

ضایعات پاتولوژیک کبدی در ماهی هامور معمولی *Epinephelus coioides* قرار گرفته در معرض بنزوآلفا

پایرن

مریم خانیان^{۱*}، نگین سلامت^۱، علیرضا صفاهیه^۱، عبدالعلی موحدی نیا^۱

گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

چکیده

بنزوآلفاپایرن (BaP)، آلاینده محیطی جهانی که در هوا، آب و رسوب وجود دارد. BaP به راحتی از طریق تمام مسیرهای تماسی جذب شده و قادر به عبور از غشاء پلاسمایی بیشتر انواع سلول ها می باشد. تحقیق حاضر جهت مطالعه اثرات BaP بر ساختار بافتی کبد ماهی هامور معمولی *Epinephelus coioides* قرار گرفته در معرض غلظت های مختلف BaP صورت گرفت. برای این منظور ۱۰۰ عدد ماهی هامور معمولی (میانگین وزنی 183 ± 5 گرم و میانگین طولی 20 ± 1 سانتیمتر) پس از طی ۱ هفته سازش با شرایط آزمایشگاهی، به مدت ۱۴ روز با غلظت های مختلف بنزوآلفاپایرن (۲، ۲۰ و ۲۰۰ mg/kg) و به صورت درون صفاقی تزریق شدند. در روزهای ۰، ۲، ۷ و ۱۴ مقطعاتی به ضخامت ۵/ سانتیمتر از بافت کبد جهت مطالعات هیستوپاتولوژیک اخذ و در محلول فرمالین بافر ۱۰٪ تثبیت شد. مقاطعی به ضخامت ۵ میکرومتر از بافت ها تهیه گردیده و با رنگ هماتوکسیلین و ائوزین برای بررسی با میکروسکوپ نوری رنگ آمیزی شدند. در بافت کبد ماهیان گروه های کنترل و کنترل حلال ضایعه پاتولوژیکی مشاهده نشد. از جمله ضایعات بافتی ایجاد شده در طول دوره آزمایش می توان به واکوئولاسیون هیپاتوسیت ها، افزایش مراکز ملانوماکروفاژی، اتساع فضای دیس و اتساع سینوزوئیدی، نکروز کانونی، هیپرتروفی سلول های کبدی، مرزنشینی هسته و دژنراسیون سلول های کبدی اشاره کرد. در تمام روزها شدت و وسعت ضایعات مشاهده شده، با افزایش غلظت افزایش می یافت. بیشترین آسیب های بافتی ایجاد شده در بافت کبد تیمار $BaP 200 \text{ mg/kg}$ در روز هفتم آزمایش مشاهده شد.

واژگان کلیدی: پاتولوژی، بافت کبد، بنزوآلفاپایرن، ماهی هامور معمولی.

۱. مقدمه

پلاسمایی بیشتر انواع سلول ها عبور کند (Chen et al., 2008). BaP از جمله هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای با جرم مولکولی بالا بوده که قادر به ایجاد جهش و سرطان زایی می باشد. سرعت توزیع یا انتشار آلاینده ها در بافت های خاص، توسط سرعت جریان خون موضعی آن بافت تعیین می شود. در اندام هایی مانند کبد، کلیه و طحال که جریان خون بالایی دارند، تمایل آلاینده ها برای تجمع بیشتر است (Pritchard, 1993). به علاوه فاکتورهای دیگری از قبیل اتصال پروتئین های پلاسما، فرایندهای متابولیسمی و عمل دفع نیز بر الگوی توزیع، بقا و سمیت آلاینده ها تاثیر می گذارد (Gesto et al., 2008).

ماهی هامور معمولی *Epinephelus coioides* از ماهیان بومی خلیج فارس و با ارزش غذایی زیاد بود که از بازار پسندی خوبی در جنوب ایران برخوردار می باشد. لذا، تحقیق حاضر با هدف بررسی اثرات بنزوالفاپایرن (به عنوان یکی از مهمترین آلاینده های آلی که بنا به مطالعات قبلی صورت گرفته، از جمله PAH های موجود در خلیج فارس می باشد) بر ساختار بافتی کبد ماهی هامور معمولی به عنوان شاخص تعیین اثرات BaP بر وضعیت سلامت ماهیان صورت گرفت. هدف تحقیق حاضر استفاده از پارامترهای پاتولوژیکی جهت ارزیابی تاثیر آلودگی بنزوالفاپایرن بر ماهیان شانک زردباله بود.

۲. مواد و روش ها

۲-۱- تهیه و نگهداری ماهیان

جهت انجام تحقیق حاضر ۱۰۰ عدد ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) (میانگین وزنی $180 \pm 7/9$ گرم و میانگین طولی $20/8 \pm 2$ سانتی متر و همگی نابالغ) در مهر ماه ۱۳۹۰ از ایستگاه تحقیقاتی بندر امام خمینی واقع در استان خوزستان تهیه گردیده (بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی داری از لحاظ طول و وزن وجود نداشت) و در همان مرکز در تانک های ۶۰۰۰ لیتری مدور محتوی آب

افزایش سریع فعالیت های آنتروپوژنیک (ناشی از فعالیت های انسانی) به ویژه ورود آلاینده های آلی به اکوسیستم آبی افزایش یافته و منجر به گسترش این آلاینده ها به ویژه در مناطق ساحلی از طریق تخلیه و استفاده مستقیم آنها، آب های سطحی، بارش باران، انتقال از طریق زنجیره غذایی و ... شده است (Reynaud and Deschaux, 2006). احتمالاً آلودگی محیط زیست دریایی یکی از دلایل اصلی شیوع بیماری ها در موجودات آبی، می باشد. مطالعات فراوانی، احتمال وجود ارتباط میان زنبیوتیک های مختلف و ایجاد بیماری، در موجودات را گزارش نموده اند (Reynaud and Deschaux, 2006).

قرار گرفتن موجودات آبی در معرض آلاینده های مختلف موجب ایجاد تغییرات بافتی در بافت های مختلف آنها می شود (Mohamed, 2009). بنابراین تغییرات هیستوپاتولوژیکی می توانند به عنوان شاخص هایی از اثرات آلاینده های مختلف بر موجودات و از جمله ماهیان مورد استفاده قرار گرفته و از آنها جهت ارزیابی وضعیت سلامت ماهیان استفاده نمود (Hinton and Laurén, 1990). غشای سلول ها عمدتاً متشکل از لیپید می باشد. از آنجایی که اکثر آلاینده های آلی و به خصوص PAH ها چربی دوست هستند، بنابراین می توانند به راحتی از غشای پلاسمایی عبور کرده و به داخل سلول نفوذ کنند. برقراری پیوند کوالانسی بین PAH ها و ماکرومولکول هایی نظیر پروتئین ها، DNA و RNA منجر به آسیب سلولی، جهش و انواع سرطان ها می شود (Holt et al., 2005). بنزوالفاپایرن (BaP) (Benzo[a]Pyrene) از جمله آلاینده های محیطی موجود در هوا، آب و رسوبات می باشد که از سوختن ناقص مواد آلی و سوخت های فسیلی در دمای بین ۳۰۰ تا ۶۰۰ درجه سانتیگراد تولید می شود. این ترکیب دارای حلالیت زیاد در چربی بوده و به سهولت از طریق دستگاه تنفس و گوارش جذب بدن می شود، بنابراین می تواند مستقیماً از غشای

نارگیل) و ماهیان تانک ۵ نیز هیچ تزریقی دریافت نکرده و به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند.

۲-۴- تهیه نمونه های بافتی از ماهیان

جهت مطالعه تغییرات هیستوپاتولوژیک کبد از بافت کبد ماهیان در روزهای ۲، ۴، ۷ و ۱۴ قطعاتی از بافت به ابعاد ۵/ سانتیمتر جدا شده و به محلول ثبوت بوئن منتقل شدند.

۲-۵- تهیه مقاطع بافتی

برای آماده کردن بافت ها جهت تهیه برش های بافتی مراحل پاساژ بافتی شامل آگیری، شفاف کردن و آغستگی به پارافین، از دستگاه اتوتکنیکون (هیستوکینت) مدل RX- 11B, Tissue tek rotary, japan استفاده شد. سپس توسط دستگاه میکروتوم (مدل LEICA-RM2245) برش هایی به ضخامت ۵ تا ۶ میکرومتر از نمونه بافتی تهیه و مقاطع حاصل در نهایت با استفاده از رنگ آمیزی معمولی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) رنگ آمیزی شدند.

۲-۶- مطالعات هیستوپاتولوژیک

پس از تهیه اسلایدها به منظور مطالعه هیستوپاتولوژیک، مقاطع بافتی رنگ آمیزی شده با استفاده از میکروسکوپ نوری Olympus و با بزرگ نمایی های متفاوت بررسی و تصاویر مناسب توسط دوربین نصب شده بر روی میکروسکوپ Dinolite Digital Microscope و سیستم رایانه ای متصل به دوربین مجهز به نرم افزار Dino capture تهیه و ذخیره شد.

۳. نتایج

تغییرات هیستوپاتولوژیک کبد در اثر تیمار با غلظت های مختلف بنزوآلفاپیرن

در نمونه های اخذ شده از کبد ماهیان گروه های کنترل و کنترل حلال ضایعه هیستوپاتولوژیکی

دریای فیلتر و تیمار شده با اشعه ماورای بنفش (UV) در سوله سرپوشیده نگه داری شدند. جهت انجام پروژه، ۵ تانک ۳۰۰ لیتری تا حجم ۲۰۰ لیتر با آب فیلتر شده و هوادهی شده دریا پر شده و ۲۰ عدد ماهی هامور معمولی به هر تانک انتقال داده شد. میانگین دما ۲۶/۵ درجه سانتی گراد، pH ۷/۸ و شوری ۳۹ گرم بر لیتر بوده و به طور منظم کنترل می شد. تعویض حجم آب، هر دو روز یک بار از کف از طریق سیفون کردن انجام می شد. دوره سازگاری (برای پیشگیری از اثرات احتمالی ناشی از استرس جابجایی بر بافت های ماهیان) ۷ روز و طول مدت قرار دادن در معرض بنزوآلفاپیرن ۱۴ روز در نظر گرفته شد (Wang, 2005).

۲-۲- تهیه غلظت های مختلف BaP

در این پروژه جهت تهیه غلظت های مختلف BaP ابتدا غلظت های معینی از BaP (Aldrich, USA) شامل ۲، ۲۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن که به صورت گرانول های جامد زرد رنگ هستند، را در ۱ml/kg وزن بدن، روغن نارگیل حل نموده و جهت سهولت کار از حمام اولتراسونیک (Alex machine, turkey) استفاده گردید. سپس محلول های استوک آماده شده تا زمان انجام آزمایش در ظروف تیره رنگ و در دمای اتاق (۲۵ درجه) نگهداری شد (Nahrgang et al., 2009).

۲-۳- تیمار بندی

طراحی آزمایش به این صورت بود که ماهیان موجود در تانک های اول تا سوم که به عنوان تیمارهای ۱، ۲ و ۳ در نظر گرفته شدند، به ترتیب با غلظت های ۲، ۲۰ و ۲۰۰ mg/kg وزن بدن، از BaP (Wang, 2005) تزریق شدند. برای انجام تزریق پس از بیهوشی ماهیان، بدن آن ها را با یک پارچه تمیز به آرامی خشک کرده و سپس BaP آماده و حل شده در ۱ml/kg وزن بدن روغن نارگیل (به عنوان حلال BaP) به صورت درون صفاقی تزریق شد. ماهیان تانک شماره ۴ (کنترل حلال) فقط با روغن نارگیل تزریق شدند (جهت ارزیابی اثرات احتمالی روغن

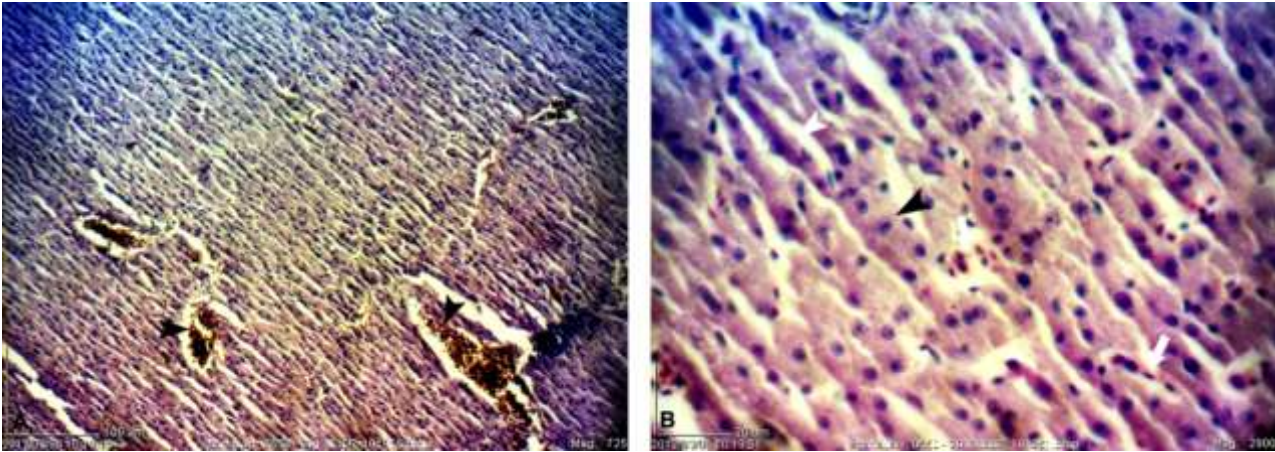
آسیب های بافتی ایجاد شده در ماهیان تیمار شده با غلظت $BaP 2 \text{ mg/kg}$ می توان به واکوئولاسیونسلول ها و مرز نشینی هسته اشاره کرد که البته وسعت این ضایعات در مقایسه با غلظت های ۲۰ و 200 mg/kg گرم بر کیلوگرم بسیار کمتر بود (شکل ۳).

در روز هفتم آزمایش، آسیب های هیستوپاتولوژیک نظیر نکروز کانونی، مرز نشینی هسته، پیکنوز هسته و اتساع سینوزوئیدی در تیمار $BaP 20 \text{ mg/kg}$ و با وسعت بیشتر در تیمار $BaP 200 \text{ mg/kg}$ مشاهده شد. قابل ذکر است که در این روز وسعت ضایعات با افزایش غلظت BaP افزایش یافت (شکل ۴).

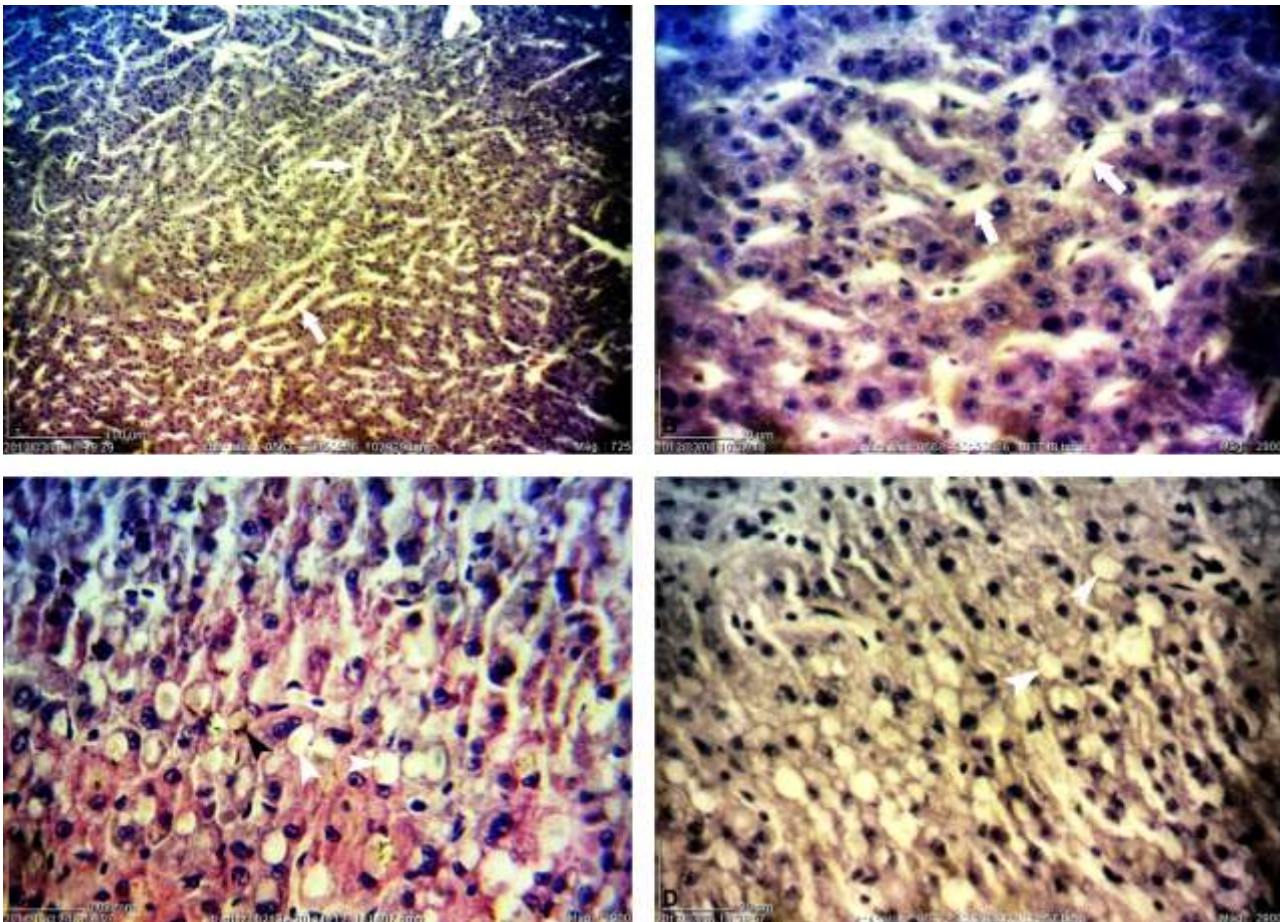
در روز چهاردهم، ضایعاتی از جمله واکوئولاسیون، مراکز ملانوماکروفاژی کوچک به ویژه اطراف عروق خونی، احتقان خون در سیاهرگ مرکزی و نکروز کانونی در تیمار $BaP 200 \text{ mg/kg}$ مشاهده شد، اما وسعت این ضایعات تفاوت قابل توجهی با ضایعات ایجاد شده در روزهای ۴ و ۷ نداشت. در تیمار $BaP 20 \text{ mg/kg}$ و $BaP 2 \text{ mg/kg}$ وسعت ضایعات بسیار کم بود و تنها ضایعات مشاهده شده واکوئولاسیون برخی سلول های کبدی و اتساع فضای دیس بود. به طور کلی در تمام روزهای نمونه برداری با افزایش غلظت BaP وسعت و شدت ضایعات ایجاد شده در بافت کبد افزایش یافت (شکل ۵).

مشاهده نشد و کبد دارای ساختار طبیعی بود. هپاتوسیت ها یا سلول های کبدی با سیتوپلاسم صورتی دانه دار و هسته مدور مرکزی، سلول هایی چند سطحی بوده که به دنبال هم از مرکز تا محیط لوبول ردیف شده و طناب یا صفحات کبدی را ایجاد می کردند. سینوزوئیدها، مویرگ های خونی نامنظم با فضای وسیع بوده که به صورت نوارهایی بین صفحات سلولی از مرکز به محیط ادامه داشته و در جدارشان علاوه بر سلول های آندوتلیال معمولی تعدادی سلول های کوپفر (Kupffer) که وظیفه تصفیه خون را بر عهده دارند، نیز وجود داشت. فضای دیس (Disse) نیز بین هپاتوسیت ها و سینوزوئیدها دیده می شد (شکل ۱). در روز دوم پس از تیمار ماهیان با $BaP 200 \text{ mg/kg}$ آسیب های هیستوپاتولوژیکی از جمله واکوئولاسیون هپاتوسیت ها در بافت کبد مشاهده شد. ضایعات پاتولوژیک مشاهده شده در تیمار $BaP 20 \text{ mg/kg}$ دارای وسعت کمتری بوده و واکوئولاسیون جزئی و همچنین تعداد محدودی مراکز ملانوماکروفاژی کوچک در این تیمار دیده شد. همچنین واکوئولاسیون هپاتوسیت ها و اتساع فضای دیس با وسعت بسیار کم تنها ضایعات بافتی ایجاد شده در $BaP 2 \text{ mg/kg}$ بود (شکل ۲).

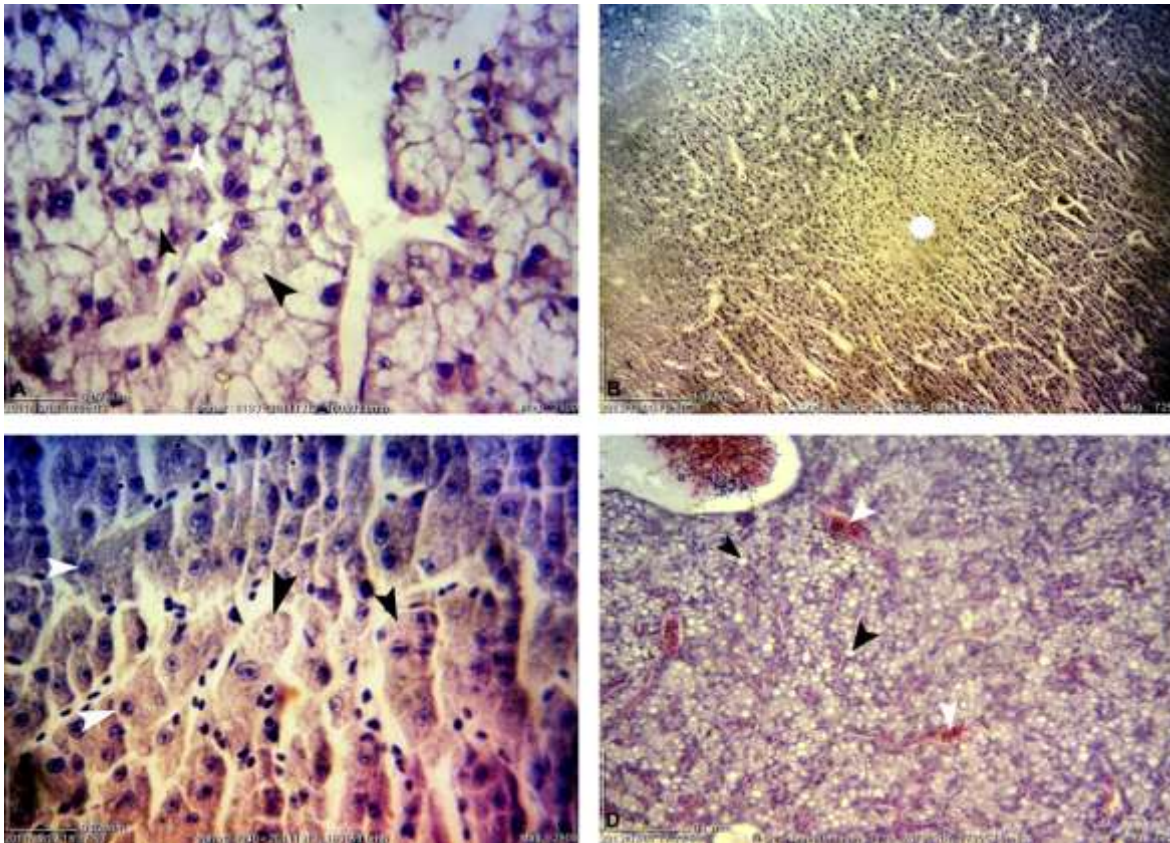
در چهارمین روز نمونه برداری ضایعاتی نظیر واکوئولاسیون هپاتوسیت ها، هیپرتروفی، مرز نشینی هسته و اتساع سینوزوئیدی با وسعت زیاد در تیمار $BaP 200 \text{ mg/kg}$ مشاهده شد. در $BaP 20 \text{ mg/kg}$ بافت کبد ظاهر طبیعی تری داشت و اتساع فضای دیس و نکروز کانونی در این تیمار مشاهده شد. از جمله



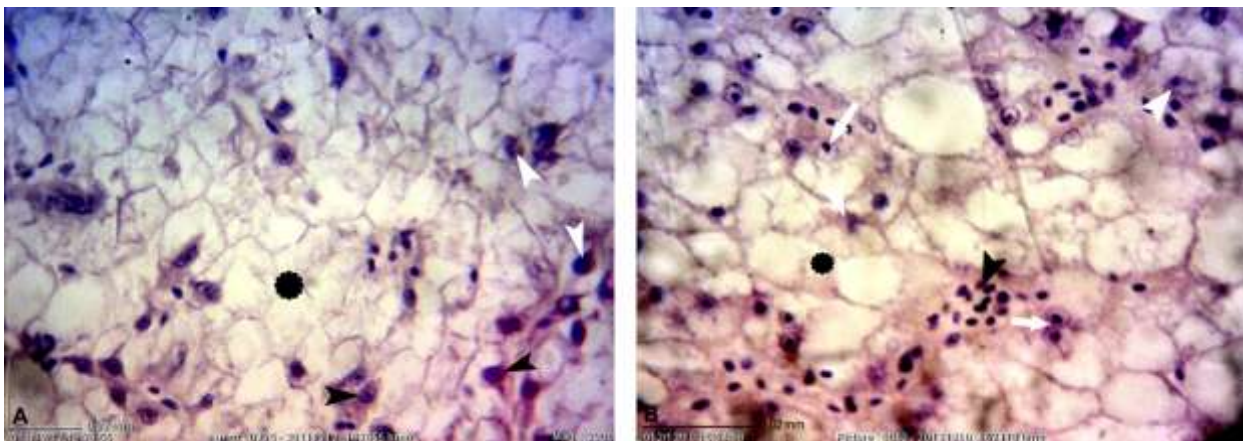
شکل ۱. تصاویر میکروسکوپ نوری ساختار طبیعی بافت کبدماهی هامور معمولی گروه کنترل و کنترل حلال: A. سیاهرگ مرکزی (سر پیکان های سیاه)، B. هیپاتوسیت (سر پیکان سیاه)، طناب کبدی (سر پیکان سفید)، سینوئید (پیکان سفید). A. (H&E; $\times 725$), B. (H&E; $\times 2900$)



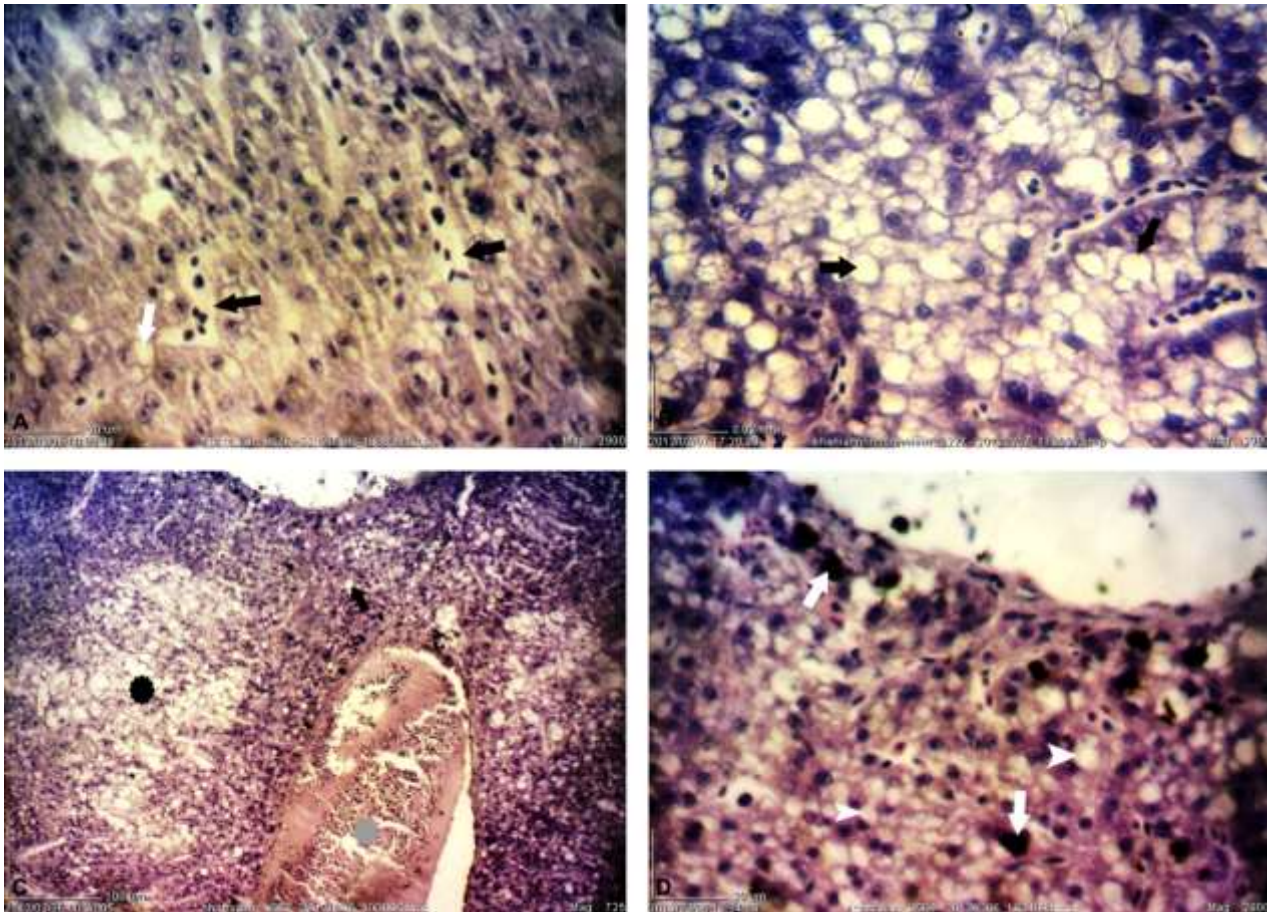
شکل ۲. تصاویر میکروسکوپ نوری تغییرات بافتی کبد ماهی هامور معمولی پس از دو روز تیمار: A و B. تیمار BaP_2 دارای اتساع فضای دیس (پیکان سفید)، C. تیمار BaP_2 دارای واکنش های سفید، مراکز ملانوماکروفاژی (سر پیکان های سیاه)، D. تیمار BaP_2 دارای واکنش های سفید، مراکز ملانوماکروفاژی (سر پیکان های سیاه)، D. تیمار BaP_2 دارای واکنش های سفید، مراکز ملانوماکروفاژی (سر پیکان های سیاه). A. (H&E; $\times 725$), B. (H&E; $\times 725$), C. (H&E; $\times 2900$), D. (H&E; $\times 2900$)



شکل ۳. تصاویر میکروسکوپ نوری تغییرات بافتی کبد ماهی هامور معمولی پس از چهار روز تیمار: A. تیمار BaP_2 mg/kg دارای واکوئولاسیون (سر پیکان سیاه)، مرز نشینی هسته (سر پیکان سفید). B. تیمار BaP_2 ۲۰ mg/kg دارای نکروز کانونی (ستاره سفید)، تیمار BaP_2 ۲۰۰ mg/kg دارای هیپرتروفی هپاتوسیت (سر پیکان سیاه)، مرز نشینی هسته (سر پیکان سفید). D. تیمار BaP_2 ۲۰۰ mg/kg اتساع سینوزوئیدی (سر پیکان سفید)، واکوئولاسیون (سر پیکان سیاه)، A و C ($H\&E$; $\times 2900$) و B و D ($H\&E$; $\times 725$).



شکل ۴. تصاویر میکروسکوپ نوری تغییرات بافتی کبد ماهی هامور معمولی پس از هفت روز تیمار: A. تیمار BaP_2 ۲۰ mg/kg دارای نکروز کانونی (ستاره سیاه)، مرز نشینی هسته (سر پیکان سیاه)، پیکنوز هسته هپاتوسیت (سر پیکان سفید)، تیمار BaP_2 ۲۰۰ mg/kg مرز نشینی هسته (پیکان سفید)، اتساع سینوزوئیدی (سر پیکان سیاه)، نکروز (ستاره سیاه)، پیکنوز هسته هپاتوسیت (سر پیکان سفید). A، B ($H\&E$; $\times 2900$).



شکل ۵. تصاویر میکروسکوپ نوری تغییرات بافتی کبد ماهی هامور معمولی پس از چهارده روز تیمار: A. تیمار $BaP 2 \text{ mg/kg}$ دارای واکوئولاسیون سلول های کبدی (پیکان سفید)، اتساع فضای دیس (پیکان سیاه)، B. تیمار $BaP 20 \text{ mg/kg}$ دارای واکوئولاسیون سلول های کبدی (پیکان سیاه)، C. تیمار $BaP 200 \text{ mg/kg}$ دارای واکوئولاسیون سلول های کبدی (پیکان سیاه)، نکروز (ستاره سیاه)، احتقان خون در سیاهرگ مرکزی (ستاره خاکستری). D. واکوئولاسیون سلول های کبدی (سر پیکان سفید)، مراکز ملانوماکروفاژی (پیکان سفید)، (H&E; $\times 2900$) A و D، (H&E; $\times 725$) B و C.

۴. بحث و نتیجه گیری

کبد در ماهیان تلئوست، اندام اصلی تغییر شکل زیستی زنوبیوتیک ها، متابولیسم هورمون های جنسی و... می باشد (Health, 1995; Hinton et al., 2001). بسیاری از آلاینده ها تمایل به تجمع در کبد دارند، از این رو این اندام نسبت به سایر اندام ها در معرض مقادیر بیشتری از آلاینده های محیطی قرار می گیرد (Health, 1995). به همین دلیل، استفاده از هیستوپاتولوژی کبد به عنوان شاخص وضعیت سلامت ماهیان در ارتباط با مقادیر زنوبیوتیک ها معمول است (Au, 2004).

در این مطالعه، نتایج حاصل از بررسی عوارض هیستوپاتولوژیکی بافت کبد ماهیان هامور معمولی

تحت تاثیر غلظت های مختلف BaP در بازه زمانی ۱۴ روزه، مورد بررسی قرار گرفت. در بافت کبد ماهیان گروه های کنترل و کنترل حلال ضایعه پاتولوژیکی مشاهده نشد. از جمله ضایعات بافتی ایجاد شده در طول دوره آزمایش می توان به واکوئولاسیون هیپاتوسیت ها، افزایش مراکز ملانوماکروفاژی، اتساع فضای دیس و اتساع سینوزوئیدی، نکروز کانونی، هیپرتروفی سلول های کبدی، مرز نشینی هسته، احتقان در سیاهرگ مرکزی و پیکنوز شدن هسته اشاره کرد. در تمام روزها شدت و وسعت ضایعات مشاهده شده، با افزایش غلظت افزایش می یافت. در این مطالعه ارتباطی بین غلظت و مدت زمان القاء آلاینده، با شدت و وسعت

های مختلفی از ماهیان، آسیب های بافت کبد نظیر نکروز، واکوئولاسیون و دژنراسیون را مشاهده نموده و آنها را به عنوان پاسخ غیر اختصاصی به استرس در ماهیان تیمار شده با آلاینده معرفی نمودند.

تغییرات ساختاری ایجاد شده در آبشش و کبد ماهیان، القا کننده پاسخ موجودات به تغییرات محیطی بوده و دو نوع اصلی تغییرات ساختاری را نیز توصیف نمودند. نوع اول اثرات سمی مستقیم آلاینده بوده که منجر به دژنراسیون بافتی و نکروز کبد شده و نوع دوم تکامل مکانیسم های جبرانی در آبشش نظیر هیپرپلازی سلول ها، هیپرتروفی و برآمدگی اپیتلیوم آبششی، برای مقابله با استرس می باشد. این مکانیسم های جبرانی فاصله بین محیط خارجی و خون را افزایش داده و به عنوان سدی برای ورود زنبویوتیک ها به کار می روند (Belicheva and Sharova, 2011). تکامل چنین تغییراتی همچنین منجر به کاهش سطح انتشار کل و باز جذب اکسیژن شده و هیپوکسی را ایجاد می نماید. بنابراین دژنراسیون و نکروز کبد ماهی ممکن است به طور جزئی به علت کمبود اکسیژن در نتیجه تغییرات نواحی سطحی آبشش باشد (Hinton and Lauren, 1990).

Hinton و همکاران (۲۰۰۱)، ضایعاتی نظیر تغییرات سلولی کانونی، واکوئولاسیون، نکروز و هیپرپلازی سلول ها را به عنوان بیومارکرها های هیستوپاتولوژی کبدی برای ارزیابی سمیت مزمن در ماهیان معرفی نمود. این محققین در سال ۲۰۰۲ در بررسی پاسخ پاتولوژیک کبد به تیمار با سموم، مشاهده نمودند که تمام سموم منجر به نکروز کبدی معنی داری در مقایسه با گروه کنترل شدند. این تغییرات در ماهیان تیمار شده با آلاینده ها به مدت ۵ روز مشاهده شد، در حالی که پاسخ های ترمیم در ماهیان اکسپوز شده به مدت ۱۵ روز دیده شد. وی بیان کرد که در ماهیان تیمار شده، نکروز معمولاً دلالت بر اختلال عروق موضعی داشته و تصور می شود تخریب و نکروز

تغییرات بافتی ایجاد شده در ماهیان مشاهده شد، به طوری که بیشترین آسیب های بافتی ایجاد شده در بافت کبد از اولین روز نمونه برداری تا اواسط دوره (روز ۷) و در تیمار با غلظت های بالاتر (BaP ۲۰۰ mg/kg) مشاهده شد. با حل شدن در غشاء چرب هپاتوسیت ها منجر به تغییر نفوذ پذیری آنها و در نهایت پارگی غشاء این سلول ها (Suresh, 2009) و در نتیجه افزایش وسعت ضایعات پاتولوژیک مشاهده شده در کبد تا روز ۷ آزمایش شدند.

Ortiz و همکاران (۲۰۰۱)، در بررسی تاثیر آلاینده های آلی مقاوم بر تغییرات هیستوپاتولوژیکی کبد ماهی *Cyprinus carpio*، ایجاد ضایعاتی نظیر واکوئولاسیون شدید، دژنراسیون، احتقان سینوزوئیدها، خونریزی و نکروز را در ارتباط با زنبویوتیک های لیپوفیلیک بیان نمودند. به طوری که این آلاینده با عبور از غشای پلاسمایی سلول ها به خصوص هپاتوسیت ها موجب ایجاد تغییراتی در ساختار و عملکرد سلول ها می شوند. نتیجه این تغییرات کاهش کارایی عملکرد کبد در ماهی می شود.

Ogundiran و همکاران (۲۰۱۰) در مطالعه اثرات توکسیکولوژی در جنین ها بر بافت کبد *Clarias gariepinus*، در ماهیان تیمار شده، ضایعات بافتی شامل ادم، واکوئولاسیون و نفوذ سلولی، احتقان و نکروز نظیر آنچه در مطالعه حاضر مشاهده شد، را گزارش نمودند.

واکوئولاسیون و نفوذ سلولی با تجمع چربی و گلیکوژن در نتیجه عملکرد ناقص کبد در اثر تیمار با سموم و یا دژنراسیون چربی هپاتوسیت ها مرتبط می باشد (Ogundiran et al., 2010). همچنین نکروز به دلیل عدم توانایی ماهیان برای باز تولید سلول های کبدی جدید و یا در نتیجه فرایند سم زدایی بیش از حد کبد بوده تا در طی عمل سم زدایی خود را از ترکیبات سمی پاک کند (Ogundiran et al., 2010).

Belicheva و Sharova (۲۰۱۱)، در مطالعه ارزیابی وضعیت سلامتی ماهیان تحت اثر آلاینده ها در گونه

Haaparanta و همکاران (۱۹۹۶) عملکرد مراکز ملانوماکروفاژی را در ارتباط با تخریب، سم زدایی و باز سازی ترکیبات اندوژنی و اکزوژنی بیان نمودند.

با بررسی تغییرات هیستوپاتولوژی کبد *Channa punctatus* تیمار شده با سوخت های فسیلی توسط Kakkar و همکاران (۲۰۱۱) بیان گردید که افزایش تراکم مراکز ملانوماکروفاژی احتمالاً دلالت بر اختلالات متابولیسمی و فقدان تغذیه ای در پاسخ به آلاینده ها دارد. آنها همچنین خونریزی در بافت را نتیجه اختلال عروق خونی و نشانه ای از آسیب فیزیکی شدید حاصل از تاثیر آلاینده معرفی نموده و همولیز، اتساع عروق خونی و احتقان را به اثرات مستقیم سموم بر هیپاتوسیت ها (مکان اصلی سم زدایی انواع سموم و مواد شیمیایی) نسبت دادند.

Fanta و همکاران (۲۰۰۳)، در بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیکی کبد ماهی *Corydoras paleatus*، با بررسی نتایج بیان نمودند که ایجاد واکوئولاسیون ممکن است نوعی مکانیسم جبرانی توسط هیپاتوسیت ها در پاسخ به وضعیت استرس موجود در محیط باشد که به دلیل نیاز ماهی به انرژی زیاد رخ داده و منجر به مهار سنتز پروتئین و تجمع چربی (برای تشکیل واکوئل های چربی) جهت ایجاد انرژی لازم می شود.

Paulo و همکاران (۲۰۱۲)، نیز در بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیکی کبد *Poecilia vivipara* افزایش معنی داری در واکوئولاسیون سیتوپلاسم سلول های کبدی را در ارتباط با اختلال در متابولیسم تری گلیسریدهای کبد به علت سنتز ناقص لیپوپروتئین های با تراکم بسیار کم (LD) که در انتقال و جابه جایی تری گلیسریدهای کبدی به بافت های خارج کبدی دخیلند، بیان نمودند.

Moore و همکاران (۲۰۰۲)، در چندین گونه از ماهیان پهن، واکوئولاسیون سلول های مجاری صفراوی و هیپاتوسیت ها را به دلیل آسیب های متابولیکی حاصل از تیمار با آب آلوده با هیدروکربن ها و همچنین نوعی مکانیسم جبرانی توسط

ناشی از تاثیر مستقیم محرک و به عنوان یک پاسخ دفاعی در ماهیان تفسیر شود (Hinton et al., 2001). مراکز ملانوماکروفاژ موجود در کبد در مطالعه حاضر، در مراحل اولیه از تعدادی اریتروسیت به همراه ماکروفاژهایی با درجات مختلف پیگمانتاسیون تشکیل شده و یک بافت همبند سست ناحیه مرزی را ایجاد می کند. سپس تعدادی از سلول های لایه سخت لنفوسیتی مرکز را احاطه کرده و در مراحل بعد ماکروفاژها به طور فزاینده ای تیره شده و به علاوه ته نشین شدن پیگمان ها در آنها افزایش می یابد. در مراحل پیشرفته بسیاری از ماکروفاژها به رنگ قهوه ای تیره در آمده به طوری که لایه لنفوسیتی کاملاً غیر قابل رویت شده و در عوض بخش مرکزی توسط تعدادی اریتروسیت با هسته پیکنوز شده اشغال می شود (Deivasigmani, 2007).

Suresh (۲۰۰۹)، در مطالعه تاثیر BaP بر مراکز ملانوماکروفاژی موجود در کبد *Tilapia mossambica* افزایش معنی داری در تعداد و اندازه مراکز ملانوماکروفاژی و ماکروفاژهای آزاد در بافت کبد که با غلظت ۲۰/۹۳ میلی گرم بر لیتر کلرید کادمیوم تیمار شده بودند را گزارش نمود. این محقق بیان کرد که تغییرات مراکز ملانوماکروفاژی موجود در کبد می توانند به عنوان شاخص استرس القا شده توسط آلاینده های مختلف در محیط های آبی مورد بررسی قرار گیرند. وی افزایش تعداد مراکز ملانوماکروفاژی را احتمالاً به دلیل درگیری آنها در فرایند سم زدایی نسبت داد.

Pacheco و Santos (۲۰۰۲)، توصیف کردند که افزایش واکوئولاسیون هیپاتوسیت ها نشانه ای از فرایند دژنراسیون بوده که نشان دهنده آسیب های متابولیکی حاصل از تیمار با آب آلوده می باشد. آنها همچنین افزایش تراکم مراکز ملانوماکروفاژی در کبد *Pleuronectus lineatus* را در ارتباط با آسیب های کبدی مهم نظیر دژنراسیون و نکروز معرفی نمودند.

water quality? Aquatic Toxicology 34: 253-272.

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

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

Hinton, D.E. and Laurén, D.J. 1990. Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes. Potential biomarkers of exposure. Biomarkers of Environmental and Contamination 11:17-57.

Holt, J., Hothem, S., Howerton, H., Larson, R. and Sanford, R. 2005. Bioremediation and Biodegradation 9, 10-phenanthrene quinone photoauto catalyzes its formation from phenanthrenes and inhibits Biodegradation of Naphtalene. Environmental Quality 34: 462-468.

Kakkar, K.G. 2011. Water soluble fraction of diesel fuel induced histopathological alterations in the liver of *Channa punctatus*. Fish and Shellfish Immunology 18: 14-16.

Mohamed, F.A.S. 2009. Histopathological studies on *Tilapia zillii* and *Solea vulgaris* from Lake Qarun, Egypt. Fish and Marine Science 1: 29-39.

Moore, M.N. 2002. Biocomplexity: the post-genome in ecotoxicology. Aquatic Toxicology 59: 1-15.

Nahrgang, J., Camusa, L., Gonzalez, P., Goksoyr, A., Christiansen, J.S. and Hop, H. 2009. PAH biomarker responses in polar cod (*Boreogadus saida*) exposed to benzo(a)pyrene. Aquatic Toxicology 17: 309-319.

Ogundiran, .A., Fawole O.O., Adewoye, S.O. and Ayandiran, T.A. 2010. Toxicological impact of detergent effluent on juvenile of African Catfish (*Clarias gariepinus*) (Buchell 1822). Agriculture Biology 10: 2151-7525.

Ortiz, J.B., Gonzlez, D. and Sarasquete, C. 2001. The Impact of a Persistent Organic Contaminant: Histopathological Alterations in Fish Tissues. Ecotoxicology and Environmental Research 4(2): 45-52.

Pacheco, M. and Santos, M.A. 2002. Biotransformation, genotoxic and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla*

هیپاتوسیت ها در پاسخ به وضعیت استرس موجود در محیط‌گزارش کرده و از این آسیب بافتی به عنوان یک شاخص بافتی مناسب برای ارزیابی اثرات آلاینده ها یاد نمودند.

منابع

Au, D.W.T. 2004. The application of histocytological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. Marine Pollution Bulletin 48: 814-834.

Belicheva, A. and Sharova, J.N. 2011. Assessment of fish health status under long term water pollution: Vygozero reservoir, North-west Russia. Environmental Technology 17: 368-373.

Chen, J., Wong, M.H., Wong, Y.S. and Tomnora, F.A. 2008. Multi factors on biodegradation kinetics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) by sphingomonas sp. Abacterial strain isolation from mangroves sediment. Marine Pollution Bulletin 57: 695-702.

Deivasigamani, B. 2007. Structure of immune organ in edible catfish, *Mystus gulio*. Environmental Biology 28(4): 757-764.

Di Giulio, R.T., Habig, C. and Gallagher, E.P. 1993. Effect of Black Rock Harbor sediments on indices of biotransformation. Oxidative stress and DNA integrity in channel catfish. Aquatic Toxicology 26: 1-22.

Fanta, E., Rios, F.A., Romao, S., Vianna, A.C.C. and Freiberger, S. 2003. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. Ecotoxicology and Environmental Safety 54: 119-130.

Gesto, M., Soengas, J.L. and Miguez, J.M. 2008. Acute and prolonged stress responses of brain monoaminergic activity and plasma cortisol level in rainbow trout are modified by PAH treatment. Aquatic Toxicology 86: 341-351.

Gopalakrishnan, S., Thiliga, H., Huang, W.B. and Wang, K.T. 2009. Immunomodulation in the marine gastropod *Haliotis diversicolor* exposed to benzo(a)pyrene. Chemosphere 75: 389-397.

Haaparanta, A., Valtonen, E.T., Hoffaman, R. and Colmes, J. 1996. Do macrophages centers in freshwater fishes reflect the differences in

- Reynaud, S. and Deschaux, P. 2006. The effect of polycyclic aromatic hydrocarbon on the immune system of fish. *Aquatic Toxicology* 77: 229-238.
- Suresh, N. 2009. Effect of benzo[a]pyrene on liver, spleen and kidney melanomacrophage centers in *Tilapia mossambica*. *Environmental Biology* 30(4): 505-508.
- Wang, X., Sato, T., Xing, B. and Tao, S. 2005. Health risks of heavy metals to general public in Tianjin, China via consumption of vegetable and fish. *Science of the Total Environment* 350: 28-37.
- anguilla L.*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53: 331-347.
- Paulo, D.V., Fontes, F.M. and Flores-Lopes, F. 2012. Histopathological alterations observed in the liver of *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) as a tool for the environmental quality assessment of the Cachoeira River, BA. *Brazilian Journal of Biology* 72: 1-15.
- Pritchard, J.B. 1993. Environmental health perspectives: past, present and prospect. *Aquatic Toxicology* 100: 249-257.

Pathologic liver lesions in orange spotted grouper *Epinephelus coioides* exposed to Benzo[a]Pyrene

Maryam Khaniyan*, Negin Salamat, Alireza Safahieh, Abdolali Movahedinia

Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science, Khorramshahr University of Marine Science and Technology

Abstract

Benzo[a]pyrene (BaP), is a ubiquitous environmental contaminant present in air, water, and sediment. BaP is readily absorbed by all routes of exposure and can pass directly through the plasma membrane of most cell types. The present study was conducted to examine the effects of BaP on liver tissue structure in orange spotted grouper *Epinephelus coioides* affected by different concentration of BaP. In the present report, 100 *E. coioides* were exposed by intraperitoneal injection to 2, 20 and 200 mg/kg of BaP for 14d under laboratory conditions and the samples were taken from fish liver in days 0, 2, 4, 7 and 14 of experiment for histopathological study. The liver samples were fixed in 10% formalin buffer solution. Five-micrometer thick sections were obtained and were stained in hematoxylin/eosin for examination in light microscopy. No pathological alteration was observed in the liver samples of controls fish. The pathological alterations of liver were including of hepatocyte vacuolation, increase of melanomacrophage centers, dilation of diss space, sinusoidal dilation, focal necrosis, hepatocytes hypertrophy, nucleus in a lateral position and hepatocyte degeneration. The frequency and severity of tissue changes rose with the increase of BaP concentration in all sampling days. The most frequency and severity of histopathological alteration were observed in fish treated by 200 mg/kg BaP in day 7.

Keywords: pathology, Liver tissue, Benzo[a]pyrene, *Epinepheluscoioides*.