بررسی تأثیر غلظت تحت کشنده سم بوتاکلر بر برخی شاخص‌های بیوشیمیایی و بافت کبد بچه تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)

سیما غلامیان[1*]

۱. مرکز ملی علوم اکادمیک آذربایجان، باکو (تهران، شهرک اکباتان، فاز ۲، بلوک۹، پلاک ۱۴۷)

***مسئول مکاتبات:**
Sgholamian@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱/۲۵
کد مقاله: ۱۳۹۳۰۲۰۱۹۱

چکیده

به‌منظور ارزیابی برخی اثرات تحت کشندگی علف‌کش بوتاکلر (Butachlor) در بچه تاس‌ماهیان ایرانی (*Acipenser persicus*) آزمایش تعیین سمیت حاد به‌صورت ساکن و بر اساس روش استاندارد (OECD) در موسسه تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری به انجام رسید. ۱۲۰ عدد بچه تاسماهی ایرانی با میانگین وزن ۲±۱۰ گرم در ۴ گروه (۳ گروه آزمایشی و یک گروه شاهد) پس از تعیین محدوده کشندگی، در معرض غلظت‌های ۰/۱۰۷ و ۰/۲۱۵ و ۰/۳۲۲ میلی‌گرم بر لیتر بوتاکلر قرار گرفتند. میزان متوسط غلظت کشنده (LC50) بوتاکلر در طی ۹۶ ساعت برای بچه تاس‌ماهیان ایرانی، ۰/۴۳ میلی‌گرم بر لیتر است که جهت مطالعات بیوشیمیایی از ماهیان، بعد از مدت‌زمان ۲۴ و ۹۶ ساعت، خون‌گیری به عمل آمد. پس از جداسازی سرم، مقادیر کورتیزول و گلوکز اندازه‌گیری شد. کورتیزول و گلوکز سرم در گروه آزمون نسبت به شاهد دارای افزایش معنی‌داری بودند ($P<0/05$). از بافت کبد ماهیان در مواجهه با سم بوتاکلر در غلظت‌های کمتر از LC50-96h در زمان‌های ۲۴ و ۹۶ ساعته نمونه‌برداری گردید و پس از مطالعه بافت‌شناسی و مقایسه آن‌ها با بافت‌های گروه شاهد، تغییراتی شامل پرخونی، خونریزی، واکوئله شدن سیتوپلاسم و پیکنوزه شدن هسته، تجمع هموسیدرین در سلول‌های ملانوماکروفاژ و نکروز و اسیدوفیلیک شدن سلول‌ها مشاهده گردید. نتایج به دست آمده نشان داد که علف‌کش بوتاکلر در غلظت‌های پایین نیز اثرات نامطلوب بر فیزیولوژی بچه تاس‌ماهیان ایرانی ایجاد می‌نماید.

واژگان کلیدی: بوتاکلر، خون، کبد، تاس‌ماهی ایرانی، *Acipenser persicus*.

مقدمه

توسعه و گسترش استعمال سموم کشاورزی و اثرات بعدی آن بر اکوسیستم‌های آبی یکی از نگرانی‌های جامعه‌ی بشری است. از اثرات مهم این آلاینده‌ها می‌توان تأثیر بر جمعیت ماهیان و در پی آن تأثیر بر روی فعالیت‌های شیلاتی نام برد. بوتاکلر که بانام تجاری ماچتی (MACHETE) شناخته می‌شود، معمولاً به‌صورت یک کاربرد پیش از خروج برای کنترل علف‌های یک‌ساله و برخی علف‌های برگ‌پهن (دانه‌دار و قابل نشاء) در مزارع برنج به کار می‌رود. تاس‌ماهی ایرانی یکی از مهم‌ترین گونه‌های ماهیان خاویاری بومی دریای خزر می‌باشد و بیش‌ترین پراکنش را در قسمت جنوب شرقی دریای خزر دارد. ذخایر تاس‌ماهیان به‌شدت رو به کاهش هستند (Chebanov and Billard, 2001). این روند رو به کاهش ناشی از عواملی چون صید بی‌رویه، صید غیرمجاز، تجمع آلاینده‌ها، سدسازی بر روی رودخانه‌ها و محدود شدن آب‌های جاری می‌باشد که موجب جلوگیری از مهاجرت و تولیدمثل این ماهیان می‌شود (Dettlaf *et al.*, 1993). بنابراین

تکثیر و پرورش مصنوعی تاس‌ماهیان روش بسیار مهمی برای بازسازی جمعیت‌های این ماهیان می‌باشد.گونه‌ی تاس‌ماهی ایرانی یک‌گونه‌ی رودکوچ بوده و برای تخم‌ریزی به رودخانه‌های حوضه جنوبی دریای خزر و از جمله سفیدرود مهاجرت می‌نماید (بهمنی، ۱۳۸۴). بنابراین همگام با ورود سم بوتاکلر از مزارع کشاورزی اطراف سفیدرود به این رودخانه، تعدادی از فاکتورهای خونی و بافتی این‌گونه ماهی تحت تأثیر این سم قرار می‌گیرد. ویژگی‌های بیوشیمیایی خون به‌عنوان مهم‌ترین شاخص‌های وضعیت درونی ماهی قلمداد می‌گردد و تغییرات بیوشیمیایی خون در واقع ماحصل تغییر در روند سوخت‌وساز ماهی بوده که می تواند تحت تأثیر آلاینده‌ها باشد. تجزیه و تحلیل شاخص‌های خونی، اطلاعاتی را در مورد عملکرد اندام‌های داخلی مثل کبد و کلیه ارائه می دهد (Duncan *et al*., 1994). همچنین مطالعات بافت‌شناسی دانش ما را در مورد اثرات آلاینده‌ها بر ماهیان توسعه می‌بخشد (Soldatov, 2005).

اطلاعات حاصل از آزمایش‌های سم‌شناسی در علم اکوتوکسیکولوژی، اثرات این سموم را بر جمعیت آبزیان نشان می‌دهد و نتایج حاصله نشان می‌دهند که توان اثرگذاری کدام‌یک از مواد آلاینده بیشتر و در چه میزانی از حد مجاز مصرف قرار دارد. همچنین جهت محدودسازی کاربرد مواد سمی باید چنین آزمایش‌هایی صورت گیرند. بنابراین هدف از آزمایش‌های سنجش سمیت آلاینده‌ها، رسیدن به معیارهای قابل‌اعتماد برای حفاظت منابع آبزیان می‌باشد (Milijoprojekt, 1994).

در طی سال‌های اخیر مطالعه گسترده‌ای درباره اثرات سوء سموم و آلاینده‌های شیمیایی بر بسیاری از جنبه‌های زیستی و فیزیولوژیک آبزیان مختلف صورت گرفته است، که از این جمله می‌توان به تأثیر بوتاکلر بر روی *Daphnia magna* (پیری و همکاران، ۱۳۷۶)، تعیین غلظت کشنده علف‌کش بوتاکلر بر روی بچه‌ماهیان قره برون و ازون برون (پژند، ۱۳۸۴)، بررسی تأثیر سمیت بوتاکلر از نظر فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در *Aulosira feritissima* (Kumari *et al*., 2009) و تأثیر بوتاکلر روی برخی از پارامترهای هماتولوژی در ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) (فرخروز شیدانی و همکاران، ۱۳۸۹) اشاره کرد. Meng و Chen در سال ۲۰۰۷ بوتاکلر را برای ماهی آمور topmouth gudeon (*Pseudorasbora parva*) بسیار سمی معرفی کردند و LC50-96h را برای این ماهی ۰/۳۳ میلی‌گرم بر لیتر اعلام نمودند. درصورتی‌که پاشایی و همکاران (۱۳۹۰) LC50-96h بوتاکلر را برای بچه‌ماهیان سیاه کولی ۱ تا ۲ گرمی ۰/۰۶۱ میلی‌گرم در لیتر گزارش کرده است.

با توجه به رهاسازی بچه‌ماهیان خاویاری حاصل از تکثیر مصنوعی توسط مراکز تکثیر و بازسازی ذخایر شیلات به رودخانه‌های منتهی به سواحل جنوبی دریای خزر و از طرفی ورود حجم قابل‌توجهی از سموم کشاورزی و به‌ویژه سم بوتاکلر به شکل‌های مستقیم و غیرمستقیم به رودخانه‌ها، هدف از این تحقیق، مطالعه اثرات علف‌کش بوتاکلر بر تغییرات فیزیولوژیک بچه تاس‌ماهیان ایرانی در قالب یک مدل آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها

برای انجام آزمایش‌های تشخیص سمیت زیر کشنده بوتاکلر بر روی بچه‌ماهیان خاویاری ۱۲۰ عدد بچه تاس‌ماهی ایرانی در موسسه تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری (رشت–ایران) مورد مطالعه قرار گرفت. از آنجایی که پژند و همکاران در سال ۱۳۸۴ میزان LC50-96h سم مزبور را برای تاس‌ماهی ایران ۰/۴۳ میلی‌گرم در لیتر محاسبه نمودند، در این بررسی از غلظت‌های ۰/۱۰۷ و ۰/۲۱۵ و ۰/۳۲۲ میلی‌گرم در لیتر به همراه گروه شاهد در مدت‌زمان ۹۶ ساعت استفاده شد. برای این منظور پس از دوره سازگاری، ماهیان ۲±۱۰ گرمی برای انجام آزمایش انتخاب شدند. تعداد ۱۰عدد بچه ماهی وارد هر آکواریوم گردید و آکواریوم‌ها مرتباً توسط پمپ هوا، هوادهی شده و شرایط فیزیکی شیمیایی آب نظیر درجه حرارت ۱/۲۳ ±۲۴/۶۷ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۰/۲±۷/۲ میلی‌گرم در لیتر و سختی کل ۲±۱۰۸ میلی‌گرم در لیتر در طول مدت زمان در معرض قرارگیری ماهی‌ها با سم بوتاکلر، اندازه‌گیری گردید. برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد. در این مدت از غذادهی ماهی‌ها و تغییر محیط آب بر اساس روش استاندارد (Organisation Economic Cooperation and Development) OECD خودداری گردید.

در طی مراحل اجرای آزمایش کلیه علائم ظاهری بچه‌ماهیان شامل تغییر رنگ پوست، میزان فعالیت، میزان ترشح موکوس، چگونگی شنا و تعادل حرکت آن‌ها مشاهده و ثبت گردید (Koprucu *et al*., 2006).

ماهیانی را که در معرض سم بوتاکلر قرار گرفته بودند، بعد از گذشت زمان‌های ۲۴ و ۹۶ ساعت از آکواریوم خارج کرده و خون‌گیری از سیاهرگ ناحیه ساقه دمی انجام شد (Bahmani *et al*., 2000). در این مرحله از آزمایش، از هر تیمار ۳ عدد ماهی انتخاب شد و پس از خونگیری، بدن ماهی از ناحیه شکمی باز و کبد آن از سایر احشا جدا گردید. برای تعیین فاکتورهای بیوشیمیایی خون، نیاز به تهیه سرم بود که به دلیل کوچکی اندازه ماهیان و درنتیجه حجم کم خون، جهت تهیه سرم از روش پولینگ (Pooling) استفاده شد (Bahmani, 2002; Bahmani *et al*., 2001). به ترتیب که خون اخذ شده از ماهیان یک تکرار، در یک لوله آزمایش مشترک ریخته شد. سپس جداسازی سرم از سلول‌های خونی توسط سانتریفوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور در زمان ۱۰ دقیقه انجام گرفت. سرم موجود در لایه بالایی، به‌آرامی توسط سمپلر جدا شده و به لوله‌های اپندورف انتقال داده شد (Pottinger and Carrik, 2001). مقادیر کورتیزول و گلوکز سرم به وسیله دستگاه اتوآنالایزر (TECHNICON-RA 100) و کیت‌های شرکت پارس آزمون اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری کورتیزول سرم از روش Radioimmunoassay (Bahmani, 2002) و برای اندازه‌گیری گلوکز از روش Colorimetric استفاده شد و میزان گلوکز سرم برحسب واحد میلی‌گرم/دسی‌لیتر محاسبه گردید (Duncan *et al*., 1994).

پس از زمان ۲۴ و ۹۶ ساعت از در معرض قرارگیری با سم، بدن ماهی‌های مورد آزمایش را باز کرده و قسمتی از بافت کبد خارج گردید که جهت مطالعات بافت‌شناسی مراحل زیر انجام شد (Paulsen, 2000):

تثبیت در محلول بوئن، عمل‌آوری بافت (که خود شامل سه مرحله آبگیری، شفاف‌سازی و پارافینه می‌باشد: آبگیری در اتانول ۵۰، ۷۰، ۸۰ و ۹۶ درصد و ۱- بوتانول انجام شد، شفاف‌سازی توسط کلروفرم و پارافینه کردن در مخلوط کلروفرم و پارافین خالص در دمای ۵۶ درجه سانتی گراد صورت گرفت). سپس قالب‌گیری، سوارکردن قالب نمونه روی پایه چوبی، برش‌گیری با ضخامت ۷ میکرون، نصب بافت روی لام‌ها، رنگ‌آمیزی به روش هماتوکسیلین- ائوزین، چسب زدن لامل بر روی لام و مشاهده زیر میکروسکوپ نوری (مدلNikon E600، ساخت ژاپن) انجام گردید.

برای تعیین اختلاف معنی‌دار در کل تیمارهای آزمایشی از آنالیز واریانس یک‌طرفه (Oneway Anova) استفاده شد. و پس از انجام آزمون Test of Homogeneity of Variances جهت مقایسه گروه‌ها با یکدیگر از پس آزمون دانکن و توکی استفاده شد. به منظور تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش هفدهم و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel2007 انجام گردید. همچنین به منظور محاسبه رابطه بین گلوکز و کورتیزول سرم، از آزمون ضریب همبستگی پیرسون استفاده شد.

نتایج

پاسخ‌های رفتاری ماهی‌های آزمایشی در هر ۱۲ ساعت در طول دوره آزمایش مورد توجه قرار گرفتند. علائم عادی شامل شنای فعال، تعادل مناسب و رنگ پوست به‌صورت طبیعی در ماهی‌های گروه شاهد در مدت آزمایش مشاهده گردید. در مورد سایر گروه‌های آزمایشی که در معرض سم بوتاکلر گرفته بودند پس از ۲۴ ساعت علائمی همچون وجود مخاط فراوان روی سطح بدن، شنای چرخشی، حرکت سریع آبشش‌ها، گرفتگی عضلات دور دهانی و از دست دادن تعادل بدن مشاهده شد. درصورتی‌که فلج ماهیچه، تغییر رنگ آبشش‌ها و قسمت زیرین بدن در ماهیانی که در معرض غلظت‌های بالای بوتاکلر قرارگرفته بودند، مشاهده گردید.

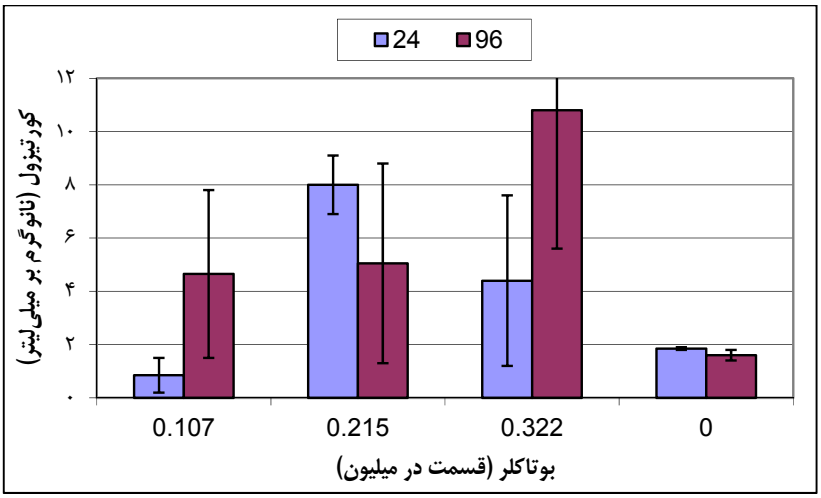
مقایسه بین میانگین کورتیزول سرم خون ماهیان مختلف نشان داد که پس از مدت‌زمان ۲۴ و ۹۶ ساعت، اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها وجود دارد ($P<۰/۰۵$). بر اساس آزمون دانکن به‌منظور مقایسه دوبه‌دو گروه‌ها با یکدیگر میزان کورتیزول خون ماهیان در غلظت‌های ۰/۲۱۵ و ۰/۳۲۲ میلی‌گرم در لیتر بوتاکلر افزایش‌یافته است و به لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با شاهد و غلظت ۰/۱۰۷ میلی‌گرم بر لیتر بوتاکلر وجود دارد ($P<۰/۰۵$) (شکل ۱).

بر اساس آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه به‌منظور مقایسه میزان گلوکز در خون ماهیان بین غلظت‌های مختلف سم بوتاکلر با شاهد پس از ۲۴ ساعت اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). پس از ۹۶ ساعت اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده شد (P<۰/۰۵) و بر اساس آزمون دانکن به‌منظور مقایسه دوبه‌دو گروه‌ها با یکدیگر میزان گلوکز خون ماهیان در غلظت‌های ۰/۱۰۷، ۰/۲۱۵ و۰/۳۲۲ میلی‌گرم بر لیتر افزایش یافته است و به لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با شاهد مشاهده گردید (P<۰/۰۵) به‌منظور مقایسه میزان گلوکز در خون ماهیان در ۲۴ و ۹۶ ساعت در هر یک از غلظت‌های مورداستفاده از سم بوتاکلر اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (P<۰/۰۵). در تمام تیمارها روند افزایشی، مشاهده گردید. در شکل ۲ تغییرات گلوکز خون در غلظت‌های مختلف سم ارائه شده است.

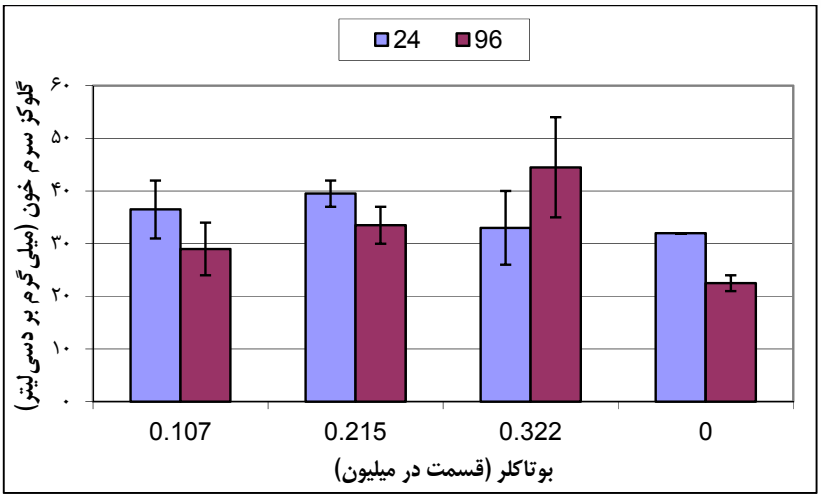
بر اساس آزمون ضریب همبستگی پیرسون بین گلوکز و کورتیزول، پس از گذشت ۹۶ ساعت از تأثیر سم بوتاکلر بر روی بچه تاس‌ماهیان ایرانی، ارتباط مستقیم و مثبت مشاهده شد و با توجه به شکل۳ با افزایش کورتیزول سرم خون میزان گلوکز سرم نیز، افزایش یافته است.

در این تحقیق از بافت کبدی بچه تاس‌ماهیان ایرانی تحت تأثیر سم بوتاکلر در غلظت‌های کمتر از LC50-96h در زمان‌های۲۴ و۹۶ ساعته نمونه‌برداری گردید و پس از مطالعه لام‌های تهیه‌شده از این بافت و مقایسه آن‌ها با بافت‌های گروه شاهد، تغییرات بارزی مشاهده گردید که تغییراتی همچون پرخونی و بعضاً خونریزی، واکوئله شدن سیتوپلاسم و پیکنوزه شدن هسته، تجمع هموسیدرین در سلول‌های ملانوماکروفاژ و بالاخره نکروز و اسیدوفیلیک شدن سلول‌ها از این جمله می‌باشد.

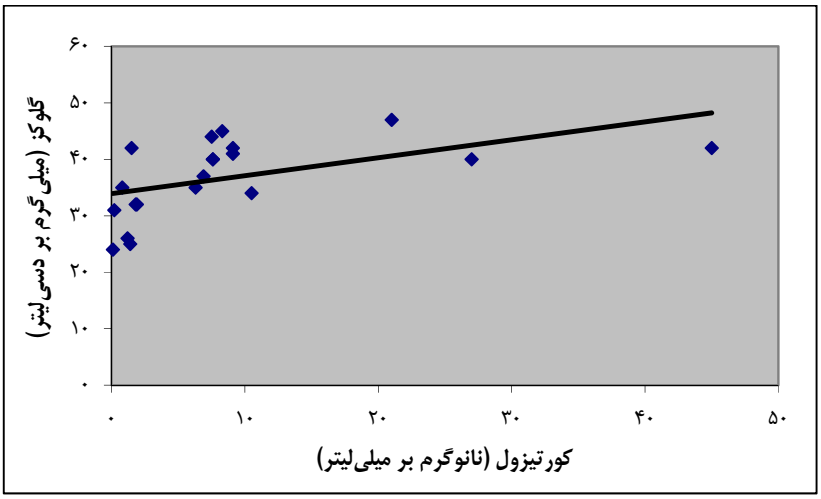
در نمونه‌های تیمار شده با بوتاکلر اولین چیزی که مشاهده شد پرخونی و خونریزی در بافت کبد بود به نحوی که در غلظت‌های ۰/۱۰۷ و ۰/۲۱۵ میلی‌گرم بر لیتر به راحتی پدیده پرخونی و خونریزی قابل مشاهده بود (شکل۴-۱) و با افزایش غلظت بوتاکلر این پدیده، با شدت بیشتری مشاهده گردید. در این بررسی پدیده تورم ابری در غلظت‌های بالای بوتاکلر (۰/۳۲۲ میلی‌گرم بر لیتر) مشاهده گردید. در این حالت سلول متورم شده و سیتوپلاسم آن ابری شکل و دانه‌دار می‌گردد (شکل۴-۲). علاوه بر این پدیده هموسیدروزین در بافت کبد ماهی‌هایی که در معرض غلظت‌های بالاتر از ۰/۲۱۵ میلی‌لیتر بوتاکلر قرار داشتند، مشاهده گردید (شکل ۴-۳). در این حالت تجمع رنگ‌دانه‌های هموسیدرین در داخل هپاتوسیت‌ها و یا در فضای بافت زمینه‌ای صورت می‌گیرد. یکی دیگر از تغییرات بوجود آمده در بافت کبد، واکوئله شدن سیتوپلاسم در غلظت‌های ۰/۲۱۵ و ۰/۳۲۲ میلی‌گرم بر لیتر بوتاکلر بود که در نتیجه‌ی تراکم زیاد چربی در سیتوپلاسم بوجود می‌آید و این واکوئل‌های بزرگ در سلول، هسته را مجبور می‌کند به محیط بیرونی هپاتوسیت منتقل شود و این شرایط معمولاً با آتروفی هسته همراه است. نتایج این بررسی نشان داد که نکروز سلول‌های کبد، در غلظت‌های بالای بوتاکلر مشاهده شد (شکل۴-۴).



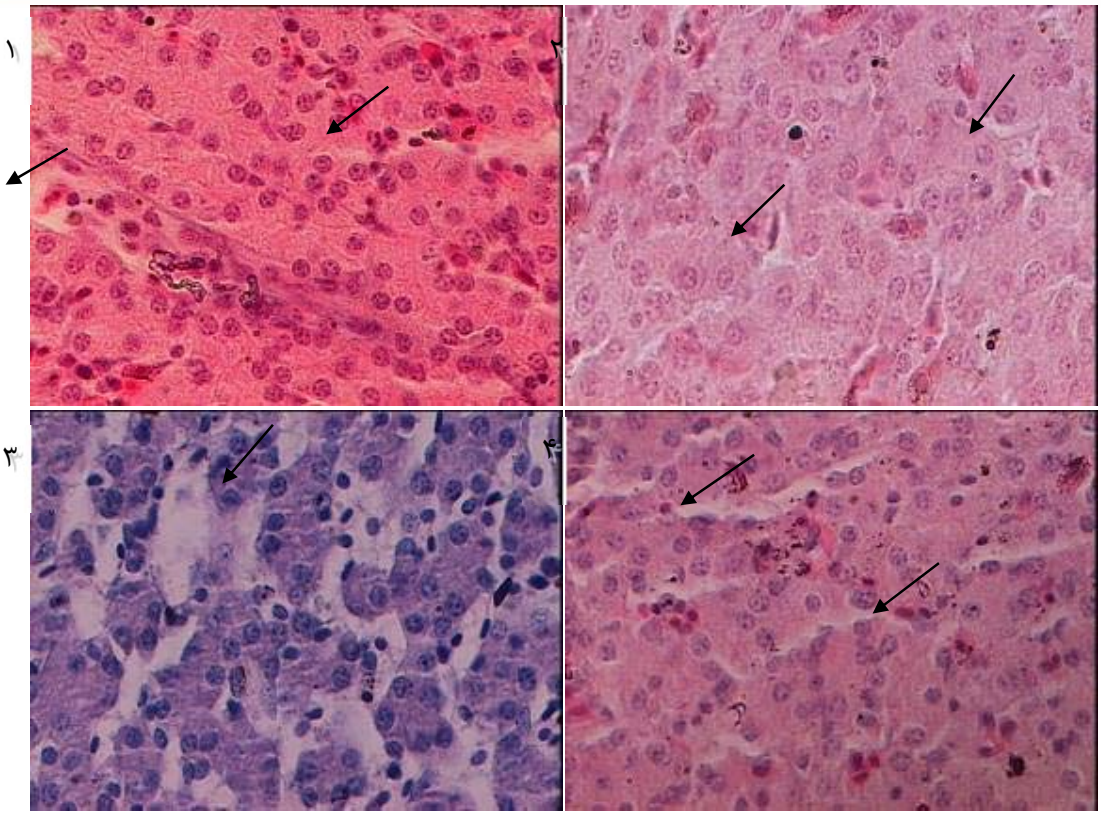
شکل ۱ : تغییرات میزان کورتیزول سرم خون تاس‌ماهیان ایرانی (Acipenser persicus) تحت تأثیر غلظت‌های مختلف سم بوتاکلر پس از ۲٤ و۹٦ ساعت.



شکل۲: تغییرات میزان گلوکز سرم خون تاس‌ماهیان ایرانی (*Acipenser persicus*) تحت تأثیر غلظت‌های مختلف سم بوتاکلر پس از ۲٤ و ۹٦ ساعت.



شکل۳: ضریب همبستگی پیرسون بین گلوکز و کورتیزول سرم خون تاس‌ماهیان ایرانی (*Acipenser persicus*) تحت تأثیر غلظت‌های مختلف سم بوتاکلر پس از ۹٦.



شکل٤: بافت شناسی کبد تاس‌ماهیان ایرانی (*Acipenser persicus*) تیمار شده با سم بوتاکلر (HE,X400).

شکل۴-۱: ایجاد حالت خونریزی در کبد با غلظت ۰/۲۱۵ میلی‌گرم بر لیتر بوتاکلر بعد از ۲۴ ساعت

شکل۴-۲: ایجاد حالت تورم ابری در کبد با غلظت ۰/۳۲۲ میلی‌گرم بر لیتر بوتاکلر بعد از ۲۴ ساعت

شکل۴-۳: ایجاد هموسیدروزین در کبد با غلظت ۰/۳۲۲ میلی‌گرم بر لیتر بوتاکلر بعد از ۹۶ساعت

شکل۴-۴: ایجاد نکروز در کبد با غلظت ۰/۳۲۲ میلی‌گرم بر لیتر بوتاکلر بعد از ۹۶ ساعت

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که میزان گلوکز سرم خون بچه تاس‌ماهیان ایرانی که در معرض با سم بوتاکلر قرارگرفته‌اند به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش پیدا می‌کند که این تغییرات می‌تواند عکس‌العملی باشد تا اثرات ماده سمی به حداقل برسد. در تحقیقات پاشایی (۱۳۹۰) آمده است که افزایش معنی‌دار گلوکز به‌عنوان یک پاسخ عمومی ماهیان علیه اثرات حاد آلاینده‌ها به شمار می‌رود. گلوکز یکی از فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون است که می‌تواند به‌عنوان یکی از شاخص‌های مهم در تعیین وضعیت فیزیولوژیک ماهی به کار رود. در شرایط استرس‌زا، ترشحات هورمون‌های گلوکوکورتیکوتروئینی باعث افزایش فعالیت واکنش‌های دوباره‌سازی گلوکز می‌گردد. این هورمون‌ها با افزایش کاتابولیسم پروتئین‌ها در بافت‌ها موجب افزایش اسیدهای آمینه توسط کبد و افزایش فعالیت آنزیم‌های مؤثر در چرخه بازسازی گلوکز در کبد می‌گردد. علاوه بر این گلوکوکورتیکوئیدها، از مصرف گلوکز توسط بافت‌های خارج کبدی نیز جلوگیری می‌نمایند و این امر موجب افزایش گلوکز خون می‌شود. اختلال در تنظیم قند خون در پستانداران و سایر جانوران موجب اختلال در سیستم تنظیم ایمنی بدن می‌شود که با سایر اختلالات خود ایمنی همراه خواهد بود (بنایی و همکاران، ۱۳۹۰).

کبد اولین عضو از بدن است که فرایند سم‌زدایی از ارگان‌ها را بر عهده دارد. تعداد زیادی از علف‌کش‌ها و سایر مواد ساخت بشر به مقدار زیادی در کبد تجمع می‌یابند و باعث آسیب‌های زیادی به این ارگان می‌شوند. بافت پارانشیم کبدی کارکردهای مهم فیزیولوژیک نظیر

متابولیسم واسطه‌ای پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و چربی‌ها، سنتز پروتئین‌های پلاسما و ترشح صفرا نقش دارند. به همان اندازه که سم‌زدایی محصولات ناشی از متابولیسم، مهم می‌باشد، سم‌زدایی حاصل از مواد خارجی، داروها، سموم، آفت‌کش‌ها و فلزات سنگین نیز دارای اهمیت می‌باشد. بنابراین تغییر در ساختار کبد نقش مهمی در ارزیابی سلامت ماهیان دارد (حیدری جامع بزرگی، ۱۳۸۸). در این آزمایش در نمونه‌های بافت کبد ماهیان شاهد تغییر پاتولوژیک مشاهده نشد و سلول‌های هپاتوسیت به شکل چندوجهی با سیتوپلاسم یکنواخت و هسته درشت مرکزی و گرانول‌های بازوفیلیک مشاهده شدند. در این مطالعه بعد از اضافه کردن سم بوتاکلر در بافت کبد ماهی‌های گروه‌های تیماری در مقایسه با گروه کنترل تفاوت‌هایی دیده شد. نتایج این بررسی نشان داد که تغییرات هیستوپاتولوژیک کبد به‌صورت تغییرات پرخونی و خونریزی، واکوئله شدن سیتوپلاسم و دژنراتیو هپاتوسیت‌ها همراه با نکروز، تورم ابری، آتروفی و ... دیده شد. در مطالعه حاضر در غلظت ۰/۱۰۷ میلی‌گرم بر لیتر بوتاکلر، ضایعات عمده بصورت پرخونی و خونریزی مشاهده گردید و با افزایش غلظت سم میزان این صدمات نیز بیشتر شد به طوری که در غلظت ۰/۳۲۲ میلی‌گرم بر لیتر بوتاکلر، قسمت عمده پارانشیم کبدی حاوی نکروز و واکوئله شدن سیتوپلاسم بود. همچنین بررسی‌ها نشان داد

که در تیمارهای ۹۶ ساعته نسبت به تیمارهای ۲۴ ساعته، تغییرات هیستوپاتولوژیک در کبد افزایش‌یافته بود و مشخص شد که این سم سبب تغییر شکل و بر هم خوردن نظم پارانشیم کبدی می‌گردد که این تغییرات با گذشت زمان شدت بیشتری پیدا می‌کند. دگرگونی‌های ایجادشده بیشتر به علت دژنره شدن و نکروز سلول‌ها ایجاد می‌شود. این تغییرات به وجود آمده را می‌توان به اثرات مستقیم مواد آلاینده بر هپاتوسیت‌ها نسبت داد که در تحقیقات متعدد به آن اشاره شده است (پژند و همکاران، ۱۳۸۴؛ پیری و همکاران، ۱۳۷۶؛ حیدری جامع بزرگی، ۱۳۸۸). حضور نکروز در واقع یکی از آسیب‌های مهم قابل‌مشاهده بافت‌های تحت تأثیر آلاینده‌ها است (Maxwell and Dutta, 2005) که در این تحقیق نیز این مسئله بوضوح مشاهده شد. در کبد ماهیانی که در معرض استرس یا مسمومیت قرار گرفته‌اند، تغییرات برگشت‌پذیر در سلول‌های کبدی رخ می‌دهد که در این حالت چروکیده و تیره می‌شود و به آن پیکنوزه هسته می‌گویند. هسته سلول‌های نکروزه عاقبت از بین رفته و جذب می‌شود. طبق گفته Fernandes و Mazon (۲۰۰۳) نکروز در نتیجه عدم کارکرد آنزیمی، آسیب‌های غشای سلولی و اختلال در سنتز پروتئین و متابولیسم کربوهیدرات‌ها است. در تحقیق حاضر تجمع رنگ‌دانه‌های هموسیدرین در داخل هپاتوسیت‌ها و یا در فضای بافت زمینه‌ای مشاهده شد که با افزایش غلظت سم بوتاکلر و زمان تحت تأثیر قرار دادن ماهیان، وجود هموسیدرین‌ها افزایش یافت. در حقیقت این رنگ‌دانه‌ها نتیجه‌ی محصولات کاتابولیسمی هموگلوبین بوده و در زیر میکروسکوپ نوری با رنگ‌آمیزی هموتوکسیلین- ائوزین به رنگ قهوه‌ای روشن تا طلایی و حتی سیاه دیده می‌شوند (شکل‌های ۳ و ۴). در شکل ۱ حالت خونریزی در بافت کبد مشاهده می‌شود که به دنبال این نوع آسیب بافتی، به وجود آمدن حالت هموسیدرین می‌باشد. در شکل ۲ حالت تورم ابری سلول‌ها قابل‌مشاهده است که در این حالت سلول متورم شده و سیتوپلاسم آن ابری شکل و دانه‌دار می‌گردد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق، اهمیت جلوگیری از استفاده بی‌رویه این سم در مزارع کشاورزی اطراف رودخانه سفیدرود که محل رهاسازی این‌گونه ماهی می‌باشد، بیشتر نمایان می‌شود. از این‌رو پیشنهاد می‌شود ضمن استفاده از روش‌های مبارزه‌ی بیولوژیک و یا استفاده از سموم کم‌خطر علیه آفات کشاورزی، راه‌کارهای پیشگیری و کنترل محیط زیستی نیز توسط ارگان‌های مسئول به انجام رسد، تا بدین ترتیب گامی مؤثر در جهت حفظ ذخایر باارزش آبزیان و به‌ویژه تاس‌ماهیان برداشته شود.

منابع

بنایی، م.، میرواقفی، ع.ر.، مجازی امیری، ب.، رفیعی، غ.ر. و نعمت دوست، ب. ۱۳۹۰. بررسی خون‌شناسی و آسیب‌شناسی بافتی در مسمومیت تجربی با دیازینون در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*).نشریه شیلات، مجله منابع طبیعی ایران، دوره ۶۴، شماره ۱،صفحات ۱-۱۳.

بهمنی، م. ۱۳۸٤. خاویار ایران. انتشارات موج سبز، نشر آموزش کشاورزی، ۱۲۰ ص.

پاشایی، ح.، ابراهیمیان، ب.، فرخ روز، م.، زمینی، ع.ع.،۱۳۹۰.کنفرانس ملی بهره‌برداری از آب دریا دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، ۶ ص.

پژند، ذ.، اسماعیلی ساری، ع. و پیری، م.، ۱۳۸٤. تعیین غلظت کشنده علف‌کش ماچتی بر روی بچه ماهیان قره برون (*Acipenser persicus*) و ازون برون (*Acipenser stellatus*). مجله علمی شیلات ایران،۱، سال چهاردهم، صفحات ۵۰-۴۱.

پیری، م.، نظامی، ش. ع.، امینی رنجبر، غ.ر.، و اردک، و.،۱۳۷٦. مطالعات اکوتوکسیکولوژی بر روی *Daphnia magna* و تعیین اثر سموم Diazinon, Saturn, Machete, Malathion بر این ارگانیزم. مجله علمی شیلات ایران، شماره۳، سال ششم، صفحات۳۴-۲۳.

حیدری جامع بزرگی، ف.، ۱۳۸۸. تأثیر آلودگی فاز محلول نفت خام بر بافت‌های کبد، آبشش و کلیه بچه‌ماهیان سفید دریای خزر.پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس، ۷۵ ص.

فرخروزلاشیدانی، م.، قاسمی نژاد، ا.، فلک رو، ک.، فهیم، م.، و رحیمی بشر، م.، ۱۳۸۹. تأثیر علف‌کش بوتاکلر روی برخی از پارامترهای هماتولوژی در ماهی سفید(*Rutilus frisii kutum*). مجله علوم زیستی(لاهیجان)، شماره ۴، پیاپی۱۲، صفحات ۵۷-۶۵.

Bahmani, M., 2002. Study of stress hormones effects on ovarian follicular and testis apoptosis in gold fish, *Carassius auratus*. Postdoctoral Research Fellow Thesis in Comparative Reproductive Endocrinology. Biological Scienses Dept., University of Calgary, Canada, 475p.

Bahmani, M., Kazei, R., and Donskaya, P., 2001. A comparative study of some hematological features in young reared sturgeon. Fish Physiology and Biochemistry, 24: 135-140.

Bahmani, M., Oryan, S., and Vosoughi, G., 2000. Ecophysiological indicators of stress in female Persian sturgeon *Acipenser persicus*. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 2(1): 37-45.

Chebanov, M., and Billard, R., 2001. The culture of sturgeon in Russia: Production of juveniles for stocking and meat for human consumption.Aquat.Living.Resour, 14:375-381.

Dettlaf, T. A, Ginsburg, A. S., and Schmalh O. I., 1993. Sturgeon Fishes: Developmental ausen, Biology and Aquaculture. Spring-verlag Press, Berlin, Heidelberg, Germany, 300p.

Duncan, R. J., Prasse, K. W. and Mahaffey, E. A., 1994. Veterinary Laboratory Medicine Clinical Pathology, 3rd Edition. Iowa State Press, Ames, IA. 237P.

Fernandes, M. N. and Mazon, A. F., 2003. Environmental pollution and fish gill morphology. In:Val, A. L., Kapoor, B. G.(Eds.).

Koprucu, S.S., Koprucu, K., Ural, M.S., Ispir, U. and Pala, M., 2006. Acute toxicity of organophosphorous pesticide diazinon and its effects on behavior and some haematological parameters of fingerling European catfish *Silurus glanis*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 86(2):99-105.

Kumari, N., Narayan, O.P. and Rai, L.C., 2009. Understanding butachlor toxicity in *Aulosira fertilissima* using physiological, biochemical and proteomic approaches. Chemosphere, 77: 1501-1507.

Maxwell, L. B. and Dutta, H. M. 2005. Diazinon- induced endocrine disruption in blue gill sunfish, lepomis macrochirus. Ecotoxicology and Environmental Safety, 60(1): 21-70.

Meng. S. L. and Chen. J. C., 2007. Toxic effects of herbicides atrazine and butachlor on topmouth gudgeon (*Pseudorasbora parva*). Environmental Polluttion Contamination, 4: 254-260.

Milijoprojekt, N., 1994. Ecotoxicological evolution of industrial wastewater. 254p.

OECD, 1992. Guidelines for testing chemicals. No. 203 and 204. OECD, Paris. 11P.

Paulsen, D. F., 2000. Histology and cell biology. Examination and board review .MC Graw-Hill Publisher. Fourth edition, 376p.

Pottinger, T. G. and Carrick, T. R., 2001. Stress responsiveness affects dominant-Subordinate relationships in rainbow. Hormones and Behaviour, 40(3): 419-427.

Soldatov, A. A., 2005. Peculiarities of Organization and Functioning of the Fish Red Blood System. Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology, Vol. 41, No.3, pp. 272.