Archive of SID

روشهای چند متغیره برای آنالیز داده های حضور و عدم حضور در مطالعات بافت شناختی ماهیان

پورباقر، ه. *[۱]؛ پیربیگی، ع.[۱]؛ ایگدری س.[۱]

[۱] گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
Email: poorbagher@ut.ac.ir

بیشتر روشهای مورد استفاده در بافت شناسی ماهیان مبتنی بر توصیف علائم مشاهده شده است. در مطالعه حاضر به معرفی روشهایی برای آنالیز و مقایسه کمی علائم بافت شناختی میپردازد. برای این منظور سیاه ماهی (*Capoeta buhsei*) از رودخانه کردان کرج صید شده، در معرض دیازینون در دوزهای ۰ تا ۱/۵ در مدت ۱ تا ۹ روز قرار داده شد. پس از پایان زمان آزمایش نمونه ها بیهوش شده و از کبد آنها نمونه برداری گردید. با استفاده از روشهای متداول بافت شناسی، از کبد مقطع تهیه گردید. تغییرات بافتی به صورت حضور و عدم حضور (۰ و ۱) ثبت گردید. داده ها با روشهای آنالیز افزونگی مبتنی بر فاصله، آنالیز واریانس چند متغیره ناپارمتریک و مقیاس‌بندی چندبُعدی غیرمتریک مورد بررسی قرار گرفت. چون داده ها به صورت ۰ و ۱ بودند از اندیکس شباهت ژاکارد استفاده شد. تمامی آنالیزها اثر سم و زمان قرار گیری در معرض آن را عواملی تاثیر گذار بر بافت کبد تشخیص دادند اما آنالیز واریانس چند متغیره ناپارامتری با سهولت بیشتری همراه بود. استفاده از داده های حضور و عدم حضور و بکارگیری روشهای آماری در بررسی علائم پاتولوژیک در بافتهای ماهی توصیه میشود.

کلمات کلیدی: دیازینون، سیاه ماهی، کبد، آنالیز چند متغیره.

مقدمه:

امروزه یکی از مسائل زیست محیطی جدی در سراسر دنیا مشکل آلودگی میباشد. آلودگیهای زیست محیطی به طرق مختلف به اکوسیستم های آبی راه میابند .*(Bagheri et al., 2000; Talebi, 1998)* از آلوده کننده های مهم حشره کشهای کشاورزی میباشند که به طور رو به تزایدی از آنها استفاده میشود. نشان داده شده است که از مقدار حشره کشهای مورد استفاده، مقداری ناچیز یعنی در حدود ۰/۱ درصد به موجودات هدف رسیده، بقیه در اکوسیستم رها شده و ممکن است به مدت طولانی در اکوسیستم رها شده یا به موجودات دیگر میرسند .*(Pimentel, 1995)* برای کاستن اثرات آفت کشها فرمولاسیون آنها تغییر داده شده است به عنوان مثال سموم ارگانوفسفره به جای سموم ارگانوکلره جایگزین گردیده اند *(Khoshbavar-Rostami et al., 2006)*. سموم ارگانوکلره دارای دوام بیشتری در اکوسیستم بوده و از اینرو مخربتر در نظر گرفته میشوند. یکی از سموم ارگانوفسفره که به میزان وسیعی در کشاورزی مورد استفاده قرار میگیرد دیازینون میباشد. این سم به علت دارا بودن نیمه عمرکوتاه، سمی دوستدار محیط زیست در نظر گرفته شده است. این سم در ایران نیز برای آفات گیاهی، سبزیجات و مزارع برنج مورد استفاده قرار میگیرد. هرچند دیازینون سمی با دوام کوتاه میباشد اما در شرایط خاص نظیر پایین بودن درجه حرارت و فقدان تجزیه باکتریایی میتواند تا چندین ماه در محیط باقی بماند .*(Köprücü et al., 2006)* از این گذشته، تحقیقات نشان میدهد که وقتی دیاینون با سموم دیگر در محیط وجود داشته باشد میزان آسیب وارد شده به موجودات شدت پیدا میکند *(Haines et al., 2001)*.

ماهی از جمله موجوداتی است که در ارزیابی های زیستی برای بررسی اثرات آفت کش ها مورد استفاده قرار گرفته است. انواعی از سطوح بررسی در ماهیان مورد استفاده قرار گرفته است، به عنوان مثال تغییرات آنزیمی، تغییرات در سیستم ایمنی، تغییرات

www.SID.ir

Archive of SID

در مولکول *DNA* و تغییرات بافت شناختی شامل آبشش، کبد و خون (*Said and Agroudy, 2006; Štrbac et al., 2014*). در این میان مطالعات بافت شناسی حجم وسیعی از مطالعات را به خود اختصاص داده است (*Boran et al., 2010; Cengiz, 2006; Dutta and Meijer, 2003; Rudnicki et al., 2009*). بسیاری از مطالعات بافت شناسی روشی توصیفی را برای ارزیابی اثرات سموم بر بافت مورد استفاده قرار داده اند. به عنوان مثال تغییرات بافت را باعلامت + نشان داده یا رتبه ای عددی (مثلا ۱ تا ۴) داده شده است و با وخامت وضعیت بافت بر تعداد این علائم افزوده اند (مثلا +++) یا مقدار رتبه ای بالاتر برای آن قرار داده شده است. این روش توصیفی بوده و بسیار متاثر از نظر فرد میباشد. البته میتوان در مطالعات بافت شناسی مواردی را یافت که در جهت کمی کردن روش کار اقدام شده است مثلا تعداد ضایعه ها برروی لام با استفاده از شبکه وصل شده بر روی چشمی میکروسکوپ مورد شمارش قرار گرفته است (*Fanta et al., 2003*). در مطالعات بافت شناسی تشخیص تغییر بافت به صورت حضور و عدم حضور کاملا میسر است. این داده دوتایی به عنوان متغیر وابسته را میتوان با استفاده از رگرسیون لجستیک بررسی نمود اما در مطالعات بافت شناسی تنها یک عارضه بروز نمیکند و به طور همزمان بر روی لازم چندین عارضه را میتوان مشاهده کرد. از اینرو به روشی نیاز است که چند متغیر را به طور همزمان مورد بررسی قرار دهد. چندین روش چند متغیره وجود دارند که میتوان داده هایی که به صورت حضور و عدم حضور هستند (۰ و ۱) را مورد بررسی قرار داد نظیر *PCA*، *CCA*، آنالیز افزونگی مبتنی بر فاصله (*db-RDA*)، آنالیز واریانس چند متغیره ناپارامتری. بسیاری از آزمونهای آماری چند متغیره مقدار احتمال ارائه نمیدهند و در انتها یک نمودار ارائه میشود که در اینجا هم تفسیر فرد بر نتیجه گیری از آن تاثیر گذار است. از اینرو در مقاله حاضر هدف بر این است تا با چند روش تاثیر سم دیازینون بر بافت کبد در سیاه ماهی (*Capoeta buhsei*) مورد بررسی قرار گیرد. نتایج این مقاله می‌تواند روش‌هایی کمی را برای مطالعات بافت‌شناسی پیشنهاد دهد.

مواد و روش‌ها:

تعداد هشتاد ماهی (*Capoeta buhsei*) با وزن متوسط ۱۷۶ میلیمتر (انحراف معیار ۲/۷) از رودخانه کردان کرج با استفاده از الکتروشوکر صید گردیدند. نمونه ها به آزمایشگاه شیلات دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران منتقل گردیدند. به مدت دو نمونه ها در محیط آزمایشگاه با فتوپرید ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شده و با غذای تجاری (اصفهان مکمل) روزی دوبار تغذیه گردیدند. دیازینون (سیگنتا با درجه خلوص ۶۰٪) با دوزهای ۰ (کنترل)، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی گرم در لیتر تهیه شد و نمونه ها به مدت ۱، ۵ و ۹ روز در معرض آنها قرارگرفتند.

دوز سم با توجه به گزارش های قبلی در محیط تعیین شدند. در روزهای ۱، ۳ و ۵ بعد از شروع آزمایش نمونه ها با پودر گل میخک بیهوش گردیده و کبد آنها جدا شده در فرمالین قرار داده شد. در این پژوهش با توجه به نوع رنگ آمیزی از محلول بوئن (اجزاء تشکیل دهنده محلول بوئن شامل: ۷۰ درصد اسید پیکریک اشباع شده، ۲۵ درصد فرمالین تجاری (فرمالدهید ۳۷ درصد) و ۵ درصد اسید استیک) به جهت تثبیت بافت ها استفاده شد.

برای تهیه بافت از روش پارافینه کردن استفاده شد که شامل مراحل آبگیری، شفاف سازی، الکل گیری، پارافینه کردن، قالب گیری، برش بافت با دستگاه میکروتوم، رنگ آمیزی و چسباندن برش های تهیه شده بر روی لام بود. بافتها پس از تهیه با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی گردید و حضور یا عدم حضور تغییرات پاتولوژیک در آنها مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز داده ها:

داده ها که به صورت ۰ یا ۱ بودند با فرمت طولی در اکسل وارد شدند. برای متغیرهای مستقل دوزسم و زمان دو ستون اختصاص داده شدند. برای هر علامت پاتولوژیک بافتی یک ستون اختصاص داده شد. برخی از نمونه ها هیچ آسیب بافتی را از خود نشان

www.SID.ir

Archive of SID

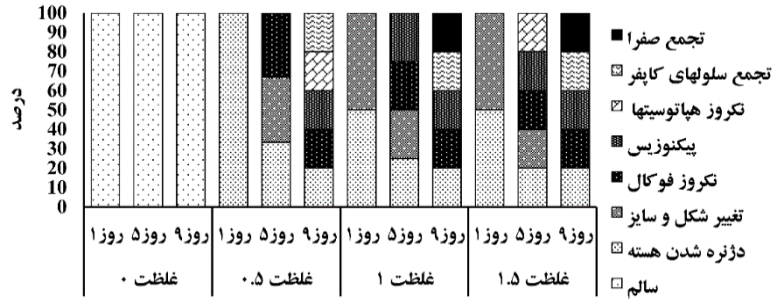
ندادند (تیمار کنترل)، از اینرو ستونی به عنوان نمونه های سالم در نظر گرفته شد زیرا در آنالیزهای چند متغیره ردیفی از داده ها که تماما دارای مقدار صفر باشد قابل آنالیز نیست.

داده ها وارد *R 2.3.5* گردیدند. داده ها با روشهای آنالیز افزونگی مبتنی بر فاصله ، آنالیز واریانس چند متغیره ناپارمتریک و مقیاس‌بندی چندبُعدی غیرمتریک مورد بررسی قرار گرفت. چون داده ها به صورت ۰ و ۱ بودند از اندیکس شباهت ژاکارد استفاده شد. برای انجام آنالیز افزونگی مبتنی بر فاصله از تابع *capscale* در بسته *vegan* استفاده گردید. پس از آنالیز افزونگی، اثر غلظت شم و زمان با استفاده از نمره های بدست آمده برای هر نمونه از ماهی با آنالیز واریانس یک طرفه که برای هر محور جداگانه انجام شد، بررسی گردید.

آنالیز واریانس چند متغیره ناپارامتری با استفاده از تابع *Adonis* در بسته *vegan* با ۹۹ جایگشت انجام پذیرفت. برای مقیاس‌بندی چندبُعدی غیرمتریک ابتدا ماتریس فاصله ژاکارد با استفاده از تابع *dist* در بسته *proxy* بدست آمد، سپس ماتریس بدست آمده با تابع *isoMDS* در بسته *MASS* آنالیز شد. با استفاده از آنالیز با *ANOVA* یک طرفه اثر غلظت و سم بر این نقاط بدست آمده از مقیاس‌بندی چندبُعدی غیرمتریک بررسی شدند.

نتایج:

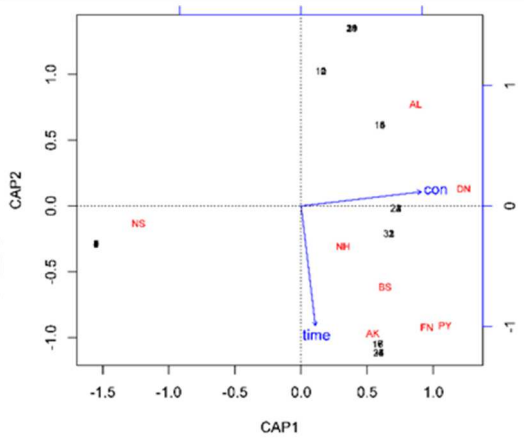
اثر غلظت دیازینون و زمان قرار گیری نمونه ها در معرض سم در شکل ۱ نشان داده شده است. نمونه های کنترل هیچ علامت پاتولوژیکی در کبد از خود نشان ندادند. در تمامی تیمارهای قرار گرفته در معرض سم دژنره شدن هسته را نشان دادند. از روز ۱ به بعد تغییر شکل و سایز هپاتوسیتها مشاهده گردید. نکروز فوکال و پیکنوسیس از روز ۵ به بعد در تیمارهای قرار گرفته در معرض سم مشاهده شد. تجمع سلولهای کاپفر و تجمع صفر در روز ۹ مشاهده گردید. شایعترین علامت پاتولوژیک دژنره شدن هسته و نادرترین علامت تجمع صفرا بودند.



شکل ۱. تغییرات درصد علائم مشاهده شده در نمونه های سیاه ماهی تحت تاثیر غلظت و زمان قرار گیری در معرض دیازینون.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- نمودار *RDA* که در آن رابطه بین غلظت دیازینون *(con)* و زمان *(time)* در معرض قرارگیر ی با علائم پاتولوژیکی در کبد سیاه ماهی نمایش داده شده است *(NS:* سالم، *DN:* دژنره شدن هسته، *AL:* تغییر در سایز و شکل هپاتوسیتها، *FN:* نکروزفوکال، *PY:* پیکنوسیس، *NA:* نکروز هپاتوسیتها، *AK:* تجمع سلولهای کاپفر، *BS:* تجمع صفرا.

نتایج حاصل از آنالیز افزونگی (شکل ۲) نشان داد که دو محور اول بیش از ۸۵ درصد از واریانس را توصیف نمودند (مقدار ویژه محور اول = ۵/۷۱۱، محور دوم = ۲/۸۳۰). غلظت سم و زمان نمونه برداری به طور مستقل از یکدیگر بر بافت کبد تاثیر گذاردند. غلظت سم بیشترین تاثیر را بر دژنره شدن هسته و زمان بر تجمع سلولهای کاپفر داشت. آنالیز واریانس بر روی نمره های بدست آمده از هر ماهی برای محور اول و دوم اثر معنی دار سم و زمان را نشان داد و برخلاف شکل ۲، وجود اثرات متقابل بین غلظت سم و زمان را نشان داد (برای محور اول: $F6,24 = 2.61 \times 1024$، برای محور دوم: $F6,24 = 1.36 \times 1030$).
آنالیز واریانس چند متغیره ناپارامتری وجود اثرات معنی دار غلظت سم و زمان قرارگیری در معرض سم را نشان داد (جدول ۱). همچنین وجود اثرات متقابل بین غلظت و زمان محرز بود.

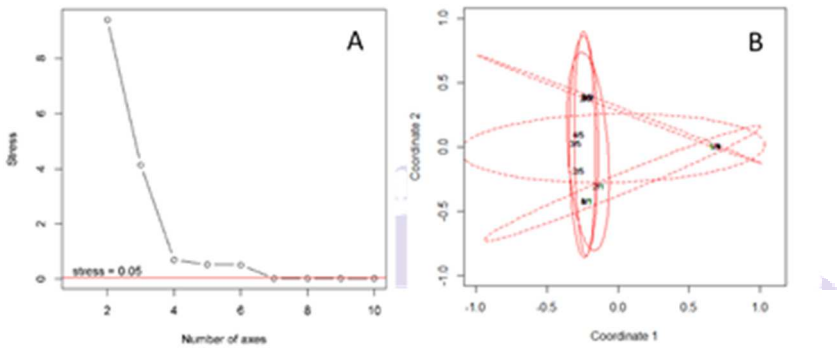
جدول ۱- جدول تجزیه واریانس چند متغیره ناپارمتری برای بررسی اثر سم و زمان قرار گیری در معرض دیازینون.

	df	*SS*	*MS*	*Pseudo F*	R^2	*Pr(>F)*
غلظت	۱	۳/۵۳۰۷	۳/۵۳۰۷	۲۹/۱۹۲۴	۰/۳۵۳۰۰	۰/۰۱
زمان	۱	۲/۰۱۱۷	۲/۰۱۱۷	۱۶/۶۳۲۷	۰/۲۰۱۱۳	۰/۰۱
غلظت	۱	۰/۵۸۹۳	۰/۵۸۹۳	۴/۸۷۲۷	۰/۰۵۸۹۲	۰/۰۱
باقیمانده	۳۲	۳/۸۷۰۳	۰/۱۲۰۹	۰/۳۸۶۹۵		
مجموع	۳۵	۱۰/۰۰۲۰	۱/۰۰۰۰۰			

برای انجام مقیاس بندی چند بعدی نامتریک ابتدا ماتریس فاصله ژاکارد محاسبه گردید. اما برخی فاصله ها بین دو نمونه ماهی صفر بود و انجام آزمون امکان پذیر نبود. برای حل این مشکل عددی بسیارکوچک (۱۰-۷) به تمامی اعداد ماتریس شباهت ژاکارد اضافه شد. از آنجاکه استرس کمتر از ۰/۰۵ به عنوان برازش خوب در نظر گرفته میشود، انجام مکرر آنالیز و تعیین مقدار استرس مشخص نمود که نگه داشتن شش محور برای دست یافتن به این استرس لازم است (شکل ۳).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳- (*A*) تغییرات استرس در مقیاس بندی چند بعدی نامتری با تغییرات تعداد محورها. استرس کمتر از ۰/۰۵ به عنوان برازش خوب در نظر گرفته میشود. (*B*) تغییرات نمرات بدست آمده برای دو محور اول (خط ممتد: اثر غلظت سم، خط شکسته: اثر زمان قرار گیری در معرض سم).

آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که غلظت سم و زمان قرار گیری در معرض آن و اثر متقابل بین غلظت سم و زمان قرار گرفتن در معرض دیازینون در تمامی شش محور بدست آمده تاثیر معنی داری داشتند.

بحث:

دیازینون از سمومی است که در کشور ما در مزارع و باغات و همچنین در کشت برنج برای مبارزه با آفات به کرات مورد استفاده قرار میگیرد. با توجه به نیمه عمر کوتاه خود، نسبت به سایر سموم ماده ای کم خطرتر برای محیط زیست در نظر گرفته شده است (*Giddings et al., 1996*). مطالعه حاضر اثرات این ماده شیمیایی را در شرایط آزمایش بر یکی از فراوانترین ماهیان آبهای داخلی ایران مورد مطالعه قرار داده است.

مطالعه حاضر نشان داد که دیازینون تاثیر زیادی بر بافت کبد در *C. bushei* میگذارد که در مطالعات قبلی نیز به آن اشاره شده بود (*Fanta et al., 2003; Hadi and Alwan, 2012; Koca et al., 2008*). برخی از علائم مشاهده شده نظیر واکول سازی در کبد حاکی از بوجود آمدن اختلالات متابولیک میباشد و احتمالا کبد به بازسازی سلولهای خویش نبوده است (*Pacheco and Santos, 2002*). علائمی دیگر نظیر ماندن صفرا هم در شرایطی اتفاق می افتد که محصولات حاصل از متابولیسم تحت تاثیر شرایطی استرس زا قرار گرفته باشند.

از علائم مشاهده شده پیکنوسیس بود که آن نیز در شرایط استرس زا در ماهی بوجود می آید. وسعت تغییر بوجود آمده در کبد ماهی مورد مطالعه در مقایسه با ماهیان سالم نشان داد که دوز کم از این ماده نیز میتواند در کوتاه مدت اثرات مخرب در ماهی ایجاد نماید که به عنوان اندیکاتور به کار رود.

در بسیاری از مطالعات بافت شناسی روشی توصیفی برای تحلیل علائم بافت شناسی مورد استفاده قرار گرفته است اما مطالعه حاضر به ارائه چند روش برای کمی نمودن داده ها و آنالیزشان پرداخته است. در تمامی روشهای بکار رفته در مطالعه حاضر معنی دار بودن غلظت دیازینون و زمان قرار گیری نشان داده شد. روشهای چند متغیره *RDA* و *NM-MDS* به تنهایی به مقدار *P* ختم نشده و برای قضاوت قطعی نهایی به آنالیز بیشتر بر نمره های بدست آمده نیاز بود.

در *RDA* با حداکثر ۲ محور بیش از ۸۸ درصد از واریانس تعریف شد که تنها با آزمون اضافی برای بدست آمدن نتایج نهایی کافی بود. در مورد *NM-MDS* این مساله بغرنجتر بوده و ۶ آزمون اضافی برای بدست آوردن نتیجه گیری نهایی لازم بود. مشکل استفاده از این آزمون تعریف نشدن کامل واریانس با محور های انتخاب شده است. به عبارتی مقداری اطلاعات با آنالیز اضافی نمرات حاصل از این دو از دست میرود. بررسی پیشفرضهای آزمونهای اضافی نیز باید در نظر گرفته شود. آنالیز واریانس

www.SID.ir

Archive of SID

چند متغیره ناپارامتریک آنالیز مستقیم داده های حضور و عدم حضور را فراهم آورد. نظر به اینکه این آنالیز از خروجی آنالیز دیگر استفاده ننموده است و برخلاف نوع پارامتری خود دارای پیشفرض خاصی نیست بیشترین سهولت را در اجرا داشته و توصیه می شود.

منابع:

1- Bagheri, H., M. Saraji, M. Chitsazan, S. Mousavi and M. Naderi (2000). Mixed-level orthogonal array design for the optimization of solid-phase extraction of some pesticides from surface water. Journal of Chromatography A, 888: 197-208.
2- Boran, H., I. Altinok and E. Capkin (2010). Histopathological changes induced by maneb and carbaryl on some tissues of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. Tissue and Cell, 42: 158-164.
3- Cengiz, E. I. (2006). Gill and kidney histopathology in the freshwater fish Cyprinus carpio after acute exposure to deltamethrin. Environmental Toxicology and Pharmacology, 22: 200-204.
4- Dutta, H. and H. Meijer (2003). Sublethal effects of diazinon on the structure of the testis of bluegill, Lepomis macrochirus: a microscopic analysis. Environmental Pollution, 125: 355-360.
5- Fanta, E., F. S. A. Rios, S. Romão, A. C. C. Vianna and S. Freiberger (2003). Histopathology of the fish Corydoras paleatus contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. Ecotoxicology and Environmental Safety, 54: 119-130.
6- Giddings, J. M., R. C. Biever, M. F. Annunziato and A. J. Hosmer (1996). Effects of diazinon on large outdoor pond microcosms. Environmental Toxicology and Chemistry, 15: 618-629.
7- Hadi, A. and S. Alwan (2012). Histopathological changes in gills, liver and kidney of fresh water fish, Tilapia zillii, exposed to aluminum. International Journal of Pharmacy & Life Sciences, 3: 2071-2081.
8- Haines, W., M. Taylor, K. Crofton, R. Marshall and S. Padilla (2001). The anticholinesterase insecticide, diazinon, may potentiate the toxicity of the pyrethroid insecticide deltamethrin at low dosages.In: Society of Toxicology, San Francisco, CA. Journal of Neurochemistry.
9- Khoshbavar-Rostami, H., M. Soltani and H. Hassan (2006). Immune response of great sturgeon (Huso huso) subjected to long-term exposure to sublethal concentration of the organophosphate, diazinon. Aquaculture, 256: 88-94.
10- Koca, S., Y. B. Koca, Ş. Yildiz and B. Gürcü (2008). Genotoxic and histopathological effects of water pollution on two fish species, Barbus capito pectoralis and Chondrostoma nasus in the Büyük Menderes River, Turkey. Biological Trace Element Research, 122: 276-291.
11- Köprücü, S. Ş., K. Köprücü, M. Ş. Ural, Ü. İspir and M. Pala (2006). Acute toxicity of organophosphorous pesticide diazinon and its effects on behavior and some hematological parameters of fingerling European catfish (Silurus glanis L.). Pesticide biochemistry and physiology, 86: 99-105.
12- Pacheco, M. and M. A. Santos (2002). Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (Anguilla anguilla L.). Ecotoxicology and Environmental Safety, 53: 331-347.
13- Pimentel, D. (1995). Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics. Journal of Agricultural and Environmental Ethics, 8: 17-29.
14- Rudnicki, C. A. M., G. C. Melo, L. Donatti, H. G. Kawall and E. Fanta (2009). Gills of juvenile fish Piaractus mesopotamicus as histological biomarkers for experimental sub-lethal contamination with the organophosphorus Azodrin® 400. Brazilian Archives of Biology and Technology, 52: 1431-1441.
15- Said, T. O. and N. A. E. Agroudy (2006). Assessment of PAHs in water and fish tissues from Great Bitter and El Temsah lakes, Suez Canal, as chemical markers of pollution sources. Chemistry and Ecology, 22: 159-173.
16- Štrbac, S., A. Šajnović, L. Budakov, N. Vasić, M. Kašanin-Grubin, P. Simonović and B. Jovančićević (2014). Metals in the sediment and liver of four fish species from different trophic levels in Tisza River, Serbia. Chemistry and Ecology, 30: 169-186.

www.SID.ir