



غلظت کشندگی مخاط شقایق دریایی *Stichodactyla sp.* و خواص نفروتوکسیک آن در ماهی گورخری *Danio rerio*

مریم حامدی شهرکی^۱، صابر خدابنده^{۲*}، جعفر سیف آبادی^۲، شهلا همتی^۱

تاریخ دریافت: اسفند ۹۳

تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۹۴

چکیده

جهت بررسی غلظت کشندگی و اثرات نفروتوکسیک مخاط شقایق دریایی *Stichodactyla sp.* از ماهی گورخری *Danio rerio* به عنوان مدل استفاده شد. شقایق فرشی از نواحی جزرومدی جزیره هرمز جمع‌آوری و پس از انجماد در تانک نیتروژن (دمای °C -۱۶۰) به آزمایشگاه منتقل و مخاط صفحه دهانی آن جداسازی شد. غلظت کشندگی (LC_{50}^{96h}) مخاط برای ماهی گورخری ۱۷۵/۰۳ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد. سه غلظت (۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) از مخاط تهیه و به آکواریوم‌های ماهی گورخری اضافه شد. سپس تغییرات بافتی کلیه در ماهیان تیمار شده بعد از تهیه لام و رنگ‌آمیزی، با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شد. در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر، ماهیان در کم‌تر از ۲ ساعت تلف شد و آسیب‌های بافتی از جمله پرخونی، اتساع و نکروز کلاف گلومرولی و کاهش فضای بومن، تورم مویرگ‌های گلومرولی و ورود مایعات درون توبولی به فضای بینابینی دیده شد. ولی در دو غلظت ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر مرگ و میری رخ نداد و کمی افزایش حجم در کلاف گلومرولی مشاهده شد. نتایج نشان داد که مخاط این شقایق دریایی با آسیب رساندن به نفرون‌ها باعث مرگ ماهی گورخری می‌شد، همچنین میزان و شدت این آسیب‌ها با افزایش غلظت مخاط، بیش‌تر می‌شد.

واژگان کلیدی: *Stichodactyla*، نفروتوکسیک، *Danio rerio*، LC_{50}^{96h} ، بافت‌شناسی.

۱- کارشناس ارشد زیست‌شناسی دریا، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران.

۲- دانشیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران.

* نویسنده مسئول: skhoda@modares.ac.ir

مقدمه

بی‌مهرگان و سخت‌پوستان اثر سیتولیتیک^۱ دارند (Anderluh and Macek, 2002). در شقایق‌های فرشی تنناکول‌ها علاوه بر سم نماتوسیت، مقدار زیادی مخاط نیز ترشح می‌کنند (Marshall and Wright, 1993; Goldberg, 2002).

مطالعات Ravindran و همکاران (۲۰۱۰) نشان داد که ترکیبات موجود در مخاط شقایق دریایی *Anthopleura middori* باعث خونریزی در مغز، همولیز در قلب و کلیه و آسیب‌های شدید به سلول‌های هیپاتوسیت در موش می‌شود.

کلیه در ماهیان استخوانی اندامی ترکیبی متشکل از بافت خون‌ساز^۲، سلول‌های فاگوسیت کننده، غدد درون‌ریز و نفرون‌های دفعی است (Mumford et al., 2007; Menke et al., 2011). در ماهیان آب شیرین کلیه در حفظ نمک‌ها و دفع آب اضافی بدن نقش دارد که این امر با فیلتراسیون بالای گلومرولی، بازجذب نمک‌ها در توبول‌های پروگزیمال و رقیق شدن ادرار در توبول پیچ در پیچ دیستال انجام می‌گیرد (Mumford et al., 2007). لذا

جانوران ساکن محیط‌های دریایی از ترکیبات متفاوتی به عنوان مکانیسم‌های دفاعی استفاده می‌کنند. این زیست‌مندان منبعی استثنایی از ترکیبات زیست‌فعال هستند که خواص شیمیایی و ساختاری بسیاری از آن‌ها در خشکی‌زیان یافت نمی‌شود (Carte, 1996). این ترکیبات به منظور تولیدمثل، ارتباط، دفاع در برابر شکارچی، رقابت و سایر مکانیسم‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Kijjoa and Sawangwong, 2004). بیش‌تر این ترکیبات به عنوان سم شناخته می‌شوند. از جمله موجوداتی که توانایی تولید این ترکیبات را دارند می‌توان به شقایق‌های دریایی اشاره کرد. شقایق‌های دریایی (Cnidaria: Actinaria) از شکارچیان گزنده هستند که برای زنده ماندن وابستگی زیادی به این سموم زیستی دارند (Castaneda and Harvey, 2009). این آبزیان شکار خود را با استفاده از سلول‌هایی به نام نماتوسیت که مسئول ساخت، ذخیره و انتقال سم هستند به دام می‌اندازند (Moran et al., 2009). از جمله اثرات این سموم مسدود کردن کانال‌های سدیمی-پتاسیمی دریچه‌دار وابسته به ولتاژ است که در

1- Cytolytic

2- Hematopoietic Tissue

1996)، ولی روی مکانیسم احتمالی کشتن شکار مطالعات زیادی انجام نگرفته است، بنابراین در پژوهش حاضر آسیب رسیدن به نفرون‌های کلیوی در ماهی گورخری به عنوان مدل، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

نمونه‌برداری از گونه *Stichodactyla* sp. در بهمن ۱۳۹۲ در یک جزر کامل در ساحل شرقی جزیره هرمز در ایستگاه خضر نبی (۱ تا ۲۷ تا ۶ ۲۷ عرض شمالی و ۲۵ تا ۵۶ تا ۳۰ ۵۶ طول شرقی) انجام شد و شناسایی با استفاده از کلید شناسایی (Haussermann, 2004) صورت گرفت. سپس صفحه دهانی ۱۰ قطعه شقایق دریایی هم‌اندازه، بعد از برش با کاتر، جمع‌آوری و پس از قرار دادن در کیسه فریزر و نیترژن مایع (دمای 160°C -) به آزمایشگاه منتقل و در دمای 80°C - نگهداری شد. در زمان کار، مخاط صفحه دهانی شقایق‌های دریایی پس از یخ‌زدایی، به آرامی جداسازی شد.

آسیب رسیدن به این اندام می‌تواند سبب اختلال در سیستم هومئوستاز شده و عامل مرگ باشد.

کلیه در ماهیان استخوانی یکی از اولین اندام‌هایی است که تحت تأثیر ترکیبات خارجی و آلودگی‌ها قرار می‌گیرد (Thophon et al., 2003; Camargo et al., 2007). از آنجایی که کلیه یکی از مهم‌ترین اندام‌های بدن ماهیان در تنظیم یونی و حفظ هومئوستاز است (Evans, 2005) و نقش گسترده‌ای در دفع سموم دارد، همچنین اندام هدف در بسیاری از بیماری‌ها است و تمایل در به دام انداختن ذرات آنتی‌ژنی در گردش خون دارد، از این نظر اهمیت زیادی دارد. این عمل توسط تعداد زیادی سلول فاگوسیت موجود در سینوزوئیدهای کلیوی و مویرگ‌های دور توبول‌ها در بخش قدامی و خلفی کلیه انجام می‌شود (پوستی و صدیق مروستی، ۱۳۷۸). علاوه بر این، کلیه به عنوان اندام هدف برای بسیاری از مواد آلی بیگانه با سیستم بیولوژیکی ماهی و فلزات سنگین به شمار می‌رود.

اگرچه علت کشنده نبودن شقایق‌ها برای برخی دلفک ماهیان نسبت به سایر ماهیان از مدت‌ها پیش مورد توجه پژوهشگران بوده (Fautin, 1991; Elliot and Mariscal,)

تیماربندی

(مدل Microds 8402، ساخت شرکت دید سبز، ایران)، برش‌های ۴ میکرومتری تهیه شد. لام‌های به دست آمده در آون با دمای 24°C به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. سپس به روش هماتوکسیلین- ائوزین- گرین لایت رنگ‌آمیزی شده، با چسب هیستولوژی مونتاژ شدند و با میکروسکوپ نوری (مدل Nikon3200) مجهز به دوربین (Olympus DP72) مطالعه و عکس‌برداری شدند (Martoja and Martoja-Pierson, 1967;) Ghanizadeh Kazerouni and (Khodabandeh, 2010).

اندازه‌گیری غلظت کشنده‌گی (LC_{50})

برای به دست آوردن LC_{50} مخاط، ابتدا مقدار ۲ گرم از مخاط تر شقایق دریایی پس از توزین، در ۲ لیتر آب مخزن، به عنوان ذخیره اولیه تهیه شد و غلظت‌های مورد نظر (۱۲۰، ۱۳۰، ۱۴۰، ۱۵۰، ۱۶۰، ۱۷۰، ۱۸۰، ۱۹۰، ۲۰۰، ۲۱۰، ۲۲۰ و ۲۳۰ میلی‌گرم مخاط در لیتر آب) از آن ساخته و در بشرهای شیشه‌ای به حجم یک لیتر ریخته شدند. یک بشر پر از آب مخزن نیز به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد. به هر ظرف ۷ عدد بچه ماهی گورخری ۱۵ روزه به مدت ۹۶ ساعت معرفی

تعداد ۲۰۰ قطعه ماهی گورخری با میانگین وزن ۱/۵ گرم و طول ۲/۵ سانتی‌متر از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان تزئینی خریداری و به منظور سازگاری با شرایط آزمایشگاه به مدت دو هفته در آکواریوم‌های حاوی آب شهر هوادهی شده، نگهداری شدند. تیمار ماهی‌ها با مخاط شقایق دریایی در سه غلظت ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم مخاط در لیتر آب (با سه تکرار) صورت گرفت. ابتدا ۲ گرم از مخاط در ۲ لیتر آب مخزن (که از نظر شرایط فیزیوشیمیایی با آب آکواریوم‌ها یکسان بود) به عنوان ذخیره اولیه تهیه و غلظت‌های مورد نظر از آن ساخته شد. تیمار ماهیان در بشرهای شیشه‌ای ۱ لیتری حاوی ۷ ماهی صورت گرفت. ماهیان در حال مرگ و نمونه‌های شاهد پس از قطع ساقه‌ی دمی به مدت ۲۴ ساعت در بوئن تثبیت شدند. سپس ۴ ماهی تثبیت شده از هر گروه تیمار و شاهد به صورت تصادفی انتخاب و تا خروج کامل بوئن، در اتانول ۷۰٪ قرار داده شدند، سپس توسط اتانول ۸۰٪، ۹۰٪، ۱۰۰٪ و نهایتاً بوتانول آگیری شدند. نمونه‌ها پس از قرارگیری در محلول زایلن به مدت ۳ ساعت، با پارافین (Merck، کشور آلمان) قالب‌گیری شدند. از قالب‌ها با میکروتوم

تغییرات رفتاری ماهی گورخری پس از تیمار با غلظت‌های مختلف از مخاط شقایق دریایی در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر، ماهی‌ها بلافاصله پس از قرارگیری، گرفتار حرکات تشنجی شامل تغییر مسیرهای ناگهانی، افزایش حرکت و آمدن به سطح آب و شنای وارونه شدند. پس از مدتی از میزان حرکت ماهیان کاسته شد، کیفیت شنای آن‌ها کاهش یافت و سطوحی از بی‌تعادلی در ماهیان مشاهده شد. در نهایت ماهی‌ها از حالت افقی خارج و به صورت عمودی درآمدند، به طوری که سر در بالا و دم در پایین قرار گرفت. در نهایت ماهی‌ها به ته ظروف رفته و پس از مدتی لب زدن و تکان دادن باله‌ها جهت به‌دست آوردن تعادل، تمامی علائم حیاتی خود را از دست دادند. در ماهیان تیمار شده با مخاط در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر در کمتر از ۲ ساعت همگی تلف شدند. ولی ماهیان مورد آزمایش در غلظت‌های ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر از مخاط در مدت ۲۴ ساعت تیمار، مرگ و میری را نشان ندادند.

شد. محلول حاوی سم هر ۲۴ ساعت با محلول هم غلظت جایگزین شد. در هر بار جایگزین کردن محلول‌ها، ماهی‌های مرده نیز از داخل بشرها برداشته و شمرده شدند. بعد از ۹۶ ساعت تعداد کل ماهی‌های مرده در هر ظرف مشخص شد. در انتها با استفاده از اعداد به دست آمده و به کارگیری نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۶)، مقدار LC_{50} به روش پروبیت ولیو^۱ محاسبه شد (Finney, 1971).

نتایج

LC_{50} مخاط شقایق دریایی روی ماهی گورخری

با استفاده از میزان مرگ و میر در غلظت‌های مختلف مخاط شقایق دریایی، دوز کشندگی با استفاده از روش آماری پروبیت ولیو در نرم‌افزار SPSS تعیین شد و اعداد به دست آمده از آزمایش تحلیل شد. میزان LC_{50} مخاط بر روی ماهیان گورخری در روش نیمه پایدار (۹۶ ساعت) و حدود اطمینان بالا و پایین آن در جدول ۱ آمده است.

1- Probit Value

جدول ۱: میزان LC₅₀ و حدود بالا و پایین اطمینان (میلی گرم در لیتر) مخاط شقایق دریایی روی ماهی گورخری

LC ₅₀	حد اطمینان بالا	حد اطمینان پایین	زمان (ساعت)
۱۷۵/۰۳	۱۸۲/۶	۱۶۷/۵	۹۶

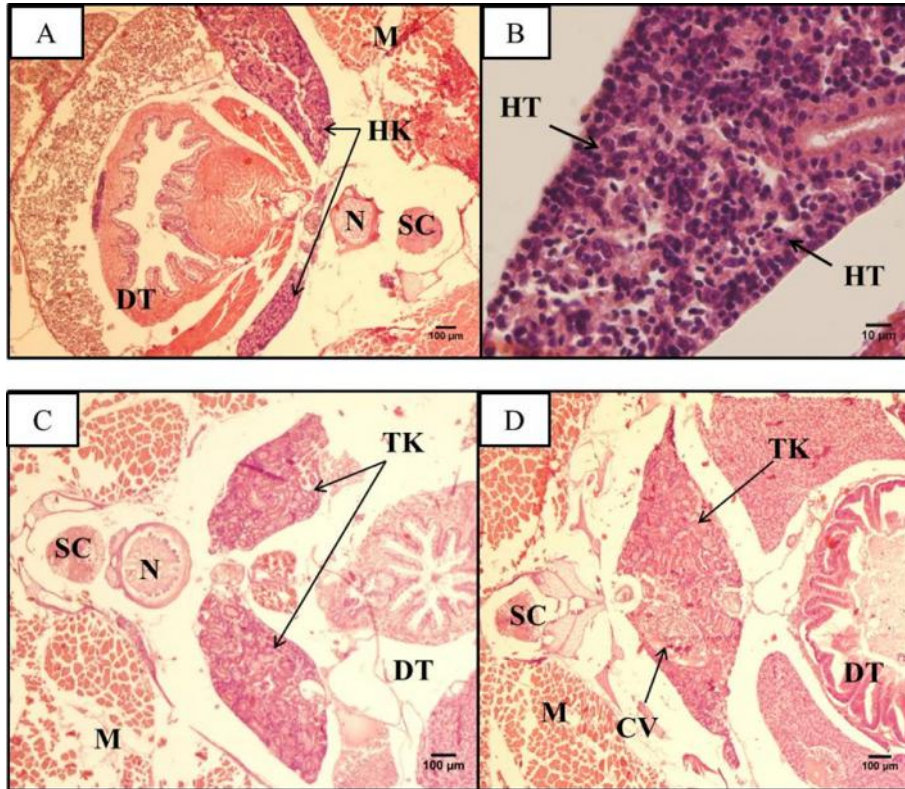
منظم و بیضی شکل در قسمت قاعده‌ای- مرکزی سلول قرار دارند. ارتفاع نوار مسواکی بلند است و در رنگ آمیزی H&E&G^۱ به رنگ تیره دیده می‌شوند (شکل‌های ۲B و ۲C). توبول دیستال سلول‌های اپیتلیال استوانه‌ای دارد، هسته آن‌ها تقریباً کروی و کوچک بوده، قاعده‌ای تا مرکزی است. نوار مسواکی رأسی کاهش یافته یا وجود ندارد (شکل ۲D).

ساختار کلیه در ماهی گورخری تیمار شده با غلظت‌های مختلف مخاط شقایق دریایی

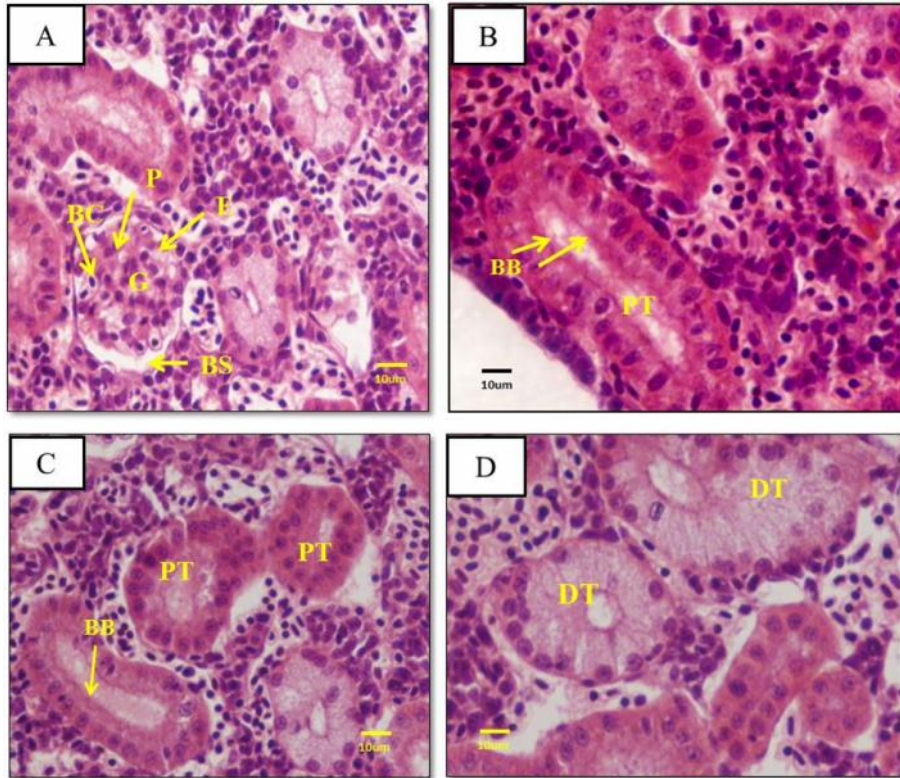
در ماهیان تیمار شده با غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر عوارضی همچون نکروز کلاف گلومرولی، متورم شدن پودوسیت‌ها (شکل ۳A)، اتساع کلاف گلومرولی و در نتیجه کاهش فضای بومن (شکل ۳B)، ورود مایعات درون توبولی به فضای میان‌بافتی و پرخونی مشاهده می‌شود (شکل‌های ۳C و ۳D).

نتایج بافت‌شناسی کلیه در ماهیان گروه شاهد
پیش از بررسی اثرات مخاط شقایق دریایی روی کلیه‌ی ماهی گورخری، ساختار کلیه در گروه شاهد بررسی شد. با بررسی برش‌های طولی و عرضی از کلیه مشاهده شد که این اندام از دو بخش رأسی و تنه تشکیل شده است. قسمت رأسی که اندکی بعد از سرپوش آبششی قرار گرفته، بخش کمی را به خود اختصاص داده است و کاملاً از هم جدا هستند (تصویر ۱A). این بخش کلیه از بافت خون‌ساز تشکیل شده است (شکل ۱B). بخش تنه‌ای کلیه‌ها نیز در ابتدا از هم جدا بوده، سپس به هم متصل شده و تا انتهای کلیه به هم وصل هستند (شکل‌های ۱C و ۱D).

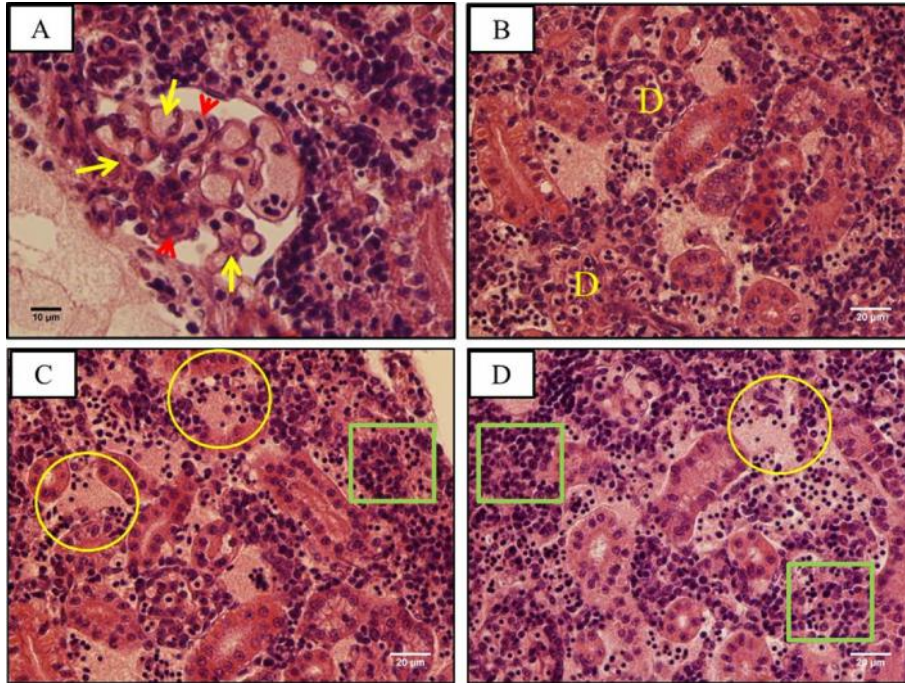
بخش تنه کلیه از تعداد زیادی نفرون گلومروله تشکیل شده است. گلومرول‌ها از سلول‌های اندوتلیال دیواره مویرگ‌های منشعب، پودوسیت‌ها یا سلول‌های اصلی سازنده گلومرول ساخته شده‌اند (شکل ۲A). در سلول‌های اپیتلیال پروگزیمال، هسته‌های



شکل ۱: برش عرضی از قسمت راسی و تنه کلیه ماهی گورخری (رنگ آمیزی به روش H&E&G). A: برش عرضی از قسمت قدامی کلیه. دو کلیه چپ و راست در قسمت ابتدایی سر کلیه کاملاً از هم جدا هستند. B: بافت خون‌ساز در برش عرضی از قسمت راسی کلیه. C: برش عرضی از ناحیه جلویی تنه کلیه که نشان می‌دهد دو کلیه در ناحیه ابتدایی تنه از هم جدا هستند. D: برش عرضی از ناحیه میانی تنه کلیه. کلیه‌ها در ناحیه میانی به هم متصل شده و این اتصال تا انتها حفظ می‌شود. CV: سیاهرگ اصلی (Cardinal Vein)، DT: حفره گوارشی (Digestive Tract)، HK: قسمت قدامی کلیه (Head Kidney)، HT: بافت خون‌ساز (Hematopoietic Tissue)، M: ماهیچه (Muscle)، N: طناب پشتی (Notochord)، SC: نخاع (Spinal Cord)، TH: قسمت تنه کلیه (Trunk Kidney).



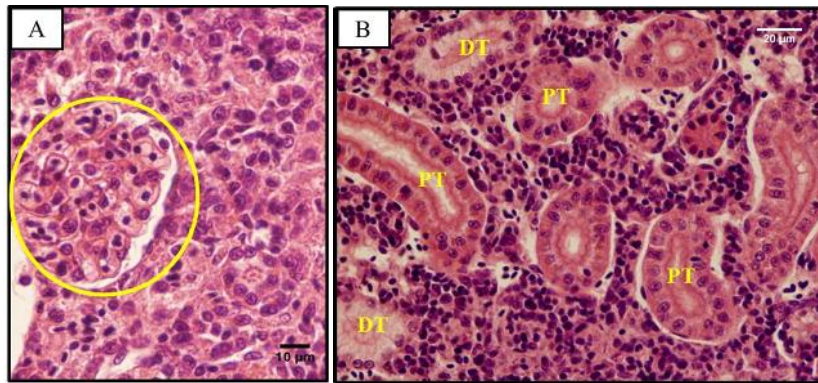
شکل ۲: شکل‌های بافت‌شناسی بخش تنه کلیه در گروه کنترل ماهی گورخری (رنگ‌آمیزی به روش H&E&G). A: ساختار گلومرول در نمونه شاهد که سلول‌های اندوتلیال دیواره رگ‌های خونی و سلول‌های پودوسیت به خوبی دیده می‌شوند. B و C: توبول پروگزیمال با هسته‌های منظم در قسمت قاعده‌ای-مرکزی سلول و نوار مسواکی رأسی قابل تشخیص است. D: توبول دیستال با سلول‌های اپیتلیال استوانه‌ای و هسته‌های کروی کاملاً قاعده‌ای قابل تشخیص است. BB: بخش مسواک مانند (Brush Border); BC: سلول خونی (Blood Cell); BS: فضای بومن (Bowman's Space); DT: توبول دیستال (Distal Tubule); E: سلول‌های اندوتلیال رگ‌های خونی (Endothelial Cells of Blood Vessel); G: گلومرول (Glomerulus); P: پودوسیت (Podocyte); PT: توبول پروگزیمال (Proximal Tubule).



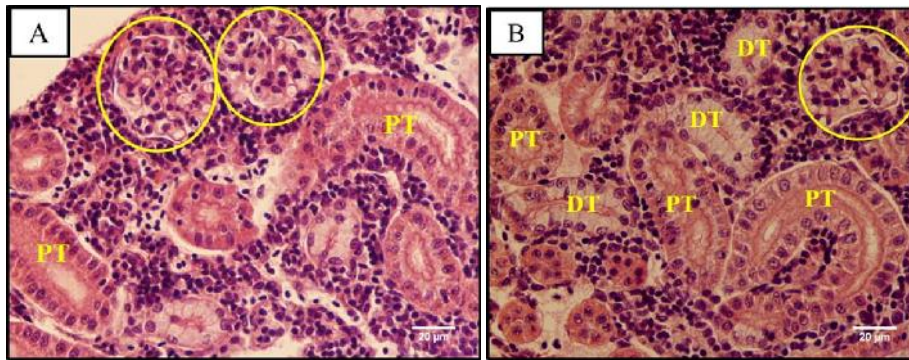
شکل ۳: برش عرضی بخش تنه کلیه در ماهی گورخری تیمار ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر شقایق دریایی (رنگ آمیزی به روش H&E&G). A: نکروز در قسمت کلاف گلومرولی (پیکان) و تورم پودوسیت‌ها (نوک پیکان) قابل مشاهده است. B: اتساع کلاف گلومرولی (D) که نتیجه آن کاهش فضای بومن است به وضوح قابل مشاهده است. C و D: پرخونی در نقاط مختلف از برش عرضی بافت بینابینی کلیه (مربع) و ورود مواد رسوبی به فضای بینابینی (دایره) قابل مشاهده است. D: تورم (Dilation).

در ماهیان تیمار شده با غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر ساختار کلی بافت کلیه تقریباً مشابه گروه شاهد بود. گلومرول‌ها تحت تأثیر مخاط شقایق کمی افزایش حجم یافته و فضای کپسول بومن کاهش یافته بود. در توبول‌های ادراری آسیب خاصی مشاهده نشد (شکل‌های ۵A و ۵B).

در ماهیان تیمار شده با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر، برخی گلومرول‌ها افزایش حجم یافته و فضای کپسول بومن کاهش یافته بود (شکل‌های ۴A و ۴B) ولی در ساختار کلی بافت کلیه آسیب خاصی در توبول‌های ادراری مشاهده نشد.



شکل ۴: برش عرضی تنه کلیه در ماهی گورخری تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر مخاط شقایق دریایی. A: اتساع کلاف گلومرولی که نتیجه آن کاهش فضای بومن است به وضوح قابل مشاهده است (دایره). B: توپول‌های کلیوی سالم و مشابه گروه کنترل بوده و آسیب خاصی در آن مشاهده نمی‌شود. DT: توپول دیستال (Distal Tubule)، PT: توپول پروگزیمال (Proximal Tubule).



شکل ۵: برش عرضی بافت کلیه در ماهیان گورخری تیمار شده با غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر از مخاط شقایق دریایی. A و B: اتساع کلاف گلومرولی که نتیجه آن کاهش فضای بومن است به وضوح قابل مشاهده است (دایره). ساختار کلی بافت کلیه تقریباً سالم و مشابه کلیه‌ی گروه شاهد است. توپول‌ها و بافت خون‌ساز سالم بوده و آسیب خاصی مشاهده نمی‌شود. DT: توپول دیستال (Distal Tubule)، PT: توپول پروگزیمال (Proximal Tubule).

بحث

در این بررسی، LC_{50}^{96h} مخاط صفحه دهانی *Stichodactyla* sp. روی بچه ماهی گورخری ۱۷۵/۰۳ میلی‌گرم در لیتر محاسبه شد. مطالعات متعددی در رابطه با اندازه‌گیری دز کشندگی (LD_{50}) به ویژه در موش و آبزیانی همچون میگو و خرچنگ انجام شده است، اما مطالعه‌ای درباره ماهیان صورت نگرفته است تا با نتایج حاضر قابل مقایسه باشد. در مطالعات مشابه، میزان LD_{50} دو ترکیب GigantoxinII و GigantoxinIII استخراجی از *Stichodactyla gigantea* در خرچنگ به ترتیب ۷۰ و ۱۲۰ میکروگرم کیلوگرم (Shiomi et al., 2002) و LD_{50} ترکیب PsTX-20A استخراج شده از *Phyllodiscus* sp. روی میگو ۵۰ میکروگرم در کیلوگرم (Nagai et al., 2002) گزارش شده است. همچنین LD_{50} سیتولیزین استخراجی از *Heteractis* sp. بر روی موش ۵۰ میکروگرم در کیلوگرم (Il'ina et al., 2005)، دوز کشندگی عصاره خام *S. haddoni* برای خرچنگ ۰/۴۷ میلی‌گرم در کیلوگرم، برای *S. mertensii* ۰/۷۱ میلی‌گرم در کیلوگرم و LC_{50} برای ناپلی میگوی آب شور *Artemia salina* ۰/۶۲۵ میلی‌گرم در

میلی‌لیتر و ۰/۸۵۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (Veeruraj et al., 2008) گزارش شده است. در پژوهش حاضر، تیمار ماهی گورخری با مخاط شقایق دریایی در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر در کم‌تر از ۲ ساعت منجر به مرگ ماهی شد، ولی در دو غلظت دیگر در تیمار ۲۴ ساعته تلفاتی مشاهده نشد. در تمام ماهیان تیمار شده قبل از مرگ علائمی مانند حرکات تشنجی، تغییر مسیرهای ناگهانی و بیرون پریدن از آب، افزایش حرکت، آمدن به سطح و شنای وارونه از خود نشان دادند که مدت و شدت این رفتارها بستگی به غلظت مخاط داشت. در پژوهش‌های پیشین، عصاره آبی مخاط و بافت هموزنه و پروتئین همولیتیک شقایق‌های دریایی *Entacmaea quadricolor* و *Heteractis magnifica* اثرات کشندگی قابل توجهی در ماهی آب شور *Dascyllus aruanus* و ماهی آب شیرین *Leuciscus idus* داشتند، به طوری که ماهیان حتی در غلظت‌های خیلی رقیق از این سم نیز در کم‌تر از ۲ ساعت همگی تلف شدند (Mebs, 1994). علاوه بر موارد ذکر شده، اشاره شده است که عصاره شقایق‌های دریایی *Stichodactyla* و *Stichodactyla gigantea* باعث انقباض شدید زوائد حرکتی

بومن، تورم مویرگ‌های گلوبروولی و ورود مواد رسوبی به فضای بینابینی نیز دیده شد، ولی در دو غلظت دیگر مرگ و میری رخ نداد و کمی افزایش حجم در کلاف گلوبروولی مشاهده شد. بیش‌ترین آسیب‌های بافتی کلیه ماهیان در معرض سموم و آب‌های آلوده، شامل دژنره شدن توبول‌ها (Cloudy Swelling) یا تورم ابری) و تغییر در جسم کلیوی شامل اتساع مویرگ‌ها در گلوبروول و کاهش فضای بومن گزارش شده است (Iqbal et al., 2004).

از آن جایی که آبشش رابط بین محیط داخلی و خارجی ماهی بوده و مهم‌ترین جایگاه تبادل یونی بین بدن و محیط به شمار می‌رود، نقش مهمی در ثابت نگه‌داشتن ترکیب یونی درون بدن به ویژه در مواجهه با محیط‌های آلوده دارند (Evans et al., 2005). احتمالاً چسبندگی تیغه‌های آبششی به یکدیگر در معرض سموم به دلیل انعقاد مخاط سطح سلول‌های آبشش از طریق تغییر در ترکیب گلیکوپروتئین آن رخ می‌دهد (Schreck and Moyle, 1990)، بنابراین حذف لایه مخاطی آبشش و به دنبال آن تخریب سلول‌های پوششی آن باعث هدررفت بیش‌تر یون از طریق آبشش و هجوم بیش‌تر آب به خون و در نتیجه افزایش حجم خون می‌شود. این افزایش

و تشنج قوی روی خرچنگ ساحلی *Ocypode macrocera* می‌شود (Bragadeeswaran, Thangaraj and 2012).

به طور کلی در مطالعات محدودی که روی اثرات سموم شقایق دریایی روی آبشش ماهیان انجام شده، به اثر سیتولیزین‌های موجود در مخاط که سبب تشکیل منفذ در غشاهای پوششی لاملاها می‌شوند و نیز به سموم عصبی که باعث بلوکه شدن کانال‌های وابسته به ولتاژ می‌شوند، اشاره شده و علت اصلی مرگ ماهیان تشخیص داده شده است (Mebs, 1994). همچنین بر مهلک بودن فسفولیپازها و سیتولیزین‌ها در مخاط شقایق‌ها به عنوان یکی از عوامل مرگ ماهیان شکار شده اشاره شده است (Frazao et al., 2012). علاوه بر این، سموم عصبی موجود در مخاط شقایق‌های دریایی که شامل سموم کانال‌های سدیمی-پتاسیمی وابسته به ولتاژ هستند، می‌تواند باعث فلجی و در نهایت مرگ ماهی‌ها شود (Anderluh and Macek, 2002).

بررسی اثرات مخاط شقایق دریایی نشان داد که در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر، علاوه بر تلف شدن ماهیان در کم‌تر از ۲ ساعت، آسیب‌های بافتی از جمله پرخونی، اتساع و نکروز کلاف گلوبروولی و کاهش فضای

بررسی اثرات عصاره خام از کل بافت سه گونه شقایق دریایی روی اندام‌های مختلف موش از جمله کلیه، آسیب‌های کلیوی مشاهده شد (Ravindran et al., 2010). همچنین طی پژوهشی سم Gigantoxin-4 استخراجی از *S. gigantea* آسیب‌های بافتی متعدد از جمله کیست‌های پراکنده را در کلیه نشان داد (Hu et al., 2011).

افزایش حجم گلومرول و کاهش فضای بومن از دیگر آسیب‌های عمده مشاهده شده در این پژوهش است. از آنجا که کلیه اندامی است که در سرتاسر آن حجم زیادی از خون جریان دارد، ترکیبات خارجی موجود در خون می‌توانند برخی تغییرات پاتولوژیکی از جمله تکثیر و ازدیاد سلول‌های اپیتلیال و ضخیم شدن لامینای پایه و در نتیجه کاهش فضای بومن را سبب شوند (Silva and Martinez, 2007).

در مطالعه حاضر، نمونه‌های قرار گرفته در معرض غلظت‌های ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر مخاط، تغییرات اندکی را در بافت کلیه نشان دادند و ساختار کلی بافت، توپول‌ها و بافت خون‌ساز آن‌ها تقریباً سالم و مشابه کلیه گروه شاهد بوده و آسیب خاصی مشاهده نشد. این نشان می‌دهد که کلیه به دلیل آن که به

حجم خون باعث افزایش میزان خون ورودی به کلیه‌ها جهت دفع آب اضافی شده، که این امر خود باعث افزایش حجم کلاف مویرگی و گاهی پارگی مویرگ‌ها و کلاف مویرگی و نیز افزایش مایع میان‌بافتی می‌شود.

سلول‌های اپیتلیوم توپولی کلیه به علت نقش دفع‌کننده مواد و سموم خارجی و از طرف دیگر به دلیل ویژگی‌های ترکیبات تشکیل‌دهنده مخاط شقایق دریایی، در غلظت‌های بالا در برابر مخاط آسیب‌پذیر هستند، زیرا به دلیل وجود فسفولیپاز A2 و خاصیت سیتولیزینی، مخاط (Mebs et al., 1992) به راحتی در غشای دو لایه سلول حل شده، از آن عبور می‌کند و به درون سلول زنده راه می‌یابد. آسیب‌های سلولی ممکن است باعث کاهش سطح ATP داخل سلول شود و با اختلال در عملکرد پمپ کاتیونی سلول سبب نفوذ یون‌های سدیم، کلر و کلسیم و آب به داخل سلول شده که افزایش حجم سلول و آسیب به غشای سلول را به دنبال خواهد داشت و باعث ترشح پتاسیم، آنزیم و پروتئین به خارج سلول می‌شود (Silva and Martinez, 2007). در مورد آسیب‌های بافت‌شناسی سموم شقایق دریایی، بیش‌تر مطالعات روی موش انجام گرفته است. در

قرار گرفته در معرض کادمیوم، مشاهده شد (Thophon et al., 2003).

بررسی نتایج مطالعه حاضر و مقایسه آن با نتایج سایر پژوهشگران نشان می‌دهد که ماهی گورخری نسبت به مخاط شقایق دریایی حساس است و با قرار گرفتن در معرض غلظت‌های مختلف، به دلیل آسیب‌های بافتی ایجاد شده توان حفظ هومئوستازی را ندارد و تلف می‌شود. علائم نشان می‌دهد که ماهی گورخری بیش از حد نرمال مورد هجوم آب و از دست دادن یون قرار گرفته است، بنابراین وظیفه کلیه چند برابر شده و آسیب‌هایی در آن ایجاد می‌شود. نتایج نشان داد مخاط شقایق دریایی *Stichodactyla* sp. با آسیب رساندن به نفرون‌ها باعث مرگ ماهی گورخری می‌شود، همچنین میزان و شدت این آسیب‌ها با افزایش غلظت مخاط بیش‌تر می‌شود. به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که اثرات نفروتوکسیک مخاط شقایق‌های دریایی در محیط طبیعی خود می‌تواند یکی از روش‌های از پا درآوردن شکار از جمله ماهیان صید شده، باشد.

طور مستقیم در معرض آلاینده‌ها نیست در غلظت‌های پایین آسیب نمی‌پذیرد. در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر، آسیب‌ها شامل پرخونی، اتساع و نکروز کلاف گلومرولی و کاهش فضای بومن، تورم مویرگ‌های گلومرولی و ورود مواد رسوبی به فضای بینابینی بود، این امر نشان می‌دهد که با افزایش غلظت مخاط، بافت کلیه دچار آسیب‌های گسترده‌تری می‌شود.

آسیب‌های مشاهده شده در این مطالعه مشابه آسیب‌های گزارش شده ناشی از اثرات برخی آلاینده‌ها مانند حشره‌کش‌ها و فلزات سنگین مانند کادمیوم و جیوه بود. در پژوهشی در مورد اثرات کشندگی و هیستوپاتولوژیک ناشی از آفت‌کش آندوسولفان در ماهی کپور معمولی، پرخونی در عروق خونی و کلاف مویرگی، تورم در بافت بینابینی کلیه و نکروز در لوله‌های ادراری گزارش شده است (شریف‌پور و همکاران، ۱۳۸۴). پدیده تورم ابری به همراه هسته‌های پیکنوتیک و دژنراسانس قطرات هیالین در سلول‌های اپیتلیالی توبول‌ها در کلیه ماهی باس دریایی

منابع

- از سم آندوسولفان در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). مجله منابع طبیعی ایران، ۵۸(۲): ۳۸۲-۳۷۳.
- پوستی ا. و صدیق مروستی س.ع. ۱۳۷۸. اطلس بافت‌شناسی ماهی. موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. ۳۲۸ص.
- شریف‌پور ع.، سلطانی م. و فتح‌الهی ب. ۱۳۸۴. مطالعه آثار کشتگی و هیستوپاتولوژیک ناشی
- Anderluh G. and Macek P. 2002.** Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). *Toxicon*, 40(2): 111-124.
- Camargo M.M. and Martinez C.B. 2007.** Histopathology of gills, kidney and liver of a neotropical fish caged in an urban stream. *Neotropical Ichthyology*, 5(3): 327-336.
- Carte B.K. 1996.** Biomedical potential of marine natural products. *Bioscience*, 46(4): 271-286.
- Castaneda O. and Harvey A.L. 2009.** Discovery and characterization of cnidarian peptide toxins that affect neuronal potassium ion channels. *Toxicon*, 54(8): 1119-1124.
- Elliott J.K. and Mariscal R.N. 1996.** Ontogenetic and interspecific variation in the protection of anemone fishes from sea anemones. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 208(1): 57-72.
- Evans D.H., Piermarini P.M. and Choe K.P. 2005.** The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological Reviews*, 85(1): 97-177.
- Fautin D.G. 1991.** The anemonefish symbiosis: What is known and what is not. *Symbiosis*, 10: 23-46.
- Finney D.J. 1971.** Probit analysis. Univ. Press, Cambridge. 333P.
- Frazao B., Vasconcelos V. and Antunes A. 2012.** Sea anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) toxins: An overview. *Marine Drugs*, 10(8): 1812-1851.
- Ghanizadeh Kazerouni E. and Khodabandeh S. 2010.** Effects of ultraviolet radiation on skin structure and ultrastructure in Caspian Sea salmon, *Salmo trutta caspius*, during alevin stage. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 92 (5): 903-914.
- Goldberg W.M. 2002.** Feeding behavior, epidermal structure and mucus cytochemistry of the

- scleractinian *Mycetophyllia reesi*, a coral without tentacles. *Tissue and Cell*, 34: 232–245.
- Haussermann V. 2004.** Identification and taxonomy of soft-bodied hexacorals exemplified by Chilean Sea anemones; including guidelines for sampling, preservation and examination. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 84(05): 931–936.
- Holden J.A., Layfield L.L. and Matthews J.L. 2013.** The Zebrafish: Atlas of Macroscopic and Microscopic Anatomy. Cambridge University Press. 154P.
- Hu B., Guo W., Wang L.H., Wang J.G., Liu X.Y. and Jiao B.H. 2011.** Purification and characterization of Gigantoxin-4. A new actinoporin from the sea anemone *Stichodactyla gigantea*. *International Journal of Biological Sciences*, 7(6): 729–739.
- Il'ina A.P., Monastyrnaya M.M., Isaeva M.P., Guzev K.V., Rasskazov V.A. and Kozlovskaya E.P. 2005.** Primary structures of actinoporins from sea anemone *Oulactis orientalis*. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 31(4): 320–324.
- Iqbal F., Zia Qureshi I. and Ali M. 2004.** Histopathological changes in the kidney of common carp, *Cyprinus Carpio*, following nitrate exposure. *Journal of Research (Science)*, 15(4): 411–418.
- Kijjoo A. and Sawangwong P. 2004.** Drugs and cosmetics from the sea. *Marine Drugs*, 2: 73–82.
- Marshall A.T. and Wright O.P. 1993.** Confocal laser scanning light microscopy of the extra-thecal epithelia of undecalcified scleractinian corals. *Cell Tissue Research*, 272: 533–543.
- Martoja R. and Martoja-Pierson M. 1967.** Initiation aux techniques de l histologie animale. Masson et Cie, Paris. 345P.
- Mebis D. 1994.** Anemonefish symbiosis: Vulnerability and resistance of fish to the toxin of the sea anemone. *Toxicon*, 32(9): 1059–1068.
- Mebis D., Claus I., Schroter A., Takeya H. and Iwanga S. 1992.** Hemolytic proteins from sea anemones. *Recent Advances in Toxinology Research*, 2: 392–395.
- Menke A.L., Spitsbergen J.M., Wolterbeek A.P. and Woutersen R.A. 2011.** Normal anatomy and histology of the adult zebrafish. *Toxicologic Pathology*, 39(5): 759–775.
- Moran Y., Gordon D., and Gurevitz M. 2009.** Sea anemone toxins affecting voltage-gated sodium channels—molecular and evolutionary features. *Toxicon*, 54(8): 1089–1101.

- Mumford S., Heidel J., Smith C., Morrison J., Macconnell B. and Blazer V. 2007.** Fish histology and histopathology manual. U.S. Fish and Wildlife Service, National Conservation Training Center. 357P.
- Nagai H., Oshiro N., Takuwa-Kuroda K., Iwanag S., Nozaki M. and Nakajima T. 2002.** A new polypeptide toxin from the nematocyst venom of an Okinawan sea anemone *Phyllodiscus semoni* (Japanese Name “unbachi- isoginchaku”). Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 66(12): 2621–2625.
- Ravindran V., Kanan L. and Venkateshvaran K.V. 2010.** Biological activity of sea anemone proteins: Toxicity and histopathology. Indian Journal of Experimental Biology, 47: 1225–1232.
- Schreck C.B. and Moyle P.B. 1990.** Methods for fish biology. American Fisheries Society, Bethesda. 684P.
- Shiomi K., Honma T., Ide M., Nagashima Y., Ishida M. and Chino M. 2003.** An epidermal growth factor-like toxin and two sodium channel toxins from the sea anemone *Stichodactyla gigantea*. Toxicon, 41(2): 229–236.
- Silva A. and Martinez C. 2007.** Morphological changes in the kidney of a fish living in an urban stream. Environmental Toxicology and Pharmacology, 23: 185–192.
- Thangaraj S. and Bragadeeswaran S. 2012.** Assessment of biomedical and pharmacological activities of sea anemones *Stichodactyla mertensii* and *Stichodactyla gigantea* from Gulf of Mannar biosphere reserve, southeast coast of India. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, 18(1): 53–61.
- Thophon S., Kruatrachue M., Upatham E.S., Pokethitiyook P., Sahaphong S. and Jaritkhuan S. 2003.** Histopathological alterations of white sea bass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. Environmental Pollution, 121(3): 307–320.
- Veeruraj A., Arumugam M., Ajithkumar T. and Balasubramanian T. 2008.** Isolation and biological properties of neurotoxin from sea anemone (*Stichodactyla mertensii*, *S. haddoni*). Internet Journal of Toxicology, 5(2): 400–407.



Lethal concentration and nephrotoxic effects of mucus of sea anemone, *Stichodactyla* sp., on the zebra fish, *Danio rerio*

Maryam Hamed Shahraki¹, Saber Khodabandeh^{2*}, Jafar Seyfabadi²,
Shahla Hemmati¹

Received: March 2015

Accepted: April 2015

Abstract

The lethal concentration and nephrotoxic effects of sea anemone, *Stichodactyla* sp., mucus on zebra fish, *Danio rerio* were examined. Sea carpet was collected from an intertidal zone of the Hormoz Island, frozen in nitrogen tank (-160°C), and transported to the laboratory to have its mucus isolated. The lethal concentration (LC_{50}^{96h}) of mucus for the fish, determined as 175.03 mg/L. Three concentrations of mucus (250, 500, 1000 mg/L) were made and added to the fish aquaria. Then, the histological changes of the fish kidney were examined. In 1000 mg/L, the fish was killed in less than 2h and pathologic lesions of the kidney were evident, including congestion, enlargement and necrosis of the glomerulus, reduction of Bowman's space, fluids inside tubular and glomerular capillaries inflation in interstitial space, but in 500 and 250 mg/L, no death were observed and a slight increase in glomerular volume was observed. Results showed that mucus of the sea anemone could be harmful and even lethal to the zebra fish by damaging its kidney, the severity of which depended on its concentration.

Key words: *Stichodactyla* sp., *Nephrotoxic*, *Danio rerio*, LC_{50}^{96h} , *Histology*.

1- M.Sc.in Marin Biology, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science, Tarbiat Modarres University, Noor, Mazandaran, Iran.

2- Associated Professor in Marin Biology Department, Faculty of Marine Science, Tarbiat Modares University, Noor, Mazandaran, Iran.

*Corresponding Author: skhoda@modares.ac.ir