد، جهت تعیین میزان آلودگی بوم سازگان آبی بررسی آسیب شناسی بافت و تشخیص تغییرات آسیب شناختی در ماهیان می باشد (۲۴).

آلاینده های آلی یک گروه بزرگ از آلاینده ها هستند که وارد بوم سازگان ها شده و سلامت آب و آبزیان را به خطر می اندازند. از جمله مهم ترین آلاینده های آلی محیطی می توان به آفت کش ها اشاره کرد. استفاده گسترده از آفت کش ها (حشره کش ها، قارچ کش ها، علف کش ها و...) منجر به افزایش آلودگی در آب ها می شوند. این مواد سبب بروز عوارض و آسیب های بافتی متعددی در آبزیان و مصرف کنندگان آن ها می گردند (۱۷). بوتاکلر، یکی از رایج ترین علف کش ها است که جهت کنترل علف های هرز مزارع برنج به ویژه در ایران مورد استفاده قرار می گیرد. با توجه به این که بیشتر زمین های کشاورزی در مسیر رودخانه ها واقع شده اند، زهاب آلوده شده توسط آفت کش ها منجر

به اثرات زیان بار مختلفی بر روی موجودات آبی از جمله ماهی ها می گردد (۹).

تغییرات آسیب شناسی بافت می تواند به عنوان شاخصی جهت بررسی اثرات آلاینده های مختلف انسانی در موجودات زنده، استفاده شود و بازتابی از سلامت عمومی کل جمعیت بوم سازگان باشد. این زیست نشانگرهای آسیب شناسی بافت در ارتباط نزدیک با زیست نشانگر تنش زا در بسیاری از آلاینده ها که توانایی تحریک تغییرات یاخته ای را دارند، می باشند، لذا اندامگان مبتلا، متحمل فعالیت سوخت و سازی می گردد. از جمله زیست نشانگرهای مهم آسیب شناختی بافت که در پایش یک بوم سازگان به کار گرفته می شوند، زیست نشانگرهایی هستند که به طور اختصاصی اندام های حیاتی نظیر عضله را درگیر می کنند (۱۰). نظر به اینکه مطالعات آسیب شناسی بافت یک ابزار مفید برای ارزیابی درجه آلودگی به ویژه برای مقادیر زیر کشنده آلاینده ها در شرایط مزمن است، با توجه به توسعه تغییرات آسیب شناختی بافت جهت تشخیص اثر رهاش آرام چنده مشخصی از آلاینده ی بوتاکلر بر بافت عضله ماهی قرمز (به عنوان یکی از اندام های هدف آلاینده ها) در این مطالعه نیز از روش بررسی آسیب شناسی بافت استفاده شده است.

مواد و روش کار انتخاب نمونه

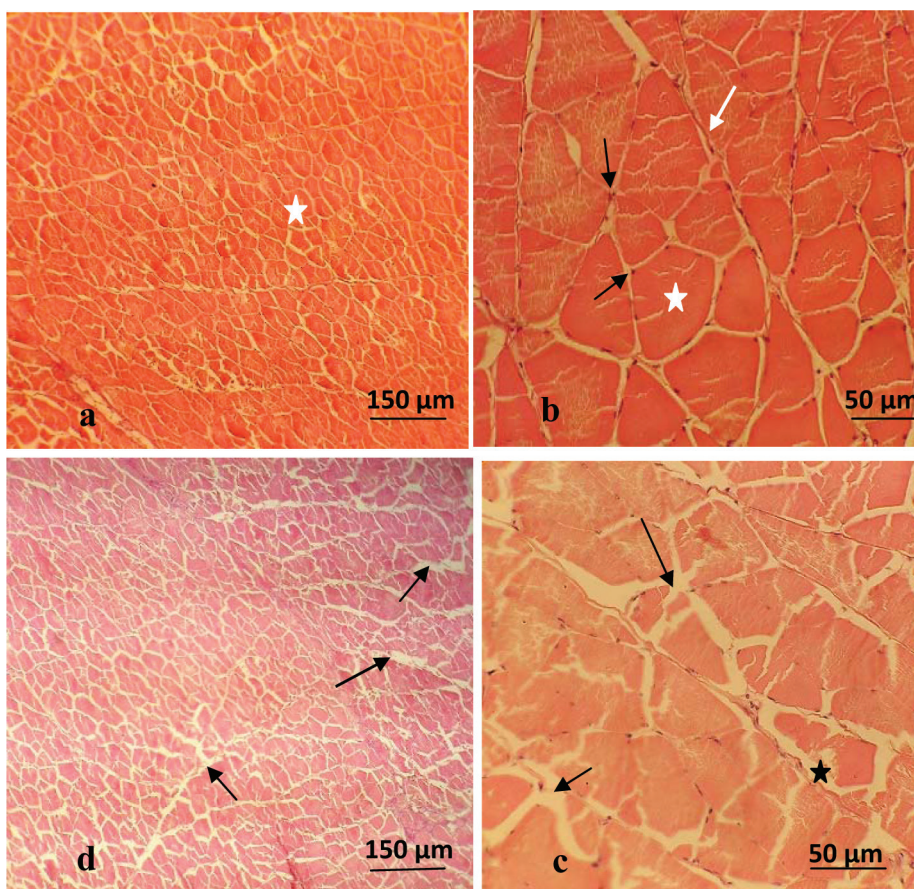
در این پژوهش ۳۲ قطعه ماهی قرمز با میانگین ($\pm$ انحراف معیار) وزن و طول به ترتیب $31/47 \pm 100/97$ گرم و $14/19 \pm 23/2$ سانتیمتر در زمستان ۱۳۹۳ تهیه گردید. ابتدا نمونه‌ها به آبزیان ۷۰ لیتری حاوی آب چاه انتقال یافتند. سپس ۴ آبزیان انتخاب و در داخل هر کدام ۸ قطعه ماهی قرمز قرار گرفته که توسط غذای آماده تغذیه می‌شدند. طی دوره آزمایش دما ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) و pH ($7/5 - 8/5$) هر روز بازبینی شدند. از ۴ آبزیان تهیه شده، یکی بعنوان شاهد در نظر گرفته شد و سه تای دیگر آنها غلظت‌های زیرکشنده آلاینده بوتاکلر ۶۰ درصد به ترتیب ۰/۱۴، ۰/۱ و ۰/۲۸ میلی‌لیتر بر لیتر به مدت ۱۵ روز اضافه گردید (آب آبزیان‌ها هر سه روز یک بار تعویض شد و مقادیر فوق دوباره به محیط اضافه شد).

رنگ آمیزی

جهت مطالعه آسیب‌های بافتی بخشی از عضله ماهی برداشته شد و در محلول بوئن به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت تثبیت گردید. سپس نمونه‌ها برای انجام مراحل معمول بافت شناسی (آب‌گیری، شفاف سازی، نفوذ پارافین، قالب‌گیری) برش‌هایی با ضخامت ۶ میکرون تهیه و با روش هماتوکسیلین-ئوزین رنگ آمیزی شد (۲۲). لام‌های تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی و توسط دوربین رقمی مجهز عکس برداری شد.

نتایج آسیب‌های بافتی در عضله

نتایج بافت‌شناسی در عضله نشان داد که هیچ اختلالی در بافت عضلانی نمونه شاهد مشاهده نشد و در برش عرضی و طولی، رشته‌های ماهیچه‌ای به



شکل ۱- اثرات آسیب شناختی عضله در غلظت‌های متفاوت آلاینده بوتاکلر در ماهی قرمز، (رنگ آمیزی H&E).
(a و b) تیمار شاهد ($10\times$): خطوط ماهیچه‌ای طبیعی (پیکان سفید)، هسته‌ها با ساختار طبیعی (پیکان سیاه)، رشته در اندازه و فاصله طبیعی از یکدیگر (ستاره سفید)؛ (c و d) تیمار با غلظت ۱/۰ ml/l ($40\times$): شکل (c) بافت مرده خفیف رشته‌ها (پیکان سیاه)، بافت مرده و خیز خفیف رشته‌ها (ستاره سیاه)، شکل (d) استحاله خفیف هیالین به‌همراه تغییر در ترتیب و اندازه هسته‌ها (پیکان سیاه).

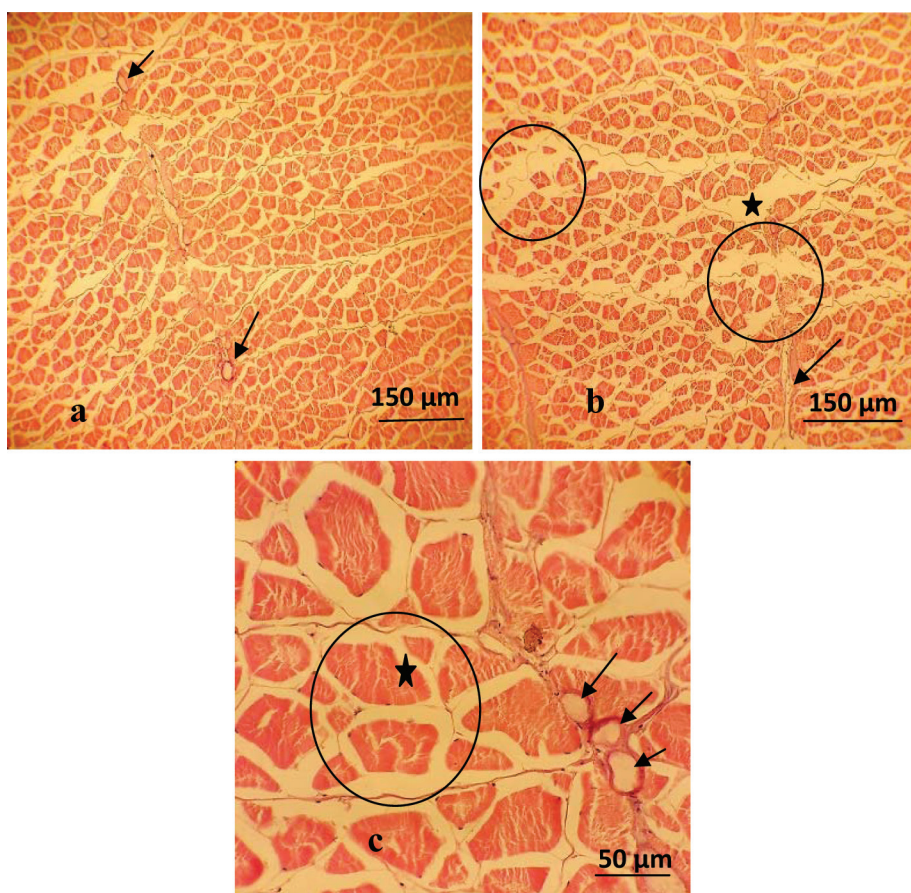
در بافت عضلانی ماهیان تیمار شده با غلظت ۰/۲۸ میلی لیتر بر لیتر افزایش تغییرات در خطوط با استحاله شدید هیالین توسعه یافت و شکاف برداشتن رشته‌ها به همراه بافت مرده و استحاله آن‌ها و تغییرات هسته‌ای با شدت بیشتری نسبت به غلظت ۰/۱۴ و ۰/۱ میلی لیتر بر لیتر مشاهده شد. همچنین تورم ابری، استحاله هیالین و استحاله دانه‌ای نیز علاوه بر تغییرات در خطوط و تغییرات هسته‌ای با شدت بیشتری نسبت به دو غلظت پایین‌تر از آثار بافتی مشخص این تیمار بود (شکل ۳).

آسیب‌های بافتی در کلیه

در کپور ماهیان که از جمله ماهی‌های قرمز هستند، لوله ادراری از گوینه، لوله‌های جلویی، لوله‌های انتهایی و لوله‌های گردآورنده تشکیل شده‌اند. گلومرول از فضای بومن، سلول‌های مزانژیال، سلول‌های اندوتلیال،

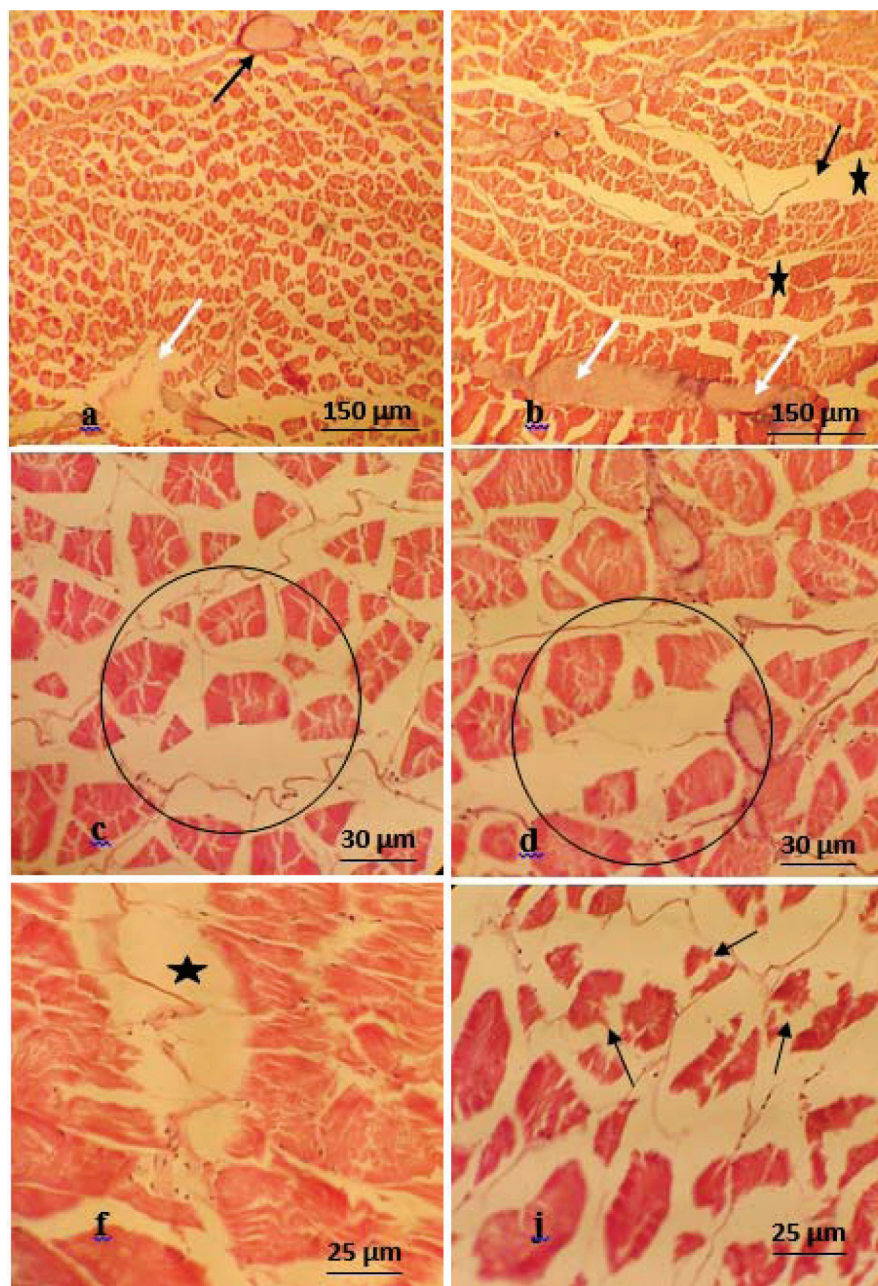
طور منظم در کنار یکدیگر قرار داشت و فاصله کمی بین دوک‌های عضلانی وجود داشت و هسته‌ها به طور منظم در اطراف فیبرها یا رشته‌های عضلانی قرار داشتند (شکل ۱: a و b).

اما در نمونه بافتی تهیه شده از غلظت ۰/۱ میلی لیتر بر لیتر بوتاکلر، تغییرات اندکی در خطوط ماهیچه‌ای (استحاله هیالین) به همراه تغییرات هسته‌ای و بافت مردگی و خیز به طور خفیف مشاهده گردید (شکل ۱: c و d). همچنین در بافت عضله ماهیان قرار گرفته در معرض بوتاکلر به غلظت ۰/۱۴ میلی لیتر بر لیتر، تغییرات در خطوط و بافت مردگی رشته‌ها، کربچه شدن، تورم ابری، بافت مردگی و استحاله هیالین و استحاله هسته‌ای با شدت بیشتری نسبت به غلظت ۰/۱ میلی لیتر بر لیتر مشاهده شد. در این تیمار شکاف درون فیبرهای عضلانی واضح تر شده و خیز با شدت بسیار بیشتری قابل مشاهده بود (شکل ۲).



شکل ۲- اثرات آسیب شناختی عضله با غلظت ۱۴/۰ ml/l آلاینده بوتاکلر در ماهی قرمز، (رنگ آمیزی H&E).

- (a) (۱۰۰X): ایجاد کربچه در بین دستجات رشته‌های عضلانی (پیکان سیاه)؛
 (b) (۱۰۰X): شدت یافتن استحاله هیالین و استحاله دانه‌ای (دایره سیاه)، بافت مرده و خیز شدید (ستاره سیاه) و تورم ابری و کربچه شدن (پیکان سیاه)؛
 (c) (۴۰۰X): شدت یافتن استحاله هیالین و استحاله دانه‌ای (دایره سیاه)، بافت مرده و خیز شدید (ستاره سیاه) و تورم ابری و کربچه شدن (پیکان سیاه).



شکل ۳- اثرات آسیب شناختی عضله با غلظت ml/128/0 آلاینده بوتاکلر در ماهی قرمز، (رنگ آمیزی H&E).
 a) (۱۰۰X): کرچه شدن (پیکان سیاه) و تورم ابری (پیکان سفید) دستجات رشته‌های عضلانی؛
 b) (۱۰۰X): خیز شدید (ستاره سیاه)، استحاله هیالین، تغییر شدید خطوط (پیکان سیاه) و تورم ابری (پیکان سفید)؛
 c) و d) (۴۰۰X): ادم شدید، استحاله هیالین و تغییر شدید خطوط (دایره سیاه)؛
 e) و f) (۴۰۰X): بافت مرده و تورم ابری (ستاره سیاه)؛
 g) و h) (۴۰۰X): شکاف برداشتن و استحاله شدن شدید دستجات رشته‌های عضلانی (پیکان سیاه).

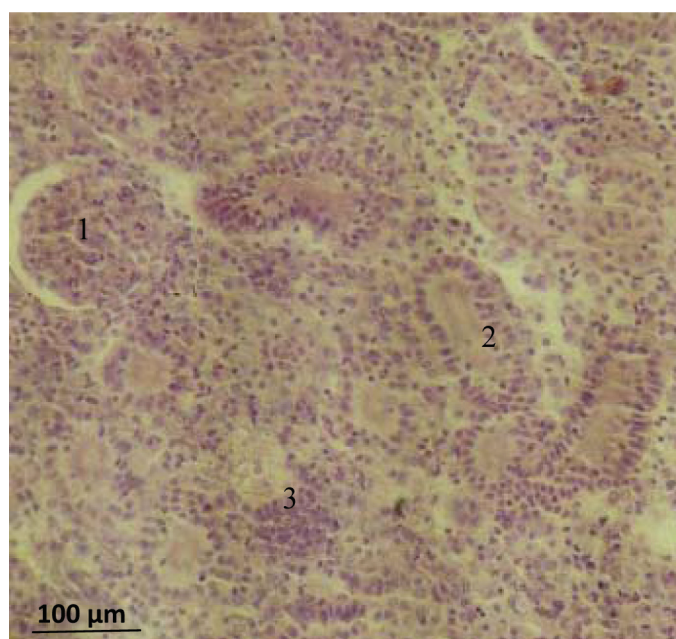
ماهی جهت آلوده بودن و یا نبودن بافت خوراکی ماهیان مفید می‌باشد. با وجود انجام تحقیقات فراوان در مورد آثار آسیب‌شناسی بافتی آلاینده‌ها روی ساختار کلیه، کبد و آبشش در ماهیان مختلف، تعداد تحقیقات روی آثار سموم روی بافت عضلانی محدود بوده است. اگرچه عضله بیشترین بخش خوراکی بدن ماهی را تشکیل می‌دهد، اما همین بخش یکی از قسمت‌های بدن ماهی است که بیشتر در معرض آسیب‌های حاصل از آلاینده‌های مختلف است (۱ و ۲۳). فیبر عضلانی کپور ماهیان در دایره‌های هم مرکزی بنام ماهیچه‌پار مرتب شده و توسط بافت همبند از ابتدا تا انتها بهم متصل شده‌اند. بافت ماهیچه‌ای در تماس نزدیک با آلاینده‌های محلول در آب هستند، از این رو واکنش و تغییر در فراساختار ماهیچه به خودی خود اتفاق می‌افتد (۴۳).

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که بوتاکلر باعث تخریب یا تغییر شکل بافت عضلانی ماهی قرمز شده و با افزایش غلظت بوتاکلر میزان آسیب بافتی افزایش می‌یابد. مطالعه‌ی اثرات آسیب‌شناسی بافتی بوتاکلر بر عضله ماهی قرمز مشخص کرد که پس از در معرض قرارگیری، خطوط رشته‌های ماهیچه‌ای نامشخص شده یا همه ناپدید می‌گردند. همچنین تغییرات هسته‌ای مانند تغییر در اندازه تعداد و موقعیت هسته‌ها رخ داد. پدیده تورم ابری که در اثر تغییرات در سیتوپلاسم ایجاد می‌شود و با ناپدید شدن خطوط همراه است در هر سه غلظت قابل مشاهده بود. استحالته هیالین به همراه ناپدید شدن خطوط ماهیچه‌ای دیده شد. استحالته دانه‌ای بصورت شکل‌گیری سارکوپلاسم دانه‌دار شده نیز گزارش شد. بوتاکلر بر عضله ماهی کپور علف‌خوار نیز اثرات مشابهی با این تحقیق به جا گذاشته

اپیتلیوم احشایی پوشینه کلیوی، اپیتلیوم جداری پوشینه کلیوی، یاخته‌های پودوسیت و مویرگ‌ها تشکیل شده است، که در شکل ۴ به برخی از این موارد در بافت کلیه ماهی قرمز شاهد نشان داده شده است. جدا شدن بافت پوششی بیشتر لوله‌های کلیوی از غشاء پایه، تیمار بافت مرده در یاخته‌های لوله‌ای و بافت همبند، اتساع مویرگ گلومرولی و خونریزی در کنار نفوذ لنفوسیتی از عمده‌ترین ضایعات مشاهده شده در نمونه‌های تیمار بوتاکلر در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۱۴ میلی‌لیتر بر لیتر بود (شکل ۵). آسیب‌های بافتی در بالاترین غلظت (۰/۲۸ میلی‌لیتر بر لیتر) تغییرات وسیعی در بافت کلیه نظیر خونریزی با وسعت بیشتر، ظاهر شدن مراکز ملانو ماکروفاژی، بافت مرده شدید و گسترده در یاخته‌های لوله‌ای و بافت همبند، افزایش فضای مجرا و احتقان در فضای پوشینه بومن مشاهده شد (شکل ۶).

بحث

منابع آلاینده حاصل از فعالیت‌های انسانی از قبیل روان آب کشاورزی و پساب صنعتی و شهری، مشکلات زیادی را به‌صورت موضعی و منطقه‌ای در سراسر جهان ایجاد کرده است (۸). در بعضی موارد شدت آلودگی بحدی است که سبب فجایع زیست‌محیطی و نابودی بوم‌سازگان می‌گردند. از آنجایی که نوع و گونه‌ی ماهی‌های کشورهای مختلف در اکوسیستم‌های متفاوت است، خواص فیزیولوژی هر گونه ماهی و نیز عکس‌المعل ماهی‌ها در برابر آلودگی‌ها یکسان نمی‌باشد، لذا استفاده از تکنیک بیومارکرهای هیستوپاتولوژیک به عنوان یک شاخص بسیار مناسب در ارزیابی سلامت



شکل ۴- اثرات آسیب‌شناختی کلیه تیمار شاهد در ماهی قرمز، (رنک‌آمیزی H&E): جسمک کلیوی (۱)، لوله‌های ادراری با ساختار طبیعی (۲)، بافت همبند کلیوی (۳).

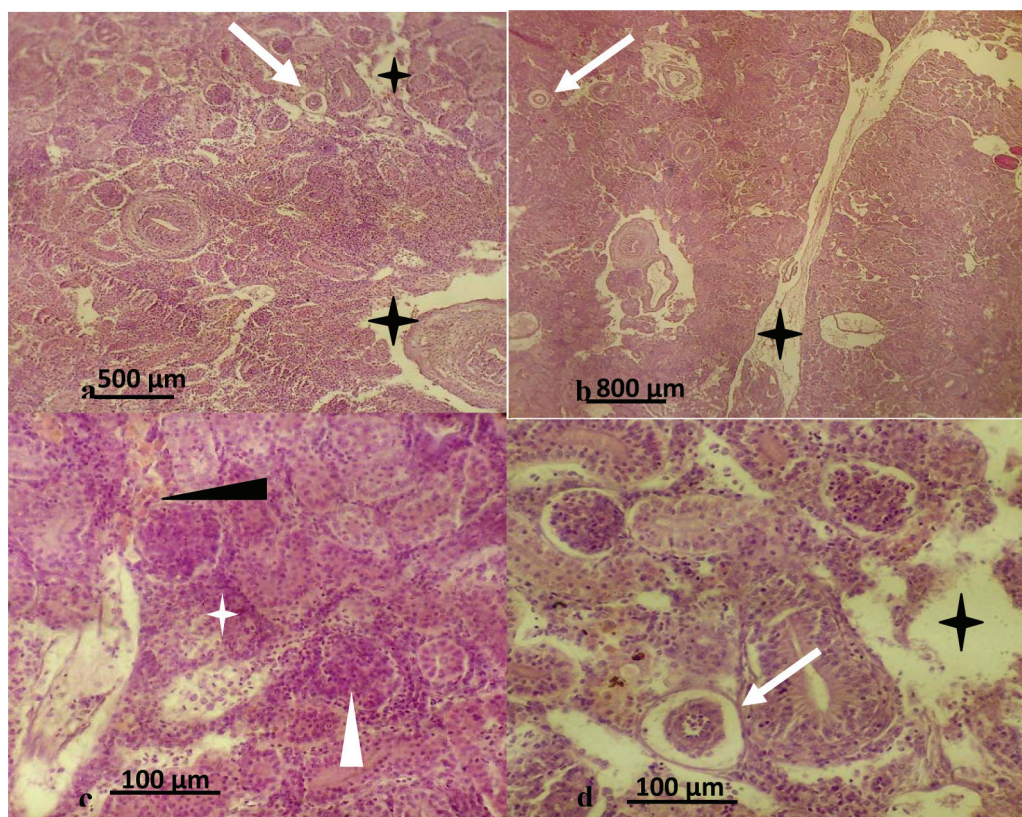
آسیب‌دیده در اثر مواجهه *Nandus nandus* با کنیلفوس (quinolphos) و پادان (padan) قابل مشاهده بود (۵).

سم بوتاکلر در بدن ماهی و در کبد به متابولیت‌های خطرناکی تبدیل می‌گردد که بطور مستقیم سبب القای نکروز در بافت کبد و سایر بافت‌ها نظیر عضله می‌گردد (۴۰). بوتاکلر بعنوان یکی از رایج‌ترین سم آفت کش و علف کش اثرات عمده‌ای بر حیات آبزیان دارد. در مطالعه‌ای که به بررسی اثر آپوپتوزی بوتاکلر بر گربه ماهی راه رونده (*Clarias batrachus*) انجام شد نشان داده شد که در مواجهه با سم بوتاکلر، اندامک میتوکندری با آزاد سازی سیتوکروم C به سیتوزول، نقش محوری در ارسال سیگنال آپوپتوز و مرگ برنامه ریزی شده سلولی ایفا می‌کند. آزاد شدن سیتوکروم C به سیتوزول از طریق فضای بین غشایی میتوکندری‌ها یکی از دلایل اصلی و مقدماتی وقوع آبشار آپوپتوز در سلول‌ها است (۴۰). در این تحقیق حالت‌هایی مانند تورم ابری و واکوئل شدن و بافت

است (۶). اثرات آسیب شناسی بافت مشابهی در مطالعاتی که بر روی اثر آلاینده‌های مختلف در ماهیان گوناگون انجام شده تاکنون گزارش شده است (۳، ۲۵، ۲۸، ۳۶، ۳۷، ۳۸).

محرك اولیه حاصل از وجود آفت‌کش‌ها می‌تواند سبب القای بیش فعالی و تحریک‌پذیری در آبی شود. در نتیجه منجر به انتشار اسیدلاکتیک و خستگی عضلانی پس از آن خواهد شد. محتوای گلیکوژن تشکیل شده متعاقب این شرایط به بافت عضله تخلیه می‌شود و با افزایش غلظت آلاینده افزایش می‌یابد (۳۹).

مطالعه روی *Tilapia nilotica* نشان داده که قرارگیری در معرض آفت کش‌هایی مثل دیازینون قادر است تغییرات آسیب شناختی متعددی در اندامک‌های سلول عضلانی می‌گردد. این‌طور تصور می‌شود که این اثرات با فعالیت‌های ضد کولین استرازی این گونه آفت کش‌ها مرتبط است (۲۵). همچنین در کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) لایه‌های عضلانی



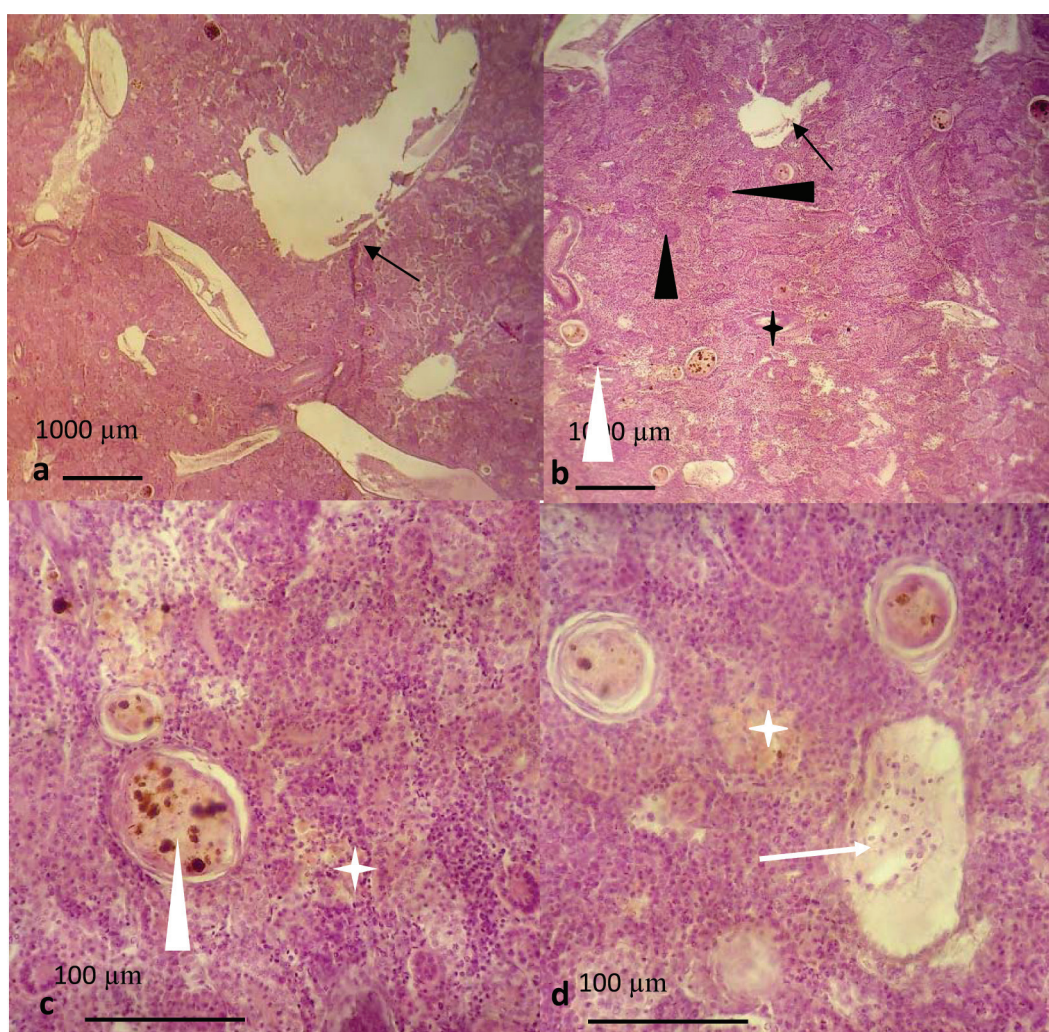
شکل ۵- اثرات آسیب شناختی کلیه در تیمارهای مختلف ماهی قرمز، (رنگ آمیزی H&E) (خط مقیاس 100 μm):
(a و b) غلظت ۰/۱ ml/l (به ترتیب X 100 و X 200): جدا شدن بافت پوششی بیشتر لوله‌های کلیوی از غشاء پایه (پیکان سفید)، بافت مردگی در بافت همبند (ستاره سیاه)؛
(c و d) غلظت ۰/۴۱ ml/l (X 400): جدا شدن بافت پوششی بیشتر لوله‌های کلیوی از غشاء پایه (پیکان سفید)، بافت مردگی در بافته‌های توبولی (پیکان سیاه) و بافت همبند (ستاره سیاه)، اتساع مویرگ گلو مری (نوک پیکان سفید) و خونریزی (نوک پیکان سیاه) در کنار نفوذ لنفوسیتی (ستاره سفید).

داشته باشد. این واسطه‌ها شامل کلرین‌های فعال و سایر آلدئیدها می‌باشد که قادرند با گلوپروتئین موجود در بافت‌ها واکنش داده و سبب کاهش سطح آن گردند. این کاهش سبب آسیب به بافت‌ها می‌گردد و آنها را برای ابتلا به دیگر اثرات سمی آلاینده‌ها مستعدتر می‌کند (۴۲).

آلاینده‌هایی مانند بوتاکلر سبب آسیب و صدمات شدید بافتی به سلول می‌شود که با تغییرات مورفولوژیکی مانند تورم سیتوپلاسم و اندامک‌ها بخصوص میتوکندری در کنار تغییر در هسته‌ها همراه است. آسیب‌های مشاهده شده در بافت عضله و کلیه ماهی قرمز را این‌طور می‌توان توجیه کرد که تحت اثر آلاینده‌ها و سم بوتاکلر و طی واکنش‌های ذکر شده با تخریب هسته و سایر اندامک‌ها در مرحله‌ای که سلول دیگر قادر به کنترل

مردگی از اثرات هیستوپاتولوژیک اصلی مشاهده شده در بافت عضله ماهی حوض در مواجهه با غلظت‌های مختلف بوتاکلر بود. محققین معتقدند که یکی از دلایل احتمالی واکوئل شدن سلول‌ها و در نهایت بافت مردگی آن‌ها می‌تواند در اثر نفوذ الکترولیت‌های حاصل از متابولیسم شدن بوتاکلر در بدن آبی از جریان خون از طریق غشای پلاسمایی به درون سلول‌ها است. در ضمن چون پروتوپلاسم نمی‌تواند حجم افزایش یافته سلول (حاصل از نفوذ متابولیت‌ها) را اشغال کند، در این قبیل سلول‌ها افزایش در حجم یا هایپرتروفی ایجاد می‌گردد (۴۱).

سموم خانواده کلرواستانلیلیدها که بوتاکلر نیز یکی از آن‌ها است بطور بالقوه قادرند واسطه‌های واکنش‌گری تولید کنند که قادر است اثرات سمی



شکل ۶- اثرات آسیب شناختی کلیه در تیمار با غلظت ۰/۸۲ ml/l ماهی قرمز، (رنگ آمیزی H&E): خونریزی با وسعت بیشتر (ستاره سفید) و ظاهر شدن مراکز ملانوماکروفاژی (نوک پیکان سفید)، بافت مردگی شدید در یاخته‌های لوله‌ای (پیکان سفید) و بافت همبند (پیکان سیاه)، افزایش فضای لومن (ستاره سیاه) و احتقان در فضای پوشینه بومن (نوک پیکان سیاه) (بزرگنمایی تصاویر a و b: X 100، بزرگنمایی تصاویر c و d: 400X).

سم علف کش تماسی است و اندام‌هایی مانند آبشش، کبد، کلیه، پوست و عضله بیشتر توسط این ماده تحت تاثیر قرار می‌گیرد. غلظت‌های بالای بوتاکلر قادر است که ساختار یاخته را در بافت‌های مختلف تخریب کند (۵). تماس با آفت‌کش‌ها لوله‌های ادراری ماهی‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد و منجر به سوخت و سار غیر عادی می‌گردد (۱۲). نتایج بررسی اثر بوتاکلر بر کلیه ماهی قزل‌آلا نتایج مشابهی با مطالعه حاضر نشان داد (۱۶)، در حالی‌که همین آلاینده آلی بر بافت کلیه ماهی فلاندر *Paralichthys olivaceus* اثرات تخریبی خاصی نشان نداد (۲۹). اثرات آسیب‌شناسی بافت مضر می‌تواند تاثیر منفی بر رشد ماهی پرورشی داشته باشد و ممکن است منجر به کاهش رشد و زیان اقتصادی نیز گردد. همچنین همزمانی استفاده از بوتاکلر در مزارع کشت برنج با فصل تولید مثل بسیاری از ماهیان در رودخانه‌های شمال ایران اثر مخربی بر تولیدمثل ماهیان داشته است. بنابراین پایش علف-کش‌ها در رودخانه‌های این منطقه بخصوص در فصل تخم‌ریزی ضروری است. آفت سیپرترین نیز عوارض آسیب‌شناسی بافت مشابهی را در ماهی آب شیرین *Cirrhinus mrigala* بجای می‌گذارد. بطور کلی مطالعات بسیاری که به بررسی اثر آلاینده‌های آلی و غیر آلی بر ماهیان آب شیرین پرداخته‌اند نتایج مشابهی با تحقیق حاضر ارائه کرده‌اند (۳۱، ۳۲، ۳۳). تغییر شکل در گومرول و کپسول بومن و لوله‌های ادراری کلیه ماهی تحت اثر آلاینده می‌تواند به دلیل تغییر در سیتوپلاسم و تخریب هسته باشد (۱۳). مشاهده اثرات بافتی در کلیه ماهی *Labeorohita* که در معرض هگزاکلروسیکلوهگزان قرار گرفته مشابه نتایج این تحقیق است و نتایج آن نیز نشان می‌دهد که تغییر شکل لوله‌ها و دگرگونی بافت مرده با قطعه قطعه شدن و تحلیل و محوشدگی هسته یاخته‌های بافتی تحت تاثیر مرتبط است (۱۴) این نتایج از بررسی در کلیه کپور معمولی در تضاد با یافته‌های لیندان (۲۰) و دلتامترین (۱۳) نیز مشاهده شده است. بسیاری از محققین این گونه ضایعات را تحت عنوان ضایعات آسیب‌شناسی غیراختصاصی کلیه می‌نامند. زیرا انواع گوناگونی از آلاینده‌های آلی و حشره‌کش‌ها و فلزات سنگین قادر به ایجاد پنین ضایعاتی در کلیه ماهی هستند (۱۱). این تغییرات بافتی شروع فرآیند تخریب یاخته بوده و تا ایجاد قطرات هیالین که به شکل دانه‌های ائوزینوفیلی بزرگ در درون یاخته مشخص می‌شوند پیش می‌رود. این دان‌ها ممکن است به دلیل جذب نشدن دوباره پروتئین‌های پلاسمایی در ادرار ایجاد شود که به آسیب جسمک‌های کلیوی می‌انجامد (۱۹). در مطالعه حاضر مراکز ملانوماکروفاژی مشاهده شده در کلیه ماهیان تیمار شده با بوتاکلر در مطالعه حاضر ارتباط زیادی با خون‌ریزی و تخریب یاخته‌های قرمز خون در کلیه ماهیان وجود دارد. شواهد فراوانی در ارتباط با ایجاد و افزایش این مراکز در کلیه، کبد، آبشش و ... ماهیان قرار گرفته در معرض سطوح بالای مواد شیمیایی و یا ماهیان ساکن در محیط‌های با کیفیت پایین وجود دارد (۴). مراکز ملانوماکروفاژی یک شاخص غیر اختصاصی برای قرار گرفتن در معرض محیط‌های آبی آلوده محسوب می‌شود (۲۶).

منابع مورد استفاده

1-Abo Nour, A. Amer, A. 1995. Impairment of muscle performance in the Nile catfish *Clarias lazera* in response to hostathion insecticide contamination and/or gamma irradiation. *Journal of the. Eryp-*

عملکردهای نرمال خود نیست بافت مردگی و مرگ سلولی اتفاق می‌افتد. علائم تایید کننده بروز این تغییرات در نتایج تحقیق حاضر بوضوح قابل مشاهده است.

کلیه ماهیان استخوانی یکی از نخستین اندام‌هایی است که تحت تاثیر آلاینده‌های موجود در محیط آب هستند و بیشترین سهم خون پس آبششی را دریافت می‌کند. بنابراین آسیب‌های وارد شده به بافت کلیه شاخص مناسبی برای آلودگی محیطی است (۱۳، ۱۵) میزان اثرات تخریبی آلاینده‌ها بر کلیه به میزان حساسیت گونه ماهی بستگی دارد (۲۷). عمومی‌ترین عوارضی که در بافت کلیه ماهیانی که در معرض آلاینده قرار می‌گیرند، ایجاد می‌شود شامل تغییرات لوله‌ها و تغییرات در پوشینه بومن مثل اتساع مویرگ‌ها در گویینه‌ها و کاهش فضای مجرا است در مطالعه حاضر کلیه ماهی قرمز پس از مواجهه مزمن با غلظت-های متفاوتی از سم علف کش بوتاکلر، تغییرات بافتی از قبیل خون ریزی، ظاهر شدن مراکز ملانوماکروفاژی بافت مرده در یاخته‌های لوله‌ای و بافت همبند، افزایش فضای مجرا و احتقان در فضای پوشینه بومن مشاهده شد. تغییرات مشابهی در همین ماهی قرمز و نیز قزل‌آلای رنگین کمان تحت تاثیر آلاینده‌هایی مختلفی مشاهده شد (۱۸). در ماهی کپور معمولی نیز آثاری چون شامل افزایش مراکز ملانوماکروفاژی، چروکیدگی گویینه‌ها و اتساع فضای بومن، کاهش یا انسداد فضای ادراری، اتساع مویرگ‌های گویینه‌ای در مواجهه با بنزوالفاپایرن مشاهده و ثبت شد (۳۵). در بالاترین غلظت (میزان ۰/۲۸ میلی لیتر بر لیتر) تغییرات وسیعی چون خون ریزی با وسعت، ظاهر شدن مراکز ملانوماکروفاژی، بافت مرده شدید در یاخته‌های لوله‌ای و بافت همبند و نیز احتقان در فضای پوشینه بومن بوضوح مشاهده شد. اما آنچه تغییرات این غلظت را متمایز می‌کند، مشاهده گویینه‌های در حال تخریب در لابلاهای گویینه‌های متسع بود که در غلظت‌های پایین‌تر مشاهده نمی‌شد. گزارش مشابهی از وقوع این تغییرات در بافت کلیه ماهی هامور معمولی تحت تاثیر بنزوالفاپایرن توسط دزفولی و همکاران، ارائه شده است (۷).

مواجهه مزمن با آلاینده می‌تواند اختلال عملکردی کلیه را در پی داشته باشد. کلیه اندام بسیار حساس به آلودگی است و به سرعت تحت تاثیر آلاینده‌ها قرار می‌گیرد. به‌طوری‌که بر عملکرد آن تاثیر می‌گذارند. از طرفی کلیه اندام دفاعی هم محسوب می‌شود که در سم زدایی و دفع آلاینده‌ها کمک می‌کند و تغییرات در اندازه و ساختار یاخته‌های اپیتلیوم و انسداد فضای لومن بازدارنده این عملکردهاست (۳۵). این‌طور می‌توان گفت که تا حدودی در همه مطالعات آسیب‌شناسی بافت از بافت مرده لوله‌های کلیوی که تا حد زیادی به دلیل تجمع دانه‌های هیالینی، جریان پروتئین و بیش پروردگی یاخته است، می‌توان بعنوان اثر تخریبی اصلی و مهم آلاینده‌ها در بیشتر ماهیان نام برد (۲).

علف‌کش‌هایی مانند بوتاکلر جزء آلاینده‌های آلی پایدار هستند. این ترکیبات در محیط زیست پایدارند و در چربی حل می‌شوند و بنابراین تجمع و بزرگ نمایی زیستی می‌یابند. از آنجاکه غلظت این ترکیبات در زنجیره غذایی افزایش می‌یابد بنابراین ارزیابی اثر این آلاینده‌ها بر حیات وحش برای کاهش مخاطرات آن دارای اهمیت است (۳۰). اثر غلظت‌های مختلف بوتاکلر بر ماهی *Oreochromis niloticus* جوان به همراه آثار مشابهی است و نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که اثرات ایجاد شده توسط بوتاکلر به غلظت آن، مدت زمان معارضه و نیز گونه آبی بستگی دارد (۳۳). این

tian.German. *Society of Zoology*. 18, 153-175.

2-Ada, F.B. Ndome, C.B. Bayim, P.R. 2011. Some haematological changes in *Oreochromis niloticus* juveniles exposed to butachlor. *Journal of agriculture and food technology*, 1, 73-80.

3-Adams, S.M. 2002 Biological indicators of aquatic ecosystem stress: introduction and overview. In: Adams, S.M. Biological indicators of aquatic ecosystem stress, American Fisheries Society, Bethesda, 1-12.

4-Adeogun, A.O., Chukwuka, A.V. and Ibor, O.R. 2011. Impact of abattoir and saw-mill effluents on water quality of upper Ogun River (Abeokuta). *American Journal of Environmental Sciences*. 7: 525-530.

5-Ahmadivand, A. Farahmand, H. Mirvaghefi, A.R, Eagderi, S., Shokrpour, S and Rahmati-Holasoo, H. 2014. Histopathological and haematological response of male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) subjected to Butachlor. *Veterinari Medicina*. 59: 433-439.

6-Dass, B. and Mukherjee, S. 2000. A histopathological study of carp (*Labeo rohita*) exposed to hexachlorocyclohexane. *Vet. Arhiv*. 70: 169-180.

7-Dezfuli B.S., Simoni, E., Giani, L. and Mormera, M. 2006. Effects of experimental terbutylazine exposure on the cells of *Dicentrarchus labrax*. *Chemosphere*. 64: 1684-1694.

8- El-Serafy, S.S, Ibrahim, S.A. and Mahmoud, S.A. 2005. Biochemical and histopathological studies on the muscles of the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Egypt. *Egyptian Journal of Aquatic Biology & Fisheries*. 9: 81-96.

9-Esmaily Sari, A., 2002, Pollutants, Health and Standards in the Environment, 1st Edn., Mehr Pub., Iran.

10-Gernhofer, M., Pawert, M., Schramm, M., Muller, E., and Trieb-skorn, R. 2001. Ultrastructural Biomarkers As Tools To Characterize The Health Status Of Fish In Contaminated Streams, *Journal Of Aquatic Ecosystem Stress And Recovery (Formerly Journal Of Aquatic Ecosystem Health)* 8, 241-260.

11-Giari, L., Simoni, E., Manera, M., and Dezfuli, B.S. 2008. Histocytological responses of *Dicentrarchus labrax* (L.) following mercury exposure. *Ecotoxicol. Environ Safety*. 70: 400-410.

12-Guo H.R, Yin L.C, Zhang S.C, Feng W.R. 2011. The toxic mechanism of high lethality of herbicide butachlor in marine flat-fish flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Ocean University of China*. 9: 257-264.

13-Hample, M., Ortiz-Delgado, J.B., Sarasquete, C. and Blasco, J. 2008. Effects of sediment sorbed linear alkylbenzene sulphonate on juveniles of the Senegal sole, *Solea senegalensis*: toxicity and histological indicators. *Histology and histopathology*, 23: 87-100.

14- Haya, K. 1989. Toxicity of pyrethroid insecticides to fish. *Envi-*

ron. Toxicol. Chem, 8: 381-391.

15-Hinton, D.E., Baumann, P.C., Gardner, G., Hawkins, W.E., Hendricks, J.D. and Okihiro, M.S. 1992. Histologic biomarkers. In: Huggett R.J., Kimerli R.A., Mehrle Jr. P.M. and Bergman H.L. (Eds). Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Lewis publishers, boca raton. USA. 156.196.

16-Karuppasamy, R. 2000. Tissue histopathology of channa punctatus (Bloch) under phenyl mercuric acetate toxicity. *Bulletin of pure and Applied Sciences*., 19:109-116.

17-Khan, R.A. 1995. Histopathology in winter flounder, *Pleuronectes americanus*, following chronic exposure to crude oil. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 54, 279-301.

18-Movahedinia, A. Loghmani, M. Ghasemi, S. Kouchaknejad, E. Izadian, M. Esfandiari, E. 2014. Study on the effects of Benzo(a) pyrene exposure on renal tissues in Common 16- Carp, *Cyprinus carpio*. *Aquatic Physiology and Biotechnology*. 2: 31-45. [in Farsi] 19-Nasci, C., Da Ros, L., Campesan, G., Van Vleet, E.S., Salizato, M., Sporni, L., and Pavoni, B. 1999. Clam transplantation and stress related biomarkers as useful tools for assessing water quality in coastal environments. *Mar. Pollut. Bull.*, 39: 255-260.

20-Oliveira, R.C.A., Fanta, E., Turcatti, N.M., Cardoso, R.J., and Carvalho, C.S. 1996. Lethal effects of inorganic mercury on cells and tissues of *Trichomycterus Brasiliensis*. *Biocell*. 20: 171-178.

21-Ortiz, J.B., De Canales, M.L.G. and Sarasquete, C. 2003. Histopathological changes induced by lindane (gamma-HCH) in various organs of fishes. *Sci. Mar.*, 67: 53-61.

22-Posti, M. Sadigh, M. 1994. An Atlas of fish histology normal and pathological feature. Tehran University Press p.781 [in Farsi]

23-Ramah, K. 2011. Histopathological study on the effect of rice herbicides on grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *African Journal of biotechnology*., 10: 1112-1116.

24-Roncarati, A., Melott, P., Dee, A., Mordenti, O. and Angellotti, L. 2006. Welfare status of cultured seabass (*Dicentrarchus labrax* L) and seabream (*Sparus aurata* L.) assessed by blood parameters and tissue characteristics. *International Aquatic Research*. 22: 225-234.

25-Sakr, S and Gabr S. 1991. Ultrastructural changes induced by diazinon and neopybuthrin in skeletal muscles of *Tilapia nilotica*. *Proceed. Zool. Soc. A.R.E.*, 21: 1-14.

26-Sitohy, M.Z. El-Masry, R.A. Siliem, T.A. and Mohamed, N.A. 2006. Impact of some trace metals pollution in the River Nile water on muscles of *Clarias gariepinus* inhabiting El-Kanater El-Khyria and Helwan sites. *Zagazig Journal of Agricultural Research*, 33: 1207-1222.

- 27-Takashima, F and Hibiya, T. 1995. An atlas of fish histology: normal and pathological features. Lubrecht & Cramer Ltd. P: 213.
- 28-Teh, S.J. Adams, S. and Hinton, D.E. 1997. Histopathological biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. *Aquat. Toxicol.*, 37: 51-70.
- 29-Tilak, K.S. Satyavardhan, K and Thathaji, P.B. 2003. Biochemical changes induced by fenvalerate in the freshwater fish *Channa punctata*. *J. Ecotoxicol. Environ. Monit.*, 13,: 261-270.
- 30-Tilak, K.S. Veeraiah, K. Thathaji, P.B and Butchiram MS. 2007. Toxicity studies of butachlor to fresh water fish, *Channa punctata* (Bloch). *Journal of Environmental Biology*. 28:485-487.
- 31-Tilak, K.S. Veeraiah. K and Koteswara. D. 2004. Toxicity and bioaccumulation of chlorpyrifos in Indian carp *Catla catla* (Ham.), *Labeo rohita* (Ham.) and *Cirrhinus mrigala* (Ham). *Bull. Environ. Contam Toxicol.*, 3,: 933-941.
- 32-Venkatesam, R and Subramaian. N. 2007. Effect of copper sulphat on histopathological changes in the fresh water fish *Oreochromis mossambicus* (peters). *J. Ecotoxi.*, 17,: 353-361.
- 33-Yokote, M. 1982. Digestive system, In Hibiya T (ed.): An Atlas of Fish Histology: Normal and Pathological Features. Kodansha Ltd, Tokyo, p. 74-93.
- 34-Young, A.L. 1987. Minimising the risk associated with pesticides minimizing the risk. ragsdale R. J. kuhr (Eds). ACS symp. ser. 336 Amer.chem. soc. Washington. D. C.
- 35-Zarei, M. Salamat, N. Nabavi, MB. Fahieh, A. Ghanemi, K. 2013. In vitro effects of Benzo[a]Pyrene different concentrations on tissue structure of kidney in Orange-spotted Grouper (*Epinephelus coioides*). *Journal of food microbiology*. 4:1-10. [in Farsi]
- 36- Das, B. and Mukherjee. S, 2000. A histopathological study of carp (*Labeo rohita*) exposed to hexachlorocyclohexane. *Veterinary Archives*, 70:169 - 180.
- 37- Mohamed, F.A.S. and. Gad, N.S. 2008. Environmental Pollution - Induced biochemical changes in tissues of *T. zilli*, *S. vulagris* and *M. capito* from Lake Qarun, Egypt. *Global Veterinaria.*, 2(6), 327 – 336.
- 38- Mohamed, F.A.S. 2009. Histopathological studies on *Tilapia zilli* and *Solea vulgaris* from Lake Qarun, Egypt. *World Journal of Fish and Marine Science*. 1, 29 - 39 (2009).
- 39- Bhuvaneshwari, R. Padmanaban, K. and BabuRajendran, R. 2015. Histopathological Alterations in Muscle, Liver and Gill-Tissues of Zebra Fish *Danio Rerio* due to Environmentally Relevant Concentrations of Organochlorine Pesticides (OCPs) and Heavy Metals. *International Journal of Environmental Research*. 9(4):1365-1372.
- 40- Ateeq B, Farah MA, Ahmed W 2006: Evidence of apoptotic effects of 2, 4-D and butachlor on walking catfish, *Clarias batrachus*, by transmission electron microscopy and DNA degradation studies. *Life Sciences* 78, 977-986.
- 41- Yadav, A. S. Bhatnagar, A. and Kaur, M. 2010. Assessment of Genotoxic Effects of Butachlor in Fresh Water Fish, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). *Research Journal of Environmental Toxicology*, 4: 223-230.
- 42- Nwani, C. D., Ama, U. I., Okoh, F., Oji, U. O., Ogbonyealu, R. C., Agha, A., Ibiam and Udu-Ibiam, O. 2013. Acute toxicity of the chloroacetanilide herbicide butachlor and its effects on the behavior of the freshwater fish *Tilapia zillii*. *African Journal of Biotechnology* Vol. 12(5), pp. 499-503.
- 43- Patnaik, B. B., Howrelia, H., Mathews, T., and Selvanayagam, M. 2011. Histopathology of gill, liver, muscle and brain of *Cyprinus carpio communis* L. exposed to sublethal concentration of lead and cadmium. *African Journal of Biotechnology*. 10(57): pp. 12218-12223.

