بررسی تغییرات هماتولوژی و شاخص‌های استرس ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix* Valenciennes, ۱۸۸۴) در مواجهه با غلظت‌های کشنده و تحت‌کشنده کلرید سرب

- **سعید شهبازی‌ناصرآباد***: باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد یاسوج، دانشگاه آزاد اسلامی، یاسوج، ایران
- **سیدعلی‌اکبر هدایتی**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۸

چکیده

امروزه پیشرفت صنعت آبزی‌پروری، لزوم گسترش تشخیص سلامت ماهیان را بیش از پیش نمایان می‌سازد. شاخص‌های خونی بیومارکرهای مفیدی هستند که به‌منظور ارزیابی شرایط فیزیولوژیک آبزیان در پاسخ به استرس آلاینده‌ها به‌کار رفته و تغییرات درونی بدن ماهی را دقیقاً منعکس می‌کنند. این تحقیق با هدف بررسی تغییرات هماتولوژی و شاخص‌های استرس ماهی فیتوفاگ در مواجهه با غلظت‌های کشنده و تحت‌کشنده کلرید سرب انجام گرفت. در انجام پژوهش حاضر ابتدا غلظت نیمه‌کشنده (LC50) فلز سرب به‌میزان ۳۸/۰۹ میلی‌گرم در لیتر از طریق محاسبه تلفات ماهیان کپور نقره‌ای در معرض کلرید سرب در زمان‌های ۲٤، ٤۸، ۷۲ و ۹٦ ساعت با کمک آنالیز پروبیت تعیین شد. سپس با طراحی آزمایش جداگانه‌ای، کپور ماهیان نقره‌ای به‌مدت ۹٦ ساعت درمعرض تیمار کشنده و تحت‌کشنده کلرید سرب (۱۰ و ۵۰ درصد LC50 96h) و نیز یک گروه شاهد هر کدام با ۳ تکرار قرار داده شد. پس از خونگیری، شاخص‌های هماتولوژی و بیوشیمیایی نظیر هماتوکریت، هموگلوبین، شاخص‌های گلبول قرمز، تعداد کل گلبول‌های سفید و قرمز و شمارش افتراقی گلبول‌های سفید، گلوکز، کورتیزول و پروتئین کل مورد بررسی قرار گرفت. نتایج کاهش معنی‌دار گلبول قرمز، درصد هماتوکریت، هموگلوبین و هم‌چنین افزایش میزان نوتروفیل را با افزایش میزان غلظت سم نشان داد. هم‌چنین برای شاخص‌های بیوشیمیایی نیز افزایش معنی‌دار میزان گلوکز وکورتیزول و نیز کاهش معنی‌دار پروتئین کل مشاهده شد. به‌طورکلی می‌توان بیان نمود که فلز سنگین سرب حتی در غلظت‌های تحت‌کشنده نیز آسیب‌های شدید فیزیولوژیک ایجاد نموده و منجر به القای استرس ثانویه می‌گردد.

کلمات کلیدی: آلودگی، هماتولوژی، سرب (Pb)، فیتوفاگ، فلزات سنگین

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Saeid.shahbazi@ut.ac.ir

مقدمه

شایع‌ترین علل آلودگی آب در کشورهای در حال توسعه ضایعات صنعتی و خانگی شامل انواع مختلف آلاینده مانند فلزات سنگین، مواد رادیواکتیو، آفت‌کش‌ها، علف‌کش‌ها و مواد خورنده مانند اسیدها و بازها هستند که به‌طور مستقیم و بدون تصفیه به جریان‌های آبی و یا استخرهای آب، رها می‌شوند و در نتیجه موجودات آبزی نظیر ماهیان را تحت‌تاثیر تنش و استرس قرار می‌دهند.استرس یک واکنش عمومی و غیراختصاصی به هرگونه عاملی است که سبب اخلال در هموستاز می‌شود. واکنش استرس شامل تغییرات مختلف فیزیولوژیکی ازجمله تغییردر ترکیب خون و نیزمکانیزم ایمنی بدن است (lolade وOginni، ۲۰۱۰). تکنیک ارزیابی زیستی، پایه و اساس برنامه‌های مبتنی بر سلامت زیست‌محیطی و نیز ایمنی مواد شیمیایی است، در واقع پایش زیستی روشی است که در آن عکس‌العمل‌های موجودات آبزی برای آشکارسازی تأثیر یک یا چند ماده سمی را مورد بررسی قرار می‌دهد (Martins و همکاران، ۲۰۰۷). اگرچه تغییرات رفتاری نظیر تمایل و عدم تمایل به گرفتن غذا، الگوی شنا و الگوهای تنفسی می‌توانند در ارزیابی پاسخ به تنش‌های محیطی مفید باشند (Shariati و همکاران، ۲۰۱۱)، با این وجود ارزیابی تغییرات هماتولوژی و بیوشیمیایی خون می‌تواناطلاعات بیش‌تری در مورد اثرات تحت‌کشنده آلاینده‌ها ومواد تنش‌زا در رابطه با موجودات آبزی در اختیار محققان قرار دهد (Rose و همکاران، ۲۰۰۶). ویژگی‌های هماتولوژی به پاسخ جانوران به محیط زیست خودبسیار وابسته‌هستند،درنتیجه‌تغییرات این‌شاخص‌ها دلالت بر تغییرات نامطلوب کیفیت آب محیط دارد و این تغییر با افزایش یا کاهش برخی از شاخص‌های خونی در ایجاد بیماری تاثیرگذار است (Verma و همکاران، ۱۹۸۲). علاوه بر این، پروفیل بیوشیمیایی در ماهیان و دیگر موجودات آبزی تحت تنش فلزات سنگین، به‌عنوان شاخص مهم زیستی برای نظارت بر محیط‌های آبی استفاده می‌شود (Van der Oost و همکاران، ۲۰۰۳)،هم‌چنین سطوح کورتیزول، گلوکز و پروتئین کل، معمولاً به‌عنوان شاخص‌استرس استفاده می‌شود (Firat و همکاران، ۲۰۱۱). امروزه فلزات سنگین به‌دلیل سمی بودن، زمان ماندگاری بالا و نیز تجمع آن‌ها در بافت جانداران، اهمیت اکولوژیک و بیولوژیکی زیادی دارند و می‌توانند اثرات مخربی بر تعادل اکولوژیکی و تنوع زیستی اکوسیستم‌های آبی داشته باشند (Vinodhini و Narayanan، ۲۰۰۸).در واقع فلزات سنگین نیمه‌عمر طولانی دارند و بر خلاف سایر آلاینده‌ها که قادرند به‌طور کامل به‌واسطه باکتری‌ها و میکروارگانیسم‌ها تجزیه شوند و از بین بروند، قابلیت تجزیه زیستی ندارند و به نوعی غیر قابل تجزیه هستند (Javed و Usmani، ۲۰۱۵). درمیان فلزات‌سنگین، سرب به‌دلیل ثبات‌و پایداری، ازجمله آلاینده‌های زیست محیطی است که غلظت آن به‌طور پیوسته در رودخانه‌ها، دریاچه‌ها و اقیانوس در حال افزایش است (Holcombe و همکاران، ۱۹۷۶)، سرب یک عنصر طبیعی، غیرضروری و فلز سمی تجمعی است که هیچ اثر شناخته شده غذایی مفید یا مطلوبی در ماهی و یا سایر موجودات ندارد (Kaya و همکاران، ۲۰۱۵). این فلز با تجمع در استخوان‌ها و بافت‌های ماهی در غلظت‌های بالا می‌تواند سبب کم‌خونی (Kaya و همکاران، ۲۰۱۵)، اختلال در عمل‌کرد کبد، کلیه و طحال، اختلال در رشد، تولیدمثل و نیز بقای موجودات آبزی به‌خصوص ماهیان شود (Malik و همکاران، ۲۰۱۰). سرب حتی در مقادیر کم نیز برای موجودات زنده اثرات سمی فراوانی دارد. این آلاینده می‌تواند از طریق فرسایش زمین‌شناسی، فعالیت‌های آتش‌فشانی و یا فعالیت‌های مختلف انسانی نظیر عملیات معدنی(ذوب سنگ‌سرب)،سوزاندن زغال‌سنگ،پساب حاصل از صنایع باتری‌سازی، عملیات ذوب و نیز کود و آفت‌کش‌ها وارد بدنه آب شود. آلودگی آب از طریق فعالیت‌های انسانی علت اصلی مسمومیت ماهیان با سرب است (Kaya و همکاران، ۲۰۱۵). پرورش ماهیان گرمابی در ایران عمدتاً به‌صورت چندگونه‌ای و شامل کپور ماهیان چینی و کپور معمولی است که در این میان ماهی کپور نقره‌ای (فیتوفاگ) با نام علمی *Hypophthalmichthys molitrix* یکی‌ازمهم‌ترین‌گونه‌های کپور ماهیان است‌که به‌واسطه ویژگی‌هایی‌نظیر رشدسریع،قابلیت سازگاری وسیع و گوشت لذیذ یکی از اولین ماهیان پرورشی آب‌شیرین در سیستم کشت چندگونه‌ای هستند که اهمیت اقتصادی بسیار زیادی دارند و به‌علت تغذیه از فیتوپلانکتون‌ها گونه غالب سیستم پرورشی توام‌است(Shaluei وهمکاران،۲۰۱۳).باتوجه به این‌که اکوسیستم‌های آبی نقش به‌سزایی در تأمین غذای انسان دارند، لذا بررسی وضعیت بهداشتی آن‌ها اهمیت ویژه‌ای دارد، بنابراین یکی از مؤلفه‌های مهم در مراکز پرورش و نگه‌داری ماهی کیفیت آب مورد استفاده و عدم آلودگی آن به آلاینده‌های مختلف است، از طرف دیگر فلزات سنگین قادرند از طریق انباشتگی زیستی و زنجیره‌های غذایی به انسان منتقل گردند. از این‌رو بررسی اثرات کشنده و تحت‌کشنده این سموم بر گونه‌های مهم و اقتصادی ضروری به‌نظر می‌رسد، بنابراین در پژوهش حاضر با توجه به اهمیت بسیار زیاد ماهی فیتوفاگ به‌عنوان یک گونه با ارزش اقتصادی و خوراکی و نیز فراوانی استفاده از فلز سرب، بررسی پاسخ‌های فیزیولوژیکی ماهی فیتوفاگ در معرض این آلاینده مورد آزمایش قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

به‌منظور انجام این پژوهش از بچه‌ماهیان کپور نقره‌ای با میانگین طول کل ۲±۱۸ سانتی‌متر و وزن متوسط ۳±۴۵ گرم استفاده شد.

ماهیان برای سازش با موقعیت جدید به‌مدت دو هفته در شرایط آزمایشگاهی در سالن تکثیر و پرورش دانشگاه کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان، نگه‌داری و دو بار در روز با غذای تجاری غذادهی شدند. در طول دوره سازگاری و هم‌چنین آزمایش اصلی، ماهیان تحت یک رژیم نورانی ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی قرار گرفتند. در طی آزمایش حتی‌المقدور شرایط فیزیکوشیمیایی آب کنترل گردید و تمام شرایط در طی دوره آزمایش یکسان نگه‌داری شد (جدول ۱). آزمایش تعیین سمیت کشنده به‌روش استاتیک تجدید شونده از روش شرح داده شده Sprague (۱۹۷۱) انجام گرفت. بدین منظور برای تعیین LC50 سرب، ابتدا محلول نمکی از آن تهیه شد و سپس ماهیان کپور نقره‌ای در معرض غلظت‌های ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴ و ۱۲۸ میلی‌گرم در لیتر کلرید سرب و نیز یک گروه شاهد قرار گرفتند، برای هر غلظت سه آکواریوم ۱۲۰ لیتری به‌عنوان تکرار درنظر گرفته شد و در هر آکواریوم ۱۰ ماهی قرار داده شد. زمان انجام آزمایش غلظت کشندگی، ۹۶ ساعت بود و میزان مرگ و میر در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲، و ۹۶ ساعت محاسبه شد. درنهایت براساس روش آنالیز آماری پروبیت، مقادیر LC30، LC50، LC90 و LC99 در ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به‌طور جداگانه محاسبه شد، هم‌چنین در تمام طول مدت آزمایش تعیین سمیت کشنده، تمام گروه‌های آزمایشی هر ۸ ساعت کنترل و تغییرات رفتاری آن‌ها با جزییات دقیق بررسی و ثبت گردید. پس از تعیین LC50 96-h و با استناد به آن، برای انجام آزمایش اصلی (بررسی شاخص‌های خونی و بیوشیمیایی)، ماهیان در معرض دو تیمار با غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ درصد از LC50 96-h کلرید سرب و نیز یک گروه شاهد (هر کدام با سه تکرار) قرار گرفتند، نمونه‌های خون از ۳ قطعه ماهی در هر تکرار به‌دست آمد. سپس در چهار دوره زمانی و پس از گذشت ۲۴ ، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت از زمان در معرض قرارگیری ماهیان با کلرید سرب، ماهیان به‌آرامی با یک تور دستی صید شده و به‌منظور خونگیری، بلافاصله در داخل تشت‌های پلاستیکی محتوی آب همسان با آکواریوم حاوی هر ماهی که ماده بی‌هوش‌کننده گل‌میخک (۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) دارد، بی‌هوش شدند. پس از بی‌هوشی، جهت اندازه‌گیری فاکتورهای خونی، خونگیری با استفاده از سرنگ و سرسوزن شماره ۲۱ هپارینه شده از ورید ساقه دمی صورت گرفت (Ruane و همکاران، ۲۰۰۱)، بخشی از نمونه خون به‌منظور شمارش شاخص‌های هماتولوژیک در لوله اپندورف آغشته به EDTA و بخش دیگر نیز به‌منظور محاسبه شاخص‌های بیوشیمیایی به لوله بدون ماده ضدانعقاد (EDTA) منتقل شد. این بخش از خون برای اندازه‌گیری پروتئین، گلوکز و کورتیزول پلاسمای خون ماهی، به‌مدت ۶ دقیقه با ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. در پژوهش حاضر شمارش لکوسیت‌ها و اریتروسیت‌ها به‌روش هموسیتومتری (Thrall و همکاران، ۲۰۰۴)، اندازه‌گیری هموگلوبین به‌روش سیانومت هموگلوبین با دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر و بر اساس روش درابکین (Drobkin، ۱۹۴۵)، سنجش هماتوکریت برحسب درصد به‌روش میکروهماتوکریت (Stoskopf، ۱۹۹۳)، تشخیص تفریقی گلبول‌های سفید براساس تهیه گسترش خون و رنگ‌آمیزی با گیمسا و سنجش شاخص‌های گلبولی (MCV, MCHC, MCH) براساس فرمول‌های استاندارد صورت گرفت (Ruane و همکاران، ۲۰۰۱). اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی خون با کیت‌های تهیه شده از شرکت پارس آزمون و با دستگاه اسپکتروفتومتری UV/Vis (مدل ۲۱۰۰ یونیکو آمریکا UV-2100 UNICO) صورت گرفت. جهت اندازه‌گیری گلوکز سرم خون از روش گلوکز اکسیداز در طول موج ۵۰۰ نانومتر و توسط دستگاه اتوآنالایزر RA-1000 آمریکایی استفاده گردید (Andresen، ۱۹۸۶)، هم‌چنین میزان کورتیزول نیز به‌روش آزمایشگاهی Radioimmunoassay (RIA) و با کیت فرانسوی Immunotech و پروتئین تام نیز به‌روش Modi-biuret و در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Shaluei و همکاران، ۲۰۱۲). اطلاعات حاصل از آنالیزهای خون‌شناسی با استفاده از نرم‌افزار Spss 20 و با انجام آنالیز تجزیه واریانس دوطرفه و سپس مقایسه با آزمون دانکن در سطح معنی‌داری ۵ درصد ($P<0/05$) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. همه نتایج به‌دست آمده به‌وسیله میانگین±انحراف معیار محاسبه شدند.

نتایج

فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب آزمایش در تمامی طول مراحل به‌طور روزانه اندازه‌گیری شد و مشخصات فیزیکوشیمیایی به‌صورت زیر بود (جدول ۱).

جدول ۱: شاخص‌های فیزیکوشیمیایی در طول آزمایش

سختی کل (میلی گرم/لیتر)	اکسیژن محلول (میلی گرم/لیتر)	پی‌اچ	درجه حرارت (درجه سانتی‌گراد)
۱۵±۲۳۵	۶/۹/۰±/۸	۷/۰±۴/۳	۲±۲۵

هیچ‌گونه مرگ و میری در مدت ۹۶ ساعت در گروه شاهد، ۴ و ۸ میلی‌گرم در لیتر کلرید سرب مشاهده نشد، با این وجود تمامی ماهیان در تیمار ۶۴ و ۱۲۸ میلی‌گرم در لیتر، در مدت ۹۶ ساعت تلف شدند. به‌طورکلی با افزایش غلظت کلرید سرب و نیز با گذشت زمان، درصد مرگ و میر جمعیت ماهیان در معرض این آلاینده افزایش چشمگیری را نشان داد. به‌طور مثال در غلظت ۳۲ میلی‌گرم در لیتر کلرید سرب، در ۲۴ ساعت اولیه آزمایش ۱ ماهی از بین رفت و در همین غلظت در ۹۶ ساعت، مرگ ۷ ماهی کپور نقره‌ای مشاهده شد

و این در حالی بود که در غلظت ۱۶ میلی‌گرم در لیتر در ۹۶ ساعت تنها مرگ ۲ ماهی کپور نقره‌ای به ثبت رسید (جدول ۲).

جدول ۲: تعداد تلفات بچه ماهیان فیتوفاگ (Silver carp) طی چهار روز در اثر غلظت‌های مختلف کلرید سرب

غلظت	مرگ و میر (تعداد)			
(میلی‌گرم/لیتر)	۲۴ ساعت	۴۸ساعت	۷۲ساعت	۹۶ ساعت
۰	۰	۰	۰	۰
۴	۰	۰	۰	۰
۸	۰	۰	۰	۰
۱۶	۰	۰	۱	۲
۳۲	۱	۳	۴	۷
۶۴	۵	۱۰	۱۷	۳۰
۱۲۸	۱۹	۲۶	۳۰	۳۰

بررسی نتایج به‌دست‌آمده از تعیین غلظت کشنده کلریدسرب در ماهیان کپور نقره‌ای با استفاده از آنالیز پروبیت نشان داد (جدول ۳) که میزانLC50 کلرید سرب برای ماهی فیتوفاگ با افزایش مدت زمان قرارگیری در برابر سم کاهش یافته است (جدول ۲)، به‌عبارت دیگر با افزایش ساعات آزمایش میزان غلظت کم‌تری از سم لازم است تا ۵۰ درصد از جمعیت ماهیان تلف شوند و مقدار LC50 در ۲۴ ساعت اولیه آزمایش همواره بیش‌تر از LC50 در پایان ۹۶ ساعت است (جدول ۳). میزان LC50 96-h کلرید سرب برای ماهی آزمایش شده ۳۸/۰۹ میلی‌گرم‌درلیتربه‌دست آمد. مقایسه‌شاخص‌های‌خونی ماهیان کپور نقره‌ای که در معرض دو غلظت کشنده (سطوح بالا) و تحت کشنده کلرید سرب قرار گرفتند نسبت به گروه شاهد، نشان داد که در شاخص‌های هماتوکریت، هموگلوبین، تعداد گلبول‌های سفید و قرمز خون و نیز شاخص‌های ایمنی شناختی نظیر لنفوسیت، نوتروفیل و آئوزینوفیل اختلاف معنی‌داری قابل مشاهده است (جدول ۴). به‌طور مثال بررسی تغییرات در تعداد گلبول‌های قرمز خون در هر ۴ مرحله نمونه‌برداری نشان داد که بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود دارد. کمترین میزان تعداد گلبول‌های قرمز ($۱۰^{۶}\times$ ۰/۰۶±۱/۴۹) در روز چهارم نمونه‌برداری و در تیمار با بیش‌ترین غلظت سم (۵۰ درصد غلظت LC50) مشاهده شد که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد ($۱۰^{۶}\times$ ۰/۰۰۵±۲/۲۱) و سایر تیمارها نشان داده است ($p<۰/۰۵$) (جدول ۴).

جدول ۳: غلظت‌های کشنده کلرید سرب (PbCl2) طی چهار روز (۹۶) ساعت در بچه‌ماهیان فیتوفاگ

Point	انحراف معیار ± غلظت کلرید سرب (میلی‌گرم درلیتر)			
	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
LC30	۰/۰۴ ± ۹۰/۰۶	۰/۰۴ ± ۶۶/۸۹	۰/۰۷ ± ۴۷/۸۳	۰/۰۱ ± ۳۲/۰۸
LC50	۰/۰۴ ± ۱۱۱/۳۱	۰/۰۴ ± ۸۴/۶۶	۰/۰۷ ± ۵۹/۱۵	۰/۰۱ ± ۳۸/۰۹
LC90	۰/۰۴ ± ۱۶۳/۲۳	۰/۰۴ ± ۱۲۸/۰۷	۰/۰۷ ± ۸۶/۸۱	۰/۰۱ ± ۵۲/۸۰
LC99	۰/۰۴ ± ۲۰۵/۵۶	۰/۰۴ ± ۱۶۳/۴۷	۰/۰۷ ± ۱۰۹/۳۶	۰/۰۱ ± ۶۴/۷۸

جدول۴: مقدار متوسط شاخص‌های خونی ماهی کپور نقره‌ای در تیمارهای مختلف کلرید سرب (میانگین±SD)

فاکتور	غلظت	شاهد	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
گلبول قرمز	۱۰ ٪ غلظت LC50	۰/۰۰۵±۲/۲۱a	۰/۰۲۵±۲/۰۹a	۰/۱۷±۱/۶۲b	۰/۰۳±۱/۵۵b	۰/۰۹۴±۱/۵۱b
(میکرولیتر/$۱۰^{۶}\times$)	۵۰ ٪ غلظت LC50	۰/۰۰۵±۲/۲۱a	۰/۰۷۲±۱/۸۵b	۰/۰۲۶±۱/۶۱c	۰/۰۱۵±۱/۵۴cd	۰/۰۶۶±۱/۴۹d
هموگلوبین	۱۰ ٪ غلظت LC50	۰/۰۷۶±۷/۶۱a	۰/۰۶۸±۶/۹۳b	۰/۲۴±۶/۵۳c	۰/۱۴±۶/۳۴cd	۰/۰۹۵±۶/۱۰d
(گرم/دسی‌لیتر)	۵۰ ٪ غلظت LC50	۰/۰۷۶±۷/۶۱a	۰/۲۳±۶/۹۱b	۰/۰۱±۵/۷۹c	۰/۰۹±۵/۵۷c	۰/۰۹۶±۵/۱۶d
هماتوکریت	۱۰ ٪ غلظت LC50	۰/۱۵±۲۷/۹۶a	۰/۴۴±۲۱/۶۲b	۰/۲۲±۱۸/۷۳c	۰/۰۷±۱۸/۲۲c	۰/۴۳±۱۶/۴۲d
(درصد)	۵۰ ٪ غلظت LC50	۰/۱۵±۲۷/۹۶a	۰/۵۰±۲۰/۵۵b	۰/۱۰±۱۶/۱۴c	۰/۲۱±۱۵/۸۳c	۰/۱۶±۱۳/۸۲d
گلبول سفید	۱۰ ٪ غلظت LC50	۲۲۰±۶۵۴۶a	۷۲۱±۱۱۴۰۰b	۸۰۲±۱۹۴۶۶c	۷۱۷±۱۷۷۰۶d	۷۰۰±۱۵۶۰۰e
(میکرولیتر/$۱۰^{۴}\times$)	۵۰ ٪ غلظت LC50	۲۲۰±۶۵۴۶a	۱۶۰۹±۱۲۶۰۰b	۹۹۵±۲۳۵۴۳d	۲۰۸۸±۲۰۶۳۵c	۶۰۸±۱۹۳۷۰c
M.C.H.C	۱۰ ٪ غلظت LC50	۰/۲۳±۲۷/۲۳a	۰/۴۵±۳۲/۰۶b	۱/۶۶±۳۴/۸۸c	۰/۶۳±۳۴/۷۹c	۱/۴۴±۳۷/۱۶d
(گرم/دسی‌لیتر)	۵۰ ٪ غلظت LC50	۰/۲۳±۲۷/۲۳a	۱/۷۷±۳۳/۶۵b	۰/۲۳±۳۵/۸۷cd	۱/۰۱±۳۵/۱۸bc	۰/۹۴±۳۷/۳۶d
M.C.V	۱۰ ٪ غلظت LC50	۰/۹۶±۱۲۶/۱۶c	۱/۸۹±۱۰۳/۱۳a	۱۴/۷۹±۱۱۶/۲۴abc	۲/۰۳±۱۱۷/۵۷bc	۶/۳۳±۱۰۸/۵۲ab
(فمتولیتر)	۵۰ ٪ غلظت LC50	۰/۹۶±۱۲۶/۱۶a	۴/۰۶±۱۱۱/۱۶b	۲/۱۳±۱۰۰/۲۷c	۲/۳۸±۱۰۲/۶۲c	۴/۸۴±۹۲/۶۸d
M.C.H	۱۰ ٪ غلظت LC50	۰/۳۳±۳۴/۳۶a	۰/۱۶±۳۳/۰۶a	۳/۵۷±۴۰/۴۱b	۰/۶۲±۴۰/۹۰b	۳/۱۸±۴۰/۳۵b
(پیکوگرم)	۵۰ ٪ غلظت LC50	۰/۳۳±۳۴/۳۶a	۲/۶۹±۳۷/۴۲a	۰/۶۴±۳۵/۹۶a	۰/۴۳±۳۶/۰۹a	۲/۰۲±۳۴/۶۳a

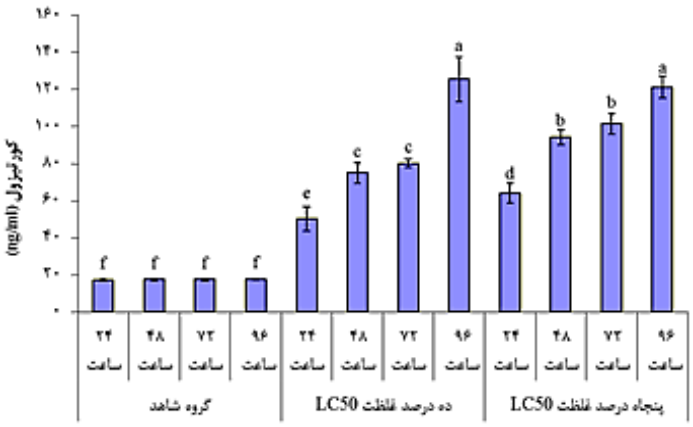
* مقایسه درون گروهی بوده و حروف لاتین متفاوت در هر سطر بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح اعتماد ۵ درصد می‌باشد.

بیش‌ترین میزان هموگلوبین و هماتوکریت در تیمار شاهد مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری را با سایر تیمارها نشان داده‌است (p<۰/۰۵)، به‌طوری‌که با افزایش غلظت کلرید سرب و نیز گذشت زمان از میزان این شاخص‌های خونی کاسته شده است. میزان گلبول‌های سفید خون (WBC) نیز در تیمار ۵۰ درصد غلظت LC50 کلرید سرب در ماهی کپور نقره‌ای با افزایش غلظت و نیز گذشت زمان افزایش معنی‌داری پیدا کرده است (p<۰/۰۵). بررسی نتایج حاصل از شاخص‌های ایمنی شناسی و شمارش تفریقی گلبول‌های سفید ماهی کپور نقره‌ای در معرض غلظت‌های مختلف کلرید سرب نشان داد که میزان تغییرات لنفوسیت و نوتروفیل، کاملاً معنی‌دار می‌باشد (p<۰/۰۵)، این در حالی است که تغییرات برای آئوزینوفیل معنی‌دار نبود. میزان لنفوسیت با افزایش مقدار آلاینده در هر چهار دوره نمونه‌برداری، کاهش و برای نوتروفیل نیز با افزایش زمان و میزان غلظت کلرید سرب، افزایش در مقدار آن مشاهده شد (جدول ۵).

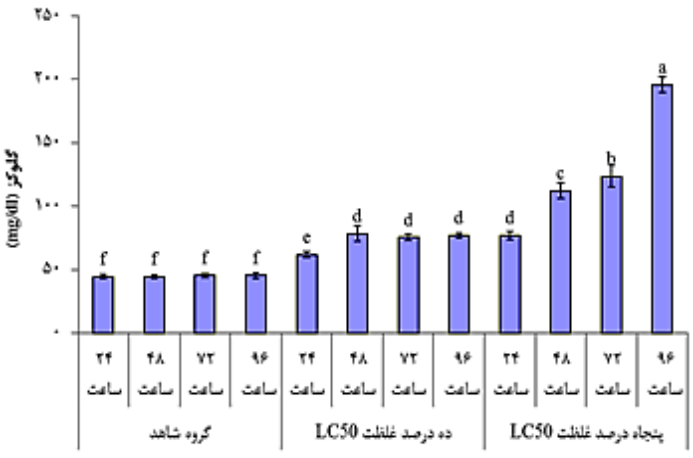
جدول ۵: مقدار متوسط شاخص‌های ایمنی شناختی ماهی کپور نقره‌ای در تیمارهای مختلف کلرید سرب (میانگین±SD)

فاکتور (درصد)	زمان	شاهد	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
لنفوسیت	۱۰ ٪ غلظت LC50	۰/۵۷±۹۱/۶۶a	۰/۷۵±۹۰/۱۰b	۰/۳۲±۸۹/۲۳b	۰/۲±۸۶/۳۰c	۰/۶۲±۸۲/۴۰d
	۵۰ ٪ غلظت LC50	۰/۵۷±۹۱/۶۶a	۰/۵۷±۸۷/۶۶b	۰/۷۵±۸۶/۷۳b	۰/۲±۸۱/۲۰c	۰/۸۷±۷۷/۲۶d
نوتروفیل	۱۰ ٪ غلظت LC50	۰/۵۷±۸/۳۳a	۰/۷۵±۹/۹۰b	۰/۴۵±۱۰/۴۳b	۰/۶۱±۱۳/۰۳c	۰/۴۳±۱۶/۶۰d
	۵۰ ٪ غلظت LC50	۰/۵۷±۸/۳۳a	۰/۵۲±۱۲/۲۵b	۰/۳±۱۳/۰۰b	۰/۶۱±۱۸/۱۳c	۰/۷۵±۲۱/۷۳d
آئوزینوفیل	۱۰ ٪ غلظت LC50	۰/۰۰±۰/۰۰a	۰/۰۰±۰/۰۰a	۰/۵۷±۰/۳۳a	۰/۵۷±۰/۶۶a	۱/۰۰±۱/۰۰a
	۵۰ ٪ غلظت LC50	۰/۰۰±۰/۰۰a	۰/۵۷±۰/۶۶a	۰/۵۷±۰/۶۶a	۰/۵۷±۰/۶۶a	۱/۰۰±۱/۰۰a

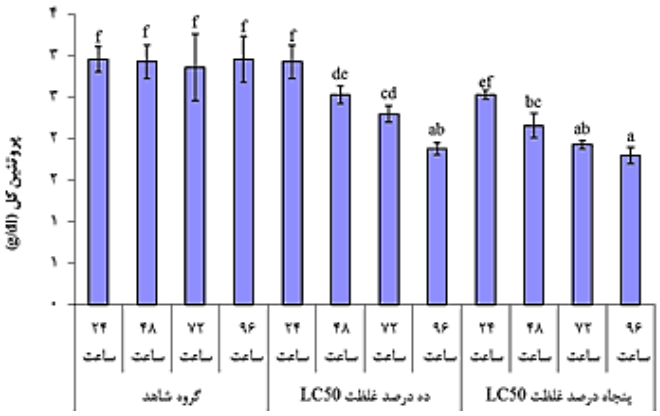
* مقایسه درون گروهی بوده و حروف لاتین متفاوت در هر سطر بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح اعتماد ۵ درصد می باشد.



شکل ۱: تغییرات کورتیزول خون ماهی فیتوفاگ در معرض سرب



شکل ۲: تغییرات گلوکز خون ماهی فیتوفاگ در معرض سرب



شکل ۳: تغییرات پروتئین کل خون ماهی فیتوفاگ در معرض سرب

در پژوهش حاضر نتایج بررسی شاخص‌های استرسی نظیر گلوکز، کورتیزول و نیز پروتیین کل ماهیان کپور نقره‌ای که در معرض کلرید سرب قرار گرفته بودند نشان داد که با افزایش غلظت آلاینده میزان گلوکز و کورتیزول به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است (شکل‌های ۱ و ۲)، این درحالی بود که میزان پروتئین کل به‌طور معنی‌داری با افزایش غلظت کلریدسرب و نیز گذشت زمان کاهش یافته است (شکل ۳). این نتایج نشان داد که در تیمار ۵۰٪ غلظت LC50 (بیش‌ترین غلظت سم) در روز چهارم، میزان پروتئین کل خون به کم‌ترین مقدار خود یعنی ۱/۸ رسیده است، این در حالی است که بیش‌ترین مقدار این شاخص خونی در تیمار شاهد قابل مشاهده بود. در پژوهش حاضر در گروه شاهد تغییرات رفتاری و یا مرگ و میر در طول مدت زمان آزمایش مشاهده نشد و در واقع همه ماهیان گروه شاهد فعال بوده و به‌طور معمول شنا می‌کردند. با این‌حال ماهیان تحت آزمون تغییرات رفتاری

متفاوتی را در غلظت‌های مختلف سرب نشان دادند. در ساعات اولیه آزمایش پس از در معرض قرارگیری ماهیان با سرب، نرخ حرکات ماهی فزونی یافت، به‌طوری‌که ماهیان جنبش شدید داشته و قصد فرار از مخزن را داشتند. اختلال‌های رفتاری شامل بی‌تابی شدید، حرکات عمودی و مارپیچ، افزایش باز و بسته شدن سرپوش آبششی در غلظت ۱۶ میلی‌گرم در لیتر پس از ۴۸ ساعت از قرارگرفتن در معرض سرب مشاهده شد. این در حالی است که برای تیمارهای ۳۲، ۶۴ و ۱۲۸ میلی‌گرم در لیتر از همان ساعات اولیه این اختلالات رفتاری آغاز گردید و نیز در این تیمارها وجود لایه لزج سطحی بر روی پوست ماهیان مشاهده شد. لازم به ذکر است که میزان این حرکات رفتاری، نوع و مدت زمان آن با افزایش غلظت سرب افزایش یافت.

بحث

بررسی تغییرات شاخص‌های خون با توجه به حساسیت گونه‌های مختلف ماهیان و نیز نشان دادن شرایط فیزیوپاتولوژیک آن‌ها تحت شرایط مختلف استرس، می‌تواند به‌عنوان یک ابزار مفید به‌منظور درک اثر آلاینده‌هایی نظیر فلزات سنگین استفاده گردد. این پارامترها به‌عنوان نشانگرهای زیستی با نشان‌دادن وضعیت فیزیولوژی و سلامت عمومی موجود زنده، در شرایط مختلف تحت بررسی مفید می‌باشند (Van der Oost و همکاران، ۲۰۰۳). در پژوهش حاضر با افزایش غلظت آلاینده میزان مرگ و میر ماهیان فیتوفاگ نیز افزایش یافت، هم‌چنین با افزایش غلظت سرب مدت زمان لازم برای کشتن ۵۰٪ از ماهیان تحت آزمایش را کاهش یافت. میزان LC_{50} 96h کلرید سرب برای ماهی فیتوفاگ به‌دست آمد. Olaifa و همکاران (۲۰۰۳) میزان سمیت کشنده سرب (کلرید سرب) در ۹۶ ساعت را برای گربه ماهی آفریقایی (*Clarias gariepinus*) ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر محاسبه نمودند. هم‌چنین میزان LC_{50} 96h نیترات سرب برای کپور ماهی *Labeo rohita* ۶/۸۰ میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آمد (Latif و همکاران، ۲۰۱۴)، میزان LC_{50} 96h نیترات سرب برای ماهی *Oreochromis niloticus* ۲/۱۵ میلی‌گرم در لیتر، برای گربه‌ماهی *Clarias lazera* ۱/۷۲ میلی‌گرم در لیتر و برای بی‌مهرگان آبزی *Chironomus tentans* ۱/۷۷ و نیز *Benacus* sp. ۱/۳۶ میلی‌گرم در لیتر گزارش شده است (Oladimeji و Offem، ۱۹۸۹). همان‌گونه که پژوهشگران مختلف گزارش داده‌اند، ماهیان گونه‌های مختلف تفاوت قابل توجهی را در میزان حساسیت و پاسخ به آلاینده سرب از خود نشان داده‌اند. تفاوت در میزان سمیت کشنده سرب تابع سختی آب، درجه حرارت، پی‌اچ، گونه مورد آزمایش و سن ماهی است، به‌طور مثال با افزایش سختی آب سمیت سرب به‌واسطه تشکیل ترکیبات غیرآلی پیچیده که میزان سرب را برای ماهی تحت کنترل قرار می‌دهد، کاهش می‌یابد (Hodson و همکاران، ۱۹۸۴). به‌طورکلی تغییرات رفتاری که زودتر از مرگ و میر ماهیان نمایان می‌شوند به‌عنوان شاخصی مناسب، برای ارزیابی آلودگی‌های تحت‌کشنده حتی در غلظت‌های پایین کاربرد دارند. در پژوهش حاضر اختلال‌های رفتاری شامل بی‌تابی شدید، حرکات عمودی و مارپیچ، افزایش باز و بسته شدن سرپوش آبششی در ماهیان مورد مطالعه در تیمارهای مختلف مشاهده شد که مشابه چنین علایمی نظیر بیش فعالی، شنای نامنظم و از دست دادن تعادل در ماهی قزل‌آلای جویباری (*Salvelinus fontinalis*) در پاسخ به آلاینده سرب (Holcombe و همکاران، ۱۹۷۶)، گربه‌ماهی آفریقایی *Clarias gariepinus* در معرض نیکل (Ololade و Oginni، ۲۰۱۰) و نیز مارماهی *Anguilla anguilla* در پاسخ به سرب (Ciftci و همکاران، ۲۰۰۸) گزارش شده بود. پژوهش Lal Shah (۲۰۱۰) نشان داد زمانی‌که لای ماهیان (*Tinca tinca*) در معرض سرب قرار می‌گیرند دارای تغییرات رفتاری نظیر حرکت عمودی، حرکت در سطح آب، بی تابی و در نهایت بی‌حالی و سقوط به کف می‌شوند. در واقع حرکات عمودی، مارپیچ و بی‌تابی ماهی می‌تواند در نتیجه از دست دادن تعادل در اثر مسمومیت باشد (Ololade و Oginni، ۲۰۱۰). همان‌گونه که در جدول ۴ قابل مشاهده است، تعداد گلبول‌های قرمز، میزان هماتوکریت و هموگلوبین ماهیان در معرض سرب در هر دو غلظت کشنده و تحت‌کشنده، نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری را نشان داده است، در واقع با افزایش غلظت سرب این مقادیر کاهش بیش‌تری را نشان داده است، Vani و همکاران (۲۰۰۱) بیان کردند، آسیب مواد سمی بر روی اریتروسیت‌ها تاثیری ثانویه است که در نتیجه عمل اولیه سموم بر روی بافت‌های اریتوپویتیک بوده که ساخت گلبول‌های قرمز متوقف شده و یا به‌دلیل افزایش تخریب گلبول‌های قرمز است. به‌عبارت دیگر کاهش در میزان اریتروسیت‌ها و هم‌چنین سطح هموگلوبین و هماتوکریت نشان‌دهنده کم‌خونی به سبب متوقف شدن خون‌سازی، اختلال در عملکرد تنظیم اسمزی و افزایش تخریب گلبول‌های قرمز در ارگان خون‌ساز می‌باشد. Fantin و همکاران (۱۹۸۸) با بررسی تاثیر آلاینده سرب با غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر بر شاخص‌های خونی ماهی قرمز (*Carassius carassius auratus*) پس از ۴۸ ساعت گزارش دادند که شاخص‌های خونی نظیر RBC، هماتوکریت، هموگلوبین و MCHC کاهش یافته است. بررسی تاثیر نیکل بر روی پارامترهای خونی گربه‌ماهی آفریقایی (*Clarias gariepinus*) نیز با افزایش غلظت نیکل کاهش معنی‌دار شاخص‌های هماتوکریت، هموگلوبین و گلبول‌های قرمز را نشان داد (Ololade و Oginni، ۲۰۱۰). هم‌چنین پژوهش Latif و همکاران (۲۰۱۴) با بررسی تاثیر نیترات سرب بر شاخص‌های هماتولوژی ماهی *L. rohita* کاهش معنی‌دار در میزان شاخص‌های RBC، هموگلوبین و هماتوکریت را نشان داد. این در حالی

است که لای‌ماهیان در معرض سرب کاهش در شاخص‌های هموگلوبین و تعداد گلبول‌های قرمز و نیز افزایش در هماتوکریت را نشان دادند (Lal Shah، ۲۰۱۰). پژوهش Kaya و همکاران (۲۰۱۵) نشان داد شاخص‌های هماتولوژی (هماتوکریت، هموگلوبین، تعداد گلبول‌های قرمز) ماهی تیلاپیا (*Oreochromis mossambicus*) در معرض سرب در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشته است.

سرب باعث مرگ زودرس سلول‌های بالغ قرمز خون و ممانعت از شکل‌گیری هموگلوبین از طریق مهار آنزیم ALA-D می‌شود (Hodson و همکاران، ۱۹۸۴). مولکول ALA-D دارای گروه‌های تیول (thiol) بوده که به‌عنوان یک آنزیم دخیل در بیوسنتز هم (آهن) می‌باشد و توسط سرب غیرفعال می‌شوند (Fantin و همکاران، ۱۹۸۸). این خاصیت سرب می‌تواند علت کاهش هموگلوبین و در نتیجه کم‌خونی در مطالعه اخیر باشد. مطالعات Hodson و همکاران (۱۹۷۷) نشان داد که در بررسی اثر برخی فلزات سنگین هم‌چون سرب (Pb)، روی (Zn)، کادمیوم (Cd)، جیوه (Hg)، بر فعالیت آنزیم ALA-D و تاثیر آن بر میزان گلبول‌های قرمز خون در ماهیان مختلف، تنها فلز سرب می‌باشد که دارای قابلیت غیرفعال‌سازی و بازدارندگی این آنزیم می‌باشد. در پژوهش حاضر قرارگیری ماهیان در معرض سرب موجب کاهش معنی‌دار هماتوکریت گردید (جدول ۴). مطالعه Adeyemo (۲۰۰۷) نشان داد، قرارگیری گربه‌ماهی *Clarias gariepinus* در معرض سرب طی ۹۶ ساعت سبب کاهش معنی‌دار میزان هماتوکریت و RBC خواهد شد. Banaee و همکاران (۲۰۰۸)، بیان کردند عواملی که باعث تغییر در اندازه یا تعداد گلبول‌های قرمز می‌شوند، می‌توانند باعث تغییر در میزان هماتوکریت شوند و اگر آلاینده‌ای توانایی ایجاد تأثیر در گلبول‌های قرمز ارگانیسمی را داشته باشد، هماتوکریت خون آن نیز کاهش می‌یابد و سنجش آن می‌تواند در تشخیص بیماری مؤثر باشد. علاوه بر این با توجه به آن که هموگلوبین در داخل گلبول‌های قرمز است، پس اختلالات گلبول‌های قرمز می تواند در آن تأثیر بگذارد. به‌عنوان مثال کاهش هموگلوبین می‌تواند ناشی از پاره شدن و از بین رفتن گلبول قرمز باشد (Ololade و Oginni، ۲۰۱۰). درنهایت می‌توان گفت کاهش تعداد گلبول‌های قرمز، میزان هماتوکریت و هم‌چنین غلظت هموگلوبین همگی از نشانه‌های کم‌خونی در برابر اثرات سرب و مسمومیت ناشی از آن می‌باشد.

همان‌گونه که جدول ۴ نشان می‌دهد در پژوهش حاضر تعداد گلبول‌های سفید خون ماهی فیتوفاگ در هر دو غلظت مورد آزمایش نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری یافته است. با این‌حال در تیمار ۵۰ درصد از میزان LC_{50} 96h میزان گلبول‌های سفید خون پس از گذشت ۷۲ ساعت از شروع آزمایش نسبت به قبل از آن کاهش یافت. Cogun و Sahin (۲۰۱۳) با بررسی شاخص‌های خونی نظیر تعداد گلبول‌های سفید ماهی *Oreochromis niloticus* در برابر غلظت‌های مختلف سرب گزارش کرد که پس از ۱۰ روز در معرض قرارگیری ماهیان در برابر سرب تغییری در تعداد گلبول‌های سفید مشاهده نشد، این در حالی بود که در پایان ۲۰ روز از آزمایش کاهش سطح این پارامتر خونی گزارش شد. هم‌چنین میزان گلبول‌های سفیدخون ماهی *Clarias gariepinus* (Adeyemo، ۲۰۰۷) و نیز ماهی *Labeo rohita* (Latif و همکاران، ۲۰۱۴) در معرض سرب نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری را نشان داد.

در حالت کلی از پاسخ‌های ایمنی‌بدن ماهی در طی دوره استرس، افزایش تعداد کل گلبول‌های سفید و در عوض کاهش کاهش هموگلوبین و تعداد اریتروسیت (گلبول قرمز) می‌باشد (Das و همکاران، ۲۰۰۶). افزایش میزان گلبول‌های سفید خون ماهیان قرار گرفته در معرض استرس ممکن است به این دلیل باشد که موجود توانسته است سیستم ایمنی خود را در مواجهه با آلاینده تقویت کرده و با شرایط سازگار شود (Remyla و همکاران، ۲۰۰۸). با این‌حال همان‌گونه که اشاره شد در اواخر دوره آزمایش میزان گلبول‌های سفید خون کاهش یافته است، که به‌نظر می‌رسد کاهش در تعداد گلبول‌های سفید (لکوپنیا) ممکن است در اثر تجمع فلز در کبد و کلیه باشد (Ololade و Oginni، ۲۰۱۰). در واقع به‌طور معمول با تضعیف بدن در غلظت‌های بالا با کاهش تولید گلبول‌های سفید مواجه خواهیم بود که کاهش در تعداد WBC نشان‌دهنده ترشح اپی‌نفرین در طول استرس بوده که باعث کاهش مقادیر لکوسیت و در نتیجه تضعیف سیستم ایمنی بدن می‌باشد (Adeyemo، ۲۰۰۷). در پژوهش حاضر میزان لنفوسیت گروه‌های در معرض آلاینده، نسبت به گروه شاهد دارای کاهش معنی‌داری بود. کاهش تعداد لنفوسیت‌ها می‌تواند ناشی از نقص در سیستم ایمنی بدن باشد (Bannaee و همکاران، ۲۰۰۸). پدیده کاهش لنفوسیت در ماهی به‌عنوان یک اثر ثانویه استرس، مربوط به آزادسازی کاتکول آمین‌ها است. به‌علت بالا بودن استرس القا شده، کورتیزول پلاسما مستقیماً بر لنفوسیت‌ها اثر سیتولیتیک دارد (Engelsma و همکاران، ۲۰۰۳). وظیفه نوتروفیل‌ها نیز فاگوسیتوز عامل خارجی است (Evans، ۲۰۰۸)، در واقع علت افزایش آن‌ها می‌تواند به‌دلیل مقابله با عامل خارجی در این‌جا سرب باشد. Banaee و همکاران (۲۰۰۸) ، بیان کردند که اکثر عفونت ها باعث افزایش نوتروفیل و نوتروفیلی شدن خون می‌شوند. شاخص‌های اریتروسیتی نظیر MCV، MCH و MCHC کاملاً به مقادیر شاخص‌های هموگلوبین، هماتوکریت و تعداد گلبول‌های قرمز خون وابسته می‌باشد، بنابراین تغییرات در شاخص‌های ذکر شده سبب تغییر در این سه فاکتور می‌گردد. در مطالعه حاضر، میزان شاخص‌های اریتروسیتی نسبت به گروه شاهد تغییرات معنی‌داری را نشان دادند، از میان این پارامترها، MCH در تیمار ۱۰ درصد غلظت LC_{50} 96h

افزایش معنی‌داری به نسبت گروه شاهد داشته است، که نشان‌دهنده تورم سلول‌های قرمز خون بوده و یا نشان‌دهنده ورود غلظت بالایی از گلبول‌های قرمز نابالغ کوچک‌تر حاوی هموگلوبین کم‌تر به گردش خون به‌دلیل هیپرپلازی در مکان‌های تولیدکننده گلبول‌های قرمز می‌باشد. این درحالی بود که میزان شاخص MCHC نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد. بررسی تاثیر نیکل بر روی پارمترهای خونی گربه‌ماهی آفریقایی (*Clarias gariepinus*) کاهش معنی‌دار شاخص‌های اریتروسیتی (MCV، MCH و MCHC) را نشان داد (Ololade و Oginni، ۲۰۱۰). از سوی دیگر میزان MCHC در بررسی اثر نیترات سرب برای کپور ماهی *Labeo rohita* افزایش نشان داد (Latif و همکاران، ۲۰۱۴). هم‌چنین در پژوهش Adeyemo (۲۰۰۷) با بررسی اثر سرب بر گربه‌ماهی *Clarias gariepinus* مقادیر MCHC، MCH و MCV به‌طور قابل توجهی در تمام تیمارها نسبت به شاهد افزایش یافت. یکی از عوامل تاثیرگذار در مسمومیت آبزیان زمان است، هنگامی‌که ماهی در معرض غلظت‌های ثابتی از سم باشد به مرور زمان هم مقاومت ماهی تحلیل می‌رود و هم سم فرصت بیش‌تری برای تاثیر گذاری روی ماهی پیدا می‌کند (Oh و همکاران، ۱۹۹۱)، هم‌چنین بر اهمیت این عامل در دیگر مطالعات نیز تاکید شده است (Shahbazi و همکاران، ۲۰۱۵). در پژوهش حاضر نیز در بسیاری از پارامترها، در یک غلظت ثابت با گذشت زمان شاهد کاهش بیش‌تر در میزان این پارامترها بودیم.

در پژوهش حاضر میزان کورتیزول و گلوکز خون در هر دو تیمار مورد آزمایش نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است، مطالعات متعددی نشان داده است که قرار گرفتن ماهی در معرض فلزات سنگین باعث بروز استرس شده که مشخصه آن افزایش سطوح کورتیزول و گلوکز خون می‌باشد (Gagnon و همکاران، ۲۰۰۶). در پژوهش Firat و همکاران (۲۰۱۱) پس از قرارگیری ماهیان تیلاپیای‌نیل *Oreochromis niloticus* در معرض غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر سرب، ۴ روز پس از شروع آزمایش افزایش معنی‌داری در میزان گلوکز و کورتیزول خون مشاهده شد، این در حالی بود که پس از ۲۱ روز از شروع آزمایش هیچ تفاوتی در میان شاخص‌های ذکر شده با گروه شاهد مشاهده نشد. Martinez و همکاران (۲۰۰۴) گزارش دادند که گلوکز پلاسما و نیز سطح کورتیزول در ماهی *Prochidolus lineatus* در پاسخ به آلاینده سرب افزایش یافته است. در شرایط استرس، انتشار و آزادسازی کورتیکواستروئیدها یک پدیده شایع و یک پاسخ غیراختصاصی به استرس‌های محیطی می‌باشد (Gagnon و همکاران، ۲۰۰۶). بنابراین در پژوهش حاضر سرب به‌عنوان یک عامل استرس‌زا شناخته شده که در اثر آن کورتیزول سرم خون افزایش چشمگیری داشته است. کورتیزول شاخص غیراختصاصی از استرس در ماهیان بوده و ارزیابی آن به‌عنوان یک پاسخ اولیه به عوامل استرس‌زا مانند فلزات و آفت‌کش‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد و می‌تواند نشان‌دهنده بروز استرس و شدت آن باشد (Martinez و همکاران، ۲۰۰۴؛ Firat و همکاران، ۲۰۰۱)، محور هیپوتالاموس هیپوفیز اینتررنال (HPI) در ماهیان به‌منظور تولید کورتیزول و سایر هورمون‌های کورتیکواستروئید برای حفظ هموستاز بدن در برابر آلاینده‌هایی هم‌چون فلزات سنگین فعال شده‌است (Gagnon و همکاران، ۲۰۰۶). کورتیزول در بافت اینتررنال ذخیره نمی‌شود، بلکه در اثر تقاضای بدن در پاسخ به استرس‌های هم‌چون حضور فلزات سنگین و آفت‌کش‌ها ترشح می‌شود (Fantin و همکاران، ۱۹۸۸).

در پژوهش حاضر افزایش سطح گلوکز خون نشانه اختلال در سوخت و ساز کربوهیدارت است، در واقع افزایش محتوای گلوکز خون به‌عنوان یک نتیجه در معرض قرارگیری ماهیان با فلزات سنگین می‌تواند به‌عنوان یک عامل تنش‌زا باشد که احتمالاً به‌دلیل گلیکوژنولیز فشرده‌و سنتز گلوکز از پروتئین‌ها و اسیدهای آمینه بافت اضافه کبدی صورت می‌گیرد (Almeida و همکاران، ۲۰۰۱). Fantin و همکاران (۱۹۸۸) با بررسی تاثیر آلاینده سرب با غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر بر غلظت گلوکز خون ماهی *Carassius carassius auratus* پس از ۴۸ ساعت گزارش دادند که غلظت گلوگز ماهیان در معرض آلاینده در برابر گروه شاهد افزایش یافته است. هم‌چنین پژوهش Mohiseni و همکاران (۲۰۱۶) نشان داد که میزان گلوکز خون ماهی کپور معمولی در پاسخ به سرب در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافته است. هم‌چنین مطالعه Ciftci و همکاران (۲۰۰۸) نشان داد با افزایش غلظت و هم‌چنین زمان قرارگیری مارماهی *Anguilla anguilla* در معرض سرب میزان گلوکز خون به‌صورت خطی افزایش می‌یابد.

در پژوهش حاضر با افزایش غلظت سرب میران پروتئین خون کاهش معنی‌داری داشته است، کاهش پروتئین خون ماهی در طی تنش و استرس محیطی می‌تواند ناشی از ناتوانی در جذب غذا، بالا رفتن هزینه تولید انرژی جهت ایجاد هوموستازی، ترمیم بافتی و نیز سمیت زدایی در بدن باشد (Neff، ۱۹۸۵). Sastry و Roa (۱۹۸۴) با مطالعه اثرات کلرید جیوه بر روی ماهی *Channa punctatus* بیان کردند که افزایش کورتیزول می‌تواند موجب افزایش فعالیت آنزیم‌هایی شود که نقش مهمی در کاتابولیسم آمینواسید دارند (مانند گلوتامات دهیدروژناز، آمینواسید اکسیداز و گزانتین اکسیداز) که در نهایت موجب کاهش میزان پروتئین و در مقابل باعث افزایش غلظت گلوکز می شود که در پژوهش حاضر افزایش گلوکز و کاهش پروتئین کل مشاهده شد. مطالعه Ciftci و همکاران (۲۰۰۸) نشان داد با افزایش غلظت و هم‌چنین زمان قرارگیری مارماهی *Anguilla anguilla* در معرض سرب میزان پروتئین خون به‌صورت خطی کاهش

می‌یابد. مطالعه Firat و همکاران (۲۰۱۱) کاهش پروتئین کل را در طول قرارگیری ماهیان تیلاپیای نیل در معرض آلاینده سرب پس از ۲۱ روز نشان داد. Mohiseni و همکاران (۲۰۱۶) گزارش دادند که میزان پروتئین خون ماهی کپور معمولی در معرض سرب نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است.

آگاهی از پاسخ ماهی به عوامل استرس‌زای مختلف کمک بیش‌تری در بهبود تولید ماهی و نیز ارائه اطلاعات بیش‌تر درباره راه‌های موثر در کنترل و نظارت بر استرس در آبزی‌پروری می‌شود. باتوجه به آن که قراردادن ماهی کپور نقره‌ای در معرض سطوح مختلف سرب نشان از تغییرات در شاخص‌های مهم خونی و نیز غلظت پروتئین، کورتیزول و گلوکز خون دارد، بنابراین تغییرات در شاخص‌های خونی و بیوشیمیایی ماهی فیتوفاگ در برابر آلاینده سرب نشان می‌دهد که می‌توان آن‌ها را به‌عنوان شاخص‌های استرس ماهی در معرض سطوح مختلف سرب در آب استفاده کرد، این تغییرات در بدن ماهی به‌عنوان یک شاخص زیستی، زنگ خطری برای بهداشت و سلامت انسان است که به چنین زنجیره‌های غذایی متأثر از محیط وابسته است.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر حاصل طرح پژوهشی در باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان دانشگاه آزاد اسلامی به شماره شناسه ۹۴۳۷۰ است. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از همکاری مادی و معنوی دانشگاه آزاد اسلامی واحد یاسوج (باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان) صمیمانه قدردانی و تشکر به‌عمل آورند.

منابع

۱. **Adeyemo, O.K., 2007.** Haematological profile of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) exposed to lead. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. Vol. 7, No. 2, pp: 163-169.

۲. **Almeida, J.A.; Novelli, E.L.B.; Silva, M.D.P. and Júnior, R.A., 2001.** Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Environmental Pollution. Vol. 114, No. 2, pp: 169-175.

۳. **Andresen, B.D., 1986.** Textbook of clinical chemistry (Vol. 486). Tietz, N.W., (ed.), Philadelphia et al.: Saunders. 146 p.

۴. **Banaee, M.; Mirvagefei, A.R.; Rafei, G.R. and Amiri, B.M., 2008.** Effect of sub-lethal diazinon concentrations on blood plasma biochemistry. International Journal of Environmental Research. Vol. 2, pp: 189-198.

۵. **Ciftci, N.; Cicik, B.; Erdem, C. and Ay, O., 2008.** Effects of lead concentrations on sera parameters and hematocrit levels in *Anguilla anguilla* (Linnaeus, 1758). Journal of Fisheries Sciences. Vol. 2, pp: 616-622.

۶. **Cogun, H.Y. and Şahin, M., 2013.** The effect of lead and zeolite on hematological and some biochemical parameters in Nile fish (*Oreochromis niloticus*). Current Progress Biological Research. Vol. 12, pp: 277-286.

۷. **Das, P.C.; Ayyappan, S. and Jena J.K., 2006.** Haematological changes in the three Indian major carps, *Catla catla* (Hamilton), *Labeo rohita* (Hamilton) and *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) exposed to acidic and alkaline water pH. Aquaculture. Vol. 256, pp: 80-87.

۸. **Drobkin, D.R., 1945.** Crystallographic and optical properties of human hemoglobin: a proposal for the standardization of hemoglobin. American Journal of the Medical Sciences. Vol. 209, pp: 268-270.

۹. **Engelsma, M.Y.; Hougee, S.; Nap, D; Hofenk, M.; Rombout, J.H.; van Muiswinkel, W.B. and Erburg-van Kemenade, B.L., 2003.** Multiple acute temperature stress affects leucocyte populations and antibody responses in common carp, *Cyprinus carpio* L. Fish & shellfish immunology. Vol. 15, No. 5, pp: 397-410.

۱۰. **Evans, G.O., 2008.** Animal hematotoxicology: a practical guide for toxicologists and biomedical researchers. CRC Press. 224 p.

۱۱. **Fantin, A.M.B.; Trevisan, P.; Pederzoli, A. and Bergomi, M., 1988.** Effects of acute experimental pollution by lead on some haematological parameters in *Carassius carassius (L.) var. auratus*. Italian Journal of Zoology. Vol. 55, pp: 251-255.

۱۲. **Fırat, O.; Cogun, H.Y.; Yüzereroğlu, T.A.; Gök, G.; Fırat, O.; Kargin, F. and Kötemen, Y.A., 2001.** Comparative study on the effects of a pesticide (cypermethrin) and two metals (copper, lead) to serum biochemistry of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish Physiology and Biochemistry. Vol. 37, No. 3, pp: 657-666.

۱۳. **Fırat, O. and Kargın, F., 2010.** Individual and combined effects of heavy metals on serum biochemistry of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Archives of environmental contamination and toxicology. Vol. 58, No. 1, pp: 151-157.

۱۴. **Gagnon, A.; Jumarie, C. and Hontela, A., 2006.** Effects of Cu on plasma cortisol and cortisol secretion by adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic toxicology. Vol. 78, No. 1, pp: 59-65.

۱۵. **Hodson, P.V.; Blunt, B.R.; Spry, D.J. and Austen, K., 1977.** Evaluation of erythrocyte δ-amino levulinic acid dehydratase activity as a short-term indicator in fish of a harmful exposure to lead. Journal of the Fisheries Board of Canada. Vol. 34, No. 4, pp: 501-508.

۱۶. **Hodson, P.V.; Whittle, D.M.; Wong, P.T.; Borgmann, U. and Thomas, R.L., 1984.** Lead contamination of the Great Lakes and its potential effects on aquatic biota. In: Nriagu, J.O. Simmons, M.S. (ed.), Toxic contaminants in the Great Lakes. John Wiley and Sons, Indianapolis, In. Advances in Environmental Science and Technology. 527 p.

۱۷. **Holcombe, G.W.; Benoit, D.A.; Leonard, E.N. and McKim, J.M., 1976.** Long-term effects of lead exposure on three generations of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Journal of the Fisheries Board of Canada. Vol. 33, No. 8, pp: 1731-1741.

۱۸. **Javed, M. and Usmani, N., 2015.** Impact of heavy metal toxicity on hematology and glycogen status of fish: a review. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences. Vol. 85, No. 4, pp: 889-900.

۱۹. **Kaya, H.; Akbulut, M. and Yılmaz, S., 2015.** Influence of sublethal lead concentrations on glucose, serum enzymes and ion levels in tilapia (*Oreochromis mossambicus*). In Proceedings of the 7th International Conference on

of the freshwater murrel, *Channa punctatus*. Environmental Research. Vol. 34, No. 2, pp: 343-350.

۳۵. **Shahbazi, S.; Moëzzi, F.; Poorbagher, H. and Rostamian, N., 2015.** Effects of Malathion Acute Toxicity on Behavioral and Haematological Parameters in *Capoeta damascina* (Cypriniformes: Cyprinidae). Journal of Chemical Health Risks. Vol. 5, No. 3, pp: 209-220.

۳۶. **Shaluei, F.; Hedayati, A.; Jahanbakhshi, A. and Baghfalaki, M., 2012.** Physiological responses of great sturgeon (*Huso huso*) to different concentrations of 2-phenoxyethanol as an anesthetic. Fish physiology and biochemistry. Vol. 38, No. 6, pp: 1627-1634.

۳۷. **Shaluei, F.; Hedayati, A.; Jahanbakhshi, A.; Kolangi, H. and Fotovat, M., 2013.** Effect of subacute exposure to silver nanoparticle on some hematological and plasma biochemical indices in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). Human & experimental toxicology. Vol. 32, No. 12, pp: 1270-1277.

۳۸. **Shariati, F.; Sari, A.E.; Mashinchian, A. and Pourkazemi, M., 2011.** Metallothionein as potential biomarker of cadmium exposure in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). Biological trace element research. Vol. 143, No. 1, pp: 281-291.

۳۹. **Sprague, J.B., 1971.** Measurement of pollutant toxicity to fish-III: Sublethal effects and safe concentrations. Water Research. Vol. 5, No. 6, pp: 245-266.

۴۰. **Stoskopf, M.K., 1993.** Clinical pathology of Carp, Gold fish and Koi in Fish Medicine. In: M.K. Stoskopf. Eds. W.B. Sounders Company. Philadelphia, USA. pp: 450-453.

۴۱. **Thrall, M.A.; Weiser, G.; Allison, R. and Campbell, T.W., 2012.** Veterinary hematology and clinical chemistry. John Wiley & Sons. 776 p.

۴۲. **Van der Oost, R.; Beyer, J. and Vermeulen, N.P.E., 2003.** Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environmental Toxicology and Pharmacology. Vol. 13, No. 2, pp: 57-149.

۴۳. **Vani, T.; Saharan, N.; Mukherjee, S.C.; Ranjan, R.; Kumar, R. and Brahmchari, R.K., 2001.** Deltamethrin induced alterations of hematological and biochemical parameters in fingerlings of *Catla catla* (Ham.) and their amelioration by dietary supplement of vitamin C. Pesticide Biochemistry and Physiology. Vol. 101, No. 1, pp: 16-20.

۴۴. **Verma, S.R.; Rani, S. and Dalela, R.C., 1982.** Indicators of stress induced by pesticides in *Mystus vittatus*: haematological parameters. Indian Journal of Environmental Health. Vol. 24, pp: 58-64.

۴۵. **Vinodhini, R. and Narayanan, M., 2008.** Bioaccumulation of heavy metals in organs of fresh water fish *Cyprinus carpio* (Common carp). International Journal of Environmental Science & Technology. Vol. 5, No. 2, pp: 179-182.

Information and Communication Technologies in Agriculture. Food and Environment. pp: 858-866.

۲۰. **Lal Shah, S., 2010.** Hematological changes in *Tinca tinca* after exposure to lethal and sublethal doses of Mercury, Cadmium and Lead. Iranian Journal of Fisheries Sciences. Vol. 9, No. 3, pp: 434-443.

۲۱. **Latif, A.; Khalid, M. and Ali, M., 2014.** Evaluation of Toxic Stress of Copper Sulphate and Lead Nitrate on Hematological and Serum Biochemical Characteristics of Freshwater Cyprinid (*Labeo rohita*). International journal of current engineering and technology. Vol. 4, pp: 366-۳۷۲.

۲۲. **Malik, N.; Biswas, A.K.; Qureshi, T.A.; Borana, K. and Virha, R., 2010.** Bioaccumulation of heavy metals in fish tissues of a freshwater lake of Bhopal. Environmental Monitoring and Assessment. Vol. 160, pp: 267-276.

۲۳. **Martinez, C.B.R.; Nagae, M.Y.; Zaia, C.T.B.V. and Zaia, D.A.M., 2004.** Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Brazilian Journal of Biology. Vol. 64, No. 4, pp: 797-807.

۲۴. **Martins, J.; Oliva, T.L. and Vasconcelos, V., 2007.** Assays with Daphnia magna and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. Environment International. Vol. 33, No. 3, pp: 414-425.

۲۵. **Mohiseni, M.; Asayesh, S.; Shafiee Bazarnoie, S.; Mohseni, F.; Moradi, N.; Matouri, M. and Mirzaee, N., 2016.** Biochemical Alteration Induced by Cadmium and Lead in Common Carp via an Experimental Food Chain. Iranian Journal of Toxicology. Vol. 10, No. 4, pp: 25-۳۲.

۲۶. **Neff, J.M., 1985.** Use of biochemical measurements to detect pollutant-mediated damage to fish. In Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Seventh Symposium. ASTM International.

۲۷. **Oh, H.S.; Lee, S.K.; Kim, Y.H. and Roh, J.K., 1991.** Mechanism of selective toxicity of diazinon to killfish (*Oryzias latipes*) and loach (*Misgurnus Anguillicaudatus*). Aquatic Toxicology and Risk Assesment. Vol. 14, pp: 343-353.

۲۸. **Oladimeji, A.A. and Offem, B.O., 1989.** Toxicity of lead to *Clarias lazera*, *Oreochromis niloticus*, *Chironomus tentans* and Benacus sp. Water, Air, and Soil Pollution. Vol. 44, pp: 191-201.

۲۹. **Olaifa, F.E.; Olaifa, A.K. and Lewis, O.O., 2003.** Toxic stress of lead on *Clarias gariepinus* (African catfish) fingerlings. African Journal of Biomedical Research. Vol. 6, No. 2, pp: 101-104.

۳۰. **Ololade, I.A. and Oginni, O., 2010.** Toxic stress and hematological effects of nickel on African catfish, *Clarias gariepinus*, fingerlings. Journal of environmental chemistry and Ecotoxicology. Vol. 2, No. 2, pp: 014-019.

۳۱. **Remyla, S.R.; Ramesh, M.; Sajwan, K.S. and Kumar, K.S., 2008.** Influence of zinc on cadmium induced haematological and biochemical responses in a freshwater teleost fish *Catla catla*. Fish physiology and biochemistry. Vol. 34, No. 2, pp: 169-174.

۳۲. **Rose, W.L.; Nisbet, R.M.; Green, P.G.; Norris, S.; Fan, T.; Smith, E.H.; Cherr, G.N. and Anderson, S.L., 2006.** Using an integrated approach to link biomarker responses and physiological stress to growth impairment of cadmium exposed larval topsmelt. Aquatic toxicology. Vol. 80, No. 3, pp: 298-308.

۳۳. **Ruane, N.M.; Huisman, E.A. and Komen, J., 2001.** Plasma cortisol and metabolite level profiles in two isogenic strains of common carp during confinement. Journal of fish biology. Vol. 59, No. 1, pp: 1-12.

۳۴. **Sastry, K.V. and Rao, D.R., 1984.** Effect of mercuric chloride on some biochemical and physiological parameters