مجله علمی شیلات ایران ۳۱(۵) ۱۲۷-۱۲۳ (DOI): 10.22092/ISFJ.2023.128475

یافته علمی کوتاه:

اثر غلظت‌های تحت کشنده سرب بر شاخص‌های خونی و بیوشیمیایی ماهی کپور معمولی، *Cyprinus carpio*

اعظم آفاقی*[۱]، صمد زارع[۲]، آزاده جدایی[۳]

*azam.afaghi@gmail.com

۱- گروه میکروبیولوژی، واحد صوفیان، دانشگاه آزاد اسلامی، صوفیان، ایران.
۲- گروه زیست شناسی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
۳- گروه شیمی، واحد صوفیان، دانشگاه آزاد اسلامی، صوفیان، ایران.

تاریخ دریافت: تیر ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: آبان ۱۴۰۱

لغات کلیدی: سرب، شاخص‌های بیوشیمیایی، شاخص‌های خونی، کپور معمولی

مقدمه

افزایش جمعیت و توسعه مراکز مسکونی، تجاری، صنعتی و کشاورزی بدون رعایت نمودن ملاحظات زیست‌محیطی باعث ورود آلاینده‌های خطرناکی مثل فلزات سنگین سرب به محیط زیست شده که موجب آلودگی ماهی‌ها و سایر موجودات آبزی می‌شوند (شهریاری و همکاران، ۱۳۸۹). سرب از طریق آب و رژیم غذایی وارد بدن ماهی و جریان خون شده و به پروتئین‌های حامل در خون متصل می‌شود که اولین تأثیر را بر پارامترهای خونی خواهد گذاشت. پارامترهای خونی مانند هماتوکریت (HCT)، هموگلوبین (Hb) و تعداد گلبول‌های قرمز خونی (RBC) نه تنها نشان‌دهنده ظرفیت حمل اکسیژن به بافت‌های مختلف هستند بلکه به عنوان شاخص‌های تعیین‌کننده تغییرات فیزیولوژیک و پاتولوژیک ماهی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند (Witeska *et al*., 2013). سرب بر نورون‌های آزادکننده CRH (هورمون آزاد کننده کورتیزول) در هیپوتالاموس اثر می‌کند و میزان رهایی CRH و میزان کورتیزول را افزایش می‌دهد (Sumera *et al*., 2018). از مطالعات صورت گرفته در زمینه اثرات فلزات سنگین بر ماهی می‌توان به کاهش گلبول‌های سفید خونی به‌ویژه لنفوسیت‌ها در ماهیان مسموم شده با فلزات سنگین (Witeska *et al*., 2013)، کاهش سطح کورتیزول و اختلال در متابولیسم کربوهیدرات در ماهیانی که به طور مزمن در معرض فلزات سنگین هستند Levesque *et al*., 2002) ، بررسی اثرات فلز سنگین بر شاخص‌های خونی ماهی کفشک زیتونی (*Paralichthys olivaceus*، (Kim *et al*., 2019)، اشاره نمود. در مطالعه حاضر، تغییرات ایجاد شده در شاخص‌های خون‌شناسی و بیوشیمیایی به دنبال مواجهه با سرب، به عنوان بررسی سلامت ماهیان و شاخص‌های تعیین کیفیت آب مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش کار

در این تحقیق، ماهیان کپور معمولی (۵۰±۲۰۰ گرم)، به صورت دو گروه آزمایشی هر یک با سه تکرار و هر تکرار ۱۰ ماهی، به مدت ۲۱ روز در معرض غلظت‌های تحت کشنده سرب (به‌ترتیب ۱/۳ و ۲/۶ میلی‌گرم در لیتر برای گروه‌های ۱ و ۲ که معادل ۱۵ درصد و ۳۰ درصد LC50 (غلظت کشنده سم برای ۵۰٪ حیوانات مورد آزمایش در ۹۶ ساعت است)، قرار گرفتند. به منظور ثابت ماندن میزان غلظت فلزات سنگین در آب، آب تانک‌ها هر روز عوض می‌شد. ماهیان موجود در آب شیر هوادهی شده، گروه شاهد را تشکیل دادند. پس از گذشت ۲۱ روز، پس از بی‌هوش کردن ماهی‌ها با زدن ضربه به سر آنها، از سیاهرگ دمی آنها خون‌گیری انجام شد. لام نئوبار، محلول‌های مخصوص شمارش سلول‌های خونی (محلول‌هایم برای شمارش گلبول‌های قرمز خونی و محلول مارکانو برای شمارش گلبول‌های سفید خون) و میکروسکوپ نوری برای شمارش تعداد گلبول‌های قرمز و سفید خونی مورد استفاده قرار گرفت Rusia and Sood, (1992). از کیت معمولی هموگلوبین و روش سیان‌مت هموگلوبین برای اندازه‌گیری میزان هموگلوبین استفاده شد (Drabkin, 1946). درصد هماتوکریت با روش میکروهماتوکریت سنجیده شد (Mazon *et al.*, 2002). میزان کلسترول، تری‌گلیسرید به‌وسیله اسپکتروفتومتر و کیت‌های مخصوص ساخت شرکت زیست شیمی مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای تعیین میزان هورمون کورتیزول از روش رادیوایمنواسی استفاده شد Sevcikova *et al.*, (2016). تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. نتایج به صورت خطای استاندارد±میانگین نشان داده شد. برای ارزیابی وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها از آزمون آماری One-way ANOVA و تست مقایسه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel 2016 رسم شدند.

نتایج و بحث

نتایج شاخص‌های خونی نشان‌دهنده کاهش معنی دار گلبول‌های سفید خونی، هموگلوبین، گلبول‌های قرمز خونی، هماتوکریت، میانگین غلظت هموگلوبین گلبول‌های قرمز در ماهیان آزمایشی در مقایسه با گروه شاهد بودند. سطوح میانگین حجم گلبول‌های قرمز و متوسط میزان هموگلوبین در هرگلبول قرمز نیز در گروه آزمایشی نسبت به گروه شاهد بالاتر بود. مقادیر خطای استاندارد±میانگین کورتیزول، کلسترول و تری‌گلیسیرید نیز در جدول ۱ ارائه شده است. نتایج آنالیز آماری نشان می‌دهد که میزان کورتیزول در ماهیان قرار گرفته در معرض ۲/۶ میلی‌گرم بر لیتر نیترات سرب در مقایسه با گروه شاهد، به طور معنی‌داری کاهش یافته است. میزان تری‌گلیسیرید و کلسترول خون به طور معنی‌داری ($p <$ ۰/۰۵) در ماهیان قرار گرفته در معرض ۱/۳ میلی‌گرم بر لیتر سرب نسبت به گروه شاهد افزایش یافته است (جدول ۱).

جدول ۱: مقایسه شاخص‌های خونی و بیوشیمیایی ماهیان کپور معمولی قرار داده شده در معرض ۱/۳ میلی‌گرم بر لیتر و ۲/۶ میلی‌گرم بر لیتر نیترات سرب با گروه شاهد. داده‌ها به‌صورت خطای استاندارد ± میانگین بیان‌شده است.؛ a: $p <$ ۰/۰۵

Table 1: Comparison of hematological and biochemical indices of common carp exposed to 1.3 mg/l and 2.6 mg/l of lead nitrate with the control group. Data are expressed as mean ± standard error, a: $p<0.05$

شاخص	گروه آزمایشی		
	شاهد	۱/۳ (میلی‌گرم بر لیتر)	۲/۶ (میلی‌گرم بر لیتر)
RBC (میلی‌متر مکعب/ $۱۰^{۶}$ ×)	۱/۸ ± ۰/۰۱	۱/۴۲ ± ۰/ ۰۱^{a}	۱/۳۶ ± ۰/۰۲^{a}
Hb (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	۶/۹۴ ± ۰/۰۲	۶/۲۶ ± ۰/۰۶^{a}	۶ ± ۰/۰۵^{a}
HCT (درصد)	۲۹/۰۳ ± ۰/۱۷	۲۸/۱۶ ± ۰/۲۶	۲۷/۰۶ ± ۰/۳۴ ^{a}
MCV (فمتو لیتر)	۱۶۱/۳۰ ± ۱/۴۸	۱۹۸/۳۳ ± ۱۱/۸۴^{a}	۱۹۰ ± ۱۱/۸۴^{a}

شاخص	گروه آزمایشی		
	شاهد	۱/۳ (میلی‌گرم بر لیتر)	۲/۶ (میلی‌گرم بر لیتر)
MCH (پیکوگرم)	۳۸/۵۵ ± ۰/۲۱	۴۴/۳۳ ± ۰/۳۱[a]	۴۴/۳۵ ± ۰/۸۸[a]
MCHC (گرم بر دسی‌لیتر)	۲۲/۸۳ ± ۰/۱۲	۲۲/۱۳ ± ۰/۰۸[a]	۲۲/۲۰ ± ۰/۰۵[a]
WBC (میلی‌متر مکعب/ $\times 10^3$)	۲۴/۵ ± ۰/۲۸	۲۳/۷ ± ۰/۲۰	۲۳/۱۰ ± ۰/۲۵ [a]
کورتیزول (میکروگرم بر دسی‌لیتر)	۲۰/۹۳± ۰/۳۰	۲۸/۶۶± ۱/۴۵	۱۲/۰۳± ۲/۳۰[a]
تری گلیسیرید (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	۱۳۷/۰۹± ۵/۵۰	۳۴۱/۳۸± ۵/۸۷[a]	۲۳۰/۵۲± ۷/۶۳
کلسترول (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	۱۲۸/۵۰ ± ۶/۰۶	۱۷۸/۵۰±۳/۱۷[a]	۱۱۸±۴/۶۱

RBC: تعداد گلبول‌های قرمز خونی، Hb: هموگلوبین، HCT: هماتوکریت، MCV: سطوح میانگین حجم گلبول‌های قرمز، MCH: متوسط میزان هموگلوبین در هر گلبول قرمز، MCHC: میانگین غلظت هموگلوبین گلبول‌های قرمز، WBC: تعداد گلبول‌های سفید خونی

نتایج حاصل از این پژوهش نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار میزانHb, HCT, MCHC و RBC در ماهیان گروه آزمایشی در مقایسه با گروه شاهد بود که مطابق با یافته‌های سایر محققان است Mahmoud *et al.*, (2013). قرار گرفتن در معرض غلظت‌های زیر کشنده سرب، روی و مس منجر به کاهش تعداد گلبول‌های قرمز، کاهش غلظت هموگلوبین خون و کم‌خونی همولیتیک به علت پراکسیداسیون لیپیدی غشاء گلبول‌های قرمز، انسداد ژن‌ها در مغز استخوان، آسیب به غشاء روده و جذب ناکافی آهن، تخریب سلول‌های خون‌ساز در بافت کلیه و طحال، تخریب بافت آبشش و اختلال در تنظیم اسمزی می‌شود (Shah *et al.*, 2020). اپی‌نفرین آزاد شده در طول استرس ممکن است باعث رها شدن گلبول‌های قرمز نابالغ شود و سطوح هماتوکریت را مختل کند (Serezli *et al.*, 2011). همولیز، آسیب ساختار هموگلوبین، رهاسازی گلبول‌های قرمز از طحال به علت استرس و هیپوکسی باعث آسیب ساختاری به غشاء RBC و در نهایت تغییر سطوح MCV، MCH و MCHC در مطالعه حاضر شده است (Ololade and Oginni, 2010). در این مطالعه کاهش معنی‌دار WBC در ماهیان گروه آزمایشی نسبت به گروه شاهد، مشاهده گردید که این کاهش، به علت آزاد شدن کورتیزول و اپی نفرین هنگام استرس و تجمع سرب در بافت کلیه و تخریب قسمت خون‌ساز این بافت است (Abdel-Warith *et al.*, 2020). کاهش معنی‌داری در سطح کورتیزول ماهیان قرار گرفته در معرض ۲/۶ میلی‌گرم بر لیتر نیترات سرب نشان‌دهنده تخلیه محور HPI و آتروفی سلول‌های بین کلیوی است (Flodmark *et al.*, 2002). کبد چرب و سندرم نفروتیک ناشی از فلزات سنگین باعث افزایش تری‌گلیسیرید و سطح کلسترول خون در گروهی شد که در معرض ۱/۳ میلی‌گرم بر لیتر سرب قرار داشتند. این نتایج با نتایج به‌دست آمده از سایر محققان، مطابقت دارد (Zhou *et al.*, 2009). مواجهه طولانی‌مدت با فلز و استرس ناشی از آن، سازگاری را در ماهی دشوار می‌کند و باعث ضعف در ماهی می‌شود. این شاخص‌ها به عنوان نشانگرهای زیستی تعیین آلودگی آب و بررسی شرایط سلامتی ماهی مورد ارزیابی قرار گرفت.

منابع

شهریاری، ع.؛ گل فیروزی، ک. و نوشین، ش.، ۱۳۸۹. میزان تجمع کادمیوم و سرب در بافت عضلانی سه گونه از ماهیان دریایی کپور، کفال و ماهی سفید سواحل دریای خزر در حوضچه خلیج گرگان در سال های۸۶-۱۳۸۵. مجله علمی شیلات ایران، سال نوزدهم، شماره ۲، صفحات ۱۰۰-۹۵. Doi: 10.22092/ISFJ. 2017.109945

Abdel-Warith, A.W.A., Younis, E.S.M., AL-Asgah, N.A., Rady, A.M. and Allam, H.Y., 2020. Bioaccumulation of lead nitrate in tissues and its effects on hematological and biochemical parameters of *Clarias gariepinus*. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 27: 840-845. Doi: 10.1016/j.sjbs.2020.01.015.

Drabkin, D.L., 1946. Spectrophotometric studies: XIV. The crystallographic and optical properties of the hemoglobin of man in comparison with those of other species. *Journal of Biological Chemistry*, 164: 703-723. Doi: 10.1016/S0021-9258(17)41272-5.

Flodmark, L., Urke, H., Halleraker, J., Arnekleiv, J., Vøllestad, L. and Poleo, A., 2002. Cortisol and glucose responses in juvenile brown trout subjected to a fluctuating flow regime in an artificial stream. *Journal of Fish Biology*, 60: 238-248. Doi: 10.1111/j.1095-8649.2002.tb02401.x.

Kim, J.H., Choi, H., Sung, G., Seo, S.A., Kim, K.I., Kang, Y.J. and Kang, J.C., 2019. Toxic effects on hematological parameters and oxidative stress in juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* exposed to waterborne zinc. *Aquaculture Reports*, 15: 100225. Doi: 10.1016/j.fsi.2022.02.022.

Levesque, H., Moon, T., Campbell, P .and Hontela, A., 2002. Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the field. *Aquatic Toxicology*, 60: 257-267. Doi: 10.1016/S0166-445X(02)00012-7.

Mahmoud, U.M., Ebied, A.M. and Mohamed, S. M., 2013. Effect of lead on some haematological and biochemical characteristics of *Clarias gariepinus* dietary supplemented with lycopene and vitamin E. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences. C, Physiology and Molecular Biology*, 5: 67-89. Doi: 10.21608/EAJBSC.2013.16112.

Mazon, A., Monteiro, E., Pinheiro, G. and Fernadez, M., 2002. Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in the freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. *Brazilian Journal of Biology*, 62: 621-631. Doi: 10.1590/S1519-69842002000400010.

Ololade, I. and Oginni, O., 2010. Toxic stress and hematological effects of nickel on African catfish, *Clarias gariepinus*, fingerlings. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 2: 014-019. Doi: /10.5897/JECE.9000060.

Rusia, V. and Sood, S.K., 1992. Routine haematological test In: Medical laboratory technology Mukerjee, K.L. (ed), Vol. 1. Tata McGraw Hill Publishing Company Limited, pp. 252-258.

Serezli, R., Akhan, S. and Delihasan-Sonay, F., 2011. Acute effects of copper and lead on some blood parameters on Coruh trout (Salmo coruhensis). *African Journal of Biotechnology*,10(16):3204-3209. Doi: 10.5897/AJB10.2505.

Sevcikova, M., Modra, H., Blahova, J., Dobsikova, R., Plhalova, L., Zitka, O., Hynek, D., Kizek, R., Skoriic, M. and Svobodova, Z., 2016. Biochemical, haematological and oxidative stress responses of common carp (*Cyprinus carpio* L.) after sub-chronic exposure to copper. *Veterinarni Medicina*, 61. Doi: 10.17221/8681.

Shah, N., Khan, A., Ali, R., Marimuthu, K., Uddin, M.N., Rizwan, M., Rahman, K.U., Alam, M., Adnan, M. and Jawad, S. M., 2020. Monitoring bioaccumulation (in gills and muscle tissues), hematology, and genotoxic alteration in *Ctenopharyngodon idella* exposed to selected heavy metals. *BioMed Research International*, 20:1-16. Doi: 10.1155/2020/6185231.

Sumera, S., Husna, M., Laiba, S. and Aqsa, C., 2018. Changes in growth hormone and cortisol profile due to lead induced toxicity in *Labeo rohita*. *Turkish Journal of Zoology*, 18: 921-926. Doi: 10.4194/1303-2712-v18_7_10.

Witeska, M., Kondera, E. and Belniak, N., 2013. Hematological and hematopoietic changes induced by formaldehyde and malachite green in common carp (*Cyprinus carpio L.*). *Zoology and Ecology*, 23: 245-251. Doi: 10.1080/21658005.2013.821790.

Zhou, X., Li, M., Abbas, K. and Wang, W., 2009. Comparison of haematology and serum biochemistry of cultured and wild Dojo loach *Misgurnus anguillicaudatus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35: 435-441. Doi: 10.1007/s10695-008-9268-4.

Effect of sub-lethal concentrations of lead on hematological and biochemical indices in common carp, *Cyprinus carpio*

Afaghi A.[1*]; Zare S.[2]; Jodaei A.

[*]azam.afaghi@gmail.com

1- Department of Microbiology, Sofian Branch, Islamic Azad University, Sofian, Iran
2- Department of Biology, Urmia University, Urmia, Iran
3- Department of Chemistry, Sofian Branch, Islamic Azad University, Sofian, Iran

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the toxicological effects of lead on hematological and biochemical indices of common carp. For this purpose, 90 fish were exposed to two sub-lethal levels (1.3 mg/l and 2.6 mg/l) for 21 days. Then, the blood samples were taken to measure the cortisol, cholesterol, triglyceride, red blood cells, white blood cells, hematocrit, and hemoglobin. The amount of cortisol and total white blood cells in the group exposed to 2.6 mg/l of lead were 12.03±2.30 µg/dl and 23.10±0.25×10^3/ mm^3, respectively, which were significantly decreased compared to the control group. Compared to the control group, cholesterol and triglyceride levels were significantly higher in the group exposed to 1.3 mg/l, (178.50±3.17 mg/dl and 341.38±5.87 mg/dl, respectively). A decrease in the values of hemoglobin, hematocrit, and red blood cells indicates anemia in the exposed fish.

Keywords: Lead, Biochemical parameters, Hematological indices, Common carp

[*]Corresponding author