

## بررسی تغییرات سطوح هورمون اریتروپوئیتین و ضایعات پاتولوژیک بافت کلیه هامورماهی لکه زیتونی منقوط (*Epinephelus stoliczkae*) در پاسخ به آلاینده کروم

پروین صادقی<sup>۱\*</sup>، فرانک کازرونی<sup>۲</sup>، احمد سواری<sup>۳</sup>، عبدالعلی موحدی‌نیا<sup>۴</sup>،

علیرضا صفاهیه<sup>۵</sup>، دانیال اژدری<sup>۶</sup>

- ۱- استادیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، استان سیستان و بلوچستان، چابهار، پست الکترونیکی: [parvin.sadeghi@gmail.com](mailto:parvin.sadeghi@gmail.com)
- ۲- استادیار گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، استان تهران، تهران، پست الکترونیکی: [fk\\_kazerouni@yahoo.com](mailto:fk_kazerouni@yahoo.com)
- ۳- استاد گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، استان خوزستان، خرمشهر، پست الکترونیکی: [savari32@yahoo.com](mailto:savari32@yahoo.com)
- ۴- استادیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، استان خوزستان، خرمشهر، پست الکترونیکی: [amovahedinia@yahoo.com](mailto:amovahedinia@yahoo.com)
- ۵- استادیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، استان خوزستان، خرمشهر، پست الکترونیکی: [a.Safahieh@Kmsu.ac.ir](mailto:a.Safahieh@Kmsu.ac.ir)
- ۶- استادیار، مرکز تحقیقات شیلات آبهای دور- چابهار، استان تهران، تهران، پست الکترونیکی: [danielajdari@yahoo.com](mailto:danielajdari@yahoo.com)

تاریخ پذیرش: ۹۴/۳/۲۶

\* نویسنده مسوول

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۲۰

© نشریه علمی - پژوهشی اقیانوس‌شناسی ۱۳۹۴، تمامی حقوق این اثر متعلق به نشریه اقیانوس‌شناسی است.

### چکیده

پاسخ‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و هیستولوژیکی برای تشخیص وجود آلاینده‌ها در محیط زیست موجودات، مورد استفاده قرار می‌گیرند. در این پژوهش تغییرات میزان اریتروپوئیتین و ضایعات بافتی کلیه هامورماهی لکه زیتونی منقوط تحت تاثیر کروم در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. هامورماهیان لکه زیتونی منقوط به مدت ۲۱ روز تحت القاء سه غلظت مختلف از فلز کروم (۳/۶، ۷/۳۱ و ۱۴/۶ میلی‌گرم بر لیتر) قرار داده شدند و در فواصل زمانی ۰/۵، ۱، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز، از ماهی‌ها نمونه خون و بافت کلیه گرفته شد. دو فاز افزایش و کاهش معنی‌دار در میزان اریتروپوئیتین در نمونه‌های تحت القاء در مقایسه با گروه کنترل ثبت گردید ( $P < 0/05$ ). میزان تجمع کروم در بافت کلیه در تمامی زمان‌ها با گروه کنترل اختلاف آماری معنی‌داری داشت ( $P < 0/05$ ). ضایعات هیستوپاتولوژیکی متنوعی در بافت کلیه مشاهده شد و اختلاف آماری معنی‌داری در شاخص تغییرات هیستوپاتولوژیک در تمامی زمان‌ها در سه غلظت مختلف کروم ثبت گردید ( $P < 0/05$ ).

## ۱. مقدمه

دفع متابولیت‌های متنوعی از جمله زنبوبوتیک‌ها شناخته شده است. از این رو بافت کلیه به صورت دائم تحت تاثیر اثرات ناشی از مواد سمی و شیمیایی است. با این تفاسیر کلیه در بسیاری از مطالعات بیولوژیک و فیزیولوژیک به‌عنوان اندام هدف مورد بررسی قرار می‌گیرد (Filazi et al., 2003; Au, 2004). اریتروپوئیتین (EPO) هورمونی گلیکوپروتئینی است که به‌عنوان تنظیم‌کننده اصلی تولید گلبول قرمز عمل می‌کند و نقش آن در ساخت گلبول قرمز پستانداران و ماهیان شناخته شده است (Chu et al., 2007; Fried, 2009; Fisher, 2010). در پستانداران علاوه بر کبد و کلیه که مکان‌های اصلی ترشح این هورمون می‌باشند، مغز استخوان و طحال نیز قادر به ترشح هورمون اریتروپوئیتین هستند. اما در بیشتر ماهی‌ها، کلیه محل اصلی تولید هورمون اریتروپوئیتین و ساخت گلبول‌های قرمز است (Bagnis et al., 2001; Lai et al., 2006). ردیابی سلولی در کلیه نشان داده است که هورمون اریتروپوئیتین در سلول‌های لوله‌های پروگزیمال ساخته می‌شود (Elliott et al., 2008; Wiwanitkit, 2013). ترشح هورمون اریتروپوئیتین در شرایط مورد نیاز نشان‌دهنده عملکرد صحیح کلیه است و زمانیکه سنجش سطح این هورمون در پلاسما با مطالعات هیستوپاتولوژی و یا مولکولی همراه باشد، می‌تواند نشانگر مناسبی برای بررسی عملکرد طبیعی کلیه محسوب شوند (Horiguchi et al., 2000). دریای مکران و خلیج چابهار، به عنوان بزرگترین خلیج در حاشیه سواحل دریای مکران، زیستگاه گروه متنوعی از موجودات آبی هستند. طی چند سال اخیر، فعالیت‌های گسترده صنعتی و توریستی زیادی در این منطقه به اجرا در آمده است و پیش‌بینی می‌شود آبیان این منطقه با قرارگرفتن در معرض آلودگی‌ها به‌ویژه فلزات سنگین در معرض آسیب باشند. یکی از آبیان ارزشمند دریای مکران هامورماهی لکه زیتونی منقوط (*Epinephelus stoliczkae*) متعلق به خانواده هامورماهیان است. این گونه در منطقه مذکور در تمام طول سال در دسترس است و شرایط آزمایشگاهی را به سهولت تحمل می‌کند. به‌طوریکه میزان مرگ و میر این ماهی در شرایط انتقال و اسارت بسیار پایین است. این ماهی به‌صورت جمعیت‌های پر تعداد در منطقه مطالعاتی وجود دارد و این امر جمع‌آوری آن را به تعداد مورد نیاز امکان‌پذیر می‌کند. لذا، تحقیق حاضر با هدف بررسی تغییر میزان اریتروپوئیتین پلاسما و

کروم به‌عنوان یک آلاینده محیطی مهم، در نتیجه فعالیت‌های بشری به محیط‌های آبی وارد می‌شود و از طرف آژانس حفاظت از محیط زیست (EPA) جزء ۱۲۹ آلاینده در الویت قرار دارد (Irwin et al., 1997). کروم ۶ ظرفیتی به دلیل اثرات جهش‌زایی و سرطان‌زایی به‌عنوان یک ماده سمی برای سیستم‌های زیست‌شناختی شناخته می‌شود (Hodgson, 2004; Velma et al., 2009). این فلز به دلیل سمیت بالا می‌تواند سبب تغییرات متابولیکی (Vutukuru, 2005)، آسیب به ساختارهای بافتی (Mishra and Mohanty, 2008) و تغییر فاکتورهای بیوشیمیایی و خونی (Subashini et al., 2005) در گونه‌های مختلف ماهیان شود. افزایش بیش از حد کروم در ماهی‌ها سبب کاهش وزن، افزایش مصرف اکسیژن، اختلال در تولیدمثل، افزایش هماتوکریت، آسیب‌های بافتی و اختلال در تنظیم اسمزی می‌شود. در غلظت‌های بالای حضور کروم در محیط، سطح بدن ماهی از موکوس پوشیده شده و اپیتلیوم تنفسی آبشش‌ها آسیب می‌بیند و ماهی دچار خفگی می‌شود (Moore et al., 1990). پاسخ‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی، سلولی، هیستولوژیکی، رفتاری و جمعیتی از جمله نشانگرهای زیستی هستند که برای تشخیص و شناسایی وجود آلاینده‌ها در محیط زیست موجودات، مورد استفاده قرار می‌گیرند و نشان‌دهنده وضعیت مطلوب یا نامطلوب زیست محیطی می‌باشند (Van der Oost et al., 2003; Au, 2004). پارامترهای خون‌شناسی از جمله نشانگرهای زیستی مهم شناخته شده در ماهی‌ها می‌باشند. از آنجا که پارامترهای خونی نسبت به عوامل تنش‌زای محیطی حساس بوده و عکس‌العمل نشان می‌دهند، به‌عنوان یک روش غیرمخرب در ارزیابی سلامت ماهیان کاربرد دارند و می‌توانند اطلاعات مفیدی در مورد وضعیت سلامت فیزیولوژیک موجود و بوم‌سامانه ارائه دهند (Van der Oost et al., 2003). وضعیت بافت‌شناسی کلیه نیز از جمله پارامترهای ایمنی‌شناسی هستند، که قابلیت استفاده به‌عنوان نشانگرهای زیستی در ماهیان در معرض آلاینده‌های محیطی را دارند (Wester et al., 1994). کلیه ماهی نقش مهمی در حفظ هومئوستاز اسمزی بدن بازی می‌کند. علاوه بر این کلیه حجم عظیمی از جریان خون را دریافت می‌کند و به‌عنوان مسیر اصلی

WTW 2A20- (مدل pH از pH و Thermoworks) (1012) استفاده گردید.

به منظور سنجش میزان هورمون اریتروپوئیتین، از ماهیان تیمار شده با فلز کروم در ۱، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز پس از آغاز آزمایش، خون‌گیری از ناحیه ساقه دمی انجام گرفت. خون جمع‌آوری شده به لوله‌های آزمایش بدون هرگونه ماده ضد انعقاد انتقال یافت و جهت جداسازی سرم، به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ دور بر دقیقه قرار داده شد. سرم به آرامی توسط سرنگ کشیده شده و به لوله‌های اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل گردید و به وسیله درب پلاستیکی و پارافیلیم بسته و تا زمان سنجش هورمون در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  - نگهداری شد. سنجش میزان هورمون اریتروپوئیتین پلاسمای با استفاده از دستگاه الیزا ریدر مدل (Anthos 2020) و کیت الیزای اریتروپوئیتین (NM56011) شرکت IBL آلمان در طول موج جذب ۴۵۰ نانومتر طبق دستورالعمل کیت انجام پذیرفت (Lai et al., 2006). مقادیر سنجیده شده بر حسب  $\text{mU/mL}$  بیان گردید. حداقل مقدار حد تشخیص کیت اریتروپوئیتین  $1/2 \text{ mU/mL}$  بود. در پایان هر مرحله از خون‌گیری، بافت کلیه ماهی برای سنجش میزان کروم در ظروف پلاستیکی مناسب در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  - نگهداری شد (Ogoyi et al., 2011). بخشی از بافت کلیه نیز برای مطالعات بافت‌شناسی در محلول تثبیت‌کننده بوئن قرار داده شد و پس از ۴۸ ساعت از محلول بوئن خارج و تا زمان انجام مراحل بعدی در الکل ۷۰٪ نگهداری شد (Velma and Tchounwou, 2010). برای سنجش میزان کروم موجود در بافت کلیه، نمونه‌های خشک شده در دستگاه خشک‌کننده انجمادی Operon (ساخت کره) در هاون چینی کاملاً پودر و همگن گردید. سپس یک گرم از بافت پودر شده به لوله مخصوص هضم انتقال داده شد و ۱۰ میلی‌لیتر اسیدنیتریک غلیظ (۶۵٪) به آن افزوده شد و به مدت یک ساعت در دمای اتاق و ۳-۴ ساعت در دمای ۹۰-۱۴۰ درجه سانتی‌گراد بر روی Hotplate digester و زیر هود قرار گرفته تا هضم انجام گردید. پس از سرد شدن، با استفاده از کاغذ صافی واتمن ۴۲ فیلتر شده و به بالن ژوژه ۵۰ میلی‌لیتر منتقل گردیدند و با آب ۲ بار تقطیر به حجم رسانده شدند (Moopam, 1999; Mitra et al., 2012). سنجش میزان کروم با استفاده از دستگاه جذب اتمی GBC مدل Savant AAS انجام شد و نتایج برحسب میکروگرم بر گرم در وزن خشک گزارش گردید.

تغییرات پاتولوژیکی ایجاد شده در بافت کلیه هامورماهی لکه زیتونی منقوت تحت تاثیر غلظت‌های مختلف کروم صورت گرفت.

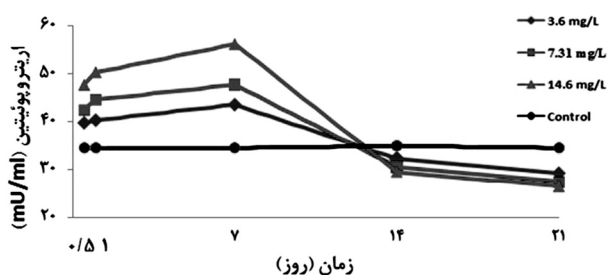
## ۲. مواد و روش‌ها

جهت انجام تحقیق حاضر، حدود ۲۰۰ قطعه هامورماهی لکه زیتونی منقوت با میانگین وزن  $(\text{Mean} \pm \text{SE}) 389.5 \pm 92.4$  گرم و میانگین طول کل  $29.6 \pm 2.2$  سانتی‌متر از خلیج چابهار به روش صید انتظاری و به وسیله قلاب دستی و طعمه در دی ماه ۱۳۹۰ صید گردید. ماهی‌های صید شده به صورت زنده با استفاده از مخزن انتقال نمونه و پمپ هوا به کارگاه تکثیر و پرورش مرکز تحقیقات شیلات آب‌های دور چابهار انتقال داده شدند. به منظور سازگاری ماهی با شرایط آزمایشگاهی، نمونه‌ها به مدت دو هفته در تانک‌های فایبرگلاس محتوی آب دریای فیلترشده و مجهز به سیستم هوادهی و گرمایی و تحت دوره نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری شدند و دوبار در روز (صبح و عصر) با استفاده از غذای تازه (گوشت ماهی) به میزان ۲٪ وزن بدنشان تغذیه گردیدند. پس از طی دوره سازگاری، با توجه به غلظت حدکشندگی متوسط فلز کروم برای هامورماهی لکه زیتونی منقوت (صادقی و همکاران، ۱۳۹۳) و میزان تجمع این آلاینده در رسوبات منطقه مطالعاتی، سه غلظت مختلف از فلز کروم ( $3/6$ ،  $7/31$  و  $14/6$  میلی‌گرم بر لیتر کروم برابر با ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد غلظت حدکشندگی (LC50) که برابر با  $73/09 \text{ mg/L}$  بود) برای آزمایش سمیت تحت‌کشنده در نظر گرفته شد. آزمایش با سه تکرار و یک کنترل برای هر غلظت و ۱۲ قطعه ماهی در هر تانک انجام گرفت. طول دوره آزمایش ۲۱ روز بود. به منظور جلوگیری از تجمع آمونیاک و دیگر متابولیت‌ها حدود ۳۰ درصد آب هر تانک یک روز در میان تخلیه و آب جدید جایگزین گردید (Kavitha et al., 2010). فاکتورهای فیزیکی‌وشیمیایی آب تانک‌ها در طول مدت زمان آزمایش به صورت مداوم کنترل شدند و سعی گردید تا حدامکان تمام شرایط ثابت باقی بماند تا تنها عامل متغیر، غلظت‌های آلاینده کروم باشد (Di Giulio and Hinton, 2008). میانگین شوری  $37 \pm 0.5$  ppt، pH برابر با ۸/۱ و دما  $27 \pm 0.5$  درجه سانتی‌گراد و اکسیژن محلول  $6/5 \pm 0.5$  میلی‌گرم در لیتر بود. جهت چک کردن روزانه شوری از شوری سنج چشمی (مدل ATAGO)، دما از ترمومتر دیجیتالی (مدل

داده‌های مربوط به هر سنجش به صورت مقدار میانگین  $\pm$  خطای استاندارد (Mean  $\pm$  SE) بیان شده است. اختلاف بین این داده‌ها و مقایسه میانگین نمونه‌ها در تیمارهای مختلف با سنجش واریانس یکطرفه (One-Way ANOVA) در نرم افزار SPSS، نسخه ۱۶ انجام گرفت. در صورت وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها، پس آزمون Duncan برای تفکیک داده‌ها انجام گردید و اختلاف در سطح اطمینان بالای ۹۵٪ ( $P < 0/05$ ) بررسی شد. پس از پایان تجزیه و تحلیل، نمودارها در محیط برنامه Microsoft Office Excel 2010 رسم شدند.

### ۳. نتایج

مقایسه آماری نتایج حاصل از سنجش میزان اریتروپوئیتین پلاسماي خون هامورماهی لکه زیتونی منقوت تحت القاء کروم نشان داد که میزان این هورمون، از اولین زمان نمونه‌گیری تا روز ۷ از دوره القاء در هر سه غلظت مختلف کروم افزایش معنی‌داری را در مقایسه با گروه کنترل داشته است و پس از آن تا پایان دوره روند کاهشی بوده، به‌طوری‌که میزان این هورمون در روز ۱۴ و ۲۱ کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشته است ( $P < 0/05$ ). دامنه مقادیر اریتروپوئیتین در پلاسما بین  $56/11 \pm 0/42$  و  $26/47 \pm 1/6$  میلی‌یونیت بر میلی‌لیتر ثبت گردید که بیشترین مقدار در غلظت  $14/6$  میلی‌گرم بر لیتر کروم و در روز ۷ و کمترین میزان در سه غلظت مختلف کروم در روز ۲۱ مشاهده شد (شکل ۱).



شکل ۱: تغییرات هورمون اریتروپوئیتین در زمان‌ها و غلظت‌های مختلف کروم در هامورماهی لکه زیتونی منقوت

نتایج به دست آمده از سنجش میزان تجمع کروم در بافت کلیه هامورماهی لکه زیتونی منقوت تحت القاء در شکل ۲ ارائه شده است. دامنه مقادیر کروم تجمع یافته در بافت کلیه این ماهی  $137/1 - 35/61$  میکروگرم بر گرم وزن خشک بود. مقایسه نتایج آنالیز آماری نشان داد که میزان تجمع کروم در بافت کلیه در تمامی

برای مطالعات بافت‌شناسی، کلیه مراحل پاساژ بافتی شامل آبیگری، شفاف‌سازی و آغشتگی توسط دستگاه پاساژ بافت یا هیستوکینت (اتوتکنیکون) مدل RX-11B, Tissue tek rotary, Japan و تحت برنامه زمان‌بندی شده، انجام گرفت. سپس از قالب‌های پارافینه با استفاده از دستگاه روتاری میکروتوم (مدل LEICA-RM2245)، برش‌هایی با ضخامت ۴-۵ میکرون تهیه گردید و با استفاده از محلول‌های هماتوکسیلین و اتوزین رنگ‌آمیزی شدند (Liu et al., 2011). لام‌های بافتی آماده شده با استفاده از میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین عکس‌برداری دیجیتال بررسی گردید. به‌منظور ارزیابی نتایج پاتولوژیک، تغییرات هیستوپاتولوژیکی مشاهده شده در کلیه هامورماهی بر اساس رده‌بندی انجام شده توسط Mitrovic- و Poleksic (1994) Tutundzic (جدول ۱) (درجه یک: تغییرات بافتی اندک، درجه دو: تغییرات بافتی متوسط، درجه سه: تغییرات بافتی شدید). در پایان شاخص تغییرات هیستوپاتولوژیک<sup>۱</sup> (HAI) با توجه به تغییرات پاتولوژیک ایجاد شده در بافت کلیه هامورماهی لکه زیتونی منقوت در غلظت‌های مختلف کروم با استفاده از رابطه ۱ محاسبه گردید:

$$HAI = (1 \times \Sigma I) + (10 \times \Sigma II) + (100 \times \Sigma III) \quad (1)$$

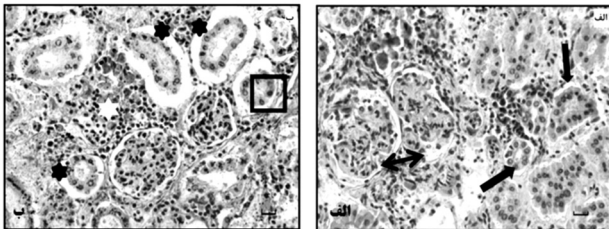
در این رابطه I، II و III مراحل تغییرات بافتی و  $\Sigma$  تعداد تغییرات بافتی هر مرحله را نشان می‌دهد. مقادیر ۱۰-۰ این شاخص نشان‌دهنده عملکرد طبیعی اندام، ۲۰-۱۱ نشان‌دهنده آسیب اندک اندام، ۵۰-۲۱ نشان‌دهنده آسیب متوسط اندام، ۱۰۰-۵۰ نشان‌دهنده آسیب شدید اندام و مقادیر بالای ۱۰۰ نشان‌دهنده آسیب بسیار شدید و غیرقابل بازگشت در اندام است (Poleksic and Mitrovic-Tutundzic, 1994; Viana et al., 2013).

جدول ۱: تغییرات هیستوپاتولوژیک کلیه: مرحله I: تغییرات بافتی اندک، مرحله II: تغییرات بافتی متوسط، مرحله III: تغییرات بافتی شدید

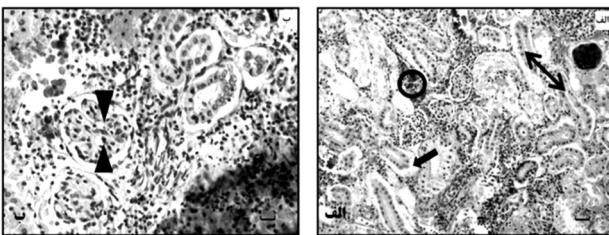
مرحله آسیب	تغییرات هیستوپاتولوژیکی کلیه
I	اتساع مویرگ‌های گلومرولی، جدا شدن اپیتلیوم از غشای پایه، هیپرتروفی و هیپرپلازی سلول‌های کپسول بومن، هیپرتروفی و هیپرپلازی سلول‌های توبولی، نفوذ لوکوسیتی، اتساع لومن لوله‌ای
II	کاهش فضای ادراری، قطرات هیالین، هیپرتروفی هسته، واکنش‌دهنده شدن، تورم ابری، تجمع ملانوماکروفازها، هموراژی، کاهش فضای ادراری لوله‌ها، ضخیم شدن غشای پایه گلومرول
III	نکروز سلول‌های توبولی، انسداد لومن لوله‌ای، وجود خون در فضای کپسول بومن

<sup>1</sup> Histopathological Alteration Index

هیستوپاتولوژیکی همچون جدا شدن لایه اپیتلیومی از غشای پایه، کاهش یا انسداد فضای لوله‌های ادراری، کاهش یا انسداد فضای لومن، افزایش تجمعات ملانوماکروفاژی، نکروز سلول‌های اپیتلیالی لوله‌های ادراری، هیپرتروفی کلافه مویرگی، اتساع مویرگ گلوبولوی، هیپرتروفی و واکوئولاسیون سلول‌های اپیتلیالی لوله‌های ادراری، نفوذ لوکوسیتی، ضخیم شدن غشای پایه گلوبولول و هیپرتروفی هسته سلول لوله‌های ادراری در بافت نمونه‌های تحت القاء مشاهده گردید. تصاویر منتخبی از این عوارض در شکل‌های ۴، ۵ و ۶ ارائه شده است. نتایج بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیکی کلیه هامورماهی لکه زیتونی منقوط تحت القاء غلظت‌های مختلف کروم نیز به تفکیک زمان‌های نمونه‌برداری در جدول ۲ ارائه شده است.



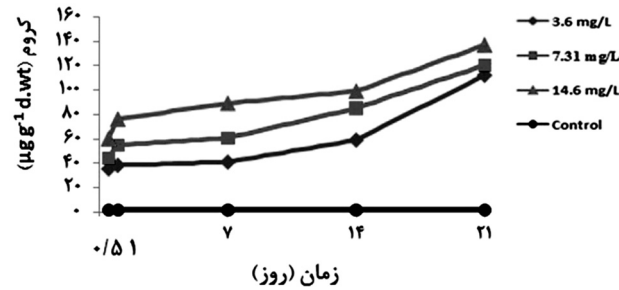
شکل ۴: تصاویر میکروسکوپ نوری از عوارض بافتی مشاهده شده در بافت کلیه هامورماهی لکه زیتونی منقوط در تیمار اول (۳/۶ میلی‌گرم بر لیتر کروم) (هماتوکسیلین-ائوزین، ۴۰X- مقیاس ۱۰ μm الف) جدا شدن اپیتلیوم از غشای پایه (پیکان سیاه)، کاهش فضای ادراری (پیکان دوسر) ب) جدا شدن اپیتلیوم از غشای پایه (ستاره سیاه)، پیکنوز هسته سلول‌های لوله‌های ادراری (مربع)، نفوذ لوکوسیتی (ستاره سفید)



شکل ۵: تصاویر میکروسکوپ نوری از عوارض بافتی مشاهده شده در بافت کلیه هامورماهی لکه زیتونی منقوط در تیمار دوم (۷/۳۱ میلی‌گرم بر لیتر کروم) الف) جدا شدن اپیتلیوم از غشای پایه (پیکان سیاه)، افزایش مراکز ملانوماکروفاژی (دایره)، کاهش فضای لومن لوله‌های ادراری (پیکان دوسر سیاه)، ب) اتساع مویرگ‌های گلوبولوی (سر پیکان سیاه). الف: (هماتوکسیلین-ائوزین، ۲۰X- مقیاس ۱۰ μm)؛ ب: (هماتوکسیلین-ائوزین، ۴۰X- مقیاس ۱۰ μm)

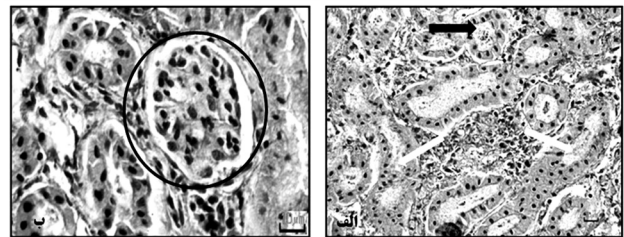
بر اساس نتایج حاصل از بررسی اسلایدهای بافتی، شاخص تغییرات هیستوپاتولوژیکی کلیه در سه غلظت مختلف کروم روند

زمان‌ها با گروه کنترل (۲/۰۵ میکروگرم بر گرم وزن خشک) اختلاف آماری معنی‌داری داشته است ( $P < 0.05$ ). بر اساس نتایج به دست آمده بیشترین تجمع کروم در ۳ تیمار مربوط به غلظت ۱۴/۶ میلی‌گرم بر لیتر کروم و روز ۲۱ آزمایش است.



شکل ۲: میزان تجمع کروم در بافت کلیه هامورماهی لکه زیتونی منقوط تحت القاء غلظت‌های مختلف کروم در زمان‌های مختلف

مطالعه بافت‌شناسی کلیه هامورماهی لکه زیتونی منقوط نشان داد، که ساختار بافتی نمونه‌های گروه کنترل طبیعی بود. جسمک‌های کلیوی و لوله‌های ادراری با ساختار طبیعی در میان بافت همبند داریستی قرار داشتند. کپسول بومن با دو لایه جداری (بافت پوششی سنگفرشی ساده) و احشایی (یک لایه سلول پدوسیت)، فضای ادراری با اندازه طبیعی و کلافه مویرگی در جسمک کلیوی مشاهده شد. لوله‌های ادراری دارای یک لایه اپیتلیوم مکعبی تا استوانه‌ای کوتاه و حفره مرکزی مشخصی بودند (شکل ۳).



شکل ۳: تصویر میکروسکوپ نوری از ساختار طبیعی کلیه هامورماهی لکه زیتونی منقوط در گروه کنترل (هماتوکسیلین-ائوزین: ۴۰X- مقیاس ۱۰ μm) الف) لوله پروگزیمال (پیکان سیاه)، لوله جمع‌کننده ادراری (پیکان سفید)، ب) جسمک کلیوی (دایره)

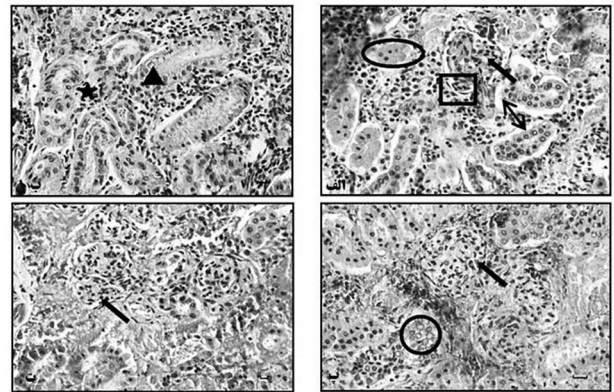
مقایسه نمونه‌های تحت القاء کروم با گروه کنترل نشان داد، که عوارض هیستوپاتولوژیکی متنوعی در بافت کلیه هامورماهی لکه زیتونی منقوط تحت تنش ایجاد شده است. نوع و شدت تغییرات هیستوپاتولوژیکی ایجاد شده در بافت کلیه با توجه به غلظت کروم و مدت زمان القاء تفاوت‌هایی داشت. عوارض

( $P < 0.05$ ). با توجه به مقادیر شاخص هیستوپاتولوژیک کلیه هامورماهی لکه زیتونی منقوط در تیمارهای مختلف کروم بر اساس رده‌بندی ارائه شده در جدول ۱ می‌توان نتیجه گرفت که ضایعات پاتولوژیک ایجاد شده در تمامی تیمارها پس از ۷ روز القاء کروم از نوع غیرقابل ترمیم و برگشت‌ناپذیر بوده و عملکرد طبیعی اندام را مختل می‌کند. درحالی‌که مقدار این شاخص در گروه کنترل بیانگر عملکرد طبیعی بافت کلیه است.

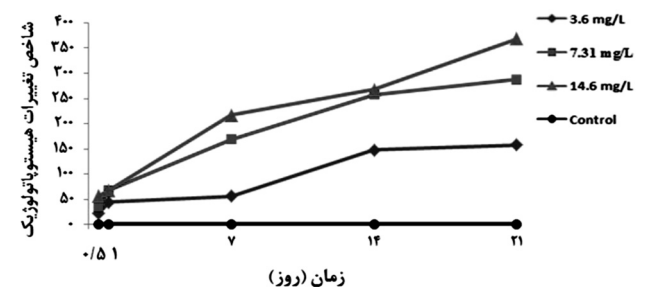
#### ۴. بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش هورمون اریتروپوئیتین و شاخص‌های خونی به عنوان پاسخ فیزیولوژیک کلیه در مقابل آلاینده کروم مورد مطالعه قرار گرفت. کسب اطلاع از سطوح EPO به عنوان هورمون خون‌ساز در بدن ماهی و به تبع آن تغییرات تعداد گلبول‌های قرمز خون ماهی حایز اهمیت است. علیرغم اهمیت این هورمون، تنها مطالعات اندکی در مورد خصوصیات مولکولی و تعیین توالی ژن مسئول سنتز این هورمون در برخی از ماهیان آب شیرین صورت گرفته است و مطالعاتی در رابطه با تغییر سطح اریتروپوئیتین در شرایط کمبود اکسیژن در ماهیان آب شیرین و یک گونه ماهی دریایی انجام شده است (Lai et al., 2006; Chu et al., 2007). با وجود اینکه ماهی‌ها متنوع‌ترین گروه مهره‌داران هستند و گونه‌های بسیاری را شامل می‌شوند، اما مطالعات در خصوص اریتروپوئیتین ماهی تنها مربوط به پاسخ ماهی در مقابل کاهش اکسیژن بوده است (Nogawa-Kosaka et al., 2010; Katakura et al., 2013). نقش اریتروپوئیتین در خون‌سازی پستانداران به‌خوبی بررسی و مستند شده است (Horiguchi et al., 1996; Kakuta, 2002; Chou et al., 2004) اما در مورد ماهیان استخوانی عالی اطلاعات جامعی وجود ندارد. با این تفاسیر، پژوهشی در مورد بررسی اثر آلاینده‌های محیطی روی سطوح اریتروپوئیتین پلاسمای خون ماهی صورت نگرفته است. لذا در این تحقیق تغییرات سطوح اریتروپوئیتین پلاسمای در مقابل آلاینده کروم در ماهی دریایی هامورماهی لکه زیتونی منقوط بررسی گردید. با بررسی نتایج حاصل از سنجش میزان هورمون اریتروپوئیتین در پلاسمای خون هامورماهی لکه زیتونی منقوط تحت القاء کروم در آزمایشگاه، مشخص شد که میزان این هورمون تا روز ۷ دوره القاء در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌دار و در روز ۱۴ و ۲۱ دوره، کاهش معنی‌داری داشته است ( $P < 0.05$ ).

افزایشی نشان داد (شکل ۷). نتایج، اختلاف آماری معنی‌داری بین HAI نمونه‌های کنترل و نمونه‌های تحت القاء نشان داد ( $P < 0.05$ ). با افزایش غلظت کروم و مدت زمان مواجهه ماهی با آلاینده، آسیب‌های بافتی ایجاد شده بیشتر بود و شاخص تغییرات هیستوپاتولوژیکی افزایش داشت، به‌طوری‌که بیشترین میزان افزایش مربوط به تیمار سوم و زمان ۲۱ روز بود. در هر کدام از تیمارها، اختلاف افزایش شاخص تغییرات هیستوپاتولوژیکی در زمان ۲۱ روز با زمان‌های دیگر نمونه‌گیری معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ).



شکل ۶: تصاویر میکروسکوپ نوری از عوارض بافتی مشاهده شده در بافت کلیه هامورماهی لکه زیتونی منقوط در تیمار سوم (۱۴/۶ میلی‌گرم بر لیتر کروم) (هماتوکسیلین-انوزین،  $40\times$  - مقیاس  $10\mu\text{m}$ ) الف) جدا شدن اپتلیوم از غشای پایه (پیکان دو سر)، اتساع مویرگ‌های گلومرولی (پیکان سیاه)، کاهش فضای ادراری (مربع)، کاهش یا انسداد فضای لومن لوله‌های ادراری (بیضی) (ب) هیپرتروفی و واکوئوله شدن بعضی سلول‌های لوله‌های ادراری (سر پیکان سیاه)، نفوذ لوکوسیتی (ستاره سیاه) (پ) واکوئوله شدن هسته سلول‌های لوله‌های ادراری (دایره)، کاهش یا انسداد فضای ادراری (پیکان سیاه) (ت) کاهش یا انسداد فضای ادراری (پیکان سیاه).



شکل ۷: شاخص تغییرات هیستوپاتولوژیکی (HAI) کلیه هامورماهی لکه زیتونی منقوط تحت القاء غلظت‌های مختلف کروم در زمان‌های مختلف.

نتایج آنالیز آماری نشان داد که در سه غلظت مختلف کروم اختلاف معنی‌داری بین مقدار شاخص تغییرات هیستوپاتولوژیکی با گروه کنترل در تمامی زمان‌ها وجود دارد ( $P < 0.05$ ). در تمامی زمان‌ها بین تیمار اول و سوم اختلاف آماری معنی‌دار بود

جدول ۲: تغییرات هیستوپاتولوژیک کلیه در هامورهای لکه زیتونی منقوت تحت القاء غلظت‌های مختلف کروم. مرحله I: تغییرات اندک، مرحله II: تغییرات متوسط، مرحله III: تغییرات شدید

ضایعات پاتولوژیک															مرحله آسیب	
تیمار اول					تیمار دوم					تیمار سوم						
۰/۵	۱	۷	۱۴	۲۱	۰/۵	۱	۷	۱۴	۲۱	۰/۵	۱	۷	۱۴	۲۱		
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	I	اتساع مویزهای گلومرولی
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	I	جداشدن اپیتلیوم از غشای پایه
+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	I	هیپرتروفی و هیپرپلازی سلول‌های کپسول بومن
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	I	هیپرتروفی و هیپرپلازی سلول‌های توبولی
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	I	نفوذ لوکوسیتی
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	I	اتساع لومن لوله‌ای
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	II	انسداد فضای ادراری
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	II	تجمع ملانوماکروفاژی
+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	II	واکنش‌دهنده سلول‌های لوله ادراری
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	II	کاهش فضای ادراری لوله‌ها
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	II	هیپرتروفی هسته سلول‌ها
+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	II	ضخیم شدن غشای پایه گلومرول
-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	II	هموراژی
+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	III	نکروز سلول‌های توبولی
+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	III	وجود خون در فضای کپسول بومن
+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	III	انسداد لومن لوله‌ای

اریتروپوئیتین است (Jelkmann, 1992; Haidar et al., 1997) و کاهش یا فقدان اکسیژن سبب تحریک رونویسی ژن این هورمون در کلیه می‌شود (Mukundan et al., 2002; Horiguchi et al., 2006). با توجه به اینکه این هورمون در بافت کلیه ماهی سنتز می‌شود، هرگونه عاملی که سبب تخریب بافت کلیه شود، مانع از ترشح این هورمون به پلاسما می‌گردد. از این رو با توجه به مطالعات هیستوپاتولوژیکی کلیه در زمان‌های نمونه‌گیری و مشاهده آسیب‌های وارده به بافت کلیه در اثر القاء کروم، علت کاهش سطح اریتروپوئیتین بعد از روز ۷ دوره آزمایش ارتباط مستقیم با میزان آسیب‌دیدگی بافت کلیه دارد و همچنین ورود ماهی به فاز خستگی ناشی از تنش، ممکن است از علل دیگر کاهش این هورمون باشد. از سوی دیگر بررسی تعداد گلبول‌های قرمز ماهی نیز نشان داد که تعداد گلبول‌ها از روز ۷ دوره القاء تا پایان آزمایش کاهش معنی‌داری داشته است (Sadeghi et al., 2014)، که با کاهش میزان ترشح اریتروپوئیتین در این دوره کاملاً هم‌خوانی دارد و نشان‌دهنده نقش این هورمون در فرآیند خون‌سازی و این‌بار در ماهیان دریایی است. تنها مطالعه مربوط به بررسی اریتروپوئیتین ماهیان دریایی توسط Kakuta (2002) روی کفشک ماهی گونه *Pleuronectes yokohamae* در آب‌های ژاپن است. در این مطالعه ماهی به مدت ۷ روز تحت تأثیر سه دوز متفاوت کمبود اکسیژن قرار گرفت که میزان اریتروپوئیتین بافت کلیه طی ۱۲ ساعت اولیه آزمایش افزایش نشان داد. این محقق قادر به تشخیص اریتروپوئیتین در پلاسمای کفشک ماهی نشد و

کروم به عنوان یک عامل تنش‌زا سبب ایجاد اختلال در عملکرد طبیعی بدن می‌شود. یکی از مهمترین اختلالاتی که توسط کروم به وجود می‌آید، کاهش میل هموگلوبین جهت اتصال به اکسیژن است (Witeska and Kosciuk, 2003). به دنبال کاهش میزان اکسیژن خون ترشح هورمون اریتروپوئیتین افزایش می‌یابد (Lai et al., 2006) تا از طریق افزایش تولید گلبول قرمز تا حدودی با اختلال ایجاد شده که همان کاهش اکسیژن خون است، مقابله نماید. بنابراین روند افزایشی میزان اریتروپوئیتین پلاسما تا روز ۷ دوره القاء می‌تواند ناشی از این امر باشد. از سوی دیگر پس از ۷ روز، روند کاهشی میزان این هورمون مشاهده شد و در روز ۱۴ و ۲۱ میزان اریتروپوئیتین در غلظت‌های مختلف کروم نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد ( $P < 0.05$ ). افزایش میزان این هورمون تا روز ۷ دوره القاء را می‌توان با مرحله هشدار پاسخ موجود به تنش تفسیر نمود. به این صورت که با افزایش غلظت کروم و ایجاد تنش برای هامورهای، میزان اریتروپوئیتین تا حد قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد تا با عامل تنش‌زا مبارزه کند. پس از روز ۷ و با کاهش میزان اریتروپوئیتین تا حد میزان آن در نمونه‌های کنترل، مرحله مقاومت به تنش طی می‌شود و ماهی تلاش می‌کند با شرایط ایجاد شده تا حدی مقابله کند. پس از آن و در روز ۱۴ و ۲۱ میزان اریتروپوئیتین کاهش معنی‌داری می‌یابد که می‌تواند نشان‌دهنده مرحله خستگی باشد. از سوی دیگر، سلول‌های لوله‌های پروگزیمال کلیه محل اصلی ساخت هورمون

اریتروپوئیتین بافت کلیه را سنجش نمود. در مطالعه حاضر در ۱۲ ساعت اولیه آزمایش میزان هورمون اریتروپوئیتین خون هامورماهی لکه زیتونی منقوط افزایش چشمگیری داشت. این افزایش در مقایسه با گروه کنترل تا روز ۷ دوره مشاهده گردید و پس از آن تا پایان آزمایش سطح این هورمون در پلاسما کاهش یافت. بنابراین در هامورماهی لکه زیتونی منقوط سطح اریتروپوئیتین پلاسما در فاصله ۱۲ تا ۲۴ ساعت پس از شروع آزمایش افزایش یافته و تا روز ۷ دوره آزمایش به اوج افزایش خود می‌رسد.

از آنجا که عملکرد فیزیولوژیک کلیه در ماهی، حفظ تعادل مایعات و الکترولیت‌ها و ثابت نگهداشتن محیط داخلی بدن است و همچنین دریافت‌کننده حجم عظیمی از خون شریانی و مواد دفعی است، بنابراین به عنوان اندام مهمی در زمان مواجهه با آلاینده‌های محیطی محسوب می‌شود (Cengiz, 2006; Silva and Martinez, 2007). در بسیاری از مطالعات انجام شده بر روی ماهیان، تمایل بالای فلز کروم به تجمع در کلیه به تایید رسیده است و کلیه به عنوان اندام هدف اصلی تجمع فلز سنگین کروم در ماهی معرفی شده است (Romeo et al., 2000; Rauf et al., 2009; Szkoda et al., 2011). بررسی وضعیت کلیه یکی از راه‌های مطالعه اثرات ناشی از آلاینده‌های محیطی بر آبزیان است و از شاخص‌های مفید برای ارزیابی وضعیت سلامت ماهی محسوب می‌شود (Hinton and Lauren, 1990; Kurtovic et al., 2008). نتایج حاصل از سنجش آلاینده کروم در بافت کلیه هامورماهی لکه زیتونی منقوط تحت القاء کروم، در تمامی زمان‌های نمونه‌گیری نشان داد که میزان تجمع در نمونه‌های تحت القاء در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت ( $P < 0.05$ )، و این افزایش در غلظت‌های مختلف و زمان‌های مختلف اختلافاتی را با یکدیگر نشان داد. وجود ارتباط بین افزایش غلظت کروم و مدت زمان مواجهه با میزان تجمع کروم در نتایج مطالعات Palaniappan و Karthikeyan (۲۰۰۹)؛ Abdel-Baki و همکاران (۲۰۱۱)؛ Tabari و همکاران (۲۰۱۰) نیز گزارش گردیده است.

با توجه به اینکه میزان تجمع آلاینده‌ها در بدن آبزیان به عواملی مانند گونه، سن، جنس، وضعیت تولیدمثلی، عادات غذایی و سایر ویژگی‌های زیستی ماهی بستگی دارد (Brumley et al., 1998; Strydom et al., 2006) و با استناد به نتایج سنجش‌های این مطالعه و مقایسه آن با سایر تحقیقات در این زمینه می‌توان عنوان نمود که

هامورماهی لکه زیتونی منقوط با قابلیت تجمع غلظت بالای کروم در کلیه خود می‌تواند به عنوان شاخص زیستی آلودگی کروم معرفی گردد. بافت‌های بدن ماهی‌ها شاخص بسیار حساس به آلودگی آب هستند و تغییرات هیستولوژیک ماهی تحت تاثیر فلزات سنگین می‌تواند به عنوان چشم‌اندازی در بررسی و تخمین سطوح آلودگی محیط‌های آبی مورد استفاده قرار گیرد (Mela et al., 2007; Velmurugan et al., 2007; Mishra and Mohanty, 2008). از سوی دیگر، مطالعات آسیب‌شناسی بافتی ابزاری حساس و سریع برای تشخیص اثرات ترکیبات شیمیایی روی اندام‌های مختلف ماهی در شرایط آزمایشگاهی است. مطالعات هیستوپاتولوژیک به درک بهتر رابطه بین اثر آلاینده‌ها و پاسخ‌های زیست‌شناختی مختلف موجودات کمک می‌کند (Boran et al., 2013; Viana et al., 2010). کلیه اندام هدف مهم و مناسبی در مطالعات هیستوپاتولوژیکی است که برای بررسی میزان آسیب‌های بافتی و سلولی در مقابل تنش به همراه شاخص‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی در ماهی مورد مطالعه قرار می‌گیرد (Rabbito et al., 2005; Oliveira et al., 2006).

مطالعه هیستوپاتولوژیک کلیه هامورماهی لکه زیتونی منقوط تحت القاء کروم عوارض هیستوپاتولوژیک متنوعی را آشکار نمود که عبارتند از: اتساع مویرگ‌های گلومرولی، جداشدن اپیتلیوم از غشای پایه، هیپرتروفی و هیپرپلازی سلول‌های کپسول بومن، هیپرتروفی و هیپرپلازی سلول‌های توبولی، نفوذ لوکوسیتی، اتساع لومن لوله‌ای، کاهش فضای کپسول بومن، هیپرتروفی هسته، واکوئوله شدن، تجمع ملانوماکروفازها، هموراژی، کاهش فضای اداری لوله‌ها، ضخیم شدن غشای پایه گلومرول، وجود خون در فضای کپسول بومن، نکروز سلول‌های توبولی، انسداد لومن لوله‌ای.

نکروز لوله‌های کلیوی از عوارض شایعی است که در بیشتر مطالعات هیستوپاتولوژیکی به‌عنوان یکی از اثرات مخرب آلاینده‌ها بر بافت کلیه ماهی بیان می‌شود. از مهمترین علل تخریب لوله‌ها جریان پروتئین و تشکیل ذرات هیالینی در داخل سلول‌های لوله‌های اداری و در نتیجه هیپرتروفی و در نهایت پارگی سلول‌ها است. علت جریان پروتئین‌ها به داخل لوله‌ها و سلول‌ها، تغییرات ساختار گلومرول و افزایش نفوذپذیری غشای گلومرول می‌باشد. قطرات هیالن و تورم ابری از عوارض تخریب لوله‌ها است که جزء عوارض شایع بافت کلیه در ماهیان تحت تاثیر آلاینده‌های آب بروز می‌کند. در تورم ابری، سلول متورم شده و سیتوپلاسم آن دانه‌دار و



ساعت تحت القاء ۲۰ و ۴۰ میلی گرم بر لیتر کروم قرار گرفت. بررسی های هیستوپاتولوژیکی نشان داد که در غلظت ۲۰ میلی گرم بر لیتر کروم تغییراتی چون هیپرتروفی سلول های اپیتلیال و لوله های کلیوی، کاهش فضای لومن لوله ها، اتساع گلوامرولی و اتساع فضای کپسول بومن در بافت کلیه به وجود آمده است. اما تغییرات مشاهده شده در بافت کلیه تحت القاء ۴۰ میلی گرم بر لیتر کروم شامل آتروفی و دژنره شدن لوله های کلیوی و کپسول بومن بود. هیپرتروفی سلول های اپیتلیال و لوله های کلیوی، آتروفی و دژنره شدن لوله های کلیوی، کاهش فضای لومن لوله ها، اتساع گلوامرولی، اتساع فضای کپسول بومن، هیپرتروفی در سلول های بینابینی بافت کلیه و هسته سلول های لوله های ادراری، تجمع مراکز ملانوماکروفاژی از عوارض هیستوپاتولوژیکی هستند که در اثر القاء کروم در بافت ماهی گزارش گردیده اند (Silva and Martinez, 2007). تغییرات مشاهده شده در اثر القاء کروم در بافت کلیه هامورماهی لکه زیتونی منقوط با بسیاری از عوارض ذکر شده هم خوانی دارد.

همان طور که اشاره شد، مطالعه تغییرات سطح هورمون اریتروپوئیتین پلازما در هامورماهی لکه زیتونی منقوط نشان داد که میزان این هورمون در اثر مواجهه ماهی با کروم ابتدا افزایش یافته و سپس روند کاهشی را طی می کند. بیشترین میزان کاهش در تیمار سوم (۱۴/۶ میلی گرم بر لیتر) و در روز ۲۱ نمونه گیری ثبت شد. از آنجاییکه کلیه به عنوان مکان اصلی سنتز اریتروپوئیتین در ماهی معرفی شده است (Lai et al., 2006)، این تغییرات نشان دهنده بروز تخریب در بافت کلیه و ایجاد اختلال در سنتز این هورمون است. به طوریکه تخریب بافت کلیوی در هامورماهی لکه زیتونی منقوط مانع از سنتز و ترشح اریتروپوئیتین شد و در نهایت منجر به کاهش سطح این هورمون در پلازما گردید. بیشترین میزان تجمع کروم و به تبع آن بیشترین میزان تخریب بافت کلیه در غلظت بالاتر یعنی تیمار سوم کروم مشاهده شد. ارتباط مستقیم بین میزان عوارض هیستوپاتولوژیکی و مقدار تجمع آلاینده ها در بافت کلیه در مطالعات دیگری نیز گزارش شده است (Van der Oost et al., 2003; Farag et al., 2006; Tetreault et al., 2012). با این تفاسیر می توان بیان کرد که تغییرات هیستوپاتولوژیکی بافت کلیه هامورماهی لکه زیتونی منقوط می تواند شاخص زیستی مناسبی برای ارزیابی وضعیت سلامت ماهی و محیط زیست آن باشد.

ابری شکل می شود. دانه ها ریز یا درشت هستند و تقریباً به شکل قطرات هیالینی و ائوزینوفیلی در سیتوپلاسم ظاهر می شوند (Thophon et al., 2003; Boran et al., 2010).

مراکز ملانوماکروفاژی در پوست، کلیه، کبد، امتداد عروق لنفاوی و طحال ماهیان استخوانی عالی وجود دارد و به عنوان نشانگر غیراختصاصی سیتولوژیک جهت تشخیص سلامت ماهیانی که در معرض آلاینده های محیطی قرار دارند مورد استفاده قرار می گیرند. افزایش تعداد مراکز ملانوماکروفاژی از شایع ترین تغییرات بافت در پاسخ به تنش آلاینده ها و ترکیبات شیمیایی است (Mela et al., 2007; Haschek et al., 2010).

عارضه هیپرتروفی سلول های لوله های کلیوی از عوارض شایع دیگر در بافت کلیه است که در پاسخ به آلاینده ها و عوامل تنش زای محیطی بروز می کند. علت این عارضه هیپرپلازی اندامک های درون سیتوپلاسم و بزرگ شدن هسته و سلول در اثر آسیب است. دانه های بسیار ریزی درون سیتوپلاسم سلول های هیپرتروفی شده دیده می شود. حد و مرز این سلول ها به وضوح قابل تشخیص نیست. این عارضه سبب کاهش فضای داخلی لوله ها می گردد. تغییر در اندازه و ساختار سلول های اپیتلیال و قطر لومن لوله های کلیوی در نهایت مانع عملکرد صحیح کلیه می شود (Patel and Bahadur, 2010). عارضه دیگر قابل تشخیص در بافت کلیه در شرایط بحرانی، نکروز سلول های توبولی است. در این عارضه هسته سلول ها کوچک شده و کروماتین سلول متراکم می گردد و به اصطلاح پیکنوزه می شود و در نهایت به دژنره شدن هسته و مرگ سلولی منتهی می شود. نکروز نشان دهنده کاهش فعالیت سلول و پیش زمینه مرگ سلولی است. این عارضه در اثر تجمع میزان زیاد آلاینده در بافت کلیه ماهی مشاهده می شود (Thophon et al., 2003).

بر اساس پژوهش انجام شده توسط Velma و Tchounwou (۲۰۱۰) سوی القاء غلظت های مختلف کروم (۲۱/۴۲، ۴۲/۸۵ و ۸۵/۷ میلی گرم بر لیتر) به مدت ۹۶ ساعت روی بافت کلیه ماهی حوض (*Carassius auratus*)، اثرات هیستوپاتولوژیکی متنوعی از جمله جدا شدن اپیتلیوم از غشای پایه، نکروز سلول های توبولی، اتساع مویرگ های گلوامرولی و وجود خون در فضای کپسول بومن در طی دوره آزمایش مشاهده شد. در مطالعه ای که توسط Mishra و Mohanty (۲۰۰۸) انجام گرفت، اثرات دی کرومات پتاسیم روی بافت کلیه ماهی *Channa punctatus* بررسی شد. در این پژوهش، ماهی به مدت ۹۶

- Chu, C.Y.; Cheng, C.H.; Chen, G.D.; Chen, Y.C.; hung, C.C.; Huang, C.J., 2007. The zebrafish erythropoietin: Functional identification and biochemical characterization. *FEBS Letters*, 581: 4265-4271.
- Di Giulio, R.T.; Hinton, D.E. 2008. *The Toxicology of Fishes*. Taylor and Francis Group. 1101 P.
- Elliott, S.; Phama, E.; Iain, C., 2008. Erythropoietins: A common mechanism of action. *Experimental Hematology*, 36: 1573-1584.
- Farag, A.M.; May, T.; Marty, G.D.; Easton, M.; Harper, D.D.; Little, E.E.; Cleveland, L., 2006. The effect of chronic chromium exposure on the health of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquatic Toxicology*, 76(3-4): 246-257.
- Filazi, A.; Baskaya, R.; Kum, C., 2003. Metal concentration in tissues of the Black Sea fish (*Mugil auratus*) from Sinop-Icliman, Turkey. *Human and Experimental Toxicology*, 22: 85-87.
- Fisher, J.W., 2010. Landmark advances in the development of erythropoietin. *Experimental Biology and Medicine*, 235: 1398-1411.
- Fried, W., 2009. Erythropoietin and erythropoiesis. *Experimental Hematology*, 37: 1007-1015.
- Haidar, M.A.; Loya, F.; Yang, Y.; Lin, H.; Glassman, A.; Goldwasser, E.; Albitar, M., 1997. Electron microscopic localization of lacZ expression in the proximal convoluted tubular cells of the kidney in transgenic mice carrying chimeric erythropoietin/lacZ gene constructs. *Journal of Structural Biology*, 118(3): 220-225.
- Haschek, W.M.; Rousseaux, C.G.; Wallig, M.A., 2010. *Fundamentals of toxicologic pathology*. Academic Press, 686P.
- Hinton, D.E.; Lauren, D.J., 1990. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. *American Fisheries Society Symposium*, 8: 51-66.
- صادقی، پ.؛ سواری، الف.؛ موحدی نیا، ع.الف.؛ صفاهیه، ع.ر.؛ و ازدری، د.، ۱۳۹۳. تعیین غلظت کشندگی متوسط (LC50) دی کرومات پتاسیم و بررسی پاسخ‌های رفتاری در هامورماهی لکه زیتونی منقوط (*Epinephelus stoliczkae*). نشریه اقیانوس‌شناسی، دوره ۵، شماره ۱۷، صفحات ۹-۱.
- Abdel-Baki, A.S.; Dkhil, M.A.; Al-Quraishy, S., 2011. Bioaccumulation of some heavy metals in tilapia fish relevant to their concentration in water and sediment of Wadi Hanifah, Saudi Arabia. *African Journal of Biotechnology*, 10(13): 2541-2547.
- Au, D.W.T., 2004. The application of histocytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Marine Pollution Bulletin*, 48: 817-834.
- Bagnis, C.; Beaufils, H.; Jacquiaud, C.; Adabra, H.; Jouanneau, C.; Nahour, G.L.; Jaudon, M.C.; Bourbouze, R.; Jacobs, C.; Deray, G., 2001. Erythropoietin enhances recovery after cisplatin-induced acute renal failure in the rat. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 16(5): 932-938.
- Boran, H.; Altinok, I.; Capkin, E., 2010. Histopathological changes induced by maneb and carbaryl on some tissues of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Tissue and Cell*, 42: 158-164.
- Brumley, C.M.; Haritos, V.S.; Ahokas, J.T.; Holdway, D.A., 1998. The effects of exposure duration and feeding status on fish bile metabolites: implications for biomonitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 39: 147-153.
- Cengiz, E.I., 2006. Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 22: 200-204.
- Chou, C.F.; Tohari, S.; Brenner, S.; Venkatesh, B., 2004. Erythropoietin gene from a teleost fish, *Fugu rubripes*. *Blood*, 104:1498-1503.

- Kavitha, C.; Malarvizhi, A.; Kumaran, S.S.; Ramesh, M., 2010. Toxicological effects of arsenate exposure on hematological, biochemical and liver transaminases activity in an Indian major carp, *Catla catla*. Food and Chemical Toxicology, 48: 2848-2854.
- Kurtovic, B.; Teskeredzic, E.; Teskeredzic, Z., 2008. Histological comparison of spleen and kidney tissue from farmed and wild European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) Acta Adriatic, 49(2): 147-154.
- Lai, J.C.C.; Kakuta, I.; Mok, H.O.L.; Rummer, K.D.; Randall, D., 2006. Effects of moderate and substantial hypoxia on erythropoietin levels in rainbow trout kidney and spleen. The Journal of Experimental Biology, 209: 2734-2738.
- Liu, X.J.; Luo, Z.; Li, C.H.; Xiong, B.X.; Zhao, Y.H.; Li, X.D., 2011. Antioxidant responses, hepatic intermediary metabolism, histology and ultrastructure in *Synechogobius hasta* exposed to water borne cadmium. Ecotoxicology and Environmental Safety, 74: 1156-1163.
- Mela, M.; Randi, M.A.F.; Ventura, D.F.; Carvalho, C.E.V.; Pelletier, E.; Ribeiro, C.A.O., 2007. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 68: 426-435.
- Mishra, A.K.; Mohanty, B., 2008. Acute toxicity impacts of hexavalent chromium on behavior and histopathology of gill, kidney and liver of the freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). Environmental Toxicology and Pharmacology, 26: 136-141.
- Mitra, A.; Barua, P.; Zaman, S.; Banerjee, K., 2012. Analysis of trace metals in commercially important crustaceans collected from UNESCO protected world heritage site of *Indian sundarbans*. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Science, 12: 53-66.
- Moopam, 1999. Manual of oceanographic observations and pollutant analyses methods. ROPME, Kuwait. 483 p.
- Hodgson, E., 2004. A textbook of modern toxicology. A John Wiley & Sons, Inc., publication. Hoboken, New Jersey, 557P.
- Horiguchi, H.; Sato, M.; Kono, N.; Fukushima, M., 1996. Long-term cadmium exposure induces anemia in rats through hypoinduction of erythropoietin in the kidney. Archives of Toxicology, 71:11-19.
- Horiguchi, H.; Kayama, F.; Oguma, E.; Willmore, W.G.; Hradecky, P.; Bunn, H.F., 2000. Cadmium and platinum suppression of erythropoietin production in cell culture: clinical implications. Blood, 96: 3743-3747.
- Horiguchi, H.; Etsuko, O.; Kayama, F., 2006. Cadmium and cisplatin damage erythropoietin-producing proximal renal tubular cells. Archives of Toxicology, 80: 680-686.
- Irwin, R.J.; Van Mouwerik, M.; Stevens, L.; Seese, M.D.; Basham, W., 1997. Environmental contaminants encyclopedia. National Park Service, Water Resources Division, Fort Collins, Colorado. Distributed within the Federal Government as an Electronic Document (Projected public availability on the internet or NTIS:1998).
- Jelkmann, W., 1992. Erythropoietin: Structure, control of production, and function. Physiological Reviews, 72: 449-489.
- Kakuta, I., 2002. Physiological indicators of marbled sole, *Pleuronectes Yokohamae*, Exposed to hypoxic Conditions and captured in the anoxic water regions of Tokyo Bay and Kesen-numa Bay. Erythropoietin as an Anoxic Biomarker. Bulletin of the Society of Sea Water Science, Japan, 56(6): 432-439.
- Katakura, F.; Katzenback, B.A.; Belosevic, M., 2013. Molecular and functional characterization of erythropoietin of the goldfish (*Carassius auratus* L.). Developmental and Comparative Immunology, 40: 148-157.

- of copper ions. Journal of cell and tissue research, 10(3): 2365-2370.
- Poleksic, V.; Mitrovic-Tutundzic, V., 1994. Fish gills a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: R. Muller and R. Lloyd. ed., Sublethal and chronic effects of pollutants of freshwater fish. Oxford: Fishing News Books, 339-352 P.
- Rabitto, I.S.; Costa, J.R.M.A.; Silva de Assis, H.C.; Randi, M.A.F.; Akaishi, F.M.; Pelletier, E.; Oliveira Ribeiro, C.A., 2005. Dietary Pb (II) and TBT (tributyltin) exposures to neotropical fish *Hoplias malabaricus*: Histopathological and biochemical findings. Ecotoxicology and Environmental Safety, 60: 147-156.
- Rauf, A.; Javed, M.; Ubaidullah, M., 2009. Heavy metal leveles in three major carps from the river Ravi, Pakestan. Pakistan Veterinary Journal, 29(1): 24-26.
- Romeo, M.; Bennani, N.; Gnassia-Barelli, M.; Lafaurie, M.; Girard, J.P., 2000. Cadmium and copper display different responses towards oxidatives stress in the kidney of the sea bass. Aquatic toxicology, 48:185-194.
- Sadeghi, P.; Savari, A.; Movahedinia, A.; Safahieh, A.; Ajdari, D., 2014. An assessment of hematological and biochemical responses in the tropical fish *Epinephelus stoliczkae* of Chabahar Bay and Gulf of Oman under chromium exposure: ecological and experimental tests. Environmental Science and Pollution Research, 21: 6076-6088.
- Silva, A.G.; Martinez, B.R.C., 2007. Morphological changes in the kidney of a fish living in an urban stream. Environmental Toxicology and Pharmacology, 23: 185-192.
- Strydom, C.; Robinson, C.; Etheresia, P.; Whitcutt, J.M.; Jorika, M.; Bornman, M.S.; Resia, P., 2006. The effect of selected metals on the central metabolic pathways in biology : a review. Water Research Council, 32(4): 543-554.
- Moore, S.B.; Winckel, J.; Detwiler, S.J.; Klasing, S.A.; Gaul, P.A.; Kanim, N.R.; Kesser, B.E.; Debeveck, A.B.; Beardsley, K.; Puckett, L.K., 1990. Fish and wild life resources and agricultural drainage in the San Joaquin Valley, California. San Joaquin Drainage Program, Sacramento, California. Six sections and 2 appendixes. Portions reproduced with the permission of senior author Stephen Moore, Fish and Wild life Service, Regional Office, Portland, Oregon.
- Mukundan, H.; Resta, T.C.; Kanagy, N.L., 2002. 17Beta-estradiol decreases hypoxic induction of erythropoietin gene expression. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative andComparative Physiology, 283: R496-R504.
- Nogawa-Kosaka, N.; Hirose, T.; Kosaka, N.; Aizawa, T.; Nagasawa, K.; Uehara, N.; Miyazaki, H.; Komatsu, N.; Kato, T., 2010. Structural and biological properties of erythropoietin in *Xenopus laevis*. Experimental Hematology, 38(5): 363-372.
- Ogoyi, D.O.; Mwita, C.J.; Nguu, E.K.; Shiundu, P.M., 2011. Determination of heavy metal content in water, Sediment and microalgae from Lake Victoria, East Africa. The Open Environmental Engineering Journal, 4: 156-161.
- Oliveira, H.; Santos, T.M.; Ramalho-Santos, J.; Pereira, M.L., 2006. Histopathological effects of hexavalent chromium in mouse kidney. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 76: 977-983.
- Palaniappan, P.L.R.M.; Karthikeyan, S., 2009. Bioaccumulation and deprution of chromium in the selected organs and whole body tissue of freshwater fish *Cirrhinus mrigala* individually and in binary solutions with nickel. Journal of Environmental Sciences, 21: 229-236.
- Patel, J.M.; Bahadur, A., 2010. Histopatological alternation in *Catla catla* induced by chronic exposure

- liver and kidney of goldfish, *carassius auratus*. Mutation Research, 698: 43-51.
- Velma, V.; Vutukuru, S.S.; Tchounwou, P.B., 2009. Ecotoxicology of hexavalent chromium in freshwater fish: A critical review. Reviews on Environmental Health, 24(2): 129-145.
- Velmurugan, B.; Selvanayagam, M.; Cengiz, E.I.; Unlu, E., 2007. The effects of fenvalerate on different tissues of freshwater fish *Cirrhinus mrigala*. Journal of Environmental Science and Health B, 42(2): 157-163.
- Viana, A.P.; Fredou, F.L.; Montes, C.S.; Rocha, R.M., 2013. Fish histopathology and catalase activity as biomarkers of the environmental quality of the industrial district on the Amazon estuary, Brazil. Maringa, 35(3): 395-401.
- Vutukuru, S.S., 2005. Acute effects of Hexavalent chromium on survival, oxygen consumption, hematological parameters and some biochemical profiles of the Indian Major Carp, *Labeo rohita*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2: 456-462.
- Wester, P.W.; Vethaak, D.; van Muiswinkel, W.B., 1994. Fish as biomarkers in immunotoxicology. Toxicology, 86: 213-232.
- Witeska, M.; Kosciuk, B., 2003. Change in common carp blood after short-term zinc exposure. Environmental Science and Pollution Research, 3: 15-24.
- Wiwanitkit, V., 2013. Erythropoietin, heart disease and global rate. Journal of Medical Hypotheses and Ideas, 7: 5-6.
- Subashini, P.; Manavalaramanujam, R.; Ramesh, M.; Geetha, N., 2005. Changes in selected biomarkers in freshwater teleost fish, *Cyprinus carpio* var. communis exposed to sublethal concentrations of chromium sulphate toxicity. Journal of Environmental Science and Engineering, 47: 65-68.
- Szkoda, J.; Nawrocka, A.; Kmiecik, M.; Zmudzki, J., 2011. Monitoring study of toxic elements in food of animal origin (in Polish). In Ochrona Srodowiskai Zasobow Naturalnych, 48: 475-482.
- Tabari, T.; Saeedi Saravi, S.S.; Bandany, G.A.; Dehghan, A.; Shokrzadeh, M., 2010. Heavy metals (Zn, Pb, Cd and Cr) in fish, water and sediments sampled from Southern Caspian Sea, Iran. Toxicology and Industrial Health, 26(10): 649-656.
- Tetreault, G.R.; Bennetta, C.J.; Cheng, C.; Servos, M.R.; McMaster, M.E., 2012. Reproductive and histopathological effects in wild fish inhabiting an effluent-dominated stream, Wascana Creek, SK, Canada. Aquatic Toxicology, 110-111: 149-161.
- Thophon, S.; Kruatrachue, M.; Upathan, E.S.; Pokethitiyook, P.; Sahaphong, S.; Jarikhuan, S., 2003. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer* in acute and subchronic cadmium exposure. Environmental Pollution, 121: 307-320.
- Van der Oost, R.; Beyer, J.; Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environmental Toxicology and Pharmacology, 13: 57-149.
- Velma, V.; Tchounwou, P.B., 2010. Chromium-induced biochemical, genotoxic and histopathologic effects in