تأثیر غلظت زیر کشنده سرب بر میزان آهن خون ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

سید قاسم قربان زاده زعفرانی[1*]، ناصر کرمی راد[2]، شهلا جمیلی[3]

*Ghorbanzadeh110@yahoo.com

۱- سازمان حفاظت محیط زیست، تهران، ایران
۲- سازمان شیلان ایران، تهران، ایران
۲- موسسه تحقیقاتی علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۴

چکیده

به‌منظور بررسی تأثیر غلظت سرب (Pb) بر میزان آهن خون کپور معمولی، تعداد ۱۲۰ عدد بچه ماهی بصورت تصادفی به‌وسیله تور پره از استخر پرورش توام ماهی گرمابی واقع در شهرستان بابل در چه سال ۱۳۸۶نمونه برداری شد. ابتدا ماهیان طی ۴۸ ساعت با شرایط آزمایشگاه سازگاری یافته و سپس در قالب ۴ گروه شامل گروه شاهد و سه گروه آزمون با غلظت‌های متفاوت (mg/L 541/0 = mg/L , A 078/1 = mg/L ,B 623/1 = C) و هر گروه با سه تکرار که در هر تکرار ۱۲عدد ماهی قرار داشت، تقسیم‌بندی شدند. خونگیری از ماهیان پس از گذشت ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت و از سیاهرگ ساقه دمی انجام شد. میانگین وزن و طول (کل) ماهیان به ترتیب ۱۴۰/۵ گرم و ۲۱/۸ سانتی‌متر بود. غلظت سرب و آهن خون پس از هضم اسیدی نمونه‌های خونی بوسیله ماکروویو، با دستگاه ICP-OES اندازه گیری شد. در این مطالعه مشخص شد که میزان جذب سرب با گذشت زمان، افزایش یافته بطوریکه تیمارهای آزمون افزایش معناداری (n ;05/0 >p=۳) نسبت به شاهد داشتند ولی به دلیل آنکه خون بعنوان ناقل فلزات سنگینی مانند سرب به اندام‌های هدف عمل می‌کند، روند افزایشی مشخصی مشاهده نشد. همچنین ارتباط معنی‌داری (n ;05/0 <p=۳) بین افزایش سرب جذب شده در خون و تغییرات آهن خون مشاهده نشد که می‌توان نتیجه گرفت احتمالاً جایگزینی و تداخل سرب با آهن خون در گردش خونی رخ نمی‌دهد و روند افزایشی در آهن خون در طول این مطالعه، احتمالاً بدلیل ایجاد تغییرات فیزیولوژیک ناشی از استرس در خون ماهی می باشد.

لغات کلیدی : سرب، آهن، خون، کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

*نویسنده مسئول

مقدمه

با توجه به نقش مهم ماهیان در رژیم غذایی انسان، این گروه از آبزیان می‌توانند یکی از مسیرهای ورود مواد زنوبیوتیک[1] به انسان و سایر جانورانی که از آنها تغذیه می‌کنند، باشند. مواد زنوبیوتیک ترکیباتی هستند که به صورت شیمیایی سنتز شده و در طبیعت وجود ندارند (Bruck-Jastrzebska *et al.*, 2005). فرا سنجه های خونی، سریع ترین روش ردیابی و آشکارساختن تغییرات در ماهی می‌باشد. سرعت بروز سمیت فلزات سنگین، به دلیل آنکه بوسیله خون به تمام بخش های بدن پخش می‌شود، به ویژگی‌های انتقال خون بستگی دارد. بنابراین سنجش اثرات سمی فلزات سنگین بوسیله نتایج حاصل از بررسی فراسنجه های خونی تسهیل می گردد (Bruck-Jastrzebska *et al.*, 2005).

بیش از ۹۰٪ سرب خون به هموگلوبین گلبول‌های قرمز خون در انسان متصل می‌شود. پروتئین‌های ویژه متصل‌شونده به سرب با وزن ملکولی ۱۰۰۰۰ دالتون شناسایی شده که نقش محافظتی دارند. سرب موجود در خون بطور عمده با بافت‌ها و اندام‌ها قابل تبادل هستند. با وجود اینکه محل اصلی اتصال سرب، ماکروملکول ها(عمدتاً پروتئین‌هایی با چند گروه سولفیدریل آزاد مانند متالوتیونین دارای سیستئین) هستند، ممکن است با سایر زنجیره های جانبی آمینواسیدها مانند گروه E آمینواسید لیزین، گروه کربوکسیل گلوتامیک اسید و آسپارتیک اسید و گروه فنوکسیل تیروزین، ترکیباتی با پایداری کمتر ایجاد نمایند. تداخلاتی از سرب با کادمیوم، کلسیم، مس، آهن، منیزیم، فسفر، روی، ویتامینD و چندین آنزیم بویژه آنزیم‌های مسیر سنتز هِم[2] گزارش شده است(Athar *et al.*, 2001). ازدیاد مقدار سرب در خون به کندی انجام می‌شود و مانند مقدار آن در ادرار دارای نوسان نیست (ثنائی، ۱۳۷۵). اگر قزل آلای رنگین کمان در معرض غلظت پایین ۱۳ میکروگرم در لیتر سرب قرار گیرد باعث تغییراتی می‌شود که عبارتند از: ۱- افزایش تعداد گلبول قرمز، ۲-کاهش حجم گلبول‌های قرمز خون، ۳- کاهش مقدار آهن در سلول‌های گلبول قرمز خون و ۴- کاهش فعالیت آمینولولنیک اسید در گلبول قرمز (بلوری عربانی، ۱۳۸۳).

تحقیقات مشابه غالباً بر روی اثر سمیت یون های فلزی بر روی فراسنجه های خونی، آهن سرمی و همچنین تداخل آهن موجود در رژیم غذایی و فلزات سنگین ضروری یا غیرضروری در دستگاه گوارش انسان و حیوانات صورت گرفته است. در این رابطه مطالعات اندکی در ایران انجام گردیده که از آن جمله می‌توان به مطالعه داعی (۱۳۸۷) که به بررسی اثرات سرب و کادمیوم بر آهن خون شاه‌کولی پس از۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از در معرض قرار گرفتن پرداخته است، بررسی اثرات کادمیوم بر آهن خون کپور معمولی که در زمان‌های مشابه انجام شده (قربانزاده زعفرانی و همکاران،۱۳۹۴) و بررسی میزان سرب در سرم تاس ماهی ایرانی و اوزون برون(ابطحی و همکاران، ۱۳۸۵) اشاره نمود. هدف مطالعه حاضر، بررسی تأثیر غلظت زیرکشنده سرب بر میزان آهن خون ماهی کپور معمولی بعد از گذشت ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت می‌باشد تا احتمال جایگزینی و تداخل سرب با آهن خون مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری کپور معمولی بوسیله تور از استخر پرورش توام ماهی با مساحت تقریبی پنج هکتار واقع در شهرستان بابل در سال ۱۳۸۶ انجام شد. ماهیان از نظر سلامت ظاهری بررسی و انتخاب شدند. ماهیان به آزمایشگاه محیط زیست دریایی مرکز تحقیقات زیست محیطی سازمان حفاظت محیط زیست واقع در شهر تهران منتقل گردید. ابتدا ۱۵۰ماهی به منظور سازگاری با شرایط آزمایشگاه، در داخل تانک‌های ۷۰ لیتری پلی اتیلنی، به مدت ۴۸ ساعت بدون تغذیه نگهداری شدند. آبگیری آکواریم های۲۰۰ لیتری با استفاده از آب شهری (با

۱ Xenobiotics

۲ Heme

سختی کل کربنات کلسیم ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر) انجام و از نمک نیترات سرب $Pb(NO_3)_2$ (GR, Merck) جهت تهیه تیمارهای سه گانه سرب استفاده شد. با در نظر گرفتن LC_{50} در زمان ۹۶ ساعت برابر با ۳/۵۳ mg/L برای کپور معمولی (Subhendu *et al.*, 2004)، غلظت‌های انتخابی زیرکشنده سرب به ترتیب برابر ۱/۶۲۳ mg/L ، ۱/۰۷۸mg/L و ۰/۵۴۱ mg/L انتخاب گردید. برای هر تیمار سه تکرار انتخاب و در هر یک از آنها ۱۲ قطعه ماهی قرار داده شد. همزمان سه آکواریم مجزای ۲۰۰ لیتری با آب شهری (بدون افزودن نمک مذکور) به عنوان شاهد تهیه و در هر کدام از آنها نیز ۱۲ قطعه ماهی قرار داده شد.

در طول آزمایش فراسنجه های فیزیکی و شیمیایی شامل دما(^{oC} ۲۱/۲)، ، هدایت الکتریکی (µS/cm ۴۴۳/۲)، غلظت اکسیژن محلول(mg/L ۵/۳)، و pH (۷/۸) و شوری (در حد صفر) توسط دستگاه مولتی پارامترWTW ثبت گردید. به دلیل آنکه در زمان‌های کمتر تغییرات قابل ملاحظه ای گزارش نگردید (داعی،۱۳۸۷) بنابراین طی زمان‌های ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت، خونگیری از ساقه دمی ماهیان بصورت تصادفی و بوسیله سرنگ ۲ میلی لیتری آغشته به محلول EDTA پس از بیهوشی با محلول گل میخک (۱۰۰ppm) و ثبت طول کل و وزن آنها انجام شد (قیومی، ۱۳۷۹ ؛ ابطحی و همکاران، ۱۳۸۱، قربان زاده زعفرانی و همکاران، ۱۳۹۴). میانگین وزن و طول (کل) ماهیان به ترتیب ۱۴۰/۵ گرم و ۲۱/۸ سانتی‌متر بود. تقریباً ۱/۵ میلی لیتر خون درون ظروف مخصوص (فالکن های ۱۵ میلی لیتری کد گذاری شده) ریخته و حجم و وزن خون یادداشت گردید. نمونه‌ها با استفاده از اسید نیتریک غلیظ ۶۵ ٪ (Supra pure, Merck) بوسیله دستگاه ماکروویوBERGHOF مدل 2-MWS هضم گردید. نمونه‌های هضم شده با آب دیونیزه به حجم ۱۰ میلی لیتر رسید و با تکنیک اسپکترومتری نشر نوری پلاسمای جفت شده القایی[۳] بوسیله دستگاه ICP- Spectroscopy، مدل ICAP 6500, Themo آنالیز گردید. در آنالیز دستگاهی حداقل ۲ نمونه بلانک برای هر آنالیز آماده و مقدار متوسط اندازه گیری شده فلز در بلانک از غلظت سرب نمونه خونی کم شد (MOOPAM, 2010).

در این مطالعه تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از مقایسه میانگین‌ها با روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA)، آزمون توکی، ضریب همبستگی Pearson (r)، ضریب تعیین کنندگی (r^2) برای پی‌بردن میزان درصد نقش سرب محیط در غلظت سرب درخون و میانگین ضرایب تشابه (Unweighted Average Linkage Clustering) برای گروه‌های مختلف آزمون جهت دسته بندی زمان‌های آزمون براساس غلظت عناصر آهن و سرب به صورت نمودار درختی انجام شد. سطح اطمینان در تجزیه و تحلیل آماری ۹۵٪ در نظر گرفته شد و در محاسبات از برنامه‌های آماری SPSS, Minitab MS, Excel و Origin استفاده گردید.

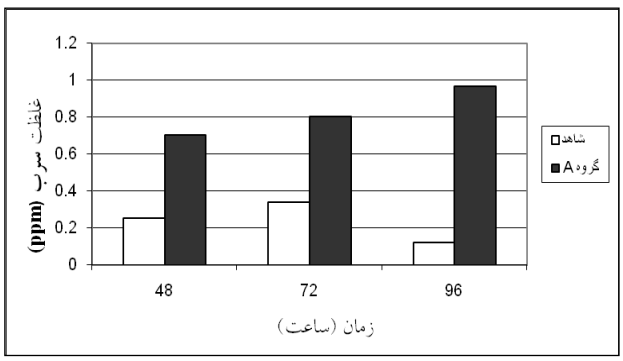
نتایج

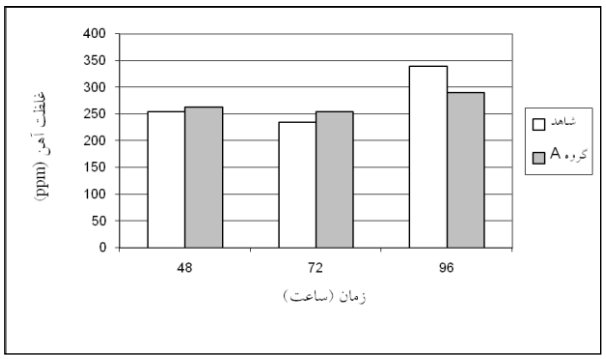
نتایج اندازه‌گیری بصورت میانگین مقادیر سرب و آهن نمونه‌ها در زمان‌های مختلف در جدول (۱) و شکل‌های ۱ تا ۵ همراه با مقادیر خطای استاندارد ارایه شده است.

۳ ICP-OES

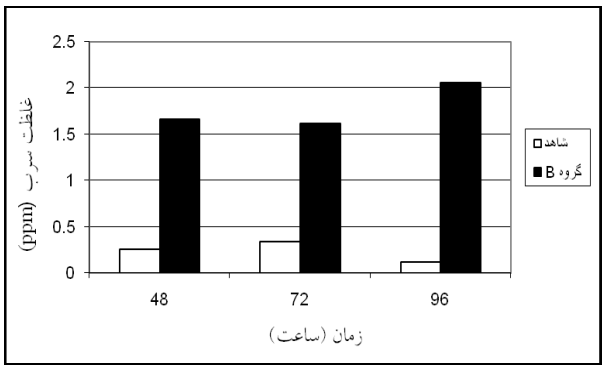
جدول۱ : غلظت عناصرسرب و آهن (ppm) در خون ماهیان گروه شاهد (۰ ppm)، گروه A (۰/۵۴۱ ppm)، گروه B (۱/۰۷۸ ppm)، گروه C (۱/۶۲۳ppm) در زمان های ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت

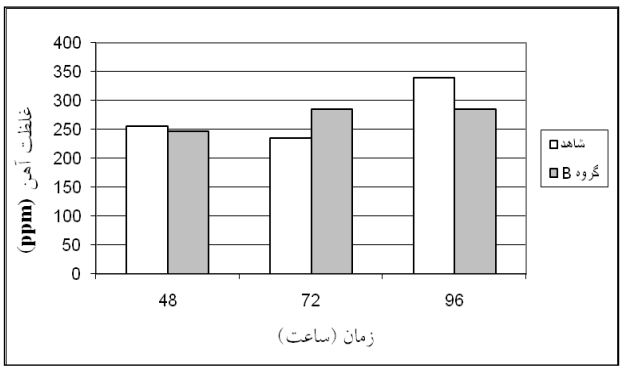
فلز	زمان(ساعت)	غلظت درگروه (n=3)			
		شاهد (۰ ppm)	A (۰/۵۴۱ ppm)	B (۱/۰۷۸ ppm)	C (۱/۶۲۳ppm)
		میانگین (±SE)	میانگین (±SE)	میانگین (±SE)	میانگین (±SE)
سرب	۴۸	۰/۲۵۳(±۰/۰۲۷)	۰/۷۰۵(±۰/۱۳۵)	۱/ ۶۷(±۰/۱۸۶)	۱/۵۹۳(±۰/۲۶۲)
	۷۲	۰/۳۴۱(±۰/۰۲۳)	۰/۸۰۶(±۰/۲۰۰)	۱/۶۲۱(±۰/۰/۱۴۱)	۱/۸۴۴(±۰/۴۵۳)
	۹۶	۰/۱۲۱(±۰/۰۰۳)	۰/۹۷۰(±۰/۱۲۷)	۲/۵۵۵(±۰/۱۵۸)	۱/۷۲۹(±۰/۳۱۹)
آهن	۴۸	۲۵۵/۱۶۶(±۷/۹۹)	۲۶۳/۸۵۵(±۱/۶۵۱)	۲۴۷/۶۲(±۱۸/۷۴)	۲۵۵/۳۴۴(±۱۰/۷۵۸)
	۷۲	۲۳۵/۲۵۵(±۲۴/۸۶۴)	۲۵۴/۸۷۷(±۳۰/۰۷۷)	۲۸۵/۰۶۶(±۲/۳)	۲۴۳/۴۰۰(±۲۹/۰۸۲)
	۹۶	۳۴۰/۰۲۰(±۲۷/۴۹۶)	۲۹۰/۶۵۵(±۲۷/۶۵۷)	۲۸۵/۰۳۰ (±۱۸/۹۹۵)	۲۸۱/۶۵۵(±۱۰/۳۵۷)



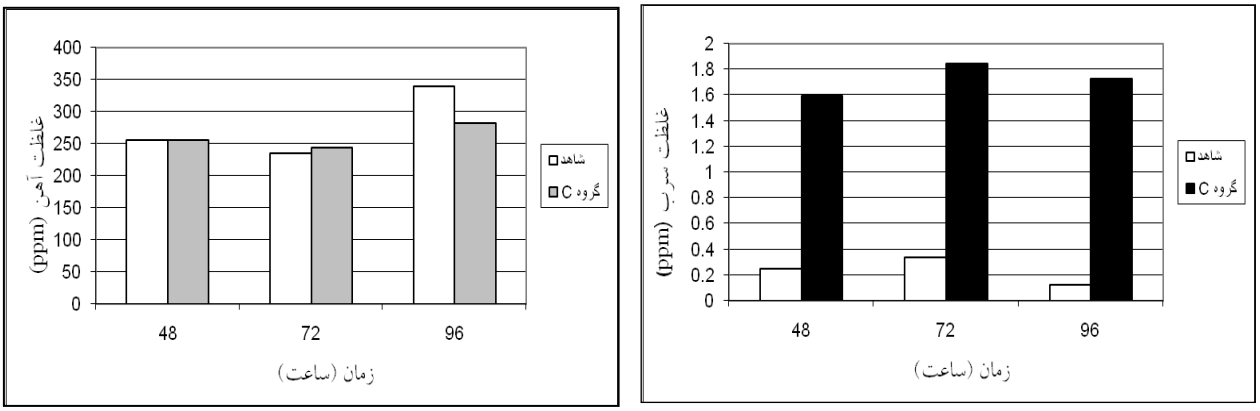


شکل ۱: نمودار مقایسه ای میانگین غلظت سرب خون (راست) و آهن خون (چپ) بین نمونه های گروه A (۰/۵۴۱ ppm سرب) و شاهد در زمان های ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت

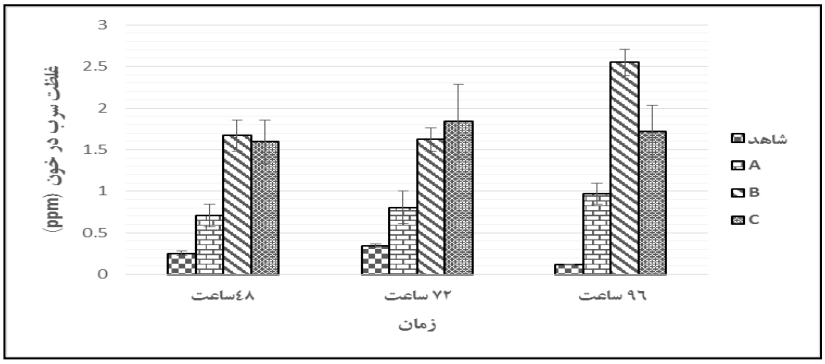




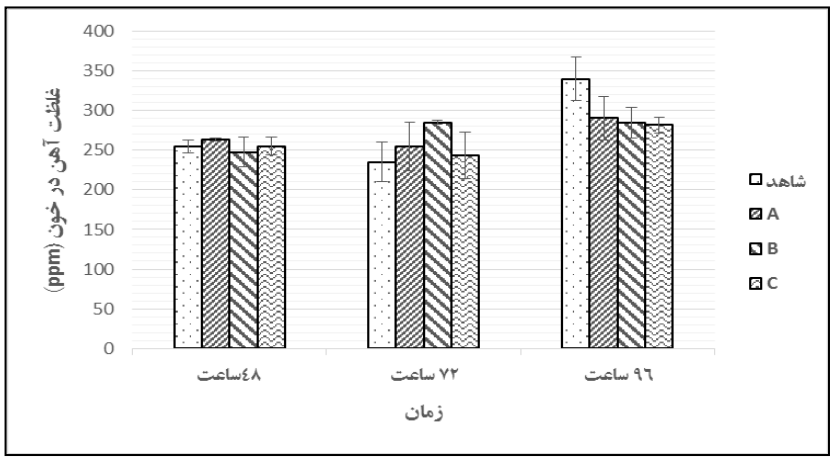
شکل ۲: نمودار مقایسه ای میانگین غلظت سرب خون (راست) و آهن خون (چپ) بین نمونه های گروه B (۱/۰۷۸ ppm سرب) و شاهد در زمان های ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت



شکل ۳: نمودار مقایسه ای میانگین غلظت سرب خون (راست) و آهن خون (چپ) بین نمونه های گروه C (۸/۶۵۶ ppm سرب) و شاهد در زمان های ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت



شکل ۴: نمودار میزان تغییرات خطای استاندارد میانگین غلظت سرب خون (±SE) در گروه شاهد (۰ ppm)، گروه A (۰/۵۴۱ ppm)، ، گروه B (۱/۰۷۸ ppm) ، گروه C (۱/۶۲۳ ppm) در زمان های ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از افزودن یون سرب به محیط



شکل ۵: نمودار میزان تغییرات خطای استاندارد میانگین غلظت آهن خون (±SE) در گروه شاهد (۰ ppm)، گروه A (۰/۵۴۱ ppm)، ، گروه B (۱/۰۷۸ ppm) ، گروه C (۱/۶۲۳ ppm) در زمان های ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از افزودن یون سرب به محیط

طبق جدول۱و شکل‌های ۱ تـا ۵ سـرب در خـون ماهیـان گروه شاهد مشاهده می‌شود. بـا توجـه بـه اینکـه در آغـاز آزمایش یون سرب بـه آکـواریم‌هـای شـاهد اضـافه نشـد، احتمال دارد از محیط زندگی قبلی وارد خون شده (غلظت سرب آب استخر پرورش مـاهی کمتـر از ۱۰۰pbb انـدازه گیری شد) و یا ناشی از حساسـیت انـدازه گیـری دسـتگاه باشد.

توجه: در جـداول زیـر علامـت* تفـاوت معنـی‌دار آمـاری ($p< ۰/۰۵$) را نشان می‌دهد.

جدول ۲: همبستگی Pb و Fe خون در غلظت شاهد (۰ ppm) برای میانگین ۳ نمونه از ۳ تکرار ($p< ۰/۰۵; n=۳$) در زمان های ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت

	Fe در ۴۸ ساعت	Fe در ۷۲ ساعت	Fe در ۹۶ ساعت
Pb در ۴۸ ساعت	r = -۰/۵۳۱ p =۰/۶۴۴		
Pb در ۷۲ ساعت		r =۰/۷۶۱ p =۰/۴۵۰	
Pb در ۹۶ ساعت			r = -۰/۰۴۹ p =۰/۹۶۹

جدول ۳: همبستگی Pb و Fe خون در غلظت ۰/۵۴۱ ppm سرب برای میانگین ۳ نمونه از ۳ تکرار ($p< ۰/۰۵; n=۳$) در زمان های ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت

	Fe در ۴۸ ساعت	Fe در ۷۲ ساعت	Fe در ۹۶ ساعت
Pb در ۴۸ ساعت	r =-۰/۳۹۳ p =۰/۷۴۳		
Pb در ۷۲ ساعت		r = -۰/۰۲۰ p =۰/۹۸۷	
Pb در ۹۶ ساعت			r = ۰/۱۴۱ p =۰/۹۱۰

جدول۴: همبستگی Pb و Fe خون در غلظت ۱/۰۷۸ ppm سرب برای میانگین ۳ نمونه از ۳ تکرار ($p< ۰/۰۵; n=۳$) در زمان های ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت

	Fe در ۴۸ ساعت	Fe در ۷۲ ساعت	Fe در ۹۶ ساعت
Pb در ۴۸ ساعت	r =۰/۶۸۷ p =۰/۵۱۸		
Pb در ۷۲ ساعت		r =-۰/۹۸۶ p =۰/۱۰۸	
Pb در ۹۶ ساعت			r =۰/۲۵۴ p =۰/۸۳۷

جدول۵: همبستگی Pb و Fe خون در غلظت ppm ۱/۶۲۳ سرب برای میانگین ۳ نمونه از ۳ تکرار (p< ۰/۰۵; n=۳) در زمان های ۴۸ ،۷۲ و ۹۶ ساعت

	Fe در ۴۸ ساعت	Fe در ۷۲ ساعت	Fe در ۹۶ ساعت
Pb در ۴۸ ساعت	r =۰/۶۲۷ p =۰/۵۶۹		
Pb در ۷۲ ساعت		r =۰/۸۳۷ p =۰/۳۶۸	
Pb در ۹۶ ساعت			r = -۰/۸۷۸ p =۰/۳۱۷

به‌طوری که از نتایج جداول (۲ الی۵) آشکار می‌گردد ارتباط معنی‌داری بین غلظت‌های آهن و سرب خون با توجه به میزان غلظت سرب محیط برای زمان‌های مختلف وجود ندارد.

در بررسی میزان غلظت سرب و آهن خون و میزان غلظت سرب محیط نتایج در جدول (۶) به شرح ذیل ارایه می گردد:

جدول۶: همبستگی Pb محیط با Pb و Fe خون (p< ۰/۰۵; n=۳) در زمان های ۴۸ ،۷۲ و ۹۶ ساعت

		Pb در خون	Fe درخون
غلظت Pb در محیط در گروه های مختلف	۴۸ ساعت	r =۰/۹۳۱	r = -۰/۳۰۴
		p =۰/۰۶۹	p =۰/۶۹۶
	۷۲ ساعت	r =۰/۹۷۹	r =۰/۳۲۱
		*p = ۰/۰۲۱	p =۰/۶۷۹
	۹۶ ساعت	r =۰/۹۸۴	r = -۰/۸۵۲
		p =۰/۱۱۶	p=۰/۱۴۸

جدول ۶ نشاندهنده این مطلب است‌که بین غلظت سرب محیط و میزان سرب خون پس از۷۲ ساعت همبستگی قوی مثبت معنی‌دار (۰/۹۷۹; p=۰/۰۲۱ =r) وجود داشته و باتوجه به ضریب تعیین‌کنندگی (r^2= ۰/۹۶) مشخص می‌گردد که فقط ۴٪ از تغییرات مربوط به عوامل دیگر محیط بوده و ۹۶٪ مربوط به میزان غلطت سرب در محیط می‌باشد. همچنین آزمون نشان داد که هیچ ارتباطی بین میزان غلظت سرب در محیط با میزان آهن خون در زمان‌های مختلف وجود ندارد. پس از ۴۸ ساعت همبستگی بین میزان سرب محیط با آهن و سرب خون مشاهده نمی شود. انجام آزمون ANOVA One-way بین گروه‌های مختلف غلظت سرب محیط برای زمان ۴۸ ساعت یک اختلاف معنی‌دار قوی (p= ۰/۰۰۱; n=۳) را بین میانگین غلظت سرب خون نشان داد. این اختلاف معنی دار برای گروه های مختلف در ۴۸ ساعت در جدول ۷ ارایه شده است.

جدول ۷ : نتایج آزمون ANOVA سرب خون برای زمان ۴۸ ساعت پس از افزودن یون سرب به محیط در گروه های مختلف آزمون (p< ۰/۰۵; n=۳)

	غلظت Pb خون پس از ۴۸ ساعت (ppm)		
	گروه A	گروه B	گروه C
شاهد	*p =۰/۰۳	**p =۰/۰۰۲	**p =۰/۰۰۷
گروه A		*p =۰/۰۱۴	*p =۰/۰۴
گروه B			p =۰/۸۳۱

جدول ۷ نشان می‌دهد که فقط بین گروه B و گروه C اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (p= ۰/۸۳۱; n=۳). آزمون ANOVA بین گروه‌های مختلف غلظت سرب محیط برای زمان ۷۲ ساعت یک اختلاف معنی دار (n=۳ ;p= ۰/۰۱۱) را بین میانگین غلظت سرب خون نشان داد. این اختلاف معنی‌دار برای گروه غلظت‌ها در ۷۲ ساعت در جدول ۸ ارایه شده است.

جدول۸: نتایج آزمون ANOVA سرب خون برای زمان ۷۲ ساعت پس از افزودن یون سرب به محیط در گروه های مختلف آزمون (n=۳ ;p< ۰/۰۵)

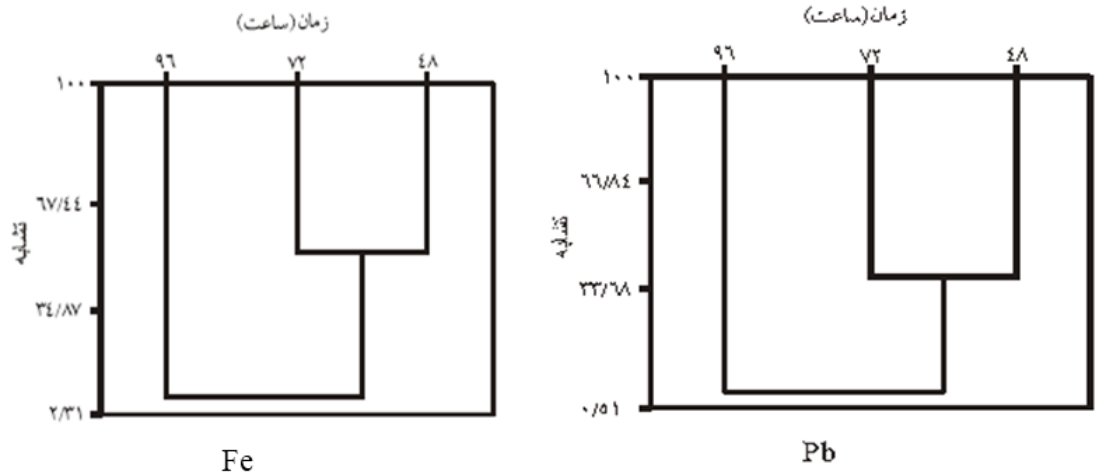
	غلظت Pb خون پس از ۷۲ ساعت (ppm)		
	گروه A	گروه B	گروه C
شاهد	p= ۰/۰۸۲	**p =۰/۰۰۱	*p =۰/۰۳
گروه A		*p =۰/۰۲۹	p= ۰/۱۰۴
گروه B			p= ۰/۶۶۴

جدول ۸ نشان می‌دهد که بین گروه B و دو گروه شاهد (۰ ppm) و گروه A (۰/۵۴۱ ppm) اختلاف معنی‌دار (P= ۰/۰۰۱; n=۳ ; p=۰/۰۲۹) و همچنین بین گروه C و شاهد اختلاف معنی‌دار (۰/۰۳; n=۳ p=) مشاهده می‌شود. آزمون مورد اشاره درخصوص زمان۹۶ ساعت وجود اختلاف معنی‌دار را بین میانگین غلظت‌های سرب گروه های شاهد و A (p= ۰/۰۰۳; n=۳)، بین شاهد و B (۰/۰۰۱; n=۳ p=)، بین شاهد و C (p= ۰/۰۰۷; n=۳) و بین گروه A و B (p= ۰/۰۰۶; n=۳) نشان داد.

با انجام آزمون ANOVA برای گروه شاهد مشاهده می‌شود که بین میانگین غلظت سرب خون در زمان ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت اختلاف معنی‌داری (p< ۰/۰۵; n=۳) وجود دارد. این آزمون برای گروه A و B اختلاف معنی‌داری (p< ۰/۰۵; n=۳) را بین میانگین غلظت سرب خون در زمان ۴۸ با زمان۹۶ ساعت نشان داد.

با توجه به حضور سرب در محیط در غلظت‌های گوناگون، آزمون ANOVA بین گروه‌های مختلف غلظت آهن خون برای زمان‌های ۴۸ ساعت (n=۳ ;p= ۰/۸۰۴)، ۷۲ ساعت (p= ۰/۵۲۷; n=۳) و ۹۶ ساعت (p= ۰/۲۸۵; n=۳) اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. با انجام آزمون ANOVA برای گروه شاهد مشاهده می‌شود که بین میانگین غلظت آهن خون در زمان ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت اختلاف معنی‌داری (p< ۰/۰۵; n=۳) وجود دارد. این آزمون برای گروه A اختلاف معنی‌داری (p< ۰/۰۵; n=۳) را بین میانگین غلظت آهن خون در زمان ۴۸ با زمان ۹۶ ساعت و برای گروه B اختلاف معنی‌داری (p< ۰/۰۵; n=۳) را بین میانگین غلظت آهن خون در زمان ۴۸ با زمان۷۲ و ۹۶ ساعت و همچنین برای گروه C اختلاف معنی‌داری (p< ۰/۰۵; n=۳) را بین میانگین غلظت آهن خون در زمان ۴۸ و ۷۲ با زمان ۹۶ ساعت نشان داد. با توجه به آزمون تشابه،

نمودار درختی غلظت‌های آهن و سرب خون ماهیان در ارتباط با زمان و گروه‌های مختلف آزمون در شکل۶ ارائه شده است. نمودار درختی آهن نشان می‌دهد که شباهت زیادی میان مقادیر آهن خون در زمان های ۴۸ و ۷۲ ساعت در مقایسه با زمان ۹۶ ساعت وجود دارد. به عبارتی تغییرات آهن در خون ماهیان بعد از ۷۲ ساعت قابل توجه می‌باشد. همچنین در خصوص سرب خون نمودار درختی سرب نشان می‌دهد که میزان تغییرات سرب در خون ماهیان در فاصله زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت زیاد نبوده است. به عبارتی میزان آن در دو زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت تا حدود ۳۴٪ شبیه بوده و تشکیل یک گروه را می‌دهند. لیکن میزان سرب ماهیان در ۹۶ ساعت کاملاً متفاوت از دو زمان دیگر می باشد.



شکل ۶: نمودار درختی غلظت آهن (نمودار سمت چپ) و غلظت سرب (نمودار سمت راست) خون ماهیان در ارتباط با زمان و گروه های مختلف آزمون

بحث

هم اکنون مهره‌داران شامل ماهی‌ها توسط سم شناسانی که روی توان سمی ترکیبات مختلف ازجمله فلزات و در خصوص موضوعاتی چون روش جذب آنها به داخل بدن و دوره در معرض قرار گیری مطالعه می‌کنند، مورد توجه قرار گرفته اند(Bruck-Jastrzebska *et al*., 2005). اگر ماهی بمدت کوتاهی در معرض غلظت پایین فلزات سنگین قرار گیرد اغلب باعث افزایش شاخص‌های خونی (تعداد اریتروسیت، غلظت هموگلوبین، درصد هماتوکریت و غلظت گلوکز) می‌شود که نشان دهنده شروع واکنش استرس ناشی مواد شیمیایی در ماهی می باشد. این موضوع سبب عدم تعادل اسموتیک و تغییر در سیستم تنظیم تبادل یون، کم شدنpH خون و افزایش حجم اریتروسیت‌ها و متعاقباً افزایش هماتوکریت می‌شود. استرس همچنین باعث افزایش اپی‌نفرین و انقباض طحال شده که منجر به آزاد سازی اریتروسیت‌ها به خون و سپس افزایش درصد هماتوکریت می‌شود. غلظت بالای فلزات سنگین یا زمان طولانی تر قرارگیری ماهی در غلظت زیرکشندگی فلزات سنگین معمولا شاخص‌های فوق‌الذکر را کاهش می‌دهد. کاهش تعداد اریتروسیت یا درصد هماتوکریت نشان‌دهندهٔ بدتر شدن حالت موجود زنده و گسترش آنمی در آن می‌باشد. (Vosyliene,1999).

در بررسی روی کپور معمولی که بمدت کوتاهی (۳ ساعت) در غلظت بالایی از کادمیوم و سرب (۱۰ میلی گرم بر لیتر) قرار گرفته و سپس وارد محیط بدون آلودگی شدند، نشان داد که تا ۹۶ ساعت تغییرات ناپایداری در سیستم خونی ماهی دیده می‌شود که از آن جمله می‌توان به افزایش درصد

هماتوکریت بدون تغییرات مهمی در تعداد گلبول قرمز (که ناشی از تورم موقت در سلولهاست) و افزایش در نسبت اریتروسیت‌ها (نشان دهندهٔ افزایش درصد سلول های نابالغ در گردش خون) اشاره کرد (Witeska, 2005).

محققین دریافته‌اند که استرس سبب تورم گلبول قرمز به دلیل اختلالات اسموتیک و سپس جذب و ورود الکترولیت‌ها و آب به داخل سلول‌ها توام با اسیدی شدن پلاسما و قلیایی‌شدن سیتوپلاسم اریتروسیت می‌شود (Witeska, 2005).

سرب با عمل مهار آنزیم‌های سنتزکننده هِم جایگزین فلز روی در روند سنتز هِم می‌شود. همچنین بر اساس مشاهده ارتباط غیرخطی بین غلظت سرب در خون و میزان سرب قابل جذب در انسان، وجود مکانیسم جذبی قابل‌اشباع یا وجود برخی از فرآیندهای دیگر محدودکننده ظرفیت در توزیع سرب به جایگاه‌های اتصال بافت‌های مختلف پیشنهاد شده است. سرب در خون بسیار ناپایدار بوده و دارای نیمه عمر ۳۶ روز می‌باشد. جذب سرب حداقل در بچه‌ها بطور معکوس تحت تأثیر وضعیت آهن قرار می گیرد که نشان‌دهنده تداخل بین فلزات ضروری و فلزات غیرضروری می‌باشد (Goyer *et al*, 2004).

مطالعات نشان می‌دهد با قرارگیری ماهی قزل آلای رنگین کمان در غلظت ۰/۰۱۳ میلی‌گرم درلیتر سرب، کاهش میزان آهن سلول قرمز رخ داده در حالیکه تغییری در میزان آهن خون کامل و هماتوکریت مشاهده نشده‌است. این تغییرات افزایش تولید سلول‌های قرمز را نشان می دهند تا مرگ سلول‌های قرمز و مهار تولید هموگلوبین جبران گردد (Albert *et al*., 1989).

فلزاتی چون سرب، کادمیوم، مس و روی (مشخصاً سرب) باعث افزایش اریتروبلاست‌ها در خون کپور معمولی می‌شوند که ناشی از انقباض طحال بواسطه کاتکولامین‌ها در حضور استرس می‌باشد که سبب رها شدن اریتروسیت‌های جدید به جریان خون می‌شود. عدم افزایش تعداد گلبول قرمز نشان‌دهندهٔ تخریب سریع سلول‌هاست (Witeska, 2005).

برخلاف تحقیقات تریپاتی و همکارانش که ارتباط منفی خوبی (۰/۶۱-) بین آهن و سرب خون انسان گزارش‌دادند(Tripathi *et al*, 2001)، عدم ارتباط معنی‌دار بین غلظت سرب خون و آهن خون ماهیان در زمان‌های مختلف آزمون (نتایج جداول ۲ الی ۶)، می‌تواند نشانگر این مطلب باشد که در غلظت‌های سرب محیط در زمان مورد نظر آزمون، غلظت‌های آهن خون تغییرات معنی‌دار نداشته و افزایش غلظت سرب می‌تواند بدون تداخل و کاهش میزان آهن خون، روند افزایشی در خون داشته باشد. این نتیجه مشابه نتیجه حاصل از اثر کادمیوم بر آهن خون ماهی کپور معمولی گزارش شده توسط قربان زاده‌زعفرانی و همکاران در سال ۱۳۹۴ می‌باشد.

با توجه به ارتباط قوی مثبت معنی‌دار بین غلظت سرب محیط و میزان سرب خون پس از ۷۲ ساعت و همچنین ضریب تعیین‌کنندگی ۰/۹۶ =r^2 (جدول ۳-۱۸) مشخص می‌گردد که فقط ۴٪ از تغییرات مربوط به عوامل‌دیگر محیط بوده و ۹۶٪ مربوط به میزان غلظت سرب در محیط می‌باشد. به عبارتی بیشترین جذب سرب در خون پس از ۷۲ ساعت صورت خواهد گرفت. پس از ۴۸ ساعت همبستگی بین میزان سرب محیط با آهن و سرب خون مشاهده نمی‌شود. احتمال دارد این موضوع ناشی از مقاومت ماهی در جذب این عناصر باشد.

آزمون آنالیز واریانس (جدول ۷) نشان می‌دهد که میزان جذب سرب در خون ماهیان در گروه B و C در زمان ۴۸ ساعت تفاوتی نخواهد داشت. به عبارتی جذب سرب در غلظت‌های پایین سرب در زمان ۴۸ ساعت نقش بیشتر و تعیین‌کننده ای خواهد داشت. همچنین می‌توان نتیجه ای مشابه‌ای را برای غلظت‌های پایین در زمان۷۲ استنباط نمود (جدول ۸). آزمون مورد اشاره درخصوص زمان ۹۶ ساعت تقریباً روند مشابهی را با آزمون زمان ۷۲ ساعت نشان داد که می‌توان همان دلایل را برای آن مد نظر قرار داد. به طورکلی می‌توان نتیجه گرفت

که غلظت‌های مختلف سرب محیط در میزان جذب سرب خون موثر بوده لیکن بین غلظت‌های مورد آزمون اختلاف معنی‌دار کاملاً آشکاری نمایان نمی‌باشد. البته این مطلب در خصوص غلظت‌های بالا چندان در میزان سرب خون تعیین‌کننده نخواهد بود. علی‌رغم حضور سرب در محیط در غلظت‌های گوناگون و بر اساس نتایج حاصله از آزمون ANOVA، از عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین غلظت آهن خون در گروه‌های مختلف در زمان‌های ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت می‌توان چنین استنباط کرد که حضور سرب در محیط در غلظت‌های مورد آزمون نمی‌تواند موجبات تغییر در میزان آهن خون را سبب شود. اگرچه میزان غلظت سرب خون در ارتباط با غلظت‌های محیطی تغییر یافته لیکن از روند خاصی همچون افزایش غلظت بیرونی و متعاقب آن درون خون تبعیت نمی کند که می‌تواند در ارتباط با خصوصیات فیزیولوژیکی ماهیان مورد آزمایش، تعداد تیمارها و خطای آزمون باشد. همچنین از نمودار درختی آهن آزمایش سرب (شکل ۱) نتیجه می‌شود که شباهت زیادی میان مقادیر آهن خون در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت در مقایسه با زمان ۹۶ ساعت وجود دارد و تغییرات آهن در خون ماهیان بعد از ۷۲ ساعت قابل توجه می‌باشد و میزان سرب ماهیان در ۹۶ ساعت کاملاً متفاوت از دو زمان دیگر می‌باشد که احتمالاً بدلیل جذب کند سرب و انتقال و خروج تدریجی این یون از خون می‌باشد. بطورکلی از بررسی جذب سرب خون در ماهی کپور معمولی در زمان ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از افزودن سم مربوطه نتیجه می‌شود که میزان جذب عناصر در زمان‌های بیشتر، بالاتر و مشخص‌تر می‌باشد.

در پایان می‌توان نتیجه گرفت که به دلیل آنکه خون بعنوان ناقل عمل می‌کند و محل انتقال فلزات سنگین چون کادمیوم و سرب به اندام‌های هدف می‌باشد، بنابراین تغییرات معنی‌داری در غلظت آهن و روند خاص و مشخص در غلظت سرب در طی آزمایش مشاهده نگردید و احتمالاً بر خلاف نظر ولکو[۴] (Valko *et al.*, 2005) که اظهار نموده "ایجاد پیوند کوالانسی یون کادمیوم با DNA با تئوری جایگزینی کادمیوم با آهن و مس در پروتئین‌های مختلف غشائی و سیتوپلاسمی تقویت می‌شود"، جایگزینی و تداخل سرب با آهن خون در گردش خونی رخ نمی‌دهد و تغییرات آهن خون در طول آزمایش، احتمالاً بدلیل ایجاد تغییرات فیزیولوژیک در خون ازجمله آزادسازی آهن و گلبول قرمز نابالغ از بافت‌های دیگر به خون و یا خروج آهن از خون به طرف ارگان هدف مثل کلیه می‌باشد (Bruck-Jastrzebska *et al.*, 2005).

.

تشکر و قدردانی

از جناب آقای دکتر نبوی، مهندس صدیقی، مهندس عربها، مهندس تیموری و سرکار خانم طباطبایی و سرکار خانم ملک، همکاران محترم در سازمان حفاظت محیط زیست و همچنین جناب آقای مهندس فراهانی، کارشناس آزمایشگاه فرآوری معدنی بخاطر راهنمایی ارزشمند و همکاری و مساعدت در انجام مراحل تحقیق و عملیات آزمایشگاهی تقدیر و تشکر می‌گردد.

منابع

ابطحی، ب.، آقاجانپور، م.، شریف پور، ع.، رسولی، ع.، ۱۳۸۱. LC50 اسانس گل میخک و MS222 در بچه ماهیان تاس ماهی ایرانی و مقایسه آن با قزل آلای رنگین کمان و کپور معمولی، خلاصه مقالات دومین همایش ملی-منطقه‌ای ماهیان خاویاری، موسسه تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان، رشت. ۱۰ صفحه.

ابطحی، ب.، بهمنی، م.، شریف پور، ع.، اسماعیلی ساری، ع.، کاظمی، ر.، حلاجیان، ع.، ۱۳۸۵. بررسی آثار هیستوپاتولوژیک و آلودگی به برخی فلزات سنگین در تاس ماهی ایرانی و ازون برون صید

[۴] Valko

شده در سواحل گیلان و گلستان. مؤسسه تحقیقات شیلات ایران- انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان.

بلوری عربانی، ط.، ۱۳۸۳. ارزیابی کمی و کیفی فلزات سنگین (روی، مس، سرب) بر عضله کپور ماهی (آمور و فیتوفاگ) وتأثیر آن بر میزان یون کلسیم. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال.

ثنائی، غ.، ۱۳۷۵. سم شناسی صنعتی. انتشارات دانشگاه تهران، جلد اول. ۵۱صفحه.

داعی، ص.، ۱۳۸۷. بررسی تاثیر سرب و کادمیوم بر میزان آهن خون شاه کولی. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات.

قربان زاده زعفرانی، س. ق.، جمیلی، ش.، ناظم، ح.، عربها، ف.، تونی، ا.، ۱۳۹۴. بررسی تأثیر غلظت کادمیوم بر روی میزان آهن خون ماهی کپور معمولی. علوم و تکنولوژی محیط زیست، ۶۳-۵۰ :۱۷(۳).

قیومی، ر.،۱۳۷۹. مطالعه اثرات بیهوشی گل میخک (عصاره و اسانس) در ماهی کپور معمولی. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی شهرستان نور.

Albert, L.A., Elias, R., Temmink, J.H.M., Roderer, G., Koch, R. and Kodama, Y., 1989. International Program on Chemical Safety, Environmental Health Criteria 85, Lead - Environmental Aspects, WHO, Geneva. http://www.inchem.org

Athar, M. and Vohora, S.B., 2001. Heavy metals and environment. New Age International, New Delhi, vi, 216p.

Bruck-Jastrzebska, E. and Protasowicki, A., 2005. Effects of cadmium and nickel exposure on hematological *parameters of common carp, Cyprinus carpio L. Acta Ichthyologica Et Piscatoria.*, 35(1): 29-38.

Goyer, R., Golub, M., Choudhury, H., Hughes, M., Kenyon, E., Stefelman, M., 2004. Issue Paper on the Human Health Effects of Metals, submitted by: ERG.

MOOPAM (Manual of Oceanographic Observation and Pollutant Analyses Methods), 2010. Regional Oranization for the Protection of the Marine Environment (ROPME), Fourth Edition.

Subhendu, D. and Radha, C., 2004. Influence of some abiotic environmental factors on acute toxicity of inorganic lead to Cyprinus carpio var communis (Linn.) and Catla catla (Ham.) in simulated toxic aquatic environment, Toxicological and Environmental Chemistry, Taylor and FrancisLtd, Volume 85,N. 4-6.pp 203-219(17).http://www.ingentaconnet.com/tandf/gtec/2004

Tripathi, R.M., Raghunath, R., Mahapatra, S. and Sadasivan, S., 2001. Blood lead and its effect on Cd, Cu, Zn, Fe and hemoglobin levels of children, The Science of Total Environmental, 277. http://www.sciencedirect.com/Locate/Scitotenv

Valko, M., Morris, H. and Cronin, M.T.D., 2005. Metals, Toxicity and Oxidative Stress, Current Medicinal Chemistry, vol. 12, 1161-1208.

Vosyliene, M.Z., 1999. The Effect of Heavy Metals on Hematological Indices of Fish (Survey), Acta Zoological, Hydrobiologia, Vol. 9. N.2, 80p.

Witeska, M., 2005. Stress in Fish – Hematological and Immunological Effects of Heavy Metals, Electronic Journal of Ichthyology, pp35-41.

Effects of lead sub-lethal concentration on Blood Iron content of the common carp, *Cyprinus carpio*

Ghorbanzadeh Zafarani S.G.,[1]; Karami Rad, N.[2]; Jamili Sh.[3]

[*] Ghorbanzadeh110@yahoo.com

1-Department of Environment of IRAN
2- Iranian Fisheries Organization, Tehran, Iran
3-Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

Abstract

In order to examine the effect of lead on the iron content of blood, sampling of common carp was carried out randomly from a fish culture pond in southeast of Babol by purse seine, in 2008. First of all, the experimental fish were adapted to laboratory conditions for 48 hours. Then, the effect of different concentrations of lead were examined using 3 experimental (A: 4.296 mg/l, B: 7.127 mg/l, C: 8.656 mg/l) and one control groups. There were 12 aquariums, each containing 12 fish. It was tried to apply an equal environmental condition for all of the aquariums during the experiment. Following 24, 48, 72 and 96 hours of exposure, fish were anesthetized and blood samples were taken from caudal vein. The fish average weight and length (total length) were 140.5 g, 21.8 cm, respectively. Concentrations of lead and iron have been determined by ICP-OES after acid digestion of blood samples by Microwave. This study showed that the absorption of lead and its concentration in the blood significantly increased ($p<0.05$) as the time passed compared to the control group. However, there was no significant trend since the blood acts as a carrier of heavy metals such as lead to the target organs.There was also no significant relationship ($p<0.05$, $n=3$) between increasing the amount of absorbed lead and blood iron changes. Therefore, it may be concluded that there is no interaction between blood iron and lead concentration. Increasing trend of blood iron concentration during the experiment was also probably because of some physiological changes resulting from stress in fish.

Keywords: Lead, Iron, Blood, Common carp (*Cyprinus carpio*)

*Corresponding author