



پاسخ هیستوپاتولوژیکی هیپاتوپانکراس و آبشش خرچنگ (Forskål, 1775) *Metopograpsus messor* در مواجهه با آلاینده کادمیوم

صدیقه پوررضا، نرگس امراللهی بیوکی*، محمدرضا طاهری زاده

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

نوع مقاله:	چکیده
پژوهشی	
تاریخچه مقاله:	
دریافت: ۹۴/۰۲/۲۳	
اصلاح: ۹۴/۰۶/۰۵	
پذیرش: ۹۴/۰۸/۰۱	
کلمات کلیدی:	
بیومارکر	
خرچنگ	
فلزات سنگین	

در سال‌های اخیر پایش اکوسیستم‌های آبی از سنجش کمی مقدار آلاینده در آب، رسوب و بافت ماهی به سنجش‌های کیفی اثرات آلاینده‌ها بر آبزیان و بررسی وضعیت سلامت آبزیان و نهایتاً اکوسیستم سوق پیدا نموده است. مطالعه حاضر به منظور بررسی پاسخ هیستوپاتولوژیکی هیپاتوپانکراس و آبشش خرچنگ *Metopograpsus messor* در مواجهه با آلاینده کادمیوم در سه تکرار انجام شد. به این صورت که، آکواریوم‌هایی با غلظت ۵ µg/L کادمیوم آماده شد و همچنین، یک تیمار به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. نمونه‌برداری از خرچنگ‌ها در ۲ مرحله کوتاه مدت (۷۲ ساعت) و بلند مدت (۱۴ روز) پس از شروع آزمایش صورت گرفت. پس از انجام مراحل معمول بافت‌شناسی، رنگ‌آمیزی به روش هماتوکسیلین-ئوزین انجام شد. عوارض مشاهده شده در آبشش‌ها شامل: شکسته شدن سلول‌های پیلار و فروپاشی تیغه، هیپرپلازی، نکروز، جدا شدن کوتیکول، چماقی شدن رئوس انتهایی آبشش، واکوئله شدن، بدشکلی در رأس آبشش‌ها و انحراف اندک تیغه‌ها و در هیپاتوپانکراس شامل: آرایش غیر عادی لومن، نکروز، ضخیم شدن لامینا بازال، افزایش در تعداد سلول‌های B، حضور سلول‌های RI و گسترش حفره‌های خونی بود. مقایسه بین دو گروه مختلف زمانی نشان داد که ارتباط مستقیمی بین زمان و شدت آسیب‌های ایجاد شده وجود دارد.

مقدمه

فلزات سنگین^۱ از معمول‌ترین آلاینده‌هایی هستند که به طور طبیعی در محیط زیست و در مقادیر متفاوت در تمام زمین و آب‌های سطحی یافت می‌شوند. این فلزات، یکی از پنج نوع اصلی آلاینده‌های سمی در اکوسیستم‌های آبی محسوب می‌شود (Wu and Chen, 2004; Van Dyk *et al.*, 2007). در سال‌های اخیر پایش اکوسیستم‌های آبی از سنجش کمی مقدار آلاینده در آب، رسوب و بافت ماهی به سنجش‌های کیفی اثرات آلاینده‌ها بر آبزیان و بررسی وضعیت سلامت آبزیان و نهایتاً اکوسیستم سوق پیدا نموده است (Pereira *et al.*, 2006). بیومارکرها^۲ یا نشانگرهای زیستی شاخص‌های ژنتیکی، بیوشیمیایی، سلولی، بافتی، خون‌شناسی، آنزیمی و جمعیتی هستند که به ردیابی اثرات ثانویه آلاینده‌ها بر آبزیان می‌پردازند و وضعیت فیزیولوژیک آبزی را جهت ارزیابی سلامت آبزیان و نهایتاً اکوسیستم آبی مورد بررسی قرار می‌دهند. از مزایای بیومارکرها می‌توان به تشخیص

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: bionab1@gmail.com

¹ Heavy metals

² Biomarkers

به موقع اثرات آلاینده‌ها پیش از بروز آسیب‌های اکولوژیک، سهولت در اجرا، عدم پیچیدگی روش‌ها، نیاز به صرف هزینه کم و اجرا در شرایط مختلف آزمایشگاهی و محیطی نام برد (Schlenk, 2006). Fossi و همکاران (۲۰۰۰)، در گزارش خود اظهار داشتند با توجه به اینکه، بی‌مهرگان ۹۵ درصد از تمام گونه‌های جانوری را تشکیل می‌دهند، اجزای اصلی تمام اکوسیستم‌ها هستند و اغلب جمعیتشان زیاد است به‌طوری‌که، نمونه‌ها می‌توانند برای تجزیه و تحلیل به کار گرفته شوند بدون اینکه تأثیر قابل‌توجهی روی پویایی جمعیت آن‌ها بگذارد، بنابراین برای ارزیابی خطرات زیست محیطی ارجحیت دارند. خرچنگ‌ها از جمله بی‌مهرگانی هستند که به عنوان موجودات نگهبان انتخاب می‌شوند، چرا که جمع‌آوری و همچنین نگه داشتن آن‌ها تحت شرایط آزمایشگاهی آسان است (Gomiero et al., 2006).

کادمیوم^۱ از جمله، فلزاتی است که امروزه نگرانی‌های زیادی را ایجاد کرده و در گروه فلزات سنگین بسیار سمی طبقه‌بندی شده است (Hetzler et al., 2006). کادمیوم حتی در غلظت‌های بسیار کم باعث مسمومیت در موجودات آبی می‌شود و به عنوان یکی از سمی‌ترین عناصر در محیط در نظر گرفته شده است (Padmanaban and Mohan, 2013). جانوران در اثر مسمومیت با کادمیوم دچار فقر آهن خون، بیماری‌های کبدی و آسیب‌های مغزی-عصبی می‌شوند. اثرات سمی کادمیوم از برهم زدن تعادل اسمزی تا مرگ می‌تواند متغیر باشد (Ghiyasi et al., 2007). این فلز حلالیت بالایی در آب دارد و همچنین ظرفیت بالایی برای تجمع زیستی^۲ در بسیاری از گونه‌های آبی دارد (Liu et al., 2013) همچنین می‌تواند توسط آبزبان از طریق سیستم تنفسی، سیستم گوارشی و سطح بدن جذب شود (Rainbow and White, 1989; Van Hatton et al., 1989). مطالعات متعددی نشان داده‌اند که، در برخی از بی‌مهرگان آبی، جذب فلز سنگین از طریق فاز محلول بیشتر از جذب آن از طریق غذا است (Beltrame et al., 2010). در نتیجه، جذب عمده فلزات توسط خرچنگ ممکن است از طریق ستون آب و به وسیله بافت آبشش صورت گیرد (Ben-Khedher et al., 2013). آبشش اندام تنفسی خرچنگ و در تماس مستقیم با آب است (Wang et al., 2012). غده‌ی گوارشی سخت‌پوستان ده‌پا^۳ در جذب و ذخیره‌ی مواد غذایی، در سنتز آنزیم‌های گوارشی و در سمیت‌زدایی^۴ مواد شیمیایی نقش دارد (Schuwerack and Lewis, 2003). از آنجایی‌که، آبشش‌ها نخستین اندام برای تماس با آلودگی زیست محیطی هستند و هیاتوپانکراس اندام سم‌زدا و ذخیره‌گاه اصلی فلزات سنگین می‌باشد (Pan and Zhang, 2006). می‌توان نتیجه گرفت که آبشش و هیاتوپانکراس می‌توانند از مهمترین اندام‌های تجمع کادمیوم در خرچنگ محسوب شوند (Liu et al., 2013).

مطالعات متعددی حساسیت بالای هیاتوپانکراس و آبشش را به عنوان نشانگرهای زیستی در بررسی اثرات آلاینده‌ها نشان داده‌اند. به‌عنوان مثال: Allayie و همکاران (۲۰۱۲) مطالعاتی بر روی آبشش خرچنگ مانگرو *Neopisesarma medri* انجام داده و مشاهده کردند که، در معرض‌گذاری حاد با آمونیاک سبب تغییرات هیستوپاتولوژیکی مشخصی نظیر نکروز، هیپرپلازی، شکسته شدن سلول‌های پیلار و فروپاشی کل لاملا می‌شود و Kavitha و همکاران (۲۰۱۳)، در بررسی هیاتوپانکراس خرچنگ گلی *Scylla olivacea* تحت استرس نانوذرات کادمیوم مشاهده کردند که، تزریق نانوذرات کادمیوم به خرچنگ موجب تغییرات بافتی مانند واکنش شدن شدید و نکروز در هیاتوپانکراس هر دو جنس نر و ماده *S. olivacea* می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیک بافت هیاتوپانکراس و آبشش خرچنگ *Metopograpsus messor* در مواجهه با آلاینده کادمیوم در دو دوره‌ی زمانی کوتاه‌مدت و بلندمدت بود. در واقع، شناسایی و بررسی آسیب‌های ایجاد شده در بافت‌های مذکور می‌تواند به عنوان نشانگر هیستوپاتولوژیکی برای پایش آلودگی در سایر اکوسیستم‌ها استفاده شود.

مواد و روش‌ها

¹ Cadmium

² Bioaccumulation

³ Decapoda

⁴ Detoxification

نمونه‌برداری از خرچنگ‌ها در آذر ماه سال ۱۳۹۲ طی یک هفته در منطقه‌ی خواجه عطا در شهرستان بندرعباس واقع در استان هرمزگان انجام شد. منطقه‌ی نمونه‌برداری از لحاظ موقعیت جغرافیایی در عرض شمالی ۲۷ درجه و ۱۰ دقیقه و ۵۷/۰۵ ثانیه و طول شرقی ۵۶ درجه و ۱۸ دقیقه و ۵۳/۳۹ ثانیه واقع شده است.

نمونه‌های زنده خرچنگ به صورت تصادفی و با کمترین استرس با استفاده از روش صید با دست جمع‌آوری شدند که در مجموع ۲۴ نمونه جمع‌آوری شد و پس از قرار دادن نمونه‌ها در ظرف حاوی آب دریا به آزمایشگاه زیست‌شناسی دانشگاه هرمزگان انتقال یافتند.

خرچنگ‌ها جهت سازگاری با شرایط آزمایشگاه در آکواریوم‌های شیشه‌ای پر شده با آب دریا فیلتر شده به مدت ۱۴ روز نگهداری شدند (Kavitha et al., 2013). در طول دوره‌ی سازگاری و در معرض گذاری، نمونه‌ها دوبار در روز با تکه‌های کوچکی از گوشت ماهی به صورت دستی غذاهای می‌شدند (Ferrer et al., 2006).

شرایط آب در طول دوره‌ی سازگاری و در معرض گذاری به شرح ذیل بود:

درجه حرارت $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ، شوری ۴۵ppt، اسیدیته (pH): ۸/۳، اکسیژن محلول (DO): ۲/۷۵ mg/L و دوره‌ی نوری ۱۲D/۱۲L. پس از سازگاری نمونه‌ها با شرایط آزمایشگاهی، نمونه‌های بالغ که از نظر ظاهری کاملاً سالم بودند، با میانگین طول کارپاس $1/98 \pm 20/13$ mm برای آزمایش انتخاب شدند.

بر اساس مطالعات صورت گرفته و سایز گونه خرچنگ و گونه‌های مشابه یک غلظت زیرکشنده از فلز سنگین کادمیوم به مقدار $5 \mu\text{g/L}$ در دو بازه‌ی زمانی کوتاه مدت (۷۲ ساعت) و بلندمدت (۱۴ روز) برای پژوهش حاضر در نظر گرفته شد. همه‌ی شرایط موجود برای نمونه‌های تیمار مشابه شرایط ایجاد شده برای دوره‌ی سازگاری بود (Liu et al., 2013). آزمایشی در ارتباط با تأثیر فلز سنگین کادمیوم با سه تکرار انجام شد. همچنین یک تیمار بدون در معرض گذاری به عنوان شاهد (گروه کنترل) نگه داشته شد (Kavitha et al., 2013). خرچنگ‌های شاهد فقط در معرض آب تمیز قرار گرفتند و در شرایطی مشابه با شرایط خرچنگ‌های تیمار نگه داشته شدند (Wang et al., 2012).

نمونه‌برداری از خرچنگ‌ها در ۲ مرحله از در معرض گذاری کوتاه‌مدت (۷۲ ساعت) و بلندمدت (۱۴ روز) پس از شروع آزمایش صورت گرفت. به این صورت که، در هر زمان نمونه‌گیری، دو خرچنگ از هر تکرار از گروه‌های در معرض قرار گرفته و شاهد نمونه‌برداری شد. پس از اتمام هر دوره‌ی زمانی، خرچنگ‌ها را با قرار دادن آن‌ها به مدت ۱۵ دقیقه بر روی یخ بی‌هوش کرده (Liu et al., 2013; Wang et al., 2008; Liu et al., 2011) سپس هیپاتوپانکراس و آبشش با دقت جدا شده و به مدت ۴۸ ساعت در محلول بوئن تثبیت و بعد از آن به الکل ۷۰ درصد منتقل شدند. تهیه مقاطع بافتی بر اساس روش پارافینه انجام گرفت. برش‌های بافتی ۵ میکرونی تهیه شده بر اساس روش هماتوکسیلین-اؤزین رنگ‌آمیزی شدند. بررسی اثرات تخریبی کادمیوم بر روی بافت‌های هیپاتوپانکراس و آبشش در زیر میکروسکوپ نوری در بزرگنمایی‌های مختلف انجام شد. تغییرات بافتی ساختارهای هیپاتوپانکراس و آبشش بر اساس روش نیمه کمی با استفاده از امتیازات از - تا +++ بر اساس درجه تغییر، مورد ارزیابی قرار گرفت. در این روش (-) بدون تغییر، (+) تغییر خفیف، (++) تغییر متوسط و (+++) تغییر شدید می‌باشد.

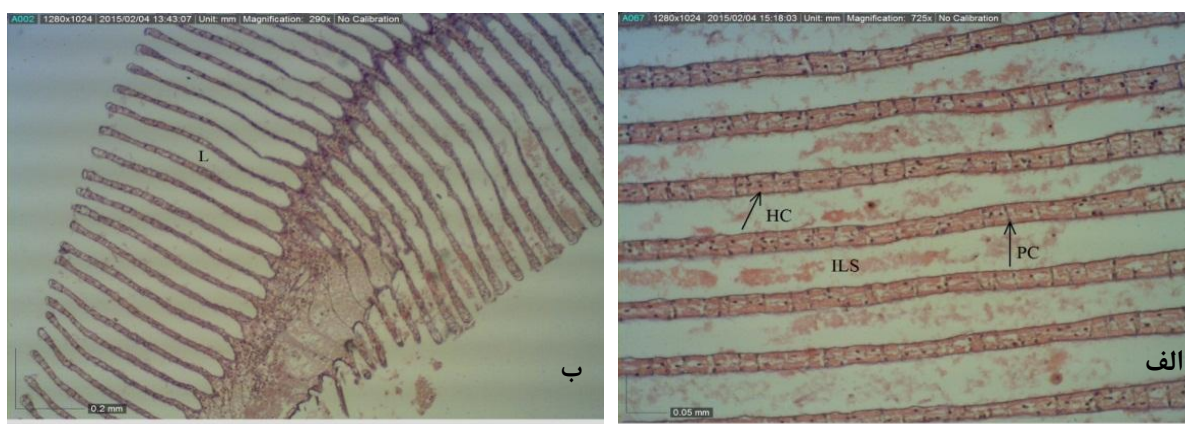
نتایج

یکی از اهداف این تحقیق بررسی ساختار آبشش خرچنگ *M. messor* در معرض آلاینده کادمیوم بود که در پایان نتایج قابل توجهی به دست آمد. براساس نتایج بافتی، آبشش‌ها در اتافک آبشش در منطقه قدامی - شکمی قفسه سینه قرار گرفته‌اند. آبشش‌ها زوج هستند و ساختار هلالی شکلی دارند و به طور جانبی در هر دو طرف هیپاتوپانکراس و لوله گوارشی قرار گرفته‌اند (شکل ۱). آبشش‌های *M. messor* از تعدادی لاملا یا صفحات مسطح تشکیل شده است، یک لایه نازک از کیتین کل سطح خارجی آبشش را می‌پوشاند و در فواصل نامنظم، تیغه‌های آبششی توسط سلول‌های پیلار پیوسته شده‌اند. حضور و پراکنش

تناوبی سلول‌های پیلار در داخل تیغه آبشش در حمایت ساختاری و هدایت جریان همولف کمک می‌کند. براساس مطالعات بافت‌شناسی تغییرات پاتولوژیکی شاخصی در نمونه‌های کنترل مشاهده نشد. آبشش‌های خرچنگ‌های کنترل آرایش یکنواخت تیغه (L^۱) همراه با فضای یکنواخت داخلی تیغه (ILS^۲) و فضای خونی طبیعی با تعداد مناسبی از هموسیت‌ها در جریان خون (HC^۳) را نشان می‌دهند و هیچ ناهنجاری و بدشکلی ساختاری (MF^۴) در رأس آبشش‌های گروه کنترل مشاهده نشد (شکل ۲).



شکل ۱. نمایی از شکل ظاهری آبشش خرچنگ

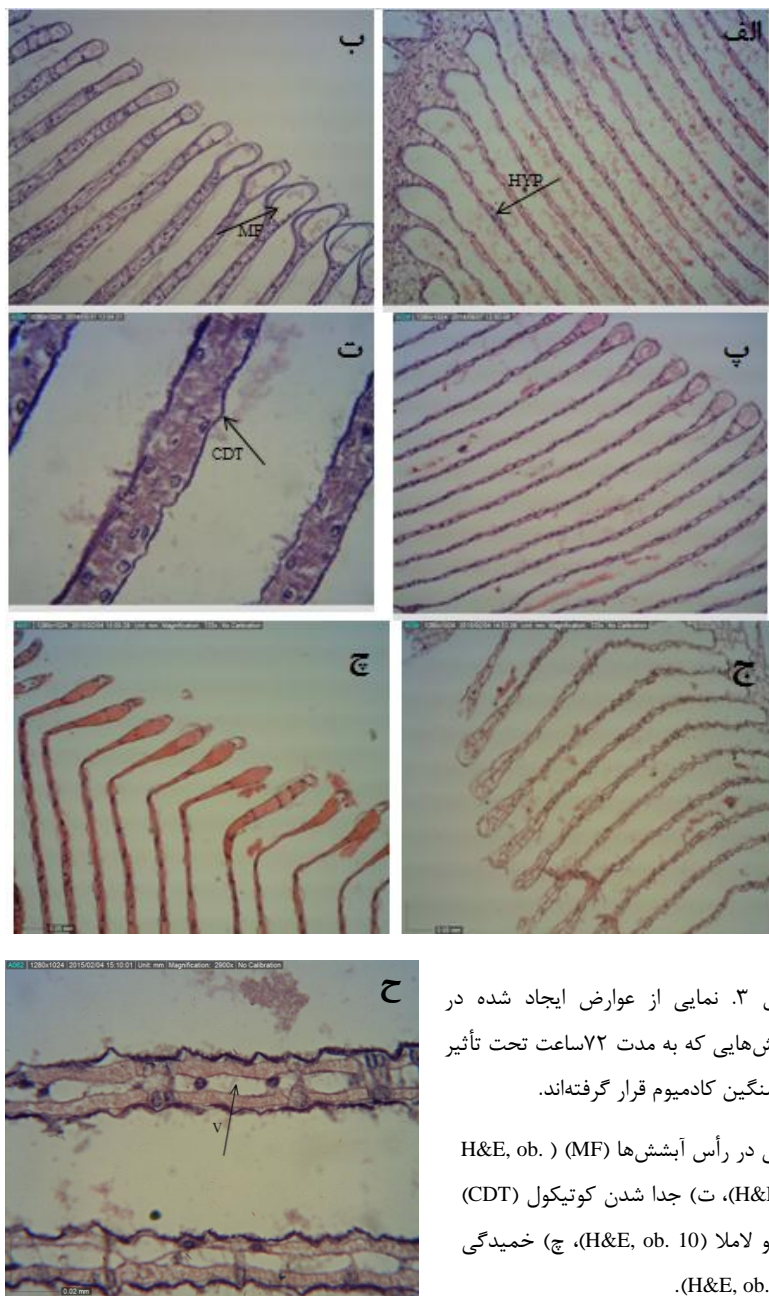


شکل ۲. ساختار عمومی آبشش در گروه کنترل

الف) سلول‌های پیلار (PC^۵)، هموسیت‌ها (HC)، فضای یکنواخت داخلی لاملا (ILS) (H&E, ob.10). ب) آرایش طبیعی لاملا (L) (H&E, ob. 4).

- 1 Lamellae
- 2 Interlamellar space
- 3 Haemocytes
- 4 Malformation
- 5 Pillar cells

نتایج حاصل از بررسی پاتولوژیکی بافت آبشش در خرچنگ *M. messor* گروه‌های آزمایشی قرار گرفته در معرض فلز سنگین کادمیوم نشان می‌دهد که، تغییرات قابل توجهی در تیمارهای مختلف در مقایسه با گروه کنترل وجود دارد. این تغییرات عبارتند از: شکسته شدن سلول‌های پیلار و جمع شدگی و تا شدگی لاملا^۱، هیپرپلازی^۲، نکروز^۳، جدا شدن کوتیکول^۴، چماقی شدن رئوس انتهایی لاملا^۵، واکوئله شدن^۶، بدشکلی در رأس آبشش‌ها^۷ و خمیدگی اندک لاملا^۸ (شکل‌های ۳ و ۴).



شکل ۳. نمایی از عوارض ایجاد شده در آبشش‌هایی که به مدت ۷۲ ساعت تحت تأثیر فلزسنگین کادمیوم قرار گرفته‌اند.

(الف) هیپرپلازی (HYP) (H&E, ob.10)، (ب) بدشکلی در رأس آبشش‌ها (MF) (H&E, ob. 10)، (پ) چماقی شدن رئوس انتهایی لاملا (H&E, ob.10)، (ت) جدا شدن کوتیکول (CDT) (H&E, ob. 40)، (ج) شکسته شدن سلول‌های پیلار و لاملا (H&E, ob. 10)، (چ) خمیدگی اندک لاملا (H&E, ob.10) (V) واکوئله شدن (H&E, ob.40).

¹ Disruption of the pillar cells and collapsing of lamellae

² Hyperplasia

³ Necrosis

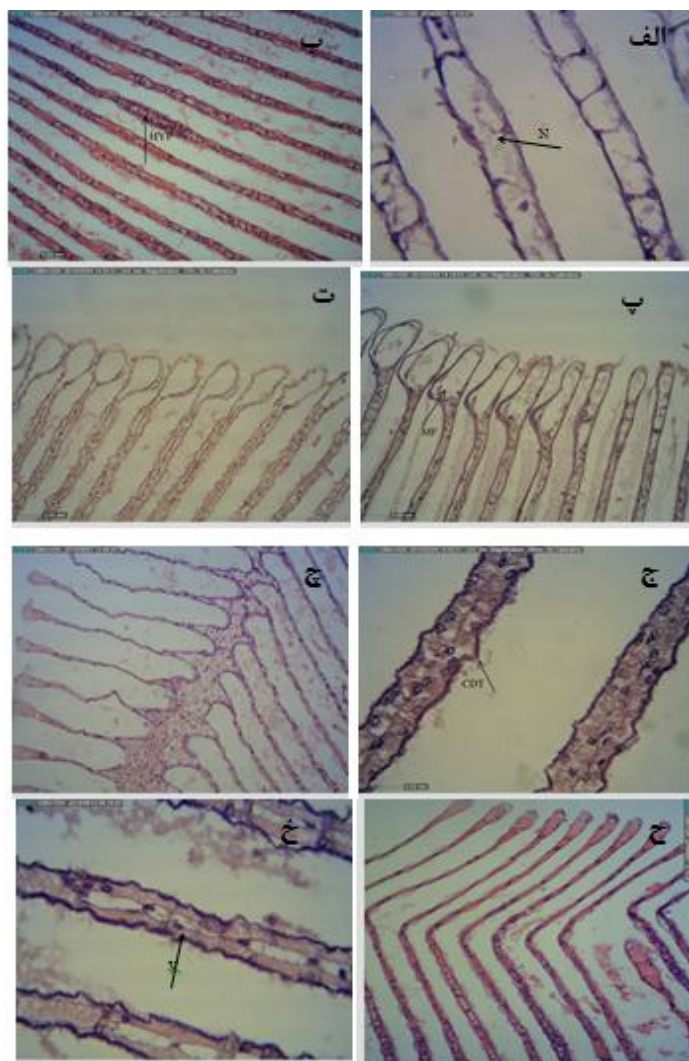
⁴ Detached Cuticle

⁵ Club-shaped distal tips of gill lamellae

⁶ Vacuolisation

⁷ Malformation at tip of the gills

⁸ Slight lamellae distortion



شکل ۴. نمایی از عوارض ایجاد شده در آبشش‌هایی که به مدت ۱۴ روز تحت تأثیر فلزسنگین کادمیوم قرار گرفته‌اند. (الف) نکروز (N) (H&E, ob.40)، (ب) هیپرپلازی (HYP) (H&E, ob.10)، (پ) بدشکلی در رأس آبشش‌ها (MF) (H&E, ob. 10)، (ت) چماقی شدن رئوس انتهایی لاملا (H&E, ob.10)، (ج) جدا شدن کوتیکول (CDT) (H&E, ob. 40)، (چ) شکسته شدن سلول‌های پیلار و جمع شدگی و تا شدگی لاملا (H&E, ob. 10)، (ح) خمیدگی اندک لاملاها (H&E, ob.10)، (خ) واکنش شدن (V) (H&E, ob.40).

براساس بررسی‌های انجام شده مشاهده گردید که، با افزایش مدت زمان در معرض‌گذاری عوارض بافت‌شناسی ناشی از فلز سنگین کادمیوم بر ساختار و ریخت‌شناسی بافت آبشش بیشتر می‌شود (جدول ۱).

از دیگر اهداف این تحقیق بررسی ساختار هیپاتوپانکراس خرچنگ *M. messor* در معرض آلاینده کادمیوم بود. هیپاتوپانکراس به شکل یک اندام زرد-قهوه‌ای در امتداد هر دو سمت معده به طور مساوی قرار گرفته است (شکل ۵). کل هیپاتوپانکراس، از توپول‌های کور متعدد تشکیل شده که توسط یک غشا یا آستر تونیکا محصور شده است. غشا توپول‌ها را می‌پوشاند و پیوستگی اندام را حفظ می‌کند. مطالعه بافت‌شناسی نشان می‌دهد که هر توپول هیپاتوپانکراس توسط فضاهای خونی که شامل هموسیت‌ها و رگ‌های خونی مشخص است، احاطه شده است.

توپول‌های هیپاتوپانکراس توسط یک لایه بازال با لومن مرکزی محصور شده‌اند. سه نوع از سلول‌های اپیتلیال در این توپول‌ها دیده می‌شوند سلول‌های R، F و B. سلول‌های R فراوان‌ترین نوع سلول مشاهده شده هستند. سلول‌های F سلول‌های با سیتوپلاسم شدیداً بازوفیلیک هستند و سلول‌های B که به واسطه دارا بودن یک واکنش منفرد بزرگ مشخص می‌شوند. براساس مطالعات بافت‌شناسی تغییرات پاتولوژیکی شاخصی در نمونه‌های کنترل مشاهده نشد. در هیپاتوپانکراس خرچنگ‌های کنترل، لومن (L¹) و همچنین سینوس‌های میان‌بافتی بین توپول‌ها طبیعی بودند (شکل ۶).

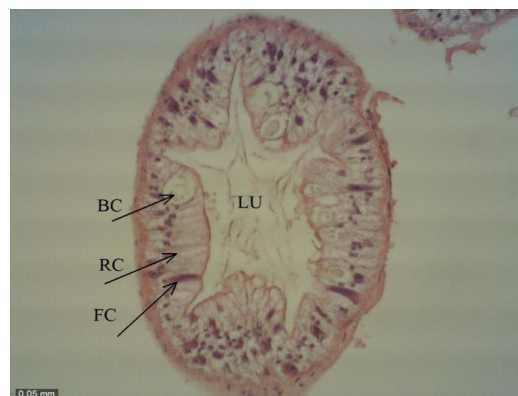
¹ lumen

جدول ۱. خلاصه‌ای از اثرات پاتولوژیکی مشاهده شده در بافت آبشش خرچنگ *M. messor* در معرض ۵μg/L کادمیوم. بدون تغییر (-)، تغییرات خفیف و کم (+)، تغییرات متوسط (++)، تغییرات زیاد (+++).

نوع عارضه	کنترل	۷۲ ساعت در معرض گذاری	۱۴ روز در معرض گذاری
شکسته شدن سلول‌های پیلار و جمع شدگی و تا شدگی لاملا هیپرپلازی	-	+	++
نکروز	-	-	+
کوتیکول جدا شده	-	++	+++
چماقی شدن رئوس انتهایی لاملا	-	++	+++
واکوئله شدن	-	++	+++
بدشکلی در رأس آبشش‌ها	-	+	++
خمیدگی اندک لاملاها	-	+	++



شکل ۵. نمایی از شکل ظاهری هپاتوپانکراس خرچنگ



شکل ۶. ساختار عمومی هپاتوپانکراس در گروه کنترل

لومن طبیعی (LU)، سلول‌های B (BC)، سلول‌های F (FC)، سلول‌های R (RC) (H&E, ob. 10).

نتایج حاصل از بررسی بافت هپاتوپانکراس در خرچنگ *M. messor* گروه‌های آزمایشی در معرض قرار گرفته با فلز سنگین کادمیوم نشان می‌دهد که، تغییرات قابل توجهی در تیمارهای مختلف در مقایسه با گروه کنترل وجود دارد. این تغییرات عبارتند از: آرایش غیرعادی لومن^۱، نکروز^۲، ضخیم شدن لامینا بازال^۳، افزایش در تعداد سلول‌های B^۴، حضور سلول‌های RI^۵ و اتساع حفره‌های خونی^۶ (شکل ۷ و ۸).

¹ Formation of abnormal lumen

² Necrosis

³ Thickened basal laminae

⁴ Increase in number of B-cells

⁵ The presence of Reserve Inclusion

⁶ Dilatation of the hemal sinuses

براساس بررسی‌های انجام شده مشاهده گردید که، با افزایش مدت زمان در معرض‌گذاری، تأثیر فلز سنگین کادمیوم بر ساختار و ریخت‌شناسی بافت هیپاتوپانکراس بیشتر می‌شود.

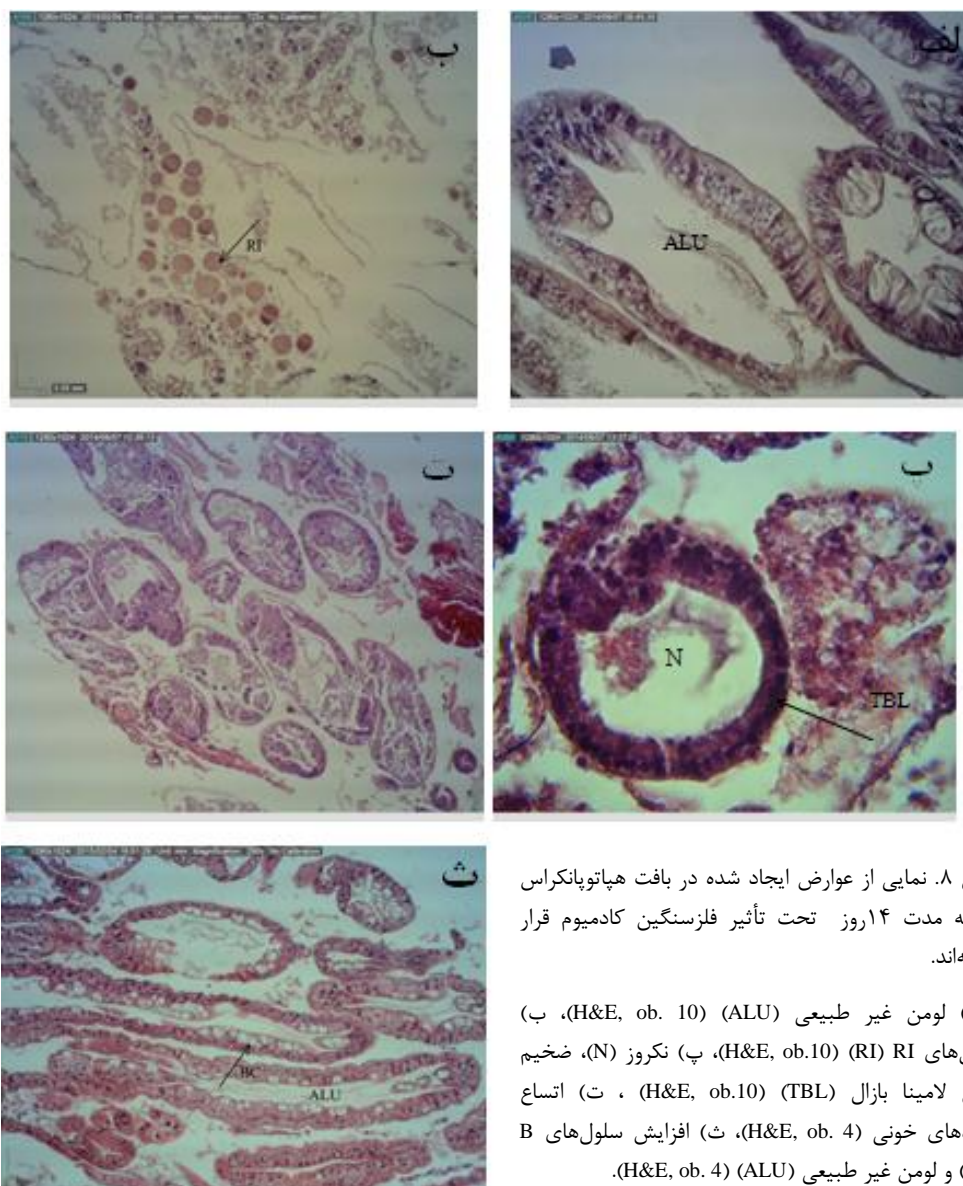


شکل ۷. نمایی از عوارض ایجاد شده در بافت هیپاتوپانکراس که به مدت ۷۲ ساعت تحت تأثیر فلزسنگین کادمیوم قرار گرفته‌اند.

الف) لومن غیر طبیعی (ALU) (H&E, ob. 10)، ب) سلول‌های RI (RI) (H&E, ob.10)، پ) نکروز (N)، ضخیم شدن لامینا بازال (TBL) (H&E, ob.10)، ت) اتساع حفره‌های خونی (B) (H&E, ob. 4) ث) افزایش سلول‌های B (BC) (H&E, ob. 10).

جدول ۲. خلاصه‌ای از اثرات پاتولوژیکی مشاهده شده در بافت هیپاتوپانکراس خرچنگ *M. messor* در معرض $5\mu\text{g/L}$ کادمیوم. بدون تغییر (-)، تغییرات خفیف و کم (+)، تغییرات متوسط (++)، تغییرات زیاد (+++).

نوع عارضه	کنترل	۷۲ ساعت در معرض‌گذاری	۱۴ روز در معرض‌گذاری
آرایش غیر عادی لومن	-	++	+++
نکروز	-	+	++
ضخیم شدن لامینا بازال	-	+	++
سلول‌های B	+	+	++
سلول‌های RI	-	+	++
اتساع حفره‌های خونی	-	++	+++



شکل ۸. نمایی از عوارض ایجاد شده در بافت هپاتوپانکراس که به مدت ۱۴ روز تحت تأثیر فلزسنگین کادمیوم قرار گرفته‌اند.

الف) لومن غیر طبیعی (ALU) (H&E, ob. 10)، ب) سلول‌های RI (RI) (H&E, ob.10)، پ) نکروز (N)، ضخیم شدن لامینا بازال (TBL) (H&E, ob.10)، ت) اتساع حفره‌های خونی (B) (H&E, ob. 4)، ث) افزایش سلول‌های B (BC) و لومن غیر طبیعی (ALU) (H&E, ob. 4).

بحث

در سال‌های اخیر، اثر بیولوژیکی فلزات سنگین در سیستم‌های آبی به یک نگرانی بزرگ تبدیل شده است. یکی از مهمترین مسایل در حوزه آلاینده‌های فلزات سنگین، اثر گذاری مقادیر بسیار کم این ترکیبات در سیستم‌های زیست محیطی است. در این رابطه، بی‌مهرگان به عنوان شاخص مفید سنجش سلامت محیط به کار می‌روند. تمایل تجمع فلزات سنگین به ویژه کادمیوم و سرب در بی‌مهرگان نسبت به سایر موجودات آبی به اثبات رسیده است (Meyer *et al.*, 1991). مطالعات هیستوپاتولوژی در ارزیابی پتانسیل آلودگی ناشی از سموم فلزات سنگین مفید هستند، زیرا حتی مقدار ناچیزی از این مواد شیمیایی که منجر به مرگ حیوانات نمی‌شوند می‌توانند آسیب‌های قابل ملاحظه‌ای در ساختار بافتی اندام‌های بدن ایجاد کنند (Chourpagar and Kulkarni, 2013) برای مثال، مواجهه طولانی مدت ترکیبات فلزی، تغییرات هیستوپاتولوژیکی آشکاری در هپاتوپانکراس و آبشش خرچنگ ایجاد می‌کند (Krishnaja *et al.*, 1987).

در تفسیر تغییرات مشاهده شده در بافت آبشش خرچنگ‌های تحت استرس کادمیوم، می‌توان بیان نمود که، آبشش‌ها از جمله اندام‌های مهم سخت‌پوستان بوده و مسئول تبادل گاز، دفع آمونیاک، تنظیم اسمزی و متعادل کردن اسید-باز هستند (Romano and Zeng, 2007) و همچنین یکی از اصلی‌ترین مکان‌های جذب فلزات سنگین موجود در محیط می‌باشند

(Shaganas, 2007). آبشش‌ها اولین نواحی هستند که توسط سموم از جمله فلزات سنگین آسیب می‌بینند. در واقع، سطح جذب وسیع، عبور حجم زیادی از آب در طول سطح آبشش و بیومس نسبتاً کوچک آبشش‌ها در مقایسه با سطوح دیگر منجر به حضور غلظت‌های بالای فلزات سنگین، به‌خصوص کادمیوم در این اندام تنفسی شده است (Meyer et al., 1991). همچنین، سلول‌های اپیدرمی تیغه آبشش، برخلاف بقیه پوست دارای تنها یک پوشش خیلی نازک از کوتیکول هستند در نتیجه آبشش‌های سخت‌پوستان نفوذپذیرترین قسمت از پوستشان را تشکیل می‌دهند، بنابراین نسبت به حمله میکروبی و صدمات آسیب‌پذیرند (Vogan et al., 2001). علاوه بر این، آبشش‌های سخت‌پوستان در تنفس و تنظیم فشار اسمزی مهم بوده و هر نوع آسیب سلولی که منجر به بهم ریختگی ساختار طبیعی بافت آبشش شود می‌تواند عواقب جدی در بر داشته باشد. تحقیقات نشان داده که فلزات سنگین باعث اختلال در توانایی تنظیم اسمزی در خرچنگ‌ها می‌شوند (Krishnaja et al., 1987). تجمع کادمیوم در آبشش‌ها منجر به تغییرات مورفولوژیکی در سطح سلولی می‌شود که اثراتی روی عملکرد اندام‌ها نشان می‌دهد (Shaganas, 2007).

هیپرپلازی رشته‌های آبششی بیشتر یک پاسخ بلندمدت سلول‌های سنگفرشی است که اغلب در پاسخ به میزان کم عوامل آسیب‌رسان اتفاق می‌افتد. هیپرپلازی سلول‌های پوششی به عنوان پاسخ مزمن علیه عفونت‌های میکروبی و انگلی و یا تحریکات شیمیایی می‌باشند (Sharifpour et al., 2011). هیپرپلازی ایجاد شده در اثر تماس با آلاینده‌هایی همچون هیدروکربن‌های نفتی و فلزات سنگین، در سلول‌های پوششی آبشش ناشی از عدم توانایی سلول‌ها در تفکیک شدن می‌باشد که در نتیجه به افزایش تقسیم سلولی یا میتوز می‌انجامد (Rostami Bashman et al., 1997). تخریب سلول‌های پیلار ناشی از جریان شدید خون به درون تیغه‌های آبششی و یا حتی اثر مستقیم آلاینده بر روی این سلول‌ها می‌باشد. چماقی شدن لاملا دلیلی بر تغییرات مزمن آبشش می‌باشد (Sharifpour et al., 2011). در دید میکروسکوپی، سلول‌های اپیتلیال در رأس لاملاها تجمع یافته که به این دلیل منظره‌ای شبیه به چماق پیدا کرده‌اند (Ahmadmoradi et al., 2013). بسیاری از عوامل آسیب‌رسان باعث واکنش شدن و نکرور بافت پوششی تیغه‌های آبششی می‌شوند (Sharifpour et al., 2011). واکنش شدن سلول‌ها ممکن است یک شکست برای تنظیم مقدار حجم آب نشان دهد. در واقع واکنش شدن به طور بالقوه‌ای روی فرآیندهای فیزیولوژیکی در آبشش توسط افزایش فاصله انتشار برای گازهای تنفسی و یون‌ها اثر خواهد گذاشت (Ben-Khedher et al., 2013). نکرور ضایعه‌ای است که در آن سلول‌ها فعالیت کمتری دارند و حتی می‌میرند. هسته این سلول‌ها دچار تغییراتی شده و سیتوپلاسم آن‌ها معمولاً یکنواخت می‌گردد. نهایتاً این سلول‌ها سیتولیز یا فاگوسیت می‌شوند (Haschek et al., 2010).

عواقب فیزیولوژیکی تغییرات بافتی مانند نکرور، آسیب اپیتلیال و فروپاشی لاملا. عوارض بافتی مانند نکرور^۱، آسیب اپیتلیال و فروپاشی لاملا با اثر بر تبادل گازهای تنفسی و ایجاد اختلال در فشار اسمزی می‌تواند بر روی میزان بهره برداری صنایع آبی پروری تاثیرگذار باشد. افزایش وسیع هموسیت‌ها، همراه با جمع شدگی و تا شدگی تیغه آبشش احتمالاً منجر به کاهش جریان همولنف لازم برای تبادل گاز در داخل ساختار آبشش می‌شود (Romano and Zeng, 2007).

در تفسیر تغییرات مشاهده شده در بافت هیپاتوپانکراس خرچنگ‌های تحت استرس کادمیوم، می‌توان بیان نمود که، هیپاتوپانکراس مکان اصلی متابولیسم است و به‌راحتی به تغییرات ایجاد شده در شرایط آب مانند حضور آلاینده‌ها واکنش نشان می‌دهد (Maharajan et al., 2012). در واقع، غده‌ی گوارشی سخت‌پوستان مکان اصلی برای تجمع و سم‌زدایی فلزات است (Ben-Khedher et al., 2013) و از آنجایی که، این اندام هیستوپاتولوژی بحرانی و تغییرات فراساختاری در مراحل بسیار اولیه از در معرض‌گذاری با مواد سمی را نشان می‌دهد می‌تواند به‌عنوان یک اندام هدف برای سنجش آلودگی فلزات سنگین شناخته شود (Maharajan et al., 2012). هیپاتوپانکراس سخت‌پوستان در ترشح آنزیم‌های گوارشی، جذب و انتقال غذا مهم هستند و همچنین به عنوان یک منبع ذخیره‌سازی مهم برای گلیکوژن، چربی و مواد معدنی شناخته شده‌اند. بنابراین، هر آسیبی به این اندام می‌تواند اثرات نامطلوبی بر این آبزبان داشته باشد (Krishnaja et al., 1987).

در معرض قرارگیری با فلزات تغییراتی در ساختار توبول‌ها و سلول‌های اپیتلیال به وجود خواهد آورد (Ben-Khedher et al., 2013). واکنش شدن گسترده هیپاتوپانکراس در پاسخ به در معرض‌گذاری شیمیایی و باکتریایی گزارش شده است (Vogan et

Anderson, et al., 2001). برای مثال، Anderson و همکاران (۱۹۹۷) اظهار داشتند که سلول‌های R مسئول افزایش واکوئله در پاسخ به در معرض گذاری شیمیایی هستند.

افزایش ضخامت لامینا بازال جنبه‌ی دیگری از تغییرات مشاهده شده در غده‌ی گوارشی *M. messor* در مواجهه با فلز سنگین کادمیوم بود. این ضخامت ممکن است به دلیل فعال شدن دیواره توسط هموسیت یا به دلیل تولید فیبرهای کلاژن و ملانین باشد. همچنین ممکن است نشان دهنده یک واکنش دفاعی در مقابل سمیت فلزات باشد (Ben-Khedher et al., 2013). در حقیقت، اختلال در عملکرد دستگاه گوارش با فرآیندهای جذب در خرچنگ تداخل خواهد داشت. در مراحل نهایی از مسمومیت کادمیوم، اختلالات بیشتر و جدی‌تری مشاهده شده بود. این چرخه نادرست منجر به نکرور سلولی و در نهایت اختلال در عملکرد اندام می‌شود (Liu et al., 2013).

منابع

- Ahmadmoradi, E., Mousavi, S.M., Rezaie, A. 2013. Histopathological study of gill and skin of *carassius auratus* and *ptreophyllum* sp In Abadan and Khorramshahr. Iranian Veterinary Journal. 9(3): 13-26.
- Allayie, S.A., Hemalatha, S., Elanchezhiyan, C., Manoharan, V. 2012. Acute Effect of NH₃ on Mangrove Crab *Neoepisesarma medri* (Crustacea- decapoda). Insight Ecology. 1(1): 1-6.
- Anderson, M.B., Reddy, P., Preslan, J.E., Fingerman, M., Bollinger, J., Jolibois, L., Maheshwarudu, G., George, W.J. 1997. Metal accumulation in crayfish, *Procambarus clarkii*, exposed to a petroleum-contaminated bayou in Louisiana. Ecotoxicology and Environmental Safety. 37: 267-272.
- Beltrame, M.O., De Marco, S.G., Marcovecchio, J.E. 2010. Influences of sex, habitat, and seasonality on heavy-metal concentrations in the burrowing crab (*Neohelice Granulata*) from a coastal lagoon in Argentina. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 58: 746-756.
- Ben-Khedher, S., Jebali, j., Houas, Z., Naweli, H., Jrad, A., Banni, M., Boussetta, H. 2013. Metals bioaccumulation and histopathological biomarkers in *Carcinus maenas* crab from Bizerta lagoon, Tunisia. Environmental Science and Pollution Research. 21: 4343-4357.
- Chourpagar, A.R., Kulkarni, G.K. 2013. Impact of Copper sulphate on Gill structure of a Freshwater Female Crab, *Barytelphusa cunicularis* (Westwood). Journal of Academia and Industrial Research. 2: 167-169.
- Ferrer, L., Andrade, S., Asteasuain, R., Marcovecchio, J. 2006. Acute toxicities of four metals on the early life stages of the crab *Chasmagnathus granulata* from Bahía Blanca estuary, Argentina. Ecotoxicology and Environmental Safety. 65: 209-217.
- Fossi, M.C., Casini, S., Savelli, C., Corbelli, C., Franchi, E., Mattei, N., Sanchez-Hernandez, J.C., Corsi, I., Bamber, S., Depledge, M.H. 2000. Biomarker responses at different levels of biological organisation in crabs (*Carcinus aestuarii*) experimentally exposed to Benzo (a) Pyrene. Chemosphere. 40: 861-874.
- Ghiasi, F., Mirzargar, S., Salar Amoli, J., Bahonar, A., Ebrahimzadeh Mousavi, H. 2007. Study on hematology and serum biochemistry of common carp, *Cyprinus carpio* after low cadmium concentration exposure. Journal of Veterinary Research. 65(1): 61-66.
- Gomiero, A., Pampanin, D.M., Bjørnstad, A., Larsen, B.K., Provan, F., Lyng, E., Andersen, O.K. 2006. An ecotoxicoproteomic approach (SELDI-TOF mass spectrometry) to biomarker discovery in crab exposed to pollutants under laboratory conditions. Aquatic Toxicology. 78: 34-41.
- Hetzer, A., Daughney, C.J., Morgan, H.W. 2006. Cadmium ion Biosorption by the thermophilic bacteria *Geobacillus stearothermophilus* and *G. thermocatenulatus*. Applied Environmental Microbiology. 6: 4020-4027.
- Kavitha, R., Deepa Rani, S., Sivagnanam, S., Padmaja, M. 2013. Cadmium Nanoparticle Induced Histological and Biochemical changes in Hepatopancreas of Mud Crab *Scylla olivacea* (Herbst, 1796). Journal of Academia and Industrial Research. 2: 205-209.
- Krishnaja, A.P., Rege, M.S., Joshi, A.G. 1987. Toxic effects of certain heavy metals (Hg, Cd, Pb, As, and Se) on the intertidal crab *Scylla serrate*. Marine Environmental Research. 21: 109-119.
- Liu, D., Yan, B., Yang, J., Lei, W., Wang, L. 2011. Mitochondrial pathway of apoptosis in the hepatopancreas of the freshwater crab *Sinopotamon yangtsekiense* exposed to cadmium. Aquatic Toxicology. 105: 394-402.

- Liu, D., Yang, J., Wang, L. 2013. Cadmium induces ultrastructural changes in the hepatopancreas of the freshwater crab *Sinopotamon henanense*. The International Research and Review Journal for Microscopy. 47: 24-32.
- Maharajan, A., Rajalakshmi, S., Vijayakumaran, M., Kumarasamy, P. 2012. Sublethal effect of copper toxicity against histopathological changes in the spiny lobster, *Panulirus homarus* (Linnaeus, 1758). Biological Trace Element Research. 145: 201-210.
- Meyer, W., Kretschmer, M., Hoffmann, A., Harisch, G. 1991. Biochemical and Histochemical Observations on Effects of Low-Level Heavy Metal Load (Lead, Cadmium) in Different Organ Systems of the Freshwater Crayfish, *Astacus astacus* L. (Crustacea: Decapoda). Ecotoxicology and Environmental Safety. 21: 137-156.
- Padmanaban, A.M., Mohan, K. 2013. Toxic effects of cadmium chloride on hematological changes in fresh water field crab *Paratelphusa hydrodromous* (decapoda: brachyura). International Journal of Innovative Research in Science. Engineering and Technology. 8: 2319-8753.
- Pan, L., Zhang, H. 2006. Metallothionein, antioxidant enzymes and DNA strand breaks as biomarkers of Cd exposure in a marine crab, *Charybdis japonica*. Comparative Biochemistry and Physiology. 144: 67-75.
- Pereira, R., Pereira, M.L., Ribeiro, R., Gonçalves, F. 2006. Tissues and hair residues and histopathology in wild rats (*Rattus rattus* L.) and Algerian mice (*Mus spretus* Lataste) from an abandoned mine area (Southeast Portugal). Environmental Pollution., 139: 561-575.
- Rainbow, P.S., White, S. L. 1989. Comparative strategies of heavy metal accumulation by crustaceans: zinc, copper and cadmium in a decapod, an amphipod and a barnacle. Hydrobiologia. 174: 245-262.
- Romano, N., Zeng, C. 2007. Ontogenetic changes in tolerance to acute ammonia exposure and associated gill histological alterations during early juvenile development of the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus*. Aquaculture. 266: 246-254.
- Rostami Basham, M., Soltani, M., Sasani, F. 1997. A survey on Copper, Zinc, Mercury, Cadmium histopathological lesions in common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Veterinary Research. 55 (4): 1-3.
- Schlenk, D. 2006. Mechanisms of stereoselective sulfoxidation and toxicity of the organophosphate, fenthion, in three fish species. Marine Environmental Research. 62: 39.
- Schuerack, P.M.M., Lewis, J.W. 2003. The mode of action of acute and chronic concentrations of waterborne Cd in the digestive gland of the acclimated infested freshwater crab (*Potamonautes warreni*). Cell and Tissue Research. 312: 249-263.
- Shaganas, B.B. 2007. Studies on the effect of toxic heavy metal Mercury on the physiology and biochemistry of an estuarine crab *Scylla serrata* (Forsk.) Ph.D. thesis. School of Environmental Studies Cochin University of Science And Technology Kochi. 682 022, Kerala. 187 p.
- Sharifpour, I., Abtahi, B., Heidary Jamebozorgi, F., Seyfabadi, S., Taghizadeh, R. 2011. Experimental assessment of the histopathological effects of water-soluble fraction of crude oil on gill tissue of juvenile *Rutilus frisii kutum*. Iranian Scientific Fisheries Journal. 20(1): 89-100.
- Van Dyk, J.C., Pieterse, G.M., Van Vuren, J.H.J. 2007. Histological changes in the Liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. Ecotoxicology and Environmental Safety. 66: 432-440.
- Van Hatton, B., De Voogt, P., Van Den Bosch, L. 1989. Bioaccumulation of cadmium by the freshwater isopod *Asellus aquaticus* (L.) from aqueous and dietary sources. Environmental Pollution. 62: 129-151.
- Vogan, C.L., Ramos, C.C., Rowley, A.F. 2001. A histological study of shell disease syndrome in the edible crab *Cancer pagurus*. Diseases of Aquatic Organisms. 47: 209-217.
- Wang, J., Wang, Q., Li, J., Shen, Q., Wang, F., Wang, L. 2012. Cadmium induces hydrogen peroxide production and initiates hydrogen peroxide-dependent apoptosis in the gill of freshwater crab, *Sinopotamon henanense*. Comparative Biochemistry and Physiology. 156: 195-201.
- Wang, L., Yan, B., Liu, N., Li, Y., Wang, Q. 2008. Effects of cadmium on glutathione synthesis in hepatopancreas of freshwater crab, *Sinopotamon yangtsekiense*. Chemosphere. 74: 51-56.
- Wu, J.P., Chen, H.C. 2004. Effects of cadmium and zinc on oxygen consumption, ammonium excretion, and osmoregulation of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Chemosphere. 57: 1591-1598.