بهره‌برداری و پرورش آبزیان
جلد دوم، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۲
http://japu.gau.ac.ir

تأثیر ۴، ۲– دی‌کلروفنوکسی‌استیک اسید (2,4-D) بر برخی پارامترهای بیوشیمیایی و آسیب‌شناسی بافتی در آبشش و کبد ماهی مولی (*Poecilia sphenops*)

***مهدی بنایی[۱]، احسان کیهانی[۲] و کمال احمدی[۳]**

[۱]استادیار گروه شیلات، دانشگاه صنعتی خاتم‌الانبیاء (ص) بهبهان، [۲]دانش‌آموخته کارشناسی شیلات، دانشگاه صنعتی خاتم‌الانبیاء (ص) بهبهان، [۳]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد شیلات و عضو باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/٦/۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۲۳

چکیده

علف‌کش فنوکس، ٤،۲– دی‌کلروفنوکسی‌استات اسید (توفوردی)، یکی از شناخته شده‌ترین علف‌کش‌هایی است که از آن برای کنترل گیاهان هرز خشکی‌زی و گیاهان آبزی استفاده می‌شود. تماس طولانی مدّت با این سم به‌طور بالقوه می‌تواند موجب بروز صدماتی به سلامت ماهی‌ها به‌عنوان موجودات زنده غیرهدف گردد. بنابراین، در این مطالعه، تأثیر سمیت زیر کشنده توفوردی (۰/۰، ۰/۷، ۱/٤ و ۲/۸ میلی‌گرم توفوردی معادل ۰، ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد از مقدار عددی غلظت کشنده (LC_{50} ۹٦ ساعته) توفوردی برای ماهی مولی) بر تغییرات بیوشیمیایی و آسیب‌شناسی بافت آبشش و کبد ماهی مولی (*Poecilia sphenops*)، پس از گذشت ۱۵ روز مورد مطالعه قرار گرفت. تغییرات معنی‌داری در تمامی فاکتورهای بیوشیمیایی متناسب با غلظت سم مشاهده شد. کاهش فعالیت آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آلکالین فسفاتاز (ALP) در بافت آبشش و کبد نشان‌دهنده بروز آسیب‌های پاتولوژیک در بافت آبشش و کبد است. در ماهی‌های تحت تیمار توفوردی به‌طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) کاهش[۱] یافت، در حالی‌که فعالیت این آنزیم در کبد ماهی‌های تحت تیمار ۲/۸ میلی‌گرم بر لیتر توفوردی به‌طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) افزایش یافت. تغییرات آسیب‌شناسی در بافت‌های آبشش و کبد ماهی‌های تحت

*مسئول مکاتبه: mahdibanaee@yahoo.com

تیمار غلظت‌های مختلف توفوردی، مشاهده شد که شامل هیپرتروفی اپیتلیال، افزایش اپیتلیوم تیغه‌های آبششی، و بهم چسبیدن تیغه‌های ثانویه آبششی و نیز هیپرتروفی سلول‌های کبدی، تورم ابری و شکل‌گیری واکول‌های سیتوپلاسمی در بافت کبد ماهی‌های تحت تیمار غلظت‌های ۱/٤ و ۲/۸ میلی‌گرم بر لیتر توفوردی است. این نتایج نشان می‌دهد که مطالعات بافت‌شناسی و تجزیه و تحلیل فاکتورهای بیوشیمیایی در بافت‌های مختلف ماهی‌ها ممکن است ابزار مناسبی در پایش زیستی محیط‌زیست باشد.

واژه‌های کلیدی: علف‌کش فنوکسی، ماهی مولی، آسیب‌شناسی بافتی، فاکتورهای بیوشیمیایی

مقدمه

علف‌کش‌های متعددی با نحوه عمل مختلف بیش از ۳۵ سال است که در مزارع کشاورزی ایران به فراوانی مورد استفاده قرار می‌گیرند. براساس آمارنامه وزارت جهاد کشاورزی در سال ۱۳۸۷ بیش از ۲۵۳۷۳۷۱ لیتر بر کیلوگرم انواع علف‌کش در بین کشاورزان توزیع شده است. در میان علف‌کش‌های مورد استفاده در ایران، ترکیبات فنوکسی نظیر ۲،٤- دی‌کلروفنوکسی استیک اسید (2,4-D)، ۲،٤،۵- تری‌کلروفنوکسی استیک اسید (2,4,5-T) و مشتقات آن‌ها از اهمیّت به‌سزایی برخوردارند و به وفور در مزارع کشاورزی، به‌ویژه غلات استفاده می‌شود. در این میان، علف‌کش 2,4-D یکی از مهمترین علف‌کش‌های ارزان قیمتی است که در بسیاری از نقاط جهان مورد استفاده قرار می‌گیرد (واچوپ و همکاران، ۱۹۹۲). این علف‌کش به‌طور معمول از طریق ممانعت از سنتز و ترشح هورمون‌های رشد یا اتوکسین‌ها در گیاهان عمل می‌کند. به‌عبارتی دیگر این علف‌کش دارای خصوصیّاتی مشابه به هورمون‌های طبیعی گیاهان می‌باشند و این خصوصیّت سبب شده تا تمایل به مصرف این علف‌کش جهت مهار علف‌های هرز خشکزی و آبزی، به‌ویژه جهت مهار علف‌های هرز مزارع نیشکر افزایش یابد (اورک و همکاران، ۲۰۰٤). با این وجود در بسیاری از موارد به‌منظور افزایش سطح کارایی سم‌پاشی، علف‌کش توفوردی به‌صورت توام با دیگر سموم نظیر ام‌سی‌پی‌آ، دای‌کامبا، پیکلورام و نیز دایوران جهت کنترل گونه‌های مختلف گیاهان هرز مورد استفاده قرار می‌گیرد (موسوی و همکاران، ۲۰۰۰).

علف‌کش توفوردی به‌دلیل ظرفیت جذب پایین، ماندگاری زیاد و حلالیت بالا می‌تواند در خاک نفوذ کند و به آب‌های زیرزمینی راه یابد (بابازاده و جابلی، ۲۰۰۳). نصرتی و همکاران (۲۰۰۷) توانستند با ردیابی بقایای علف‌کش 2,4-D در عمق ۱۵ تا ۲۰ سانتی‌متری خاک مزارع کشاورزی مناطق مختلف، پس از گذشت پنج ماه تا یک سال از سم‌پاشی نشان دهند که این سم ممکن است از طریق زهکش مزارع کشاورزی به سهولت از سطح خاک به لایه‌های زیرین نفوذ نماید. همچنین، آبشویی لایه‌های سطحی خاک و یا زهکش مزارع ممکن است زمینه نفوذ این علف‌کش به آب‌های سطحی و زیرزمینی نزدیک مزارع کشاورزی را فراهم سازد (لوسیتی و همکاران، ۲۰۰۶). البته به‌کارگیری این علف‌کش در کنترل گیاهان آبزی نیز یکی دیگر مسیرهای ورود این سم به بوم‌سازگان‌های آبی است (لوسیتی و همکاران، ۲۰۰۶). در مطالعات صورت گرفته بر روی آب آشامیدنی برداشت شده از برخی چاه‌های اطراف واشنگتن در ایالات‌متحده، میزان این سم بیش از سطح استاندارد تعریف شده توسط سازمان محیط‌زیست ایالات‌متحده گزارش شده است، به نحوی‌که وزارت بهداشت آمریکا، مصرف این آب‌ها را ممنوع اعلام کرد (الیزابت و همکاران، ۲۰۰۰؛ دوف، ۲۰۰۰). آلودگی آب به مواد سمی مانند علف‌کش‌ها ممکن است موجب ایجاد تغییراتی در سطح مولکولی، سلولی و ژنتیکی ارگانیسم‌های مختلف آبزی یا دیگر گونه‌هایی که از این آب‌های آلوده استفاده می‌کنند، گردد (تانگوی و همکاران، ۲۰۰۵؛ آماندو و همکاران، ۲۰۰۶). جهش‌زایی و سرطان‌زایی (هارتج و همکاران، ۲۰۰۵)، بروز اختلالات مادرزادی (دبیری، ۲۰۰۱)، شیوع سرطان بیضه در سگ‌ها (روتچل و همکاران، ۲۰۰۱)، افزایش جهش‌های ژنتیکی مرگ‌آور در حلزون‌های *Biomphalaria glabrata* ساکن آب‌های آلوده به توفوردی (گری و همکاران، ۱۹۹۶؛ استیوام و همکاران، ۲۰۰۶)، اختلالات کروموزومی، نازایی، نقص عضو و همچنین افزایش سطح ناقص الخلقگی مادرزایی در میان فرزندان کشاورزانی که با این علف‌کش تماس مستقیم داشتند (گری و همکاران، ۱۹۹۶؛ آمر و آلی، ۲۰۰۱). اگر چه این علف‌کش اغلب در غلظت‌های پایین برای ماهی‌ها غیرسمی است (گالاگر و دی گیولیو، ۱۹۹۱). اما، تأثیر غلظت‌های زیرکشنده این سموم در طولانی مدت می‌تواند قابل توجه باشد (کاتانئو و همکاران، ۲۰۰۸). تغییر فاکتورهای بیوشیمیایی و نیز تغییرات آسیب‌شناسی بافتی در گربه ماهی (*Rhamdia queleri*)، (کاتانئو و همکاران، ۲۰۰۸)، ماهی آب شیرین (*Leporinus obtusidens*)، (موراز و همکاران، ۲۰۰۷؛ دافونسکا و همکاران، ۲۰۰۸) در تماس با سم توفوردی، کاهش نرخ رشد (آلوارز و فوی‌مان، ۲۰۰۵)، کاهش توان زادآوری و اختلالات

تولیدمثلی (تیلر و همکاران، ۱۹۹۸)، تضعیف سیستم ایمنی (فاتیما و همکاران، ۲۰۰۰؛ ۲۰۰۱) و در نهایت کاهش شانس بقا و زنده‌مانی در شرایط نامساعد محیطی از مهمترین پیامدهایی است که در ماهی‌های ساکن آب‌های آلوده به سموم شیمیایی گزارش شده است.

استفاده از مدل‌های جانوری در پایش آلودگی‌های زیست‌محیطی و بررسی اثرات بیولوژیکی سموم بر شاخص‌های سلامت مدل‌های آزمایشگاهی و جانوری، می‌تواند به‌عنوان یکی از متداول‌ترین روش‌ها در مطالعات سم‌شناسی، مورد توجه قرار گیرد. با توجه به سهولت دسترسی به گونه‌های مختلف ماهی‌های زینتی، چرخه زیستی کوتاه و سازگاری بالای برخی از این گونه‌ها به شرایط آزمایشگاهی، استفاده از این گونه‌ها در مطالعات سم‌شناسی محیطی در مقیاس آزمایشگاهی در بسیاری از کشورهای جهان رایج و متداول می‌باشد (توفت و باتروپ، ۲۰۰۳؛ کینبرگ و همکاران، ۲۰۰۳؛ وی‌ران و همکاران، ۲۰۰۳؛ ییلماز و همکاران، ۲۰۰٤؛ باتاکاریا و همکاران، ۲۰۰۸). از این رو در این مطالعه از ماهی مولی (*Poecilia sphenops*) به‌عنوان یک مدل آزمایشگاهی استفاده شده است. هدف از این مطالعه، بررسی تغییرات بیوشیمیایی و آسیب‌شناسی بافتی، بافت‌های آبشش و کبد ماهی مولی در مسمومیت تجربی با توفوردی است. زیرا ماهی مولی یکی از گونه‌های ماهی‌های زینتی در ایران است که در بسیاری از مراکز تکثیر و پرورش، در استخرهای خاکی نگهداری و تکثیر می‌گردد و با توجه به رویش گیاهان آبزی در این استخرها و استفاده از روش‌های شیمیایی جهت کنترل این گیاهان، احتمال قرار گرفتن این ماهی در معرض علف‌کش‌های شیمیایی محتمل می‌باشد.

مواد و روش‌ها

ماهی: ٤۰۰ قطعه ماهی مولی (*Poecilia sphenops*) نر و ماده با وزن متوسط ٦/٤٥±۰/۲۲ گرم و طول متوسط ۵۷/۵±۰/۷ میلی‌گرم از یک مزرعه خصوصی واقع در روستای ده‌پیاله، از توابع شیراز خریداری و به آزمایشگاه تکثیر و پرورش آبزیان دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی بهبهان انتقال داده شد. پس از انتقال، ماهی‌ها جهت سازگاری با شرایط آزمایشگاهی (۲±۲٤ درجه سانتی‌گراد دما، دوره نوری ۱٦ L/۸ D، اکسیژن ٦±۱ mg/L، pH ۷±۰/۲) در آکواریوم‌های ٦۵ لیتری توزیع گردید. در طی دوره سازگاری ماهی‌ها با جیره تجاری مخصوص ماهی‌های آکواریوم به‌صورت دو بار در روز و معادل ۲ درصد وزن بدن تغذیه شدند.

تعیین سمیت حاد و مقدار عددی LC_{50} علف‌کش 2,4-D: آزمایش تعیین سمیت حاد و مقدار عددی LC_{50} براساس دستورالعمل شماره ۲۰۳ سازمان همکاری‌های اقتصادی و توسعه[1] و به‌صورت ایستا انجام گرفت. در این مرحله از آزمایش، ۱۸۰ ماهی مولی نر و ماده، پس از سازگاری با شرایط آزمایشگاهی، به‌طور تصادفی در ۱۸ آکواریوم ٦٥ لیتری در قالب ٦ تیمار آزمایشی، هر یک با ۳ تکرار توزیع و در معرض غلظت‌های ۰/۰ (گروه کنترل)، ۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۵ و ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر سم ۲،٤- دی‌کلروفنوکسی استیک اسید (2,4-D)، تجاری با خلوص ۳٦ درصد، قرار داده شدند. در طی ۹٦ ساعت از آغاز آزمایش میزان مرگ و میر ماهی‌ها پس از گذشت ۲٤، ٤۸، ۷۲ و ۹٦ ساعت، ثبت و ماهی‌های مرده به سرعت از سیستم حذف گردید. پس از اتمام آزمایش، مقدار عددی LC50 ۲٤، ٤۸، ۷۲ و ۹٦ ساعته علف‌کش توفوردی، برای ماهی‌های مولی براساس آزمون آنالیز پروبیت (Probit Analysis test) محاسبه شد (آیدین و کوپروکو، ۲۰۰۵).

سمیت زیرکشنده علف‌کش 2,4-D: در این مرحله، ۱۲۰ ماهی مولی نر و ماده، پس از سازگاری با شرایط آزمایشگاهی، به‌طور تصادفی در ۱۲ آکواریوم ۲۵ لیتری در قالب ۳ تیمار آزمایشی و یک تیمار کنترل، هر یک با ۳ تکرار توزیع و در معرض غلظت‌های سم معادل ۱۰، ۲۰ و ٤۰ درصد مقدار سمیت ۹٦ ساعته علف‌کش 2,4-D LC_{50}، برای ماهی‌های مولی به‌مدت ۱۵ روز قرار داده شدند و پس از پایان دوره آزمایشی، از هر تیمار، ۱۲ ماهی جهت مطالعات آسیب‌شناسی بافتی، به‌طور تصادفی انتخاب و صید گردید.

فاکتورهای بیوشیمیایی بافت‌های کبد و آبشش: پس از صید ماهی‌ها و کالبدشکافی، بافت آبشش و کبد ماهی‌های هر آکواریوم به‌طور جداگانه، جدا و با محلول سرم فیزیولوژی، شستشو شد. جهت تهیه عصاره بافت کبد و آبشش، از محلول تریتون x-۱۰۰ و بافر فسفات با pH ۷/۵ به نسبت حجمی ۱ به ۱۰ استفاده گردید. پس از هموژنه کردن بافت، محلول حاصل جهت استحصال عصاره بافت در دستگاه سانتریفوژ با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه و دمای ثابت ٤ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس مایع سطحی[2] جهت سنجش فاکتورهای بیوشیمیایی جداسازی گردید. اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی عصاره بافت با استفاده از کیت‌های تهیه شده از شرکت پارس آزمون و با دستگاه اسپکتوفتومتر UV/Vis یونیکو مدل ۲۱۰۰ صورت گرفت. سطح پروتئین کل عصاره بافت

1- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) Guideline No. 203
2- Ssupernatant

براساس واکنش بایوره و در طول موج ٥٤٠ نانومتر، سطح فعالیت آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) عصاره بافت براساس مقدار مصرف NADPH و تبدیل آن به NAD^+ در طول موج ٣٤٠ نانومتر، لاکتات دهیدروژناز (LDH) عصاره بافت براساس تبدیل پیروات به لاکتات در طول موج ٣٤٠ نانومتر، آلکالین فسفاتاز (ALP) براساس تبدیل نیتروفنیل فسفات به نیتروفنول و فسفات و در طول موج ٤٠٥ نانومتر تعیین و براساس میزان جذب نوری OD و فرمول ارایه شده در دستورالعمل کیت‌ها محاسبه گردید.

بافت‌شناسی: پس از کالبد شکافی و نمونه‌برداری از بافت کبد و آبشش، نمونه‌ها در محلول بوئن به‌مدت ٤٨ ساعت قرار داده شد. تهیه بافت براساس روش ارائه شده توسط گنجی و آروند (۲۰۰۲) صورت گرفت. لام‌های تهیه شده نیز به روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین رنگ‌آمیزی و بافت‌ها با میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ٤٠ عدسی شیئی مشاهده و مورد مطالعه قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آمار: پس از محاسبه نرمال بودن داده‌ها با آزمون کولموگراف- اسمیروف Test، تجزیه و تحلیل داده‌ها به روش تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) و با استفاده از نرم‌افزار SPSS 15 انجام و مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون توکی در سطح اطمینان ۹۵ درصد (α=۰/۰۵) صورت گرفت. نتایج براساس میانگین ± انحرات معیار نشان داده شده است.

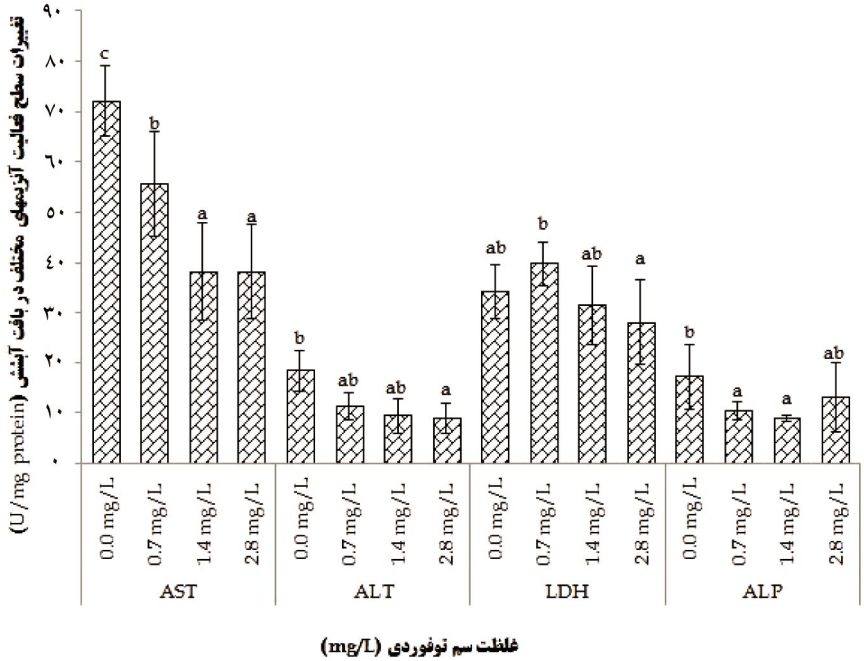
نتایج

مقدار عددی LC_{50} محاسبه شده پس از گذشت ٢٤، ٤٨، ٧٢ و ٩٦ ساعت از زمان آغاز آزمایش در جدول ۱ ارائه شده است. براساس نتایج به‌دست آمده، میزان مرگ و میر ماهی‌ها با افزایش غلظت سم توفوردی در طی آزمایش تعیین سمیت حاد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت.

سپس، ماهی‌ها در مرحله بررسی اثرات سمیت زیرکشنده توفوردی، در معرض غلظت‌های ۰/۷، ١/٤ و ۲/۸ میلی‌گرم بر لیتر توفوردی معادل ۱۰، ۲۰ و ٤٠ درصد مقدار عددی LC_{50} ٩٦ ساعته قرار داده شدند. در این مرحله، اگرچه، مرگ و میری در ماهی‌های تحت آزمایش مشاهده نگردید، اما ماهی‌ها در طول دوره آزمایش دچار سستی و رخوت شدند. تغییر الگوی رفتاری، افزایش مقدار موکوس جلدی، شنای نامتعادل و در سطح آب و همچنین تغییر الگوی رنگ بدن ماهی‌ها، به‌خصوص در مراحل پایانی آزمایش، از مهمترین تغییرات ظاهری مشاهده شده در ماهی‌های تحت تیمار غلظت ۲/۸ میلی‌گرم بر لیتر سم توفوردی است.

جدول ۱- مقدار عددی LC_{50} ۲٤، ٤۸، ۷۲ و ۹٦ ساعته توفوردی برای ماهی مولی

مدت زمان تماس با سم (براساس ساعت)	مقدار عددی LC_{50} (براساس mg/L)
۲٤	۲۱/۸٦ ± ۱/۹۱ (۱۸/٦۱-۲٦/۵۳)
٤۸	۱۷/۵۹ ± ۱/٦۱ (۱٤/۷٦-۲۱/۳۹)
۷۲	۱۳/۰۵ ± ۱/۲۷ (۱۰/۷۲-۱۵/۹۳)
۹٦	۷/۲۹ ± ۰/۵۷ (٦/۲۳-۵/۵۸)



شکل ۱- نمودار تغییرات سطح فعالیت آنزیم‌های AST، ALT، LDH و ALP در بافت آبشش ماهی مولی تحت تیمار غلظت‌های مختلف توفوردی

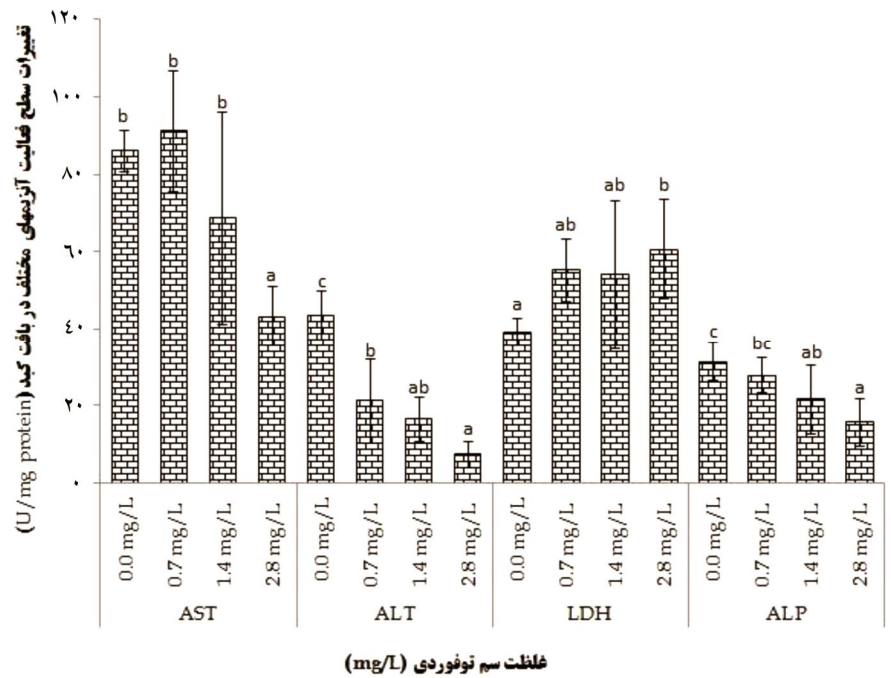
حروف انگلیسی متفاوت در هر بخش (آنزیم) بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد

داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار می‌باشد

تغییرات بیوشیمیایی صورت گرفته در بافت آبشش و کبد ماهی‌های تحت تیمار مولی گویای تأثیر این سم بر فعالیّت فاکتورهای اندازه‌گیری شده در عصاره این بافت‌ها است (شکل ۱ و ۲). کاهش معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) در بافت آبشش ماهی‌هایی که در معرض

سم توفوردی قرار داشتند، به‌طور کامل محسوس است. مواجهه ماهی‌ها با غلظت ۰/۷ و ۱/٤ میلی‌گرم نیز موجب کاهش معنی‌دار سطح فعالیت آنزیم آلانین‌آمینو ترانسفراز (ALT) در بافت آبشش گردید. اگرچه سطح فعالیت آنزیم لاکتات‌دهیدروژناز (LDH) در بافت آبشش ماهی‌های در معرض غلظت ۲/۸ میلی‌گرم در لیتر سم توفوردی در مقایسه با سطح فعالیت این آنزیم در آبشش ماهی‌های در معرض غلظت ۰/۷ میلی‌گرم در لیتر به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) کاهش یافت، اما این تغییرات در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار نیست. کاهش معنی‌داری (P<۰/۰۵) سطح فعالیت آنزیم آلکالین‌فسفاتاز (ALP) تنها در آبشش ماهی‌های تحت تیمار ۰/۷ و ۱/٤ میلی‌گرم بر لیتر علف‌کش توفوردی مشاهده گردید (شکل ۱).

تماس ماهی‌ها با غلظت ۲/۸ میلی‌گرم بر لیتر علف‌کش توفوردی، سبب کاهش (P<۰/۰۵) سطح فعالیت آنزیم آسپارتات‌آمینوترانسفراز (AST) در کبد در طی دوره آزمایش مشاهده گردید. کاهش معنی‌دار سطح فعالیت آنزیم آلانین‌آمینو ترانسفراز (ALT) در بافت کبد ماهی‌هایی که در تماس با سم توفوردی قرار داشتند از مهمترین تغییرات مشاهده شده در سطح فعالیت این آنزیم در طول دوره آزمایشی است. افزایش معنی‌دار (P<۰/۰۵) سطح فعالیت آنزیم لاکتات‌دهیدروژناز (LDH) در بافت کبد ماهی‌های در معرض ۲/۸ میلی‌گرم سم توفوردی از دیگر تغییرات مشاهده شده در طول دوره آزمایش است. کاهش معنی‌دار (P<۰/۰۵) سطح فعالیت آنزیم آلکالین‌فسفاتاز (ALP) در بافت کبد ماهی‌های در معرض غلظت ۱/٤ و ۲/۸ میلی‌گرم بر لیتر علف‌کش توفوردی بیانگر تأثیر این سم بر روی سطح این آنزیم در بافت کبد است (شکل ۲).

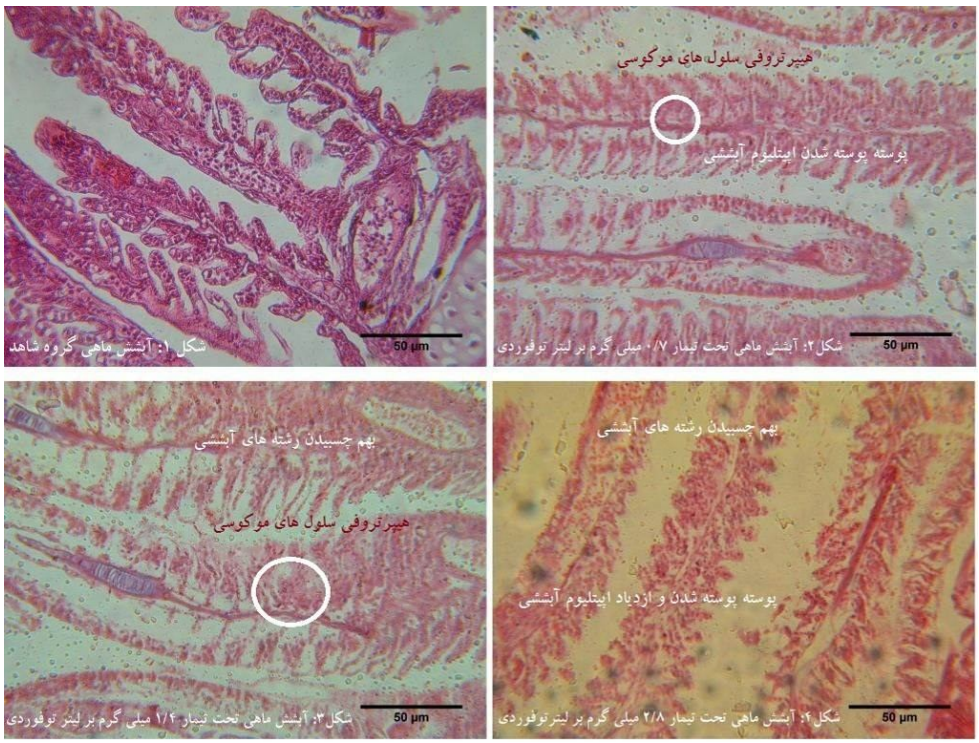


شکل ۲- نمودار تغییرات سطح فعالیت آنزیم‌های AST، ALT، LDH و ALP در بافت کبد ماهی مولی تحت تیمار غلظت‌های مختلف توفوردی

حروف انگلیسی متفاوت در هر بخش (آنزیم) بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد

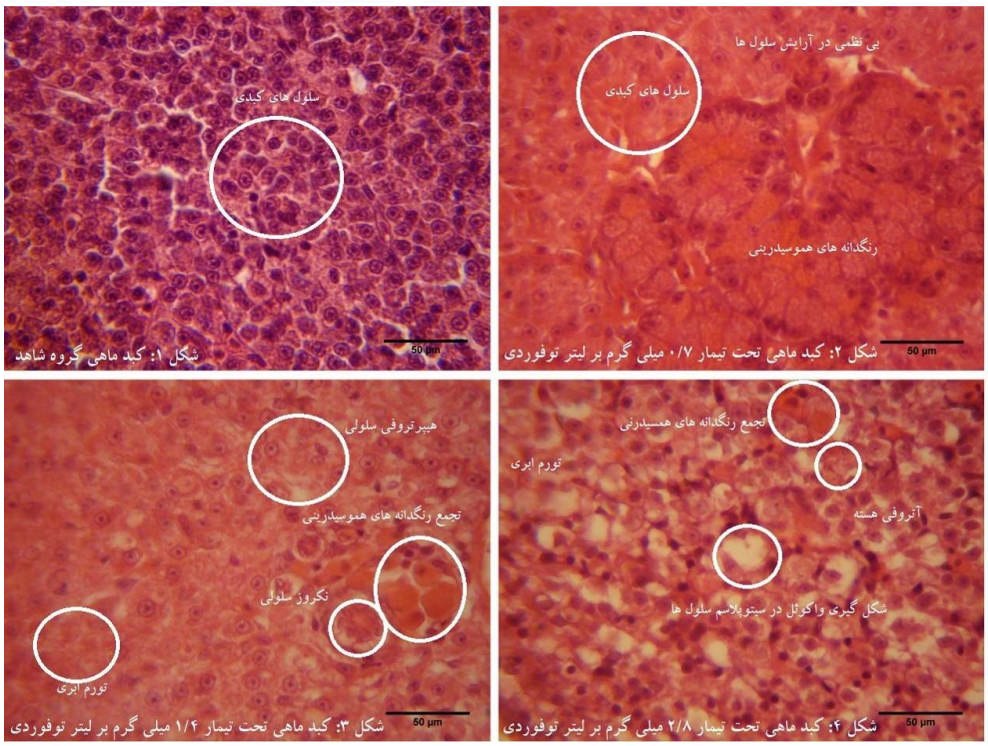
داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار می‌باشد

نتایج بافت‌شناسی بافت آبشش و کبد به‌ترتیب در شکل‌های ۳ و ٤ ارائه شده است. اگرچه مطالعه آسیب‌شناسی بافت آبششی گروه تحت تیمار سم به‌خوبی تغییرات آسیب‌شناسی را نشان می‌دهد، اما تغییری در بافت آبشش گروه کنترل مشاهده نشد. تغییرات آسیب‌شناسی بافتی، بافت آبشش ماهی‌های تحت تیمار علف‌کش توفوردی، در مقایسه با بافت آبشش ماهی‌های گروه کنترل مقایسه گردیده است. هیپرپلازی اپیتلیوم بین لاملاهای ثانویه و به‌هم‌چسبیدگی آن‌ها در بافت آبشش ماهی‌های تحت تیمار سم به‌وضوح مشخص است. تورم سلول‌های موکوسی، افزایش بیش از حد موکوس، در آبشش این ماهی‌ها می‌تواند در تنفس، تبادلات گازی و همچنین تبادلات یونی و تنظیم اسمزی آن‌ها اختلال ایجاد نماید.



شکل ۳- تغییرات آسیب‌شناسی بافت آبشش ماهی مولی تحت تیمار علف‌کش توفوردی در غلظت‌های مختلف ۰/۰ (شکل ۱)، ۰/۷ (شکل ۲)، ۱/٤ (شکل ۳) و ۲/۸ (شکل ٤) براساس میلی‌گرم بر لیتر

براساس نتایج به‌دست آمده از مطالعات آسیب‌شناسی بافت کبد می‌توان به بهم ریختگی شکل ظاهری سلول‌های کبدی، رسوب مواد سیتوپلاسمی و هسته‌ای و در نتیجه به‌هم ریختگی آرایش سلولی و شکل‌گیری واکوئل‌های سلولی در کبد ماهی‌های تحت تیمار علف‌کش توفوردی، و نیز از هم گسیختگی سینوس‌های خونی در بافت کبد، به‌ویژه در ماهی‌های تحت تیمار غلظت‌های ۱/٤ و ۲/۸ میلی‌گرم بر لیتر علف‌کش توفوردی، اشاره کرد که به‌طور کامل محسوس است. نکروز و تخریب ساختار سلول‌های کبدی در این ماهی‌ها به وضوح گویای تأثیر علف‌کش توفوردی، در تخریب غشای سلولی و در نتیجه نکروز سلول‌های کبدی است.



شکل ٤- تغییرات آسیب‌شناسی بافت کبد ماهی مولی تحت تیمار علف‌کش توفوردی در غلظت‌های مختلف ۰/۰ (شکل ۱)، ۰/۷ (شکل ۲)، ۱/٤ (شکل ۳) و ۲/۸ (شکل ٤) براساس میلی‌گرم بر لیتر

بحث

براساس نتایج حاصل از آزمایش، سمیت کشنده توفوردی، (مقدار عددی LC_{50}) پس از گذشت ٢٤، ٤٨، ٧٢ و ٩٦ ساعت به‌ترتیب برابر ۱/۹۱±۲۱/۸٦، ۱/٦۱±۱۷/۵۹، ۱/۲۷±۱۳/۰۵ و ۰/۵۷±۷/۲۹ است. البته، شدت سمیت توفوردی و متابولیت‌های آن به فرمولاسیون شیمیایی و شرایط محیطی بستگی دارد (لوسیتو و همکاران، ۲۰۰٦). شدت سمیت توفوردی به‌ویژه اشکال اسیدی و نمک‌های آمینی برای ماهی‌ها بسیار ناچیز می‌باشد (۸۰/۲٤ تا ۲۲٤٤ میلی‌گرم در لیتر)؛ اما فرم استری توفوردی کم و بیش برای ماهی‌های آب شیرین و شور سمی و خطرناک (۰/۱۵٦٤ تا ۱٤/۵ میلی‌گرم در لیتر) می‌باشد (زند و همکاران، ۲۰۰۸). مقدار عددی LC_{50} ۹٦ ساعته علف‌کش توفوردی بدون اشاره به نوع فرمولاسیون سم، برای ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، قزل‌آلای گلو

بریده (*O.clarki*)، قزل‌آلای دریاچه‌ای، ماهی قنات (*Cyprinodon variegates*)، ماهی آبشش آبی، گربه‌ماهی روگاهی (*Ictalurus punctatus*)، به‌ترتیب ۲، ٦/٤ تا ۷۲، ٤/٥ تا ۳۵، ۱۸ تا ۲۵، ۱/۲ و ۱۵/۵ میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد (جونسون و فین‌لی، ۱۹۸۰).

با توجه به مقدار عددی LC_{50} ۹٦ ساعته علف‌کش توفوردی، غلظت زیرکشنده توفوردی، جهت انجام آزمایش نهایی برابر ۰/۷، ۱/٤ و ۲/۸ میلی‌گرم بر لیتر توفوردی در نظر گرفته شد. در طی مدتی که ماهی‌ها در معرض غلظت‌های مذکور قرار داشتند، مرگ و میری در ماهی‌ها مشاهده نشد. اما بروز تغییرات رفتاری به وضوح در ماهی‌های تحت تیمار توفوردی، به‌خصوص در غلظت ۲/۸ میلی‌گرم مشاهده گردید. مشابه این تغییرات رفتارها در ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O.mykiss*) (بنایی و همکاران، ۲۰۱۱)، گوپی (*P.eticulate*)، (وی‌ران و همکاران، ۲۰۰۳)، گربه ماهی اروپایی، (*Silurus glanis*)، (کوپروکو و همکاران، ۲۰۰٦)، اسبله، (*Heteropneustes fossilis*)، (ساها و کاویراج، ۲۰۰۳) کپور (*C.carpio*) (بنایی و همکاران، ۲۰۰۸) که در معرض آفت‌کش‌های مختلف قرار داشته‌اند، نیز گزارش شده است (بنایی، ۲۰۱۲). توفوردی می‌تواند به راحتی از سد دیواره مویرگی بافت عصبی مرکزی عبور نماید (بونجیووانی و همکاران، ۲۰۱۱) و حتی بر سطح یون‌های فلزی، میانجی‌گرهای عصبی، به‌ویژه کاتکول‌آمین‌ها اثر گذارد و نیز موجب برهم زدن تعادل اکسیداتیو سلولی، پراکسیداسیون لیپیدی و بروز آسیب‌های اکسیداتیو در سیستم عصبی موجودات زنده (امریت و همکاران، ۲۰۰٤) شود، که همین امر می‌تواند سبب بروز چنین تغییرات رفتاری در این ماهی‌ها گردد.

آبشش ماهی‌ها یکی از مسیرهای اولیه ورود آفت‌کش‌ها به بدن ماهی‌ها است، بنابراین بروز اختلالات تنفسی و تنظیم اسمزی، اولین واکنش ماهی‌ها در مواجهه با عوامل آلاینده زیست‌محیطی است. آسیب بافت‌شناسی در آبشش ماهی‌های گروه کنترل مشاهده نگردید. هیپرتروفی سلولی، گرزی شکل شدن و بهم چسبیدن تیغه‌های آبششی، نکروز بافت پوششی آبششی، افزایش سطح ترشح موکوس از مهمترین تغییرات مشاهده شده در بافت آبشش ماهی‌هایی است که در معرض توفوردی قرار داشته‌اند. با برخی از پراکسیداسیون لیپیدی فسفولیپیدهای غشای سلولی، و نیز ترکیب شدن متابولیت‌های توفوردی با این مولکول‌ها، سبب بروز اختلالات فیزیولوژیکی در عملکرد غشای سلولی و نکروز سلولی می‌شوند (داچنوویز و همکاران، ۲۰۰۲؛ بوکووسک، ۲۰۰٦). افزایش ترشحات موکوسی، نکروز، پوسته‌پوسته و کوتاه شدن و بهم چسبیدن رشته‌های آبششی، نکروز و تخریب کاملاً تیغه‌های آبششی، هیپرتروفی و هیپرپلازی اپیتلیوم آبششی، بروز ادم، افزایش واکوئله شدن و

بهم‌ریختگی در ظاهر تیغه‌های آبششی در ماهی گوپی (*Poecilia reticulate*)، ماهی گوپی معمولی (*Lebistes reticulatus*) و ماهی گامبوزیا (*Gambusia affinis*) به‌ترتیب در تماس با سیفون‌ترین، کلورفیریفوس، سیپرمترین و دلتامترین دیده شد (ارکمن و همکاران، ۲۰۰۰؛ دیی سلییوا و ساماییاواردهانا، ۲۰۰۲؛ کالیس‌کان و همکاران، ۲۰۰۳؛ کنگییز و اونلو، ۲۰۰٦). مشابه این تغییرات به وسیله دیگر پژوهشگران نیز گزارش شده است (کنگییز و اونلو، ۲۰۰۲؛ ۲۰۰۳؛ بنایی و همکاران، ۲۰۱۱).

کبد، در فرایند سم‌زدایی و حذف سموم و متابولیت‌ها از بدن جانوران و همچنین در گلوکونئوژنز، سنتز و اکسیداسیون اسیدهای چرب نقش مهمی ایفا می‌کند. بنابراین، آسیب وارده به بافت کبد می‌تواند به بروز اختلالات شدید فیزیولوژیکی و متابولیکی منجر شود. اگرچه تغییرات آسیب‌شناسی در بافت کبد ماهی‌های گروه کنترل مشاهده نگردید. خون‌ریزی و افزایش اندازه کبد، تورم سلولی، دانه‌دار و ابری شدن سیتوپلاسم، شکل‌گیری واکوئل‌ها و تجمع چربی در ساختار بافت همراه با آتروفی و پیکنوزه شدن هسته در سلول‌های کبدی و نیز رکود صفرا در بخش‌هایی از بافت کبد در ماهی‌های تحت تیمار توفوردی، به‌ویژه در غلظت‌های ۱/٤ و ۲/۸ میلی‌گرم بر لیتر، کاملاً مشهود است. افزایش تعداد و اندازه مراکز ملانوماکروفاژی به وضوح در بافت کبد این ماهی‌ها مشاهده گردید. آسیب‌های بافتی مشابهی در کبد ماهی‌های مختلف در تماس با سموم آفت‌کش متیل‌پاراتیون، دلتامترین و دیازینون گزارش شده است (فانتا و همکاران، ۲۰۰۳؛ کنگیز و اونلو، ۲۰۰٦؛ بنایی، ۲۰۱۰؛ بنایی و همکاران، ۲۰۱۲a؛ ۲۰۱۲b). افزایش سطح رادیکال‌های آزاد در طی متابولیسم و سم‌زدایی توفوردی در بافت کبد و درپی آن، آسیب‌های وارده به غشای سلولی، بروز فسفوریلاسیون اکسیدایتو، اختلال در فعالیت استیل‌کوآنزیم (برادبرری و همکاران، ۲۰۰۰؛ فری و همکاران، ۲۰۰۷) تغییر ساختار میتوکندری و افزایش نفوذپذیری غشای میتوکندری (کایوموا و همکاران، ۲۰۰۱)، مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (توشل و شواب، ۲۰۰۳؛ بیلی‌زاریو و همکاران، ۲۰۰۷)، از مهمترین دلایل تغییرات بافت‌شناسی کبد می‌باشد. ترکیب شدن متابولیت‌های توفوردی و ایجاد پیوندهای برگشت‌ناپذیر کوالانسی آن‌ها به پروتئین‌های کبدی نیز به نوبه خود می‌تواند موجب پیشرفت سطح آسیب‌های پاتولوژیکی در این بافت گردد (دی‌پائولو و همکاران، ۲۰۰۱؛ بوکووسکا، ۲۰۰٦). همچنین توفوردی می‌تواند با ایجاد اختلال در فرایندهای متابولیکی نظیر سنتز RNA و پروتئین و نیز دخالت در روند فسفوریلاسیون و فرایند تولید

مولکول آدنوزین تری‌فسفات (ATP) و ایجاد اختلال در عملکرد برخی آنزیم‌ها سبب برهم خوردن تعادل بیوشیمیایی در درون سلول‌های موجودات زنده گردد (رابرگ و همکاران، ۲۰۰۳).

تماس ماهی‌ها با غلظت ۰/۷ و ۱/٤ میلی‌گرم نیز موجب کاهش معنی‌دار سطح فعالیت آنزیم آلانین‌آمینو ترانسفراز (ALT) در بافت آبشش گردیده است. سطح فعالیت آنزیم AST در کبد ماهی‌های در معرض غلظت ۲/۸ میلی‌گرم بر لیتر علف‌کش توفوردی، به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته است. کاهش معنی‌دار سطح فعالیت آنزیم ALT در بافت کبد ماهی‌هایی که در تماس با سم توفوردی قرار داشتند از دیگر تغییرات مشاهده شده در طول دوره آزمایشی است. کاهش سطح فعالیت آنزیم‌های AST و ALT در بافت آبشش و کبد، ممکن است بیانگر آسیب وارده به سلول‌ها و یا اختلال در روند سنتز این آنزیم‌ها در سلول‌ها باشد. آنزیم AST و ALT در بافت‌های مختلفی نظیر کبد (سریواستاوا و همکاران، ۲۰۰٤)، قلب، ماهیچه‌های اسکلتی (پترویچ و همکاران، ۱۹۹٦)، کلیه، پانکراس، طحال، گلبول‌های قرمز و آبشش ماهی‌ها (باتاچاریا و همکاران، ۲۰۰۸) یافت می‌شود. قسمت عمده این آنزیم‌ها در داخل سلول‌های کبدی، در میتوکندری هپاتوسیت قرار دارد. بنابراین هر گونه آسیب خفیف، التهاب یا نکروز سلول‌های کبد موجب آزاد شدن این آنزیم و افزایش سطح آن در پلاسما می‌گردد. از آن‌جایی‌که در ماهی‌ها، پروتئین به‌عنوان مهمترین منبع تأمین انرژی است، آنزیم AST و ALT نقش مهمی در مراحل نهایی تجزیه پروتئین جهت تولید ATP ایفا می‌کند (پتروویچ و همکاران، ۱۹۹٦). افزایش سطح فعالیت این آنزیم، نقش موثری در استفاده از اسیدهای آمینه در فرایند اکسیداسیون یا گلوکوژنز بازی می‌کند (راوو، ۲۰۰٦) و می‌تواند شاخص بالینی مناسبی جهت تشخیص آسیب‌های وارده به کبد (فیلیپ و همکاران، ۱۹۹۵) و دیگر بافت‌ها از جمله آبشش محسوب شود.

آنزیم لاکتات‌دهیدروژناز (LDH) در سیتوپلاسم تمام سلول‌های بدن ماهی‌ها به‌ویژه در بافت عضله اسکلتی، قلب، کبد، کلیه و دیگر بافت‌ها یافت می‌شود و در اثر بروز هرگونه آسیب به غشای سلولی، آزاد می‌شود و سطح آن در خون افزایش می‌یابد. در شرایطی که ماهی‌ها در معرض یک عامل استرس‌زا قرار می‌گیرند، روند کاتابولیسم گلیکوژن و گلوکز به سمت تشکیل لاکتات در عضلات پیش می‌رود و این امر می‌تواند افزاش سطح LDH را در پی داشته باشد (ولیسک و همکاران، ۲۰۰٦). افزایش معنی‌دار سطح فعالیت آنزیم LDH در بافت کبد ماهی‌های در معرض ۲/۸ میلی‌گرم سم توفوردی به‌خوبی گویای بروز چنین وضعیتی است. در حالی‌که تغییر معنی‌داری در سطح آنزیم LDH

آبشش مشاهده نشده است. آسیب‌های پاتولوژیکی وارده به بافت کبد ناشی از مسمومیت با توفوردی و بروز شرایط هیپوکسی در خون، ممکن است مانع از فسفوریلاسیون اکسیداتیو در میتوکندری گردد که در نتیجه باعث کاهش سطح تولید ATP می‌شود. مهار فسفوریلاسیون اکسیداتیو در پی تماس با آلاینده‌ها و سموم شیمیایی سبب مرگ سلولی می‌شود. در چنین شرایطی دیگر اکسیداسیون دوباره NADH با اکسیژن از طریق زنجیره تنفسی میسر نیست. بنابراین پیرووات به‌وسیله NADH و طی واکنش بیوشیمیایی که به‌وسیله آنزیم لاکتات دهیدروژناز کاتالیز می‌شود، به لاکتات احیا می‌گردد. به‌این ترتیب، از طریق اکسیداسیون مجدد NADH به‌وسیله لاکتات، فرایند گلیکولیز در غیاب اکسیژن ادامه می‌یابد (بنایی، ۲۰۱۰). کاهش سطح فعالیت این آنزیم در بافت‌های مختلف ماهی‌هایی که در معرض آفت‌کش‌های مختلف قرار داشته‌اند نیز گزارش شده است (میشرا و شوکا، ۲۰۰۳؛ آگراهاری و همکاران، ۲۰۰۷). کاهش سطح فعالیت این آنزیم تنها در بافت آبشش ماهی‌های تحت تیمار ۲/۸ میلی‌گرم بر لیتر توفوردی در مقایسه با ماهی‌های تحت تیمار ۰/۷ میلی‌گرم بر لیتر توفوردی مشاهده شد. در واقع، کاهش سطح فعالیت این آنزیم را می‌توان به افزایش نرخ گلیکولیز که تنها مسیر تولید انرژی در جانوران تحت شرایط استرس‌زا محسوب می‌شود، نسبت داد (آگراهاری و همکاران، ۲۰۰۷). کاهش سطح این آنزیم در قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhyncus mykiss*) و مارماهی مهاجر (*Anguilla Anguilla*) که به‌ترتیب در معرض سم لیندین و حشره‌کش‌های بی‌فنیل پلی‌کلره قرار داشته‌اند نیز مشاهده کرد (استرماک و براون‌بک، ۲۰۰۲).

آنزیم آلکالین‌فسفاتاز (ALP) در تمامی بافت‌های ماهی‌ها یافت می‌شود (آگراهاری و گوپال، ۲۰۰۹). نکروز بافت کبد موجب آزاد شدن این آنزیم از سلول‌های آسیب دیده و در نتیجه افزایش سطح این آنزیم در خون و نیز کاهش سطح فعالیت آن در بافت کبد می‌گردد (السید و سعد، ۲۰۰۸؛ ساها و کاویراج، ۲۰۰۹). سطح فعالیت آنزیم ALP در بافت کبد ماهی‌های در معرض غلظت ۱/٤ و ۲/۸ میلی‌گرم بر لیتر علف‌کش توفوردی و نیز سطح فعالیت این آنزیم در بافت آبشش ماهی‌های تحت تیمار ۰/۷ و ۱/٤ میلی‌گرم بر لیتر علف‌کش توفوردی در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است؛ که این امر بیانگر تأثیر این سم بر روی سطح این آنزیم در بافت کبد است. آنزیم ALP کبد نقش مهمی در متابولیسم گلیکوژن ایفا می‌کند و می‌تواند آنزیم‌های فسفوریلاز را غیرفعال نماید و سنتز گلیکوژن را در کبد تحریک نماید. ممانعت از فعالیت این آنزیم در کبد با تجزیه گلیکوژن جهت تأمین انرژی موردنیاز تحت شرایط استرس‌زا در ارتباط است و یا سبب کاهش نرخ

فسفوریلاسیون یا از فسفوریلاسیون اکسیداتیو در زنجیره تنفسی جلوگیری می‌نماید (ساها و کاویراج، ۲۰۰۹). کاهش معنی‌داری سطح فعالیت این آنزیم در کبد ماهی‌های *Channa punctatus* و ماهی‌های *Heteropnustes fossilis* در تماس با آفت‌کش فن‌والرات و همچنین در کبد ماهی‌های *Oreochromis niloticus* در تماس با متیل‌پاراتیون نیز گزارش شده است (سارابادی‌کاری و سور، ۱۹۹۲؛ جوهال و همکاران، ۲۰۰۲).

براساس تغییرات فاکتورهای بیوشیمیایی و تغییرات آسیب‌شناسی بافت آبشش و کبد می‌توان اذعان داشت که سم توفوردی می‌تواند علاوه‌بر ایجاد اختلال در واکنش‌های بیوشیمیایی، موجب بروز آسیب‌های بافت‌شناسی گردد و در نتیجه بروز آسیب‌های بیوشیمیایی سنتز و یا حتی فعالیت بسیاری از فاکتورهای بیوشیمیایی ممکن است به‌شدت دستخوش تغییراتی گردد. به‌عبارتی دیگر، تغییر سطح فعالیت این آنزیم‌ها، می‌تواند به‌عنوان یک شاخص کلینیکی در تشخیص و تأیید غیرمستقیم آسیب وارده به بافت‌های مختلف بدن، به‌ویژه در پی مسمومیت با آلاینده‌های زیست‌محیطی مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از زحمات و همکاری‌های ارزشمند جناب آقای کیقبادی کارشناس آزمایشگاه تشخیص طبی آزمایشگاه فرزانگان شیراز و جناب آقای مهندس ابراهیم‌پور کارشناس آزمایشگاه بافت‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران که در سنجش فاکتورهای بیوشیمیایی و تهیه اسلایدهای بافت‌شناسی ما را یاری رساندند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نماییم.

منابع

1.Agrahari, S., and Gopal, K. 2009. Fluctuations of certain biochemical constituents and markers enzymes as a consequence of monocrotophos toxicity in the edible freshwater fish, *Channa punctatus*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 94: 5-9.

2.Agrahari, S., Pandey, K.C., and Gopal, K. 2007. Biochemical alteration induced by monocrotophos in the blood plasma of fish, *Channa punctatus* Pesticide Biochemistry and Physiology, 88: 268-272.

3.Alvarez, M.C., and Fuiman, L.A. 2005. Environmental levels of atrazine and its degradation products impair survival skills and growth of red drum larvae. Aquatic Toxicology, 74: 229-241.
4.Amando, L.L., Eduardo da Rosa, C., Leite, A.M., Moraes, L., Wagner, V.P., Grasiela, L., Pinho, L., Martins, C.M.G., Robaldo, R.B., Nery, L.E.M., and Monserrat, J.M. 2006. Biomarkers in croakers *Micropogonias furnieri* from polluted and non-polluted areas from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil): evidences of genotoxic and immunological effects. Marine Pollution Bulletin, 52: 2. 199-206.
5.Amer, S.M., and ALy, F.A.F. 2001. Genotoxic effect of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid and its metabolite 2,4-dichlorophenol in mouse. Mutation Research, 494: 1-12.
6.Aydın, R., and Köprücü, K. 2005. Acute toxicity of diazinon on the common carp (*Cyprinus carpio*) embryos and larvae. Pesticide Biochemistry and Physiology, 82: 220-225.
7.Babazade, H., and Jebeli, S.J. 2003. Impact of agricultural activities on quality of surfacewater and groundwater. Olive Magazine, 155: 6-11.
8.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, 149p.
9.Banaee, M. 2012. Adverse effect of insecticides on various aspects of fish's biology and physiology: insecticides–basic and other applications book, Edited by Sonia Soloneski and Marcelo Larramendy, Published by InTech, Chapter 6:101-126.
10.Banaee, M., Mirvagefei, A.R., Rafei, G.R., and Majazi Amiri, B. 2008. Effect of sub-lethal diazinon concentrations on blood plasma biochemistry, International J. Environmental Research, 2: 189–198.
11.Banaee, M., Mirvaghefei, A.R., Majazi Amiri, B., and Rafei, G.R. 2012a. Biochemical blood and histopathological study of experimental diazinon poisoning in common carp fish (*Cyprinus carpio*). J. Fisheries, Iranian J. Natural Research, 65: 2. 119-133.
12.Banaee, M., Mirvaghefi, A.R., Mojazi Amiri, B., Rafiee, G.R., and Nematdost, B. 2011. Hematological and Histopathological effects of Diazinon Poisoning in common carp (*Cyprinus carpio*). J. Fisheries, Iranian J. Natural Research, 64: 1. 1-13.
13.Banaee, M., Mirvaghefi, A.R., Sureda, A., Rafei, G.R., and Ahmadi, K. 2012b. Effect of sub-Lethal concentrations of diazinon on blood parameters and liver histopathology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J. Natural Environmental, Iranian J. Natural Research, 65: 3. 297-313.
14.Banaee, M., Sureda, A., Mirvaghefi, A.R., and Ahmadi, K. 2011. Effects of diazinon on biochemical parameters of blood in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Pesticide Biochemistry and Physiology, 99: 1-6.

15. Belizário, J.E., Alves, J., Occhiucci, J.M., Garay-Malpartida, M., and Sesso, A. 2007. A mechanistic view of mitochondrial death decision pores. Brazilian J. Medical and Biological Research, 40(8): 1011-1024.
16. Bhattacharya, H., Xiao, Q., and Lun, L. 2008. Toxicity studies of nonylphenol on rosy barb (*Puntius conchonious*): A biochemical and histopathological evaluation. Tissue and Cell, 40: 243-249.
17. Bongiovanni, B., Konjuh, C., Pochettino, A., and Ferri, A. 2011. Oxidative stress as a possible mechanism of toxicity of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D); Chapter 17. 315-334. In Herbicides-Properties, Synthesis and Control of Weeds Book, Edited by Mohammed Naguib Abd El-Ghany Hasaneen. InTech Publisher, 502p.
18. Bradberry, S.M., Watt, B.E., Proudfoot, A.T., and Vale, J.A. 2000. Mechanisms of toxicity, clinical features, and management of acute chlorophenoxy herbicide poisoning: a review. J. of Clinical Toxicology, 38(2): 111-122.
19. Bukowska, B. 2006. Toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid–molecular mechanisms. Polish J. Environmental Study, 15(3): 365-374.
20. Caliskan, M., Erkmen, B., and Yerli, S.V. 2003. The effects of zeta cypermethrin on the gills of common guppy (*Lebistes reticulatus)*. Environmental Toxicology and Pharmacology, 14: 117-120
21. Cattaneo, R., Loro, V.L., Spanevello, R., Silveira, F.A., Luz, L., Miron, D.S., Fonseca, M.B., Moraes, B.S., and Clasen, B. 2008. Metabolic and histological parameters of silver catfish *(Rhamdia quelen*) exposed to commercial formulation of 2,4-dichlorophenoxiacetic acid (2,4-D) herbicide. Pesticide Biochemistry and Physiology, 92: 3. 133-137
22. Cengiz, E.I., and Unlu, E. 2002. Histopathological changes in the gills of mosquitofish (*Gambusia affinis)* exposed to endosulfan. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 68: 290-296.
23. Cengiz, E.I., and Unlu, E. 2003. Histopathology of gills in mosquitofish (*Gambusia affinis*) after long-term exposure to sub lethal concentrations of malathion. J. Environmental Science and Health Part B, 38: 5. 581-589.
24. Cengiz, E.I., and Unlu, E. 2006. Sub-lethal effects of commercial deltamethrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosquitofish (*Gambusia affinis):* a microscopic study. Environmental Toxicology and Pharmacology, 21:246-53.
25. Da Fonseca, M.B., Glusczak, L., Moraes, B.S., de Menezes, C.C., Pretto, A., Tierno, M.A., Zanella, R., Gonçalves, F.F., and Loro, V.L. 2008. The 2,4-D herbicide effects on acetylcholinesterase activity and metabolic parameters of piava freshwater fish (*Leporinus obtusidens*). Ecotoxicology and Environmental Safety, 69: 3. 416-420.
26. Dabiri, M. 2001. Environmental pollution-air, water, soil, sound. Ethehad publisher. 399p.

27. De Silva, P.M.C.S., and Samayawardhena, L.A. 2002. Low concentrations of lorsban in water result in far reaching behavioral and histological effects in early life stages in guppy. Ecotoxicology and Enviromental Safety, 53: 248–254.
28. Di Paplo, O., De Duffard, A.M., and De Duffard, R. 2001. *In vivo* and *in vitro* binding of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid to a rat liver mitochondrial protein. Chemico-Biological Interactions, 137(229): 5-15.
29. Duchnowicz, P., Koter, M., and Duda, W. 2002. Damage of erythrocyte by phenoxyacetic herbicides and their metabolites. Pesticide Biochemistry and Physiology, 74(1): 1-7.
30. Duff, R. 2000. Paradise road well contamination. The Washington State Department of Health.
31. Elisabeth, A., Scribner, E., Thurman, M., and Zimmerman, L.R. 2000. Analysis of selected herbicide metabolites in surface and ground water of the United States. The Science of the Total Environment, 248: 2-3. 5: 157-167.
32. El-Sayed, Y.S., and Saad, T.T. 2008. Sub-acute intoxication of a deltamethrin-based preparation (Butox 5% EC) in monosex Nile tilapia, (*Oreochromis niloticus*) Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology, 102: 293-299.
33. Emerit, J., Edeas, M., and Bricaire, F. 2004. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. Biomedicine and Pharmacotherapy, 58: 1. 39-46.
34. Erkmen, B., Caliskan, M., and Yerli, S.V. 2000. Histopathological effects cyphenothrin gills of the *Lepistes reticulatus*. Veterinary and Human Toxicology. 42: 5-7.
35. Estevam, E.C., Nakano, E., Kawano, T., Pereira, C., Amancio, F.F., and Melo, A. 2006. Dominant lethal effects of 2,4-D in Biomphalaria glabrata. Mutation Research, 611: 83-88.
36. Fanta, E., Rios, F.S.A., Romao, S., Vianna, A.C.C., and Freiberger, S. 2003. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sub-lethal levels of organophosphorus in water and food Ecotoxicology and Enviromental Safety, 54: 119-130.
37. Fatima, M., Ahmad, I., Sayeed, I., Athar, M., and Raisuddin, S. 2000. Pollutant induced over-activation of phagocytes is concomitantly associated with peroxidative damage in fish tissues. Aquatic Toxicology, 49: 4. 243-250.
38. Fatima, M., Ahmad, I., Siddiqui, R., and Raisuddin, S. 2001. Paper and pulp mill effluent-induced immunotoxicity in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch). Archives Environmental Contamination and Toxicology, 40: 271-276.
39. Ferri, A. Duffard, R. and Evangelista de Duffard, A.M. 2007. Selective oxidative stress in brain areas of neonate rats exposed to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid through mother's milk. Drug and Chemical Toxicology, 30: 1. 17-30.

40.Gallagher, E., and Di Giulio, R. 1991. Effects of 2,4-D dichlophenoxyacetic acid and picloran on biotransformation, peroxisomal and serum enzyme activities in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Toxicology Letters 57: 65-72.
41.Ganji, F.K., and Arvand, M. 2002. Histology practical. University of Medical Sciences and Health Services Mashhad. ISBN 7-08-5627-964, 15-19p.
42.Garry, V.E., Schreinemachers, D., Harkins, M.E., and Griffith, J. 1996. Pesticide appliers, biocides, and birth defects in rural Minnesota. Environmental Health Perspectives, 104: 394-399.
43.Hartge, P. Colt, J.S. Severson, R.K. Cerhan, J.R. Cozen, W. Camann, D. Zahm, S.H. and Davis, S. 2005. Residential herbicide use and risk of non-Hodgkin's lymphoma. American Association for Cancer Research, 14: 934-937.
44.Johal, M.S. Sandhu, G.S. and Kaur, R. 2002. Effect of fenvalerate on acid and alkaline phosphatase activity in certain tissues of *Heteropneustes fossilis*. Pollution Research, 21: 309-313.
45.Johnson, W.W. and Finley, M.T. 1980. Handbook of acute toxicity of chemicals to fish and aquatic invertebrates. Summaries of toxicity tests conducted at Columbia National Fisheries Research Laboratory, 1965-78. 98p.
46.Kaioumova, D., Kaioumov, F., Opelz, G. and Süsa, l C. 2001. Toxic effects of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on lymphoid organs of the rat. Chemosphere, 43: 4-7. 801-805.
47.Kinnberg, K. Korsgaard, B. and P. Bjerregaard, 2003; Effects of octylphenol and 17β-estradiol on the gonads of guppies (*Poecilia reticulata*) exposed as adults via the water or as embryos via the mother. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 134: 45-55.
48.Köprücü, S.Ş. Köprücü, K. Ural, M.Ş. İspir, Ü. and Pala, M. 2006. Acute toxicity of organophosphorous pesticide diazinon and its effects on behavior and some hematological parameters of fingerling European catfish (*Silurus glanis*). Pesticide Biochemistry and Physiology, 86: 99-105.
49.Losito, I. Amorisco, A. Carbonara, T. Lofiego, S. and Palmisano, F. 2006. Simultaneous determination of phenyl- and sulfonyl-urea herbicides in river water at sub-parts-per-billion level by on-line preconcentration and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Analytica Chimica Acta, 575(1) 4: 89-96.
50.Mishra, R. and Shukla, S.P. 2003. Endosulfan effects on muscle malate dehydogenase of the freshwater catfish (*Clarias batrachus)*. Ecotoxicology and Enviromental Safety, 56: 425-433.
51.Moraes, B.S., Loro, V.L., Glusczak, L., Pretto, A., Menezes, C., Marchezan, E., and de Oliveira Machado, S. 2007. Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). Chemosphere, 68: 8. 1597-1601.

52.Mousavi, K., Zand, A., and Sarami, H. 2000; Physiological functions and application of herbicides. Zanjan University publisher, 286p.
53.Nosrati, A., Iranbakhsh, A.R., and Saboori, M.S. 2007. A survey on dispersion and disintegration of herbicides 2,4 D and Atrazin in field conditions. Pajouhesh and Sazandegi, 75: 86-96. [In persian]
54.Oruç, E.Ö., Sevgiler, Y., and Üner, N. 2004. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 137: 43-51.
55.Petrovic, S., Ozretic, B., and Krajnovic-Ozretic, M. 1996. Cytosolic aspartate aminotransferase from grey mullet (*Mugil auratus*) red muscle: Isolation and properties. The International J. Biochemistry and Cell Biology, 28: 2. 873-881.
56.Philip, G.H., Reddy, P.M., and Sridevi, G. 1995. Cypermethrin induced in vivo alterations in the carbohydrate metabolism of freshwater fish *Labeo rohita*, Ecotoxicology and Enviromental Safety, 31: 173-178.
57.Raberga, S., Nystrom, M., Erosb, M., and Plantman, P. 2003. Impact of the herbicides 2,4-D and diuron on the metabolism of the coral *Porites cylindrical*. Marine Environmental Research, 56: 503-514.
58.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.
59.Saha, S., and Kaviraj, A. 2003. Acute toxicity synthetic pyrethroid cypermethrin freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis*, International J. Toxicology, 22: 325-328.
60.Saha, S., and 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: 1254-259.
61.Sarabadikary, A., and Sur, R.K. 1992. Effect of short duration exposure to methyl parathion followed by recovery of activities of some enzymes of the fish *Oreochromis niloticus*. Environment and Ecology, 10: 333-340.
62.Srivastava, A.S., Oohara, I., Suzuki, T., Shenouda, S., Singh, S.N., Chauhan, D.P., and Carrier, E. 2004. Purification and properties of cytosolic alanine aminotransferase from the liver of two freshwater fish, *Clarias batrachus* and *Labeo rohita*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 137: 197-207.
63.Strmac, M., and Braunbeck, T. 2002. Cytological and biochemical effects of a mixture of 20 pollutants on isolated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. Ecotoxicology and Enviromental Safety, 53: 293-304.
64.Tanguy, A., Boutet, I., Laroche, J., and Moraga, D. 2005. Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas)* in response to pesticide exposure. FBS J., 359: 1–3. 90-100.

65.Toft, G., and Baatrup, E. 2003. Altered sexual characteristics in guppies (*Poecilia reticulata*) exposed to 17β-estradiol and 4-tert-octylphenol during sexual development. Ecotoxicology and Environmental Safety, 56: 228-237
66.Tuschl, H., and Schwab, S. 2003. Cytotoxic effects of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in HepG2 cells. Food and Chemical Toxicology, 41: 1. 385-393.
67.Tyler, C.R., Jobling, S.R., and Sumpter, J.P. 1998. Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence. critical reviews in toxicology, 28: 4. 319-361.
68.Velisek, J., Dobsikova, R., Svobodova, Z., Modra, H., and Luskova, V. 2006. Effect of deltamethrin on the biochemical profile of common carp (*Cyprinus carpio*). Bulletin Environmental Contamination Toxicology, 76: 992-998.
69.Viran, P., Erkoc¸ Ü.F., Polat, H., and Kocak, O. 2003. Investigation of acute toxicity of deltamethrin on guppies (*Poecilia reticulata*). Ecotoxicology and Environmental Safety, 55: 82–85.
70.Viran, R., Erkoç, F.Ö., Polat, H., and Koçak, Ö. 2003. Investigation of acute toxicity of deltamethrin on guppies (*Poecilia eticulate*), Ecotoxicology and Enviromental Safety, 55: 82-85.
71.Yılmaz, M., Gül, A., and Erbasli, K. 2004. Acute toxicity of alpha-cypermethrin to guppy (*Poecilia reticulata*). Chemosphere, 56: 381-385.
72.Zand, E., Mousavi, S.K., and Heidari, A. 2008. Herbicides and their application. Jahad of Mashhad University Press. 576p.