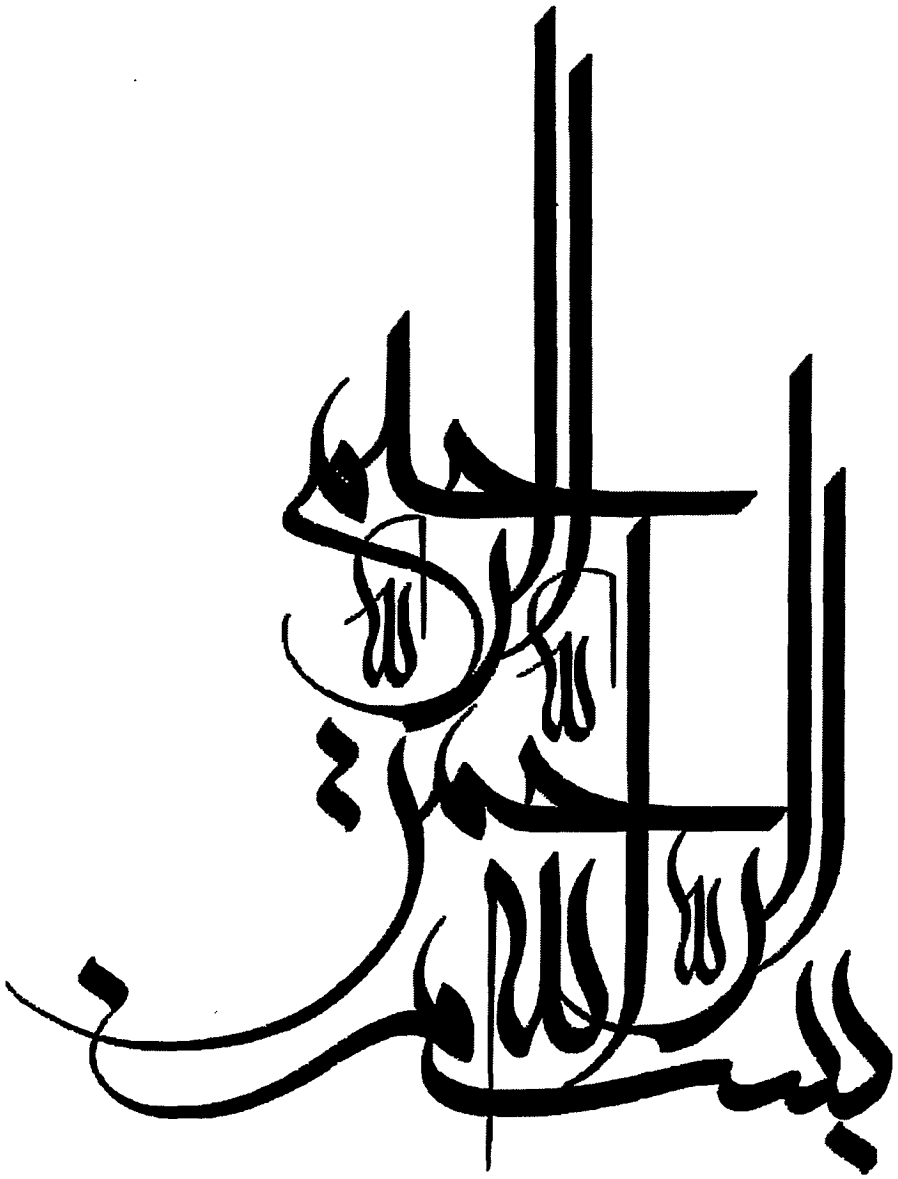

بسم الله الرحمن الرحيم

١١٤٧٠

دانشکده علوم پایه

گروه زیست شناسی

(زیست شناسی دریا – جانوران دریا)

تاثیر رشد دهنده های شیمیایی بر بافت کبد و کلیه ماهی و تغییرات شیمیایی ادرار

از:

مریم عباسی

استاد راهنما:

دکتر نادر شعبانی پور

۱۳۸۸ /۳/ ۲

بهمن ماه ۸۷

۱۱۳۶۷۰

تقدیم به آنکس که گفت :

« می فهمم »

و « فهمیدن » ادعای بزرگی بود

پس او ـــــــ

« بزرگ است »

تقدیر و تشکر

خدایا، مرا معبر آرامش کن؛ تا آنجا که نفرت هست، عشق جاری سازم. آنجا که خطا هست، بخشایش بگسترم. آنجا که جدایی هست، وصل بیافرینم. آنجا که لغزش و دروغ هست، حقیقت بیاورم. آنجا که تردید هست، ایمان بنا کنم. آنجا که ظلمت هست، نور بتابانم و آنجا که اندوه هست، شادی منتشر کنم.

از تمام عزیزانی که در انجام این پژوهش مشوق من بودند و یاریم کردند کمال تشکر را دارم و سپاسگزارم:

از مادرم که روحی بزرگ و سرشتی مهربان دارد. پدرم که همراه همیشگی و خواهرم، که سرشار از محبت و سادگی ست.

از همراهی استاد بزرگوار و دلسوزم جناب آقای دکتر نادر شعبانی پور که راهنمایی و نظارت این پروژه را بر عهده داشتند. آرزو دارم همیشه سعادت یارشان باشد.

استاد گرامی جناب آقای دکتر علی اکبر که زحمات بسیاری در انجام آنالیز نمونه های این پروژه متحمل شدند.

اساتید ارجمندم جناب آقای مهندس روضاتی، آقای مهندس گلچین راد و آقای دکتر حیدری که از راهنمایی های ایشان در مراحل تئوری و عملی بهره مند شدم.

سرکار خانم مهندس هادوی، آقای مهندس علوی و سرکار خانم مهندس شایگان صمیمانه سپاسگزارم.

و هچنین از دوستان بسیار عزیزم خانم مهندس نرگس حسینی، ربابه شاهی، فاطمه نظر حقیقی، صدیقه خدادادی، هاله رحمانی، لیلا یاوری، آقای محمد گودرزی، ندا اعدلیان، فاطمه زارع، زهرا بهرامی نژاد، نرگس یوسفی، زینب شمسیان، ندا آقاجانپور و شیرین شاهنگیان که در کنار هم خاطرات زیبایی را تجربه کردیم.

فهرست مطالب

عنوان **شماره صفحه**

چکیده فارسی ..... چ

چکیده انگلیسی ..... خ

فصل اول / مقدمه و کلیات

مقدمه ۲

۱-۱ آرسنیک ۲

۱ -۱-۲ سمیت آرسنیک ۳

۱-۱-۳ اثر آرسنیک در ماهی ۳

۱-۲- ترکیبات آلی آرسنیک ٤

۱-۲-۱ روکسارزون ٥

۱-۲-۱-۱ سابقه روکسارزون ٥

۱-۲-۲- سمیت روکسارزون ٦

۱-۳- ارزیابی عملکرد کلیه و مثانه ۸

۱-٤- جمع آوری ادرار ۱۰

۱-٤-۱- روش های جمع آوری ادرار در ماهی ۱۰

۱-٤-۱-۱ نمونه برداری ناحیه ای از مثانه ۱۱

۱-٤-۱-۲ محفظه های تقسیم شده ۱۱

۱-٤-۱-۳ لوله گذاری داخل مثانه ۱۲

۱-٤-۱-٤ لوله گذاری خارجی برای جمع آوری مستقیم ادرار خارج شده ۱۳

فصل دوم / مواد و روشها

۲-۱ تهیه نمونه ها ۱٦

۲-۲- طرح کلی آزمایش ۱٦

۲-۳- شرح آزمایش ۱٦

۲-۳-۱ بخش اول آزمایش ۱۷
۲-۳-۱-۱ آماده سازی فولی ۱۷
۲-۳-۱-۲ کانوله گذاری نمونه های غیر زنده ۱۸
۲-۳-۱-۳ کانوله گذاری در کپور زنده ۱۹
۲-۳-۲- بخش دوم آزمایش ۲۰
۲-۳-۲-۱ خوراندن روکسارزون به ماهی ۲۰
۲-۳-۲-۲ تهیه مقاطع بافتی ۲۱
۲-۳-۲-۳ آنالیز شیمیایی نمونه های ادرار ۲۱

فصل سوم / نتایج

۳-۱- کانوله گذاری ۲۳
۳-۲- تاثیر روکسارزون بر بافت ۲٤
۳-۳- شناسائی کمی و کیفی روکسارزون در ادرار ۲٦

فصل چهارم / بحث

٤-۱- روش جمع آوری ادرار ۲۹
٤-۲- روکسارزون ۳۱
٤-۲-۱- سرنوشت روکسارزون ۳۳
٤-۲-۲ تاثیر روکسارزون در بافت ۳٤
٤-۲-۲-۱ تاثیر روکسارزون بر کبد ۳٤
٤-۲-۲-۲ تاثیر روکسارزون بر کلیه ۳٥
٤-۲-۳- دفع روکسارزون از بدن ۳٦

پیشنهادات ۳۷

منابع ۳۹

ضمائم ٤٦

فهرست جدول

جدول ۳- ۱..... ۲۶

فهرست شکل ها

شکل۱-۱ ساختار شیمیایی روکسارزون..... ۶

شکل۱-۲ طرح شماتیک نفرون در ماهیان آب شیرین..... ۹

شکل۱-۳ محفظه های تقسیم شده..... ۱۲

شکل۱-٤ کانوله گذاری داخلی..... ۱۳

شکل۱-٥ کانوله گذاری خارجی..... ۱٤

شکل۲-۱ محل نگهداری نمونه ها..... ۱٦

شکل۲-۲ کوتاه کردن فولی..... ۱۸

شکل۲-۳ فولی آماده شده سایز ٦..... ۱۷

شکل۲-٤-a کانوله گذاری در نمونه غیر زنده..... ۱۸

شکل۲-٤-b کانوله گذاری در نمونه غیر زنده و طریقه قرار گرفتن آن..... ۱۹

شکل۲-٤-c شکل شماتیک از محل قرار گیری فولی..... ۱۹

شکل۳-۱ بافت کبد سالم و بافت کبد تحت تاثیر روکسارزون..... ۲٥

شکل۳-۲ بافت کلیه سالم و کلیه تحت تاثیر روکسارزون..... ۲٥

شکل۳-۳-a- کروماتوگرام HPLC از روکسارزون..... ۲۷

شکل۳-۳-b- کروماتوگرام HPLC از نمونه ادرار ماهی..... ۲۷

چکیده

تاثیر رشد دهنده های شیمیایی بر بافت کبد و کلیه ماهی و تغییرات شیمیایی ادرار

مریم عباسی

جمع آوری ادرار از ماهی در مطالعات متابولیکی جهت اندازه گیری ترشح و دفع ترکیبات بیوشیمیایی مختلف به کار می رود.این مطالعات به منظور تخمین غلظت مواد دفعی حاصل از گوارش مواد غذایی یا تبدیل متابولیکی موادی که در بدن ذخیره شده است، صورت می گیرد.

تحقیق حاضر تاثیر یک پیش برنده رشد را در گذر از مجاری گوارشی و سیستم دفعی دنبال نمود. به منظور تشخیص مسیر خروج روکسارزون از بدن ماهی، روش کانوله گذاری در داخل مثانه، جهت جمع آوری نمونه ادرار ماهی انتخاب گردید. برای کانوله گذاری از فولی هایی در اندازه های مختلف استفاده شد که جهت مناسب سازی ابتدای فولی با مثانه و جمع آوری مداوم ادرار در زمان های معین، تغییراتی در فولی ها صورت گرفت. سپس مقدار روکسارزون مورد نظر، به صورت محلول به ماهی خورانده شد. شناسایی روکسارزون موجود در نمونه های ادرار ماهی توسط دستگاه HPLC صورت گرفت. همچنین به منظور بررسی تاثیر روکسارزون بر کبد و کلیه، مقاطعی به منظور مطالعه بافتی تهیه شد.

در کانوله گذاری انجام شده، ماهی بطور معمول شنا کرده و فعالیت طبیعی خود را داشت. در بررسی حاضر روکسارزون بدون تغییر در ادرار یافته شد، لذا بخشی از روکسارزون تجویز شده به ماهی جذب خون شده و بتدریج توسط کلیه ها از بدن، تصفیه می گردد. تغییرات مشاهده شده در بافت کبد و کلیه ماهی کپور نیز نشان دهنده تاثیر این ترکیب آرسنیک دار آلی بر این اندام ها بوده و با توجه به حضور روکسارزون در ادرار، گذر روکسارزون از کلیه ها ثابت شد.در این مطالعه قدم اصلی در راه تاثیر روکسارزون بر ماهی با ارائه مکانیسم جمع آوری ادرار برداشته شد و تا حدی مسیر خروج آن از بدن ماهی تائید می شود.

لغات کلیدی : کانوله گذاری، روکسارزون، ماهی کپور

Abstract

The effect of synthetic growth promotors on fish liver and kidney and urine composition

M. Abbasi

In metabolic studies, urine collection in fish is designed to measure the excretion of various biochemical compounds. Such studies are made to estimate the concentration of excretory products resulted from digestion of food or metabolic conversion of reservoir materials. Because of anatomical differences in urinary system of marine and fresh water species and the anatomical diversity of teleosts, cannulation is a difficult and complex process.

In this study, the effect of a growth promotor was investigated while passing the intestinal tract and urinary system. Urinary bladder internal catheterization technique is used to recognize excretion route of roxarsone in fish. Catheterization accomplished by LATEX FOLEY CATHETER-Silicon Coated. In order to fit the catheter into urinary bladder and possibility of urine collection for a long period, it was modified desirably. Roxarsone was given to the fish in solution form. Urine samples were collected at specific time and kept in 5^{oc} temperature, to be analyzed by HPLC to detect roxarsone.

Histological studies were made to consider effect of roxarsone on liver and kidney tissues.

The advantage of present technique is durability of cannula for longer time, possibility of urine collection for many times particularly when urine quality is considered for drugs, food components and environmental effects.

Roxarsone was found unchange in urine. It was noticed that roxarsone, partly absorbed by blood and filtered by kidney gradually. Damaged kidney and liver tissues in common carp was signs of roxarsone effect by passing through liver and kidney.

This study was a primary step to identify the effects of roxarsone on fish by analyzing urine collected during a known period of time.

Key word: Catheterization, Roxarsone, Common Carp

فصل اول

مقدمه و کلیات

مقدمه :

در حال حاضر محیط زیست توسط هزارها ماده شیمیایی یا زنوبیوتیک های معرفی شده به محیط توسط انسان، آلوده می شود.اما اقدامات بسیار کمی در برابر میزان خسارت آلودگی انجام شده است. فلزات و شبه فلزات در صورت تجمع در بدن، بزرگترین عامل بالقوه بیماری هستند. در بین این فلزات سطح آلودگی آرسنیک به سطح بسیار خطرناکی در بسیاری ازنقاط جهان، منجمله هند[Chakraborty *et al.*, 2003] و خصوصاً بنگال غربی[Acharyya *et al.*, 1999] ، رسیده است.

آلایندگی آرسنیک در آبهای آشامیدنی یک نگرانی جهانی سلامت عمومی است. وجود این نگرانی در برخی کشورها به حدی رسیده است که برخی آن را بزرگترین عامل مسمومیت جامعه بشری دانسته اند[Bhattacharjee, 2007].

۱-۱ آرسنیک

بطور کلی شاخه های اصلی مصرف آرسنیک در محصولات محافظ چوب است. اغلب به صورت مواد شیمیایی کشاورزی، همچون حشره کش ها، آفت کش ها، قارچ کش ها و پیش برنده های رشد یافت می شود. مقادیر بسیار کمی در تولید برخی شیشه ها و آلیاژهای غیر آهنی و در صنعت الکترونیک استفاده می شوند[Department for Environment, Food and Rural Affairs and the Environment Agency, 2002].

آرسنیک می تواند واکنش های مختلفی را در محیط زیست متحمل شود که شامل واکنش های اکسایش- کاهش، تبادل لیگاند، رسوب و تغییر شکل زیستی است [Welch *et al.*, 1988]. ترکیبات آرسنیکی مختلفی در محیط شناسایی شده اند و در داخل سه گروه اصلی طبقه بندی می شوند: آرسنیک غیر آلی، آلی و آرسین [Masscheleyn *et al.*, 1991].

آرسنیک جزء اصلی و سازنده بسیاری از کانی هاست و اغلب با سولفور ترکیب می شود؛ مانند آرسنو پیریت (FeAsS). اما وقتی از منابع معدنی یا کانی ها جدا می شود، مجموعه ای از ترکیبات آلی و غیرآلی را در خاک، رسوبات و آبهای طبیعی تشکیل می دهد، اما بیشتر در فرم غیرآلی آرسنات [As(V)] یا آرسنیت [As(III)] است[Smith *et al.*, 1999]. فرم شیمیایی آرسنیک در آب به صورت یونهای اکسین باردار منفی است ($HAsO^{-2}_4$, $H_2AsO^{-}_4$, $H_2AsO^{-}_3$, $HAsO^{-2}_3$) [Sadiq, 1997].

۱-۱-۲ سمیت آرسنیک

به طور کلی گفته شده که ترکیبات آرسنیک آلی سمیت کمتری نسبت به انواع غیر آلی دارند و آنهایی که در ماهی و نرم تنان تجمع می یابد(به طور عمده آرسنوبتاین و آرسنوکولین که گاهی اوقات به عنوان "آرسنیک ماهی" قلمداد می شوند)، حقیقتاً غیر سمی هستند[Department for Environment, Food and Rural Affairs and the Environment Agency, 2002]. سمیت آرسنیک به مسیرکاربردی، شکل شیمیایی و فیزیکی ترکیب و میزان آن بستگی دارد. در بین آرسنیک غیر آلی، AsIII، بخاطر واکنش با گروه سولفیدریل سیستئین در پروتئین ها و غیرفعال کردن بسیاری آنزیم ها، سمیت بیشتری از AsV دارد. آرسنیک متیلاسیون را در کبد متحمل می شود و منجر به تشکیل مونو متیل آرسنیک اسید و دی متیل آرسنیک اسید می شود. این دو آرسنیک متیله شده، در مقایسه با گونه های غیر آلی، در سمیت متفاوت هستند. اشکال آرگانیک آرسنیک در ادرار سریع تر از اشکال غیرآلی دفع می شوند[Buchet and Lison, 2000].

۱-۱-۳ اثر آرسنیک در ماهی

در سیستم آبزیان آرسنیک غیر آلی می تواند در هر دو حالت اکسایشی AsIII و AsV ایجاد شود، هر دو شکل معمولاً با هم وجود دارند[Wakao *et al.*, 1988]. آرسنیک در حالت اکسیداسیون ۳+ ، سرطان زا است و می تواند بزرگی کبد، تخریب سلول، نکروز و فیبروز (تصلب بافت ها) را موجب شود[Santra *et al.*, 2000] .

آرسنیک به عنوان یکی از مهمترین عناصر سمی در ماهی ها طبقه بندی می شود و در حالت حاد، به خاطر افزایش القای آرسنیک در تولید موکوس، ایجاد خفگی یا اثرات زیانبخش و مستقیم روی اپیتلیوم آبشش ها، می تواند منجر به مرگ سریع شود [Bhattacharya *et al.*, 2007]. در ماهی ها تغییرات مورفولوژیکی، بعلاوه تغییرات اولیه در کبد ایجاد می شود [Irwin *et al.*, 1997]. در خورشید ماهی سبز (*Lepomis cyanellus*) ، همراه با تجمع آرسنیک در کبد، تغییراتی در سلول های کبدی بوجود آمد [Sorensen *et al.*, 1985].

هیچ تغییر قابل اندازه گیری در گناد ماهی آب شیرین *Colisa fasciatus* ، در دوز mgl^{-1} ۲ در طی ۱۰ یا ۳۰ روز مشاهده نشد؛ در حالیکه در دوز بالاتر تغییرات مشخصی در هر اندام دیده شد. تغییرات بیضه ای شامل دژنره شدن لوبول ها، کاهش در سلول های ترشحی و اسپرماتوژنز تغییر یافته همراه با نکروزیس بود[Shukla and Pendey, 1984b]. تغییرات تخمدان هم شامل کاهش در تکامل و رشد اووسیت ها در مرحله II و III، کاهش در تعداد قطر هستک ها و افزایش شمار فولیکول های آترشی بود[Wang *et al.*, 2004; Shukla and Pendey, 1984a]. گربه ماهی آب شیرین (*Clarias batrachus*) در مواجه با آرسنیک، افزایش میزان پروتئین در کبد همراه با کاهش وزن تر، افزایش در آمینواسیدهای آزاد و نفوذ پذیری بافتی را نشان می دهد [Jana *et al.*, 1986]. اگرچه در آبهای آشامیدنی آلودگی طبیعی با آرسنیک غیر آلی وجود دارد، اما بیشترین خطر برای سلامت انسان ها و محیط زیست، استفاده از ارگانوآرسنیکال های تجاری است، که یک نگرانی در حال رشد است [Sapkota *et al.*, 2007].

۱-۲- ترکیبات آلی آرسنیک

ترکیبات ارگانیک آرسنیک، به صورت افزودنی خوراک حیوانات و در مصارف دارویی بکار می روند، همچون Arsanilic acid، Roxarsone، Carbarsone و Nitarsone. آرسانیلیک اسید و روکسارزون برای افزایش وزن و راندمان تغذیه در جوجه ها و خوک ها و کنترل اسهال خونی در خوک ها مورد استفاده قرار می گیرد و دوتای بعدی برای درمان حساسیت در بوقلمون ها بکار می روند [Brown, 2003].

ارگانو آرسنیکال هایی همچون رکسارزون به طور گسترده در صنعت طیور استفاده می شوند [Chapman *et al.*, 2002; Arai *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2004] ۳-نیترو ٤-هیدروکسی فنیل آرسنیک اسید(3-NHPAA) یا رکساروزون، در حال حاضر در مالزی در صنعت طیور به عنوان یک پیش برنده رشد برای بهبود تبدیل غذا، پردهی و افزایش تولید تخم مرغ مورد استفاده قرار می گیرد. در ویرجینیا آمریکا واحدهای تولید طیور بطور نمونه ترکیبی از روکسارزون و آنتی بیوتیک ها را برای رشد بهینه استفاده می کنند [Chapman and Johnson, 2002].

مصرف گسترده روکسارزون در مناطقی همچون شبه جزیره Delmarva، منجر به افزایش نگرانی در باره سرنوشت زیست محیطی این ترکیب شده است.وقتی که فضولات طیور به عنوان کود کشاورزی بکار می روند سالانه حدود ۵۰-۲۰ تن آرسنیک وارد شبه جزیره Delmarva می شود [Christen, 2001].

۱-۲-۱ روکسارزون

روکسارزون شامل کمترین میزان آرسنیک توصیه شده در غذای حیوانات است[Alpharma, 1999]. آرسنیک در سطوح بسیار پائین در بافت های حیوانات تغذیه شده با آرسنیکال ها مشخص شده است[Calvert, 1975; Wershaw *et al.*, 1999] .

هر چند بررسی ها نشان داده، وقتی که آرسنیکال ها به مدت ۵ روز قبل از کشتار از جیره غذایی حذف شوند، میزان آرسنیک به سرعت به زیر محدوده تعیین شده توسط FDA (آژانس جهانی غذا و داروی آمریکا)، ۰/۵ppm، کاهش می یابد [Andersone and Chamblee, 2001].

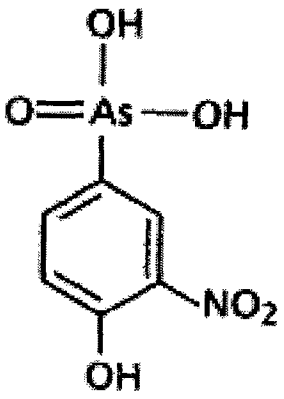
برخی مطالعات ثابت کرده که این ترکیب ارگانوآرسنیک در بافت یا پر مرغ تجمع نمی یابد، اما به سرعت و بدون تغییر دفع می شود، که منجر به افزایش غلظت رکسارزون در کود حاصل از ماکیان می شود

[Jafariah *et al.*, 2006; Rutherford *et al.*, 2003; Mandal and Suzuki, 2002].

بیشتر روکسارزون بدون تغییر از جوجه ها دفع می شود [Morrisone, 1969]، در حالیکه باقیمانده آن، میزان کل آرسنیک موجود در بافت جوجه را افزایش می دهد [Lasky *et al.*, 2004] ، روکسارزون باقی مانده می تواند به بلع ۵/۲٤-۱/۳۸ میلی گرم در روز آرسنیک در متوسط مقدار، در صورت مصرف جوجه توسط انسان (٦۰ گرم/فرد/روز) برسد [Walling, 2006]. روکسارزون دفع شده می تواند دارای خطر زیست محیطی باشد، بطوریکه میکروب های بی هوازی می توانند آرسنیت غیر آلی (AsIII)، را از روکسارزون آزاد کنند[Stolz *et al.*, 2007].

۱-۲-۱-۱ سابقه روکسارزون:

در سال ۱۹۰۷، روبرت کخ، اولین مصرف دارویی یک آرسنیکال آلی،(P-Arsanilic acid (atoxyl راکشف کرد. این ترکیب برای درمان بیماری خواب استفاده می شد. در ۱۹۳۰، آرسنیکال های زیادی به منظور یافتن اثر درمانی و کنترل اجتماع باکتریایی آزمایش شدند که سرانجام روکسارزون بهترین نتیجه را داد [Andersone, 1999]. در سال ۱۹٤٥، Mayfield و Morehouse کشف کردند که روکسارزون (شکل۱-۱) می تواند به عنوان یک پیشبرنده رشد و کنترل کننده کوکسید و تجمع رنگدانه ها در بافت در جوجه ها بکار رود [Calvert, 1975].



شکل۱-۱ ساختار شیمیایی روکسارزون

روکسارزون ($C_6H_6AsNO_6$)، با وزن مولکولی ۲٦۳۰۰ از ترکیبات آلی آرسنیک دار است. به سختی در آب حل می شود، اما به نسبت ۱ به ۳۰ در آب جوش قابل است. متانول، اتانول، استون و اسید استیک حلال های خوب این ماده هستند. این ماده به مقدار ناچیز در آب حل می شود و در اتیل استات و اتر غیر قابل حل است. نقطه ذوب این ماده حدود ۱۵۱ درجه سانتی گراد است. روکسارزون به میزان ۵۰ گرم در هر تن غذای مرغ و بوقلمون و ۲۵ تا ٤۰ گرم در هر تن غذای خوک به کار میرود و توقف معرفی روکسارزون، ۷ روز قبل از کشتار صورت می گیرد[Vandiver, 2004].

۱-۲-۲- سمیت روکسارزون :

اثرات روکسارزون روی سلامت انسان ها بخوبی مطالعه نشده است و مکانیسم تاثیر بیولوژیکی آن روی بافت های پستانداران ناشناخته است، هر چند پیشنهاد شده است که تمام اثرات بیولوژیکی روکسارزون مستلزم تبدیل آن به AsIII غیر آلی است [O'Connor *et al.*, 2005].

اطلاعات موجود درباره سمیت روکسارزون پیشنهاد می کند که مجاری گوارشی(معده و روده)، کلیه و سیستم عصبی نقاط حساس به روکسارزون هستند. استفراغ و خونریزی معده و روده در سگ های دریافت کننده ۵۰ میلی گرم روکسارزون مشاهده شده است. اثرات کلیوی در موش در معرض ۳۲ میلی گرم روکسارزون/ کیلوگرم/ روز، شامل افزایش در وزن کلیه، دژنره شدن سلول های اپی تلیال توبولی و معدنی شدن موضعی بود.

قابلیت تحریک شدگی بالا، ناهماهنگی حرکتی و یا لرزش در موش های صحرائی در معرض ۲۰ میلی گرم/کیلوگرم/روز برای ۱۳ هفته مشاهده شد. لرزش ماهیچه ای در دوز های بالاتر از ٦/۳ میلی گرم روکسارزون/ کیلوگرم/روز و تخریب میلین در طناب عصبی در دوز ٦/۳میلی گرم دیده شد.

به نظر می رسد که خوک ها بطور ویژه به سمیت عصبی روکسارزون حساس باشند. از طرف دیگر، هیچ گونه تاثیر بر معده و روده در موش های آزمایشگاهی و موش های صحرائی با ۲ یا ٤۲ میلی گرم/کیلوگرم/روز در طی دو سال دیده نشد.

شواهد نامعلومی از سرطان زائی روکسارزون (افزایش خفیف در انتشار تومور های پانکراتیک)، در موش های نری که به طور حاد در معرض روکسارزون بودند، پیدا شده است. هیچ افزایشی در تومورهای سرطانی در موش های ماده صحرائی یا ماده های آزمایشگاهی مشاهده نشد. مطالعات نسبتاً کمی از سمیت ژنی ارگانوآرسنیکال ها وجود دارد، برخی آزمایشات نشان داده که دی متیل آرسنیک(DMA) و روکسارزون قادرند تا جهش و گسیختگی زنجیره DNA را موجب شوند، اما بدون اطلاعات بیشتر به سختی می توان قضاوت کرد که تاثیری بر سلامت انسان ها دارد [U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2007].

به خاطر مصرف زیاد روکسارزون در نواحی جغرافیایی خاص، سرنوشت زیست محیطی این ترکیب و محصولات تغییر یافته آن، اهمیت دارد تا اثرات احتمالی بر سلامت انسان و محیط زیست بررسی و مطالعه شود.

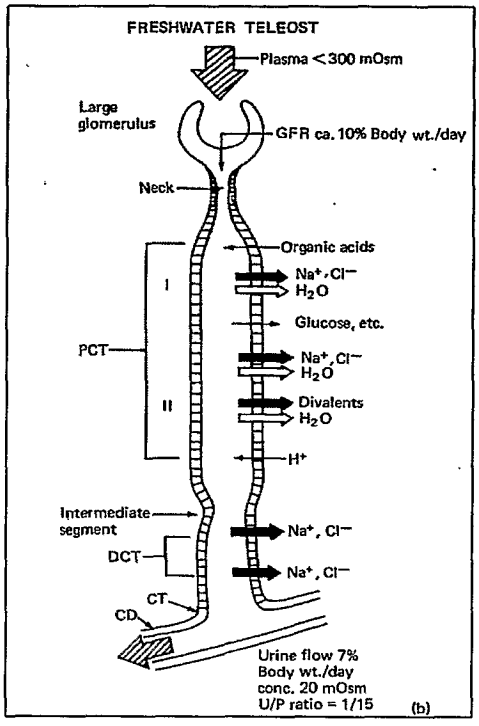
۱-۳- ارزیابی عملکرد کلیه و مثانه :

بطور کلی ماهیان استخوانی، ترکیب یونی و اسمولاریته مایعات بدنشان را در سطوح مشخصی متفاوت از محیط خارج نگه می دارند. بطور مشخص ماهیان استخوانی آب شیرین هیپراسموتیک و ماهیان دریایی در مقایسه با محیط بیرونی مربوطه، هیپواسموتیک هستند[Foskett *et al.*, 1983]. به نظر می رسد که هر دو حالت دارای نقائصی است که ماهیان باید بر آن ها فائق آیند، تا بتوانند آبهای کره زمین را اشغال کنند. بنابراین ماهیان باید از نظر فیزیولوژیکی قادر باشند که از جذب یا اتلاف بیش از حد آب جلوگیری کنند. در ماهیان آب شیرین، آب بطور اجتناب ناپذیر، مازاد بر نیاز موجود زنده از طریق اسمز به داخل کشیده می شود [ستاری و همکاران، ۱۳۸۵].

مکانیسم های مختلفی در تنظیم اسمزی ماهیان آب شیرین دخیل هستند. نخست سطح بدن که نفوذپذیری کمی به آب و یون ها دارد و وجود فلس و موکوس در آنها نفوذپذیری سطحی بدن را کاهش می دهد. همچنین کلیه ها برای جبران جذب اسمزی آب در ماهیان استخوانی آب شیرین حجم زیادی از ادرار رقیق را تولید می کند. برای کاهش اتلاف نمک، ادرار توسط بازجذب فعال نمک ها رقیق می شود. در واقع فرایند تشکیل ادرار در ماهیان استخوانی آب شیرین مدلی ساده از عملکرد کلیه مهره داران است. کلیه شامل میلیونها واحد توبولی مشخص یا نفرون است. عملکرد نفرون تصفیه خون از متابولیت های زاید و مواد خارجی است. برای انجام این عمل خون در گلومرولوس، یک ساختار منحصر به فرد در مهره داران، فیلتر می شود. مایعی که فیلتر می شود، فاقد خون و مولکول های بزرگی همچون پروتئین است. این مایع همچنین متابولیت های ضروری (مانند گلوکز، اسید آمینه) را به خون باز می گرداند. این اعمال در توبول های پروکسیمال و دیستال نفرون ها صورت می گیرد؛ در نهایت مواد زاید به صورت ادرار به محیط خارج ترشح می شوند[McFarland *et al.*, 1979].

بطور کلی ساختار نفرون، در ماهیان آب شیرین شامل گلومرول، کپسول بومن، قطعه پروکسیمال دو قسمتی(نزدیک)، یک قطعه حد واسط، یک قطعه دیستال(دور) و توبول جمع کننده است (شکل۱-۲). اگر مایعات صاف شده از خون در محل گلومرول، بهمراه تمام نمک هایی که بطور کامل و متعارف در داخل آنها وجود دارند، دفع شوند، هیچ گونه منفعتی از این تنظیم اسمزی عاید ماهی نمی شود. منفعت زمانی عاید می شود که ادرار دفعی، رقیق تر از پلاسما باشد (منفعت فیزیولوژیک دیگر در بعضی از ماهیان، با ترشح مقادیر کمی از ترشحات نیتروژنی زائد به داخل ادرار حاصل می شود) [ستاری و همکاران، ۱۳۸۵]. برای حفظ یون های

ضروری، باز جذب آنها به طور فعال، از توبول های پروکسیمال و دیستال که در ماهیان استخوانی آب شیرین به آب نفوذپذیر است، صورت می گیرد؛ بنابراین ادرار تولید شده رقیق و نسبت به خون هیپواسموتیک است[McFarland *et al.*, 1979].



شکل۱-۲ طرح شماتیک نفرون در ماهیان آب شیرین

به نظر می رسد در ماهیان استخوانی، کیسه ادراری (مثانه) درتنظیم اسمزی نقش دارد[Wood and Patrick, 1994]. دیواره این کیسه نسبت به آب غیر قابل نفوذ است و در واقع محل بازجذب یون ها به حساب می آید. غلظت اسمزی ادرار در گونه های مختلف و شرایط متفاوت، متغیر است. ادرار حاوی مقادیر کمی از ترکیبات نیتروژنی، مانند اسید اوریک، کراتین، کراتینین و آمونیاک است [ستاری و همکاران، ۱۳۸۵].

۱-٤- جمع آوری ادرار

جمع آوری ادرار از ماهی، در مطالعات متابولیکی، جهت اندازه گیری ترشح و دفع ترکیبات بیوشیمیایی مختلف به کار می رود. این مطالعات به منظور تخمین غلظت مواد دفعی که از جذب مواد غذایی یا از طریق تبدیل متابولیکی موادی که در بدن ذخیره شده، صورت می گیرد[Coloso *et al.*, 2001].

فاکتورهای مشخص جهت تاثیر بر نتایج بررسی های فیزیولوژیکی کلیه و جمع آوری ادرار در ماهی، متناسب با زمان بندی جمع آوری ادرار است و به زمان تغذیه دستی ماهی، عوامل بیهوشی و اطمینان از روش نمونه برداری وابسته است که امکان بدست آوردن مقدار ادرار مورد نیاز را برای تشخیص ترکیبات فراهم می کند [Roy and Lall, 2003].

دربیشتر ماهیان استخوانی، مجرای جمع کننده ادرار از هر سمت کلیه به داخل مجرای مزونفریک جداگانه ای خالی می شود که عموماً میزنای نامیده می شود و ادرار را به یک مجرای آرکی نفریک منفرد ملحق می سازد. مجرای آرکی نفریک معمولاً تا اندازه ای گسترش می یابد که عموماً urinary bladder یا مثانه نامیده می شود و از طریق پاپیلای ادراری به بیرون باز می شود. از لحاظ جنین شناسی، مثانه نیز مانند کلیه از مزودرم منشاء می گیرد و اکنون مشخص شده است که اپی تلیوم آن، نقش کلی در انتقال یون ها و تعدیل نهائی ادرار بازی می کند[Wood and Patrick, 1994].

۱-٤-۱- روش های جمع آوری ادرار در ماهی:

جمع آوری ادرار در آبزیان، خصوصاً ماهیان به خاطر شنای آزاد و مداوم آنها آسان نبوده و روش های متعددی با توجه به نوع آزمایش و اهداف آن پیشنهاد شده است :

۱-٤-۱-۱ نمونه برداری ناحیه ای از مثانه (Spot Sampling from Urinary Bladder):

این روش با موفقیت بزرگی توسط فیزیولوژیست ها در اواخر ۱۸۰۰، همراه بود و باعث شد تا اطلاعاتی در مورد اساس عملکرد کلیه ماهیان غضروفی و استخوانی جمع آوری شود[Marshall, 1934]. اخیراً این روش به عنوان بخشی از روش های غیر

مستقیم جهت اندازه گیری میزان دفع و جریان ادراری بدون لوله گذاری، مورد استفاده قرار می گیرد. در این روش ماهی به سرعت بیهوش شده یا با یک ضربه سریع سر کشته می شود، یک لوله موئین شیشه ای یا یک لوله پلی اتیلن از طریق پاپیلای ادراری در داخل مثانه قرار داده شده و ادرار بوسیله مکش گرفته می شود. از معایب این روش آن است که تنها یک نمونه برداری لحظه ای صورت می گیرد و امکان جریان ادراری مداوم و تعیین میزان دفع آن وجود ندارد[Curtis and Wood, 1992].

۱-٤-۱-۲ محفظه های تقسیم شده (Divided Chamber):

این تکنیک توسط Homer Smith در سال ۱۹۲۹ کشف شد و نخستین اثبات تجربی را فراهم کرد که آبشش ها بیشتر از کلیه، جایگاه اصلی ترشح و دفع اوره و آمونیوم در تلئوست های ammoniotelic هستند. در این روش ماهی به آرامی توسط یک ماده بیهوش کننده(MS 222) بیهوش شده و سپس سر ماهی در سوراخی در یک غشای الاستیکی وارد می شود. ماهی در وضعیتی قرار می گیرد که ناحیه آبشش ها از بقیه تنه جدا است. اندازه سوراخ و مکان صحیح غشاء بستگی به آناتومی گونه دارد [Smith, 1929;Wood and Patrick, 1994].

در بیشتر موارد مانعی پشت باله های جانبی قرار می گیرد، بعلاوه چندین بخیه و یا چسب سیانواکریلیت به نگهداری پرده در جایش کمک می کند. در برخی گونه ها لازم است تا برای جلو گیری از تقلای ماهی، بیهوشی خفیفی صورت گیرد. محفظه های جلوئی و عقبی محتوی آب هوادهی شده هستند، که حجم و ترکیباتش در سطح یکسانی نگه داشته شده است. تغییرات اندازه گیری شده در ترکیب آب نشان دهنده میزان دفع کلیوی و برانشیال جانور خواهد بود.

این روش برای مطالعه جزئیات دفع کلیوی مفید است. مزایای این روش سهولت آن بویژه برای گونه هایی است که اندازه کوچکی دارند و یا آناتومی ادراری- تناسلی آنها از لوله گذاری ممانعت می کند.معایب این روش شامل استرس ایجاد شده در ماهی بر اثر محدود شدن، امکان نشت مواد از یک محفظه به دیگری، دشواری اندازه گیری مواد دفع شده خاص با توجه به مواد موجود در آب است[Wood and Patrick, 1994].