

## بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیک آبشش ماهی گورخری (*Aphanius sophiae*) در مسمومیت با آرسنیک و کادمیوم در شرایط آب شور و آب شیرین

### • معصومه آریایی

گروه محیط زیست، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران  
• امیرحسین حمیدیان (نویسنده مسئول)

گروه محیط زیست، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران  
• سهیل ایگدری

گروه شیلات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران

• سهراب اشرفی

گروه محیط زیست، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: دی ماه ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۲

Email: a.hamidian@ut.ac.ir

### چکیده

آلاینده‌های اکوسیستم‌های آبی از جمله فلزات سنگین همواره سبب تغییرات آسیب‌شناختی در ماهیان می‌شوند. از آنجایی که اثرات آلاینده‌ها تحت تاثیر ویژگی‌های شیمیایی آب می‌باشد، از این رو این پژوهش با هدف مقایسه تاثیرات هیستوپاتولوژیکی دو فلز سنگین As و Cd بر بافت آبشش ماهی بومی *Aphanius sophiae* انجام شد. در مجموع تعداد ۳۵۰ قطعه ماهی در طی دو فصل بهار و تابستان ۱۳۹۰ از رودخانه شور اشتهارد نمونه برداری گردیدند. برای آب شور، ۷ تیمار حاوی غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۲۰ پی‌پی‌ام آرسنیک و ۵، ۱۰ و ۲۰ پی‌پی‌ام کادمیوم به همراه یک تیمار شاهد در آکواریوم‌های شیشه‌ای ۳۰ لیتری با سه تکرار طراحی شدند. در هر آکواریوم تعداد ۲۵ ماهی معرفی گردید. طرح مشابه نیز برای آب شیرین با استفاده از آب شهری کلرزدایی شده طراحی و اجرا گردید. پس از ۱۸ روز دوره مواجهه، از هر یک از تیمارهای آب شور و شیرین تعداد ۳ ماهی در محلول بوئن تثبیت و سپس آبشش سمت چپ آنها برای بافت‌شناسی جداسازی گردید. تاثیرات در مراحل اولیه هر دو تیمار مورد بررسی شامل جدا شدن لایه اپیتلیال، افزایش تعداد سلول‌های موکوسی و چسبیدن لاملاهای ثانویه بود. نتایج نشان داد که در تیمار آب شیرین شدت این تغییرات بیشتر از آب شور بود. نکروزه شدن سلول‌های آبششی، گریز شدن سر تیغه‌های آبششی، هیپرپلازی و به هم چسبیدن تیغه‌های اولیه و ثانویه با شدت بیشتری در تیمار آب شیرین مشاهده شد. داده‌های حاصل براساس آنالیز چند متغیره Two-way NPMANOVA در نرم‌افزار Past مورد تحلیل قرار گرفتند. با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان نتیجه‌گیری نمود که کاهش غلظت نمک و به دنبال آن کاهش سختی آب تلفات را به میزان ۱۱/۴ برابر افزایش می‌دهد و منجر به افزایش اثرات آسیب‌های بافتی می‌گردد.

کلمات کلیدی: آسیب‌های بافتی، ماهی گورخری، رودخانه شور، اکوتوکسیکولوژی، فلزات سنگین

- Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 105 pp: 57-67

**Study of histopathological changes on gill of *Aphanius sophiae* in arsenic and cadmium toxicity in saltwater and freshwater**

By: Ariyae, M. , IMSc. Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj.

Hamidian, A.H. (Corresponding Author), Department of Environment, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj.

Eagderi, S., Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj.

Asharfi, S., Department of Environment, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj.

Email: a.hamidian@ut.ac.ir

Received: January 2014 Accepted: February 2014

In aquatic ecosystems, pollutants including heavy metals cause pathological alternations in fishes. As, the impacts of pollutants are affected by chemical properties of water, this study was conducted to compare the histopathological effects of two heavy metals As and Cd on Gill structure of *Aphanius sophiae*. A total of 350 specimens were collected from the Shoor River of Eshtehard during the spring and summer of 2011. For saltwater experiments seven treatments including 5, 10 and 20 ppm of As and 5, 10 and 20 ppm of Cd plus a control one were prepared in 30-L glass aquariums with three replicates. Twenty five fish specimens were introduced into each aquarium. Similar experiments were designed for freshwater treatments using dechlorinated tap water. After 18 days of exposure, three specimens were sampled from each treatment and fixed into Boein fixative solution and left gill were removed for histological preparation. The observations of prepared histological sections showed alterations including epithelial lifting, increasing goblet cells and fusion of secondary lamellae in both treatments. Result revealed that the severity of these changes in freshwater was more than saltwater treatment. Necrosis, hyperplasia, fusion of first and secondary lamellae had been intensively occurred in freshwater treatments. Data were analyzed by multivariate analysis Two-way NPMANOVA in Past software. It was concluded that decreasing salinity, which led to a decrease in water hardness can proliferate the losses rate of 11/4 times and histopathological effects as a result of As and Cd pollution.

**Key words: Histopathology, *Aphanius sophiae*, Shoor River, Ecotoxicology, Heavy metals**

## مقدمه

(۲۰۱۰). از این رو در مطالعات آسیب شناسی بافتی، شناخت آسیب های آبششی می تواند به عنوان یک شاخص مدنظر قرار بگیرد. به عنوان نمونه آلودگی شدید منابع آبی با سرب باعث تنگی نفس و اختلالات ژنتیکی در ماهی ها شده و مرگ ومیر آن ها را افزایش می دهد. (Clark, ۱۹۸۶) Oliveira ribeiro ، Guimaraes ، Pfeiffer (۱۹۹۶) در بررسی اثرات کلرید جیوه بر روی ماهی *Trichomycterus zonatus* بیان داشتند که جدا شدن اپیتلیوم آبششی و واکنش شدن آن، ادما، متلاشی شدن سلول های پیلار، اتصال تیغه های آبششی، هیپرتروفی و هیپرپلازی سلول های آبشش مهم ترین عوارض هیستوپاتولوژیک بافت آبشش ماهیان در معرض جیوه می باشند. در بررسی بافت شناسی آبشش وقوع هیپرتروفی سلولی، هیپرپلازی سلول های موکوسی، گریزی شکل شدن و به هم چسبیدن تیغه های آبششی، واکنش شدن و نکروز بافت پوششی آبششی، افزایش سطح ترشح موکوس و تغییرات ادما تیزی به وفور در بافت آبشش ماهیانی که در معرض مواد شیمیایی مختلف قرار گرفته اند مشاهده می شود

در میان آلاینده های زیست محیطی، فلزات سنگین جایگاه ویژه ای دارند چراکه جذب آن ها به صورت کاتیونی توسط جانداران در غلظت های بیش از مقدار مورد نیاز بدن منجر به ایجاد ضایعات متعددی می گردد (Reddy ، Reif ، Bachand ، Ridgway ، ۲۰۰۱). در این بین، آلاینده های اکوسیستم های آبی منجر به آسیب آبزیان، به ویژه ماهیان می گردد. فلزات سنگین از جمله این آلاینده ها هستند که سبب آسیب زیادی بر سلامت ماهیان شده، که اثرات آن در اندام هایی از جمله پوست، کبد، کلیه، خون و آبشش گونه های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است (Amin ، ۱۹۹۸). در بین اندام های مذکور آبشش ها به عنوان مهم ترین جایگاه ارتباط با محیط بیرونی، می تواند به عنوان اولین محل تأثیر آلودگی ها مطرح باشد چراکه آبشش ماهیان اولین مکانی است که به طور مستقیم تحت تأثیر آلاینده ها قرار می گیرند (S. Koca ، Y.B. Koca ، ۱۹۸۴ ، Brafield و Oronsaye) ، Oliveira-Filho Muniz ، Ferreira ، ، ۲۰۰۸ ، Yildiz ، Gurcu

### مواد و روش‌ها نمونه برداری و طرح آزمایش

در این تحقیق در مجموع تعداد ۳۵۰ قطعه ماهی در طی دو فصل بهار و تابستان ۱۳۹۰، از یکی از شاخه‌های فرعی رودخانه شور اشتهارد با مشخصات جغرافیایی "۳۶'۳۱" ۳۵° عرض شمالی و "۴۸'۲۳" ۵۰° طول شرقی و ارتفاع ۱۱۴۳ متر از سطح دریا نمونه برداری گردید. محل نمونه برداری دارای بستری پوشیده از گل بسیار نرم بود که در فصل‌های گرم سال لجنی شده و پوشش گیاهی آن در مناطق کم عمق، گیاهان بن در آب می‌باشد. در آنالیز نمونه‌های گرفته شده از تیمارهای آب شور ۲۷ درصد از نمونه‌ها نر و ۷۳ درصد ماده بودند، همچنین در آنالیز نمونه‌های گرفته شده از تیمارهای آب شیرین ۳۸ درصد از نمونه‌ها نر و ۶۲ درصد ماده بودند. متوسط طول ماهی‌ها در آب شور \* ۲/۴ ± ۰/۳۴ سانتی متر و در آب شیرین ۲/۷۱۵ ± ۰/۱۵۵ سانتی متر و میانگین وزنی ۹/۵ ± ۱/۱ میلی گرم بود. در هنگام نمونه برداری میانگین اکسیژن محلول ۱۰/۶۸ میلی گرم در لیتر، میانگین دمای آب ۱۲/۸۵ ± ۰/۲۲ درجه سانتی‌گراد و pH بین ۷ تا ۸/۵ متغیر بود (شکل ۱). ماهیان پس از صید توسط یک تانک مجهز به سیستم هوادهی به آزمایشگاه منتقل شدند. قبل از انجام آزمایش، ماهیان جهت سازگاری به مدت ۵ روز در یک مخزن ۱۰۰۰ لیتری با هوادهی مناسب، نگهداری و در طی دوره آزمایش با دافنی و غذای دستی (بیومار) تغذیه شدند. در مدت دوره آزمایش میانگین اکسیژن محلول ۸ میلی گرم در لیتر، میانگین دمای آب ۲۷/۵ ± ۰/۲۲ درجه سانتی‌گراد و pH بین ۷/۲۷ تا ۸/۲۴ در تیمارها متغیر بود. در این تحقیق برای تیمارهای آب شور، ۷ تیمار به ترتیب حاوی غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۲۰ پی‌پی‌ام آرسنیک، ۵، ۱۰ و ۲۰ پی‌پی‌ام کادمیوم و یک تیمار شاهد در آکواریوم‌های شیشه‌ای ۳۰ لیتری طراحی شدند، برای ثابت نگه داشتن غلظت فلز مربوطه، هر روز به همان میزان غلظت فلز تهیه کرده و به آکواریوم مربوطه می‌افزودیم (Mansouri و همکاران، ۲۰۱۱). تعداد تکرار در این آزمایش نیز ۳ ماهی از هر آکواریوم در نظر گرفته شده بود که به هر آکواریوم تعداد ۲۵ ماهی اضافه گردید. برای تهیه غلظت‌های مورد نظر از نمک‌های آرسنیک اکساید (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) و نمک کادمیوم کلراید (CdCl<sub>2</sub>) ساخت Merk آلمان استفاده گردید. آب شور با شوری ۱۲-۱۱ گرم در لیتر از محل رودخانه اشتهارد تهیه و به آزمایشگاه منتقل گردید. برای تیمارهای آب شیرین نیز مراحل فوق عیناً تکرار گردید و آب شیرین مورد استفاده آب شهری کلرزدايي شده بود. در طی آزمایش پس از ۱۸ روز دوره مواجهه، در هر نوبت تعداد ۳ ماهی از هر کدام از تیمارهای آب شور و شیرین جهت بررسی اثرات بافت شناسی در محلول بوئن تثبیت شدند. نمونه‌ها پس از ۴۸ ساعت به الکل اتیلیک ۷۲ درصد منتقل و پس از کالبد شکافی ماهیان، بافت آبشش سمت چپ آن‌ها جدا گردید. تهیه مقاطع بافتی بر اساس روش پرافینه انجام شد (Sedigh Marvasti و Posti، ۲۰۱۱). برش‌های بافتی تهیه شده ۵ میکرون بوده و رنگ آمیزی آن‌ها بر اساس روش هماتوکسیلین اتوزین انجام گردید. بررسی اثرات تخریبی هر دو فلز بر روی بافت‌های آبشش در زیر میکروسکوپ نوری در بزرگنمایی‌های مختلف انجام شد. تغییرات بافتی ساختارهای آبشش براساس روش نیمه کمی با استفاده از امتیازات از - تا +++ براساس درجه تغییرمورد ارزیابی قرار گرفت. در این روش (-) بدون تغییر، (+) تغییر خفیف، (++) تغییر متوسط و (+++) تغییر شدید می‌باشد

(Van der ost، Beber، Vermeulen، ۲۰۰۳)

در بین آلاینده‌های فلزات سنگین کادمیوم و آرسنیک سمیت بالایی دارند. ماهی‌ها به‌طور کلی به سمیت کادمیوم حساس می‌باشند، اگرچه برخی گونه‌های خاص مانند سوف و تیلاپیا می‌توانند غلظت‌های بالای کادمیوم را تحمل کنند. مهار و جلوگیری از جذب کلسیم یکی از مکانیسم‌های کلیدی سمیت ناشی از کادمیوم در ماهی می‌باشد. کادمیوم همچنین می‌تواند تعادل یونی را به واسطه تغییر در قابلیت نفوذپذیری غشاها مختل کرده و به ساختار آبشش ماهیان آسیب جدی وارد کند (Lee و Stuebing، ۱۹۹۰). وجود کادمیوم در جیره ماهی تیلاپیا موجب برهم زدن تعادل یونی پلازما و همچنین تغییر در سلول‌های آبششی شده است (Pratap و Wend-laar Bonga، ۱۹۹۳). مطالعات نشان داده است که در معرض کادمیوم قرار گرفتن بر اعمال کبد و کلیه و همچنین جذب کلسیم توسط آبشش در ماهی قزل‌آلا اثر می‌گذارد (Amin، ۱۹۹۸). آرسنیک نیز یک فلز سمی کاملاً شناخته شده است که می‌تواند منجر به مرگ آبزیان گردد. غلظت بالا و خطرناک آرسنیک غیر آلی که در حال حاضر در آب‌های سطحی موجود است، احتمال تغییرات ژنتیکی در ماهی‌ها را افزایش می‌دهد (Nouri، Ferdowsi، Manahan، ۱۹۹۲).

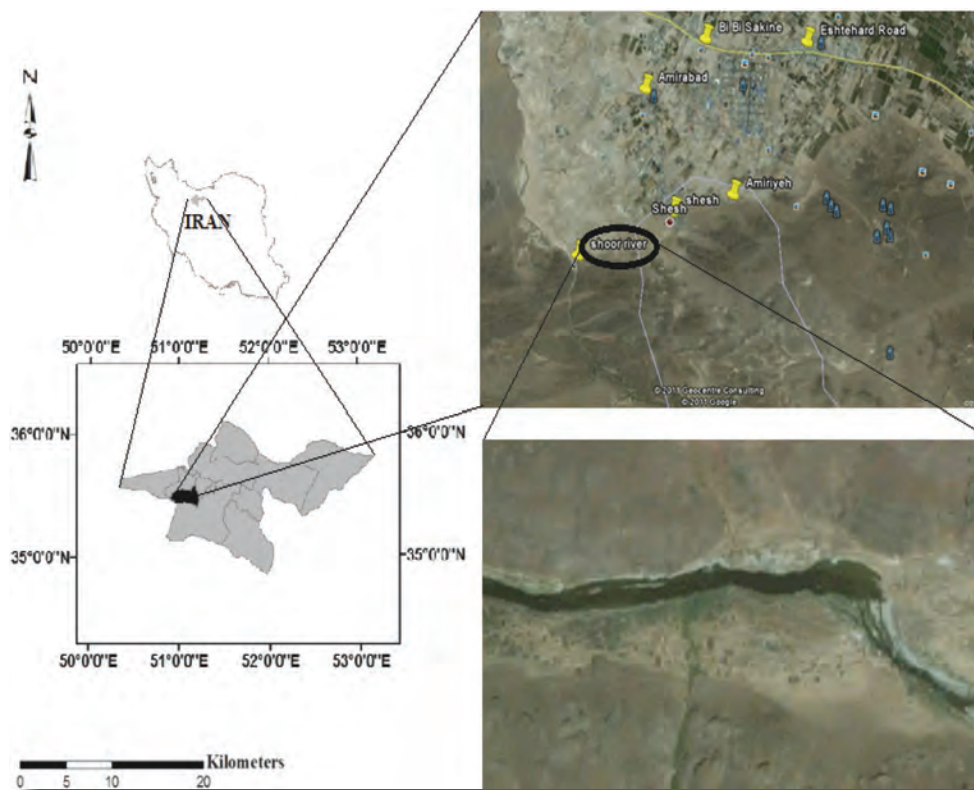
در بین آبزیان ایران، ماهی گورخری (*Aphanius sophiae*) از خانواده کپور دندان ماهیان به عنوان یک گونه بومزاد، پراکنش وسیعی در اکوسیستم‌های آبی ایران دارد (Abdoli، ۱۹۸۹). این گونه در حوضه‌های آبی متعدد ایران از جمله حوضه دجله، دریاچه نمک گزارش شده است و در اکوسیستم‌های آبی مختلف از شور تا شیرین با دمای ۳۷-۵ درجه سانتی‌گراد یافت می‌شود (Coad، ۲۰۱۳) و می‌تواند به عنوان یک مدل یا الگو در مطالعات مربوط به اکوتوکسیکولوژی برای بررسی تأثیر ویژگی‌های محیطی مثل شوری بر میزان سمیت مورد استفاده قرار گیرد چراکه این گونه قادر است در دامنه وسیع شوری زیست نماید (شکل ۱). از این رو این تحقیق با هدف بررسی تأثیر دو فلز سنگین آرسنیک و کادمیوم بر روی بافت آبشش ماهی گورخری (*Aphanius sophiae*) در دو محیط آب شور و شیرین انجام شده است. نتایج این تحقیق می‌تواند به درک بهتر تأثیر آلاینده‌های فوق در اکوسیستم‌های مختلف مثل شور و شیرین بر روی ماهیان کمک نماید.



شکل ۱: نام علمی *Aphanius sophiae* نام فارسی: ماهی گورخری (Toothed carp)

گرفتند. Two-way NPMANOVA یک روش غیر پارامتریک است برای بررسی تفاوت معنی داری بین دو یا چند گروه می باشد که مقادیر F را مشابه آنالیز ANOVA ولی برای داده‌های چند متغیره محاسبه می کند و ارزش P در این روش نیز براساس آزمون Permutation با ده هزار تکرار بیان می گردد. این آنالیز در نرم افزار Past برای بررسی اثرات متقابل بین تیمارهای مختلف انجام شد.

(Roy, Ghosh, Kumar Mandal, 2013). برای بررسی آماری اثرات هیستوپاتولوژیکی تیمارهای مورد بررسی، درجات آسیب های مشاهده شده بین یک تا چهار امتیازدهی شدند، با در نظر گرفتن ۲ سطح شوری (آب شور، آب شیرین)، دو فلز سنگین (As, Cd) و ۳ سطح غلظت های مختلف در هر تیمار (۵، ۱۰، ۲۰ میلی گرم در لیتر)، سپس داده های حاصل براساس آنالیز چند متغیره Two-way NPMANOVA مورد تحلیل قرار



شکل ۲: موقعیت جغرافیایی و ماهواره ای منطقه نمونه برداری (رودخانه شور)

آبشش حالت طبیعی داشتند و هیچ گونه آثار آسیب شناختی قابل توجه بافتی قابل مشاهده نبود. در تیمارهای آرسنیک آب شور، آسیب ها به تدریج با افزایش غلظت از جدا شدن اپیتلیال پوستی به صورت جزئی تا حالت هیپرپلازی سلول های بافت پوششی قابل مشاهده بود. در تیمار کادمیوم آب شور نیز درجه آسیب بافتی بیشتر از آرسنیک بوده و از هیپرپلازی و روی هم افتادگی تیغه های ثانویه تا دژنره شدن سلول های کلراید متغیر بود (شکل ۳ و جدول ۱). درجه آسیب تیمارهای مختلف براساس غلظت های مختلف آلاینده در جدول ۲ آورده شده است.

نتایج مقایسه آماری تفاوت معنی داری را از نظر آسیب های بافتی بین تیمارهای آب شیرین و شور برای هر دو فلز سنگین آرسنیک و کادمیوم نشان داد ( $F=10/47$  و  $P=0/0004$ ). ولی تفاوت معنی داری از نظر میزان آسیب های بافتی بواسطه نوع فلز آلاینده یعنی آرسنیک و کادمیوم در بین تیمارها مشاهده نشد ( $F=0/181$  و  $P=0/194$ ). به علاوه علیرغم تفاوت در

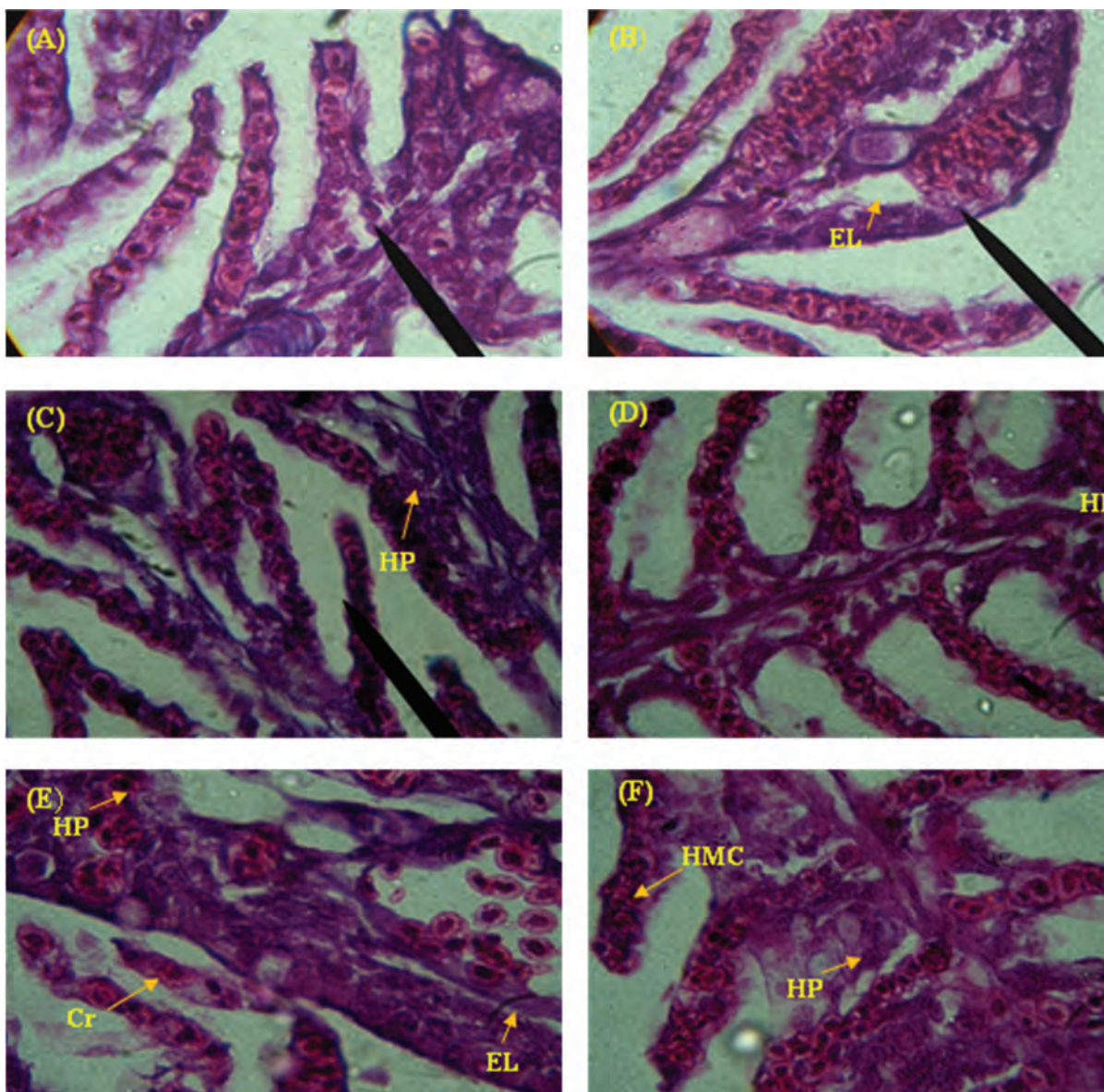
## نتایج

در طی دوره آزمایش در تیمارهای آب شیرین، میزان تلفات ۵۷ درصد بود که میزان ۳۸ درصد از تلفات مربوط به یک روز پس از مواجهه با فلزات سنگین بود. از مقدار کل تلفات در تیمارهای آب شیرین مقدار ۴۴ درصد مربوط به تیمارهای آرسنیک و ۵۶ درصد مربوط به تیمارهای کادمیوم بود. تلفات در کل تانک های آکواریومی آرسنیک و کادمیوم و شاهد از نظر جنسی ۷۶ درصد از کل ماده ها و ۸۵ درصد از کل نرها را شامل شده است. بعلاوه درصد تلفات ماهیان در تیمارهای آب شور ۵ درصد مربوط به تیمارهای آرسنیک بود و میزان تلفات آب شیرین ۱۱/۴ برابر آب شور ثبت گردید.

مشاهدات بافت شناختی تیمارهای مورد بررسی بر اساس مقاطع بافتی تهیه شده تغییرات قابل توجهی را در ساختارهای آبشش نسبت به تیمارهای شاهد نشان داد. در نمونه های شاهد لاملاهای اولیه و ثانویه

از درجه آسیب مشاهده نگردید ( $F=0/5422$  و  $P=0/748$ ).

نوع آسیب، تفاوت معنی داری بین غلظت‌های در معرض قرار گرفته فلزات



شکل ۳: اثرات آسیب‌شناختی آبتشی در غلظت‌های متفاوت فلزات سنگین As, Cd ماهی *Aphanis sophiae* در آب شور بونن، (HE).

(A) تیمار شاهد ( $X1700$ ) حالت نرمال؛

(B) تیمار ( $5\text{ppmAs}$ ) ( $X1700$ ): جداشدگی پوشش تیغه‌های ثانویه؛

(C) تیمار ( $10\text{ppmAs}$ ) ( $X1900$ ): هیپرپلازی؛

(D) تیمار ( $20\text{ppmAs}$ ) ( $X1700$ ): هیپرپلازی؛

(E) تیمار ( $5\text{ppmCd}$ ) ( $X680$ ): جداشدگی پوشش تیغه‌های ثانویه، Cr: خمیدگی و HP: هیپرپلازی؛

(F) تیمار ( $10\text{ppmCd}$ ) ( $X1700$ ): هیپرپلازی و HMC: افزایش سلول‌های موکوسی

جدول ۱: بررسی اثرات هیستوپاتولوژیک آبششی در غلظت‌های متفاوت فلزات سنگین As, Cd در آب شور

غلظت فلزات سنگین (ppm)	نتایج بررسی میکروسکوپی
شاهد	حالت نرمال و بدون اثر هیستوپاتولوژیک خاص (شکل A)
۵ As	جداشدگی ضعیف پوشش تیغه‌های ثانویه (شکل B)
۱۰ As	حجیم شدن پوشش تیغه‌های ثانویه افزایش تعداد Goblet cell، تا حدی هیپرپلازی (شکل C)
۲۰ As	هیپرپلازی سلول‌های بافت پوششی در تیغه ثانویه (شکل D)
۵ Cd	هیپرپلازی بافت پوششی، روی هم افتادگی سلول‌های تیغه ثانویه (خمیدگی) افزایش زیاد تعداد Goblet cell (شکل E)
۱۰ Cd	هیپرپلازی بافت پوششی سلول‌های تیغه ثانویه، خمیدگی سلول‌های تیغه ثانویه بزرگ شدن سلول‌های موکوسی (شکل F)
۲۰ Cd	هیپرپلازی بافت پوششی و جدا شدن سلول‌های تیغه ثانویه و دژنره شدن سلول‌های کلراید

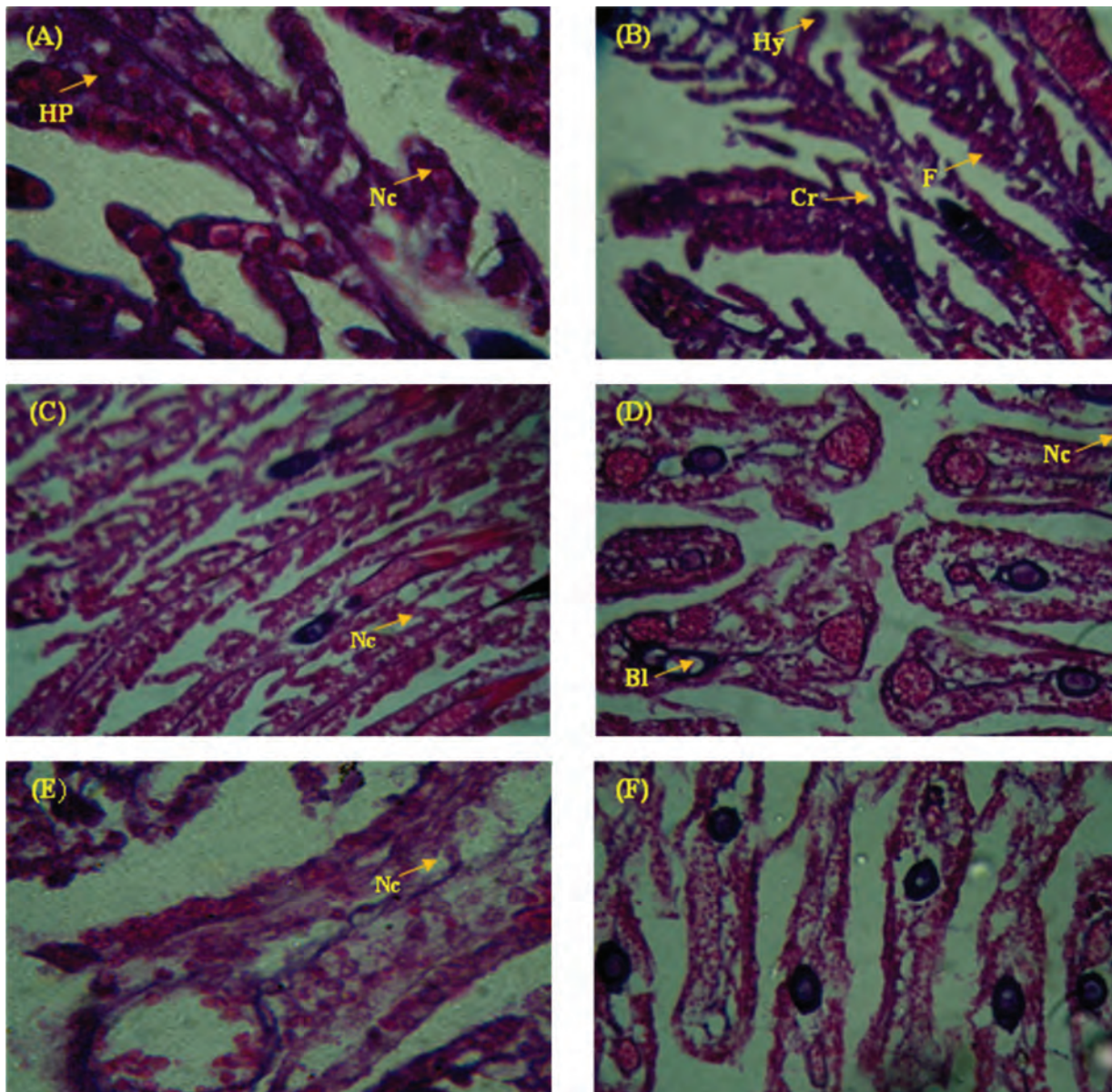
جدول ۲: امتیازدهی نیمه کمی ساختار بافت آبشش در تیمارهای آب شور ماهی *Aphanius sophiae* در مواجهه با As و Cd

Cd (ppm)			As (ppm)			شاهد	اثرات هیستوپاتولوژیک در آب شور
۲۰	۱۰	۵	۲۰	۱۰	۵	۰	غلظت
++	+++	+	++	+	-	-	هیپرپلازی
-	-	+	-	-	+	-	جداشدگی پوشش تیغه‌های ثانویه
-	-	-	-	+	-	-	حجیم شدن پوشش تیغه‌های ثانویه
-	-	++	-	+	-	-	افزایش تعداد Goblet cell
+++	++	+	-	-	-	-	روی هم افتادگی سلول‌های تیغه ثانویه
-	+	-	-	-	-	-	بزرگ شدن سلول‌های موکوسی
++	-	-	-	-	-	-	دژنره شدن سلول‌های کلراید

تیمار Cd آب شور تغییر در اندازه و تعداد سلول‌های موکوسی مشاهده شد.

تغییرات بافتی تیمارهای Cd و As آب شیرین در شکل ۴ آورده شده است.

به طور کلی در تیمارهای Cd و As آب شور، با افزایش غلظت آلاینده جداشدگی اپیتلیال، گریزی شدن سر تیغه‌های آبششی و هیپرپلازی تیغه‌های آبششی ثانویه افزایش می‌یابد، علاوه بر این‌ها در مقاطع بافت آبشش As آب شور نکروزه شدن تیغه‌های ثانویه و در مقاطع بافت آبشش



شکل ۴: اثرات آسیب‌های بافتی در آبشش در آفتاب‌پرست در غلظت‌های فلزات سنگین As، Cd ماهی *Aphanius sophiae* در آب شیرین. (پون، HE).  
(A) تیمار ۵ ppmAs (X1۹۰۰) HP: هیپرپلازی و Nc: نکروزه شدن؛  
(B) تیمار ۱۰ ppmAs (X1۷۰۰): گری شدن سر تیغه‌های آبششی ثانویه، Hy: هیپرپلازی و Nc: نکروزه شدن؛  
(C) تیمار ۲۰ ppmAs (X۸۴۰) نکروزه شدن؛  
(D) تیمار ۵ ppmCd (X1۷۰۰) Nc: نکروزه شدن و Bl: گشاد شدن رگ‌ها؛  
(E) تیمار ۱۰ ppmCd (X۶۸۰) نکروزه شدن و تخریب بافت؛  
(F) تیمار ۲۰ ppmCd (X۷۶۰) مشاهده تخریب کلی بافت

گری شدن سر تیغه‌های آبششی، هیپرپلازی و بهم چسبیدن تیغه‌های اولیه و ثانویه و در مقاطع بافت آبشش Cd آب شیرین گشاد شدن رگ‌ها (تلاژیکتازی=آنروسیسم) مشاهده شد (جدول ۳). درجه آسیب تیمارهای مختلف براساس غلظت‌های مختلف آلاینده در جدول ۴ آورده شده است.

در تیمارهای آب شیرین میزان و درجه آسیب‌های بافتی بیشتر از تیمارهای آب شور بود. در تیمارهای Cd و As آب شیرین با افزایش غلظت آلاینده نکرزه شدن افزایش می‌یابد و آسیب و تخریب در غلظت‌های بالا به حداکثر می‌رسد. علاوه بر آن در مقاطع بافت آبشش As آب شیرین

جدول ۳: بررسی اثرات هیستوپاتولوژیک آبششی در غلظت‌های متفاوت فلزات As, Cd در آب شیرین

غلظت فلزات سنگین (ppm)	نتایج بررسی میکروسکوپی
شاهد	حالت نرمال و بدون اثر هیستوپاتولوژیک خاص
۵ As	آسیب شدید، نکرزه شدن کل بافت، گری شدن سر تیغه‌های آبششی ثانویه، به هم چسبیدن تیغه‌های آبششی ثانویه، هیپرپلازی سلول‌های موکوسی در تیغه‌های آبششی اولیه (شکل A)
۱۰ As	گری شدن سر تیغه‌های آبششی ثانویه، به هم چسبیدن تیغه‌های آبششی ثانویه، هیپرپلازی تیغه‌های آبششی اولیه، خورده شدن پوسته و بافت پوششی تیغه‌های ثانویه (شکل B)
۲۰ As	تخریب کلی، نکرزه شدن تیغه‌های آبششی ثانویه، نکرزه بافت پوششی و مرگ سلول‌های موکوسی هیپرپلازی سلول‌های موکوسی در تیغه‌های آبششی اولیه (شکل C)
۵ Cd	تخریب دیوارهای پوششی تیغه‌های اولیه و ثانویه، گری شدن سر تیغه‌های آبششی ثانویه، گشاد شدن رگ‌ها (شکل D)
۱۰ Cd	تخریب کلی، نکرزه کامل آبشش (شکل E)
۲۰ Cd	خورده شدن کامل تیغه‌های ثانویه (شکل F)

جدول ۴: امتیازدهی نیمه کمی ساختار بافت آبشش در تیمارهای آب شیرین ماهی *Aphanius sophiae* در مواجهه با Cd و As

Cd (ppm)			As (ppm)			شاهد	اثرات هیستوپاتولوژیک در آب شیرین
۲۰	۱۰	۵	۲۰	۱۰	۵	۰	غلظت
-	-	-	+++	++	+	-	هیپرپلازی
+++	++	-	+++	-	++	-	نکرزه شدن
++	+	+	++	+	+	-	گری شدن سر تیغه‌های آبششی ثانویه
+++	++	+	+++	++	+	-	به هم چسبیدن تیغه‌های آبششی ثانویه
-	-	-	-	++	-	-	خورده شدن تیغه‌های ثانویه
-	-	+	-	-	-	-	گشاد شدن رگ‌ها
++	+++	+	+++	+	++	-	تخریب کلی بافت



## بحث

شور مشاهده نگردید ولی در تیمار آب شیرین شدت این آسیب در تیمارهای با غلظت بالا به حدی بود که باعث ایجاد تلفات بالا حتی در روزهای اول مواجهه شده بود. در تیمار آب شیرین میزان تلفات کل پس از ۲۴ ساعت در معرض غلظت‌های مختلف As و Cd ۳۸ درصد بود. این مرگ بواسطه دژنره شدن و نکروز سلول‌های آبششی در نتیجه کمبود اکسیژن بافتی بوده است (Visoottivisetth ، Thamamaruitkun ، Kruatrachue ، Sahaphong ، Riengrojpitak ، Varanka ، ۱۹۹۹ ، Abraham و Rojik ، Nemcso ، ۲۰۰۱ ، O'Brein و Pourahamad ، ۲۰۰۰) از این رو نه تنها نوع آلاینده و میزان غلظت آلاینده بلکه ویژگی آب نیز از عوامل تأثیرگذار بر میزان آسیب بافتی بر روی ساختار آبشش ماهی گورخری می‌باشد.

از آنجایی که در بررسی آماری تمامی آسیب‌های بافتی از نظر نوع آسیب به یک میزان امتیازدهی شده بودند و یا به عبارت دیگر در این روش ارزش یکسانی برای آنها در نظر گرفته شده بود، تفاوت آماری بین غلظت‌های مورد مطالعه نمی‌تواند ملاک قرار گیرد و نیاز است که به صورت توصیفی نیز مورد مقایسه قرار گیرند. ولی براساس نتایج آماری می‌توان نتیجه گرفت که آسیب‌هایی از قبیل دژنره شدن سلول‌های کلراید، بزرگ شدن سلول‌های موکوسی، افزایش تعداد Goblet cell، گشاد شدن رگ‌ها و جداشدگی پوشش تیغه‌های ثانویه آسیب‌هایی هستند که در مراحل اولیه و در غلظت‌های پایین شروع و درجه آن‌ها با افزایش غلظت تغییر معنی‌داری را نشان نمی‌دهد. از این رو این آسیب‌ها می‌توانند بعنوان آسیب‌های قابل برگشت یا آسیب‌هایی که در صورت شرایط مساعد محیطی بهبود خوانند یافت. در نظر گرفته شوند. بر همین اساس آسیب‌ها شامل گریزی شدن سر تیغه‌های آبششی ثانویه، بهم چسبیدن تیغه‌های آبششی، هیپرپلازی و نکروزه شدن می‌توانند به عنوان آسیب‌های غیرقابل برگشت در نظر گرفته شوند چرا که در آنالیز مجزای امتیازات مربوط به این آسیب‌ها تفاوت بین غلظت‌ها معنی‌دار بود.

همان‌طور که نتایج نشان داد میزان تخریب بافتی در غلظت‌های As بیشتر از Cd و در آب شیرین بیشتر از آب شور بود به طوری که میزان تلفات در آب شیرین ۱۱/۴ برابر تیمار آب شور مشاهده شد. کاهش غلظت نمک و به دنبال آن کاهش سختی آب تلفات ناشی از As و Cd را در محیط افزایش می‌دهد چراکه سمیت فلزات سنگین در ماهی تابعی از غلظت یون آزاد فلزی است که تحت کنترل مقدار کلرید آب قرار دارد (Weiner، ۲۰۰۷) و هنگامی که غلظت یون کلرید افزایش می‌یابد، غلظت یون‌های فلزی آزاد نسبت به غلظت کل فلز به دلیل پیوند با یون‌های کلرید کاهش می‌یابد، به عبارت دیگر ممکن است دلیل اینکه سمیت در شوری کم افزایش می‌یابد مربوط به اختلال تنظیمات اسمزی و کاهش یون‌های فلزی آزاد باشد.

افزایش شوری و به دنبال آن افزایش سختی آب باعث کاهش سمیت فلزات سنگین برای موجودات زنده به ویژه ماهیان می‌گردد چراکه با کاهش سختی حلالیت فلزات سنگین در آب افزایش و سمیت فلزات افزایش می‌یابد (Weiner ، ۲۰۰۷). تحقیقات Pyle، Swanson و Lehmkucht (۲۰۰۲) نشان داد که با افزایش ۷ برابری سختی آب (از ۲۰ تا ۱۴۰ میلی گرم در لیتر) میزان سمیت نیکل برای لاروهای ماهی مینو سربزرگ (Pimephales promelas) تا ۵ برابر کاهش می‌دهد. آنها بیان داشتند که

در آلودگی اکوسیستم‌های آبی، وقتی ماهیان در معرض آلودگی قرار می‌گیرند، آبشش به عنوان یک شاخص در مرحله اول به صورت مستقیم در معرض آلودگی قرار می‌گیرد. (Clark، ۱۹۸۶، Mansouri و همکاران، ۲۰۱۱a) همان‌طور که نتایج این تحقیق نشان داد، هر دو فلز سنگین مورد مطالعه در تمامی غلظت‌های مورد بررسی باعث ایجاد تغییرات در بافت آبشش شده بودند که از آسیب‌های قابل برگشت مثل نکروزه شدن، جداشدگی اپیتلیال و افزایش تعداد سلول‌های موکوسی در غلظت‌های پایین تا گریزی شدن تیغه‌ها، بهم چسبیدن و هیپرپلازی سلول‌های موکوسی تیغه‌های اولیه و ثانویه متغیر بود. اساساً آبشش‌ها اندام‌های حیاتی موجودات آبی برای تنفس و تنظیم فشار اسمزی می‌باشند (Evan ، ۱۹۹۳). که به واسطه فلزات سنگین و سموم باعث بروز اختلالات تنفسی عمده در ماهیان می‌گردند (Patil و Magare ، ۲۰۰۰).

نتایج این تحقیق به منظور مقایسه تأثیر فلزات سنگین آرسنیک و کادمیوم در دو محیط آب شیرین و شور نشان داد که تأثیرات در مراحل اولیه هر دو محیط مورد بررسی شامل جداشدگی لایه اپیتلیال، افزایش تعداد سلول‌های موکوسی و چسبیدن لاملاهای ثانویه بود ولی در تیمار آب شیرین شدت این تغییرات بیشتر از آب شور بود. چنین تغییراتی نه تنها باعث کاهش سطح در دسترس لاملا برای تماس با آلاینده (Lappivaara ، Nikinmaa و Tuurala ، ۱۹۹۵)، بلکه سبب افزایش فاصله بین آب و خون نیز می‌گردد (Skidmore و همکاران ، ۱۹۷۲) که می‌تواند کمبود اکسیژن در بافت‌ها را موجب گردد (Cerqueira و Fernandes ، ۲۰۰۲). نکروزه شدن سلول‌های آبششی، گریزی شدن سر تیغه‌های آبششی، هیپرپلازی، بهم چسبیدن تیغه‌های اولیه و ثانویه و گشاد شدن رگ‌های خونی در غلظت‌های پایین تیمارهای آب شیرین نسبت به آب شور قابل توجه بود که بیانگر پاسخ‌های فیزیولوژیکی بیشتر ماهیان در آب شیرین می‌باشد (Adil و همکاران، ۲۰۱۱). چنین مشاهداتی در مورد تأثیر فلزات سنگین بر روی ساختارهای آبششی ماهیان بوسيله Oliveira ribeiro و همکاران (۱۹۹۶) در ماهی *Trichomycterus zonatus*، Ribeiro Oliveira و Torres (۱۹۹۵) در ماهی *Trichomycterus brasiliensis*، Atabati، Safaeian ، Ros- و Vatandoost (۲۰۰۹)، Keykhosravi و Sabrjo و tami (۲۰۰۸) در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) و نتایج (Strazielle ، Daoust ، Godard ، Devaux ، Legras ، ۱۹۹۴) بر روی آبشش قزل آلی رنگین کمان نیز گزارش شده است. با توجه به نتایج این تحقیق و موارد ذکر شده بر روی گونه‌های دیگر (Erol ، Ilhan ، Baron ، Ertugrul ، ۲۰۱۲)، بنابراین به نظر می‌رسد که غلظت‌های پایین فلز سنگین در محیط آب شیرین اثرات بسیار شدیدی از نظر بافت‌شناختی بر روی ساختار آبشش ماهی می‌گذارد. علاوه بر این در این ماهی ساختار آبشش می‌تواند به عنوان یک اندام مهم برای بررسی آسیب‌های بافتی ناشی از آلاینده‌های فلز سنگین در تماس مستقیم با محیط و آلاینده باشد.

در بافت‌های آبشش مورد بررسی در تیمارهای آب شیرین افزایش آلاینده باعث افزایش نکروزه شدن، گریزی شدن، بهم چسبیدن تیغه‌های آبششی و بطور کلی تخریب بافت آبشش گردید که به عنوان یک آسیب غیرقابل برگشت می‌تواند باشد. نکروزه شدن ساختار آبششی در تیمار آب

ability of the derivatization procedure for PEEK molecular-mass determination-application to PEEK-carbon fibre composite. *Polymer*, Vol, 35, No, 25. pp: 5498-5503.

10- Evans, DH. (1993). *The physiology of fishes*. Boca Raton, Florida: CRC Press.

11- Karthikeyan, S. Palaniappan, P.R. and Sabhanayakam, S. (2007). Influence of pH and water hardness upon nickel accumulation in edible fish *Cirrhinus mrigala*. *Journal of Environmental Biology*, Vol, 28, No, 2. pp: 489-492.

12- Koca, S. Koca, Y.B. Yildiz, S. and Gurcu, B. (2008). Genotoxic and histopathological effects of water pollution on two fish species, *Barbus capito pectoralis* and *Chondrostoma nasus* in the Büyük Menderes river, Turkey. *Biological Trace Element Research*, Vol, 122, No, 3. pp: 276-291.

13- Lappivaara, J. Nikinmaa, M. and Tuurala, H. (1995). Arterial oxygen tension and the structure of the secondary lamellae of the gills in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after acute exposure to zinc and during recovery. *Aquat. Toxicol*, Vol, 32, No, 4. pp: 321-331.

14- Lee, YH. and Stuebing, RB. (1990). Heavy metal contamination in the river toad, *Bufo juxtasper* (Inger), near a copper mine in east Malaysia. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol, 45, No, 2. pp: 272-279.

15- Mansouri, B., Ebrahimpour, M. Babaei, H. 2011a. Bioaccumulation and elimination of nickel in the organs of black fish (*Capoeta fusca*). *Toxicology and Industrial Health*, Vol, 28, No, 4. pp: 361-368.

16- Mansouri, B., Ebrahimpour, M. Babaei, H. 2011b. Determine of heavy metals in different tissues of Black Fish (*Capoeta fusca*) in central part Qanats of Birjand. *Veterinary Journal (Pajouhesh and Sazandegi)*, No, 89. pp: 45-52

17- Magare, SR. Patil, HT. (2000). Effect of pesticides on oxygen consumption, red blood cell count and metabolites of a fish, *Puntius ticto*. *Environ Ecol*, Vol, 18, No, 5. pp: 891-894.

18- Naji, T. Safaeian, Sh. Rostami, M. and Sabrjo, M. (2008). Effects of zinc sulfate on gill tissues of carp (*Cyprinus carpio*). *Environmental Science and Technology*, Vol, 9, No, 2. pp: 29-36.

19- Nouri, J. Ferdowsi, S. Manahan, S. (1992). *Chemistry of environment*, First press, Tehran. Iamc Azad University Publication Center.

20- Oliveira-Filho, E.C. Muniz, D.H.F. and Ferreira, M.F.N. (2010). Cesar Koppe Grisolia evaluation of acute toxicity, cytotoxicity and genotoxicity of a nickel mining waste to *Oreochromis niloticus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol, 85, No, 5. pp: 467-471.

این کاهش سمیت در اثر رقابت بین یون های کلسیم و منیزیم برای باند شدن در بدن ارگانیسم می باشد به عبارتی می توان گفت که سختی آب با اشباع کردن سطح آبشش ماهی با کاتیون کلسیم، میزان سمیت فلزات سنگین را کاهش می دهد. همچنین مطالعات Karthikeyan, Pal -niappan و Sabhanayakam (۲۰۰۷) نشان داد که افزایش سختی آب از ۲۷۰ به ۵۶۰ میلی گرم در لیتر میزان سمیت جیوه را برای ماهیان قد انگشتی کیپور ماهیان هندی (*Catla catla*, *Labeo rohita* و *nus mirigala*) از ۱/۰۱ تا ۱/۳ برابر کاهش می دهد. به طور کلی می توان گفت، سختی زیاد آب برای ارگانیسم های آبی بسیار مفید می باشد زیرا با افزایش سختی میزان سمیت فلزات سنگین کاهش می یابد.

## پاورقی

\* ±SD میانگین

## منابع مورد استفاده

- 1- Abdoli, A. (1989). *Freshwater fishes of Iran*. Printing, Publishing Museum of Nature and Wildlife of Iran. 377pp.
- 2- Adil, A.Wani, M. Sikdar-Bar, K. Borana, H.A. Khan, S.S.M. Andrabi and Pervaiz, P.A. (2011). Histopathological Alterations Induced in Gill Epithelium of African Catfish, *Clarias gariepinus*, Exposed to Copper Sulphate. *Society of Applied Sciences*, Vol, 2, No, 2. pp:278-282.
- 3- Amin, R. (1998). Effects of heavy metals on fish. Fisheries expert discussions. Bachelor discussions of Department of Fisheries and the environment. Tehran University.
- 4- Atabati, A. Keykhosravi, A. and Vatandoos, J. (2009). Toxic effects of various concentrations of zinc and copper in the liver and gills of common carp (*Cyprinus carpio*). Twelfth Conference of Environmental Health, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Faculty of Health: 2628-2637.
- 5- Baron, H. Erol, C. Ilhan, A. and Ertugrul, T. (2012). Assessment of acute toxicity and histopathology of the fungicide captan in Rainbow trout. *Experimental and Toxicologic Pathology*, Vol, 64, No, 3. pp: 175-179.
- 6- Cerqueira, C.C.C. and Fernandes, M.N. (2002). Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter response in the tropical fish *Prochilodus scofa*. *Ecotox. Environ. Saf*, Vol, 52, No, 2. pp: 83-91.
- 7- Clark, R.B. (1986). *Marine pollution* Clarendon Press. Oxford London. pp: 64-82.
- 8- Coad, B. W. (2013). *Freshwater Fishes of Iran* (Available at <http://www.briancoad.com>) (accessed on 11 July 2013).
- 9- Daoust, D. Godard, P. Devaux, J. Legras, R. and Strazielle, C. (1994). Chemical modification of poly (ether ether ketone) for size exclusion chromatography at room temperature: 2. On the reli-

- 21- Oliveira ribeiro, C.A. Guimaraes, J.R.D. and Pfeiffer, W.C. (1996). Accumulation and Distribution of Inorganic Mercury in a Tropical Fish (*Trichomycterus zonatus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol, 34, No, 2. pp: 190-195.
- 22- Oronsaye, J. A. O. and Brafield, A.E. (1984). The effect of dissolved cadmium on the chloride cells of the gills of the stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L. *Journal of Fish Biology*, Vol, 25, No, 2. pp: 253-258.
- 23- Posti, I and Sedigh Marvasti, A. (2011). *An Atlas of Fish Histology Normal and Pathological Features*. (F. Takashi Hibiya). Tehran University Press. (Original work published 1984)
- 24- Pourahamad, J. and O'Brien, P. J. (2000). A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanisms for Cu<sup>2+</sup>, and Cd<sup>2+</sup>. *Toxicol*, Vol, 143, No, 3. pp: 263-273.
- 25- Pratap, H.B. and Wendlaar-Bonga, S.E.W. (1993). Effects of ambient and dietary Cadmium on Pavement cells, Chloride cell and Na<sup>+</sup>-k<sup>+</sup> ATPase activity in the gills of freshwater, teleost, *Oreochromis mossambicus* normal and high Cadmium levels in the ambient Water. *Aquat. Toxicol*, Vol, 26, No, 3. pp: 133-150.
- 26- Pyle, G.G. Swanson, S.M. and Lehmkuht, D.M. (2002). The influence of water hardness, pH, and suspended solids on nickel toxicity to larva fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Water Air and Soil Pollution*, Vol, 133, No, 1-4. pp: 215-226.
- 27- Reddy, M.L. Reif, J.S. Bachand, A. and Ridgway, S.H. (2001). Opportunities for using Navay marine mammals to explore associations between organochlorine contaminates and unfavorable effects on reproduction. *Science of the Total Environment*, Vol, 274, No, 3. pp: 171-182.
- 28- Roy, D. Ghosh, D. Kumar Mandal, D. (2013). Cadmium induced histopathology in the olfactory epithelium of a snakehead fish, *Channa punctatus* (Bloch). *International Journal of Aquatic Biology*, Vol, 1, No, 5. pp: 221-227.
- 29- Skidmore, J.F. and Towell, P.W.A. (1972). Toxic effects of zinc sulphate on the gills of rainbow trout. *Water Research*, Vol, 6, No, 3. pp: 271-230.
- 30- van der Ost, R. Beber J. and Vermeulen, N.P.E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, Vol, 13, No, 2. pp: 57- 149.
- 31- Varanka, z. Rojik, I. Nemcsok, J. and Abraham, M. (2001). Biochemical and morphological change in caro (*Cyprinus carpio*) liver following exposure to copper sulfate and tannic acid. *Comp. Biochem. Physiol part. C*, Vol, 128, No, 3. pp: 467-478.
- 32- Visoottiviset, P. Thamamaruitkun, T. Sahaphong, S. Rienrojpitak, S. and Kruatrachue, M. (1999). Histopathological effects of triphenyltin hydroxide on liver, kidney and gill of Nile tilapia (*Oreochromis nilotica*). *Appl. Organometal Chem*, Vol, 13, No, 10. pp: 749-763.
- 33- Wani, A.A. Sikdar-Bar, M. Borana, K. Khan, H.A. Andrabi, S.S.M. et al., (2011). Histopatological Alterations Induced in Gill Epithelium of African Catfish, *Clarias gariepinus*, Exposed to Copper Sulphate. *Asian J. Exp. Biol. Sci*, Vol, 2, No, 2. pp: 278-282.
- 34- Weiner, E.R. (2007). *Applications of environmental chemistry: A practical guide*. 2nd ed. CRC Press. Boca Raton. pp. 352.

