پاسخ‌های بافتی کبد ماهی هامور معمولی *Epinephelus coioides* در نتیجه قرار گرفتن کوتاه مدت در معرض ترکیبی از بنزوآلفاپایرن و باکتری *Vibrio alginolyticus*

نجمه نوروزی[۱]، نگین سلامات[۲*]، غلامرضا اسکندری[۳]، محمد موسوی[۴]

۱- گروه زیست دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، پست الکترونیکی: norozi.najme@yahoo.com

۲- گروه زیست دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، پست الکترونیکی: salamatnegin@gmail.com

۳- موسسه تحقیقات شیلات ایران، پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور، اهواز، پست الکترونیکی: gh.skandary@yahoo.com

۴- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، پست الکترونیکی: smmousavi@kmsu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۲/۵/۳۰ * نویسنده مسوول تاریخ پذیرش: ۹۳/۱/۲۳

© نشریه علمی ـ پژوهشی اقیانوس‌شناسی ۱۳۹۳، تمامی حقوق این اثر متعلق به نشریه اقیانوس‌شناسی است.

چکیده

مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر همزمان بنزوآلفاپایرن (هیدروکربن آروماتیک پنج حلقه‌ای) و باکتری *Vibrio alginolyticus* بر ساختار بافت کبد ماهی هامور معمولی *Epinephelus coioides*، صورت گرفت. در این راستا ۱۴۰ قطعه ماهی هامور معمولی سالم نابالغ (میانگین وزنی ۷/۹±۱۸۰ گرم و میانگین طولی ۰/۲±۲۰/۸سانتی متر) در ۷ تانک تقسیم شدند که شامل: ۱- گروه کنترل، ۲- گروه تزریق شده با روغن نارگیل، ۳- گروه تزریق شده با باکتری *Vibrio alginolyticus*، ۴ و ۵- گروه تزریق شده با mg/kg ۲۰ و ۲۰۰ بنزوآلفاپایرن، ۶ و ۷- گروه تزریق شده با باکتری *Vibrio alginolyticus* و غلظت‌های mg/kg ۲۰ و ۲۰۰ بنزوآلفاپایرن. ماهیان به‌مدت ۱۴ روز پس از تزریق باکتری در شرایط ثابت آزمایشگاهی قرار داده شدند. نمونه‌گیری در روزهای ۱ و ۲ و ۴ و ۷ و ۱۴ انجام شد.

به‌منظور بررسی ضایعات پاتولوژیک کبد، نمونه‌ها در محلول ثبوت بافر فرمالین تثبیت شد و پس از انجام مراحل معمول بافت شناسی، مقاطع بافتی به ضخامت ۶ میکرون تهیه، به روش هماتوکسین- ائوزین رنگ آمیزی شده و مورد مطالعه میکروسکوپی قرار گرفتند. نتایج مطالعه هیستوپاتولوژیک کبد نشانگر ضایعات بافتی از قبیل واکوئلاسیون سلول‌ها و تجمعات ملانوماکروفاژی در گروه تیمار شده با باکتری، خونریزی، واکوئلاسیون هپاتوسیت‌ها، مراکز ملانوماکروفاژی، اتساع فضای دیس، هیپرتروفی هپاتوسیت‌ها و دژنره شدن سلول‌های کبد در گروه‌های تیمار شده با BaP بود. در گروه‌های ترکیبی نیز واکوئلاسیون سلول‌ها، مراکز ملانوماکروفاژی، اتساع فضای دیس و نکروز بافتی مشاهده شد.

کلمات کلیدی: *بنزوآلفاپایرن، Vibrio alginolyticus، هیستوپاتولوژی، کبد، هامور معمولی.*

۱. مقدمه

تحقیات متعددی نشان داده‌اند که پیشرفت و انتشار بیماری‌های عفونی با فعالیت های آنتروپوژنیک نظیر تغییرات آب و هوا، قرار گرفتن موجودات در معرض مواد شیمیایی و انتقال جهانی عوامل عفونی در ارتباط است (Lafferty et al., 2004). از آنجایی‌که بسیاری از باکتری‌ها پاتوژن‌های فرصت طلب هستند و تنها منجر به ایجاد بیماری در موجودات قرار گرفته در معرض تنش می‌شوند (Arkoosh et al., 2001)، درک ارتباط متقابل تنش و بیماری‌ها بسیار مهم است. کاهش مقاومت به عوامل ایجاد کننده بیماری‌های عفونی در بسیاری از موجودات آبزی گزارش شده است و امروزه تضعیف و مهار سامانه ایمنی نتیجه قرار گرفتن در معرض آلاینده‌ها در نظر گرفته می‌شود. اثرات بالقوه این روابط شامل کاهش تندرستی، کاهش باروری، کاهش فعالیت‌های متابولیکی، توقف عملکرد ایمنی و مرگ و میر است. (Prosser et al., 2011). Carlson و همکاران (۲۰۰۲) کاهش مقاومت مداکای ژاپنی (*Oryzias latipes*) قرار گرفته در معرض بنزوآلفاپایرن (Benzo[a]pyrene) (BaP) را در مقابل باکتری *Yersinia ruckeri* گزارش نمودند. باکتری *Vibrio alginolyticus*، باکتری فرصت‌طلب بوده که به‌عنوان بخشی از فلور میکروبی نرمال در دستگاه گوارش آبزیان تلقی می‌شود. با این حال تحقیقات نشان داده‌اند که این باکتری در ماهیانی که در شرایط پر تنش زیست می‌کنند، قادر به ایجاد بیماری ویبریوزیس است (Balebona et al., 1998; Campanelli et al., 2008).

مکانیسم‌های سم‌زدایی سلول‌ها و حذف آلاینده‌ها بسیار پیچیده بوده و به عوامل متعددی از قبیل نوع و غلظت آلاینده، بیولوژی گونه، نوع بافت و سلول‌های متاثر و قرار گرفتن در معرض سایر سموم و یا عوامل عفونی وابسته است. بسیاری از مطالعات توکسیکولوژی که بر تعیین اثرات متقابل عوامل ایجاد کننده آلودگی (عفونی و غیر عفونی) تاکید دارند، و جو اثرات آنتاگونیستی (تاثیرات متضاد) و یا سینرژیک (تاثیرات تشدید شده که بیش از اثرات هر یک از عوامل آلوده کننده به تنهایی است) را در موجودات، بافت‌ها و یا سلول‌هایی که به‌طور همزمان در معرض عوامل عفونی و غیر عفونی متفاوت قرار دارند، ثابت نموده‌اند (Balebona et al., 1998; Campanelli et al., 2008).

کبد ماهی اندام اصلی بیوترانسفورماسیون زنوبیوتیک‌ها و همچنین خارج کننده مواد مضر است (Healt, 1995; Hinton et al., 2001). بسیاری از عوامل عفونی و آلاینده‌ها تمایل به تجمع در کبد داشته، منجر می‌شوند که این اندام تحت تاثیر آلودگی‌های عفونی و غیر عفونی موجود در آب قرار گیرد (Health, 1995). به‌همین دلیل کبد شاخصی ارزشمندی جهت تعیین سمیت مواد میکروبی و شیمیایی موجود در آب بوده و مطالعات کبدی به‌عنوان روش‌های کارامدی برای بررسی اثرات سموم و پاتوژن‌های محیط‌های آبی بر جانوران آبزی استفاده می‌شوند (Fernandes and Mazon, 2008). گزارشات فراوانی مبنی بر تغییرات هیستوپاتولوژیک کبد در ماهیانی که در معرض عوامل عفونی و غیرعفونی قرار داشتند، وجود دارد (Vandenberghe, 1996; Braunbeck, 1998). بنزوآلفاپایرن یکی از مهم‌ترین هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (Polycyclic aromatic hydrocarbons) (PAH) است که از سوختن ناقص مواد آلی مثل گازوئیل، زباله‌ها یا هر ماده حیوانی یا گیاهی دیگر به‌وجود می‌آید. این ترکیب دارای اثرات موتاژنیک، کارسینوژنیک و ایمنوتوکسیک بوده و در محیط‌های آبی به‌طور گسترده‌ای پراکنده شده است (Osman et al., 2009). BaP در تمام محیط‌های ساحلی با حلالیت نسبت بالایی در آب وجود داشته، برای مهره داران بسیار سمی است و منجر به نکروز وسیع بافتی (Sikkema et al., 1994) و تضعیف ایمنی (Yin et al., 2007) می‌شود. تحقیق حاضر با هدف مطالعه روابط متقابل (سینرژیسم، آنتاگونیسم و...) موجود میان هیدروکربن آروماتیک چندحلقه‌ای بنزوالفاپایرن و عامل مولد بیماری عفونی حاد (*Vibrio alginolyticus*) در ماهی هامور معمولی به‌عنوان یک ماهی تجاری بازار پسند با ارزش غذایی بالا در جنوب کشور و تاثیر متقابل این دو استرسور بر ساختار بافتی کبد این ماهی صورت گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. نگهداری ماهیان قبل از دوره آزمایش

۱۴۰ عدد ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) (میانگین وزنی ۷/۹±۱۸۰ گرم و میانگین طولی ۰/۲±۲۰/۸ سانتی

متر و همگی نابالغ) در مهر ماه ۱۳۹۰ از مرکز تحقیقات شیلات بندر امام خمینی(ره) واقع در شهرستان بندر امام خمینی(ره) استان خوزستان تهیه و به ۷ تانک ۳۰۰ لیتری که تا حجم ۲۰۰ لیتر با آب فیلتر شده و هوادهی شده دریا پر شده بود منتقل شدند، به‌طوری که ۲۰ عدد ماهی در هر تانک قرار داده شد. دوره آداپتاسیون (سازگاری) ۷ روز در نظر گرفته شد. در این دوره ماهی‌ها برای دیدن نشانه‌های غیر طبیعی کنترل شده و ماهیانی که نشانه‌های آشکاری از بیماری مانند بی حالی و شنای عجیب را نشان می-دادند، از آزمایش حذف شدند. میانگین دما ۲۶/۵ درجه سانتی‌گراد، pH=۷/۸ و شوری ۳۹ گرم بر لیتر بوده و به‌طور روزانه کنترل می‌شدند. آب تانک‌ها هر دو روز یک‌بار از طریق کف تانک‌ها و با سیفون کردن تعویض می‌شد (Wang et al., 2005).

۲-۲. گروه‌بندی ماهیان

برای انجام این آزمایش، تانک‌ها به‌طور تصادفی به ۷ تیمار تقسیم شدند: ۱. ماهیان شاهد هیچ تزریقی دریافت نکردند، ۲. جهت ارزیابی اثرات احتمالی روغن نارگیل به این ماهیان تنها روغن نارگیل تزریق شد، ۳. به این ماهیان تنها باکتری Vibrio alginolyticus با غلظت ۱۰۴cfu/ml تزریق شد، ۴. به ماهیان گروه چهار تنها بنزوآلفا پایرن با غلظت mg/kg ۲۰ (غلظت پایین) تزریق شد، ۵. این ماهیان تنها بنزوآلفاپایرن را با غلظت ۲۰۰mg/kg (غلظت بالا) دریافت نمودند، ۶. به ماهیان گروه شش ترکیبی ازVibrio alginolyticus (با غلظت cfu/ml ۱۰۴) و بنزوآلفاپایرن (با غلظت mg/kg ۲۰) (Vibrio+low BaP) تزریق شد، ۷. ماهیان این تانک نیز ترکیبی از Vibrio alginolyticus (با غلظت cfu/ml ۱۰۴) و بنزوآلفاپایرن (با غلظت mg/kg ۲۰۰) (Vibrio+high BaP) را دریافت نمودند.

برای تزریق، بنزوآلفاپایرن در ml/kg۱ روغن نارگیل حل شد. همچنین قبل از تزریق باکتری‌ها، آنها را در بافر فسفات به حجم مورد نیاز رسانده و به صورت سوسپانسیون ۴۸ ساعت پس از تزریق بنزوآلفاپایرن به صورت درون صفاقی تزریق باکتری انجام شد. طول دوره آزمایش از زمان تزریق باکتری تا مدت ۱۴ روز در نظر گرفته شد، زیرا بنا به گزارشات این دوره زمانی برای پیشرفت بیماری ویبریوزیس کافی است. نمونه‌برداری از بافت کبد در روزهای ۰، ۲، ۴، ۷ و ۱۴ انجام گرفت. غذادهی به ماهیان در طول دوره آزمایش صورت نگرفت.

۲-۳. اخذ نمونه‌های بافتی از ماهیان

نمونه‌های بافتی به ابعاد ۰/۵ سانتیمتر از کبد در روزهای ۱، ۲، ۴، ۷ و ۱۴ جهت مطالعه ضایعات پاتولوژیک احتمالی ایجاد شده در این بافت‌ها و وسعت این ضایعات در تیمارهای مختلف، اخذ و به محلول ثبوت بافر فرمالین ۱۰ درصد منتقل شد.

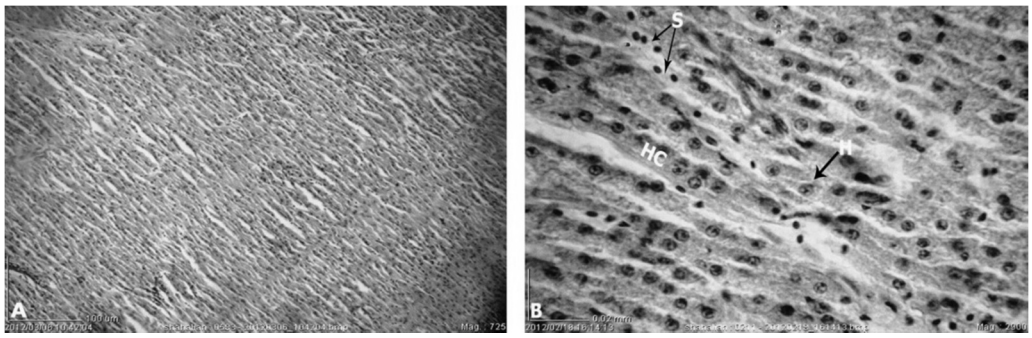
۲-۴. تهیه اسلایدهای بافتی رنگ آمیزی شده با رنگ هماتوکسیلین و ائوزین

در آزمایشگاه بافت شناسی آبزیان دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر قطعات کوچکی از کبد جدا شده و جهت انجام مراحل آبگیری، شفاف سازی و پارافینه شدن به دستگاه هیستوکینت تمام اتوماتیک مدل RX- 11B, Tissue tek rotary, japan انتقال داده شدند. سپس با استفاده از دستگاه میکروتوم (مدل LEICA-RM2245) برش‌هایی به ضخامت ۵ تا ۶ میکرومتر از هر یک از نمونه ها تهیه و جهت مطالعه با میکروسکوپ نوری، مقاطع تهیه شده سرانجام با استفاده از رنگ آمیزی معمولی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) رنگ آمیزی شدند. مقاطع بافتی آماده شده به‌منظور مطالعه هیستوپاتولوژیک با استفاده از میکروسکوپ نوری Olympus و با بزرگ نمایی‌های متفاوت بررسی و تصاویر مناسبی توسط دوربین Dinolite Digital Microscope نصب شده بر روی میکروسکوپ و سامانه رایانه‌ای متصل به دوربین مجهز به نرم افزار Dino capture تهیه و ذخیره شد.

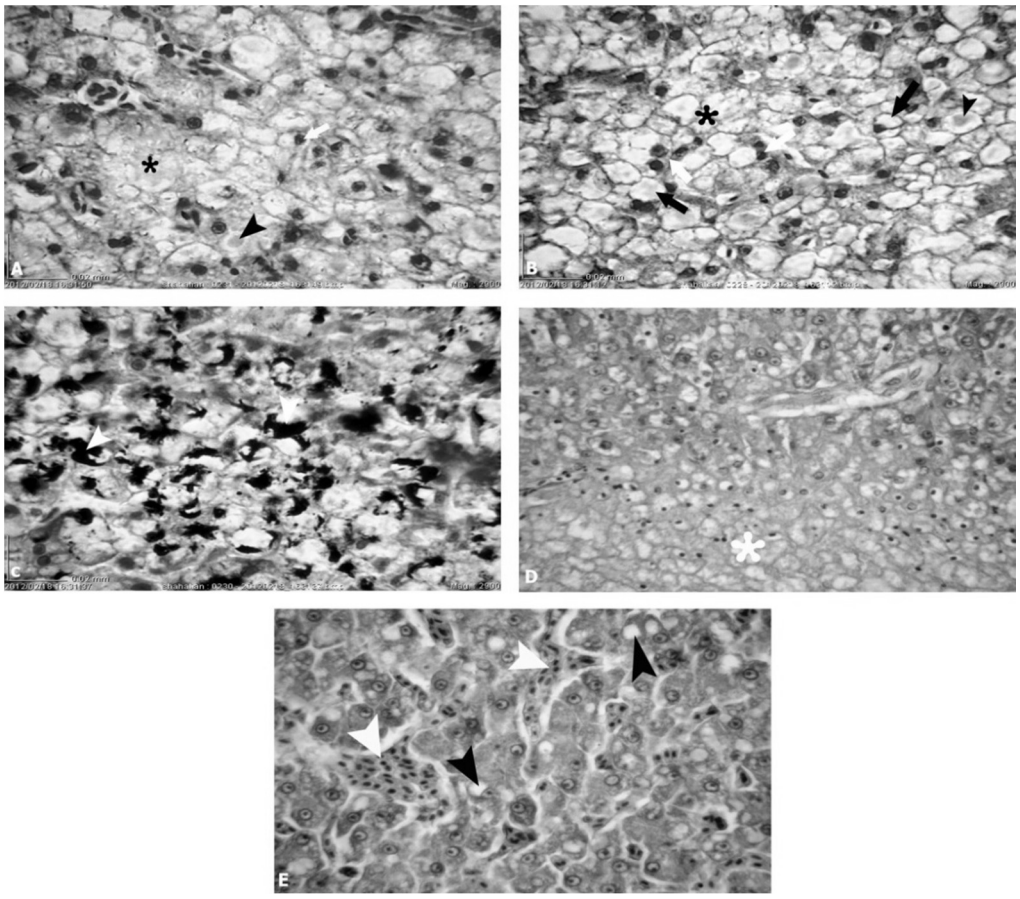
۳. نتایج

طی دوره آزمایش، مرگ و میری در میان ماهیان مشاهده نگردید و تنها در ماهیان قرار گرفته تحت تاثیر باکاری و بالاترین غلظت BaP (۲۰۰mg/kg) شنای غیر طبیعی (عمودی) و ساکن شدن در مجاورت جداره های تانک ها دیده شد. در نمونه‌های کبد ماهیان گروه‌های کنترل و کنترل حلال ضایعه هیستوپاتولوژیکی مشاهده نشد و کبد دارای ساختار طبیعی بود. سلول‌های کبدی با هسته مدور سیاه و سیتوپلاسم صورتی به‌صورت سلول‌های چندسطحی دیده می‌شوند. فضای دیس هم بین هپاتوسیت‌ها و مویرگ‌های کبدی دیده می‌شود (شکل ۱). در روز دوم در تیمارهای باکتری و ترکیبی ضایعات خاصی دیده نشد و در کل در این روز در هر پنج تیمار

چهره بافت کبد طبیعی به نظر می‌رسید. در روز چهارم آزمایش آسیب‌های مشاهده شده در گروه دارای BaP۲۰۰mg/kg، شامل واکوئلاسیون هپاتوسیت‌ها، هیپرتروفی هپاتوسیت‌ها، جابه‌جایی هسته به یک طرف و اتساع سینوزوئیدی با وسعت زیاد بود. اما در تیمار BaP۲۰mg/kg اتساع فضای دیس و نکروز کانونی مشاهده گردید (شکل ۲). همچنین در چهارمین روز نمونه‌برداری ضایعات مشاهده شده در تیمار باکتری فقط شامل تجمعات ملانوماکروفاژی بود ضایعات خاصی در این گروه در روز چهارم دیده نشد.



شکل ۱: تصاویر میکروسکوپ نوری ساختارطبیعی بافت کبد ماهی هامور معمولی گروه کنترل و کنترل حلال: A، B. هپاتوسیت‌ها (H)، طناب کبدی (HC)، سینوزوئیدها (S). A (H&E; × 750) و B (H&E; × 2900)



شکل ۲: تصاویر میکروسکوپ نوری تغییرات بافتی کبد ماهی هامور معمولی پس از چهار روز تیمار: A، قطرات هیالن در هپاتوسیت‌ها (سر پیکان سیاه)، نکروز (ستاره سیاه)، جابه‌جایی هسته به یک طرف (پیکان سفید) در تیمار باکتری. B، تیمار Bac+BaP۲۰mg/kg دارای نکروز (ستاره سیاه)، جابه‌جایی هسته به یک طرف (پیکان سفید)، واکوئولاسیون (پیکان سیاه)، قطرات هیالن در هپاتوسیت‌ها (سر پیکان سیاه). C، تیمار Bac+Bap۲۰۰mg/kg دارای مراکز ملانوماکروفاژی فراوان (سر پیکان‌های سفید). D، تیمار BaP۲۰ mg/kg دارای نکروز کانونی (ستاره سفید). E، تیمار BaP۲۰۰ mg/kg دارای اتساع سینوزوئیدی (سر پیکان سفید)، واکوئلاسیون (سر پیکان سیاه). E,D,C,B,A (H&E; ×2900)

اگرچه ضایعات چندانی در گروه‌های ترکیبی Bac+BaP۲۰mg/kg و Bac+BaP۲۰۰ mg/kg در روز چهارم در کبد مشاهده نشد، اما ضایعات مشاهده شده شامل تجمعات ملانوماکروفاژی، افزایش مختصری در فضای دیس و همچنین وجود واکوئل‌های چربی در هپاتوسیت‌ها و نکروز سلولی بود؛ که این ضایعات در تیمار Bac+BaP۲۰۰ mg/kg شدیدتر از تیمار Bac+BaP۲۰ mg/kg بود. در کل این ضایعات نسبت به روز دوم شدیدتر بودند (شکل ۲).

در روز هفت دوره آسیب های هیستوپاتولوژیکی مشاهده شده در گروه BaP نظیر نکروز کانونی، جابه‌جایی هسته به یک طرف، پیکنوز هسته و اتساع سینوزوئیدی بود که این ضایعات در تیمار BaP۲۰۰ شدیدتر از تیمار BaP۲۰ بود. در روز هفت آزمایش در این دو گروه با افزایش غلظت BaP ضایعات نیز افزایش یافتند (شکل ۳). در این روز در تیمار باکتری ضایعه خاصی دیده نشد و بافت کبد دارای ظاهری طبیعی بود و فقط مقداری تجمعات ملانوماکروفاژی مشاهده شد (شکل ۳). در گروه‌های ترکیبی در کبد در روز هفتم ضایعات شامل تجمعات ملانوماکروفاژی، افزایش واکوئل‌های چربی در هپاتوسیت‌ها و نکروز سلولی بود که این ضایعات شدیدتر از روز چهارم بودند و در تیمار Bac+BaP۲۰۰mg/kg هم شدیدتر از تیمار Bac+BaP۲۰mg/kg بود (شکل ۳).

اگرچه در روز چهاردهم نمونه‌برداری ضایعات هیستوپاتولوژیکی مثل واکوئلاسیون، مراکز ملانوماکروفاژی کوچک به‌ویژه اطراف عروق خونی، احتقان خون در سیاهرگ مرکزی و نکروز کانونی در تیمار BaP۲۰۰ مشاهده شد، اما وسعت این ضایعات به‌طور قابل توجهی کمتر از روز ۷ بود.

در تیمار BaP۲۰ ضایعات بسیار کمی دیده شد، به‌طوری که مقداری واکوئلاسیون سلول‌های کبدی و اتساع فضای دیس مشاهده شد (شکل ۴). همچنین در روز چهاردهم نمونه‌برداری در تیمار باکتری سلول‌های کبدی به شدت واکوئله بودند، به‌طوری که چهره بافت حالت اسفنجی و حفره حفره پیدا کرده بود. اگرچه در گروه‌های ترکیبی ساختار کبد نسبتا طبیعی و مشابه کنترل بود، ولی مراکز ملانوماکروفاژی به مقدار محدودی قابل مشاهده بود. این مراکز ملانوماکروفاژی به‌طورعمده در اطراف عروق مشاهده شدند. همچنین اگرچه گلبول‌های قرمز شکسته شده در گروه Bac+BaP۲۰ مشاهده شد، اما در گروه ۲۰۰ +Bac BaP ساختار بافت کبد ضایعات چندانی نشان نداد و فقط در برخی قسمت‌ها واکوئلاسیئن در سلول‌های کبدی مشاهده شد (شکل ۴).

۴. بحث و نتیجه‌گیری

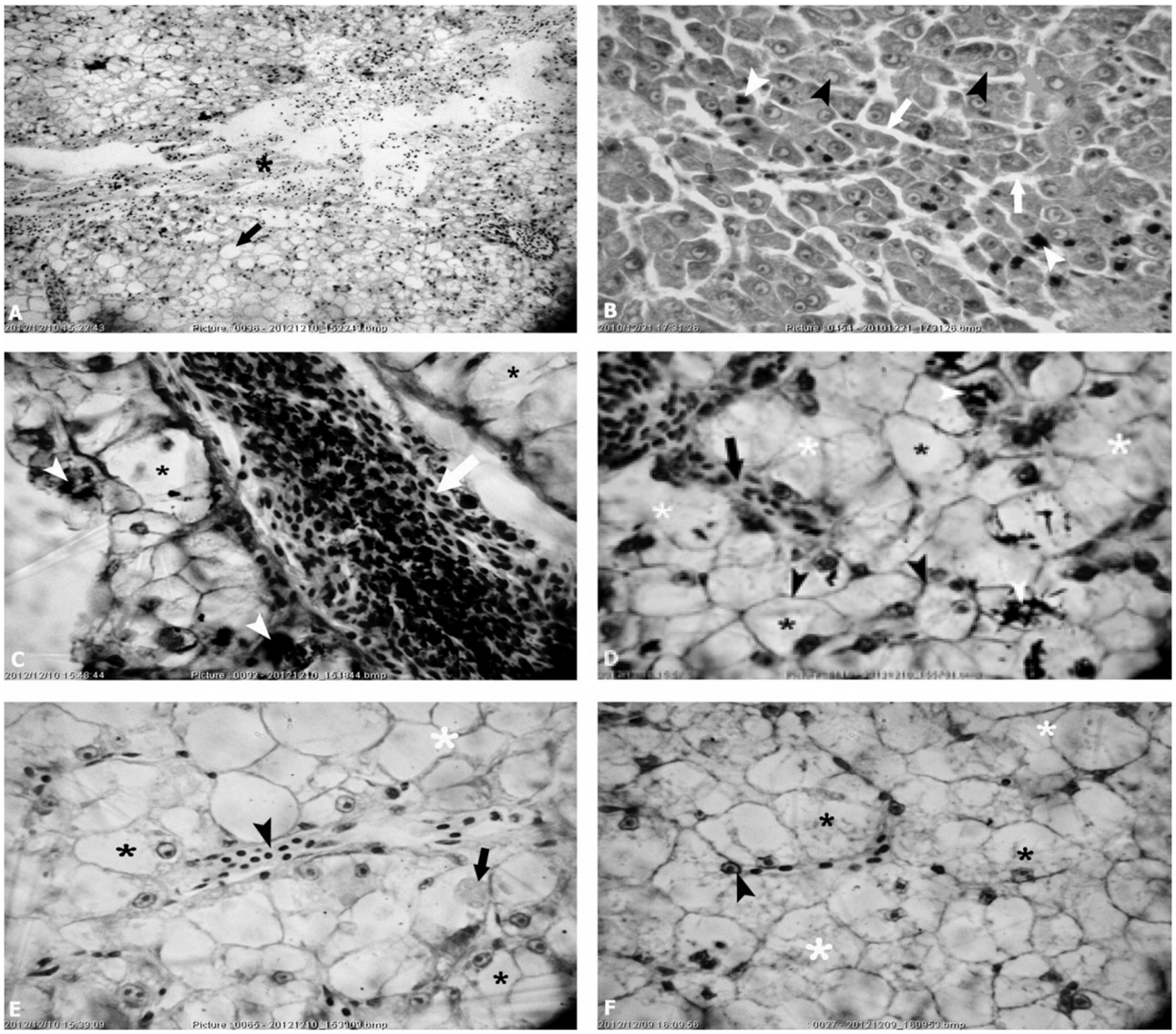
کبد به‌دلیل دارا بودن ویژگی‌های متابولیسمی خاص (دارا بودن آنزیم‌های متابولیزه کننده)، تولید صفرا، ویتلوژنزیز، بیوترانسفرماسیون و ترشح آلاینده‌های آلی و غیر آلی، اندام هدف مناسبی برای بروز تغییرات بافتی است (Hinton and Lauren, 1990). از این رو کبد اندام مناسبی برای مطالعه و ارزیابی سلامت ماهی و پایش‌های زیست‌بوم‌ها آبی معرفی گردیده است و بررسی هیستوپاتولوژیکی آن روشی مناسب برای شناسایی و تشخیص اثرات آلاینده‌های مختلف بر بافت‌ها و اندام‌های ماهی است (Bernet et al., 1999; Thophon et al., 2003; Simonato et al., 2008; Rodrigues et al., 2010).

القای BaP، باکتری *V. alginolyticus* و یا ترکیبی از این دو استرسور در اولین روزهای آزمایش منجر به تغییر ساختار بافتی کبد تیمارها نشد و ساختار این اندام تفاوتی با کبد ماهیان شاهد نشان نداد، چراکه تغییرات بافتی در اندام‌ها پس از گذشت مدتی از القا، عوامل عفونی یا غیرعفونی ایجاد می‌شوند (Altinok and Capkin, 2008). از سوی دیگر در تحقیق حاضر باکتری *V. alginolyticus* پس از گذشت ۲ تا ۳ روز فعال شده و منجر به تغییر عملکرد فیزیولوژیک اندام‌ها و ساختار بافتی آنها می‌گردد.

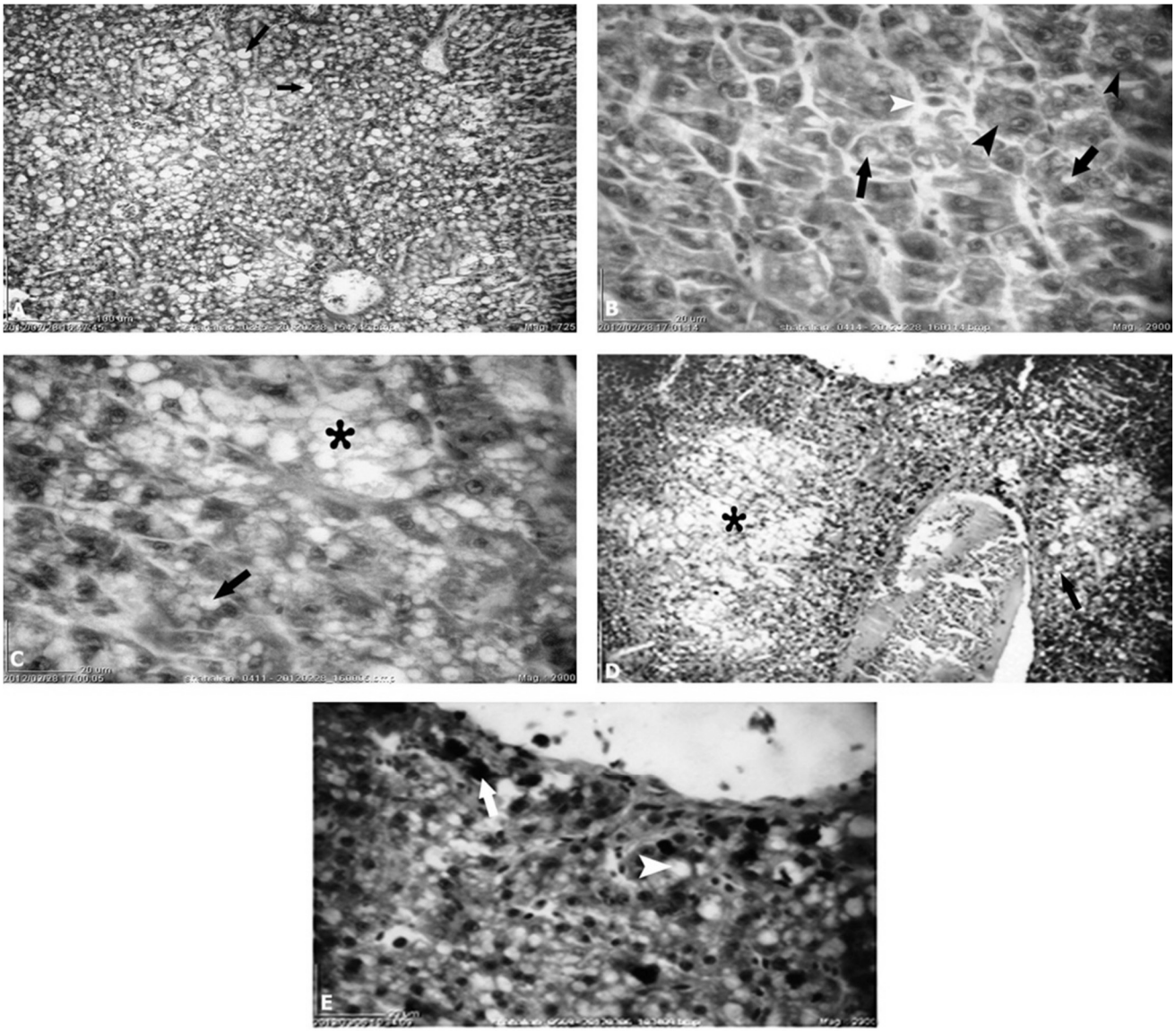
معمول‌ترین ضایعات هیستوپاتولوژیک مشاهده شده در کبد ماهیان هامور معمولی، تحت تاثیر BaP، *V. alginolyticus* و ترکیب این دو عامل، عبارت بودند از: هیپرتروفی هپاتوسیت‌ها، واکوئله شدن هپاتوسیت‌ها، هیپرتروفی هسته، جانبی شدن هسته، دژنره شدن هپاتوسیت‌ها، پیکنوزه هسته، اتساع فضای دیس، اتساع سینوزوئیدها، پرخونی، خونریزی، تغییر شکل سلول‌های خونی، نفوذ لنفوسیت‌ها، افزایش تجمعات ملانوماکروفاژی و نکروز.

آسیب‌های پاتولوژیک وارد شده به بافت کبد ماهیان تیمار شده با غلظت‌های مختلف BaP پس از روز چهارم کاهش یافته و در روز هفتم ضایعات کمتری در کبد این تیمارها مشاهده شد. همچنین در روز چهاردهم نمونه‌گیری ضایعات قابل توجهی در بافت مورد مطالعه در هیچ کدام از تیمارها مشاهده نگردید. Aas و همکاران (۲۰۰۰)، در مطالعه‌ای بیشترین تجمع PAHها را در

ماهی آتلانتیک کاد (*Gadus morhua*) در روز چهارم در معرض قرارگیری گزارش نموده و عنوان نمودند که افزایش بیوترنسفورماسیون اغلب PAH ها و تبدیل آنها به متابولیت‌هایشان، دلیل اصلی کاهش اثرات اغلب PAHها پس از گذشت چهار روز است. از سوی دیگر آسیب بافتی در کبد ماهیان تیمار شده با باکتری تا روز هفتم آزمایش به حداکثر میزان خود رسیده و پس از آن رو به کاهش گذاشت، چراکه دوره بیماری‌زایی باکتری ۶ تا ۷ روز بوده و پس از آن دوره بیماری‌زایی باکتری به اتمام می‌رسد. همچنین افزایش شدت و وسعت آسیب‌های بافتی در تیمارهای ترکیبی تا روز هفتم قابل مشاهده بود و از طرفی آسیب‌های بافتی در این تیمارها بیش از سایرین بود. Arkoosh و همکاران (۲۰۰۱)، گزارش نمودند که حساسیت ماهیان آزاد قرار گرفته در معرض آلاینده‌ها نسبت به پاتوژن‌های باکتریایی بیشتر است.



شکل ۳: تصاویر میکروسکوپ نوری تغییرات بافتی کبد ماهی هامور معمولی پس از هفت روز تیمار: A و B، در تیمار باکتری واکوئلاسیون (پیکان سیاه)، خونریزی (*سیاه)، افزایش فضای دیس (پیکان سفید)، مراکز ملانوماکروفاژی (سر پیکان سفید)، دژنراسیون هسته هپاتوسیت‌ها (سرپیکان سیاه)، دژنراسیون هپاتوسیت (پیکان خاکستری). C، احتقان خون (پیکان سفید)، واکوئلاسیون (*سیاه)، مراکز ملانوماکروفاژی (سر پیکان سفید) در تیمار Bac+BaP۲۰mg/kg. D، اتساع سینوزوئیدی (پیکان سفید)، واکوئلاسیون (*سیاه)، هیپرتروفی هپاتوسیت ها (سر پیکان سیاه)، مراکز ملانوماکروفاژی (سر پیکان سفید)، نکروز کانونی (*سفید)، جابه‌جایی هسته به یک طرف (پیکان خاکستری) در تیمار Bac+BaP۲۰۰mg/kg. E اتساع سینوزوئیدی (سر پیکان سیاه)، واکوئلاسیون (*سیاه)، نکروز کانونی (*سفید)، قطرات هیالن در هپاتوسیت‌ها (پیکان سیاه) در تیمار BaP۲۰۰ mg/kg. F واکوئلاسیون (*سیاه)، نکروز کانونی (*سفید)، جابه‌جایی هسته به یک طرف (سر پیکان سیاه) در تیمار BaP۲۰ mg/kg. A (H&E; ×725) F,E,D,C,B (H&E; ×2900)



شکل ۴: تصاویر میکروسکوپ نوری تغییرات بافتی کبد ماهی هامور معمولی پس از چهارده روز تیمار: A، واکوئولاسیون (پیکان سیاه)، در تیمار باکتری. B، Bac+BaP۲۰mg/kg دارای اتساع فضای دیس (سر پیکان سفید)، هیپرتروفی هپاتوسیت‌ها (سرپیکان سیاه)، واکوئولاسیون (پیکان سیاه). C، Bac+BaP۲۰۰mg/kg دارای نکروز (ستاره سیاه)، واکوئولاسیون(پیکان سیاه). D، تیمار BaP۲۰۰ mg/kg دارای واکوئلاسیون سلول‌های کبدی (پیکان سیاه)، نکروز (ستاره سیاه)، احتقان خون در سیاهرگ مرکزی (ستاره خاکستری). E، واکوئلاسیون سلول‌های کبدی (سر پیکان سفید)، مراکز ملانوماکروفاژی (پیکان سفید)، D,A (H&E; ×725)، E,C,B (H&E; ×2900)

عارضه بزرگ شدن سلول‌های کبدی از عوارض شایع در بافت کبد است که در پاسخ به عوامل عفونی و غیرعفونی بروز می‌کند. هیپرپلازی اندامک‌های درون سیتوپلاسم، بزرگ شدن هسته و رشد و التهاب شبکه اندوپلاسمی همراه با واکوئله شدن هپاتوسیت‌ها دلایل عمده هیپرتروفی سلول‌های کبدی است (Rodrigues et al., 2010). واکوئله شدن هپاتوسیت‌ها یک فرایند فراگیر و پیش رونده می‌باشد که می‌تواند نتیجه اختلال در سنتز پروتئین‌ها، تخلیه شدن انرژی، پراکندگی میکروتوبول‌ها و یا تغییر در سوبسترای واکنش‌ها باشد (Hinton and Lauren, 1990). پرخونی در عروق خونی از عوارض کبدی دیگری است که به‌خصوص در سیاهرگ باب کبدی و انشعابات آن حادث می شود. گاهی اوقات پرخونی در سیاهرگهای کوچک و سینوزوئیدی کبدی به‌وجود می‌آید (Di Giulio and Hinton, 2008). هجوم خون تحت القای تنش منجر به اتساع عروق خونی

به همراه همولیز درون عروقی و ایجاد ترومبوس (لخته) در رگ‌های خونی می‌شود که با متوقف ساختن جریان خون به بافت به ایجاد دژنراسیون سلولی و نکروز بافت کبد می‌انجامد (Mohamed, 2001).

جانبی شدن هسته‌ها شکل دیگری از تغییرات هسته‌ای است که دلیل آن افزایش اندازه واکوئل‌های سیتوپلاسمی و تجمع چربی در هپاتوسیت‌های کبدی است که سرانجام موجب فشار به هسته و رانده شدن هسته سلول‌ها به یک سمت سلول می‌شود. این عارضه نیز در صورت پیشرفت معمولاً به آتروفی یا پیکنوزه شده هسته‌ها منجر می‌شود (Genten et al., 2009). گشادشدگی سینوزوئیدها نیز از عوارض دیگری بافت کبد تحت تنش آلاینده‌ها است که دراین حالت فضای سینوزوئیدی عریض‌تر می‌شود و تعداد گلبول‌های قرمز بیشتری در کنار هم قرار می‌گیرند. این عارضه معمولاً همراه با ادم در فضای سینوزوئیدی است. به نظر می‌رسد که علت این تغییر نیاز بیشتر بافت کبد به خون برای سمیت زدایی بیشتر آلاینده‌ها باشد (Rodrigues et al., 2010).

Ortiz و همکاران (۲۰۰۱)، ایجاد ضایعاتی نظیر واکوئلاسیون شدید، دژنراسیون، احتقان سینوزوئیدها، خونریزی و نکروز را در ارتباط با عوامل لیپوفیلیک بیان نمودند. به‌طوری که این عوامل با عبور از غشای پلاسمایی سلول‌ها به خصوص هپاتوسیت‌ها موجب ایجاد تغییراتی در ساختار و عملکرد سلول‌ها می شوند. نتیجه این تغییرات کاهش کارایی عملکرد کبد در ماهی است.

Costiner (2010) در بررسی اثر باکتری *Vibrio alginolyticus* بر ماهی خاویاری *Acipenser baerii*، ضایعات بافتی شامل ادم، واکوئلاسیون و نفوذ سلولی، احتقان و نکروز نظیر آنچه در مطالعه حاضر مشاهده شد، را در کبد ماهیان تیمار شده با این باکتری گزارش نمودند. این محققین واکوئلاسیون و نفوذ سلولی را به تجمع چربی و گلیکوژن در نتیجه عملکرد ناقص کبد در اثر تیمار با این باکتری و یا دژنراسیون چربی هپاتوسیت‌ها نسبت دادند. این محققین همچنین بیان کردند که نکروز ممکن است به‌دلیل عدم توانایی ماهیان برای باز تولید سلول‌های کبدی جدید باشد.

Liu (2004)، در مطالعه ارزیابی وضعیت سلامتی میگوی سفید *Litopenaeus vannamei* قرار گرفته در معرض باکتری *Vibrio alginolyticus*، آسیب‌های بافت کبد نظیر نکروز، واکوئلاسیون و دژنراسیون را مشاهده نموده و آنها را به‌عنوان پاسخ غیر اختصاصی به استرس معرفی نمودند. آنها بیان کردند که تغییرات ساختاری ایجاد شده در کبد، القا کننده پاسخ موجودات به تغییرات محیطی هستند.

نکروز سلولی و بافتی کبدی یک یافته معمول است که در واکنش‌های التهابی کبد در پاسخ به تنش‌های عفونی (پیغان و مهجور، ۱۳۸۶) و یا در نتیجه اختلالات متابولیکی، بیماری‌های توکسیک و در مواردی که بدن با کمبود اکسیژن مواجه می‌شود مثلا در سپتی سمی‌ها و بیماری‌های توکسیک دیده می‌شود (Alderman and Clifton, 1993).

ملانوماکروفاژها سلول‌هایی هستند که به سامانه ایمنی غیر اختصاصی تعلق دارند. افزایش تعداد مراکز ملانوماکروفاژی یکی از شایع ترین تغییرات بافت کبد در پاسخ به استرس آلاینده‌ها و ترکیبات سمی است که به‌نظر می‌رسد در سمیت زدایی و متابولیسم ترکیبات خارجی و داخلی و همچنین حفاظت بافت کبد نقش دارد. Suresh (2009) بیان کرد که تغییرات مراکز ملانوماکروفاژی موجود در کبد می‌تواند به‌عنوان شاخص تنش القا شده توسط آلاینده‌های مختلف در محیط‌های آبی مورد بررسی قرار گیرند. مراکز ملانوماکروفاژی مشاهده شده در بافت‌های ماهیان تیمار شده با BaP، باکتری و یا هر دو استرسور در مطالعه حاضر ارتباط زیادی با خون ریزی و تخریب سلول‌های خونی قرمز در آنها داشت. در نتیجه القای تنش، میزان خون رسانی به بافت افزایش یافته و حجم زیاد خون منجر به شکستن برخی گلبول‌های قرمز خونی در نتیجه برخورد با یکدیگر و یا با دیواره رگ می‌شود. با تخریب این سلول‌ها، هموگلوبین نیز تجزیه شده و به دو بخش هم (حاوی آهن) و گلوبین تبدیل می‌شود. وجود هم در بافت به‌عنوان یک ماده اگزوژن توسط ماکروفاژها شناسایی شده و بلعیده می‌شود. با بلعیدن هم، ماکروفاژها به رنگ تیره (سیاه) دیده می‌شوند (Suresh, 2009).

منابع

پیغان، ر.؛ مهجور، ا.، ۱۳۸۶. آسیب شناسی ماهی . تالیف : آ .ژ. روبرتس. انتشارات دانشگاه شهید چمران، ۱۱۰۰صفحه.

Aas, E.; Beyer, J.; Goksoyr, A., 2000. Fixed wavelength fluorescence (FF) of bile as a monitoring tool for polyaromatic hydrocarbon exposure in fish: an evaluation of compound specificity, inner filter effect

pollution and fish gill morphology, In: Val, A.L., Kapoor, B.G. (Eds.), Fish adaptation. Enfied, Science Publishers, 203-231 pp.

Genten, F.; Terwinghe, E.; Danguy, A., 2009. Atlas of fish histology. Science publisher, 92-98: 215p.

Health, A.G., 1995. Water Pollution and Fish Physiology, second ed. CRC Lewis Publishers, Boca Raton, FL. 125-140 pp.

Hinton, D.E.; Lauren, D.J., 1990. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. In: Adams, S.M. (Ed.), Biological Indicators of Stress in Fish: American Fisheries Symposium 8. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, 51-66pp.

Hinton, D.E.; Segner, H.; Braunbeck, T., 2001. Toxic responses of the liver. In: Schlenk, D., Bensen, W.H. (Eds.), Organs. In: Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts, vol. 1. Taylor & Francis, London, 224–268pp.

Lafferty, K.D.; Porter, J.W.; Ford, S.E., 2004. Are diseases increasing in the ocean?. Annual Review in Ecology, Evolution and Systematic, 35: 31–54.

Liu, E.C., 2004. Immunotoxicity of nonhalogenated polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Dean, J.H., Luster, M.I., Munson, A.E., Amos, H. (Eds.), Immunotoxicology and Immunopharmacology. Raven Press, New York, 291–303pp.

Mohamed, F.A., 2001. Impacts of environmental pollution in the southern region of Lake Manazalah, Egypt, on the histological structures of the liver and intestine of Oreochromis niloticus and Tilapia zillii. Journal of Egypt Academic Society of Environment Development, 2: 25-42.

Ortiz, R. M.; Wade, C. E.; Ortiz, C.L., 2001. Effects of prolonged fasting on plasma cortisol and TH in postweaned northern elephant seal pups. American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 208: 790-795.

and signal interpretation. Biomarkers, 5 (1): 9-23.

Alderman, M.; Clifton, G., 1993. Induction of DNA strand breakage and apoptosis in the eel *Anguilla anguilla*. Marine Environmental Research, 54: 517–520.

Altinok, I.; Capkin, E., 2008. Histopathology of Rainbow trout exposed to sublethal concentrations of methiocarb or endosulfan. Review Aquatic Science, 4:210-223.

Arkoosh, M.; Clemons, E.; Huffman, P.; Kagley, A., 2001. Increased susceptibility of juvenile Chinook salmon to vibriosis after exposure to chlorinated and aromatic compounds found in contaminated urban estuaries. Journal of Aquatic Animal Health, 13: 257–268.

Balebona, M.C.; Andreu, M.J.; Bordas, M.A.; Zorrilla, I.; Morinigo, M.A.; Borrego, J.J., 1998. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for cultured gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.). Application of Environmental Microbiology, 64: 4269–4275.

Bernet, D.; Schmidt, H.; Meier, W.; Burkhardt-Holm, P.; Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. Journal of Fish Disease, 22: 25-34.

Campanelli, A.; Sanchez-Politta, S.; Saurat, J.H., 2008. *Cutaneous ulceration* after an octopus bite: infection due to Vibrio alginolyticus, an emerging pathogen. Annual Dermatol Venereol, 135: 225–227.

Carlson, E.A.; Li, Y.; Zeliko, J.T., 2002. The Japanese medaka (*Oryzias latipes*) model: applicability for investigating the immunosuppressive e□ects of the aquatic pollutant benzo[a]pyrene (B[a]P). Marine Environment Research, 54: 565-568.

Costiner, M.S., 2010. Polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. Journal of Environmental Pathological and Toxicology, 3: 537-567.

Di Giulio, R.T.; Hinton, D.E., 2008. The toxicology of fishes. Boca Raton, Taylor and Francis Group, 1101p.

Fernandes, M.N.; Mazon, A.F., 2008. Environmental

the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. Ecotoxicoogy and Environmental Safety, 69: 112-120.

Suresh, N., 2009. Effect of benzo(alpha)pyrene on liver, spleen and kidney melanomacrophage centers in Tilapia mossambica. Journal of Environmental Biology, 30(40): 505-508.

Thophon, S.; Kruatrachue, M.; Upatham, E.S.; Pokethitiyook, P.; Sahaphong, S.; Jaritkhuan, S., 2003. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcalifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. Environmental Pollution, 121: 307–320.

Wang, X.; Sato, T.; Xing, B.; Tao, S., 2005. Health risks of heavy metals to general public in Tianjin, chin via consumption of vegetable and fish. Science of the Total Environment, 350: 28-37.

Yin, Y.; Fu, W.; Fu, M.; He, G.; Traore, L., 2007. The immune effects of edible fungus polysaccharides compounds in mice. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 16: 258-60.

Osman, C.; Merkwirth, C.; Langer, T., 2009. Prohibitins and the functional compartmentalization of mitochondrial membranes. Journal of Cell Science, 122: 3823–3830.

Prosser, M.; Michael, A.; Wolfgang, K., 2011. Multistressor interactions in the zebrafish (*Danio rerio*): Concurrent phenanthrene exposure and Mycobacterium marinum infection. Aquatic Toxicology, 102: 177-185.

Rodrigues, R.V.; Miranda-Filho, K.C.; Gusmao, E.P.; Moreira, C.B.; Romano, L.A.; Sampaio, L.A., 2010. Deleterious effects of water-soluble fraction of petroleum, diesel and gasoline on marine pejerrey Odontesthes argentinensis larvae. Science of the Total Environment, 408: 2054-2059.

Sikkema, J.; de Bont, J.A.M.; Poolman, B., 1994. Intercalations of cyclic hydrocarbons with biological membranes. Journal of Biology and Chemistry, 20: 8022–8028.

Simonato, J.D.; Guedes, C.L.B.; Martinez, C.B.R., 2008. Biochemical, physiological and histological changes in