

تغییرات ساختار آبشش ماهی طلایی (*Carassius auratus*) در مواجهه نیمه مزمین به آلاینده‌های آلی

مریم اقدامی^{۱*}، شهربانو عریان^۲، فاطمه نظر حقیقی^۳

۱- کارشناس ارشد زیست دریا، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران

۲- دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه خوارزمی، تهران

۳- دانشجوی دکتری زیست دریا، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران

چکیده

آلاینده‌های آلی گروه بزرگی از آلاینده‌ها هستند که موجب ایجاد تغییرات هیستوپاتولوژیکی در آبزیان می‌شوند. این تغییرات به نوبه خود می‌توانند به عنوان شاخصی جهت بررسی اثرات آلاینده‌های مختلف انسانی در جانوران آبی، استفاده شوند و بازتابی از سلامت عمومی کل جمعیت اکوسیستم باشند. این مطالعه به ارزیابی کلی تغییرات پاتولوژیکی آبشش ماهی طلایی در مواجهه با آلاینده‌های نفتالن، بیس فنل A و بوتاکلر پرداخته است. بدین منظور ماهیان به مدت ۱۵ روز در معرض بیس فنل ۹۹٪ به میزان ۵۰۰ µg/l و بوتاکلر ۶۰٪ به میزان ۰/۲۸ µl/l قرار داده شدند. سپس کمان دوم آبششی آن‌ها جدا شد. از بافت‌های فیکس شده در بوئن پس از طی مراحل معمول بافت شناسی، برش‌های ۶ میکرونی تهیه و به روش هماتوکسیلین-ائوزین رنگ‌آمیزی شد. مشاهده بافت‌ها با میکروسکوپ نوری تغییرات پاتولوژیکی از جمله خمیدگی تیغه ثانویه، اتساع مویرگ‌های لاملائی، به هم چسبیدن کامل لاملاها، دژنره شدن اپیتلیوم رشته‌های اولیه و تیغه‌های ثانویه را در آبشش نشان داد. به نظر می‌رسد تغییرات ایجاد شده در آبشش‌ها جهت ایجاد سد دفاعی برای جلوگیری از ورود بیش‌تر آلاینده به بدن ماهی صورت گرفته باشد.

واژگان کلیدی: هیستوپاتولوژی، ماهی طلایی، آبشش، آلاینده‌های آلی.

مقدمه

آلاینده‌های آلی گروه بزرگی از ترکیبات شیمیایی هستند که وارد اکوسیستم‌های آبی می‌شوند. این مواد که در اثر فعالیت‌های صنعتی، کشاورزی و شهری بشر تولید می‌شوند، در غلظت‌های زیر کشنده، موجب بروز تغییرات هیستوپاتولوژیکی در آبزیان می‌شوند (Das and Konar., 1990). کاربرد هیستوپاتولوژی ماهی، بخش اصلی بیومارکرهای مورد استفاده در برنامه‌های پایش اکوسیستم‌های آبی است. این تکنیک وسیله‌ای برای شناسایی اثرات حاد و مزمن آلاینده‌های گوناگون در مواجهه با بافت‌ها و ارگان‌های خاص است (Gernhofer et al., 2001). موقعیت آبشش‌ها به عنوان یک اندام خارجی موجب می‌شود تا آن‌ها به عنوان اندام هدف اولیه آلاینده‌ها محسوب شوند. اثرات هیستوپاتولوژیکی به عنوان سطح بالاتری از پاسخ، منعکس کننده تغییر اولیه در عملکرد فیزیولوژیکی و یا بیوشیمیایی هستند. به همین دلیل آسیب‌های وارده به آبشش با اختلال تنفسی، نارسایی تنظیم اسمزی و یونی و غیره همراه است. این اختلالات به نوبه خود زنگ خطری برای سلامت ماهیان به حساب می‌آید و می‌تواند بر تداوم حیات آن‌ها آثار مخربی بگذارد (Smith et al., 2007). نظر به این که مطالعات بافت شناسی ابزاری مفید برای ارزیابی درجه آلودگی در شرایط مزمن است و همچنین با توجه به این که غلظت‌های زیر کشنده در کوتاه مدت منجر به مرگ ماهی نمی‌شود بلکه با ایجاد آسیب‌های خاص، زنده ماندن در شرایط تغییر یافته را برای ماهی ممکن می‌سازد، در این پژوهش به بررسی دوز مشخصی از آلاینده‌های آلی (بوتاکلر، بیس فنل A و نفتالن) بر بافت هدف آبشش پرداخته شده است.

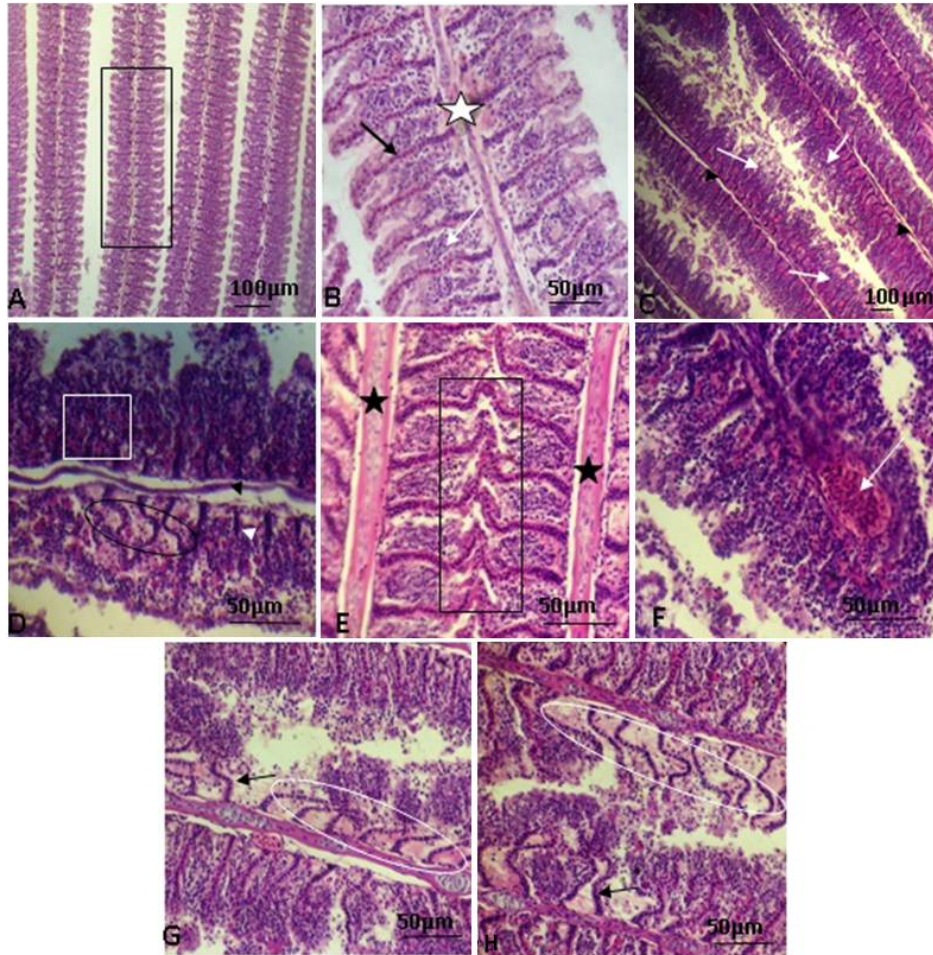
مواد و روش‌ها

جهت انجام این مطالعه، نمونه‌گیری از ماهی طلایی در مرداد ۱۳۹۱ از یک استخر پرورشی در حومه رشت انجام گرفت و نمونه‌های ماهی (وزن $100/97 \pm 31/47$ g و طول $19/14 \pm 2/23$ cm) به آکواریوم‌های ۷۰ لیتری حاوی آب چاه در آزمایشگاه زیست‌شناسی دریا دانشکده علوم دانشگاه گیلان انتقال یافتند. تعداد نمونه‌ها در هر آکواریوم ۱۲-۱۰ قطعه و آب آکواریوم‌ها هر سه روز یک‌بار تعویض و ماهی‌ها توسط غذای آماده تغذیه می‌شدند. طی دوره آزمایش دما ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) و pH هر روز کنترل شدند. بعد از سازگاری نمونه‌ها با شرایط آزمایشگاهی به آکواریوم منتقل شدند. در این آزمایش تیمارها طی مدت ۱۵ روز به ۳ آکواریوم حاوی ماهی طلایی اضافه شدند. بدین

ترتیب که بیس فنل ۹۹٪ به میزان $500 \mu\text{g/l}$ پس از حل شدن در اتانول (Lv et al., 2007)، نفتالن به میزان $200 \mu\text{g/l}$ پس از حل شدن در اتانول (Pollino et al., 2009) و بوتاکلر ۶۰٪ به میزان $28 \mu\text{l/l}$ (Wany et al., 1992) به آکواریوم‌ها اضافه شدند. لازم به ذکر است که هم‌زمان با تعویض آب، هر سه روز یک‌بار، مقادیر فوق مجدداً به محیط آکواریومی اضافه می‌شدند. به منظور بررسی‌های بافتی، کمان دوم آبششی هر ماهی برداشته شد و در محلول بوئن به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت فیکس شد. سپس نمونه‌ها تا انجام سایر مراحل بافت‌شناسی به الکل ۷۰٪ منتقل گردید. از قطعات ۲-۳ سانتی‌متری بافت‌های فیکس شده، پس از انجام مراحل معمول بافت‌شناسی (آبگیری، شفاف‌سازی، نفوذ پارافین، قالب‌گیری) برش‌هایی با ضخامت ۶ میکرون تهیه و با روش هماتوکسیلین-ائوزین رنگ‌آمیزی شد. اسلایدهای تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی و به کمک دوربین دیجیتال عکس برداری شد.

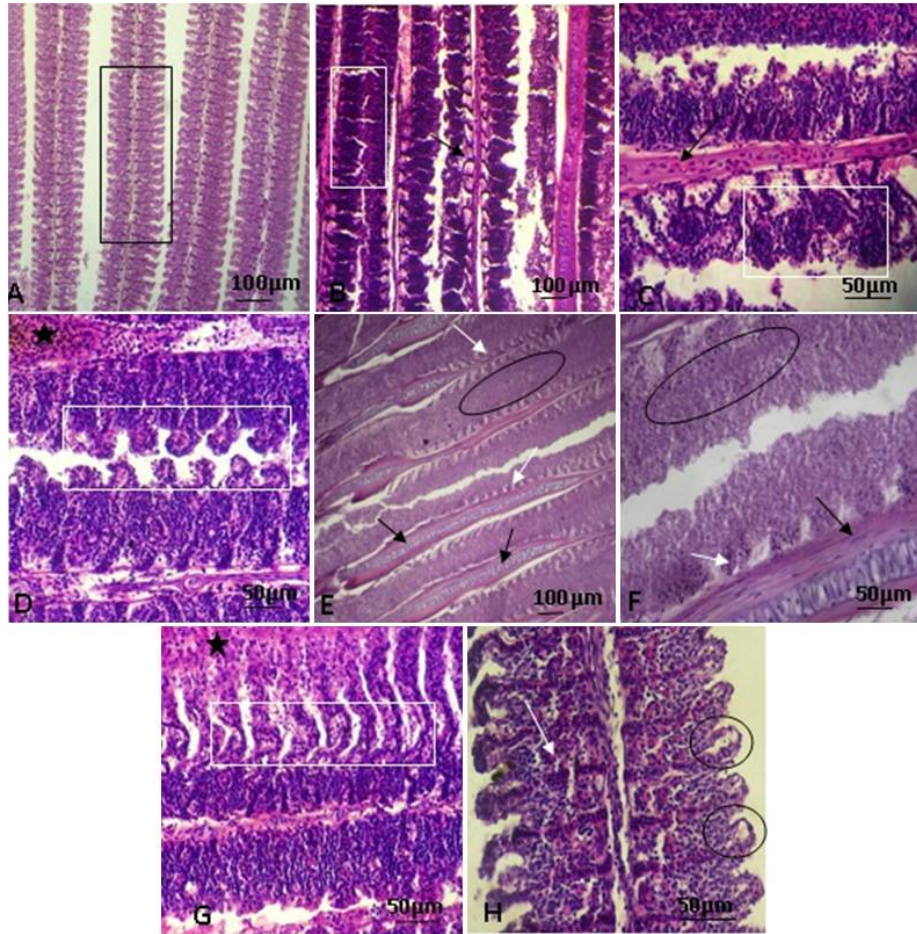
نتایج

بررسی اسلایدهای بافتی، بروز عوارض متعددی را در بافت آبشش ماهی طلایی در نتیجه تیمار با هر سه آلاینده نشان داد. اشکال ۱ تا ۳ نشان دهنده تغییرات هیستوپاتولوژیکی آبشش هستند. در شکل ۱ تغییرات هیستوپاتولوژیکی آبشش ماهی طلایی در مواجهه با نفتالن قابل مشاهده است. شکل‌های ۱A و ۱B ساختار طبیعی آبشش را نشان می‌دهد. دژنراتیو و نکروز شدید اپیتلیوم تیغه‌های ثانویه، جدا شدن اپیتلیوم از غشای پایه، خمیدگی تیغه‌ها، هایپرپلازی و تکثیر بی‌رویه اپیتلیوم تیغه‌ها، به هم چسبیدن تیغه‌های مجاور، اتساع رگ‌های خونی، پر خونی فیلامنت‌های آبششی از عوارضی این مواجهه هستند (شکل ۱، C تا H). گریزی شدن سر تیغه‌های ثانویه، اتساع رگ‌های خونی فیلامنت‌های آبششی، پر خونی، دژنراتیو و نکروز شدید تیغه‌های ثانویه، آتروفی و تحلیل تیغه‌های ثانویه، خمیدگی تیغه‌های ثانویه، خون ریزی فیلامنت‌های آبششی، تکثیر اپیتلیوم تیغه‌های ثانویه، از بین رفتن اپیتلیوم تیغه‌ها، جدا شدن اپیتلیوم از غشای پایه تیغه‌های ثانویه از جمله آسیب‌های مشاهده شده در آبشش در مواجهه با بوتاکلر است (شکل ۲، B تا H). خمیدگی تیغه‌های ثانویه، نکروز شدید اپیتلیوم تیغه‌های ثانویه، آتروفی تیغه‌ها، اتساع رگ‌های خونی نیز از جمله عوارض مشاهده شده در آبشش در مواجهه با بیس فنل A است (شکل ۳، B تا F).



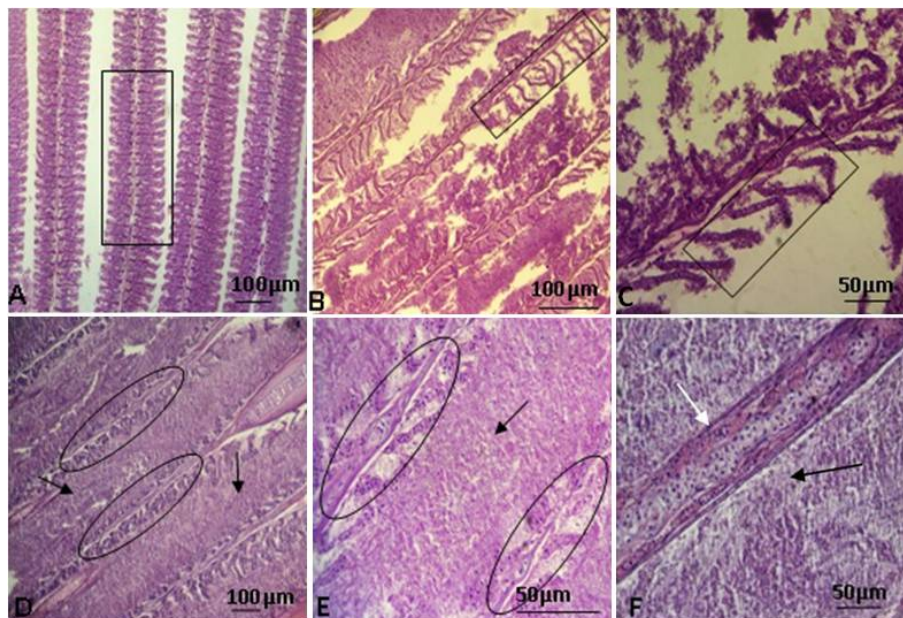
شکل ۱: تغییرات هیستوپاتولوژیکی آبشش ماهی طلایی در مواجهه با نفتالن. A و B: آبشش نرمال ماهی. A: بخشی از یک رشته آبششی همراه با تیغه‌های ثانویه آن (مستطیل سیاه). B: اپیتلیوم تیغه‌های ثانویه (پیکان سفید)، سلول‌های پیلار تیغه‌های ثانویه (پیکان سیاه)، رگ‌های خونی فیلامنت‌های آبششی (ستاره سفید). C: دژنراتیو و نکروز شدید اپیتلیوم تیغه‌های ثانویه (پیکان سفید)، جدا شدن اپیتلیوم از غشای پایه (سر پیکان سیاه). D: خمیدگی تیغه‌های ثانویه (بیضی سیاه)، تکثیر بی‌رویه اپیتلیوم تیغه‌ها (مربع سفید)، تحلیل واز بین رفتن تیغه‌های ثانویه (سر پیکان سفید)، جدا شدن اپیتلیوم از غشای پایه (سر پیکان سیاه). E: هایپرپلازی اپیتلیوم تیغه‌ها و هم چسبیدن متعاقب تیغه‌های مجاور (مستطیل سیاه)، اتساع رگ‌های خونی (ستاره سیاه). F:

پر خونی فیلامنت‌های آبششی (پیکان سفید). **G** و **H**: خمیدگی تیغه‌های ثانویه (بیضی سفید)، از بین رفتن اپیتلیوم تیغه‌های ثانویه (پیکان سیاه).



شکل ۲: تغییرات هیستوپاتولوژیکی آبشش ماهی طلایی در مواجهه با پوتاکلر. **A**: آبشش نرمال ماهی طلایی. بخشی از یک رشته آبششی همراه با تیغه‌های ثانویه آن (مستطیل سیاه). **B**: تکثیر اپیتلیوم تیغه‌های ثانویه (مستطیل سفید)، از بین رفتن اپیتلیوم تیغه‌های ثانویه (پیکان سیاه). **C** و **D**: گزری شدن سر تیغه‌های ثانویه (مستطیل سفید)، پر خونی و تراکم خون رگ‌های خونی فیلامنت‌های آبششی (ستاره سیاه)، اتساع رگ‌های خونی (پیکان سیاه). **E** و **F**: دژنراتیو و نکروز شدید تیغه‌های ثانویه (بیضی سیاه)، اتساع رگ‌های خونی فیلامنت‌های آبششی (پیکان سیاه)، آتروفی و تحلیل تیغه‌های ثانویه (پیکان سفید). **G**: خمیدگی تیغه‌های

ثانویه (مستطیل سفید)، خون ریزی فیلامنت‌های آبششی (ستاره سیاه). **H**: جدا شدن اپیتلیوم از غشای پایه در تیغه‌های ثانویه (بیضی سیاه)، تکثیر بی‌رویه اپیتلیوم تیغه‌ها (فلش سفید).



شکل ۳: تغییرات هیستوپاتولوژیکی آبشش ماهی طلایی در مواجهه با بیس فنل **A**: آبشش نرمال ماهی طلایی. بخشی از یک رشته آبششی همراه با تیغه‌های ثانویه آن (مستطیل سیاه). **B** و **C**: خمیدگی تیغه‌های ثانویه (مستطیل سیاه). **D** تا **F**: آتروفی تیغه‌های ثانویه (بیضی سیاه)، نکروز و دژنراتیو شدید رشته‌های آبششی و تیغه‌های ثانویه (پیکان سیاه)، اتساع رگ‌های خونی (پیکان سفید).

بحث

نتایج مطالعه کنونی، تغییرات هیستوپاتولوژیکی بارزی را در آبشش ماهی طلایی در مواجهه با آلاینده‌ها نشان داد. تغییرات دیده شده نظیر هایپرپلازی و هایپرتروفی سلول‌های اپیتلیومی و متعاقب آن، به هم چسبیدن نسبی لاملاهای ثانویه، اتساع رگ‌های خونی، پرخونی فیلامنت‌های آبششی، دژنراتیو و نکروز اپیتلیوم تیغه‌های ثانویه از شایع‌ترین عوارض مشاهده شده در آبشش ماهی‌ها در مواجهه با سموم مذکور هستند.

به نظر می‌رسد استرس اکسیداتیو ناشی از ورود آلاینده‌ها، در حله اول موجب القاء عملکرد آنتی‌اکسیدانی آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز می‌شود. ادامه مواجهه در شرایط مزمن، موجب مهار فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیم‌ها و از بین رفتن مکانیسم دفاعی آن‌ها می‌شود. این مهار به نوبه خود منجر به آسیب اکسیداتیو در مولکول‌های بیولوژیکی و اختلال عملکردهای سلولی مانند آسیب میتوکندری و مهار آنزیم‌های NADH دهیدروژناز، NADH اکسیژناز و ATPase می‌شود. مهار عملکرد این آنزیم‌ها، کاهش ATP را به دنبال دارد. به این ترتیب قدرت انقباض رشته‌های کلاژن سلول‌های پیلاژ موجود در ساختار بافت پوششی تیغه‌های ثانویه کاهش می‌یابد. در نتیجه جهت‌گیری سلول‌های پیلاژ از بین می‌رود و نظم آن‌ها دچار فروپاشی می‌شود. با ترکیب سلول‌های پیلاژ کانال‌های خونی بزرگی ایجاد می‌شود و تجمع خون در این کانال‌ها، پرخونی را ایجاد می‌کند. البته گشاد شدن رگ‌ها و افزایش جریان خون به درون لاملا همچنین گاهی فیبروزه شدن وسیع دیواره مویرگ‌های فیلامنت‌های آبششی، می‌تواند علت دیگری برای بروز پرخونی باشد.

به هر حال پرخونی یک مکانیسم دفاعی است که موجب کاهش فضای بین لاملایی، اتصال لاملاهای مجاور، کاهش آسیب‌پذیری آبشش در برابر نفوذ آلاینده‌ها از طریق اپیتلیوم می‌شود. Huarong و همکارانش (۲۰۱۰) نیز در بررسی اثر بوتاکلر بر آبشش ماهی *Paralichthys olivaceus* پرخونی را به عنوان یک آسیب بافتی گزارش دادند.

ورود آلاینده‌ها، باعث القاء دژنراتیو و نکروز اپیتلیوم فیلامنت‌های آبششی و تیغه‌های ثانویه می‌شود، این القاء همراه با اتساع رگ‌های خونی رشته‌های آبششی، موجب تخریب غشای سلولی می‌شود. با از بین رفتن غشای سلولی ناحیه سطحی تیغه‌های آبششی کم شده، متعاقب آن تبادل گاز و تنظیم یونی کاهش می‌یابد. این امر یک پاسخ تطبیقی جهت جلوگیری از ورود آلاینده‌ها در سطح آبشش است و یک واکنش پاتولوژیکی نسبت به جذب مواد سمی محسوب می‌شود. رستگار و همکاران نیز در سال ۱۳۹۱ در مطالعه اثر بنزوآلفا پایرن بر آبشش ماهی شانک زرد باله نیز دژنراتیو و نکروز اپیتلیوم فیلامنت‌های آبششی را مشاهده کردند.

استرس نفوذ آلاینده‌ها از سوی دیگر موجب القاء هایپرپلازی سلول‌های اپیتلیومی و به هم چسبیدن متعاقب لاملاهای ثانویه می‌شود. جوش خوردن لاملاها به یک‌دیگر، با وجود کاهش

کیفیت فعالیت آبشش‌ها، 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 می‌کند. Ribeiro و همکارانش نیز (۲۰۰۵) در بررسی تاثیرات آفت‌کش‌ها و هیدروکربن‌ها نفتالی بر آبشش مار ماهی، همچنین Santos و همکارانش (۲۰۱۱) در بررسی اثر نفتالن بر آبشش ماهی *Trachinotus carolinus* هایپرپلازی را گزارش کردند.

در مجموع می‌توان گفت، تغییرات پاتولوژیکی آبشش، نتیجه اثر مستقیم آلاینده‌ها است و یک شاخص کیفی خوب و مطمئن برای نشان دادن استرس ناشی از ورود سطوح پایین این آلاینده‌ها به محیط زیست ماهی‌ها، محسوب می‌شود.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد تغییرات هیستوپاتولوژیکی آبشش ماهی طلایی در مواجهه با هر سه آلاینده، کم و بیش مشابه با یک‌دیگر و همچنین مشابه سایر آلاینده‌های آلی است، این موضوع نشان دهنده آن است که برخی از این تغییرات اختصاصی نیستند و ممکن است توسط آلاینده‌های متفاوت القاء شوند. این آلاینده‌ها نیز مانند سایر آلاینده‌ها باعث به راه افتادن مکانیسم‌های دفاعی جهت ممانعت از ورود بیش‌تر آلاینده‌ها به درون بدن ماهی می‌شوند. تغییرات بافتی ایجاد شده توسط آلاینده‌های آلی در غلظت‌های زیر کشنده، به منظور سازگاری ماهی با محیط زندگی آلوده رخ داده است به همین دلیل باعث مرگ ماهی نمی‌شود.

منابع

- رستگار س.، موحدی نیا ع. و یاراحمدی ز. ۱۳۹۱. بررسی اثر بنزوآلفاپایرن بر بافت آبشش و سطوح کورتیزول پلاسما در ماهی شانک زرد باله *Acanthopa gruslatus* مجله علوم و فنون دریایی (پذیرفته شده).
- Das P.K.M.K. and Konar S.K. 1990.** Influence of mixture of light Iranian crude oil and cryptoanionic detergent on aquatic ecosystem. *Environment and Ecology (Kalyani)* 8(3): 834-841.
- Gernhofer M., Pawert M., Schramm M., Muller E. and Triebkorn R. 2001.** Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 8: 241-260.
- Huarong G., Licheng Y., Shicui Z. and Wenrong F. 2010.** The toxic mechanism of high lethality of herbicide butachlor in marine flatfish flounder (*Paralichthy solivaceus*). *Oceanic and Coastal Sea Research*, 9: 257-264.
- LV X., Zhou Q., Song M., Jiang G. and Shao J. 2007.** Vitellogenic Responses Of 17 β -Estradiol And bisphenola In Male Chinese loach (*Misgurnus guillicaudatus*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 24: 155-159.
- Pollino C.A., Georgiades E., and Holdway D.A. 2009.** physiological changes in reproductively active rainbow fish (*Melanotaenia fluviatilis*) following exposure to naphthalene. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 1265-1270.
- Ribeiro C., Vollaie 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.
- Santos T.C.A., Ngan P.V., Gomes V., Passos M.J.A.C.R. and Campos D.Y.F. 2011.** Histological alterations in the gills of *Trachinotus carolinus* (Carangidae). *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 6(2): 109-120.
- Smith C.J., Shaw B.J. and Handy R.D. 2007.** Toxicity Of Single Walled carbonnanotubes To Rainbow Trout, (*Oncorhynchus mykiss*): respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology*, 82: 94-109.
- Wany Y.S., Jaw C.G., Tang H.C., Lin T.S. and Chen, Y.L. 1992.** Accumulation and release of herbicides butachlor, thiobencarb, and chlomethoxyfen by fish, clam, and shrimp. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 48: 474-480.

Changes in gill structure of the goldfish (*Carassius auratus*) during sub-chronic exposure to organic pollutants

Maryam Eghdami^{1*}, Shahrbanoo Oryan², Fatemeh Nazarhaghighi³

*1- MSc. in Marine Biology, Department of Biology, Science and Research Branch of
Islamic Azad University, Tehran, Iran.*

2-Professor in Department of Biology, Kharazmi University, Tehran, Iran.

*3- Ph.D. Student in Marine Biology, Department of Biology, Science and Research
Branch of Islamic Azad University, Tehran, Iran.*

Received: October 2013

Accepted: February 2014

Abstract

Organic pollutants are large group of pollutants that cause histological alterations in aquatic animals. These changes are used as indicators to evaluate the effect of human xenobiotic in these organisms and reflect ecosystem general health conditions. This study evaluated the pathologic alterations of gill exposed to Bisphenol A, Naphthalene, Butachlor. These Pollutants were added to aquariums containing goldfish with doses of 500 µg/l, 200 µg/l, 0.28 µl/l respectively, for 15 days, then sampling was performed on days 15. Second gill arc were removed and fixed by Bouins solution, processed, embedded in paraffin, sectioned at 6µ thickness, further stained by Hematoxylin-Eosin staining method. Based on the histological study, secondary lamella curling, lamellar capillaries dilation, complete lamellar fusion, degeneration of epithelium of filaments and second lamella in gill tissue. It seems these alterations in gills were formed to prevent pollutants to penetrate to fish body.

Key words: *Histopathology, Goldfish, Gill, Organic pollutants.*

*Corresponding Author: eghdamimary@yahoo.com