دانشگاه گنبد کاووس
نشریه "پژوهش‌های ماهی شناسی کاربردی"
دوره دوم، شماره سوم، پاییز ۹۳
http://jair.gonbad.ac.ir

تعیین غلظت کشندگی $LC_{50}96h$ نیتریت سدیم و تأثیر آن بر بافت کبد بچه ماهی سفید (*Rutilus kutum* Kamensky, 1901)

زهرا عظیمی[1]*، علی صادق پور[2]، حسین خارا[3]، اکبر پورغلامی مقدم[4]، رودابه روفچایی[5]

[1] کارشناس ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، بندر انزلی، [2] مربی گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، لاهیجان، [3] دانشیارگروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، لاهیجان، [4] مربی مرکز تحقیقات شیلات، پژوهشکده آبهای داخلی، بندر انزلی، [5] کارشناس تغذیه و غذای زنده، پژوهشکده آبهای داخلی، بندر انزلی، ایران.

تاریخ ارسال: ۹۳/۹/۱۷ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۲۰

چکیده

نیتریت محصول حد واسط در چرخه طبیعی نیتروژن است که افزایش غلظت محیطی آن موجبات مرگ و میر ماهیان آب شیرین را فراهم می‌کند. پس از آزمایش‌های اولیه محدوده کشندگی این ماده تعیین و سپس جهت تعیین دقیق LC_{50}، ۱۸۰ قطعه بچه ماهی سفید با میانگین وزنی ۰/۸±۴/۰۵ گرم، در ۶ گروه (۵ گروه آزمایشی و گروه شاهد) در معرض غلظت‌های ۱۳۰، ۱۴۴/۵، ۱۶۱/۵، ۱۸۰، ۲۰۰ میلی‌گرم درلیتر نیتریت سدیم قرار گرفتند. آزمایشات به صورت ساکن (استاتیک) و بر اساس روش استاندارد به مدت ۴ شبانه روز (۹۶ ساعت) انجام شد. در مدت اجرای آزمایش اکسیژن محلول، اسیدیته و دمای آب روزانه اندازه‌گیری و ثبت گردید. میزان متوسط کشندگی (LC_{50}) نیتریت روی بچه ماهیان سفید طی ۹۶ ساعت ۱۴۶/۶۲ میلی‌گرم درلیتر ، با استفاده از روش آماری Probit analysis تعیین گردید. طی این بررسی در ماهیان مسموم رفتار غیر طبیعی چون بی‌قراری، شنا در سطح آب و از دست دادن تعادل دیده شد. به منظور مشاهده تغییرات میکروسکوپی بافت کبد، این بافت در ماهیان در حال مرگ در پایان هر ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. پس از تثبیت بافت‌ها در فرمالین ۱۰ درصد، مقاطع بافتی با ضخامت ۵ میکرون تهیه و به روش هماتوکسیلین- ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. مهم‌ترین ضایعات کبد مشاهده شده، خون ریزی ورید مرکزی، آتروفی، نکروزه شدن هپاتوسیت، نکروز کانونی مزمن، Cloudy swelling (تورم ابری) و حضور ملانین و صفرا بود. نتایج نشان دادکه این ماهی جز ماهیان مقاوم در برابر سم نیتریت بوده و بافت کبد می‌تواند به‌عنوان یک بیومارکر شاخص آلودگی نیتریت در این گونه مورد بررسی قرار گیرد.

***واژه‌های کلیدی*: ماهی سفید، *Rutilus Kutum*، نیتریت، هیستو پاتولوژیک، غلظت کشندگی، آلودگی**

*نویسنده مسئول: zahra.azimi81@yahoo.com

مقدمه

سمیت یک آلاینده از طریق سنجش زیستی (Bioassay) ارزیابی می‌گردد که به‌وسیله آن غلظت لازم جهت ایجاد تلفات نیمی از موجودات مورد آزمایش در یک دوره زمانی مشخص (کوتاه مدت یا بلند مدت) معلوم می‌شود. هدف از این آزمایش‌ها قضاوت درباره توان بالقوه مواد آلاینده و بررسی تأثیرات زیان‌بخش آن بر اکوسیستم و موجودات زنده می‌باشد (Kordovani, 1994).

در شرایط پرورشی و در سیستم‌های بسته و متراکم که آب چرخشی استفاده می‌شود غلظت بالای نیتریت قابل مشاهده است (Svobodova *et al.*, 2005). آمونیاک دفعی ماهی‌ها در این سیستم‌های پرورشی تحت فعالیت باکتری‌های نیتروزوموناس قرارگرفته که این امر میزان نیتریت را به‌عنوان یک ماده حدواسط تا حد سمی افزایش می‌دهند (Palackek *et al.*, 1984). در آب‌های جاری نیز فعالیت‌های زیستی گیاهان آبزی به‌دلیل عدم تعادل در حضور باکتری‌های نیتریفایر (باکتری‌های شوره‌گذار) شاهد افزایش غلظت نیتریت تا حد سمی هستیم (Scarano *et al.*, 1984).

مطالعات انجام شده حضور نیتریت را در میزان بالا (حاد) (Ozcan*et al.*, 2010) و میزان کم در دراز مدت (مزمن) برای ماهی‌ها به‌عنوان سم معرفی کرده است (Kroupova *et al.*, 2008 and 2010). سمیت نیتریت برای ماهی‌های مختلف به بسیاری از عوامل داخلی و خارجی همچون کیفیت آب، گونه ماهی، سایز و حساسیت‌های فردی ماهی بستگی دارد (Jensen, 2003; Voslarova *et al.*, 2006).

نیتریت علاوه بر اینکه به تنهایی مکانیسم سمی ایجاد می‌کند، بلکه چندین مکانیسم دیگر را نیز فعال می‌نماید. از جمله کاهش غلظت هموگلوبین و کم خونی منتج از آن، دژنره شدن سلول‌های کبدی متعاقب کم خونی حادث شده و آسیب غشای لیزوزومی و میکروزومال در کبد، تخریب DNA و تغییر هموستاز خارج سلولی همچون بروز هیپوکلسیمی می‌باشد (Huertaz *et al.*, 2002).

ماهی سفید یکی از گونه‌های مهم اقتصادی است. زیستگاه اصلی آن مربوط به بخش جنوبی دریای خزر به‌خصوص سواحل ایران می‌باشد (Tamarin and Kuliev،۱۹۸۹). علی‌رغم تحقیقاتی که تاکنون روی این گونه ارزشمند انجام شده است، هنوز پرورش این گونه میسر نشده است. لذا، جهت بهره‌برداری شیلاتی آن در شرایط پرورشی، از یک طرف و بررسی توان بیولوژی این گونه در برابر میزان نیتریت این بررسی صورت گرفت. در این تحقیق سمیت حاد (Acute toxicity) نیتریت روی بچه ماهی سفید با هدف تأثیر بر پاسخ‌های رفتاری و ساختار بافت کبد که متابولیسم بسیاری از مواد و سم‌زدایی را در آبزیان به‌عهده دارد، مورد بررسی قرار گرفت. تعیین غلظت ۵۰ درصدکشندگی سم نیتریت سدیم در ۹۶ ساعت (LC_{50} 96h) و مشخص نمودن حداکثر غلظت مجازآن برای بچه ماهی سفید ازجمله مواردی است که در این تحقیق مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال ۱۳۹۱ در ایستگاه تغذیه و غذای زنده آبزیان واقع در بندر انزلی انجام شد. جهت اجرای این تحقیق بچه ماهیان با میانگین وزنی ۰/۸±۴/۰۵ گرم در وان‌های مخصوص نگهداری بچه ماهیان به مدت یک‌ماه جهت سازگاری نگهداری و با غذای کنستانتره تغذیه شدند. آزمایش بر اساس روش سازمان اقتصاد و همکاری و توسعه[1] (OECD, ۱۹۸۴)، به منظور تعیین LC_{50} 96h انجام گرفت. برای آزمایش سمیت تعداد ۱۸ وان ۲۰ لیتری و در هر وان ۱۰ عدد ماهی در نظر گرفته شد. ۲۴ ساعت قبل از آزمایش غذادهی قطع شد.

بر اساس محاسبات لگاریتمی و تکرارهای مجدد آزمایش‌های تیمار نهایی با ۵ تیمار (۲۰۰،۱۸۰، ۱۶۱/۵، ۱۴۴/۵، ۱۳۰ میلی‌گرم درلیتر نیتریت سدیم $NaNo_3$) و ۳ تکرار در کنار تیمار شاهد انجام شد. نیتریت سدیم مورد مصرف مرک آلمان با خلوص ۹۹ درصد بود. شرایط آزمایش استاتیک بوده (TCR, 1984) و میزان نیتریت آب و اکسیژن محلول در طول آزمایش ثابت بود. زمان نمونه‌برداری ۹۶ ساعت پس از افزودن سم بود آب مصرفی از لوله‌کشی شهری بود که قبل از مصرف با هوادهی کلرزدایی شد (Naji, 2008). در طول آزمایش اکسیژن، pH، دما و سختی آب به‌ترتیب (mg/l) ۰/۳ ۷/۵، ۷/۳±۰/۶، ۲۰±۱ºC، ۳۰۰±۲۵ (mg/l) بود.

میزان نیتریت سدیم بر اساس آنالیز پروبیت محاسبه شد. ماهیان مورد آزمایش از نظر رفتاری کنترل و علایم بالینی آنها ثبت گردید. بعد از کسب نتایج نهایی اطلاعات حاصله بر طبق روش آماری Program version۱/۵، (USEPA probit, 1985) با سطح اطمینان ۹۵ درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و مقادیر LC_{10}، LC_{50}، LC_{90} طی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت و میزان حداکثر غلظت مجاز (MAC)[2] که همان غلظت غیر مؤثر(NOEC)[3] بوده و معادل hLC_{50} 96×10^{-1} و حداقل غلظت مؤثره نیز (LOEC)[4] نیتریت سدیم که معادل $hLC_{10}96$ نیز تعیین شد (TRC, 1984). به‌منظور بررسی ضایعات هیستوپاتولوژیک نیتریت سدیم، در پایان هر ۲۴ ساعت ماهیان درحال مرگ از هر تکرار برداشت شده و پس از جدا سازی کبد، نمونه‌ها در ظروف حاوی فرمالین ۱۰ درصد قرارداده شد. نمونه‌های بافتی پس از طی مراحل پاساژ بافت، آماده برش‌گیری و رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین شدند (Hung *et al*., 1990; Posti and Sedigh, 2009). پس از رنگ آمیزی لام‌های حاوی نمونه بافت‌ها با کمک میکروسکوپ Nikon مدل Eclipse 50 مجهز به مانیتور و دوربین عکاسی Nikon مدل CCTV مورد مطالعه قرار گرفتند. آسیب‌های بافتی به‌وجود آمده با علامت‌های: (−) بدون ضایعه بافتی، (+) کمتر از ۲۰ درصد ضایعه بافتی،

1. Organization of Economic Cooperation and Development
2. Maximum Allowable Toxicant Concentration
3. No Observed Effect Concentration
4. Lowest Observed Effect Concentration

(++) کمتر از ۶۰ درصد ضایعه بافتی، (+++) کمتر از ۸۰ تا ۱۰۰ درصد ضایعه بافتی، (++++) تخریب بافتی صد درصد مشخص گردیدند (Veiga *et al*., 2002; Silva *et al*., 2005; Xing *et al*., 2012).

نتایج

در این بررسی حداکثر غلظت مجاز، حداقل غلظت مؤثر، غلظت غیر مؤثر نیتریت سدیم در بچه ماهی سفید به‌ترتیب ۱۴/۶۶۲، ۱۱۶/۵۱، ۱۴/۶۶۲ میلی‌گرم برلیتر تعیین شد. ماهیان مسموم رفتارهای غیرطبیعی شامل بی‌قراری، شنای روی آب، از دست دادن تعادل و در بعضی مواقع توقف در حرکت را نشان دادند. نتایج بافت‌شناسی کبد ماهیان شاهد و مقایسه آن با بافت آبشش ماهیانی که تحت تاثیر ۵ غلظت نیتریت سدیم (۱۳۰، ۱۴۴/۵، ۱۶۱/۵، ۱۸۰، ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) قرار داشتند نشان داد هنگامی که بچه ماهیان در معرض ۱۳۰ میلی‌گرم بر لیتر نیتریت سدیم قرارگرفتند، تقریبا تلفاتی مشاهده نشد در حالیکه ماهیانی که در معرض ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نیتریت سدیم قرارداشتند دچار مرگ و میر شدند. تأثیر ضایعات بافتی ایجاد شده در تمام پنج تیمار مورد ارزیابی قرار گرفت.

جدول ۱- اعداد استخراجی از جدول پروبیت در بچه ماهیان سفید ۳-۴ گرمی در معرض غلظت‌های مختلف نیتریت سدیم بر مرگ و میر بچه ماهیان سفید، طی ۹۶ ساعت

یمار	غلظت (میلی‌گرم در لیتر)	لگاریتم غلظت	Probit value			
			۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
شاهد	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۱	۱۳۰	۲/۱۱	۳/۸۸۷۷	۴/۰۲۹۹	۴/۱۵۸۴	۴/۲۷۱۰
۲	۱۴۴/۵	۲/۱۶	۴/۵۶۸۴	۴/۷۴۶۷	۴/۷۴۶۷	۴/۸۳۱۳
۳	۱۶۱/۵	۲/۲۰	۵/۰۸۲۸	۵/۱۶۶۲	۵/۱۶۶۲	۵/۳۳۹۸
۴	۱۸۰	۲/۲۵	۵/۶۲۱۹	۵/۶۲۱۹	۵/۶۲۱۹	۵/۹۶۶۱
۵	۲۰۰	۲/۳۰	۵/۹۶۶۱	۶/۲۸۱۶	۶/۲۸۱۶	۸/۹۱۹۰

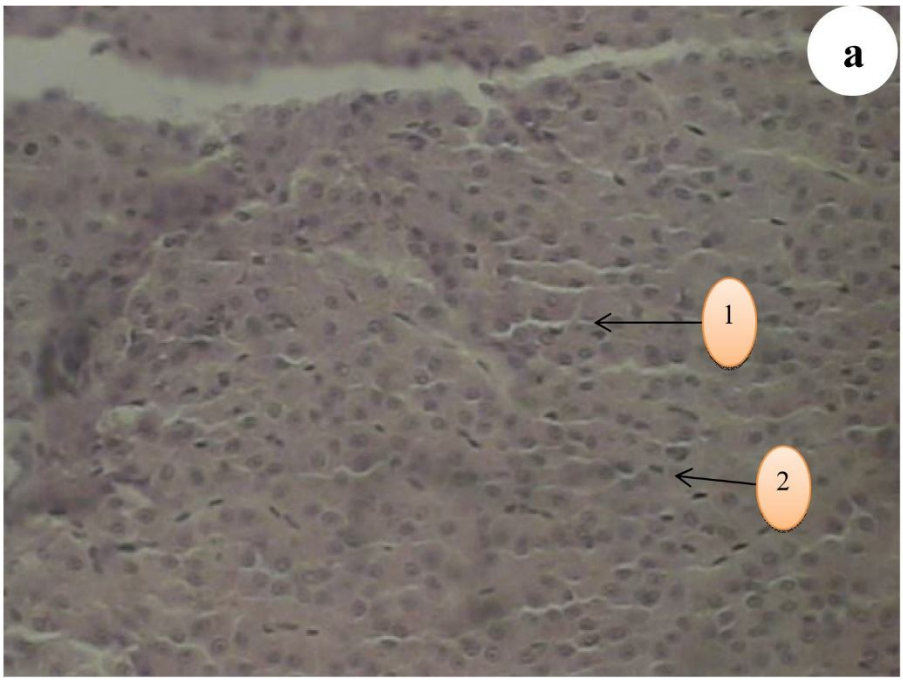
جدول۲-غلظت‌های کشنده نیتریت سدیم درطی ۴ روز روی بچه ماهی سفید (۳ تا ۴ گرمی).

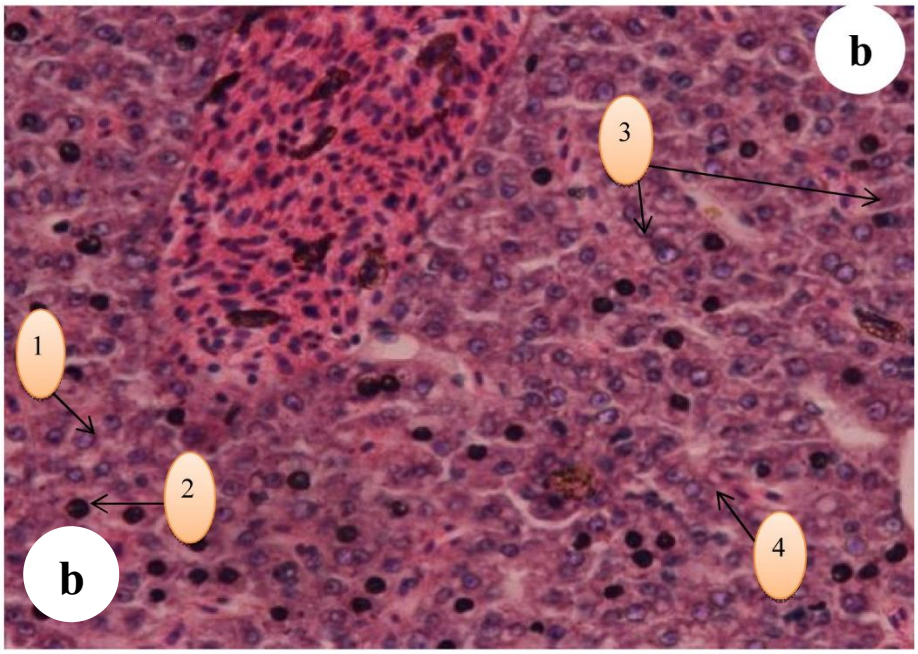
زمان / LC	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
۱۰	۱۲۲/۰۹	۱۱۹/۵۳	۱۱۷/۳۵	۱۱۶/۵۱
۵۰	۱۵۹/۴۷	۱۵۴/۷	۱۵۳/۸۵	۱۴۶/۶۲
۹۰	۲۰۸/۲۵	۲۰۰/۱۷	۱۹۸/۶۹	۱۶۷/۲۶

جدول ۳- عوارض مشاهده شده در کبد بچه ماهی سفید قرار گرفته در معرض دوزهای متفاوت نیتریت سدیم

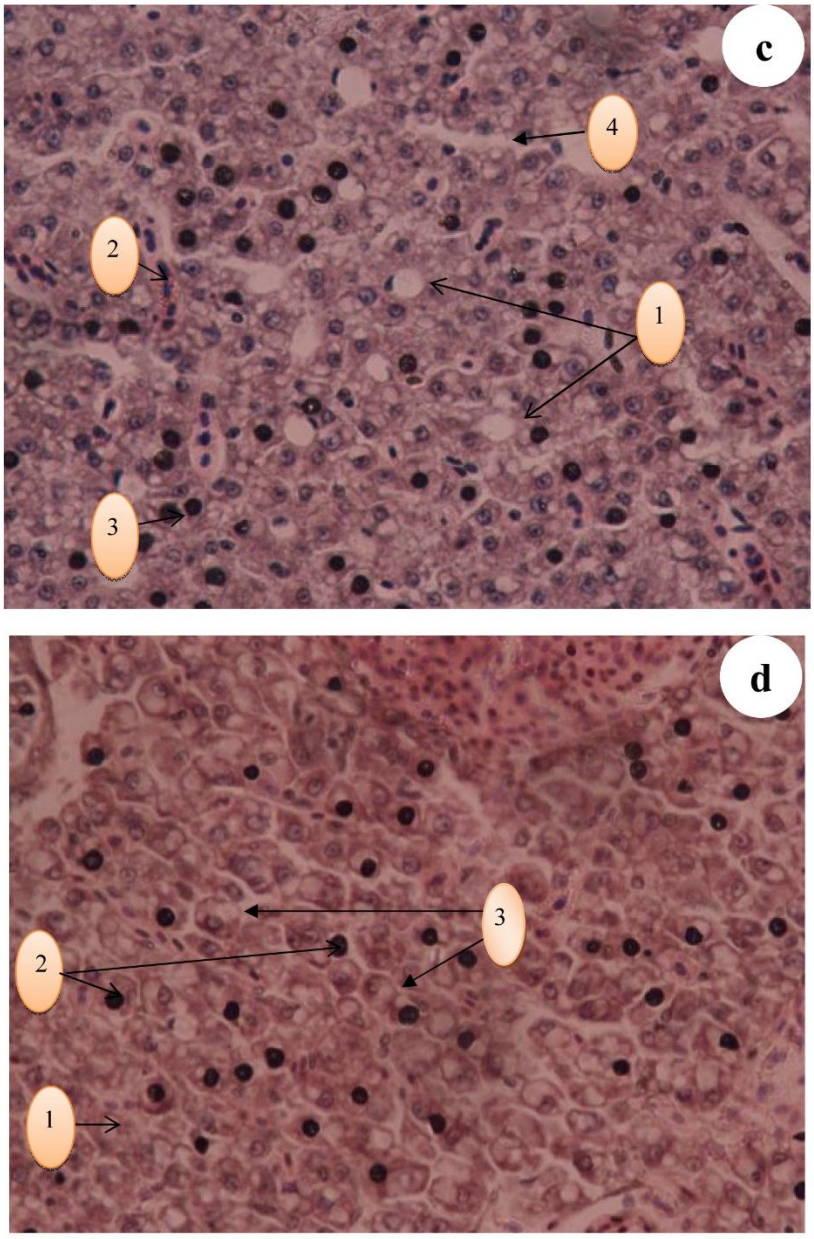
آسیب	غلظت تحت کشنده نیتریت سدیم(ppm)					
	۰	۱۳۰	۱۴۴/۵	۱۶۱/۵	۱۸۰	۲۰۰
پرخونی و خونریزی	-	+	++	++	++	+++
استیتوزی	-	-	+	++	++	++
خونریزی ورید مرکزی	-	+	+	++	+++	+++
آتروفی	-	-	-	+	++	+++
نکروزه شدن هپاتوسیت	-	-	+	++	+++	+++
نکروز کانونی مزمن	-	-	-	+	++	+++
تورم ابری (Cloudy swellin)	-	-	-	++	++	+++

آسیب‌های بافتی بوجودآمده (–) بدون ضایعه بافتی، (+) کمتر از ۲۰ درصد ضایعه بافتی، (++) کمتر از ۶۰ درصد ضایعه بافتی، (+++) کمتر از ۸۰ تا ۱۰۰درصد ضایعه بافتی، (++++) تخریب بافتی صددرصد.

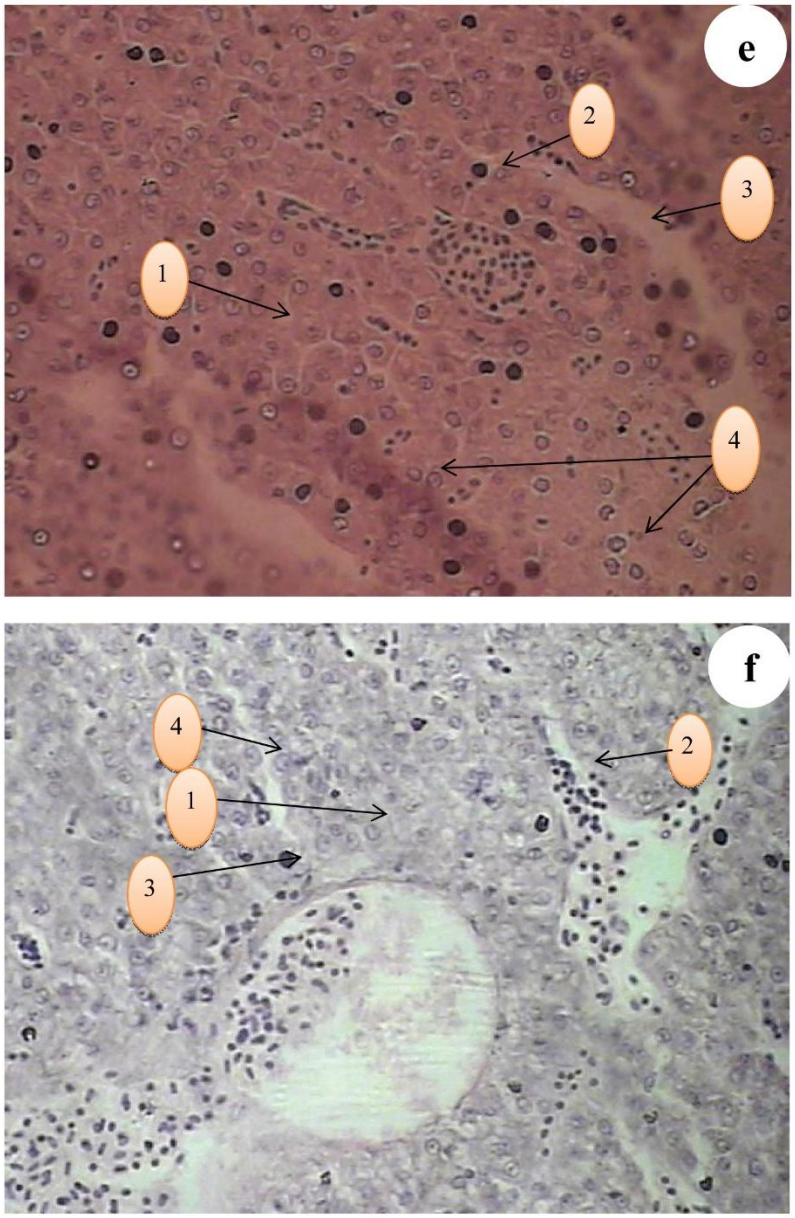




شکل ۱- تغییرات هیستوپاتولوژیک در کبد بچه ماهی سفید *Rutilus kutum*، تحت تأثیر غلظت‌های مختلف نیتریت سدیم پس از ۹۶ ساعت. (a). شاهد ۱. سینوزوئید ۲. هپاتوسیت (H&E، ۴۰۰ X) (b). ۱. هپاتوسیت‌های در حال نکروزه شدن ۲. هپاتوسیت‌های پیکنوزه ۳. خونریزی در بافت کبدی (انتشار گلبول‌های قرمز بین هپاتوسیت‌ها و فضای سینوزوئیدها) ۴. دژنرسانس واکوئلی هسته سلول‌های کبد در غلظت ۱۳۰ mg/l (H&E،۴۰۰ X).



شکل ۲. (c). ۱.نکروزه شدن هپاتوسیت‌ها ۲.خونریزی ۳.پیکنوزه شدن هپاتوسیت ۴. گشاد شدن سینوزوئیدها در غلظت ۱۴۴/۵mg/l (H&E،۴۰۰ X). (d). ۱. نکروز هپاتوسیت‌ها ۲. پیکنوزه شدن هپاتوسیت‌ها ۳. تورم ابری در غلظت ۱۶۱/۵ mg/l (H&E،۴۰۰ X).



شکل ۳. (e)۱. نکروز ۲. پیکنوز سلول‌های هپاتوسیت ۳. اتساع سینوزوییید ۴. دژنرسانس هسته در غلظت mg/l ۱۸۰ (H&E،۴۰۰ X). (f):۱. نکروز ۲. خونریزی ۳. پیکنوز ۴. افزایش حجم سینوزوئید در غلظت mg/l ۲۰۰. (X H&E،۴۰۰).

همانطور که در تصاویر (شکل ۱) و (جدول ۳) نشان داده شده بیشترین ضایعات بافت کبد ثبت شده در این آزمایش مربوط به ضایعات تخریبی بافتی براین اندام شامل: پرخونی، آتروفی، استیتوزی، خونریزی ورید مرکزی، سلول‌های در حال نکروزه شدن می‌باشد. با افزایش زمان و میزان سم، همانطور که مشاهده می‌شود، نکروز کانونی مزمن، ترومبوز عروق، رسوب هموسیدرین و حضور ملانین و صفرا در ضایعات بافتی دیده شد (شکل ۲).

بحث و نتیجه‌گیری

همانطور که نتایج بررسی نشان می‌دهد (جدول ۱ و ۲) غلظت نیمه کشنده LC_{10}، LC_{50}، LC_{90} پس از ۹۶ ساعت به‌ترتیب برابر ۱۱۶/۵۱، ۱۴۲/۶۲، ۱۶۷/۲۶ میلی‌گرم بر لیتر بدست آمده و حداکثر غلظت مجاز (MAC)، غلظت غیر مؤثر (NOEC)، حداقل غلظت مؤثر (LOEC) به‌ترتیب ۱۴/۶۶۲، ۱۴/۶۶۲ و ۱۱۶/۵۱ میلی‌گرم بر لیتر محاسبه گردید. در یک بررسی کلی بر روی تأثیر سمیت نیتریت بر روی آبزیان پرورشی، غلظت نیمه کشنده برای ماهیانی چون قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) ۲۱/۷میلی‌گرم بر لیتر و گوپی (*Poecilia reticulate*) ۳۰/۲ میلی‌گرم برلیتر می‌باشد که جزو ماهیان حساس به نیتریت می‌باشند. ماهیانی چون کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) با LC_{50} ۲۷۰ میلی‌گرم بر لیتر، خورشید ماهی (*Lepomis macrochirus*) با LC_{50} ۳۵۵ میلی‌گرم برلیتر و گورخر ماهی *Danio rerio* با غلظت نیمه کشندگی ۲۴۲/۵۵ میلی‌گرم برلیتر جزو ماهیان مقاوم نسبت به نیتریت هستند (Dolezelova *et al*., 2011; Lewis and Moriss, 1986). ماهیانی چون تاس‌ماهی سیبری انگشت قد (*Acipenser baeri*) و *Micropterus salmoides*، ۱۳۰ میلی‌گرم برلیتر برآورد شده است (Huertaz *et al*., 2002). همانطور که اشاره شد در این بررسی، غلظت نیمه کشنده در بچه ماهی سفید ۳ تا ۴ گرمی LC_{50} 96h NO_2^- ۱۴۶/۶۲ میلی‌گرم بر لیتر است که می‌توان جزو ماهیان مقاوم نسبت به این ماده در نظر گرفت. گرچه بررسی‌ها حاکی از آن است که در بین ماهیان یک خانواده نیز مقاومت نسبت به نیتریت یکسان نیست و از طرفی تأثیر شرایط محیطی را نیز باید مد نظر قرار داد.

از مهمترین عواملی که بر سمیت نیتریت تأثیر می‌گذارد، غلظت یون کلراید در آب است. برخی از محققین اثر محافظتی یون‌های کلراید را در برابر سمیت نیتریت نشان داده و بیان کردند که رابطه معکوسی بین غلظت کلرید محیط زیست ماهی و سمیت نیتریت وجود دارد (Weirich and Riche, 2006; Perrone and Meade, 2011). در یک بررسی استاتیک ۲۴ ساعته که روی ماهی کپور ۵ تا ۶ گرمی در مجاورت سموم نیتریت، نیترات و آمونیاک انجام شد عامل کاهش مصرف اکسیژن و بروز تخریب بافتی را در مقایسه بامیزان سم آمونیاک و نیترات در اثر بروز متموگلوبین و در نهایت قابلیت کاهش اکسیژن مصرفی بیان نمود (Tilak *et al*., 2007). در این بررسی نیمه کشندگی طی ۲۴ ساعت،

نیتریت برای کپور ۱۷۱/۳۶ میلی‌گرم برلیتر برآورد گردید که نزدیک به میزان LC_{50} 24h (۱۵۹/۴۷ میلی‌گرم برلیتر) در بررسی حاضر است. تاس‌ماهی سیبری یکساله برای یک مدت طولانی و به شکل مزمن در معرض سم نیتریت قرار گرفتند. میزان متموگلوبین در خون تاس‌ماهیانی‌که در حال مرگ بودند کمتر از متموگلوبین تولید شده در خون ماهیان زنده بود. از این‌رو گروهی از محققین بر این باورند که تولید متموگلوبین نمی‌تواند عامل اولیه مرگ ماهیان در معرض سم نیتریت باشد (Huertaz *et al*., 2002).

به‌دلیل کثرت گونه‌های ماهی و تفاوت زیادبافت ها و اندام‌های آنان، بررسی بافت‌شناسی یک گونه را نمی‌توان به سایر گونه‌ها تعمیم داد (Schlenk and Benson, 2001). از آنجایی که مطالعه مشابهی در ارتباط با تأثیر این ماده بر روی این گونه انجام نشده است نمی‌توان مقایسه مستیقمی با سایر گونه‌ها داشت.

در بررسی میزان جذب نیتریت در بافت‌های آبشش، ماهیچه و کبد ماهیان در حال مرگ و ماهیان زنده تاس‌ماهی سیبری یکساله که در معرض نیتریت قرار داشتند، در پلاسمای خون بافت آبشش و ماهیچه‌ای اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد، اما این اختلاف در بافت کبد معنی‌دار بود. به‌طوری‌که محققین در تحلیل بررسی خویش قابلیت سم‌زدایی سلول‌های هپاتوسیت را یکی از دلایل این اختلاف بیان کردند (Huertaz *et al*., 2002). نتایج مشابهی نیز درباره قابلیت هپاتوسیت ماهی بدست آمد (Doblander and Lackner, 1997) که تحلیل محققین مبنی بر قابلیت تبدیل شدن نیتریت به نیترات در سلول‌های کبدی به کمک آنزیم‌های کاتالاز و سیتوکروم اکسیداز بود (Doblander`and Lackner, 1997).

یکی از عوامل مؤثر بر تخریب بافت می‌تواند مربوط به فشار شیمیایی سموم با توجه به شدت و طول مدت اثر آن بر اختلال در عملکرد آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی باشد. با توجه به اینکه سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی از جمله کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز می‌توانند مانع افزایش آسیب اکسایشی سموم بر بافت‌ها باشند (Ahmad *et al*., 2000) لذا اعلام نتیجه‌گیری دقیق‌تر نیازمند تحقیقات بیشتر روی تغییرات میزان این آنزیم پس از قرارگیری در معرض سم می‌باشد. از آنجایی که کبد اندامی است که در ذخیره‌سازی برخی از مواد غذایی نقش دارد، لذا تغییرات این بافت در مجاورت نیتریت سدیم می‌تواند در تحلیل ایجاد ضایعات این ماده مد نظر قرار گیرد. همانطور که نتایج این بررسی در جدول ۳ و تصاویر۱ دیده می‌شود، تأثیرات نیتریت بر بافت کبد در ابتدا باعث افزایش کانون‌های خونسازی و ایجاد پرخونی شده و در ادامه کاهش ظرفیت اکسیژن رسانی ایجاد شده، هسته سلول‌های بافت کبدی کوچک شده و کروماتین اطراف آن متراکم می‌گردد (a-e). در ادامه این تغییرات به مرور هسته، پیکنوز و سپس کاریولیز شده و عارضه بافتی نکروز بروز می‌کند. گاهی در مرکز بافت نکروز کیست ایجاد می‌شود. همانطور که

تصویر نشان می‌دهد ادم داخل سلولی و حضور لنفوسیت‌ها نیز می‌تواند ناشی از اثرات کم خونی ایجاد شده باشد (Zcan *et al*., 2010) از جمله تغییرات بافتی که با افزایش غلظت نیتریت در این بررسی مشاهده شد، کاهش اندازه سلولی نسبت به اندازه طبیعی و ناپدید شدن مواد ذخیره شده سلولی بود (آتروفی). تورم سلولی و ابری شدن سیتوپلاسم و دانه‌دار شدنش (تورم ابری)، پرخونی در سیاهرگ‌های کوچک و سینوزوئیدهای کبدی از جمله ضایعاتی بود که در غلظت‌های بالا دیده شد. ایجاد متموگلوبین و کم خونی متعاقب در اثرجذب این ماده و اختلالات آنزیمی ایجاد شده در فرآیند سم زدایی هپاتوسیت را می‌توان از عوامل ایجاد این ضایعات برشمرد (Palachek *et al*.,1986; Berent *et al*., 1999).

نتیجه کلی این پژوهش همانطور که در جدول ۳ مشخص است؛ نشان می‌دهد که غلظت کشندگی ۹۰ درصد این ماهیان طی ۹۶ ساعت برابر ۱۶۷/۲۶ میلی‌گرم برلیتر بود. بافت کبد در معرض نیتریت طی ۹۶ ساعت با افزایش میزان نیتریت و مدت درمعرض قرارگیری، دچار ضایعه شده بیشترین ضایعات در میزان بالای این ماده و در پایان ۹۶ ساعت مشاهده شد که شامل: نکروز، آتروفی و تورم ابری سلولی بود. از این‌رو لازم است جهت بررسی مکانیسم اثر نیتریت سدیم، اثر این ماده بصورت مزمن مورد مطالعه مجدد قرارگیرد. نتایج نشان داد که این گونه نسبت به آلودگی نیتریت نسبتاً مقاوم است و تغییرات بافتی اندام کبد به عنوان بیومارکر می‌توان در رابطه با آلودگی نیتریت مورد بررسی قرار گیرد.

منابع

Ahmad I., Hamid T., Fatima M., Chand H.S., Jain S.K., Athar M., Raisuddin S. 2000. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus*) is abiomarker of paper mill effluent exposure, Biochimica et Biophysica Acta, (BBA), 1523(1): 37-48.

Doblander C., Lackner R. 1997. Oxidation of nitrite to nitrate in isolated erythrocytes: a possible mechanism for adaptation to environmental nitrite, Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 54(1): 157–161.

Dolezelova P., Macova S., Pistekova V., Svobodova Z., Bedanova I. Voslarova, A. 2011. Nitrite toxicity assessment in *Daniorerio* and *Poecilia reticulate*. Acta Veterinaria Brno, 80(2): 309–312.

Hurtas M., Gisbert E., Rodriguez A., Cardona L., Williot P., Castello-Orvay, F. 2002. Acute exposure of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) yearlings to nitrite: median-lethal concentration (LC_{50}) determination, haematological changes and nitrite accumulation in selected tissues, Aquatic Toxicology. 57(4): 257–266.

Hung S.S.O., Groff J.M., Lutes P.B., Kofifynn-Aikins F. 1990. Hepatic and intestinal histology of juvenile white sturgeon feed different carbohydrates. Aquaculture, 87(3): 349-360.

Jensen F.B. 2003. Review: Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals, Comparative Biochemistry and Physiology - Part A 135(1): 9-24.

Kroupova H., Machova J., Piackova V., Blahova J., Dobsikova R., Novotny L., Svobodova Z. 2008. Effects of subchronic nitrite exposure on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Ecotoxicology and Environmental Safety, 71(3):813-820.

Kroupova H., Prokes M., Macova S., Penaz M., Barus V., Novotny L., Machova J. 2010. Effect of nitrite on early-life stages of common carp (*Cyprinus carpio*), Environmental Toxicology and Chemistry, 29(3): 535-540.

Kordovanu P. 1994. Natural ecosystems (Volume II) aquatic ecosystems. Press Paliz, 155-157p.

Lewis W.M., Morris D.P. 1986. Toxicity of nitrite to fish: A review, Transactions of the American Fisheries Society, 115(2): 183-195.

Naji T., Khara H., Rostamy M., NasiriPejman A. 2008. Effect of ammonia toxicity in the liver of fish (*Cyprinus carpio*) Carp. Environmental Science and Technology, 11(1): 1-18.

Ozcan K., Gul S., Ozen H., Karaman M. 2010. Acute exposure of transcaucasian barb (*Capoeta capoeta*) to nitrite: Determination of median lethal concentration (LC_{50}), genotoxic and histopathology effects, Fresenius Environmental Bulletin, 19(2):1344-1351.

Palachek R.M., Tomasso J.R. 1984. Toxicity of nitrite to channel catfish (*Ictalurus punctatus*), tilapia (*Tilapia aurea*), and largemouth bass (*Micropterus salmoides*): evidence for a nitrite exclusion mechanism. Canadian Journal of Fisheries Aquatic Sciences, 41(12): 1739–1744.

Perrone S.J., Meade T.L. 2011. Effect of Chloride on Nitrite Toxicity to Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Journal of the Fisheries Research Board Canadian, 34(4): 486-492.

Posti E., Sedigh Marvdasty A. 2009. Histology Atlas Fish, Publishing and Printing Institute of Tehran University, 297 p.

Scarano G., Saroglia M.G., Gray R.H., Tivaldi E. 1984. Hematological responses of sea bass *Dicentrarchus labrax* to sublethal nitrite exposures. Transactions of the American Fisheries Society 113(3): 360–364.

Schlenk D., Benson W.H. 2001. Targetorgan toxicity in marine and freshwater, Taylo and Francis, 395 p.

Silva A.F., Rocha E., Dias J., Silva P., Rems P., Gamesi E., Valente L.M.P. 2005. Partial replacement of fish oil by soybean oil on lipid distribution and liver histology in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles, Aquaculture Nutrition. 11(2): 147-155.

Svobodova Z., Machova J., Poleszczuk G., Huda J., Hamackova J., Kroupova H. 2005. Nitrite poisoning of fish in aquaculture facilities with water recirculating systems. Acta Veterinario Brno, 74(1): 129-137.

T.C.R. 1984. O.E.C.D. Guideline for testing if chemical section 2, on biotic systemmms, 39 p.

Tamarin A.E., Kuliev Z.M. 1989. Black Searoach In: Caspian sea; Ichthyofauna and commercial stocks. Naukapress. Moscow. pp: 144-145.

Tilak K.S., Veeraiah K., Milton P., Raju J. 2007. Effects of ammonia, nitrite and nitrate on hemoglobin content and oxygen consumption of freshwater fish, *Cyprinuscarpio*. Journal of Environmental Biology, 28(1): 45-47.

USEPA. 1985. Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. 3rd Ed. Environmental Protection Agency, Environmental Monitoringroo and support Laboratory, Cincinnati, OH. EPA-600/4-85/013.

Veiga M.L., Rodrigues E.L., Pacheco F.J. 2002. Histopathologic changes in the kidney tissue of *Prohilodus lineatus* (*Characiformes, Prochilodontidae)* induced by sublethal concentration of trichlorfon exposure. Brazilian Archives of Biology and Technology, 45(2): 171–175.

Voslarova E., Pistekova V., Svobodova Z. 2006. Nitrite toxicity to *Danio rerio*: Effects of fish age and chloride concentrations. Acta Veterinaria Brno. 75(1): 107-113.

Weirich C.R., Riche M. 2006. Tolerance of juvenile black sea bass *Centropristis striata* to acute ammonia and nitrite exposure at various salinities. Fishe. Science. 72(5): 915-921.

Xing H., Li S., Wangb Z., Gao X., Xu S. H., Wangc X. 2012. Histopathological changes and antioxidant response in brain and kidney of common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos. Chemosphere, 88(4): 377–383.