

## "مقاله پژوهشی"

## اثرات حاد و مزمن حشره کش دلتامترین بر فعالیت آنزیم‌های استیل کولین استراز مغز، کاتالاز خون و آسیب‌شناسی بافتی ماهی طلایی *Carassius auratus* در حضور ویتامین C

مریم بهتری پور<sup>۱</sup>، سعید مشکینی<sup>۲\*</sup>، علی اکبر طافی<sup>۱</sup>

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲- گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۸/۱۶

### چکیده

هدف این مطالعه تعیین سمیت حاد و مزمن حشره‌کش دلتامترین و تأثیر آن بر فعالیت آنزیم‌های استیل کولین استراز مغز و کاتالاز سرم و بافت‌های آبشش و کبد ماهی کاراس طلایی (*Carassius auratus*) در حضور ویتامین C بود. در آزمایش سمیت حاد LC<sub>50</sub> دلتامترین با آزمون پروبیت (Probit test analysis) محاسبه شده و تأثیر غلظت مزمن آن بر ماهیان (g ۱۰/۵ ± ۰) در چهار تیمار: یک شاهد (فاقد سم و ویتامین)، دو (۰/۰۱۵۸ ppm دلتامترین)، سه (۰/۰۱۵۸ ppm دلتامترین + ۲۰۰ mg/Kg Food ویتامین C) و چهار (۲۰۰ mg/Kg Food ویتامین C) بررسی شد. در پایان آزمایش برای مطالعات آنزیمی و آسیب‌شناسی بافتی، نمونه‌های خون و بافت آبشش و کبد ماهیان تهیه شد. نتایج نشان داد دلتامترین (تیمار دو) باعث کاهش فعالیت استیل کولین استراز و کاتالاز در مقایسه با شاهد شد که این کاهش در مورد استیل کولین استراز معنی‌دار بود ( $p < ۰/۰۵$ ). اما ویتامین C در تیمار سه بطور معنی‌داری ( $p < ۰/۰۵$ ) باعث افزایش فعالیت این آنزیم نسبت به تیمار دوم شد. دلتامترین (تیمار دو) موجب ایجاد نکروز، کوتاهی، اتصال و هیپرپلازی تیغه‌های ثانویه در بافت آبشش‌ها، و خون‌ریزی، نکروز و ایجاد واکوئل چربی در بافت کبد گردید. شدت آسیب‌های بافتی در تیمار سه (دلتامترین و ویتامین C)، کمتر از تیمار دوم (دلتامترین) بود. براساس نتایج، ویتامین C در جیره غذایی ماهی کاراس طلایی باعث بهبود شرایط آنزیمی سیستم آنتی‌اکسیدانی و کاهش آسیب‌های بافتی ناشی از دلتامترین در آبشش و کبد ماهیان می‌شود.

**کلمات کلیدی:** دلتامترین، کاتالاز، استیل کولین استراز، ویتامین C، *Carassius auratus*.

## مقدمه

تغییر کیفیت آب تمامی جوامعی که در آن محیط زندگی می کنند، را تحت تأثیر جدی قرار می دهد (Mishra *et al.*, 2014). حشره کش ها بطور گسترده ای در فعالیت های کشاورزی مورد استفاده قرار می گیرند و قسمت عمده ای از آن ها وارد اکوسیستم های آبی می شوند (Das and Mukherjee, 2003; Mishra *et al.*, 2014). این آفت کش ها به تدریج وارد زنجیره های غذایی موجود در آب ها شده و از طریق پلانکتون ها به ماهی ها منتقل، و در نهایت به سفره غذایی انسان وارد می شوند. موجودات غیرهدف مانند بی مهره گان آبرزی و ماهیان به اثرات نورو توکسیک حشره کش ها که به منابع آبی وارد می شوند، بسیار حساس هستند (Shankar *et al.*, 2013). در حال حاضر پیرتروئیدها به دلیل فعالیت انتخابی، سمیت پایین برای ارگانسیم های غیر هدف و فعالیت بالایشان در برابر طیف وسیعی از حشرات، یکی از بیشترین حشره کش های مورد استفاده در کشاورزی و جنگلداری محسوب می شوند. یکی از ترکیبات سنتتیک در گروه پیرتروئیدها دلتامترین است که بطور وسیعی در فعالیت های کشاورزی و خانگی برای کنترل حشرات مورد استفاده قرار می گیرد (Aznar-Aleman *et al.*, 2017) و حوضه استفاده گسترده از این سم، تحقیق و بررسی اثرات آن را بر محیط زیست و جانوران غیرهدف با اهمیت تر نموده است.

ماهیان مهمترین موجودات آبرزی می باشند که به علت ارزش اقتصادی و حساسیت در برابر آلاینده ها از اهمیت خاصی برخوردار بوده، و به همین دلیل جهت انجام آزمایشات زیست سنجی در بعد وسیعی از آن ها استفاده می گردد. ماهی طلایی به عنوان یک نمونه

بیولوژیکی مهم جهت مطالعات فیزیولوژیکی در نظر گرفته می شود و نتایج در خصوص این گونه با طیف وسیعی از گونه های ماهی مقایسه می شود (Eslamloo *et al.*, 2014). سمیت پیرتروئیدها برای ماهی ها ممکن است مهلک باشد یا منجر به استرس شود که به نوبه خود باعث سرکوب سیستم ایمنی و حساسیت به عفونت ثانویه می شود (Vani *et al.*, 2011).

بیشتر سموم ارگانوفسفره از جمله دلتامترین با تاثیر بر میزان آنزیم های همچون استیل کولین استراز و کاتالاز نقش منفی خود را در کاهش پاسخ های سیستم ایمنی و تضعیف توان آنتی اکسیدانی بدن آبرزان اعمال می کنند (Ozcan *et al.*, 2012). سطح فعالیت این آنزیم ها از شاخص های مهم بیوشیمیایی در زمینه تعیین حساسیت ناشی از تماس ماهیان با سموم و یا حضور سموم در محیط یا بدن آنهاست. لذا بررسی میزان تغییرات این آنزیم ها در بدن و همچنین پژوهش در زمینه استفاده از موادی که باعث جلوگیری از تغییرات شدید این آنزیم ها شده و در تعدیل میزان فعالیت آنها موثر باشد، بسیار دارای اهمیت است (علی عسگری و همکاران، ۱۳۹۷).

ویتامین C یا اسید آسکوربیک یکی از آنتی اکسیدان های غیر آنزیمی است که می تواند تأثیر منفی رادیکال های آزاد را در بدن محدود کرده و با تاثیر بر میزان آنزیم های سیستم آنتی اکسیدانی از آسیب رسیدن به بافت ها جلوگیری کند. ویتامین C دارای توانایی در حفاظت از سیتوسولیک (Cytosolic) و ترکیبات غشایی سلول ها در برابر آسیب های اکسیدانی است. محققین گزارش کرده اند که مکمل سازی جیره با ویتامین C برای ارگانسیم های آبرزی از آسیب های منفی استرس جلوگیری می کند و مسمومیت ایجاد شده

شد (OECD, 2001). تعداد ۱۸۰ قطعه ماهی طلایی در پنج تیمار و با سه تکرار (در هر تکرار ۱۲ ماهی) به مدت ۹۶ ساعت در معرض مقادیر ppm ۰/۰۷۵، ppm ۰/۱۵، ppm ۰/۳ و ppm ۰/۶ سم دلتامترین (با افزودن سم به آب و سپس معرفی ماهیان به آکواریوم‌ها) قرار داده شدند. طی این مدت تعویض آب صورت نگرفته و هوادهی آب به وسیله پمپ‌های هوادهی انجام گرفت. دمای آب به وسیله بخاری‌های برقی و در درجه حرارت  $24^{\circ}\text{C}$  تنظیم گردید و به منظور خروج مواد دفعی ماهیان روزانه عمل سیفون کردن انجام شد. از آغاز آزمایش میزان مرگ و میر ماهیان هر ۲۴ h ثبت و ماهیان تلف شده بلافاصله از سیستم حذف شدند. پس از اتمام آزمایش مقدار عددی  $\text{LC}_{50}$  96h سم دلتامترین برای ماهیان براساس آزمون آنالیز پروبیت (Probit Analysis Test) محاسبه شد (Asifa et al., 2016).

برای تعیین اثرات مسمومیت مزمن سم دلتامترین، تعداد ۱۶۸ قطعه ماهی طلایی در چهار تیمار به صورت، تیمار اول: شاهد (تغذیه با غذای بدون سم و ویتامین)، تیمار دوم: دلتامترین با غلظت یک دهم مقدار  $\text{LC}_{50}$  96h (۰/۱۵۸ ppm دلتامترین)، تیمار سوم: دلتامترین با غلظت یک دهم مقدار  $\text{LC}_{50}$  96h (۰/۱۵۸ ppm) دلتامترین + ۲۰۰ mg/Kg Food ویتامین C و تیمار چهارم: ویتامین C با مقدار ۲۰۰ mg/Kg Food، با سه تکرار (هر تکرار حاوی ۱۴ قطعه ماهی) در ۱۲ آکواریوم شیشه‌ای حاوی ۳۰ لیتر آب تقسیم‌بندی شدند. تعویض آب آکواریوم‌ها با توجه به نیمه عمر سم دلتامترین (دو هفته) انجام گردید (MacLachlan, 2014). ضمن تعویض آب، هوادهی و عمل سیفون نیز به منظور خروج مواد دفعی و زائدات مواد غذایی، بصورت روزانه انجام گردید. برای تغذیه ماهیان از

بواسطه آب‌های آلوده را به حداقل رسانده است و واکنش‌های ایمنی را افزایش می‌دهد (Ozcan et al., 2012). با توجه به اهمیتی که تاثیر سموم کشاورزی بر محیط زیست و ارگانسیم‌های آبی دارد، پژوهشگران مختلفی از جمله ترخانی و هدایتی (۱۳۹۲) و حسین‌پور و همکاران (۱۳۹۲) در مطالعات خود میزان سمیت سموم پرکاربردی همچون دلتامترین و دیازینون را به ترتیب در ماهی کاراس طلایی (*Carassius auratus*) و ماهی آنجل (*Pterophyllum scalare*) مورد بررسی قرار داده‌اند، و سمیت بالای این سموم را برای این ماهیان زینتی گزارش کرده‌اند (ترخانی و هدایتی، ۱۳۹۲؛ حسین‌پور و همکاران ۱۳۹۲). بنابراین، در مطالعه حاضر، با توجه به کاربرد گسترده سم دلتامترین در کشاورزی و نفوذ این سم به اکوسیستم‌های آبی و سمیت آن برای آبزیان، میزان سمیت این حشره کش بر سیستم آنتی‌اکسیدانی ماهی کاراس طلایی (*Carassius auratus*) و نقش آنتی‌اکسیدانی ویتامین C در کاهش سمیت آن، مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

### تهیه ماهیان و آزمایشات سمیت حاد و مزمن

تعداد ۳۴۸ قطعه ماهی طلایی با میانگین وزنی  $10.5 \pm 0.5$  g از یکی از مراکز تکثیر و پرورش ماهیان زینتی تبریز تهیه و پس از ضدعفونی با محلول نمک طعام ۵ درصد، جهت سازگاری با شرایط محیط آزمایشگاه (دمای آب  $24^{\circ}\text{C}$  و  $\text{pH}=7.4$ ) به مدت یک هفته در مخزن ۱۰۰۰ لیتری نگهداری شدند.

آزمایش تعیین سمیت حاد و مقدار عددی  $\text{LC}_{50}$  براساس دستورالعمل شماره ۲۰۳ سازمان همکاری و توسعه اقتصادی (OECD) و بصورت استاتیک انجام

پاتولوژیکی، با نمونه‌های شاهد مورد مقایسه قرار گرفتند.

### اندازه‌گیری آنزیم‌ها

فعالیت آنزیم استیل کولین استراز بافت مغز براساس روش Freitas و همکاران (2016)، اندازه‌گیری گردید. نمونه‌های بافت مغز ماهیان بطور دقیق وزن شده و  $0.2 \text{ g}$  از هر نمونه بافت مغز را در  $2 \text{ ml}$  از محلول  $\text{KCl}$   $10$  درصد موجود در دستگاه هموژنایزر اضافه کرده و کاملاً هموژن شده و با دستگاه سانتریفیوژ به مدت  $10 \text{ min}$  با سرعت  $10000 \text{ rpm}$  سانتریفیوژ شدند و مایع رویی که همان عصاره بافت مغز بود جداسازی گردید. عصاره بافت مغز در داخل چاهک‌های میکروپلیت  $96$  خانه‌ای ریخته شده و به تمام چاهک‌های حاوی نمونه و چاهک‌های حاوی محلول استاندارد مقدار  $1000 \mu\text{l}$  محلول Pyrophosphate افزوده شد و مجموعه حاصل  $3 \text{ min}$  دقیقه در دمای  $37^\circ \text{C}$  در داخل انکوباتور قرار گرفتند. سپس مقدار  $250 \mu\text{l}$  محلول Butyrylthiocholine به نمونه‌ها افزوده شد و پس از گذشت  $2 \text{ min}$ ، جذب نوری نمونه‌ها چهار مرتبه و با فواصل زمانی یک دقیقه‌ای بوسیله دستگاه Elisa (DANA, USA) Reader در طول موج  $405 \text{ nm}$  قرائت گردید. برای محاسبه فعالیت آنزیم استیل کولین استراز مغز، براساس دستورالعمل، میانگین تفاوت جذب نوری نمونه‌ها در هر قرائت در عدد  $68500$  ضرب گردید (Freitas et al., 2016). اندازه-گیری آنزیم کاتالاز سرم به روش الیزا و کیت اندازه-گیری کاتالاز (به شماره ab123456، شرکت Abcam، کشور انگلستان) و بوسیله دستگاه الیزا ریدر (مارک AWARENESS، کشور آمریکا) انجام شد.

پلت‌های غذایی (OPTIMUM ساخت کشور تایلند) استفاده شد. ویتامین C مورد استفاده در تغذیه گروه‌های مربوطه اسید آسکوربیک با فرمول شیمیایی  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$  ساخت شرکت EMD-Millipore کشور آلمان بود. غذادهی به مدت  $30$  روز و روزانه دو بار و به مقدار دو درصد وزن ماهیان صورت گرفت.

### تهیه نمونه‌های سرم خون و بافت ماهی

برای نمونه‌برداری در انتهای دوره  $30$  روزه آزمایش، غذادهی ماهیان به مدت  $24 \text{ h}$  قطع گردید و از هر تکرار  $6$  ماهی بصورت تصادفی پس از بیهوشی در  $150 \text{ ppm}$  محلول پودر گل میخک، با قطع ساقه دمی از آن‌ها خون‌گیری شدند. نمونه‌های خونی پس از انعقاد به مدت  $15 \text{ min}$  با دور  $3000 \text{ rpm}$  سانتریفیوژ شدند و سرم آن‌ها با سمپلر جداسازی شد. نمونه‌های سرم تا زمان استفاده برای اندازه‌گیری آنزیم کاتالاز در دمای  $8^\circ \text{C}$  - نگهداری شدند (Amin and Hashem, 2012). برای اندازه‌گیری آنزیم استیل کولین استراز مغز نمونه‌های بافت مغز از ماهیان گرفته شده و تا زمان آزمایش در دمای  $8^\circ \text{C}$  - نگهداری شدند. برای مطالعات آسیب‌شناسی بافتی، بافت‌های کبد و آبشش ماهیان جدا شده و پس از شستشو با سرم فیزیولوژی در فرمالین  $10\%$  قرار داده شدند (Kan et al., 2012). پس از مراحل پاساژ بافتی، با استفاده از دستگاه میکروتوم مقاطع بافتی با ضخامت  $5$  میکرون تهیه شده و با روش هماتوکسیلین - ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. میکروگراف‌های بافتی تهیه شده توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی  $40$  بررسی شده و عکسبرداری شدند. تصاویر تهیه شده از مقاطع بافتی برای بررسی تغییرات

## تجزیه و تحلیل آماری

برای تعیین  $LC_{50}$  96h از آزمون Probit Analysis Test استفاده گردید. نمودارهای مربوطه توسط نرم افزار Excel رسم و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس دو طرفه (Two Way ANOVA) و جهت بررسی اختلاف میانگین داده‌ها از آزمون Tukey در نرم افزار SPSS

استفاده گردید. کلیه آزمون‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد و میزان معنی داری ۰/۰۵ صورت گرفتند.

## نتایج

### نتایج مربوط به $LC_{50}$ دلتامترین

تلفات حاصل از مجاورت ماهی طلایی با غلظت- های افزایشی دلتامترین در زمان‌های ۲۴ h، ۴۸ h، ۷۲ h و ۹۶ h ساعت در (جدول ۱) آورده شده است.

جدول ۱: تعداد تلفات تجمعی ماهیان طلایی در غلظت‌های مختلف سم دلتامترین، طی مدت زمان ۹۶ ساعت

تعداد ماهیان	تعداد تلفات تجمعی ماهیان طی زمان				غلظت دلتامترین (ppm)
	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت	
۳۶	۰	۰	۰	۰	۰
۳۶	۰	۰	۶	۱۲	۰/۰۷۵
۳۶	۰	۶	۱۲	۱۲	۰/۱۵
۳۶	۶	۱۲	۱۸	۲۴	۰/۳
۳۶	۱۸	۳۰	۳۶	۳۶	۰/۶

SPSS محاسبه گردید که در (جدول ۲) نشان داده شده است.

بر اساس میزان مرگ و میر ماهیان طلایی در آزمایش سمیت کشنده،  $LC_{50}$  ۹۶ ساعته سم دلتامترین برای ماهیان کاراس طلایی با آزمون Probit نرم افزار

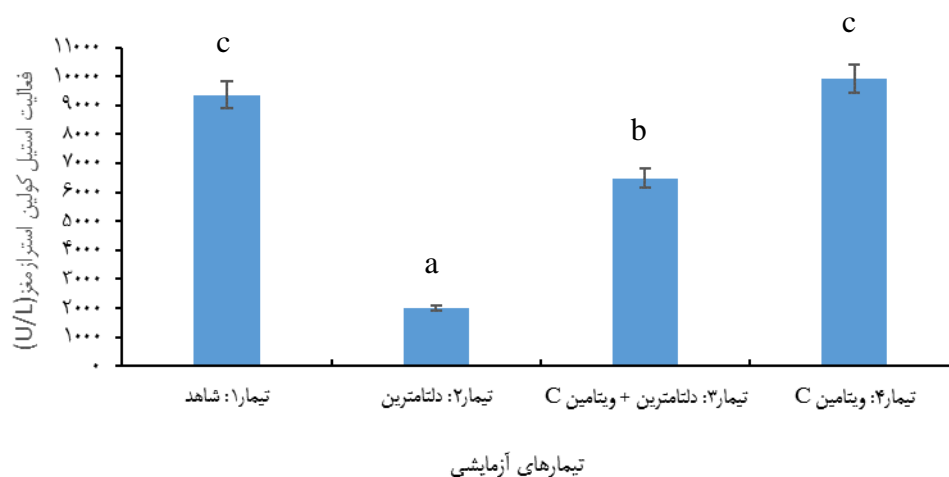
جدول ۲: نتایج جدول آزمون Probit برای تعیین  $LC_{50}$  96h سم دلتامترین برای ماهیان طلایی

غلظت* (ppm) (درجه اطمینان ۹۵٪)	
۰/۰۱۷	$LC_1$
۰/۰۴۶	$LC_{10}$
۰/۰۹۶	$LC_{30}$
۰/۱۵۸	$LC_{50}$
۰/۲۶۲	$LC_{70}$
۰/۵۴۳	$LC_{90}$
۱/۴۸۴	$LC_{99}$

### نتایج فعالیت آنزیم استیل کولین استراز مغز

نتایج حاصل از آنالیز مقادیر اندازه‌گیری شده فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در تیمارهای مختلف نشان داد که فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در هر دو تیمار دو (دلتامترین) و سه (ppm ۰/۰۱۵۸) و سه (دلتامترین + ویتامین C) در مقایسه با تیمار شاهد کاهش معنی‌داری را نشان دادند (ppm ۰/۰۱۵۸ + ویتامین C) در مقایسه با تیمار شاهد کاهش معنی‌داری را نشان دادند (ppm ۰/۰۱۵۸) که (p < ۰/۰۵).

دلتامترین + ۲۰۰ mg/Kg Food ویتامین C)، در مقایسه با تیمار دو (دلتامترین) دارای افزایش معنی‌دار در فعالیت آنزیم استیل کولین استراز بود (p < ۰/۰۵). تیمار چهار (۲۰۰ mg/Kg Food ویتامین C) نیز افزایش نیز افزایش در فعالیت آنزیم استیل کولین استراز مغز را نشان داد که این افزایش در مقایسه با تیمار شاهد معنی‌دار نبود (شکل ۱).

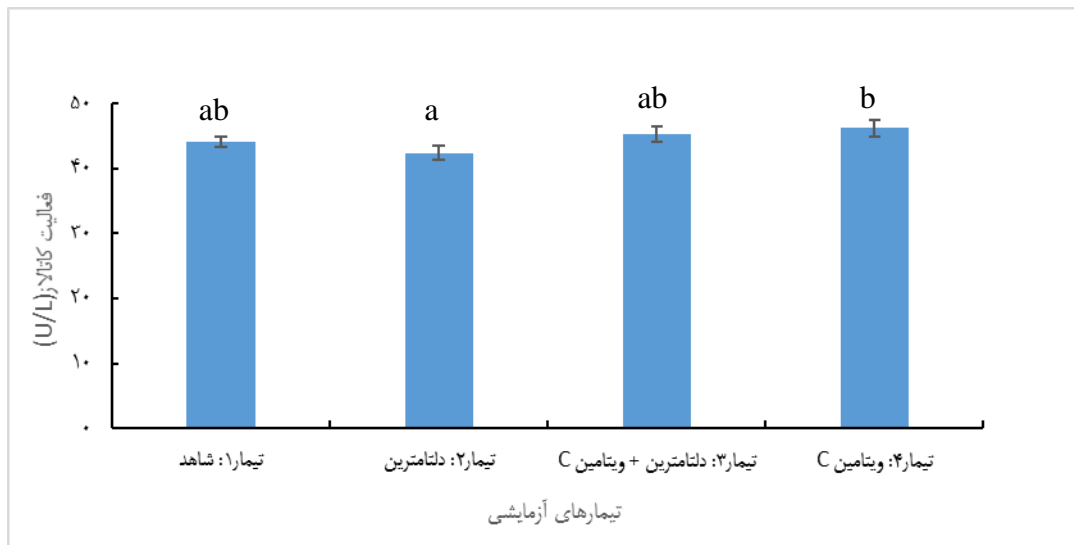


شکل ۱: مقایسه میزان فعالیت آنزیم استیل کولین استراز مغز در تیمارهای مختلف

### نتایج فعالیت آنزیم کاتالاز

نتایج نشان داد که سم دلتامترین در تیمار دو (ppm ۰/۰۱۵۸) باعث کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز گردید که در مقایسه با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (p > ۰/۰۵). تیمارهای سه (ppm ۰/۰۱۵۸) و چهار (دلتامترین + ۲۰۰ mg/Kg Food ویتامین C) و چهار (۲۰۰ mg/Kg Food ویتامین C) منجر به افزایش

فعالیت آنزیم کاتالاز شدند. اما این افزایش فعالیت در مقایسه با تیمار شاهد معنی‌دار نبود (p > ۰/۰۵). تیمار چهار (۲۰۰ mg/Kg Food ویتامین C) نسبت به تیمار دو (دلتامترین) افزایش معنی‌دار فعالیت کاتالاز را به دنبال داشت (p > ۰/۰۵) (شکل ۲).

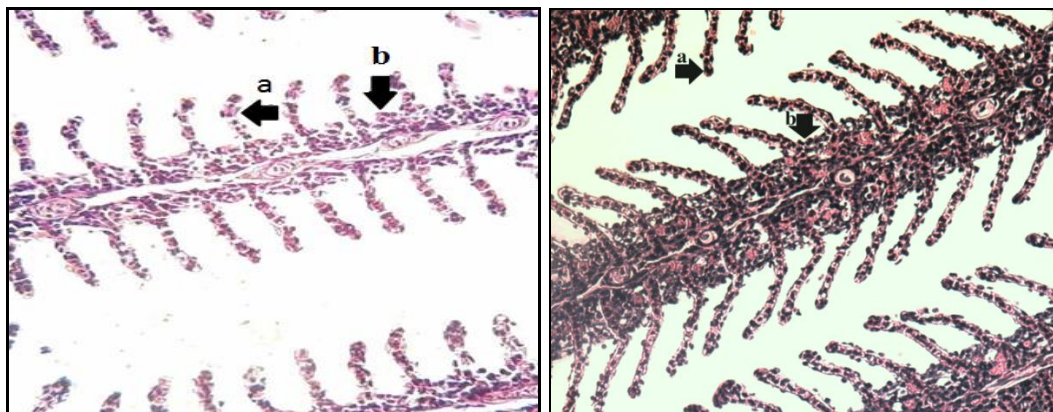


شکل ۲: میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمارهای مختلف

ساختار بافتی طبیعی بوده که در ساختمان هر کمان آبششی، تیغه‌های آبششی اولیه دارای تعداد زیادی تیغه-های آبششی ثانویه در طرفین خود هستند (شکل ۳).

### نتایج آسیب شناسی بافتی آبشش و کبد ماهی طلایی

مشاهدات آسیب شناسی بافتی گروه شاهد و تیمار چهار (۲۰۰ mg/Kg Food ویتامین C)، نشان دهنده



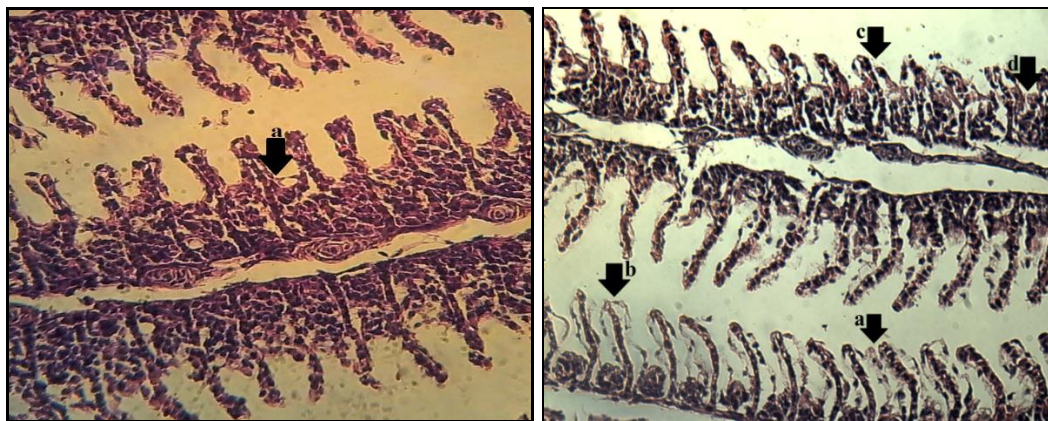
شکل ۳: ساختمان تیغه‌های آبششی شاهد (سمت راست) و تیمار تغذیه شده با ویتامین C (سمت چپ) در ماهی طلایی، a- تیغه ثانویه، b- تیغه اولیه (H&E 400x)

هیپرپلازی در تیغه‌ها و بهم چسبیدگی تیغه‌های ثانویه در مقایسه با تیمار شاهد مشاهده شد (شکل ۳). در تیمار سه (۲۰۰ ppm دلتامترین + mg/Kg Food ویتامین C)، نیز آسیب‌هایی مانند هیپرپلازی

در تیمار دو (۱۵۸ ppm دلتامترین)، آسیب‌های بافت شناسی از جمله کوتاه شدن تیغه‌های ثانویه، پهن شدن تیغه‌های اولیه و ثانویه، ادم، نکروز تیغه‌های ثانویه،

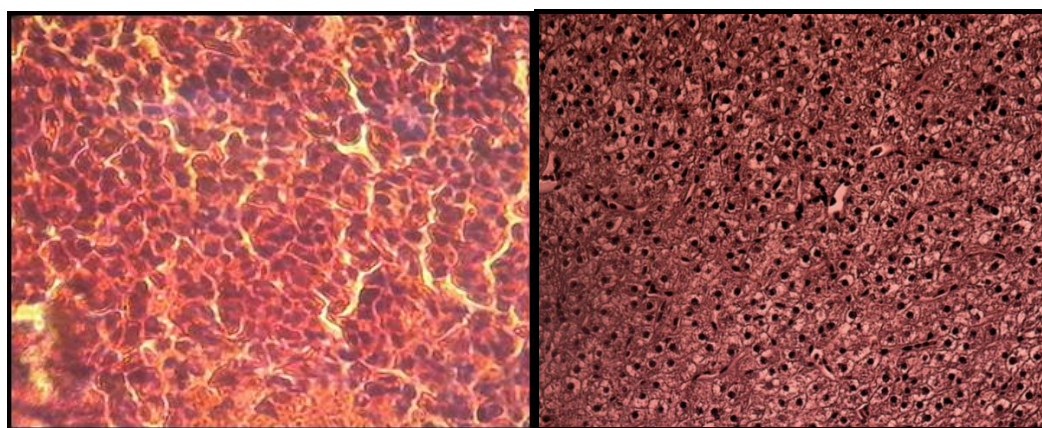
شدت کمتری داشتند (شکل ۴).

و بهم چسبیدگی تیغه‌های ثانویه مشاهده شدند اما این آسیب‌ها نسبت به تیمار دو (۰/۰۱۵۸ ppm دلتامترین)



شکل ۴: ساختمان تیغه‌های آبششی تیمار دلتامترین (سمت راست) و دلتامترین+ویتامین C (سمت چپ) در ماهی طلایی، a- چسبندگی تیغه‌ها، b- ادم، c- کوتاه شدن تیغه‌های ثانویه، d- پهن شدن تیغه اولیه (H&E 400x)

مشاهدات آسیب‌شناسی بافت کبد تیمار شاهد و تیمار چهار (۲۰۰ mg/Kg Food ویتامین C)، نشان دهنده ساختار بافتی طبیعی بود (شکل ۵).

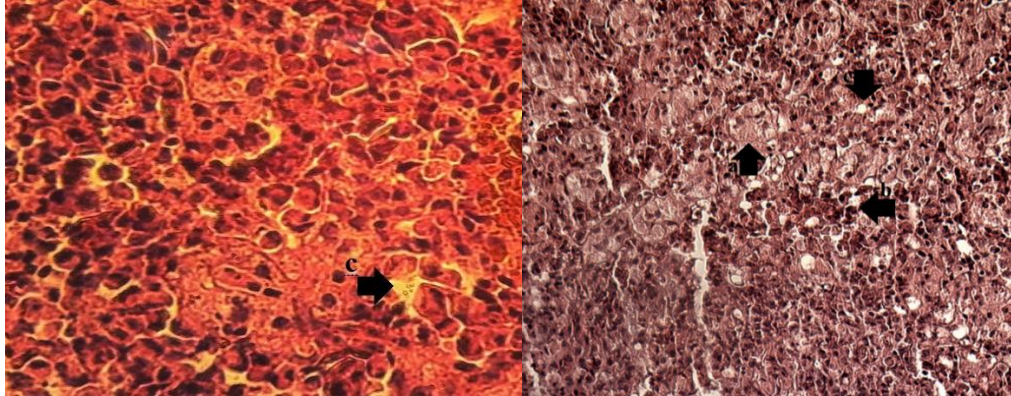


شکل ۵: بافت سالم سلول‌های کبدی شاهد (سمت راست) و تیمار تغذیه شده با ویتامین C (سمت چپ) در ماهی طلایی، (H&E 400x)

در تیمار سه (۰/۰۱۵۸ ppm دلتامترین + mg/Kg Food ۲۰۰ ویتامین C) نیز آسیب‌هایی همچون نفوذ واکوئل‌های چربی در سلول‌های کبدی مشاهده شد و شدت این آسیب‌های بافتی نسبت به تیمار دو (۰/۰۱۵۸ ppm دلتامترین) کمتر بود (شکل ۶). بررسی

در نتایج آسیب‌شناسی تیمار دو (۰/۰۱۵۸ ppm دلتامترین) در مقایسه با تیمار شاهد، آسیب‌های بافتی همچون تورم سلولی سلول‌های کبدی، واکوئل‌های چربی در سلول‌های کبدی، خون ریزی و نکروز در تعدادی از سلول‌های کبدی مشاهده شد (شکل ۶).

مقایسه‌ای آسیب‌های بافتی در تیمارهای مختلف در جدول ۳ آورده شده است.



شکل ۶: سلول‌های کبدی تیمار حاوی سم دلتامترین (سمت راست) و تیمار دلتامترین + ویتامین C (سمت چپ) در ماهی طلایی، a- تورم سلول‌های کبدی، b- خونریزی و مشاهده سلول‌های خونی، c- نفوذ واکوئل‌های چربی در هپاتوسیت‌ها (H&E 400x)

جدول ۳: مقایسه شدت آسیب‌های بافتی در بافت آیشش و کبد ماهیان طلایی در تیمارهای مختلف

تیمارها		شاهد	آسیب‌های بافتی	بافت
۰/۰۱۵۸ ppm دلتامترین + ویتامین C ۲۰۰ mg Kg/Food	۰/۰۱۵۸ ppm دلتامترین			
-	+	+++	-	ادم
-	++	++	-	هیپریلازی در تیغه‌ها
-	+	+	-	بهم چسبیدگی تیغه‌های ثانویه
-	+	+	-	نکروز تیغه‌های ثانویه
-	+	+	-	کوتاه شدگی تیغه‌های ثانویه
-	+	++	-	پهن شدن تیغه‌ها
-	+	++	-	نکروز
-	++	++	-	خون‌ریزی
-	+	++	-	تورم سلولی
-	+	+	-	واکوئل چربی

-: عدم مشاهده، +: خفیف، ++: متوسط، +++: شدید

## بحث

قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در مطالعه Velisek و همکاران (۲۰۰۷) ۰/۰۲ mg/L گزارش گردید (Velisek et al., 2007). طی بررسی‌های Sadeghi و Hedayati (۲۰۱۴) بر روی ماهی سیچلاید زندانی (*Cryptoheros*)

محققین زیادی تأثیر دلتامترین را بر روی آبزیان مورد بررسی قرار داده‌اند و براساس نوع گونه و دیگر شرایط آزمایش، مقادیر متفاوتی را برای LC<sub>50</sub> 96h دلتامترین گزارش کرده‌اند. میزان LC<sub>50</sub> برای ماهی

دلتمترین) شده است. نتایج این پژوهش با یافته‌های Vani و همکاران (۲۰۱۱)، مطابق بوده بطوری که در پژوهش مذکور فعالیت این آنزیم در ماهی کاتلا (*Catla catla*) بدنبال تماس آن با سم دلتمترین و جیره دارای ویتامین C، در مقایسه با تیمار شاهد، به میزان جزئی کاهش پیدا کرده بود. این مسئله ممکن است بدلیل عملکرد محافظتی و ضد استرسی ویتامین C باشد (Vani et al., 2011). همچنین نتایج مطالعه Yousef و همکاران (۲۰۰۶) نیز تأییدکننده نقش ویتامین‌ها در کاهش آثار سموم روی فعالیت آنزیم استیل کولین استراز مغز می‌باشد (Yousef et al., 2006).

همانگونه که یافته‌های مطالعه حاضر در نمودار ۲ نشان می‌دهد، فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار دو (ppm ۰/۰۱۵۸ دلتمترین)، در مقایسه با تیمار شاهد معنی‌دار نبود. در حالی که نتایج تحقیقات Dinu و همکاران (۲۰۱۰) نشان دهنده کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم کاتالاز کبد ماهی طلائی (*Carassius auratus*) در مواجهه با دلتمترین بود (Dinu et al., 2010). در بررسی دیگری نیز دلتمترین باعث کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم کاتالاز ماهی تیلای نیل (*Oreochromis niloticus*) شد (Abdelkhalek et al., 2015). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ویتامین C در تیمار سه (ppm ۰/۰۱۵۸ دلتمترین + mg/Kg Food ۲۰۰ ویتامین C) در مقایسه با تیمار دو (ppm ۰/۰۱۵۸ دلتمترین)، افزایش فعالیت کاتالاز را بدنبال داشته اما این افزایش فعالیت در مقایسه با تیمار شاهد، معنی‌دار نبود.

بررسی‌های بافت‌شناسی ابزار مناسبی برای تشخیص اثرات مستقیم ترکیبات شیمیایی در اندام‌های هدف

*nigrofasciatus* و Josephine و همکاران (۲۰۰۶) بر روی ماهی تیلای نیل (*Oreochromis niloticus*)، میزان LC<sub>50</sub> 96h دلتمترین برای ماهیان نامبرده بترتیب ppm ۰/۱۵ و  $\mu\text{g/l}$  ۱۵/۴۷ بدست آمد (Josephine et al., 2006; Sadeghi and Hedayati, 2014). مطالعه حاضر هم غلظت کشنده در طی ۹۶ h برای ۵۰ درصد از جمعیت ماهیان طلائی برابر با ppm ۰/۱۵۸ بدست آمد. در مطالعه حاضر فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در تیمار دو (ppm ۰/۰۱۵۸ دلتمترین) در مقایسه با شاهد، بطور معنی‌داری کاهش یافته است و با نتایج مطالعه Mohammed و همکاران (۲۰۱۶) روی ماهی تیلای نیل (*Oreochromis niloticus*) و همکاران روی قزل‌آلای رنگین کمان همخوانی دارد، به طوری که ایشان هم کاهش معنی‌دار فعالیت استیل کولین استراز مغز را به ترتیب در ماهی تیلای نیل و قزل‌آلای رنگین کمان در اثر سم دلتمترین گزارش کرده‌اند و دلیل این موضوع را اثر مهارتی ترکیبات پیرتروئیدی موجود در ترکیب دلتمترین بیان کرده‌اند (Mohammed et al., 2016; Velisek et al., 2007).

براساس گزارشات پژوهشگران برخی ویتامین‌ها، از جمله ویتامین C نقش مهمی در کاهش استرس‌های اکسیداتیو و کاهش آثار برخی سموم در بدن آبزیان دارند (Dabrowski, 2001; Li et al., 1999). در مطالعه حاضر هر چند دلتمترین در تیمار دو (ppm ۰/۰۱۵۸ دلتمترین) باعث کاهش فعالیت آنزیم استیل کولین استراز شده است اما استفاده از ویتامین C در کنار این سم در تیمار سه (ppm ۰/۰۱۵۸ دلتمترین + mg/Kg Food ۲۰۰ ویتامین C) باعث افزایش معنی‌دار فعالیت این آنزیم در مقایسه با تیمار دو (ppm ۰/۰۱۵۸

آن از شدت کمتری برخوردار بودند. طی تماس ماهی تیلاپپای نیل (*Oreochromis niloticus*) با سم دلتامترین و حیره حاوی ویتامین E نیز بعضی از تغییرات آسیب‌شناختی ایجاد شده در بافت آبشش توسط دلتامترین کاهش پیدا کرده اما ویتامین مورد نظر نقش حفاظتی خود را کاملاً ایفا نکرده است (Kan et al., 2012). بررسی‌های آسیب‌شناسی Korkmaz و همکاران (۲۰۰۹) نشان داد که آسیب‌های ایجاد شده توسط سم سپرمتترین در بافت آبشش ماهیان تیلاپپای نیل نسبت به تیمار حاوی سم و ویتامین C شدیدتر بود (Korkmaz et al., 2009).

مکانیسم‌های تنظیمی کبد در اثر افزایش غلظت ترکیبات سمی دچار اختلال شده و متعاقباً منجر به آسیب‌های ساختاری در این اندام مهم می‌گردد (Kan et al., 2012). در مطالعه حاضر، در گروه شاهد و تیمار چهار (۲۰۰ mg/Kg Food ویتامین C) آسیب بافتی خاصی مشاهده نشد (تصویر ۳)، اما در تیمار دو (۰/۰۱۵۸ ppm دلتامترین)، آسیب‌های بافتی همچون تورم سلولی، واکوئل‌های چربی و نکروز در تعدادی از سلول‌های کبدی مشاهده شد. در مطالعات محققین دیگر هم چنین آسیب‌هایی در بافت کبد ماهیان در اثر مواجهه با سموم مختلف گزارش شده است. Kan و همکاران (۲۰۱۲)، جراحاتی همچون هایپرتروفی سلول‌های کبدی، واکوئل‌های چربی و نکروز موضعی در بافت کبد ماهی تیلاپپای نیل (*Oreochromis niloticus*) در اثر تماس با سم دلتامترین را گزارش کرده‌اند (Kan et al., 2012). به نظر می‌رسد نکروز یا مرگ سلول‌ها ممکن است بوسیله اتولیز یا تجزیه سریع به وقوع بپیوندد. اتولیز بوسیله آنزیم‌های خود سلول که در اثر مرگ سلولی در محیط پخش می‌شود، ایجاد

ماهیان مطرح شده‌اند (Kan et al., 2012) و پژوهشگران تاثیر مخرب سموم و حشره‌کش‌های مورد استفاده در کشاورزی را بر بافت‌های ماهیان گزارش کرده‌اند (شاملوفر و همکاران، ۱۳۹۴؛ کشتکار لنگرودی و تهرانی‌فرد، ۱۳۹۷). از آنجا که بافت آبشش ماهیان در تماس مستقیم با محیط خارج است، نسبت به آلودگی‌های زیست محیطی بسیار حساس بوده و آسیب‌های وارده به آن براحتی قابل مشاهده می‌باشد (Cengiz, 2006). در تحقیق حاضر در گروه شاهد و تیمار چهار (۲۰۰ mg/Kg Food ویتامین C) ساختار آبشش طبیعی بود، اما در تیمار دو (۰/۰۱۵۸ ppm دلتامترین)، در بافت آبشش ماهی طلایی ضایعاتی همچون کوتاه شدن تیغه‌های ثانویه، ادم، نکروز تیغه‌های ثانویه، هیپرپلازی در تیغه‌ها، بهم چسبیدگی تیغه‌ها مشاهده شد. در تحقیقات انجام شده توسط سایر محققین نیز، علائم مشابهی در آبشش ماهیان قرار گرفته در معرض این سم مشاهده شد، بطوری که Velisek و همکاران (۲۰۰۷) تغییرات پاتولوژیکی شدید ناشی از سم سپرمتترین را در تیغه‌های ثانویه آبشش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) گزارش کردند. نتایج ایشان نشان داد که حتی سطوح بسیار پایین پیرتروئیدها در آب‌ها به شدت توسط آبشش‌ها قابل جذب هستند (Velisek et al., 2007). همچنین یافته‌های تحقیق Cengiz و Unlu (۲۰۰۶) در زمینه تأثیر منفی دلتامترین بر آبشش پشه ماهی (*Gambusia affinis*)، تایید کننده نتایج مطالعه حاضر است (Cengiz and Unlu, 2006). در تیمار سه (۰/۰۱۵۸ ppm دلتامترین + ۲۰۰ mg/Kg Food ویتامین C)، نیز آسیب‌های بافتی همچون تیمار دو (۰/۰۱۵۸ ppm دلتامترین)، مشاهده شد، اما تعداد و میزان آسیب‌های

می‌گردد و این ترکیبات نه تنها خود سلول، بلکه موجب متلاشی شدن سایر سلول‌های مجاور نیز می‌گردد (پورغلام و همکاران، ۱۳۹۱). در تیمار سه (ppm) ۰/۰۱۵۸ دلتامترین + ۲۰۰ mg/Kg Food ویتامین C، نیز آسیب‌های بافتی همچون تیمار دو (۰/۰۱۵۸ ppm دلتامترین)، مشاهده شد. اما میزان آسیب‌ها در این تیمار از شدت کمتری برخوردار. در بررسی دیگری مواجهه موش‌های صحرایی با دلتامترین به‌مراه ویتامین C، آسیب‌های بافتی کمتری نسبت به تیمار بدون ویتامین نشان داد ولی اختلاف معنی‌داری میان این دو تیمار مشاهده نشد (قاسمی و همکاران، ۱۳۹۳). اما در تحقیق دیگری تجویز ویتامین E در جیره غذایی ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) که در معرض سم دلتامترین قرار گرفته بودند، باعث کاهش چشمگیر آسیب‌های بافتی در کبد این ماهیان شد (Kan et al., 2012). در مطالعه حاضر، دلتامترین که از سموم پیرتروئیدی می‌باشد در غلظت بکار رفته، آثار منفی بر بافت‌ها و آنزیمی‌های آنتی‌اکسیدانی ماهی طلائی داشته و ویتامین C بکار برده شده قادر بوده تا حدودی این آثار را کاهش دهد. با توجه به نتایج مطالعه حاضر، تغییرات بافتی و آنزیمی می‌توانند بعنوان بیومارکرهای آلودگی محیط زیست ماهی و سایر آبزیان به سموم مختلف پیرتروئیدی، کاربرد مؤثری داشته باشند. همچنین باید در استفاده از این سموم و آگاهی از دوز مناسب آن‌ها احتیاط لازم به عمل بیاید. استفاده از مکمل‌های ویتامین C در جیره غذایی آبزیان می‌تواند تا حدودی باعث حفاظت از ماهیان در برابر اثرات مخرب سموم پیرتروئیدی بر سیستم آنزیمی و بافت‌های حیاتی آنها شود.

### سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می‌دانیم از زحمات تمام کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نماییم.

### منابع

- ۱- پورغلام، ر.، قیاسی، م.، رضایی، م.، نصرالله زاده، ح.، سعیدی، ع.، صفری، ر.، بهروزی، ش.، و پورغلام، م.ع.، ۱۳۹۱. بررسی آسیب شناسی تأثیر غلظت‌های تحت کشنده سم دیازینون بر برخی از اندام‌های کپور علفخوار (آمور) (*Ctenopharyngodon idella*). مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ۲۲(۹۸)، ۳۲۶-۳۲۳.
- ۲- ترخانی، ر.، و هدایتی، س.ع.ا.، ۱۳۹۲. تعیین غلظت کشنده سموم دیازینون و دلتامترین در ماهی کاراس طلائی (*Carassius auratus gibelio*). نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان، ۲(۲)، ۱۳۱-۱۲۱.
- ۳- حسین پور، م.، مرادزاده، م.، ترخانی، ر.، بهرامی، م.، حسین‌نیا، ز.، عباسی، م.، و سلمروودی، م.، ۱۳۹۲. تعیین غلظت کشنده سموم دلتامترین و دیازینون در ماهی آنجل. فصلنامه علوم تکثیر و آبرزی پروری، ۱(۲)، ۴۵-۵۴.
- ۴- شاملوف، م.، جرجانی، س.، و قلیچی، ا.، ۱۳۹۴. تعیین LC50 و بررسی ضایعات بافتی ناشی از سم سوین در بچه ماهیان سفید *Rutilus frisii kutum*. نشریه توسعه آبرزی پروری، ۹(۱)، ۵۱-۴۳.
- ۵- علی عسگری، ا.، ماشینچیان مرادی، ع.، احتشامی، ف.، جمیلی، ش.، و ربانی، م.، ۱۳۹۷. بررسی

- Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 22(2), 200-204.
- 13-Cengiz, E.I., Unlu, E., 2006. Sublethal 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(3), 246-253.
- 14-Dabrowski, K., 2001. Ascorbic Acid in aquatic organisms, Chemical Rubber Company (CRC) press, Florida, 288 p.
- 15-Das, B.K., Mukherjee, S.C., 2003. Toxicity of cypermethrin in *Labeo rohita* fingerlings: biochemical, enzymatic and haematological consequences. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology Pharmacology*, 134(1), 109-121.
- 16-Dinu, D., Marinescu, D., Munteanu, M.C., Staicu, A.C., Costache, M., Dinischiotu, A., 2010. Modulatory Effects of Deltamethrin on Antioxidant Defense Mechanisms and Lipid Peroxidation in *Carassius auratus gibelio* Liver and Intestine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58, 757-764.
- 17-Freitas, A.P., Santos, C.R., Sarcinelli, P.N., Silva Filho, M.V., Hauser-Davis, R.A., Lopes, R.M., 2016. Evaluation of a Brain Acetylcholinesterase Extraction Method and Kinetic Constants after Methyl-Paraoxon Inhibition in Three Brazilian Fish Species. *Public Library of Science (PLOS) ONE*, 11(9), e0163317.
- 18-Eslamloo, K.h., Akhavan, S.R., Jamalzad Fallah, F., Henry, M.A., 2014. Variations of physiological and innate immunological responses in goldfish (*Carassius auratus*) subjected to recurrent acute stress. *Fish and Shellfish Immunology*, 37(1), 147-53.
- 19-Josephine, O.B., Nunoo, F.K.E., Dankwa, H.R., Ocran, M.H., 2006. Acute Toxic Effects of Deltamethrin on Tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). *West Africa Journal of Applied Ecology (WAJAE)*, 9, 1-5.
- 20-Kan, Y., Ipek Cengiz, E., Ugurlu, P., Yanar, M., 2012. The protective role of vitamin E on gill and liver tissue histopathology and تغییرات فصلی آنزیم گلوکوتایون اس ترانسفراز، کاتالاز و استیل کولین استراز در اندازه‌های مختلف صدف دوکف‌های مرواریدساز *Pinctada radiata*. فصلنامه علمی پژوهشی محیط زیست جانوری، ۱۰(۲)، ۳۳۰-۳۱۹.
- ۶- قاسمی، ف.، سعدونی، ه.، و جوهری، ح.ا.، ۱۳۹۳. اثر حفاظتی ویتامین C بر تغییرات بافتی کلیه موش صحرائی مورد مواجهه با آفت کش دلتامترین. *مجله علوم پزشکی پارس*، ۱۳(۱)، ۵۵-۴۵.
- ۷- کشتکارلنگرودی، ا.، و تهرانی فرد، ا.، ۱۳۹۷. تاثیر زیر حد کشندگی سم دیازینون بر پارامترهای خونی و بافت‌های آبشش و عضله بچه ماهی قره‌برون. *نشریه توسعه آبرزی پروری*، ۱۲(۳)، ۱۲۸-۱۱۹.
- 8- Abdelkhalek, N.K.M., Ghazy, E.W., Abdel-Daim, M.M., 2015. Pharmacodynamic interaction of *Spirulina platensis* and deltamethrin in freshwater fish Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: impact on lipid peroxidation and oxidative stress. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 3023-3031.
- 9- Amin, K.A., Hashem, K.S., 2012. Deltamethrin-induced oxidative stress and biochemical changes in tissues and blood of catfish (*Clarias gariepinus*): antioxidant defense and role of alpha-tocopherol. *BioMed Central Veterinary Research*, 45, 1-8.
- 10-Asifa, K.P., Vidya, P.V., Chitra, K.C., 2016. Assessment of median lethal concentration (LC50 - 96h) and behavioural modification of nonylphenol in the Cichlid fish, *Etroplus maculatus* (Bloch, 1795). *International Journal of Advanced Life Sciences*, 9(2), 190-195.
- 11-Aznar-Aleman, O., Eljarrat, E., Barcelo, D., 2017. Effect of pyrethroid treatment against sea lice in salmon farming regarding consumers' health. *Food and Chemical Toxicology*, 105, 347-354.
- 12-Cengiz, E.I., 2006. Gill and kidney histopathology in the freshwater fish

- vitamin C. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 101, 16–20.
- 30-Velisek, J., Jurcikova, J., Dobsikova, R., Svobodova, Z., Piackova, V., Machova, J., Novotny, L., 2007. Effects of deltamethrin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23, 297–301.
- 31-Yousef, M.I., Awad, T.I., Mohamed, E.H., 2006. Deltamethrin-induced oxidative damage and biochemical alterations in rat and its attenuation by Vitamin E. *Toxicology*, 227, 240–247.
- micronucleus frequencies in peripheral erythrocytes of *Oreochromis niloticus* exposed to deltamethrin. *Environmental toxicology and pharmacology*, 34, 170–179.
- 21-Korkmaz, N., Cengiz, E.I., Unlu, E., Uysal, E., Yanar, M., 2009. Cypermethrin-induced histopathological and biochemical changes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), and the protective and recuperative effect of ascorbic acid. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 28, 198–205.
- 22-MacLachlan, D., 2014. Deltamethrin (135), First edition, FAO, Australia, 191 p.
- 23-Mishra, A., Meshram, L., and Chubey, K., 2014. Study of lethal effects of pesticides (Trichlorfon) on fish *Heteropneustis fossilis*. *Journal of Industrial Pollution Control*, 30(2), 293-295.
- 24-Mohammed, R.A., Tohamy, A.F., Mahmoud, M.A., Elhady, M.A., Soliman, M.M., 2016. Subchronic toxicity of deltamethrin and tetramethrin in Nile tilapia fish. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 5(10), 28-52.
- 25-OECD (Organization Economic Cooperation Development), 2001. Guideline for testing of chemicals. No. 210. Section 2. Effect on biotic system direction, pp. 1-39.
- 26-Ozkan, F., Gul Gunduz, S., Berkoz, M., Ozluer Hunt, A., Yalın, S., 2012. The protective role of ascorbic acid (vitamin C) against chlorpyrifos-induced oxidative stress in *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiology Biochemistry*, 38, 635–643.
- 27-Sadeghi, A., Hedayati, A.A., 2013. Investigation of Acute Toxicity Diazinon, Deltamethrin, Butachlor and pretilachlor on Zebra Cichlid (*Cryptoheros nigrofasciatus*). *Iranian Journal of Toxicology*, 8(25), 1086-1092.
- 28-Shankar Murthy, K., Kiran, B.R., Venkateshwarlu, M., 2013. A review on toxicity of pesticides in Fish. *International Journal of Open Scientific Research*, 1(1), 15-36.
- 29-Vani, T., Saharan, N., Mukherjee, C., Ritesh, R., Rajesh, K., Brahmchari, K., 2011. Deltamethrin induced alterations of hematological and biochemical parameters in fingerlings of *Catla catla* (Ham.) and their amelioration by dietary supplement of