



بررسی عوارض هیستوپاتولوژیک سم آفلاتوکسین ب ۱ بر برخی بافت‌های داخلی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

احمد ایمانی^{۱*}، کوروش سروی مغانلو^۱، سیده ثریا محمودی^۲، حامد غفاری فارسانی^۳، فرزانه نوری^۴، محسن فرزانه^۵

۱. دانشیار گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲. گروه آسیب‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳. گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۴. استادیار پژوهشکده آرتمیا و آبی‌پروری، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۵. استادیار پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۱۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۱/۱۵

چکیده

مطالعه حاضر با هدف بررسی سمیت آفلاتوکسین بر بافت‌های مختلف ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام گرفت. در این مطالعه تعداد ۲۰۷ قطعه بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزن ابتدایی $9/67 \pm 0/2$ گرم در ۳ تیمار (گروه شاهد، ۲۵ و ۵۰ ppm آفلاتوکسین ب ۱) به مدت ۸ هفته پرورش یافتند. پس از پایان آزمایش بافت‌های مختلف ماهیان آزمایشی از نظر آسیب‌های احتمالی مورد بررسی قرار گرفت. عوارض هیستوپاتولوژیکی ناشی از مواجهه بافت‌های مختلف ماهی با آفلاتوکسین شامل هیپرپلازی و تخریب تیغه‌های ثانویه آبشش و تغییرات عروقی و ادم و نکروز نورونی در مغز و همچنین تخریب و نکروز راسی پرزهای روده و زوائد پیلوریک بود. شدت ضایعات بافتی با افزایش میزان آفلاتوکسین ب ۱ به جیره غذایی افزایش یافت به طوری که این آسیب‌ها در ماهیان دریافت‌کننده جیره حاوی ۵۰ ppm آفلاتوکسین شدیدتر از گروه تیمار شده با جیره دارای ۲۵ ppm آفلاتوکسین بود.

واژگان کلیدی: مایکوتوکسین، هیستوپاتولوژی، جیره غذایی، آلودگی، قزل‌آلای رنگین‌کمان



Histopathological effect of aflatoxin B₁ on some internal tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

**Ahmad Imani^{1*}, kourosh Sarvi Moghanlo¹, Seyedeh Soraya Mahmoudi²,
Hamed Ghafarifarsani³, Farzaneh Noori⁴, Mohsen Farzaneh⁵**

1. Associate Professor, Department of Fisheries, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran

2. Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

3. Department of Fisheries, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran

4. Assistant Professor, Artemia and Aquaculture Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran

5. Assistant Professor, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Received: 04-Mar-2020

Accepted: 08-May-2020

Abstract

Present study was carried out to assess effects of aflatoxin B₁ on different rainbow trout tissues. In the present study, 207 rainbow trout fingerlings with an average body weight of 9.67 ± 0.2 g were reared for eight weeks in three distinctive treatments (control group, 25 and 50 ppb aflatoxin B₁). At the end of the trial, various tissues of experimental groups were studied regarding probable histological alterations. Histological alterations due to dietary aflatoxin B₁ exposure including hyperplasia and lamellar necrosis in the gill, necrotic and vascular changes in the brain along with inflammatory cell infiltration and necrotic changes in the intestinal and pyloric region were evident. The severity of pathologies was more pronounced in those fish received 50 ppb aflatoxin B₁ content in comparison to the group fed 25 ppb toxin contaminated diet.

Keyword: Mycotoxin, Histopathology, Diet, Contamination, Rainbow trout

۱. مقدمه

وجود آفلاتوکسین‌ها در خوراک آبزیان یک مشکل جدی در توسعه آبی‌پروری در سطح جهان است که می‌تواند پیامدهای اقتصادی قابل توجهی بر تولید کنندگان ماهی داشته باشد (Matejova, 2017). آفلاتوکسین‌ها (Aflatoxins) مهم‌ترین سموم قارچی سرطان‌زا هستند، که توسط گونه‌های مختلف جنس *Aspergillus* و برخی گونه‌های *Penicillium* طی فراوری و ذخیره دانه‌ها و خوراک تولید می‌شوند (Boonyaratpalin *et al.*, 2001; Hooft *et al.*, 2011) میان انواع مختلف آفلاتوکسین، آفلاتوکسین B₁ (AFB₁) سمی‌ترین، فراوان‌ترین و قوی‌ترین ترکیب سرطان‌زای طبیعی تلقی می‌شود (Chavez-Sanchez *et al.*, 1994; Bennett and Klich, 2003). این سم، در حال حاضر یکی از مهمترین میکوتوکسین‌های تحت نظارت سازمان غذا و داروی ایالات متحده آمریکا (FDA) می‌باشد (Aggarwal *et al.*, 2004). آفلاتوکسین در دام و طیور موجب کاهش سرعت رشد و بازدهی پایین حیوان و نیز سرکوب سیستم ایمنی، سمیت کبدی، جهش‌زایی، تغییرات تولید مثل، اختلالات فیزیولوژیکی و تغییرات نامطلوب بر بافت‌ها و سرانجام افزایش هزینه‌های تولید می‌شود (Boonyaratpalin *et al.*, 2001; Sahoo and Mukherjee, 2001; Gopinath *et al.*, 2009).

قرار گرفتن آبزیان در معرض آلودگی میکوتوکسینی می‌تواند سبب بسیاری از آسیب‌های بافتی شود، که ممکن است برای آبزیان بسیار کشنده نباشد، اما در دراز مدت به اندام‌های داخلی نفوذ کرده و بر وضعیت و فرآیندهای فیزیولوژیکی آبی تأثیر بگذارد (Yancheva *et al.*, 2016). ضایعات بافت شناسی و پاتولوژیک به عنوان نشانگرهای زیستی در پایش وضعیت سلامت آبزیان در معرض آلاینده‌ها مطرح است (Hedayati and Hassan Nataj, 2015). این نشانگرهای زیستی هیستوپاتولوژیک به منظور نظارت بر محیط زیست شامل بررسی اندام‌های هدف خاص مانند کلیه، کبد، آبشش، مغز، روده و...

می‌باشند، که عمدتاً وظیفه عملکردهای زیستی مانند دفع، تنفس، تجمع و انتقال زیستی زئوبیوتیک‌ها را در ماهیان به عهده دارند (Chamarthi *et al.*, 2014; Abarghuei *et al.*, 2016; Yancheva *et al.*, 2016).

بررسی تغییرات بافت آبشش می‌تواند شاخص مناسبی جهت تشخیص وجود سموم یا سایر آلاینده‌ها در محیط زندگی آبی باشد (Mishra and Mohanty, 2008; Yancheva *et al.*, 2016). آبشش‌های ماهی وظیفه تبادل گاز، تنظیم اسمزی، تنظیم اسید پایه، دفع نیترژن زائد، تنظیم اسید-باز را به عهده دارند (Farkas *et al.*, 2011; Vajargah *et al.*, 2018). همچنین، روده و دستگاه گوارش نیز مسیر اصلی عبور طیف وسیعی از مواد سمی از طریق جیره غذایی یا آب می‌باشند (Banerjee and Bhattacharya, 1995) که با بررسی آن می‌توان به ارزیابی دقیقی از آلاینده مدنظر پرداخت.

قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) یک گونه اقتصادی بسیار مهم می‌باشد. رشد سریع و سازگاری مناسب آن با شرایط پرورش از ویژگی‌های مناسب این گونه برای اهداف آبی‌پروری است. اگر چه مطالعات بسیاری در مورد تأثیر سموم آفلاتوکسین بر آبزیان در کشور گزارش شده است (Motallebi Moghanjouei, 2016; Khani *et al.*, 2017; Imani *et al.*, 2018; Mahmoudi Kia *et al.*, 2019). با این حال مطالعات محدودی در مورد تأثیر آفلاتوکسین بر بافت‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام شده است. همچنین در دیگر نقاط جهان نیز پژوهش‌های محدودی در این زمینه گزارش شده است (Santacroce *et al.*, 2008; Hooft *et al.*, 2011; Al-Bairuty *et al.*, 2013).

اثرات احتمالی آفلاتوکسین در گونه‌های مختلف ماهی از جمله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، ماهی آزاد اقیانوس اطلس، گربه ماهی کانالی، کپور معمولی، بررسی شده است (Jantraratotai *et al.*, 1990; Ellis *et al.*, 2000; Sahoo and Mukherjee, 2001 and 2002). مطالعات صورت گرفته نشان داده است که قزل‌آلای رنگین‌کمان

خوراک ماهی ساخت کارخانه فرادانه (با تجزیه تقریبی شامل ۴۲ درصد پروتئین خام، ۲۰ درصد چربی خام و انرژی ناخالص ۴۵۵۰ کالری بر کیلوگرم) سه بار در روز به میزان ۰/۵ درصد وزن بدن خود تغذیه شدند (Boujard et al., 2000; Khani et al., 2017; Imani et al., 2018). مخازن و سایر تجهیزات پرورش مورد استفاده قبل از ذخیره‌سازی، به وسیله محلول تجاری هیپوکلریت سدیم (۵ درصد) کاملاً ضدعفونی و سپس با آب شسته شو داده شدند. ماهیان در داخل ۹ مخزن ۳۰۰ لیتری (با حجم آبگیری ۲۰۰ لیتر) به تعداد ۲۳ قطعه در هر مخزن توزیع شدند. سه عدد از وان‌ها به ماهی‌های تیمار شاهد اختصاص یافت که با غذای تجاری بدون سم تغذیه شدند و در شش وان دیگر ماهی‌های تحت مطالعه به ترتیب با جیره‌های غذایی حاوی ۲۵ و ۵۰ ppb سم آفلاتوکسین ب ۱ به مدت ۶۰ روز تغذیه شدند. طی مدت آزمایش ماهیات به میزان ۲ درصد وزن بدن طی سه نوبت در روز تغذیه شدند. برای تنظیم میزان غذای مورد نیاز، کل ماهیان هر مخزن هر دو هفته یکبار توزین شدند. البته ماهیان پیش از هر بار توزین به مدت ۲۴ ساعت قطع غذا می‌شدند (Imani et al., 2018). اندازه‌گیری عوامل کیفی آب همچون دمای آب، اکسیژن محلول و pH به صورت روزانه انجام گرفت. در طول دوره پرورش میانگین دمای آب $17/0 \pm 3/2$ درجه سانتی‌گراد، pH آب برابر $7/6-7/9$ ، اکسیژن محلول $8/5 \pm 0/12$ ppm و سرعت جریان آب $3/2 \pm 0/2$ لیتر بر دقیقه بود.

۱.۲. ساخت جیره آزمایشی و غذادهی

برای این منظور غذای تجاری ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (کارخانه فرادانه شهرکرد، FFT2) تهیه و به کمک آسیاب ضدعفونی شده با الکل اتیلیک، آسیاب گردید. پس از کشت قارچ *Aspergillus flavus* روی نمونه غذای مورد استفاده طبق مطالعات قبلی و تعیین غلظت سم آفلاتوکسین ب ۱ در آن (Farzaneh et al., 2012; Khani et al., 2017)، مقادیر مختلف نمونه حاوی سم

حساس‌ترین گونه ماهی به آفلاتوکسین ب ۱ می‌باشد (Santacroce et al., 2008).

مطالعه Sahoo و همکاران در سال ۲۰۰۱ در زمینه بررسی اثرات حاد و تحت مزمن آفلاتوکسین بر ماهی *Labeo rohita* نشان داد که تغییرات در اندام‌های مختلف و بسته به دوز و زمان می‌باشد. سمیت با دوز حاد موجب تغییرات نکرولی و عروقی در کبد و لاملای آبشش‌ها شد، مننژیست و احتقان در مغز و نیز تغییرات نکرولی در لوله‌های کلیوی و ضخیم شدن مخاط روده از دیگر تغییرات مشاهده شده در این پژوهش بود.

با توجه به اهمیت این موضوع و نیز این واقعیت که ممکن است پلت‌های غذایی در رطوبت و دمای نامناسب بسته‌بندی شده و در شرایط نامناسب حمل و نقل و انبار گردند. همچنین، احتمال آلودگی نهاده‌های اولیه غذایی با این سم وجود دارد، یک مطالعه جامع به منظور بررسی تاثیر سم آفلاتوکسین ب ۱ بر بافت‌های مختلف ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ضروری به نظر می‌رسد. لذا هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر سم آفلاتوکسین ب ۱ بر بافت‌های آبشش، مغز، طحال و روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و شدت اثرگذاری آن است. به دلیل اهمیت روز افزون توجه به حضور میکوتوکسین‌ها در نهاده‌های غذایی، بر اساس نتایج این مطالعه می‌توان میزان شدت تخریب این سم را در بافت‌های مختلف ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مشخص کرده و میزان خطرات احتمالی این سم را در خوراک آبزیان پیش‌بینی نمود.

۲. مواد و روش کار

تعداد ۲۰۷ قطعه بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزن ابتدایی $9/67 \pm 0/2$ گرم از یکی از مراکز پرورش ماهی خصوصی واقع در شهرستان ارومیه تهیه و بصورت زنده به آزمایشگاه پرورش آبزیان دانشگاه ارومیه منتقل شد. ماهی‌ها در ابتدا به مدت یک هفته با شرایط آزمایشگاهی سازگار شدند. ماهیان طی مدت سازگاری با

(۲۰۰۵) استفاده شد.

۳. نتایج

نتایج آسیب‌شناسی بافت‌های آبشش، مغز، روده و زوائد پیلوریک ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با سطوح مختلف سم آفلاتوکسین در اشکال ۱ تا ۴ نمایش داده شده است. همچنین درجه‌بندی کمی آسیب‌های آبشش نیز در جدول ۱ قابل مشاهده است.

در بررسی بافت‌شناسی آبشش گروه شاهد هیچ گونه عارضه هیستوپاتولوژیکی را نشان نداد (شکل ۱ A). در گروه تیمار آفلاتوکسین با غلظت ۲۵ ppb (شکل ۱ B و C)، هیپرپلازی تیغه‌های ثانویه شایع‌ترین عارضه در این گروه بود، از دیگر تغییرات این گروه آز مایشی ادم در تیغه‌های ثانویه (فلش سفید) و نیز چماقی شدن این تیغه‌ها گزارش شد (فلش سیاه). آسیب‌های بافتی مشاهده شده در گروه تیمار آفلاتوکسین با غلظت ۵۰ ppb (شکل ۱ D و E) شدیدتر بوده و شامل آنوریسم (فلش سفید)، هیپرپلازی شدید تیغه‌ها، فیوزن و بهم چسبیدن تیغه‌ها (فلش سیاه رنگ)، آتروفی و تخریب شدید بافت آبشش (شکل ۱ D) بود.

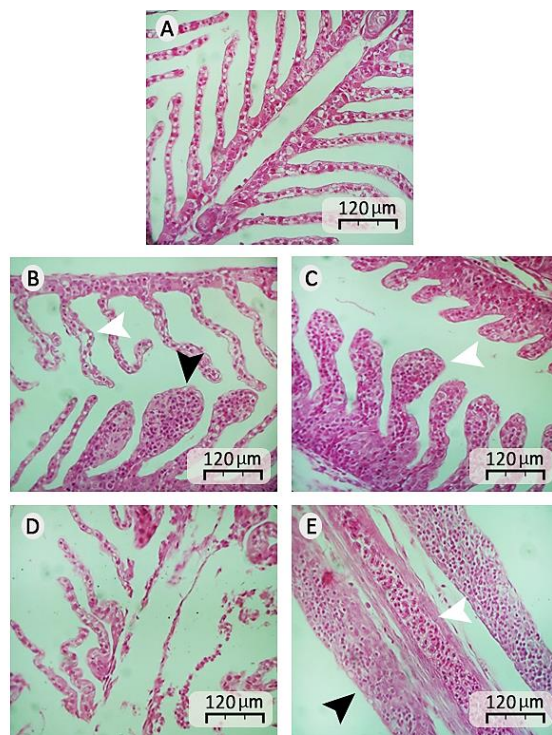
شکل (۲ A) بافت مغز طبیعی را با سلول‌های عصبی شفاف که دارای هسته‌ی مشخص هستند نشان می‌دهد، قرار گرفتن ماهیان در معرض آفلاتوکسین با غلظت ۲۵ تغییرات پرخونی عروق مغزی و ادم وازوژنیک را در مقایسه با گروه شاهد نشان داد (شکل ۲ B و C)، همچنین در این گروه آزمایشی واکوئله و اسفنجی شدن ماده سفید مغز (فلش سفید) و نیز کاریولیز یا همان از بین رفتن هسته نوروها (فلش سیاه) مشاهده شد. در گروه آزمایشی آفلاتوکسین با غلظت ۵۰ ppb (شکل ۲ D و E) نیز واکوئله و اسفنجی شدن ماده سفید مغز با شدت بیشتر نسبت به تیمار قبلی و نیز نکروز شدید نرونی و کاریولیز شدید مشاهده شد.

باتوجه به تیمارهای مورد نظر به جیره غذایی تجاری افزوده شد. سپس با افزودن رطوبت به میزان مورد نیاز، خمیر به دست آمده به کمک چرخ گوشت صنعتی به صورت رشته‌های نازک در آمد. رشته‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق خشک گردیدند. سپس رشته‌های حاصل در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد در آون به مدت یک شب نگهداری شدند تا به طور کامل خشک گردند. رشته‌های خشک شده به قطعات کوچکتری شکسته شدند. برای زدودن خاکه‌ها از الک با اندازه چشمه کوچکتر (۱ mm) استفاده گردید. در نهایت دان‌های تهیه شده در کیسه‌های فریزر یک کیلوگرمی به همراه مقداری ژل نم‌گیر با ثبت تاریخ ساخت، در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. غذادهی ماهیان بر اساس وزن بدن و دمای آب در روز به صورت ۳ وعده انجام شد (Lovell, 2003).

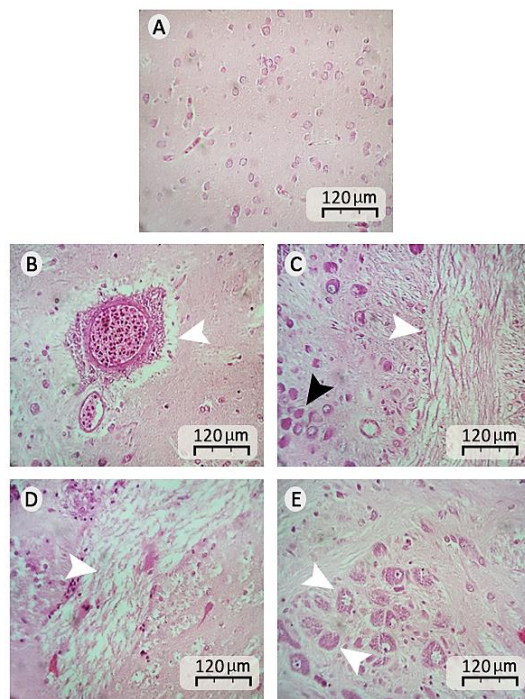
پس از گذشت ۶۰ روز، برای انجام مطالعات هیستوپاتولوژیک، از هر وان ۳ قطعه ماهی انتخاب شدند و پس از کالبدگشایی از بافت‌های آبشش، مغز، روده و زوائه پیلوریک آن‌ها نمونه‌برداری شد. بدین منظور روده از چربی احشایی آزاد و سپس نمونه‌هایی از روده دیستال درست قبل از مقعد (طول ۱/۵ تا ۲ سانتی‌متر) با دقت برداشته شد (Hoof et al., 2011).

۲.۲. بررسی هیستوپاتولوژیکی بافت‌ها

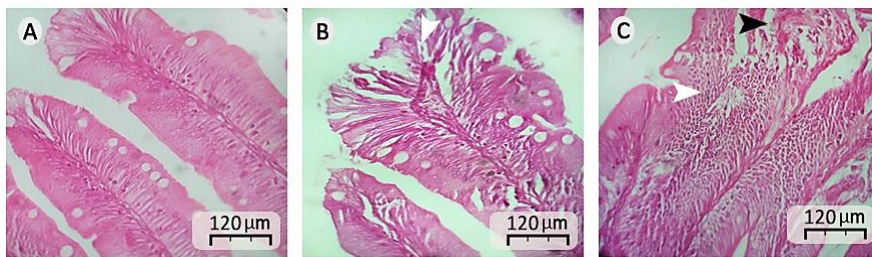
نمونه‌ها با روش‌های مرسوم بافت‌شناسی کلاسیک مورد مطالعه بافتی قرار گرفتند. به این ترتیب که ابتدا نمونه‌های بافت در محلول بوئن به مدت ۷۲ ساعت تثبیت شدند. سپس به ترتیب مراحل آبگیری، شفاف‌سازی با گزیلول، آغشتگی با پارافین و قالب‌گیری انجام شد (Khani et al., 2017). پس از مراحل آماده‌سازی بافتی و تهیه بلوک‌های پارافینی، مقاطعی به ضخامت ۵ میکرون از بافت‌ها تهیه و به روش هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. سپس نمونه‌ها توسط میکروسکوپ نوری و بزرگ‌نمایی ۴۰۰ بررسی شدند. برای توصیف شدت تغییر آسیب‌شناسی از روش Riba و همکاران



شکل ۱- تصویر بافت آبشش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمار شاهد (شکل A)، گروه درمانی آفلاتوکسین غلظت ۲۵ ppb (شکل B و C)، گروه درمانی آفلاتوکسین غلظت ۵۰ ppb (شکل D و E)، رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین با درشت نمایی ۴۰۰.



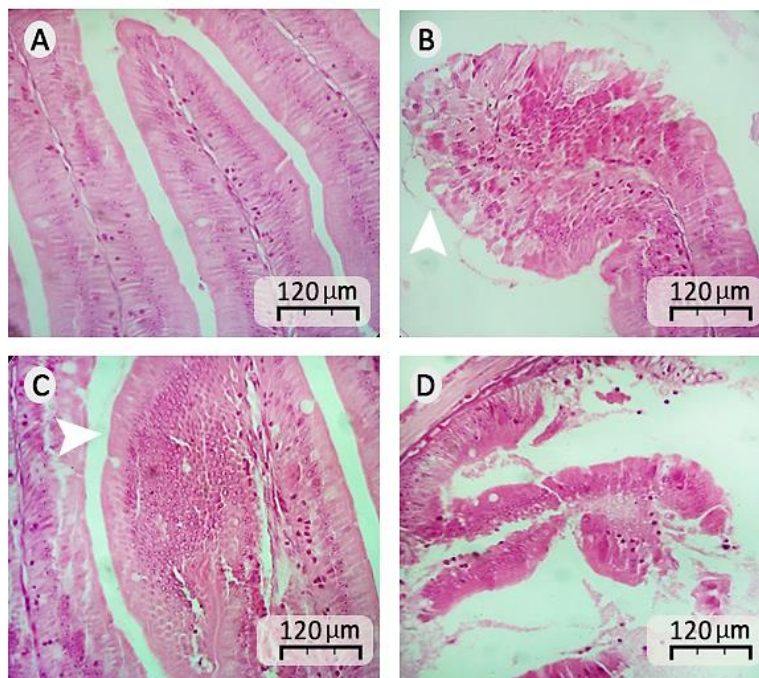
شکل ۲- تصویر بافت مغز ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمار شاهد (A)، گروه درمانی آفلاتوکسین غلظت ۲۵ ppb (شکل B و C)، گروه درمانی آفلاتوکسین غلظت ۵۰ ppb (شکل D و E)، رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین با درشت نمایی ۴۰۰.



شکل ۳- تصویر بافت روده ماهی قزل آلابی رنگین کمان در تیمار شاهد (شکل A)، گروه درمانی آفلاتوکسین غلظت ۲۵ ppb (شکل B)، گروه درمانی آفلاتوکسین غلظت ۵۰ ppb (شکل C)، رنگ آمیزی هماتوکسیلین اتوزین با درشت نمایی ۴۰۰.

بررسی بافت شناسی زوائد پیلوریک گروه شاهد هیچ گونه عارضه هیستوپاتولوژیکی را نشان نداد (شکل ۴، A). در گروه تیمار آفلاتوکسین با غلظت ۲۵ ppb (شکل ۴، B) عارضه اصلی نکروز راسی پرزهای زوائد پیلوریک بود (فلش سفید رنگ). با بالا رفتن غلظت آفلاتوکسین در گروه تیمار آفلاتوکسین ۵۰ ppb (شکل ۴، C و D) هیپرپلازی شدید پرزها (فلش سفید رنگ شکل ۴، C) و نکروز و تخریب شدید پرزهای مخاط این زوائد (شکل ۴، D) مشاهده شد.

همانطور که در شکل (۳، A) قابل مشاهده است، روده ماهیان گروه شاهد دارای ساختار طبیعی است. بافت روده در گروه تیمار آفلاتوکسین با غلظت ۲۵ ppb آسیب‌هایی نظیر تخریب و نکروز راسی پرزهای روده را نشان می‌دهد (شکل ۳، B)، این در حالی است که در گروه تیمار آفلاتوکسین با غلظت ۵۰ ppb نفوذ سلول‌های التهابی در پرزهای روده و ضخیم شدن پرزها (فلش سفید) و همچنین نکروز شدید آنتروسیت‌ها (فلش سیاه) قابل مشاهده بود (شکل ۳، C).



شکل ۴- تصویر بافت زوائد پیلوریک ماهی قزل آلابی رنگین کمان تیمار شاهد (شکل A)، گروه درمانی آفلاتوکسین غلظت ۲۵ ppb (شکل B)، گروه درمانی آفلاتوکسین غلظت ۵۰ ppb (شکل C و D)، رنگ آمیزی هماتوکسیلین اتوزین با درشت نمایی ۴۰۰.

جدول ۱- مقایسه عوارض هیستوپاتولوژیک آبشش ماهی قزل آلابی رنگین کمان گروه‌های مختلف آزمایشی در انتهای دوره پرورش

غلظت سم (ppb)			آسیب
۵۰ آفلاتوکسین	۲۵ آفلاتوکسین	شاهد	
+++	++	+	هیپرپلازی تیغه‌های ثانویه
+++	+	-	بهم چسبیدگی تیغه‌ها (فیوژن)
+++	+	-	آنورسم لاملائی
+++	-	-	تخریب شدید لاملا
+++	++	-	ادم
+++	++	-	چماقی شدن تیغه‌ها

«-»: بدون عارضه؛ «+»: عارضه خفیف؛ «++»: عارضه متوسط؛ «+++»: عارضه شدید

جدول ۲- مقایسه عوارض هیستوپاتولوژیک مغز ماهی قزل آلابی رنگین کمان گروه‌های مختلف آزمایشی در انتهای دوره پرورش

غلظت سم (ppb)			آسیب
۵۰ آفلاتوکسین	۲۵ آفلاتوکسین	شاهد	
++	+++	-	پر خونی عروق مغزی
+	++	-	ادم واژونیک
++	+	-	هسته‌های پیکنوتیک
+++	+	-	واکوئله و اسفنجی شدن ماده سفید مغز
+++	+	-	کاربولیز
+++	+	-	نکروز شدید نورونی

«-»: بدون عارضه؛ «+»: عارضه خفیف؛ «++»: عارضه متوسط؛ «+++»: عارضه شدید.

جدول ۳- مقایسه عوارض هیستوپاتولوژیک روده ماهی قزل آلابی رنگین کمان گروه‌های مختلف آزمایشی در انتهای دوره پرورش

غلظت سم (ppb)			آسیب
۵۰ آفلاتوکسین	۲۵ آفلاتوکسین	شاهد	
++	+	-	نکروز و تخریب پرزهای روده
+++	+	+	نفوذ سلول‌های التهابی در پرزهای روده
+++	+	-	ضخیم شدن پرزها
+++	+	-	نکروز شدید آنتروسیت‌ها

«-»: بدون عارضه؛ «+»: عارضه خفیف؛ «++»: عارضه متوسط؛ «+++»: عارضه شدید.

جدول ۴- مقایسه عوارض هیستوپاتولوژیک زوائد پیلوریک ماهی قزل آلابی رنگین کمان گروه‌های مختلف آزمایشی در انتهای دوره پرورش

غلظت سم (ppb)			آسیب
۵۰ آفلاتوکسین	۲۵ آفلاتوکسین	شاهد	
+++	+	-	هیپرپلازی شدید پرزهای پیلور
+++	+	-	نکروز و تخریب شدید پرزهای پیلور

«-»: بدون عارضه؛ «+»: عارضه خفیف؛ «++»: عارضه متوسط؛ «+++»: عارضه شدید.

۴. بحث و نتیجه گیری

تغذیه و اطمینان از سلامت غذای مصرفی یکی از ارکان اصلی توسعه صنعت آبی پروری تلقی می شود. با این حال گزارش های متعدد حاکی از این است که در خوراک تولیدی آبزیان سموم، میکروب ها، قارچ ها و متابولیت های آنها به ویژه آفلاتوکسین ها وجود دارند که منجر به کاهش کیفیت جیره غذایی و همچنین اتلاف سرمایه و به دنبال آن افزایش هزینه های تولید می گردد (Azimi et al., 2013).

مطالعه حاضر نشان داد که تغذیه با جیره غذایی آلوده به سم آفلاتوکسین حتی در غلظت ۲۵ ppb و به مدت محدود ۶۰ روز باعث آسیب هایی در بافت آبشش نظیر ادم در تیغه ثانویه، چماقی شدن به علت هیپرپلازی، تورم و به هم چسبیدن تیغه های ثانویه، آنوریسم لاملائی و برآمدگی بافت پوششی می شود.

مطالعات متعددی نشان داده اند که آفلاتوکسیکوز اغلب با تغییرات ساختاری در بافت اندام های حیاتی از جمله کبد، کلیه، تیموس، طحال، روده و تولیدمثل همراه است (Sahoo, 2000; Gallo et al., 2010). همچنین مطالعه Hooft و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان داده است که مواجهه با دی اکسی نی والنول باعث تغییر رنگ، دژنراسیون چربی، هایپرپلازی، انسداد مجرای صفراوی و تومورهای کبدی در ماهی قزل آلی رنگین کمان می شود. هایپرپلازی افزایش غیرطبیعی تعداد سلول های اپیتلیوم آبشش است. این عارضه و به هم چسبیدن لاملاها و برآمدگی بافت پوششی، بر تبادل اکسیژن و فعالیت تنفسی آبی تاثیر گذاشته و در حالات شدیدتر می تواند منجر به اتصال تیغه های مجاور به یکدیگر شوند، که سرانجام جذب اکسیژن را مختل نموده و منجر به هیپوکسی سیستمیک می شود (Bilberg et al., 2010, Al-Bairuty et al., 2013).

بر اساس نتایج Stewart and Larson (2002) سه شکل پاتولوژیک آفلاتوکسیکوز حاد، تحت حاد و مزمن قابل توصیف است. آفلاتوکسیکوز حاد در ماهی، مانند

سایر حیوانات، در صورت تزریق دوزهای متوسط تا زیاد آفلاتوکسین رخ می دهد. علائم آفلاتوکسیکوز حاد در ماهی قزل آلی رنگین کمان کم خونی، آبشش کم رنگ و ادم بیان شده است (Stewart and Larson, 2002). گونه های مختلف ماهی از نظر حساسیت به AFB_1 بسیار متفاوت هستند و ماهی قزل آلی رنگین کمان نسبت به AFB_1 بسیار حساس است (Hendricks, 1994). با این وجود، گونه های دیگر مانند گربه ماهی تنها در دوزهای بالا تحت تأثیر قرار می گیرند (Jantrarotai and Lovell, 1990; Jantrarotai et al., 1990).

مغز مرکز کنترل کلیه عملکردها و حرکات بدن موجودات مانند ماهی است که به عنوان حالت رله عمل می کند (Chamarthi et al., 2014). در مطالعه حاضر، نکروز در نورون های مغز و ایجاد واکوئل در ماده سفید مغز مشاهده شد. این تغییرات می تواند به مهار احتمالی یا کاهش فعالیت کولینرژیک مربوط باشد (Chamarthi et al., 2014). همچنین در این آزمایش در دو گروه تیمار با غلظت ۲۵ و ۵۰ ppb آفلاتوکسین عارضه کاریولیز مشاهده شد، که در تیمار ۵۰ ppb این عارضه شدیدتر بود. به طور کلی کاریولیز شامل از بین رفتن کروماتین هسته سلول ها تحت تاثیر فعالیت DNAase می باشد (Cotran et al, 1994). نکروز نیز یک نوع آسیب سلولی محسوب می شود، که شامل مرگ زودرس سلول ها در بافت ها می باشد. نکروز توسط فاکتورهای خارجی همچون عفونت، مواد سمی و غیره اتفاق می افتد که منجر به هضم غیر متعادل و برنامه ریزی نشده مواد سلولی می شود (Proskuryakov et al, 2003). بررسی ضایعات بافتی مغز ماهیان مختلف از جمله *Channa punctatus* ناشی از حضور آلاینده ها در آب نظیر سموم ارگانوفسفره ها آسیب هایی همچون نکروز، واکوئولاسیون و تخریب شدن بافت ها را نشان می دهد (Mishra and Devi, 2014).

آسیب شناسی بافت مغز گربه ماهی *Rhamdia quelen* تغذیه شده با غذای آلوده به سم آفلاتوکسین ب ۱ کاهش خفیف در اندازه نورون ها،

اولیه بافت مخاط روده و ناپدید شدن پرزهای روده گزارش شد. بر اساس گزارشات موجود، سلول اپیتلیال روده اولین سلول‌های دستگاه گوارش هستند است که با متابولیسم این سموم در فرآیند سم‌زدایی و در نتیجه جلوگیری از ورود مایکوتوکسین‌ها به داخل بافت‌های زیرین درگیر هستند. طی این فرآیند متابولیسمی ترکیبات سمی تری همچون اپوکسیدها شکل می‌گیرند که در صورت اختلال در ادامه مراحل متابولیسم یا تداوم در ورود این سموم به بدن سبب از بین رفتن سلول‌ها و سرانجام بافت‌ها و اندام‌ها می‌شوند (Fan et al., 2018).

در مطالعه مشابه صورت گرفته توسط Farabi و همکاران (۲۰۱۱) مسمومیت با آفلاتوکسین B₁ در فیل ماهی‌های جوان سبب بروز علائم کلینیکی چون خونریزی در ناحیه سر، پلاک‌های استخوانی ردیف شکمی، ایجاد خمیدگی در ستون فقرات و همچنین ظهور نقاط زرد رنگ در ناحیه سینه‌ای گردید. Amany و همکاران (۲۰۰۹)، چنین عنوان کردند که سم آفلاتوکسین سبب متورم شدن و حالت شکننده پیدا کردن کلیه‌ها و تغییر رنگ آن به قرمز تیره، تغییر رنگ آبشش‌ها به قرمز تیره و پر شدن حفره آبششی از ترشحات موکوسی در گونه *Oreochromis niloticus* می‌شود.

در مطالعه‌ای که توسط Sahoo و همکاران (۲۰۰۱) در ارتباط با اثرات مسمومیت حاد (دوزهای ۷/۵، ۱۱/۲۵ و ۱۳/۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۱۰ روز) و مزمن (دوزهای ۱/۲۵ و ۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۹۰ روز) آفلاتوکسین B₁ در *Labeo rohita* انجام گرفت، مشخص شد که مسمومیت حاد موجب افزایش تلفات شد. همچنین در اندام‌های مختلف سبب ضایعاتی مانند ادم پیرامون عروق خونی و نکروز بافت کبد و آبشش، پرخونی مغز، تغییرات التهابی و دژنراتیو قلب، تغییرات دژنراتیو و نکروتیک توبول‌های کلیه و تخریب و کنده شدن مخاط روده شد. علاوه بر این، مسمومیت مزمن موجب بروز ضایعات پیش سرطانی مانند آدنوما کبدی و هیپرپلازی و اتصال کامل تیغه‌های آبشش و نفوذ سلول‌های التهابی

تغییرات در فرم سلول عصبی و از بین رفتن هسته، هفت روز بعد از تغذیه با جیره غذایی آلوده به آفلاتوکسین را نشان داد. این در حالی بود که با افزایش دوره آزمایش به مدت ۱۴ روز کاهش شدید در اندازه نوروها و کروماتولیز سلول عصبی مشاهده شد. در نهایت ۲۱ روز پس از تغذیه با این جیره غذایی آلوده، تکثیر پراکنده میکروگلیا و آستروسیت‌ها و تخریب نوروپیل گزارش شد (Baldissera et al., 2018).

در بررسی اثر آفلاتوکسین جیره غذایی در ماهی ازون برون، جراحی نظیر نقاط خون‌ریزی در ناحیه سر، سرپوش آبششی در تیمار ۷۵ و ۱۰۰ ppb مشاهده شد (Motallebi Moghanjoui, 2016). همچنین مطالعه‌ی دیگری که توسط Mahmoudi Kia و همکاران (۲۰۱۹)، روی تاثیر همزمان تراکم پرورش و آلودگی جیره غذایی با سم آفلاتوکسین B₁ بر فیزیولوژی دستگاه گوارش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام شد، مشخص گردید که پرزهای روده ماهیان پرورشی در تراکم بالا که با جیره غذایی دارای ۵۰ ppb آفلاتوکسین تغذیه شده بودند، دچار تخریب شد. این یافته نشان می‌دهد که در شرایط آبی‌پروری کنونی که تاکید بر افزایش تراکم پرورش در واحد سطح می‌باشد، حضور آلاینده‌های غذایی همچون آفلاتوکسین ب ۱ سبب تشدید عوارض بافت‌شناسی، مشابه مواردی که در مطالعه حاضر به آن اشاره شد، می‌گردد.

در مطالعه صورت گرفته توسط Huang در سال ۲۰۱۹ اثرات سم T-2 که یک مایکوتوکسین طبیعی است و اغلب از طریق تغذیه با خوراک آلوده بروز می‌نماید، مشخص شد که در میگوهای *Litopenaeus vannamei* تغذیه شده با جیره غذایی آلوده به سم T-2 در مقایسه با تیمار شاهد، به طور قابل توجهی کاهش وزن، کاهش سرعت رشد ویژه مشهود بود. همچنین در این مطالعه آسیب‌شناسی بافت روده میگو شامل دژنراسیون و نکروز بافتی، بسته به غلظت سم در جیره غذایی متفاوت بود، بطوری که با افزایش غلظت سم T-2 جیره غذایی، التهاب

در آبزبان تحت تاثیر عواملی از جمله گونه آبی، جنس، سن، وزن و شدت آلودگی و مدت زمان تغذیه با جیره غذایی آلوده می‌باشد (Stewart and Larson, 2002). به عنوان جمع‌بندی نهایی می‌توان عنوان کرد که مواجهه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با سطوح مورد مطالعه آفلاتوکسین ب ۱، باعث ایجاد اثرات تخریبی بر بافت‌های مختلف این گونه می‌شود. همچنین، این عوارض و تخریب‌های بافتی با افزایش غلظت سم در جیره غذایی شدت یافت. بنابراین، مطالعه آسیب‌شناختی این بافت‌ها می‌تواند نشان‌گر زیستی مناسبی برای وجود آفلاتوکسین ب ۱ در جیره غذایی و تبعات بعدی آن بر سلامت و عملکرد آبی پرورشی باشد.

تک هسته‌ای در زیر مخاط روده شد. همچنین در مطالعه Mwihia و همکاران (۲۰۱۸) در مورد اثرات آفلاتوکسین بر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و ماهی تیلاپپای نیل نتایجی مانند شکم متورم، کبد بزرگ دارای ندول‌های سفید تا زرد رنگ در نتیجه آلودگی غذای ماهیان به سم آفلاتوکسین به دست آمد. در مطالعه دیگری که بر روی گر به ماهی انجام گرفت، مشخص شد که وجود اکراتوکسین A در جیره غذایی موجب کاهش رشد و هماتوکریت ماهیان شد. همچنین، آلودگی جیره غذایی موجب تغییرات هیستوپاتولوژیک در کبد و کلیه گربه ماهیان گردید. مشخص شده است که میزان صدمات ناشی از تغذیه با جیره‌های غذایی آلوده به آفلاتوکسین

References

۵. منابع

- Abarghuei, S., Hedayati, A., Ghorbani, R., Kolangi, H., Bagheri, T. 2016. Histopathological effects of waterborne silver nanoparticles and silver salt on the gills and liver of goldfish. *International Journal of Environmental Science and Technology* 13(7), 1753–1760.
- Aggarwal, B. B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R. S., Seeram, N. P., Shishodia, S., Takada, Y. 2004. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: Preclinical and clinical studies'. *Anticancer Research*, 24(5A), 2783–2840.
- Al-Bairuty, G. A., Shaw, B. J., Handy, R. D., Henry, T. B. 2013. Histopathological effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on the organs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 126, 104-115.
- Amany, M. K., Hala, M., Mohammad, M., Abdel-Wahab, M. 2009. Pathological studies on effects of aflatoxin on *Oreochromis niloticus* with application of different trials of control. *Egyptain Journal of Comparative Pathology and Clinical Pathology* 22(1) 175-193.
- Azimi, J., Karimi Torshizi, M. A., Allameh, A., Ahari, H. 2013. Effects of adding of two commercial absorbent materials and natural zeolite to the diets contaminated with aflatoxin B₁ on broiler performance and their immune system. *Iranian Journal of Animal Science Research* 4 (4), 292-297 (In Persian).
- Baldissera, M. D., Souza, C. F., Zeppenfeld, C. C., Descovi, S. N., Moreira, K. L. S., da Rocha, M. I. U., Baldisserotto, B. 2018. Aflatoxin B₁-contaminated diet disrupts the blood–brain barrier and affects fish behavior: involvement of neurotransmitters in brain synaptosomes. *Environmental toxicology and pharmacology*, 60, 45-51.
- Banerjee, S., Bhattacharya, S. 1995. Histopathological changes induced by chronic nonlethal levels of elsan, mercury, and ammonia in the small intestine of *Channa punctatus* (Bloch). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 31, 62–68.
- Bennett, J. W., and Klich, M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 497–516.
- Bilberg, K., Malte, H., Wang, T., Baatrup, E. 2010. Silver nanoparticles and silver nitrate cause respiratory stress in eurasian perch (*Perca fluviatilis*). *Aquatic Toxicology* 96, 159–165.
- Boonyaratpalin, M., Supamattaya, K., Verakunpiriya, V., Suprasert, D. 2001. Effects of aflatoxin B₁ on growth performance, blood components, immune function and histopathological changes in black tiger shrimp (*Penaeus monodon Fabricius*). *Aquaculture Research* 32(s1), 388-398.

- Boujard, T., Burel, C., Médale, F., Haylor, G., Moisan, A. 2000. Effect of past nutritional history and fasting on feed intake and growth in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Living Resources* 13(3), 129-137.
- Chamarthi, R. R., Bangeppagari, M., Gooty, J. M., Mandala, S., Tirado, J. O., Marigoudar, S. R. 2014. Histopathological alterations in the gill, liver and brain of *Cyprinus carpio* on exposure to quinalphos. *American Journal of Life Sciences* 2(4), 211-216.
- Chavez-Sanchez, M. C., Palacios, C. M., Moreno, I. O., 1994. Pathological effects of feeding young *Oreochromis niloticus* diets supplemented with different levels of aflatoxin B₁. *Aquaculture*, 127(1), 49-60.
- Cotran, R. S., Kumar, V., Robbins, S. L. 1994. Robbins pathologic basis of disease (No. RB 111. R623 1994).
- Ellis, R. W., Clements, M., Tibbetts, A., Winfree, R. 2000. Reduction of the bioavailability of 20 ppm aflatoxin in trout feed containing clay. *Aquaculture* 183(1), 179-188.
- Fan, W., Lv, Y., Ren, S., Shao, M., Shen, T., Huang, K., Zhou, J., Yan, L., Song, S. 2018. Zearalenone (ZEA)-induced intestinal inflammation is mediated by the NLRP3 inflammasome. *Chemosphere* 190, 272-279.
- Farabi, S. M. V., Yousefian, M., Hajimoradloo, A. 2006. Aflatoxiosis in juvenile *Huso huso* fed a contaminated diet. *Journal of Applied Ichthyology* 22(Suppl.), 234-234.
- Farkas, J., Christian, P., Gallego-Urrea, J. A., Roos, N., Hassellöv, M., Tollefsen, K. E., Thomas, K. V. 2011. Uptake and effects of manufactured silver nanoparticles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill cells. *Aquatic Toxicology*, 101(1), 117-125.
- Farzaneh, M., Shi, Z.Q., Ghassempour, A., Sedaghat, N., Ahmadzadeh, M., Mirabolfathy, M., Javan-Nikkhah, M. 2012. Aflatoxin B₁ degradation by *Bacillus subtilis* UTBSP1 isolated from pistachio nuts of Iran. *Food Control* 23(1), 100-106.
- Gallo, A., Masoero, F., Bertuzzi, T., Piva, G., Pietri, A. 2010. Effect of the inclusion of adsorbents on aflatoxin B₁ quantification in animal feedstuffs. *Food Additives and Contaminant*, 27(1), 54-63.
- Gopinath, R., Paul Raj, R. 2009. Histological alterations in the hepatopancreas of *Penaeus monodon Fabricius* (1798) given aflatoxin B₁-incorporated diets. *Aquaculture Research* 40, 1235-1242.
- Hedayati, A., Hassan Nataj Niazie, E. 2015. Hematological changes of silver carp in response to diazinon pesticide. *Journal of Environmental Health Science and Engineering* 13(1), 52.
- Hendricks, J. D. 1994. Carcinogenicity of aflatoxins in nonmammalian organisms. In: Eaton, D.L., Groopman, J.D. (Eds.), *Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance*. Academic Press, San Diego pp. 103-136.
- Hooft, J. M., Elmor, A. E. H. I., Encarnação, P., Bureau, D. P. 2011. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is extremely sensitive to the feed-borne fusarium mycotoxin deoxynivalenol (DON). *Aquaculture* 311(1), 224-232.
- Huang, Z., Wang, Y., Qiu, M., Sun, L., Deng, Y., Wang, X., Bi, S., Gooneratne, R., Zhao, J. 2019. Effects of T-2 toxin on digestive enzyme activity, intestinal histopathology and growth in shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Scientific reports* 9(1), 1-8.
- Imani, A., Bani, M. S., Noori, F., Farzaneh, M., Moghanlou, K. S. 2018. The effect of bentonite and yeast cell wall along with cinnamon oil on aflatoxicosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Digestive enzymes, growth indices, nutritional performance and proximate body composition. *Aquaculture* 476, 160-167.
- Jantrarotai, W., Lovell, R. T. 1990. Subchronic toxicity of dietary aflatoxin B₁ to channel catfish. *Journal Aquatic Animal Health*, 2, 248-254.
- Jantrarotai, W., Lovell, R. T., Grizzle, J. M. 1990. Acute toxicity of dietary aflatoxin B₁ to channel catfish. *Journal Aquatic Animal Health* 2, 237-247.
- Khani, S., Sarvi moghanlou, K., Imani, A., Agh, N., Razi, M. 2017. The Protective Effect of Dietary Cinnamon Essential Oil (*Cinnamomum verum*) Supplementation in Reducing the Toxicity of Aflatoxin B₁ to Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fingerlings, *Journal of Fisheries* 69(4), 481-495 (In Persian).
- Lovell, R. T. 2003. Diet and Fish Husbandry. In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), *Fish Nutrition*, third ed. Academic Press, San Diego pp. 703-754.

- Mahmoudi Kia, Z., Imani, A., Sarvi Moghanloo, K., Razi, M. 2019. Effect of simultaneous rearing densities, Aflatoxin B₁ toxin and herb powder mixture on digestive physiology of rainbow trout. *Iranian Journal of Fisheries* 28(1), 107-117 (In Persian).
- Matejova, I. (2017). Impact of mycotoxins on aquaculture fish species: A review. *Journal of the World Aquaculture Society* 48, 186-200.
- Mishra, A., Devi, Y. 2014. Histopathological alterations in the brain (optic tectum) of the fresh water teleost *Channa punctatus* in response to acute and subchronic exposure to the pesticide Chlorpyrifos. *Acta histochemica* 116(1), 176-181.
- Mishra, A. K., Mohanty, B. 2008. Acute toxicity impacts of hexavalent chromium on behavior and histopathology of gill, kidney and liver of the freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 26(2), 136-141.
- Motallebi Moghanjoui, M., 2016. Study and evaluation of economical and wellbeing effects of aflatoxins in some Iranian aquaculture. *Research project of the Fisheries Sciences Research Institute of Iran*. pp. 298 (In Persian).
- Mwihia, E. W., Mbutia, P. G., Eriksen, G. S., Gathumbi, J. K., Maina, J. G., Mutoloki, S., Lyche, J. L. 2018. Occurrence and levels of aflatoxins in fish feeds and their potential effects on fish in Nyeri, Kenya. *Toxins* 10(12), 543.
- Proskuryakov, S. Y., Konoplyannikov, A. G., Gabai, V. L. 2003. Necrosis: a specific form of programmed cell death. *Experimental cell research* 283(1), 1-16.
- Riba, I., Blasco, J., Jiménez-Tenorio, N., de Canales, M. G., DelValls, T. A. 2005. Heavy metal bioavailability and effects: II. Histopathology–bioaccumulation relationships caused by mining activities in the Gulf of Cádiz (SW, Spain). *Chemosphere* 58(5), 671-682.
- Sahoo, P. K. 2000. Histological distribution and ultrastructure of exocrine pancreas in Indian major carp (*Labeo rohita* Ham.) and its alteration in aflatoxicosis. *Bangladesh Journal of Fisheries Research* 4(1), 1–6.
- Sahoo, P. K., Mukherjee, S. C. 2002. Influence of high dietary α -tocopherol intakes on specific immune response, nonspecific resistance factors and disease resistance of healthy and aflatoxin B₁-induced immunocompromised Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton). *Aquaculture Nutrition* 8(3), 159–167.
- Sahoo, P. K., Mukherjee, S. C., Nayak, S. K., Dey, S. 2001. Acute and subchronic toxicity of aflatoxine B₁ to rohum *Labeo rohita* (Hamilton). *Indian Journal of Experimental Biology* 39, 453-458.
- Santacroce, M. P., Conversano, M. C., Casalino, E., Lai, O., Zizzadoro, C., Centoducati, G., Crescenzo, G. 2008. Aflatoxins in aquatic species: metabolism, toxicity and perspectives. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 18(1), 99–130.
- Stewart, D., Larson E. 2002. Aflatoxicosis in wildlife. Information sheet 1582. Mississippi state univ. Extension service. Cooperating with U.S. Dept. of Agriculture steyn ps (1995) Mycotoxins, general view. Chemistry and structure. *Toxicollett* 82/83, 843 -851.
- Vajargah, M. F., Mohamadi Yalsuyi, A., Hedayati, A., Faggio, C. 2018. Histopathological lesions and toxicity in common carp (*Cyprinus carpio* L. 1758) induced by copper nanoparticles. *Microscopy Research and Technique* 81(7), 724–729.
- Yancheva, V., Velcheva, I., Stoyanova, S., Georgieva, E. 2016. Histological biomarkers in fish as a tool in ecological risk assessment and monitoring programs: a review. *Applied Ecology and Environmental Research* 14(1), 47-75.

