

تأثیر غلظت های تحت کشنده دیازینون بر بافت بیضه در ماهی گورخری (*Danio rerio*)

معصومه درویشی^۱، رقیه صفری^۲

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد شیلات- تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران.

M_darvishi_m71@yahoo.com

۲- استادیار گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۸/۹/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۹/۲/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: دیازینون از سموم ارگانوفسفره پر کاربرد در مزارع کشاورزی است که جهت از بین بردن آفات و کرم ساقه خوار در مزارع استفاده می شود. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر غلظت های تحت کشنده دیازینون بر بافت بیضه در ماهی گورخری (*Danio rerio*) انجام گرفت.

روش کار: بدین منظور ۲۴۰ عدد ماهی نر با میانگین وزنی 0.2 ± 0.05 پس از ۲ هفته سازگاری با شرایط آزمایشگاه در ۳ تیمار تحت کشنده سم دیازینون که پس از انجام تست LC50 به ترتیب ۰/۸، ۱/۶ و ۳/۲ میلی گرم بر لیتر و تیمار شاهد به مدت ۳۰ روز قرار گرفتند. در پایان دوره از بافت بیضه ماهیان نمونه برداری و سپس مقاطع بافتی تهیه شد.

یافته ها: در بررسی بافتی بیشترین ناهنجاری در دوز بالاتر (۳/۲ میلی گرم بر لیتر) مشاهده گردید که کاهش اندازه گناد از مهم ترین آن می باشد. در برش بافتی گروه شاهد بافت بیضه از اندازه و رشد مناسب برخوردار بوده و سلول ها در مرحله رسیدگی جنسی قرار داشتند، در صورتی که در تیمار ۰/۸ میلی گرم بر لیتر آتروفی سلول های جنسی بافت بیضه مشاهده شد. همچنین در این تیمار دیواره لوبول ها نیز از بین رفته بود. در تیمار ۱/۶ میلی گرم بر لیتر دژنره شدن و آتروفی سلول های جنسی، از بین رفتن شکل و دیواره لوبول ها مشاهده شد. در بالاترین غلظت سم، دژنره شدن و آتروفی سلول های جنسی، از بین رفتن شکل و دیواره لوبول ها و کاهش تعداد سلول های جنسی مشاهده شده که این کاهش تعداد سلول های جنسی و عوارض مشاهده شده موجب کاهش اندازه بافت بیضه نیز می شود.

نتیجه گیری: این مشاهدات نشان دهنده افزایش عوارض و ناهنجاری های سم دیازینون بر بافت بیضه ماهی گورخری با افزایش غلظت سم می باشد.

واژه های کلیدی: دیازینون، بافت بیضه، ماهی گورخری.

مقدمه

شسته و وارد آب های زیرزمینی، سطحی و در نهایت محیط زیست آبزیان شود و بر گستره وسیعی از آبزیان غیر هدف از جمله ماهی ها، پستانداران و بی مهرگان آبرزی تاثیر گذارد (۳۰). از آن جایی که آبزیان دارای سطوح تماس فیزیولوژیک بالا از جمله خون در آبشش با آب می باشند، بنابراین سموم به سرعت از طریق آبشش جذب خون شده و وارد اندام هایی مانند کبد، کلیه و گناد و برخی

در حال حاضر استفاده از آفت کش ها به میزان زیادی افزایش یافته که از عمده ترین مواد آلاینده محیط های آبی و عامل مسمومیت آبزیان به شمار می روند (۴۵، ۶). دیازینون یک سم ارگانوفسفره غیرسیستمیک است (۱۵) که جزو سموم تماسی و نفوذی بوده (۳) و در مزارع کشاورزی و باغ مرکبات، برای از بین بردن آفات و کرم ساقه خوار استفاده می شود (۱۸). این سم به راحتی می تواند

بیماری‌ها داشته و کاوش‌ها یا یافته‌های بافت‌شناسی امکان افزایش دانش ما در مورد اثرات آلاینده‌ها روی ماهی‌ها را توسعه می‌بخشد (۷). مطالعات مختلفی در رابطه با اثر آلاینده‌ها بر بافت بیضه از جمله اثر سم دیازینون در ماهی سفید (۵)، ماهی کپور (۱۱)، ماهی *Lepomis macrochirus* (۱۹)، علف کش رانداپ در ماهی قزل-آلا (۲۳)، نیتريت در ماهی گورخری (۳۲) و میکروسیستین لوسین در ماهی مداکا (۴۴) و ماهی گورخری (۴۱) توسط محققین مختلف بررسی شده است. با این وجود، با توجه به گزارشات مختلف در رابطه با شیوع بالای اختلالات تولیدمثلی و هم چنین به دلیل ساختار فعال و بسیار حساس بافت های زاینده از جمله بیضه و دستگاه تولیدمثلی به عوامل خارجی و استفاده از سم دیازینون در کشاورزی، در مطالعه حاضر به بررسی تأثیر غلظت‌های تحت کشنده سم دیازینون بر بافت بیضه ماهی گورخری (*Danio rerio*) به عنوان گونه مدل پرداخته شده است. ماهی گورخری یک گونه کوچک از ماهیان استخوانی آب شیرین متعلق به خانواده‌ی Cyprinidae از راسته Cypriniformes، بومی منطقه هیمالیا می‌باشد که به راحتی در آزمایشگاه نگهداری و پرورش می‌یابد. جنس نر و ماده از هم جدا و قابل تشخیص است و جنس‌های نر دارای بدنی دوکی شکل می‌باشند (۴). این گونه ماهی به جهت سهولت در نگهداری و هزینه پایین، باروری بالا، در دسترس بودن کامل توالی ژنوم، دستکاری راحت، همولوگ بودن بسیاری از ژن‌های این ماهی با پستانداران، وجود سویه‌های جهش یافته و شباهت بالای ژنتیکی، فیزیولوژیکی و فارماکولوژیکی با انسان به یک گونه مدل و محبوب تبدیل شده است (۴۰، ۲۸، ۲۵، ۲۴، ۲۰، ۱۷، ۱۳). به همین جهت مطالعات زیادی با استفاده از این گونه مدل در راستای ارزیابی عملکرد تولیدمثلی در محور هیپوتالاموس، هیپوفیز و گناد صورت گرفته است (۴).

مواد و روش‌ها

از اندام‌های دیگر می‌شود (۳۱). مکانیسم اثر سم دیازینون مهار شدن کلیه آنزیم‌ها به ویژه آنزیم استیل کولین استراز است (۲۶) که روی اعصاب مرکزی اثر مخرب برجای گذاشته و می‌تواند موجب مرگ جنین در مراحل اولیه بارداری شود (۳۶، ۳۴، ۲۷). هم چنین در غلظت‌هایی که کشندگی ندارد باعث سایر اختلالات بیولوژیکی و اکولوژیکی مانند عقیم کردن، کاهش همآوری و تولیدمثل، عدم رشد کافی در موجودات می‌شود (۲). سم دیازینون اگرچه پس از استفاده در مزارع به سرعت تجزیه می‌شود ولی تحت شرایط خاص، پایین بودن دما، رطوبت پایین، قلیائیت بالا و فقدان فعالیت تجزیه‌ای میکروبی (۱۲) معمولاً به مدت ۱۴-۱۲ هفته در خاک به صورت فعال باقی مانده و پس از برخورد با پوست و مخاط به آسانی جذب می‌شود (۲۹، ۱۶). با این که بسیاری از متابولیت‌های فعال این سموم در بدن دفع می‌شوند ولی مقدار باقی مانده آن در بافت‌های مختلف از جمله در اندام‌های جنسی می‌تواند تاثیر منفی برجای گذارند (۹). تاثیر بر سلول‌های جنسی نر، افزایش ناهنجاری در ساختار اسپرم افرادی که در معرض این گونه سموم هستند، آتروفی شدن سلول‌های لایدیگ، کاهش سطح تستوسترون سرم خون، کاهش قطر سلول‌های ژرمینال، هم چنین گاهی افزایش و گاهی کاهش قطر مجاری اسپرم‌ساز از جمله مواردی است که در بعضی از مطالعات گزارش شده است (۱۸، ۹). این گونه عوارض تنها به جنس نر اختصاص ندارد. سم دیازینون در جنس ماده نیز موجب کاهش قطر تخمدان، ایجاد بافت نکروز در تخمدان، افزایش فولیکول‌های آترتیک و تخریب اووسیت‌های بالغ می‌شود (۳۳). علم بافت‌شناسی به مطالعه ساختمان‌های کوچک گیاهان و جانوران پرداخته و در هیستوپاتولوژی یا آسیب‌شناسی بافتی هدف اصلی شناخت و تشخیص بیماری‌ها از طریق تغییرات مرضی در بافت‌ها می‌باشد. به همین دلیل مطالعات هیستوپاتولوژی نیز اهمیت به سزایی در تشخیص، سبب‌شناسی و پیشگیری از

تک قالب گیری و پارافینه شدند (۲۳). از قالب‌های پارافین با استفاده از دستگاه میکروتوم برش‌هایی با ضخامت ۵μm تهیه و پس از قرار دادن بر روی لام، به مدت نیم ساعت در آن (۶۰°C) قرار داده شد تا پارافین اضافه از روی بافت حذف شود. نمونه‌ها پس از پارافین زدایی و جایگزینی آن با زایلن به وسیله سری‌های کاهشی اتانول (۱۰۰، ۹۰ و ۷۰) آب‌دهی مجدد و با استفاده از محلول‌های هماتوکسیلین و انوزین رنگ آمیزی شدند. بافت‌های تهیه شده مجدداً به آن منتقل شده تا خشک شوند. تمامی مواد مورد استفاده در این مراحل محصول شرکت مرک بود. در نهایت با استفاده از چسب هیستوفلوئید بر روی لام‌های تهیه شده لامل چسبانده شد (۲۱). سپس اسلایدهای بافت‌های تهیه شده توسط میکروسکوپ اینورت (مدل نیکون TS100) آزمایشگاه ماهی‌شناسی دانشکده شیلات و محیط زیست مورد مطالعه قرار گرفت و سپس با استفاده از میکروسکوپ اینورت، از نمونه‌ها عکس‌هایی با بزرگ‌نمایی (۱۰X) تهیه و عکس‌ها به صورت کیفی بررسی گردید.

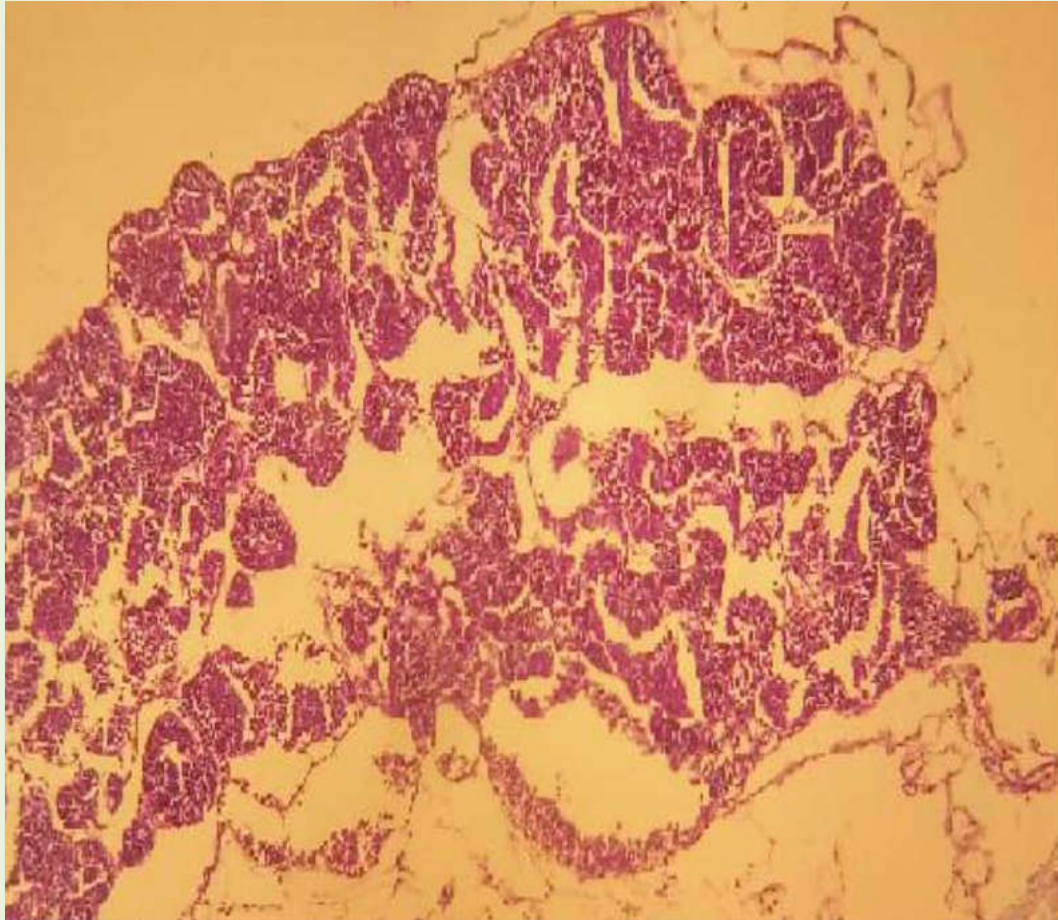
نتایج

در تیمارهای مختلف ماهی‌های گورخری پس از مدت ۳۰ روز مواجهه با سم دیازینون هیچ گونه مرگ و میری مشاهده نشد. از مهم‌ترین تغییرات رفتاری مشاهده شده در تیمارها عدم تعادل و کاهش اشتها بود که در غلظت‌های بالاتر سم این علائم مشهودتر می‌شد. در بررسی بافتی بیشترین ناهنجاری در دوز بالاتر (۳/۲ میلی گرم بر لیتر) مشاهده گردید که کاهش اندازه گناد از مهم‌ترین آن می‌باشد. در برش بافتی گروه شاهد که در معرض سم دیازینون قرار نگرفته بودند بافت بیضه از اندازه و رشد مناسب برخوردار بوده و سلول‌ها در مرحله رسیدگی جنسی قرار داشتند (شکل ۱)، در صورتی که در تیمار ۰/۸ میلی گرم بر لیتر آتروفی سلول‌های جنسی بافت بیضه مشاهده شد. هم چنین در این تیمار دیواره لوبول‌ها

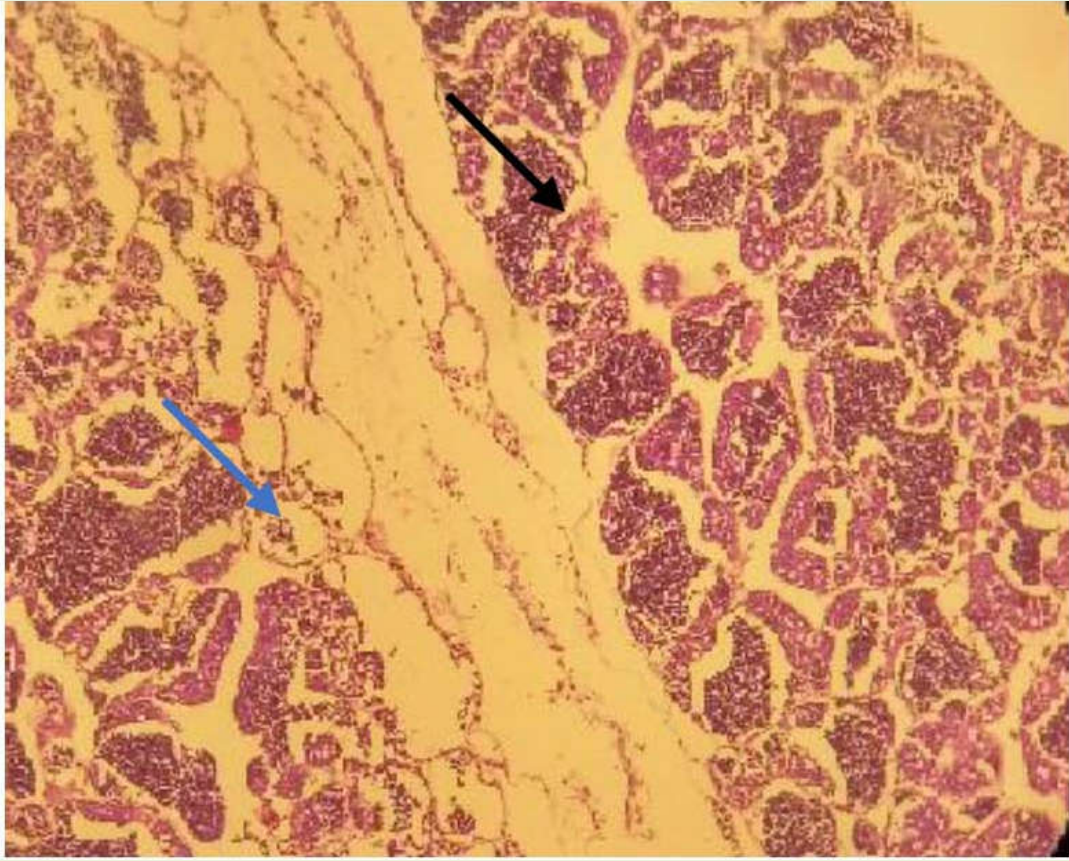
از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان زینتی شصت کلاً گرگان بچه ماهیان گورخری نر با سن حدود ۲ ماه خریداری و به مرکز تحقیقات آبرزی پروری شهید فضل‌ی برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شدند. پس از ۲ هفته سازگاری ماهی‌ها با تراکم ۴۵ عدد در هر آکواریوم شیشه ای ۲۵۰ لیتری که ۲۵ لیتر از آن آبگیری شده بود به طور تصادفی در ۴ تیمار و ۳ تکرار رهاسازی شدند. به منظور هوادهی آکواریوم‌ها از سنگ هوا و تنظیم دمای آب در ۲۶ درجه سانتی گراد از هیتر برقی استفاده شد. میانگین pH آب ۸/۳ بود. ماهی‌های گورخری در طول مدت نگهداری و دوره مطالعه با استفاده از غذای بیومار (فرانسه) تغذیه شدند. در روز اول شروع آزمایش، تزریق سم درون آب انجام شد و هر ۴۸ ساعت یک‌بار تا حدود ۹۰ درصد از آب آکواریوم تعویض و سم تجدید شد. میزان LC50 برای سم دیازینون پس از انجام تست LC50 در آکواریوم‌ها و با توجه به خصوصیات فیزیکوشیمیایی آب، ۱۶ میلی گرم بر لیتر در نظر گرفته شد که میزان ۰، ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد از LC50 مورد نظر که به ترتیب ۰، ۰/۸، ۱/۶ و ۳/۲ میلی گرم بر لیتر محاسبه شدند، برای تیمارها استفاده شد. پس از ۳۰ روز مواجهه ماهی‌ها با سم دیازینون و پایان دوره آزمایش ۶ ماهی به طور تصادفی از هر تیمارها صید و با استفاده از پودر گل میخک ۰/۵ گرم بر لیتر بیهوش و کشته شدند. نمونه برداری از گناد ماهیان نر جهت مطالعات بافت‌شناسی و تعیین مرحله رسیدگی جنسی در هر کدام از تیمارها انجام و در فرمالین فیکس شد. بافت‌های گناد تثبیت شده در فرمالین ۱۰٪ پس از ۲۴ ساعت به الکل ۷۰٪ منتقل شد. سپس آب‌گیری با افزایش اتانول (۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰ و ۱۰۰٪) انجام و در ادامه در زایلن وارد شدند. تمامی این مراحل توسط دستگاه پاساژ بافت تحت برنامه تعریف شده برای این کار صورت گرفت. بافت‌ها سپس با پارافین (دمای ذوب ۵۶-۵۸) بر روی قالب‌های تیشیو-

لوبولها و کاهش تعداد سلولهای جنسی مشاهده شد (شکل ۴) که این کاهش تعداد سلولهای جنسی و عوارض مشاهده شده موجب کاهش اندازه بافت بیضه نیز می شود. این مشاهدات نشان دهنده روند صعودی عوارض و ناهنجاریها نسبت به افزایش غلظت سم می باشد.

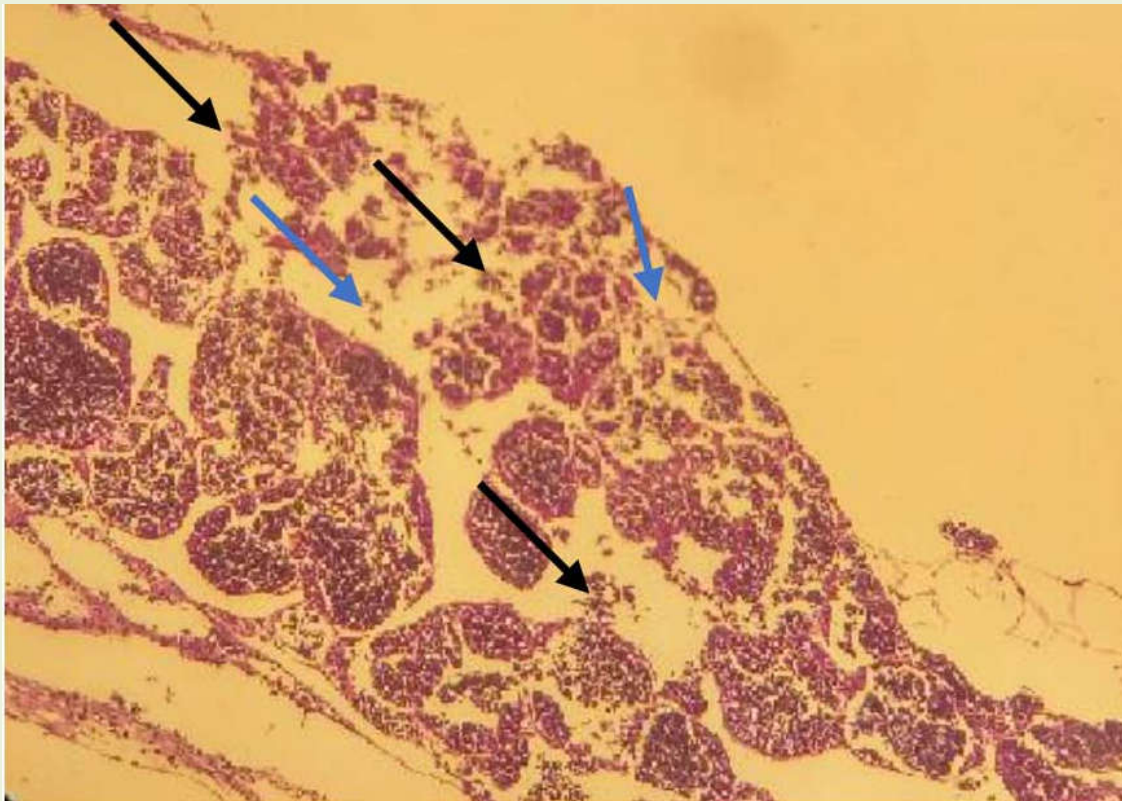
نیز از بین رفته بود (شکل ۲). در تیمار ۱/۶ میلی گرم بر لیتر دژنره شدن و آتروفی سلولهای جنسی، از بین رفتن شکل و دیواره لوبولها مشاهده شد (شکل ۳). در بالاترین غلظت سم که میزان دوز آن ۳/۲ میلی گرم بر لیتر بود دژنره شدن و آتروفی سلولهای جنسی، از بین رفتن شکل و دیواره



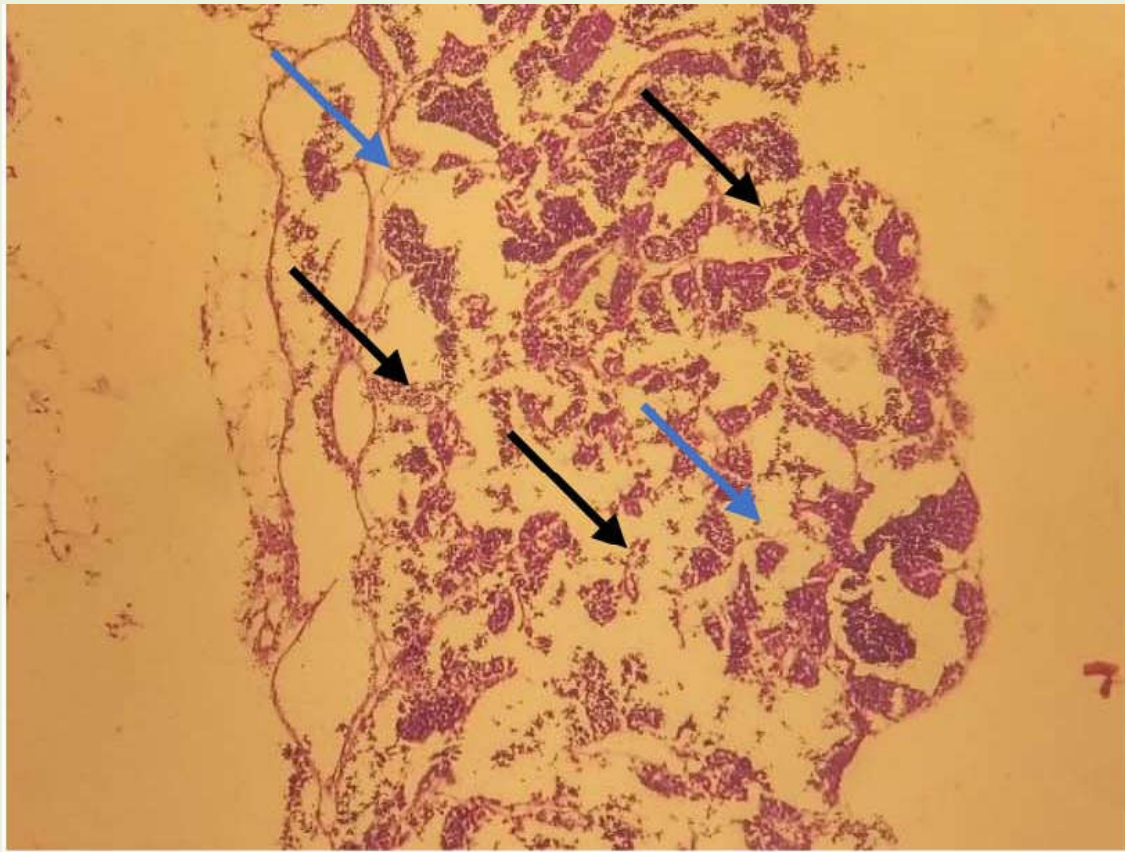
شکل ۱- گروه شاهد برش بافتی بیضه. اندازه و رشد سلولهای طبیعی در بافت بیضه طبیعی



شکل ۲- تیمار ۰/۸ میلی گرم بر لیتر سم دیازینون. آتروفی شدن سلول‌های جنس (فلش آبی). از بین رفتن دیواره لوبول‌ها (فلش مشکی)



شکل ۳- تیمار ۱/۶ میلی گرم بر لیتر سم دیازینون. از بین رفتن شکل و دیواره لوبول‌ها (فلش مشکی). دژنره شدن و آتروفی سلول‌های جنسی (فلش آبی).



شکل ۴- تیمار ۳/۲ میلی گرم بر لیتر سم دیازینون. از بین رفتن شکل و دیواره لوپولها (فلش مشکی). دژنره شدن و آتروفی سلول های جنسی (فلش آبی).

بحث و نتیجه گیری

با وجود این که سم دیازینون توانایی تجمع در بافت ماهیچه، کبد، گناد و آبشش را داشته (۳۷) و از این طریق می تواند بر هوموستازی، رشد و رفتار ماهیان تأثیر گذارد (۸). بخشی از آن ممکن است در بافت های مختلف بدن از جمله غدد جنسی تجمع پیدا کرده و با تأثیر بر سلول های غدد جنسی موجب بروز ضعف و کاهش توان تولید مثلی در آبزیان شود (۲۲، ۴۶). مطالعه انجام شده روی بافت بیضه ماهی گورخری در مواجهه ۳۰ روزه با غلظت های مختلف دیازینون نشان دهنده آسیب های هیستوپاتولوژیکی در بافت بیضه می باشد که با افزایش غلظت سم این آسیب ها افزایش یافته و افزایش زمان مواجهه با سم نیز این عوارض و آسیب ها را بیشتر کرده است. آسیب های مشاهده شده در تیمار ۰/۸ میلی گرم بر لیتر آتروفی سلول های جنسی، از بین رفتن دیواره لوپولها

و در تیمار ۱/۶ میلی گرم بر لیتر دژنره شدن و آتروفی سلول های جنسی، از بین رفتن شکل و دیواره لوپولها می باشد. این عوارض در غلظت بالاتر سم دیازینون که ۳/۲ میلی گرم بر لیتر بود افزایش یافته و روند وابسته به غلظت را نشان می دهد. از بین رفتن شکل و دیواره لوپولها، دژنره شدن و آتروفی سلول های جنسی و هم چنین کاهش تعداد سلول های جنسی از جمله آسیب های وارد شده به بافت بیضه در بالاترین غلظت می باشد که در مقایسه با گروه شاهد سلول ها در مرحله رسیدگی پایین تر قرار داشته و اندازه گناد کاهش چشمگیری پیدا کرده است. مطالعات مختلفی در این رابطه صورت گرفته که تاثیر منفی آلاینده ها بر بافت گناد را تایید می کند. در مطالعه صورت گرفته توسط شמושکی و همکاران (۱۳۹۰) کاهش وزن گناد و شاخص گنادی ماهیان سفید در مواجهه با غلظت های مختلف سم دیازینون مشاهده گردید که این امر می

ماهی تحت تیمار با دوز بالاتر مشاهده شد که در واقع پیدایش واکوئل‌ها در سلول‌های سرتولی و تغییرات آسیب شناسی بافت بیضه ظاهراً به علت فعالیت فاگوسیتوزی و تحلیل و تضعیف فعالیت سلول‌های سرتولی می‌باشد که این امر می‌تواند باعث ایجاد وقفه در فرآیند اسپرماتوزنز و به تاخیر افتادن روند تولید و بلوغ اسپرماتوزوئیدها شود (۱). Lin et al (2018) پس از افزایش غلظت نیتريت تغییرات پاتولوژیک را در ماهی گورخری مشاهده کردند که منجر به کاهش تراکم سلول و افزایش اجسام باقی مانده در سلول‌های سرتولی و زیر ساخت شد (۳۲). این نتایج نشان‌دهنده اختلال در روند اسپرماتوزنیک بود. تغییرات وابسته به غلظت بافت بیضه ماهی گورخری در مواجهه با میکروسیستن - لوسین آرژنین در مطالعه‌ی Su et al (2016) کاهش چشمگیر میزان اسپرم بالغ، افزایش فضای بین سلولی و تخریب اپیتلیوم توبولی مانند سلول‌های سرتولی بود (۴۱). کاهش تراکم سلولی و تخریب لوله‌های اسپرمی هم در ماهی مداکا غوطه‌ور شده در غلظت کم (۵) میکروگرم بر لیتر) میکروسیستن - لوسین آرژنین به مدت ۳۰ روز در مطالعه‌ی Trinchet et al (2011) گزارش شده است (۴۴). Qiao et al (2013) وخامت سلولی و فضا‌های خالی بین سلولی اپتیکی را در بیضه ماهی گورخری بالغ پس از مواجهه با میکروسیستن - لوسین آرژنین به مدت ۳۰ روز گزارش کردند (۳۵) که این نتایج و همچنین نتایج مطالعه (Su et al (2016) و Trinchet et al (2011) نشان‌دهنده‌ی این امر می‌باشد که سلول‌های اسپرماتوگونی و سلول‌های سرتولی احتمالاً از عوامل اصلی مواجهه با میکروسیستن - لوسین آرژنین در بافت بیضه می‌باشند. در ماهی سلول‌های سرتولی، سلول‌های سوماتیک بیضه هستند و اسپرماتوزنز تنها زمانی اتفاق می‌افتد که اسپرماتوگونیوم به طور کامل توسط پروتئین‌های سیتوپلاسم سلول‌های سرتولی در کیست‌ها احاطه شده باشد. تحقیقات قبلی نشان داده‌اند که سلول‌های سرتولی

تواند ناشی از تحلیل رفتن آن در اثر افزایش غلظت سم باشد. بررسی‌های آسیب‌شناسی نیز عوارضی مانند آتروفی، فیبروز و کاهش اسپرماتیدها در بیضه را نشان داد (۶). به هم خوردن مراحل رسیدگی چرخه سلولی، پراکندگی اسپرماتوگونیایها، افزایش نواحی بین لوبول‌ها، خوشه‌ای شدن اسپرماتوسیت‌ها، پراکندگی ماده کروماتین و نازک شدن دیواره بیضه در غلظت‌های پایین و تخریب گسترده اسپرماتوگونی‌ها، خارج شدن برخی از اسپرماتوگونیایها از چرخه اسپرماتوزنز و افزایش نواحی بین لوبول‌ها از جمله عوارض مواجهه ماهی قرل آلای رنگین کمان با علف کش راندپ در دوزهای بالاتر می‌باشد (۲۳). در بررسی صورت گرفته روی بیضه ماهی سفید تحت تاثیر غلظت‌های مختلف دیازینون آسیب‌های هیستوپاتولوژیکی مشاهده شد که با افزایش غلظت سم در بافت مشهودتر بود. در این بررسی با افزایش غلظت سم ضایعات وارد شده بر ساختمان لوبول‌ها بیشتر شده و در نهایت منجر به مرگ سلول‌های جنسی و توقف فرآیند اسپرماتوزنز شده است (۵). در بافت بیضه ماهی *Lepomis macrochirus* در مواجهه با ۶۰ میکروگرم در لیتر سم دیازینون کاهش قطر لومن، کاهش قطر لوله‌های اسپرم و هم چنین کاهش قطر اسپرماتوگونی‌ها از عوارض مشاهده شده می‌باشد (۱۹). در ماهی کپور نیز بروز ناهنجاری‌های ساختاری، از بین رفتن مجاری اسپرم بر و بافت بینابینی، تخریب سلول‌های لایدیگ و آتروفی سلول‌های بافت بیضه در معرض سم دیازینون مشاهده شده است (۱۱). بررسی بافت‌شناسی و هیستوپاتولوژیک بافت بیضه در ماهی‌های کپور که در معرض سم دیازینون قرار گرفته بودند ناهنجاری‌های ساختاری از جمله از بین رفتن مجاری اسپرم بر و بافت بینابینی، دژنره شدن سلول‌های لایدیگ و آتروفی سلول‌های بافت بیضه را نشان داد. هم چنین فاگوسیتوز سلول‌های آسیب دیده و در نتیجه پیدایش واکوئل‌های سلولی در ساختار بافت بیضه نیز در

اجزاء اصلی در فرآیند اسپرماتوزن می‌باشند، کاهش تعداد و کیفیت آن‌ها در تولید اسپرماتوزوآهای سالم و بی‌نقص و از طرفی کاهش تولید اسپرم سالم و فعال در قابلیت باروری مولدین نر تاثیرگذار خواهد بود. با این وجود بروز چنین تغییراتی در بافت بیضه کیفیت و بازماندگی محصولات جنسی را کاهش داده و در نهایت قابلیت باروری ماهیان نر کاهش می‌یابد (۸). مطالعه حاضر که در آن آسیب‌های هیستوپاتولوژیکی با افزایش غلظت سم افزایش یافته، نشان‌دهنده تاثیر آلاینده‌ها از جمله سم دیازینون بر انرژی تخصص یافته جهت رشد و تکامل غدد جنسی می‌باشد. بافت بیضه یکی از نقاط اثر سم بوده که ماهی پس از مواجهه با آن دچار استرس شده و جهت برقراری هوموستازی و تعادل فیزیولوژیکی خود بیشترین انرژی را مصرف می‌کند. بنابراین انرژی جهت ساخت و تکامل گناد کاهش یافته و سلول‌های جنسی در مراحل پایین‌تری از رشد قرار می‌گیرند. در این صورت حجم گناد نیز کاهش می‌یابد.

نقش اصلی را در توسعه بیضه‌ها و تولید اسپرم در ماهی‌های استخوانی بر عهده دارند (۳۹، ۳۸). در واقع تنظیم غدد درون‌ریز اسپرماتوزن با فعالیت هورمون محرک فولیکول (FSH) و T در سلول‌های سرتولی مرتبط است (۵). در مطالعات مختلف مشخص گردیده که سمیت دیازینون در گونه‌های مختلف ماهیان متفاوت و به سن، جنسیت، اندازه بدن ماهی، شرایط آب و هوایی و فرمول آفت‌کش، خصوصیات شیمیایی محیط و فاکتورهای دیگر بستگی دارد (۶). سم دیازینون به طور مستقیم روی بافت‌ها و سلول‌های جنسی اثر گذاشته و موجب آسیب‌های مختلف در ساختار بیضه و رده‌های مختلف سلولی در فرآیند اسپرماتوزن نیز و اختلالات هورمونی می‌شود (۴۲). هم‌چنین علاوه بر تماس مستقیم بر بافت تولیدمثلی، دیازینون و سموم ارگانوفسفره قادر به ایجاد آسیب در مکانیسم‌های فیزیولوژی تولیدمثل از طریق اختلال در محور هیپوتالاموس-هیپوفیز و گناد و تولید هورمون‌های گنادوتروپینی نیز می‌باشند (۱۰). سلول‌های جنسی که از

منابع

- ۱-بنایی، م.، میرواقفی، ع.ر.، احمدی، ک.و.، عاشوری، ر. ۱۳۸۸. تاثیر غلظت تحت کشنده دیازینون بر تغییرات هیستوپاتولوژیک بیضه و تخمدان ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). مجله بیولوژی دریا. سال اول. شماره ۲. ص ۲۶-۱۴.
- ۲-پژند، ذ. ۱۳۷۸. تعیین غلظت کشنده (LC5096h) سموم حشره کش دیازینون و علف کش بوتاکلر بر روی دو گونه از ماهیان خاویاری قره برون و ازون برون. پایان نامه کارشناسی ارشد رشته شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان. ص ۱۶-۱۲.
- ۳-خانجانی، ع.، پورمیرزا، م. سم شناسی. چاپ اول. دانشگاه بوعلی سینا. ۱۳۸۰، ۱۶۴ ص.
- ۴-درویشی، م.، صفری، ر. ۱۳۹۷. ماهی گورخری (*Danio rerio*) به عنوان مدل ژنوتوکسیکولوژی. آزمون زیستی. سال پنجم. شماره ۴. ص ۲۳-۳۴.
- ۵-فداکارماسوله، ف.، مجازی امیری، ب.، میرواقفی، ع.ر.، نعمت الهی، م.ع. ۱۳۹۰. بررسی تاثیر تخریبی سم دیازینون بر ساختار بیضه ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*) با استفاده از تکنیک کشت بافت (در شرایط *In Vitro*). مجله منابع طبیعی ایران. سال شست و چهارم. شماره ۲. ص ۱۲۸-۱۲۱.
- ۶-محمد نژاد شמושکی، م.، سلطانی، م.، شریف پور، ع.، ایمانپور، م.ر.، بهارلویی، ا.، نعیمی، م.ا. ۱۳۹۰. بررسی اثر غلظت های تحت کشنده سم دیازینون بر بافت های گناد، مغز و قلب مولدین نر ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum* Kamensky, 1901). مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز. سال پنجم. شماره ۳. ص ۱۲۹۴-۱۲۸۷.
- ۷-ووثوقی، غ.، مستجیر، ب. ماهیان آب شیرین. تهران: انتشارات دانشگاه تهران. ۳۱۷ ص.
8. Abadin, H., Todd, D., Wohlers, D., Hard, C.M. (2009). Priority data needs for Diazinon. Syracuse Research Corporation, 75 p.

9. Abd, M.E.A., Sahlab, A., Abd, M.E.K. (1994). Influence of diazinon and deltamethrin on reproductive organs and fertility of male rats. *DTW Deutsche tierärztliche Wochenschrift*, 101(6);230-2.
10. Arcand-Hoy, L.D., Benson, W.H. (1998). Fish reproduction: an ecologically relevant indicator of endocrine disruption. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International J*, 17(1);49-57.
11. Banai, M., Miryaghefi, A.R., Ashouri, R. (2009). Effect of sublethal concentration of diazinon on histopathological changes of male carp (*Cyprinus carpio*) testis. Lagoons conference in Azad university of Ahvaz, 127p.
12. Castano, A., Bols, N., Braunbeck, T., Dierick, P., Halder, M., Isomaa, B., et al. (1986). Diazinon hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. *US Fish and Wildlife Service*, US, 85;1-38.
13. Cerda, J., Conrad, M., Markl, J., Brand, M., Herrmann, H. (1998). Zebrafish vimentin: molecular characterisation, assembly properties and developmental expression. *European Journal of Cell Biology*, 77(3);175-187.
14. Chang, J., Liu, S., Zhou, S., Wang, M., Zhu, G. (2013). Effects of butachlor on reproduction and hormone levels in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Experimental and Toxicology Pathology*, 65(1-2); 205-209.
15. Croucher, L., Jewess, P., Roberts, M.C. (2007). *Metabolic Pathways of Agrochemicals: Part 2: Insecticides and Fungicides*: Royal Society of Chemistry.
16. Dahlgren, J., Takhar, H., Ruffalo, C., Zwass, M. (2004). Health effects of diazinon on a family. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 42(5);579-91.
17. Dooley, K., Zon, L.I. (2000). Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Development*, 10(3);252-256.
18. Dutta, H., Meijer, H. (2003). Sublethal effects of diazinon on the structure of the testis of bluegill, *Lepomis macrochirus*: a microscopic analysis. *Environmental pollution*, 125(3);355-60.
19. Dutta, H.M., Maxwell, L.B. (2003). Histological examination of sublethal effects of diazinon on ovary of bluegill, *Lepomis macrochirus*. *Environmental pollution*, 121(1);95-102.
20. Eisen, J.S. (1996). Zebrafish make a big splash. *Cell*, 87(6);969-977.
21. Fanta, E., Rios, F.S.A., Romão, S., Vianna, A.C.C., Freiburger, S. (2003). Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotoxicology and environmental safety*, 54(2);119-30.
22. Fattahi, E., Jorsaraei, S.G.A., Parivar, K., Moghaddamnia, A.A. (2010). The effects of a single dosage of Diazinon and Hinosan on the structure of testis tissue and sexual hormones in Mice. *Yakhteh Medical Journal*, 12 (3);405-410.
23. Figueiredo-Fernandes, A., Ferreira-Cardoso, J.V., Garcia-Santos, S., Monteiro, S.M., Carrola, J., Matos, P. (2007). Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 27(3);103-9.
24. Gerlai, R., Lahav, M., Guo, S., Rosenthal, A. (2000). Drinks like a fish: zebrafish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 67(4);773-782.
25. Goldsmith, P. (2004). Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why, and chemical toxicity. *Toxicological Sciences*, 86;6-19.
26. Hamm, J., Wilson, B., Hinton, D. (1998). Organophosphate-induced acetyl cholin esterase inhibition and embryonic retinal cell necrosis in vivo in the teleost (*Oryzias latipes*). *Neurotoxicology*, 19(6);853-569.
27. Hatjian, B., Mutch, E., Williams, F., Blain, P., Edwards, J. (2000). Cytogenetic response without changes in peripheral cholin esterase enzymes following exposure to a sheep dip containing diazinon in vivo and in vitro. *Mutation Research /Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 472(1);85-92.
28. Hill, A.J., Teraoka, H., Heideman, W., Peterson, R.E. (2005). Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Sciences*, 86(1);6-19.
29. Konda, L.N., Czinkota, I., Füleky, G., Morovján, G. (2002). Modeling of single-step and multistep adsorption isotherms of organic pesticides on soil. *J of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25);7326-31.
30. Kuivila, K.M., Foe, C.G. (1995). Concentrations, transport and biological effects of dormant spray pesticides in the San Francisco Estuary, California. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14(7);1141-50.
31. Lasheidani, M., Balouchi, S., Keyvan, A., Jamili, S., Falakru, K. (2008). Effect of butachlor on density, volume and number of abnormal sperms in caspian kutum (*Rutilus Frisii Kutum*). *Research J of Environmental Sciences*, 2; 474-482.

32. Lin, W., Guo, H., Li, Y., Wang, L., Zhang, D., Hou, J., et al. (2018). Single and combined exposure of microcystin-LR and nitrit results in reproductive endocrine disruption via hypothalamic pituitary-gonadal-liver axis. *Chemosphere*, 211; 1137-1146.
33. Maxwell, L.B., Dutta, H. (2005). Diazinon-induced endocrine disruption in bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60(1); 21-7.
34. Pina-Guzman, B., Solis-Heredia, M., Quintanilla-Vega, B. (2005). Diazinon alters sperm chromatin structure in mice by phosphorylating nuclear protamines. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 202(2); 189-98.
35. Qiao, Q., Liu, W., Wu, K., Song, T., Hu, J., Huang, X. (2013). Female zebrafish (*Danio rerio*) are more vulnerable than males to microcystin-LR exposure, without exhibiting estrogenic effects. *Aquatic toxicology*, 142; 272-282.
36. Sánchez-Peña, L., Reyes, B., López-Carrillo, L., Recio, R., Morán-Martínez, J., Cebrián, M. (2004). Changes on sperm chromatin structure in organophosphorus agricultural workers. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 196; 108-13.
37. Sapozhnikova, Y., Bawardi, O., Schlenk, D. (2004). Pesticides and PCBs in sediments and fish from the Salton Sea, California, USA. *Chemosphere*, 55 (6); 797-809.
38. Schulz, R.d.W., Menting, S., Bogerd, J., França, L.R., Vilela, D.A., Godinho, H.P. (2005). Sertoli cell proliferation in the adult testis: evidence from two fish species belonging to different orders. *Biology of reproduction*, 73(5); 891-8.
39. Schulz, R.W., De França, L.R., Lareyre, J.J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R.H. (2010). Spermatogenesis in fish. *General and comparative endocrinology*, 165(3); 390-411.
40. Spitsbergen, J.M., Kent, M.L. (2003). The state of the art of the zebrafish model for toxicology and toxicopathology research: advantages and current limitations. *Toxicologic pathology*, 31(1-suppl); 62-87.
41. Su, Y., Li, L., Hou, J., Wu, N., Lin, W., Li, G. (2016). Life-cycle exposure to microcystin-LR interferes with the reproductive endocrine system of male zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 175; 205-12.
42. Swanson, P., Dickey, J.T., Campbell, B. (2003). Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28(1-4); 53-9.
43. Teng, M., Qi, S., Zhu, W., Wang, Y., Wang, D., Dong, K., Wang, C. (2018). Effects of the bioconcentration and parental transfer of environmentally relevant concentrations of difenoconazole on endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Pollution*, 233; 208-217.
44. Trinchet, I., Djediat, C., Huet, H., Dao, S.P., Edery, M. (2011). Pathological modifications following sub-chronic exposure of medaka fish (*Oryzias latipes*) to microcystin-LR. *Reproductive toxicology*, 32(3); 329-340.
45. Van Der Geest, H., Stuijzand, S., Kraak, M., Admiraal, W. (1997). Impact of a diazinon calamity in 1996 on the aquatic macroinvertebrates in the River Meuse, The Netherlands. *Netherlands Journal of Aquatic Ecology*, 30 (4); 327-30.
46. Yilmaz, N., Yilmaz, M., Altuntas, I. (2012). Diazinon-induced brain toxicity and protection by vitamins E plus C. *Toxicology and industrial health*, 28 (1); 51-57.
47. Yu, L., Liu, C., Chen, Q., Zhou, B. (2014). Endocrine disruption and reproduction impairment in zebrafish after long-term exposure to DE-71. *Environmental toxicology and chemistry*, 33(6); 1354-1362.



Effect of Sublethal Concentrations of Diazinon in Testicular Tissue in Zebrafish (*Danio rerio*)

M.Darvishi¹, R.Safari²

1. Graduate of Fisheries - Aquaculture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. Iran.

M_darvishi_m71@yahoo.com

2. Assistant Professor, Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. Iran

Received: 2018. 12. 12

Accepted: 2020.10.5

Abstract

Inroduction & Objective: Diazinon is an organophosphoric pesticide used in agricultural fields. The aim of this study was to evaluate the effect of sublethal concentrations of diazinon on testicular tissue in *Danio rerio*.

Material and Methods: For this purpose, 240 male animals with mean weight of 0.20 ± 0.05 were subjected to 0.8, 1.6 and 3.2 mg / l of diazinon and control for 30 days.

Results: In histopathological study, the highest abnormality was observed in the highest dose (3.2 mg / l) and the most important abnormality was reduction in gonad size. In control group, the testicular tissue had adequate size and growth, and the cells were in the sexual maturity stage, but in 0.8 mg / l, cellular atrophy and lose of lobular walls was observed. In 1.6 mg / l, the degeneration and atrophy of the sexual cells, destruction of shape and walls of the lobules was observed. At the highest concentration, the degeneration and atrophy of the sexual cells, destruction of shape and wall of the lobules and the decrease in the number of sex cells were observed. This decrease in the number of sexual cells results in reduction of testicular tissue size.

Conclusion: These observations indicate an increase in complications and anomalies with the increase in toxin concentrations

Keywords: Diazinon, Testicular Tissue, *Danio rerio*.