



بررسی عملکرد ایمنی پریوتیک ایزومالتوالیگوساکارید بر بافت کبد و آبشش ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در مواجهه با غلظت کشنده سم بوتاکلر

سید علی اکبر هدایتی^۱، فاطمه دارابی تبار^{۲*}، محمد فروهر واجارگاه^۳

^۱گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

^۲گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

^۳گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان

چکیده

نوع مقاله:

کوتاه

هدف از این مطالعه بررسی اثرات ایمنی بخش پریوتیک ایزومالتوالیگوساکارید بر آسیب‌های بافتی کبد و آبشش ناشی از غلظت‌های کشنده سم بوتاکلر در ماهی کپور معمولی می‌باشد. در این بررسی ۱۲۰ قطعه ماهی کپور با میانگین وزنی $6/13 \pm 0/31$ نگه‌داری شدند. در طول دوره‌ی آزمایش فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب اندازه‌گیری شد. $LC_{50/96h}$ برای سم بوتاکلر $0/785$ محاسبه گردید که براساس آن چهار غلظت کشنده $1/05$ ppm، $1/1$ ppm، $1/2$ ppm و $1/15$ ppm، هر کدام با سه تکرار برای این بررسی در نظر گرفته شد. بیشترین و وسیع‌ترین عارضه‌های مشاهده شده در بافت آبشش شامل هایپرپلازی تیغه اولیه و ثانویه، نکروز، چسبندگی تیغه‌های ثانویه، تخریب لاملاهای ثانویه و خمیدگی لاملاهای ثانویه بود و در بافت کبد عارضه‌های خونریزی، نکروز، تخریب سلول‌های کبدی مشاهده شد. این مطالعه نشان داد که پریوتیک ایزومالتوالیگوساکارید نمی‌تواند از میزان آسیب‌های بافتی کبد و آبشش در برابر غلظت‌های کشنده سم بوتاکلر بکاهد.

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۴/۱۲/۲۰

اصلاح: ۹۵/۰۶/۳۱

پذیرش: ۹۵/۰۷/۰۹

کلمات کلیدی:

پریوتیک

ذخایر ژنی

سم بوتاکلر

فاکتور ایمنی

مقدمه

استفاده از آفت‌کش‌ها به صورت مداوم و گسترده در اکوسیستم‌های آبی ذخایر ژنی آن‌ها را در معرض تهدید قرار داده و موجب کوچک شدن مبنای ژنی (Shrinking genetic base) و کاهش تنوع زیستی فون و فلور اکوسیستم می‌شود (Rahman *et al.*, 2002). این فرآیندها نهایتاً برای انسان به دلیل وابسته بودن به غذاهای موجود در محیط‌های آبی از جمله ماهی خطر آفرین می‌باشد (Mellanby, 1967). کپور معمولی متعلق به خانواده کپور ماهیان (*Cyprinidae*)، بزرگ‌ترین خانواده در بین ماهیان، می‌باشد و نقش پررنگی در جیره غذایی انسان‌ها در سراسر جهان دارد. اعضای این خانواده را می‌توان بر اساس داشتن دندان حلقی ۱ تا ۳ ردیف و لب‌های نازک تشخیص داد. بیشتر آن‌ها شکارچینی هستند که از بی‌مهرگان تغذیه می‌کنند. اما بعضی از آنها نیز گوشت‌خوار هستند و بعضی دیگر از جلبک‌ها، گیاهان عالی‌تر و مواد آلی تغذیه می‌کنند (Satari *et al.*, 2005). ایزومالتوالیگوساکارید یکی از انواع الیگوساکاریدها است که اخیراً به‌عنوان پریوتیک در آبی‌پروری مطرح شده است.

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

بوتاکلر، Butachlor با فرمولاسیون ماچتی^۱ علفکش انتخابی، سیستمیک از گروه کلراستانیلید (آمید) می باشد. بوتاکلر (ماچتی)، برای مبارزه با علف های هرز یکساله کشیده برگ و بعضی پهن برگها در زراعت برنج، قبل از رویش در مزارع به کار برده می شود. حدود ۴۰٪ از تولیدات آفتکشها در جهان مربوط به علفکشها می باشد که این مواد می توانند از طریق روانابهای کشاورزی وارد اکوسیستمهای آبی شوند. اثر این سم به میزان آبی که در دسترس گیاه است بستگی دارد (Noroozian, 2000). به طور کلی سمیت یک آلاینده از طریق آزمایش سنجش زیستی ارزیابی می گردد که به وسیله آن غلظت لازم جهت ایجاد تلفات نیمی از موجودات مورد آزمایش در یک دوره زمانی مشخص (کوتاه و بلند مدت) معلوم می شود. این آزمایشها شاخه ای از علم اکوتوکسیکولوژی بوده و وظایف آن قضاوت درباره توان بالقوه مواد آلاینده و بررسی تاثیرات زیان بخش این مواد بر اکوسیستمها و موجودات زنده در آن می باشد (Sharif Poor and Soltani, 2004). از آنجا که آبشش اولین مکان بعد از پوست است که ماهیها از آن طریق در معرض مستقیم سموم یا آلایندهها قرار دارند، بنابراین بررسی تغییرات ساختار آبشش شاخص مناسبی برای سموم یا آلایندهها تحت شرایط استرس است (Bais and Lokhande 2012). دلایل مختلفی مبنی بر حساسیت کبد به آلایندههای محیطی وجود دارد از جمله اینکه آلایندهها همراه با آب اغلب از طریق مجاری گوارشی وارد روده شده و پس از جذب توسط سیاهرگهای کبدی وارد کبد می شوند. بنابراین کبد اولین اندامی است که در معرض آلایندههای جذب شده در روده قرار می گیرد (Hedayati et al., 2014). هدف از این مطالعه بررسی اثرات ایمنی بخش پریبیوتیک ایزومالتوالیگوساکارید بر آسیبهای بافتی کبد و آبشش ناشی از غلظتهای کشنده سم بوتاکلر در ماهی کپور معمولی می باشد.

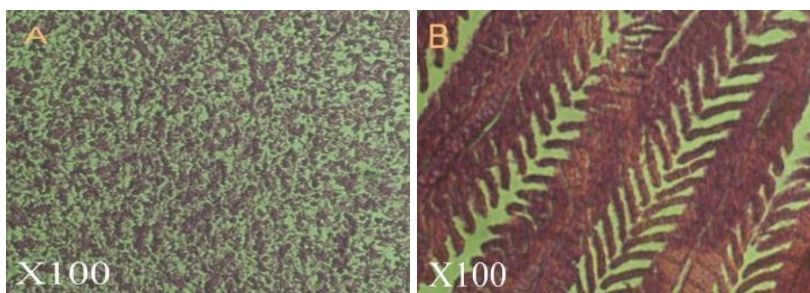
مواد و روشها

در این بررسی ۱۲۰ قطعه ماهی کپور با میانگین وزنی $0.31 \pm 0.13/6$ به مدت دو هفته جهت سازگاری با شرایط محیطی آکواریوم، نگهداری شدند. تعدادی آکواریوم ۱۰۰ لیتری در سالن آبیروزی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان برای انجام طرح در نظر گرفته شد. بعد از ضدعفونی و آماده سازی آکواریومها، آبیگری آنها صورت گرفت. در طول دوره آزمایش فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب اندازه گیری شد که شامل دمای آب 21 ± 1 درجه سانتی گراد، $6.7 - 7.9$ (pH)، غلظت اکسیژن محلول: ۹-۷ میلی گرم در لیتر و سختی آب، ۲۱۰ میلی گرم کربنات کلسیم در لیتر بود. اضافه کردن پریبیوتیک ایزومالتوالیگوساکارید به غذا با روش اسپری کردن به میزان ۱ g/kg صورت گرفت. به این صورت که ابتدا میزان ۲ گرم پودر ژلاتین به آب اضافه شد و پس از حل شدن پودر در آب، مقادیر مورد نیاز پریبیوتیک را که از قبل توزین و آماده شده بود، به محلول آب و پودر ژله اضافه شد. در نهایت پس از حل شدن پریبیوتیک، محلول آماده شده بر غذای تجاری اسپری شد. $LC_{50/96h}$ برای سم بوتاکلر ۷۸۵/۰ محاسبه گردید (آزمایش طبق روش استاندارد و تعیین غلظت کشنده سم بوتاکلر در مدت زمان کوتاه (۹۶ ساعت) به طور ثابت (استاتیک) انجام شد. پس از انجام آزمایش سمیت حاد، میزان مرگ و میر ماهیان در فاصله زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت ثبت و بر اساس آن درصد تغییرات مرگ و میر بجه ماهیان نسبت به تیمار شاهد محاسبه و با استفاده از نرم افزار پروبیت عدد مربوط به هریک از تغییرات استخراج و در ستون جدول مرگ و میر قرار می گیرد. که براساس آن چهار غلظت کشنده ۰.۵ ppm، ۱/۱ ppm، ۱/۲ ppm و ۱/۱۵ ppm، هر کدام با سه تکرار برای این بررسی در نظر گرفته شد. پس از پایان دوره آزمایش از هر گروه (تیمار) به طور تصادفی حداقل سه تا پنج ماهی انتخاب و بعد از بیهوش کردن (با استفاده از محلول گل میخک) از بافت آبشش و کبد نمونه برداری صورت گرفت و سپس نمونه های بافتی در محلول بوئن تثبیت شد. سپس مقاطع بافتی به ضخامت ۶-۵ میکرومتر تهیه و به روش همتوکسیلین - اتوزین رنگ آمیزی گردید و بر روی لام قرار گرفت. هر یک از لام ها با استفاده از میکروسکوپ نوری مدل KF2 با بزرگنمایی های مختلف مورد بررسی هیستوپاتولوژیکی قرار گرفت (Martoja and Martoja-Pierson, 1967).

نتایج

در طول دوره آزمایش در هیچ یک از تیمارهای آزمایشی و گروه کنترل مرگ و میر مشاهده نشد. بررسی‌های بافت‌شناسی ماهیان که در معرض سم بوتاکلر قرار داشتند، نشان‌دهنده بروز ناهنجاری‌های ساختاری در بافت کبد و آبشش بود (شکل ۱، شکل ۲).

بیشترین و وسیع‌ترین عارضه‌های مشاهده شده در تمام تیمارها به جز گروه شاهد شامل هایپرپلازی تیغه اولیه و ثانویه، نکروز، چسبندگی تیغه‌های ثانویه، تخریب تیغه‌های آبششی ثانویه و خمیدگی تیغه آبششی ثانویه بود. عارضه‌های خونریزی و کوتاه شدن تیغه‌های ثانویه نسبت به سایر عارضه‌های مشاهده شده کمتر دیده شدند. آسیب‌های بافت آبشش در همه غلظت‌های ۱/۵، ۱/۱، ۱/۲، ۱/۱۵ ppm مشاهده شدند (شکل ۲).



شکل ۱. بافت کبد و آبشش نمونه شاهد ماهی کپور معمولی با بزرگنمایی ۱۰۰ برابر

A=بافت کبد B=بافت آبشش

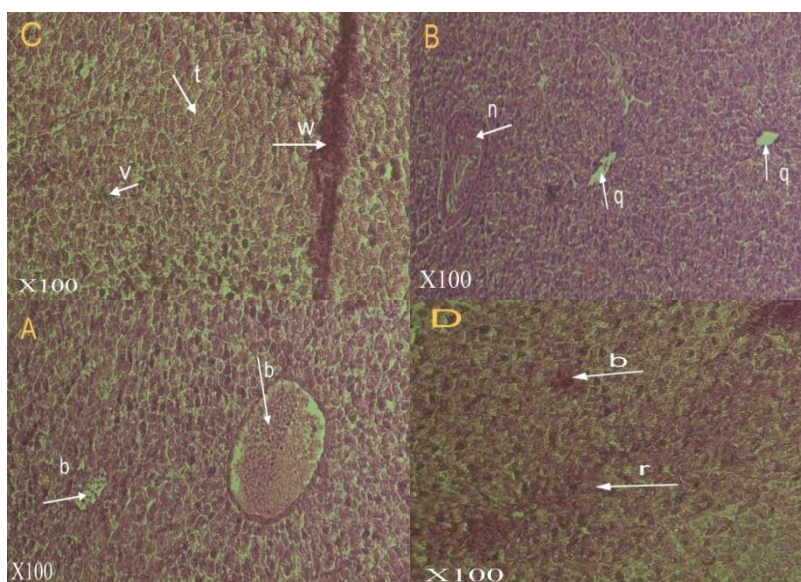


شکل ۲. اثر پریوتیک ایزومالتوالیگوساکارید بر تخریب بافت آبشش ماهی کپور معمولی ناشی از غلظت‌های کشنده بوتاکلر با بزرگنمایی ۱۰۰ برابر
A=غلظت ۱/۵ ppm بوتاکلر ، B=غلظت ۱/۱ ppm بوتاکلر ، C=غلظت ۱/۲ ppm بوتاکلر ، D=غلظت ۱/۱۵ ppm سم بوتاکلر
چسبندگی تیغه آبششی ثانویه (a)، خونریزی (b)، ادم (d)، تخریب تیغه آبششی ثانویه (e)، خمیدگی تیغه ثانویه (h)، هایپرپلازی تیغه آبششی اولیه (j)، نکروز (n)، هایپرپلازی تیغه آبششی ثانویه (g)، کوتاه شدن تیغه آبششی ثانویه (k)

جدول ۱. اثر پریبیوتیک ایزومالتوالیگوساکارید بر تخریب بافت آبشش ناشی از غلظت‌های کشنده سم بوتاکلر

۱/۱۵ ppm	۱/۲ ppm	۱/۱ ppm	۱/۰.۵ ppm	۰ ppm	عارضه‌های آبشش
++++	++++	++++	++++	-	چسبندگی لاملای ثانویه
+++	+++	+++	++	-	خونریزی
+++	++++	++++	++++	-	تخریب لاملای ثانویه
++++	++++	++++	++++	-	خمیدگی تیغه ثانویه
++++	++++	++++	++++	-	هایپرپلازی لاملای ثانویه
++++	++++	++++	++++	-	هایپرپلازی لاملای اولیه
+++	++++	++++	+++	-	نکروز
++	++++	++	++	-	کوتاه شدن تیغه‌های ثانویه

عدم مشاهده عارضه (-)، ۱ تا ۳ عارضه مشاهده شده (+)، ۳ تا ۵ عارضه مشاهده شده (++)، ۵ تا ۱۱ عارضه مشاهده شده (+++).
و بیشتر از ۱۱ (++++).



شکل ۳. اثر پریبیوتیک ایزومالتوالیگوساکارید بر تخریب بافت کبد ماهی کپور معمولی ناشی از غلظت‌های کشنده سم بوتاکلر با بزرگنمایی ۱۰۰ برابر
A= غلظت ۱/۰.۵ ppm سم بوتاکلر، B= غلظت ۱/۱ ppm سم بوتاکلر، C= غلظت ۱/۲ ppm سم بوتاکلر، D= غلظت ۱/۱۵ ppm سم بوتاکلر
خونریزی (b)، نکروز (n)، سینوزوئیدهای کبدی (q)، کاربولیز هسته (t)، رکود صفرا (v)، فضای سینوزوئیدی (w)، تخریب سلول‌های کبدی (از بین رفتن سیتوپلاسم) (r)

جدول ۲. اثر پریبیوتیک ایزومالتوالیگوساکارید بر تخریب بافت کبد ناشی از غلظت‌های کشنده سم بوتاکلر

۱/۱۵ ppm	۱/۲ ppm	۱/۱ ppm	۱/۰.۵ ppm	۰ ppm	عارضه‌های کبد
++++	+++	+++	+++	-	خونریزی
+++	++++	++	+++	-	کاربولیز هسته
+++	+++	++	++	-	رکود صفرا
+++	++++	++	++	-	تخریب سلول‌های کبدی
++++	++++	+++	++	-	نکروز

عدم مشاهده عارضه (-)، ۱ تا ۳ عارضه مشاهده شده (+)، ۳ تا ۵ عارضه مشاهده شده (++)، ۵ تا ۱۱ عارضه مشاهده شده (+++). و بیشتر از ۱۱ (++++).

عارضه‌های مشاهده شده در بافت کبد شامل خونریزی، نکروز، رکود صفرا، کاربولیز هسته و تخریب سلول‌های کبدی بود. که بیشترین تخریب در اثر عارضه‌های خونریزی، نکروز، تخریب سلول‌های کبدی بود. با افزایش غلظت سم بوتاکلر در غلظت ppm ۱/۱۵ عارضه‌های مشاهده شده بیشتر دیده شدند (شکل ۳).

بحث

تغییرات بافت شناسی در نمونه‌های قرار گرفته در معرض سم بوتاکلر مشهود بود در حالیکه هیچ تغییر قابل تشخیصی در ماهیان گروه شاهد مشاهده نشد. بیشترین و وسیع‌ترین عارضه‌های مشاهده شده در بافت آبشش در تمام تیمارها به جز گروه شاهد شامل هایپرپلازی تیغه اولیه و ثانویه، نکروز، چسبندگی تیغه‌های ثانویه، تخریب تیغه‌های آبششی ثانویه و خمیدگی تیغه‌های آبششی ثانویه بود. عارضه‌های خونریزی و کوتاه شدن تیغه‌های ثانویه نسبت به سایر عارضه‌های مشاهده شده کمتر دیده شدند و عارضه‌های مشاهده شده در بافت کبد شامل خونریزی، نکروز، رکود صفرا، کاربولیز هسته و تخریب سلول‌های کبدی بود. با افزایش مدت زمان قرارگیری در برابر غلظت‌های سم بوتاکلر میزان آسیب‌های بافتی نیز مشهودتر بود. به‌طوریکه در غلظت ppm ۱/۱۵ میزان تخریب وسیع‌تر بود. در بافت کبد تعداد عارضه مشخص شده در تیمارهای ۱/۵ و ۱/۱ نسبت به دو تیمار ۱/۲ و ۱/۱۵ کمتر مشاهده شد. Vendemiatti و همکاران در سال (2003)، در مطالعه‌ای روی تیلپای رود نیل (*Oreochromis niloticus*)، اثرات سطوح مختلف (۰، ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۶، ۹ و ۱۲ گرم به ازای کیلوگرم غذا) مانان الیگوساکارید در جیره را بر فاکتورهای رشد و بازماندگی مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از این مطالعه بین افزایش سطح پربیوتیک در جیره و فاکتورهای رشد و بازماندگی تیلپای ارتباط منفی را نشان داد. در مطالعه‌ای که صفوی و همکاران بر روی تأثیر غلظت‌های مختلف سم سایپرمتین بر بافت آبشش سیاه ماهی (*Capoeta damascina*, Valenciennes, 1842) انجام دادند نتایج نشان داد آسیب‌هایی نظیر هایپرپلازی سلول‌های رأسی تیغه‌های آبششی، پوسته پوسته شدن اپیتلیال تیغه‌های آبششی، هایپرپلازی سلول‌های موکوسی در رشته‌های آبششی، فیوژن، کوتاه شدگی تیغه‌های آبششی، تورم رگی با شدت متفاوت در تیمارهای مختلف مورد بررسی مشاهده گردید. نتایج این تحقیق نشان داد که با افزایش غلظت سم و زمان در معرض بودن ماهیان در برابر سم، آسیب‌های بافتی بیشتری بر آبشش ماهیان وارد می‌شود (Safavi et al., 2015). در مطالعه‌ای پورغلام و همکاران به بررسی آسیب شناسی تأثیر غلظت‌های تحت کشنده سم دیازینون بر برخی از اندام‌های کپور علف خوار (*Ctenopharyngodon idella*) پرداختند. نتایج بررسی‌های آسیب شناسی با میکروسکوپ نوری نشان داد که غلظت‌های مختلف سم باعث آسیب‌های جدی به ساختمان سلول‌ها و بافت‌ها شده که به صورت پرخونی، خونریزی، نفوذ سلول‌های آماسی، پیکنوزه شدن سلول‌های هسته‌های سلولی، دژنراسیون واکوتلی و نکروز عمومی در بافت‌های کیله، طحال و کبد مشاهده گردید (Pourgholam et al., 2013). در مطالعه‌ای آسیب‌شناسی بافتی تحت سم دیازینون در بچه ماهی قزل‌الای رنگین کمان انجام شد که مهم‌ترین تغییرات بافتی در بافت کبد شامل پرخونی، رکود صفراوی، نکروزی شدن سلول، دژنراسیون چربی و آتروفی سلول را نشان دادند اما در بافت آبشش پرخونی، هایپرپلازی آبششی و بهم چسبندگی لاملای ثانویه و چماقی شدن لاملا از مهم‌ترین تغییرات هیستوپاتولوژیکی مشاهده شده بود (Saeedi Far, 2012). به نظر می‌رسد بروز این تغییرات در بافت آبشش در مرحله اول به عنوان یک مکانیسم دفاعی برای ممانعت از ورود ماده آلاینده به درون بدن باشد. تغییرات گسترده در اپیتلیوم تیغه‌های ثانویه ممکن است ضخامت اپیتلیوم را افزایش داده و در نهایت منجر به کاهش ورود نرخ آلاینده به گردش خون شود و یا آن را با تاخیر مواجه کند (Roberts, 1989). این مطالعه نشان داد که پربیوتیک ایزومالتوالیگوساکارید نمی‌تواند از میزان آسیب‌های بافتی کبد و آبشش در برابر غلظت‌های کشنده سم بوتاکلر بکاهد. پربیوتیک ایزومالتوالیگوساکارید به‌عنوان فاکتور ایمنی در این مطالعه اثر سودمند و مثبتی در جهت افزایش ایمنی ماهی کپور در برابر غلظت کشنده آلاینده نشان نداد. سم بوتاکلر باعث تغییرات و آسیب‌های شدید بافتی در آبشش و کبد شد. که میزان این آسیب‌ها با افزایش میزان سم در غلظت ۱/۱۵ مشاهده شد. میزان آسیب در بافت آبشش بیشتر از بافت کبد بود که علت آن می‌تواند آسیب‌پذیری بیشتر این بافت در برابر آلاینده‌های محیطی باشد.

منابع

- Bais, U.E., Lokhande, M.V. 2012. Effect of cadmium chloride on histopathological changes in the freshwater fish *Ophiocephalus striatus* (Channa). *International Journal of Zoology Research*. 8(1): 23-32.
- Hedayati, A., Jahanbakhshi, A., Ghaderi Ramazi, F. 2014. *Aquatic Toxicology*. 1st edition. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. 210 p. (in Persian)
- Martoja, R., Martoja-Pierson, M. 1967. *Initiation Aux Techniques de l histology animale*. 1nd edition. Masson et Cie. 345 p.
- Mellanby, K. 1967. *Pesticides and Pollution* (Fontana New Naturalist Series). 1nd edition. Collins Clear type Press. 134 p.
- Noroozian, M. 2000. List of permitted pesticides Plant Protection Organization. 1nd edition. SID Press. 233 p. (in Persian)
- Pourgholam, R., Ghiyasi, M., Rezai, M., Nasrollahzadeh, H., Saiedi, A.A., Safari, R. 2013. Histopathological studies of some organs of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) exposed to sublethal concentrations of diazinon. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*. 23(98): 282-287.
- Rahman, M.Z., Hossain, Z., Mollah, M.F.A., Ahmad, G.U. 2002. Effect of diazinon 60EC on *Anabas testudineus*, *Channa punctatus* and *Barbodes gonionotus* 'Naga'. *The Iclarm Quarterly*. 25(2): 8-12.
- Roberts, R.J. 1989. *Fish pathology*. 2nd edition. Balliere Tindall. 21 p.
- Saeedi Far, M., Roodsari, H.V., Zamini, A., Mirrasooli, E., Kazemi, R. 2012. The effects of diazinon on behavior and some hematological parameters of fry rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Fish and Marine Sciences*. 4(4): 369-375.
- Safavi, F., Poorbagher, H., Javanshir, A., Eagderi, S. 2015. Effect of different concentration of cypermethrin on gill of *Capoeta damascina* (Valenciennes, 1842). *Journal of Aquatic Ecology*. 4(4): 95-88.
- Satari, M., Shahsavani, D., Shafiee, Sh. 2005. *Ichthyology and systematic*. 2nd edition. Haghshenas Press. 502 p. (in Persian)
- Sharif Poor, A.S., Soltani, M. 2004. Determine LC50 and lesions caused by Endosulfan poisoning in children Beluga *Huso huso*. *Iranian Scientific Fisheries Journal*. 12(4):84-69. (in Persian)
- Vendemiatti, J.A., Costa, A.B., Cyrino, J.E.P. 2003. Mananoligossacaride osalimentares (MOS) comoagentes profila'ticos das infeccxões por Edwardsiellatarda emTila'pia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Journal of the World Aquaculture Society*. 39(6): 821-827.