

مطالعه آزمایشگاهی اثرات غلظت‌های مختلف بنزوآلفاپایرن بر ساختار بافتی کلیه هامور معمولی

(Epinephelus coioides)

مهدی زارعی^{۱*}، نگین سلامت^۱، محمد باقر نبوی^۱، علیرضا صفاهیه^۱، کمال غانمی^۲

۱. گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران.

۲. گروه شیمی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران.

* نویسنده مسئول: milad.zarei86@Gmail.com

چکیده

بنزوآلفاپایرن (BaP) یکی از مهم‌ترین ترکیبات آروماتیک چندحلقه‌ای نفتی (PAH) می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر هیستوپاتولوژیک آلاینده بنزوآلفاپایرن بر روی کلیه ماهی هامور معمولی در شرایط آزمایشگاهی بود. بدین منظور ۱۰۰ قطعه ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) پس از طی یک هفته دوره سازگاری، به مدت هفت روز در مجاورت غلظت‌های متفاوت بنزوآلفاپایرن (دزهای ۰،۲، ۲۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) در شرایط ثابت آزمایشگاهی قرار داده شدند. در روزهای چهارم، هفتم و چهاردهم تعداد ۶ قطعه ماهی از هر تیمار به طور تصادفی انتخاب شد و پس از ثبوت بافت کلیه در محلول بوئن به مدت دو هفته، به روش هماتوکسین-ائوزین رنگ‌آمیزی و مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج حاصله شامل ضایعاتی نظیر کاهش یا انسداد فضای ادراری، اتساع مویرگ-های گلوبولوی، ضخیم شدن غشاء پایه گلوبولوی، دژنراسانس سلول‌های لوله‌های ادراری و جدا شدن سلول‌ها از غشاء پایه، نفوذ لوکوسیت‌ها، خونریزی و نکروز لوله‌های ادراری بود. لازم به ذکر است با افزایش غلظت بنزوآلفاپایرن وسعت و شدت ضایعات افزایش یافت. کلمات کلیدی: بنزوآلفاپایرن، کلیه، هامور معمولی، هیستوپاتولوژی.

مقدمه

. بنزوآلفاپایرن^۲ (BaP) یک آلاینده محیط زیستی است که در آب، هوا و رسوبات حضور دارد. این ماده یک هیدروکربن آروماتیک پنج حلقه‌ای است که از اشتعال مواد آلی حاصل می‌شود (Carlson et al., 2002). مطالعات اخیر نشان داده که بنزوآلفاپایرن یکی از مهمترین و سرطان-زاترین ترکیبات آروماتیک می‌باشد. مطالعات همه‌گیری-شناسی فراوانی، اثرات ایمونوتوکسیک، ناقص‌الخلقه‌زایی، تغییرات کروموزومی (القائه ضایعه میکرونوکلئوکروموزومی)، موتاژنیک و سرطان‌زایی بنزوآلفاپایرن را اثبات کرده‌اند (Miller and Olejnik, 2001). این ترکیب در غلظت‌های

هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی^۱ ترکیبات چربی دوستی هستند که به وفور در محیط‌های آبی آلوده یافت می‌گردند (Schafer and Kohler, 2009). این ترکیبات اصولاً به خاطر پایداری ساختمان شیمیایی و مقاومت ذاتی در برابر تجزیه زیستی و غیر زیستی جزء آلاینده‌های آلی پایدار محسوب می‌شوند. آنها قادر به تجمع در لابستر، خرچنگ، نرم‌تنان، کفزیان و ماهیان بوده و ممکن است در این موجودات برای مدتی باقی مانده و یا حتی تبدیل به متابولیت‌های سرطان‌زای فعال شوند (Richard et al., 2008)

1-polycyclic Aromatic Hydrocarbon(PAH)

2-Benzo[a]pyrene (BaP)

همچنین ضخیم شدن غشای پایه می‌باشند (Spies et al., 1996). در مطالعه حاضر، گونه مورد استفاده ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) می‌باشد. هامور ماهیان به دلیل گوشت لذیذشان از با ارزش‌ترین ماهیان دریایی و همچنین از پرطرفدارترین ماهیان جنوب کشور می‌باشند (Assadi and Dehghani, 1997). از لحاظ شکل ظاهری بدن این ماهی دوکی شکل بوده و کمی از پهلوها فشرده است. این ماهیان متعلق به خانواده Serranidae بوده که هرمافرودیت پروتوزینوس می‌باشند، بدین معنی که در طی دوره زندگی تغییر جنسیت داده و از فرم ماده به نر تبدیل می‌گردند (Abbassi et al., 2007). این ماهیان اغلب گوشت‌خوار بوده و در قسمت بالایی زنجیره غذایی قرار دارند و به طور عمده از ماهیان، سخت پوستان و سرپایان تغذیه می‌کنند (Randall et al., 1996). تا کنون ۱۱ گونه از خانواده هامور ماهیان در خلیج فارس و دریای عمان گزارش شده است (Heemstra and Randall, 1993). هدف از این مطالعه، بررسی آسیب‌های بافتی ناشی از بنزوآلفاپایرن در کلیه می‌باشد. با توجه به اینکه مطالعات آزمایشگاهی چندانی در این خصوص در کشور انجام نشده، لذا مطالعه حاضر می‌تواند اطلاعات با ارزشی در ارتباط با نحوه اثرگذاری بنزوآلفاپایرن بر ماهی هامور معمولی که یکی از ماهیان با ارزش آب‌های جنوب است را در اختیار ما قرار دهد.

مواد و روش کار

به منظور انجام تحقیق حاضر، تعداد ۱۰۰ عدد ماهی هامور معمولی در مهر ماه سال ۱۳۹۰ از ایستگاه تحقیقات ماهیان

بالا دارای اثرات تراژونیک است، ولی اثرات مزمن آن عمدتاً شامل التهاب پوستی، حساسیت نوری و تحرکات چشمی می‌باشد (Miller and Olejnik, 2001). تغییرات قابل ملاحظه در عملکرد بافت‌ها و اندام‌ها نیز می‌تواند نتیجه در معرض قرار گرفتن غلظت‌های تحت کشنده آلاینده‌های محیطی باشد که باعث تغییر ساختار سلول‌ها و ایجاد ضایعات پاتولوژیکی می‌شود. مزیت استفاده از تکنیک‌های هیستوپاتولوژیک به عنوان یک نشانگر زیستی این است که به محققین فرصت مناسبی را جهت بررسی اندام‌ها و سلول‌های هدف ویژه که تحت تأثیر مواد شیمیایی محیطی قرار گرفته‌اند، می‌دهد. علاوه بر این، هیستوپاتولوژی ابزاری برای شناسایی اثرات زیان آور حاد و مزمن ناشی از قرار گرفتن بافت‌ها و اندام‌های موجود در معرض آلاینده می‌باشد (Adams, 2002). استفاده از روش هیستوپاتولوژیک به منظور تخمین سلامت فرد و در سطوح بالاتر سلامت یک جامعه غالباً آسان است. محدوده وسیعی از تغییرات هیستوسیتولوژیک در ماهی‌ها و دوکفه‌ای‌ها تعیین شده و به عنوان نشانگرهائی جهت پایش اثرات آلاینده‌ها استفاده می‌گردد (Adams, 2002; Matthiessen et al., 1993).

در ماهیان و دیگر آبزیان، کلیه نقش بسیار مهمی در تنظیم الکترولیت‌ها و آب بدن و همچنین ثابت نگهداشتن محیط داخلی بدن ایفا می‌کند. بدن‌بال در معرض قرارگیری ماهی‌ها با سموم و آلاینده‌ها، تغییرات بافتی در سطوح اپیتلیوم لوله-ای و گلمرول‌ها مشاهده می‌شود (Teh et al., 1997). عمده‌ترین تغییرات پاتولوژیکی گلمرول‌های کلیوی شامل اتساع فضای بومن، افزایش سلول‌ها و فیبروز گلمرولی و

(al., 2009). همچنین در روزهای ۴، ۷ و ۱۴ از بافت کلیه گروه‌های تحت مطالعه نمونه‌گیری با سه تکرار به عمل آمد. جهت نمونه‌برداری، ماهیان توسط محلول ۲- فنوکسی اتانول بیهوش شدند و بافت کلیه به آرامی و به وسیله یک پنس ظریف، از بافت‌های اطراف جدا می‌شد و تمام نمونه‌های بافتی برداشته شده با ذکر شماره تیمار در ظروف شیشه‌ای درب‌دار در محلول بوئن (متشکل از محلول اسید پیکریک به نسبت ۷۵٪، اسید استیک به نسبت ۵٪ و فرمالین به نسبت ۲۵٪) و به مدت دو هفته قرار داده شدند. بعد از طی کردن بقیه مراحل در دستگاه اتوتکنیکون، برش‌هایی از نمونه‌ها به ضخامت ۵ میکرومتر با استفاده از میکروتوم (LEICA-RM2245, Germany) تهیه گردید و پس از رنگ‌آمیزی H&E مورد بررسی قرار گرفتند. عکس‌برداری از نمونه‌ها توسط دوربین نصب شده بر روی میکروسکوپ Dinolite Digital Microscope و سیستم رایانه‌ای متصل به دوربین مجهز به نرم افزار Dino capture تهیه شد.

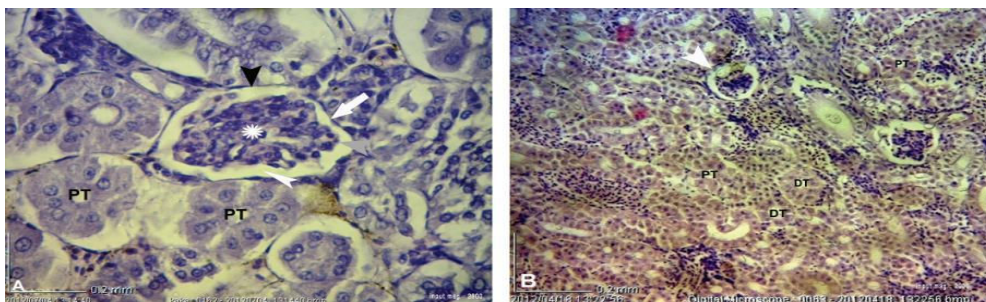
نتایج

مطالعات هیستوپاتولوژیک کلیه ماهی هامور معمولی تحت‌تأثیر غلظت‌های مختلف بنزوآلفاپایرن در طی دوره آزمایشی ۱۴ روزه، نشانگر بروز انواعی از ضایعات پاتولوژیک در این اندام بود. نمونه‌های اخذ شده از کلیه ماهیان گروه‌های کنترل و کنترل حلال (گروه تیمار شده با روغن نارگیل) دارای ساختار بافتی طبیعی متشکل از جسمک‌های کلیوی و لوله‌های ادراری در میان بافت همبند بود. کپسول بومن با دو لایه جداری (بافت پوششی

دریایی بندر امام خمینی واقع در استان خوزستان و از مخازن ذخیره ۶۰۰۰ لیتری انتخاب و به ۵ تانک ۳۰۰ لیتری مدور محتوی آب دریای فیلتر و تیمار شده با اشعه ماورای بنفش (UV) در سوله سرپوشیده تحقیقاتی منتقل شدند. به هر کدام از تانک‌ها تعداد ۲۰ قطعه ماهی هامور معمولی هم اندازه (میانگین طول کل $20/8 \pm 0/2$ سانتی متر، وزن $180 \pm 7/9$ گرم) منتقل گردید. مدت زمان دوره سازگاری ۷ روز بود و طول دوره آزمایش ۱۴ روز با سیکل نوری ۱۲ ساعت روز/شب بود. در طی این مدت، هر روز به منظور جلوگیری از تجمع مواد زائد، دو سوم حجم آب از کف تانک‌ها جایگزین می‌شد ضمن اینکه در طول دوره آزمایش هیچ گونه غذا دهی صورت نگرفت (Lin Wang et al., 2011; Yin et al., 2007; Boleas et al., 1998). در این مطالعه از بنزوآلفاپایرن (Aldrich, USA) با خلوص بالای ۹۷ درصد استفاده شد. محلول اصلی (محلول استوک) این ترکیب از طریق حل نمودن میزان معینی از BaP در روغن نارگیل با دوزهای ۲، ۲۰ و ۲۰۰ mg/kg ساخته شد (Carlson et al., 2002). طراحی آزمایش بدین صورت بود که در روز صفر به ماهیان موجود در تانک‌های اول تا سوم یکبار و به ترتیب میزان ۲، ۲۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بنزوآلفاپایرن به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و به صورت درون صفاقی تزریق شد (Carlson et al., 2002). همچنین جهت ارزیابی امکان اثرگذاری روغن نارگیل، به ماهیان تانک شماره چهار فقط روغن نارگیل بصورت داخل صفاقی تزریق شد. به ماهیان تانک شماره پنج نیز تزریقی صورت نگرفت (Wang et al., 2005; Nahrgangag et al., 2005).

اپیتلیوم مکعبی تا استوانه‌ای کوتاه و حفره مرکزی مشخصی بودند (شکل ۱).

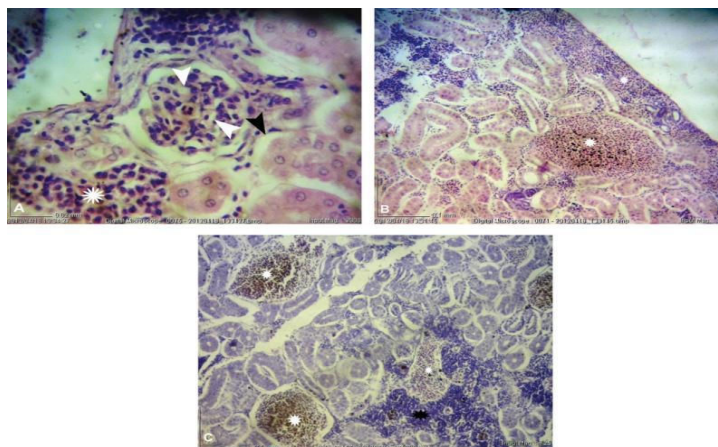
سنگفرشی ساده) و احشایی (یک لایه سلول پدوسیت)، فضای اداری با اندازه طبیعی و کلافه مویرگی در جسمک- های کلیوی مشاهده گردید. لوله‌های اداری دارای یک لایه



شکل ۱- ساختار بافتی طبیعی کلیه ماهی هامور معمولی؛ A. جسمک کلیوی (سر پیکان سیاه)، مویرگ گلومرولی (ستاره سفید)، غشاء خارجی کپسول بومن (پیکان سفید)، غشاء داخلی کپسول بومن (سر پیکان خاکستری)، PT: لوله کلیوی نزدیک، B. جسمک کلیوی (سر پیکان سفید)، PT: لوله پیچیده نزدیک، DT: لوله پیچیده دور؛ A (H&E, 40X)؛ B (H&E, 10X).

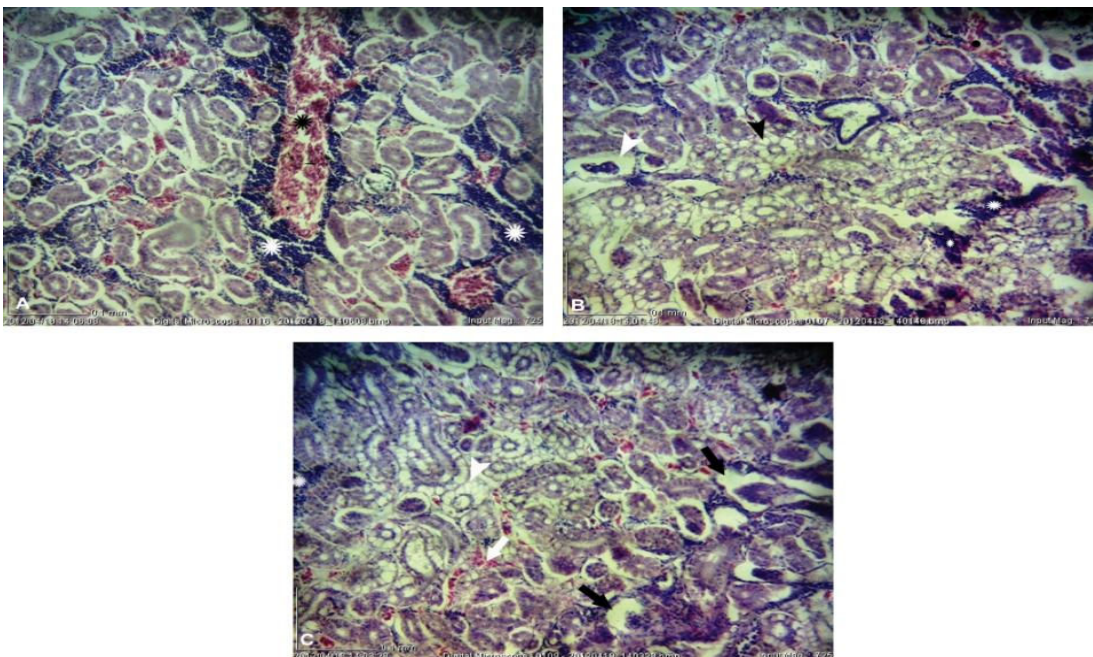
B. در کلیه ماهیان تیمار BaP200 تغییرات پاتولوژیک مشاهده شده در سایر تیمارها با شدت بیشتری مشاهده شد. علاوه بر این نفوذ لنفوسیتی از دیگر ضایعات مشاهده شده در این تیمار بود (شکل ۲، C).

در روز چهارم آزمایش، جداسدن اپیتلیوم تمام لوله‌های کلیوی از غشای پایه، اتساع مویرگ گلومرولی و خونریزی جزئی از عمده‌ترین ضایعات مشاهده شده در نمونه‌های ماهیان تیمار BaP200 بود (شکل ۲، A). در نمونه‌های تیمار BaP200 خونریزی با وسعت بیشتری مشاهده شد (شکل ۲،



شکل ۲- تغییرات بافتی کلیه ماهی هامور معمولی تیمار شده با بنزوآلفا پائرن در روز چهارم آزمایش؛ A. اتساع مویرگ گلومرولی (سر پیکان سفید)، جدا شدگی اپیتلیوم لوله‌های کلیوی از غشاء پایه (سر پیکان سیاه)، افزایش لنفوسیت‌ها در بافت همبند (ستاره سفید) در تیمار BaP200؛ B. خونریزی (ستاره سفید) در تیمار BaP200؛ C. خونریزی (ستاره سفید)، نفوذ لوکوسیتی (ستاره سیاه)، در تیمار BaP200؛ A (H&E, 40X)؛ B, C (H&E, 10X).

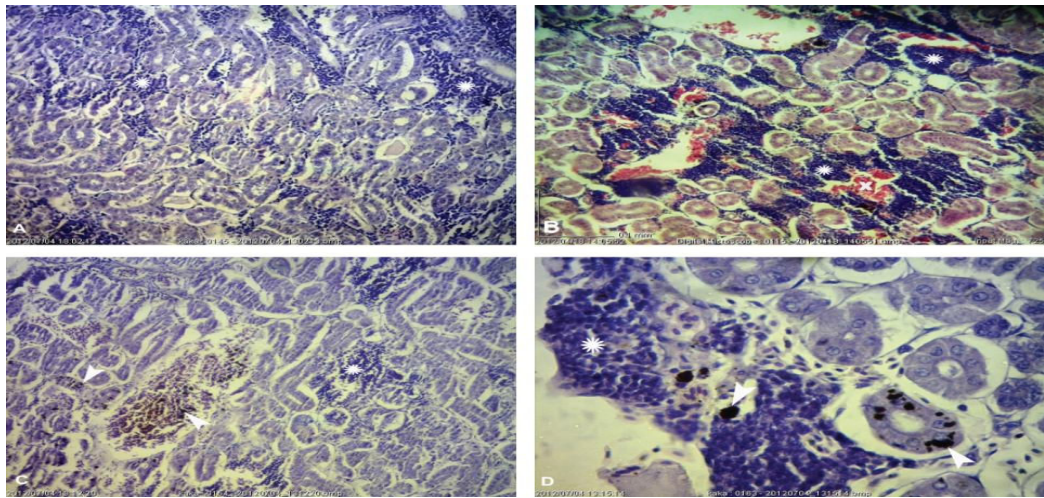
فضای ادراری، نفوذ لوکوسیتی و خونریزی از جمله ضایعات مشاهده شده در تیمار BaP20 (شکل ۳، B) و با وسعت بیشتر در BaP200 بود (شکل ۳، C).



شکل ۳- تغییرات هیستوپاتولوژیک بافت کلیه ماهی هامور معمولی تیمار شده با بنزوآلفا پایرن در روز هفتم آزمایش؛ A. خونریزی (ستاره سیاه)، نفوذ لوکوسیتی (ستاره سفید) در تیمار BaP20؛ B. اتساع فضای ادراری (سر پیکان سفید)، واکوئوله شدن سلول‌های پوششی لوله‌های ادراری (سر پیکان سیاه)، نفوذ لوکوسیتی (ستاره سفید)، نفوذ لوکوسیتی (ستاره سفید)، واکوئوله شدن سلول‌های پوششی لوله‌های ادراری (سر پیکان سیاه)، افزایش فضای ادراری (پیکان سیاه)، در تیمار BaP200؛ A، B، C (H&E, 10X).

لوکوسیتی، خونریزی و مراکز ملانوماکروفاژی از مهم‌ترین تغییرات بافتی مشاهده شده در تیمار BaP200 بود (شکل ۴، C).

در روز چهاردهم آزمایش تغییرات وسیعی در تیمارها مشاهده شد. در نمونه‌های کلیه تیمار BaP2 (شکل ۴، A) نفوذ لوکوسیتی با وسعت کم‌تر، و با وسعت بیشتر به همراه خونریزی در تیمار BaP20 دیده شد (شکل ۴، B). نفوذ



شکل ۴- تغییرات هیستوپاتولوژیک بافت کلیه ماهی هامور معمولی تیمار شده با بنزوآلفاپایرن در روز چهاردهم آزمایش؛ A. نفوذ لوکوسیتی (ستاره سفید) در تیمار BaP2؛ B. نفوذ لوکوسیتی (ستاره سفید)، خونریزی (x سفید) در تیمار BaP20؛ C. مراکز ملانوماکروفازی (سر پیکان سفید)، نفوذ لوکوسیتی (ستاره سفید) در تیمار BaP200؛ D. نفوذ لوکوسیتی (ستاره سفید)، مراکز ملانوماکروفازی (سر پیکان سفید) در تیمار BaP200؛ (H&E و 10X) A,B,C؛ (H&E و 40X) D.

بحث

معمولی در معرض فاضلاب‌های آلوده به PAH، تغییرات بافتی از قبیل جداسدن اپیتلیوم لوله‌های کلیوی از غشای پایه و کاهش فضای ادراری که در مطالعه حاضر نیز مشاهده شد را گزارش نمودند. بسیاری از محققین اینگونه ضایعات را تحت عنوان ضایعات پاتولوژیک غیر اختصاصی کلیه می‌نامند، چرا که انواعی از آلاینده‌ها نظیر PAH، PCB، حشره‌کش‌ها و فلزات سنگین قادر به ایجاد چنین ضایعاتی در کلیه ماهی هستند (Oliveira et al., 1996). این تغییرات پاتولوژیکی شروع فرآیند تخریب سلول بوده و تا ایجاد قطرات هیالین که به شکل گرانول‌های ائوزینوفیلی بزرگ در درون سلول مشخص می‌شوند، پیش می‌رود. این گرانول‌ها ممکن است به دلیل عدم جذب مجدد پروتئین‌های پلاسمایی در ادرار ایجاد شود که به آسیب جسمک

کلیه اندامی حیاتی است که مهم‌ترین فعالیت آن تنظیم و نگهداری هومئوستازی بدن جاندار می‌باشد (Mohamed, 2009). همچنین کلیه یکی از اولین اندام‌هایی است که با در معرض قرار گرفتن آلاینده‌های محیطی، تحت تأثیر قرار می‌گیرد (Thophon et al., 2003)، بنابراین به نظر می‌رسد مطالعه ضایعات کلیوی شاخص مناسبی برای آلاینده‌های موجود در محیط زیست باشد (Ortiz-Zarragoitia and Cajaraville, 2000).

در بررسی آسیب‌شناسی بافت کلیه ماهیان گروه‌های تیمار تغییرات پاتولوژیک شامل: جداسدن اپیتلیوم لوله‌های کلیوی از غشای پایه، نفوذ لوکوسیتی، اتساع فضای ادراری، مشاهده مراکز ملانوماکروفازی و خونریزی را نشان داد. Kakuta and Murach (1997) با قرار دادن ماهی کپور

گزارش شده است (Giari et al., 2008). از جمله (Nasci et al., 1999)، نفوذ شدید سلول‌های هموسیتیک (سلول‌های دفاعی) در بافت‌های همبندی صدف‌های دوکفه‌ای منتقل شده به خور نیمه گرمسیری در خلیج تامپا که به شدت در معرض فاضلاب‌های شهری و پالایشگاهی قرار داشت را گزارش نمودند.

در مطالعه حاضر، ضایعات هیستوپاتولوژیک مختلفی در کلیه ماهیان قرار گرفته در معرض بنزوآلفا پیرن مشاهده شد. این ضایعات شامل جدا شدن از اپیتلیوم لوله‌های کلیوی از غشای پایه، نفوذ لوکوسیتی، کاهش فضای ادراری، مراکز ملانوماکروفاژی و خون‌ریزی بود. این تغییرات پاتولوژیکی آغاز فرآیند تخریب سلول بوده و تا ایجاد دانه‌های هیالین که به شکل گرانول‌های ائوزینوفیلی بزرگی در درون سلول‌ها مشخص می‌شوند، پیش می‌رود. این گرانول‌ها ممکن است درون سلول‌ها به دلیل عدم جذب مجدد پروتئین‌های پلاسمایی در ادرار ایجاد شوند که به آسیب جسمک‌های کلیوی می‌انجامد. در مجموع می‌توان گفت بنزوآلفا پیرن ترکیبی با قابلیت تأثیرگذاری گسترده در اندام‌هایی همانند کلیه می‌باشد.

تشکر و قدردانی

با تشکر از مسئولین مرکز تکثیر و پرورش بندر امام خمینی و کمک‌های بی‌دریغ دکتر رضا صحراپیان که در انجام مراحل آزمایشگاهی تحقیق حاضر نهایت همکاری را داشتند

های کلیوی می‌انجامد (Camargo and Martinez, 2007). در مطالعه حاضر، مراکز ملانوماکروفاژی مشاهده شده در کلیه ماهیان تیمار شده با غلظت‌های بالای بنزوآلفا پیرن در مطالعه حاضر ارتباط زیادی با خون‌ریزی و تخریب گلبول‌های قرمز در کلیه ماهیان داشت. شواهد فراوانی در ارتباط با ایجاد و افزایش این مراکز در کلیه، کبد، آبشش و برخی اندام‌های دیگر ماهیان قرار گرفته در معرض سطوح بالای مواد شیمیایی و یا ماهیان ساکن در محیط‌های با کیفیت پایین وجود دارد (Dezfuli et al., 2006; Giari et al., 2008). هر چند ثابت شده است که حضور مراکز ملانوماکروفاژی مفید و موثر است، لیکن به عنوان یک شاخص غیر اختصاصی قرار گرفتن در معرض محیط‌های آبی آلوده محسوب می‌شود (Giari et al., 2008). تورم و واکنش شدن سیتوپلاسم در سلول‌های پوششی لوله‌های کلیوی در ماهی تیلاپیا و بیاح تیمار شده با غلظت‌های بالای بنزوآلفا پیرین نشان‌دهنده سازگاری سلول میزبان برای جلوگیری از ایجاد تغییرات دژنراتیو ناشی از آلاینده‌ها می‌باشد

(Nasr et al., 2012) و (Silva and Martinez ۲۰۰۷) با مطالعه ضایعات بافتی ایجاد شده در بخش پشتی کلیه ماهی *Astyanax altiparanae* ساکن رودخانه آلوده به پساب‌های پالایشگاه نفت، ضایعات هیستوپاتولوژیک اتساع گلومرولی و کاهش فضای بومن، تخریب توبولی، تخریب سلول‌ها، انسداد لومن لوله‌ها، هیپرتروفی هسته و سلول‌های لوله‌ای و خون‌ریزی را در بافت کلیه را گزارش نمودند. نفوذ لوکوسیتی نظیر آنچه در تحقیق حاضر دیده شد در برخی مطالعات دیگر در مواجهه با غلظت بالای آلاینده‌ها

References

1. Abbassi, F., Oryan, S., and Matinfar, A. 2007. Interaction of ovarian development and gonadal hormones in *Epinephelus coioides* of Persian Gulf. *Res. Dev.* 79: 72-80. (In Farsi).
2. Adams, S.M. 2002. Biological indicators of aquatic ecosystem stress: introduction and overview. In: Adams, S.M. (ed.). *Biological indicators of aquatic ecosystem stress*, American Fisheries Society, Bethesda, pp: 1-12.
3. Assadi, H., and Dehghani, R. 1997. *Atlas of the Persian Gulf and the Sea of Oman fishes*. Iranian Fisheries Research Organization Publication, Tehran, 226p.
4. Boleas, S., Fernandez, C., Beyer, J., Tarazona, J., and Goksoyr, A. 1998. Accumulation and effects of benzo (a) pyrene on cytochrome P450 1A in waterborne exposed and intraperitoneal injected juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Mar. Environ. Res.* 46: 17-20.
5. Camargo, M.M.P., and Martinez, C.B.R. 2007. Histopathology of gills, kidney and liver of a neotropical fish caged in an urban stream. *Neotrop. Ichthyol.* 5: 327-336.
6. Carlson, E.A., Li, Y., and Zelikoff, J.T. 2002. Exposure of Japanese medaka (*Oryziaslatipes*) to benzo[a]pyrene suppresses immune function and host resistance against bacterial challenge. *Aquat. Toxicol.* 56: 289-301.
7. Dezfuli, B.S., Simoni, E., Giari, L., and Manera, M. 2006. Effects of experimental terbuthylazine exposure on the cells of *Dicentrarchus labrax* (L.). *Chemosphere.* 64: 1684-1694.
8. Giari, L., Simoni, E., Manera, M., and Dezfuli, B.S. 2008. Histocytological responses of *Dicentrarchus labrax* (L.) following mercury exposure. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 70: 400-410.
9. Heemstra, P.C., and Randall, J.E. 1993. *FAO species catalogue. Groupers of the world (Family Serranidae, Subfamily Epinephelinae)*. An annotated and illustrated catalogue of the grouper, Rockcod, Hind, Coral grouper and Lyretail species known to date, FAO Publication, Italy, p:32-36.
10. Kakuta, I., and Murachi, S. 1997. Physiological response of carp, *Cyprinus carpio*, exposed to raw sewage containing fish processing wastewater. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 12: 1-9.
11. Matthiessen, P., Thain, J.E., Law, R.J., and Fileman, T.W. 1993. Attempts to assess the environmental hazard posed by complex mixtures of organic chemicals in UK

- estuaries. Mar. Pollut. Bull. 26: 90-95.
12. Miller, J.S., and Olejnik, D. 2001. Photolysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water. Water Res. 35: 233-243.
 13. Mohamed, F.A.S. 2009. Histopathological studies on *Tilapia zillii* and *Solea vulgaris* from Lake Qarun, Egypt. World J. Fish Mar. Sci. 1: 29.
 14. Nahrgangag, J., Camus, L., Gonzalez, P., Goksoyr, A., Christiansen, J. S., and Hope, H. 2009. PAH biomarker responses in polar cod (*Boreogadus saida*) exposed to benzo(a)pyrene. Aquat. Toxicol. 94: 309-319.
 15. Nasci, C., Da Ros, L., Campesan, G., Van Vleet, E.S., Salizzato, M., Sporni, L., and Pavoni, B. 1999. Clam transplantation and stress related biomarkers as useful tools for assessing water quality in coastal environments. Mar. Pollut. Bull. 39: 255-260.
 16. Nasr, I., Neveen, H., and Yosef, T. 2012. Study of some polycyclic aromatic hydrocarbons residues in fish at sharkia governorate markets in relation to public health. Glob. Vet. 8: 670-675.
 17. Oliveira, R.C.A., Fanta, E., Turcatti, N.M., Cardoso, R.J., and Carvalho, C.S. 1996. Lethal effects of inorganic mercury on cells and tissues of *Trichomycterus Brasiliensis*. Biocell. 20: 171-178.
 18. Ortiz-Zarragoitia, M., and Cajaville, M.P. 2000. Environmental estrogenic compounds alter peroxisomal functions in fish. Comp. Biochem. Physiol. Mol. Integr. Physiol. 126: 113.
 19. Randall, J.E., Allen, G.R., and Steene, R.C. 1996. Fishes of the Great Barrier Reef and Coral Sea. University of Hawaii Publication, Hawaii, p: 138-154.
 20. Richard, T., Di Giulio and David E. Hinton. 2008. The toxicology of fishes. CRC Press, Florida, p: 1101.
 21. Schafer, S., and Kohler, A. 2009. Gonadal lesions of female sea urchin (*Psammechinus miliaris*) after exposure to the polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene. Mar. Environ. Res. 68: 128-136.
 22. Silva, A.G., and Martinez, C.B.R. 2007. Morphological changes in the kidney of a fish living in an urban stream. Environ. Toxicol. Pharmacol. 23: 185-192.
 23. Spies, R.B., Stegeman, J.J., Rice, J., Woodin, D.W., Thomas, B., Hose, P., Cross, J.E., Prieto, M. 1996. Sublethal responses of *Platichthys stellatus* to organic contamination in San Francisco Bay with emphasis on reproduction. In: McCarthy, J.F., Shugart, L.R. (eds.), Biomarkers of environmental contamination. CRC Press, Florida, pp. 87-121
 24. Teh, S.J., Adams, S., and Hinton, D.E. 1997. Histopathological biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. Aquat. Toxicol. 37: 51-70.

25. Thophon, S., Kruatrachue, M., Upatham, E., Pokethitiyook, P., Sahaphong, S., and Jaritkhuan, S. 2003. Histopathological alterations of white sea bass, *Lates calcarifer*, in acute and sub chronic cadmium exposure. *Environ. Pollut.* 121: 307-320.
26. Wang, C., Zhao, Y., Zheng, R., Ding, X., Wei, W., Zuo, Z., and Chen, Y. 2005. Effects of tributyltin, benzo[a]pyrene, and their mixture on antioxidant defense systems in *Sebastiscus marmoratus*. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 381-387.
27. Wang, L., Pan, L., Liu, N., Liu, D., Xu, C., and Miao, J. 2011. Biomarkers and bioaccumulation of clam *Ruditapes philippinarum* in response to combined cadmium and benzo[a]pyrene exposure. *Food Chem. Toxicol.* 49: 3407-3417.
28. Yin, Y., Jia, H., Sun, Y., Yu, H., Wang, X., Wu, J., and Xue, Y. 2007. Bioaccumulation and ROS generation in liver of *Carassius auratus*, exposed to phenanthrene. *Comp. Biochem. Physiol.* 145: 288-293.