



مطالعه هیستوپاتولوژیک آبشش و کبد هامورماهی لکه زیتونی منقوط (*Epinephelus stoliczkae*) تحت تأثیر کروم

پروین صادقی^{۱*}، امید کوهکن^۲

تاریخ دریافت: مهر ۹۴

تاریخ پذیرش: آبان ۹۴

چکیده

تغییرات هیستوپاتولوژیکی به عنوان نشانگرهای زیستی در ارزیابی سلامت ماهیان در معرض آلاینده در هر دو محیط آزمایشگاهی و طبیعی به کار برده می‌شوند. در این پژوهش، تغییرات هیستوپاتولوژیک ناشی از غلظت‌های تحت کشنده فلز کروم در بافت‌های آبشش و کبد هامورماهی لکه زیتونی منقوط در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. برای این منظور، ۲۰۰ قطعه هامورماهی لکه زیتونی منقوط با میانگین وزن $389/5 \pm 92/4$ گرم و میانگین طول کل $29/6 \pm 2/2$ سانتی‌متر به مدت ۲۱ روز در شرایط ثابت آزمایشگاهی تحت تاثیر سه غلظت $3/6$ ، $7/31$ و $14/6$ میلی‌گرم بر لیتر کروم قرار گرفتند و در فواصل زمانی $0/5$ ، 1 ، 7 ، 14 و 21 روز پس از آغاز آزمایش نمونه بافت آبشش و کبد آن‌ها جداسازی شد. نتایج مطالعات هیستوپاتولوژیک توسط میکروسکوپ نوری در بافت آبشش شامل ضایعاتی چون چماقی شدن، هیپرپلازی، پرخونی و جدا شدن اپیتلیوم تیغه‌های آبششی و در بافت کبد نکروز، واکوئولاسیون، بی‌نظمی در آرایش هپاتوسیت‌ها، مراکز ملانوماکروفاژی و اتساع سینوزوئیدهای کبدی بود. نتایج مطالعات هیستوپاتولوژیکی ارتباط ویژه‌ای را بین غلظت کروم و شدت عوارض ایجاد شده نشان داد. به طوری که شدیدترین عوارض در غلظت‌های بالاتر کروم و مدت زمان طولانی‌تر مواجهه، در بافت‌های مورد مطالعه ماهی مشاهده شد.

واژگان کلیدی: هیستوپاتولوژی، آبشش، کبد، هامورماهی لکه زیتونی منقوط، کروم.

۱- استادیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران.

۲- مربی گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران.

* نویسنده مسئول: parvin.sadeghi@gmail.com

مقدمه

کروم به عنوان فلز سنگینی که در بسیاری از صنایع کاربرد دارد، یک تهدید کننده جدی برای اکوسیستم‌های آبی محسوب می‌شود و بر روی بقا و رشد موجودات آبی به ویژه ماهیان تأثیرگذار است (Mishra and Mohanty, 2008). کروم در محیط‌های آبی به صورت یون کرومات وجود دارد که به راحتی از غشاهای زیستی عبور می‌کند و سبب آسیب سلولی می‌شود (Irwin et al., 1997). همچنین کروم به دلیل اثرات جهش‌زایی و سرطان‌زایی به عنوان یک ماده سمی برای سیستم‌های بیولوژیکی شناخته می‌شود (Hodgson, 2004; Velma et al., 2009). این فلز به دلیل سمیت بالا می‌تواند سبب بروز عوارض جانبی مختلفی از جمله آسیب به ساختارهای بافتی در گونه‌های مختلف ماهیان شود (Kuykendall et al., 2006). ماهی موجودی مناسب برای درک جنبه‌های مختلف مسمومیت با فلزات سنگین در اکوسیستم‌های آبی است (Velma and Tchounwou, 2010). از جنبه دیگر، ماهی‌ها موجودات مهمی جهت انتقال آلاینده‌ها به جمعیت‌های انسانی هستند و می‌توانند نشان‌دهنده قرار گرفتن موجود در معرض آلاینده‌های محیطی باشند (Al-Sabti and Metcalfe, 1995). در خصوص اثرات سمیت کروم روی ماهی‌ها اطلاعات محدود است و عمدتاً به بررسی اثرات کروم بر روی پروفایل بیوشیمیایی - آنزیمی، خون‌شناسی (Vutukuru, 2005; Sadeghi et al., 2014) و پاسخ‌های ایمنی (Arunkumar et al., 2000) پرداخته شده است. مطالعه بر روی پاسخ‌های هیستوپاتولوژیک اندام‌های حیاتی مانند آبشش و کبد در مواجهه با کروم در ماهیان آب شور کم‌تر مورد توجه قرار گرفته است (Mishra and Mohanty, 2008). تغییرات هیستوپاتولوژیکی به طور گسترده‌ای به عنوان نشانگرهای زیستی در ارزیابی سلامت ماهی‌های قرار گرفته در معرض آلاینده در هر دو محیط آزمایشگاهی و طبیعی به کار برده می‌شوند (Thophon et al., 2003; Camargo and Martinez, 2007). از این رو مطالعه جنبه‌های هیستوپاتولوژیکی بافت‌های مهم در ماهیان حائز اهمیت است. به دلیل ارتباط مداوم آبشش با آب اطراف، این عضو اولین اندام هدف ماهی در مواجهه با آلاینده‌های محیطی است (Perry and Laurent, 1993). در واقع، آلاینده‌ها از راه

جمعیت‌های پرتعداد در این منطقه وجود دارد و قادر است شرایط آزمایشگاهی را به خوبی تحمل کند. با توجه به این موارد و همچنین با در نظر گرفتن سمیت کروم و اثبات این واقعیت که پژوهش‌های بافت‌شناسی ابزار دقیق و حساسی برای تشخیص اثرات ترکیبات شیمیایی بر اندام‌های هدف موجودات در شرایط آزمایشگاهی و محیطی هستند (Olojo et al., 2005; Cengiz, 2006; Velmurugan et al., 2007)، در مطالعه حاضر اثرات هیستوپاتولوژیکی ناشی از غلظت‌های مختلف فلز کروم بر بافت‌های آبشش و کبد هامورماهی لکه زیتونی منقوط مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

در مطالعه حاضر، به روش صید انتظاری و به وسیله قلاب دستی و طعمه، ۲۰۰ قطعه هامورماهی لکه زیتونی منقوط با میانگین وزن $389/5 \pm 92/4$ گرم و میانگین طول کل $29/6 \pm 2/2$ سانتی‌متر از خلیج چابهار صید شد. ماهی‌های صید شده به صورت زنده با استفاده از مخزن انتقال نمونه و پمپ هوا به آزمایشگاه انتقال داده شدند. پس از طی دو هفته دوره سازگاری، با توجه به غلظت حدکشندگی

آبشش وارد بدن ارگانسیم شده و اثرات سمی خود را در اپیتلیوم آبششی اعمال می‌کنند (Playle et al., 1992). بنابراین تغییر در ساختار آبشش ماهی از جمله شایع‌ترین و شناخته شده‌ترین پاسخ‌ها به عوامل استرس‌زای محیطی است (Au, 2004). از این رو آبشش ابزار کارآمدی در پایش زیستی محیط زیست ماهی است (Oliveira Ribeiro et al., 2005).

از سوی دیگر، کبد نقش مهمی در عملکردهای حیاتی بدن از جمله سوخت و ساز ایفا می‌کند و اندام مهمی در تجمع و دفع آلاینده‌ها در ماهی محسوب می‌شود (Triebkorn et al., 1997). به همین دلیل این اندام در مطالعات سم‌شناسی ناشی از فلزات سنگین در گونه‌های مختلف ماهی کاربرد دارد و انواع تغییرات هیستوپاتولوژیکی در کبد ماهیان در معرض طیف گسترده‌ای از آلاینده‌ها مانند ترکیبات آلی و فلزات سنگین گزارش شده است (Rabitto et al., 2005; Mela et al., 2007).

هامورماهی لکه زیتونی منقوط (*Epinephelus stoliczkae*) از خانواده هامورماهیان، یکی از گونه‌های آبی ارزشمند دریای مکران است که در تمام طول سال و در

شد. نمونه‌های بافتی در محلول تثبیت‌کننده بوئن قرار داده شدند و پس از ۴۸ ساعت از محلول بوئن خارج و تا زمان انجام مراحل بعدی در الکل ۷۰٪ نگهداری شدند (Velma and Tchounwou, 2010). کلیه مراحل پاساژ بافتی شامل آب‌گیری، شفاف‌سازی و آغشتگی توسط دستگاه پاساژ بافت یا هیستوکینت (اتوتکنیکون، مدل RX-11B، Tissue Tek Rotary، ژاپن) و تحت برنامه زمان‌بندی شده در آزمایشگاه دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، انجام گرفت. نمونه‌های بافتی با ضخامت ۴-۵ میکرون طبق روش‌های روتین بافت‌شناسی تهیه و با استفاده از محلول‌های هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند (Liu et al., 2011). لام‌های بافتی آماده شده با استفاده از میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین عکس‌برداری دیجیتال بررسی شد. برای ارزیابی نتایج پاتولوژیک، تغییرات هیستوپاتولوژیکی مشاهده شده در بافت‌های آبشش و کبد هامورماهی بر اساس میزان گستردگی و شدت ضایعات، به صورت کیفی و در ۴ گروه «- : بدون ضایعه، ± : در برخی نمونه‌ها، + : ضایعه <۲۰٪، ++ : ضایعه <۶۰٪، + : ضایعه <۲۰٪ و +++ : ضایعه <۶۰٪» دسته‌بندی شدند

متوسط (LC_{50}) فلز کروم برای هامورماهی لکه زیتونی منقوط که $73/09 \text{ mg/L}$ محاسبه شده بود (صادقی و همکاران، ۱۳۹۳) و میزان تجمع این آلاینده در رسوبات منطقه مطالعاتی، سه غلظت $3/6$ ، $7/31$ و $14/6$ میلی‌گرم بر لیتر از فلز کروم (برابر با ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد غلظت حدکشندگی) برای آزمایش سمیت تحت کشنده در نظر گرفته شد. طول دوره آزمایش ۲۱ روز بود و آزمایش با یک شاهد و سه تکرار برای هر غلظت و ۱۲ قطعه ماهی در هر وان انجام گرفت.

فاکتورهای فیزیوشیمیایی آب شامل شوری (شوری سنج چشمی مدل ATAGO، ساخت ژاپن)، دما (دماسنج دیجیتالی مدل Thermoworks، ساخت آمریکا) و pH (pH متر دیجیتالی مدل WTW 2A20-1012، ساخت آلمان) در طول مدت زمان آزمایش به صورت مداوم کنترل شدند و سعی شد تا حد امکان تمام شرایط ثابت باقی بماند تا تنها عامل متغیر، غلظت‌های آلاینده کروم باشد (Di Giulio and Hinton, 2008).

به منظور مطالعه تغییرات هیستوپاتولوژیک، از ماهیان تیمار شده با فلز کروم در ۰/۵، ۱، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز پس از آغاز آزمایش، پس از تشریح، نمونه بافت آبشش و کبد جداسازی

غلظت‌های کم کروم نیز مشاهده شد پدیده چماقی شدن بود و با افزایش غلظت عوارضی چون هیپرپلازی، پرخونی، جداسدن اپیتلیوم و بهم چسبیدگی تیغه‌های آبششی دیده شد. تقریباً تمامی صدمات مشاهده شده با افزایش غلظت کروم افزایش نشان دادند. درجه آسیب تیمارهای مختلف بر اساس غلظت‌های مختلف و زمان نمونه‌برداری در جدول ۱ ارائه شده است.

جمع‌شدگی و هیپرپلازی هم در تیغه ثانویه و هم در بخش قاعده‌ای تیغه‌ها در تیمار $3/6 \text{ mg/L}$ کروم و در ۱۴ و ۲۱ روز پس از مواجهه مشاهده شد (شکل ۲). بهم ریختگی و هیپرپلازی با افزایش میزان کروم به ویژه در غلظت $14/6 \text{ mg/L}$ پس از ۱۴ روز با افزایش چشمگیری همراه بود و در نهایت منجر به محو شدن تیغه‌های آبششی ثانویه شد (شکل ۳). دژنره شدن و تخریب اپیتلیوم در غلظت‌های بالای کروم دیده شد، به طوری که اپیتلیوم آبششی در برخی از ماهیان مواجه شده با غلظت $14/6 \text{ mg/L}$ کروم کاملاً از بین رفته بود (شکل ۴). از سوی دیگر، فیوزن و بی‌شکلی در تیغه ثانویه آبششی و همچنین کوتاهی لاملا نیز مشاهده شد (شکل ۳). چماقی شدن و جدا شدن اپیتلیوم تیغه ثانویه در اکثر تیمارها

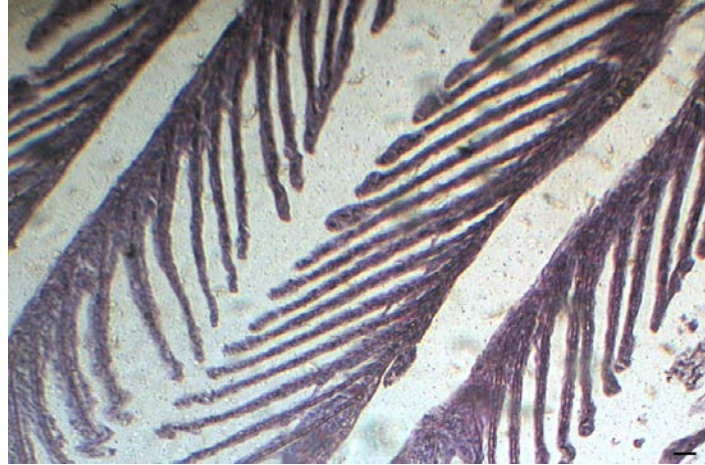
(کوهکن و همکاران، ۱۳۹۳؛ Mishra and Mohanty, 2008).

نتایج

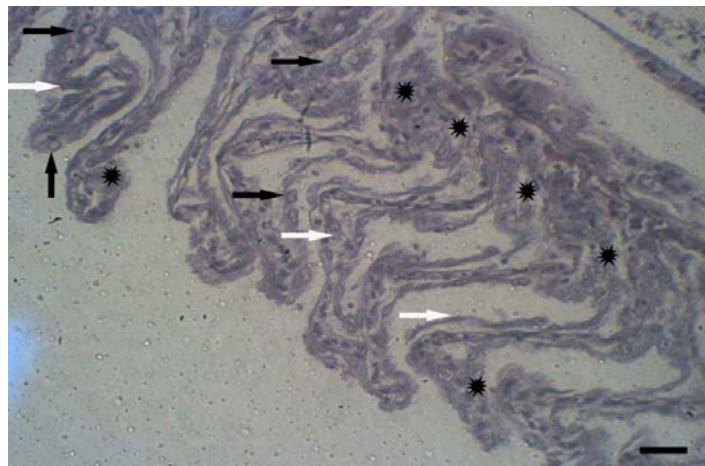
فاکتورهای فیزیکوشیمیایی اندازه‌گیری شده در طول دوره آزمایش شامل شوری، pH و دما به ترتیب 37 ± 0.5 ppt، $8/1$ و 27 ± 0.5 درجه سانتی‌گراد بودند.

مشاهدات ماکروسکوپی نمونه‌های شاهد هیچ گونه عارضه و حالت غیرطبیعی را نشان نداد، اما نمونه‌های مواجه شده با کروم در تیمارهای مختلف علائمی از قبیل حرکات دارت مانند و تیرگی پوست را بروز دادند. اما با این وجود هیچ گونه تلفاتی مشاهده نشد. برای بررسی ضایعات بافتی مطالعات میکروسکوپی بافت‌های آبشش و کبد انجام گرفت. در بافت آبشش تیغه دوم آبشش در ماهیان گروه شاهد، نازک و کشیده بود و هیچ حالت غیرطبیعی را نشان نداد. لاملا از یک ردیف سلول‌های نازک تشکیل شده و ساختار رشته‌ای را ایجاد کرده بود. رشته‌ها و تیغه‌های آبششی به طور منظم قرار گرفته و آسیب خاصی را نشان ندادند (شکل ۱). مطالعات میکروسکوپی نمونه‌های تحت تأثیر فلز کروم، ضایعات مختلفی را نشان داد. اولین و فراوان‌ترین ضایعه که در

مشاهده شد (شکل ۵). این تغییرات با افزایش خونی همراه بود (شکل ۶). مدت زمان مواجهه با پرخونی و اتساع عروق

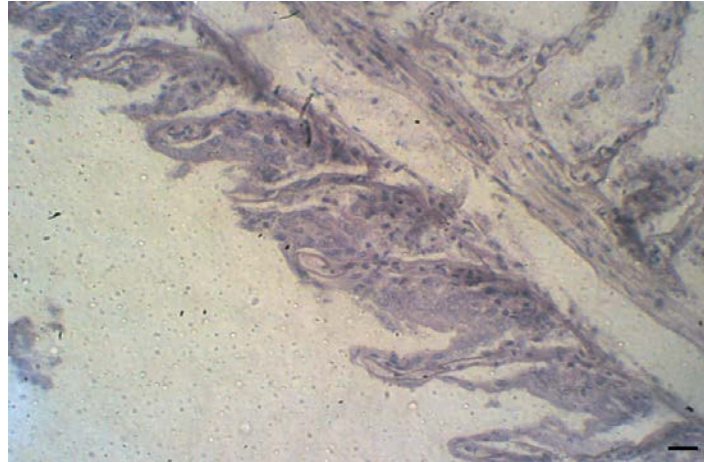


شکل ۱: مقطع میکروسکوپی آبشش هامورماهی لکه زیتونی منقوط در گروه شاهد. لاملاها دارای ساختاری کاملاً طبیعی هستند و سالم به نظر می‌رسند (H&E، ۱۰×).

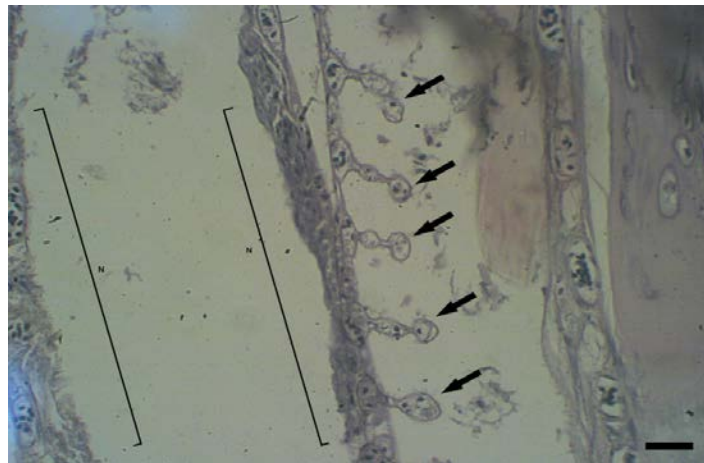


شکل ۲: مقطع میکروسکوپی آبشش ماهی مواجه شده با $3/6 \text{ mg/L}$ کروم بعد از ۲۱ روز: در شکل هسته‌های در حال نکروز سلول‌های کلراید (فلش سیاه) مشاهده می‌شود. همچنین بدشکلی و خمیدگی

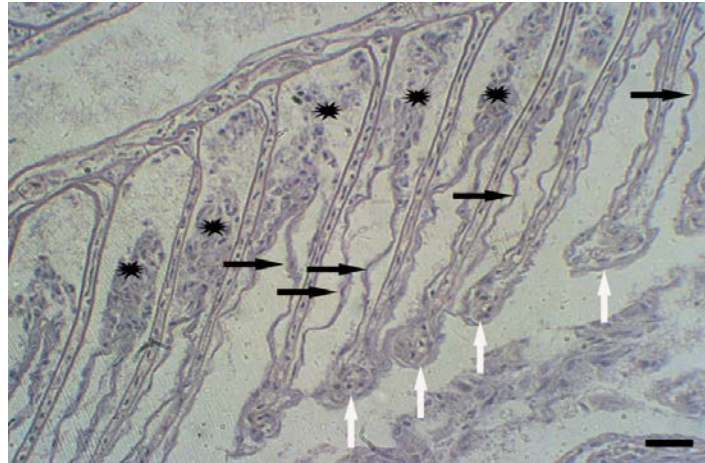
فیلامنت‌های آبششی و هیپرتروفی (فلش سفید) و هیپرپلازی (ستاره) به ویژه در بخش قاعده‌ای فیلامنت‌ها کاملاً مشخص است (H&E، ۴۰×).



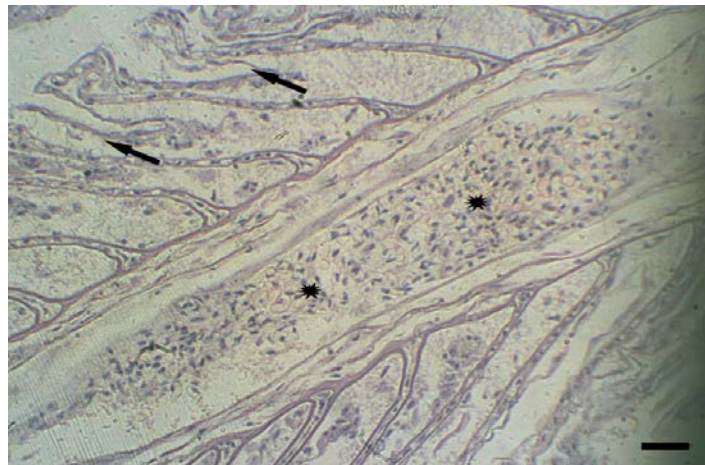
شکل ۳: مقطع میکروسکوپی آبشش هامورماهی لکه زیتونی منقوط مواجه شده با ۱۴/۶mg/L کروم بعد از ۱۴ روز: هیپرپلازی و تکثیر بی‌رویه اپیتلیوم به ویژه در بخش قاعده‌ای فیلامنت‌ها به شدت افزایش یافته و باعث به هم چسبیدن تیغه‌های ثانویه مجاور شده است (H&E، ۴۰×).



شکل ۴: مقطع میکروسکوپی آبشش هامورماهی لکه زیتونی منقوط مواجه شده با ۱۴/۶mg/L کروم بعد از ۲۱ روز. تیغه‌های ثانویه در حال دژنره شدن و نکروز شدید اپیتلیوم (فلش‌ها)؛ حذف تیغه ثانویه (N) نیز دیده شد به نحوی که فیلامنت‌های آبششی در برخی از ماهیان کاملاً از بین رفته بود (H&E، ۴۰×).



شکل ۵: مقطع میکروسکوپی آبشش هامورماهی لکه زیتونی منقوط مواجه شده با $3/6 \text{ mg/L}$ کروم بعد از ۱۴ روز. جدا شدن اپیتلیوم آبششی (فلش سیاه)، چماقی یا گریزی شدن (فلش سفید) و هیپرپلازی (ستاره) در تیغه ثانویه کاملاً مشخص است (H&E، $40\times$).



شکل ۶: مقطع میکروسکوپی آبشش هامورماهی لکه زیتونی منقوط مواجه شده با $7/31 \text{ mg/L}$ کروم بعد از ۲۱ روز. پرخونی شدید و افزایش سلول‌های خونی (ستاره) که با افزایش غلظت کروم میزان پرخونی نیز افزایش یافت. فلش‌ها جدا شدن اپیتلیوم آبششی را نشان می‌دهند (H&E، $40\times$).

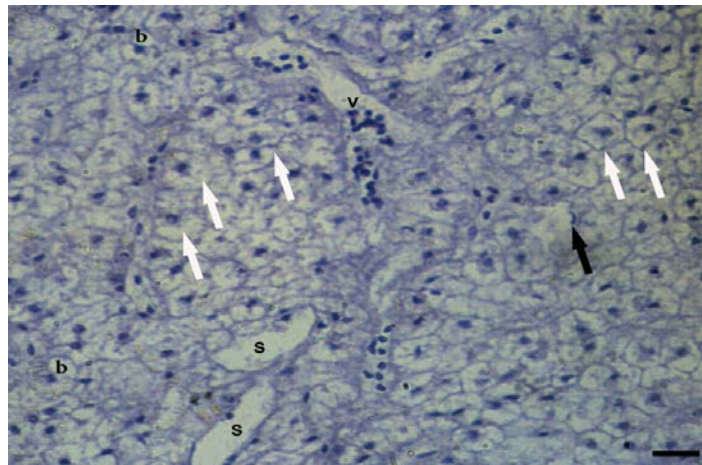
جدول ۱: شدت ضایعات مشاهده شده در آبشش هامورماهی لکه زیتونی منقوط در غلظت‌های مختلف کروم

غلظت (mg/L)	زمان (روز)	چماقی شدن	هیپرتروفی	جداشدن اپیتلیوم	هایپرپلازی	نکروز	پرخونی	بهم چسبیدگی
شاهد	-	-	-	-	-	-	-	-
۳/۶	۰/۵	-	-	+	±	-	-	-
	۱	+	+	+	+	-	±	±
	۷	++	+	++	++	+	+	+
	۱۴	+++	++	++	++	+	++	++
	۲۱	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
۷/۳۱	۰/۵	-	-	-	+	-	-	-
	۱	+	-	+	++	+	±	-
	۷	++	+	++	++	+	+	±
	۱۴	++	+	+++	++	++	++	+
	۲۱	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
۱۴/۶	۰/۵	+	+	+	+	-	+	-
	۱	+	+	++	++	+	+	+
	۷	++	++	+++	+++	++	++	++
	۱۴	++	++	+++	+++	++	+++	+++
	۲۱	-	++	+++	+++	+++	+++	-

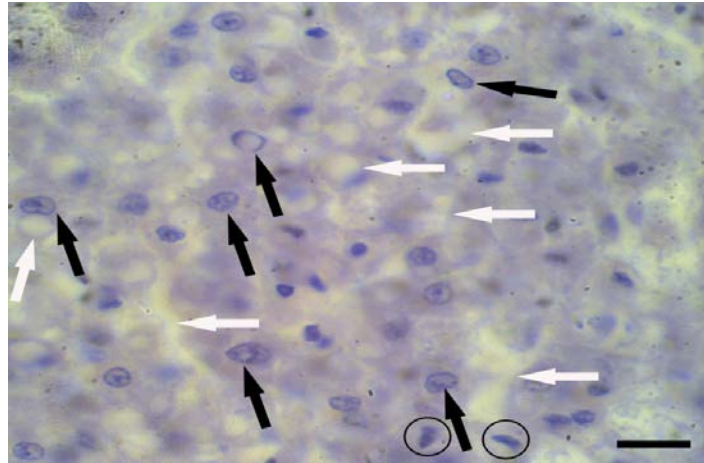
«-»: بدون ضایعه؛ «±»: در برخی نمونه‌ها؛ «+»: ضایعه > ۲۰٪؛ «++»: ضایعه > ۶۰٪؛ «+++»: ضایعه > ۶۰٪

بررسی میکروسکوپی کبد نمونه‌های شاهد نشان داد که بافت کبد شامل توده سلولی پیوسته بود و تعداد زیادی رگ خونی داشت. هسته‌های مرکزی و سیتوپلاسم مشخص از ویژگی هپاتوسیت‌ها است (شکل ۷). اما در ماهیان مواجه شده با کروم تغییرات هیستوپاتولوژیکی زیادی به ویژه در محدوده اطراف لوبول‌های کبدی مشاهده شد. صدماتی

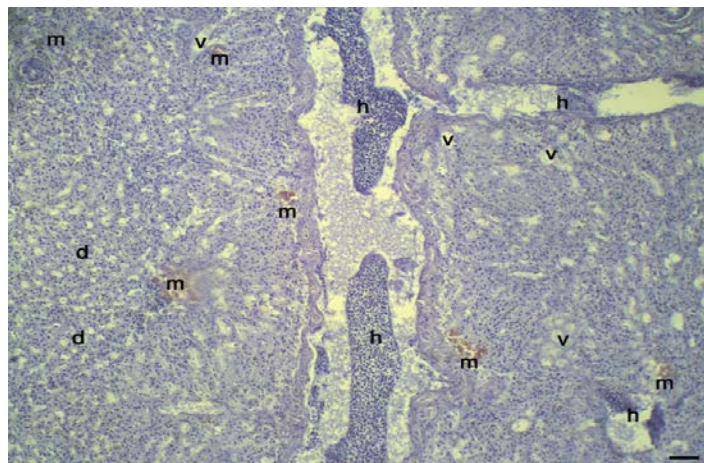
از قبیل نکروز شدید، واکوئولاسیون گسترده، بی‌نظمی در آرایش هپاتوسیت‌ها، لیز سلولی و از هم پاشیدگی حدود سلولی که در غلظت‌های بالاتر به شدت افزایش نشان داد (شکل‌های ۸ و ۹). گسترده‌گی ضایعات مختلف در هپاتوسیت‌های کبدی در هامورماهی لکه زیتونی منقوط تحت تأثیر غلظت‌های مختلف کروم و زمان نمونه‌برداری به صورت کلی در جدول ۲ آورده شده است. کبد ماهیان مواجه شده با کروم در غلظت $7/31 \text{ mg/L}$ با گذشت ۲۱ روز مراحل آغازین واکوئولاسیون به همراه مراکز ملانوماکروفاژ و پرخونی سینوزوئیدها را نشان داد (شکل ۹) و در غلظت $14/6 \text{ mg/L}$ کروم در روز ۲۱، علاوه بر واکوئولاسیون شدید و پیشرونده، مراکز فعال ملانوماکروفاژی فراوان، خونروی و اتساع سینوزوئیدهای کبدی نیز مشاهده شد (شکل ۱۰). میزان، شدت و گسترده‌گی واکوئولاسیون و نکروز سلولی در غلظت‌های با زمان طولانی‌تر به شدت افزایش نشان داد (شکل ۱۱).



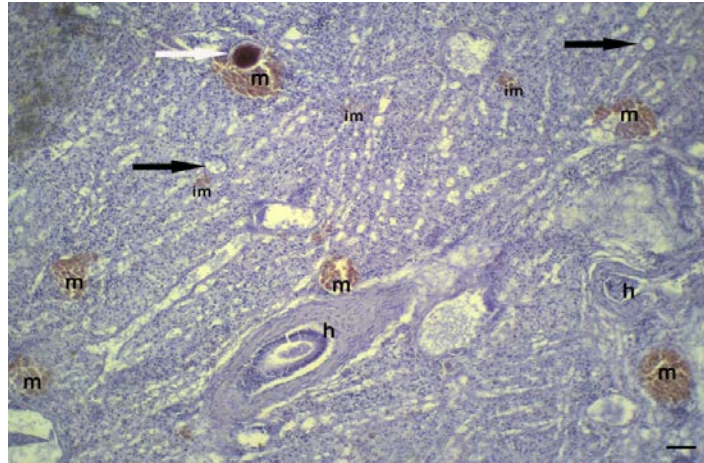
شکل ۷: مقطع میکروسکوپی کبد هامورماهی لکه زیتونی منقوط در گروه شاهد. هپاتوسیت‌های تیپیک (فلش سفید) با هسته کاملاً مرکزی و حدود سیتوپلاسمی مشخص. s: سینوزوئیدهای کبدی. v: سیاهرگ بزرگ که گلبول‌های قرمز در آن قابل تشخیص است. b: مجاری صفراوی. فلش سیاه: هسته اندوتلیال (H&E، $10\times$).



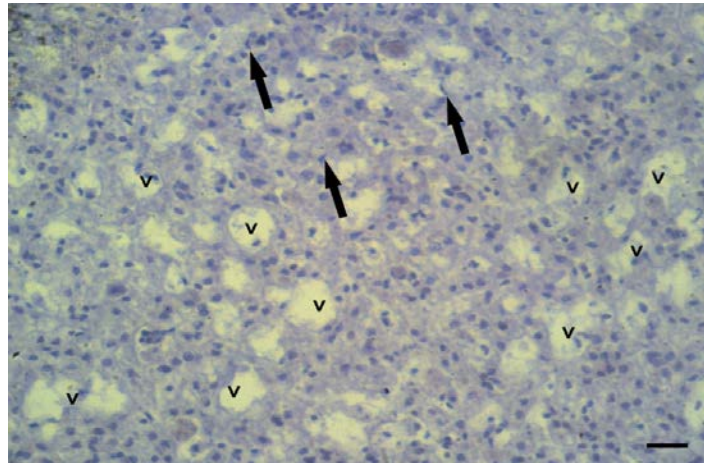
شکل ۸: مقطع میکروسکوپی کبد هامورماهی لکه زیتونی منقوط مواجه شده با $14/6 \text{ mg/L}$ کروم بعد از ۱۴ روز. در غلظت‌های بالا مرز بین سلولی از بین رفته و حدود سلول‌ها مشخص نیست. هسته سلول شروع به نکروز کرده (فلش سیاه) و در نهایت منجر به واکوئولاسیون شدید (فلش سفید) و پیشرونده می‌شود. دوایر پیکنوز سلولی را نشان می‌دهند (H&E، $40\times$).



شکل ۹: مقطع میکروسکوپی کبد هامورماهی لکه زیتونی منقوط مواجه شده با $7/21 \text{ mg/L}$ کروم بعد از ۲۱ روز. مراکز ملانوماکروفاژی (m) در حال تشکیل هستند و واکوئولاسیون (v) نیز مشاهده می‌شود. h: پرخونی شدید عروق کبدی. d: بی‌نظمی در آرایش هیپاتوسیت‌ها (H&E، $10\times$).



شکل ۱۰: مقطع میکروسکوپی کبد هامورماهی لکه زیتونی منقوط مواجه شده با 14.6 mg/L کروم بعد از ۲۱ روز. مراکز ملانوماکروفازی بسیار گسترده (m)، مراکز ملانوماکروفاز در حال تشکیل (im)، واکوئولاسیون (فلش سیاه) و خونروی (فلش سفید) مشاهده می‌شود (H&E، $10\times$).



شکل ۱۱: مقطع میکروسکوپی کبد هامورماهی لکه زیتونی منقوط در مواجهه با 14.6 mg/L کروم بعد از ۲۱ روز. واکوئولاسیون گسترده (v) و هسته‌های نکروزه و پیکنوتیک (فلش سیاه) مشاهده می‌شود (H&E، $10\times$).

جدول ۲: شدت ضایعات مشاهده شده در کبد هامورماهی لکه زیتونی منقوط در غلظت‌های مختلف کروم

غلظت (mg/L) زمان (روز) واکونولاسیون	نکروز	پرخونی	خونروی	ملانوماکروفاز	بهم ریختگی سلولی	شاهد
-	-	-	-	-	-	شاهد
۰/۵	-	-	-	-	-	۳/۶
۱	±	+	-	-	±	
۷	±	+	++	-	+	
۱۴	+	++	++	-	++	
۲۱	++	++	+++	±	++	
۰/۵	-	-	-	-	-	۷/۳۱
۱	±	-	+	-	-	
۷	+	+	++	±	±	
۱۴	+	+	++	±	+	
۲۱	++	++	+++	+	+++	
۰/۵	-	-	-	-	-	۱۴/۶
۱	+	+	++	+	+	
۷	++	++	+++	++	++	
۱۴	++	++	+++	++	+++	
۲۱	+++	+++	+++	+++	+++	

(-) بدون ضایعه؛ (±) در برخی نمونه‌ها؛ (+) ضایعه > ۲۰٪؛ (++) ضایعه > ۶۰٪؛ (+++) ضایعه > ۶۰٪؛ (-) بدون ضایعه؛ (±) در برخی نمونه‌ها؛ (+) ضایعه > ۲۰٪؛ (++) ضایعه > ۶۰٪؛ (+++) ضایعه > ۶۰٪.

بحث

استخوانی عالی از جمله پژوهش‌های جدیدی است که امروزه در سراسر دنیا انجام می‌شود (Thophon et al., 2003; Van Heerden et al., 2004; Olojo et al., 2005; Dyk et al., 2012). تغییرات هیستوپاتولوژیک در

بررسی اثرات آلاینده‌هایی چون فلزات سنگین جیوه، مس، کادمیوم، روی و سرب بر هیستوپاتولوژی اندام‌های مختلف در ماهیان

اندام اصلی در تنفس و تنظیم اسمزی ماهی محسوب می‌شود، آسیب ناشی از اثرات سمی کروم به این بافت سبب کاهش مصرف اکسیژن و اختلال در تنظیم اسمزی خواهد شد (Mishra and Mohanty, 2008).

نتایج این پژوهش شامل ضایعات و صدمات گسترده‌ای در آبشش و کبد هامورماهی لکه زیتونی منقوط مواجه شده با کروم بود که نشان‌دهنده اثرات سمی و طولانی مدت کروم در این ماهی است. در آبشش فیوزن، نکروز، هیپرتروفی و هیپرپلازی، جداسدن اپیتلیوم از غشای پایه مشاهده شد و صدمات اصلی کبد شامل نکروز و واکوئولاسیون، مراکز ملانوماکروفازی و بهم ریختگی سلولی بود. Mishra و Mohanty (۲۰۰۸) و همچنین Gupta و Kumar (۲۰۰۶) تغییرات مشابهی را به ترتیب در آبشش ماهی *Channa punctatus* در مواجهه با کروم و آبشش ماهی *Cirrhinus mrigala* در مواجهه با جیوه گزارش کردند. Muthukumaravel و Rajaraman (۲۰۱۳) فیوزن، هیپرتروفی و دژنره شدن اپیتلیوم در آبشش و واکوئولاسیون، نکروز و بی‌نظمی سلولی در کبد ماهیان انگشت‌قد *Labeo rohita* مواجه شده با کروم را گزارش کردند. تمامی این عوارض بافتی در

اندام‌های ماهی امروزه به عنوان راهی مفید در ارزیابی و پایش زیستی محیط‌های دریایی به کار می‌رود (Lang et al., 2006). در مطالعه حاضر برای نخستین بار، اثرات غلظت‌های تحت کشنده فلز کروم به عنوان یکی از سمی‌ترین آلاینده‌ها، بر روی تغییرات هیستوپاتولوژیک بافت آبشش و کبد هامورماهی لکه زیتونی منقوط مورد بررسی قرار گرفت.

مطالعات آسیب‌شناسی بافتی به ویژه در بافت‌هایی چون کبد و آبشش می‌تواند راه مناسبی برای بررسی و ارزیابی اثرات سمی مواد آلاینده باشد. کبد به عنوان اندامی که متابولیسم اولیه مواد غیرزیستی و سم‌زدایی را انجام می‌دهد، ممکن است تحت تأثیر مواد سمی دچار تغییرات هیستوپاتولوژیک شود (آقامحمدی و همکاران، ۱۳۹۰؛ کوهکن و همکاران، ۱۳۹۳). آبشش نیز به دلیل موقعیت خارجی آن همیشه تحت تأثیر عوامل محیطی موجود در آب قرار می‌گیرد. این امر باعث حساسیت بیش از حد آبشش شده به نحوی که پس از قرارگرفتن در معرض محرک‌های محیطی اولین اندامی است که دچار تغییر می‌شود (پوستی و صدیق مروستی، ۱۳۸۷؛ افضل و همکاران، ۱۳۸۹). از آنجا که آبشش

مطالعه حاضر نیز مشاهده شد. Kaoud و El-Dahshan (۲۰۱۰) هیپرپلازی شدیدی را در تیغه ثانویه آبششی ماهی *Oreochromis niloticus* تیمار شده با مس، کادمیوم، سرب و جیوه مشاهده کردند که در تیمارهای بالاتر منجر به اتصال تیغه‌های مجاور به هم شد. در پژوهش حاضر نیز هیپرپلازی مشاهده شد، این نتایج با صدمات ناشی از کلرید جیوه در *Acipenser persicus* (Khoshnood et al., 2011) و صدمات ناشی از سرب و کادمیوم در *Cyprinus carpio* (Patnaik et al., 2011) و *Lates calcarifer* (Thophon et al., 2003) و همچنین آلاینده‌های محیطی در *Clarias gariepinus* (Dyk et al., 2012) کاملاً قابل مقایسه است. همچنین Hemalatha و Banerjee (۱۹۹۷) و Al-Attar (۲۰۰۷) نیز در ماهیان *Oreochromis* و *Heteropneustes fossilis niloticus* مواجه شده با کلرید روی و نیکل صدمات آبششی مشابه را گزارش کردند.

در مطالعه حاضر آسیب‌های کبدی مختلفی از قبیل نکروز و واکوئولاسیون پیشرونده و مراکز ملانوماکروفاژی گسترده مشاهده شد که مشابه نتایج صدمات کبدی *Labeo rohita* تیمار شده با کروم بود (Muthukumaravel و Rajaraman, 2013). موارد بسیار زیادی از آسیب‌های کبدی گزارش شده است. از جمله صدمات بافتی گسترده و تغییر در هیپاتوسیت‌های کبد ماهی *Hypophthalmichthys molitrix* شده با نیکل مشاهده شد (Athikesavan et al., 2006). دژنره شدن عروق خونی، هیپرتروفی، واکوئولاسیون، نکروز و هسته‌های پیکنوتیک ضایعاتی بود که توسط Athikesavan و همکاران دیده شد. واکوئولاسیون درون سلولی، نکروز و چروکیدگی هسته که در این پژوهش دیده شد مشابه نتایج پژوهش Loganathan و همکاران (۲۰۰۶) بود که در کبد ماهیان *Labeo rohita* مواجه شده با فلز روی دیده شد. همچنین آسیب‌های بافتی چون واکوئوله شدن و نکروز ناشی از اثر فلزات سنگینی مانند کروم در ماهی *Channa punctatus* و مس در ماهی *Oreochromis niloticus* گزارش شده است (Figueiredo-Fernandes et al., 2007; Mishra and Mohanty, 2008). واکوئوله شدن سلول‌های کبدی که یکی از عوارض شایع و واضح در آسیب‌های بافتی است در اثر تجمع بیش از حد چربی در سیتوپلاسم سلول ایجاد می‌شود (Bogiswariy et al.,

2008) و سبب مهار سنتز پروتئین، ادغام میکروتوبول‌ها و رانده شدن هسته هیپاتوسیت‌ها به حاشیه سلول می‌شود (Hinton and Lauren, 1990). از سوی دیگر نکرور سلول‌های کبدی نیز ممکن است به دلیل تجمع نوتروفیل و لنفوسیت در آن‌ها باشد (Velma and Tchounwou, 2010). مراکز ملانوماکروفاژی گروهی از سلول‌های رنگدانه‌دار در بسیاری از اندام‌های ماهی هستند که معمولاً حاوی رنگدانه ملانین و هموسیدرین هستند (Agius and Roberts, 2003). تجمع این مراکز یکی از آسیب‌های شناخته شده بافتی است که در ماهیان در معرض آلاینده‌ها گزارش شده است (Dyk et al., 2012). در این مطالعه نیز تجمع مراکز ملانوماکروفاژی در غلظت‌های بالای کروم در بافت آبشش و کبد هامورماهی لکه زیتونی منقوط ثبت شد.

به طور کلی نتایج مطالعات هیستوپاتولوژیکی در این مطالعه ارتباط ویژه‌ای بین غلظت کروم و شدت عوارض ایجاد شده را نشان داد. به طوری که شدیدترین عوارض در غلظت‌های بالاتر کروم (تیمار سوم: ۱۴/۶ میلی‌گرم بر لیتر کروم) و مدت زمان طولانی‌تر مواجهه در بافت‌های مورد مطالعه هامورماهی لکه زیتونی منقوط مشاهده شد.

منابع

- افضلی ف.، شریف پور ع.، سلطانی م. و ابطحی ب. ۱۳۸۹. بررسی تغییرات بافتی کبد، کلیه و آبشش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss*) ناشی از حمام با ماده ضد عفونی کننده آکواجرم. فصلنامه علمی تحقیقات منابع طبیعی تجدیدشونده، ۱(۱): ۶۳-۷۰.
- آقامحمدی م.، فرخی ف. و توکمه‌چی ا. ۱۳۹۰. بررسی اثرات سمی غلظت‌های مختلف علف‌کش پاراکوات بر بافت کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی rainbow trout. همایش ملی تغییر اقلیم و تأثیر آن بر کشاورزی و محیط زیست. ارومیه، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان غربی. ص: ۹۱۸-۹۱۳.
- پوستی ا. و صدیق مروستی م. ۱۳۷۸. اطلس
- بافت‌شناسی ماهی- اشکال طبیعی و آسیب شناسی (ترجمه). انتشارات دانشگاه تهران. ۲۵۲ص.
- صادقی پ.، سواری ا.، موحدی نیا ع.، صفاهیه ع. ر. و اژدری د. ۱۳۹۳. تعیین غلظت کشندگی متوسط (LC_{50}) دی کرومات پتاسیم و بررسی پاسخ‌های رفتاری در هامورماهی لکه زیتونی منقوط (*Epinephelus stoliczkae*). مجله اقیانوس‌شناسی، ۵(۱۷): ۹-۱.
- کوهکن ا.، عبدی ر.، سلیقه زاده ر. و جادی ی. ۱۳۹۳. آسیب شناسی بافتی ناشی از مسمومیت تحت حاد علف‌کش پاراکوات در بافت کبد ماهی بنی انگشت قد (*Barbus sharpeyi*). مجله پاتوبیولوژی مقایسه‌ای، ۱۱(۱): ۱۱۷۲-۱۱۶۷.
- Agius C. and Roberts R.J. 2003.** Melano-macrophage centers and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases*, 26(9): 499-509.
- Al-Attar A.M. 2007.** The influences of nickel exposure on selected physiological parameters and gill structure in the teleost fish, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Biological Sciences*, 7(1): 77-85.
- Al-Sabti K. and Metcalfe C.D. 1995.** Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research*, 343: 121-135.
- Arunkumar R.I., Rajasekaran P. and Michael R.D. 2000.** Differential effects of chromium compounds on the immune responses of the African mouthbreeder, *Oreochromis mossambicus* (Peters.). *Fish and Shellfish Immunology*, 10: 667-676.
- Athikesavan S., Vincent S., Ambrose T. and Velmurugan B. 2006.** Nickel induced histopathological changes in the different tissues of freshwater fish, *Hypophthalmichthys molitrix*

- (Valencienes). *Journal of Environmental Biology*, 27: 391–395.
- Au D.W.T. 2004.** The application of histocytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: A review. *Marine Pollution Bulletin*, 48: 817–834.
- Bogiswariy S., Jegathambigai R. and Marimuthu K. 2008.** Effect of acute exposure of cadmium chloride in the morphology of the liver and kidney of mice. *International Conference of Environmental Research and Technology (ICERT)*. P: 1036–1042.
- Camargo M.M.P. and Martinez C.B.R. 2007.** Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotropical Ichthyology*, 5(3): 327–336.
- Cengiz E.I. 2006.** Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 22: 200–204.
- Di Giulio R.T. and Hinton D.E. 2008.** *The Toxicology of Fishes*. Taylor and Francis Group. New York. 1101P.
- Dyk J.C., Cochrane M.J. and Wagenaar G.M. 2012.** Liver histopathology of the sharptooth catfish *Clarias gariepinus* as a biomarker of aquatic pollution. *Chemosphere*, 87: 301–311.
- Figueiredo-Fernandes A., Ferreira-Cardoso J.V., Garcia-Santos S., Monteiro S.M., Carrola J., Matos P. and Fontainhas-Fernandes A. 2007.** Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. *Brazilian Veterinary Research*, 27(3): 103–109.
- Gupta A.K. and Kumar A. 2006.** Histopathological lesions in the tissues of *Cirrhinus mrigala* (Ham.) fingerlings exposed to a sublethal concentration of mercury. *Journal of Environmental Biology*, 27(2): 235–239.
- Hemalatha S. and Banerjee T.K. 1997.** Histopathological analysis of sublethal toxicity of zinc chloride to the respiratory organs of the air breathing catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Biological Research*, 30(1): 11–21.
- Hinton D.E. and Lauren D.J. 1990.** Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. *American Fisheries Society Symposium* 8. P: 51–65.
- Hodgson E. 2004.** *A Textbook of Modern Toxicology*. A John Wiley & Sons, Inc., Publication. Hoboken, New Jersey. 557P.

- Irwin R.J., Van Mouwerik M., Stevens L., Seese M.D. and Basham W. 1997.** Chromium VI (hexavalent chromium). Environmental Contaminants Encyclopedia. National Park Service, Water Resources Division, Fort Collins, Colorado. 43P.
- Kaoud H.A. and El-Dahshan A.R. 2010.** Bioaccumulation and histopathological alterations of the heavy metals in *Oreochromis niloticus* fish. Natural Sciences, 8(4): 147–154.
- Khoshnood Z., Khodabandeh S., Shahryari Moghaddam M. and Mosafer Khorjestan S. 2011.** Histopathological and pathomorphological effects of mercuric chloride on the gills of Persian sturgeon, *Acipenser persicus*, fry. International Journal of Natural Resources and Marine Sciences, 1(1): 23–32.
- Kuykendall J.R., Miller K.L., Mellinger K.N. and Cain A.V. 2006.** Waterborne and dietary hexavalent chromium exposure causes DNA-protein crosslink (DPX) formation in erythrocytes of largemouth bass (*Micropterus salmoides*). Aquatic Toxicology, 78: 27–31.
- Lang T., Wosniok W., Barsiene J., Katja Broeg K., Kopecka J. and Parkkonen J. 2006.** Liver histopathology in Baltic flounder (*Platichthys flesus*) as indicator of biological effects of contaminants. Marine Pollution Bulletin, 53: 488–496.
- Liu X.J., Luo Z., Li C.H., Xiong B.X., Zhao Y.H. and Li X.D. 2011.** Antioxidant responses, hepatic intermediary metabolism, histology and ultrastructure in *Synechogobius hasta* exposed to water borne cadmium. Ecotoxicology and Environmental Safety, 74: 1156–1163.
- Loganathan K., Velmurugan B., Howrelia J.H., Selvanayagam M. and Patnaik B.B. 2006.** Zinc induced histological changes in brain and liver of *Labeo rohita* (Ham). Journal of Environmental Biology, 27(1): 107–110.
- Mela M., Randi M.A.F., Ventura D.F., Carvalho C.E.V., Pelletier E. and Oliveira Ribeiro C.A. 2007.** Effects of dietary methyl mercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 68: 426–435.
- Mishra A.K. and Mohanty B. 2008.** Acute toxicity impacts of hexavalent chromium on behavior and histopathology of gill, kidney and liver of the freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). Environmental Toxicology and Pharmacology, 26: 136–141.
- Muthukumaravel K. and Rajaraman P. 2013.** A study on

- the toxicity of chromium on the histology of gill and liver of freshwater fish *Labeo rohita*. *Journal of Pure and Applied Zoology*, 1: 122–126.
- Oliveira Ribeiro C.A., Vollaire Y., Sanchez-Chardi A. and Roche H. 2005.** Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. *Aquatic Toxicology*, 74: 53–69.
- Olojo E.A.A., Olurin K.B., Mbaka G. and Oluwemimo A.D. 2005.** Histopathology of the gill and liver tissues of the African catfish, *Clarias gariepinus* exposed to lead. *African Journal of Biotechnology*. 4(1): 117–122.
- Patnaik B.B., Howrela H.J., Mathews T. and Selvanayagam M. 2011.** Histopathology of gill, liver, muscle and brain of *Cyprinus carpio communis* L. exposed to sublethal concentration of lead and cadmium. *African Journal of Biotechnology*, 10(57): 12218–12223.
- Perry S.F. and Laurent P. 1993.** Environmental effects on fish gill structure and function. P: 231–264. In: Rankim J.C. and Jensen F.B. (Eds.). *Fish Ecophysiology*. Chapman and Hall, London.
- Playle R.C., Gensemer R.W. and Dixon D.G. 1992.** Copper accumulation on gills of fathead minnows: Influence of water hardness, complexation and pH of the gill micro-environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11: 381–391.
- Rabitto I., Alves Costa J.R.M., Akaishi F.M., Silva de Assis H.C., Pelletier E. and Oliveira Ribeiro C.A. 2005.** Dietary Pb(II) and TBT (tributyltin) exposures to neotropical fish *Hoplias malabaricus*: Histopathological and biochemical findings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60: 147–156.
- Sadeghi P., Savari A., Movahedinia A., Safahieh A.R. and Ajdari D. 2014.** An assessment of haematological and biochemical responses in the tropical fish *Epinephelus stoliczkae* of Chabahar Bay and Gulf of Oman under chromium exposure: Ecological and experimental tests. *Environmental Science and Pollution Research*, 21: 6076–6088.
- Thophon S., Kruatrachue M., Upathan E.S., Pokethitiyook P., Sahaphong S. and Jarikhuan S. 2003.** Histopathological alterations of white seabass, *Latescal cariferin* acute and subchronic cadmium exposure. *Environmental Pollution*, 121: 307–320.
- Triebskorn R., Kohler H.R., Honnen W., Schramm M., Adams S.M. and Muller E.F.**

1997. Induction of heat shock proteins, changes in liver ultrastructure, and alterations of fish behaviour: Are these biomarkers related and are they useful to reflect the state of pollution in the field? *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 6: 57–73.
- Van Heerden D., Vosloo A. and Nikinmaa M. 2004.** Effects of short-term copper exposure on gill structure, metallothionein and hypoxia-inducible factor-1a (HIF-1a) levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 69: 271–280.
- Velma V. and Tchounwou P.B. 2010.** Chromium-induced biochemical, genotoxic and histopathologic effects in liver and kidney of goldfish, *Carassius auratus*. *Mutation Research*, 698: 43–51.
- Velma V., Vutukuru S.S. and Tchounwou P.B. 2009.** Ecotoxicology of hexavalent chromium in freshwater fish: A critical review. *Reviews on Environmental Health*, 24(2): 129–145.
- Velmurugan B., Selvanayagam M., Cengiz E.I. and Unlu E. 2007.** The effects of fenvalerate on different tissues of freshwater fish *Cirrhinus mrigala*. *Journal of Environmental Science and Health B*, 42(2): 157–163.
- Vutukuru S.S. 2005.** Acute effects of hexavalent chromium on survival, oxygen consumption, hematological parameters and some biochemical profiles of the Indian major carp, *Labeo rohita*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2: 456–462.



Histopathological study of gill and liver of Epaulet grouper (*Epinephelus stoliczkae*) under the chromium effect

Parvin Sadeghi^{1*}, Omid Koohkan²

Received: October 2015

Accepted: November 2015

Abstract

Histopathological changes as biomarkers in risk assessment of fish health are used in both laboratory and field environments. In this study, the histopathological lesions induced by sub-lethal concentrations of chromium was investigated in gill and liver of *Epinephelus stoliczkae* under laboratory conditions. For this purpose 200 number of *Epinephelus stoliczkae* with an average weight of 389.5 ± 92.4 g and the average total length of 29.6 ± 2.2 cm were exposed to three concentrations of 3.6, 7.31 and 14.6ppm of chromium for 21 days in the laboratory fixed conditions, and samples of gill and liver tissues were extracted in during 0.5, 1, 7, 14 and 21 days after start the experiment. Results of histopathological studies by light microscopy in the gill tissue were clubbing, hyperplasia, hyperemia and epithelial lifting of the lamellae, and in the liver tissue were necrosis, vacuolation, Irregular of hepatocytes, melanomacrophage centers and dilatation of liver sinusoids. Results of histopathological studies showed special relationship between chromium concentration and severity of lesion. The most severe lesion was observed at higher concentrations of chromium and longer duration of exposure, in the fish tissues.

Key words: *Histopathology, Gill, Liver, Epinephelus stoliczkae, Chromium.*

1- Assistant Professor in Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime and Marine Science University, Chabahar, Iran.

2- Scientific Member in Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime and Marine Science University, Chabahar, Iran.

*Corresponding Author: parvin.sadeghi@gmail.com