

بررسی اثر مقدار حاد علف‌کش ترکیبی ۲،۴-dichlorophenoxyacetic acid و (۲-methyl-۴-chlorophenoxyacetic acid) بر فاکتورهای خونی و آنزیم‌های کبدی ALT و AST قزل‌آلای رنگین‌کمان rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

محسن علی^۱، فرزاد غیائی^۲، هدیه بدخشان^۳

دریافت: ۹۲/۰۹/۱۰ پذیرش: ۹۲/۱۲/۰۶

چکیده

زمینه و هدف: در طی سال‌های اخیر به دلیل مصرف بی‌رویه انواع سموم کشاورزی از جمله علف‌کش‌ها در طی عملیات زراعی، این ترکیبات طی فرایند زهکشی به اکوسیستم‌های آبی وارد شده که در نهایت با آثار زیانبار این ترکیبات بر جمعیت گونه‌های آبی موجود در آن مواجه هستیم. در این مطالعه، اثر علف‌کش توفوردی - ام‌سی‌پی‌آ از جمله سموم پرمصرف کشاورزی در استان کردستان بر پارامترهای خون‌شناسی و آنزیم‌های کبدی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به عنوان گونه مهم پرورشی در این استان مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: پس از تعیین LC_{50} سم با استفاده از مدل پروبیت، تعداد ۶۰ عدد ماهی قزل‌آلای سالم با میانگین وزنی ۹۷ g به دو گروه تقسیم شدند. گروه اول به عنوان شاهد در نظر گرفته شد و در گروه دوم، به میزان ۱ (mL/L) (معادل ۳۶۰ mg/L توفوردی + ۳۱۵ mg/L ام‌سی‌پی‌آ) علف‌کش مورد استفاده قرار گرفت. پس از ۷۲ h، پارامترهای خون‌شناسی، شامل تعداد کلی گلبول‌های قرمز و سفید، تعداد تفریقی گلبول‌های سفید، هماتوکریت و مقادیر آنزیم‌های سرمی ALT و AST اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: مقادیر شاخص‌های خونی شامل لوکوسیت، مونوسیت و ائوزینوفیل در گروه تحت تیمار سم به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش یافت. در حالی‌که، مقادیر لنفوسیت، اریتروسیت و هماتوکریت در مقایسه با گروه شاهد کاهش قابل ملاحظه‌ای داشت ($p < 0/05$). بین میزان نوتروفیل در دو گروه شاهد و تیمار تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. همچنین مقادیر آنزیم‌های کبدی ALT و AST در گروه تیمار به‌طور معنی‌دار نسبت به گروه شاهد افزایش یافت ($p < 0/05$). همچنین میزان تلفات پس از ۷۲ h در گروه تیمار شده با سم ۲۵٪ محاسبه شد.

نتیجه‌گیری: مواجهه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با علف‌کش MCPA + D-24 موجب کاهش مقادیر اریتروسیت و هماتوکریت خون شده که در نهایت اختلال در فرایند خون‌رسانی و کمبود اکسیژن را به دنبال دارد. آسیب وارد شده به گلبول‌های قرمز خون و بافت‌های خون‌ساز بدن در نتیجه تماس با سم مذکور، از جمله دلایل احتمالی کاهش سطح این سلول‌ها در خون است. از طرفی افزایش سطح آنزیم‌های کبدی در سرم خون و علائم کالبدگشائی مشاهده شده در اندام کبد، کلیه و آبشش در ماهیان تلف شده نیز آسیب‌های ناشی از مواجهه با این سم را نشان داد.

واژگان کلیدی: توفوردی - ام‌سی‌پی‌آ، فاکتورهای خونی، علف‌کش، آنزیم‌های کبدی

۱- کارشناس ارشد بوم‌شناسی آبزیان، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران

۲- نویسنده مسئول) دکترای بهداشت و بیماری‌های آبزیان، استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه کردستان

۳- دکترای ژنتیک بیومتری، اصلاح نباتات، استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان

مقدمه

در طی سال‌های اخیر به منظور افزایش بهره‌برداری بیشتر از محصولات کشاورزی، از علف‌کش‌ها به طور گسترده‌ای استفاده شده است که در نتیجه آن، مقادیر قابل توجهی از این گونه ترکیبات سمی در نتیجه فرآیند شسته شدن از سطح خاک و گیاه و زهاب به اکوسیستم‌های آبی وارد شده‌اند، که در نهایت منجر به ایجاد آثار زیانباری بر جمعیت گونه‌های آبی موجود در این اکوسیستم‌ها می‌شوند. از میان سموم کشاورزی پر مصرف، علف‌کش‌ها از جمله ترکیباتی هستند که سوء مصرف آن‌ها در این زمینه باید مورد توجه قرار گیرد. در میان علف‌کش‌ها، ترکیبات فنوکسی (Phenoxy) دارای پتانسیل سمیت بالایی برای موجودات زنده هستند. این ترکیبات، در سال ۱۹۴۰ به دنیا معرفی شدند و جزء علف‌کش‌های انتخابی هستند که برای از بین بردن علف‌های هرز پهن برگ به کار گرفته می‌شوند (۱). از جمله آن‌ها، می‌توان به یک نوع علف‌کش ترکیبی بنام ۲,۴-dichlorophenoxyacetic acid (۲,۴- [methyl-۴-Chlorophenoxyacetic D]; ۲- acid (MCPA) اشاره کرد (۲).

بر اساس گزارش کارخانجات سازنده (AgroSciences, and AGRO-GOR, Dow Nufarm, U.S.A) توفوردی-ام‌سی‌پی یکی از پر مصرف‌ترین علف‌کش‌ها در دنیا محسوب می‌شود (۳). این سم نوعی علف‌کش هورمونی (اکسین سنتتیک) است که در مزارع گندم و جو مورد استفاده قرار می‌گیرد و به دو فرم نمک و استر فرموله می‌شود (۴). همچنین نیمه عمر آن در محیط آبی دارای اکسیژن کافی، ۱۵ روز و در محیط بدون اکسیژن تا ۳۳۳ روز تخمین زده شده است (۵).

سمیت توفوردی-ام‌سی‌پی برای آبزیان، بستگی زیادی به فرم شیمیایی آن دارد. بطوری که فرم استری این سم در داخل آب پس از هیدرولیز به صورت ساختار شیمیایی اسید تغییر می‌کند که قابلیت جذب و امکان نفوذ بیشتری به پیکره آبی را دارد. از طرفی فرم اسیدی زمان ماندگاری (نیمه عمر) بیشتری نسبت به فرم‌های دیگر سم دارد. همچنین مطالعات انجام شده نشان می‌دهد فرایند جذب سطحی این سم بخصوص در بافت اپیتلیوم آبشش در ماهی‌ها به خوبی صورت می‌گیرد (۶ و ۷).

از جمله مکانیسم‌های سمیت این علف‌کش می‌توان به القاء رادیکال‌های آزاد ناشی از فرایند متابولیسم آن در پیکره آبزیان از جمله ماهی‌ها اشاره کرد. بطوری که رادیکال‌های آزاد تولید شده

می‌تواند موجب تخریب غشاء فسفولیپیدی سلول طی فرایند پراکسیداسیون لیپید و اختلال در عملکرد طبیعی آن شده، که در نهایت مرگ سلول را به دنبال خواهد داشت (۸ و ۹). همچنین اثرات ژنوتکسیک این سم، شامل افزایش ناهنجاری‌های کروموزومی، شکست زنجیره DNA، افزایش ریز هستک‌های درون سلولی و اختلال در چرخه تقسیم سلولی است که در اریتروسیت‌ها و سلول‌های کبدی مورد بررسی قرار گرفته است (۸). مطالعه صورت گرفته بر روی یک گونه از ماهیان آب‌شیرین بنام (*Channa punctatus*) آسیب‌های وارده ذکر شده در مطالب فوق را توسط سم توفوردی بر روی ژن‌های این ماهی‌ها تایید می‌کند (۱۰). همچنین این علف‌کش می‌تواند سبب شکست در رشته‌های کروماتید و کروموزوم‌ها و همچنین ایجاد ریز هستک‌ها در سلول‌های خون انسان شود (۱۱). مقادیر LC_{50} گزارش شده سم توفوردی طی ۹۶ h با توجه به شرایط محیطی و به خصوص دما متغیر است. این مقدار در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ۳۷۷ ppm گزارش شده است (۱۲).

در ایران به طور بی‌رویه‌ای از انواع علف‌کش‌ها استفاده می‌شود. میزان متوسط مصرف سالیانه آن‌ها در کشور $10^6 \text{ Kg} \times 12$ است که توزیع آن بصورت 7 kg/h ذکر شده است. در حالی که، میزان مصرف علف‌کش در دنیا 0.8 kg/h برآورد شده است (۱۳). یکی از پر مصرف‌ترین علف‌کش‌ها در ایران و به ویژه در استان کردستان توفوردی-ام‌سی‌پی است که در طی مدت زمان یک سال از ۱۳۸۹ تا ۱۳۹۰ در حدود 50366 L بوده که این توسط سازمان جهاد کشاورزی استان مذکور گزارش شده است (طبق آمار دریافت شده بصورت مکاتبه‌ای از سازمان جهاد کشاورزی استان کردستان در سال ۹۰-۱۳۸۹).

از آنجایی که ویژگی‌های بیوشیمیایی خون به عنوان یکی از مهم‌ترین شاخص‌های وضعیت فیزیولوژیک ماهی قلمداد می‌شود، ورود آلاینده‌ها در پیکره موجود زنده می‌تواند موجب تغییر قابل توجه و معنی‌داری در پروفایل بیوشیمیایی خون شود که در واقع بازتابی از ایجاد تغییرات در پروسه متابولیسم طبیعی بدن ماهی است که در نتیجه متابولیسم آلاینده طی فرایند سم‌زدایی حاصل می‌شود (۱۴). از جمله فاکتورهای بیوشیمیایی مهم، آنزیم‌های کبدی ALT و AST هستند که از سنجش آنها به عنوان یک شاخص آزمایشگاهی استاندارد جهت بررسی

میزان LC_{50} علف‌کش توفوردی-ام‌سی‌پی‌آ به شیوه آزمون و خطا تعداد ۱۲۰ عدد ماهی در شش گروه و در شرایط کاملاً یکسان در آکواریوم‌های L_1 ۱۴۰ که هر کدام واجد ۲۰ ماهی قزل‌آلا بودند در طی ۹۶ h تحت تاثیر مقادیر مختلف توفوردی -ام‌سی‌پی‌آ ۵/۶۷٪ قرار گرفتند و سپس با استفاده از مدل پروبیت (۱۹)، میزان LC_{50} سم پس از ۹۶ h بدست آمد. پس از تعیین LC_{50} سم، جهت بررسی اثرات حاد سم بر فاکتورهای خونی و آنزیم‌های کبدی ماهی قزل‌آلا، تعداد ۶۰ عدد ماهی باقیمانده به طور تصادفی در دو گروه مساوی شاهد و تیمار در آکواریوم‌های L_1 ۱۴۰ تقسیم شدند. آکواریوم‌ها با آب چاه (میزان اکسیژن محلول 8 mg/L ، pH برابر با ۸/۳، سختی کل معادل ۲۰۵ برحسب CaCO_3 و قلیائیت 195 mg/L و درجه حرارت $20.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ آبیگری شدند. ماهیان گروه اول در آب عاری از سم نگهداری شدند در حالی که، آکواریوم گروه دوم (گروه تیمار) در معرض 1 mL از سم توفوردی + ام‌سی‌پی‌آ ۵/۶۷٪ (مقدار حاد): شامل 360 mg/L سم توفوردی و 315 mg/L ام‌سی‌پی‌آ قرار گرفتند. پس از سپری شدن ۷۲ h از ماهی‌های گروه‌های آزمایشی نمونه‌برداری شد.

-خون‌گیری:

خون‌گیری با سرنگ و سرسوزن نمره ۲۰ از طریق ورید ساقه دمی انجام گرفت. بخشی از نمونه‌های خون در لوله‌های $1/5 \text{ mL}$ حاوی ماده ضد انعقاد هپارین برای مطالعات خون‌شناسی و بقیه خون برای تهیه سرم و مطالعات آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت. سرم‌های جدا شده تا زمان اندازه‌گیری آنزیم در دمای 20°C -نگهداری شدند.

-روش‌های خون‌شناسی

جهت شمارش گلبول‌های سفید، گلبول‌های قرمز، شمارش تفریقی گلبول‌های سفید و هماتوکریت گلبول‌های قرمز و گلبول‌های سفید از روش Svobodova استفاده شد (۲۰).

-اندازه‌گیری آنزیم‌های سرمی

آنزیم‌های سرمی آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) و آسپاراتات آمینو ترانسفراز (AST) با استفاده از دستگاه اتو آنالایزر-BT ۱۵۰۰ ساخت کشور ایتالیا براساس دستورالعمل کشور سازنده دستگاه اندازه‌گیری شدند.

اختلالات کبدی در موجودات استفاده می‌شود. این آنزیم‌ها، اساساً داخل سلولی هستند و در بسیاری از اندام‌های مختلف دیگر ماهی نیز یافت می‌شوند. با توجه به اینکه، در حالت طبیعی مقادیر این آنزیم‌ها در داخل سلول بیشتر از خارج سلول است، بنابراین افزایش مقادیر جزئی آنها در محیط خارج سلول اعم از مایع بین سلولی و پلاسما بعنوان یک اندیکاتور حساس، بیانگر وقوع آسیب سلولی در مواجهه با انواع آلاینده‌های وارد شده به بدن موجود زنده خواهد بود (۱۶ و ۱۵).

امروزه با افزایش کاربرد بسیاری از ترکیبات شیمیایی در بخش‌های کشاورزی و صنعتی در دنیا، ضروری است که تکنیک‌های محاسبه و تعیین مقادیر سمیت این‌گونه ترکیبات نیز توسعه یابد. در مرحله نخست، سمیت حاد این مواد بر روی جلبک‌ها، ماهی‌ها و دیگر موجودات زنده باید مورد ارزیابی قرار بگیرد تا خطرات ناشی از مواجهه با آنها مشخص شوند. اگرچه، آزمایش‌های مسمومیت بر روی آبزیانی که در ابتدای زنجیره غذایی اکوسیستم‌های آبی هستند از جمله، بی‌مهرگانی همچون کلادوسرها، روتیفر و گروه‌های دیگر انجام گرفته است، اما چگونگی تاثیر مواد سمی بر روی این موجودات به ماهی‌ها قابل تعمیم نیست زیرا که، ماهی‌ها در حلقه‌های بالاتر زنجیره و هرم غذایی قرار می‌گیرند و تاثیرات مخرب این ترکیبات را بهتر نمایان می‌سازند (۱۷ و ۱۸).

با توجه به مصرف بالای سم توفوردی-ام‌سی‌پی‌آ در استان کردستان و ضمن این‌که، گونه قزل‌آلای رنگین‌کمان یکی از گونه‌های مهم پرورشی و حساس به انواع آلاینده‌ها در این استان است، ارزیابی پارامترهای خون‌شناسی و آنزیم‌های کبدی به‌عنوان شاخص مناسبی در تعیین آلودگی‌های محیطی در ماهی قزل‌آلا ضروری به‌نظر می‌رسد بنابراین، در مطالعه اخیر تاثیر میزان کشنده سم توفوردی-ام‌سی‌پی‌آ بر روی پارامترهای خونی قزل‌آلا رنگین‌کمان مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

-تعیین LC_{50} سم در ماهی قزل‌آلا

تعداد ۱۸۰ عدد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی 97 g از یکی از مزارع پرورش ماهی در استان کردستان تهیه شده و به منظور سازگار شدن با محیط، قبل از انجام آزمایش‌ها، یک هفته در شرایط آزمایشگاه نگهداری شدند. جهت تعیین

-تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه داده‌ها با استفاده از آزمون t student مستقل در سطح معنی داری ۰/۵٪ و به کمک نرم‌افزار آماری SPSS انجام شد.

یافته‌ها

در طی ۷۲ h زمان آزمایش تاثیر سم توفوردی-ام‌سی‌پی‌آ، هیچگونه تلفاتی در گروه ماهیان شاهد مشاهده نشد در صورتی که میزان تلفات در گروه تیمار به ۲۵٪ رسید. در ماهیان تلف شده علائم کالبدگشایی نظیر پرخونی در اندام‌های آبشش، کلیه، طحال و روده و همچنین، بزرگی کلیه، کبد و طحال مشاهده شد. شاخص‌های خونی در دو گروه شاهد و تیمار پس از ۷۲ h اندازه‌گیری شدند و پس از حصول اطمینان از نرمال بودن داده‌ها، با استفاده از آزمون t مستقل، معنی دار بودن اختلاف دو گروه از لحاظ این شاخص‌ها، مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن در جدول ۱ منعکس است. براساس نتایج مندرج در جدول ۱ مشخص شد که مقادیر شاخص‌های خونی لوکوسیت-مونوسیت و ائوزینوفیل به طور معنی داری ($p < 0/05$) در گروه تیمار افزایش یافته است (نمودارهای ۳-۵-۶). در حالی که، مقادیر لنفوسیت، اریتروسیت (گلبول‌های قرمز) و هماتوکریت به طور معنی داری ($p < 0/05$) در گروه تیمار (نمودارهای ۱-۲-۴). تغییر در تعداد نوتروفیل در گروه تیمار نسبت به گروه شاهد معنی دار نبود ($p < 0/05$). با مقایسه مقدار آنزیم‌های کبدی ALT و AST کبدی در دو گروه تیمار و شاهد مشخص شد که مقدار این آنزیم‌ها در گروه تیمار به طور قابل توجهی نسبت به گروه شاهد افزایش یافته است ($p < 0/05$). در مطالعه حاضر، ضمن بررسی‌های میکروسکوپی گلبول‌های



شکل ۱: ضایعات Basophilic stippling در گلبول‌های قرمز ماهی قزل‌آلا رنگین کمان ۷۲ h پس از مواجهه با علف کش توفوردی - ام‌سی‌پی‌آ

قرمز در گروه‌های تیمار و شاهد و مقایسه این دو گروه با هم، مشخص شد که گلبول‌های گروه تیمار دارای ضایعات پاتولوژیک Basophilic stippling بودند (شکل ۱) که بیانگر آسیب‌های سلولی در نتیجه تماس با سم است.

بحث

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که در مسمومیت حاد با توفوردی - ام‌سی‌پی‌آ، مقادیر میانگین گلبول‌های قرمز از ۱۰۶۳۳۳۳ در گروه شاهد به ۶۱۱۴۲۸/۶ در گروه تیمار به طور معنی داری ($p < 0/05$) کاهش یافت. طی مطالعات صورت گرفته توسط آژانس حفاظت از محیط زیست آمریکا (USEPA) در سال ۲۰۰۳، اثرات ناشی از مواجهه این علف‌کش با موجودات زنده از جمله انسان و جوندگانی مثل موش، با کاهش تعداد گلبول‌های قرمز خون، مقادیر هموگلوبین و همچنین کاهش فعالیت آنزیم‌های کبدی همراه بوده است (۲۱). همچنین طی تحقیقات Bukowska در سال ۲۰۰۳ افزایش مقادیر رادیکال‌های آزاد تولید شده ناشی از متابولیسم سم توفوردی و متابولیت‌های حاصل از آن در گلبول‌های قرمز، و خنثی سازی آنها توسط آنتی اکسیدان‌های درون این گلبول‌های خونی، از جمله گلوتاتیون، در نهایت موجب می‌شود ذخایر سیستم دفاع آنتی اکسیدانی درون گلبول‌های قرمز بطور قابل توجهی مصرف شده و کاهش یابد. در چنین شرایطی رادیکال‌های آزاد با آسیب رساندن به ارگان‌های مختلف سلول‌ها نهایتاً موجبات مرگ آنها را به دنبال خواهند داشت (۲۲). پس می‌توان چنین استنباط کرد که کاهش میزان گلوتاتیون به دنبال فرایند خنثی سازی رادیکال‌های آزاد حاصله از سم مورد مطالعه، احتمالاً یکی از دلایل کاهش گلبول‌های قرمز در ماهیان گروه تیمار است. برطبق مطالعه صورت گرفته توسط Pechanova و همکاران در سال ۱۹۹۹، گلوتاتیون از جمله ترکیبات آنتی‌اکسیدانی است که در سم‌زدایی موادی نظیر هیدروژن پراکساید (H_2O_2) نقش مهمی دارد (۲۳). از طرفی نتایج تحقیقات Bukowska و همکاران در سال ۱۹۹۸ نیز نشان داد که سموم دارای ساختار فنوکسی می‌توانند باعث افزایش هموگلوبین، به دنبال کاهش ظرفیت حمل اکسیژن توسط خون در ماهیان تحت تاثیر شوند (۲۴).

با توجه به نتایج مطالعه حاضر، میانگین تعداد نوترفیل در ماهی قزل‌آلا در گروه شاهد و گروه تیمار شده با سم به ترتیب برابر با ۷/۶۶ و ۸/۴۳ بود، که نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌داری گروه‌های شاهد و تیمار بود ($p < 0/05$). اما نتایج بدست‌آمده از تحقیقات Verschuuren و همکاران در سال ۱۹۷۵، که هدف آن ارزیابی اثر علف‌کش Mecoprop (MCP) بر مشخصات هماتولوژی تعدادی موش صحرائی نژاد Wistar در سنین پس از شیرخواری بود نشان داده شد که در مدت زمان کوتاهی پس از در معرض قرار گرفتن سم، تعداد گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و نوترفیل در این موش‌ها کاهش یافته است. این علف‌کش همانند توفوردی دارای ساختار کلروفونوکسی بوده و گاهی به صورت ترکیب با توفوردی و ام‌سی‌پی آ بکار می‌رود (۲۹). علت این اختلاف احتمالاً به خاطر اختلاف در گونه‌های مورد آزمایش و شرایط آزمایش است.

از جمله نتایج دیگر بدست آمده از مطالعه حاضر، کاهش معنی‌دار ($p < 0/05$) مقدار میانگین هماتوکریت از ۳۸/۸۷٪ در گروه شاهد به ۲۹/۴۲٪ در گروه تیمار بود. اما نتایج مطالعات Paulino و همکاران در سال ۱۹۹۶ نشان داد که اثرات مقادیر حاد، مزمن و تحت مزمن سم توفوردی در رت به ترتیب موجب افزایش، عدم تغییر معنی‌دار و افزایش در میزان هماتوکریت می‌شود (۳۰).

در مطالعه اخیر مقادیر میانگین آنزیم کبدی ALT از ۲۳/۲۲۳۲ U/L در گروه شاهد به ۲۲۲/۰۰۰ U/L در گروه تیمار و مقدار میانگین آنزیم AST از ۷۱۴۳ U/L در گروه شاهد به ۲۱۴/۵۰۰ U/L در گروه تیمار بطور معنی‌داری ($p < 0/05$) افزایش داشت. گزارشات مشابه نتایج مذکور در این مطالعه طی تاثیر ترکیبات فنوکسی بر روی آنزیم‌های کبدی حیوانات وجود دارد. بطوری‌که Paulino و همکاران در سال ۱۹۹۶ گزارش کردند که تاثیر مقادیر حاد سم توفوردی بر روی موش‌های تحت تیمار، می‌تواند موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های کبدی ALT، AST و LDH AP نسبت به گروه شاهد شود (۳۰). علاوه بر این در یافته‌های بدست‌آمده از مطالعه‌ای مشابه که توسط Charles و Leeming صورت پذیرفت، مشخص شد که سگ‌های تحت تیمار علف‌کش Dichlorophenoxybutyric (۲،۴-DB) با افزایش مقادیر آنزیم‌های ALT و AST مواجه

در مطالعه اخیر، با بررسی گلبول‌های سفید و مقایسه آن‌ها در هر دو گروه مشخص شد که میانگین گلبول‌های سفید خون از ۱۰۹۷۷/۷۸ در گروه شاهد به ۲۵۲۰۰ در گروه تیمار افزایش معنی‌داری ($p < 0/05$) داشته است. همچنین، در طی شمارش افتراقی گلبول‌های سفید مشخص شد که مقادیر میانگین لنفوسیت‌ها از ۸۱/۶۶٪ در گروه شاهد به ۶۴/۴۳٪ در گروه تیمار تنزل کرده است. این کاهش می‌تواند به نوبه خود موجب تضعیف فعالیت سیستم ایمنی ماهی شود. بعلاوه مقادیر مونوسیت در گروه تیمار از میزان ۱۰/۵۶٪ در شاهد به ۲۳/۰۶٪ در تیمار افزایش معنی‌داری داشته است. نتایج مطالعه حاضر با یافته‌های بدست آمده تاثیر سم تری‌کلروفون بر پاسخ‌های ایمنی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) توسط Swiki و همکاران در سال ۱۹۹۰ مطابقت دارد (۲۵).

از یافته‌های دیگر این مطالعه، می‌توان به افزایش معنی‌دار مقادیر میانگین ائوزینوفیل از مقدار ۰/۱۱٪ به مقدار ۳/۹۳۷۵٪ اشاره کرد. یافته‌های این پژوهش مشابه با نتایج بدست آمده از مطالعه Dalela و همکاران بود که در سال ۱۹۸۰ انجام پذیرفت و طی آن افزایش در تعداد ائوزینوفیل در مواجهه با سم آلدترین (Aldrin) از جمله سموم کشاورزی، در گونه‌های مختلف ماهی مانند (*Cirrhina mrigala*; *Clarias batrachus*) گزارش شده است (۲۶). همچنین طی مطالعه‌ای که توسط Singh و همکاران در سال ۲۰۰۸ صورت گرفت نیز افزایش شمار ائوزینوفیل در خون ماهی (*Channa punctatus*) طی مواجهه با غلظت حاد فلز مس گزارش شد که مشابه نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر است (۲۷). همچنین در سال ۱۹۹۹، مطالعه‌ای توسط Kobal و Budihna انجام گرفت که طی آن تاثیر سم توفوردی و ام‌سی‌پی آ در دوزهای تحت کشنده بر روی تعداد سلول‌های قرمز و سفید، مقادیر هماتوکریت و هموگلوبین در خرگوش و موش صحرائی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست‌آمده نشان داد بین گروه شاهد و تحت تیمار سم تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. در حالی‌که، بین گروه‌های تیمار شده توسط سم مذکور نسبت به هم در مورد فاکتورهای اندازه‌گیری شده مذکور تفاوت‌های معنی‌دار مشاهده شد، بدین ترتیب که با افزایش مقادیر این سم، مقدار لنفوسیت و ائوزینوفیل افزایش و مونوسیت کاهش یافت (۲۸).

مشابه که بوسیله Sarikaya و Yilmaz در سال ۲۰۰۳ صورت گرفت سمیت حاد علف کش توفوردی بر رفتار کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) با میانگین وزنی ۷۵ g مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش به تغییرات رفتاری و بالینی در گروه‌های تیمار مانند پرش‌های ناگهانی، شنای غیر طبیعی، ضربه‌زدن به مخزن نگهداری، شنای رو به پایین و عمودی، از دست دادن تعادل، رنگ‌پریدگی، افزایش ترشح موکوس، اختلالات تنفسی و استقرار در سطح آب اشاره شده است. همچنین در مطالعات نکرپسی صورت گرفته در این تحقیق به خونریزی‌هایی در سطح سیستم گوارشی و دفعی نمونه‌های مورد آزمایش به همراه تورم بافت کبد نیز اشاره شده است (۳۷). همچنین Shallangwa در سال ۲۰۱۱ تاثیر حاد این سم را بر گونه‌ای از ماهیان آفریقایی بنام (*African mud fish*) و با نام علمی (*Clarias gariepinus*) مورد بررسی قرار داد که منجر به افزایش میزان تهویه آبشش، ازدست دادن تعادل، قرارگیری در سطح آب، نکروز انعقادی تیغه‌های اولیه آبششی و دیگر عوارض نامطلوب در ماهیان تحت تیمار این سم شد (۳۸). آنچه بعنوان نکته ضروری در مطالعات اکوتوکسیکولوژیک مطرح است در نظر گرفتن شرایط محیطی است چرا که ویژگی‌هایی مثل دما، نور و اکسیژن یکی از مهم‌ترین فاکتورهای زیستی برای ماهیان، از جمله گونه‌ای مثل قزل‌آلای رنگین‌کمان محسوب می‌شوند و از طرفی نیمه عمر ترکیبات سمی نیز که بیانگر ماندگاری آن‌ها در محیط پیرامون ماهی است، می‌تواند تحت تاثیر فاکتورهای محیطی قرار گرفته و طی زمان‌های متفاوت تجزیه شده یا پایدار بماند (۳۹). به طور کلی اثرات ناشی از مواجهه با این سم بستگی به نوع ساختار شیمیایی آن (فرمولاسیون)، سن و گونه ماهی، کیفیت آب و ویژگی‌های محیطی از جمله دما و فصل دارد (۴۰).

نتیجه‌گیری

به‌عنوان نتیجه‌گیری می‌توان یکی از دلایل مرگ و میر در ماهیان گروه تیمار که در معرض مقدار حاد توفوردی - ام‌سی‌پی‌آ قرار گرفتند را احتمالاً اختلال در خون‌رسانی و کمبود اکسیژن ذکر کرد. یکی از دلایل مهم کمبود اکسیژن، کاهش گلبول‌های قرمز ماهی‌های در معرض سم است. آسیب‌های مذکور در نتیجه القاء

شدند (۳۱). Paulino و همکاران در سال ۱۹۹۵ پژوهشی تحت عنوان تاثیر حاد توفوردی بر روی آنزیم‌های کبدی سرم گاوی انجام دادند که در نهایت یافته‌ها نشان دادند که این سم سبب اختلال در فعالیت‌های آنزیمی شده و از جمله آن می‌توان به کاهش فعالیت آنزیم AST اشاره کرد (۳۲). از طرفی در مطالعه دیگری که Morgulis و همکاران در سال ۱۹۹۸ انجام دادند تاثیر حاد توفوردی بر جوجه‌های گوشتی مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش مواجهه سم از طریق خوراکی انجام شده و نتایج بدست‌آمده تغییرات معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های کبدی ALT, AST را پس از مواجهه با سم نشان ندادند (۳۳).

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از پژوهش حاضر می‌توان گفت که یکی از شاخص‌های مهم در بررسی تفاوت میان شرایط نرمال و غیر نرمال اکولوژیک برای ماهیان، مطالعات هماتولوژی و بررسی تغییر در پارامترهای آن است. طبق تحقیقات صورت گرفته ترکیبات سمی به‌راحتی می‌توانند به سیستم گردش خون ماهیان وارد شوند، چرا که، ماهیان در محیط‌های آبی آلوده به سموم به‌طور دائمی غوطه‌ور هستند و اندام‌های بدن به‌ویژه اندام‌های تنفسی در مدت زمانی طولانی در معرض مستقیم سم قرار می‌گیرند (۳۴).

از جمله خصوصیات علف‌کش توفوردی پس از ورود به بدن موجودات آبی، عبور این ترکیب از جدار روده و کلیه بوده که در مرحله بعد با توجه به قابلیت حلالیت آن در خون و مایعات میان‌بافتی، امکان جابجایی و انتقال به ارگان‌ها و بافت‌های مختلف بدن را داراست (۳۵). در مطالعه‌ای که توسط Sturtz و همکاران در سال ۲۰۰۰ صورت گرفت وجود سم توفوردی در اندام‌های معده، خون، کلیه و مغز نوزادان موشی شناسایی شد که والد ماده آن‌ها در مدت ۷۲ h در معرض این سم قرار داشت (۳۶).

در مطالعه حاضر از تغییر علائم رفتاری و بالینی مشاهده شده در ماهیان در معرض سم توفوردی - ام‌سی‌پی‌آ می‌توان به شنای غیرطبیعی، رنگ‌پریدگی، افزایش حرکات سرپوش‌های آبششی و اختلالات تنفسی در آنها اشاره کرد. در بررسی‌های کالبدگشایی، تورم کبد، آسیب و تجمع مایعات درحفره بطنی و رنگ‌پریدگی آبشش‌ها مشاهده شد. درمطالعه‌ای

رادیکال‌های آزاد ناشی از سم در سلول‌های مذکور رخ می‌دهد. از طرفی آسیب‌های مذکور در بافت‌های خون‌ساز از جمله کلیه نیز از جمله دلایل دیگر کاهش گلبول‌های قرمز است. همچنین از جمله مکانیسم‌های دیگر این سم می‌توان به اثرات ژنوتکسیک آن از جمله افزایش ناهنجاری‌های کروموزومی، شکست زنجیره DNA، همچنین افزایش ریز هستک‌های درون سلولی و اختلال در چرخه تقسیم سلولی اشاره کرد که در سلول‌های خونی از جمله اریتروسیت‌ها و سلول‌های کبدی موجبات مرگ سلولی را به دنبال دارد. همچنین افزایش سطح آنزیم‌های کبدی (ALT, AST) سنجش شده در سرم خون احتمالاً به دلیل اثرات مخرب سم بر بافت کبد و تخریب آن است. همچنین با توجه به علائم کالبدگشائی مشاهده شده در اندام‌هایی نظیر آبشش، کلیه و کبد در ماهیان تلف شده، می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً تاثیر سم بر این اندام‌ها از دلایل دیگر مرگ و میر و تغییرات رفتاری در ماهیان مورد آزمایش است، که تایید این مطلب نیاز به مطالعات بیشتر و بررسی اثرات پاتولوژیک سم بر روی اندام‌های حیاتی ماهی دارد. در هر حال، میزان سمیت این دسته از علف‌کش‌ها بستگی به گونه ماهی، دمای آب و وزن ماهی دارد بعلاوه، میزان تاثیر سم در یک گونه از ماهی نیز می‌تواند تحت تاثیر فاکتورهای مختلف فردی و محیطی قرار بگیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پروژه با عنوان بررسی اثر مقدار حاد علف‌کش ترکیبی توفوردی + ام‌سی‌پی آبرفاکتورهای خونی و آنزیم‌های کبدی ALT و AST قزل‌آلای رنگین‌کمان در مقطع کارشناسی بوده که در سال ۱۳۹۰ با حمایت گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی دانشگاه کردستان اجرا شده است. لازم می‌دانم از همکاری مدیریت گروه و مسئولین این دانشکده صمیمانه تشکر و قدردانی نمایم.

منابع

- 1- Ware GW. The Pesticide Book. 5th ed. California: Thomson Publications; 2000.
- 2- Alexander H, Gersich F, Mayes M. Acute toxicity of four phenoxy herbicides to aquatic organisms. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 1985;35(1):314-21.
- 3- Aylward LL, Morgan MK, Arbuckle TE, Barr DB, Burns CJ, Alexander BH, et al. Biomonitoring data for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in the United States and Canada: interpretation in a public health risk assessment context using Biomonitoring Equivalents. *Environmental Health Perspectives*. 2010;118(2):177-81.
- 4- Grabińska-Sota E, Wiśniowska E, Kalka J. Toxicity of selected synthetic auxins—2, 4-D and MCPA derivatives to broad-leaved and cereal plants. *Crop Protection*. 2003;22(2):355-60.
- 5- Aly OM, Faust SD. Herbicides in surface waters, studies on fate of 2, 4-D and ester derivatives in natural surface waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1964;12(6):541-46.
- 6- Meehan WR, Norris LA, Sears HS. Toxicity of various formulations of 2, 4-D to salmonids in southeast Alaska. *Journal of the Fisheries Board of Canada*. 1974;31(4):480-85.
- 7- Finlayson B, Verrue K. Toxicities of butoxyethanol ester and propylene glycol butyl ether ester formulations of 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid (2, 4-D) to juvenile salmonids. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 1985;14(2):153-60.
- 8- Bukowska B. Toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid molecular mechanisms. *Polish Journal of Environmental Studie*. 2006;15(3):365-74.
- 9- Oruc EO, Uner N. Combined effects of 2,4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2000;127(3):291-96.
- 10- Farah MA, Ateeq B, Ali MN, Ahmad W. Evaluation of genotoxicity of PCP and 2,4-D by micronucleus test on freshwater fish *Channa punctatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2003;54(1):25-29.
- 11- Zeljezic D, Garaj-Vrhovac V. Chromosomal aberrations, micronuclei and nuclear buds induced in human lymphocytes by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid pesticide formulation. *Toxicology*. 2004;200(1):39-47.
- 12- Carpenter LA, Eaton DL. The Disposition of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid in Rainbow Trout. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 1983;12(2):169-73.
- 13- Haji Sharafi GHH, Shokouhfar AR. Replace herbicide sugarcanes to reduce consumption and optimal use of pesticide in agro industrial Sugarcane Khuzestan. *Journal of Crop physiology*. 2009;1(1):49-57 (in Persian).
- 14- Edsall CC. A blood chemistry profile for lake trout. *Journal of Aquatic Animal Health*. 1999;11(1):81-86.
- 15- Ayalagu OE, Igbih NM, Dede E. Biochemical changes in the serum and liver of albino rates exposed to petroleum samples (Gasoline, Kerosene, and Crude Petroleum). *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*. 2001;5(1):97-100.
- 16- Parma MJ, Loteste A, Campana M, Bacchetta C. Changes of hematological parameters in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae) exposed to sublethal concentration of cypermethrin. *Journal of Environmental Biology*. 2007;28(1):147-49.
- 17- Brando C, Bohets HL, Vyver IE, Dierickx PJ. Correlation between the in vivo cytotoxicity to cultured fathead minnow fish cells and fish lethality data for 50 chemicals. *Chemosphere*. 1992;25 (2):553-62.
- 18- Castano A, Cantarino MJ, Castillo P, Tarazona JV. Correlation between the RTG-2 cytotoxicity test EC50 and in vivo LC50 rainbow trout bioassay. *Chemosphere*. 1996;32(11):2141-57.
- 19- Finney DJ, Stevens WL. A table for the calculation of working probits and weights in probit analysis. *Biometrika*. 1948;35(1-2):191-201.
- 20- Svobodova Z, Kroupova H, Modra M, Flajshans T, Randak T, Savina LV, et al. Haematological profile of common carp spawners of various breeds. *Journal of Applied Ichthyology*. 2008;24(1):55-59
- 21- USEPA. Hazard Summary: 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid) (including salts and esters) USA: USEPA; 2003 [cited 10 May 2012]. Available from: <http://www.epa.gov/ttnatw01/hlthef/di-oxyac.html/>.
- 22- Bukowska B. Effects of 2,4-D and its metabolite 2,4- dichlorophenol on antioxidant enzymes and level of glutathione in human erythrocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Toxicology & Pharmacology*. 2003;135(4):435-41.
- 23- Pechanova O, Kashiba M, Inoue M. Role of glutathione in stabilization nitric oxide during hypertension developed by inhibition of nitric oxide synthase in rat. *Japanese Journal of Pharmacology*. 1999;81(2):223-29.
- 24- Bukowska B, Resezka B, Duda W, Duchnowicz P. Influence of phenoxy herbicides and their metabolites form of oxy and deoxyhemoglobin of vertebrates. *Biochemistry & Molecular Biology International*. 1998;45(1):47-59.
- 25- Siwicki AK, Cossarini-Dunier M, Studnicka M,

- Demaël A. In vivo effect of the organophosphorus insecticide trichlorophon on immune response of carp (*Cyprinus carpio*). II. Effect of high doses of trichlorophon on nonspecific immune response. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 1990;19(1):99-105.
- 26- Dalela RC, Gupta AK, Verma SR. Aldrin induced alterations in the leucocyte populations of *Clarias batrachus* and *Cirrhina mrigala*. *Journal of Environmental Biology*. 1980;1:55-57.
- 27- Singh D, Nath K, Trivedi SP, Sharma, YK. Impact of copper on haematological profile of freshwater fish, *Channa punctatus*. *Journal of Environmental Biology*. 2008;29(2):253-57.
- 28- Kobal S, Budihna MV. Toxicity of herbicides 2,4-D and MCPA for rats and rabbits. *Acta Veterinaria Brno*. 1999;68(4):281-90.
- 29- Verschuuren HG, Kroes R, Den Tonkelaar EM. Short-term oral and dermal toxicity of MCPA and MCPP. *Toxicology*. 1975;3(3):349-59.
- 30- Paulino CA, Guerra JL, Oliveira GH, Palermo-Neto J. Acute, subchronic and chronic 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) intoxication in rats. *Veterinary & Human Toxicology*. 1996;38(5):348-52.
- 31- Charles JM, Leeming NM. Chronic dietary toxicity study on 2,4-dichlorophenoxybutyric acid in the dog. *Toxicological Sciences*. 1998;46(1):134-42.
- 32- Paulino CA, Palermo-Neto J. Effects of acute 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on cattle serum components and enzyme activities. *Veterinary & Human Toxicology*. 1995;37(4):329-32.
- 33- Morgulis MS, Oliveira GH, Dagli ML, Palermo-Neto J. Acute 2,4-dichlorophenoxyacetic acid intoxication in broiler chicks. *Poultry Science*. 1998;77(4):509-15.
- 34- Hlavova V. Reference values of the haematological indices in grayling (*Thymallus thymallus linnaeus*). *Comparative Biochemical and Physiology*. 1993;105(3):525-32.
- 35- Munro IC, Carlo GL, Orr JC, Sund KG, Wilson RM, Kennepohl E, et al. A comprehensive, integrated review and evaluation of the scientific evidence relating to the safety of the herbicide 2, 4-D. *International Journal of Toxicology*. 1992;11(5):559-664.
- 36- Sturtz N, Evangelista de Duffard AM, Duffard R. Detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) residues in neonates breast-fed by 2,4-Dexposed dams. *Neurotoxicology*. 2000;21(1-2):147-54.
- 37- Sarikaya R, Yılmaz M. Investigation of acute toxicity and the effect of 2, 4-D (2, 4-dichlorophenoxyacetic acid) herbicide on the behavior of the common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758; Pisces, Cyprinidae). *Chemosphere*. 2003;52(1):195-201.
- 38- Shallangwa SM. Toxicity of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid on african mud fish *Clarias gariepinus* (Teugals). *Agricultural Journal*. 2011;6(4):177-80.
- 39- Lindstrom-Seppa p, Oikari A. Biotransformation and other toxicological and physiological responses in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) caged in a lake receiving effluents of pulp and paper industry. *Aquatic Toxicology*. 1990;16(3):187-204.
- 40- Nešković NK, Karan V, Elezović I, Poleksić V, Budimir M. Toxic effects of 2, 4-D herbicide on fish. *Journal of Environmental Science & Health Part B*. 1994;29(2):265-79.

Acute effects of combined herbicides (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) and (2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid) on blood factors and ALT and AST liver enzymes in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

¹Mohsen Ali, ^{2*}Farzad Ghiasi, ³Hedieh Badakhshan

¹Department of Fishery, Natural Resources Faculty, University of Tehran, Karaj, Iran.

²Department of Fisheries, Natural Resources Faculty, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.

³Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.

1 December 2013

25 February 2013

ABSTRACT

Background and Objectives: In the recent years, we confront to harmful effects of toxins such as herbicides on aquatic species due to irregular consumption of these compounds in agricultural operations and drainage of them to water ecosystems. In the present study, the effect of 2,4-D + MCPA “the frequently used herbicide in Kurdistan province” was assessed on the hematological parameters and liver enzymes in rainbow trout as the main aquatic species farmed in this area.

Materials and Methods: After determination of LC50 using Probit model, 60 healthy trout fish with an average weight of 97 g were divided into two groups. The first group was considered as control and in the second treatment group, 1 cc/L herbicide (equivalent to 360 mg/L 2,4-D + 315 mg/L MCPA) was used. After 72 hours, hematology parameters including total number of red and white blood cells, differential count of white blood cells, hematocrit, and serum levels of ALT and AST enzymes were measured.

Results: The values of blood tests including leukocytes, monocytes, and eosinophils in the toxin group was significantly increased in comparison with control group, whereas, the values of lymphocytes, erythrocytes and hematocrit were significantly decreased in toxin group compared with the control ($p < 0.05$). There was no difference between the level of neutrophils in the treatment and control groups. The levels of liver enzymes, ALT and AST, in the treatment group increased significantly compared with the control group ($P < 0.05$). The mortality rate after of 72 hours was 25% in the group treated with the toxin.

Conclusions: Erythrocytes and hematocrit amounts of blood in rainbow trout were decreased due to exposure to 2,4-D + MCPA herbicide that eventually leads to oxygen deficiency and inefficient blood supply. The contact of red blood cells and hematopoietic tissues to toxin and destruction of them are led to loss of the cells in the blood. On the other hand, liver, kidney and gills autopsy of the wasted fish and the increasing of liver enzymes in the blood and tissues showed that exposure to the toxin lead to damages in fish blood cells and tissues.

Keywords: 2,4-D+ MCPA; blood factors; herbicide, liver enzymes.

*Corresponding Author: f.ghiasi@uok.ac.ir

Tel: + 98 8716620551