

بررسی اثرات اتیدیوم بروماید بر تعدادی از پارامترهای هماتولوژیکی در ماهی کپور (*Cyprinus carpio*) معمولی

حمیرا حاتمی^{۱*}، مهدی سیه چهره^۲

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۱/۵/۴

چکیده

اتیدیوم بروماید به عنوان یک ماده جهش زا و سرطان زا مطرح است که به طور وسیعی در آزمایشگاههای بیولوژی و پزشکی مورد استفاده قرار می گیرد. به دلیل مصرف بسیار بالای این ماده در سال های اخیر، حلالیت آن در آب، پایداری آن در محیط، احتمال ورود آن به اکوسیستم های آبی و سرانجام اثرات بالقوه آن به عنوان اختلال گر سیستم گردش خون، در این تحقیق اثرات اتیدیوم بروماید بر تعدادی از پارامترهای هماتولوژیکی مورد بررسی قرار گرفت. غلظت های مورد نظر اتیدیوم بروماید (۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی گرم در ۱۰۰ لیتر آب) به وان های نگهداری ماهی های کپور اضافه شده و بعد از ۱۵ روز، خون گیری به عمل آمد. مقایسه گروه های آزمایشی مختلف با هم توسط روش آماری تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) انجام شد. تعداد گلبول های قرمز و میزان هموگلوبین در گروه های دریافت کننده اتیدیوم بروماید نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری نشان داد ($P < 0.05$). تعداد گلبول های سفید در غلظت ۲۰ میلی گرم اتیدیوم بروماید / ۱۰۰ لیتر آب نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری نشان داد ($P < 0.05$). تعداد پلاکت ها در هر سه غلظت اتیدیوم بروماید نسبت به گروه کنترل افزایش معنی دار نشان داد ($P < 0.05$). حجم متوسط گلبول های قرمز در غلظت ۳۰ میلی گرم نسبت به گروه کنترل افزایش معنی دار نشان داد و از طرفی هموگلوبین متوسط گلبول های قرمز و غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز در غلظت ۳۰ میلی گرم اتیدیوم بروماید نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری نشان داد ($P < 0.05$). لذا آلودگی مزمن اکوسیستم های آبی توسط اتیدیوم بروماید زندگی آبزیان و در نهایت انسان را تهدید می نماید.

واژگان کلیدی: اتیدیوم بروماید، ماهی کپور، پارامترهای خونی

مقدمه

اتیدیوم بروماید (Ethidium Bromide) یا

هومیدیدوم بروماید (Homidium Bromide) یک ماده قرمز تیره، کریستالی جامد، غیر فرار و بطور متوسط محلول در آب می باشد. اتیدیوم بروماید دارای خاصیت فلورسنس و رنگ قهوه ای مایل به قرمز در هنگام قرار گرفتن در معرض اشعه UV بوده و یک

۱- استادیار، گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز،

تبریز- ایران

۲- دانشجو، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز- ایران

*- پست الکترونیکی نویسنده مسئول: homeirahatami@yahoo.com

طحال به چشم خورده و از طرفی انسفالی و میکروسفالی از عوارض این ماده سمی است (۷). آلودگی شیمیایی آب با چنین موادی به عنوان یک استرس شیمیایی برای ماهی ها و سایر آبزیان مطرح می‌باشد. مشخص شده عوامل استرس زا یا مستقیماً سبب مرگ ماهی شده و یا به طور غیر مستقیم با کاهش مقاومت بدن، سبب آسیب پذیر شدن ماهی ها در برابر بیماری ها می‌گردند (۲۷). استرسورها سبب تغییر پاسخ ایمنی ذاتی می‌شوند که از جمله می‌توان به تغییرات در فعالیت سلول‌های سیتوتوکسیک غیر اختصاصی (Non-specific cytotoxic cell) (۱۰)، عملکرد ماکروفاژها (۵ و ۸) و یا تغییر سطوح سلول‌های ایمنی موجود در گردش خون همچون نوتروفیل‌ها اشاره نمود (۲۴). مشخص شده برخی سموم شیمیایی سبب تغییر پارامترهای هماتولوژیکی همچون افزایش میزان اریتروسیت، هموگلوبین، و کاهش میزان لکوسیت می‌گردند (۱۹). در شرایط طبیعی، ماهی‌ها به طور همزمان تحت تاثیر انواعی از استرسورهای فیزیکی و شیمیایی هستند. علاوه بر این بیشتر مطالعات تمایل دارند تا اثر استرسور ویژه ای را مورد ارزیابی قرار دهند. تا کنون در ایران تحقیقی در زمینه اثرات سمی این ترکیب بر فیزیولوژی سیستم‌های مختلف بدن صورت نگرفته است. لذا هدف این مطالعه نیز تعیین اثر استرسور شیمیایی اتیدیوم بروماید روی بعضی از پارامترهای هماتولوژیکی در ماهی کپور است.

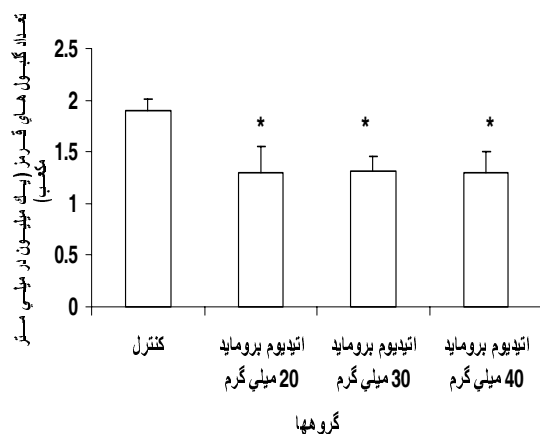
مواد و روش کار

در این پژوهش از ۴۰ قطعه ماهی کپور معمولی (دو ساله) استفاده شد. جهت سازگاری با محیط، ماهی‌ها در وان‌های پلاستیکی (بدون افزودن اتیدیوم بروماید) به مدت یک هفته نگهداری شدند. تعداد ماهی در هر گروه ۱۰ عدد بوده و تعداد گروهها نیز عبارت بودند از: ۱- گروه کنترل، بدون افزودن اتیدیوم بروماید. ۲- گروه تجربی الف: حاوی ۲۰ میلی‌گرم

موتازن قوی با خاصیت سمی متوسط بعد از یک تماس حاد است (۱۲). اتیدیوم بروماید اگر چه یک ابزار مناسب جهت تحقیق می‌باشد ولی به خاطر خصوصیات خطرناک آن، بایستی در هنگام جابجائی و دفع به نکات ایمنی و بهداشتی آن توجه نمود. اتیدیوم بروماید می‌تواند از طریق پوست جذب فوری شود، بنابراین ممانعت از تماس با این ماده شیمیایی بسیار مهم می‌باشد. (۱). این در حالی است که در اکثر نقاط کشور ما اتیدیوم بروماید وارد اکوسیستم‌های آبی شده و حیات آبزیان و از جمله ماهی ها را تهدید می‌نماید. در گذشته دامپزشکان از این ترکیب برای درمان تریپانوزومویس (*Trypanosomosis*) استفاده می‌کردند. اما به دلیل مقاومت آنتی بیوتیکی بالای آن، رفته رفته کاربرد فارماکولوژیکی اتیدیوم بروماید محدود گردید (۱۹). اتیدیوم بروماید به عنوان یک ترکیب موتازن سبب ایجاد اختلال در تکثیر و نسخه برداری DNA می‌شود (۲۲). مشخص شده متابولیت‌های حاصل از این ترکیب نیز از خاصیت سمی برخوردار هستند. اضافه کردن اتیدیوم بروماید به محیط کشت لئوسیت‌های انسانی سبب ایجاد تغییر در ساختار کروموزومی آنها می‌شود (۳). همچنین اتیدیوم بروماید قادر است بخش *NADH- Ubiquinone* در زنجیره تنفسی را در میتوکندری مهار نماید (۱۶). دوز های مورد استفاده در آزمایشگاه‌ها 1-0.25 microgram/ml می‌باشد که کمتر از حد مورد نیاز برای ایجاد سمیت می‌باشد. با این حال هنوز اثر سمی این ترکیب در دوزهای ذکر شده روی افراد انسانی به آزمایش در نیامده است و در این زمینه نیاز به تحقیقات بیشتری است. گزارشی از رسوب این ترکیب در بافت‌های قلب- عضلات اسکلتی- تیروئید- آدرنال و روده وجود دارد (۹). اثرات تراژدیک اتیدیوم بروماید در مورد لارو سه هفته‌ای قورباغه آفریقایی به نام گزنپوس لویس (*Xenopus laevis*) گزارش شده است. بد شکلی‌های حاصل از این ترکیب در ساختار

نتایج

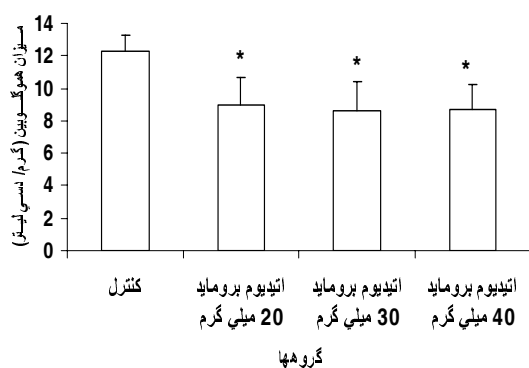
در نمودار ۱، محاسبات آماری نشان می‌دهد که تعداد گلبول‌های قرمز در گروه‌های دریافت کننده ایتیدیوم بروماید (در هر سه غلظت ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ لیتر) نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌دار، نشان می‌دهد ($P < 0.05$).



نمودار ۱- اثر غلظت‌های مختلف ایتیدیوم بروماید، بر تعداد گلبول‌های قرمز خون. هر ستون بیانگر میانگین \pm میانگین خطای استاندارد بوده و تعداد ماهی‌ها در هر گروه ۱۰ عدد می‌باشد. * نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه کنترل و گروه‌های دریافت کننده ایتیدیوم بروماید است.

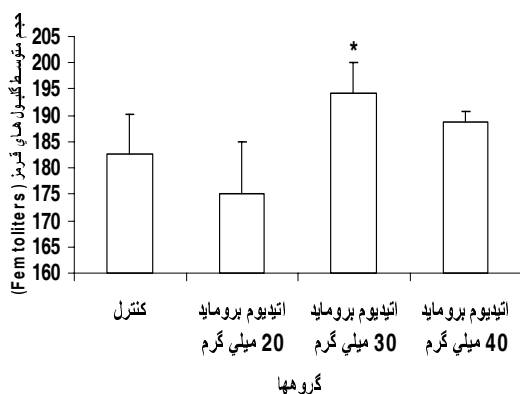
تعداد گلبول‌های سفید در گروه ایتیدیوم بروماید ۲۰ میلی‌گرم، نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد، نمودار ۲ ($P < 0.05$)، اما در گروه‌های ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم از ایتیدیوم بروماید با اینکه تعداد گلبول‌های سفید نسبت به گروه کنترل کاهش نشان می‌دهد ولی این کاهش معنی‌دار نمی‌باشد.

ایتیدیوم بروماید به ازای هر ۱۰۰ لیتر آب. ۳- گروه تجربی ب: حاوی ۳۰ میلی‌گرم ایتیدیوم بروماید به ازای هر ۱۰۰ لیتر آب. ۴- گروه تجربی پ: حاوی ۴۰ میلی‌گرم ایتیدیوم بروماید به ازای هر ۱۰۰ لیتر آب. جانوران به مدت ۱۵ روز در آب آلوده به ایتیدیوم بروماید (به جز گروه کنترل) به سر برده و در روز ۱۶ ابتدا ماهیان با استفاده از محلول گل میخک با غلظت ۱۷۰ ppm بی‌هوش شده و سپس خون مورد نیاز توسط سرنگ ۲ سی سی از ناحیه دم گرفته شد. لازم به ذکر است در طی ۱۵ روز به کمک پمپ‌های اکسیژن و فیلترهای تصفیه، آب داخل وان‌ها هوادهی می‌گردید. جمع‌آوری خون در لوله‌های آزمایشگاهی مخصوص خون‌گیری و آغشته به ماده ضد انعقاد (EDTA) صورت گرفت. تعداد گلبول‌های قرمز خون، تعداد گلبول‌های سفید، پلاکت‌ها، هماتوکریت، هموگلوبین، حجم متوسط گلبول‌های قرمز (Mean Corpuscular Volume= MCV)، هموگلوبین متوسط گلبول‌های قرمز (Mean Corpuscular Hemoglobin= MCH) و غلظت متوسط گلبول‌های قرمز (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration= MCHC) توسط آنالایزر اتوماتیک (Ms9vet) ساخت کشور فرانسه) مورد سنجش قرار گرفت. بررسی آماری نتایج به دست آمده با استفاده از برنامه آماری این استیت (Instate) صورت گرفت. مقایسه گروه‌های آزمایشی مختلف با هم توسط روش آماری تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) انجام شد و در مواردی که اختلاف معنی‌دار وجود داشت از آزمون تعقیبی توکی برای روشن شدن اختلاف بین گروه‌ها استفاده گردید. $P < 0.05$ به عنوان معیار معنی‌دار بودن اختلاف در نظر گرفته شده است. در ضمن بعد از اتمام آزمایش به ازای هر میلی‌گرم ایتیدیوم بروماید ۱۰ میلی‌لیتر مایع سفید کننده اضافه نموده و به آرامی به مدت چهار ساعت همزده و پس از گذشت یک شبانه روز به ازای هر قسمت از محلول، ۲۰ قسمت آب اضافه کرده و وارد شبکه جمع‌آوری فاضلاب نمودیم (۱).

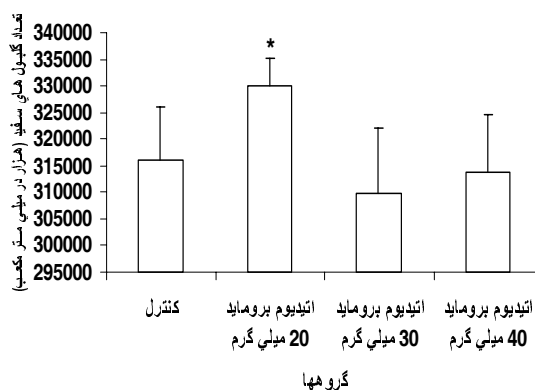


نمودار ۴- اثر غلظت های مختلف اتیدیوم بروماید بر میزان هموگلوبین در ماهی کپور، میزان هموگلوبین در بین گروه کنترل و گروه های دریافت کننده اتیدیوم بروماید کاهش معنی دار نشان می دهد.

در نمودار ۵، حجم متوسط گلبول قرمز (MCV) در غلظت ۳۰ میلی گرم اتیدیوم بروماید در ۱۰۰ لیتر آب نسبت به گروه کنترل افزایش معنی دار نشان می دهد ($P < 0.05$). هموگلوبین متوسط گلبول های قرمز (MCH) و غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MCHC) در غلظت ۳۰ میلی گرم اتیدیوم بروماید در ۱۰۰ لیتر آب نسبت به گروه کنترل کاهش معنی دار نشان داد ($P < 0.05$), (به دلیل محدودیت صفحات مقاله، نمودارها نشان داده نشده اند).

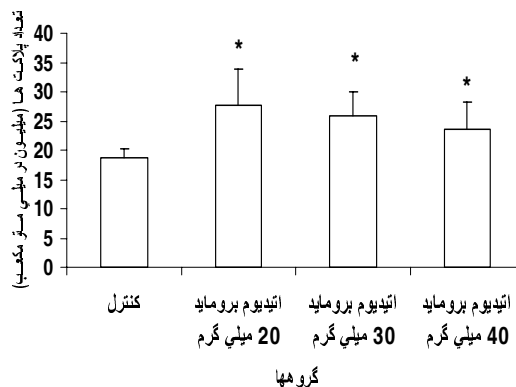


نمودار ۵- اثر غلظت های مختلف اتیدیوم بروماید بر حجم متوسط گلبول قرمز در ماهی کپور. اختلاف معنی داری بین گروه اتیدیوم بروماید ۳۰ میلی گرم و گروه کنترل وجود دارد.



نمودار ۲- اثر غلظت های مختلف اتیدیوم بروماید، بر تعداد گلبول های سفید خون. اختلاف معنی داری بین گروه اتیدیوم بروماید ۲۰ میلی گرم و گروه کنترل وجود دارد.

در نمودار ۳، تعداد پلاکت ها گروه های دریافت کننده اتیدیوم بروماید (در هر سه غلظت ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی گرم در ۱۰۰ لیتر) نسبت به گروه کنترل افزایش معنی دار، نشان می دهد ($P < 0.05$).



نمودار ۳- اثر غلظت های مختلف اتیدیوم بروماید، بر تعداد پلاکت های خون. تعداد پلاکت ها در گروه های دریافت کننده اتیدیوم بروماید نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری نشان می دهد.

در نمودار ۴، میزان هموگلوبین در گروه های دریافت کننده اتیدیوم بروماید (در هر سه غلظت ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی گرم در ۱۰۰ لیتر) نسبت به گروه کنترل کاهش معنی دار، نشان می دهد ($P < 0.05$). از طرفی میزان هماتوکریت در گروه های تجربی نسبت به گروه کنترل تغییر معنی داری نشان نمی دهد (به دلیل محدودیت صفحات مقاله، نمودار نشان داده نشده است).

بحث

در طی ۱۵ روز تماس ماهیان با سه غلظت اتیدیوم بروماید هیچ گونه تلفاتی در ماهیان مشاهده نشد. از آنجایی که سیستم گردش خون در رساندن مواد غذایی و اکسیژن به بافت ها دخالت می نماید هر نوع کاهش یا افزایش در تعداد سلول های خونی در عملکرد این سیستم اختلال ایجاد می نماید. از طرفی متاثر شدن سیستم ایمنی توسط مواد آلاینده سبب آسیب پذیری جانوران آبی در برابر

بیماری ها می گردد که در بلند مدت با کاهش گونه های آبی و به خوردن تعادل در اکوسیستم های آبی همراه خواهد بود.

پاسخ های هماتولوژیکی ماهی کپور به سمیت اتیدیوم بروماید به صورت کاهش معنی دار در تعداد گلبول های قرمز، کاهش هموگلوبین متوسط گلبول های قرمز و غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز نسبت به گروه کنترل می باشد. گلبول های قرمز در بیشتر ماهیان، عمدتاً در کلیه و طحال تولید می شوند (۱۷). کاهش این سلول ها را می توان به نقص عملکرد بافت کلیه در حضور سم اتیدیوم بروماید نسبت داد. از طرفی کاهش گلبول های قرمز می تواند به دلیل لیز شدن گلبول های قرمز اتفاق افتاده باشد (۱۵). گزارش شده اکثر سموم و آفت کش ها نیز با ایجاد اختلال در عملکرد کلیه سبب کاهش مقادیر گلبول های قرمز و هموگلوبین می گردند (۲۰). از طرفی برخی از سموم همچون تری کلوروفن سبب افزایش میزان اریتروسیت، هموگلوبین و هماتوکریت می گردند (۲). به نظر می رسد اتیدیوم بروماید مشابه کادمیوم، سرب، جیوه، و روی سبب کاهش هموگلوبین و تعداد گلبول های قرمز شده و پتانسیل ایجاد کم خونی در ماهیان را دارد (۴). تیمار با اتیدیوم بروماید DNA میتوکندریایی سلول را کاهش می دهد (۱۳). از طرفی هر گونه اختلال در بیان ژنوم میتوکندریایی منجر به ایجاد اختلال در زنجیره تنفسی و کاهش سنتز ATP می شود (۲۱). از آنجایی

که ATP جهت اریتروپوئیزس (Erythropoiesis) ضروری می باشد، هر نوع اختلال در مسیر تولید ATP منجر به ایجاد اختلال در تولید سلول های خونی می گردد. اتیدیوم بروماید ۲۰ میلی گرم، سبب افزایش تعداد گلبول های سفید نسبت به گروه کنترل گردید، اما در گروه های ۳۰ و ۴۰ میلی گرم از اتیدیوم بروماید با اینکه تعداد گلبول های سفید نسبت به گروه کنترل کاهش نشان می دهد ولی این کاهش معنی دار نمی باشد. این یافته ها بیانگر متاثر شدن سیستم ایمنی ماهی کپور توسط استرسور شیمیایی اتیدیوم بروماید می باشد. تغییرات ایجاد شده در سیستم ایمنی با تاثیر گذاری بر هوموستازی بدن، جانور را در برابر بیماری ها مستعد تر می نمایند (۲۳). مشخص شده استرس های محیطی کوتاه مدت سبب افزایش فعالیت سیستم ایمنی می گردند (۶ و ۱۱).

مشخص شده، اتیدیوم بروماید با مهار سنتز DNA کیتوپلاست می تواند سبب مهار تقسیم سلولی گردد (۱۴). با توجه به جستجوی انجام شده در اینترنت، مقالات مرتبط با اثرات سمی اتیدیوم بروماید در ماهیان یافت نشد. لذا یافته های پژوهش حاضر با یافته های منبع ۲۶ که در زمینه اثرات اتیدیوم بروماید بر بزها می باشد مورد مقایسه قرار گرفت. در سال ۲۰۱۰ نتایج کلینیکی، هماتولوژیکی، بیوشیمیایی و پاتولوژیکی عفونت بزها با تریپانوزوم ویواکس (Trypanosomoe vivax) و درمان با اتیدیوم بروماید مورد بررسی قرار گرفت (۲۶). در این مطالعه تک دوز ۲/۵ میلی گرم/کیلوگرم به صورت داخل عضلانی و دوز هفتگی ۱ میلی گرم/کیلوگرم به مدت سه هفته متوالی سبب حذف انگل از خون و کبد گردید. علائم کلینیکی به تدریج ناپدید شده و بیماری بزها رفته رفته رو به بهبود گذاشت. مشاهدات کلینیکی - پاتولوژیکی در این مطالعه مشابه با یافته های سال ۲۰۰۰ و ۲۰۰۸ می باشد (۲۵ و ۲۶). در بز های تیمار شده با اتیدیوم بروماید، آبریزش بینی، اسهال خونی و کولیک، افزایش دمای

آسیب پذیری جانوران آبی در برابر بیماری‌ها می‌گردد که در بلند مدت با کاهش گونه‌های آبی و به خوردن تعادل در اکوسیستم‌های آبی همراه خواهد بود. در واقع مراکز تحقیقاتی و بیولوژی بایستی روش‌های مناسب و موثری برای آلودگی زدایی و تصفیه اتیدیوم بروماید بنمایند. حد اقل در مراکز دانشگاهی بایستی زباله‌های حاوی اتیدیوم بروماید از زباله‌های معمولی تفکیک شده و به صورت مجزا سوزانده شوند.

منابع

۱- مردانی، ح. قاسمیان، م. اسفند (۱۳۸۴): بررسی روش‌های دفع اتیدیوم بروماید و بیان روش موثر در مراکز تحقیقات. اولین همایش ملی مهندسی ایمنی و مدیریت. دانشگاه صنعتی شریف.

بدن و سرعت تنفس، کاهش تعداد نبض، کاهش وزن و کاهش فشار خون مشاهده گردید. همچنین کاهش هموگلوبین، کاهش گلبول‌های قرمز، کاهش هماتوکریت، افزایش در پروتئین‌های تام و غلظت آلبومین مشاهده شد. کاهش هموگلوبین، گلبول‌های قرمز، هماتوکریت و رتیکولوسیتوزیس (*Reticulocytosis*) بیان‌گر این است که اتیدیوم بروماید سبب کم‌خونی شده که ممکن است ناشی از اثر آن بر اریتروپوئیزیس مربوط باشد. کاهش در هماتوکریت به همراه افزایش در پروتئین‌های تام، آلبومین و کاهش وزن بدن شاخصی از دهیدراتاسیون می‌باشد. دهیدراتاسیون نیز به دلیل فقدان اشتهای جانور است. در این مطالعه هیچ تغییر معنی‌داری در غلظت متوسط هموگلوبین و هموگلوبین متوسط گلبول قرمز، اتوزینوفیل‌ها و بازوفیل‌ها مشاهده نشد. از طرفی افزایش معنی‌داری در گلبول‌های سفید خون، رتیکولوسیت‌ها، منوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها و پلاکت‌ها مشاهده گردید (۲۶). در مطالعه حاضر نیز اتیدیوم بروماید در هر سه غلظت ذکر شده سبب افزایش میزان پلاکت‌ها نسبت به گروه کنترل گردید که با یافته‌های (۲۶) هم‌خوانی دارد. مشخص شده پلاکت‌ها نقش اصلی در شروع آترواسکلروز و تشکیل لخته‌های کرونری بازی می‌کنند. به عبارتی افزایش پلاکت‌ها با تجمع پلاکتی، تشکیل توپ پلاکتی و ایجاد ترومبوز ارتباط مستقیم دارد (۱۸). به نظر می‌رسد اتیدیوم بروماید فعالیت پلاکتی و سیستم انعقادی ماهی را می‌تواند دچار تغییر نماید. به طور خلاصه آلودگی آنها به دست انسان سبب کاهش تنوع زیستی در بلند مدت شده و بر روابط بین‌گونه‌ای نیز اثر چشمگیری دارد. از آنجایی که سیستم گردش خون در رساندن مواد غذایی و اکسیژن به بافت‌ها دخالت می‌نماید هر نوع کاهش یا افزایش در تعداد سلول‌های خونی در عملکرد این سیستم اختلال ایجاد می‌نماید. از طرفی متاثر شدن سیستم ایمنی توسط مواد آلاینده سبب

- 2- Alkahem, H.F., Ahmed, Z., Alakel, A.S., Shamsi, M.J.K., (1998): Toxicity bioassay and changes in hematological parameters of *Oreochromis niloticus* by trichlorfon. Arab Gulf journal of scientific Research. 16: 581-593.
- 3- Andersen, O., Ronne, M., (1986): Effects of ethidium bromide and bisbenzimidazole (Hoechst 33258) on human lymphocyte chromosome structure. Hereditas. 105(2):269-72.
- 4- Bansal, S.K., Dalela, R.C., (1997): Physiology dysfunction of the haemopoietic system in a fresh water teleost. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology Journal. 22 (3), 18- 20.
- 5- Beaman, J.R., Finch, R., Gardner, H., Hoffman, F., Rosencrance, A., Zelikoff, J.T, (1999): Mammalian immunoassays for predicting the toxicity of malathion in a laboratory fish model. Journal of Toxicology and Environmental. 56: 523-42.
- 6- Bly, J., Quininou, M.A., Clem, L.W., (1997): Environmental effects on fish immune mechanisms. Development in Biological Standardization. 90: 33-43.
- 7- Courchesne, C.L., Bantle, J.A., (1985): Analysis of the activity of DNA, RNA, and protein synthesis inhibitors on *Xenopus* embryo development. Terato Carcino Mutagen. 5(3): 177- 93.
- 8- Duffy, J., Carlson, E.A., Li Y., Prophete, C., Zelikoff, J.T., (2003): Age-related differences in the sensitivity of the fish immune response to a coplanar PCB. Ecotoxicology. 12: 251-9.
- 9- Ellens, H., Van Renswoude, A.J.B.M., Kroon, A.M., (1978): Tissue distribution of free and complexed ethidium bromide and its possible relation to cardiotoxicity. Journal of Molecular Medicine. 3: 247-255
- 10- Esteban, M., Cuesta, A., Ortuno, J., Meseguer, J., (2001): Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. Fish and Shellfish Immunology. 11:303-15.
- 11- Fletcher, T., (1986): Modulation of nonspecific host defenses in fish. Veterinary Immunology and Immunopathology. 12: 59-67.
- 12- Huang, Q. Fu, WL., (2005): Comparative analysis of the DNA staining efficiencies of different fluorescent dyes in preparative agarose gel electrophoresis. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 43 (8): 841-2.
- 13- King, M.P., Attardi, G., (1988): Injection of mitochondria into human cells leads to rapid replacement of the endogenous mitochondrial DNA. Cell. 52: 811-819.
- 14- Morales, N. M., Schaeffer, F.W., Keller, S.J. Meyer, R.M., (1972): Effect of ethidium bromide and several acridine dyes on the kinetoplast DNA of *Leishmania tropica*. Journal of Protozoology. 19: 667- 672.
- 15- Niimi, A.J, (1997): Biological and toxicological effects of environmental contaminations in fish. Canadian Journal of fisheries and aquatic science. 40: 306-312.
- 16- Pena, A., Chavez, E., Carabez, A., De Gomez-puyou, M.T., (1977): The metabolic effects and uptake of ethidium bromide by rat liver mitochondria. Archives of Biochemistry and Biophysics. 30; 180(2):522-9.
- 17- Satchel, G.H., (1971): Circulation in fishes. London: Cambridge Univ press, 131 pp, In: Fishes: An Introduction to Ichthyology, Moyle. P.B, and Cech J.J. 2000, 4th edn. Prentice- Hall, Upper

Saddle River, New Jersey.

- 18- Selwyn, A.P., Braunwald, E., (2001): Ischemic heart disease; in: Braunwald E, fauci AS, Kasper DL, et al. Harrison's principles internal medicine, 15th ed, Mc Graw Hill Medical Publishing Devison; pp: 1399.
- 19- Stevenson, P., Sones, K.R., Gicheru, M.M., Mwangi, E.K., (1995): Comparison of isometamidium chloride and homidium bromide as prophylactic drugs for trypanosomiasis in cattle at Nguruman, Kenya. *Acta Tropical* 59 (2): 257-258.
- 20- Svoboda, M., Luskova, V, Drastichova, J., Ilabek, V., (2001): The effect of diazinon on heamatological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta veterinaria Brno.* 70: 457-465.
- 21- Wallace, D.C., (1993): Mitochondrial diseases: genotype versus phenotype. *Trends in Genetic.* 9: 128-133.
- 22- Waring, M.J., (1965): Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *Journal of Molecular Biology.* 13 (1): 269-282.
- 23- Watts, M., Munday, B.L., Burke, C.M., (2001): Immune responses of teleost fish. *Australian Veterinary Journal.* 79: 570-574.
- 24- Wendelaar, Bonga, S., (1997): The stress response in fish. *Phsiological Reviews.* 77: 591- 625.
- 25- Youssif, F.M., Mohamed, O.S.A., Hassan, T., (2008): Efficacy and toxicity of Cymelarsan in Nubian goats infected with *T. evansi*. *Journal of Cell and Animal biology.* 2 (7): 140-151.
- 26- Youssifa, F.M., Mohamedb, O.S.A. Gameelc, A.A., Hassand, T., (2010): Efficacy and toxicity of homidium bromide (ethidium) in goats infected with *T. vivax*. *Small Ruminant Research.* 89: 36-41.
- 27- Zelikoff, J.T, Enane, N.A, Bowser, D., Squibb, K.S., Frankel, K., (1991): Development of fish peritoneal macrophages as a model of higher vertebrates in immunological studies I. Characterization of trout macrophage morphological, functional and biochemical properties. *Fundamental and Applied Toxicology.* 16: 576-89.