

## اثرات بنزوآلفاپایرن و باکتری *Vibrio alginolyticus* بر ساختار بافتی اندام‌های ایمنی ماهی هامور معمولی *Epinephelus coioides*

نجمه نوروزی<sup>۱</sup>، نگین سلامات<sup>۲\*</sup>، غلامرضا اسکندری<sup>۳</sup>، محمد موسوی<sup>۴</sup>

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، پست الکترونیکی: [noroz.najmeh@yahoo.com](mailto:noroz.najmeh@yahoo.com)
- ۲- استادیار گروه زیست دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، پست الکترونیکی: [salamatnegin@yahoo.com](mailto:salamatnegin@yahoo.com)
- ۳- استادیار موسسه تحقیقات شیلات ایران، پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور، اهواز، پست الکترونیکی: [skandari.gh@yahoo.com](mailto:skandari.gh@yahoo.com)
- ۴- دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، پست الکترونیکی: [mousavimohammad@gmail.com](mailto:mousavimohammad@gmail.com)

تاریخ پذیرش: ۹۳/۲/۷

\* نویسنده مسوول

تاریخ دریافت: ۹۳/۸/۱۵

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

### چکیده

در تحقیق حاضر ۲۰۰ عدد ماهی هامور معمولی *Epinephelus coioides* در مهرماه ۱۳۹۰ از مرکز تحقیقات شیلات بندر امام خمینی (ره) (استان خوزستان) تهیه و به ۷ گروه تقسیم شدند: ۱- گروه شاهد، ۲- گروه حلال، ۳- گروهی از ماهیان که تنها باکتری *Vibrio alginolyticus* (BaC) را دریافت نمودند، ۴ و ۵- گروه‌هایی که ابتدا غلظت‌های ۲۰ mg/kg و ۲۰۰ mg/kg از بنزوآلفاپایرن (BaP) و پس از ۴۸ ساعت باکتری و ویبریو را دریافت نمودند، ۶ و ۷- دو گروه دیگر نیز ۲۰ mg/kg و ۲۰۰ mg/kg از BaP را دریافت نمودند. در روزهای ۱، ۲، ۴، ۷، ۱۴ آزمایش نمونه‌های بافتی از راس کلیه و طحال ماهیان اخذ شد و جهت انجام مطالعات بافتی در محلول بافر فرمالین تثبیت شدند. مقاطعی به ضخامت ۵ میکرومتر از نمونه‌ها تهیه و با هماتوکسیلین و اتوزین رنگ‌آمیزی شدند. نتایج حاکی از تغییرات بافتی شامل افزایش مراکز ملانوماکروفاژی، مشاهده باکتری‌ها به صورت انفرادی، افزایش تراکم لنفوسیتی و خونریزی در نمونه‌های طحال و راس کلیه همه تیمارها به ویژه در روزهای ۴ و ۷ بود.

کلمات کلیدی: بنزوآلفاپایرن، *Vibrio alginolyticus*، طحال، راس کلیه، هامور معمولی.

### ۱. مقدمه

ارتباط با حیات آبزیان و سلامت انسان‌ها داشته و انسان را به سمت تکثیر و پرورش مصنوعی آبزیان به ویژه ماهیان سوق داده است. از سویی تکثیر مصنوعی ماهیان، غنی‌سازی دریاها و پرورش ماهی در حوضچه‌ها و استخرها، با مسائل زیست‌محیطی جدید و تلفات زیاد ناشی از بیماری‌ها همراه بوده است. هم

محدودیت منابع آبی و استحصال از ذخایر آبزیان، آلودگی دریاها و اقیانوس‌ها در نتیجه پساب کارخانجات صنعتی، فاضلاب‌های بنادر و شهرها، همگی حکایت از عمق نگرانی در

محیط‌های آبی به‌طور گسترده‌ای پخش شده‌اند (Campanelli et al., 2008). این ترکیب به‌سرعت توسط موجوداتی که در معرض آن هستند جذب شده و می‌تواند به‌طور مستقیم از غشاء پلاسمایی انواع سلول‌ها بگذرد. این ترکیب در تمام محیط‌های ساحلی با حلالیت نسبت بالایی در آب وجود داشته و برای مهره داران بسیار سمی است و منجر به نکروز وسیع بافتی و تضعیف ایمنی می‌شود (Suresh, 2009).

ماهی هامور معمولی *Epinephelus coioides* از ماهیان پیش ماده و یکی از گونه‌های مهم و تجاری خلیج فارس با ارزش غذایی زیاد بوده که از بازار پسندی خوبی در جنوب کشور برخوردار است. از آنجایی که مطالعات اندکی روی اثرات آلاینده‌های آلی بر مقاومت سامانه ایمنی این ماهی در مقابل ایجاد بیماری توسط باکتری فرصت طلبی نظیر *Vibrio alginolyticus* صورت گرفته است، لذا تحقیق حاضر با هدف بررسی اثرات متقابل بنزوآلفا پیرن (به‌عنوان یکی از مهمترین آلاینده‌های آلی که بنا به مطالعات قبلی صورت گرفته، از جمله PAH‌های موجود در خلیج فارس است) و باکتری *V. alginolyticus* بر ساختار بافتی اندام‌های ایمنی (طحال و راس کلیه) ماهی هامور معمولی صورت گرفت.

## ۲. مواد و روش‌ها

۲۰۰ عدد ماهی هامور معمولی (*E. coioides*) (میانگین وزنی  $180 \pm 7/9$  گرم و میانگین طولی  $20/8 \pm 0/2$  سانتی‌متر و همگی نابالغ) در مهر ماه ۱۳۹۰ از مرکز تحقیقات شیلات بندر امام خمینی (ره) (استان خوزستان) تهیه شد و پس از زیست‌سنجی، تا قبل از زمان آزمایش در تانک‌های ۶۰۰۰ لیتری حاوی آب دریای فیلتر شده‌ای که توسط اشعه ماورای بنفش ضد عفونی شده بود، نگهداری شدند. با شروع دوره آزمایش، ماهی‌ها به ۷ تانک ۳۰۰ لیتری که تا حجم ۲۰۰ لیتر با آب فیلتر شده و هوادهی شده دریا پر شده بود منتقل شدند، به‌طوری‌که ۲۰ عدد ماهی در هر تانک قرار داده شد. دوره سازگاری (آداپتاسیون) ۷ روز در نظر گرفته شد. در این دوره ماهیانی که نشانه‌های آشکاری از بیماری مانند بی‌حالی و شنای عجیب را نشان می‌دادند، از آزمایش حذف شدند.

میانگین دما  $26/5$  درجه سانتی‌گراد،  $pH=7/8$  و شوری برابر با  $39$  گرم بر لیتر بود که به‌طور روزانه کنترل می‌شدند. آب

اکنون بسیاری از کشورهای اصلی پرورش دهنده آبزیان به‌خصوص در شرق آسیا که بزرگ‌ترین تولیدکنندگان آن نیز در سطح جهان هستند) از بروز بیماری‌های آبزیان رنج می‌برند و این مشکل تاثیر عمیقی در جهت کاهش تولید آنها داشته است (Arunkumar et al., 2000).

در زمره بیماری‌های ماهیان، شناخت و مبارزه با بیماری‌های باکتریایی را باید مورد توجه خاص قرار داد. بسیاری از پاتوژن‌های باکتریایی ماهی قادر به ادامه حیات در خارج از بدن ماهی بوده و تنها تعداد کمی از آنها به‌صورت انگل اجباری وجود دارند. حتی این انگل‌های اجباری نیز قادرند به‌مدت قابل ملاحظه‌ای در درون بافت‌های میزبان زندگی کنند بدون اینکه اثرات زیان باری برای میزبان داشته باشند. معمولاً تنها به‌دنبال تغییر قابل توجه در فیزیولوژی میزبان بیماری‌های باکتریایی ظهور می‌کنند. بسیاری از عوامل باکتریایی به‌عنوان پاتوژن‌های فرصت طلب شناخته شده‌اند که تنها در موجودات آبی دچار تنش، منجر به بیماری می‌شوند (سلطانی، ۱۳۷۵). باکتری *Vibrio alginolyticus* باکتری فرصت طلب بوده که به‌عنوان بخشی از فلور میکروبی نرمال محیط‌های دریایی تلقی می‌شود. با این حال تحقیقات نشان داده‌اند که این باکتری در ماهیانی که در شرایط پر تنش زیست می‌کنند، قادر به ایجاد بیماری و بی‌ریزی است (Arunkumar et al., 2000).

آلودگی‌ها با تضعیف سامانه ایمنی موجود، به‌عنوان یکی از مهمترین عوامل ایجاد کننده شرایط مناسب برای پاتوژن‌های فرصت طلب مطرح هستند (Osman et al., 2009). هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی (Polycyclic aromatic hydrocarbons) (PAHs) از جمله مهمترین آلاینده‌هایی هستند که به جهت پایداری و مقاومت در زیست‌بوم‌های دریایی و دارا بودن اثرات شدید و طولانی مدت بر آبزیان بیشترین نگرانی را به خود اختصاص داده‌اند (دبیری، ۱۳۷۹). مطالعاتی که با هدف ارزیابی خطرات ایمونوتوکسیک این آلاینده‌ها صورت گرفته، نشان داده‌اند که تضعیف پاسخ‌های ایمنی ناشی از این زئوبیوتیک‌ها به‌طور عمده بر مقاومت موجودات نسبت به پاتوژن‌ها تاثیر می‌گذارند (Prosser et al., 2011).

بنزوآلفا پیرن (BaP) یکی از مهمترین ترکیبات PAH محسوب می‌شود که از سوختن ناقص مواد آلی مثل گازوئیل، زباله‌ها یا هر ماده حیوانی یا گیاهی دیگر به‌وجود می‌آید. بنزوآلفا پیرن دارای اثرات موتاژنیک، کارسینوژنیک و ایمونوتوکسیک بوده و در

Prosser et al.,) فعالیت زیاد یا کاهش اشتها) بررسی و کنترل شد (2011). غذادهی در طول دوره آزمایش صورت نگرفت.

### ۲-۲. اخذ نمونه‌های بافتی از ماهیان

نمونه‌های بافتی به ابعاد ۰/۵ سانتی‌متر از راس کلیه و طحال 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، جدا شد و در محلول ثبوت بافر فرمالین ده درصد قرار داده شد. نمونه‌ها سپس به آزمایشگاه تحقیقات بافت شناسی دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر منتقل گردید.

### ۲-۳. مطالعات هیستوپاتولوژیک

در آزمایشگاه بافت شناسی نمونه‌های بافتی از محلول فرمالین خارج و جهت انجام مراحل معمول پاساژ بافتی به مدت ۲۱ ساعت به دستگاه تمام اتوماتیک هیستوکینت مدل Tissue tek، RX-11B، rotary، japan انتقال داده شد. سپس با استفاده از دستگاه میکروتوم (مدل LEICA-RM2245) برش‌هایی به ضخامت ۵ تا ۶ میکرومتر از هر یک از نمونه‌ها تهیه و جهت مطالعه با میکروسکوپ نوری، با استفاده از رنگ آمیزی معمولی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شدند. مقاطع بافتی آماده شده با استفاده از میکروسکوپ نوری Olympus و با بزرگ‌نمایی‌های متفاوت بررسی و تصاویر مناسبی توسط دوربین Dinolite Digital Microscope مجهز به نرم افزار Dino capture تهیه شد.

### ۳. نتایج

#### ۳-۱. تغییرات هیستوپاتولوژیک راس کلیه

در نمونه‌های راس کلیه اخذ شده از گروه‌های شاهد و حلال ضایعه هیستوپاتولوژیکی مشاهده نشد و این بافت دارای ساختار طبیعی بود. ساختار راس کلیه متشکل از بافت لنفاوی و سلول‌های خونی بالغ و نابالغ بود (شکل ۱). در دومین روز آزمایش در نمونه‌های راس کلیه در همه گروه‌های آزمایشی آسیب هیستوپاتولوژیکی دیده نشد و ظاهر بافت در همه گروه‌ها کاملاً طبیعی و فاقد تفاوت با نمونه‌های کنترل بود.

تانک‌ها هر دو روز یک‌بار از طریق کف تانک‌ها و با عمل سیفون کردن تعویض شد (موحدی نیا و همکاران، ۱۳۹۱).

### ۲-۱. طراحی آزمایش و تیمار بندی

جهت انجام این پروژه ۷ تانک حاوی ۲۰ عدد ماهی هامور معمولی به‌طور تصادفی به ۷ تیمار تقسیم شدند:

(۱) ماهیان تانک شماره ۱ هیچ تزریقی دریافت نکرده و به‌عنوان ماهیان شاهد در نظر گرفته شدند.

(۲) به ماهیان تانک شماره ۲ فقط روغن نارگیل تزریق شد. این گروه جهت ارزیابی اثرات احتمالی روغن نارگیل مورد بررسی قرار گرفتند.

(۳) به ماهیان تانک شماره ۳، فقط باکتری *V. alginolyticus* با غلظت ۱۰۴ cfu/ml تزریق شد.

(۴) به ماهیان تانک شماره ۴، تنها ۲۰ mg/kg بنزوالفاپایرن (غلظت پایین) تزریق شد.

(۵) ماهیان تانک شماره ۵ تنها بنزوالفاپایرن با غلظت ۲۰۰ mg/kg (غلظت بالا) را دریافت نمودند.

(۶) به ماهیان تانک شماره ۶، ترکیبی از *V. alginolyticus* (با غلظت ۱۰۴ cfu/ml) و بنزوالفاپایرن (با غلظت ۲۰ mg/kg) تزریق شد.

(۷) ماهیان تانک شماره ۷، نیز ترکیبی از *V. alginolyticus* (با غلظت ۱۰۴ cfu/ml) و بنزوالفاپایرن (با غلظت ۲۰۰ mg/kg) را دریافت نمودند.

همه تزریق‌ها به‌صورت درون صفاقی انجام شدند. به این صورت که بعد از بیهوش کردن ماهیان (با ماده بیهوشی ۲- فنوکسی اتانول) بدن آنها با یک پارچه تمیز به آرامی خشک شده و سپس تزریق انجام گرفت. بنزوالفاپایرن به صورت محلول در ۱ ml/kg روغن نارگیل به ماهیان تزریق شد. باکتری‌ها پیش از تزریق در بافر فسفات به حجم مورد نیاز رسانده شده و سوسپانسیون حاصله ۴۸ ساعت پس از تزریق بنزوالفاپایرن به‌صورت درون صفاقی به ماهیان تزریق شد. طول دوره آزمایش از زمان تزریق باکتری تا مدت ۱۴ روز در نظر گرفته شد، زیرا بنا به گزارش‌های این دوره زمانی برای پیشرفت بیماری ویبریوزیس کافی است. در طی این ۱۴ روز، وضعیت زنده ماندن و مرگ و میر ماهی‌ها کنترل گردید و هر تغییر غیرطبیعی در فاکتورهای وضعیتی یا رفتاری ماهی (مثل شنای غیرنرمال و بی هدف،

باکتری‌های منفرد در سراسر بافت راس کلیه تیمار باکتری در این روز مشاهده گردید (شکل ۱). وسعت ضایعات در تیمارهای ترکیبی به ویژه تیمار *Vibrio*+high BaP بیشتر از سایر تیمارها بود به طوری که به هم ریختگی بافت شدیدی در آنها مشاهده شد (شکل ۱).

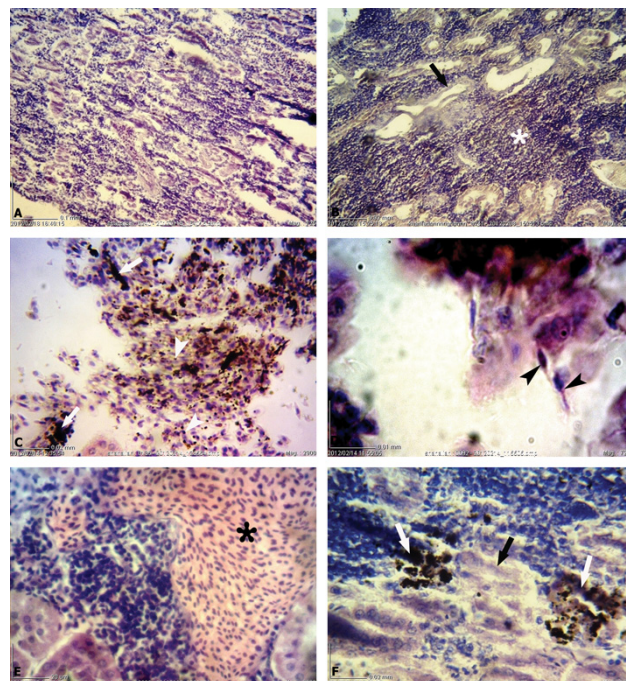
در روز چهاردهم، ساختار بافتی راس کلیه ماهیان تیمار شده با BaP نسبتاً طبیعی بود و تنها خونریزی اندکی در تیمار BaP، ۲۰۰ mg/kg گزارش شد (شکل ۱). در راس کلیه تیمار باکتری و تیمارهای ترکیبی نیز در این روز ضایعات اندکی نظیر پرخونی جزئی مشاهده گردید (شکل ۱). در مجموع در تمامی روزهای نمونه برداری تنوع و وسعت ضایعات مشاهده شده تابع الگوی زیر بود:

*Vibrio*+high BaP > *Vibrio*+low BaP > BaP ۲۰۰ mg/kg > BaP ۲۰ mg/kg

### ۲-۳. تغییرات هیستوپاتولوژیک طحال

در نمونه‌های طحال اخذ شده از ماهیان شاهد و حلال ضایعه هیستوپاتولوژیکی مشاهده نشد و طحال دارای ساختار طبیعی بود. در این نمونه‌ها، کپسول، پولپ‌های قرمز و سفید و عروق خونی به وضوح قابل مشاهده بودند (شکل ۲). در نمونه‌های طحالی اخذ شده از تمام تیمارها در دومین روز نمونه‌برداری نیز آسیب هیستوپاتولوژیکی قابل توجهی مشاهده نشد. تنها خونریزی جزئی در نمونه‌های طحال تیمارهای ترکیبی مشاهده گردید (شکل ۲). در روز چهارم ضایعات هیستوپاتولوژیک شامل خونریزی، افزایش تجمعات ملانوماکروفاژی و تراکم لنفوسیتی در تیمارهای BaP ضایعات مشاهده گردید که وسعت عوارض در تیمار BaP، ۲۰۰ mg/kg، بیش از تیمار BaP، ۲۰ mg/kg بود (شکل ۲).

در روز هفتم در تیمارهای BaP، ضایعات وسیع‌تری نسبت به روز چهارم دیده شد که شامل افزایش قابل توجهی در وسعت پولپ‌های سفید در مقایسه با پولپ‌های قرمز طحال و مراکز ملانوماکروفاژی بود. در این روز افزایش مراکز ملانوماکروفاژی، از بین رفتگی سازمان بافتی، خونریزی، افزایش تراکم سلول‌های ایمنی و افزایش تجمعات هموسیدرین در بافت طحال تیمار باکتری گزارش گردید (شکل ۲). در گروه‌های ترکیبی در روز هفتم ضایعات نسبت به روز دوم و



شکل ۱: تصاویر میکروسکوپ نوری ساختار بافتی طبیعی (A) و تغییرات بافتی راس کلیه ماهی هامور معمولی (B, C, D, E, F): تراکم لنفوسیتی (ستاره سفید)، دژنراسیون اپیتلیوم لوله‌های کلیوی (پیکان سیاه)، مراکز ملانوماکروفاژی (پیکان سفید)، سلول‌های خونی تخریب شده (سر پیکان سفید)، باکتری درون بافت راس کلیه (سر پیکان سیاه)، خونریزی (ستاره سیاه). A. (H&E;×۷۲۵)، B و C و E و F (H&E;×۲۹۰۰)، D (H&E;×۷۲۵۰).

آسیب‌های بافتی ایجاد شده در ماهیان تیمار شده با BaP در روز چهارم شامل خونریزی، سلول‌های خونی تخریب شده، افزایش مراکز ملانوماکروفاژی، افزایش تراکم لنفوسیت‌ها، دژنراسیون سلولی لوله‌های کلیوی موجود در راس کلیه بود. اما وسعت این ضایعات در تیمار BaP، ۲۰۰ mg/kg، بیش از تیمار BaP، ۲۰ mg/kg بود (شکل ۱). اگرچه در این روز راس کلیه تیمار باکتری دارای ساختار بافتی نسبتاً طبیعی بود، ولی خونریزی و مراکز ملانوماکروفاژی در راس کلیه تیمارهای ترکیبی (*Vibrio*+low BaP و *Vibrio*+high BaP) ثبت گردید که شدت این ضایعات در تیمار *Vibrio*+high BaP بیش از تیمار دیگر بود (شکل ۱).

نمونه‌برداری در روز هفتم در راس کلیه تیمارهای BaP خونریزی، سلول‌های خونی تخریب شده و افزایش قابل توجه وسعت تراکم لنفوسیتی گزارش گردید که شدت این ضایعات در تیمار BaP، ۲۰۰ mg/kg، بیش از تیمار BaP، ۲۰ mg/kg بود (شکل ۱). همچنین ضایعاتی از قبیل خونریزی، افزایش قابل ملاحظه تجمعات لنفوئیدی، افزایش مراکز ملانوماکروفاژی، گلبول‌های قرمز تخریب شده، کلنی‌های کوچکی از باکتری و یا

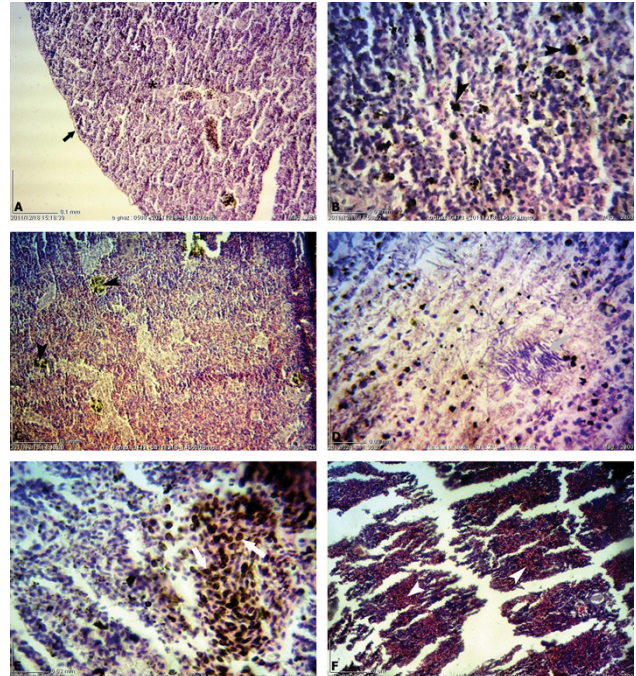
#### ۴. بحث و نتیجه‌گیری

راس کلیه در ماهیان اندام لنفوئیدی (لنفوای) و هماتوپویتیک اصلی بوده که با در برداشتن لنفوسیت‌ها، در تولید آنتی بادی نیز دخالت دارد. نقش راس کلیه به‌عنوان مکان اصلی تولید سلول-های اریتروئیدی، لنفوئیدی و میلوئیدی ثابت شده است (Reynaud and Deschaux, 2006). طحال از اندام‌های ایمنی است که در ماهیان استخوانی دارای وظایفی از قبیل خون‌سازی، به دام انداختن آنتی‌ژن‌ها، تسهیل تحریک و تکثیر لنفوسیت‌ها است. این اندام یکی از بافت‌های هدف پاتوژن‌های عفونی و آلاینده‌ها است که در نتیجه مواجهه با سموم عفونی و غیرعفونی دچار تغییراتی در ساختار بافتی و عملکرد فیزیولوژیک می‌شود (Aguis and Roberts, 2003).

در روزهای نخستین آزمایش (روزهای اول و دوم نمونه‌برداری) ضایعات پاتولوژیکی در طحال و راس کلیه در نتیجه القاء BaP، باکتری *V. alginolyticus* و ترکیبی از این دو تشنور مشاهده نشد و هر دو اندام دارای ساختار طبیعی بودند. معمولاً ساختار بافتی اندام‌ها پس از گذشت مدتی از القاء آلاینده‌ها یا عوامل عفونی متاثر می‌شوند (Anderson and Zeeman, 1995). باکتری پس از گذشت یک دوره ۲ تا ۳ روزه فعال شده و منجر به تغییر عملکرد فیزیولوژیک اندام‌ها و ساختار بافتی آنها می‌شوند. به همین دلیل در روزهای اول در ماهیان تیمار شده با باکتری *V. alginolyticus* ضایعات بافتی مشاهده نشد. از طرفی در ماهیان تیمار شده با BaP نیز تغییرات بافتی در روزهای نخستین مشاهده نگردید، چرا که تغییر ساختار بافتی اندام‌ها آخرین پاسخ به القاء تشنورها است (Anderson and Zeeman, 1995) و BaP ابتدا منجر به تغییر شرایط فیزیولوژیک بدن شده تا جایی‌که به تدریج این تغییرات به ایجاد ضایعات سلولی و بافتی منتهی می‌شوند.

در مطالعه حاضر آسیب‌های پاتولوژیک وارد شده به بافت‌ها در ماهیان تیمار شده با غلظت‌های مختلف BaP پس از روز چهارم کاهش یافته و تا روز ۱۴ ضایعه‌ای در هیچ یک از بافت‌های مورد مطالعه در این تیمارها مشاهده نشد. Aas و همکاران (۲۰۰۰)، در مطالعه ماهی آتلانتیک کاد (*Gadus morhua*)، بیشینه تجمع PAHها را در روز چهارم مشاهده نمودند و پس از آن میزان PAHها رو به کاهش گذارد. این محققین عنوان نمودند که دلیل اصلی کاهش اثرات اغلب PAHها

چهارم افزایش یافته بودند. در این روز در بافت طحال تیمار *Vibrio+low BaP* به ویژه درون عروق خونی کلی‌های باکتری قابل رویت بودند (شکل ۲).



شکل ۲: تصاویر میکروسکوپ نوری ساختار بافتی طبیعی (A) و تغییرات بافتی طحال ماهی هامور معمولی (B, C, D, E, F): پولپ قرمز (ستاره سفید)، پولپ سفید (ستاره سیاه)، کپسول طحال (پیکان سیاه)، افزایش مراکز ملانوماکروفاژی (سر پیکان سیاه)، کلی باکتری درون بافت طحال (پیکان خاکستری)، سلول‌های خونی تخریب شده (پیکان سفید)، خونریزی (سر پیکان سفید). A و C (H&E;×725)، B و D و E و F (H&E;×۲۹۰۰).

در تیمار *Vibrio+high BaP* در روز هفتم ضایعات وسیع‌تری در مقایسه با سایر تیمارها شامل افزایش قابل توجه مراکز ملانوماکروفاژی، تراکم قابل ملاحظه تجمعات لنفوئیدی، از بین رفتن یکپارچگی بافت، خونریزی و افزایش گلبول‌های قرمز شکسته شده گزارش شد (شکل ۲). بافت طحال تیمارهای BaP در روز چهاردهم دارای ساختار نسبتاً طبیعی بود، تنها خونریزی مختصری در تیمار ۲۰۰ mg/kg BaP مشاهده شد (شکل ۲). در این روز ضایعات هیستوپاتولوژیک شامل خونریزی و به هم ریختگی شدید بافتی در تیمار باکتری و تیمارهای ترکیبی مشهود بود (شکل ۲). در مجموع در تمامی روزهای نمونه‌برداری تنوع و وسعت ضایعات مشاهده شده تابع الگوی زیر بود:

*Vibrio+high BaP* > *Vibrio+low BaP* > BaP ۲۰۰ mg/kg > BaP ۲۰ mg/kg

همین دلیل ملانوماکروفاژها به‌عنوان شاخصی برای کیفیت آب از سنجش تاثیر آلودگی‌ها و یا کمبود اکسیژنی مطرح هستند، چرا که اندازه یا فراوانی ملانوماکروفاژها در شرایط محیطی تنش‌زا افزایش می‌یابد (Aguis and Roberts, 2003).

Osman و همکاران (۲۰۰۹)، گزارش نمودند که ۲ تا ۶ هفته پس از تیمار ماهی *Oreochromis niloticus* با فلز مس ضایعاتی نظیر احتقان، افزایش تعداد فولیکول‌های لنفونیدی، افزایش مراکز ملانوماکروفاژی و نکروز انعقادی کانونی در سراسر پارانشیم طحال و راس کلیه مشاهده شد (Osman et al., 2009). این محققین وجود احتقان و پرخونی سیاهرگ‌های این بافت‌ها را به‌دلیل افزایش خون‌رسانی طحال پس از مواجهه با تنش بیان نمودند. همچنین گزارش نمودند شکسته شدن تعداد زیادی از سلول‌های خونی قرمز منجر به افزایش مراکز ملانوماکروفاژی می‌شود. عوامل عفونی و غیرعفونی قادرند تعداد لنفوسیت‌ها، توانایی زنده ماندن و شاخص بافتی اندام‌های ایمنی در ماهیان را تحت تاثیر قرار دهند (Arunkumar et al., 2000).

#### منابع

- دبیری، م.، ۱۳۷۹. آلودگی محیط‌زیست (هوا- آب- خاک- صوت). نشر اتحاد، تهران، صفحه ۳۹۹.
- سلطانی، م.، ۱۳۷۵. بیماری‌های باکتریایی ماهی. انتشارات سازمان دامپزشکی کشور با همکاری موسسه نشر جهاد وابسته به جهاد کشاورزی، صفحات ۲۱ تا ۲۳.
- موحدی‌نیا، ع.؛ سواری، ا.؛ سلاطی، ا.، ۱۳۹۱. سازگاری‌های فراساختاری آبشش ماهی شانک زردباله (*Acanthopagrus latus*) تحت شرایط اسمزی مختلف. مجله تحقیقات دامپزشکی، ۶۷: ۱۶۵-۱۷۴.
- نوروزی، ن.؛ سلامات، ن.؛ اسکندری، غ.؛ موسوی، م.، ۱۳۹۳. پاسخ‌های بافتی کبد ماهی هامور معمولی *Epinephelus coioides* در نتیجه قرار گرفتن کوتاه مدت در معرض ترکیبی از بنزوآلفاپایرن و باکتری *Vibrio alginolyticus*. نشریه اقیانوس‌شناسی، ۱۹: ۱۱-۲۰.
- 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 and signal interpretation. *Biomarkers*, 5 (1): 9-23.

بعد از ۴ روز به‌خاطر افزایش بیوترنسفورماسیون آن‌ها و تبدیل آن‌ها به متابولیت‌هایشان است (Aas et al., 2000). این محققین گزارش نمودند که میزان PAHها بعد از یک هفته کاملاً کاهش یافت که این مطلب نشانگر توانایی بالای ماهیان در دفع این ترکیبات است.

از سوی دیگر، آسیب بافتی در ماهیان تیمار شده با باکتری تا روز هفتم آزمایش به حداکثر میزان خود رسیده و پس از آن رو به کاهش و بهبود بافتی گذاشت. دوره بیماری‌زایی باکتری ۶ تا ۷ روز بوده و پس از آن دوره بیماری‌زایی باکتری به اتمام می‌رسد. همچنین افزایش آسیب‌های بافتی در تیمارهای ترکیبی تا روز هفتم قابل مشاهده بود و از سوی دیگر وسعت آسیب‌های بافتی در این تیمارها بیش از سایر تیمارها بود. در مطالعه Arkoosh و همکاران (۲۰۰۱) نیز افزایش حساسیت ماهیان آزاد قرار گرفته در معرض آلاینده‌ها نسبت به پاتوژن‌های باکتریایی مشاهده گردید. به اعتقاد این محققین اثرات آلاینده‌های شیمیایی بر قابلیت ایمنی و حساسیت پذیری در مقابل بیماری‌ها قابل انکار نیست (Altinok and Capkin, 2008). این محققین دریافتند که پاسخ ایمنی مهار شده در ماهیان اکسپوز شده با آلاینده‌ها نسبت به آنتی ژن‌های اختصاصی، منجر به افزایش مرگ و میر ماهیان در مواجهه با باکتری *V. anguillarum* در محیط طبیعی می‌شود.

Suresh (2009) بیان کرد که تغییرات مراکز ملانوماکروفاژی موجود در بافت‌ها می‌توانند به‌عنوان شاخص تنش القا شده توسط آلاینده‌های مختلف در محیط‌های آبی مورد بررسی قرار گیرند (Romano et al., 2002). مراکز ملانوماکروفاژی مشاهده شده در بافت‌های ماهیان تیمار شده با BaP، باکتری و یا هر دو تنشور در مطالعه حاضر ارتباط زیادی با خونریزی و تخریب سلول‌های خونی قرمز در آنها داشت. در نتیجه القای تنش، میزان خون‌رسانی 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 (نوروزی و همکاران، ۱۳۹۳). هم در بافت به‌عنوان یک ماده آگزوزن توسط ماکروفاژها شناسایی شده و بلعیده می‌شود. با بلعیدن هم، ماکروفاژها به رنگ تیره (سیاه) دیده می‌شوند (Romano et al., 2002). مراکز ملانوماکروفاژی در حالت طبیعی نیز در بافت‌های خون‌ساز کلیه و طحال وجود دارند، ولی گاهی در نتیجه عوامل و جراحات مزمن توسعه می‌یابند. به

- Osman, M.M.; EL-Fiky, S.A.; Soheir, Y.M.; Abeer, A.I., 2009. Impact of Water Pollution on Histopathological and Electrophoretic Characters of *Oreochromis niloticus*. *Fish Pathology*, 17: 34-102.
- Prosser, M.; Michael, A.; Wolfgang, K., 2011. Multistressor interactions in the zebrafish: Concurrent phenanthrene exposure and *Mycobacterium marinum* infection. *Aquatic Toxicology*, 102: 177-185.
- Reynaud, S.; Deschaux, P., 2006. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: a review. *Aquatic Toxicology*, 77: 229-238.
- Romano, N.; Ceccariglia, S.; Mastrolia, L.; Mazzini, M., 2002. Cytology of lymphomyeloid head kidney of Antarctic fishes *Trematomus bernacchii* (Nototheniidae) and *Chionodraco hamatus* (Channichthyidae). *Tissue and Cell*, 34: 63-72.
- Suresh, N., 2009. Effect of benzo[alpha]pyrene on liver, spleen and kidney melanomacrophage centers in tilapia *mossambica*. *Journal of Environmental Biology*, 30(4): 505-508.
- Yin, Y.; Fu, W.; Fu, M.; He, G.; Traore, L., 2007. The immune effects of edible fungus polysaccharides compounds in mice. *Asian Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16: 258-60.
- Agius, C.; Roberts, R.J., 2003. Melano-macrophage centers and their role in fish pathology. *Journal of Fish Disease*, 26: 499-509.
- Altinok, I.; Capkin, E., 2008. Histopathology of rainbow trout exposed to sublethal concentrations of methiocarb or endosulfan. *Review Aquatic Science*, 4: 210-223.
- Anderson, D.P.; Zeeman, M.F.G., 1995. Immunotoxicology in fish[M]. In: *Fundamentals of aquatic toxicology: Environmental fate, and risk assessment* (Rand G., ed.). Washington: Taylor and Francis, 79: 371-404.
- 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.
- Arunkumar, R.I.; Rajasekaran, P.; Michael, R.D., 2000. Differential effect of chromium compounds on the immune response of the African mouth breeder *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Fish and Shellfish Immunology*, 10: 667-676.
- Campanelli, A.; Sanchez-Politta, S.; Saurat, J.H., 2008. Cutaneous ulceration after an octopus bite: infection due to *Vibrio alginolyticus*, an emerging pathogen. *Annual of Dermatology and Venereology*, 135: 225-227.