

تغییرات هیستوپاتولوژیک آبشش و کبد ماهی *Aphanius sophiae* در معرض آفت کش کارباریل

شیوا ندائی^۱، هادی پورباقر^{۲*}، سهیل ایگدیری^۳، حمید فرحمند^۳

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۲. دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۳. استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱/۱۸ تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۳/۷

چکیده

در این مطالعه تاثیرات آفت کش کارباریل بر بافت‌های کبد و آبشش ماهی *Aphanius sophiae* به مدت ۹ روز در معرض غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر پرداخته شد. بافت‌ها در روزهای اول، پنجم و نهم پس از شروع آزمایش، جهت مطالعه تغییرات هیستوپاتولوژی ایجاد شده، نمونه‌برداری شد. تغییرات مشاهده شده در بافت آبشش در طول دوره آزمایش شامل هایپرپلازی، نکروز و پوسته پوسته شدن سلول‌های لاملای ثانویه، هایپرتروفی و جدا شدن پوسته لاملای ثانویه (اپیتلیال لیفتینگ)، خمیدگی لاملای ثانویه (کرلینگ)، فیوژن، چماقی شدن لاملای ثانویه، کوتاه شدن لاملای ثانویه و از بین رفتن کامل برخی لاملاهای ثانویه و همچنین آسیب‌های ایجاد شده در بافت کبد طی این ۹ روز شامل واکوتله شدن هپاتوسیت‌ها، نکروز هپاتوسیت‌ها، نکروز هسته‌ای، زایش هپاتوسیت‌های جدید و آتروفی می‌باشند. نتایج بیان‌کننده افزایش شدت تغییرات در بافت آبشش با گذشت زمان می‌باشند در حالی که بافت کبد در روز پایانی به سمت ترمیم پیش رفته است.

واژگان کلیدی: کارباریل، *Aphanius sophiae*، کبد، آبشش، آفت‌کش.

۱. مقدمه

نمی‌باشند (Gunasekara *et al.*, 2008)، اما تحت شرایط اسیدی و فقدان فعالیت‌های میکروبی تا حدودی پایدار می‌باشند (Erickson and Turner, 2003). همچنین ممکن است دارای تاثیرات تجمعی کوتاه مدت در آبزیان باشد (Gunasekara *et al.*, 2008)، به طوری که سمیت کاربایل برای ماهی از جزئی تا شدید بیان شده است (Erickson and Turner, 2003).

ماهی‌ها ممکن است آلاینده‌ها را مستقیماً از طریق آب جذب کنند و با توجه به این که آن‌ها در محیط‌های آلوده به طور وسیع در معرض آلاینده قرار می‌گیرند، می‌توانند به عنوان اندیکاتورهای مناسبی برای بررسی کیفیت اکوسیستم‌های آبی در نظر گرفته شوند (Santos *et al.*, 2011). مطالعات هیستوپاتولوژی به منظور بررسی روابط میان قرار گیری در معرض آلاینده‌ها و پاسخ‌های بیولوژیکی ایجاد شده توسعه یافته اند (Boran *et al.*, 2010). آبخش‌های ماهی ارگان‌هایی برای تنفس، تبادلات گازی، تنظیم اسمزی و آزادسازی ضایعات نیتروژنی می‌باشند (Saenphet *et al.*, 2009) و به دلیل سطح وسیع و نفوذپذیری بالا برای ورود آلاینده‌ها به داخل بدن (Jacob *et al.*, 2102)، تحت تاثیر آلاینده‌ها قرار می‌گیرند. تغییرات هیستوپاتولوژی در آبخش گونه‌های متعددی از ماهیان در نتیجه قرار گیری در معرض آلاینده‌ها مشاهده شده است (El-Serafy *et al.*, 2009; Monfared and Soltani, 2013; Velmurugan *et al.*, 2009). همچنین Boran و همکاران (۲۰۱۰) به بررسی تاثیرات مانب و کاربایل بر بافت‌های کبد، آبخش، کلیه و طحال قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) پرداخته‌اند. کبد دارای نقش حیاتی در متابولیسم و آزاد سازی آلاینده‌ها می‌باشد که در برخی از موارد قرار گیری در معرض آلاینده دچار تغییرات مورفولوژیک نیز می‌گردد (Rocha and Monteiro, 1999). بسیاری از مطالعات به بررسی تاثیرات آلاینده‌ها بر روی بافت کبد گونه‌های مختلف پرداخته‌اند (Joshi and Sahu, 2007; Hadi and Alwan, 2012).

Aphanius sophiae (ماهی گورخری) از خانواده Cyprinodontidae، یکی از ماهیان بومی ایران می‌باشد که در مناطق پایین دست رودخانه‌ها و

استفاده از آفت‌کش‌ها با توجه به روند رو به رشد فعالیت‌های کشاورزی و صنعتی منجر به آلودگی منابع آبی (Rakhodaei *et al.*, 2012) و ایجاد نگرانی شدید در خصوص آن‌ها گردیده است، به طوری که پایش محیطی این مواد به صورت یک نیاز جدی مطرح می‌باشد (Assis *et al.*, 2011). کاربامات‌ها گروهی از آفت‌کش‌ها هستند که با توجه به تاثیرگذاری بالاتر و پایداری کوتاه مدت‌تر در محیط به عنوان آفت‌کش‌های جایگزین گروه ارگانوکلره‌ها مورد استفاده قرار گرفتند (Ribera *et al.*, 2001). این گروه از آفت‌کش‌ها دارای کاربردهای فراوان و از نظر اقتصادی نیز مقرون به صرفه می‌باشند (Sanagoudra and Bhat, 2013). کاربایل یکی از آفت‌کش‌های گروه کاربامات می‌باشد (Fattahi *et al.*, 2012)، که به عنوان یکی از قوی ترین آفت‌کش‌ها در کشاورزی مطرح می‌باشد (Gunier *et al.*, 2011) و برای کنترل آفات گیاهان توتون، تنباکو، محصولات کشاورزی، شالیزارها و مواردی از این دست به کار می‌رود (Tilak *et al.*, 1981). کاربایل علاوه بر مصارف کشاورزی و خانگی در محیط‌های مصبی نیز جهت کنترل سخت‌پوستان شکارچی حلزون‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (Pfeiffer *et al.*, 1997). مکانیسم عمل کاربایل مانند اغلب کاربامات‌ها جلوگیری از فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز می‌باشد که این عمل علاوه بر سمیت برای آفات، منجر به سمیت نسبی آن برای پستانداران نیز می‌شود (Gunasekara *et al.*, 2008).

کاربایل مانند بسیاری از آفت‌کش‌ها سرانجام به محیط‌های آبی راه می‌یابد. مقادیری از کاربایل در آب‌های سطحی نواحی شهری و کشاورزی یافت شده است (Gunasekara *et al.*, 2008)، به طوری که به عنوان دومین آفت‌کش فراوان در آب‌های سطحی امریکا گزارش شده است (Martin *et al.*, 2003) و همچنین یکی از چهار آفت‌کش فراوان در رودخانه‌های نواحی شهری است (Gilliom *et al.*, 2006)، به همین دلیل می‌تواند تهدیدی برای سایر آبزیان محسوب گردد (Tripathi and Singh, 2004). اگرچه کاربامات‌ها دارای خاصیت تجمعی در محیط

در این مطالعه از آفت کش کارباریل با نام تجاری سوین (Sevine) استفاده گردید. به منظور به دست آوردن محلول های استوک، مقادیر لازم از کارباریل در آب حل گردید و به تانک های آکواریومی مورد استفاده در آزمایش افزوده گردیدند (Mittal *et al.*, 1991). پس از پایان دوره سازگاری با شرایط آزمایشگاه، ماهی ها به صورت تصادفی به ۴ تانک آکواریومی با ابعاد ۳۰×۳۰×۴۰ سانتی متر که قبلاً توسط آب شیر هوادهی شده پر شده بودند و مقدار مناسب سم نیز به آنها اضافه شده بود منتقل شدند. به طوری که تعداد ۲۵ ماهی در هر تانک آکواریومی قرار گرفت. سه گروه از آنها در معرض غلظت های ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی گرم در لیتر از کارباریل قرار گرفتند و یک تانک آکواریومی که فاقد کارباریل بود به عنوان تیمار کنترل در نظر گرفته شد. تغذیه ماهیان که از ۴۸ ساعت قبل از شروع آزمایش متوقف شده بود در این مرحله نیز ادامه یافت و غذادهی در طول آزمایش صورت نگرفت. روزانه آب موجود در آکواریوم ها به منظور حفظ غلظت های کارباریل به کار رفته در آزمایش با آب کلر زدایی شده تعویض و دوباره مقادیر مناسب کارباریل به هر آکواریوم اضافه می گردید. آزمایش به مدت ۹ روز ادامه یافت و نمونه گیری از ماهی ها به منظور بررسی نمونه های بافتی از بافت های کبد و آبشش در روزهای اول، پنجم و نهم صورت گرفت.

۲.۲. مطالعات بافت شناسی

در هر یک از زمان های آزمایش (روزهای اول، پنجم و نهم)، تعداد ۳ ماهی از هر یک از تیمارهای آزمایشی به طور تصادفی صید و توسط محلول پودر گل میخک بیهوش گردیدند. پس از بیهوش شدن ماهی ها، بافت های آبشش و کبد جدا شده و به منظور تثبیت شدن، در داخل میکروتیوب های حاوی محلول بوئن قرار داده شدند. حجم ماده تثبیت کننده حداقل سه برابر حجم نمونه های بافتی در نظر گرفته شد. پس از ۲۴ ساعت نگهداری نمونه های بافتی در داخل محلول بوئن (Cengiz, 2006)، نمونه ها جهت آنگیری در غلظت های مختلف اتانول (۷۰-۱۰۰) قرار داده شدند (Banaee *et al.*, 2013). پس از آنگیری، نمونه ها به منظور الکل گیری و شفاف سازی در محلول زایلول قرار داده شدند. در مرحله بعد، نمونه ها در پارافین مذاب

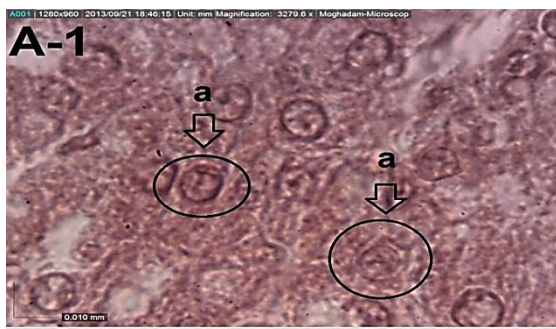
آبگیرهای پوشیده توسط گیاهان یافت می شود. جمعیت های از این ماهی که در چشمه علی دامغان زیست می کنند شمالی ترین و شرقی ترین جمعیت موجود در ایران می باشند (Coad and Abdoli, 2000). *A. sophiae* توانایی تحمل سطوح پایین اکسیژن را دارا می باشد و همچنین می تواند رنج وسیعی از تغییرات دما و شوری را تحمل نماید، به همین دلیل این ماهیان از گونه های فراوان در آب های شور و لب شور محسوب می شوند (Frenkel and Goren, 2000).

در حال حاضر کارباریل به صورت گسترده ای به منظور از بین بردن برخی آفات کشاورزی در ایران استفاده می شود (Eskafi *et al.*, 2012). با این حال مطالعات در زمینه بررسی تاثیرات کارباریل بر گونه های غیر هدف به خصوص ماهی ها در ایران اندک می باشد. آفانیوس یکی از گونه هایی است که مطالعات کمی در زمینه آلودگی بر روی آن انجام گرفته است. بنابراین بررسی تاثیرات کارباریل بر روی این گونه بسیار حائز اهمیت می باشد و نتایج این مطالعه ممکن است بتواند جهت استفاده از این گونه به عنوان یک اندیکاتور از شرایط محیطی به کار رود.

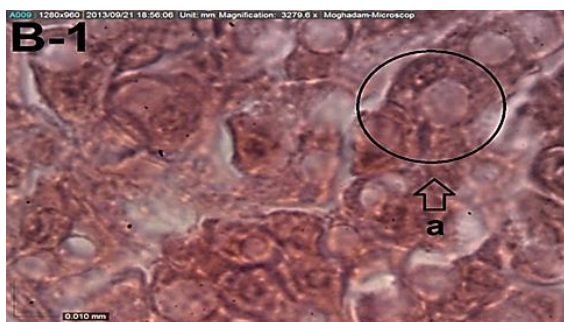
۲. مواد و روش ها

۲.۱. نمونه برداری و طرح آزمایش

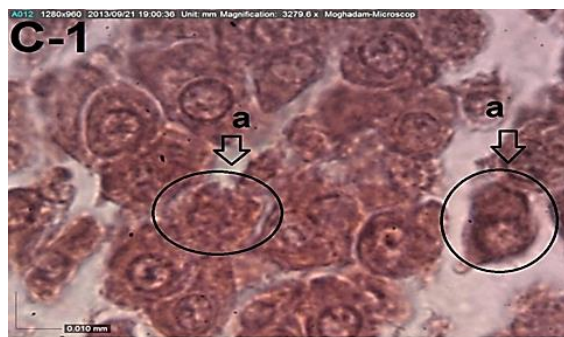
تعداد ۱۰۰ عدد ماهی *A. sophiae* با میانگین وزنی ۱ گرم و میانگین طول ۴ سانتی متر در تابستان ۱۳۹۱ از چشمه علی دامغان (۳۶°۱۶'N و ۵۴°۰۵'E) توسط تور ساچوک صید و توسط تانک های مجهز به هوادهی به آزمایشگاه شیلات دانشگاه تهران منتقل شدند. سپس ماهی ها به مدت ۱۰ روز در چند تانک آکواریومی نگهداری و به شرایط آزمایشگاه سازگار شدند (شرایط آکواریوم ها در این مدت شامل دما $21.5 \pm 1^\circ\text{C}$ و $\text{pH}=7.4$ بودند). طی دوره سازگاری، ماهی ها دو بار در روز توسط غذای دستی با نام تجاری Tetramin flake تغذیه و تانک ها نیز هوادهی شدند. تعویض آب موجود در مخازن به صورت روزانه با آب تازه ای که به مدت ۴۸ ساعت کلرزدایی شده بود انجام شد. شرایط فتوپریود به صورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بود (Cengiz, 2006).



شکل A-1- ساختار بافت کبد ماهی آفانیوس سوفیا در گروه کنترل - (بزرگنمایی با لنز ۱۰۰ و با روش رنگ آمیزی هماتوکسلین - ائوزین) - (a: هیپاتوسیت‌ها در حالت نرمال).



شکل B-1- ساختار بافت کبد ماهی آفانیوس سوفیا در معرض غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر در روز اول - (بزرگنمایی با لنز ۱۰۰ و با روش رنگ آمیزی هماتوکسلین - ائوزین) - (a: واکنش شدن هیپاتوسیت‌ها).



شکل C-1- ساختار بافت کبد ماهی آفانیوس سوفیا در معرض غلظت ۱ میلی گرم در لیتر در روز اول - (بزرگنمایی با لنز ۱۰۰ و با روش رنگ آمیزی هماتوکسلین - ائوزین) - (a: نکروز نسبی هیپاتوسیت‌ها در برخی مناطق).

C-2 و D-2). در روز پنجم تغییرات تا حدی شدیدتر و شامل نکروز و پوسته پوسته شدن در لاملای ثانویه، هایپرپلازی، خمیدگی لاملای ثانویه، هایپرتروفی، نکروز خفیف در سلول‌های لاملای ثانویه، جدا شدن پوسته لاملای ثانویه و فیوزن بودند (شکل‌های E-2، F-2 و G-2). تغییرات مشاهده شده در روز نهم نیز شامل هایپرتروفی، چماقی شدن لاملای ثانویه، خمیدگی لاملای ثانویه، نکروز و پوسته پوسته شدن در لاملای

قرار گرفته و سپس قالب‌گیری در پارافین صورت پذیرفت. پس از قرار دادن قالب‌ها در یخچال و اطمینان از استحکام آن‌ها، توسط دستگاه میکروتوم برش‌های ۴-۶ میکرونی (Velmurugan *et al.*, 2009) از بافت‌ها تهیه و بر روی لام قرار داده شدند. به منظور رنگ آمیزی لام‌ها از روش هماتوکسلین-ائوزین استفاده گردید (Figueiredo-Fernandes *et al.*, 2007). در پایان رنگ‌آمیزی، هر لام توسط یک لامل و چسب بالزام پوشیده شد. به منظور بررسی لام‌ها از میکروسکوپ نوری استفاده گردید.

۳. نتایج

۳.۱. بررسی هیستوپاتولوژی بافت کبد

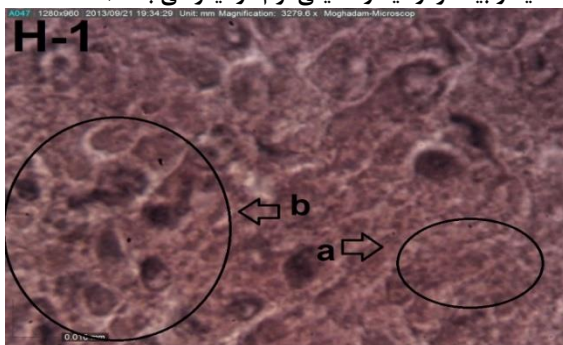
طی مدت سازگاری به شرایط آزمایشگاه و در طول آزمایش هیچ گونه تلفاتی مشاهده نشد. پس از بررسی بافت کبد در این مطالعه مشخص شد که آفت کش کارباریل سبب ایجاد تغییراتی در این بافت می‌گردد که این تغییرات در کبد ماهیان تیمار کنترل مشاهده نشده و در این گروه ساختار کبد به صورت نرمال مشاهده شد (شکل A-1). تغییرات مشاهده شده در کبد ماهیان قرار گرفته در معرض کارباریل در روز اول شامل واکنش شدن هیپاتوسیت‌ها و نکروز هیپاتوسیت‌ها می‌باشند (شکل‌های B-1، C-1 و D-1). در روز پنجم تغییرات شامل نکروز شدید هیپاتوسیت‌ها، واکنش شدن هیپاتوسیت‌ها، نکروز هسته‌ای، واکنش شدن سیتوپلاسم (شکل‌های E-1، F-1 و G-1) و در روز نهم نیز شامل نکروز هیپاتوست‌ها، زایش هیپاتوسیت‌های جدید، واکنش شدن هیپاتوسیت‌ها و آتروفی می‌باشند (شکل‌های H-1، I-1 و J-1).

۳.۲. بررسی هیستوپاتولوژی بافت آبشش

پس از بررسی‌های بافت‌شناسی بافت آبشش، مشخص گردید که بافت آبشش در ماهیان تیمار کنترل دارای ساختار نرمال می‌باشد (شکل A-2). اما هر ۳ غلظت به کار رفته در این آزمایش سبب بروز یک‌سری تغییرات بافتی در آبشش‌ها گردید. تغییرات مشاهده شده در روز اول شامل هایپرپلازی، نکروز و پوسته پوسته شدن سلول‌های لاملای ثانویه، هایپرتروفی و جدا شدن پوسته لاملای ثانویه بودند (شکل‌های B-2،



شکل G-1- ساختار بافت کبد ماهی آفانیوس سوفیا در معرض غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر در روز پنجم- (بزرگنمایی با لنز ۱۰۰ و با روش رنگ آمیزی هماتوکسلین- انوزین) - (a: نکروز هیپاتوسیت‌ها، شدت نکروز در این تیمار بیشتر از تیمار ۱ میلی گرم در لیتر می باشد).



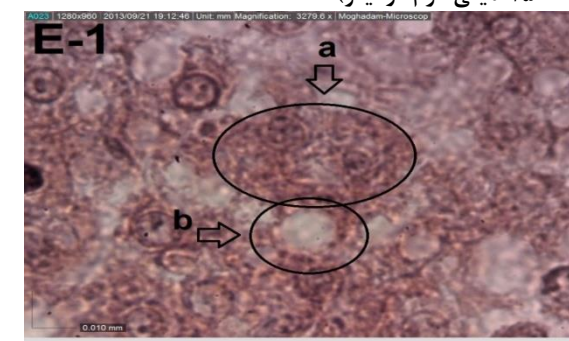
شکل H-1- ساختار بافت کبد ماهی آفانیوس سوفیا در معرض غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر در روز نهم- (بزرگنمایی با لنز ۱۰۰ و با روش رنگ آمیزی هماتوکسلین- انوزین) - (a: نکروز هیپاتوسیت‌ها- b: زایش هیپاتوسیت‌های جدید در برخی مناطق).



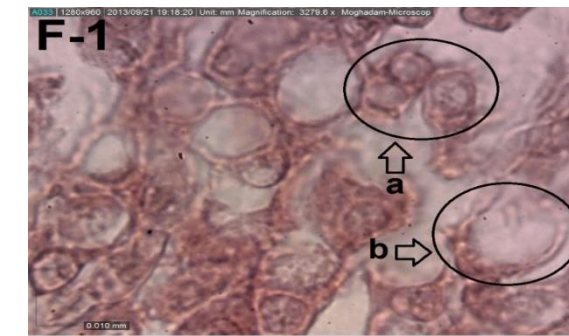
شکل I-1- ساختار بافت کبد ماهی آفانیوس سوفیا در معرض غلظت ۱ میلی گرم در لیتر در روز نهم- (بزرگنمایی با لنز ۱۰۰ و با روش رنگ آمیزی هماتوکسلین- انوزین) - (a: نکروز هیپاتوسیت‌ها- b: واکنش شدن هیپاتوسیت‌ها).



شکل D-1- ساختار بافت کبد ماهی آفانیوس سوفیا در معرض غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر در روز اول- (بزرگنمایی با لنز ۱۰۰ و با روش رنگ آمیزی هماتوکسلین- انوزین) - (a: نکروز شدیدتر هیپاتوسیت‌ها نسبت به تیمار ۰/۵ میلی گرم در لیتر).



شکل E-1- ساختار بافت کبد ماهی آفانیوس سوفیا در معرض غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر در روز پنجم- (بزرگنمایی با لنز ۱۰۰ و با روش رنگ آمیزی هماتوکسلین- انوزین) - (a: نکروز شدید هیپاتوسیت‌ها در اکثر مناطق- b: واکنش شدن هیپاتوسیت‌ها).



شکل F-1- ساختار بافت کبد ماهی آفانیوس سوفیا در معرض غلظت ۱ میلی گرم در لیتر در روز پنجم- (بزرگنمایی با لنز ۱۰۰ و با روش رنگ آمیزی هماتوکسلین- انوزین) - (a: نکروز هسته‌ای- b: واکنش شدن شدید سیتوپلاسم).

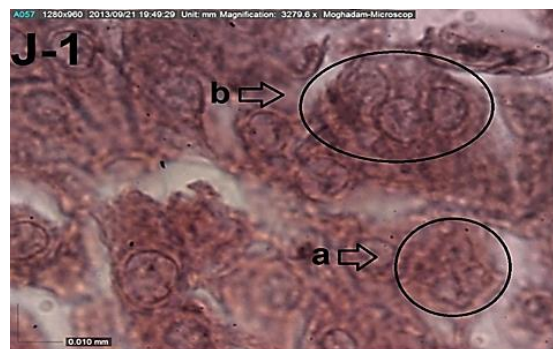
۴. بحث و نتیجه گیری

برای بررسی وضعیت سلامت اکوسیستم‌های آبی به‌طور گسترده‌ای از ماهی‌ها و پاسخ‌های بیولوژیک آنها استفاده می‌شود. مشخص گردیده که ابزارهای

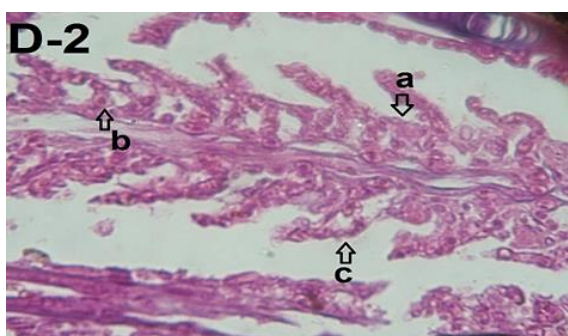
ثانویه، جدا شدن پوسته لاملای ثانویه (اپیتلیال لیفتینگ)، کوتاه شدن لاملای ثانویه، فیوژن و از بین رفتن کامل برخی لاملاهای ثانویه می‌باشند (شکل‌های H-2، I-2، J-2).



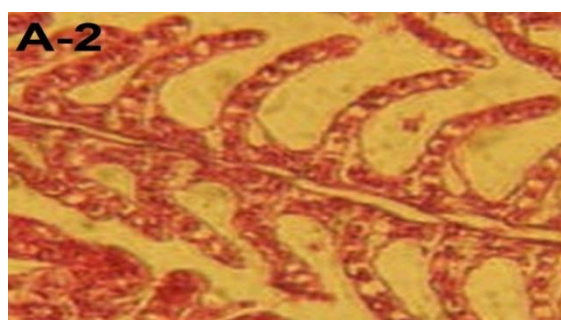
شکل C-2- ساختار بافت آبشش ماهی آفانیوس سوفیا در معرض غلظت ۱ میلی گرم در لیتر در روز اول - (بزرگنمایی با لنز ۱۰۰ و با روش رنگ آمیزی هماتوکسلین- ائوزین) -
 a: هایپرپلازی در سلول‌های راسی و قاعده‌ای لاملائی
 ثانویه - b: نکروز و پوسته پوسته شدن سلول‌های لاملائی ثانویه).



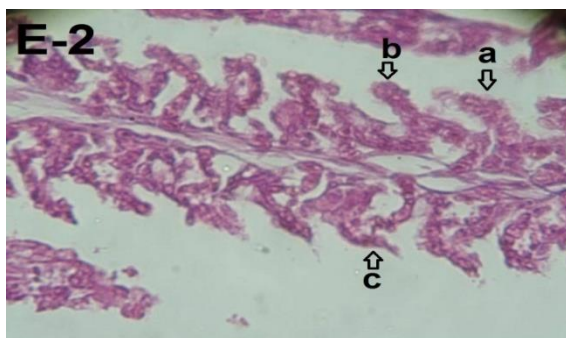
شکل J-1- ساختار بافت کبد ماهی آفانیوس سوفیا در معرض غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر در روز نهم - (بزرگنمایی با لنز ۱۰۰ و با روش رنگ آمیزی هماتوکسلین- ائوزین) - (a: نکروز هپاتوسیت‌ها - b: آتروفی).



شکل D-2- ساختار بافت آبشش ماهی آفانیوس سوفیا در معرض غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر در روز اول - (بزرگنمایی با لنز ۱۰۰ و با روش رنگ آمیزی هماتوکسلین- ائوزین) - (a: هایپرپلازی در سلول‌های قاعده‌ای لاملائی ثانویه - b: هایپرتروفی در سلول‌های قاعده‌ای لاملائی ثانویه - c: جدا شدن پوسته لاملائی ثانویه).



شکل A-2- ساختار بافت آبشش ماهی آفانیوس سوفیا در گروه کنترل - (بزرگنمایی با لنز ۱۰۰ و با روش رنگ آمیزی هماتوکسلین- ائوزین).



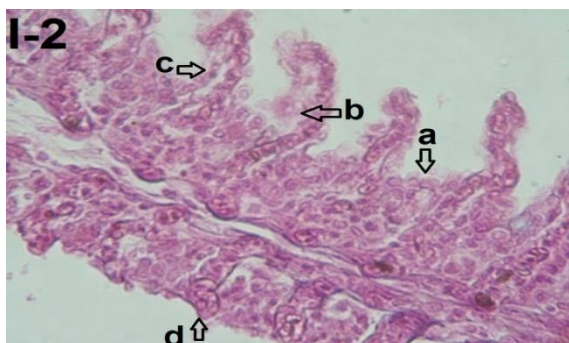
شکل E-2- ساختار بافت آبشش ماهی آفانیوس سوفیا در معرض غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر در روز پنجم - (بزرگنمایی با لنز ۱۰۰ و با روش رنگ آمیزی هماتوکسلین- ائوزین) - (a: نکروز و پوسته پوسته شدن در لاملائی ثانویه - b: هایپرپلازی در سلول‌های لاملائی ثانویه - c: خمیدگی در لاملائی ثانویه).



شکل B-2- ساختار بافت آبشش ماهی آفانیوس سوفیا در معرض غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر در روز اول - (بزرگنمایی با لنز ۱۰۰ و با روش رنگ آمیزی هماتوکسلین- ائوزین).

های به کار رفته در این مطالعه مشخص شد که آفت کش کارباریل دارای تاثیرات مخربی بر روی بافت کبد می باشد. عارضه‌های مشاهده شده در کبد شامل

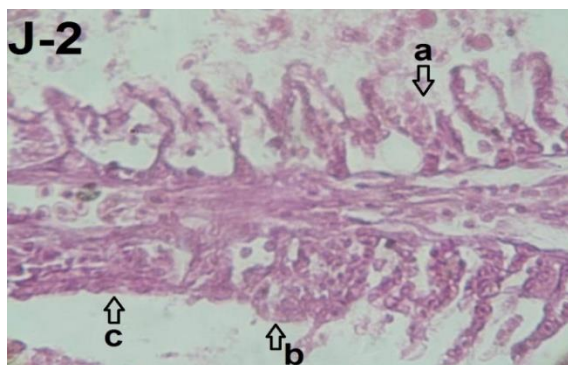
مفیدی برای بررسی تاثیر آلاینده‌ها بر ماهی‌ها بوده است (Rudnicki *et al.*, 2009) و این مطالعات بافت شناسی ویژه روش مناسبی برای بررسی سلامت موجود و اکوسیستم می‌باشند. کبد ارگان اولیه برای متابولیسم، سم زدایی آلاینده‌ها و آزاد سازی مواد مضر می‌باشد (Capkin *et al.*, 2010). پس از بررسی ساختار بافت کبد ماهیان قرار گرفته در معرض غلظت



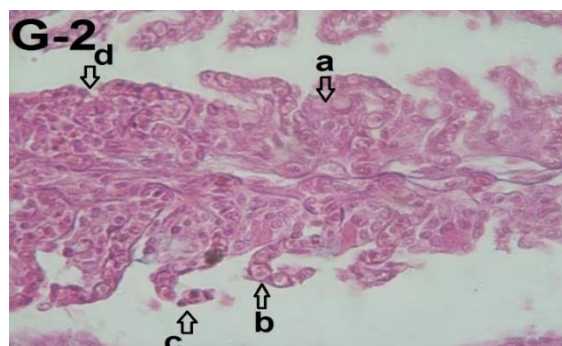
شکل I-2- ساختار بافت آبشش ماهی آفانیوس سوفیا در معرض غلظت ۱ میلی گرم در لیتر در روز نهم - (بزرگنمایی با لنز ۱۰۰ و با روش رنگ آمیزی هماتوکسلین- ائوزین)-
 a: هایپریلازی شدید در سلول های راسی و قاعده ای لاملائی ثانویه- b: نکروز و پوسته پوسته شدن در لاملائی ثانویه- c: جدا شدن پوسته لاملائی ثانویه (اپیتلیال لیفتینگ)- d: کوتاه شدن لاملائی ثانویه.



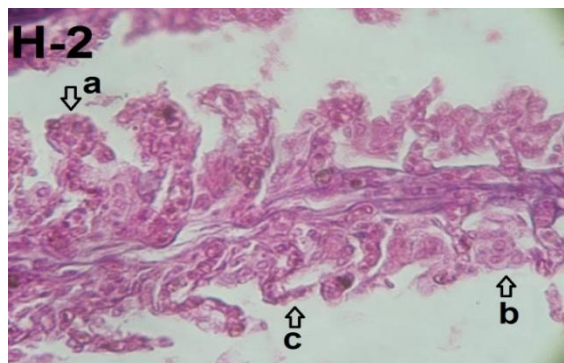
شکل F-2- ساختار بافت آبشش ماهی آفانیوس سوفیا در معرض غلظت ۱ میلی گرم در لیتر در روز پنجم - (بزرگنمایی با لنز ۱۰۰ و با روش رنگ آمیزی هماتوکسلین- ائوزین) - a: هایپریلازی شدید در سلول های قاعده ای لاملائی ثانویه- b: هایپرتروفی شدید در سلول های قاعده ای لاملائی ثانویه- c: نکروز خفیف در سلول های لاملائی ثانویه- d: جدا شدن پوسته لاملائی ثانویه.



شکل J-2- ساختار بافت آبشش ماهی آفانیوس سوفیا در معرض غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر در روز نهم - (بزرگنمایی با لنز ۱۰۰ و با روش رنگ آمیزی هماتوکسلین- ائوزین) - a: نکروز و پوسته پوسته شدن شدید در سلول های لاملائی ثانویه- b: فیوژن- c: از بین رفتن لاملائی ثانویه.



شکل G-2- ساختار بافت آبشش ماهی آفانیوس سوفیا در معرض غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر در روز پنجم - (بزرگنمایی با لنز ۱۰۰ و با روش رنگ آمیزی هماتوکسلین- ائوزین) - a: هایپریلازی بسیار شدید در سلول های قاعده ای لاملائی ثانویه- b: هایپرتروفی شدید در لاملائی ثانویه - c: خمیدگی در لاملائی ثانویه- d: فیوژن.



شکل H-2- ساختار بافت آبشش ماهی آفانیوس سوفیا در معرض غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر در روز نهم - (بزرگنمایی با لنز ۱۰۰ و با روش رنگ آمیزی هماتوکسلین- ائوزین) - a: هایپریلازی شدید به خصوص در سلول های راسی لاملائی ثانویه که منجر به چماقی شدن سلول های راسی شده است- b: هایپرتروفی در سلول های راسی و قاعده ای لاملائی ثانویه- c: خمیدگی لاملائی ثانویه.

های جدید و آتروفی می باشند.

در مطالعات دیگر نیز پس از بررسی تاثیرات آفت کش های ارگانوفسفره بر بافت کبد ماهی *Corydoras paleatus*، تغییراتی از جمله نکروز کانونی، آتروفی و واکنش شدن را مشاهده کردند (Sarkar و همکاران (۲۰۰۵) و واکنش شدن و نکروز کانونی را در ماهی *Labeo rohita* قرار گرفته در معرض آفت کش سایپرمتترین گزارش کردند. نکروز هیپاتوسیت ها پس از بررسی تاثیر سرب بر *Dasyatis kuhlii* (Tresnati and Djawad, 2012) و مالاتیون بر بافت کبد *Heteropneustes fossilis* نیز مشاهده شده است.

در این مطالعه واکنش شدن در روزهای اول، پنج و نهم مشاهده شد. واکنش های موجود در

واکنش شدن هیپاتوسیت ها، نکروز هیپاتوسیت ها، نکروز هسته ای، واکنش شدن سیتوپلاسم، زایش هیپاتوسیت

در روزهای پایانی به سمت ترمیم و سازش به شرایط موجود در حال پیشرفت می‌باشد. همچنین زایش هیپاتوسیت‌های جدید در روز نهم نیز خود می‌تواند به عنوان دلیلی برای بازسازی بافت کبد در نظر گرفته شود. همچنین با توجه به نتایج مطالعه‌ای که توسط Mollendorf (۱۹۷۳) انجام شد، بیان شد که واکوئله شدن یک مکانیسم دفاعی محسوب می‌گردد، بنابراین مشاهده واکوئله شدن که از همان روز اول آغاز شد شاید به تنهایی نتواند دلیلی بر احیاء بافت کبد با شرایط موجود باشد اما از آنجا که در روز پایانی علاوه بر واکوئله شدن، آتروفی نیز مشاهده شده است می‌توان بیان کرد که این گونه در حال بازسازی بافت کبد و احیاء می‌باشد.

بارزترین تغییرات ایجاد شده در بافت آبشش *A. sophiae* در اثر قرارگیری در معرض غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی گرم در لیتر آفت کش کارباریل شامل هایپرپلازی، نکروز و پوسته پوسته شدن سلول‌های لاملائی ثانویه، هایپرتروفی و جدا شدن پوسته لاملائی ثانویه (اپیتلیال لیفتینگ)، خمیدگی لاملائی ثانویه (کورلینگ)، فیوزن، چماقی شدن لاملائی ثانویه، کوتاه شدن لاملائی ثانویه و از بین رفتن کامل برخی لاملاهای ثانویه بودند. اپیتلیال لیفتینگ که در روز اول مشاهده شد یکی از اولین پاسخ‌های آبشش حتی در معرض غلظت‌های پایین آلاینده‌ها می‌باشد (Segers *et al.*, 1984)، که در بسیاری از مطالعات گزارش شده است (Mallatt, 1985; Figueiredo-Fernandes *et al.*, 2011; Ba-Omar *et al.*, 2007). پس از بررسی تاثیرات غلظت‌های ۱، ۵ و ۱۰ پی‌پی‌ام از آفت-کش تمفوس بر ماهی *A. dispar*، برخی آسیب‌ها از جمله فیوزن، اپیتلیال لیفتینگ، کورلینگ و اپیتلیال هایپرتروفی را گزارش کردند و هایپرتروفی اپیتلیال که منجر به فیوزن شده بود را به عنوان مکانیسم دفاعی این ماهی مطرح کردند چرا که فیوزن از طریق افزایش ضخامت لایه خارجی آبشش تا حدودی از ورود آفت کش به داخل بافت آبشش جلوگیری می‌نماید. بر اساس نتایج مطالعه Figueiredo-Fernandes و همکاران (۲۰۰۷) می‌توان فیوزن مشاهده شده در این مطالعه را به تکثیر سلولی یا ضخیم شدن اپیتلیوم فیلامنت آبششی در اثر هایپرپلازی نسبت داد. با توجه به این که فیوزن لاملاهای ثانویه منجر به کاهش سطح

سیتوپلاسم هیپاتوسیت‌ها ممکن است محتوی لیپید و یا گلیکوژن باشند که با فعالیت متابولیکی نرمال کبد در ارتباط می‌باشند (Camargo and Martinez, 2007). واکوئله شدن هیپاتوسیت‌ها ممکن است نشان دهنده عدم تعادل بین نرخ سنتز مواد در سلول‌های پاراننشیمی و نرخ آزاد شدن آن‌ها به داخل گردش سیستمیک باشد (Gingerich, 1982). Mollendorf (۱۹۷۳) بیان کرد از آنجا که تشکیل واکوئل‌ها به سبب جمع‌آوری مواد مضر سبب جلوگیری از اختلال در فعالیت حیاتی سلول می‌گردند، تشکیل آن‌ها یک مکانیسم دفاعی محسوب می‌گردد. اما از طرفی نیز بررسی تاثیرت هیستوپاتولوژیکی ناشی از استرس‌زاهای محیطی بر ماهیان مشخص کرد که جلوگیری از سنتز پروتئین، تخلیه انرژی، عدم تجمع میکروتوبول‌ها و یا تغییر در استفاده از مواد، هر کدام می‌توانند دلیلی بر ایجاد واکوئل در هیپاتوسیت‌ها باشند (Hinton *et al.*, 1988).

در روز پایانی مطالعه در تیمار قرار گرفته در معرض ۱/۵ میلی گرم در لیتر کارباریل، آتروفی سلول‌های کبدی مشاهده شد. Suzuki و همکاران (۱۹۹۵) بیان کردند که آتروفی یک شرایط غیر نرمال است که حجم سلول نسبت به حالت معمول دچار تغییر می‌گردد، قسمت خارجی سلول نامشخص و نوکلئوس‌ها نیز کوچک‌تر می‌گردند و این هیپاتوسیت‌ها در نهایت در نتیجه نکروز ناپدید می‌شوند. در نتیجه ممکن است نکروزی که در زمان‌های مختلف در این مطالعه مشاهده شده است در نتیجه آتروفی شدید سلول و ایجاد تغییرات غیر قابل بازگشت رخ داده باشد و سلول نکروز شده از طریق تغییر رنگ و کاهش سایز مشخص می‌گردد و همچنین نکروز ممکن است در نتیجه مسدود شدن سینوسویدهای رخ دهد که وظیفه انتقال خون و مواد غذایی را به هیپاتوسیت‌ها بر عهده دارند (Tresnatiand Djawad, 2012). پس می‌توان نتیجه‌گیری کرد در زمان‌های ابتدایی آتروفی سلول به حدی شدید بوده است که منجر به نکروز بافت کبد در برخی قسمت‌ها شده است. در روز نهم و در معرض غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر در کنار نکروز برخی قسمت‌ها، آتروفی نیز مشاهده شد یعنی این که هنوز سلول کاملاً از بین نرفته و دچار نکروز کامل نگردیده است. شاید بتوان اینگونه نتیجه‌گیری کرد که بافت کبد

و پوسته پوسته شدن نیز از جمله تغییرات رایج در این مطالعه بودند. Ortizet و همکاران (۲۰۰۳) بیان کردند که نکرور بافت آبشش از جمله تغییرات شدید می باشد که در اثر شرایط کمبود اکسیژن و مشکلات تنفسی رخ می دهد. بنابراین با توجه به مشاهده این تغییرات در اکثر تیمارها می توان نتیجه گیری کرد که شرایط موجود برای ماهی مطلوب نبوده است و سبب آسیب های بافتی گردیده است اما تغییرات در حدی نبوده که سبب مرگ ماهی های مورد مطالعه گردد.

در پایان می توان نتیجه گیری کرد که تغییرات ایجاد شده در آبشش و کبد می تواند به عنوان پاسخ مستقیم یا غیر مستقیم این ارگان ها به آفت کش کارباریل در نظر گرفته شوند. با توجه به افزایش نکرور در بافت آبشش با افزایش زمان و روند رو به بهبود بافت کبد در مراحل پایانی آزمایش شاید بتوان بیان کرد که از آن جا که آبشش در تماس مستقیم با محیط قرار دارد آلاینده بیشتری جذب آن شده و تاثیرات مشاهده شده در آن شدیدتر هستند. بنابراین شاید مطالعه این بافت بتواند به عنوان ابزار مناسبی برای بررسی این گونه به عنوان یک گونه اندیکاتور مطرح گردد.

تماس آبشش با محیط به منظور جلوگیری از ورود بیش از حد آلاینده می گردد، ظرفیت اکسیژن گیری ماهی کاهش می یابد و هایپوکسی رخ دهد (Karan et al., 1998). اپیتلیال لیفتینگ سبب می گردد فاصله ای که آلاینده بایستی طی کند تا به جریان خون برسد افزایش یابد. هایپرپلازی نیز با کاهش سطح تنفسی به عنوان یک مکانیسم دفاعی مطرح است، اما این پاسخ های دفاعی سبب بروز مشکلات تنفسی و جذب اکسیژن می گردند (Cengiz, 2006). در نتیجه تغییراتی از قبیل اپیتلیال لیفتینگ، هایپرپلازی و هایپرتروفی سلول های اپیتلیال و حتی فیوزن نسبی برخی لاملاهای ثانویه مانند آنچه که در این مطالعه مشاهده شد مثال هایی از مکانیسم های دفاعی قرار گیری ماهی در شرایط نامساعد محیطی می باشند که در مجموع سبب کاهش ارتباط بین خون و محیط خارجی می شوند (Hadi and Alwan, 2012). این تغییرات در این مطالعه از روز اول تا روز نهم مشاهده شدند که بیانگر این موضوع می باشد که این گونه پس از تماس با آفت کش کارباریل بلافاصله به مقابله با شرایط نامساعد محیطی پرداخته و با تغییراتی به منظور کاهش سطح تماس آبشش با آلاینده سعی در ممانعت از ورود آفت کش کارباریل نموده است. نکرور

References

- Assis, C.R.D., Bezerra, R.S., Carvalho, L.B., 2011. Fish cholinesterases as biomarkers of organophosphorus and carbamate pesticides. *Pesticides in the Modern World Pests Control and pesticides Exposure and Toxicity Assessment*, 254-278.
- Ba-Omar, T.A., Al-Jardani, S., Victor, R., 2011. Effects of pesticide temephos on the gills of *Aphanius dispar* (Pisces: Cyprinodontidae). *Tissue and Cell*, 43(1), 29-38.
- Banaee, M., Davoodi, M.H., Zoheiri, F., 2013. Histopathological changes induced by paraquat on some tissues of gourami fish (*Trichogaster trichopterus*). *Open Veterinary Journal*, 3(1), 36-42.
- Boran, H., Altinok, I., Capkin, E., 2010. Histopathological changes induced by maneb and carbaryl on some tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Tissue and Cell*, 42(3), 158-164.
- Camargo, M.M.P., Martinez, C.U.B.R., 2007. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotropical Ichthyology*, 5(3), 327-336.
- Capkin, E., Terzi, E., Boran, H., Yandi, I., Altinok, I. 2010. Effects of some pesticides on the vital organs of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Tissue and Cell*, 42(6), 376-382.
- Cengiz, E.I. 2006. Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 22(2), 200-204.
- Coad, B.W., Abdoli, A., 2000. Systematics of an isolated population of tooth-carp from northern Iran (Actinopterygii: Cyprinodontidae). *Zoology in the Middle East*, 21(1), 87-102.
- Deka, S., Mahanta, R., 2012. A Study on the Effect of Organophosphorus Pesticide Malathion on Hepato-Renal and Reproductive Organs of *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *The Science Probe* 1(1), 1-13.
- Desai, A.K., Joshi, U.M., Ambadkar, P.M., 1984. Histological observations on the liver of *Tilapia mossambica* after exposure to monocrotophos, an organophosphorus insecticide. *Toxicology Letters*, 21(3), 325-331.
- El-Serafy, S.S., Abdel-Hameid, N.A.H., El-Daly, A.A., 2009. Histological and Histochemical Alterations Induced by Phenol Exposure in *Oreochromis aureus* (Steindachner, 1864) Juveniles. *Egypt J. Aquat. Biol. & Fish*, 13(2), 151-172.

- Erickson, W., Turner, L., 2003. Carbaryl analysis of risks to endangered and threatened salmon and steelhead. Office of Pesticide Programs, US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 108 p.
- Eskafi, N., Ganbalani, G.N., Hassanpanah, D., Atamehr, A., 2012. Comparison of effect of some insecticides and their application times on controlling potato wireworms in Ardabil region, Iran. *International Journal of Agriculture: Research and Review*, 913-919.
- Fanta, E., Rios, F.S.A., Romão, S., Vianna, A.C.C., Freiburger, S. 2003. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54(2), 119-130.
- Fattahi, E., Jorsaraei, S.G.A., Gardaneh, M., 2012. The effect of Carbaryl on the pituitary-gonad axis in male rats. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 10(5), 419-424.
- Figueiredo-Fernandes, A., Ferreira-Cardoso, J.V., Garcia-Santos, S., Monteiro, S.M., Carrola, J., Matos, P., Fontáinhas-Fernandes, A., 2007. Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 27(3), 103-109.
- Frenkel, V., Goren, M., 2000. Factors affecting growth of killifish, *Aphanius dispar*, a potential biological control of mosquitoes. *Aquaculture*, 184(3), 255-265.
- Gilliom, R. J., J. E. Barbash., C. G. Crawford., P. A. Hamilton., J. D. Martin., N. Nakagaki., L. H. Nowell., J. C. Scott., P. E. Stackelberg., G. P. Thelin. 2006. The quality of our nation's waters; pesticides in the nation's streams and groundwater, 1992-2001. U.S. Geological Survey Circular 1291 .
- Gingerich, W. H. 1982. Hepatic toxicology of fishes. *Aquatic toxicology*. 1:55-105.
- Gunasekara, A. S., A. L. Rubin., K. S. Goh., F. C. Spurlock., R. S. Tjeerdema. 2008. Environmental fate and toxicology of carbaryl. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Vol 196*: Springer. 95-121.
- Gunier, R. B., M. H. Ward., M. Airola., E. M. Bell., J. Colt., M. Nishioka., P. A. Buffler., P. Reynolds., R. P. Rull., A. Hertz. 2011. Determinants of agricultural pesticide concentrations in carpet dust. *Environmental Health Perspectives*, 119(7), 970-976.
- Hadi, A.A., Alwan, S.F., 2012. Histopathological changes in gills, liver and kidney of fresh water fish, *Tilapia zillii*, exposed to aluminum. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*, 3(11), 2071-2081.
- Hinton, D.E., Lauren, D.J. Holliday, T.L., Giam, C. S., 1988. Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes: potential biomarkers of exposure. Paper read at Preprints of Papers Presented at National Meeting, Division of Water, Air and Waste Chemistry, American Chemical Society, USA.
- Jacob, J., Nandini, N.J., Natarajan, P., 2102. Histopathologic biomarkers as indicators of aquatic pollution in *Mystus gulio* (Hamilton). *J. Recent Trends Biosci*, 2 (1):10-17.
- Joshi, N., Sahu, A. P., 2007. Histopathological changes in liver of *Heteropneustes fossilis* exposed to cypermethrin. *Journal of Environmental Biology*, 28(1), 35-37.
- Karan, V., Vitorović, S., Tutundžić, V., Poleksić, V., 1998. Functional enzymes activity and gill histology of carp after copper sulfate exposure and recovery. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 40(1), 49-55.
- Mallatt, J. 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42(4), 630-648.
- Martin, J.D., Crawford, C.G., Larson, S.J., 2003. Pesticides in streams: summary statistics; preliminary results from cycle of the national water quality assessment program (NAWQA), 1992-2001. http://ca.water.usgs.gov/pnsp/pestsw/Pest-SW_2001_Text.html. Accessed August 24, 2004.
- Mittal, P.K., Adak, T., Sharma, V.P., 1991. Acute toxicity of certain organochlorine, organophosphorus, synthetic pyrethroid and microbial insecticides to the mosquito fish *Gambusia affinis* (Baird and Girard). *Indian Journal of Malariology*, 28(3), 167-170.
- Mollendorf, A. 1973. *Cytology Cell Physiology*. Academic Press, New York.
- Monfared, A.L., Soltani, S., 2013. Histological, Histometric and biochemical alterations of the gill and kidney of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to silver nanoparticles. *European Journal of Experimental Biology*, 3(2), 391-395.
- Ortiz, J.B., González de Canales, M.L., Sarasquete, C., 2003. Histopathological changes induced by lindane in various organs of fishes. *Scientia Marina*, 67(1), 53-61.
- Pfeiffer, C.J., Qiu, B., Cho, C. H., 1997. Electron microscopic perspectives of gill pathology induced by 1-naphthyl-N-methylcarbamate in the goldfish (*Carassius auratus* Linnaeus). *Histol Histopatho*, 2, 645-653.
- Rakhodaei, M., Alishahi, M., Baboli, M.J., 2012. Determining the Lethal Concentration of Diazinon Pesticide (LC 96 H) on *Barbus grypus* 50. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 4(4), 390-395.
- Ribera, D., Narbonne, J.F., Arnaud, C., Saint-Denis, M., 2001. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida* under exposed to contaminated artificial soil, effects of carbaryl. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(7), 1123-1130.
- Rocha, E., Monteiro, R.A.F., 1999. Histology and cytology of fish liver: a review. *Ichthyology: Recent Research Advances*, 321-344.
- Rudnicki, C.A.M., Melo, G.C., Donatti, L., Kwall, H.G., Fanta, E. 2009. Gills of juvenile fish *Piaractus mesopotamicus* as histological biomarkers for experimental sub-lethal contamination with the Organophosphorus

- Azodrinâ® 400. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(6), 1431-1441.
- Saenphet, S., Thaworn, W., Saenphet, K., 2009. Histopathological alterations of the gills, liver and kidneys in *Anabas testudineus* (Bloch) fish living in an unused lignite mine, Li District, Lamphun Province, Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 40(5), 1121-1126.
- Sakr, S.A., Jamal, S., 2005. Fenvalerate Induced Histopathological and Histochemical Changes in the Liver of the Catfish (*Clarias Gariepinus*). *Journal of Applied Sciences Research*, 1(3), 263-267.
- Sanagoudra, S.N., Bhat, U.G., 2013. Carbaryl Induced Changes in the protein and cholesterol contents in the liver and muscle of marine benthic fish, *Mugil cephalus*. *American Journal of Biochemistry*, 3(2), 29-33.
- Santos, T., Gomes, V., Passos, J., Rocha, A., Salaroli, R., Ngan, P., 2011. Histopathological alterations in gills of juvenile Florida pompano *Trachinotus carolinus* (Perciformes, Carangidae) following sublethal acute and chronic exposure to naphthalene. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 6(2), 109-120.
- Sarkar, B., Chatterjee, A., Adhikari, S., Ayyappan, S., 2005. Carbofuran and cypermethrin induced histopathological alterations in the liver of *Labeo rohita* (Hamilton) and its recovery. *Journal of Applied Ichthyology*, 21(2), 131-135.
- Segers, J.H.L., Temmink, J.H.M., Van den Berg, J.H.J., Wegman, R.C.C., 1984. Morphological changes in the gill of carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to acutely toxic concentrations of methyl bromide. *Water Research*, 18(11), 1437-1441
- Suzuki, Y., Takashima, F., Hibiya T., 1995. An atlas of fish histology: normal and pathological features. Vascular System, Kodansha Ltd., Tokyo, 72-87.
- Tilak, K.S., Rao, D.M., Devi, A.P., Murty, A.S., 1981. Toxicity of carbaryl and 1-naphthol to four species of freshwater fish. *Journal of Biosciences*, 3(4), 457-461.
- Todd, N. E., Van Leeuwen, M., 2002. Effects of Sevin (Carbaryl Insecticide) on Early Life Stages of Zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 53(2), 267-272.
- Tresnati, J., Djawad I., 2012. Effect of lead on gill and liver of blue spotted ray (*Dasyatis kuhlii*). *Journal of Cell and Animal Biology*, 6(17), 250-256.
- Tripathi, P.K., Singh A., 2004. Carbaryl induced alterations in the reproduction and metabolism of freshwater snail, *Lymnaea acuminata*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 79(1), 1-9.
- Velmurugan, B., Selvanayagam, M., Cengiz, E.I., Unlu, E., 2007. Histopathology of lambda-cyhalothrin on tissues (gill, kidney, liver and intestine) of *Cirrhinus mrigala*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 24(3), 286-291.
- Velmurugan, B., Selvanayagam, M., Cengiz, E.I., Unlu, E. 2009. Histopathological changes in the gill and liver tissues of freshwater fish, *Cirrhinus mrigala* exposed to dichlorvos. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(5), 1291-1296.

