

تغییرات هیستوپاتولوژیک کلیه ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) تحت تاثیر بنزوآلفاپایرن و باکتری (*Vibrio alginolyticus*)

: مهین صادقی^{۱*}، نگین سلامت^۲

چکیده

بنزوآلفاپایرن (BaP) از سمی ترین ترکیبات موجود در نفت خام است که با آلودگی اکوسیستم های آبی، موجب تضعیف سیستم ایمنی آبزیان و کاهش مقاومت آنها در برابر پاتوژن های فرصت طلب می شود. باکتری *V. alginolyticus* گونه ای از این پاتوژن های فرصت طلب است که در شرایط استرس زا، موجب بیماری ویبریوزیس در موجودات مختلف می گردد. به منظور بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیک ناشی از تاثیر دو استرسور BaP و باکتری *V. alginolyticus* بر کلیه ماهی هامور معمولی، تعداد ۱۴۰ قطعه از این ماهیان به طور تصادفی در ۷ تیمار قرار گرفتند و به مدت ۱۶ روز بررسی شدند. در تیمار شاهد هیچ تزریقی انجام نشد، در تیمار کنترل حلال، فقط روغن نارگیل و در تیمار باکتری غلظت 10^7 cfu/ml *V. alginolyticus* تزریق شد. به تیمارهای ۴ و ۵ به ترتیب غلظت های 20 mg/kg BaP و 200 و به تیمارهای ۶ و ۷ به ترتیب 20 mg/kg BaP + 10^7 cfu/ml *V. alginolyticus* و 200 mg/kg BaP + 10^7 cfu/ml *V. alginolyticus* تزریق شد. نمونه برداری از بافت کلیه در روزهای ۱، ۴، ۷ و ۱۴ صورت گرفت و پس از انجام مراحل بافت شناسی، بافت های مذکور در زیر میکروسکوپ نوری بررسی شدند. در تیمارهای مختلف ضایعاتی نظیر تشکیل مراکز ملانوماکروفاژی، نفوذ لوکوسیتی، افزایش فضای ادراری، جدا شدن غشای پایه از اپی تلیوم لوله های کلیوی، اتساع مویرگ های گلومرولی و خونریزی مشاهده گردید. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت بنزوآلفاپایرن وسعت و شدت ضایعات افزایش می یابد. از طرفی بیشترین ضایعات مربوط به تیمارهای ترکیبی و به ویژه 200 mg/kg BaP + باکتری در روز هفتم آزمایش بود. به طوری که نداشتن سازمان یافتگی بافتی، تجمع مراکز ملانوماکروفاژی و خونریزی شدید در این تیمارها مشاهده گردید.

کلمات کلیدی: بنزوآلفاپایرن، *Vibrio alginolyticus*، ماهی هامور معمولی، کلیه، هیستوپاتولوژی

۱- دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر. دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی. گروه زیست دریا

۲- نگین سلامت، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر. دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی. گروه زیست دریا.

بافت های هدف در بیماری ویبریوزیس است (۱)؛ از طرفی، یکی از اولین اندام هایی است که در مواجهه با آلاینده های محیطی، تحت تاثیر قرار می گیرد (۲۲). با توجه به اهمیت کلیه، در تنظیم اسمزی آب و نمک از طریق دفع مواد نیتروژن دار زائد از بدن موجودات (۱۶)، اختلال در عملکرد آن، می تواند موجب اختلال در همئوستاز بدن گردد. در این پژوهش، گونه مورد بررسی ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) می باشد. این ماهی از جمله ماهیان بومی خلیج فارس با ارزش غذایی بالاست که در جنوب کشور از بازارپسندی بالایی برخوردار است (۵). هدف از مطالعه حاضر، بررسی آسیب های بافتی ناشی از آلاینده شیمیایی (هیدروکربن آروماتیک پنج حلقه ای بنزوآلفاپایرن) و عامل مولد بیماری عفونی حاد ویبریوزیس (*V. alginolyticus*) و همچنین ارزیابی تاثیر همزمان این دو استرسور بر ساختار بافتی کلیه ماهی هامور معمولی می باشد. با توجه به اینکه در این خصوص، مطالعات چندانی در کشور انجام نشده است، مطالعه حاضر می تواند اطلاعات ارزشمندی در ارتباط با اثرات همزمان عوامل عفونی و غیرعفونی بر بدن ماهی، به عنوان یک مهره دار آبی و یکی از با ارزش ترین کالاهای سبد غذایی مردم، در اختیار محققین قرار دهد.

در چند دهه اخیر، افزایش فعالیت های آنتروپوژنیک منجر به افزایش سطوح آلاینده های ارگانیک و غیرارگانیک در اکوسیستم های دریایی و گسترش آنها بویژه در مناطق ساحلی شده است (۱۵). مشکلات آلودگی نفتی خصوصا در مناطق تولیدکننده نفت مانند خلیج فارس بسیار جدی و حاد می باشد. بیشترین تاثیر نفت به بخش آروماتیک آن به ویژه هیدروکربن های آروماتیک های چندحلقه ای (PAHs) نسبت داده می شود (۱۲). این ترکیبات به دلیل خاصیت چربی دوستی بالا، قادر به عبور از غشای پلاسمایی انواع سلول ها بوده و با برقراری پیوند کوالانسی با ماکرومولکول های سلول (پروتئین ها، DNA و RNA) منجر به آسیب های سلولی، جهش و انواع سرطان می شوند (۱۳). بنزوآلفاپایرن (BaP) ایمنوتوکسیک ترین و سرطانزاترین PAH هاست (۷). این ترکیب با مکانیسم های مختلفی موجب تضعیف سیستم ایمنی موجودات می گردد (۶). تضعیف سیستم ایمنی شرایطی برای بیماری زایی پاتوژن های فرصت طلب از قبیل *V. alginolyticus* فراهم می کند (۶). این باکتری که جزء فلور میکروبی نرمال محیط های دریایی و آبزیان مختلف از جمله ماهی هامور معمولی محسوب می شود، در شرایط استرس زا موجب بروز یک عفونت سیستمیک بنام ویبریوزیس می گردد. کلیه از جمله

روش کار

شد. محلول استوک این ترکیب، از حل کردن میزان معینی از BaP در روغن نارگیل تهیه شد و سپس غلظت های ۲۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم بنزوالفاپایرن، آماده گردید (۱۷). در روز اول آزمایش، غلظت های مذکور بوسیله سرنگ انسولین و به صورت درون صفاقی به ماهیان تزریق شد. همچنین باکتری *V. alginolyticus* نیز به صورت لئوفیلیزه تهیه گردید و در بافرسفات به حجم ۲۰ میکرولیتر رسید. سوسپانسیون آماده شده از باکتری، ۴۸ ساعت پس از تزریق بنزوالفاپایرن، به ماهیان تزریق گردید. طول دوره آزمایش، از زمان تزریق باکتری به مدت ۱۴ روز در نظر گرفته شد، زیرا بنا بر گزارشات موجود، این دوره زمانی برای پیشرفت بیماری ویرزیوس کافی می باشد. در طول این مدت، وضعیت زنده ماندن و مرگ و میر ماهیان کنترل گردید و تغییرات غیرطبیعی در فاکتورهای وضعیتی (طول و وزن) یا رفتاری ماهیان (شنای غیرنرمال و بی هدف، فعالیت زیاد یا کاهش اشتها) بررسی و کنترل شد (۱۹). در روزهای ۱، ۴، ۷ و ۱۴ نمونه گیری از بافت کلیه تمام ماهیان هامور معمولی انجام شد. بافت کلیه ماهیان مورد مطالعه، به آرامی و با دقت، به وسیله یک پنس ظریف از بافت های اطراف جدا گردید و پس از تثبیت در بافرفرمالین، به منظور آگیری، شفاف کردن و آغستگی به پارافین، به دستگاه تمام اتوماتیک هیستوکینت، مدل (RX-۱۱B, Tissue tek rotary, japan) منتقل شد. پس از آن، مقاطع ۵-۶ میکرومتری از قالب های پارافینی توسط دستگاه میکروتوم مدل (LEICA-RM ۲۲۴۵) تهیه گردید و مورد رنگ آمیزی عمومی هماتوکسیلین-اوتوزین (H&E) قرار گرفت. جهت بررسی هیستوپاتولوژیک مقاطع بافتی رنگ آمیزی شده، از بزرگ نمایه های مختلف میکروسکوپ نوری Olympus استفاده و تصاویر مناسب توسط دوربین مجهز به نرم افزار Dino capture تهیه و ذخیره شد.

در این پژوهش تعداد ۱۴۰ عدد ماهی هامور معمولی نابالغ جنسی، با میانگین طولی $20/8 \pm 0/2$ سانتیمتر و میانگین وزنی $180 \pm 7/9$ گرم، از ایستگاه تحقیقاتی بندر امام خمینی تهیه گردید و در همان مرکز در تانک های ۶۰۰۰ لیتری (پر شده با آب تیمار شده با اشعه UV) نگهداری شدند. در ادامه، این ماهیان به ۷ تانک ۳۰۰ لیتری (پر شده با ۲۰۰ لیتر آب فیلتر شده و هوادهی شده دریا) منتقل شدند. پیش از شروع آزمایش، دوره سازگاری ده روزه، به منظور آدپته شدن ماهیان با شرایط آزمایشگاهی در نظر گرفته شد (۲). در طی دوره سازگاری و دوره آزمایش هیچ گونه غذادهی به ماهیان صورت نگرفت (۲۳). در طول این زمان، پارامترهای شیمیایی آب (دما، شوری و pH) به طور منظم اندازه گیری و ثبت می گشت؛ همچنین، روزانه دوسوم حجم آب هر تانک با سیفون کردن از کف تانک ها خارج می شد، تا از تجمع مواد زائد در آب جلوگیری گردد (۲۳). جهت انجام این مطالعه ماهیان هامور معمولی، به طور تصادفی در ۷ تیمار قرار داده شدند. در تیمار شاهد هیچ تزریقی انجام نشد. در ماهیان تیمار شاهد حلال، روغن نارگیل به صورت درون صفاقی تزریق شد (جهت ارزیابی اثرات احتمالی روغن نارگیل). در تیمار باکتری نیز، تزریق غلظت 10^7 cfu/ml از باکتری *V. alginolyticus* صورت گرفت. در گروه های ۴ و ۵ به ترتیب غلظت های 20 mg/kg و 200 mg/kg بنزوالفاپایرن به صورت درون صفاقی تزریق شد. ماهیان در تیمار ۶، علاوه بر دریافت درون صفاقی 20 mg/kg بنزوالفاپایرن، غلظت 10^7 cfu/ml باکتری *V. alginolyticus* را نیز دریافت کردند. در تیمار ۷ نیز، تزریق 200 mg/kg کیلوگرم بنزوالفاپایرن و غلظت 10^7 cfu/ml از باکتری *V. alginolyticus* به صورت درون صفاقی انجام شد (۲۳). در این مطالعه، از گرانول های جامد زردرنگ BaP (Aldrich, USA) با خلوص بالای ۹۷٪ استفاده

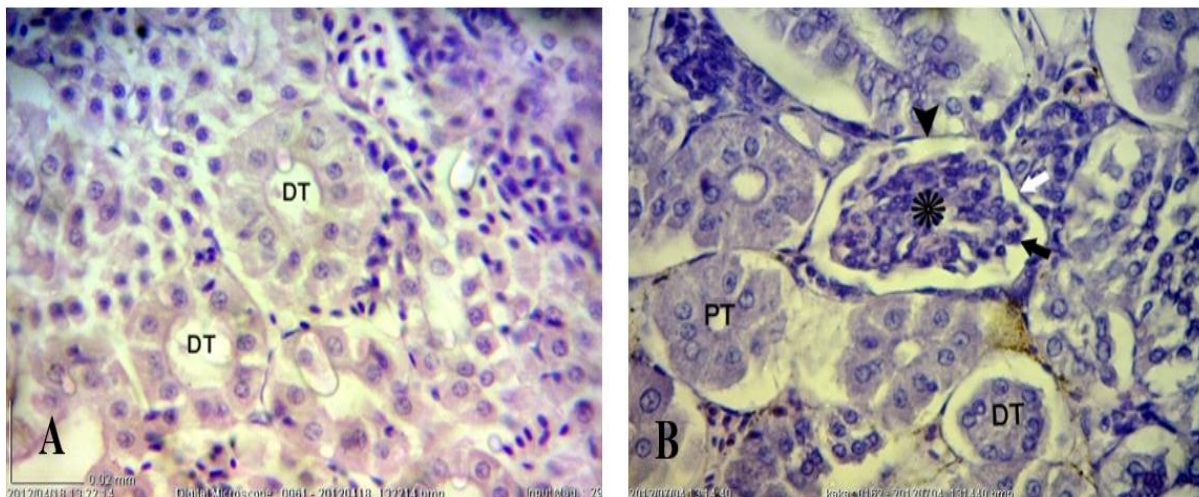
نتایج

مشاهده شده در تیمار $Bac + BaP_{200} mg/kg$ بیشتر از $Bac + BaP_{20} mg/kg$ بود (شکل ۲- C, D). همچنین در روز چهارم، جداسدن غشای پایه از اپی تلیوم لوله های ادراری تنها عارضه مشاهده شده در تیمار باکتری بود. در روز هفتم نمونه برداری، در تیمارهای $BaP_{20} mg/kg$ و $BaP_{200} mg/kg$ افزایش فضای ادراری، واکوئوله شدن سلول های پوششی لوله های ادراری، تجمععات لوکوسیتی و خونریزی مشاهده گردید. این ضایعات در تیمار $BaP_{20} mg/kg$ نسبت به تیمار $BaP_{200} mg/kg$ وسعت و شدت بیشتری داشت (شکل ۳- A). در تیمار باکتری، آسیب های بافتی مشاهده شده شامل تشکیل مراکز ملانوماکروفاژی، تجمععات لوکوسیتی، دژنراسیون اپی تلیوم لوله های ادراری، اتساع مویرگ های گلومرولی، تخریب گلبول های قرمز خون و خونریزی، نکروز وسیع و به هم ریختگی سازمان یافتگی بافت کلیه بود (شکل ۳- D). عوارض مذکور، با شدت و وسعت بیشتری در تیمارهای ترکیبی مشاهده و ثبت گردید (شکل ۳- B, C). در روز چهاردهم نمونه برداری، تجمععات لوکوسیتی و خونریزی در تیمار $BaP_{20} mg/kg$ نیز مشاهده شد. در تیمار $BaP_{200} mg/kg$ نیز افزایش مراکز ملانوماکروفاژی و تجمععات لوکوسیتی و همچنین خونریزی مشاهده گردید. در تیمار باکتری نیز خونریزی، افزایش تجمععات لوکوسیتی، افزایش مراکز ملانوماکروفاژی، وجود سلول های خونی تخریب شده قابل مشاهده بود (شکل ۴- B). در تیمارهای ترکیبی، همین عوارض به همراه اتساع مویرگ های گلومرولی، جداسدن غشای پایه از اپی تلیوم لوله های ادراری و افزایش فضای ادراری دیده شد (شکل ۴- A). مقایسه ضایعات بافتی کلیه در تمام ماهیان هامور معمولی مورد آزمایش، در روزهای مختلف نمونه برداری، نشان داد که

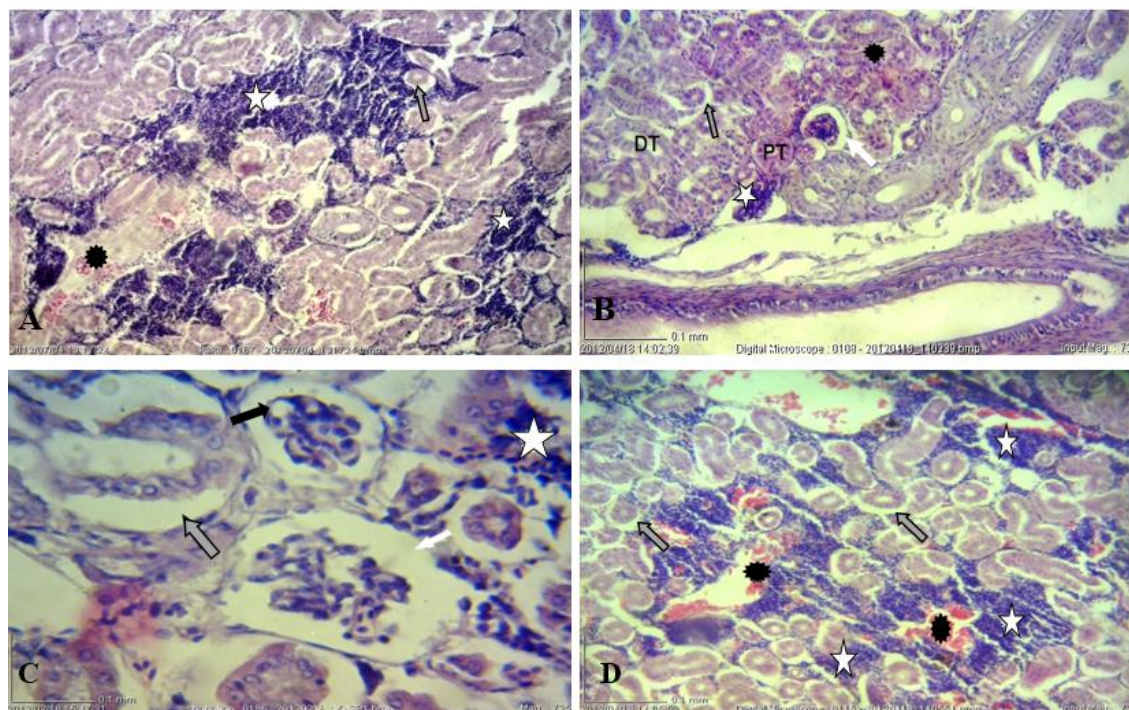
نتایج حاصل از مطالعه هیستوپاتولوژیک کلیه ماهی هامور معمولی تحت تاثیر غلظت های مختلف بنزوالفاپایرن، باکتری *V. alginolyticus* و ترکیب این دو استرسور، ضایعات پاتولوژیک مختلفی را در این اندام نشان داد. نمونه های بافت کلیه در تیمارهای شاهد و شاهد حلال (روغن نارگیل) در تمام روزهای نمونه برداری، دارای ساختار بافتی طبیعی بود (شکل ۱- A, B). علاوه بر این، ساختار بافتی کلیه در تمام تیمارهای مورد مطالعه، در اولین روز نمونه برداری، طبیعی و مشابه گروه های شاهد بود. به طوری که، ساختار بافتی این اندام، شامل جسمک های کلیوی (کپسول بومن و گلومرول) و لوله های ادراری در میان بافت همبند بود. کپسول بومن، دارای یک لایه جداری (بافت پوششی سنگفرشی ساده) و یک لایه احشایی (سلول های پدوسیت) بود. فضای ادراری (فضای بین لایه جداری و لایه احشایی) اندازه طبیعی داشت و کلافه مویرگی درون جسمک های کلیوی مشاهده گردید. لوله های ادراری (نزدیک و دور) نیز دارای یک لایه سلول های اپی تلیال استوانه ای کوتاه تا مکعبی و حفره مرکزی مشخص بودند (شکل ۱- A, B). در روز چهارم نمونه برداری، در تیمارهای $BaP_{20} mg/kg$ و $BaP_{200} mg/kg$ ، جداسدن غشای پایه از اپی تلیوم لوله های ادراری، افزایش تجمععات لوکوسیتی، اتساع مویرگ های گلومرولی و خونریزی مشاهده گردید (شکل ۲- A, B). شدت و وسعت ضایعات مشاهده شده به صورت وابسته به دوز افزایش یافت، به طوری که در تیمار $BaP_{200} mg/kg$ وسعت و تنوع ضایعات بیش از تیمار $BaP_{20} mg/kg$ بود (شکل ۲- B). در تیمارهای ترکیبی، همین عوارض با وسعت بیشتر به همراه افزایش فضای ادراری و واکوئوله شدن سلول های پوششی لوله های ادراری مشاهده گردید. ضایعات

شد. اما در روز چهاردهم میزان ضایعات ثبت شده در تمامی تیمارها نسبت به روز هفتم کاهش یافته و آسیب های بافتی ایجاد شده رو به بهبود بودند.

در روز هفتم، شدت و تنوع ضایعات مشاهده شده در تمام تیمارها، بیشتر از سایر روزها بود و به ویژه بیشترین آسیب های بافتی، در تیمارهای ترکیبی دو استرسور (BaP و باکتری *V. alginolyticus*) مشاهده

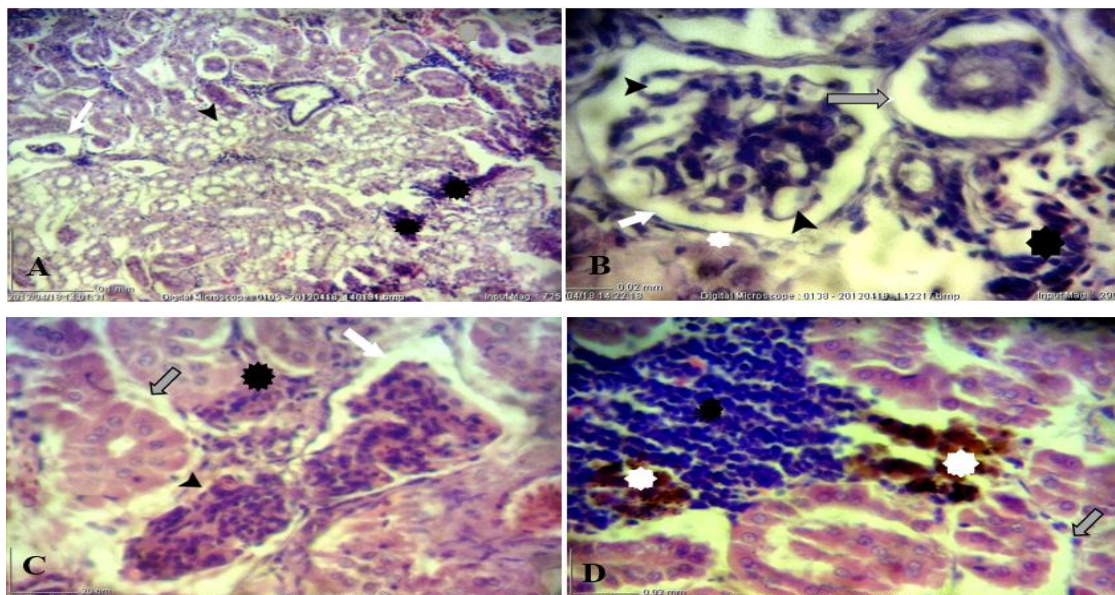


شکل ۱- ساختار بافتی طبیعی کلیه ماهی هامور معمولی در تیمار شاهد. لوله های ادراری دور (DT)، لوله های ادراری نزدیک (PT)، کلافه مویرگی (ستاره سیاه)، جسمک کلیوی (سر پیکان سیاه)، لایه جداري کپسول بومن (پیکان سفید)، لایه احتشایی کپسول بومن (پیکان سیاه)، A و B (H & E, ×۲۹۰۰).

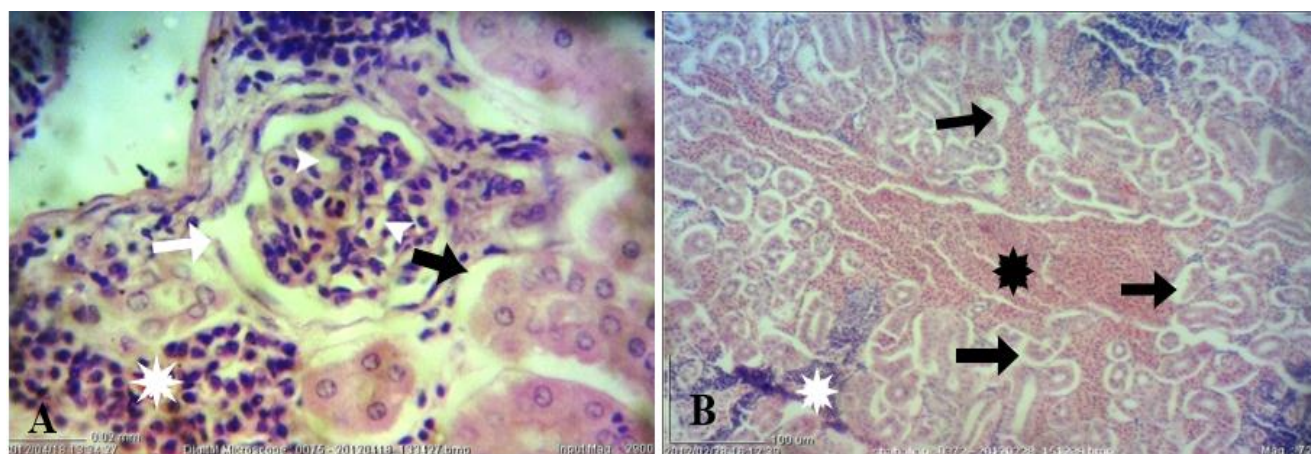


شکل ۲- تغییرات هیستوپاتولوژیک کلیه ماهی هامور معمولی در تیمارهای مختلف تحت تاثیر بنزوالفاپایرن و باکتری *V. alginolyticus* در روز چهارم نمونه برداری. جدا شدن غشای پایه از اپی تلیوم لوله های کلیوی (پیکان خاکستری)، نفوذ لوکوسیت (ستاره سفید)، خونریزی (ستاره سیاه)، اتساع مویرگ های گلوومرولی (پیکان سفید).

سیاه)، اتساع فضای ادراری (پیکان سفید)، در **A** تیمار $BaP20$ mg/kg، تیمار $BaP200$ mg/kg، تیمار $BaP200$ mg/kg + باکتری *V. alginoliticus*، **D** تیمار $BaP20$ mg/kg + باکتری *V. alginoliticus*، **A**، **B**، **C**؛ (H & E، $\times 2900$)



شکل ۳- تغییرات هیستوپاتولوژیک کلیه ماهی هامور معمولی در تیمارهای مختلف تحت تاثیر بنزوآلفاپایرن و باکتری *V. alginoliticus* در روز هفتم نمونه برداری. اتساع فضای ادراری (پیکان سفید)، مراکز ملانوماکروفازی (ستاره سفید)، نفوذ لوکوسیت (ستاره سیاه)، اتساع مویرگ های گلمرولی (سر پیکان سیاه)، خونریزی (ستاره خاکستری) جدا شدن غشای پایه از اپی تلیوم لوله های کلیوی (پیکان خاکستری) در **A** تیمار $BaP200$ mg/kg، تیمار $BaP200$ mg/kg + باکتری *V. alginoliticus*، **B**، **C**؛ (H & E، $\times 2900$) **D** تیمار $BaP20$ mg/kg + باکتری *V. alginoliticus*، **A**، **B**، **C**؛ (H & E، $\times 725$)



شکل ۴- تغییرات هیستوپاتولوژیک کلیه ماهی هامور معمولی در تیمارهای مختلف تحت تاثیر بنزوآلفاپایرن و باکتری *V. alginoliticus* در روز چهاردهم نمونه برداری. اتساع فضای ادراری (پیکان سفید)، نفوذ لوکوسیت (ستاره سفید)، اتساع مویرگ های گلمرولی (سر پیکان سفید)، خونریزی (ستاره سیاه) جدا شدن غشای پایه از اپی تلیوم لوله های کلیوی (پیکان سیاه) در **A** تیمار $BaP200$ mg/kg + باکتری *V. alginoliticus*، **B**، تیمار *V. alginoliticus*، **A**؛ (H & E، $\times 2900$) **B** (H & E، ۷۲۵)

(۲۴). از طرفی، Haaparanta و همکاران (۱۱) نیز بیان نمودند که رنگدانه های موجود در مراکز ملانوماکروفاژی، دارای اثرات باکتریوسیدال (از بین برنده باکتری) می باشند و در زمان بروز عفونت های باکتریایی، موجب از بین بردن ذرات عفونی می شوند. از این رو به نظر می رسد افزایش تجمعات ملانوماکروفاژی، در ماهیان تیمار شده با باکتری یا هر دو استرسور به ویژه در روز هفتم آزمایش، مکانیسمی طبیعی جهت حذف باکتری ها و کاهش عفونت حاصل از آنها باشد. در مطالعه حاضر، وجود مراکز ملانوماکروفاژی در بافت کلیه ماهیان تیمارهای مختلف، با خونریزی، تخریب سلول های خونی قرمز و نفوذ لوکوسیت ها، در ارتباط بود. مطالعات نشان می دهد که در نتیجه القای استرس، خون رسانی به بافت ها افزایش یافته و افزایش حجم خون، موجب برخورد گلبول های قرمز با یکدیگر و با دیواره عروق و در نتیجه تخریب سلول های خونی می شود (۲۰). علاوه بر این، Kakkar و همکاران (۱۴) در مطالعه ای بیان نمودند که افزایش تعداد مراکز ملانوماکروفاژی، منجر به افزایش فعالیت های فاگوسیتوزی و شیمیوتاکسیک و به دنبال آن مهاجرت لوکوسیت ها به درون بافت ها و تراکم لوکوسیتی در آن ها می شود. همچنین Grundy و همکاران (۱۰) ر مطالعه بیماری ویبریوزیس در ماهی قزل آلاي رنگین کمان، گزارش نمودند که به محض ورود باکتری به درون بدن ماهی، سلول های خونی فاگوسیتیک مانند لنفوسیت ها، از عروق خونی به درون بافتها و محل ورود باکتری، مهاجرت می کنند تا با فاگوسیت کردن باکتری، منجر به جلوگیری از رشد و تراکم آن شوند؛ به همین دلیل، میزان این سلول ها در بافت ها، افزایش می یابد. از طرفی پس از کنترل رشد و تکثیر باکتری، فعالیت سلول های فاگوسیتیک، به دلیل مرگ این سلول ها و یا از بین رفتن پاتوژن،

کلیه، اندامی حیاتی است که نقش بسیار مهمی در تنظیم الکترولیت ها و آب بدن و همچنین حفظ و نگهداری هموستاز بدن موجودات ایفا می کند (۱۶). این اندام، هدف مهمی برای بسیاری از سموم و آلاینده ها، محسوب می شود. به طوری که، در پی قرار گرفتن ماهیان با آلاینده های محیطی، ساختار بافتی کلیه آنها، دچار تغییرات هیستوپاتولوژیک قابل توجهی می گردد (۲۱). در مطالعه حاضر، ضایعات اصلی که در نمونه های بافتی کلیه ماهیان هامور معمولی تیمار شده با یک یا هر دو استرسور (BaP و باکتری *V. alginolyticus*) مشاهده گردید، شامل افزایش فضای ادراری، جدا شدن غشای پایه از اپی تلیوم لوله های ادراری، تجمعات لوکوسیتی، تشکیل مراکز ملانوماکروفاژی و خونریزی بود. از آنجایی که در مطالعات بسیاری، در نتیجه مواجهه موجودات با آلاینده های مختلف از قبیل ارگانوکلرین ها، ارگانوفسفات ها و فلزات سنگین، اتساع فضای ادراری و جدا شدن غشای پایه از اپی تلیوم لوله های کلیوی، در بافت کلیه مشاهده می گردد، لذا آسیب های ذکر شده به عنوان ضایعات پاتولوژیک غیراختصاصی برای کلیه عنوان می شوند (۱۸). در مطالعه حاضر، در تیمارهای ترکیبی (BaP + باکتری *V. alginolyticus*) و تیمار باکتری، تشکیل مراکز ملانوماکروفاژی مشاهده گردید. مطالعات نشان می دهد که قرارگیری ماهیان در معرض سطوح بالای مواد شیمیایی، سبب ایجاد و افزایش تجمعات ملانوماکروفاژی در اندام های مختلف از قبیل کلیه می شود. وجود این تجمعات، به عنوان یک شاخص غیراختصاصی قرار گرفتن در معرض محیط های آبی آلوده محسوب می گردد (۹). علاوه بر این، باکتری ویبریو قادر به ایجاد کم خونی همولیتیک می باشد که این امر، منجر به افزایش آهن آزاد در بافت ها و در نتیجه افزایش مراکز ملانوماکروفاژی در آنها می شود

افزایش حساسیت ماهیان قرار گرفته در معرض آلاینده ها نسبت به پاتوژن های باکتریایی، بیان کردند که آلاینده های شیمیایی بر قابلیت ایمنی موجودات تاثیر گذاشته و موجب حساسیت بیشتر آنها در مقابل بیماری ها می شوند. همچنین Prosser و همکاران (۱۹) در مطالعه اثرات دو استرسور فنانترن و باکتری *Mycobacterium marinum* بر ماهیان زبرافیش (*Danio rerio*)، گزارش نمودند که PAH ها، ترکیباتی ایمنوساپرسیو هستند که با تضعیف و مهار نمودن سیستم ایمنی، قادر به کاهش مقاومت اورگانیزم ها در برابر پاتوژن هایی از قبیل باکتری ها می شوند. در مجموع می توان گفت که بنزوالفاپایرن و باکتری *V. alginolyticus* قادر به بروز آسیب های مختلف در بافت کلیه ماهیان هامور معمولی می باشند. علاوه بر این، نتایج بافتی به دست آمده از تیمارهای ترکیبی، نشان داد که این دو استرسور (بنزوالفاپایرن و باکتری *V. alginolyticus*) دارای اثرات سینرژیسم هستند. به نظر می رسد بنزوالفاپایرن با تضعیف سیستم ایمنی ماهیان هامور معمولی، منجر به بروز عفونت در این ماهیان می شود؛ باکتری نیز پس از فعال شدن، موجب تشدید عوارض BaP گردیده و بدین ترتیب هر دو استرسور به عنوان آگونیست عمل نموده اند.

کاهش می یابد (۱۰). در مطالعه حاضر نیز، تراکم لوکوسیتی پس از روز هفتم آزمایش، در ماهیان تیمار شده با باکتری کاهش یافت که این امر، مؤید مطلب فوق می باشد. در این مطالعه، بیشترین آسیب های پاتولوژیک وارد شده به ساختار بافتی کلیه در ماهیان تیمار شده با غلظت های مختلف BaP، ماهیان تیمار شده با باکتری و همچنین در تیمارهای ترکیبی، مربوط به روز هفتم آزمایش بود و در روز چهاردهم میزان ضایعات بافتی در این تیمارها، به طور قابل توجهی، کاهش یافته بود. مطالعات نشان می دهد که سطوح هیدروکربن های آروماتیک چندحلقه ای، یک هفته پس از ورود این آلاینده ها به بدن ماهی، به دلیل بیوترانسفورماسیون (تغییر شکل زیستی) آنها در کبد و تبدیل شدن به متابولیت هایشان، کاملاً کاهش می یابد (۳). از طرفی دوره بیماریزایی باکتری *V. alginolyticus* ۶ تا ۷ روز می باشد (۸). بنابراین، به نظر می رسد که در مطالعه حاضر نیز، کاهش آثار تخریبی BaP و باکتری ویبریو در بافت کلیه، در روز چهاردهم آزمایش، به دلیل اتمام دوره بیماری زایی باکتری و همچنین تجزیه بنزوالفاپایرن در کبد، صورت گرفته است. نتایج مطالعه ما نشان داد که وسعت و شدت آسیب های بافتی در ماهیان تیمار شده با هر دو استرسور (*V. alginolyticus* و BaP) بیش از سایر تیمارها بود. Arkoosh و همکاران (۴) با مشاهده

- ۱- سلطانی، م. ۱۳۷۶. بیماری های باکتریایی ماهی. انتشارات سازمان دامپزشکی کشور با همکاری موسسه نشر جهاد وابسته به جهاد کشاورزی. صفحه ۲۱ تا ۲۳، ۱۷۵ تا ۱۸۸.
- ۲- موحدی نیا، ع. ۱۳۸۸. مکانیسم های تنظیم اسمزی در ماهی شانک (*Acanthopagrus latus*). (مطالعه اکوفیزیولوژیکی، بافت شناختی و فراساختاری آبشش). پایان نامه دکتری رشته بیولوژی دریا گرایش جانوران دریا. دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر. ۱۱۲ صفحه.
- ۳- Aas, E., Beyer, J and Goksoyr, A., ۲۰۰۰. Fixed wavelength fluorescence (FF) of bile as a monitoring tool for polyaromatic hydrocarbon exposure in fish: an evaluation of compound specificity, inner filter effect and signal interpretation. *Biomarkers*, ۵(۱), ۹-۲۳.
- ۴- Arkoosh, M. R., Casillas, E., Clemons, E., Kagle, A. N., Olson, R., Reno, P and Stein, J. E., ۱۹۹۸. Effect of pollution on fish diseases: potential impacts on salmonid populations. *Journal of Aquatic Animal Health*, ۱۰(۲), ۱۸۲-۱۹۰.
- ۵- Assadi, H., and Dehghani, R., ۱۹۹۷. Atlas of the Persian Gulf and the Sea of Oman fishes. Iranian Fisheries Research Organization Publication, Tehran, ۲۲۶p.
- ۶- Buttgerit, F., Burmester, G. R and Brand, M. D., ۲۰۰۰. Bioenergetics of immune functions: fundamental and therapeutic aspects. *Immunology today*, ۲۱(۴), ۱۹۴-۱۹۹.
- ۷- Carlson, E. A., Li, Y and Zelikoff, J. T., ۲۰۰۲. Exposure of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to benzo [a] pyrene suppresses immune function and host resistance against bacterial challenge. *Aquatic Toxicology*, ۵۶(۴), ۲۸۹-۳۰۱.
- ۸- Deane, E. E., Li, J and Woo, N. Y., ۲۰۰۴. Modulated heat shock protein expression during pathogenic *Vibrio alginolyticus* stress of sea bream. *Diseases of aquatic organisms*, ۶۲(۳), ۲۰۵-۲۱۵.
- ۹- Giari, L., Simoni, E., Manera, M and Dezfuli, B. S., ۲۰۰۸. Histo-cytological responses of *Dicentrarchus labrax* (L.) following mercury exposure. *Ecotoxicology and environmental safety*, ۷۰(۳), ۴۰۰-۴۱۰.
- ۱۰- Grundy, M. M., Ratcliffe, N. A and Moore, M. N., ۱۹۹۶. Immune inhibition in marine mussels by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Research*, ۴۲(۱-۴), ۱۸۷-۱۹۰.

- ۱۱- Haaparanta, A., Valtonen, E. T., Hoffmann, R and Holmes, J., ۱۹۹۶. Do macrophage centres in freshwater fishes reflect the differences in water quality?. *Aquatic Toxicology*, ۳۴(۳), ۲۵۳-۲۷۲.
- ۱۲- Hannam, M. L., Bamber, S. D., Galloway, T. S., Moody, A. J and Jones, M. B., ۲۰۱۰. Effects of the model PAH phenanthrene on immune function and oxidative stress in the haemolymph of the temperate scallop *Pecten maximus*. *Chemosphere*, ۷۸(۷), ۷۷۹-۷۸۴.
- ۱۳- Holt, J., Hothem, S., Howerton, H., Larson, R and Sanford, R., ۲۰۰۵. ۹, ۱۰-Phenanthrenequinone photoautocatalyzes its formation from phenanthrene, and inhibits biodegradation of naphthalene. *Journal of environmental quality*, ۳۴(۲), ۴۶۲-۴۶۸.
- ۱۴- Kakkar, P. H., Saxena, R. M., Rathee, N. S and Joshi, M., ۲۰۱۱. Water soluble fraction of diesel fuel induced histopathological alterations in the liver of *Channa punctatus*. *Toxicology international*, ۱۸(۱), ۱۴.
- ۱۵- Livingstone, D.R., Donkin, P and Walker, C.H., ۱۹۹۲. Pollutants in marine ecosystems: an overview. In: Walker, C.H., Livingstone, D.R. (Eds.), *Persistent Pollutants in Marine Ecosystems*. Pergamon, Setac special publication, Oxford, pp: ۲۳۵-۲۶۳.
- ۱۶- Mohamed, F. A., ۲۰۰۹. Histopathological studies on *Tilapia zillii* and *Solea vulgaris* from Lake Qarun, Egypt. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, ۱(۱), ۲۹-۳۹.
- ۱۷- Nahrgang, J., Camus, L., Gonzalez, P., Goksøyr, A., Christiansen, J. S and Hop, H., ۲۰۰۹. PAH biomarker responses in polar cod (*Boreogadus saida*) exposed to benzo (a) pyrene. *Aquatic Toxicology*, ۹۴(۴), ۳۰۹-۳۱۹.
- ۱۸- Oliveira, R. C., Fanta, E., Turcatti, N. M., Cardoso, R. J and Carvalho, C. S., ۱۹۹۶. Lethal effects of inorganic mercury on cells and tissues of *Trichomycterus brasiliensis* (Pisces; Siluroidei). *Biocell: official journal of the Sociedades Latinoamericanas de Microscopia Electronica... et. al*, ۲۰(۳), ۱۷۱-۱۷۸.
- ۱۹- Prosser, C. M., Unger, M. A and Vogelbein, W. K., ۲۰۱۱. Multistressor interactions in the zebrafish (*Danio rerio*): Concurrent phenanthrene exposure and *Mycobacterium marinum* infection. *Aquatic toxicology*, ۱۰۲(۳), ۱۷۷-۱۸۵.
- ۲۰- Suresh, N., ۲۰۰۹. Effect of cadmium chloride on liver, spleen and kidney melano macrophage centres in *Tilapia mossambica*. *Journal of Environmental Biology*, ۳۰(۴): ۵۰۵-۵۰۸.
- ۲۱- Teh, S. J., Adams, S. M and Hinton, D. E., ۱۹۹۷. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. *Aquatic Toxicology*, ۳۷(۱), ۵۱-۷۰.

- ۲۲- Thophon, S., Kruatrachue, M., Upatham, E. S., Pokethitiyook, P., Sahaphong, S and Jaritkhuan, S., ۲۰۰۳. Histopathological alterations of white sea bass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environmental Pollution*, ۱۲۱(۳), ۳۰۷-۳۲۰.
- ۲۳- Wang, C., Zhao, Y., Zheng, R., Ding, X., Wei, W., Zuo, Z and Chen, Y., ۲۰۰۶. Effects of tributyltin, benzo [a] pyrene, and their mixture on antioxidant defense systems in *Sebastiscus marmoratus*. *Ecotoxicology and environmental safety*, ۶۵(۳), ۳۸۱-۳۸۷.
- ۲۴- Wang, X. H and Leung, K. Y., ۲۰۰۰. Biochemical characterization of different types of adherence of *Vibrio* species to fish epithelial cells. *Microbiology*, ۱۴۶(۴), ۹۸۹-۹۹۸.