Archive of SID

فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۵۰، جلد ۱۳، شماره ۳،تابستان ۹۹، صفحه ۵۷ تا۶۷
Qjaphd.sinaweb.net ISSN: ۹۸۸۰-۱۷۳۵

تأثیر غلظت های تحت کشنده دیازینون بر بافت بیضه در ماهی گورخری (*Danio rerio*)

معصومه درویشی[۱]، رقیه صفری[۲]
۱-دانش آموخته کارشناسی ارشد شیلات- تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ایران.
M_darvishi_ m71@yahoo.com
۲-استادیار گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ایران.

تاریخ دریافت: ۹۸/۹/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۹/۲/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: دیازینون از سموم ارگانوفسفره پرکاربرد در مزارع کشاورزی است که جهت از بین بردن آفات و کرم ساقه خوار در مزارع استفاده می‌شود. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر غلظت های تحت کشنده دیازینون بر بافت بیضه در ماهی گورخری (*Danio rerio*) انجام گرفت.

روش کار: بدین منظور ۲۴۰ عدد ماهی نر با میانگین وزنی ۰/۲ ± ۰/۰۵ پس از ۲ هفته سازگاری با شرایط آزمایشگاه در ۳ تیمار تحت کشنده سم دیازینون که پس از انجام تست LC50 به ترتیب ۰/۸، ۱/٦ و ۳/۲ میلی‌گرم بر لیتر و تیمار شاهد به مدت ۳۰ روز قرارگرفتند. در پایان دوره از بافت بیضه ماهیان نمونه برداری و سپس مقاطع بافتی تهیه شد.

یافته ها: در بررسی بافتی بیشترین ناهنجاری در دوز بالاتر(۳/۲ میلی‌گرم بر لیتر) مشاهده گردید که کاهش اندازه گناد از مهم ترین آن می‌باشد. در برش بافتی گروه شاهد بافت بیضه از اندازه و رشد مناسب برخوردار بوده و سلول‌ها در مرحله رسیدگی جنسی قرار داشتند، در صورتی‌که در تیمار ۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر آتروفی سلول‌های جنسی بافت بیضه مشاهده شد. همچنین در این تیمار دیواره لوبول‌ها نیز از بین رفته بود. در تیمار ۱/٦ میلی‌گرم بر لیتر دژنره شدن و آتروفی سلول‌های جنسی، از بین رفتن شکل و دیواره لوبول‌ها مشاهده شد. در بالاترین غلظت سم، دژنره شدن و آتروفی سلول‌های جنسی، از بین رفتن شکل و دیواره لوبول‌ها و کاهش تعداد سلول‌های جنسی مشاهده شده که این کاهش تعداد سلول‌های جنسی و عوارض مشاهده شده موجب کاهش اندازه بافت بیضه نیز می‌شود.

نتیجه گیری: این مشاهدات نشان‌دهنده افزایش عوارض و ناهنجاری‌های سم دیازینون بر بافت بیضه ماهی گورخری با افزایش غلظت سم می‌باشد.

واژه های کلیدی: دیازینون، بافت بیضه، ماهی گورخری.

مقدمه

درحال حاضر استفاده از آفت‌کش‌ها به میزان زیادی افزایش یافته که از عمده‌ترین مواد آلاینده محیط‌های آبی و عامل مسمومیت آبزیان به‌شمار می‌روند(۶،۴۵). دیازینون یک سم ارگانوفسفره غیرسیستمیک است(۱۵) که جزو سموم تماسی و نفوذی بوده(۳) و در مزارع کشاورزی و باغ مرکبات، برای از بین بردن آفات و کرم ساقه‌خوار استفاده می‌شود(۱۸). این سم به‌راحتی می‌تواند شسته و وارد آب‌های زیرزمینی، سطحی و در نهایت محیط‌زیست آبزیان شود و بر گستره‌ی وسیعی از آبزیان غیر هدف از جمله ماهی‌ها، پستانداران و بی‌مهرگان آبزی تاثیر گذارد(۳۰). از آن جایی که آبزیان دارای سطوح تماس فیزیولوژیک بالا ازجمله خون در آبشش با آب می‌باشند، بنابراین سموم به سرعت از طریق آبشش جذب خون شده و وارد اندام‌هایی مانند کبد، کلیه و گناد و برخی

www.SID.ir

Archive of SID

از اندام‌های دیگر می‌شود(۳۱). مکانیسم اثر سم دیازینون مهار شدن کلیه آنزیم‌ها به‌ویژه آنزیم استیل‌کولین‌استراز است(۲۶) که روی اعصاب مرکزی اثر مخرب برجای گذاشته و می‌تواند موجب مرگ جنین در مراحل اولیه بارداری شود(۳۶، ۳۴، ۲۷). هم چنین در غلظت‌هایی که کشندگی ندارد باعث سایر اختلالات بیولوژیکی و اکولوژیکی مانند عقیم کردن، کاهش هماوری و تولیدمثل، عدم رشد کافی در موجودات می‌شود(۲). سم دیازینون اگرچه پس از استفاده در مزارع به سرعت تجزیه می‌شود ولی تحت شرایط خاص، پایین بودن دما، رطوبت پایین، قلیائیت بالا و فقدان فعالیت تجزیه‌ای میکروبی(۱۲) معمولاً به مدت ۱۴-۱۲ هفته در خاک به صورت فعال باقی مانده و پس از برخورد با پوست و مخاط به آسانی جذب می‌شود(۱۶،۲۹). با این که بسیاری از متابولیت‌های فعال این سموم در بدن دفع می‌شوند ولی مقدار باقی مانده آن در بافت‌های مختلف ازجمله در اندام‌های جنسی می‌توانند تاثیر منفی برجای گذارند(۹). تاثیر بر سلول‌های جنسی نر، افزایش ناهنجاری در ساختار اسپرم افرادی که در معرض این گونه سموم هستند، آتروفی شدن سلول‌های لایدیگ، کاهش سطح تستوسترون سرم خون، کاهش قطر سلول-های ژرمینال، هم چنین گاهی افزایش و گاهی کاهش قطر مجاری اسپرم‌ساز از جمله مواردی است که در بعضی از مطالعات گزارش شده است(۱۸، ۹). این گونه عوارض تنها به جنس نر اختصاص ندارد. سم دیازینون در جنس ماده نیز موجب کاهش قطر تخمدان، ایجاد بافت نکروز در تخمدان، افزایش فولیکول‌های آترتیک و تخریب اووسیت‌های بالغ می‌شود(۳۳). علم بافت‌شناسی به مطالعه ساختمان‌های کوچک گیاهان و جانوران پرداخته و در هیستوپاتولوژی یا آسیب شناسی بافتی هدف اصلی شناخت و تشخیص بیماری‌ها از طریق تغییرات مرضی در بافت‌ها می‌باشد. به همین دلیل مطالعات هیستوپاتولوژی نیز اهمیت به سزایی در تشخیص، سبب‌شناسی و پیشگیری از بیماری‌ها داشته و کاوش‌ها یا یافته‌های بافت‌شناسی امکان افزایش دانش ما در مورد اثرات آلاینده‌ها روی ماهی‌ها را توسعه می‌بخشد(۷). مطالعات مختلفی در رابطه با اثر آلاینده‌ها بر بافت بیضه از جمله اثر سم دیازینون در ماهی سفید(۵)، ماهی کپور(۱۱)، ماهی *Lepomis macrochirus*(۱۹)، علف کش رانداپ در ماهی قزل-آلا(۲۳)، نیتریت در ماهی گورخری(۳۲) و میکروسیستین لوسین در ماهی مداکا(۴۴) و ماهی گورخری(۴۱) توسط محققین مختلف بررسی شده است. بااین‌وجود، با توجه به گزارشات مختلف در رابطه با شیوع بالای اختلالات تولیدمثلی و هم چنین به دلیل ساختار فعال و بسیار حساس بافت های زاینده از جمله بیضه و دستگاه تولیدمثلی به عوامل خارجی و استفاده از سم دیازینون در کشاورزی، در مطالعه حاضر به بررسی تأثیر غلظت‌های تحت کشنده سم دیازینون بر بافت بیضه ماهی گورخری(*Danio rerio*) به عنوان گونه مدل پرداخته شده است. ماهی گورخری یک گونه کوچک از ماهیان استخوانی آب شیرین متعلق به خانواده‌ی Cyprinidae از راسته Cypriniformes، بومی منطقه هیمالیا می‌باشد که به‌راحتی در آزمایشگاه نگهداری و پرورش می‌یابد. جنس نر و ماده از هم جدا و قابل تشخیص است و جنس‌های نر دارای بدنی دوکی شکل می‌باشند(۴). این گونه ماهی به جهت سهولت در نگهداری و هزینه پایین، باروری بالا، در دسترس بودن کامل توالی ژنوم، دستکاری راحت، همولوگ بودن بسیاری از ژن‌های این ماهی با پستانداران، وجود سویه‌های جهش‌یافته و شباهت بالای ژنتیکی، فیزیولوژیکی و فارماکولوژیکی با انسان به یک گونه مدل و محبوب تبدیل شده است(۴۰، ۲۸، ۲۵، ۲۴، ۲۰، ۱۷، ۱۳). به همین جهت مطالعات زیادی با استفاده از این گونه مدل در راستای ارزیابی عملکرد تولیدمثلی در محور هیپوتالاموس، هیپوفیز و گناد صورت گرفته است(۴).

مواد و روش‌ها

www.SID.ir

Archive of SID

از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان زینتی شصت کلاً گرگان بچه ماهیان گورخری نر با سن حدود ۲ ماه خریداری و به مرکز تحقیقات آبزی پروری شهید فضلی برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شدند. پس از ۲ هفته سازگاری ماهی‌ها با تراکم ۴۵ عدد در هر آکواریوم شیشه ای ۲۵۰ لیتری که ۲۵ لیتر از آن آبگیری شده بود به طور تصادفی در ۴ تیمار و ۳ تکرار رهاسازی شدند. به منظور هوادهی آکواریوم‌ها از سنگ هوا و تنظیم دمای آب در ۲۶ درجه سانتی گراد از هیتر برقی استفاده شد. میانگین pH آب ۸/۳ بود. ماهی‌های گورخری در طول مدت نگهداری و دوره مطالعه با استفاده از غذای بیومار(فرانسه) تغذیه شدند. در روز اول شروع آزمایش، تزریق سم درون آب انجام شد و هر ۴۸ ساعت یک‌بار تا حدود ۹۰ درصد از آب آکواریوم تعویض و سم تجدید شد. میزان LC50 برای سم دیازینون پس از انجام تست LC50 در آکواریوم‌ها و با توجه به خصوصیات فیزیکوشیمیایی آب، ۱۶میلی گرم بر لیتر در نظر گرفته شد که میزان ۰، ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد از LC50 مورد نظر که به ترتیب ۰، ۰/۸، ۱/۶ و ۳/۲ میلی گرم بر لیتر محاسبه شدند، برای تیمارها استفاده شد. پس از ۳۰ روز مواجهه ماهی ها با سم دیازینون و پایان دوره آزمایش ۶ ماهی به طور تصادفی از هر تیمارها صید و با استفاده از پودر گل میخک ۰/۵ گرم بر لیتر بیهوش و کشته شدند. نمونه‌برداری از گناد ماهیان نر جهت مطالعات بافت‌شناسی و تعیین مرحله رسیدگی جنسی در هرکدام از تیمارها انجام و در فرمالین فیکس شد. بافت‌های گناد تثبیت‌شده در فرمالین ۱۰٪ پس از ۲۴ ساعت به الکل ۷۰ ٪ منتقل شد. سپس آب‌گیری با افزایش اتانول(۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰ و ۱۰۰٪) انجام و در ادامه در زایلن وارد شدند. تمامی این مراحل توسط دستگاه پاساژ بافت تحت برنامه تعریف شده برای این کار صورت گرفت. بافت‌ها سپس با پارافین(دمای ذوب ۵۶°C-۵۸) بر روی قالب‌های تیشو-تک قالب‌گیری و پارافینه شدند(۲۳). از قالب‌های پارافینِ با استفاده از دستگاه میکروتوم برش‌هایی باضخامت ۵µm تهیه و پس از قرار دادن بر روی لام، به مدت نیم ساعت در آون (۶۰°C) قرار داده شد تا پارافین اضافه از روی بافت حذف شود. نمونه‌ها پس از پارافین‌زدایی و جایگزینی آن با زایلن به‌وسیله سری‌های کاهشی اتانول(۱۰۰، ۹۰و ۷۰) آب‌دهی مجدد و با استفاده از محلول‌های هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. بافت‌های تهیه‌شده مجدداً به آون منتقل‌شده تا خشک شوند. تمامی مواد مورداستفاده در این مراحل محصول شرکت مرک بود. درنهایت با استفاده از چسب هیستوفلوید بر روی لام‌های تهیه‌شده لامل چسبانده شد(۲۱). سپس اسلایدهای بافت‌های تهیه‌شده توسط میکروسکوپ اینورت(مدل نیکون TS100) آزمایشگاه ماهی‌شناسی دانشکده شیلات و محیط‌زیست موردمطالعه قرار گرفت و سپس با استفاده از میکروسکوپ اینورت، از نمونه‌ها عکس‌هایی با بزرگ-نمایی(۱۰X) تهیه و عکس‌ها به‌صورت کیفی بررسی گردید.

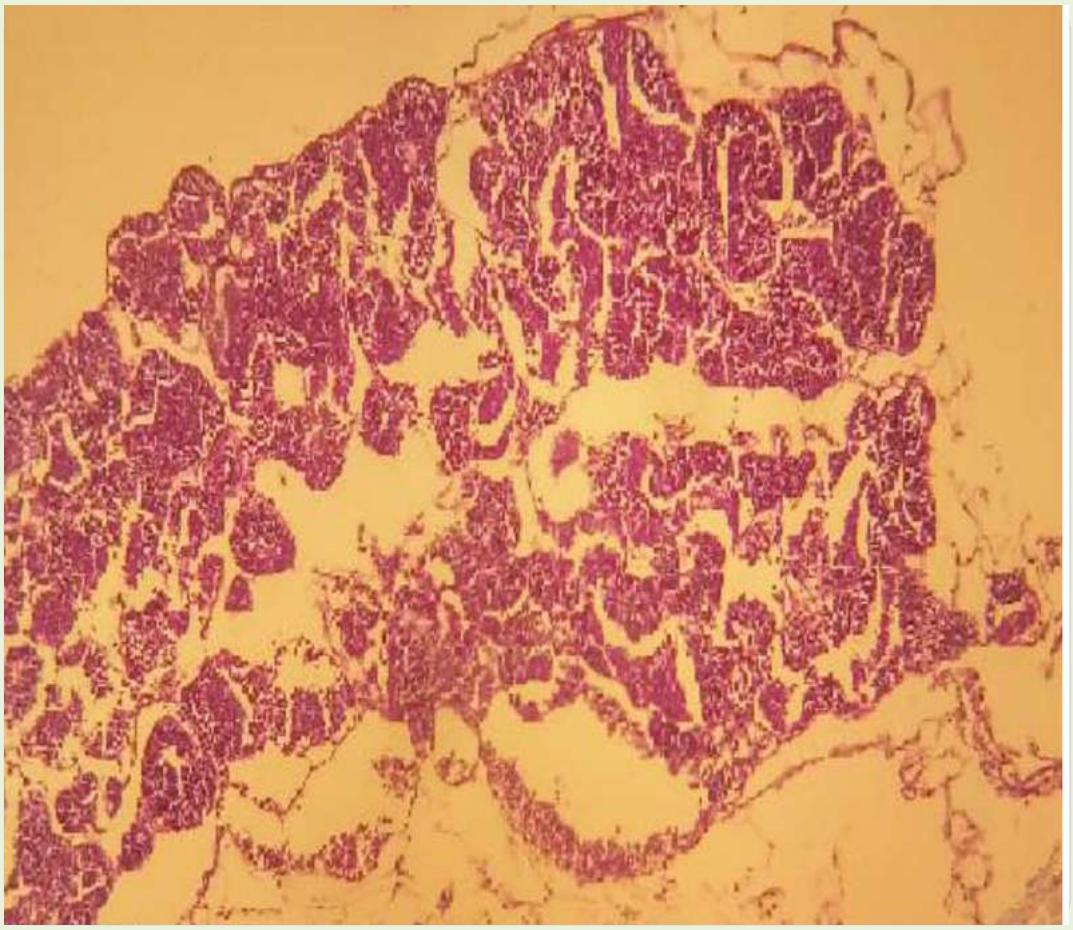
نتایج

در تیمارهای مختلف ماهی‌های گورخری پس از مدت ۳۰ روز مواجهه با سم دیازینون هیچ‌گونه مرگ‌و-میری مشاهده نشد. از مهم‌ترین تغییرات رفتاری مشاهده شده در تیمارها عدم تعادل و کاهش اشتها بود که در غلظت‌های بالاتر سم این علائم مشهودتر می‌شد. در بررسی بافتی بیشترین ناهنجاری در دوز بالاتر(۳/۲ میلی-گرم بر لیتر) مشاهده گردید که کاهش اندازه گناد از مهمترین آن می‌باشد. در برش بافتی گروه شاهد که در معرض سم دیازینون قرار نگرفته بودند بافت بیضه از اندازه و رشد مناسب برخوردار بوده و سلول‌ها در مرحله رسیدگی جنسی قرار داشتند(شکل ۱)، در صورتی‌که در تیمار ۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر آتروفی سلول‌های جنسی بافت بیضه مشاهده شد. هم چنین در این تیمار دیواره لوبول‌ها

www.SID.ir

Archive of SID

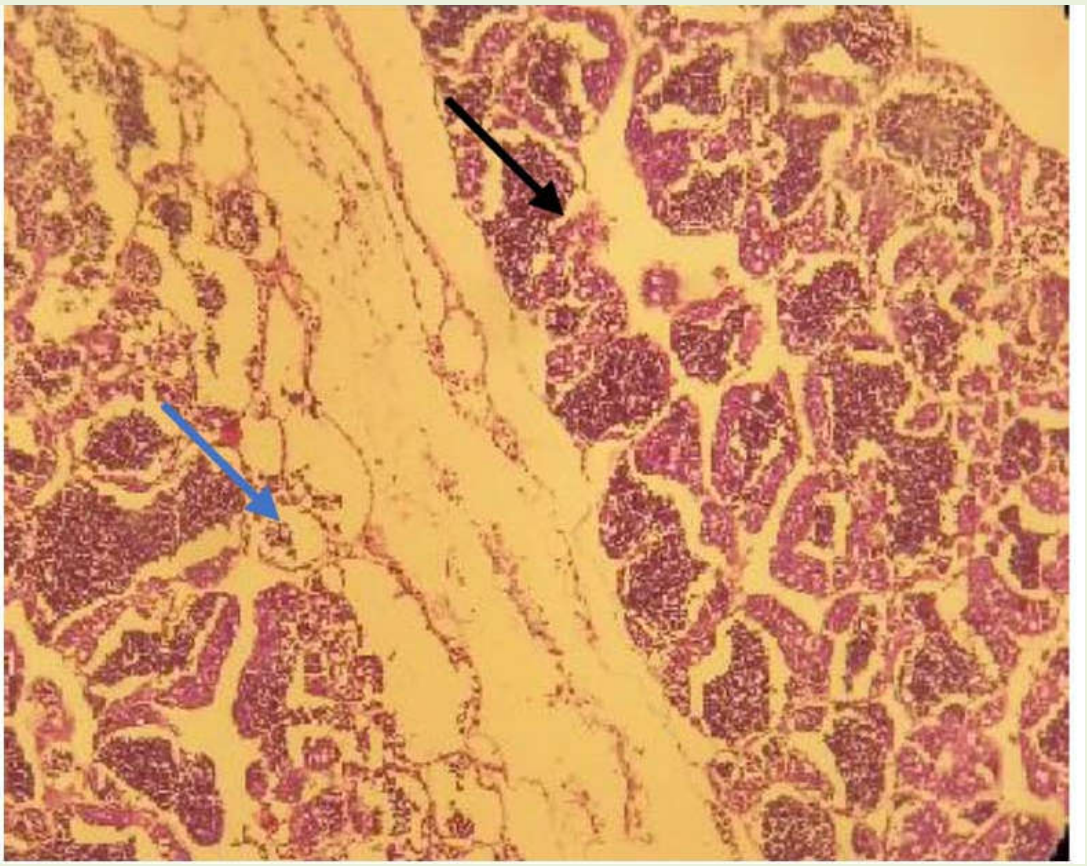
نیز از بین رفته بود(شکل ۲). در تیمار ۱/۶ میلی گرم بر لیتر دژنره شدن و آتروفی سلول‌های جنسی، از بین رفتن شکل و دیواره لوبول‌ها مشاهده شد(شکل ۳). در بالاترین غلظت سم که میزان دوز آن ۳/۲ میلی گرم بر لیتر بود دژنره شدن و آتروفی سلول‌های جنسی، از بین رفتن شکل و دیواره لوبول‌ها و کاهش تعداد سلول‌های جنسی مشاهده شد(شکل ۴) که این کاهش تعداد سلول‌های جنسی و عوارض مشاهده شده موجب کاهش اندازه بافت بیضه نیز می‌شود. این مشاهدات نشان‌دهنده روند صعودی عوارض و ناهنجاری‌ها نسبت به افزایش غلظت سم می‌باشد.



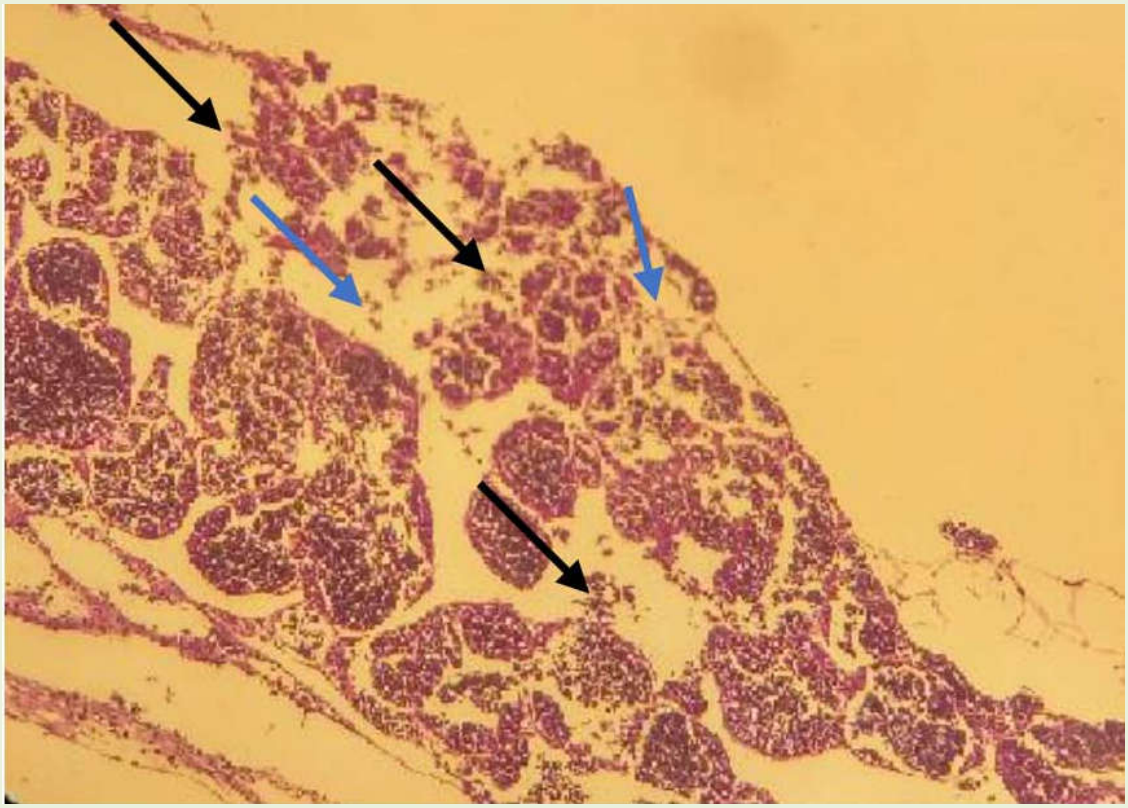
شکل ۱-گروه شاهد برش بافتی بیضه. اندازه و رشد سلول‌های طبیعی در بافت بیضه طبیعی

www.SID.ir

Archive of SID



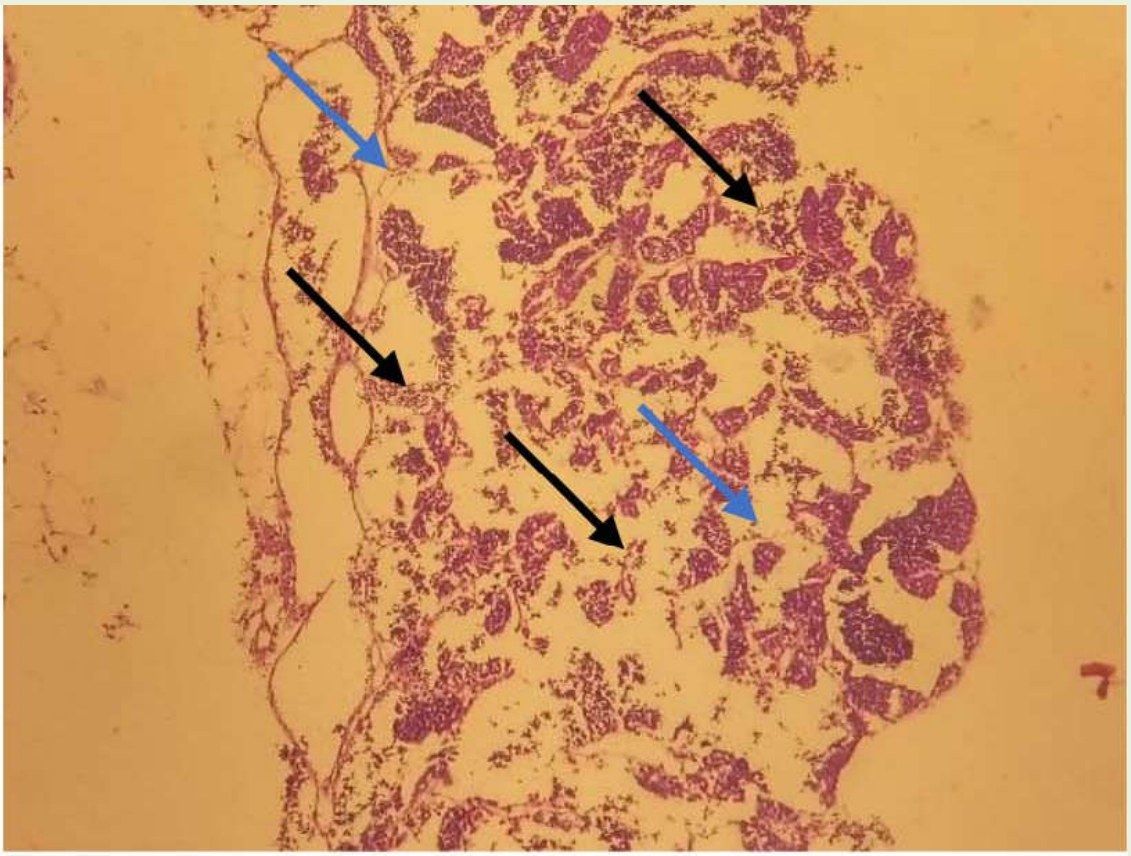
شکل ۲- تیمار ۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر سم دیازینون. آتروفی شدن سلول‌های جنس (فلش آبی). از بین رفتن دیواره لوبول‌ها(فلش مشکی)



شکل ۳- تیمار ۱/٦ میلی‌گرم بر لیتر سم دیازینون. از بین رفتن شکل و دیواره لوبول‌ها(فلش مشکی). دژنره شدن و آتروفی سلول‌های جنسی (فلش آبی).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ٤- تیمار ۳/۲ میلی‌گرم بر لیتر سم دیازینون. از بین رفتن شکل و دیواره لوبول‌ها (فلش مشکی). دژنره شدن و آتروفی سلول‌های جنسی (فلش آبی).

بحث و نتیجه گیری

با وجود این که سم دیازینون توانایی تجمع در بافت ماهیچه، کبد، گناد و آبشش را داشته(۳۷) و از این طریق می‌تواند بر هوموستازی، رشد و رفتار ماهیان تأثیر گذارد(۸). بخشی از آن ممکن است در بافت‌های مختلف بدن از جمله غدد جنسی تجمع پیداکرده و با تأثیر بر سلول‌های غددجنسی موجب بروز ضعف و کاهش توان تولیدمثلی در آبزیان شود(۴۶، ۲۲). مطالعه انجام شده روی بافت بیضه ماهی گورخری در مواجهه ۳۰ روزه با غلظت-های مختلف دیازینون نشان‌دهنده آسیب‌های هیستوپاتولوژیکی در بافت بیضه می‌باشد که با افزایش غلظت سم این آسیب‌ها افزایش یافته و افزایش زمان مواجهه با سم نیز این عوارض و آسیب‌ها را بیشتر کرده است. آسیب‌های مشاهده شده در تیمار ۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر آتروفی سلول‌های جنسی، از بین رفتن دیواره لوبول‌ها و در تیمار ۱/۶ میلی‌گرم بر لیتر دژنره شدن و آتروفی سلول‌های جنسی، از بین رفتن شکل و دیواره لوبول‌ها می-باشد. این عوارض در غلظت بالاتر سم دیازینون که ۳/۲ میلی‌گرم بر لیتر بود افزایش یافته و روند وابسته به غلظت را نشان می‌دهد. از بین رفتن شکل و دیواره لوبول‌ها، دژنره شدن و آتروفی سلول‌های جنسی و هم چنین کاهش تعداد سلول‌های جنسی از جمله آسیب‌های وارد شده به بافت بیضه در بالاترین غلظت می‌باشد که در مقایسه با گروه شاهد سلول‌ها در مرحله رسیدگی پایین‌تر قرار داشته و اندازه گناد کاهش چشمگیری پیدا کرده است. مطالعات مختلفی در این رابطه صورت گرفته که تاثیر منفی آلاینده‌ها بر بافت گناد را تایید می‌کند. در مطالعه صورت گرفته توسط شموشکی و همکاران(۱۳۹۰) کاهش وزن گناد و شاخص گنادی ماهیان سفید در مواجهه با غلظت-های مختلف سم دیازینون مشاهده گردید که این امر می-

www.SID.ir

Archive of SID

تواند ناشی از تحلیل رفتن آن در اثر افزایش غلظت سم باشد. بررسی‌های آسیب‌شناسی نیز عوارضی مانند آتروفی، فیبروز و کاهش اسپرماتیدها در بیضه را نشان داد(۶). به هم خوردن مراحل رسیدگی چرخه سلولی، پراکندگی اسپرماتوگونیاها، افزایش نواحی بین لوبول‌ها، خوشه‌ای شدن اسپرماتوسیت‌ها، پراکندگی ماده کروماتین و نازک شدن دیواره بیضه در غلظت‌های پایین و تخریب گسترده اسپرماتوگونی‌ها، خارج شدن برخی از اسپرماتوگونیاها از چرخه اسپرماتوژنزیز و افزایش نواحی بین لوبول‌ها از جمله عوارض مواجهه ماهی قزل آلای رنگین‌کمان با علف‌کش رانداپ در دوزهای بالاتر می‌باشد(۲۳). در بررسی صورت گرفته روی بیضه ماهی سفید تحت تاثیر غلظت‌های مختلف دیازینون آسیب‌های هیستوپاتولوژیکی مشاهده شد که با افزایش غلظت سم در بافت مشهودتر بود. در این بررسی با افزایش غلظت سم ضایعات وارد شده بر ساختمان لوبول‌ها بیشتر شده و در نهایت منجر به مرگ سلول‌های جنسی و توقف فرآیند اسپرماتوژنزیز شده است(۵). در بافت بیضه ماهی *Lepomis macrochirus* در مواجهه با ۶۰ میکروگرم در لیتر سم دیازینون کاهش قطر لومن، کاهش قطر لوله‌های اسپرم و هم چنین کاهش قطر اسپرماتوگونی‌ها از عوارض مشاهده شده می‌باشد(۱۹). در ماهی کپور نیز بروز ناهنجاری‌های ساختاری، از بین رفتن مجاری اسپرم بر و بافت بینابینی، تخریب سلول‌های لایدیگ و آتروفی سلول‌های بافت بیضه در معرض سم دیازینون مشاهده شده است(۱۱). بررسی بافت‌شناسی و هیستوپاتولوژیک بافت بیضه در ماهی‌های کپور که در معرض سم دیازینون قرار گرفته بودند ناهنجاری‌های ساختاری از جمله از بین رفتن مجاری اسپرم بر و بافت بینابینی، دژنره شدن سلول‌های لایدیگ و آتروفی سلول‌های بافت بیضه را نشان داد. هم چنین فاگوسیتوز سلول‌های آسیب دیده و در نتیجه پیدایش واکوئل‌های سلولی در ساختار بافت بیضه نیز در ماهی تحت تیمار با دوز بالاتر مشاهده شد که در واقع پیدایش واکوئل‌ها در سلول‌های سرتولی و تغییرات آسیب شناسی بافت بیضه ظاهرا به علت فعالیت فاگوسیتوزی و تحلیل و تضعیف فعالیت سلول‌های سرتولی می‌باشد که این امر می‌تواند باعث ایجاد وقفه در فرآیند اسپرماتوژنز و به تاخیر افتادن روند تولید و بلوغ اسپرماتوزوئیدها شود(۱). Lin et al (2018) پس از افزایش غلظت نیتریت تغییرات پاتولوژیک را در ماهی گورخری مشاهده کردند که منجر به کاهش تراکم سلول و افزایش اجسام باقی مانده در سلول‌های سرتولی و زیر ساخت شد(۳۲). این نتایج نشان‌دهنده اختلال در روند اسپرماتوژنیک بود. تغییرات وابسته به غلظت بافت بیضه ماهی گورخری در مواجهه با میکروسیستین ـ لوسین آرژنین در مطالعه‌ی Su et al (2016) کاهش چشمگیر میزان اسپرم بالغ، افزایش فضای بین سلولی و تخریب اپیتلیوم توبولی مانند سلول‌های سرتولی بود(۴۱). کاهش تراکم سلولی و تخریب لوله‌های اسپرمی هم در ماهی مداکا غوطه‌ور شده در غلظت کم(۵ میکروگرم بر لیتر) میکروسیستن ـ لوسین آرژنین به مدت ۳۰ روز در مطالعه‌ی Trinchet et al (2011) گزارش شده است(۴۴). Qiao et al (2013) وخامت سلولی و فضاهای خالی بین سلولی اپتیکی را در بیضه ماهی گورخری بالغ پس از مواجهه با میکروسیستن ـ لوسین آرژنین به مدت ۳۰ روزرا گزارش کردند(۳۵) که این نتایج و همچنین نتایج مطالعه Su et al (2016) و Trinchet et al (2011) نشان دهنده‌ی این امر می‌باشد که سلول های اسپرماتوگونیا و سلول‌های سرتولی احتمالاً از عوامل اصلی مواجهه با میکروسیستن ـ لوسین آرژنین در بافت بیضه می‌باشند. در ماهی سلول‌های سرتولی، سلول‌های سوماتیک بیضه هستند و اسپرماتوژنز تنها زمانی اتفاق می‌افتد که اسپرماتوگونیوم به طور کامل توسط پروتئین‌های سیتوپلاسم سلول‌های سرتولی در کیست‌ها احاطه شده باشد. تحقیقات قبلی نشان داده‌اند که سلول‌های سرتولی

www.SID.ir

Archive of SID

نقش اصلی را در توسعه بیضه‌ها و تولید اسپرم در ماهی‌های استخوانی بر عهده دارند(۳۹، ۳۸). درواقع تنظیم غدد درون‌ریز اسپرماتوژنز با فعالیت هورمون محرک فولیکول (FSH) و T در سلول‌های سرتولی مرتبط است(۵). در مطالعات مختلف مشخص گردیده که سمیت دیازینون در گونه‌های مختلف ماهیان متفاوت و به سن، جنسیت، اندازه بدن ماهی، شرایط آب و هوایی و فرمول آفت‌کش، خصوصیات شیمیایی محیط و فاکتورهای دیگر بستگی دارد(۶). سم دیازینون به طور مستقیم روی بافت‌ها و سلول‌های جنسی اثر گذاشته و موجب آسیب‌های مختلف در ساختار بیضه و رده‌های مختلف سلولی در فرآیند اسپرماتوژنزیز و اختلالات هورمونی می‌شود(۴۲). هم چنین علاوه بر تماس مستقیم بر بافت تولیدمثلی، دیازینون و سموم ارگانوفسفره قادر به ایجاد آسیب در مکانیسم‌های فیزیولوژی تولیدمثل از طریق اختلال در محور هیپوتالاموس- هیپوفیز و گناد و تولید هورمون‌های گنادوتروپینی نیز می‌باشند(۱۰). سلول‌های جنسی که از اجزاء اصلی در فرآیند اسپرماتوژنز می‌باشند، کاهش تعداد و کیفیت آن ها در تولید اسپرماتوزوآهای سالم و بی‌نقص و از طرفی کاهش تولید اسپرم سالم و فعال در قابلیت باروری مولدین نر تاثیرگذار خواهد بود. با این وجود بروز چنین تغییراتی در بافت بیضه کیفیت و بازماندگی محصولات جنسی را کاهش داده و در نهایت قابلیت باروری ماهیان نر کاهش می‌یابد(۸). مطالعه حاضر که در آن آسیب‌های هیستوپاتولوژیکی با افزایش غلظت سم افزایش یافته، نشان‌دهنده تاثیر آلاینده‌ها از جمله سم دیازینون بر انرژی تخصص یافته جهت رشد و تکامل غدد جنسی می‌باشد. بافت بیضه یکی از نقاط اثر سم بوده که ماهی پس از مواجهه با آن دچار استرس شده و جهت برقراری هوموستازی و تعادل فیزیولوژیکی خود بیشترین انرژی را مصرف می‌کند. بنابراین انرژی جهت ساخت و تکامل گناد کاهش یافته و سلول‌های جنسی در مراحل پایین‌تری از رشد قرار می‌گیرند. در این‌صورت حجم گناد نیز کاهش می‌یابد.

منابع

۱-بنایی، م.، میرواقفی، ع.ر.، احمدی، ک.و.، عاشوری، ر. ۱۳۸۸. تاثیر غلظت تحت کشنده دیازینون بر تغییرات هیستوپاتولوژیک بیضه و تخمدان ماهی کپور معمولی(*Cyprinus carpio*). مجله بیولوژی دریا. سال اول. شماره ۲. ص ۲۶- ۱۴.

۲-پژند، ذ. ۱۳۷۸. تعیین غلظت کشنده(LC5096h) سموم حشره کش دیازینون و علف کش بوتاکلر بر روی دو گونه از ماهیان خاویاری قره برون و ازون برون. پایان نامه کارشناسی ارشد رشته شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان. ص ۱۶- ۱۲.

۳-خانجانی، ع.، پورمیرزا، م. سم شناسی. چاپ اول. دانشگاه بوعلی سینا. ۱۳۸۰، ۱۶۴ ص.

٤-درویشی، م.، صفری، ر. ۱۳۹۷. ماهی گورخری(*Danio rerio*) به عنوان مدل ژنوتوکسیکولوژی. آبزیان زینتی. سال پنجم. شماره ۴. ص ۲۳-۳۴.

۵-فداکارماسوله، ف.، مجازی امیری، ب.، میرواقفی، ع.ر.، نعمت الهی، م.ع. ۱۳۹۰. بررسی تاثیر تخریبی سم دیازینون بر ساختار بیضه ماهی سفید دریای خزر(*Ruilus frisii kutum*) با استفاده از تکنیک کشت بافت (در شرایط In Vitro). مجله منابع طبیعی ایران. سال شست و چهارم. شماره ۲. ص ۱۲۸- ۱۲۱.

٦-محمد نژاد شموشکی، م.، سلطانی، م.، شریف پور، ع.، ایمانپور، م.ر.، بهارلویی، ا.، نعیمی، م.ا. ۱۳۹۰. بررسی اثر غلظت های تحت کشنده سم دیازینون بر بافت های گناد، مغز و قلب مولدین نر ماهی سفید(*Rutilus frisii kutum* Kamensky, 1901). مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز. سال پنجم. شماره ۳. ص ۱۲۹۴- ۱۲۸۷.

۷-وثوقی، غ.، مستجیر، ب. ماهیان آب شیرین. تهران: انتشارات دانشگاه تهران. ۳۱۷ ص.

8.Abadin, H., Todd, D., Wohlers, D., Hard, C.M. (2009). Priority data needs for Diazinon. Syracuse Research Corporation, 75 p.

www.SID.ir

Archive of SID

9.Abd, M.E.A., Sahlab, A., Abd, M.E.K. (1994). Influence of diazinon and deltamethrin on reproductive organs and fertility of male rats. DTW Deutsche tierarztliche Wochenschrift, 101(6);230-2.
10. Arcand-Hoy, L.D., Benson, W.H. (1998). Fish reproduction: an ecologically relevant indicator of endocrine disruption. Environmental Toxicology and Chemistry: An International J, 17(1):49-57.
11. Banai, M.,Miryaghefi, A.R., Ashouri, R. (2009). Effect of sublethal concentration of diazinonon histopathological changes of male carp (*Cyprnius carpio*) testis. Lagoons conference in Azad university of Ahvaz, 127p.
12. Castano, A., Bols, N., Braunbeck, T., Dierick, P., Halder, M., Isomaa, B., et al. (1986). Diazinon hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. US Fish and Wildlife Service, US, 85;1-38.
13. Cerda, J., Conrad, M., Markl, J., Brand, M., Herrmann, H. (1998). Zebrafish vimentin: molecular characterisation, assembly properties and developmental expression. Europen Journal of Cell Biology, 77(3);175-187.
14. Chang, J., Liu, S., Zhou, S., Wang, M., Zhu, G. (2013). Effects of butachlor on reproduction and hormone levels in adult zebrafish (*Danio rerio*). Experimental and Toxicology Pathology, 65(1-2); 205-209.
15. Croucher, L., Jewess, P., Roberts, M.C. (2007). Metabolic Pathways of Agrochemicals: Part 2: Insecticides and Fungicides: Royal Society of Chemistry.
16. Dahlgren, J., Takhar, H., Ruffalo, C., Zwass, M. (2004). Health effects of diazinonon a family. Journal of Toxicology: Clinical Toxicology, 42(5);579-91.
17. Dooley, K., Zon, L.I. (2000). Zebrafish: a model system for the study of human disease. Development, 10(3);252-256.
18. Dutta, H., Meijer, H. (2003). Sublethal effects of diazinon on the structure of the testis of bluegill, Lepomis macrochirus: a microscopic analysis. Environmental pollution, 125(3);355-60.
19. Dutta, H.M., Maxwell, L.B. (2003). Histological examination of sublethal effects of diazinon on ovary of bluegill, Lepomis macrochirus. Environmental pollution, 121 (1);95-102.
20. Eisen, J.S. (1996). Zebrafish make a big splash. Cell, 87(6);969-977.
21. Fanta, E., Rios, F.S.A., Romão, S., Vianna, A.C.C., Freiberger, S. (2003). Histopathology of the fish Corydoraspaleatus contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. Ecotoxicology and environmental safety, 54(2);119-30.
22. Fattahi, E., Jorsaraei, S.G.A., Parivar, K., Moghaddamnia, A.A. (2010). The effects of a single dosage of Diazinon and Hinosan on the structure of testis tissue and sexual hormones in Mice. Yakhteh Medical Journal, 12 (3);405-410.
23. Figueiredo-Fernandes, A., Ferreira-Cardoso, J.V., Garcia-Santos, S., Monteiro, S.M., Carrola, J., Matos, P. (2007). Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, Oreochromis niloticus, exposed to waterborne copper. Pesquisa Veterinária Brasileira, 27(3);103-9.
24. Gerlai, R., Lahav, M., Guo, S., Rosenthal, A. (2000). Drinks like a fish: zebrafish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 67(4);773-782.
25. Goldsmith, P. (2004). Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why, and chemical toxicity. Toxicological Sciences, 86;6-19.
26. Hamm, J., Wilson, B., Hinton, D. (1998). Organophosphate-induced acetyl cholin esterase inhibition and embryonic retinal cell necrosis in vivo in the teleost(*Oryzias latipes*). Neurotoxicology, 19(6);853-569.
27. Hatjian, B., Mutch, E., Williams, F., Blain, P., Edwards, J. (2000). Cytogenetic response without changes in peripheral cholin esterase enzymes following exposure to a sheep dip containing diazinon in vivo and in vitro. Mutation Research /Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 472(1);85-92.
28. Hill, A.J., Teraoka, H., Heideman, W., Peterson, R.E. (2005). Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. Toxicological Sciences, 86(1);6-19.
29. Konda, L.N., Czinkota, I., Füleky, G., Morovján, G. (2002). Modeling of single-step and multistep adsorption isotherms of organic pesticides on soil. J of Agricultural and Food Shemistry, 50(25);7326-31.
30. Kuivila, K.M., Foe, C.G. (1995). Concentrations, transport and biological effects of dormant spray pesticides in the San Francisco Estuary, California. Environmental Toxicology and Chemistry, 14(7);1141-50.
31. Lasheidani, M., Balouchi, S., Keyvan, A., Jamili, S., Falakru, K. (2008). Effect of butachlor on density, volume and number of abnormal sperms in caspian kutum(*Rutilus Frisii Kutum*). Research J of Environmental Sciences, 2; 474-482.

www.SID.ir

Archive of SID

32. Lin, W., Guo, H., Li, Y., Wang, L., Zhang, D., Hou, J., et al. (2018). Single and combined exposure of microcystin-LR and nitrit results in reproductive endocrine disruption via hypo thalamic pituitary-gonadal-liver axis.Chemo sphere, 211;1137-1146.

33. Maxwell, L.B., Dutta, H. (2005). Diazinon-induced endocrine disruption in bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 60(1); 21-7.

34. Pina-Guzman, B., Solis-Heredia, M., Quintanilla-Vega, B. (2005). Diazinon alters sperm chromatin structure in mice by phosphorylating nuclear protamines. Toxicology and Applied pharmacology, 202(2);189-98.

35. Qiao, Q., Liu, W., Wu, K., Song, T., Hu, J., Huang, X. (2013). Female zebrafish(*Danio rerio*) are more vulnerable than males to microcystin-LR exposure, without exhibiting estrogenic effects. Aquatic toxicology, 142; 272-282.

36.Sánchez-Peña, L., Reyes, B., López-Carrillo, L., Recio, R., Morán-Martínez, J., Cebrián, M. (2004). Changes on sperm chromatin structure in organophosphorus agricultural workers. Toxicology and Applied Pharmacology, 196; 108-13.

37. Sapozhnikova, Y., Bawardi, O., Schlenk, D. (2004). Pesticides and PCBs in sediments and fish from the Salton Sea, California, USA. Chemosphere, 55 (6); 797-809.

38. Schulz, R.d.W., Menting, S., Bogerd, J., França, L.R., Vilela, D.A., Godinho, H.P. (2005). Sertoli cell proliferation in the adult testis evidence from two fish species belonging to different orders. Biology of reproduction, 73(5); 891-8.

39. Schulz, R.W., De França, L.R., Lareyre, J.J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R.H. (2010). Spermatogenesis in fish. General and comparative endocrinology, 165(3); 390-411.

40. Spitsbergen, J.M., Kent, M.L. (2003). The state of the art of the zebrafish model for toxicology and toxicopathology research-advantages and current limitations. Toxicologic pathology, 31(1-suppl); 62-87.

41. Su, Y., Li, L., Hou, J., Wu, N., Lin, W., Li, G. (2016). Life-cycle exposure to microcystin-LR interferes with the reproductive endocrine system of male zebrafish. Aquatic Toxicology, 175; 205-12.

42. Swanson, P., Dickey, J.T., Campbell, B. (2003). Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. Fish Physiology and Biochemistry, 28(1-4); 53-9.

43. Teng, M., Qi, S., Zhu, W., Wang, Y., Wang, D., Dong, K., Wang, C. (2018). Effects of the bioconcentration and parental transfer of environmentally relevant concentrations of difenoconazole on endocrine disruption in zebra fish (*Danio rerio*). Environmental Pollution, 233; 208-217.

44. Trinchet, I., Djediat, C., Huet, H., Dao, S.P., Edery, M. (2011). Pathological modifications following sub-chronic exposure of medaka fish(*Oryzias latipes*) to microcystin-LR. Reproductive toxicology, 32(3); 329-340.

45. Van Der Geest, H., Stuijfzand, S., Kraak, M., Admiraal, W. (1997). Impact ofa diazinon calamity in 1996 on the aquatic macroinvertebrates in the River Meuse, The Nether lands. Netherland J of Aquatic Ecology, 30 (4); 327-30.

46. Yilmaz, N., Yilmaz, M., Altuntas, I. (2012). Diazinon-induced brain toxicity and protection by vitamins E plus C. Toxicology and industrial health, 28 (1); 51-57.

47. Yu, L., Liu, C., Chen, Q., Zhou, B. (2014). Endocrine disruption and reproduction impairment in zebrafish after long-term exposure to DE-71. Environmental toxicology and chemistry, 33(6);1354-1362.

www.SID.ir

Archive of SID

Effect of Sublethal Concentrations of Diazinon in Testicular Tissue in Zebrafish (*Danio rerio*)

M.Darvishi[1],R.Safari[2]

1. Graduate of Fisheries - Aquaculture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. Iran.
M_darvishi_ m71@yahoo.com

2.Assistant Professor, Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources.Iran

Received:2018. 12. 12 **Accepted: 2020.10.5**

Abstract

Inroduction & Objective: Diazinon is an organophosphoric pesticide used in agricultural fields. The aim of this study was to evaluate the effect of sublethal concentrations of diazinon on testicular tissue in *Danio rerio*.

Material and Methods: For this purpose, 240 male animals with mean weight of 0.20 ± 0.05 were subjected to 0.8, 1.6 and 3.2 mg / l of diazinon and control for 30 days.

Results: In histopathological study, the highest abnormality was observed in the highest dose (3.2 mg / l) and the most important abnormality was reduction in gonad size. In control group, the testicular tissue had adequate size and growth, and the cells were in the sexual maturity stage, but in 0.8 mg/ l, cellular atrophy and lose of lobular walls was observedIn 1.6 mg / l, the degeneration and atrophy of the sexual cells, destruction of shape and walls of the lobules was observed. At the highest concentration, the degeneration and atrophy of the sexual cells, destruction of shape and wall of the lobules and the decrease in the number of sex cells were observed. This decrease in the number of sexual cells results in reduction of testicular tissue size.

Conclusion: These observations indicate an increase in complications and anomalies with the increase in toxin concentrations

Keywords: Diazinon, Testicular Tissue, *Danio rerio*.

.

www.SID.ir