

بررسی تاثیر جیوه بر روی بافت کبد ماهی زروک (*Scatophagus argus* Linnaeus)

چکیده

در این مطالعه تاثیر فلز سنگین جیوه بر روی تغییرات ساختار بافتی در کبد ماهی زروک (*Scatophagus argus*) مورد بررسی قرار گرفت. هدف تشخیص میزان فلز و تاثیر میزان طول دوره در معرض و تغییرات بافت شناسی در کبد ماهی نمونه بود. ماهی انتخاب شده در معرض غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ قسمت در بیلیون جیوه برای سه دوره کوتاه مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته قرار داده شد. بررسی بافت کبد در دوزها و زمان‌های مختلف در معرض بودن جیوه نشان داد که تغییراتی در بافت کبد و سلول‌های کبدی بر اثر وجود جیوه ایجاد شده است. از جمله این تغییرات واکوئول‌زایی سلول‌های کبدی، نکروز هسته هیپاتوسیت‌ها، تورم ابری سلول‌های کبدی، دژنره شدن واکوئول‌ها و تراکم رگ‌های خونی می‌باشد. شدت این تغییرات بافتی متاثر از دوز جیوه و مدت زمان مورد نظر بود.

واژگان کلیدی: زروک، کبد، جیوه، تغییرات بافتی، *Scatophagus argus*.

آرام روشن^{۱*}
حسن مروتی^۲
یدالله نیکپور^۳
حسین ذوالقرنین^۴
محمد تقی رونق^۵

۱. دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشجوی دکتری بیولوژی جانوران دریا، خرمشهر، ایران
۲. دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده دامپزشکی، دانشیار گروه بافت شناسی، اهواز، ایران
۳. دانشگاه علوم و فنون دریایی، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، استادیار گروه شیمی دریا، خرمشهر، ایران
۴. دانشگاه علوم و فنون دریایی، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، استادیار گروه بیولوژی دریا، خرمشهر، ایران

*مسئول مکاتبات:

A_Roshan60@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۰/۱۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۲/۳

مقدمه

تعدادی از فلزات سنگین عناصر ضروری برای متابولیسم موجودات به شمار می‌آیند، در حالی که بقیه نقش بیولوژیکی خاصی را بازی نمی‌کنند (Prosi, 1979; Cross and Sanders, 1997; Sunda, 1985; Rainbow, 1985). به هر حال، فعالیت‌های انسانی موجب افزایش ورود غلظت‌های مختلفی از هر دو فلزات ضروری و غیر ضروری به اکوسیستم‌های آبی می‌شوند. بنابراین، موجودات آبی در معرض سطوح بالای غیر طبیعی از این فلزات قرار می‌گیرند. تاثیرات اولیه آلودگی فلزات سنگین ممکن است در ابتدا فقط در سطح سلولی یا بافتی بروز کند، قبل از این که تغییرات بارزی را در رفتار و علائم ظاهری ماهی ایجاد نماید. آلودگی جیوه در اکوسیستم‌های آبی، از زمانی که جیوه به عنوان عامل بیماری

فلزات سنگین به طور طبیعی در محیط وجود داشته و در سطوح مختلف در آب‌های سطحی یافت می‌شوند (Martin and Coughtrey, 1982). براساس اظهارات Mason (۱۹۹۱) آلودگی فلزات سنگین یکی از پنج نوع اصلی آلوده‌کننده‌های سمی معمول حال حاضر در آب‌های سطحی جهان می‌باشد. آلوده‌کننده‌های محیطی مهم، در بدن موجودات متراکم می‌شوند، پایداری شیمیایی بالایی در محیط دارند و یا تعداد تجزیه کننده‌های زیستی آنها در محیط بسیار کم می‌باشد. این آلاینده‌ها قدرت حلالیت بالایی داشته و تاثیر بسیار زیادی بر محیط می‌گذارند (Hellawell, 1986; Sanders, 1997). Sanders (۱۹۹۷) بیان می‌دارد که فلزات سنگین همه این ویژگی‌ها را داشته و از آلاینده‌های اصلی اکوسیستم‌های آبی به حساب می‌آیند.

Minamata در سال ۱۹۵۰ میلادی شناخته شد، توجه زیادی را به خود جلب کرده است (Arribere et al., 2003). جیوه غیر آلی از طرق مختلفی وارد اکوسیستم آبی می‌شود. در این اکوسیستم، بخشی از جیوه غیر آلی به متیل جیوه تبدیل شده، سپس توسط موجودات آبی جذب می‌گردد. ماهی، جیوه را مستقیماً از طریق غذا و یا آبی که در آن زیست می‌کند، جذب نموده و می‌تواند میزان بالایی از این فلز را به صورت بیولوژیکی در بافت‌های خود متراکم کند (Rainbow, 1985). به همین دلیل غذاهای دریایی از جمله ماهی، خود به تنهایی به عنوان بزرگ‌ترین منبع متیل جیوه برای انسان قابل توجه است (Clarkson, 2002).

در آلودگی فلزات سنگین، ارگان‌هایی مانند آبشش و کبد محل تجمع فلزات سنگین محسوب می‌شوند (Gbem et al., 2001). کبد اندام سم زدا در بدن بوده و در متابولیسم و ترشح مواد سمی بدن نقش مهمی را ایفا می‌کند. بنابراین ورود فلزات سنگین به کبد، ممکن است موجب تغییرات بافتی در کبد گردد (Hinton and Lauren, 1990).

ماهی زروک یک ماهی استخوانی و یوری‌هالین می‌باشد که پراکنش وسیعی در آب‌های نزدیک سواحل در منطقه هند-آرام دارد. توانایی بسیار بالایی در تطبیق و حفظ تعادل بدن در مقابل تغییرات شوری محیط زیست داشته و در آب‌های لب‌شور قادر به زیست می‌باشد. این گونه، یک ماهی آکواریومی است که بسیار مورد توجه و علاقه مردم سراسر جهان بوده و در اندازه‌های مختلف در برخی از مناطق جهان از جمله فیلیپین (حتی در ایران) به عنوان یک ماهی لذیذ از آن تغذیه می‌کنند.

این خانواده متعلق به زیر راسته Acanthuroidei از راسته سوف ماهی شکلان (Perciformes) می‌باشد. اولین فسیل‌های گونه‌های متعلق به این خانواده از رسوبات متعلق به اواخر تریاس و اواخر ائوسن شناسایی شده‌اند (گزارش Fishbase).

بافت‌شناسی ایزاری مهم برای ارزیابی اثرات آلودگی در فرآیندهای حیاتی نظیر رشد و تولیدمثل به‌شمار می‌آید (Stentiford et al., 2003). این موضوع ثابت شده که

آزمایشات بافت‌شناسی، نقش ارزشمندی در تعیین اثر آلوده کننده‌های محیطی روی ماهی دارند (Heath, 1995). در این مطالعه تأثیر فلز سنگین جیوه بر روی تغییرات ساختار بافتی در کبد ماهی زروک (*Scatophagus argus*) مورد بررسی قرار گرفت. هدف از این مطالعه، تشخیص تغییرات در بافت کبد بعد از در معرض قرار دادن ماهی در غلظت‌های مختلف جیوه در دوره‌های کوتاه مدت بود.

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۰۰ قطعه ماهی زروک با میانگین وزنی $170/31 \pm 3/704$ گرم و طول متوسط $13/24 \pm 0/165$ در سال ۱۳۸۶ از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان زینتی مروارید جنوب (وابسته به بخش خصوصی- بوشهر) تهیه و به دانشکده علوم دریایی دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر انتقال داده شد.

برای انجام این تحقیق، جیوه به صورت کلرید جیوه II مستقیماً به آب اضافه گردید و پس از انجام محاسبات لازم، میزان غلظت‌های مورد نظر (۱۰، ۲۰ و ۳۰ قسمت در بلیون) جیوه در حجم مشخص آب شرب کلر زدایی شده شهر خرمشهر تامین گردید. پس از انجام عملیات دسته‌بندی (براساس اندازه به صورت چشمی)، ماهیان در دسته‌های ۵ تایی در سه تکرار و با انجام پروسه هم‌دمایی به آکواریوم‌های در نظر گرفته شده محتوی غلظت‌های مورد نظر جیوه و آکواریوم بدون جیوه به عنوان گروه شاهد انتقال یافتند. در طی دوره آزمایش سنجش خصوصیات فیزیکوشیمیایی آب از قبیل شوری، دما، pH با استفاده از ترمومتر دیجیتالی و pH متر دیجیتالی انجام گردید.

پس از اتمام دوره آزمایش، نمونه‌برداری در سه مرحله زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته که در معرض هر سه غلظت (۱۰، ۲۰ و ۳۰ قسمت در بلیون) قرار گرفته بودند، انجام گرفت. برای خارج کردن کبد ابتدا ماهی بیهوش گردید. برای این کار از یک وان فایبر گلاس حاوی ۲۰ لیتر محلول ۱۰۰ قسمت در میلیون ماده بیهوشی عصاره پودر میخک (رازی، ایران) استفاده شد. سپس ماهی‌ها از آکواریوم خارج و به وان منتقل گردیدند. پس از بیهوشی کامل و انجام بیومتری (ثبت مقادیر طول کل، طول استاندارد و وزن کل)، شکم ماهی از ناحیه جلوی باله شکمی تا

نتایج

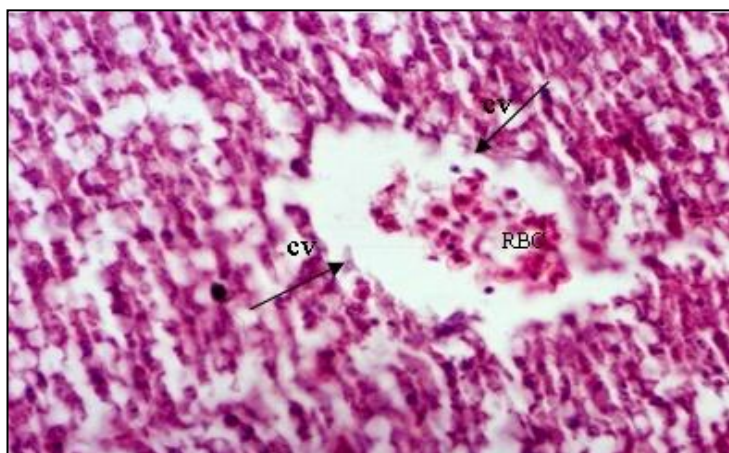
بررسی علائم ظاهری در مطالعه حاضر در ماهیانی که در معرض دوزهای مختلف جیوه قرار گرفته بودند (۱۰، ۲۰ و ۳۰ قسمت در بلیون)، نشان داد که آن‌ها از نظر وضعیت سلامت باله‌ها، فلس‌ها، چشم‌ها، دهان و پوست در شرایط مناسبی هستند. هیچ‌گونه رفتار غیر عادی در طول دوره آزمایش مشاهده نگردید و ماهی‌ها دارای حرکات شنای غیرعادی نبودند. همچنین هیچ‌گونه مرگ و میری در سراسر دوره آزمایش در ماهیان در معرض دوزهای مختلف جیوه مشاهده نشد.

مشاهدات نشان داد هنگام خارج کردن کبد از محوطه شکمی، با افزایش میزان دوز جیوه و زمان در معرض قرارگیری، بافت کبد نسبت به نمونه‌های شاهد از نظر استحکام دارای قوام کم‌تر، نرم‌تر و با رنگ پریدگی به نظر می‌رسید. رنگ پریدگی و نرمی بافت در دوره زمانی ۷۲ ساعت و دوز ۳۰ قسمت در بلیون بیش‌تر مشاهده شد. بررسی بافت‌شناسی نمونه‌های شاهد در مطالعه حاضر نشان داد که بافت کبد دارای ساختار طبیعی و نرمالی بودند و هیپاتوسیت‌ها به صورت رشته‌های سلولی با اشکال چند ضلعی حول محور یک سیاهرگ مرکزی مشاهده شدند (شکل ۱). در میان آن‌ها عروق سینوزوئید مشاهده شد (شکل ۲) و نمونه‌هایی که در معرض جیوه قرار گرفته بودند، تغییرات بافتی در ساختار کبد مشاهده گردید که شامل هیالینیزیشن، تراکم رگ‌های خونی، تورم ابری، دژنره شدن سلول‌های کبد، نکروز هسته و واکوئول‌زایی که با تراکم سلول‌های چربی همراه بود.

باله مخرجی، به طور طولی شکافته شده و پس از نمایان شدن کبد، آن را به طور کامل خارج نموده، برای انجام آنالیزهای بافتی به قطعات کوچک (۴×۴×۴ میلی‌متر مکعب) تقسیم، در محلول تثبیت کننده بوئن به مدت ۳۶ ساعت نگهداری شدند. برای آنالیزهای بافتی از تکنیک‌های استاندارد استفاده گردید (Humason, 1979; Marchetti et al., 2006).

نمونه‌های بافتی در غلظت‌های صعودی اتانول آب‌گیری و در مرحله بعد در زایلین شفاف‌سازی شده، سپس با پارافین با درجه ذوب ۵۸-۵۶ درجه‌سانتی‌گراد آغشته شدند. قالب‌گیری نمونه‌ها در بلوک‌های پارافین و مقطع‌گیری نمونه‌ها با ضخامت ۵ میکرومتر انجام گرفت. سپس برای آنالیزهای میکروسکوپ نوری از روش‌های استاندارد رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین استفاده گردید. بررسی و مطالعه بافتی توسط میکروسکوپ نوری (Olympus CH-4) با بزرگنمایی ۱۰۰ عدسی شیئی و در ۱۰ مکان تصادفی از هر اسلاید انجام گرفت.

از نرم‌افزار SPSS.ver11.5 برای آزمون آنالیز واریانس آنوای دو طرفه (Two-Way ANOVA) و آزمون توکی (Tukey) برای بررسی داده‌ها و همچنین آمار توصیفی و نرم افزار اکسل برای رسم نمودارها استفاده گردید. معنی‌داری اختلاف داده‌ها در سطح خطای ۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت.



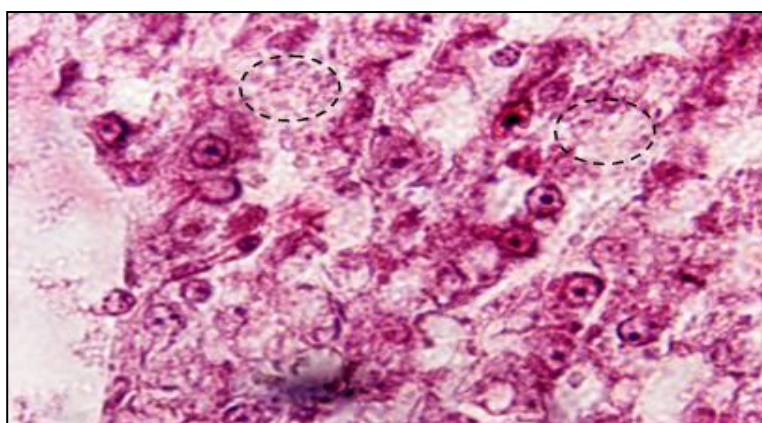
شکل ۱: شمای کلی بافت کبد، CV سیاهرگ مرکزی، RBC (گلبول قرمز) در ماهی زروک (*Scatophagus argus*) در سال ۱۳۸۶ (H&E×۴۰)



شکل ۲: شمایی از بافت کبد نمونه شاهد، S (سینوزوئید)، HC (طناب کبدی) در ماهی زروک (*Scatophagus argus*) در سال ۱۳۸۶ (H&E×۱۰۰)

بررسی‌ها نشان داد که با وسعت دوره در معرض قرارگیری (در دوزهای مختلف جیوه) این پدیده بیش‌تر مشاهده می‌شود، به‌طوری که در مدت زمان ۷۲ ساعت هیالینیزیشن افزایش یافت. شدت میزان هیالینیزیشن، در نمونه‌های بافت کبد که در معرض غلظت‌های مختلف جیوه بودند (۱۰، ۲۰ و ۳۰ قسمت در بیلون) قابل تشخیص نبود، ولی به هر حال این تغییر ساختاری در تمام نمونه‌هایی که در معرض جیوه قرار گرفته بودند، مشاهده شد.

گسترده‌ترین تغییر بافتی مشاهده شده در ماهیانی که در معرض جیوه قرار گرفته بود، پدیده هیالینیزیشن بود (شکل ۳). در این تغییر در سراسر بافت کبد، ذرات پروتئینی به صورت ساختارهای ائوزینوفیلی پراکنده و در اندازه‌های مختلف در سطح سیتوپلاسم مشاهده شدند که نشان دهنده عدم سنتز پروتئین در سلول‌های کبدی است. با توجه به بررسی‌های میکروسکوپی، در مطالعه حاضر در تمام نمونه‌های بافت کبد تیمارهای مختلف (۱۰، ۲۰ و ۳۰ قسمت در بیلون)، هیالینیزیشن مشاهده گردید.



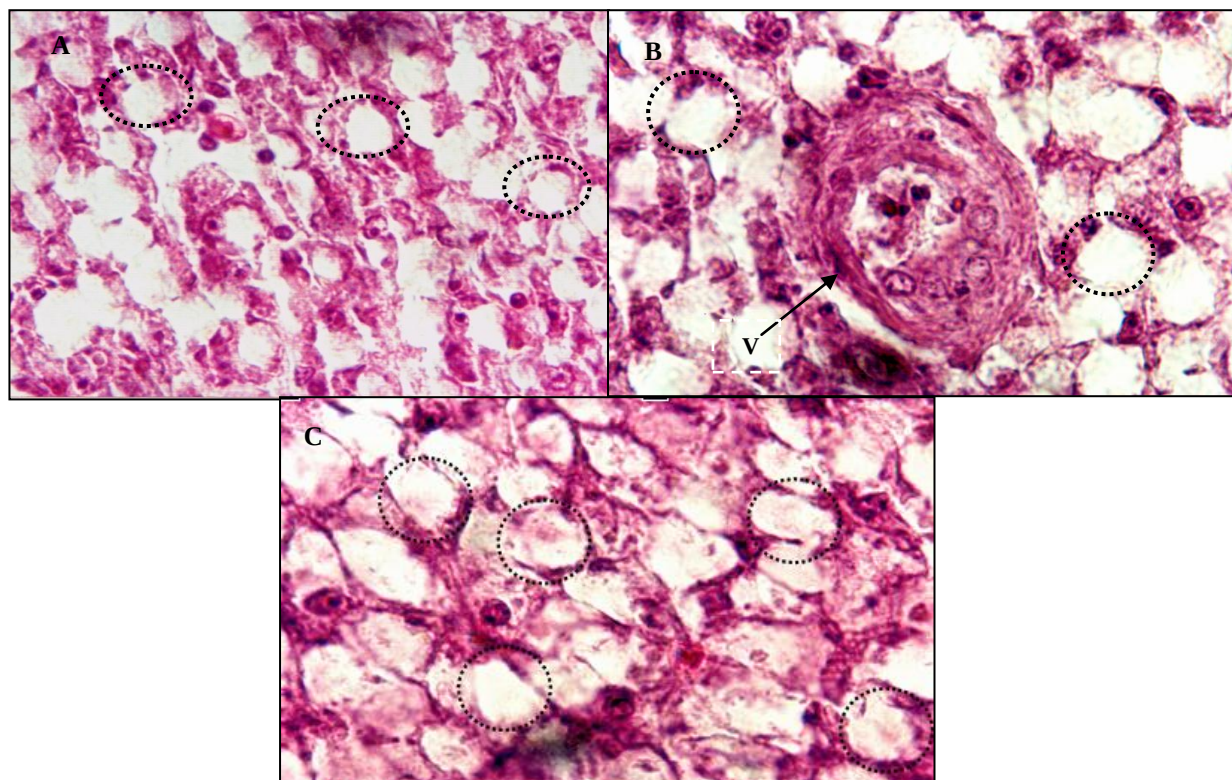
شکل ۳: پدیده هیالینیزیشن در ماهی زروک (*Scatophagus argus*) در سال ۱۳۸۶ (H&E×۱۰۰)

سیتوپلاسم)، از ویژگی‌های بارز نمونه‌هایی بود که در معرض جیوه قرار گرفته بودند. واکوئول‌زایی نتیجه تراکم زیاد چربی در سیتوپلاسم می‌باشد که این واکوئول‌های بزرگ در سلول هسته را

بررسی بافت کبد نشان داد که واکوئول‌زایی در سلول‌های کبد (شکل ۴)، در تیمارهای مختلف جیوه (۱۰، ۲۰ و ۳۰ قسمت در بیلون) وجود داشت. واکوئول‌زایی (تراکم زیاد چربی در

به طور کلی، این شرایط (واکوئول زایی) نتیجه جذب فراوان پیش ماده چربی در سلول های کبدی نیست، بلکه چربی موجود در سلول های کبدی است که تشکیل واکوئول می دهند. یک مشکل وجود دارد و آن برداشت چربی از هپاتوسیت ها است. به هر حال، میزان شدت واکوئول زایی در کبد های در معرض غلظت های مختلف فلز مشاهده شد.

مجبور می کند به محیط بیرونی هپاتوسیت منتقل شود و این شرایط معمولاً با آتروفی (تحلیل) هسته همراه است. براساس آنالیز بافت شناسان، شدت واکوئول زایی با زمان افزایش پیدا می کند و با توجه به مشاهدات میکروسکوپی انجام شده، میزان واکوئول دار شدن هپاتوسیت ها در زمان ۷۲ ساعت در معرض غلظت ۳۰ قسمت در بلیون افزایش نشان داد.

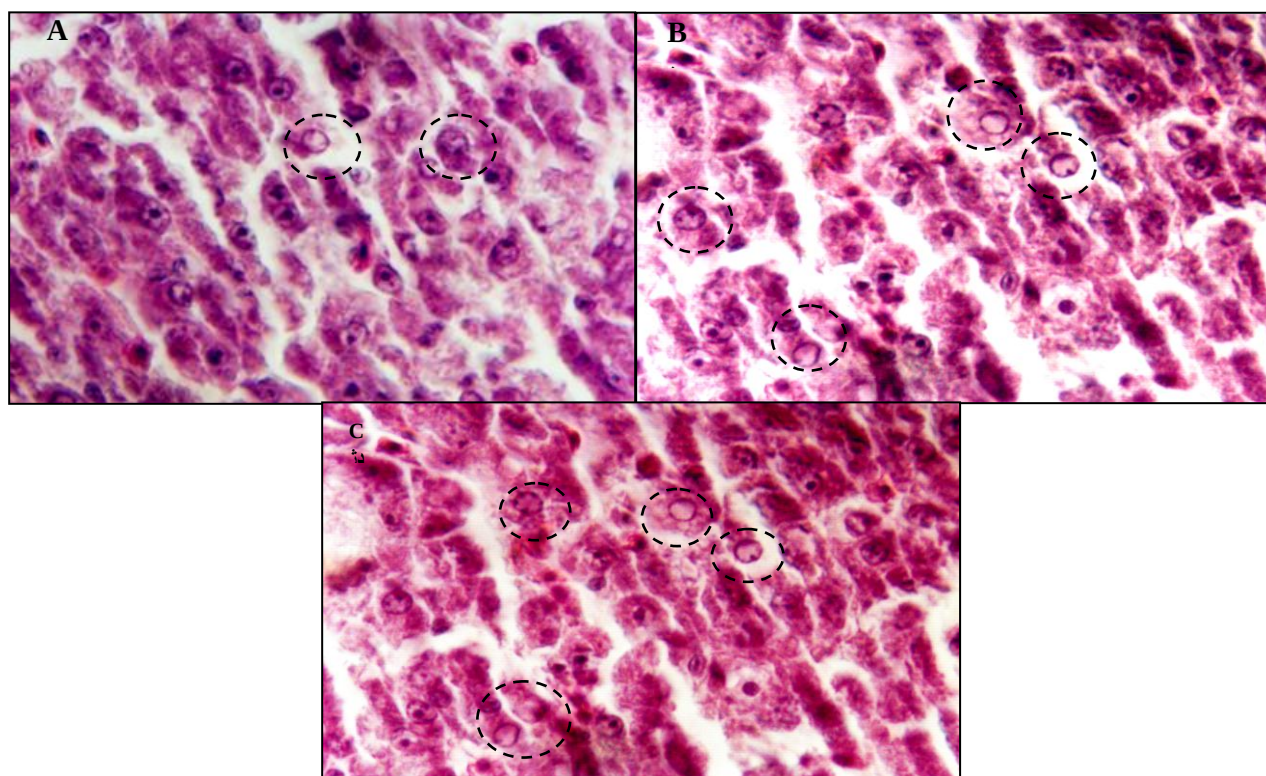


شکل ۴: واکوئول زایی به صورت فضاهای پاک سفید دورن سلول های هپاتوسیت توسط تراکم چربی (تغییر چربی) در ماهی زروک (*Scatophagus argus*) در سال ۱۳۸۶ (A) دوز ۱۰ قسمت در بلیون، (B) دوز ۱۰ قسمت در بلیون، (C) دوز ۳۰ قسمت در بلیون (H&E×۱۰۰)

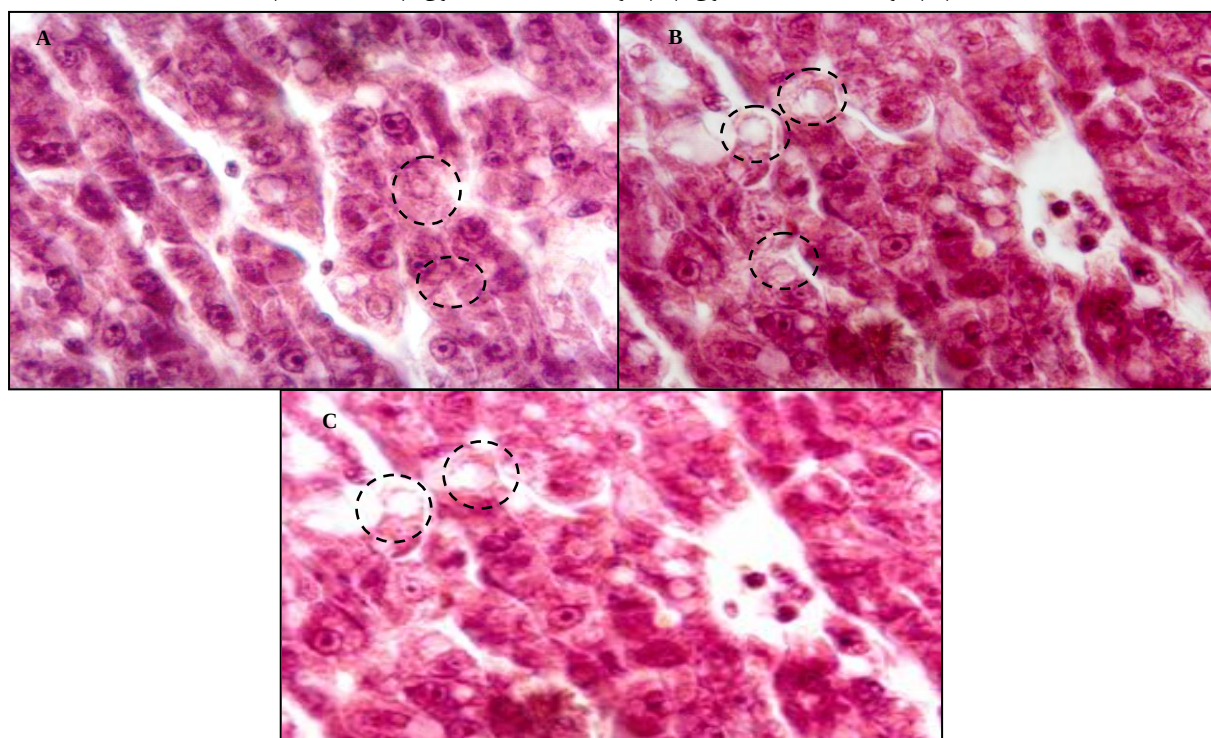
سلول متورم شده و سیتوپلاسم آن ابری شکل و دانه دار می گردد. دانه ها ممکن است ریز یا تقریباً به شکل قطرات هیالینی و ائوزینوفیلی در سیتوپلاسم ظاهر گردند. هسته به شکل طبیعی باقی مانده و گاهی نامشخص است.

Hinton و Laure'n (۱۹۹۰) اظهار داشتند که تورم هپاتوسیت ها به عنوان شاخص اصلی آسیب سمی است. این پدیده با افزایش دوز و زمان افزایش می یابد، به طوری که بیشترین تورم ابری در دوز ۳۰ قسمت در بلیون و زمان ۷۲ ساعت مشاهده شد. برای اولین در مطالعه حاضر مشاهده گردیده و تاکنون در هیچ مطالعه ای گزارش نشده است.

در مطالعه حاضر پدیده دژنراسانس (تجزیه) واکوئولی در نمونه های در معرض غلظت های مختلف (۱۰، ۲۰ و ۳۰ قسمت در بلیون) مشاهده گردید (شکل ۵). در این پدیده، واکوئول ها گاهی با رنگ آمیزی همتوکسیلین ائوزین، در داخل هسته نیز مشاهده می گردند. به نظر می رسد که این واکوئول، مخلوطی از مواد پروتئینی کلئیدی است. این پدیده با افزایش دوز و زمان افزایش می یابد، به طوری که در دوز ۳۰ قسمت در بلیون و زمان ۷۲ ساعت بیشترین دژنراسانس مشاهده شد. در این بررسی، این پدیده در همه نمونه های در معرض دوزهای مختلف (۱۰، ۲۰ و ۳۰ قسمت در بلیون) مشاهده گردید (شکل ۶). در این حالت



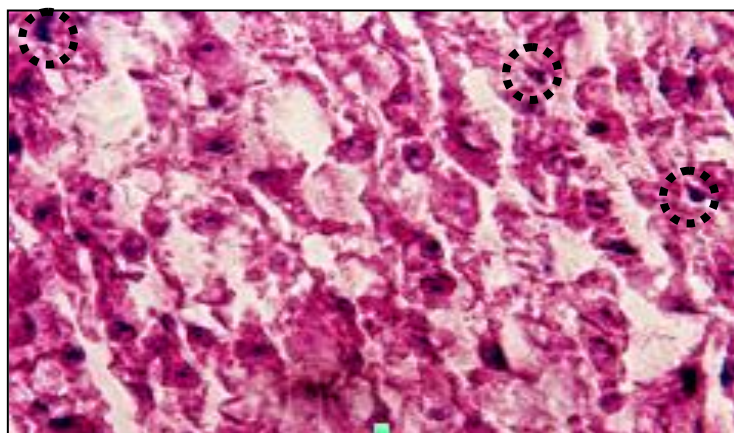
شکل ۵: دژنراسیون واکوئولی در ماهی زروک (*Scatophagus argus*) در سال ۱۳۸۶ (A) دوز ۱۰ قسمت در بیلیون، (B) دوز ۱۰ قسمت در بیلیون، (C) دوز ۳۰ قسمت در بیلیون (H&E×۱۰۰)



شکل ۶: تورم ابری هپاتوسیت‌ها به صورت ابری، دانه‌ای بر اثر نفوذ آب (تغییرات تراکم غیر عادی آب) در ماهی زروک (*Scatophagus argus*) در سال ۱۳۸۶ (A) دوز ۱۰ قسمت در بیلیون، (B) دوز ۱۰ قسمت در بیلیون، (C) دوز ۳۰ قسمت در بیلیون (H&E×۱۰۰)

در این مطالعه، نکروز هسته‌ای در سلول‌های کبدی در معرض دوزهای مختلف مشاهده گردید (شکل ۷). نکروز هسته با افزایش دوز جیوه و زمان، افزایش می‌یابد، به‌طوری که در دوز

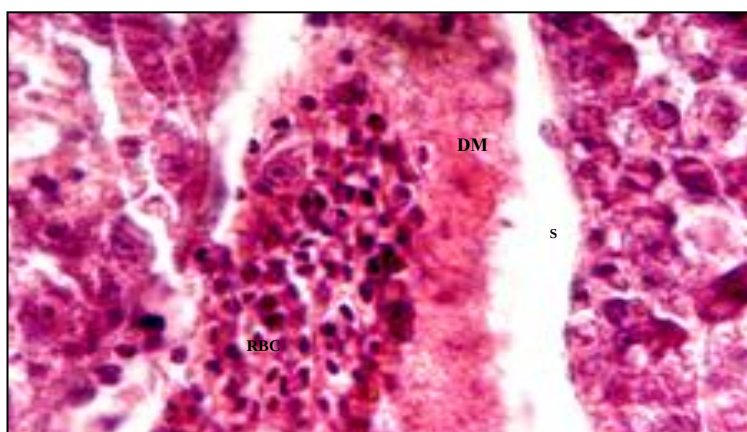
۳۰ قسمت در بیلیون و زمان ۷۲ ساعت بیش‌ترین نکروز هسته‌ای مشاهده شد.



شکل ۷: پدیده نکروز هسته در ماهی زروک (*Scatophagus argus*) در سال ۱۳۸۶ (H&E $\times 100$)

در مطالعه حاضر، تراکم رگی خصوصاً درون سیاهرگ‌های کبدی، در نمونه‌های در معرض دوزهای مختلف جیوه مشاهده گردید. تراکم رگی با افزایش دوز جیوه و زمان افزایش می‌یابد، به طوری

که در دوز ۳۰ قسمت در بیلیون و زمان ۷۲ ساعت بیش‌ترین تراکم رگی مشاهده شد (شکل ۸).



شکل ۸: S (فضای سینوزوئید)، تجمع خونی، DM (مواد باقی مانده) و RBC (گلبول قرمز) در ماهی زروک (*Scatophagus argus*) در سال ۱۳۸۶ (H&E $\times 100$)

بحث و نتیجه گیری

موجودات آبی در مقابل آلودگی‌ها پاسخ‌های بیوشیمیایی از خود نشان می‌دهند که می‌توانند برای استفاده در برنامه‌های تحقیقاتی مفید می‌باشند (Hinton, 1994). در سال‌های اخیر بافت‌شناسی به عنوان ابزاری مهم برای ارزیابی اثرات آلودگی در فرآیندهای حیاتی نظیر رشد و تولیدمثل شناخته شده است (Hinton et al., 1992; Adams, 2002).

از شاخص‌های هیستوپاتولوژیکی به‌طور وسیع برای تشخیص و ارزیابی اثرات سمی آلاینده‌ها در ماهی استفاده می‌گردد (Chliamovich and Kuhn, 1989; Schiewe et al., 1991; Schwaiger et al., 1992; Johnson et al., 1993; Khan et al., 1994; Oliveira Ribeiro et al., 2002; Rabitto et al., 2005).

مطالعات اخیر ارتباط بین در معرض بودن آلاینده‌ها و آسیب‌های کبدی را ثابت کرده است. Stentiford و همکاران (۲۰۰۳) و Stehr و همکاران (۲۰۰۴) مشاهده کردند که آسیب‌های کبدی ایجاد شده در گونه‌های مختلف ماهی در اثر سموم، به عنوان شاخص‌های بیولوژیکی موثری محسوب می‌شوند.

در این مطالعه، تأثیر تراکم غلظت‌های پایین (۱۰، ۲۰ و ۳۰ قسمت در بلیون) فلز جیوه بر روی بافت کبد مورد بررسی قرار گرفت. مشاهدات بافتی نشان داد که تغییراتی در بافت کبد و سلول‌های کبدی بر اثر وجود جیوه ایجاد شده که شامل واکوئول‌زایی سلول‌های کبدی، نکروز هسته هپاتوسیت‌ها، تورم ابری سلول‌های کبدی، دژنره شدن واکوئول‌ها و تراکم رگ‌های خونی هیالینیزیشن، افزایش واکوئول‌زایی (بر اثر تراکم چربی)، تراکم رگ‌های خونی، تجزیه واکوئولی و تورم ابری سلولی می‌باشد. این نتایج با سایر مطالعات بافتی رایج مطابقت دارد. به هر حال این تغییرات بافتی مربوط به فلز خاصی نیست و به پاسخ هپاتوسیت‌ها به سموم ارتباط دارد (Hinton and Lauren, 1990).

پاسخ‌های بافتی کبد در گونه *Hoplias malabaricus* که در معرض جیوه و متیل جیوه قرار گرفته بود، شامل آتروفی و نکروز سلول‌های کبدی، کاهش سایز هسته و هستک، عدم تشخیص اندامک‌های سلولی، آسیب سلول‌های آندوتلیالی و

کاهش در اندامک‌های هپاتوسیت‌ها بود (Mela et al., 2007) که با نتایج حاصل بر روی گونه *Barbus graellsii* مشابه بود (Raldua et al., 2006).

از هم پاشیدگی تراکم ماکروفاژها، تجزیه هپاتوسیت‌ها، افزایش تعداد مجاری صفراوی و کاهش قطر مجاری صفراوی همراه با افزایش تعداد سلول‌های اپیتلیالی در اثر آلودگی به دوزهای مخرب جیوه اتفاق می‌افتد. در مطالعه‌ای که Van DYK و همکاران در سال ۲۰۰۴ بر روی بافت کبد گونه *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) انجام دادند، ماهی در دوزهای ۵ و ۱۰ درصد از LC₅₀ (غلظت کشندگی ۵۰ درصد) مخلوط کادمیم و روی قرار گرفته و در ساعت‌های ۶، ۱۲، ۱۸، ۲۴، ۷۲ و ۹۶ به بررسی بافت نمونه‌های در معرض پرداختند. در طی مطالعه آن‌ها بیش‌ترین تغییر بافتی مشاهده را هیالینیزیشن گزارش کردند. در این پدیده، سلول‌های کبدی در اثر وجود فلزات سنگین، مکانیسم سنتز پروتئین در آن‌ها مختل شده و این مواد پروتئین به صورت قطرات هیالینی و با پذیرفتن رنگ اتوزین، در سطح سیتوپلاسم پراکنده می‌شوند. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که این پدیده با وسعت دوره در معرض در دوره‌های کوتاه مدت پیشرفت قابل ملاحظه‌ای داشت، اما در دوره طولانی مدت این پدیده مشاهده نشد. طی این مطالعه تراکم رگ‌های خونی به‌خصوص در درون سیاهرگ‌های کبدی گزارش گردید که در زمان ۲۱ ساعت، بیش‌تر تراکم رگی اتفاق افتاد که در مطالعه حاضر نیز تراکم رگی مشاهده گردید.

طبق مطالعات انجام شده با افزایش دوره در معرض بودن و بالا رفتن دوز این پدیده افزایش یافت، یعنی در زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت دوز ۳۰ قسمت در بلیون تراکم رگی در بافت کبد بیش‌تر مشاهده گردید. همچنین واکوئول‌زایی هپاتوسیت‌ها را در نتایج حاصل از کارشان گزارش کردند که در بررسی‌شان ۶۲ درصد از نمونه‌های در معرض ۵ درصد و ۷۱ درصد از نمونه‌های در معرض ۱۰ درصد، هپاتوسیت‌ها واکوئول‌دار شده بودند.

انسداد سرخرگ کبدی و سیاهرگ مرکزی بین صفراوی ایجاد شده بر اثر تجمع خون به صورت حفره‌های خونی، باعث می‌شود که خون از میان سینوزوئیدها عبور کرده و

کندتر به سیاهرگ مرکزی برسد، در نتیجه موجب می‌شود پمپ کبدی فعالیت بیش‌تر و سخت‌تری را از خود نشان دهد که به علت وجود استرس در اندام کبد می‌باشد. این پدیده تأثیرات جدی روی فعالیت‌های متابولیکی کبدی خواهد داشت. نتیجه آن کاهش در مهیا کردن مواد غذایی در بافت بر اثر کاهش و کمبود سوپسترا است که در نهایت منجر به کاهش وزن و سایز بدن خواهد شد.

در شرایط عادی سلول‌های کوپفر به دیواره‌های سینوزوئیدها متصل می‌شوند و اریتروسیت‌های عبوری و دیگر ذراتی را که در جریان خون وجود دارد را برداشت می‌کنند (Ferri and Sesso, 1981; Hampton et al., 1989; Mosconi-Bac, 1991).

وجود فلزات سنگین در کبد مانع از عملکرد سلول‌های کوپفر گردیده و منجر به انسداد سینوزوئیدها در اثر تجمع اریتروسیت‌های پیر موجود در خون می‌شود. این اریتروسیت‌ها ضعیف بوده و قدرت باند شدن با اکسیژن را ندارند. در نتیجه اکسیژن خون کاهش یافته و شرایط بافت کبدی همانند زمانی می‌شود که اکسیژن کافی به بدن نرسیده باشد. این پدیده در مطالعه حاضر به خوبی مشاهده گردید و نتایج کار ایشان را تایید می‌کند.

براساس اظهارات Manahan (۱۹۹۱) پدیده نکروز به عنوان عامل جلوگیری‌کننده عملکرد صحیح آنزیمی، عملکرد غشای سلولی و اختلال در سنتز پروتئین و متابولیسم کربوهیدرات شناخته شده است. متیل جیوه به عنوان عامل استرس‌زای اکسیداتیو آنیون، رادیکال‌های هیدروکسیل و پراکسید هیدروژن ثابت شده است (Limke et al., 2004).

Schmalz و همکاران در سال ۲۰۰۲ اظهار داشتند که وجود فضاهای نکروزه در کبد گونه *Fundulus heteroditus* که در معرض جیوه و دیگر فلزات سنگین بودند را یک واکنش سریع بافتی در برابر ورود فلزات سنگین می‌دانند. همچنین مشاهدات فراساختاری نامنظم اندامک‌های درون سیتوپلاسم در اثر وجود فلزات سنگین در بافت کبد نیز تایید شده است.

Moreira و همکاران در سال ۲۰۰۳ گزارش کردند که جیوه می‌تواند به‌طور متقابل با توبولین‌ها پیوند برقرار کرده و در پلیمریزاسیون میکروتوبول‌ها مزاحمت ایجاد کند. در مطالعه Mela و همکاران (۲۰۰۷) در اثر وجود سمیت قوی متیل جیوه، بی‌نظمی کامل و آشکاری در سازماندهی سیتواسکلت سلول‌ها، تأثیر آن در حرکت اندامک‌های سیتوپلاسمی و ترشح مواد درون اندامک‌ها به سیتوپلاسم مشاهده گردید. با توجه به این که هپاتوسیت‌ها از جوانب مختلف در متابولیسم پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و چربی‌ها شرکت دارند، این تأثیرات می‌تواند عملکرد نامناسب فیزیولوژیک سلول‌ها را در برداشته باشد.

تشکیل واکوئول‌های چربی، حاصل اختلال در متابولیسم چربی و همچنین اختلالات سیتواسکلت ناشی از اثر جیوه روی فعالیت‌های آنزیمی است (Arellano et al., 1999).

جیوه موجب کاهش میکروویلی روی سطح بازال هپاتوسیت‌ها و ایجاد آسیب در سلول‌های آندوتلیال می‌شود که موجب تغییرات زیادی در ارتباط بین هپاتوسیت‌ها و سینوزوئیدها از جمله تأثیر در پراکنش و حرکت نوترینت‌ها می‌گردد (Arellano et al., 1999).

Ptashynski و همکاران (۲۰۰۱) تأثیر مستقیم سمیت نیکل را روی گونه *Coregonus clupeaformis* بررسی کردند. آن‌ها نمونه‌ها را در معرض دوزهای صفر، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ نیکل برای مدت زمان ۱۰، ۳۱ و ۱۰۴ روز قرار داده، سپس کبد نمونه‌های در معرض را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج حاصل از بررسی، تورم هپاتوسیت‌ها، نکروز هسته، هیالینیزیشن، وجود Dedris (باقی مانده مواد) در سینوزوئیدها، تغییر ساختار سلولی، تجزیه سلولی و التهاب، نفوذ لنفوسیت‌ها، نکروز پارانشیمی در مناطق مجاری صفراوی و سیاهرگ‌های حاشیه‌ای، نکروز مناطق مرکزی بخش میان بافتی که توسط پارانشیم سالم احاطه شده، دژنراسانس چربی و تشکیل واکوئول‌های چربی و نکروز سلول‌های اپی‌تلیال می‌باشد که با برخی از پدیده‌های مشاهده شده در مطالعه حاضر مطابقت داشت.

Rohn و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کردند پدیده تورم ابری با افزایش حجم سلول افزایش پیدا می‌کند که به‌طور

Arribere, M. A., Ribeiro Guevara, S., Sanchez, R. S., Gil, M. I., Roman Ross, G., Daurade, L. E., Fajon, V., Horvat, M., Alcalde, R. and Kestelman, A. J., 2003. Heavy metals in the vicinity of a chlor-alkali factory in the upper Negro River ecosystem, Northern Patagonia, Argentina, *Sci. Total Environ*, 301: 187-203.

Chliamovitch, Y. P. and Kuhn, C., 1989. Behavioural, haematological and histological studies on acute toxicity of bis-(tri-n-butyltin) oxide on *Salmo gairdneri* Richardson and *tilapia rendalli*. *Boulenger, Fish Biology*, 10: 575-582.

Clarkson, T. W., 2002. The three modern faces of mercury. *Environ Health Perspect*, 110:11-23.

Cross, F. A. and Sunda, W. G., 1985. The relationship between chemical speciation and bioavailability of trace metals to marine organisms—a review. In: Chao, N.L., KirbySmith, W. (Eds.), *Proceedings of the Symposium on Utilization of Coastal Ecosystems*, vol. 1. Rio Grande, R.S. Brazil, PP. 169-182.

Ferri, S. and Sesso, A., 1981. Ultra structural study of the endothelial cells in teleost; liver sinusoid under normal and experimental conditions. *Cell Tissue Research*, 219: 649-657.

Gbem T. T., Balogun J. K., Lawal, F. A. and Annune, P. A., 2001. Trace metal accumulation in *Clarias gariepinus* (Teugels) exposed to sub lethal levels of tannery effluent. *Sci. of the total environment*, 271: 1-9.

Hampton, J. A., Lanz, R. C. And Hinton, D. E., 1989. Function units in rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Richardson) liver: III. Morphometric analysis of parenchyma, stroma and component cell types. *The Amer. J. Anatomy*, 185:58-73.

Heath A. G., 1995. Water pollution and fish physiology. first ed, Lewis Publishers, FL.

Hellawell, J. M., 1986. Biological Indicators of Freshwater Pollution and Environmental Management. Elsevier, London, 546p.

Hinton, D. E. and Laure'n, D. J., 1990. Integrative histopathological effects of environmental stressors on fishes. *Fish. Soc, Symp*, 8: 51-66.

Hinton, D. E., Baumann, P. C., Gardner, G. R., Hawkins, W. E., Hendricks, J. D., Murchelan, R. A. and Okihiro, M. S., 1992. Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histopathological Markers of Anthropogenic Stress. Lewis Publishers, Boca Raton, PP. 155-208.

معمول این فرآیند بر اثر از بین رفتن مکانیسم تنظیم حجم سلولی که توسط پمپ آب از بیرون به درون سلول انجام می‌شود، ایجاد می‌گردد. در حقیقت اگر سلول‌ها بمیرند به صورت ابری متورم می‌شوند، حتی اگر در شرایط ایزوتونیک متوسطی باشند. ایشان معتقدند که انرژی مورد نیاز برای پمپ آب از بیرون به درون سلول توسط افزایش تنفس سلولی و مصرف بیشتر ATP در سلول تامین می‌شود. آن‌ها دریافتند که در اثر این پدیده مصرف اکسیژن توسط بافت کبد کاهش نمی‌یابد، ولی ممکن است ایجاد این پدیده با مصرف اکسیژن سلولی در ارتباط باشد. شاید تورم ابری ایجاد شده بر اثر خصوصیت سم‌زدایی کبد به مکانیسمی مربوط باشد که هیچ ارتباطی با تنفس سلولی ندارد. این پدیده ممکن است موجب تغییر نفوذپذیری غشای سلولی گردد (با تغییر خصوصیات چربی غشای سیتوپلاسم و غشای میتوکندری) که در اثر آلودگی جیوه (یا هر نوع ماده سمی دیگر) ایجاد می‌شود.

به‌طور کلی، کاهش اکسیژن در اثر این پدیده نمی‌تواند نگران کننده باشد. این پدیده برای اولین در مطالعه حاضر مشاهده گردیده و تاکنون در هیچ بررسی گزارش نشده است.

در کل می‌توان دریافت بر اثر سمیت جیوه بخش عظیمی از انرژی کبد صرف تغییرات به وجود آمده ناشی از وجود سم در سلول‌ها گردیده و کبد نمی‌تواند فعالیت‌های طبیعی خود را انجام دهد. بسیاری از اندامک‌های سلولی و هسته از حالت طبیعی خارج شده و اعمال معمول خود را انجام نمی‌دهند که این حالت موجب ایجاد صدمات جبران ناپذیری به کبد و سایر اندام‌ها می‌گردد.

منابع

Adams, S. M., 2002. Biological indicators of aquatic ecosystem stress. *Amer. Fish. Soc*, 3: 104-112.

Arellano, M. J., Storch, V. and Sarasquete, C., 1999. Histological changes and cooper accumulation in liver and gills of the Senegales Sole, *Solea senegalensis*. *Ecotoxicol, Environ. Saf*, 44: 62-72.

- Mosconi-Bac, N., 1991.** Effects de l'alimentation sur les caracteres structuraux et metaboliques du foie de long, *Dicentrarchus labrax*, en aquaculture. These e Doctorat (Specialite Sciences), Universite de Perpignan.
- 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*, 34:190-195.
- Oliveira Ribeiro, C. A., Schatzmann, M., Silva de Assis, H. C., Silva, P. H. and Pelletier, E., 2002.** Evaluation of tributyltin subchronic effects in tropical freshwater fish (*Astyanax bimaculatus* Linnaeus, 1758). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 51: 61-167.
- Prosi, E., 1979.** Heavy metals in aquatic organisms. In: Forstner, U, Wittmann, J.T.W. (Eds.), *Metal Pollution in the Aquatic Environment*. Springer, Berlin, PP. 271-323.
- Ptashynski, M. D., Pedler, R. M., Evanse, R. E, Baron, C. L. and Klaverkamp, J. F., 2001.** Toxicology of dietary nickel in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquatic Toxicology*, 58: 229-247.
- Rabitto, I. S., Costa, J. R. M. A., Silva de Assis, H. C., Randi, M. A. F., Akaishi, F. M., Pelletier, E. and 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.
- Rainbow, P. S., 1985.** The biology of heavy metals in the sea. *Environment Study*, 25:195-211.
- Raldua, D. M., Diez, S., Josep, M., Bayona, J. M. and Barcelo, D., 2006.** Mercury levels and liver pathology in feral fish living in the vicinity of mercury cell chloralkalid factory. *Chemosphere*, 66:1217-1225.
- Rohn, M., Tehagen, B. A. and Hafmann, W., 2004.** Survival of dairy cow after surgery to correct abomasal displacement. *Veterinary Medicine, series A*, 51: 6-294.
- Sanders, M. J., 1997.** A field evaluation of the freshwater river crab, *Potamonautes warreni*, as a bioaccumulative indicator of metal pollution. M.Sc. Thesis, Rand Afrikaans University, South Africa.
- Schmalz, W. F., Hernandez, A. D. and Weis, P., 2002.** Hepatic histopathology in two populations of
- Hinton, D. E., 1994.** Cells, cellular responses, and markers in chronic toxicity of fishes. In: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds.), *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives*. CRC Press, Boca Raton, Chapter 4, PP. 207-239.
- Humason, G. L., 1979.** *Animal Tissue Techniques*. W. H. Freeman, New York.
- Johnson, L. L., Stehr, C. M., Olson, O. P., Myers, M. S., Pierce, S. M., Wigren, C. A., Mc Cain, B. B. and Varanasi, U., 1993.** Chemical contaminants and hepatic lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from the Northeast coast of the United States. *Environment, Sci, Technol*, 27: 2759-2771.
- Khan, R. A., Barker, E. E., Hooper, R., Lee, E. M., Ryan, K. and Nag, K., 1994.** Histopathology in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) living adjacent to a pulp and paper mill. *Aquat. Toxicol*, 26: 95-102.
- Limke T. L., Heidemann S. F. and Atchison W. D., 2004.** Disruption of intra neuronal divalent action regulation by methylmercury: are specific targets involved in altered neuronal development and cytotoxicity in methylmercury poisoning? *NeuroToxicol*, 25: 741-760.
- Manahan, S. E., 1991.** *Water pollution Environment Chemistry*. first ed. Lewis publishers, London.
- Marchetti, L., Capachietti, M., Sabbieti, M. G., Accili, D., Materazzi, G. and Menghi, G., 2006.** Histology and carbohydrate histochemistry of the alimentary canal in the rainbow trout *oncorhynchus mykiss*. *Journal of Fish Biology*, 68:1808-1821.
- Martin, M. H. and Coughtrey, P. J., 1982.** *Biological Monitoring of Heavy Metal Pollution*. Land and Air Applied Science, London, 475p.
- Mason, C. F., 1991.** *Biology of Freshwater Pollution*. second ed. Longman, New York, 351p.
- Mela, M., Randi Ventura, D. F., Carvalho, C. E. V., Pelletier, E. and Oliveira Ribeiro, C. A., 2007.** Effects of dietary methylmercury on Liver and Kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume, 68, Issue: 3, PP. 426-435.
- Moreira, C. M., Oliveira, E. M., Bonan, C. D., Sarkis, J. J. F. and Vassallo, D. V., 2003.** Effects of mercury on myosin ATPase in the ventricular myocardium of the rat. *Comp. Biochem. Physiol. Part C, Toxicol. Pharmacol*, 135 (3): 269-275.

- Stentiford, G. D., Longshan, M., Lyons, B. P., Jones, G., Green, M. and Feist, S. W., 2003.** Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. *Mar. Environment, Res*, 55: 137–159.
- Van Dyk, J. C., Pieterse, G. M. and Van Vuren, J. H. J., 2004.** Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66: 432–440.
- the mummichog, *Fundulus heteroclitus*. *Mar. Environ. Res*, 54 (3–5): 539–542.
- Schwaiger, J., Bucher, F., Ferling, H., Kalbfus, W. and Negele, R. D., 1992.** A prolonged toxicity study on the effects of sublethal concentrations of bis (tri-n-butyltin) oxide (TBTO): histopathological and histochemical findings in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture, Toxicology*, 23: 31–48.
- Schiewe, M. H., Weber, D. D., Myers, M. S., Jacques, F. J., Reichert, W. L., Krone, C., Malins, D. C., Mc Cain, B. B., Chan, S. L. and Varanasi, U., 1991.** Induction of foci of cellular alteration and other hepatic lesions in English sole (*Parophrys vetulus*) exposed to an extract of an urban marine sediment. *Can. Fish. Aquaculture Science*, 48: 1750–1760.
- Stehr, C. M., Myers, M. S., Johnson, L. L., Spencer, S. and Stein, J. E., 2004.** Toxicopathic liver lesions in English sole and chemical contaminant exposure in Vancouver Harbour, Canada. *Mar. Environment, Res*, 57: 55–74.