مطالعه تغییرات فاکتورهای بیوشیمیایی خون و آسیب‌شناسی بافتی کبد ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در تماس با غلظت‌های زیرکشنده دیازینون

مهدی بنایی[۱]، علیرضا میرواقفی[۲]*، آنتونی سوردا گومیل[۳]، غلامرضا رفیعی[۲] و کمال احمدی[۴]

[۱] گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی خاتم الانبیا(ص) ، بهبهان

[۲] گروه شیلات ، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران

[۳] گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم زیستی دانشگاه ایلس بالرز اسپانیا

[۴] گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال و عضو باشگاه پژوهشگران جوان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۹/۹ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۱/۱/۲۰)

چکیده

سموم حشره‌کش یکی از مهمترین آلاینده‌های اکوسیستم‌های آبی می باشد. پایش سطح آلودگی اکوسیستم‌های آبی با این ترکیبات از اهمیت بسزایی برخوردار است. سلامت آبزیان می‌تواند شاخص زیستی مناسبی برای پایش آلودگی آب‌های سطحی باشد. دیازینون یک آفت‌کش فسفره آلی است، که در اکوسیستم‌های آبی ایران یافت می‌شود. در طی سال‌های اخیر نگرانی درباره تأثیر این ترکیب بر سلامت ماهی‌ها افزایش یافته است. در این مطالعه، تأثیر غلظت‌های زیرکشنده دیازینون بر فاکتورهای بیوشیمیایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، پس از گذشت ۷، ۱۴ و ۲۸ روز بررسی شد. فعالیت استیل‌کولین استراز (ACEh) و سطوح پروتئین تام، آلبومین و نیز گلوبولین در پلاسما به طور معنی‌داری در غلظت ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر دیازینون کاهش یافت ($p<۰/۰۵$). فعالیت کراتین‌کیناز (CK) به طور معنی‌داری در گروه تحت تیمار غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در روزهای ۱۴ و ۲۸ کاهش و در ماهی‌های در معرض ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر سطح فعالیت این آنزیم در روز ۷ افزایش یافت ($p<۰/۰۵$). سطح فعالیت آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز (AST) و سطح گلوکز خون ماهی‌های تحت تیمار دیازینون به طور معنی‌داری بیشتر از ماهی‌های گروه کنترل در طول دوره آزمایش است ($p< ۰/۰۵$). فعالیت آنزیم آلکالین‌فسفاتاز (ALP) تنها در روز ۱۴ در ماهی‌های تحت هر دو غلظت دیازینون افزایش یافت ($p< ۰/۰۵$). هیپرتروفی سلول‌های کبدی، واکوئله شدن سیتوپلاسم سلولی، تورم ابری در بافت کبد ماهی‌های در معرض هر دو غلظت دیازینون مشاهده گردید. در مجموع، قرار گرفتن طولانی مدت در معرض غلظت‌های زیرکشنده دیازینون سبب ایجاد تغییرات بیوشیمیایی در خون و بافت کبد ماهی قزل‌آلای رنگین کمان می‌گردد. لذا سنجش فاکتورهای بیوشیمیایی و مطالعات آسیب‌شناسی بافت کبد می‌تواند به عنوان ابزار ساده و مناسبی جهت ارزیابی تأثیر سموم بر ماهی‌ها پیشنهاد شود.

واژه‌های کلیدی: غلظت زیرکشنده دیازینون، فاکتورهای بیوشیمیایی، تغییرات آسیب‌شناسی بافتی، استیل کولین‌استراز، ماهی قزل‌آلای رنگین کمان

* نویسنده مسئول تلفن: ۰۲۶۱-۲۲۲۳۰۴۴ فاکس: ۰۲۶۱-۲۲۴۵۹۰۸ E-mail: avaghefi@ut.ac.ir

مقدمه

دیازینون یکی از شناخته‌شده‌ترین سموم حشره‌کش فسفره آلی است که در اوایل دهه‌ی ۱۹۵۰ به بازار معرفی گردید. دیری نگذشت که استفاده از این حشره‌کش فسفره در فضاهای عمومی، مزارع کشاورزی به ویژه شالیزارها، همچنین باغ‌های میوه و همچنین در دامپزشکی جهت کنترل برخی از انگل‌های خارجی حیوانات اهلی مرسوم گردید (Üner *et al*., 2006). امروزه این حشره‌کش با نام‌های تجاری مختلفی نظیر دیانون، کنوکس‌اوت و باسودین نیز در بازارهای تجاری جهان عرضه می‌شود، که به رغم برتری‌های نسبی این سم در مقایسه با سموم کلره آلی، به علت سمیت بالای آن برای موجودات زنده غیرهدف و همچنین پیامدهای ناخواسته زیست‌محیطی، مصرف آن در بسیاری از کشورهای جهان نیز در طی سال‌های اخیر ممنوع شده است (Burkepile *et al*., 2000; Banks *et al*., 2005). در واقع، تقریباً بیش از ۹۰ درصد از سموم آفت‌کش مورد استفاده در مزارع کشاورزی هرگز به جانور هدف نمی‌رسد و در عوض در هوا، خاک و آب پراکنده می‌شود (Moses *et al*., 1993). این حشره‌کش غالباً پس از استفاده، از طریق زهکش مزارع کشاورزی و یا آبشویی مزارع کشاورزی، در پی آبیاری بیش از حد و یا پس از بارش باران‌های فصلی، از سطح گیاهان و خاک شسته شده و وارد آب‌های سطحی و حتی زیرزمینی می‌گردد (Sohrabi *et al*., 2001)، به گونه‌ای که تا به حال، گزارش‌های متعددی مبنی بر وجود این سم و متابولیت‌های آن در آب‌های سطحی و زیرزمینی حتی پس از گذشت ۳ تا ۵ ماه از زمان سم پاشی، در مناطق مختلف جهان صورت گرفته است (Shayeghi *et al*., 2001; U.S. EPA, 2005) که از آن جمله می‌توان وجود دیازینون در زهکش شالیزارهای مناطق مختلف استان‌های شمالی(Nouri *et al*., 2000; Tavakol, 2007) و رودخانه‌ها مهاباد و سیمینه‌رود(Honarpajouh, 2003)، نهند رود (Tarahi Tabrizi, 2001)، رودخانه کر و سیوند (Shayeghi *et al*., 2007)، رودخانه شاه‌پور، مند و دالکی (Shayeghi *et al*., 2007)، گرگان‌رود و قره‌سو (Bagheri, 2007)، رودخانه اشمک (Khara *et al*., 2008)، رودخانه کرج (Arjomandi *et al*., 2010)، و اغلب رودخانه‌های استان مازندران (Shayeghi *et al*., 2007; Arjomandi *et al*., 2010) و همچنین آب‌های زیرزمینی منطقه محمودآباد استان مازندران اشاره کرد (Khazaei *et al*., 2010).

لذا استفاده از مدل‌های جانوری در پایش آلودگی‌های زیست محیطی و بررسی اثرات بیولوژیکی سموم بر شاخص‌های سلامت مدل‌های آزمایشگاهی و جانوری، می‌تواند به عنوان یکی از متداول‌ترین روش‌ها در مطالعات سم‌شناسی، مورد توجه قرار گیرد (Banaee *et al*., 2008). ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان یکی از مهمترین گونه‌های پرورشی و تجاری در مناطق مختلف ایران محسوب می‌شود، که متأسفانه به علت کاهش کمیت و کیفیت آب قابل دسترس پرورش‌دهندگان در طی سال‌های اخیر، سطح تولید آن در برخی از استان‌ها به طور چشمگیری کاهش یافته است. از آنجایی که آب‌های سطحی و زیرزمینی یکی از مهمترین منابع تامین‌کننده آب مورد نیاز سیستم‌های پرورش ماهی‌های سردابی است، لذا آلودگی این منابع می‌تواند تهدیدی جدی برای آینده تکثیر و پرورش آبزیان در ایران باشد. بر اساس گزارش‌های مختلف ارایه شده بر مبنای 96hr LC50، میزان سمیت دیازینون برای اغلب آبزیان، به ویژه ماهی‌ها در حد نسبتاً خطرناک تا بسیار خطرناک گزارش شده است (Burkepile *et al*., 2000; U.S. EPA, 2004).

دیازینون نیز مانند بسیاری از سموم فسفره آلی، از طریق ممانعت از عملکرد صحیح آنزیم استیل‌کولین‌استراز بر روی جانوران هدف و غیرهدف تأثیر می‌گذارد. لذا اندازه‌گیری سطح فعالیت این آنزیم به ویژه در بافت‌های نظیر مغز، عضلات و نیز پلاسما به عنوان یک شاخص زیستی و نیز یکی از ساده‌ترین راه‌های تشخیص مسمومیت موجودات زنده با این حشره‌کش عنوان می‌شود (Üner *et al*., 2006). علاوه بر استیل‌کولین استراز، اندازه‌گیری سطح تغییرات دیگر فاکتورهای

ریخت‌شناسی، بافت‌شناسی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی نیز می‌تواند به عنوان شاخص زیستی در مطالعات سم‌شناسی محیطی و پایش آلودگی بوم‌سازگان‌های آبی مشکوک به آلودگی به سموم فسفره آلی همچون دیازینون مورد استفاده قرار گیرد. حشره‌کش‌های فسفره آلی غالبا از طریق تغییر سطح فعالیت برخی از آنزیم‌ها یا تخریب ساختار بیوشیمیایی آنها موجب بروز اختلال در عملکرد آنها در واکنش‌های بیوشیمیایی در سلول‌ها می‌شوند (Banaee, 2006). هدف از این مطالعه، بررسی تغییرات پاتولوژیکی بر اساس فاکتورهای بیوشیمیایی خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به عنوان یک مدل آزمایشگاهی در مسمومیت تجربی با دیازینون است.

مواد و روش‌ها

ماهی

در هر یک از مراحل آزمایش، ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (با وزن متوسط ۱۰g±۸۵) از یک مزرعه خصوصی واقع در روستای کردان، از توابع کرج خریداری و به آزمایشگاه تکثیر وپرورش آبزیان دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران انتقال داده شد. پس از انتقال، ماهی‌ها جهت سازگاری با شرایط آزمایشگاهی (۲±۱۵دمای C°، دوره نوری L/8 D ۱۶، اکسیژن ۱±۶ میلی‌گرم بر لیتر، ۰/۲±۷ pH) در مخزن فایبرگلاس (۱۰۰۰ لیتری) که به صورت سیستم مداربسته و به طور مجزا با تعویض روزانه ۱۰ درصدی آب نگهداری گردیدند. در طی دوره سازگاری ماهی‌ها با جیره تجاری قزل‌آلا به صورت دو بار در روز و معادل ۲ درصد وزن بدن تغذیه شدند.

تعیین سمیت حاد و مقدار عددی LC_{50} دیازینون

آزمایش تعیین سمیت حاد و مقدار عددی LC_{50} بر اساس دستورالعمل شماره ۲۰۳ سازمان همکاری‌های اقتصادی و توسعه (OECD)[1] و به صورت استاتیک انجام گرفت (OECD, 1992). در این مرحله از آزمایش، ۱۸۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (با وزن متوسط ۱۰g±۸۵)، پس از سازگاری با شرایط آزمایشگاهی، به طور تصادفی در ۱۸ مخزن فایبرگلاس ۲۰۰ لیتری در قالب ۶ تیمار آزمایشی، هر یک با ۳ تکرار توزیع و در معرض غلظت‌های ۰/۰ (گروه کنترل)، ۰/۵، ۱/۵، ۲/۵، ۳/۵، ۴/۵ میلی‌گرم بر لیتر سم دیازینون تجاری با خلوص ۶۰ درصد، قرار داده شدند. در طی ۹۶ ساعت از آغاز آزمایش میزان مرگ و میر ماهی‌ها پس از گذشت ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت، ثبت و ماهی‌های مرده به سرعت از سیستم حذف گردیدند. پس از اتمام آزمایش، مقدار عددی LC50 ۹۶، ۷۲، ۴۸ و ۲۴ ساعته دیازینون برای ماهی‌های قزل‌آلای رنگین کمان بر اساس آزمون آنالیز پروبیت (Probit Analysis test) محاسبه شد (Aydin and Köprücü, 2005).

سمیت زیرکشنده دیازینون

در این مرحله، بر اساس دستورالعمل OECD، ۹۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (با وزن متوسط ۱۰g±۸۵)، پس از سازگاری با شرایط آزمایشگاهی، به طور تصادفی در ۹ مخزن فایبرگلاس ۱۰۰۰ لیتری در قالب ۲ تیمار آزمایشی و یک تیمار کنترل، هر یک با ۳ تکرار توزیع و در معرض غلظت‌های سم معادل $\frac{۱}{۵}$ و $\frac{۱}{۱۰}$ مقدار سمیت LC_{50} ۹۶ ساعته دیازینون برای ماهی قزل‌آلای رنگین کمان به مدت ۲۸ روز قرار داده شدند و پس از گذشت ۷، ۱۴ و ۲۸ روز پس از مواجهه ماهی‌ها با سم، ۹ ماهی از هر تیمار (۳ ماهی از هر مخزن) به صورت تصادفی صید و پس از بیهوشی با پودر گل میخک (۱ به ۵۰۰۰)، از آنها خون‌گیری صورت گرفت.

فاکتورهای بیوشیمیایی خون

پس از خون‌گیری، نمونه‌های خون جهت استحصال پلاسما، در دستگاه سانتریفوژ با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی خون با استفاده از کیت‌های تهیه شده از شرکت پارس آزمون و شرکت من (MAN) و با دستگاه اتوآنالایزر هیتاچی صورت گرفت. سطح پروتئین تام پلاسما بر اساس واکنش بایوره و در طول موج ۵۴۰

1. Organisation for Economic Co-operation and Development

نانومتر، آلبومین پلاسما بر اساس واکنش برموکرزول‌گرین و در طول موج ۶۳۰ نانومتر، گلوبولین پلاسما بر اساس نسبت آلبومین از پروتئین تام پلاسما، گلوکز پلاسما بر اساس روش آنزیمی گلوکز اکسیداز و در طول موج ۵۰۰ نانومتر، سطح کلسترول پلاسما نیز به روش آنزیمی (CHO-PAP) در طول موج ۵۱۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. اساس اندازه‌گیری سطح فعالیت استیل‌کولین استراز پلاسما (AChE)[1]، هیدرولیز بوتیریل‌تیوکولین تحت تأثیر فعالیت آنزیمی استیل‌کولین استراز است. در این واکنش، سرعت کاهش رنگ زرد محلول معرف در طول موج ۴۰۵ نانومتر که رابطه مستقیمی با میزان فعالیت آنزیم کولین‌استراز دارد، اندازه‌گیری گردید. سطح فعالیت آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)[2] و آلانین آمینوترانسفراز (ALT)[3] پلاسما بر اساس مقدار مصرف NADPH و تبدیل آن به NAD^+ در طول موج ۳۴۰ نانومتر، آلکالین فسفاتاز (ALP)[4] بر اساس تبدیل نیتروفنیل فسفات به نیتروفنول و فسفات و در طول موج ۴۰۵ نانومتر، و کراتین‌فسفوکیناز (CK)[5] بر اساس تبدیل کراتین‌فسفات به کراتین در طول موج ۳۴۰ نانومتر تعیین و بر اساس میزان جذب نوری OD[6] و فرمول ارایه شده در دستورالعمل کیت‌ها محاسبه گردید (Shanmugam *et al.*, 2010).

بافت‌شناسی

پس از گذشت ۲۸ روز از آغاز زمان قرار گرفتن ماهی‌ها در معرض سم دیازینون و در پایان دوره آزمایش، از هر تیمار ۹ ماهی صید و پس از کالبد شکافی، از بخش میانه بافت کبد ۳ قطعه بافت جدا گردید و در محلول بوئن به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد. تهیه بافت بر اساس روش ارایه شده توسط Ganji and Arvand (2002) صورت گرفت. در مجموع به ازای هر نمونه ۳ لام (۹ لام به ازای هر بافت از هر ماهی) تهیه و به روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین رنگ‌آمیزی شد و با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰ عدسی شیئی مشاهده گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها به روش تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA)، نرمال بودن داده‌ها نیز بر اساس آزمون Kolmogorov-Smirrov Normality Test و مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون توکی در سطح اطمینان ۹۵ درصد و با استفاده از نرم‌افزار SPSS 15 انجام گرفت. نتایج نیز بر اساس (Mean ± S.D.) نشان داده شده است.

نتایج

مقدار عددی LC_{50} محاسبه شده پس از گذشت ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت از زمان آغاز آزمایش در جدول ۱ ارایه شده است. بر اساس نتایج بدست آمده، میزان مرگ و میر ماهی‌ها با افزایش غلظت سم دیازینون در طی آزمایش تعیین سمیت حاد به طور معنی‌داری افزایش یافت.

جدول ۱- متوسط غلظت کشنده دیازینون LC_{50} (۹۶، ۷۲، ۴۸ و ۲۴ ساعته) برای ماهی قزل‌آلای رنگین کمان

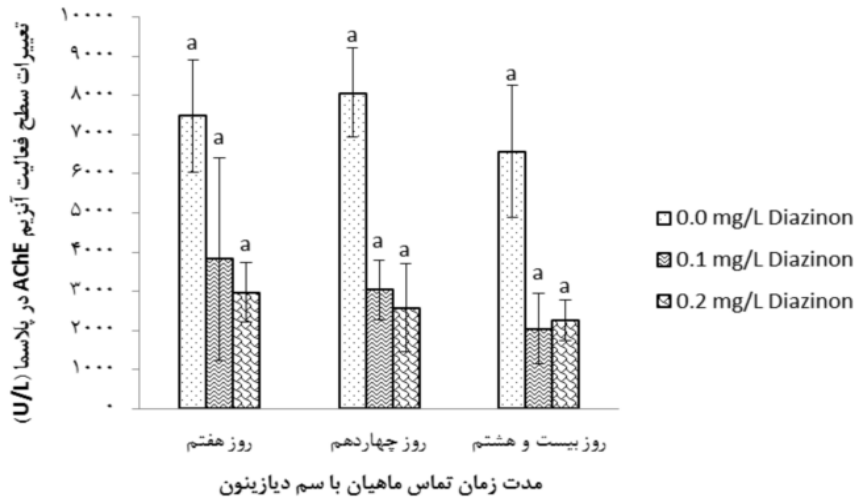
مقدار عددی LC_{50} (میلی‌گرم بر لیتر)	مدت زمان مواجهه با سم (بر اساس ساعت)
۳/۲۵±۰/۱۸ (۳/۶۶-۲/۹۲)	۲۴
۲/۲۲±۰/۱۵ (۲/۵۲-۱/۹۳)	۴۸
۱/۷۰±۰/۱۳ (۱/۹۷-۱/۴۴)	۷۲
۱/۱۷±۰/۱۳ (۱/۴۳-۰/۹۲)	۹۶

بر این اساس، ماهی‌ها در مرحله بررسی اثرات سمیت زیرکشند دیازینون، در معرض غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر دیازینون قرار داده شدند. در این مرحله تغییرات رفتاری و تغییر در فاکتورهای بیوشیمیایی در طی ۲۸ روز مورد بررسی قرار گرفت. روند تغییر در سطح فاکتورهای بیوشیمیایی خون ماهی‌های تحت تیمار دیازینون و گروه کنترل نیز به صورت نمودار (نمودار ۱ تا ۹) ارایه گردید. در این مرحله، هیچ گونه مرگ و میری در ماهی‌های تحت آزمایش مشاهده نگردید. تغییر الگوی رفتاری، افزایش مقدار موکوس جلدی، شنای نامتعادل و در سطح آب، افزایش وازنش سرپوش آبششی و همچنین

1. Acetyl cholinesterase
2. Aspartate aminotransferase
3. Alanine aminotransferase
4. Alkaline phosphatase
5. Creatine phosphokinase
6. Optic density

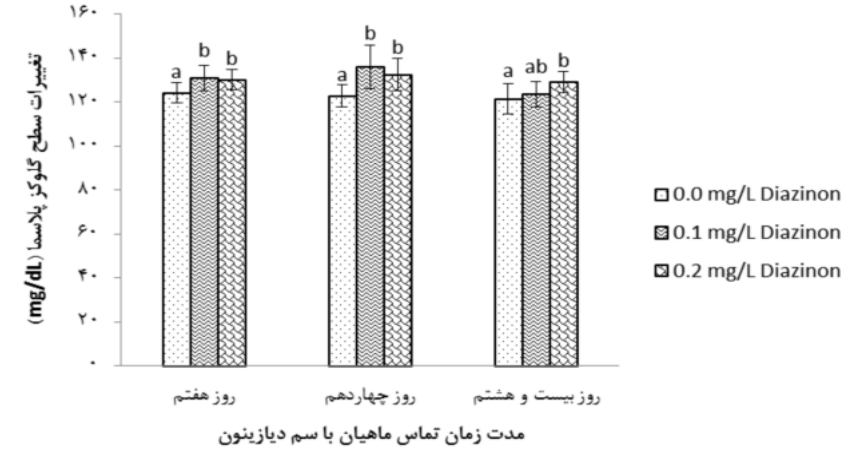
تغییر الگوی رنگ بدن ماهی‌ها، به خصوص در مراحل پایانی آزمایش، از مهمترین تغییرات ظاهری مشاهده شده در ماهی‌های تحت تیمار سم دیازینون است. تغییرات آسیب‌شناسی بافت کبد ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان در مواجهه با سم دیازینون در غلظت‌های زیرکشنده ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر به صورت شماتیک ارایه شده است (شکل ۱۲). اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف در هر مرحله از نمونه‌برداری با حروف انگلیسی مشخص شده است.

به هم ریختگی شکل ظاهری سلول‌های کبدی، رسوب مواد سیتوپلاسمی و هسته‌ای و در نتیجه بهم ریختگی آرایش سلولی و شکل‌گیری واکوئل‌های سلولی در کبد ماهی‌های تحت تیمار سم دیازینون و نیز از هم گسیختگی سینوس‌های خونی در بافت کبد، به ویژه در ماهی‌های تحت تیمار غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر دیازینون به طور کامل محسوس است. نکروز و تخریب ساختار سلول‌های کبدی در این ماهی‌ها به وضوح گویای تأثیر دیازینون در تخریب غشای سلولی و در نتیجه نکروز سلول‌های کبدی است. حالت تورم ابری بافت کبد اغلب ماهی‌ها تحت تیمار غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر و معدودی از ماهی‌های تحت تیمار غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر دیازینون مشاهده گردید.



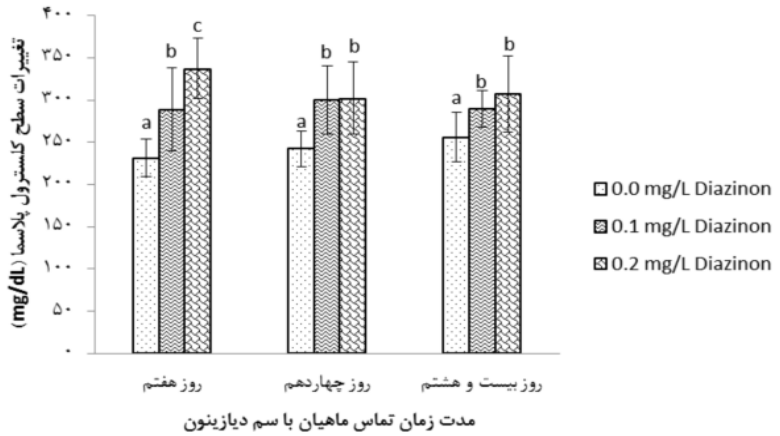
نمودار ۱- تغییرات سطح فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز در پلاسمای ماهی‌های تحت تیمار سم دیازینون کاهش معنی‌دار (p<۰/۰۵).

سطح فعالیت آنزیم AChE در پلاسمای ماهی‌های تحت تیمار سم، ناشی از تأثیر بازدارنده سم ارگانوفسفره دیازینون بر فعالیت این آنزیم است.



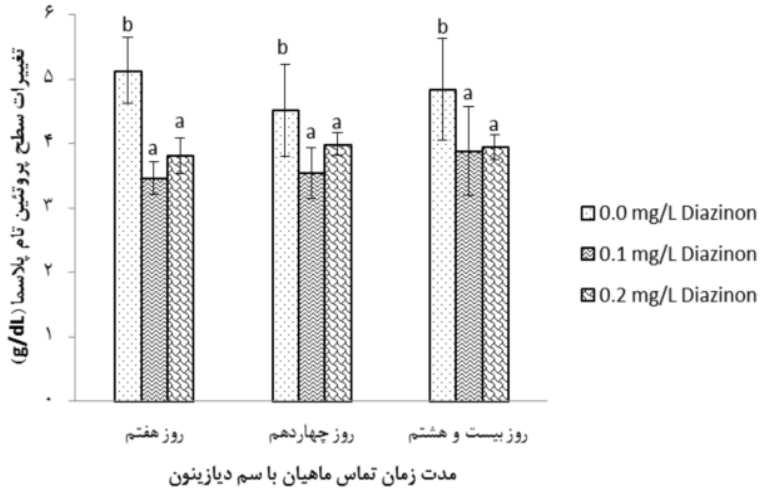
نمودار ۲- تغییرات سطح گلوکز در پلاسمای ماهی‌های تحت تیمار سم دیازینون

بر اساس نتایج بدست آمده، سطح گلوکز پلاسمای ماهی‌های تحت تیمار دیازینون در طی دوره آزمایش به طور معنی‌داری افزایش (p< ۰/۰۵) یافت.



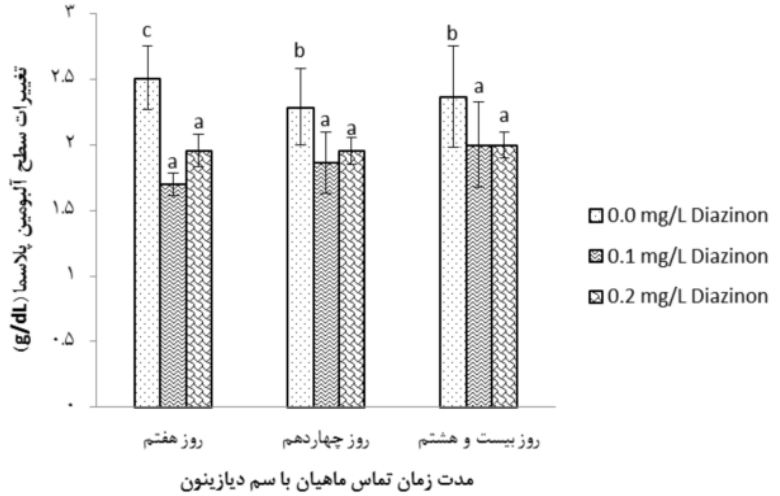
نمودار ۳- تغییرات سطح کلسترول در پلاسمای ماهی‌های تحت تیمار سم دیازینون

روند تغییرات کلسترول پلاسما در ماهی‌های تحت تیمار دیازینون به طور معنی‌داری افزایشی ($p<$ ۰/۰۵) است.



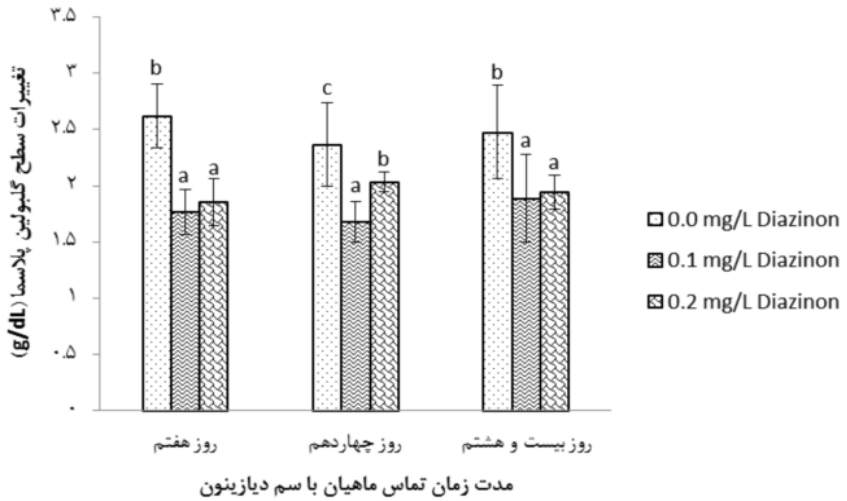
نمودار ۴- تغییرات سطح پروتئین تام در پلاسمای ماهی‌های تحت تیمار سم دیازینون

کاهش معنی‌دار ($p<$ ۰/۰۵) سطح پروتئین تام پلاسما در خون ماهی‌های تحت تیمار دیازینون در طی دوره آزمایش کاملا مشهود است.



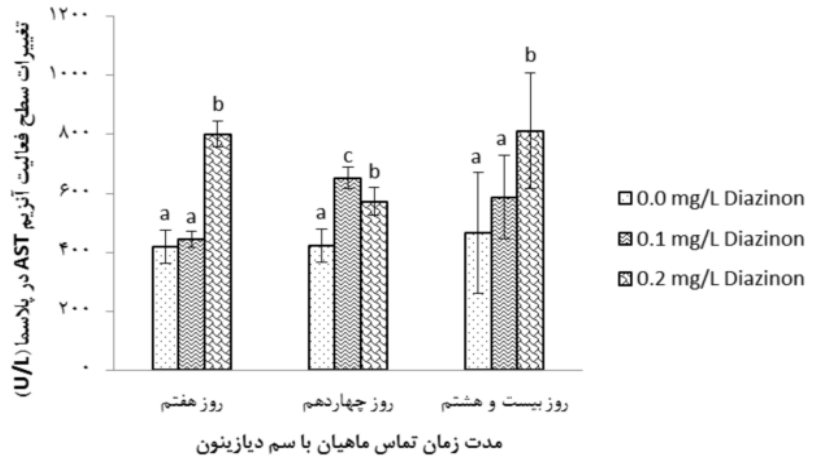
نمودار ۵- تغییرات سطح آلبومین در پلاسمای ماهی‌های تحت تیمار سم دیازینون

تغییرات سطح آلبومین پلاسمای ماهی‌های تحت تیمار دیازینون در مقایسه با گروه کنترل از یک روند کاهشی معنی‌دار ($p<$ ۰/۰۵) تبعیت می‌کند.



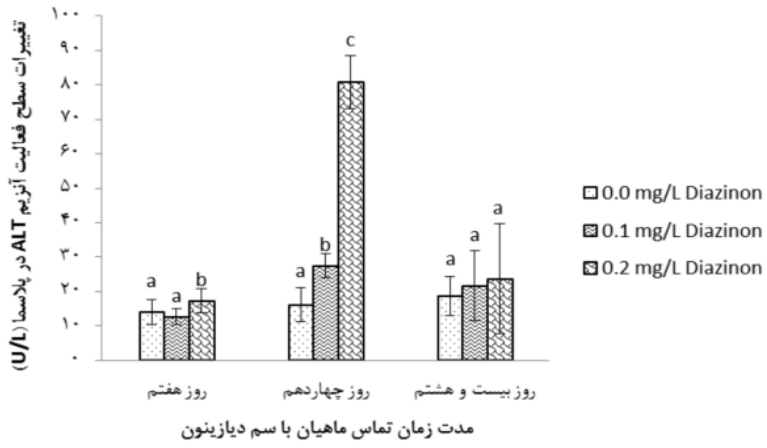
نمودار ۶- تغییرات سطح گلبولین در پلاسمای ماهی‌های تحت تیمار سم دیازینون

سطح گلبولین پلاسمای ماهی‌هایی که در معرض دیازینون قرار داده شدند در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش ($p< ۰/۰۵$) یافته است.



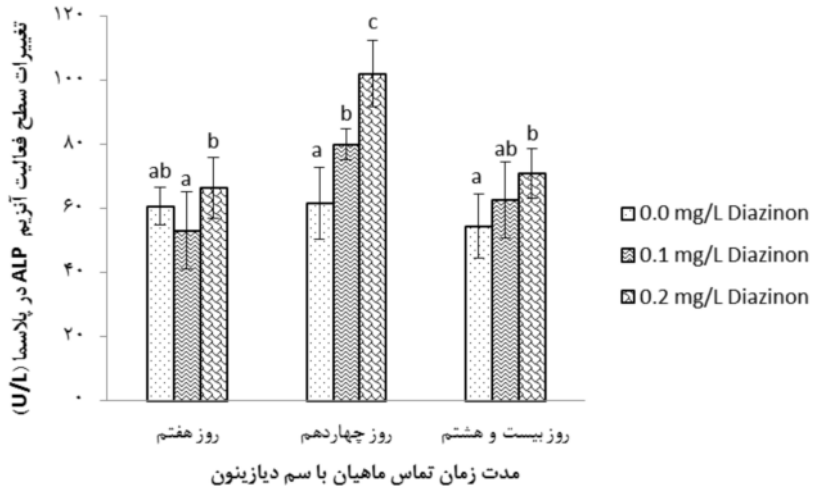
نمودار ۷- تغییرات سطح فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز در پلاسمای ماهی‌های تحت تیمار سم دیازینون

تماس ماهی‌ها با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر سم ارگانوفسفره دیازینون سبب افزایش ($p< ۰/۰۵$) سطح فعالیت آنزیم AST در پلاسما در طی دوره آزمایش می‌شود، که این امر ناشی از آزاد شدن این آنزیم از سلول‌های آسیب دیده، به ویژه سلول‌های کبدی است.



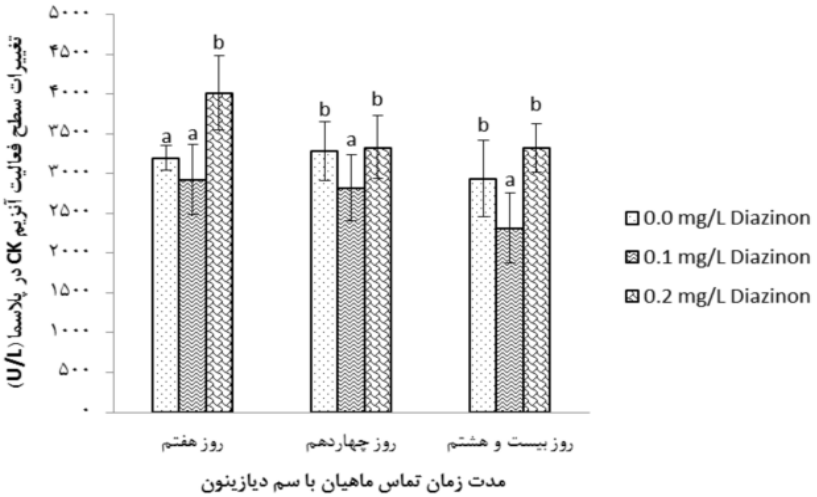
نمودار ۹- تغییرات سطح فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز در پلاسمای ماهی‌های تحت تیمار سم دیازینون

در دومین مرحله نمونه‌برداری در روز چهاردهم، سطح فعالیت آنزیم ALT در ماهی‌های تحت تیمار سم دیازینون در مقایسه با ماهی‌های گروه کنترل افزایش معنی‌داری ($p< ۰/۰۵$) داشته است.



نمودار ۱۰- تغییرات سطح فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در پلاسمای ماهی‌های تحت تیمار سم دیازینون

با افزایش غلظت سم، پس از گذشت ۱۴ و ۲۸ روز از زمان آغاز آزمایش، سطح فعالیت آنزیم ALP به طور معنی‌داری افزایش ($p<$ ۰/۰۵) یافت.

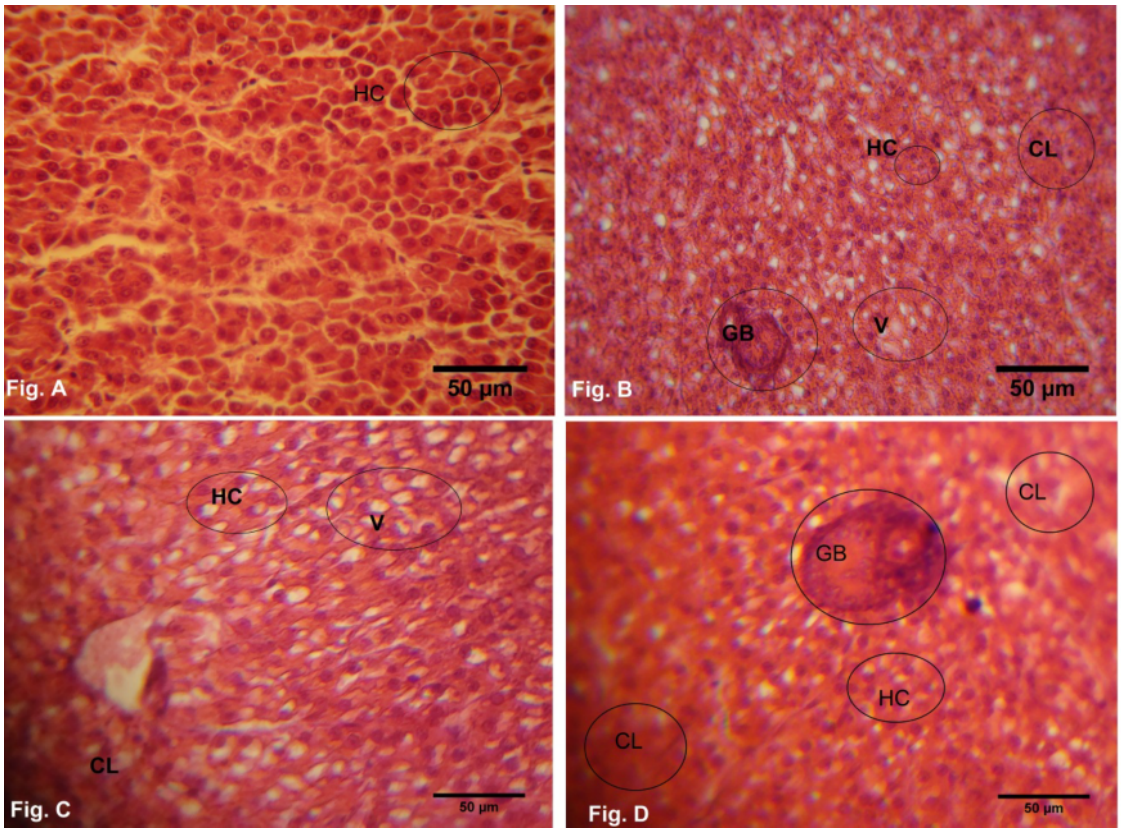


نمودار ۱۱- تغییرات سطح فعالیت آنزیم کراتین‌فسفاتاز در پلاسمای ماهی‌های تحت تیمار سم دیازینون

فعالیت کراتین‌کیناز (CK) به طور معنی‌داری در گروه تحت تیمار غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر در روزهای ۱۴ و ۲۸ کاهش داشته، در حالی که در ماهی‌های در معرض ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر سطح فعالیت این آنزیم در روز ۷ افزایش یافته است ($p<$ ۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به سطح آلودگی اکوسیستم‌های آبی کشور با سموم فسفره آلی، ارزیابی تأثیر این سموم بر آبزیان و پایش اکوسیستم‌های آبی با استفاده از مدل‌های آزمایشگاهی امری ضروری است. تعیین میزان LC_{50} سموم و آلاینده‌های زیست‌محیطی یکی از اساسی‌ترین بخش‌های سم‌شناسی محیطی محسوب می‌شود. مقدار LC_{50} دیازینون برای ماهی‌ها بسیار متغیر است و به سن، وزن، جنسیت، نوع گونه، خصوصیات ژنتیکی، شرایط اقلیمی محیط، فرمولاسیون سم، ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی محیط زیست بستگی دارد. لذا پیش از بررسی اثرات سمیت زیرکشنده دیازینون بر فاکتورهای بیوشیمیایی خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، تعیین مقدار عددی LC_{50} ضروری است. بر اساس نتایج بدست آمده، مقدار عددی LC_{50} ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعته دیازینون برای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در این آزمایش به ترتیب ۰/۱۸±۳/۲۵، ۰/۱۵±۲/۲۲، ۰/۱۳±۱/۷۰ و ۰/۱۳±۱/۱۷ میلی‌گرم بر لیتر تعیین گردید. این در حالی



شکل ١٢- به ترتیب از بالا به پایین تصاویر بافت‌شناسی کبد (با بزرگنمایی x ۴۰۰) ماهی‌های گروه کنترل (Fig. A.)، کبد ماهی‌های تحت تیمار غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر دیازینون (Fig. B.)، کبد ماهی‌های تحت تیمار غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر دیازینون (Fig. C. & Fig. D.) پس از گذشت ۲۸ روز از زمان آغاز آزمایش،ارایه شده است. بخش‌های مختلف بافت‌شناسی کبد به ترتیب شامل سلول‌های بافت کبد (HC)، مجرای صفراوی (GB)، واکوئل‌ها (V)، تورم ابری در بافت کبد (CL).

است که مقدار عددی LC_{50} ۹۶ ساعته، دیازینون برای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*)، ماهی قزل‌آلای گلو بریده (*O. clarki*) و ماهی طلایی (*Carassius auratus*)، گربه‌ماهی (*Ictalurus sp.*)، ماهی ایده (*Leucisc idus*)، ماهی پهلونقره‌ای (*Menidia beryllina*) و ماهی قنات (*Cyprinodon variegates*) به ترتیب ۲/۲، ۳/۲ و ۹، ۸، ۰/۲، ۱/۲ و ۱/۴ میلی‌گرم در لیتر گزارش شده است (U.S.EPA, 2005).

اگرچه در آزمایش مسمومیت با غلظت‌های زیر حد کشندگی دیازینون، مرگ و میری در بین ماهی‌های تحت تیمار مشاهده نگردید؛ بروز رفتارهای غیرطبیعی، شنای نامتعادل، افزایش حساسیت نسبت به شرایط محیطی، افزایش ضربات سرپوش آبششی و شنا در سطح آب، از مهمترین علائم ظاهری مسمومیت با این سم بود، که با افزایش غلظت و گذشت زمان تشدید گردید. مشابه این رفتارها در ماهیان گوپی (*Poecilia eticulate*)، (Viran *et al*., 2003)، گربه ماهی اروپایی (*Silurus glanis*)، (Köprücü *et al*., 2006)، اشلمبو (*Heteropneustes fossilis*)، (Saha and Kaviraj, 2003)، کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، (Çalta and Ural, 2004) که در معرض آفت‌کش‌های مختلف قرار داشته‌اند گزارش شده است، که از مهمترین دلایل این امر می‌توان به کاهش سطح فعالیت آنزیم استیل‌کولین‌استراز (Dutta and Arends, 2003)، مهار گاما آمینوبوتیریک اسید (GABA)، یا سیستم تحریکی گلوتامات (McDonough and Shih, 1997; Tuovien, 2004)، وقوع پراکسیداسیون لیپیدی و استرس اکسیداتیو در سلول‌های عصبی، به ویژه در مغز (Song *et al*., 2006)، آسیب‌های اسمزی وارده به سلول‌های عصبی ناشی از افزایش گلوکز اشاره کرد (Chithra and Leelamma,

1999; Piercy *et al*., 1999; Calcutt, 2002). ترکیبات فسفره آلی به طور کل چربی دوست بوده و به راحتی از طریق پوست، آبشش و سیستم گوارش جذب شده و از سد خون و مغز عبور می‌کنند (Vale, 1998) و در اثر ممانعت از فعالیت استیل کولین استراز در ماهیان می‌تواند موجب ایجاد تغییراتی در الگوی رفتاری، اختلالات شدید در رشد و تغذیه، کاهش نرخ بقا و بروز اختلالات رفتاری در تولیدمثل آنها شود (Dutta and Arends, 2003). در مواجهه جانوران با سموم فسفره آلی، نظیر دیازینون، گروه فسفره ترکیبات فسفره آلی به گروه هیدروکسیل اسید آمینه سرین موجود در ساختار آنزیم استیل‌کولین استراز حمله کرده و با ایجاد تغییر در ساختار بیوشیمیایی این آنزیم مانع از فعالیت این آنزیم می‌شود. این حشره‌کش‌ها به دلیل داشتن باند تیو یا فسفورتیونات (P=S)، غالبا پس از متابولیزه شدن به ترکیباتی واجد استرفسفات (P=O) به نام اوکسون تبدیل می‌شوند، که از خاصیت و توان بازدارندگی استیل‌کولین استرازی بیشتری برخوردار است (Tang *et al*., 2001). در واقع، ممانعت از فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز، که مسؤول تجزیه استیل‌کولین در فضای سیناپسی است، ممکن است موجب تحریک بیش از حد اعصاب کلی-نرژیک گردد، که این امر می‌تواند بروز تغییرات رفتاری، رعشه و برهم خوردن تعادل و در نهایت مرگ آبزیان گردد (Üner *et al*., 2006).

تغییرات غلظت گلوکز در بسیاری از موارد با آسیب‌های وارده به کلیه ماهی‌ها و اختلالات کبدی مرتبط می‌باشد (Agrahari *et al*., 2007; John, 2007). از سویی دیگر، غلظت گلوکز سرم بوسیله مکانیسم‌های پیچیده هورمونی نظیر گلوکاگان، انسولین و دیگر هورمون‌ها نظیر کورتیکواستروئیدها، اپی نفرین و تیروکسین تنظیم می‌شود، لذا در اثر قرار گرفتن در معرض استرس‌های محیطی، سطح گلوکز پلاسما می‌تواند به طور معنی‌داری افزایش یابد (Martin and Black, 1998; Agrahari *et al*., 2007). تغییر در غلظت گلوکز پلاسمای ماهی‌هایی که در معرض آفت‌کش‌ها قرار دارند، مستقیماً می‌تواند ناشی از بروز مسمومیت در این جانوران باشد (Omkar *et al*., 1984; Husain *et al*., 1987). بر اساس نظر دیگر محققین، افزایش سطح گلوکز خون یا هیپرگلیسمی نشان دهنده بروز اختلال در روند متابولیسم کربوهیدرات‌ها می‌باشد، که معمولاً ناشی از افزایش تجزیه گلیکوژن کبدی است (John, 2007). به عبارتی دیگر کاهش ذخایر گلیکوژن کبدی و افزایش گلوکز خون یکی از معمولی‌ترین واکنش‌های ماهی‌ها در تماس با آلاینده‌های شیمیایی محسوب می‌شود. در واقع در چنین شرایطی، گلوکز ۶- فسفات حاصل از تجزیه گلیکوژن کبدی، به وسیله گلوکز ۶-فسفاتاز هیدرولیز شده و گلوکز حاصل به داخل خون آزاد می‌گردد. هیپرگلیسمی در کپور ماهی هندی (*Labeo rohita*)، اشلمبو (*H. fossilis*)، صخره‌ماهی کره‌ای (*Sebastes schlegeli*) و قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) در تماس با آفت‌کش‌های پیرتروئید نیز مؤید همین امر است (Das and Mukherjee, 2003; Jee *et al*., 2005; Velisek *et al*., 2006; Saha and Kaviraj, 2009).

افزایش کلسترول پلاسما نیز نشان‌دهنده بروز اختلالات کبدی است. سطح کلسترول در پلاسمای ماهی چامو (*Mystus vittatus*)، اشلمبو (*H. fossilis*)، ماهی سرماری (*C. punctatus*) و گربه‌ماهی افریقایی (*C. batrachus*) در تماس با حشره‌کش‌های ارگانوفسفره، ارگانوکلره و دیگر آلاینده‌های زیست‌محیطی به طور معنی‌داری افزایش یافته است (Goel and Garg, 1980; Tyagi, 1984; Bano, 1985; John, 2007). انسداد مجاری صفراوی، مسمومیت کبدی، اختلال در عملکرد پانکراس و حتی افزایش گلوکز خون، تخریب ساختار غشاهای زیستی از جمله غشای سلول‌های عصبی می‌تواند عامل افزایش کلسترول پلاسما باشد (Banaee, 2010). گلوکز در مسیر گلیکولیز به پیروات تبدیل می‌شود و پیروات نیز در بافت‌های هوازی به استیل CoA متابولیزه می‌شود، که می‌تواند به عنوان پیش‌ساز اسیدهای چرب و کلسترول در چرخه اسید سیتریک عمل نماید(Murray *et al*., 2003). لذا در شرایطی که ماهی‌ها تحت استرس ناشی از

مسمومیت با دیازینون قرار گرفته‌اند، افزایش گلوکز خون و اختلال در عملکرد پانکراس، می‌تواند موجب افزایش اکسیداسیون گلوکز در بافت‌ها و به تبعیت آن افزایش سطح کلسترول گردد. آسیب‌های بافت‌شناسی به بافت کبد و انسداد مجاری صفراوی ناشی از نکروز بافتی در پی مسمومیت با دیازینون نیز ممکن است در فرایند تشکیل اسیدهای صفراوی و دفع آن اختلال ایجاد نماید و به این ترتیب از دفع کلسترول اضافی پلاسما از طریق اسیدهای صفراوی ممانعت به عمل آورد، که این امر سبب افزایش سطح کلسترول پلاسما می‌گردد.

آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) در بافت‌های مختلفی نظیر کبد (Srivastava *et al*., 2004)، قلب، ماهیچه‌های اسکلتی (Petrović *et al*., 1996)، کلیه، پانکراس، طحال، گلبول‌های قرمز و آبشش ماهی‌ها (Bhattacharya *et al*., 2008) یافت می‌شود. این آنزیم‌ها غالبا در داخل میتوکندری سلول‌ها، به ویژه در سلول‌های کبدی قرار دارند. لذا هر گونه آسیب خفیف، التهاب یا نکروز سلول‌های کبد موجب آزاد شدن این آنزیم‌ها و افزایش سطح آن در پلاسما می‌گردد. علاوه بر بروز اختلالات کبدی، وقوع آسیب‌های شدید و بروز اختلالات در عضلات اسکلتی، نارسایی و اختلالات قلبی نیز منجر به افزایش سطح این آنزیم در پلاسما می‌گردد (Banaee *et al*., 2008). لذا افزایش سطح فعالیت این آنزیم در پلاسمای ماهی‌های تحت تیمار دیازینون می‌تواند حاکی از بروز آسیب‌های هیستوپاتولوژیکی به بافت‌های مختلف، به ویژه بافت کبد باشد. آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز نقش مهمی در مراحل نهایی تجزیه پروتئین جهت تولید ATP ایفا می‌کند (Petrovic *et al*., 1996). به عبارت دیگر، افزایش سطح فعالیت این آنزیم‌ها، نقش مؤثری در استفاده از اسیدهای آمینه در فرایند اکسیداسیون یا گلوکوژنز بازی می‌کند (Rao, 2006) و می‌تواند شاخص بالینی مناسبی جهت تشخیص آسیب‌های واره به کبد محسوب شود (Philip *et al*., 1995). افزایش سطح فعالیت آنزیم‌های AST و ALT در پلاسمای خون ماهی اشلمبو (*H. fossilis*)، ماهی سرماری (*C. punctatus*)، ماه تیلاپیا (*Oreochromis mossambicus*) و گربه‌ماهی افریقایی (*C. batrachus*) به ترتیب در تماس با مونوکروتوفوس، کلرید جیوه، مشتقات هیدروکلراید و کاربوفوران نشان دهنده بروز آسیب‌های شدید در بافت کبدی این ماهی‌ها می‌باشد (Sastry and Sharma, 1980; Van der *et al*., 2003; Palanivelu *et al*., 2005; Agrahari *et al*., 2007).

کراتین فسفوکیناز (CK) آنزیمی است که در ماهیچه‌های اسکلتی (Grzyb and Skorkowski, 2005)، قلب (Liu *et al*., 2001; Haagensen *et al*., 2008)، آبشش (Gonga *et al*., 2004) و مغز (Dickmeis *et al*., 2001) ماهی‌ها یافت می‌شود، که نقش مهمی در فسفوریلاسیون کراتین و سنتز کراتین‌فسفات بر عهده دارد. از آنجایی که کراتین‌فسفات نیز نقش بسزایی در سنتز مجدد مولکول پرانرژی ATP از ADP دارد (Murray *et al*., 2003). لذا افزایش سطح این آنزیم در سلول‌های ماهیچه‌ای ماهی‌های در معرض آلاینده‌های شیمیایی بعید به نظر نمی‌رسد. اما آنچه که سبب افزایش سطح کراتین‌کیناز در پلاسمای این ماهی‌ها می‌شود به آسیب‌های وارده به غشاهای زیستی این سلول‌ها و آزاد شدن آنها در خون مربوط می‌شود. از اینرو افزایش سطح فعالیت این آنزیم در پلاسما می‌تواند نشان‌دهنده بروز نارسایی‌های قلبی، دیستروفی عضلانی، نارسایی کلیوی، بروز تشنج و آسیب شدید به سیستم عصبی مرکزی باشد. به عبارتی دیگر، افزایش سطح فعالیت این آنزیم می‌تواند یک شاخص کلینیکی در تشخیص آسیب‌های وارده به فیبرهای عضلانی و یا دیگر بافت‌ها باشد (Ozawa *et al*., 1999). افزایش سطح فعالیت این آنزیم در ماهی کپور در مواجهه با غلظت‌های حاد سم بی‌فنترین[1] نیز موید همین امر است (Velisek *et al*., 2008).

آلکالین‌فسفاتاز (ALP)، آنزیمی است که در اپی‌تلیوم مجاری صفراوی، سلول‌های کبدی و نیز در مخاط روده و کلیه‌ها یافت می‌شود. در کبد این آنزیم در سلول‌های کوپفر موجود است. این سلول‌ها سیستم جمع‌آوری

1. Bifenthrin

صفراوی را می‌پوشانند. لذا سطح این آنزیم در انسداد مجاری صفراوی داخل و خارج کبدی، سیروزی و اختلالات کبدی به شدت افزایش می‌یابد (Banaee *et al*., 2008). بر اساس نتایج بدست آمده، احتمالاً آسیب‌های وارده به کبد و نیز انسداد مجاری صفراوی در ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت تیمار دیازینون یکی از مهمترین دلایل افزایش سطح فعالیت این آنزیم در خون آنها است. همچنین نکروز بافت کبد موجب آزاد شدن این آنزیم از سلول‌های آسیب دیده و در نتیجه افزایش سطح این آنزیم در خون می‌گردد (El-Sayed and Saad, 2008; Saha and Kaviraj, 2009). افزایش سطح فعالیت آنزیم آلکالین‌فسفاتاز در پلاسمای خون ماهی‌های استخوانی (*Rhamdia quelen*)، ماهی تیلاپیا (*O. niloticus*)، اشلمبو (*H. fossilis*)، ماهی تیلاپیا (*O. mossambicus*)، ماهی کپور معمولی (*C. carpio*) و ماهی سرماری (*C. punctatus*) در تماس با انواع مختلف سموم دفع آفات کشاورزی و آلاینده‌های شیمیایی، به عنوان شاخصی از آسیب وارده به بافت کبد و نیز ایجاد اختلال در عملکرد کبد این ماهی‌ها معرفی شده است (Ram and Sathyanesan, 1987; Yang and Chen, 2003; Rao, 2006; Borges *et al*., 2007; Agrahari *et al*., 2007; El-Sayed and Saad, 2008; Saha and Kaviraj, 2009).

سلول‌های کبدی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان دارای شکل ظاهری شش ضلعی با یک هسته گرد و سیتوپلاسمی یکنواخت می‌باشند. مجرای جمع‌آوری کیسه صفرا بین سلول‌های کبدی به وضوح قابل تشخیص است. از آنجایی که کبد اندام سم‌زدایی بدن و محلی برای واکنش‌های چندگانه اکسایشی و تولید حداکثر رادیکال آزاد محسوب می‌شود (Lawrence *et al*., 1977). در طی فرایند سم‌زدایی دیازینون توسط سیستم سیتوکروم P_{450} منواکسیژناز در کبد، متابولیت‌های فعال اکسیژن‌داری همچون دیاکسون[1] و پیریمیدینول[2] تولید می‌گردد، که از نظر واکنشی بسیار فعال می‌باشند (Keizer *et al*., 1995) و می‌توانند مانند دیگر رادیکال‌های آزاد و ترکیبات واکنشی اکسیژنی (ROS) عمل نمایند. پراکسیداسیون لیپیدی غشای سلول‌های کبدی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*O.mykiss*) در مواجهه با سمیت حاد دیازینون نشان‌دهنده تولید رادیکال‌های آزاد طی فرایند متابولیسم دیازینون می‌باشد (Isik and Celik, 2008). در اثر پراکسیداسیون لیپیدی غشای سلولی تخریب و فعالیت کانال‌های تنظیم یونی در سطح غشای سلولی دچار اختلال گردیده و تنظیم یونی، به ویژه کلسیم و دیگر یون‌ها موجب مهار فسفوریلاسیون اکسایشی درون سلولی می‌شود (Zaragoza *et al*., 2000). در نتیجه بر هم خوردن توان تنظیم اسمزی غشاهای زیستی و سلولی، حجم هسته و هستک‌ها افزایش می‌یابد و این امر منتج به نکروز سلول‌های کبدی می‌گردد (Ahmad *et al*., 2002; Sanz *et al*., 1998). تغییرات آسیب‌شناسی بافتی مشابهی در بافت کبد ماهی سرماری (*C. punctatus*) در مواجهه با آرسنیک گزارش شده است (Roy and Bhattacharya, 2006).

در حقیقت، در پی پراکسیداسیون لیپیدی اسیدهای چرب غیراشباع غشای سلولی، اسیدهای چرب کوتاه زنجیره‌ای با بنیان‌های R-COOH، R-OOH، R-CHO و R-OH تشکیل می‌شود که به طور جدی بر روی تراوایی غشای سلولی تأثیر می‌گذارند و به این ترتیب عملکردهای غشای سلولی نظیر فعالیت گیرنده‌های هورمونی و میانجی‌گرهای عصبی، کانال‌های انتقال یون‌ها و فعالیت آنزیم‌های غشایی و انتقال مولکول‌های خاص متأثر می‌سازد. از سویی دیگر، تشکیل مالون‌دی‌آلدهید (MAD) در طی فرایند پراکسیداسیون اسیدهای چرب واجد باندهای دوگانه می‌تواند سبب تشکیل پیوندهای کووالانسی و پلیمریزه شدن اجزای غشای سلولی می‌شود. انتشار مالون‌دی‌آلدهید به درون سلول می‌تواند زمینه واکنش آن را با بازهای نیتروژنی رشته‌های DNA فراهم نماید (Sureda *et al*., 2006; Tejada *et al*., 2007). به این ترتیب، شرایط برای بروز جهش ژنتیکی و حتی

1. Diazoxon
2. Pyrimidinol

تومورزایی در جانوران در معرض سموم فسفره آلی مهیا می‌شود. واکنش رادیکال‌های آزاد با پروتئین‌ها می‌تواند موجب بروز آسیب‌های جدی سلولی در جانوران در تماس با سموم فسفره آلی شود. رادیکال‌های آزاد سوپراکسید، هیدروکسیل و پراکسید هیدروژن می‌توانند موجب هیدروکسیلاسیون غیرآنزیمی پرولین و لیزین گردد. حساسیت پروتئین‌ها نسبت به رادیکال‌های آزاد به توالی و ترکیب اسیدهای آمینه آن و موقعیت اسیدهای آمینه حساس در توالی اسیدهای آمینه به ویژه در جایگاه فعال آنزیم‌ها بستگی دارد. به عبارتی دیگر، اسیدهای آمینه‌ای نظیر فنیل‌آلانین، میتیونین، سیستئین، هیستیدین و تریپتوفان به دلیل داشتن مولکول‌های غیر اشباع و سولفوره به شدت نسبت به رادیکال‌های آزاد به ویژه ترکیبات فعال واکنشی اکسیژن‌دار حساس و آسیب‌پذیر می‌باشند (Sureda *et al*., 2006; Tejada *et al*., 2007).

در مجموع، با توجه به تغییر فاکتورهای بیوشیمیایی خون ماهی‌های تحت تیمار دیازینون، تغییرات آسیب‌شناسی بافت کبد و تغییرات رفتاری این ماهی‌ها، اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی خون، مطالعه آسیب‌شناسی بافتی و بررسی‌های ظاهری رفتاری ماهی‌های ساکن آب‌های مشکوک به آلودگی با سموم فسفره آلی به خصوص دیازینون، می‌تواند به عنوان یک شاخص زیستی و ابزار پایش و ارزیابی سلامت اکوسیستم‌های آبی بهره گرفت. در حقیقت، وجود سموم فسفره آلی و دیگر ترکیبات شیمیایی حتی در غلظت‌های بسیار اندک می‌تواند در طولانی مدت پیامدهای نامطلوبی بر سلامت و بقای آبزیان، به ویژه ماهی‌ها درپی داشته باشد؛ که این امر از دیدگاه شیلاتی و محیط زیستی بسیار حائز اهمیت است.

References

- Agrahari, S., Pandey, K.C., Gopal, K., 2007. Biochemical alteration induced by monocrotophos in the blood plasma of fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88, 268-272.
- Ahmad, A., Pillai, K.K., Najmi, A.K., Pal, S.N., 2002. Evaluation of hepatoprotective potential of jigrine post-treatment against thioacetamide induced hepatic damage. *Journalof Ethnopharmacology*, 79 35-41.
- Arjmandi, R., Tavakol, M., Shayeghi, M., 2010. Determination of organophosphorus insecticide residues in the rice paddies. *International Journal of Environmental Science Technology*, 7(1), 175-182.
- Aydın, R., Köprücü, K., 2005. Acute toxicity of diazinon on the common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos and larvae. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 82, 220-225.
- Bagheri, F., 2007. Study of pesticide residues (Diazinon, Azinphosmethyl) in the rivers of Golestan province (GorganRoud and Gharehsou), M.Sc. Thesis, Tehran University of Medical Science. Tehran, Iran. (In Persian)
- Banaee, M., 2010. Influence of silymarin in decline of sub-lethal diazinon-induced oxidative stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Ph.D. Thesis, Aquaculture and Environmental Department, Natural Resource Faculty, Natural Resource and Agriculture Collage, Tehran University, Iran, 149 pp.
- Banaee, M., Mirvaghefei, A.R., Rafiee, G.R., Mojazi Amiri, B., 2008. Effect of sublethal diazinon concentrations on blood plasma biochemistry. *International Journal of Environmenalt Research*, 2(2), 189-198.
- Banaee, M., 2006. Sub-lethal toxicity effects of diazinon on hematology and biochemical parameters and histology of kidney and spleen in common carp (*Cyprinus carpio*). M.Sc. Thesis, Tehran University, Natural Resource Faculty, Fishery and Environmental Department. Tehran, Iran. (In Persian)
- Banaee, M., Mirvaghefi, A.R., Ahmadi, K., Banaee, S., 2008. Acute toxic effects of diazinon on hematology and biochemical parameters in common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Marine Science and Technology*, Azad University, Tehran North Unit. P.1-10.
- Banks, K.E., Hunter, D.H., Wachal, D.J., 2005. Diazinon in surface waters before and after a federally-mandated ban. *Science of the Total Environment*, 350, 86– 93. Doi:10.1016/j.scitotenv.2005.01.017.
- Bano, Y., 1985. Sublethal stress of DDT on biochemical composition of catfish *Clarias batrachus* L. *International Journal of Environmental Health*, 27(3), 230–236
- Bhattacharya, H., Xiao, Q., Lun, L., 2008. Toxicity studies of nonylphenol on rosy barb (*Puntius conchonious*): A Biochemical and Histopathological Evaluation. *Tissue and Cell*, 40, 243-249.

- Borges, A., Scotti, L.V., Siqueira, D.R., Zanini, R., Amaral, F.do., Jurinitz, D.F., Wassermann, G.F., 2007. Changes in hematological and serum biochemical values in jundia *Rhamdia quelen* due to sub-lethal toxicity of cypermethrin. *Chemosphere*, 69, 920–926.
- Burkepile, D.E., Moore, M.T., Holland, M.M., 2000. The susceptibility of five non-target organisms to aqueous diazinon exposure. Bull. Environ. Contam. *Toxicol*, 64, 114–121.
- Calcutt, N.A., 2002. Potential mechanisms of neuropathic pain in diabetes. *International Review Neurobiology*, 50, 205-228.
- Çalta, M., Ural, M.Ş., 2004. Acute toxicity of the synthetic pyrethroid deltamethrin to young mirror carp, *Cyprinus carpio*, Fresenius Environmental Bulletin, 13(11a), 1179–1183.
- Chithra, V., Leelamma, S., 1999. *Coriandrum sativum* changes the levels of lipid peroxides and activity of antioxidant enzymes in experimental animals. *Indian Journal of Biochemistry Biophysiology*, 36, 59-61.
- Das, B.K., Mukherjee, S.C., 2003. Toxicity of cypermethrin in Labeo rohita fingerlings: biochemical, enzymatic and haematological consequences. Comparative Biochemistry Physiology. Part (C). *Toxicology Pharmacology*, 134, 109-121.
- Dickmeis, T., Rastegar, S., Aanstad, P., Clark, M., Fischer, N., Plessy, C., Rosa, F., Vladimir Korzh, V., Strähle, U., 2001. Expression of brain subtype creatine kinase in the zebrafish embryo. *Mechanisms of Development*, 109, 409-412.
- Dutta, H. M., Arends, D., 2003. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. *Environmental Research*, 91, 157–162.
- El-Sayed, Y.S., Saad, T.T., 2008. Sub-acute intoxication of a deltamethrin-based preparation (Butox 5% EC) in monosex Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 102, 293–299.
- Ganji, F. K., Arvand, M., 2002. Histology practical. University of Medical Sciences and Health Services Mashhad. ISBN 7 - 08 - 5627 - 964, p 15-19.
- Goel, K.A., Garg, V., 1980. 2, 4-Diamino 3-amino azo benzene 'DAAB' induced haematobiochemical anomalies in Channa punctatus. Bulletin Environmental Contamination Toxicology, 25, 469–476
- Gonga, H.Y., Wua, J.L., Huanga, W.T., Lina, C.J.F., Weng, C.F., 2004. Response to acute changes in salinity of two different muscle type creatine kinase isoforms, from euryhaline teleost (*Oreochromis mossambicus*) gills. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA), General Subjects*, 1675, 184-191.
- Grzyb, K., Skorkowski, E.F., 2005. Characterization of creatine kinase isoforms in herring (*Clupea harengus*) skeletal muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology* Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 10, 629-634.
- Haagensen, L., Jensen, D.H., Gesser, H., 2008. Dependence of myosin-ATPase on structure bound creatine kinase in cardiac my fibrils from rainbow trout and freshwater turtle. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part A 150, 404-409.
- Honarpajouh, K., 2003. Study and Identification of OP pesticides residues (Azinphosmethyl and Diazinon) in the Mahabad and Siminerood Rivers, M.Sc. Thesis, Tehran University of Medical Science. Tehran, Iran. (In Persian).
- Husain, K., Ansari, R.A., Gupta, P.K., 1987. Effect of subchronic exposure of malathion on blood and tissue enzyme activities in female rats. *Journal of Environmental Biology*, 8(2), 137–142.
- Isik, I., Celik, I., 2008. Acute effects of methyl parathion and diazinon as inducers for oxidative stress on certain biomarkers in various tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Pesticide Biochemistry and Physiology, 92, 38–42.
- John, P.J., 2007. Alteration of certain blood parameters of freshwater teleost *Mystus vittatus* after chronic exposure to Metasystox and Sevin. *Fish Physiology Biochemistry*, 33, 15-20.
- Keizer, J., D'Agostino, G., Nagel, R., Volpe, T., Gnemid, P., Vittozzi, L., 1995. Enzymological differences of AChE and diazinon hepatic metabolism: correlation of in vitro data with the selective toxicity of diazinon to fish species. *The Science of the Total Environment*, 171, 213-220.
- Khara, H., Salar Amoli, J., Mazloumi, H., Nezami, Sh.A., Zolfinezhad, K., Khodaparast, S.H., Hasan, J., Akbarzadeh, A., Mohammadi, S., Gholipour, S., Ahmadinezhad, M., Gholipour, Z., Taghizadeh, M., 2008. Survey and Seasonal measurement of pesticide (Hinosan, Machete and Diazinon) in water of Oshmak river (east of Guilan). *Journal of Biology Science*, 2 (1), 29-43.

- Khazaei, H., Khorasani, N., Talebi, Kh., Ehtesami, M., 2010. Investigation of the groundwater contamination due to the use of diazinon insecticide in Mazandaran province (case study: Mahmoud Abad city). *Journal of Natural Environment* (Iranian Journal of Natural Resources), 63(1), 23-32.
- Köprücü, S. Ş., Köprücü, K., Ural, M. Ş., İspir, Ü., Pala, M., 2006. Acute toxicity of organophosphorous pesticide diazinon and its effects on behavior and some hematological parameters of fingerling European catfish (*Silurus glanis* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 86, 99–105.
- Martin, Jr, L.K., Black, M.C., 1998. Biomarker assessment of the effects of coal-strip mine contamination on channel catfish. *Ecotoxicology and Enviromental Safety*, 41, 307–320.
- Moses, M., 1993. Farmworkers and Pesticides. In Robert D. Bullard (Ed). Confronting Environmental Racism: Voices from the Grassroots. Boston, MA: South End Press. Pp.161-178.
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W., 2003. Harper's Illustrated Biochemistry, Twenty-Sixth Edition; Lange Medical Books/McGraw-Hill (Medical Publishing Division). New York, 402 Page.
- Nouri, J., Arjmandi, R., Bayat, H., 2000. Ecological investigation of application of pesticides in rice fields. *Iranian Journal of Public Health*, 29 (1-4), 137-146.
- Omkar, V.B., Padhyay, V., Shukla, G.S., 1984. Endosulfan induced changes in the carbohydrate metabolism of a freshwater prawn, Macrobranchium lemerrii. *Current Science*, 53(5), 280–281.
- Ozawa, E., Hagiwara Y., Yoshida, M., 1999. Creatine kinase, cell membrane and Duchenne muscular dystrophy. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 190, 143-151.
- Palanivelu, V., Vijayavel, K., Ezhilarasibalasubramanian, S., Balasubramanian, M.P., 2005. Influence of insecticidal derivative (Cartap Hydrochloride) from the marine polychaete on certain enzyme systems of the freshwater fish *Oreochromis mossambicus*, *Journal of Environmental Biology*, 26, 191–196.
- Petrović, S., Ozretić, B., Krajnović-Oaretić, M., 1996. Cytosolic Aspartate Aminotransferase from grey mullet (*Mugil auratus* Risso) Red Muscle: Isolation and Properties. *International Journal of Biochemchemistry Cell Biology*, 28(8), 873-881.
- Petrovic, S., Ozretic, B., Krajnovic-Ozretic, M., 1996. Cytosolic aspartate aminotransferase from grey mullet (*Mugil auratus* Risso) red muscle: Isolation and properties. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 28(2), 873-881.
- Ram, N.R., Sathyanesan, A.G., 1987. Histopathological and biochemical changes in the liver of a teleost Wsh, *Channa punctatus* (Bloch) induced by a mercurial fungicide. *Environmental Pollution*, 47, 135–145.
- Rao, J.V., 2006. Toxic effects of novel organophosphorus insecticide (RPR-V) on certain biochemical parameters of euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology,* 86, 78-84.
- Roy, S., Bhattacharya, S., 2006. Arsenic-induced histopathology and synthesis of stress proteins in liver and kidney of *Channa punctatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65, 218-229.
- Saha, S., Kaviraj, A., 2009. Effects of cypermethrin on some biochemical parameters and its amelioration through dietary supplementation of ascorbic acid in freshwater catfish Heteropneustes fossilis. *Chemosphere*, 74, 1254-1259.
- Saha, S., Kaviraj, A., 2003. Acute toxicity synthetic pyrethroid cypermethrin freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis* (Block), *International Journal of Toxicology,* 22, 325–328.
- Sanz, N., Fernandez, C.D., Simon, L. F., Alvarez, A., Cascales, M., 1998. Necrogenic and regenerative responses of liver newly weaned rats against a sublethal dise of thioacetamide. Biochemica et Biophysica Acta., 1384, 66-78.
- Sastry, K.V., Sharma, K., 1980. Effects of mercuric chloride on the activities of brain enzymes in a freshwater teleost *Ophiocephalus* (Channa) *punctatus*, Archives of *Environmental Contamination and Toxicology*, 9, 425–430.
- Schwindt, A.R., Truelove, N., Schreck, C.B., Fournie, J.W., Landers, D.H., Kent, M.L., 2006. Quantitative evalution of macrophage aggregates in brook trout Salvelinus fontinalis and rainbow trout Oncrohyncus mykiss. *Dis Aquat Organ*., 30, 68 (2), 101-113.
- Shanmugam, S., Sathish Kumar, T., Panneer Selvqam, K., 2010. Laboratory Handbook on Biochemistry. Published by Asoke K. Ghosh, PHI Learning Private Limited, M-97New Delhi-110001. 141 page.
- Shayeghi, M., Darabi, H., Abtahi, H., Sadeghi, M., Pakbaz, F., Golestaneh, S.R., 2007. Assessment of

Persistence and Residue of Diazinon and Malathion in Three Rivers (Mond, Shahpour and Dalaky) of Bushehr Province; 2004-2005. *Iranian South Medical Journals*, 10(1), 54-60. (In Persian)
- Shayeghi, M., Shahtaheri, S.J., Selseleh, M., 2001. Phosphorous insecticides residues in Mazandaran River Waters, Iran, *Iranian Journal of Public Health*, 30(1), 115-118. (In Persian)
- Shih, T.M., McDonough, J.H., 1997. Neurochemical mechanisms in soman-induced seizures. *Journal of Applied Toxicology*, 17, 255-264.
- Sohrabi, T., Hosseini, A., Talebi, Kh., 2001. Tailwater Quality Changes in the Rice-Paddies of Guilan and Foumanat. L. Science & Technology of Agriculture & Natural Resources, 5(1), Esfahan Univeresity of Technology, Esfahan, Iran.
- Song, S.B., Xu, Y., Zhou, B.S., 2006. Effects of hexachlorobenzene on antioxidant status of liver and brain of common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere*, 65, 699–706.
- Sureda, A., Box, A., Ensenat, M., Alou, E., Tauler, P., Deudero, S., Pons, A., 2006. Enzymatic antioxidant response of a labrid fish (*Coris julis*) liver to environmental caulerpenyne. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C, 144, 191-196.
- Tang, J., Cao, Y., Rose, R.L., Brimfield, A.A., Dai, D., Goldstein, J.A., Hodgson, E., 2001. Metabolism of chlorpyrifos by human cytochrome P450 isoforms and human, mouse, and rat liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*, 29, 1201–1204.
- Tarahi Tabrizi, S., 2001. Study of pesticide residues (diazinon, malathion, metasytoux) in the Tabriz Nahand River. M.Sc. Thesis, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran. (In Persian)
- Tavakol, M., 2007. Environmental impact assessment of diazinon in rice fields (a Case Study on Amol Township Rice Fields), M.Sc. Thesis, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. (In Persian)
- Tejada, S., Sureda, A., Roca, C., Gamundí, A., Esteban, S., 2007. Antioxidant response and oxidative damage in brain cortex after high dose of pilocarpine. *Brain Research Bulletin*, 71, 372–375.
- Tuovinen, K., 2004. Organophosphate-induced convulsions and prevention of neuropathological damages. *Toxicology*, 196, 31-39.
- Tyagi, S.K., 1984. Azodyes toxicity on a few tissues of an Indian teleost fish heteropneustus fossilis. PhD thesis, Meerut University, Meerut.
- U.S. EPA., 2005. Aquatic life ambient water quality criteria Diazinon Final. Office of Science and Thechnology Whashington, DC. (CAS Registry Number 333-41-5): 1-85.
- Üner, N., Oruç, E.Ö., Sevgiler, Y., Şahin, N., Durmaz, H., Usta, D., 2006. Effects of diazinon on acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain of *Oreochromis niloticus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 21, 241–245.
- Vale, J.A., 1998. Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus OP insecticide poisoning. *Toxicology Letters*, 64(9), 102–103.
- Van der, R.O., Jonny, B., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment, a review, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13, 57–149.
- Velisek, J., Dobsikova, R., Svobodova, Z., Modra, H., Luskova, V., 2006. Effect of deltamethrin on the biochemical profile of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Bulletin Environmental Contamination Toxicology*, 76, 992-998.
- Velisek, J., Svobodova, Z., Machova, J., 2008. Effects of bifenthrin on some haematological, biochemical and histopathological parameters of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 35, 583-590.
- Viran, R., Erkoç, F.Ö., Polat, H. and Koçak, Ö., 2003. Investigation of acute toxicity of deltamethrin on guppies (*Poecilia eticulate*), *Ecotoxicol Environmtal Safety*, 55, 82–85.
- Zaragoza, A., Andres, D., Sarrion, D., Cascales, M., 2000. Potentiation of thioacetamide hepatotoxicity by phenobarbital pretreatment in rats, inducibility of FAD monooxygenase system and age effect. *Chemico Biological International*, 124, 87-101.

Blood Biochemical and Liver Histopathological Changes in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Following Exposure to Sub-Lethal Concentrations of Diazinon

M. Banaee[1], A. R. Mirvaghefi[2]*, A. Sureda[3], G. R. Rafiee[2] and K. Ahmadi[4]

[1] Department of Aquaculture, Faculty of Natural Resource, Behbahan Khatam Al-anbia University of Technology, Iran

[2] Department of Aquaculture, Faculty of Natural Resource, University of Tehran, Karaj, Iran

[3] Department of Biology Science**,** Balearic Islands University, Illes Balears, Spain

[4] Department of Aquaculture**,** Islamic Azad University, Tehran, Iran and Membrane of Yung Club Research

(Received: 29-11-2011 – Accepted: 08-04-2012)

Abstract

Pesticides are one of the most pollutants in aquatic ecosystems. Monitoring of aquatic pollution with these compounds is very important. Therefore, health status of aquatic animals can be used as a bio-indicator for pollution monitoring in surface waters. Diazinon is an organophosphorous pesticide, which is found in the aquatic environment of Iran. The concern has arisen over the ability of this compound to affect the health of fish in recent years. In this study, the effects of exposure to sub-lethal concentrations of diazinon on some biochemical parameters of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* were examined after 7, 14 and 28 days. Acetylcholinesterase (ACEh) activity and the levels of total protein, albumin as well as globulin in plasma were significantly reduced at 0.1 and 0.2 mg/L concentrations tested (p<0.05). Creatine kinase (CK) activity was significantly lower in 0.1 mg/L diazinon group at 14th and 28th sampling periods, whereas its activity significantly increased in fishes exposed to 0.2 mg/L diazinon only on 7th day (p<0.05). Aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) activities and glucose levels in diazinon treated groups were significantly higher than the controlled group at experimental periods (p<0.05). Alkaline phosphatase (ALP) activity only significantly increased after 14 days in both diazinon treatments (p<0.05). The hypertrophy of hepatocytes, the vacuolization of cell cytoplasm, as well as hepatocyte cloudy swelling were observed in liver tissue of fish exposed to both concentrations of diazinon. Therefore, measurement of biochemical markers and liver tissue pathology studies are proposed as simple and suitable tools for assessing pesticide effects on fish.

Keywords: Sub-lethal concentration of Diazinon, Biochemical parameters, Histopathological changes, Acetylcholinesterase, Rainbow trout

*Corresponding author: Tel: +982632223055 Fax: +982632245908 E-mail: avaghefi@ut.ac.ir