

ORIGINAL ARTICLE

*Histopathological Studies of Some Organs of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) Exposed to Sublethal Concentrations of Diazinon*

Reza Pourgholam¹,
Maryam Ghiyasi¹,
Maryam Rezai¹,
Hasan Nasrollahzadeh¹,
Ali Asghar Saiedi¹,
Reza Safari¹,
Shahriar Behroozi¹,
Moheb Ali Pourgholam²

¹ Caspian Sea Ecology Research Centre, Sari, Iran

²National Inland Water Aquaculture Institute, Anzali, Iran

(Received August 7, 2012 ; Accepted March 9, 2013)

Abstract

Background and purpose: Diazinon is a widely used organophosphorus pesticide around the world especially in rice paddy fields. Some studies showed that such toxic chemicals can influence the health conditions of fish at various levels including fish immune system and increase the fish susceptibility to infectious diseases.

Materials and methods: In this study, histopathological effects of different sublethal concentrations of diazinon at 1, 2 and 4 mg/L were investigated on gills, liver, spleen, kidney and nostril of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). One hundred and twenty grass carps weighing 850 ± 155 g were studied at 1, 7, 15, 30 and 45 days post-exposure to the toxicant for 12 hours at 18- 22°C.

Results: Light microscopic examinations of tissues showed that toxicant concentrations caused severe damages to the cells and tissues structure such as congestion of blood vessels, haemorrhage, cellular infiltration, pyknosis of cells nuclei, vacuolar degeneration and general necrosis in the tissues of kidney, spleen and liver.

Conclusion: There were degenerative changes of interstitial tissue and detachment of tubular basement membrane in kidney. We also observed hyperplasia and fusion of secondary lamellae, separation and sloughing of epithelium from the underlying basement membrane in gill sections and denudation of epithelial surface in nostril.

Keywords: Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*), diazinon, histopathological studies, nostril

بررسی آسیب شناسی تأثیر غلظت های تحت کشنده سم دیازینون بر برخی از اندام های کپور علف خوار (آمور) (*Ctenopharyngodon idella*)

رضا پورغلام^۱
مریم قیاسی^۱
مریم رضایی^۱
حسن نصرالله زاده^۱
علی اصغرسعیدی^۱
رضاصفری^۱
شهریار بهروزی^۱
محب علی پورغلام^۲

چکیده

سابقه و هدف: دیازینون یکی از حشره کش های ارگانوفسفره است که به طور وسیعی در اقصی نقاط دنیا به ویژه در مزارع برنج استفاده می شود. نتایج برخی مطالعات نشان داده است که چنین سمومی می توانند با تأثیر بر بهداشت آبزیان به روش های مختلف از جمله تأثیر بر سیستم ایمنی باعث افزایش حساسیت آنها به بیماری های عفونی شوند.

مواد و روش ها: در این مطالعه اثرات آسیب شناسی غلظت های مختلف تحت کشنده دیازینون (۱، ۲ و ۴ میلی گرم در لیتر) روی آبشش ها، کبد، طحال، کلیه و اندام های بیوایی ماهی آمور یا کپور علف خوار (*Ctenopharyngodonidella*) بررسی شد. تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی آمور با وزن متوسط 850 ± 155 گرم به مدت ۱۲ ساعت و در دمای ۱۸-۲۲ درجه سانتی گراد در معرض دیازینون قرار گرفته و بعد از ۱، ۷، ۱۵، ۳۰ و ۴۵ روز مورد مطالعه قرار گرفتند.

یافته ها: نتایج بررسی های آسیب شناسی با میکروسکوپ نوری نشان داد که غلظت های مختلف سم باعث آسیب های جدی به ساختمان سلول ها و بافت ها شده که به صورت پرخونی، خونریزی، نفوذ سلول های آمامی، پیکنوze شدن سلول های هسته های سلولی، دژنراسیون واکوئلی و نکروز عمومی در بافت های کلیه، طحال و کبد مشاهده گردید.

استنتاج: ضمناً تغییرات دژنراتیو بافت بینابینی، جدا شدن لایه پایه لوله های ادرای در کلیه نیز دیده شد. همچنین در آبشش ها هیپرپلازی و چسبندگی تیغه های ثانویه به هم، جدا شدن و افتادن بافت پوششی از لایه پایه و نیز حالت صاف شدن و لخت شدن سطوح پوششی اندام بیوایی مشاهده گردید.

واژه های کلیدی: ماهی آمور، دیازینون، بررسی آسیب شناسی، اندام بیوایی

مقدمه

می گیرد. نتایج برخی تحقیقات نشان داده است که این ترکیب سمی می تواند وضعیت سلامت در ماهیان را در سطوح مختلف از جمله سیستم ایمنی تحت تأثیر قرار دهد که نتیجه آن افزایش حساسیت آنها به بیماری های

D-6-metyl-2-isopropyl-(2-O-dietylO-4-pyrimidinyl Phosphorothioat) به عنوان یک حشره کش ارگانوفسفره ترکیبی است که به طور وسیع در دنیا به خصوص در مزارع برنج مورد استفاده قرار

E-mail: r_pourgholam@yahoo.com

مؤلف مسئول: رضا پورغلام - ساری: پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

۱. پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری، ایران

۲. پژوهشکده آبزی پروری آب های داخلی، بندرانزلی، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۵/۱۷ تاریخ تصویب: ۱۳۹۱/۱۲/۱۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۱/۱۱/۱۴

با همان توکسیلین ائوزین رنگ آمیزی و بوسیله میکروسکوپ نوری بررسی شدند.^(۳)

یافته ها و بحث

نتایج بررسی های آسیب شناسی نشان داد در طحال مهم ترین عوارض مشاهده شده پرخونی، خونریزی، ایجاد مراکز ملانوما کروفاژ، پیکنوتیک شدن سلول های موجود در پولپ سفید، هموسیدرورز، نکروز الیپسوئیدهای طحال و در نهایت نکروز عمومی بافت طحال بود. در کلیه عوارض به صورت پرخونی، خونریزی، نفوذ سلول های آماسی، ایجاد مراکز ملانوما کروفاژ، دژنراسیون واکوئلی و پیکنوتیک شدن هسته سلول ها و نکروز عمومی در بافت کلیه بود. در کبد عوارض به صورت پرخونی، خونریزی، دژنراسیون واکوئلی و پیکنوتیک شدن هسته سلول های کبدی، اتساع سینوسوئیدها، دژنراسیون مجاری صفرایی، نکروز کانوئی و عمومی سلول های کبدی مشاهده شد. در آبشش ها عوارض به صورت پرخونی، اتساع عروقی، نفوذ خفیف سلول های آماسی و افزایش لنفوسيت ها، تورم غشا پایه، جدا شدن و افتادگی غشا پایه، هیپرپلازی و چسبندگی تیغه های آبششی و نکروز تیغه آبششی مشاهده شد. در اندام بویابی تخریب بافت اپیتلیوم و نیز نکروز سلول های پوششی مشاهده گردید. به نظر می رسد اولین عارضه در مواجهه با این سم در اندام های کبد، کلیه، طحال و آبشش بروز پرخونی و خونریزی است و به تدریج با افزایش دوز و زمان مواجهه با سم تغییرات چشم گیرتر و در نهایت به نکروز عمومی سلول ها در اندام های فوق منجر می گردد. همچنین با توجه به نتایج بررسی های آسیب شناسی به نظر می رسد دو اندام کلیه و آبشش ها نسبت به سایر اندام های مورد بررسی از حساسیت بیش تری برخوردار بوده و بروز ضایعاتی چون پیکنوتیک شدن هسته سلول ها و بروز نکروز در غلظت های ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر و در زمان های مواجهه کمتر (۱ و ۷ روز) رخ داده است. آن چه که بر

عfonی است^(۱). از سوی دیگر به دلیل آلدگی آب های سطحی به حشره کش ها و دیگر تر کیبات صنعتی، حضور این تر کیبات در محیط های طبیعی و مصنوعی مورد استفاده برای پرورش ماهی به خوبی شناخته شده و این تر کیبات می توانند موجب تهدید سلامت ماهیان به خصوص تضعیف سیستم ایمنی آن ها گردند^(۲). در این تحقیق اثرات بافتی کوتاه و نسبتاً بلند مدت سم دیازینون در غلظت های تحت کشنده در اندام های آبشش، کلیه، طحال و اندام بویابی ماهی آمور (کپور علفخوار) مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش ها

تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی آمور با وزن ۸۵۵ ± ۱۵۵ در این مطالعه استفاده شد. ماهیان در ۱۲ حوضچه فایبر گلاس ۱۲۰۰ لیتری (در هر حوضچه ۱۰ قطعه) با جریان آب ورودی و خروجی ۱ لیتر بر ثانیه نگهداری شدند. آزمایش بعد از هفت روز آداتاسیون ماهیان آغاز گردید. در طول دوره آزمایش تغذیه ماهیان با استفاده از علوفه تازه انجام شد. همچنین طی این مدت دما، میزان اکسیژن و pH به طور روزانه اندازه گیری و به ترتیب در حدود ۲۰-۲۲ درجه سانتی گراد، ۷/۷ میلی گرم در لیتر و ۷/۵ تثیت گردید. ماهیان موجود در هر حوضچه با غلظت های ۱، ۲ و ۴ میلی گرم در لیتر دیازینون و در سه تکرار، در دمای ۲۰-۲۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲ ساعت مواجهه داده شدند. بعد از ۱، ۱۵، ۷، ۳۰ و ۴۵ روز مواجهه با سم برای مطالعات آسیب شناسی از هر تیمار ۵ قطعه ماهی جدا گردید و پس از نخاعی شدن ماهیان از بافت های کبد، کلیه، اندام بویابی، طحال و آبشش نمونه برداری گردید. جهت تثیت بافت، ابتدا تمامی بافت ها به مدت ۲۴ ساعت در فرمالین ۱۰ درصد ساعت قرار گرفتند و پس از این مدت محلول اولیه تخلیه و به ظرف حاوی بافت های تثیت شده مجدداً فرمالین ۱۰ درصد افزوده شد و با استفاده از روش استاندارد از نمونه ها مقطع گیری و مقاطع به دست آمده

Corydoras paleatus در مواجهه با دیازینون مشاهده شده، مشابه بوده است(۴،۸). کلیه به عنوان یک اندام مرکب مشکل از بخش‌های خونساز، رتیکولوآندوتیال و واحدهای درون ریز و ترشحی یکی از مهم‌ترین اندام‌های دفاعی ماهی است(۳). در این تحقیق پرخونی و خونریزی در مراحل اولیه مواجهه ماهی با سم به دلیل تأثیر سم بر دیواره عروق خونی بافت کلیه مشاهده شده است. همچنین دژنراسیون لوله‌های ادراری و سلول‌های خون‌ساز، بروز واکوئل و پیکنوزه شدن و کاریولیز هسته‌ها، نکروز کسترده بافت خونساز و ارتتاح سلولی در فضاهای بینایی سلولی بافت کلیه مشاهده شد. این تغییرات هیستوپاتولوژیک توسط محققان دیگر طی سال‌های مختلف نیز گزارش شده است(۵،۶،۸). همچنین در این بررسی درجات مختلف نکروز در الیسوئیدهای طحال، پیکنوزه شدن هسته سلول های اینمی و افزایش هموسیدرین در مراکز ملانوماکروفائز در مقاطع بافت طحال مشاهده گردید. وقوع سریع عوارضی چون پیکنوز، کاریولیز، دژنراسیون واکوئلی هسته‌ها و سرانجام نکروز بافت طحال ناشی از تأثیر سموم وارد شده از گردش خون محیطی در مطالعات متعددی گزارش شده است(۱۰،۹،۳).

در این مطالعه سطح بافت پوششی اندام بویایی کپور علف‌خوار بعد از یک روز مواجهه با میزان ۱ میلی گرم در لیتر دیازینون مشاهده شد. مواجهه با مواد شیمیایی در ماهی منجر به از دست دادن حس بویایی می‌گردد. این مسئله سبب عدم توانایی ماهی در شناسایی شکارچیان و طعمه شده و در نهایت موجب کاهش بقاء می‌گردد(۱۲). نتایج مطالعات میکروسکوپی حاضر نشان می‌دهد که دیازینون در غلظت‌های تحت کشنده قادر است بر اندام‌های حیاتی مانند آبشش، کلیه، طحال، کبد و اندام بویایی ماهی آمور اثر بگذارد، لیکن شدت آسیب‌های ایجاد شده بستگی به غلظت سم و همچنین طول دوره زمانی مواجهه دارد.

References

اساس نتایج به دست می‌آید این است که بروز ضایعات در بافت‌های مختلف با افزایش زمان مواجهه و دوز سم بیش‌تر شده است. مجاورت کپور علف‌خوار (Ctenopharyngodon idella) با ۱، ۲ و ۴ میلی گرم در لیتر سم دیازینون موجب بروز تغییرات هیستوپاتولوژیک در اندام‌های ماهی شده است. شدت ضایعات هیستوپاتولوژیک در این تحقیق کاملاً وابسته به غلظت سم بود. با توجه به عوارض نکروتیک ایجاد شده به نظر می‌رسد نکروز یا مرگ سلول‌ها ممکن است به وسیله اتوکلیز یا تعجزیه سریع به وقوع بیرونند. اتوکلیز به وسیله آنزیم‌های خود سلول که در اثر مرگ سلولی در محیط پخش می‌شود ایجاد می‌گردد و این ترکیبات نه تنها خود سلول، بلکه موجب متلاشی شدن سایر سلول‌های مجاور نیز می‌گردد(۱۲). در هر حال ضایعات آبششی مشاهده شده در این مطالعه می‌تواند منجر به اختلالات فیزیولوژیک گردد که در نهایت منجر به مرگ ماهی شود. در بررسی بافت کبد پرخونی عروق خونی و اتساع سینوسوئیدها تقریباً در همه تیمارها مشاهده شد. این حالت می‌تواند حاکی از مکانیسم دفاعی ماهی نسبت به میزان سم در خون باشد. در سلول‌های کبدی مراحل مختلف از دژنراسیون تا نکروز کامل مشاهده گردید. این نتایج نشان می‌دهد که سلول‌های کبدی کاملاً به دیازینون حساس هستند. Warkins و Klaassen معتقدند، سمی که از طریق ورید کبدی وارد این اندام می‌شود توسط فرآیندی به نام پیش سیستم دفع کننده کبدی سموم را طی یک انتقال مجزا در کبد تحت شرایط نرمال دفع می‌کند(۷). این پروسه باعث پیشگیری یا به حداقل رساندن کاهش توزیع مواد مضر به دیگر بخش‌های بدن می‌شود. تغییرات هیستوپاتولوژیک کبد کپور علف‌خوار در مواجهه با دیازینون در این مطالعه با آنچه که توسط Rahman و همکاران و Fanta و همکاران در دیگر ماهیان مانند Anabas testudineus، Channa punctatus، Barbodes gonionotus و

-
1. Svoboda M, Luskova V, Drastichova J, Zolabek V. 2001. The effect of diazinon on hematological indices of common carp (*Cyprinus carpio*). *Acta Vet. BRNO* 70: 457-465.
 2. Anderson DP, Zeeman, MG. 1995. Immunotoxicology in fish, In: Rand GM , ed, Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment ,2nd ed. Taylor & Francis, Washington DC, USA, p 371- 404
 3. Roberts RJ, 2001. Fish Pathology, 3rd ed. Philadelphia PA: W.B. Saunders; p 457.
 4. Fanta E, Flavia Sant AR , Romão S, Casagrande VAC, Freiberger S. 2003. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food .*Ecotoxicol Environ Saf* 54 (2):119-130.
 5. Velisek J, Sudova, E, Machova J, Svobodova Z. 2010. Effects of sub-chronic exposure to terbutryn in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Ecotoxicol Environ Saf* 73(3): 384-390
 6. Cengiz EI. 2006. Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin. *Environ Toxicol Pharmacol* 22(2): 200-204
 7. Klaassen CD and Warkins JB, 1984, Mechanisms of bile formation, hepatic uptake and biliary excretion, *Pharmacological Reviews*, 36: 1 - 67
 8. Rahman MZ, Hossain Z, Mollah MFA, Ahmad GD, 2002, Effect of diazinon 60 EC on Anabas testudineus, Channa punctatus and Barbodes gonionotus, Naga, *The ICLARM Quarterly*, 25(2): 8 – 12
 9. Girón-Pérez MI, Zaitseva G, Casas-Solis J, Santerre A. 2008. Effects of diazinon and diazoxon on the lymphoproliferation rate of splenocytes from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): The immunosuppressive effect could involve an increase in acetylcholine levels. *Fish Shellfish Immunol* 25(5): 517-521.
 10. Tellez-Bañuelos MC, Santerre A, Casas-Solis J, Bravo-Cuellar A, Zaitseva G. 2009. Oxidative stress in macrophages from spleen of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to sublethal concentration of endosulfan. *Fish Shellfish Immunol* 27(2):105-111.
 11. Starcevic SL, Zielinski BS. 1997. Neuroprotective Effects of Glutathione on Rainbow Trout Olfactory Receptor Neurons During Exposure to Copper Sulfate. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacol Toxicol Endocrinol* 117 (2) :211-219
 12. Abel RL, MacLaine JS, Cotton R, Xuan VB, Nickels TB, Clark TH, Wang Z, Cox JPL. 2009. Functional morphology of the nasal region of a hammerhead shark. *Handbook of Chemical Neuroanatomy* 17:417-441
 13. Tilton FA, Tilton SC, Bammler TK, Beyer RP, Stapleton PL, Scholz NL, Gallagher EP. 2011. Transcriptional impact of organophosphate and metal mixtures on olfaction: Copper dominates the chlorpyrifos-induced response in adult zebrafish. *Aquatic Toxicology*(Article in Press).