

ارزیابی ساختار بافتی آبشش ماهی شانک زرد باله *Acanthopagrus latus* در طی مواجهه کوتاه مدت با فنانترن

مصطفی موسوی 1، نگین سلامات 2*، عبدالعلی موحدی نیا 3، پروین خردمند 4

چکیده

مطالعه حاضر با هدف بررسی تغییرات ساختار بافتی آبشش ماهی شانک زردباله (*Acanthopagrus latus*) در مواجهه با غلظت های مختلف فنانترن تحت شرایط آزمایشگاهی به مدت 14 روز انجام گرفت. بدین منظور، غلظت های مختلف فنانترن (0، 2، 20، 40 و 70 میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) به صورت درون صفاقی به ماهیان شانک زردباله تزریق شد. سپس نمونه های بافتی از آبشش 100 قطعه *A. latus* (5 نمونه/گروه/روز) جهت انجام مطالعات هیستولوژیک و هیستومتریک در روزهای 1، 3، 7 و 14 جدا شده و در محلول بافر فرمالین به مدت 48 ساعت تثبیت شدند. سپس نمونه ها با استفاده از روش های معمول بافت شناسی آماده سازی شدند. مقاطع بافتی به ضخامت 5-6 میکرومتر تهیه و با استفاده از رنگ آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین رنگ آمیزی شدند. همچنین، درجه تغییرات بافتی (DTC) (Degree of tissue changes) آبشش جهت ارزیابی سلامت اندام محاسبه شد. نتایج نشان داد که هیپرپلازی سلول های تیغه های آبششی و اتصال تیغه ها و جدا شدن اپی تلیوم تیغه های آبششی از غشا پایه، عمده ترین تغییرات بافتی آبشش ماهیان در مواجهه با فنانترن بود. بیشترین مقدار DTC آبشش، در ماهیان تیمار شده با 70 mg/kg فنانترن در روز هفتم نمونه برداری اندازه گیری شد. میانگین DTC این گروه نشان دهنده آسیب بافتی متوسط تا شدید بود. حداقل میزان DTC در ماهیان تیمار شده با 2 mg/kg فنانترن ثبت شد که نشان دهنده مقاومت ماهیان به این مقدار از فنانترن بود. بر اساس نتایج به نظر می رسد که ارتباط نزدیکی میان میزان تغییرات بافتی و غلظت آلاینده وجود دارد.

کلمات کلیدی: شانک زردباله، آبشش، فنانترن

- 1- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران.
- 2- دانشیار، گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران.
- 3- دانشیار، گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران.
- 4- استادیار، گروه پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.

مقدمه

عموما سوخت‌های فسیلی به ویژه نفت جزء منابع اصلی ورود هیدروکربن‌های چندحلقه‌ای آروماتیک (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) (PAH) به طبیعت محسوب می‌شوند و قابل ذکر است که حدود 0/3 تا 7 درصد وزن نفت خام را هیدروکربن‌های چندحلقه‌ای تشکیل می‌دهند (6). هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای ترکیباتی آلی با 2 یا چند حلقه بنزنی و در بعضی مواقع حلقه‌های آروماتیک هستند. ترکیبات مختلفی از PAHs شناسایی شده است که در بین آن‌ها 16 ترکیب از اهمیت بیشتری برخوردار است که یکی از مشتقات آن‌ها فنانترن است. این ترکیب حتی در غلظت‌های کم هم به عنوان آلاینده مهم محیطی شناخته شده است و در طبقه‌بندی سازمان حفاظت محیطی آمریکا (EPA) به علت ویژگی‌های جهش‌زایی و سرطان‌زایی از آلاینده‌های سمی پرخطر محسوب می‌شود (3). اصولاً این ترکیبات از نظر شیمیایی کاملاً پایدار هستند و به خاطر حالت چربی دوستی به راحتی از غشاء زیستی عبور کرده، در اندام‌های جاندار تجمع می‌کنند (6). خلیج فارس به عنوان منبع مهم اقتصادی و یکی از ذخیره‌گاه‌های ارزشمند نفت و گاز در جهان است و حدود 40٪ از ذخایر نفت و گاز جهان در این خلیج وجود دارد، به همین دلیل یکی از پرتراکم‌ترین آبراه‌های جهان برای تانکرهای نفتی و غیرنفتی می‌باشد (15). در طی سالیان متمادی این منطقه در معرض آلودگی شدید نفتی ناشی از تخلیه مواد نفتی به هنگام شستشوی تانکرهای نفت‌کش، تخلیه آب توازن نفت‌کش‌ها، سکوه‌های بهره‌برداری از چاه‌های نفت و سوانحی مانند برخورد و تصادف کشتی‌های نفت‌کش و انهدام و آتش‌سوزی سکوه‌های نفتی قرار گرفته و آلودگی آن بر سلامت آبزیان منطقه تاثیر قابل توجهی داشته است (15).

ماهی شانک زردباله با نام علمی *Acanthopagrus* *latus* و نام انگلیسی Yellowfin Seabream از

در مقایسه با سم‌شناسی پستانداران، سم‌شناسی آبزیان حوزه بسیار جدیدتری بوده و تنها اخیراً به‌طور قابل ملاحظه‌ای مورد توجه قرار گرفته است. پس از دهه 1980، پژوهشگرانی که در زمینه سم‌شناسی آبزیان تحقیق می‌کردند توجه خود را از پاسخ‌های کلی موجودات زنده، به پاسخ‌هایی که در سطح سلولی یا بافت‌های موجود بیان می‌شد، معطوف داشتند. این موضوع منجر به افزایش اطلاعات در نتیجه استفاده از خون‌شناسی، بافت‌شناسی، هیستوشیمی، متابولیسم، فارماکوکینتیک و نیز پارامترهای فیزیولوژیکی یا بیوشیمیایی به منظور اندازه‌گیری میزان سمیت، شد (2). قرار گرفتن در معرض غلظت‌های تحت حاد آلاینده‌های محیطی ممکن است باعث تغییر ساختار سلول‌ها و ایجاد آسیب‌های بافتی شود که منجر به ایجاد تغییرات قابل ملاحظه‌ای در عملکرد بافت‌ها و اندام‌ها می‌شوند. مزیت استفاده از تغییرات بافتی به عنوان یک بیومارکر این است که به محققین فرصت مناسبی را جهت بررسی اندام‌ها و سلول‌های هدف ویژه که تحت تاثیر مواد شیمیایی محیطی قرار گرفته‌اند، می‌دهد (2).

در اکثر ماهیان آبشش اندام اصلی تنفس و تبادل گازهای تنفسی می‌باشد، اگرچه با وجود آبشش اندام‌های دیگری نیز در امر تنفس به ماهی کمک می‌کند (9). اپیتلیوم آبشش ماهی وظیفه انتشار اکسیژن، تعادل اسید-باز، تنظیم یونی، دفع مواد زائد حاصل از سوخت و ساز برخی هورمون‌ها و تنظیم اسمزی را انجام می‌دهد (22). آبشش‌ها به دلیل ارتباط مستقیم با محیط‌آبی، در معرض مستقیم پاتوژن‌ها بوده و بنابراین به عنوان اولین اندام هدف آنها محسوب می‌شوند. تاثیر عوامل آسیب‌رسان بر این اندام باعث تغییرات در ساختار و عملکرد آن می‌شود (19). مطالعات متعددی، تغییرات بافتی شدیدی در آبشش ماهیانی که در معرض آلاینده‌های مختلف قرار گرفته بودند، را گزارش کرده‌اند (8، 18، 19).

بررسی تغییرات هیستولوژیک و هیستومتریک آبشش ماهی شانک زرد باله در معرض فنانترن و امکان استفاده از این تغییرات بعنوان شاخص زیستی (بیومارکر) بود. در این راستا درجه تغییرات بافتی (Degree of tissue changes) (DTC) آبشش در ماهی شانک زرد باله در مواجهه با غلظت‌های مختلف فنانترن، تعیین شد.

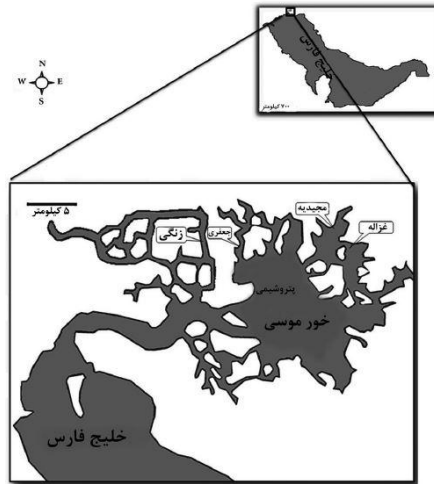
خانواده Sparidae و از گونه‌های مهم و تجاری خلیج فارس و دریای عمان محسوب می‌شود که بسیار خوش خوراک بوده و دارای میزان صید بالایی است (1). لذا با توجه به اهمیت اکولوژیکی این گونه، در مطالعه حاضر با قرار دادن ماهی شانک زرد باله در معرض غلظت‌های متفاوت فنانترن، اثرات توکسیک این آلاینده نفتی بر آبشش این ماهی بررسی شد. هدف از مطالعه حاضر

مواد و روش‌ها

تهیه و نگه‌داری ماهیان

ماهیان (7 روز و طول مدت قرار دادن در معرض فنانترن 14 روز بود. پس از طی دوره سازگاری، ماهیان موجود در تانک‌های اول تا چهارم به عنوان تیمارهای 1، 2، 3 و 4 در نظر گرفته شده، به ترتیب غلظت‌های 20، 40 و 70 میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، از فنانترن به آن‌ها تزریق شد. برای انجام تزریق پس از بیهوشی ماهیان با عصاره گل میخک، بدن آن‌ها با یک پارچه تمیز به آرامی خشک شده و سپس فنانترن حل شده در 10 میکرولیتر بر گرم وزن بدن روغن نارگیل (به عنوان حلال فنانترن) به صورت درون صفاقی به آن‌ها تزریق گردید. ماهیان تانک 5 (شاهد حلال) فقط با روغن نارگیل تزریق شدند (جهت ارزیابی اثرات احتمالی روغن نارگیل). ماهیان تانک 6 (شاهد) نیز تزریقی دریافت نمودند.

جهت انجام تحقیق حاضر، 100 قطعه ماهی شانک زردباله (همگی نرهای نابالغ) (با میانگین طول $0/2 \pm$ و $15/78 \pm 12/1$ سانتیمتر و وزن متوسط بدن $81/11 \pm$ گرم) در دی ماه 1394 از خور زنگی (از انشعابات خورموسی) واقع در استان خوزستان (شکل 1) تهیه گردید و به صورت زنده به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه ماهیان در تانک‌های 6000 لیتری محتوی آب دریای فیلتر شده با اشعه ماوراء بنفش (UV) در سوله پوشیده شده نگه‌داری شدند. جهت انجام پروژه، 6 تانک 300 لیتری (4 دوز فنانترن، روغن نارگیل و شاهد) با آب فیلتر شده و هوادهی شده دریا پر شده و 20 قطعه ماهی شانک زردباله نر منتقل گردید. تعویض حجم آب، هر دو روز یک بار از کف از طریق سیفون کردن، انجام شد. دوره سازگاری (برای پیشگیری از اثرات احتمالی ناشی از استرس جابجایی بر بافت



شکل 1. موقعیت جغرافیایی محل صید ماهی شانک زرد باله (خورزنگی)

تهیه نمونه‌های بافتی از ماهیان

پایینی کمان جدا شده و با ذکر شماره تیمار، درون ظروف شیشه‌ای درب‌دار مجزا و حاوی محلول ثبوت فرمالین 15٪ قرار داده می‌شد. جهت مطالعات بافت‌شناسی، قطعه‌ای از بخش میانی کمان دوم آبشش سمت راست هر ماهی مورد بررسی قرار گرفت.

در روزهای 1، 3، 7 و 14 آزمایش از هر تانک 4 عدد ماهی را به‌طور تصادفی و به وسیله تور دستی خارج نموده و پس از بیهوش کردن با عصاره گل میخک، آب اضافی از سطح بدن آن‌ها به وسیله حوله نرم گرفته شد. پس از برداشتن درپوش آبششی (اوپرکول) ابتدا با احتیاط، کمان‌های آبششی با قطع قسمت بالایی و

تهیه مقاطع بافتی

درصد) انجام شده و در ادامه نمونه‌های بافتی برای شفاف‌سازی به گزبل و سپس جهت پارافینه شدن به ظروف پارافین منتقل شدند. بافت‌ها سپس با استفاده از پارافین درون قالب‌های آلومینیومی لوکهارت قالب‌گیری شدند. با استفاده از دستگاه روتاری میکروتوم (مدل Leica-2245) از قالب‌های پارافینه، برش‌هایی با ضخامت 5 میکرومتر تهیه و جهت رنگ‌آمیزی بر روی اسلایدهای شیشه‌ای قرار گرفتند. مقاطع بافتی سپس با

نمونه‌های برداشته شده از بافت‌های مختلف پس از 48 از محلول ثبوت فرمالین 15٪ خارج شده و به مدت 1 هفته در اتانول 70 درصد قرار داده شدند. سپس سایر مراحل پاساژ بافتی با استفاده از دستگاه اتوتکنیکون (هیستوکینت) (مدل RX- 11B, Tissue tek rotary, Japan) تحت برنامه زمان‌بندی شده انجام گرفت. به این ترتیب که آب‌گیری بافت‌های تثبیت شده توسط سری‌های افزایشی اتانول (70، 80، 90، 100

توسط دوربین نصب شده روی میکروسکوپ Dionolite Digital Microscope تهیه و ذخیره شد. از هر یک از تیمارها در هر روز نمونه برداری، 4 قطعه ماهی و از هر ماهی 3 اسلاید مطالعه گردید.

استفاده از رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E)، رنگ آمیزی شدند. در نهایت، مقاطع بافتی رنگ آمیزی شده، با استفاده از میکروسکوپ نوری Olympus و با بزرگ نمایی های متفاوت بررسی و تصاویر مناسب

تعیین درجه تغییرات بافتی (DTC)

متوسط شامل تغییراتی هستند که شدیدتر بوده و عملکرد طبیعی بافت را متاثر می کنند. این تغییرات اگرچه برگشت پذیر هستند، اما اگر محدوده وسیعی از بافت را درگیر کرده باشند و یا اینکه شرایط آلودگی محیط همچنان ثابت باقی بماند، می توانند به تغییرات شدیدی منجر شوند. 3: تغییرات بافتی شدید شامل تغییراتی هستند که ترمیم آن ها حتی در صورت بهبود شرایط محیطی، امکان پذیر نیست.

به منظور ارزیابی تغییرات بافتی مشاهده شده در آبشش ماهیان، این تغییرات بر اساس رده بندی انجام شده توسط Poleksic و Mitrovic-Tutundzic (1994)، از درجه صفر تا سه دسته بندی شدند (20): 0: هیچ گونه تغییرات بافتی صورت نگرفته است. 1: تغییرات بافتی اندک شامل تغییراتی هستند که قابل بازسازی و ترمیم بوده و بافت عملکرد طبیعی خود را با بهبود شرایط محیطی باز می یابد. این تغییرات محدود به بخش های کوچکی از بافت هستند. 2: تغییرات بافتی

فرمول زیر جهت تعیین DTC هر بافت استفاده می شود (20):

$$DTC = (1 \times SI) + (10 \times SII) + (100 \times SIII)$$

در این فرمول I، II و III مراحل تغییرات بافتی و S به تعداد تغییرات بافتی هر مرحله را نشان می دهد. مقدار DTC بین 0 تا 10 نشان دهنده عملکرد طبیعی اندام، بین 11 تا 20 نشان دهنده آسیب اندک به اندام مورد نظر، بین 21 تا 50 نشان دهنده آسیب متوسط اندام، بین 51 تا 100 نشان دهنده آسیب شدید اندام و بیشتر از 100 نشان دهنده آسیب برگشت ناپذیر اندام می باشد (20).

پردازش داده ها و رسم نمودارها

بررسی شد. برای داده های غیرنرمال، از آزمون ناپارامتری آنالیز کروسکال-والیس و اختلافات جزئی از طریق آزمون من-ویتنی استفاده شد. کلیه آزمون ها با استفاده از نرم افزار SPSS 16.0 انجام شد. رسم نمودار در محیط برنامه Microsoft Office Excel

نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شدند. نرمال بودن داده ها از طریق آزمون شاپیرو-ویلک بررسی گردید. برای مقایسه میانگین ها در غلظت ها و روزهای مختلف از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه استفاده شد. وجود یا عدم وجود اختلاف معنی دار میان گروه های مختلف، با استفاده از پس آزمون توکی

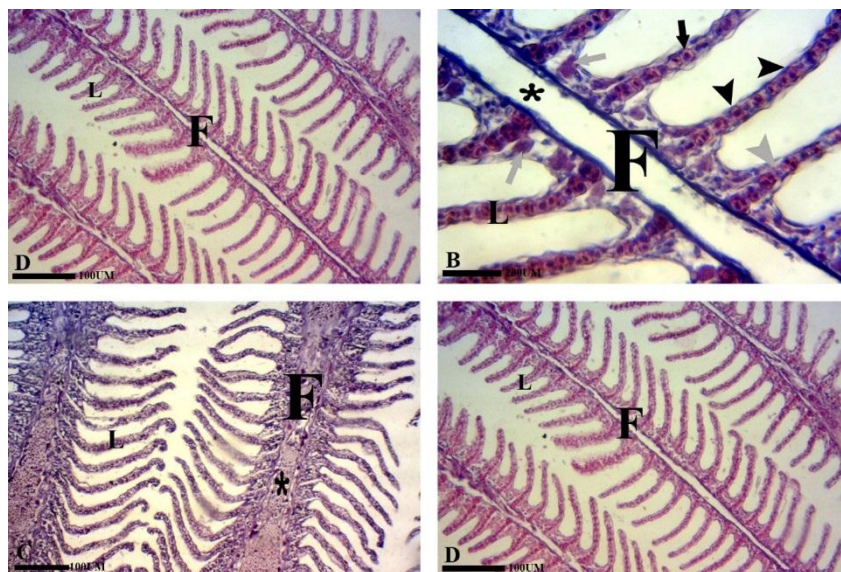
2010 با استفاده از داده‌های مستخرج از برنامه

SPSS صورت گرفت.

نتایج

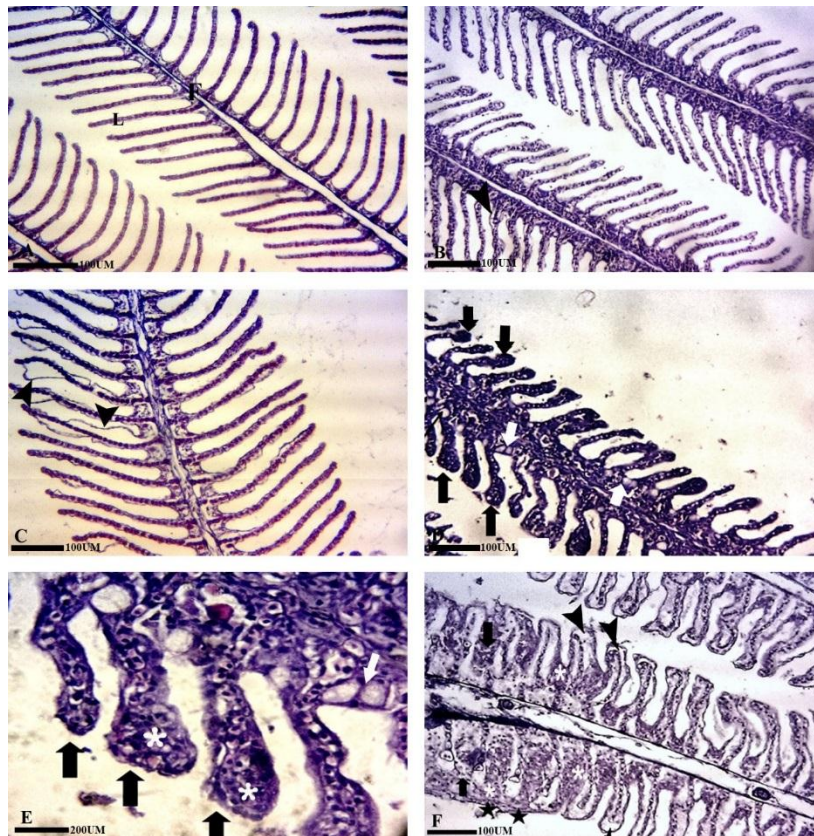
در روز اول نمونه‌برداری در هیچ تیماری ضایعه‌ای مشاهده نشد (شکل 2). در هر کمان آبششی تعداد فراوانی رشته‌های آبششی وجود داشت که بر روی هر یک از رشته‌ها، تیغه‌های آبششی به طور قرینه و عمود بر

رشته آبششی قرار گرفته بود. بافت پوششی آبشش در متشکل از انواعی از سلول‌ها شامل سلول‌های غنی از میتوکندری (کلراید)، موکوسی، سنگفرشی و ستونی بود (شکل 2).



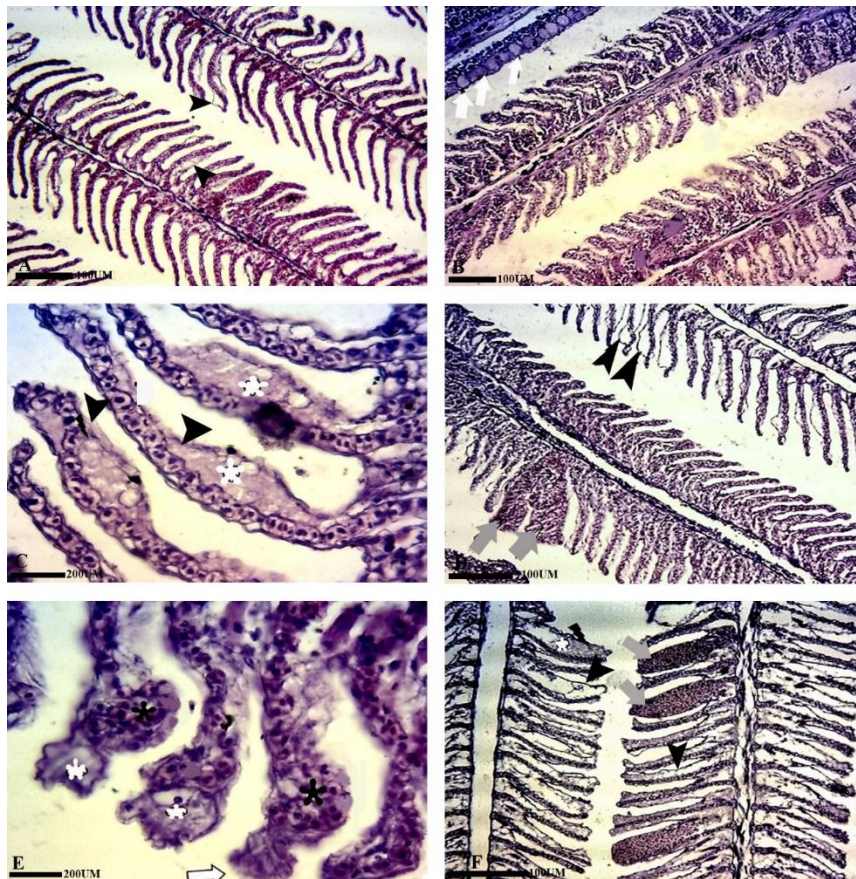
شکل 2. تصاویر میکروسکوپ نوری آبشش ماهیان شانک زرد باله بیمار شده با غلظت‌های مختلف فنانترن در روز اول نمونه‌برداری، A. تیمار 1، B. تیمار 2، C. تیمار 3، D. تیمار 4: رشته‌های آبششی (F)، تیغه‌های آبششی (L)، سلول‌های کلراید (پیکان خاکستری)، سلول‌های ستونی (راس پیکان خاکستری)، سلول‌های سنگفرشی (راس پیکان سیاه)، مویرگ تیغه آبششی حاوی سلول خونی (پیکان سیاه)، شریان رشته آبششی (ستاره سیاه)؛ A, C, D (H&E; $\times 725$) و B (H&E; $\times 2900$).

در آبشش ماهیان تیمار 1 (دوز 2 mg/kg فنانترن) در روز سوم نمونه‌برداری ضایعه‌ای مشاهده نشد. ضایعات آبشش ماهیان تیمار 2 (دوز 20 mg/kg فنانترن) شامل چماقی شدن تیغه‌های ثانویه و جدا شدن اپی‌تلیوم از غشا پایه بود. در آبشش ماهیان تیمار 3 (دوز 40 mg/kg فنانترن) چماقی شدن تیغه‌های ثانویه، افزایش سلول‌های موکوسی، اتصال تیغه‌های آبششی و هیپرپلازی سلول‌های تیغه‌های آبششی دیده شد. در آبشش ماهیان تیمار 4 (دوز 70 mg/kg فنانترن) اتساع مویرگ تیغه‌ای نیز مشاهده گردید (شکل 3).



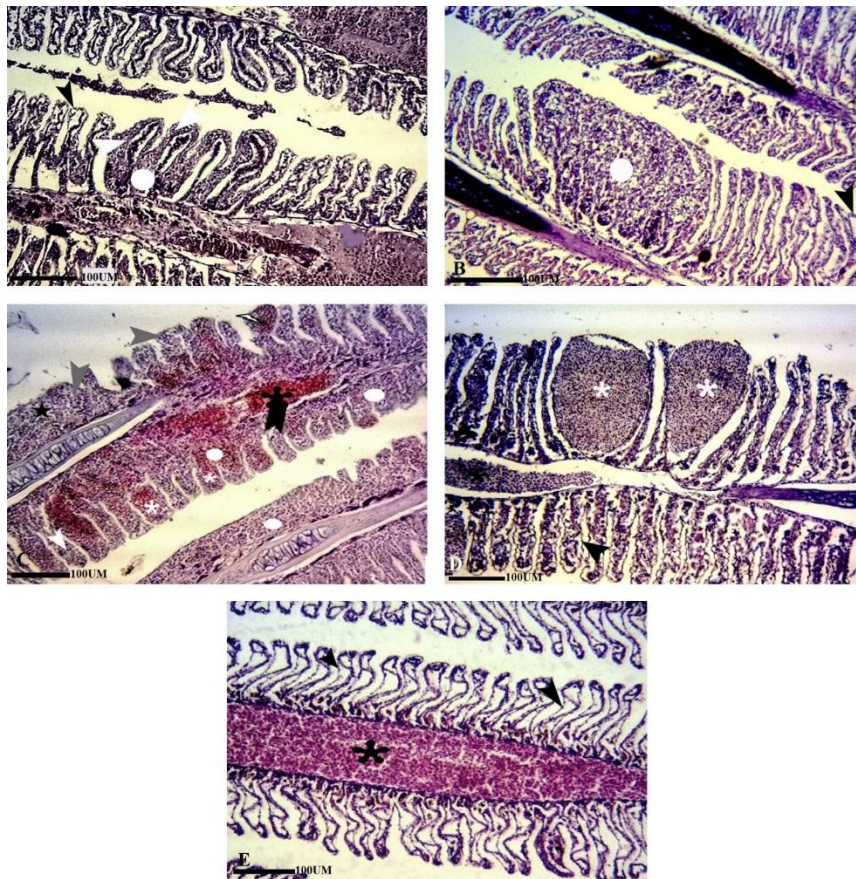
شکل 3. تصاویر میکروسکوپ نوری آبخش ماهیان شانک زرد باله تیمار شده با غلظت های مختلف فنانتین در روز سوم نمونه برداری: A. تیمار 1، B و C. تیمار 2، D و E. تیمار 3، F. تیمار 4؛ رشته آبخشی (F)، تیغه آبخشی (L)، جدا شدن اپیتلیوم آبخشی (راس پیکان سیاه)، چماقی شدن تیغه های آبخشی (پیکان سیاه)، افزایش تعداد سلول های موکوسی (پیکان سفید)، هیپرپلازی سلول های پوششی تیغه ها (ستاره سفید)، چسبندگی تیغه های آبخشی (ستاره سیاه). A, B, C, D, E (H&E; $\times 2900$) و F (H&E; $\times 725$).

ضایعات مشاهده شده در آبخش ماهیان تیمار 1 در روز هفتم نمونه برداری شامل جدا شدن اپی تلیوم از غشا پایه، چماقی شدن راس تیغه ها، هیپرپلازی و هیپرتروفی سلول های پوششی تیغه های آبخشی بود و در تیمار 2 افزایش تعداد سلول های موکوسی، اتصال تیغه ها، اتساع مویرگ تیغه ای و فضای ادماتوز نیز مشاهده گردید. آنوریسسم، جدا شدن اپی تلیوم از غشا پایه، هیپرتروفی سلول های پوششی تیغه ها، تلانژیکتازی، خون ریزی و چماقی شدن راس تیغه ها از جمله آسیب های بافت آبخش ماهیان تیمار 3 در روز هفتم نمونه برداری بودند. همچنین تغییرات بافتی آبخش ماهیان تیمار 4 شامل آنوریسسم، فضای ادماتوز و جدا شدن اپی تلیوم از غشا پایه، اتصال تیغه ها و هیپرپلازی سلول های پوششی تیغه ها بود (شکل 4).



شکل 4. تصاویر میکروسکوپ نوری آبشش ماهیان شانک زرد باله تیمار شده با غلظت های مختلف فنانتین در روز هفتم نمونه برداری: A. تیمار 1، B و C. تیمار 2، D و E. تیمار 3، F. تیمار 4؛ فضای ادماتوزه (ستاره سفید)، جدا شدن اپی تلیوم از غشا پایه تیغه های ثانویه (راس پیکان سیاه)، تلانژیکتازی (ستاره سیاه)، افزایش تعداد سلول های موکوسی (پیکان سفید)، آنوریسم (پیکان خاکستری)، چماقی شدن راس تیغه ها (پیکان سفید)، (H&E; $\times 725$) F, D, B, A، و (H&E; $\times 2900$) C, E.

در روز چهاردهم نمونه برداری آسیب هاب بافتی نظیر هیپرپلازی سلول های پوششی تیغه های ثانویه و اتصال تیغه های ثانویه، چماقی شدن راس تیغه های ثانویه و تلانژیکتازی در آبشش ماهیان تیمار شده مشاهده گردید. علاوه بر این، ضایعات بافتی نظیر اتساع شریان رشته ای، آنوریسم و نفوذ لوکوسیتی نیز در تیمارهای 3 و 4 دیده شد (شکل 5).

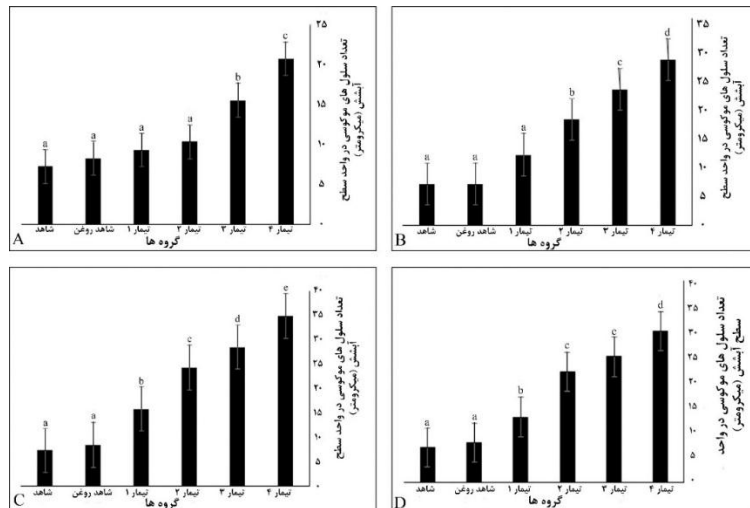


شکل 5. تصاویر میکروسکوپ نوری آبخش ماهیان شانک زرد باله تیمار شده با غلظت های مختلف فنانترن در روز چهاردهم نمونه برداری: A. تیمار 1، B. تیمار 2، C. تیمار 3 D و E. تیمار 4؛ هیپرپلازی سلول های پوششی تیغه های ثانویه (راس پیکان سفید)، اتصال تیغه های ثانویه (دایره سفید)، جدا شدن اپی تلیوم از غشا پایه تیغه های ثانویه (راس پیکان سیاه)، نفوذ لوکوسیتی (راس پیکان خاکستری)، اتساع و پرخونی شریان رشته آبخشی (ستاره سیاه)، آنوريسم (ستاره سفید)، ، A, B, C, D, E (H&E; $\times 725$).

نتایج مطالعه هیستومتریک آبخش

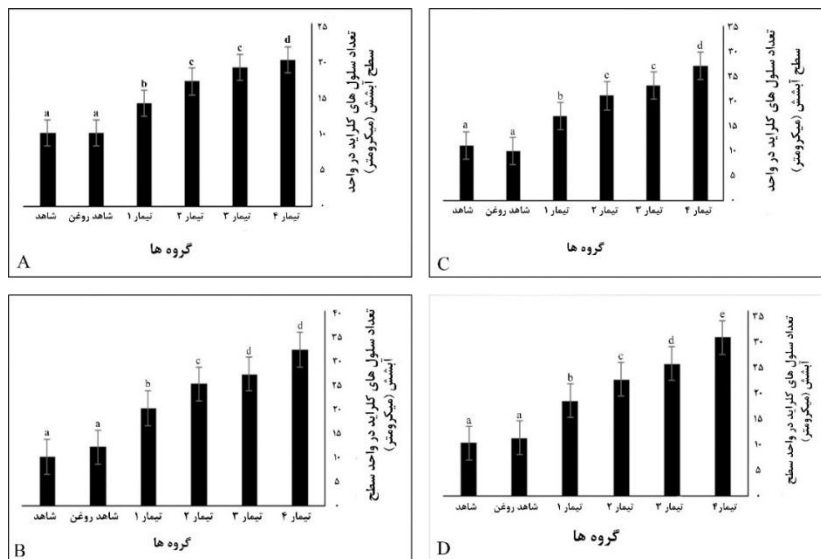
دیده نشد ($P > 0.05$)، ولی، سایر تیمارها با شاهد دارای اختلاف معنی داری بودند ($P < 0.05$)، شکل 6). مقایسه تیمارها در روز هفتم نشان داد که از لحاظ تعداد سلول های موکوسی بین تمامی تیمارها و شاهد اختلاف معنی داری وجود دارد ($P < 0.05$). در روز چهاردهم نیز اختلاف معنی داری در تعداد سلول های موکوسی میان تیمارها مشاهده شد ($P < 0.05$). البته، تفاوت معنی داری میان تیمارهای 2 و 3 وجود نداشت ($P < 0.05$)، شکل 6).

نتایج نشان داد که تعداد سلول های موکوسی در پایه تیغه های آبخشی تیمار 1 (دوز 2 mg/kg فنانترن) و تیمار 2 (دوز 20 mg/kg فنانترن) در روز اول نمونه برداری اختلاف معنی داری با تیمارهای شاهد نداشتند ($P > 0.05$). از طرفی بیشترین تعداد این سلول ها در این روز در تیمار 4 (دوز 70 mg/kg فنانترن) مشاهده شد که به طور معنی داری بیشتر از سایر تیمارها بود ($P < 0.05$)، شکل 6). در روز سوم اختلاف معنی داری در تعداد سلول های موکوسی بین تیمار 1، شاهد و روغن



شکل 6. مقایسه تعداد سلول‌های موکوسی در واحد سطح (میکرومتر) آبیض ماهیان شانک زرد باله تیمار شده با غلظت‌های متفاوت فنانتین در روزهای مختلف نمونه برداری: A. روز اول نمونه برداری، B. روز سوم نمونه برداری، C. روز هفتم نمونه برداری و D. روز چهاردهم نمونه برداری (حروف مختلف نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد).

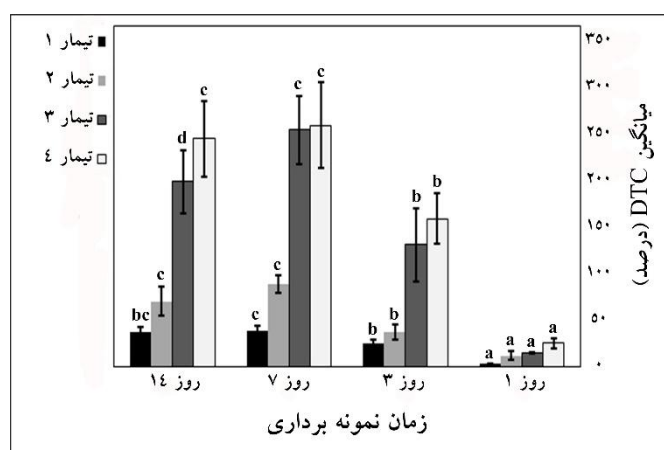
با توجه به شکل 7 در روزهای مختلف نمونه برداری، از لحاظ تعداد سلول‌های کلراید میان ماهیان تیمار شده با غلظت‌های مختلف فنانتین و شاهد اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P < 0.05$) و تعداد این سلول‌ها تا روز چهاردهم نمونه برداری در تمامی تیمارها افزایش یافت هر چند در برخی از تیمارها این افزایش تعداد، معنی‌دار نبود.



شکل 7. مقایسه تعداد سلول‌های کلراید در واحد سطح (میکرومتر) آبیض ماهیان شانک زرد باله تیمار شده با غلظت‌های متفاوت فنانتین در روزهای مختلف نمونه برداری: A. روز اول نمونه برداری، B. روز سوم نمونه برداری، C. روز هفتم نمونه برداری و D. روز چهاردهم نمونه برداری (حروف مختلف نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد).

ارزیابی درجه تغییرات بافتی (DTC)

تغییرات بافتی آبشش ماهی شانک زرد باله تیمار شده با غلظت های مختلف فنانترن بر اساس طبقه بندی انجام شده توسط Mitrovic-Tutundzic و Poleksic (1994) ارزیابی شد. بر این اساس، بیشترین و کمترین مقدار DTC به ترتیب در ماهیان تیمار شده با 70 mg/kg در روز هفتم نمونه برداری و ماهیان تیمار شده با 2 mg/kg فنانترن در روز اول نمونه برداری ثبت شد (شکل 8).



شکل 8. میانگین درجه تغییرات بافتی آبشش ماهی شانک زرد باله در مواجهه با غلظت های مختلف فنانترن در روز های مختلف نمونه برداری (حروف مختلف نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار می باشد).

بحث

آسیب در عملکرد تنفسی و تنظیم اسمزی آبشش منتهی می شود (4). بنابراین از نظر Giari و همکاران (2007)، احتمالاً این ضایعات، پاسخ هایی فیزیولوژیک به استرس ایجاد شده باشند تا پاسخ هایی منحصر به فرد به آلاینده یا سمی خاص (11). تغییرات بافتی مذکور، مثال هایی از مکانیسم های حمایتی می باشند که معمولاً منجر به افزایش فاصله میان آب و خون شده تا به عنوان سدی در برابر ورود آلاینده ها عمل کند (20). ورود آلاینده ها باعث القاء تغییرات دژنراتیو و نکروز اپی تلیوم رشته های آبششی و تیغه های ثانویه به همراه اتساع رگ های خونی رشته های آبششی شده و نهایتاً به تخریب غشا سلولی می انجامد (4). با از بین رفتن غشا سلولی ناحیه سطحی تیغه آبششی کم شده، متعاقب آن تبادل گاز و تنظیم یونی کاهش می یابد. این

تحقیقات Wood (2001) و Mallat (1985) یافته های قابل توجهی را در ارتباط با تغییرات ساختاری آبشش ماهیان در پاسخ به آلاینده ها و سموم مختلف عرضه نمود (16، 23). بر اساس یافته های این محققین و سایرین، بسیاری از تغییرات هیستوپاتولوژیک آبشش غالباً اختصاصی نبوده و محدوده وسیعی از آلاینده ها قادر به ایجاد ضایعات مشابه می باشند. هیپرپلازی اپی تلیوم به همراه چسبیدن تیغه های آبششی، تلانژیکتازی، ادم به همراه برآمدگی و حتی کندن شدن اپی تلیوم تیغه ها، که در تحقیق حاضر نیز مشاهده شد، آسیب های هیستوپاتولوژیک معمول آبشش ها در پاسخ به دامنه وسیعی از آلاینده ها شامل ارگانوکلرین ها، ترکیبات نفت خام، کربامات ها آفت کش ها و فلزات سنگین بوده (7، 10، 12) که به

(2003) گزارش دادند که عوارضی نظیر برآمدگی اپی‌تلیوم تیغه‌های ثانویه، هیپرپلازی و هیپرتروفی سلول‌های اپی‌تلیوم، به هم چسبیدن نسبی تیغه‌های ثانویه از جمله مکانیسم‌های دفاعی‌اند، که نتیجه آن افزایش فاصله بین محیط خارج و خون جهت ایجاد یک سد دفاعی جهت جلوگیری از ورود آلاینده‌ها می‌باشد (10). در تحقیق حاضر، به نظر می‌رسد، تغییرات بافتی آبشش ماهیان در مواجهه با فنانترن به منظور سازگاری ماهی با حضور آلاینده و جلوگیری از ورود بیشتر آلاینده به درون خون رخ داده‌اند. Oliviera Riberio و همکاران (2005) عوارضی نظیر هیپرپلازی و هیپرتروفی، آنوریسم و به هم چسبیدن تیغه‌های ثانویه را در آبشش مار ماهی اروپایی پس از تیمار با آلاینده‌هایی نظیر آفت‌کش‌ها، فلزات سنگین و هیدرکربن‌های نفتی مشاهده کردند. همچنین، Camargo و Martinez (2007) ضایعاتی نظیر برآمدگی بافت پوششی و چسبندگی تیغه‌ها در ماهی *Prochilodus lineatus* که به مدت 7 روز در معرض پساب‌های آلوده شهری و صنعتی قرار گرفته بود، گزارش نمودند (5). در تحقیق حاضر نیز چسبندگی تیغه‌ها مشاهده شد. Rastgar و همکاران (2015) در بررسی اثر استرس بنزوآلفا‌پایرن بر آبشش ماهی شانک زردباله بیشترین عوارض مشاهده شده را برآمدگی و هیپرپلازی اپی‌تلیوم تیغه ثانویه، به هم چسبیدن تیغه‌های ثانویه، ادم، اتساع مویرگ‌های تیغه، هیپرتروفی سلول‌های اپی‌تلیومی و خون‌ریزی گزارش نمودند (21). در تحقیق حاضر نیز این ضایعات عمده‌ترین تغییرات مشاهده شده بودند. ضایعاتی نظیر افزایش تعداد سلول‌های موکوسی و کلراید در آبشش ماهیان، در تحقیقات متعددی که در ارتباط با تاثیر آلاینده‌ها بر آبشش صورت گرفته، گزارش شده است (4، 11، 14). در نمونه‌های شانک زردباله در تحقیق حاضر در مواجهه با فنانترن، تعداد سلول‌های کلراید و سلول‌های موکوسی در مقایسه با نمونه‌های شاهد، افزایش یافتند.

امر یک پاسخ تطبیقی جهت جلوگیری از ورود آلاینده‌ها در سطح آبشش است و یک واکنش پاتولوژیکی نسبت به جذب مواد سمی محسوب می‌شود. Rastgar و همکاران (2015) نیز در مطالعه اثر بنزوآلفا‌پایرن بر آبشش ماهی شانک زردباله نیز دژنراتیو و نکروز اپی‌تلیوم رشته‌های آبششی را مشاهده نمودند (21) Hibiya (1995) بیان نمودند که بخش مهمی از عوارض آبشش ناشی از آسیب به سلول‌های پیلار، در اثر افزایش جریان خون به درون تیغه‌های ثانویه می‌باشد، که سبب آسیب به مویرگ‌های تیغه ثانویه و وقوع خون‌مردگی یا آنوریسم می‌گردد. آنوریسم مشاهده شده در تحقیق حاضر در واقع مربوط به تخریب سلول‌های پیلار در نتیجه اثر آلاینده بر شدت جریان خون یا اثر مستقیم آلاینده‌ها بر آبشش می‌باشد (17). پرخونی یک مکانیسم دفاعی است که موجب کاهش فضای بین تیغه‌ها، اتصال تیغه‌های مجاور، کاهش آسیب‌پذیری آبشش در برابر نفوذ آلاینده‌ها از طریق اپی‌تلیوم می‌شود. Huarong و همکارانش (2010) در بررسی اثر بوتاکلر بر آبشش *Paralichthys olivaceus* پر خونی را به عنوان یک آسیب بافتی گزارش دادند (13). استرس نفوذ آلاینده‌ها از سوی دیگر موجب القاء هیپرپلازی سلول‌های اپی‌تلیومی و به هم چسبیدن متعاقب تیغه‌های آبششی می‌شود. اتصال تیغه‌ها به یکدیگر، با وجود کاهش کیفیت فعالیت آبشش، موجب افزایش فاصله بین محیط خارج و خون شده، یک سد دفاعی جهت جلوگیری از نفوذ بیشتر آلاینده‌ها به بدن ماهی و کاهش عوارض آسیب‌زننده آن‌ها ایجاد می‌کنند (Oliviera Riberio et al., 2005). Oliviera Riberio و همکاران (2005) در بررسی تاثیرات آفت‌کش‌ها و هیدرکربن‌های نفتی بر آبشش مارماهی و Santos و همکاران (2011) در بررسی اثر نفتالن بر آبشش ماهی *Trachinotus carolinus*، هیپرپلازی را گزارش نمودند. Mazon و Fernandes

خط طلایی که در معرض شکوفایی حاد و تحت حاد جلبک *Chattonella marina* (از گونه های ایجاد کننده کشند قرمز) قرار داشتند، تکثیر سلول های کلراید در اپیتلیوم آبشش این ماهیان در طی چند ساعت پس از بلوم (شکوفایی) جلبک و در نهایت مرگ و میر ماهیان به مدت کوتاهی پس از آن مشاهده شد (4). افزایش تعداد سلول های موکوسی و در نتیجه افزایش ترشحات موکوسی به عنوان سدی محافظی جهت محدود کردن جذب آلاینده ها و سموم عمل می کند، ولی خود منجر به کاهش تبادل گازهای تنفسی و هیپوکسی می شود (15).

افزایش تعداد (هیپرپلازی) و حجم (هیپرتروفی) سلول های کلراید در مواجهه با آلاینده ها یک مکانیسم دفاعی در جهت حفظ تعادل اسمزی می باشد (11). بدیهی است که غلظت های بالای مواد سمی، به ویژه استرسورهای (محرک های) یونی، بر تعداد سلول هایی که در فرآیند تنظیم اسمزی نقش دارند (مانند سلول های کلراید)، اثر دارند (11). jesso و همکاران (1996) در مطالعه خود بر ماهی *Gambusia holbrooki* گزارش نمودند که تعداد سلول های کلراید و اندازه دهانه راسی آن ها پس از 14 روز قرار گرفتن در معرض جیوه، افزایش معنی داری نسبت به گروه شاهد یافته بود (14). همچنین در ماهی شانک

نتیجه گیری کلی

در مجموع می توان گفت، تغییرات پاتولوژیکی آبشش، نتیجه اثر مستقیم آلاینده ها است و یک شاخص کیفی خوب و مطمئن برای نشان دادن استرس ناشی از ورود سطوح پایین این آلاینده ها به محیط زیست ماهی ها محسوب می شود. همچنین با توجه به نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر، می توان بیان نمود که میزان آلودگی با فنانترن دارای ارتباط مستقیمی با تعداد سلول های موکوسی و کلراید بوده و با افزایش غلظت آن، تعداد این سلول ها به طور معنی داری افزایش می یابد.

منابع:

1. Abou-seedo, F.S., S. Dazie and K.A. Al-Kanaan. 2003. Sexuality, sex change and maturation patterns in yellowfin seabream, *Acanthopagrus latus* (Teleosti: Sparidae) (Houttuyn, 1782). *Journal of Applied Ichthyology* 19:95-73.
2. Adams, S. M. 2002. Biological indicators of aquatic ecosystem stress: invertebrates and overview. pp. 1-12, In: S. M. Adams (ed.), Biological indicators of aquatic ecosystem stress. American Fisheries Society, Bethesda, MD.
3. Al-Hassan, J. M., M. Afzal, C.V.N. Rao and S. Fayad. 2003. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Aliphatic Hydrocarbons (AHs) in Edible fish from the Arabian Gulf. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 70: 205-212.
4. Au, D.W.T. 2004. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine Pollution monitoring: a review. *Marine Pollution Bulletin* 48: 817-834
5. Camargo, M.M.P. and C.B.R. Martinez. 2007. Histopathology of gills, kidney and liver of a neotropical fish caged in an urban stream. *Neotropical Ichthyology* 5: 327-336.
6. Cocchieri, R.A., A. Arnese and A.M. Minicucci. 1990 Polycyclic aromatic hydrocarbons in marine organisms from Italian central Mediterranean coasts. *Marine Pollution Bulletin* 21: 15-18.
7. Datta, M. and A. Kaviraj. 2002. Acute toxicity of synthetic pyrethroid deltamethrin to freshwater catfish *Clarias gariepinus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 70: 296-299.
8. Devlin, E.W. 2006. Acute toxicity, uptake and histopathology of aqueous methyl mercury to fathead minnow embryos. *Ecotoxicology* 15: 97-110.
9. Evans, D.H. and J.B. Claiborne. 2006. The physiology of fishes. CRC.
10. Fernandes, M.N. and A.F. Mazon. 2003. Environmental Pollution and Fish Gill Morphology. pp.203-231, In: A.L. Val and B.G. Kapoor, (eds.), Fish Adaptation. Science Publishers, Enfield.
11. Giari, L., M. Manera, E. Simoni and B.S. Dezfali BS. 2007. Cellular alterations in different organs of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) exposed to cadmium. *Chemosphere* 67: 1171-1181.
12. Hemalatha, S. and T.K. Banerjee. 1997. Histopathological analysis of sublethal toxicity of zinc chloride to the respiratory organs of the air breathing catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Biological Research* 30: 11-21.
13. Huarong, G., Y. Licheng, Z. Shicui and F. Wenrong. 2010. The toxic mechanism of high lethality of herbicide butachlor in marine flatfish flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Oceanic and Coastal Sea Research* 9: 257-264.
14. Jagoe, C.H., A. Faivre and M.C. Newman. 1996. Morphological and morphometric changes in the gills of Mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) after exposure to mercury (II). *Aquatic Toxicology* 34: 163-183.

15. Khan, N.Y., M.P. Munwar and A.R.G. Price. 2002. Physical and human geography. pp. 3-21, In: The Gulf system: Health and Sustainability. Bakhuy Publishers, Leiden.
16. Mallatt, J. 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: A statistical review. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 42: 630-648.
17. Martinez, C.B.R., M.Y. Nage, C.T.B.V. Zaia and D.A.M. Zaia. 2004. Morphological and physiological acute effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Brazilian Journal of Biology* 64 (4): 797-807.
18. Mela, M., M.F.A. Randia, D.F. Venturba, C.E.V. Carvalhoc, E. Pelletierd and C.A. Oliveira Riberto. 2007. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 68: 426-435.
19. Oliveira Riberio C.A., E. Pelletier, W.C. Pfeiffer and C. Rouleau. 2000. Comparative gill damages and bioaccumulation of inorganic mercury on Tropical and Nordic freshwater fish. *Environmental Research* 83: 286-292.
20. Poleksic, V. and V. Mitrovic-Tutundzic. 1994. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. pp. 339-352, In: Muller, R. and R. Loyd (eds.), Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. Cambridge: Cambridge Univ. Press.
21. Rastgar S., A.A. Movahedinia and Z. Yarahmadi. 2015. Effects of Benz o- α -Pyren exposure stress on the gill histology and plasma levels of cortisol in Yellowfin Seabream, *Acanthopagrus latus*. *Journal of Animal Researches* 28(2): 161-169.
22. Schlenk, D. and W.H. Benson. 2001. Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts: Organ, *CRC* 34: 98-109.
23. Wood, C.M. 2001. Toxic responses of the gill. pp. 1-89, In: Schlenk, D. and W. H. Benson (eds.), Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts. London: Taylor and Francis.