

مطالعه بیومارکرهای هیستوپاتولوژیکی و روند زمانی ظهور آن‌ها در اندام‌های آبشش، غده هاضمه و پا در دوکفه‌ای آب شیرین *Anodonta cygnea* در معرض با غلظت تحت‌کشنده فلز سنگین کروم (Cr)

فاتح معزی M.Sc.^{۱*}، آرش جوانشیر Ph.D.^۲، سهیل ایگدری Ph.D.^۳، هادی پورباقر Ph.D.^۴

۱- دانش‌آموخته کارشناس ارشد، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران.

۲- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران.

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: fmoezi.fateh@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۲/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۲/۱۳

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیکی و روند زمانی وقوع آن‌ها در معرض با فلز سنگین کروم در اندام‌های آبشش، غده هاضمه و پا در دوکفه‌ای آب شیرین *Anodonta cygnea* بود.

مواد و روش‌ها: ۲۴ عدد دوکفه‌ای با دامنه طولی (۱۲/۷ تا ۱۳/۳ سانتی‌متر) از منطقه سمسکنده ساری برداشت گردید. در آزمایشگاه دوکفه‌ای‌ها با غلظت $1^{-1} \mu\text{g}$ ۱۲۵ برای مدت ۱۸ روز در معرض فلز کروم قرار گرفتند. در روزهای ۴، ۹ و ۱۸ از دوکفه‌ای‌ها جهت به‌دست آوردن توده‌های بافتی از اندام‌های مورد مطالعه، نمونه‌برداری شد. برش‌های بافتی از نمونه‌های در معرض فلز و شاهد تهیه گردید و با روش هماتوکسیلین-اتوزین (H&E) رنگ آمیزی شدند.

نتایج: وضعیت هیستولوژیکی در هر سه اندام مورد مطالعه در مقایسه با نمونه‌های شاهد، تغییرات قابل توجهی را نشان داد. در آبشش هیپوپلازی، تغییرات شکلی و اندازه‌های تیغه‌های آبششی، گرانولوما، هیپرپلازی و آتروفی کانال‌های همولنفی مشاهده گردید. در غده هاضمه آتروفی توبول‌های گوارشی، ریزش سلول‌های گوارشی و بازوفیل به درون توبول‌ها و همچنین تجمع هموسیت‌ها و گرانولوما در بافت پیوندی مشاهده گردید. در پا هیپوپلازی اپی‌تلیوم بیرونی، افزایش تعداد سلول‌های موکوسی و تورم و گسستگی بافتی در ساختار دسته‌های میوسیت مشاهده گردید. اولین علائم تغییر در روز چهارم ثبت و با افزایش مدت زمان معرض، ظهور علائم جدیدتر و افزایش گستره تغییرات هیستوپاتولوژیکی در هر سه اندام دیده شد.

نتیجه‌گیری: تغییرات هیستوپاتولوژیکی در اندام‌های دوکفه‌ای *A. cygnea* به عنوان بیومارکرهای هیستوپاتولوژیکی بسیار مناسبی جهت پایش اثرات این فلز در محیط آبی پیشنهاد می‌شود و روند زمانی ظهور تغییرات، دقت این شاخص‌ها را افزایش می‌دهد.

واژگان کلیدی: هیستوپاتولوژی، *Anodonta cygnea*، کروم، اندام‌های داخلی

مقدمه

فلزات سنگین یک اصطلاح عام برای گروهی از عناصر فلزی است که چگالی آن‌ها بیش از 3 gr cm^{-3} است که در غلظت‌های کم دارای اثرات بیولوژیکی تعریف شده بوده و زمانی که در غلظت‌های بالاتر از سطوح فیزیولوژیکی قابل تحمل در سلول‌ها وجود داشته باشند، می‌توانند اثرات سمی اعمال نمایند (۱). این عناصر از آلاینده‌های بسیار مهم محیط‌های آبی هستند که پیامدهای نامطلوبی بر جوامع زنده این زیستگاه‌ها دارند (۲ و ۳). فعالیت‌های انسانی یکی از منشاهای اصلی ورود این آلاینده‌ها به پیکره‌های آبی است (۴).

در دهه‌های اخیر گروه‌های مختلف موجودات زنده به‌طور گسترده جهت بررسی وقوع آلودگی‌های شیمیایی در محیط‌های طبیعی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. دوکفه‌ای‌ها، گروهی از نرم-تنان هستند که مطلوبیت بسیار بالایی جهت استفاده به‌عنوان بیواندیکاتورهای آلودگی در محیط‌های آبی دارند (۵). با توجه به این که این موجودات در تماس مستقیم با بخش‌های آلوده شده زیستگاه‌های آبی (رسوبات و آب) هستند و می‌توانند سطوح بالایی از فلزات سنگین را در بافت‌های نرم خود ذخیره کنند، شواهد مناسبی را در رابطه با وقوع آلودگی‌های محیطی با مقیاس زمانی از طریق بررسی پاسخ‌های سلولی و فیزیولوژیکی فراهم می‌سازند (۶).

در میان طیف گسترده شاخص‌های زیستی مورد استفاده در ارزیابی اثرات آلاینده‌ها، تغییرات هیستوسیتولوژیکی به‌عنوان ابزارهایی مناسب جهت پایش آلودگی پیشنهاد شده‌اند (۷). سلول‌ها نخستین محل‌های برهم‌کنش مواد شیمیایی و سیستم‌های بیولوژیکی هستند (۸). تفاوت‌های موجود در فرایندهای بیوشیمیایی در اندامک‌های مختلف سلول، محل اثر مواد سمی را تعیین می‌کند و تفکیک مکانی انواع سلول‌ها در بافت‌های مختلف مشخص می‌سازد که چه بافتی بیشتر تحت تاثیر یک عامل سمی قرار گرفته یا این که بیشترین پاسخ‌دهی را به آسیب عامل سمیت‌زا داشته است. تعیین پاسخ‌های هیستوسیتولوژیکی نسبتاً آسان بوده و می‌توان آن‌ها را به سلامت و شایستگی افراد در جوامع اکولوژیک نسبت داد (۶). در معرض قرارگیری بلندمدت با فلزات سنگین میزان مستعد بودن نسبت به استرس‌های محیطی را افزایش داده و گسترش ناهنجاری‌های هیستوپاتولوژیک را در موجودات زنده در پی دارد (۹). مطالعات انجام شده در این زمینه بیانگر بروز تغییرات پاتولوژیکی

انحطاطی (degenerative)، تخریبی (destructive) و التهابی (inflammatory) در ارزیابی وضعیت شکلی-عمل‌کردی بافت‌ها و اندام‌های مختلف دوکفه‌ای‌ها در معرض قرارگیری با فلزات سنگین بوده است (۷، ۱۰-۱۳).

در این مطالعه، اثرات هیستوپاتولوژیکی معرض قرارگیری با فلزات سنگین و الگوی زمانی پیدایش آن‌ها در سه اندام آبشش، غده هاضمه و پا در دوکفه‌ای آب شیرین *Anodonta cygnea* مورد بررسی قرار گرفت. این دوکفه‌ای از بی‌مهرگان ساکن در رودخانه‌ها و تالاب‌های شمال کشور است که پراکنش گسترده‌ای در خارج از ایران نیز دارد. از آنجا که در منابع متعدد اثرات اختصاصی هیستوپاتولوژیک برای عناصر سنگین مختلف ذکر نشده است (۷)، همچنین با توجه به این‌که، در میان فلزات سنگین، فلز کروم سطوح آلاینده‌گی بالاتری را در آب‌های شیرین به‌وجود آورده است (۱۴)، لذا در این مطالعه فلز کروم به‌عنوان عامل آلاینده انتخاب گردید.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های دوکفه‌ای و شرایط نگهداری در آزمایشگاه: در آذرماه ۱۳۹۰، ۳۰ نمونه از دوکفه‌ای *A. cygnea* با دامنه‌ی طولی (۱۲/۷ تا ۱۳/۳ سانتی‌متر) از مصب رودخانه تجن، منطقه سمسکنده ساری در استان مازندران (36°48'46" N, 53°6'57" E) برداشت شد. این نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه بیولوژی آبزیان گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، جهت تطابق با شرایط آزمایشگاهی به مدت ۲ هفته در تانک‌های فایبرگلاس نگهداری شدند. شرایط مخازن آزمایشی در طول دوره مطالعه ثابت نگه داشته شد به‌طوری که دامنه‌ی تغییرات دما و pH به‌ترتیب عبارت بود از ۱۵ تا ۱۷ درجه‌سانتی‌گراد و ۶/۸ تا ۷/۴.

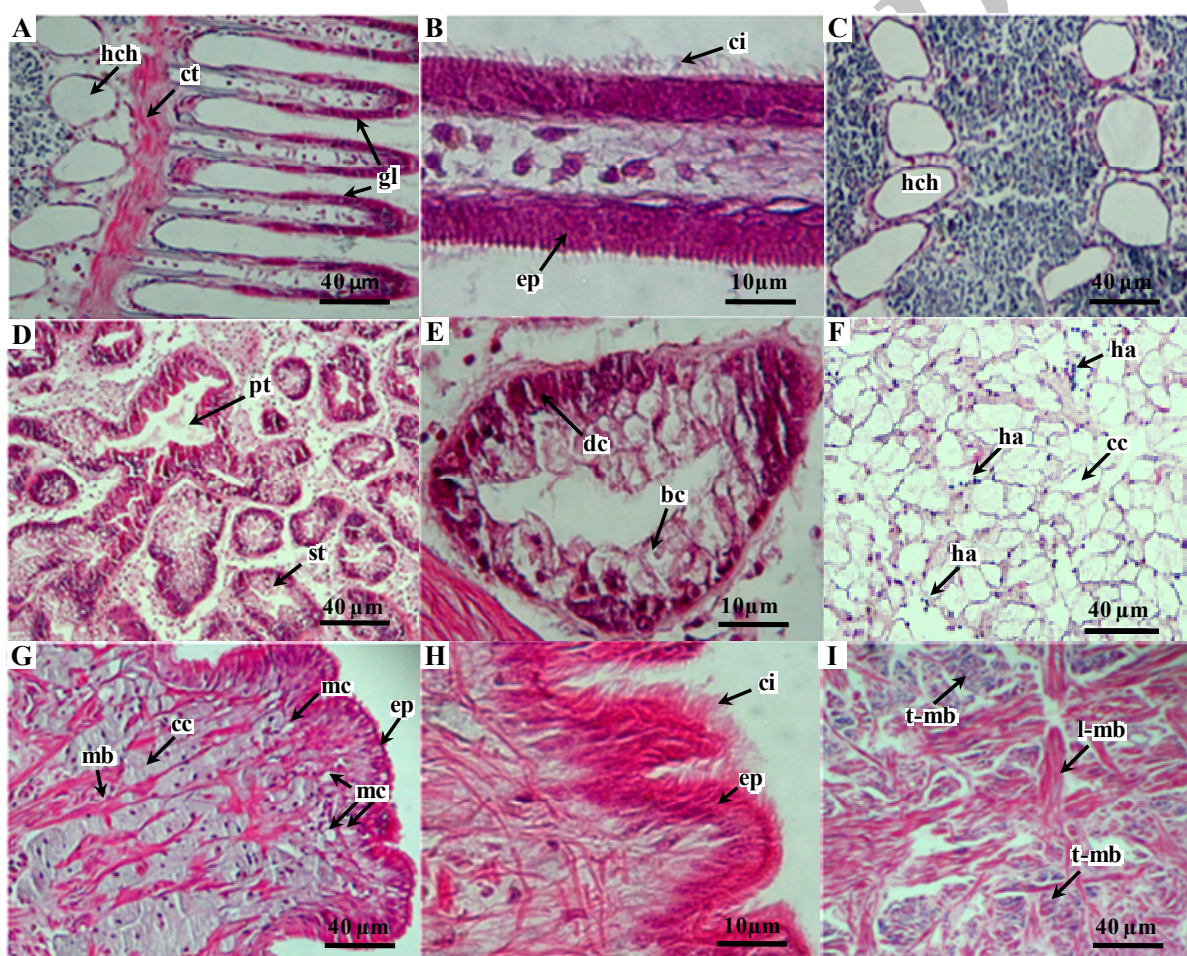
پلان مواجهه با فلز کروم: پس از دوره تطابق، ۲۴ نمونه از دوکفه‌ای‌ها در ۴ تانک تقسیم شدند (سه مخزن آزمایشی و یک مخزن شاهد). با توجه به غلظت‌های طبیعی فلز کروم و غلظت‌های مورد استفاده آن در مطالعات پیشین (۵۱)، در این مطالعه غلظت $521 \mu\text{g l}^{-1}$ جهت معرض قرارگیری استفاده شد. در روزهای ۴، ۹ و ۸۱ پس از معرض قرارگیری دوکفه‌ای‌ها با فلز کروم، از مخازن نمونه‌گیری شد به طوری که در مجموع در هر بار نمونه‌برداری حداقل ۳ نمونه از دوکفه‌ای‌ها جهت استفاده توده‌های بافتی برداشت شد.

نتایج

وضعیت هیستولوژیک اندام‌های مورد مطالعه در نمونه‌های شاهد:

وضعیت هیستولوژیک اندام‌های مورد مطالعه در بافت‌های به‌دست آمده از نمونه‌های شاهد در شکل ۱ نشان داده شده است. در آبخش ساختارهای تیغه‌های آبخشی با اندازه و شکل یکسان با فواصل نسبتاً برابر از هم مشاهده گردید (شکل ۱- A).

بافت‌شناسی: پوسته‌های دوکفه‌ای با استفاده‌ی از یک اسکالپل جهت بریدن عضلات جمع‌کننده قدامی و خلفی، باز شده و از بخش احشایی جدا گردید. سپس توده‌ی بافتی با حجم تقریبی ۰/۵ سانتی‌متر مکعب از اندام‌های آبخش، غده هاضمه و پا بریده شده و به‌منظور فیکس شدن به مدت ۴۸ ساعت در محلول بوئن (پیکریک اسید اشباع: ۷۵ بخش؛ فرمالدهید ۴۰ درصد: ۲۵ بخش؛ استیک اسید گلاسیال: ۵ بخش) و به‌دنبال آن در اتانول ۷۰ درصد نگهداری گردید. مراحل آماده‌سازی و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین نمونه‌های بافتی بر اساس پروتکل Hewitson and Darby (۱۶) انجام شد.



شکل ۱: برش‌های بافتی ۵ تا ۷ میکرونی از نمونه‌های شاهد اندام‌های آبخش (A, B, C)، غده هاضمه (D, E, F) و پا (G, H, I). *hch* کانال همولنف؛ *ct* بافت پیوندی؛ *ag* تیغه آبخشی؛ *ci* مژه؛ *ep* اپی‌تلیوم؛ *pt* توبول گوارشی اولیه؛ *st* توبول ثانویه؛ *dc* سلول گوارشی؛ *bc* سلول بازوفیل؛ *ha* هموسیت؛ *cc* سلول پیوندی؛ *mc* سلول موکوسی؛ *mb* دسته میوسیت؛ *t-mb* مقطع عرضی دسته میوسیت؛ *l-mb* مقطع طولی دسته میوسیت. رنگ‌آمیزی: هماتوکسیلین-ائوزین.

مشاهده گردید به‌طوری که فواصل بینابینی آن‌ها را بافت پیوندی پر کرده بود (شکل ۱- C). در غده‌ی هاضمه، مقاطع عرضی توبول‌های گوارشی اولیه و انشعابات چندگانه‌ی آن به

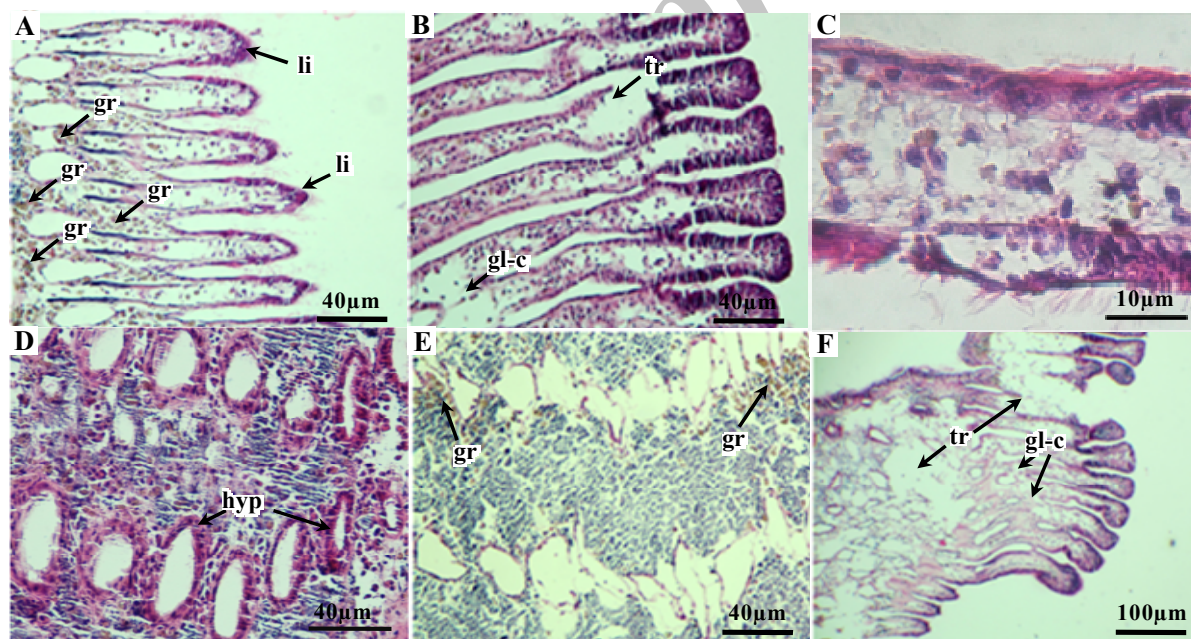
ساختارهای مژه‌ای در اپی‌تلیوم یکپارچه تیغه‌های آبخشی به‌صورت کاملاً واضح دیده شد (شکل ۱- B) و در بخش‌های درونی این اندام، کانال‌های همولنفی در یک الگوی ردیفی

مشاهده شد. پوسته پوسته شدن (*lifting*) و همچنین هیپوپلازی (تخریب ساختارهای مژه‌ای) در اپی‌تلیوم تیغه‌ها رخ داده بود (شکل ۲-A و C) و در نتیجه آن گریزی شکل شدن تیغه‌ها و کاهش فضای بینابینی آن‌ها و همچنین تخریب دیواره تیغه‌ها و اتصال تیغه‌های مجاور در محل‌های تخریب مشاهده گردید (شکل ۲-B، C و F). دیواره کانال‌های همولنفی دچار هیپوپلازی شده و ضخامت آن افزایش یافته بود (شکل ۲-D) و با گذشت زمان تخریب‌های گسسته و آتروفی ساختار کانال دیده شد (شکل ۲-E). گرانولوما (ظهور سلول‌های دارای رنگدانه‌های لیپیدی به رنگ زرد تا قهوه‌ای روشن) در بافت‌های پیوندی بینابین کانال‌ها و همچنین در ناحیه‌ی پایه‌ی تیغه‌های آبششی رخ داده بود (شکل ۲-A و E). گسستگی‌های بافتی شدید در نواحی قشری (محل تیغه‌ها) و درونی (محل کانال‌های همولنفی) دیده شد (شکل ۲-F).

وضوح مشاهده گردید (شکل ۱-D) به طوری که سلول‌های گوارشی و بازوفیل تشکیل‌دهنده ساختار توپول‌ها قابل تشخیص بود (شکل ۱-E). فضای بینابین توپول‌ها نیز متشکل از سلول‌های بافت پیوندی بود که در میان آن‌ها هموسیت‌ها با پراکنش نامنظم و تعداد کم وجود داشتند (شکل ۱-F). بخش عمده‌ی بافت پا از دسته‌های متراکم و یکپارچه‌ی میوسیت تشکیل شده بود به طوری که در جهت‌های مختلف توزیع شده بودند و مقاطع عرضی و طولی آن‌ها در برش‌های بافتی مشاهده گردید (شکل ۱-G و I). اپی‌تلیوم مژه‌دار بیرونی این اندام نیز به‌طور کامل مشخص دیده شد که ساختاری چین خورده را نشان می‌داد (شکل ۱-H). همچنین در بخش‌های زیراپی‌تلیال پا، سلول‌های بافت پیوندی فضای بینابین دسته‌های میوسیت را پر کرده بودند و در قسمت‌های نزدیک به اپی‌تلیوم سلول‌های موکوسی نیز وجود داشتند (شکل ۱-G).

انواع تغییرات هیستوپاتولوژیک مشاهده شده در اندام‌ها:

در آبشش تغییرات قابل توجهی در وضعیت هیستولوژیک تیغه‌ها



شکل ۲. برش‌های بافتی ۵ تا ۷ میکرونی آبشش در نمونه‌های معرض با فلز کروم. A: گرانولوما (*gr*) و پوسته پوسته شدن (*li*) در ناحیه تیغه‌های آبششی؛ B: گریزی شکل شدن تیغه‌های آبششی و گسستگی دیواره تیغه‌ها (*tr*) و اتصال تیغه‌های مجاور (*gl-c*)؛ C: هیپوپلازی و کاهش ضخامت اپی‌تلیوم تیغه‌های آبششی؛ D: هیپوپلازی (*hyp*) و افزایش ضخامت اپی‌تلیوم کانال‌های همولنفی؛ E: وقوع گرانولوما (*gr*) در بافت پیوندی بینابین کانال‌ها و همچنین آتروفی کانال‌های همولنفی؛ F: تغییرات نامنظم در طول و شکل تیغه‌های آبششی و اتصال تیغه‌های مجاور (*gl-c*) و گسستگی بافتی در تیغه‌های آبششی و کانال‌های همولنفی. رنگ‌آمیزی: هماتوکسیلین-ئوزین.

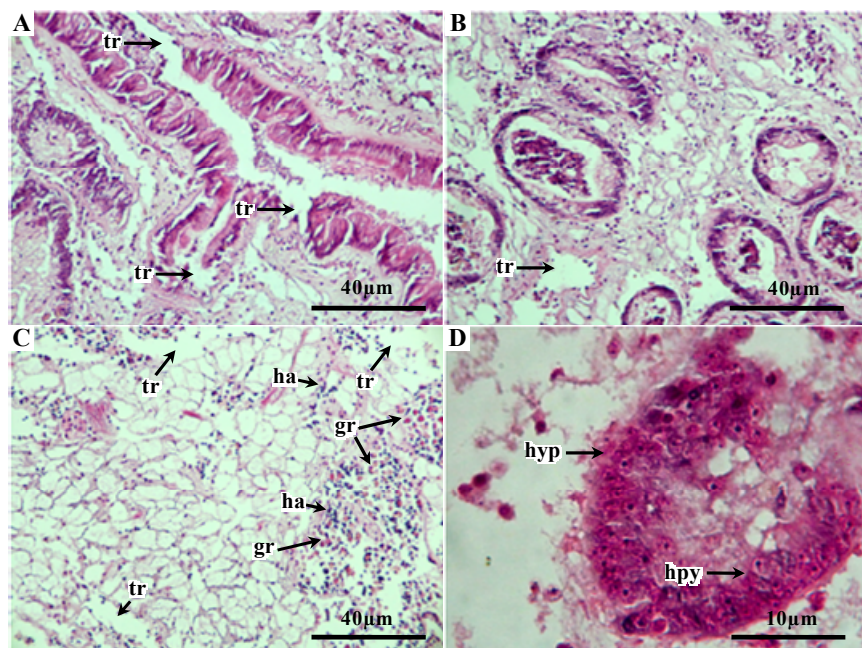
متراکم و تقریباً متمرکز هموسیت‌ها به‌همراه گرانولوما مشاهده شد (شکل ۳-B و C). در انشعابات چندگانه‌ی توپول‌های گوارشی، ریزش سلول‌های بازوفیل و گوارشی به‌درون فضای

آشکارترین تغییر مشاهده شده در غده هاضمه، تخریب و گسستگی دیواره و آتروفی توپول‌های گوارشی بود (شکل ۳-A). در بافت پیوندی فضای بینابین توپول‌ها، گسستگی بافتی و تجمع

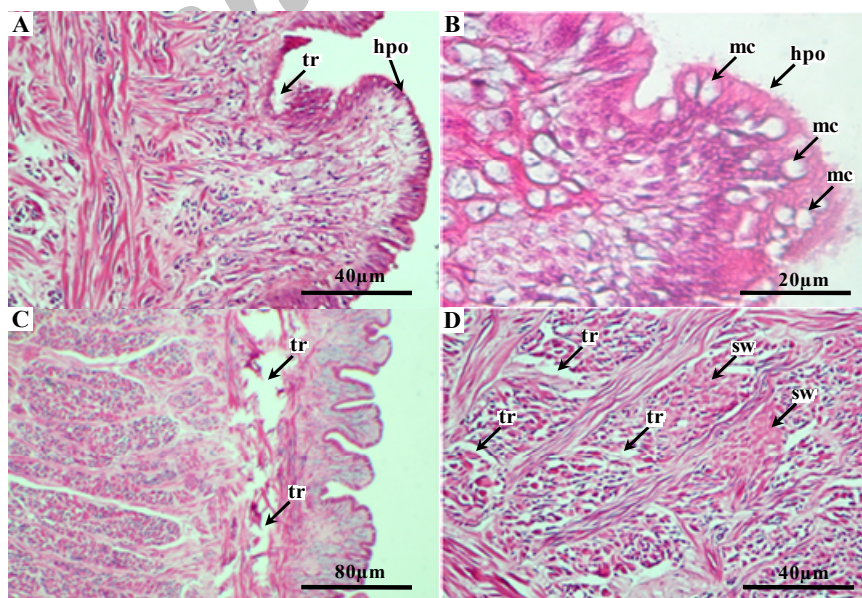
سلول‌های موکوسی در محل‌های اپی‌تلیوم تخریب شده مشاهده گردید (شکل ۴- B). در بخش‌های درونی‌تر گسستگی و اضمحلال دسته‌های میوسیت پراکنده شده در این اندام در مقایسه با وضعیت شاهد دیده شد (شکل ۴- C و D). همچنین تورم ابری میوسیت‌ها نیز رخ داده بود (شکل ۴- D).

توبول‌ها نیز به‌طور گسترده رخ داده بود (شکل ۳- B). هیپرپلازی شدید در دیواره‌ی توبول‌های گوارشی (شکل ۳- D) هم دیده شد.

مشابه آبشش، هیپوپلازی و تخریب اپی‌تلیوم بیرونی در پا نیز اتفاق افتاد (شکل ۴- A و B). در موارد بسیاری افزایش تعداد



شکل ۳: برش‌های بافتی ۵ تا ۷ میکرونی از غده هاضمه در نمونه‌های در معرض با فلز کروم. A و B: آتروفی و تغییر شکل در ساختار دیواره‌ی توبول‌های گوارشی و گسستگی بافتی (tr) در بافت پیوندی بینابین توبول‌ها؛ C: گسستگی بافتی (tr) در بافت پیوندی و تجمع متراکم هموسیت‌ها (ha) و وقوع گرانولوما (gr)؛ D: هیپرپلازی (hyp) سلول‌های گوارشی در دیواره‌ی توبول‌های گوارشی. رنگ‌آمیزی: هماتوکسیلین-ائوزین.



شکل ۴: برش‌های بافتی ۵ تا ۷ میکرونی پا در نمونه‌های در معرض با فلز کروم. A: هیپوپلازی (hpo) و گسستگی (tr) در ساختار اپی‌تلیوم بیرونی؛ B: هیپوپلازی (hpo) و افزایش تعداد سلول‌های موکوسی (mc) در اپی‌تلیوم بیرونی؛ C: گسستگی بافتی (tr) در ساختار بافت عضلانی بخش زیراپی‌تلیال؛ D: تورم (sw) میوسیت‌ها و گسستگی بافتی (tr) در ساختار دسته‌های میوسیت در بخش‌های داخلی پا. رنگ‌آمیزی: هماتوکسیلین-ائوزین.

روند زمانی وقوع تغییرات هیستوپاتولوژیکی:

تأثیر قرار داده بودند. در روز نهم تغییرات شدیدتری مشاهده گردید که بدشکلی‌های ساختاری قابل توجهی را در هر سه اندام منجر شده بود. در روز هجدهم نیز علائم جدیدتری در دو اندام آبشش و پا دیده شد که باز هم پیشرفت گستره تأثیر فلز کروم را نشان داد به طوری که بخش‌های درونی‌تر را درگیر کرده بود.

روند زمانی ظهور انواع تغییرات هیستوپاتولوژیکی مشاهده شده در اندام‌های مورد مطالعه در جدول ۱ آمده است. در روز چهارم، تغییرات هیستوپاتولوژیکی ناشی از مواجهه با فلز کروم در هر سه اندام مشاهده شد به طوری که بخش‌های سطحی اندام‌ها را تحت

جدول ۱: ترتیب زمانی وقوع انواع مختلف تغییرات هیستوپاتولوژیکی در اندام‌های مختلف در طول دوره‌ی مطالعه‌ی ۱۸ روزی.

اندام	زمان		
	روز چهارم	روز نهم	روز هجدهم
آبشش	هیپوپلازی اپی‌تلیوم تیغه‌های آبششی پوسته‌پوسته شدن اپیتلیوم تیغه‌ها	گریزی شکل شدن و تغییر طول تیغه‌ها کاهش فواصل بین تیغه‌ها هیپوپلازی دیواره کانال‌های همولنفی گرانولوما	گسستگی کانال‌ها و آتروفی آنها به هم چسبیدگی تیغه‌های مجاور در نقاط تخریب دیواره تیغه‌ها
غده هاضمه	ریزش سلول‌های گوارشی و بازوفیل به فضای درونی توپول‌ها	آتروفی توپول‌های گوارشی تجمع هموسیت‌ها در بافت پیوندی بینابین توپول‌ها گرانولومای گسترده	تورم و گسستگی در ساختار دسته‌های میوسیت
پا	هیپوپلازی اپی‌تلیوم افزایش تعداد سلول‌های موکوسی در لایه زیراپی‌تلیال	گسستگی بافتی در اپی‌تلیوم و بخش‌های زیراپی‌تلیال	

بحث

مشاهده شد. افزایش سلول‌های موکوسی در پا به احتمال زیاد در پاسخ به تخریب مزه‌های اپی‌تلیوم و نقص فرآیند حرکتی این اندام رخ داده است. افزایش تعداد سلول‌های موکوسی پوششی در اویسترها در معرض با آلاینده‌های شیمیایی گزارش شده است (۲۳). تغییرات عمده‌ی هیستولوژیکی ناشی از حضور آلاینده‌ها در دو کفه‌ای‌ها به صورت فرم نامنظم سلول‌های گوارشی و بازوفیل و واکوئل‌ها ذکر گردیده است (۲۴). تغییر در اندازه میوسیت‌های موجود در گروه‌های میوسیت و همچنین تخریب ساختار گروهی میوسیت‌ها در بلوک‌های عضلانی عضلات جمع‌کننده در ماسل‌ها در نتیجه مواجهه با فلز مس مشاهده شده است (۲۵). در این مطالعه چنین تغییراتی در ساختارهای عضلانی پا مشاهده شد. ناهنجاری‌های شکلی در آبشش و غده‌ی هاضمه نیز که در این مطالعه رخ داده بود، در مطالعات پیشین (۲۰، ۲۵، ۲۶، ۲۷ و ۲۸) گزارش شده است. وقوع گسستگی بافتی در بافت‌های مختلف نیز در نتیجه در معرض قرارگیری با فلزات سنگین گزارش شده است (۲۵).

مطالعات متعدد انجام شده تغییرات هیستوپاتولوژیکی ناشی در معرض قرارگیری با فلزات سنگین را به‌عنوان شاخص‌هایی مناسب جهت پایش اثرات آلودگی این عناصر بر موجودات زنده پیشنهاد کرده‌اند (۳، ۷، ۹، ۱۷). نتایج به‌دست آمده در این تحقیق نشان داد که در معرض قرارگیری با غلظت تحت کشنده‌ی فلز سنگین کروم در مدت ۱۸ روز تغییرات هیستوپاتولوژیکی قابل توجهی را در سه اندام آبشش، غده‌ی هاضمه و پا به دنبال دارد. هر چند این سه اندام عمل‌کرده‌های متفاوتی دارند (آبشش: عمل‌کرد فیلتراسیونی؛ غده هاضمه: عمل‌کرد تغذیه‌ای و پا: عمل‌کرد حرکتی) (۱۸) و مسیرهای معرض قرارگیری با فلز در آن‌ها متفاوت است، اما در روز چهارم پس از معرض قرارگیری با فلز کروم تغییرات بافتی در هر سه اندام مشاهده گردید.

نتایج مطالعات پیشین در موارد زیادی همسو با نتایج به‌دست آمده در این پژوهش است. وقوع گرانولوما ناشی از جذب فلزات سنگین دانسته شده است (۱۹، ۲۰ و ۲۱). همچنین نفوذ و تجمع هموسیت‌ها، به‌عنوان یک پاسخ دفاعی در محل‌های آسیب دیده در بافت‌های مختلف بی‌مهرگان گزارش شده است (۲۲) که در مطالعه‌ی حاضر نیز چنین علائمی در آبشش و غده هاضمه

بررسی الگوی زمانی تغییرات هیستوپاتولوژیکی در اندام‌های مختلف می‌تواند یک روی‌کرد مناسب را جهت تعیین دقیق زمان‌های وقوع آلودگی در محیط‌های آبی ارائه دهد. در این مطالعه در هر سه اندام در روز چهارم علائم تغییر مشاهده شد و

7. Au DWT. The application of histocytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Mar. Pollut. Bull.* 2004; 18: 817-834.
8. Senger H, Braunbeck T. Cellular response profile to chemical stress. In: Schurmann, G., Braunbeck, T. (eds.). *Ecotoxicology*. New York. John Wiley & Sons. 1998; 521-569.
9. Zorita I, Ortiz-Zarragoitia M, Soto M, Cajaraville MP. Biomarkers in mussels from a copper site gradient (Visnes, Norway): An integrated biochemical, histochemical and histological study. *Aquat. Toxicol.* 2006; 78: 109-116.
10. Lowe FM. Alterations in cellular structure of *Mytilus edulis* resulting from exposure to environmental contaminants under field and experimental conditions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1988; 46: 91-100.
11. Cajaraville MP, Marigomez I, Diez G, Angulo E. Comparative effects of the water accommodated fractions (WAF) of tree oils and mussels. 2. Quantitative alterations in the structure of the digestive tubules. *Comp. Biochem. Physiol.* 1992; 102: 113-123.
12. Yevich P.P, Yevich C.A. Use of histopathology in biomonitoring marine invertebrates. In: Kramer, K.J.M. (eds.). *Coastal waters and estuaries*. 2th Ed. New York. CRC Press; 1994; 179-192.
13. Syasina IG, Vaschenko MA, Zhadan PM. Morphological alterations in the digestive diverticula of *Mizuhopecten yessoensis* (Bivalvia: Pectinidae) from polluted areas of Peter the Great Bay, Sea of Japan. *Mar. Environ. Res.* 1997; 44(1): 85-98.
14. WHO/IPCS. Environmental health criteria 221 for Zinc. World Health Organization, International Programme on Chemical Safety, Geneva. 2001; 123.
15. Naimo, TJ. A review of the effects of heavy metals on freshwater mussels. *Ecotox.* 1995; 4(6): 341-362.
16. Hewitson, T.D., Darby, I.A. *Histology protocols*. 1th Ed. New York. Humana Press Inc. 2010.
17. Golovanova, I.L. Effects of heavy metals on the physiological and biochemical status of fishes and aquatic invertebrates. *Aquat. Toxicol.* 2008; 1: 93-101.
18. Gosling, E. *Bivalve molluscs: biology, ecology and culture*. Fishing news books. 1th Ed. New Jersey, Hoboken. Blackwell Science. 2003.
19. Johansson MW, Soderhäll K. Cellular defense and cell adhesion in crustaceans. *Anim. Biol.* 1992; 1: 97-107.

به تدریج با افزایش دوره معرض گذاری، علائم مشاهده شده نشان دهنده افزایش گستره و شدت آسیب‌ها در اندام‌های مورد مطالعه بود. در مطالعات پیشین (۲۴، ۲۶ و ۲۷) دوره‌های زمانی مواجهه با فلزات سنگین و سایر آلاینده‌ها بیش از ۱۰ روز بوده است و تغییرات هیستوپاتولوژیک پس از اتمام دوره مورد بررسی قرار گرفته‌اند، اما در این مطالعه زمان‌های ظهور علائم به‌صورت مشخص در دفعات مختلف در طول دوره مطالعه‌ی ۱۸ روزی پس از معرض قرارگیری تعیین گردید و اولین زمان روز چهارم بود. این الگوی به‌دست آمده می‌تواند در پایش‌های محیطی بسیار مفید باشد.

نتیجه‌گیری

در مجموع با توجه به نتایج به‌دست آمده در این مطالعه احتمالاً می‌توان تغییرات هیستوپاتولوژیکی در سه اندام آبشش، غده هاضمه و پا در دوکفه‌ای آب شیرین *Anodonta cygnea* را به‌عنوان بیومارکرهایی در رابطه با در معرض قرارگیری با فلز سنگین کروم به‌عنوان نمونه‌ای از آلاینده‌های فلزی سنگین مورد استفاده قرار داد. همچنین روند زمانی مشاهده شده در ظهور این بیومارکرهای هیستوپاتولوژیک، سودمندی آن‌ها را جهت تعیین دقیق‌تر اثرات آلودگی دوچندان می‌سازد.

منابع

1. Banfalvi, G. *Cellular effects of heavy metals*. 1th Ed. London, U.K. Springer. 2011.
2. Forstner, U, Wittman, G.T. *Marine pollution in the aquatic environment*. 2th Ed. Berlin. Springer; 1983.
3. Rainbow PS. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environ. Pollut.* 2002; 120(3): 497-507.
4. Buhl KJ, Hamilton SJ. Comparative toxicity of inorganic contaminants related by placer mining to early life stages of salmonids. *Ecotox. Environ. Safe.* 1990; 20(3): 325-342.
5. Livingstone DR, Chipman JK, Lowe DM, Minier C, et al. Development of biomarkers to detect the effects of organic pollution on aquatic invertebrates: recent immunological studies on the common mussel (*Mytilus edulis* L.) and other mytilids. *Int. j. Environ. Pollut.* 2000; 13: 1-6.
6. Van Duren LA, Herman PMJ, Sandee AJJ, Heip CHR. Effects of muscle filtering activity on boundary layer structure. *J. Sea Res.* 2006; 55: 3-14.

20. Usheva LN, Vaschenko VB, Durkina VB. Histopathology of digestive gland of bivalve mollusc *Crenomytilus gaganus* (Dunker, 1853) from southwestern Peter the Great Bay, Sea of Japan. Russ. j. mar. boil. 2006; 32(3): 166-172.
21. Chakraborty S, Ray M, Ray S. Arsenic toxicity: A heart-breaking saga of a freshwater mollusc. Tissue Cell. 2012; 44(3): 151-155.
22. Oliver, LM, Fisher WS. Appraisal of prospective bivalve immunomarkers. Biomarkers. 1999; 4(6): 510-530.
23. Watterman B, Thomsen A, Kolodzy H, Daehne B, et al. Histopathological lesions of molluscs in the harbor of Norderney, Lower Saxony, North Sea (Germany). Helgol. Mar. Res. 2008; 62: 167-175.
24. Tripp M.R, Fries C.R. histopathology and histochemistry. In: Giam, C.S., Ray, L.E. (eds.). Pollutant studies in marine animals. 3th Ed. Boca Raton. CRC Press Inc; 1987; 337-324.
25. Al-Subiai Sh N, Moody AJ, Mustafa SA, Jha AN. A multiple biomarker approach to investigate the effects of copper on the marine bivalve mollusc, *Mytilus edulis*. Ecotox. Environ. Safe. 2011; 74: 1913-1920.
26. Chakraborty S, Ray M, Ray S. Toxicity of sodium arsenite in the gill of an economically important mollusc of India. Fish. Shellfish. Immune. 2010; 29(1): 136-146.
27. Sheir SK, Handy RD. Tissue injury and cellular immune responses to cadmium chloride exposure in the common mussel *Mytilus edulis*: modulation by lipopolysaccharide. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2010; 59: 602-813.
28. Sheir SK, Handy RD, Galloway TS. Tissue injury and cellular immune responses to mercuric chloride exposure in the common mussel *Mytilus edulis*: modulation by lipopolysaccharide. Ecotox. Environ. Safe. 2010; 73: 1338-1344.

Study of Histopathological Biomarkers and Their Incidence Time Pattern in Gill, Digestive Gland and Foot in Freshwater Bivalve, *Anodonta cygnea*, in Exposure to Sublethal Concentration of Chromium (Cr)

Moëzzi F. M.Sc.^{1*}, Javanshir A. Ph.D.², Eagderi S. Ph.D.², Poorbagher H. Ph.D.²

1. M.Sc. Graduated Student, Department of Fisheries, Faculty of Natural resources, University of Tehran

2. Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran

* Email corresponding author: fmoezi.fateh@gmail.com

Received: 3 Mar. 2013

Accepted: 14 May. 2013

Abstract

Aim: The aim of this study was to investigate histopathological alterations and their incidence time pattern due to chromium (Cr) exposure during 18 days in gill, digestive gland and foot in freshwater bivalve, *Anodonta cygnea*.

Material and Methods: 24 bivalve specimens with length range of 12.7-13.3 cm were collected from Semeskandeh region, Sari. They were exposed to 125 $\mu\text{g l}^{-1}$ of Cr for 18 days. Bivalves were sampled in days 4, 9 and 18 for obtaining tissue samples of studied organs. Tissue sections of exposed and control group samples were prepared and staining was done using haematoxylin and eosin (H&E) method.

Results: Histology of all of three studied organs of exposed bivalves in comparison with control group showed significant histopathological changes. Hypoplasia and changes in shape and size of gill lamellae, granuloma, hyperplasia and atrophy of haemolymph channels were observed. In digestive gland, atrophy of digestive tubules, loss of digestive and basophilic cells from tubules, and haemocyte aggregation and granuloma in connective tissue were occurred. Hypoplasia of external epithelium, increase of mucus cells, and swelling and tissue rupture in myocyte blocks were observed in foot. Primary signs of histopathological alteration were appeared in fourth day, and in following days appearance of new signs and expansion of affected area was detected in all of investigated organs.

Conclusion: Based on our results, histological changes due to Cr exposure in studied organs in *A. cygnea* are proposed as appropriate histopathological biomarkers to monitoring Cr levels in aquatic environments and their incidence time pattern can increase fidelity of these indices.

Keywords: Histopathology, *Anodonta cygnea*, Chromium, Internal organs