Archive of SID

نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۱۴ بهار ۱۳۹۶
DOI: 10.22034/vj.2017.107801

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

• **محمود زارعی امامزاده هاشمی**
دانشجوی کارشناسی ارشد بوم شناسی دریا،
دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه مازندران
• **حسن تقوی جلودار (نویسنده مسئول)**
گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
• **فاطمه نظرحقیقی**
دکتری بوم شناسی دریا، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان
تاریخ دریافت:۱۹ ۰۸ ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: ۳۰ ۰۲ ۱۳۹۵
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 زیربن باله پشتی آن‌ها جدا شد. بافت‌ها در محلول بوئن فیکس شد و پس از طی مراحل بافت شناسی، برش های ۶ میکرونی تهیه و با روش هماتوکسیلین_ائوزین رنگ‌آمیزی شد. یافته‌های بافتی در این پژوهش دال‌بر تغییر پاتولوژیکی نظیر افزایش مراکز ملانوماکروفاژ، چروکیدگی گلومرول‌ها و اتساع فضای بومن، کاهش یا انسداد فضای ادراری، اتساع موبرگ‌های گلومرولی، ضخیم شدن غشاء پایه گلومرولی، دژنرسانس 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. یعلاوه تغییر پاتولوژیکی بافتی از قبیل تغییرات در خطوط، هسته، تورم ابری، دژنرسانس هیالین، دژنر سانس دانه‌ای و نکروز در بافت عضلانی مشاهده شد که بیشترین شدت تخریب در غلظت ۰/۲۸ میلی لیتر بر لیتر بود.

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

www.SID.ir

Archive of SID



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 in1393. 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 kidneies 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 6µ 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 کش‌ها در درجه نخست به منظور حفظ و سلامت انسان و بوم سازگان بکار گرفته می‌شوند، اما فقط یک درصد از آن‌ها جهت بهبود بکار می‌روند و ۹۹ درصد وارد بوم سازگان شده و باعث آلودگی می‌گردند(۳۴). یکی از روش‌های استاندارد، جهت تعیین میزان آلودگی بوم سازگان آبی بررسی آسیب شناسی بافت و تشخیص تغییرات آسیب شناختی در ماهیان می‌باشد (۲۴).

آلاینده‌های آلی یک گروه بزرگ از آلاینده‌ها هستند که وارد بوم سازگان‌ها شده و سلامت آب و آبزیان را به خطر می‌اندازند. از جمله مهم‌ترین آلاینده‌های آلی محیطی می‌توان به آفت‌کش‌ها اشاره کرد. استفاده گسترده از آفت کش‌ها (حشره کش‌ها، قارچ کش‌ها، علف کش‌ها و...) منجر به افزایش آلودگی در آب‌ها می‌شوند. این مواد سبب بروز عوارض و آسیب‌های بافتی متعددی در آبزیان و مصرف کنندگان آن‌ها می‌گردند (۱۷). بوتاکلر، یکی از رایج‌ترین علف‌کش‌ها است که جهت کنترل علف‌های هرز مزارع برنج به ویژه در ایران مورد استفاده قرار می‌گیرد. با توجه به این که بیشتر زمین‌های کشاورزی در مسیر رودخانه‌ها واقع شده‌اند، زهاب آلوده شده توسط آفت‌کش‌ها منجر به اثرات زیان بار مختلفی بر روی موجودات آبزی از جمله ماهی‌ها می‌گردد (۹).

تغییرات آسیب‌شناسی بافت می‌تواند به عنوان شاخصی جهت بررسی اثرات آلاینده‌های مختلف انسانی در موجودات زنده، استفاده شود و بازتابی از سلامت عمومی کل جمعیت بوم سازگان باشد. این زیست نشانگرهای آسیب‌شناسی بافت در ارتباط نزدیک با زیست نشانگر تنش‌زا در بسیاری از آلاینده‌ها که توانایی تحریک تغییرات یاخته‌ای را دارند، می‌باشند، لذا اندامگان میتلا، متحمل فعالیت سوخت و سازی می‌گردد. از جمله زیست نشانگرهای مهم آسیب‌شناختی بافت که در پایش یک بوم سازگان به‌کار گرفته می‌شوند، زیست نشانگرهایی هستند که به‌طور اختصاصی اندام‌های حیاتی نظیر عضله را درگیر می‌کنند(۱۰). نظر به اینکه مطالعات آسیب شناسی بافت یک ابزار مفید برای ارزیابی درجه آلودگی به ویژه برای مقادیر زیر کشنده آلاینده‌ها در شرایط مزمن است، با توجه به توسعه تغییرات آسیب‌شناختی بافت جهت تشخیص اثر رهایش آرام چنده مشخصی از آلاینده‌ی بوتاکلر بربافت عضله ماهی قرمز( به عنوان یکی از اندام‌های هدف آلاینده‌ها) در این مطالعه نیز از روش بررسی آسیب شناسی بافت استفاده شده است.



www.SID.ir

Archive of SID



## مواد و روش کار

### انتخاب نمونه

در این پژوهش ۳۲ قطعه ماهی قرمز با میانگین (± انحراف معیار) وزن و طول به ترتیب ۳۱/۴۷±۱۰۰/۹۷ گرم و ۱۴/۱۹ ± ۲۳/۲ سانتیمتر در زمستان ۱۳۹۳ تهیه گردید. ابتدا نمونه‌ها به آبزیدان ۷۰ لیتری حاوی آب چاه انتقال یافتند. سپس ۴ آبزیدان انتخاب و در داخل هر کدام ۸ قطعه ماهی قرمز قرار گرفته که توسط غذای آماده تغذیه می‌شدند. طی دوره آزمایش دما (۲۰±۲°C) و pH (۸/۵- ۷/۵) هر روز بازبینی شدند. از ۴ آبزیدان تهیه شده، یکی بعنوان شاهد در نظر گرفته شد و سه تای دیگر آنها غلظت‌های زیرکشنده آلاینده بوتاکلر ۶۰ درصد به ترتیب ۰/۱، ۰/۱۴ و ۰/۲۸ میلی‌لیتر بر لیتر به مدت ۱۵ روز اضافه گردید (آب آبزیدان‌ها هر سه روز یک بار تعویض شد و مقادیر فوق دوباره به محیط اضافه شد).

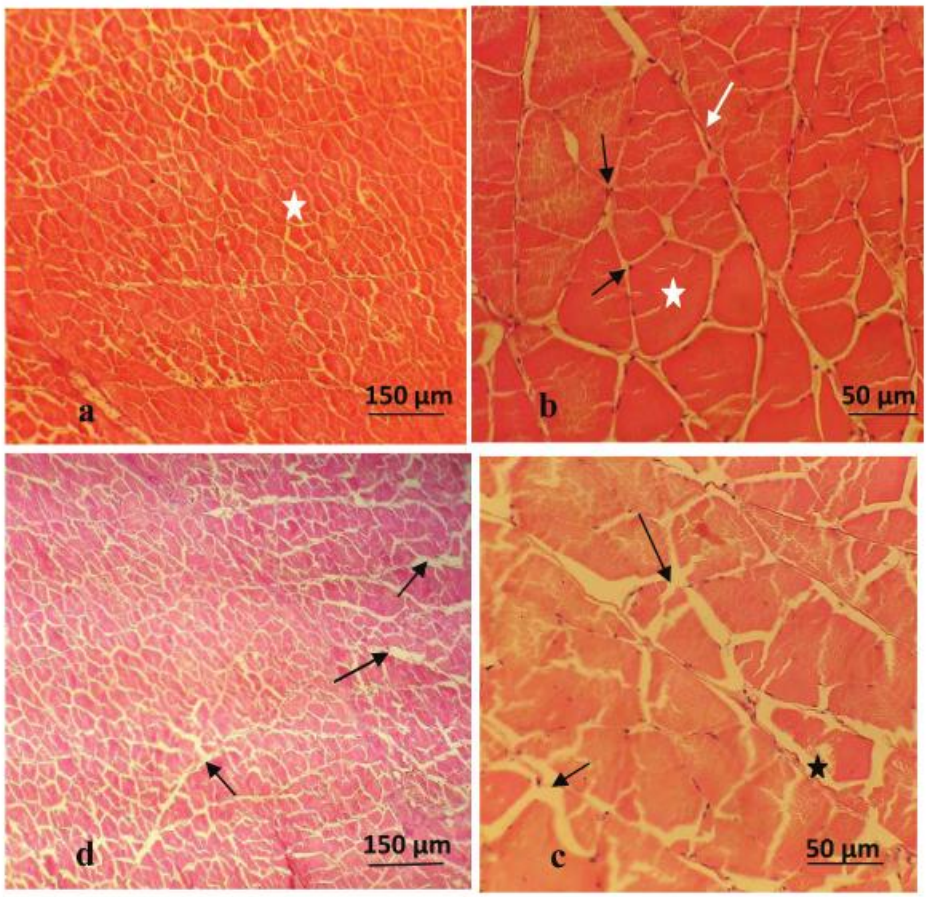
### رنگ آمیزی

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-ائوزین 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




شکل۱- اثرات آسیب شناختی عضله در غلظت‌های متفاوت آلاینده بوتاکلر در ماهی قرمز، (رنگ آمیزی H&E). (a و b) تیمار شاهد (۱۰۰X)؛ 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 ml/l 1/0 (۴۰۰X)؛ 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).



www.SID.ir

Archive of SID



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

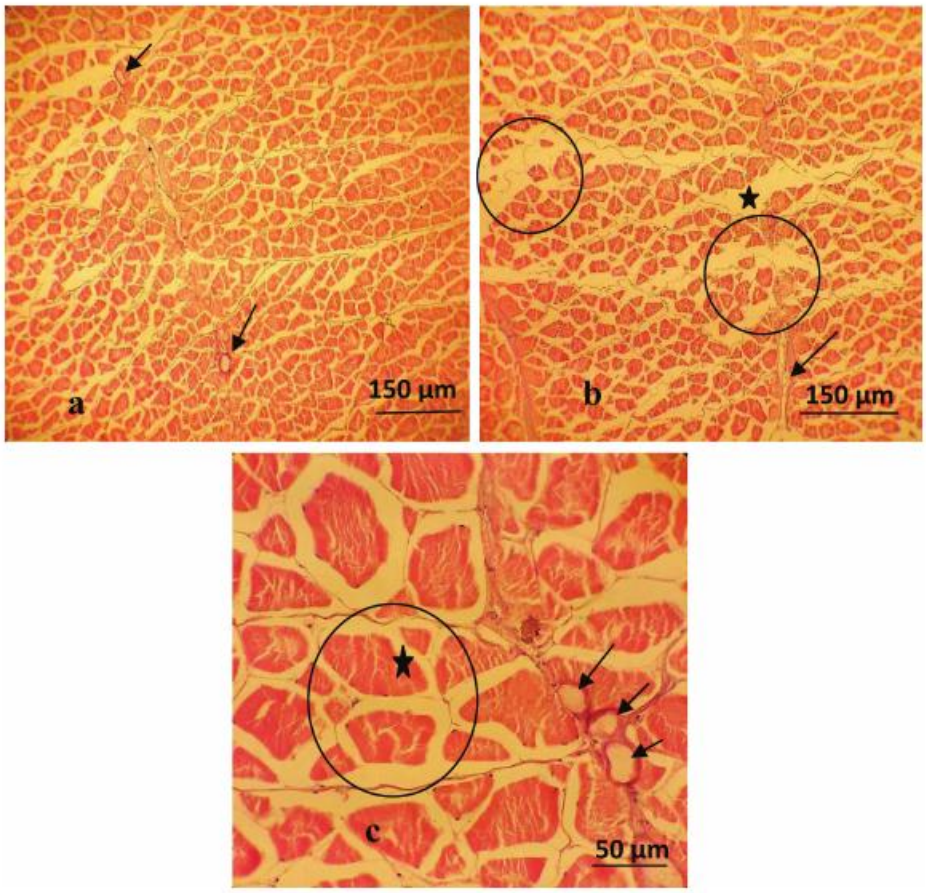
امـــا در نمونه بافتی تهیه شـــده از غلظت ۰/۱ میلی لیتـــر بر لیتر بوتاکلر، تغییرات اندکی در خطوط ماهیچه‌ای (اســـتحاله هیالیـــن) به‌همراه تغییرات هسته‌ای و بافت مردگی و خیز به‌طور خفیف مشاهده گردید (شکل ۱: d و c).

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، کربجه شـــدن، تورم ابری، بافت مردگی و اســـتحاله هیالین و استحاله هسته‌ای با شدت بیشتری نسبت به غلظت ۰/۱ میلی لیتر بر لیتر مشاهده شد. در این تیمار شـــکاف درون فیبرهای عضلانی واضح تر شده و خیز با شدت بسیار بیشتری قابل مشاهده بود (شکل ۲).

در بافت عضلانی ماهیان تیمار شـــده با غلظت ۰/۲۸ میلی‌لیتر بر لیتر افزایش تغییرات در خطوط با اســـتحاله 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 میلی‌لیتر بر لیتر مشاهده شد. همچنین تورم ابری، استحاله هیالن 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 کپـــور ماهیان که از جمله ماهی‌های قرمز هســـتند، لوله ادراری از گوییـــنـــه، لوله‌های جلویی، لوله‌های انتهایی و لوله‌های گردآورنده تشـــکیل شده‌اند.گلومرول از فضای بومن، سلول‌های مزانژیال، سلول‌های اندوتلیال،




شکل۲- اثرات آسیب شناختی عضله با غلظت ml/l 14/0 آلاینده بوتاکلر در ماهی قرمز، (رنگ آمیزی H&E).

(a) (X۱۰۰): ایجاد کربجه در بین دستجات رشته‌های عضلانی(پیکان سیاه)؛

(b) (X۱۰۰): شدت یافتن استحاله هیالین و استحاله دانه‌ای(دایره سیاه)، بافت مرده و خیز شدید(ستاره سیاه) و تورم ابری و کربجه شدن(پیکان سیاه)؛

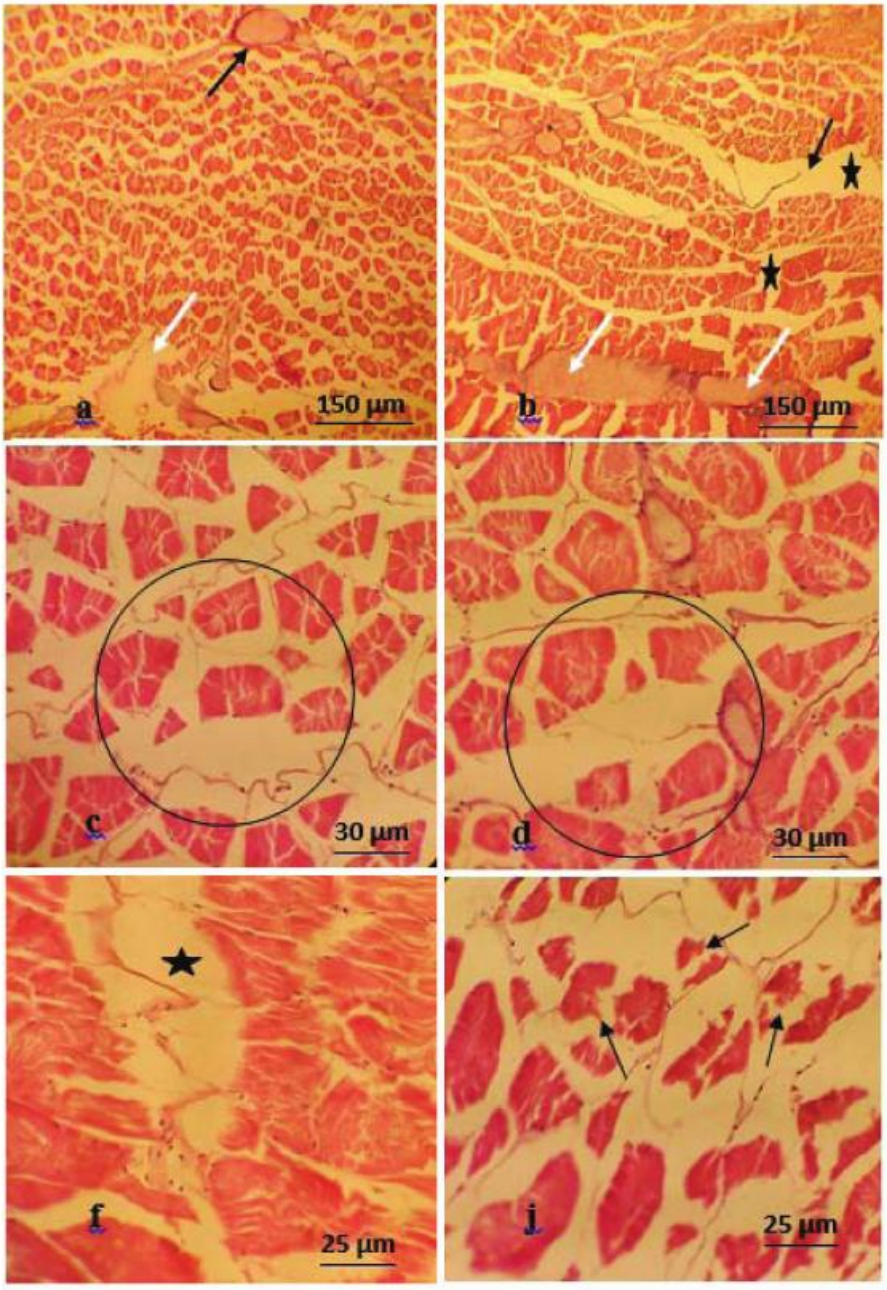
(c) (X۴۰۰): شدت یافتن استحاله هیالین و استحاله دانه‌ای(دایره سیاه)، بافت مرده و خیز شدید(ستاره سیاه) و تورم ابری و کربجه شدن(پیکان سیاه).



www.SID.ir

Archive of SID






شکل۳- اثرات آسیب شناختی عضله با غلظت ml/128/0 آلاینده بوتاکلر در ماهی قرمز،(رنگ آمیزی H&E).

(a) (۱۰۰X): کریچه شدن(پیکان سیاه) و تورم ابری(پیکان سفید) دستجات رشته‌های عضلانی؛

(b) (۱۰۰X): خیز شدید(ستاره سیاه)، استحاله هیالین، تغییرشدید خطوط (پیکان سیاه) و تورم ابری (پیکان سفید)؛

(c و d) (۴۰۰X): ادم شدید، استحاله هیالین و تغییر شدید خطوط (دایره سیاه)؛

(f) (۴۰۰X): بافت مرده و تورم ابری (ستاره سیاه)؛

(j) (۴۰۰X) شکاف برداشتن و استحاله شدن شدید دستجات رشته‌های عضلانی (پیکان سیاه).



www.SID.ir

Archive of SID



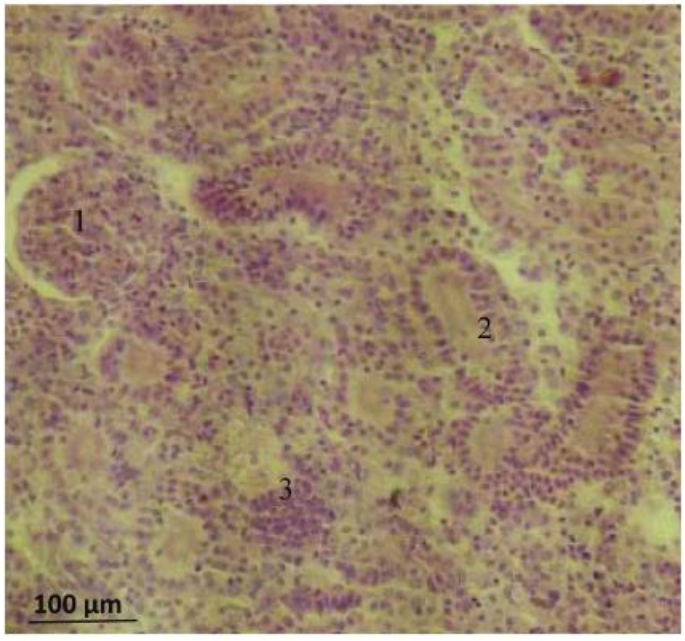
اپیتلیوم احشایی پوشینه کلیوی، اپیتلیوم جداری پوشینه کلیوی، یاخته‌های پودوسیت و مویرگ‌ها تشکیل شده است، که در شکل۴ به برخی از این موارد در بافت کلیه ماهی قرمز شاهد نشان داده شده است.

جدا شدن بافت پوششی بیشتر لوله‌های کلیوی از غشاء پایه، تیمار بافت مرده در یاخته‌های لوله‌ای و بافت همبند، اتساع مویرگ گلومرولی و خونریزی درکنار نفوذ لنفوسیتی از عمده‌ترین ضایعات مشاهده شده در نمونه‌های تیمار بوتاکلر در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۱۴ میلی‌لیتر بر لیتر بود (شکل۵). 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 بوم سازگان می‌گردند. از آنجایی که نوع و گونه‌ی ماهی‌های کشورهای مختلف در اکوسیستم‌های متفاوت است، خواص فیزیولوژی هر گونه ماهی و نیز عکس المعل ماهی‌ها در برابر آلودگی‌ها یکسان نمی باشد، لذا استفاده از تکنیک بیومارکرهای هیستوپاتولوژیک به عنوان یک شاخص بسیار مناسب در ارزیابی سلامت 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 آسیب شناسی 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 یا ناپدید شدن خطوط همراه است در هر سه غلظت قابل مشاهده بود. استحاله هیالین به همراه ناپدید شدن خطوط ماهیچه‌ای دیده شد. استحاله دانه‌ای بصورت شکل‌گیری سارکوپلاسم دانه‌دار شده نیز گزارش شد. بوتاکلر بر عضله ماهی کپور علف‌خوار نیز اثرات مشابهی با این تحقیق به جا گذاشته




**شکل۴- اثرات آسیب‌شناختی کلیه تیمار شاهد در ماهی قرمز، (رنگ‌آمیزی H&E): جسمک کلیوی (۱)، لوله‌های ادراری با ساختار طبیعی (۲)، بافت همبند کلیوی (۳).**



www.SID.ir

Archive of SID



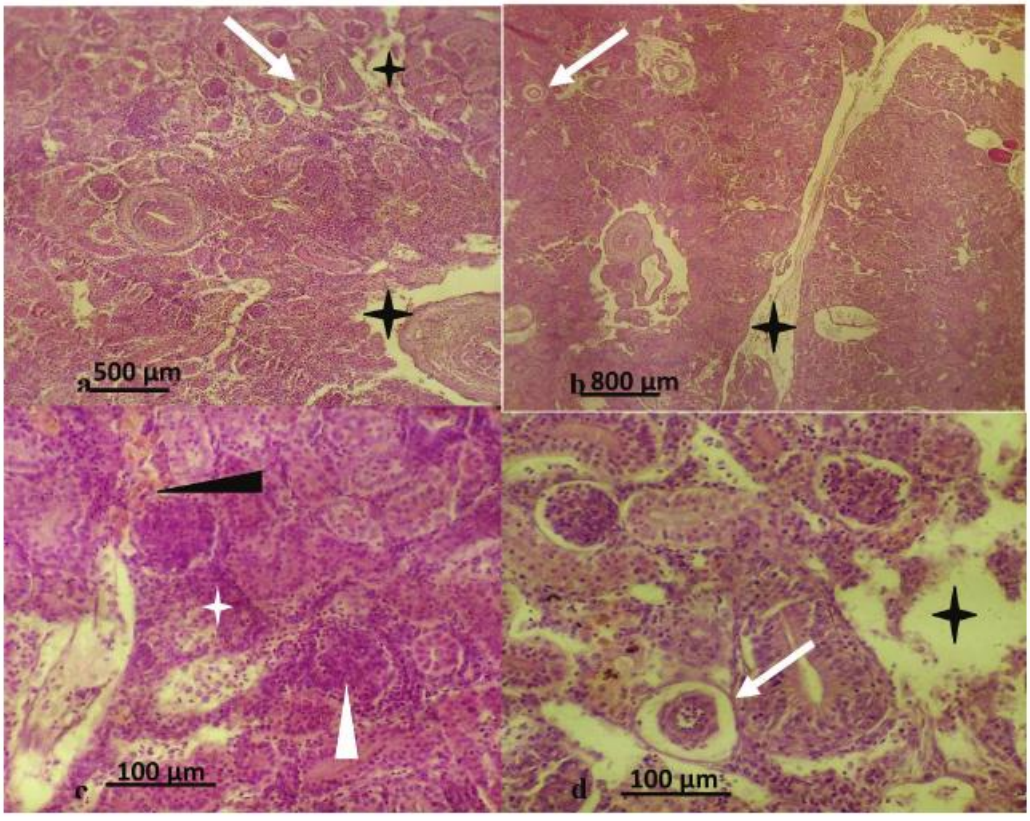
است (۶). اثرات آسیب شناسی بافت مشابهی در مطالعاتی که بر روی اثر آلاینده‌های مختلف در ماهیان گوناگون انجام شده تاکنون گزارش شده است (۳، ۲۵، ۲۸، ۳۶، ۳۸، ۳۷).

محرک اولیه حاصل از وجود آفت‌کش‌ها می‌تواند سیب القای بیش فعالی و تحریک‌پذیری در آبزی 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 یا 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 آسیب‌دیده در اثر مواجهه *Nandus nandus* با کنیلفوس (quinolphos) و پادان (padan) قابل مشاهده بود (۵).

سم بوتاکلر در بدن ماهی و در کید به متابولیت‌های خطرناکی تبدیل می‌گردد که بطور مستقیم سیب القای تکروز 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 واکوئله شدن و بافت




**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 200 و X 100): جداشدن 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): جداشدن بافت پوششی بیشتر لوله‌های کلیوی از غشاء پایه(پیکان سفید)، بافت مردگی در یاخته‌های توبولی(پیکان سیاه) و بافت همبند (ستاره سیاه)، اتساع مویرگ گلومرولی (نوک پیکان سفید) و خونریزی(نوک پیکان سیاه) در کنار نفوذ لنفوسیتی (ستاره سفید).**



www.SID.ir

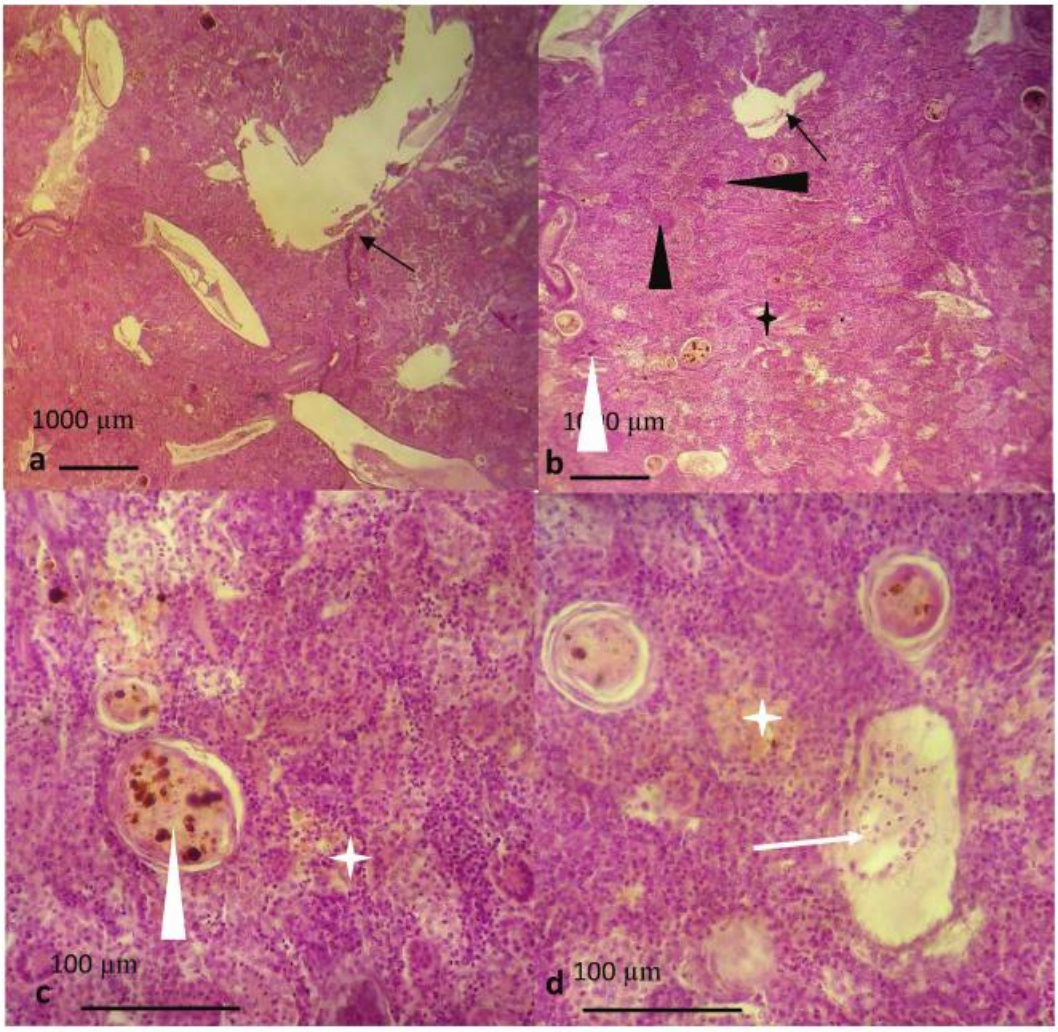
Archive of SID



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

سـموم خانواده کلرواستانیلیدها که بوتاکلر نیز یکی از آن‌ها است بطور بالقوه قادرند واسطه‌های واکنش‌گری تولید کنند که قادر است اثرات سمی داشته باشد. این واسطه‌ها شامل کلرین‌های فعال و سایر آلدهیدها می‌باشد که قادرند با گلوتاتیون موجود در بافت‌ها واکنش داده و سبب کاهش سطح آن گردند. این کاهش سـبب 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 می‌شـود که با تغییرات مورفولوژیکی مانند تورم سیتوپلاسـم و اندامک‌ها بخصوص میتوکندری در کنار تغییر در هسـته‌ها همراه اسـت. آسیب‌های مشاهده شـده در بافت عضله و کلیه ماهی قرمز را این‌طور می‌توان توجیه کرد که تحت اثر آلاینده‌ها و سـم بوتاکلر و طی واکنش‌های ذکر شـده یا تخریب هسته و سایر اندامک‌ها در مرحله‌ای که سلول دیگر قادر به کنترل




**شکل۶- 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).**



www.SID.ir

Archive of SID



عملکردهای نرمال خود نیست یافت 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 (۱۵،۱۳). 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 گوییچه‌ها و کاهش فضای مجرا است در مطالعه حاضرکلیه 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 ملانوماکروفاژ، چروکیدگی گوییچه‌ها و اتساع فضای بومن، کاهش یا انسداد فضای ادراری، اتساع مویرگ‌های گوییچه‌ای در مواجهه با بنزوآلفاپایرن مشاهده و ثبت شد (۳۵). در بالاترین غلظت (میزان ۰/۲۸ میلی لیتر بر لیتر) تغییرات وسیعی چون خون ریزی یا 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 گوییچه‌های در حال تخریب در لایه‌ای گوییچه‌های متسع بود که در غلظت‌های پایین‌تر مشاهده نمی‌شد. گزارش مشابهی از وقوع این تغییرات در بافت کلیه ماهی هامور معمولی تحت تاثیر بنزوآلفاپایرن 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 آسیب شناسی 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 می-شوند 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 *Orechromis nilotinus* جوان به‌همراه آثار مشابهی است و نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که اثرات ایجاد شده توسط بوتاکلر به غلظت آن، مدت زمان معارضه و نیز گونه آبزی بستگی دارد (۳۳). این سم علف‌کش 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 یا 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 آسیب شناسی 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 سیپرمترین نیز عوارض آسیب شناسی بافت مشابهی را در ماهی آب شیرین *Cirrhinus mrigala* بجای می‌گذارد. بطورکلی مطالعات بسیاری که به بررسی اثر آلاینده‌های آلی و غیر آلی بر ماهیان آب شیرین پرداخته‌اند نتایج مشابهی با تحقیق حاضر ارائه کرده‌اند (۶، ۲۱، ۳۱ و ۳۲). تغییر شکل در گلومرول 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 می دهد 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 این‌گونه ضایعات را تحت عنوان ضایعات آسیب شناسی غیراختصاصی کلیه می‌نامند. زیرا انواع گوناگونی از آلاینده‌های آلی و حشره کش‌ها 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 هیالن که به شکل دانه‌های ائوزینوفیلی بزرگ در درون یاخته مشخص می‌شوند پیش می‌رود. این دان ها 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. Egyp-*



www.SID.ir

Archive of SID



*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., Shokrpoor, S and Rahmati-Holasoo, H. 2014. Histopathological and haematological response of male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) subjected to Butachlor. *Veterinarni 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 terbuthylazine exposure on the cells of *Dicertrarchus labrax.Chemosphere*. 64: 1684.1694.

8- El-Serafy, S.S, Ibrahim, S.A. and Mahmoud,S.A. 2005. Biochmical 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 Triebskorn, 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 flatfish 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. *Environ. 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., Salizzato, M., Sperni, 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 (*Ctenopharyngodan 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 Claries gariepinus inhabiting El-Kanater El-Khyria and Helwan sites. *Zagazig Journal of Agricultural Research*, 33: 1207–1222.



www.SID.ir

Archive of SID



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 onhistopathological 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 aociated with peticides minimizing the risk. ragsdale R. J. kuhr (Eds). ACS symp. ser. 336 Amer.chem. soc.Wahington. 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. HistopathologicalAlterations inMuscle, Liver and Gill-Tissues of Zebra Fish Danio Rerio due to Environmentally Relevant Concentrations of Organochlo Rine 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.



www.SID.ir