

اثر غلظت‌های تحت کشنده کادمیوم بر برخی تغییرات بافتی در آبشش بچه

تاس‌ماهی استرلیاد پرورشی (*Acipenser ruthenus*)

مرضیه عروجعلی^(۱)، فاطمه پیکان حیرتی^{(۲)*}، سالار درافشان^(۳)، نصرالله محبوی صوفیانی^(۴)

* fheyrati@cc.iut.ac.ir

۱، ۲، ۳، ۴-دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان.

تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۲

چکیده

اثر غلظت‌های تحت کشنده کادمیوم محلول در آب بر ساختار بافت آبشش بچه ماهی استرلیاد مورد مطالعه قرار گرفت. در این تحقیق از ۶۰ قطعه بچه ماهی با میانگین ($SED \pm 0.95$) وزنی 41.69 ± 0.95 گرم و میانگین (SED ± 0.14) طولی 23.98 ± 0.14 سانتی‌متر در ۴ گروه با ۳ تکرار استفاده شد. ماهیان در گروه‌های صفر (شاهد)، ۱۶، ۳۲ و ۶۴ میکروگرم در لیتر کادمیوم به مدت ۲۱ روز تحت شرایط آزمایشگاهی نیمه-ثابت (Semi-statistic) قرار گرفتند. در پایان دوره، بافت آبشش پس از تثبیت در محلول بوئن و تهیه اسلامیدهای بافتی، به روش مرسمون بافت-شناختی و به دو روش کیفی و کمی مورد بررسی قرار گرفت. از نظر کیفی تغییرات هیپرپلازی، هیپرتروفی، ادم سلول‌های اپیتلیال رشته‌های آبششی، نکروز رشته‌ها و تیغه‌های ثانویه آبششی، حلقه شدن تیغه‌های ثانویه آبششی، هم‌جوشی رشته‌ها و تیغه‌های ثانویه آبششی به درجات مختلف در ماهیان مشاهده شد. مقایسه کمی بر مبنای ارزش نمره برای بافت آبشش نشان داد که با افزایش غلظت کادمیوم در آب تغییرات آسیب-شناختی به طرز چشمگیری افزایش می‌یابد. با این وجود تفاوت معنی‌داری بین دو گروه شاهد و تیمار شده با غلظت $16 \mu\text{g/L}$ کادمیوم مشاهده نشد. نتایج کلی بیانگر بروز آسیب‌های بافتی در آبشش استرلیاد در مواجه با غلظت‌های تحت کشنده کادمیوم در شرایط آزمایشگاهی بود. نتایج این تحقیق می‌تواند در ارزیابی اثرات هیستوپاتولوژیک محتمل حضور آلانینده‌های زیست-محیطی از جمله فلزات سنگین در محیط‌زیست طبیعی یا شرایط پرورشی تاس‌ماهیان مورد استفاده قرار گیرد.

لغات کلیدی: استرلیاد، *Acipenser ruthenus*، کادمیوم، آسیب-شناختی، آبشش.

*نویسنده مسئول

مقدمه

و روده بچه تاس‌ماهی ایرانی *Acipenser persicus* گزارش شده است (مسافر خور جستان و همکاران، ۱۳۹۱). حضور و تجمع فلزات سنگین مختلف در آب، رسوبات و موجودات زنده اکوسیستم‌های مختلف آبی از جمله رودخانه ولگا به عنوان مهمترین منبع تامین‌کننده آب دریای خزر گزارش شده است. به عنوان مثال Muller و همکاران (۲۰۰۷)، حضور بیش از حد معمول کادمیوم در حداکثر غلظت ۱۰ میلی‌گرم برکیلوگرم رسوب در برخی مناطق رودخانه ولگا را گزارش کردند. همچنین غلظت حدود ۳/۲ میلی گرم برکیلوگرم کادمیوم در رسوب رودخانه دانوب از دیگر زیستگاه‌های طبیعی ماهی استرلیاد گزارش شده است (Yigiterhan & Murray, 2008) سنگین از جمله کادمیوم در ماهیان خاویاری از جمله تاس‌ماهی ایرانی *Acipenser persicus* (صادقی‌زاد و همکاران، ۱۳۸۴)، ازون‌برون *Acipenser stellatus* (صادقی‌زاد و همکاران، ۱۳۸۴؛ ابطحی و همکاران، ۱۳۸۴) و استرلیاد (Jaric *et al.*, 2011) بیانگر لزوم توجه بیشتر به اثرات زیستی این نوع آلاینده‌ها بر روی ماهیان خاویاری است. هدف تحقیق ارزیابی اثرات هیستوپاتولوژیک کادمیوم محلول در آب به عنوان یک عنصر فلزی غیرضروری بر ساختار آب‌شش استرلیاد به عنوان یکی از ماهیان خاویاری حائز اهمیت از منظر اکولوژیک و اقتصادی (پروردشی) است. اطلاعات حاصل از این تحقیق می‌تواند منجر به بهبود درک چگونگی اثرگذاری فلزات سنگین بر ماهیان خاویاری خصوصاً در شرایط نگهداری در آب شیرین شود.

مواد و روش‌کار

۶۰ قطعه ماهی استرلیاد با وزن متوسط $۳۹/۹۸ \pm ۰/۴۵$ گرم و طول $۲۲/۴۵ \pm ۰/۵۶$ سانتی‌متر ($\text{mean} \pm \text{SEM}$) از مرکز تکثیر و پرورش استان اصفهان به مزارع پرورش ماهی واقع در دانشگاه صنعتی اصفهان منتقل و پس از ۲ روز نگهداری، غذاده‌ی به میزان ۲ درصد وزن بدن دو نوبت در روز (در ساعت ۹ صبح و ۴ بعدازظهر) با غذای پلت تجاری GFT1 مخصوص قزل‌آلای‌رنگین‌کمان ساخت شرکت فرادانه انجام گرفت. ماهیان برای آداتسانسیون به مدت ۱۰ روز قبل از شروع آزمایش در شرایط روشناهی طبیعی و آب جاری نگهداری شدند. جهت ایجاد مسمومیت مصنوعی، از کلرید کادمیوم منوهیدراته $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ مرک آلمان، خلوص

آلودگی محیط‌های آبی به فلزات سنگین به دلیل غیرقابل تجزیه بودن این مواد و پایداری آنها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. کادمیوم جزء فلزات نادر و کمیاب و یکی از مهمترین فلزات سنگین سمی بعد از مس و جیوه است. به دلیل افزایش غلظت کادمیوم در محیط ناشی از فعالیت‌های صنعتی این فلز معمولاً در مطالعات اکتوکسیکولوزی آبزیان محور توجه بوده است. مقدار کشنده‌ی کادمیوم (h) در ماهیان متاثر از عوامل درونی نظیر گونه، سن، رسیدگی جنسی، حضور سایر عوامل تنش‌زا نظیر بیماری‌ها و همچنین شرایط بیرونی نظیر درجه سختی، درجه حرارت و pH آب است. به طور معمول (h) کادموم در خصوص آبزیان در محدوده $5/0 \text{ mg m}^{-3}$ تا $1/21 \text{ mg m}^{-3}$ متغیر است (اسماعیلی ساری، ۱۳۸۱). فلزات سنگین در ماهیان می‌تواند موجب تغییرات رفتاری، تغییر در استرائتی‌های تغذیه، الگوی شنا، فرار شکار و شکارچی، تولیدمثل، اختلال در تنظیم اسمزی، تغییر رشد (Al-Attar, 2005)، تغییر شاخص‌های خونی (Witeska *et al.*, 2006)، تغییر در الگوی بیان ژن متالوتیونین (Alvarado *et al.*, 2006) کورتیزول (Sandhu & Vijayan, 2011) و آسیب‌های بافتی (Thophon *et al.*, 2003) شود. گزارش‌های متعددی در خصوص ارزیابی آسیب‌های ناشی از مسمومیت با فلزات سنگین در اندام‌های مختلف آبزیان منتشر شده است. از آن جمله می‌توان به تغییر در تعداد گلبولهای سفید و قرمز و همچنین برخی آنزیم‌های کبدی *Cyprinus carpio* (غیاشی و همکاران، ۱۳۸۹)، تغییر میزان هموگلوبین و هماتوکریت خون در ماهی استرلیاد (عروجی و همکاران، ۱۳۹۲)، کاهش رشد و بقاء در *Salvelinus confluentus* (Hansen *et al.*, 2008) گستره در سلول‌های اپیتلیالی آشش در سوف دریایی *Lates* (Thophon *et al.*, 2003) و لای‌ماهی *Tinca calcarifer* (Witeska *et al.*, 2006) و بروز هیپرپلازی موضعی اپیتلیوم تنفسی و هم‌جوشی تیغه‌های ثانویه در آب‌شش ماهی استرلیاد در رودخانه دانوب (Poleksic *et al.*, 2010) اشاره کرد. اخیراً تاثیر کادمیوم محلول در آب بر بروز تغییرات مخرب هیستوپاتولوژیک در کبد و پانکراس سیم دریایی *Sparus aurata* (Guardiola *et al.*, 2013) و تاثیر کلرید جیوه بر ساختار کلیه

کمتر از ۱۰ رشته بود، بافت بدون آسیب و با علامت (-) در نظر گرفته شد. آسیب ۱۰-۲۰ رشته با علامت (+) و به صورت آسیب خفیف، ۲۰-۳۰ رشته با علامت (++), به عنوان آسیب متوسط، آسیب ۳۰-۴۰ رشته با علامت (+++) به عنوان آسیب شدید و آسیب بیش از ۴۰ رشته با علامت (++++) و به عنوان آسیب بسیار شدید در نظر گرفته شد. برای سایر آسیب‌های بافتی نظیر حلقه‌شدن تیغه‌های ثانویه آبشنی و نکروز تیغه‌های ثانویه نیز رویه تقریباً مشابهی اتخاذ شد. برای کمی‌سازی شدت آسیب از شاخص اندام با استفاده از فاکتور اهمیت و ارزش نمره استفاده شد (Bernet et al., 1999).

$Iorg=\frac{rp}{rp+alt}$ (aorg rp alt×worg rp alt)

org: اندام یا بافت، alt: تغییرات، rp: الگوی واکنش، a: ارزش نمره، W: فاکتور اهمیت. بر اساس این فرمول به عنوان مثال نکروز دارای فاکتور اهمیت ۳ و ارزش نمره برابر ۶ خواهد بود. همچنین هایپرپلازی بافت آبشنش دارای فاکتور اهمیت ۲ و ارزش نمره برابر ۴ است. شاخص اندام، درجه آسیب یک اندام یا بافت را نشان می‌دهد که حاصل ضرب اهمیت فاکتور و ارزش نمره همه تغییرات یافت شده در بافت مورد آزمایش است. آنالیز آماری شامل مقایسه فراوانی و شدت ضایعات ایجاد شده در بافت آبشنش گروه‌های آزمایشی بود. ابتدا پراکنش نرمال داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف- اسمیرنوف سنجیده شد. میزان شدت تغییرات واردہ به آبشنش با استفاده از نرم افزار ۱۸: Ver (SPSS) و آزمون آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و آزمون چند دامنه دانکن مقایسه شدند. سطح معنی‌داری در تمام آرمون‌ها $\geq P<0.05$ و داده‌ها به صورت mean±SEM بیان شد. جهت رسم نمودار‌ها از Excel ۲۰۰۷ استفاده شد.

نتایج:

طی مدت آزمایش، میانگین ($SED\pm$) اکسیژن محلول mg/L ۰.۰۷/۰ \pm ۷-۵/۶ درجه حرارت ۱۱/۱ \pm ۱۳/۲۵ \pm ۱ درجه سانتی‌گراد، pH ۹۸/۰ \pm ۴۵۵ EC ۰۰/۲ \pm ۴۳/۸ میکروزیمنس، سختی معادل ۱۷۵ \pm ۱/۲۹ میلی‌گرم در لیتر کربنات‌کلسیم، نیترات ۰/۰۱۶ \pm ۰/۰۰۳ و فسفات ۲/۱۶ \pm ۰/۰۳۵ قلیائیت ۷۲ میلی‌گرم در لیتر کربنات کلسیم بود. مقدار سنجش هفتگی کادمیوم نشان داد که میانگین ($SED\pm$) کادمیوم در آب گروه‌های مختلف آزمایشی شامل گروه‌های ۷۳

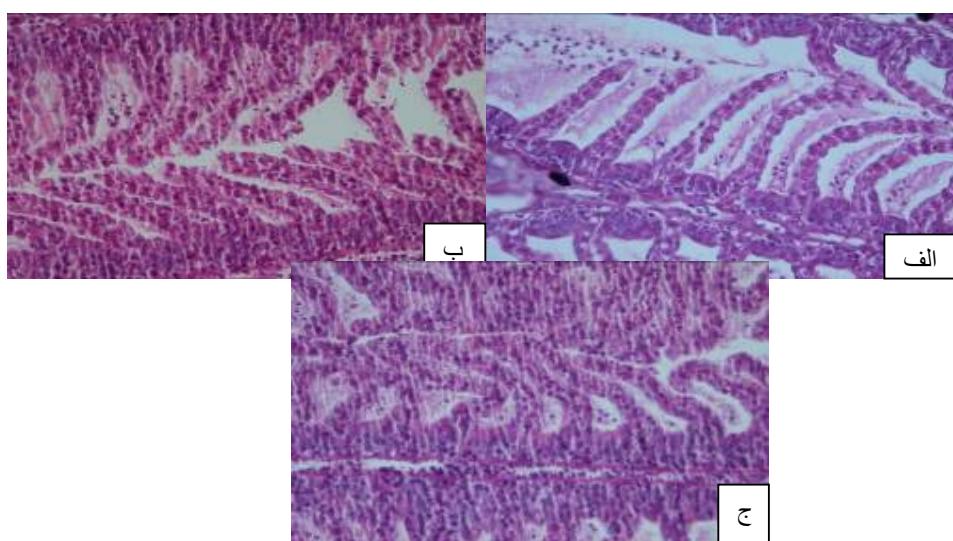
۹۹/۹۹٪) مطابق Alvarado و همکاران (۲۰۰۶) با کمی تغییرات استفاده شد. چهار تیمار آزمایشی شامل تیمار شاهد (صفر)، ۱۶ و ۶۴ میکروگرم بر لیتر کادمیوم در نظر گرفته شد که به ترتیب با کدهای Cd64، Cd 32، Cd16 و Cd0 مشخص شدند. هر تیمار شامل ۱۵ قطعه ماهی در سه تکرار (هر تکرار شامل ۵ قطعه ماهی) بود. آزمایش در شرایط آزمایشگاهی نیمه ثابت اجرا شد. در هر دقیقه حدود ۲۰۰ میلی‌لیتر از آب مخازن نگهداری ماهی تعویض و با آب حاوی غلظت معین بر اساس گروه آزمایشی جایگزین شد به این ترتیب آب هر مخزن هر ۷/۵ ساعت یکبار به طور کامل تعویض شد (Alvarado et al., 2006). غلظت‌های مورد بررسی از کادمیوم بر اساس میزان مجاز کادمیوم محلول در آب برای ماهیان آب شیرین (Raad, 1995) و میزان سمیت آن برای بچه‌ماهی شیپ *Acipenser nudiventris* در آب شیرین به عنوان یک گونه مشابه به استریلاد (محمد-تزاد شموشکی و همکاران, ۱۳۸۳) تعیین شد. فاکتورهای کیفی آب نظیر اکسیژن محلول، درجه حرارت، pH و EC به طور روزانه و میزان نیترات، فسفات، قلیائیت و سختی (Radojevic & Bashkin, 1998) به صورت هفتگی سنجش شد. از روش کروماتوگرافی گازی با استفاده از دستگاه Perkin Elmer (AAnalyst700) برای سنجش کادمیوم محلول در آب به صورت هفتگی استفاده شد (American Public Health Association, 1999) پس از اتمام دوره آزمایش (۲۱ روز)، از هر تکرار ۳ قطعه ماهی به طور تصادفی انتخاب و نمونه برداری از کمان دوم آبشنی سمت چپ ماهی (جهت فراهم آوردن شرایط یکسان نمونه-برداری) صورت گرفت. نمونه‌ها در محلول بوئن تثبیت شد. برای مطالعات آسیب‌شناسی بافتی از هر نمونه، ۳ اسلاید به روش رنگ-آزمیزی هماتوکسیلین-اوزین تهیه شد (Poleksic et al., 2010). وجود یا عدم وجود و نیز شدت تغییرات بافتی با مشاهده در زیر میکروسکوپ مورد ارزیابی قرار گرفتند (Riba et al., 2005).

کمی‌سازی آسیب بافتی: به منظور تشریح کمی تغییرات بافت‌شناسی در هر رشته آبشنی، از روش پیشنهادی Bernet و همکاران (۱۹۹۹) و برای توصیف شدت تغییر آسیب‌شناسی از روش Riba و همکاران (۲۰۰۵) استفاده شد. به عنوان مثال برای بررسی هیپرپلازی رشته‌ها و تیغه‌های ثانویه آبشنی و همچو شی در تیغه‌های ثانویه و رشته‌های آبشنی در صورتی که تعداد رشته‌های آسیب دیده

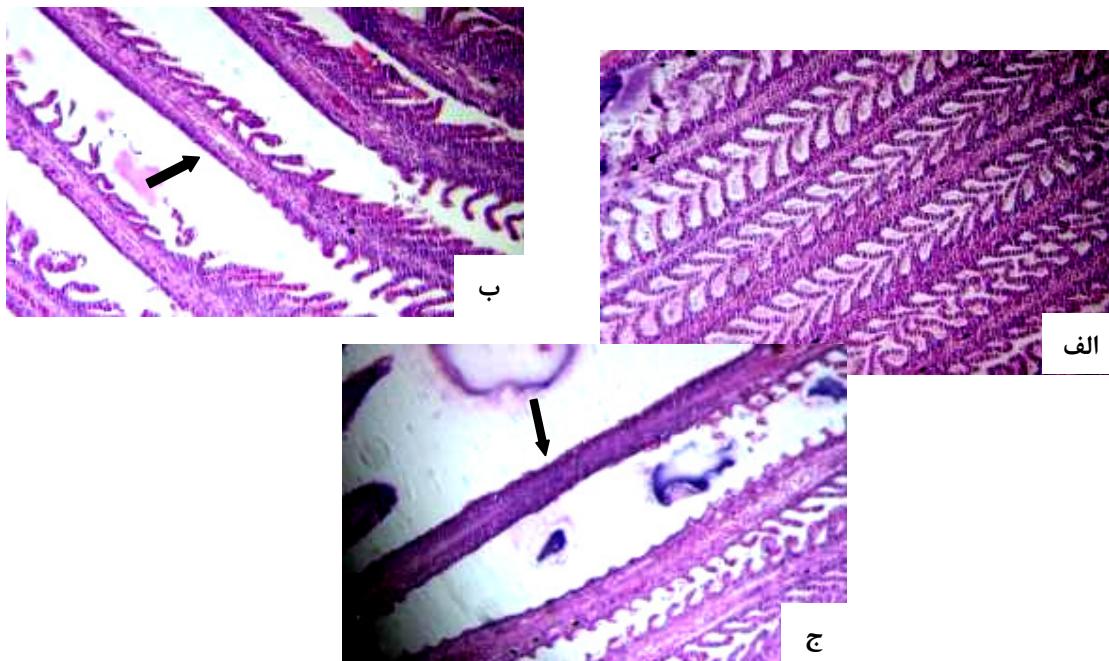
به طور کلی، در پایان دوره ۲۱ روز آزمایش، تغییرات آسیب‌شناسی محسوسی در بافت آبشش استرلیاد مشاهده شد (ب). در گروه Cd64 این تخریب شدیدتر بوده به طوری که در برخی موارد تیغه‌های ثانویه هر دو سمت رشتہ‌های آبشش کاملاً تحلیل رفته بودند (شکل ۲ ج). علاوه بر عوارض فوق، چماقی شدن راسی تیغه‌های ثانویه آبششی در برخی نمونه‌ها مشاهد شد (شکل ۲). از دیگر آسیب‌های وارد به آبشش بچه ماهی استرلیاد ایجاد هیپرتروفی (افزایش حجم سلول) در سلول‌های اپیتلیوم تیغه ثانویه بود. شدت هیپرتروفی در گروه‌های تحت تیمار Cd32 و Cd64 نسبت به دو گروه Cd0 و Cd16 بیشتر بود (جدول ۱). همچنین در برخی موارد، هیپرپلازی (افزایش تعداد سلول) در بافت آبشش استرلیاد نیز مشاهده شد (شکل ۳ الف و ب). افزایش حجم سلولی اگرچه در تمام گروه‌های تحت تیمار مشاهده شد، اما شدت آن با افزایش وزن به نحو چشمگیری افزایش یافت (جدول ۱). ادم یا افزایش اندازه سلول در اثر تجمع مایعات سلولی و حلقه شدن یا پیچ خودگی تیغه‌های ثانویه آبششی نیز در برخی موارد مشاهده شدند. بیشترین شدت آسیب‌های بافتی در گروه ۲۳ و ۶۴ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم مشاهده شد (شکل ۳، جدول ۱).

Cd0 الی Cd 64 به ترتیب معادل ۳۴ ± ۲ ، ۱۹ ± ۱ و ۶۳ ± ۳ میکروگرم در لیتر بود.

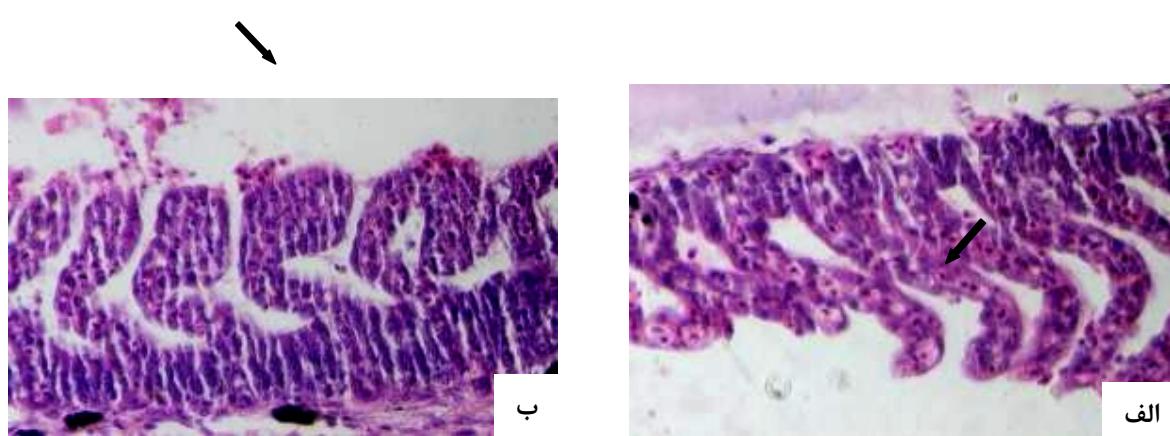
(شکل ۱ و جدول ۱). هیپرپلازی سلول‌های اپیتلیال و هم‌جوشی رشتہ‌ها و تیغه‌های ثانویه آبششی در گروه‌های مختلف آزمایشی به وضوح مشاهده شد (شکل ۱). در گروه Cd0 (شاهد)، رشتہ‌های و تیغه‌های ثانویه آبششی (شکل ۱ الف) به طور نسبتاً منظم قرار گرفته بودند، اگرچه در برخی موارد آسیب جزئی به آبشش نیز مشاهده شد. با افزایش غلظت آلاینده، شدت هیپرپلازی و هم‌جوشی افزایش یافته طوری که با افزایش غلظت به ۶۴ میکروگرم در لیتر، هیپرپلازی و هم‌جوشی به همراه خونریزی و پرخونی در ناحیه آبشش به طور محسوسی افزایش یافت (شکل ۱، ج). روند تغییرات نکروز تیغه‌های ثانویه آبششی در برخی گروه‌های آزمایشی در شکل ۲ نشان داده شده است. با افزایش غلظت کادمیوم، میزان آسیب‌های آبشش به طرز چشمگیری افزایش یافت. در تیغه‌های ثانویه گروه Cd0 نکروز چندانی مشاهده نشد (شکل ۲ الف). در گروه Cd16 در برخی از قسمت‌های آبشش به طور نسبی از طول تیغه‌های ثانویه کاسته شد. در گروه Cd32، در برخی موارد تیغه‌های ثانویه در یک سمت از رشتہ‌های آبششی به طور کامل از بین رفته بود (شکل ۲



شکل ۱: تغییرات ساختاری آبشش (هیپرپلازی و هم‌جوشی اپیتلیوم رشتہ‌ها و تیغه‌های ثانویه آبششی) در بچه‌ماهی استرلیاد قرار گرفته در معرض کادمیوم. (الف): رشتہ‌های آبششی و تیغه‌های ثانویه در گروه شاهد. (ب): بروز هم‌جوشی و هیپرپلازی سلول‌های اپیتلیال تیغه‌های ثانویه آبششی در گروه Cd32. (ج): هم‌جوشی شدید، هیپرپلازی سلول‌های اپیتلیال و پرخونی و خونریزی در ساختار تیغه‌های ثانویه ماهیان تیمار X 400 (H & E و Cd64).



شکل ۲: نکروز و چماقی شدن رشته‌های ثانویه در آبشنش بچه‌ماهی استرلیاد در معرض قرار گرفته با کادمیوم به مدت ۲۱ روز.
 (الف): گروه شاهد بدون نکروز (ب و ج): افزایش شدت نکروز و چماقی شدن رشته‌ها با افزایش غلظت کادمیوم محلول در آب از ۳۲ به ۶۴ میکروگرم در لیتر مشاهده شد (H & E X 100).



شکل ۳: هیپرتروفی (الف) و هیپرپلازی (ب) راسی رشته‌های ثانویه در آبشنش بچه‌ماهی استرلیاد در معرض کادمیوم به مدت ۲۱ روز. (الف): گروه (Cd32) و (ب): گروه (Cd64). افزایش شدت آسیب بافتی با افزایش آلینده مشهود بود (H & E X 400).
 ۷۵

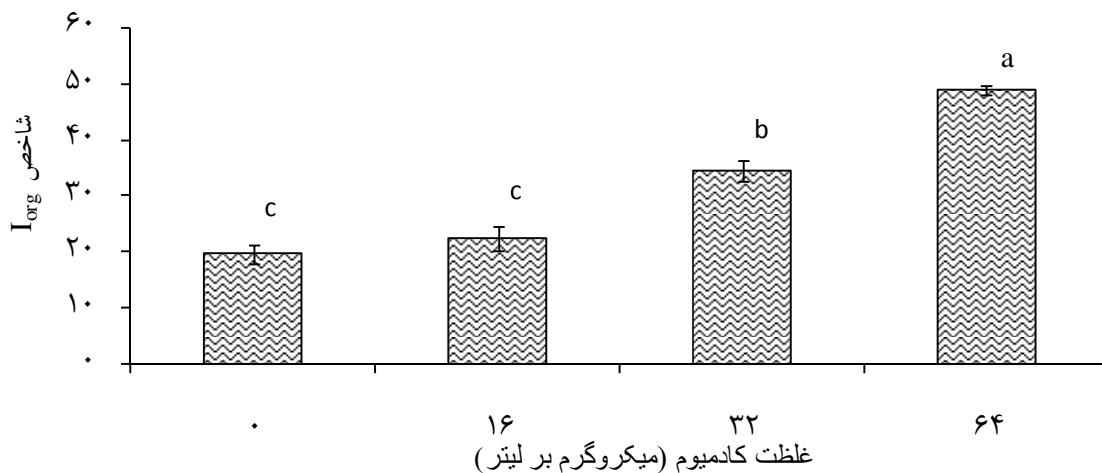
عروجی و همکاران اثر غلظت‌های تحت کشنده کادمیوم بر برخی تغییرات بافتی در آبشش بچه تاس‌ماهی استرلیاد...

در گروه شاهد ۰، میانگین ($SED \pm$) شاخص اندام معادل $174 \pm 19/60$ بود که تفاوت معنی‌داری را با میانگین ($SED \pm$) شاخص اندام گروه $16/2 \pm 33/22$. $Cd16$ نشان نداد (، $F=?$, $d.f.=?$, $P=?$). میانگین ($SED \pm$) عددی شاخص اندام تیمار $Cd32$ برابر $34/40 \pm 1/96$ بود که حد واسط گروه‌های ($Cd0$ و $Cd16$) و $Cd64$ قرار داشت (شکل ۴). بیشترین میانگین ($SED \pm$) شاخص اندام ($48/80 \pm 0/80$) در گروه 64 مشاهده شد که از نظر آماری بسیار بیشتر از مقادیر این شاخص در سایر گروه‌های آزمایشی بود ($F=?$, $d.f.=?$, $P=?$). به بیان دیگر، در مجموع، آسیب‌های بافتی واردہ به آبشش ماهیان استرلیاد، با افزایش دوز به طرز چشمگیری افزایش یافت (، $F=?$, $d.f.=?$, $P=?$).

به طور کلی، نتایج تغییرات هیستوپاتولوژیک نشان داد که اگرچه تغییرات در تمامی گروه‌ها وجود داشت، اما شدت آن با افزایش غلظت کادمیوم در آب از گروه $Cd0$ تا $Cd64$ افزایش یافته (جدول ۱). شدت افزایش تغییرات برای تمامی آسیب‌ها یکسان نبود. به عنوان مثال شدت هیپرتروفی در سلول‌های اپیتلیال گروه‌های $Cd0$ و $Cd16$ به یک میزان براورد شد در حالی که هیپرپلازی آبشش تفاوت نسبتاً محسوسی را بین دو گروه شاهد و $Cd16$ نشان داد. هیپرتروفی و ادم سلول‌های آبشش نسبت به سایر تغییرات آسیب‌شناسی با نرخ رشد کمتری افزایش یافتد. نکروز تیغه‌های ثانویه و رشتہ‌های آبششی و حلقه شدن آنها در گروه شاهد در گروه آسیب خفیف طبقه‌بندی شد در حالی که ماهیان گروه $Cd64$ به شدت دچار این آسیب شده بودند (جدول ۱).

جدول ۱: آسیب آبشش بچه ماهی استرلیاد در معرض غلظت‌های مختلف کادمیوم پس از ۲۱ روز در معرض قرارگیری

آسیب	گروه			
	$64Cd$	$22Cd$	$16Cd$	$\cdot Cd$
هیپرپلازی	بسیار شدید	بسیار شدید	شدید	متوسط
هیپرتروفی	شدید	متوسط	خفیف	خفیف
ادم اپیتلیوم آبششی	شدید	متوسط	خفیف	خفیف
حلقه شدن تیغه ثانویه	بسیار شدید	شدید	خفیف	خفیف
نکروز تیغه‌های ثانویه	بسیار شدید	شدید	خفیف	خفیف
ثانویه آشنشی	بسیار شدید	شدید	خفیف	خفیف
همجوشی در تیغه ثانویه	بسیار شدید	شدید	متوسط	خفیف
ثانویه و رشتهدان				



شکل ۴: میانگین (mean \pm SEM) تغییرات شاخص اندام I_{org} بافت آبیشش بچه‌ماهی استرلیاد در گروه‌های مختلف آزمایش. گروه‌های حداقل دارای حرف مشابه فاقد اختلاف معنی‌دار هستند.

بحث

این تغییرات در بافت آبیشش ماهیان گروه شاهد، شاید به دلیل حضور آلاینده‌های مختلف در آب تانک نگهداری ماهی یا به دلیل شرایط نگهداری پیشین ماهیان باشد. به طور کلی، آبیشش‌ها نقش مهمی در جذب، ذخیره و انتقال فلزات به محیط داخلی به واسطه گردش خون دارند (Witeska et al., 2006). در معرض قرارگیری آبزیان با آلاینده‌های مختلف از جمله کادمیوم به صورت محلول در آب سبب بروز تغییرات آسیب‌شناسی در بافت‌های مختلف از جمله آبیشش می‌شود. Thophon و همکاران (۲۰۰۳) عوارضی نظیر ادم سلول‌های آبیششی با هیپرتروفی و هیپرپلازی خفیف سلول‌های اپیتلیالی و کلرایدی در پایه رشته‌های آبیششی و لاملای ثانویه پس از یک ماه در معرض گذاری سوف عظیم جثه باراموندی Lates calcarifer با غلظت‌های تحت حد کادمیوم گزارش کردند. همچنین تغییرات رشته‌های آبیششی و تیغه تنفسی از قبیل نکروز و پوسته پوسته شدن رشته‌های تنفسی، هیپرتروفی رشته‌های تنفسی و هیپرپلازی سطح اپیتلیال تیغه تنفسی و Fundulus اپیتلیوم رشته‌های داخل تیغه‌ای در ماهی heteroclitus بعد از تنها ۲۰ ساعت در معرض قرارگیری با ppm ۵۰ کادمیوم توسط Gardner & Yevich در سال ۱۹۷۰ گزارش شده است. در ماهی کپور معمولی Cyprinus carpio در ۷۷

نتایج ارزیابی فاکتورهای فیزیکی و شیمیابی آب نشان داد که از نظر تمامی پارامترهای مورد بررسی، کیفیت نسبتاً مطلوبی برای نگهداری ماهی استرلیاد در طی دوره آزمایش فراهم شده بود. سنجش مقادیر کادمیوم محلول در آب نشان داد که مقادیر کادمیوم نسبتاً مناسب با مقادیر مورد انتظار بود. با این وجود در برخی موارد اختلافاتی در بین مقادیر سنجش شده کادمیوم با مقادیر مورد انتظار در مخازن مشاهده شد. این اختلاف می‌تواند به دلیل خطای اندازه‌گیری، جذب نسبی کادمیوم توسط جدار تانک یا لوله‌های انتقال آب و یا شاید حضور مقادیر جزئی کادمیوم در آب چاه مورد استفاده برای نگهداری ماهیان باشد. آسیب‌شناسی بافت آبیشش در آبزیان شامل ارزیابی تغییرات مختلفی است که از بین این تغییرات، برخی از آنها شامل نکروز بافتی، هیپرتروفی و هیپرپلازی سلول‌های اپیتلیال، هم‌جوشی رشته‌ها و تیغه‌های ثانویه آبیششی و تغییر شکل (پیچ خورده‌گی) تیغه‌های ثانویه مورد بررسی قرار گرفت. علت انتخاب این دسته تغییرات، به دلیل فراوانی نسبی آنها در بافت آبیشش ماهیان مورد مطالعه و همچنین عمومیت گزارش آنها در سایر تحقیقات مشابه بود. در مطالعه حاضر هم‌جوشی تیغه، هیپرپلازی و هیپرتروفی اپیتلیال آبیشش و نکروز اپیتلیال به وضوح در تمامی گروههای آزمایشی مشاهده شد. وجود

کادمیوم سعی در دور کردن آنها از سایر ترکیبات سلولی داخل سیتوپلاسم دارند به طوری که پس از اتصال با فلز سنگین به سمت دستگاه گلزاری هدایت شده و در نهایت با اتصال به لیزوژیم‌ها تجزیه می‌شوند (Foulkes, 2000). افزایش میزان پروتئین‌های داخل سلولی خود یکی دیگر از عوامل جذب زیاد آب و در نتیجه هیپرتروفی بافت است (Thophon *et al.*, 2003) به طور کلی، شدت تغییرات آسیب‌شناسی در مواجه با یک آلاینده می‌تواند متأثر از عوامل گوناگونی همچون نوع گونه مورد بررسی، شرایط محیطی از جمله درجه حرارت، میزان اکسیژن محلول، سختی آب، مرحله زیست ماهی، نوع، غلظت و نیز مدت زمان در معرض‌گذاری با آلاینده باشد (Thophon *et al.*, 2003; Poleksic *et al.*, 2010; Guardilua *et al.*, 2013) به طوری که افزایش شدت آسیب بافت آبشش، کبد و پوست تاس ماهی استرلیاد را در مکان هایی از رودخانه دانوب که غلظت فلزات سنگین بیشتر بود، پیش از این گزارش شده است (Poleksic *et al.*, 2010). همچنین تحقیقات غلامی و همکاران (۱۳۸۶) بر ماهیان سفید دریای خزر در آب شیرین نشان داد که حضور مواد شوینده در آب منجر به افزایش حدود ۴ برابری سمیت کادمیوم محلول در آب می‌شود. همچنین Wright در سال ۱۹۹۵ بیان کرد که میزان سختی آب از سمیت کادمیوم خصوصاً در فرم محلول در آب می‌کاهد. افزایش pH و سختی آب همچنین منجر به کاهش سمیت کادمیوم و روی در دو گونه از آزادماهیان شده است (Hansen *et al.*, 2008). در سال ۱۹۹۵ حد مجاز کادمیوم را برای ماهیان آب شیرین ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر پیشنهاد کرد با این وجود نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در معرض قرارگیری با ۳۲ میکروگرم در لیتر کادمیوم می‌تواند منجر به بروز تغییرات قابل توجه و معنی دار در ساختار آبشش استرلیاد شود. مطالعات اخیر نشان داده است که میزان کادمیوم در آب و رسوبات مناطق مختلف کره زمین بسیار متفاوت است به طوری که در آب مناطق اقیانوسی میزان آن در محدوده ۰/۰۱-۰/۴۲ میکروگرم در لیتر متغیر است (Soares *et al.*, 2008). نتایج کلی این تحقیق نشان داد که قرارگیری هر چند کوتاه مدت (۲۱ روز) بچه تاس ماهیان استرلیاد با مقادیر تحت کشنده کادمیوم محلول در آب می‌تواند منجر به بروز تغییرات هیستوپاتولوژیک در بافت آبشش شود. شدت این تغییرات از نظر کیفی و کمی با افزایش غلظت کادمیوم به نحو چشمگیری افزایش می‌یابد. در پایان، پیشنهاد می‌شود تا ارزیابی

عرضه‌گذاری با کادمیوم منجر به هیپرتروفی رشته‌های آبششی، هیپرپلازی سطح اپیتلیال تیغه ثانویه و اپیتلیال داخل تیغه و همچنین نکروز و پوسته پوسته شدن اپیتلیوم شد (Vinodhini & Narayanan, 2009) در این مطالعه مقایسه تغییرات بافت آبشش در بین تیمارهای مختلف نشان داد که در تمامی موارد، شدت آسیب وارد به آبشش با افزایش غلظت کادمیوم در آب افزایش یافته است. با این وجود در اغلب موارد تفاوت اندکی بین دو گروه شاهد و Cd16 مشاهد شد. از دلایل احتمالی این مساله می‌تواند حضور جزئی کادمیوم در آب گروه شاهد و یا بروز آسیب اولیه به آبشش ماهیان قبل از انتقال به محل آزمایش باشد. بروز تغییرات آسیب‌شناسی و افزایش شدت آنها متناسب با غلظت ماده آلاینده شاید بیانگر نقش حفاظتی این تغییرات در مقابل افزایش خدمات وارد شده به آبزی باشد (Mohamed, 2008). افزایش تقاضای تنفسی می‌تواند منجر به بروز تغییرات آسیب‌شناسی از جمله هیپرتروفی شود (Bais & Lokhande, 2012) هیپرتروفی در سلول‌های اپیتلیوم استرلیاد ممکن است به دلیل شرایط استرسی حضور کادمیوم در آب باشد. استرس، شدت تنفس را افزایش داده و لذا می‌تواند محركی برای بروز تغییرات ساختاری در آبشش شود. همچنین تغییرات گسترده در اپیتلیوم تیغه‌های ثانویه ممکن است ضخامت اپیتلیوم را افزایش داده و در نهایت منجر به کاهش نرخ ورود کادمیوم به خون شود و یا آن را با تأخیر مواجه کند. این تغییرات به نوبه خود می‌تواند منجر به هم‌جوشی تیغه‌های ثانویه شده و اختلالات بسیاری را در تبادل گاز و تنظیم یونی ایجاد کند. همچنین اتساع عروق خونی و حضور مایع ادماتوز (Edematose) در تیغه‌های ثانویه ممکن است به دلیل افزایش نفوذپذیری ناشی از در معرض قرارگیری با فلزات سنگین باشد که در نهایت منجر به نکروز بافت می‌شود (Kaoud, El-Dahshan; 2010, Khoshnood ۲۰۱۱). گزارش کردند که کلرید جیوه محلول در آب می‌تواند منجر به بروز تغییرات هیستوپاتولوژیک از جمله تورم، هیپرپلازی و ادغام Acipenser تیغه‌های ثانویه آششی در تاس‌ماهی ایرانی persicus شود، آنها بروز این تغییرات را به عنوان پاسخ فیزیولوژیک آبزی به منظور کاهش نرخ ورود آلاینده‌ها یا مقابله با اثرات مخرب آن قلمداد کردند. اغلب فلزات سنگین از جمله کادمیوم پس از ورود به سلول‌ها تمایل زیادی به اتصال با پروتئین‌ها از جمله متالوتیونین دارند. پروتئین‌ها با اتصال به

- برخی شاخص‌های دیگر نظیر میزان فعالیت $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -ATPase در سلول‌های آبشش در مطالعات بعدی مورد توجه قرار گیرد.
- تشکر و قدردانی**
- نگارندگان از جناب آقای مهندس متقدی کارشناس محترم گروه شیلات و مهندس تقی پور جهرمی، کارشناس محترم آزمایشگاه محتمد آلودگی محیط زیست دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان به سبب همکاری های ارزنده ایشان در انجام این تحقیق سپاسگزاری می نماید. هزینه های انجام این تحقیق از محل پژوهشی دانشگاه شماره ۵۰۲/۹۱/۵۳۹۴۹ پرداختی از سوی معاونت پژوهشی دانشگاه صنعتی اصفهان به دکتر فاطمه پیکان حیرتی تأمین شده است.
- منابع**
- اسماعیلی ساری، ع.، ۱۳۸۱. آلاینده ها، بهداشت و استاندارد در محیط زیست. انتشارات نقش مهر، تهران. ۷۶۷ صفحه.
- ابطحی، ب؛ قدرتی شجاعی، م؛ اسماعیلی ساری، ع؛ رهنما، م؛ شریف پور، ع؛ بهمنی، م؛ کاظمی، ر. و حلاجیان، ع.. ۱۳۸۴. غلظت برخی از فلزات سنگین در بافت های ماهی اوزن برون (Acipenser stellatus) صید شده در خزر جنوبی. مجله علوم محیطی، شماره ۴، صفحات ۷۷ تا ۸۴.
- صادقی راد، م؛ امینی رنجبر، غ؛ ارشد، ع. و جوشیده، م.. ۱۳۸۴. مقایسه تجمع فلزات سنگین (روی، مس، کادمیوم، سرب و جیوه) در بافت عضله و خاویار دو گونه تاس ماهی Acipenser persicus (Acipenser persicus) و ازون برون (Acipenser stellatus) حوضه جنوبی دریای خزر. مجله علمی شیلات ایران، صفحات ۷۹-۱۰۰. ۱۴۰:
- عروجعلی، م؛ پیکان حیرتی، ف؛ محبوی صوفیانی، ن. و درافشان، س. ۱۳۹۲. اثر غلظت های تحت کشنده کادمیوم بر برخی شاخص‌های خونشناسی بچه ماهی استرلیاد (Acipenser ruthenus). مجله علوم و فنون شیلات، ۲۲-۲۳: ۱۱.
- غلامی، م؛ فاطمی، س.م.ر؛ فلاحتی، م؛ اسماعیلی ساری، ع. و ماشینچیان، ع. ۱۳۸۶. تاثیر انفرادی و مخلوط فلزات سنگین (مس و کادمیوم) بر بچه ماهی سفید یک گرمی
- Al-Attar, A. M., 2005. Changes in haematological parameters of the fish, *Oreochromis niloticus* treated with sublethal concentration of cadmium. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 8(30): 421-424.
- Alvarado, N. E., Quesada, I., Hylland, K., Marigomez, I. and Soto, M., 2006. Quantitative changes in metallothionein expression in target cell-types in the gills of turbot (*Scophthalmus maximus*) exposed to Cd, Cu, Zn and after a depuration treatment. *Aquatic Toxicology*, 77: 64-77.
- American Public Health Association, American Water Works Association, 1999. Standard methods for the examination of water and wastewater. Water Environment Federation.
- Bais, U. E. and Lokhande, M. V., 2012. Effect of cadmium chloride on histopathological changes in the freshwater fish *Ophiocephalus striatus*

- of the heavy metals in *Oreochromis niloticus* fish. *Nature and Science*, 8 (4): 147-156.
- Khoshnood, Z., Khodabandeh, S., Shahryari Moghaddam, M. and Khorjestan, M., 2011.** Histopathological and pathomorphological effects of mercuric chloride on the gills of Persian sturgeon, *Acipenser persicus*, fry. *International Journal of Natural Resources and Marine Sciences*, 1(1): 23-32.
- Mohamed, F. A. S., 2008.** Bioaccumulation if selected metals and histopathological alterations in tissues of *Oreochromis niloticus* and *Lates niloticus* from lake Nasser, Egypt. *Global Veterinaria*, 2(4): 205-218.
- Muller, G., Yahya, A., Ludwig, A., Ottenstein, R., Kolomytsev, N. and Naydenkov, V., 2007.** Trace Metal and Phosphorus Concentrations in Fine Grained Sediments of the Volga River, Russia. *Journal for the Geological Sciences*, 35 (6): 361-375.
- Poleksic, V., Lenhardt, M., Jaric, I., Djordjevic, D., Gacic, Z., Cvijanovic, G. and Raskovicy, B., 2010.** Liver, gills, and skin histopathology and heavy metal content of the Danube starlet (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(3): 515-521.
- Radojevic, M. and Bashkin, V. N., 1998.** Practical environmental analysis, RSC Publication, 466P.
- Rand, M., 1995.** Fundamental of aquatic toxicology. Talor and Francis Pub., pp. 3-188.
- Riba, I., Blasco, J., Jimenez-Tenorio, N., Gonzalez, de Canales, M. L., and Angel DelValls, T., 2005.** Heavy metal bioavailability and effects: II. Histopathology–bioaccumulation relationships (Channa). *International Journal Zoological Research*, 8(1): 23-32.
- Bernet, D., Schmidt, H., Neier, W., Burkhardt, Hom, P. and Wahli T., 1999.** Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*, 22: 25-34.
- Foulkes, E. S., 2000.** Transport of the heavy metals across cell memmbarnes. *Soceity for Experimental Biology and Medicine*, 223: 234-240.
- Gardner, G. R. and Yevich, P. P., 1970.** Histological and hematological responses of an estuarine teleost to cadmium. *Journal Fisheries Research Board of Canada*, 27 (12): 2185-2196.
- Guardiola, F. A., Cuesta, A., Meseguer, J., Martínez, S., Martínez-Sánchez , M. I., Pérez-Sirvent, C. and Esteban, M. A, 2013.** Accumulation, histopathology and immunotoxicological effects of waterborne cadmium on gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish & Shellfish Immunology*, 35: 792-800.
- Hansen, J. A., Welsh, P. G., Lipton, J., Cacela, D. and Dailey, A. D., 2008.** Relative sensitivity of bull trout (*Salvelinus confluentus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to acute exposures of cadmium and zinc. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(1): 67-75.
- Jaric, I., Visnjic-Jeftic, Z., Cvijanovic, G., Gacic, Z., Jovanovic, L., Skoric, S. and Lenhardt, M., 2011.** Determination of differential heavy metal and trace element accumulation in liver, gills, intestine and muscle of sterlet (*Acipenser ruthenus*) from the Danube River in Serbia by ICP-OES. *Microchemical Journal*, 98: 77-81.
- Kaoud, H. A. and El-Dahshan, A. R., 2010.** Bioaccumulation and histopathological alterations

- Vinodhini, R. and Narayanan, M., 2009.** The impact of toxic heavy metals on the hematological parameters in common carp *Cyprinus carpio* L. Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering, 1: 23-28.
- Witeska, M., Jezierska , and Wolnicki, J., 2006.** Respiratory and hematological response of tench, *Tinca tinca* (L.) to a short-term cadmium exposure, Aquaculture International, 14:141-15.
- Wright, D. A., 1995.** Trace metal and major ion interactions in aquatic animals. Marine Pollution Bultin, 31 (1-3): 8-18.
- Yıldırıman, O. and Murray, J. W., 2008.** Trace metal composition of particulate matter of the Danube River and Turkish rivers draining into the Black Sea. Marine Chemistry, 111: 63-76 .
- caused by mining activities in the Gulf of Cadiz (SW, Spain), Chemosphere, 58: 671-682.
- Sandhu, N. and Vijayan, M. M., 2011.** Cadmium-mediated disruption of cortisol biosynthesis involves suppression of corticosteroidogenic genes in rainbow trout. Aquatic Toxicology, 103: 92-100.
- Soares, S. S., Martins, H., Gutiérrez-Merino, C. and Aureliano, M., 2008.** Vanadium and cadmium in vivo effects in teleost cardiac muscle: Metal accumulation and oxidative stress markers. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 147: 168–178.
- Thophon, S., Kruatrachue, M., Upatham, E. S., Pokethitiyook, P., Sahaphong, S. and Jaritkhuan, S., 2003.** Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. Environmental Pollution, 121: 307-320.

The sub-lethal effects of Cadmium on some gill histopathology in the cultivated Sterlet (*Acipenser ruthenus*)

Orojali, M⁽¹⁾; Paykan Heyrati, F^{(2)*}; alar Dorafshan, S⁽³⁾;

Mahboobi Soofiani, N⁽⁴⁾

Fheyратی@cc.iut.ac.ir

1,2,3,4- Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology.

Key words: Sterlet, *Acipenser ruthenus*, Cadmium, Histopathology, Gill.

Received: June 2013

Accepted: October 2013

Abstract

The sub-lethal effects of water-born Cadmium (Cd) on histopathological changes of gill tissues were investigated on Sterlet, *Acipenser ruthenus*. In this research, 60 fish (41.69 ± 0.95 g and 23.98 ± 0.14 cm) were randomly distributed in 4 experimental groups, each with 3 replicates. The fish were exposed to different concentrations of Cd for 21 days under semi-static experimental condition as: 0, 16, 32 and 64 $\mu\text{g/L}$ Cd. At the end of the experiment, the gill tissues were fixed in Bouin's solution for histopathological studies. Qualitative and quantitative changes of the gill tissues were analyzed. Several qualitative changes including hyperplasia, hypertrophy of epithelial cells and epithelial edema as well as necrosis, rings and fusion of gill filaments and secondary lamellae were observed in all treated fish including control group. Quantitative analysis based on organ index (I_{org}) showed significant increase in histopathological changes in the gill tissues coincided by elevation of Cd concentration in the water. However, there was no significant differences in the organ index between control and 16Cd group. The results of this study demonstrate severe histopathological changes in the gill tissues after exposing to sub-lethal concentration of water-born Cd under experimental condition. The results of this study might be used as a guildline for evaluation of histopahological changes being induced by heavy metals in natural or cultivated environment for sturgeon fish.