



## بررسی اثرات تحت‌کشنده کلریدسرب ( $PbCl_2$ ) بر شاخص‌های خونی، آنزیم‌های کبدی و بیان ژن سیتوکروم $P_{450}$ در ماهی

### کیپور معمولی (*Cyprinus Carpio*)

عرفان برارزاد آرابی<sup>۱</sup>، حامد پاک‌نژاد\*<sup>۲</sup>، سید علی‌اکبر هدایتی<sup>۳</sup>، رقیه صفری<sup>۳</sup>، عباسعلی حاجی‌بگلو<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی‌ارشد، گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

<sup>۲</sup> دانشیار، گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

<sup>۳</sup> استادیار، گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

#### چکیده

هدف از این تحقیق بررسی اثرات تحت‌کشنده کلرید سرب بر شاخص‌های خونی، آنزیم‌های کبدی و بیان ژن سیتوکروم  $P_{450}$  در ماهی کیپور معمولی بود. به این منظور ۸۰ قطعه بچه‌ماهیان کیپور با میانگین وزنی  $7 \pm 0.23$  گرم تهیه و در ۳ تیمار و یک گروه شاهد در معرض غلظت‌های مؤثر (۰/۱۵، ۰/۲۵ و ۰/۲۳ میلی‌گرم بر لیتر) سمیت تحت‌کشنده به مدت ۱۴ روز قرار گرفتند و در انتهای دوره نمونه‌برداری به صورت تصادفی انجام شد. نتایج نشان داد که میزان آنزیم AST و ALT به صورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد کاهش یافت ( $p < 0.05$ ). میزان آنزیم ALP به صورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش یافت ( $p < 0.05$ ). نتایج آزمایش خون-شناسی نشان داد که میزان گلبول سفید، هماتوکریت و هموگلوبین با افزایش غلظت کلریدسرب تغییر معنی‌داری نسبت به گروه شاهد نداشتند؛ ولی دارای روند ناچیز افزایشی نسبت به گروه شاهد بودند ( $p > 0.05$ ). همچنین، میزان گلبول قرمز، منوسیت، پروتئین کل و ایمونوگلوبولین سرم به صورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد کاهش یافتند ( $p < 0.05$ ). میزان لنفوسیت، بازوفیل و پروتئین کل موکوس به صورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد ( $p < 0.05$ ). میزان لیزوزیم موکوس نسبت به گروه شاهد دارای روند ناچیز کاهشی بود اگرچه معنی‌دار نبود ( $p > 0.05$ ). میزان بیان ژن  $P_{450}$  در کبد و آبشش به صورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش یافت ( $p > 0.05$ ). در این مطالعه بیان نسبی ژن سیتوکروم  $P_{450}$  به طور معنی‌داری در بافت کبد از بافت آبشش بالاتر بود ( $p < 0.05$ ) به‌طور کلی مشخص گردید که کلریدسرب دارای آثار مخربی بر کبد ماهی کیپور معمولی است.

#### واژه‌های کلیدی:

ماهی کیپور معمولی، آسپاراتات ترانس آمیناز، آلانین ترانس آمیناز، کلریدسرب، سیتوکروم  $P_{450}$

#### نوع مقاله:

پژوهشی اصیل

<https://doi.org/10.22034/jair.10.2.71>

#### تاریخچه مقاله:

دریافت: ۰۰/۰۳/۱۳

پذیرش: ۰۰/۰۹/۱۳

#### نویسنده مسئول مکاتبه:

حامد پاک‌نژاد، دانشیار، گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

ایمیل: [hkolangi@gmail.com](mailto:hkolangi@gmail.com)

#### ۱ | مقدمه

امروزه یکی از مهم‌ترین نگرانی‌های زیست‌محیطی در اکوسیستم‌های آبی، ورود، انتشار و تأثیر آلاینده‌های مختلف در اکوسیستم‌های آبی می‌باشد. (Kar et al., 2008). بسیاری از فلزات به‌طور طبیعی از اجزای اصلی اکوسیستم‌های آبی هستند و تعدادی از آن‌ها در بقای موجودات زنده نقش حیاتی دارند. اما در صورتی که غلظت آن‌ها از حد معینی فراتر برود، ممکن است باعث تغییر در روند طبیعی اکوسیستم‌های آبی و عملکرد صحیح اجزای بدن آبزیان شود. از آنجایی که فلزات سنگین تجزیه‌پذیر نیستند، ماندگاری بیشتری در محیط داشته و با جذب توسط موجودات آبزی و ورود به زنجیره‌های غذایی از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند (Turkmen et al., 2009; Demiark et al., 2006). به‌طور کلی بررسی میزان تجمع زیستی فلزات سنگین در بافت‌های مختلف آبزیان و همچنین تأثیر آن بر فرایندهای زیستی و اندام‌های داخلی بدن موجود می‌تواند به‌عنوان شاخصی در پیش‌بینی خطرات بالقوه ورود این گونه از آلاینده‌ها به‌خصوص سرب به محیط مؤثر باشد. همچنین شناخت اثرات این فلز در سطوح بیوشیمیایی، فیزیولوژیک و بافتی می‌تواند در تخمین شدت اثرات این آلاینده بر کل جمعیت موجود در آینده در صورت تداوم وجود آلودگی به‌کار آید. بر اساس گزارش‌های متعدد در منابع علمی، مسمومیت‌های مزمن با فلزات سنگین در ماهیان موجب بروز اثراتی همچون کاهش رشد و تولیدمثل، اثرات هیستوپاتولوژیک، تغییرات فاکتورهای خون‌شناسی، ضایعات تخم، جنین و لاروها در گونه‌های مختلف ماهیان می‌گردد (Haux and Larrson, 1984; James, 1992; Kulkarni et al., 2002; Metin, 2001; Mikryakov and Lapirova, 1997; Mishra and Srivastava, 1980; Singhal and Jain, 1997; Thophon et al., 2003). آبشش‌ها، پوست و لوله‌گوارشی محل‌های جذب سرب می‌باشند (Ashraf, 2006). سرب می‌تواند در اندام‌های

زیست‌محیطی در اکوسیستم‌های آبی، ورود، انتشار و تأثیر آلاینده‌های مختلف در اکوسیستم‌های آبی می‌باشد. (Kar et al., 2008). بسیاری از فلزات به‌طور طبیعی از اجزای اصلی اکوسیستم‌های آبی هستند و تعدادی از آن‌ها در بقای موجودات زنده نقش حیاتی دارند. اما در صورتی که غلظت آن‌ها از حد معینی فراتر برود، ممکن است باعث تغییر در روند طبیعی اکوسیستم‌های آبی و عملکرد صحیح اجزای بدن آبزیان شود. از آنجایی که فلزات سنگین تجزیه‌پذیر نیستند، ماندگاری بیشتری در محیط داشته و با جذب توسط موجودات آبزی و ورود به زنجیره‌های غذایی از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند (Turkmen et al., 2009; Demiark et al., 2006). به‌طور کلی بررسی میزان تجمع زیستی فلزات سنگین در بافت‌های مختلف آبزیان و همچنین تأثیر آن بر فرایندهای زیستی و اندام‌های داخلی بدن موجود می‌تواند به‌عنوان شاخصی در پیش‌بینی خطرات بالقوه ورود این گونه از آلاینده‌ها به‌خصوص سرب به محیط مؤثر باشد. همچنین شناخت اثرات این فلز در سطوح بیوشیمیایی، فیزیولوژیک و بافتی می‌تواند در تخمین شدت اثرات این آلاینده بر کل جمعیت موجود در آینده در صورت تداوم وجود آلودگی به‌کار آید. بر اساس گزارش‌های متعدد در منابع علمی، مسمومیت‌های مزمن با فلزات سنگین در ماهیان موجب بروز اثراتی همچون کاهش رشد و تولیدمثل، اثرات هیستوپاتولوژیک، تغییرات فاکتورهای خون‌شناسی، ضایعات تخم، جنین و لاروها در گونه‌های مختلف ماهیان می‌گردد (Haux and Larrson, 1984; James, 1992; Kulkarni et al., 2002; Metin, 2001; Mikryakov and Lapirova, 1997; Mishra and Srivastava, 1980; Singhal and Jain, 1997; Thophon et al., 2003). آبشش‌ها، پوست و لوله‌گوارشی محل‌های جذب سرب می‌باشند (Ashraf, 2006). سرب می‌تواند در اندام‌های

نگهداری شدند. در شروع آزمایش بچه‌ماهیان به‌طور کاملاً تصادفی در ۸ تانک تقسیم شدند. هر تانک شامل ۲۰ قطعه بچه‌ماهی کپور معمولی می‌شد که از نظر وزنی اختلاف معنی‌داری نداشتند. ماهیان تحت‌تأثیر سه غلظت مختلف از محلول کلریدسرب قرار گرفتند و یک گروه نیز به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. برای هر کدام از گروه‌های تیمار و شاهد دو تکرار در نظر گرفته شد. سایر شرایط هوادهی، دما، نور برای هر ۸ آکواریوم یکسان‌سازی شد. غذادهی در کل دوره تا حد سیری انجام می‌شد.

**تعیین غلظت کشندگی حاد یا LC<sub>50</sub>:** بر این اساس قبل از شروع آزمایش با بررسی غلظت‌های مشابه مقادیر نزدیک به LC<sub>50</sub> با بررسی دامنه‌های استفاده شده کلرید سرب در گونه مشابه در منابع علمی انتخاب گردید. روش انجام آزمایش غلظت کشندگی حاد به‌صورت استاتیک بود (Hedayati et al., 2013). برای انجام آزمایش LC<sub>50</sub> کلریدسرب، ماهیان کپور معمولی در چهار تیمار با دو تکرار (یک گروه به‌عنوان شاهد و در هر تیمار پنج ماهی) به‌صورت تصادفی در آکواریوم‌های پنج‌گانه لیتری قرار گرفتند. با شروع آزمایش کشندگی حاد، هیچ‌گونه تعویض آبی در مخازن آزمایش صورت نگرفت و غلظت سم نیز تجدید نشد.

**بررسی شاخص‌های فیزیولوژیکی ماهی‌ها:** در طی آزمایش سعی گردید که شرایط فیزیولوژیکی ماهی‌ها یکسان نگه‌داری شود. هوادهی در تمامی تانک‌ها به‌گونه‌ای که حداقل آشفته‌گی در آب ایجاد شود صورت گرفت (Hedayati et al., 2013). دمای آب ۲۱-۱۹ درجه سانتی‌گراد، پی‌اچ ۷/۶-۷/۹، غلظت اکسیژن محلول ۶-۷ میلی‌گرم در لیتر و سختی آب ۲۱۰ میلی‌گرم کربنات کلسیم در لیتر بود.

**طراحی آزمایش:** مطابق استاندارد اعلام شده OECD، مدت زمان انجام آزمایش غلظت کشندگی ۹۶ ساعت بوده و میزان مرگ و میر در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت ثبت شد (Hedayati et al., 2013). تعداد مرگ و میر از زمان القاء سم تا ساعت ۲۴، مرگ و میر روز اول محسوب شد. (Hedayati et al., 2013). باتوجه به اینکه آکواریوم‌ها با حجم ۵۰ لیتر آبیگری شده بود، برای تهیه غلظت مخزن آزمایش از فرمول  $M_1V_1=M_2V_2$  استفاده شد (Hedayati et al., 2013). پس از ثبت مرگ و میر در زمان‌های تعیین شده مقادیر LC<sub>50</sub> با محدوده اطمینان ۹۵٪ مطابق دستورالعمل اصلاح یافته Finney توسط بودو و ریبری (Boudou and Ribeyre, 1997) با روش Probit Analysis در نرم‌افزار SPSS-16 محاسبه شد.

**آزمایش سمیت تحت حاد:** پس از محاسبه LC<sub>50</sub> با رگرسیون پروبیت در SPSS-16، میزان سمیت کشنده ۰/۹ میلی‌گرم بر لیتر محاسبه شده و بر آن اساس، آزمایش سمیت تحت‌کشنده انجام شد. ۱۶۰ قطعه ماهی کپور معمولی به‌صورت تصادفی در ۸ آکواریوم ۸۰ لیتری با حجم آبیگری ۵۰ لیتر در ۴ گروه شامل: گروه شاهد (۰)، تیمار یک (۰/۰۵)، تیمار دو (۰/۱۵) و تیمار سه (۰/۲۵) میلی‌گرم بر لیتر LC<sub>50</sub> کلریدسرب قرار گرفتند. آزمایش سمیت تحت‌کشنده بر خلاف آزمایش کشندگی حاد به‌صورت تجدیدپذیر بود و تعویض آب در مخازن آزمایش انجام می‌شد. ۲۴ ساعت قبل از شروع آزمایش غذادهی

داخلی پخش شود و برای دفع، مجدداً به کبد و کلیه بازگشته و با مکانیسم ترشح دفع گردد. جذب فلزات مسمومیت‌زا و غیرضروری مانند سرب راه اختصاصی نداشته و مشابه فلزات ضروری صورت می‌گیرد (Hazel et al., 1970). سلول‌های خونی و پروتئین‌های پلاسما در انتقال سرب نقش اساسی دارند (Sastry et al., 2003; Topuzoglu et al., 2003). ماهیانی که به‌طور مکرر در معرض غلظت‌های سمی سرب قرار می‌گیرند نشانه‌های متنوعی از مسمومیت با سرب را نشان می‌دهند. این نشانه‌ها عبارتند از: انحای ستون مهره‌ها، کاهش قدرت و توانایی شنا کردن، آتروفی عضلات، کاهش رشد و افزایش غلظت سرب در خون، استخوان، کبد، کلیه و کاهش میزان گلیکوژن در کبد، کلیه، مغز و عضلات (Esmaeeli, 2002; Antilla et al., 1996; Flawor et al., 2001).

بنابراین، می‌توان با اندازه‌گیری تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در خون ماهی‌هایی که در معرض دوره‌های کوتاهی از استرس‌های تحت‌کشنده قرار گرفته‌اند موجب پیشرفت روش‌هایی به‌منظور پیش‌بینی اثرات آلاینده‌ها بر تولیدمثل، رشد و یا حتی چگونگی تحمل استرس را ایجاد کرد (Rissodfeaverney, 2001; Goodwin et al., 2003). در سطح مولکولی تغییرات ژنتیکی (تغییر در بیان، عملکرد و تنظیم ژنی) و تغییرات سطوح پروتئینی در موجودات می‌تواند به‌عنوان شاخص مواجهه با آلودگی در نظر گرفته شود؛ به‌ویژه اگر مولکول مورد بررسی قسمتی از مکانیسم دفاعی، ترمیمی و یا سم‌زدایی سلول باشد. از آن جمله، آنزیم‌های سیتوکروم P<sub>450</sub> نوعی هموپروتئین می‌باشند که در سطح بالایی در کبد وجود دارند ولی در بافت‌های دیگر نظیر آبشش، کلیه و روده نیز گزارش شده اند (Siroka and Drastichova, 2004; Itakura, 2005). این آنزیم جزء آنزیم‌های اکسایشی است که در فاز اول متابولیسم آلاینده‌ها تولید می‌شود. این آنزیم‌ها توسط آلاینده‌هایی که وارد بدن شده القاء می‌شوند و پس از واکنش با آلاینده‌های چربی-دوست سبب افزایش حلالیت این آلاینده‌ها در آب شده و سبب دفع آن‌ها از بدن می‌شوند میزان پاسخ به وسیله فعالیت آنزیم‌های وابسته به سیستم جذب عناصر سنگین در بافت‌های مختلف آبزیان (عضله، کبد، کلیه، تخمدان و آبشش) تفاوت داشته و با میزان قابلیت تجمع زیستی فلز، شرایط فیزیولوژیکی و عادات غذایی آبی مرتبط است. (Cizdziel et al., 2003; Gilbertson and Carpenter, 2004).

هدف از این تحقیق بررسی اثرات تحت‌کشنده کلریدسرب (PbCl<sub>2</sub>) بر شاخص‌های خونی، آنزیم‌های کبدی و بیان ژن P<sub>450</sub> در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus Carpio*) به‌عنوان یکی از مهم‌ترین گونه‌های سیستم پرورش گرم‌آبی در کشور ایران و جهان با مطالعه تست سمیت حاد و بررسی اثرات این آلاینده بر این موجود پس از در معرض قرار گرفتن با غلظت‌های تحت‌کشنده این فلز بوده است.

## ۲ | مواد و روش‌ها

**تیمار بندی ماهی کپور معمولی با کلریدسرب:** بچه‌ماهیان کپور معمولی با میانگین وزنی  $0/33 \pm 7$  گرم تهیه و در شرایطی با نور طبیعی و تعویض آب به‌صورت یک روز در میان، به مدت دو هفته جهت سازگاری

**نمونه‌گیری بافت جهت مطالعات بیان ژن:** به‌منظور بررسی بیان ژن P<sub>450</sub>، ماهی‌ها پس از صید با استفاده از گل میخک بیهوش و کشته شدند و بلافاصله کبد و آبشش آن‌ها به‌منظور بررسی سطوح بیان ژن P<sub>450</sub> به‌سرعت جدا و در ازت مایع قرار گرفت و سپس در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. نمونه‌گیری با ۳ تکرار در روز ۱۴ انجام گرفت و پس از اتمام کار نمونه‌گیری، استخراج RNA از ۵۰ میلی‌گرم نمونه بافت کبد، آبشش با استفاده از کیت استخراج RNX- Plus بر اساس پروتوکول پیشنهادیه شرکت سازنده انجام شد. سنتز cDNA با استفاده از مسترمیکس سنتز cDNA شرکت جینت بایو محصول کشور کره و طبق دستورالعمل آن انجام شد. قبل از انجام Real time PCR برای مطمئن شدن از درستی آغازگرها و اندازه باندهای تشکیل شده محصولات حاصل از آن‌ها و همچنین آزمایش نمودن cDNA، PCR معمولی نمونه‌ها بر اساس پروتکل انجام شد (۲ μl نمونه cDNA رقیق شده با نسبت ۱ به ۱۰، ۱ μl آغازگر پیش‌رونده، ۱ μl آغازگر پس‌رونده، ۳ μl آب استریل عاری از نوکلئاز، ۵ μl ترکیب مسترمیکس مخصوص PCR). (Miandare et al., 2013).

**طراحی آغازگر:** آغازگرهای مورد استفاده در این آزمایش از مطالعه نمرودی و همکاران (Namroodi et al., 2018) و با نرم‌افزار بایو ادیت با استفاده از توالی‌های موجود در بانک ژن آزموده شدند و با آزمایش کردن در دستگاه PCR بهترین دما برای تکثیر به‌دست آمد. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده شده است.

متوقف شد. شرایط تیمارها روزانه بررسی و هوادهی به‌طور منظم انجام شد. در نوبت‌های غذادهی، هوادهی موقتا قطع و سپس مجدداً برقرار می‌شد. پی‌اچ با دستگاه پی‌اچ متر (مدل تی‌اس) و اکسیژن محلول با دستگاه دیجیتال اندازه‌گیری اکسیژن (مدل دی‌او-۵۵۱۰) به‌طور روزانه اندازه‌گیری شد. دمای آب ۱۹-۲۱ درجه سانتی‌گراد، پی‌اچ ۷/۶-۹/۷، غلظت اکسیژن محلول ۶-۷ میلی‌گرم درلیتر و سختی آب ۲۵۰ میلی-گرم کربنات کلسیم در لیتر بود.

**خون‌گیری:** تغذیه ماهیان قبل از خون‌گیری به‌مدت ۲۴ ساعت متوقف شد. به‌منظور بررسی شاخص‌های خونی در انتهای دوره آزمایش از هر تکرار تعداد ۳ عدد بچه‌ماهی به‌صورت تصادفی انتخاب و در داخل محلول پودر گل میخک (غلظت ۳۵۰ میلی‌گرم به ازای هر لیتر آب) قرار داده شد و پس از بیهوشی با استفاده از سرنگ ۲ ml هیپارینه، از ساقه دمی صورت می‌گرفت. نمونه‌های خون با دور ۱۰۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه در سه مرحله سانتریفیوژ شدند فاز رویی برداشته و به تیوپ انتقال داده شد. سپس شاخص‌های خونی به روش کدورت‌سنجی و با استفاده از کیت‌های مخصوص و دستگاه اسپکتروفوتومتر انجام شد و همزمان نسبت به تهیه گسترش‌های خونی اقدام گردید و میزان گلبول سفید (WBC)، گلبول قرمز (RBC)، هماتوکریت، هموگلوبین، مونوسیت، لنفوسیت و بازوفیل تعیین گردید (Sudagara et al., 2009; Khajeh et al., 2010; Nazerian et al., 2013).

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در بررسی بیان P<sub>450</sub> در ماهی کپور معمولی تحت تأثیر کلریدسرب.

ژن	شماره دسترسی در NCBI	پرایمر (5'-3')	اندازه محصول (bp)	کارایی پرایمر (%)
P <sub>450</sub>	AB048939.1	F: GCTGAGAGAAAAGATCGGAATGGA R: AGACGTACAGTGAGGAATGGTGA	۱۳۶	۹۶
Beta actine	M24113.1	F: TCTTGGGTATGGAGTCTTGCG R: GTCAGCAATGCCAGGGTACA	۱۳۷	۹۵

نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کلموگراف اسمیرنف و همگن بودن واریانس داده‌ها با آزمون لون (Levene) بررسی گردید. پس از تعیین محقق بودن شرط نرمال بودن داده‌ها، اختلاف بین تیمارها از طریق آنالیز واریانس یک طرفه One-way-ANOVA و اختلاف میانگین داده‌ها از طریق تست دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ و با استفاده از نرم افزار SPSS-16 بررسی گردید.

### ۳ | نتایج

**میزان آنزیم‌های کبدی تحت تأثیر کلریدسرب، آسپارات آمینو ترانسفراز (AST):** تأثیر سطوح مختلف تحت کشنده کلریدسرب بر میزان آنزیم آسپارات آمینو ترانسفراز در ماهی کپور معمولی در شکل ۱ آمده است. همان‌طور که مشاهده می‌گردد میزان آنزیم آسپارات آمینو ترانسفراز با افزایش میزان غلظت‌های تحت کشنده به‌صورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد کاهش یافت (p < ۰/۰۵). بیشترین مقدار آنزیم در گروه شاهد با مقدار ۱۹۲/۸۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و کمترین آن در تیمار ۲ (۰/۱۵) با مقدار ۷۸/۰۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد.

**انجام Real time PCR:** ارزیابی بیان ژن در تیوپ‌های مخصوص و در ۴ تکرار تکنیکی برای هر تیمار صورت گرفت که محتویات هر تیوپ به مقدار ۲۰ میکرولیتر تنظیم شد.

**ارزیابی عملکرد آغازگرهای به‌کاررفته با استفاده از منحنی استاندارد:** به‌منظور اطمینان از بهینه بودن شرایط Real time PCR، سری غلظت‌های مختلف (۱/۱۰، ۱/۲۰، ۱/۵۰، ۱/۱۰۰ و ۱/۲۰۰) از نمونه‌های cDNA مخلوط از تیمارهای متفاوت هر پلت تهیه و با هر دو آغازگر هدف و رفرنس در ۴ تکرار تکثیر شدند و جهت تخمین کارایی و تکرارپذیری آزمایش برای هر آغازگر منحنی استاندارد ترسیم و کارایی برای هر آغازگر ارزیابی شد (Ramakers et al., 2003).

**تجزیه تحلیل آماری داده‌ها:** این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گردید. Ct به‌دست آمده برای ژن P<sub>450</sub> با استفاده از فرمول  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Pfaffl et al., 2002) در فضای نرم افزار اکسل تبدیل به بیان نسبی ژن‌های موردنظر نسبت به ژن رفرنس بتا اکتین گردید. نمودار نهایی با استفاده از نرم افزار اکسل ۲۰۱۰ رسم شد. همچنین

کشنده به‌صورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد کاهش یافت ( $p < 0.05$ ). به‌جز تیمار شاهد در سایر تیمارها با افزایش غلظت کلریدسرب میزان مونوسیت کاهش یافت.

**میزان بازوفیل تحت تأثیر سم کلریدسرب:** با توجه به شکل ۹ مشاهده می‌گردد که سطوح مختلف سم کلریدسرب بر میزان بازوفیل تأثیر معنی‌داری داشت ( $p < 0.05$ ). بیشترین میزان آن در تیمار ۲ و کمترین میزان در تیمار ۱ مشاهده شد. غلظت‌های مختلف کلریدسرب روند یکنواخت افزایشی یا کاهشی نشان نداد.

**میزان هموگلوبین تحت تأثیر سم کلریدسرب:** تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان هموگلوبین در ماهی کپور معمولی در شکل ۱۰ نشان داده شده است. با توجه به شکل ۱۰، سطوح مختلف کلریدسرب بر میزان هموگلوبین تأثیر معنی‌داری نداشت ( $p > 0.05$ ). به‌جز تیمار شاهد در سایر تیمارها، با افزایش غلظت کلریدسرب میزان هموگلوبین روند ناچیز افزایشی داشت.

**تأثیر کلریدسرب بر شاخص‌های بیوشیمیایی سرم و موکوس، تأثیر کلریدسرب بر میزان ایمونوگلوبولین سرم:** تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان ایمونوگلوبولین در ماهی کپور معمولی در شکل ۱۱ آورده شده است. براساس شکل ۱۱، سطوح مختلف سم کلریدسرب بر میزان ایمونوگلوبولین تأثیر معنی‌داری داشت ( $p < 0.05$ ). بیشترین و کمترین میزان آن به‌ترتیب در تیمار شاهد و تیمار ۱ مشاهده شد. غلظت‌های مختلف کلریدسرب روند یکنواخت افزایشی یا کاهشی نشان نداد.

**تأثیر کلریدسرب بر میزان پروتئین محلول سرم:** تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان پروتئین محلول در ماهی کپور معمولی در شکل ۱۲ آمده است. با توجه به شکل ۱۲، میزان پروتئین محلول با افزایش غلظت‌های تحت‌کشنده کلریدسرب به‌صورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد کاهش یافت ( $p < 0.05$ ). بیشترین میزان پروتئین محلول در تیمار شاهد و کمترین میزان پروتئین محلول در تیمار ۳ مشاهده شد. با افزایش غلظت‌های کلریدسرب از تیمار شاهد تا تیمار ۳ روند کاهشی مشاهده شد.

**تأثیر کلریدسرب بر لیزوزیم موکوس:** تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان لیزوزیم در ماهی کپور معمولی در شکل ۱۳ آورده شده است. همان‌طور که از شکل ۱۳ مشخص می‌گردد، سطوح مختلف کلریدسرب بر میزان لیزوزیم تأثیر معنی‌داری نداشت ( $p > 0.05$ ). بجز تیمار ۳ در سایر تیمارها با افزایش غلظت کلریدسرب میزان لیزوزیم روند ناچیز کاهشی داشت.

**تأثیر کلریدسرب بر میزان پروتئین کل موکوس:** تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان پروتئین کل موکوس در ماهی کپور معمولی در شکل ۱۴ نشان داده شده است. با توجه به شکل ۱۴، سطوح مختلف سم کلریدسرب بر میزان پروتئین کل تأثیر معنی‌داری نداشت ( $p < 0.05$ ). بیشترین میزان پروتئین کل در تیمار شاهد و کمترین میزان آن در تیمار ۱ مشاهده شد. بجز تیمار شاهد در سایر تیمارها با افزایش غلظت کلریدسرب میزان پروتئین کل موکوس افزایش یافت. غلظت‌های مختلف کلریدسرب روند یکنواخت افزایشی یا

**آلکالین فسفاتاز (ALP):** تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز در ماهی کپور معمولی در شکل ۳ آمده است. با توجه به شکل ۳ مشاهده می‌گردد که میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز با افزایش میزان غلظت‌های تحت‌کشنده به‌صورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد روند افزایشی داشت ( $p < 0.05$ ). غلظت‌های مختلف کلریدسرب روند یکنواخت افزایشی یا کاهشی نشان نداد اما در مجموع بالاترین غلظت سرب منجر به حضور بالاترین میزان ALP سرم شده است.

**آلانین آمینو ترانسفراز (ALT):** تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان آنزیم آلانین آمینو ترانسفراز در ماهی کپور معمولی در شکل ۲ آمده است. با توجه به شکل، میزان آنزیم آلانین آمینو ترانسفراز با افزایش میزان غلظت‌های تحت‌کشنده به‌صورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد کاهش یافت ( $p < 0.05$ ). به‌جز تیمار شاهد در بقیه تیمارها با افزایش غلظت کلریدسرب میزان ALT روند ناچیز افزایشی داشته است.

**میزان پارامترهای خونی تحت تأثیر سم کلریدسرب، گلبول سفید تحت تأثیر سم کلریدسرب:** تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان گلبول سفید خون در ماهی کپور معمولی در شکل ۴ نشان داده شده است. سطوح مختلف کلریدسرب بر میزان گلبول سفید خون ماهی کپور معمولی تأثیر معنی‌داری نداشت ( $p > 0.05$ ). میزان گلبول سفید در تمامی تیمارها به‌جز تیمار شاهد، روند ناچیز افزایشی داشت.

**میزان گلبول قرمز تحت تأثیر سم کلریدسرب:** تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان گلبول قرمز خون در ماهی کپور معمولی در شکل ۵ آمده است. همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود سطوح مختلف کلریدسرب بر میزان گلبول قرمز خون ماهی کپور معمولی تأثیر معنی‌داری داشت ( $p < 0.05$ ). غلظت‌های مختلف کلریدسرب روند یکنواخت افزایشی یا کاهشی نشان نداد؛ اما در مجموع نسبت به تیمار شاهد روند ناچیز کاهشی داشت.

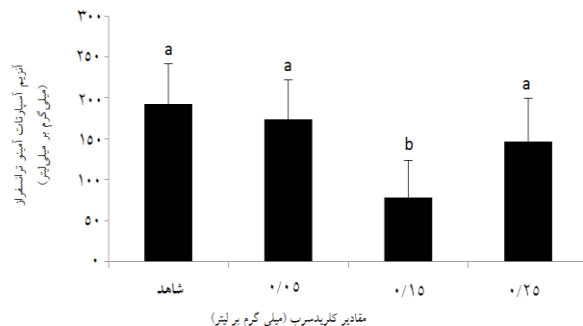
**میزان هماتوکریت تحت تأثیر سم کلریدسرب:** تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان هماتوکریت در ماهی کپور معمولی در شکل ۶ آورده شده است. با توجه به شکل ۶، سطوح مختلف کلریدسرب بر میزان هماتوکریت تأثیر معنی‌داری نداشت ( $p > 0.05$ ). به‌جز تیمار شاهد در تمامی تیمارها با افزایش غلظت کلریدسرب، میزان هماتوکریت افزایش یافت.

**میزان لنفوسیت خون تحت تأثیر سم کلریدسرب:** تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان لنفوسیت در ماهی کپور معمولی در شکل ۷ آمده است. با توجه به شکل ۷ مشاهده گردید که میزان لنفوسیت با افزایش میزان غلظت‌های تحت‌کشنده کلریدسرب به‌صورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش یافت ( $p < 0.05$ ). غلظت‌های مختلف کلریدسرب روند یکنواخت افزایشی را از گروه شاهد به سمت تیمار ۳ نشان داد.

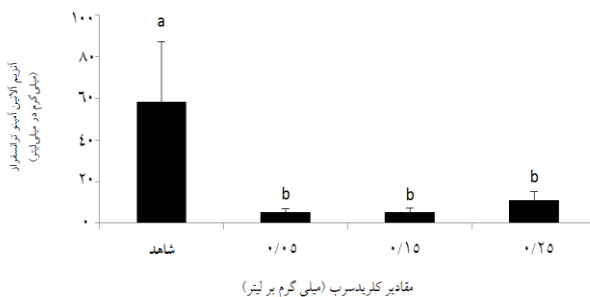
**میزان مونوسیت تحت تأثیر سم کلریدسرب:** همان‌طور که در شکل ۸ مشاهده می‌شود میزان مونوسیت با افزایش میزان غلظت‌های تحت-

میزان بیان ژن P<sub>450</sub> تحت تأثیر کلریدسرب در آبشش: تأثیر سطوح مختلف تحت کشنده کلریدسرب بر میزان بیان ژن P<sub>450</sub> در آبشش ماهی کپور معمولی در شکل ۱۶ مشاهده می‌گردد. با توجه به شکل ۱۶، میزان بیان ژن P<sub>450</sub> با افزایش میزان غلظت‌های تحت کشنده در تیمار ۱ به صورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش یافت ( $p < 0.05$ ).

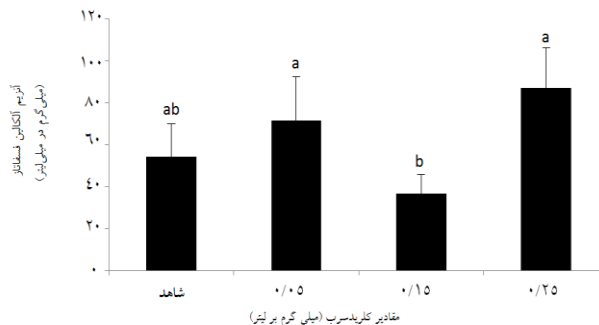
کاهش نشان نداد اما، در مجموع بالاترین غلظت کلرید سرب (به جز تیمار شاهد) منجر به بالاترین میزان پروتئین کل موکوس شد. میزان بیان ژن P<sub>450</sub> تحت تأثیر کلریدسرب در کبد: تأثیر سطوح مختلف تحت کشنده کلریدسرب بر میزان بیان ژن P<sub>450</sub> در کبد ماهی کپور معمولی در شکل ۱۵ آمده است. با توجه به شکل ۱۵، میزان بیان ژن P<sub>450</sub> با افزایش میزان غلظت‌های تحت کشنده به صورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش یافت ( $p < 0.05$ ).



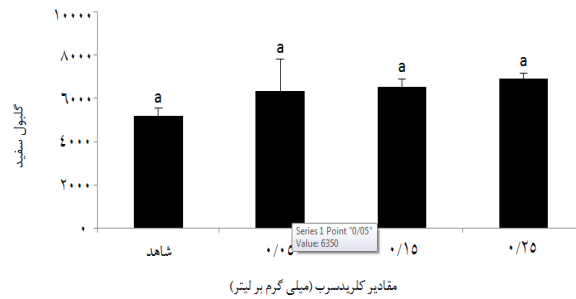
شکل ۱- تأثیر سطوح مختلف تحت کشنده کلریدسرب بر میزان آنزیم آسپارات آمینو ترانسفراز (میلی گرم بر میلی لیتر) در ماهی کپور معمولی. حروف انگلیسی غیر مشترک بالای هر ستون، نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها می‌باشد ( $p < 0.05$ ).



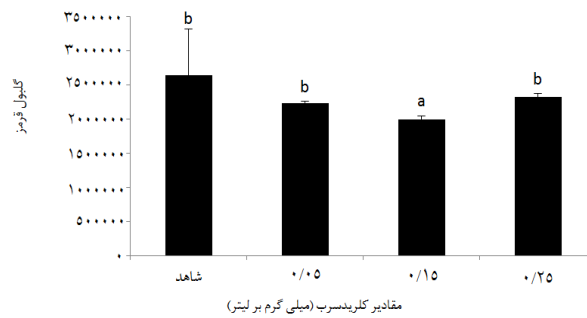
شکل ۲- تأثیر سطوح مختلف تحت کشنده کلریدسرب بر میزان آنزیم آلانین آمینو ترانسفراز (میلی گرم در میلی لیتر) در ماهی کپور معمولی. حروف انگلیسی غیر مشترک بالای هر ستون، نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها می‌باشد ( $p < 0.05$ ).



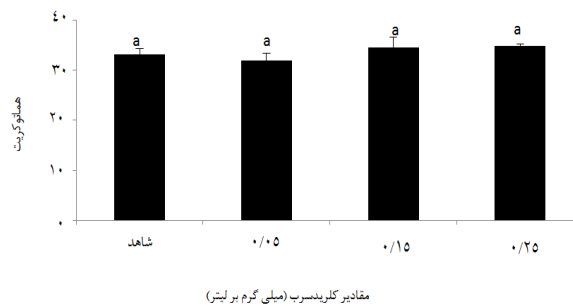
شکل ۳- تأثیر سطوح مختلف تحت کشنده کلریدسرب بر میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز (میلی گرم در میلی لیتر) در ماهی کپور معمولی. حروف انگلیسی غیر مشترک بالای هر ستون، نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها می‌باشد ( $p < 0.05$ ).



شکل ۴- تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان گلبول سفید خون (میلی گرم بر لیتر) در ماهی کپور معمولی. حروف انگلیسی مشترک بالای هر ستون، نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها می‌باشد ( $p > 0.05$ ).



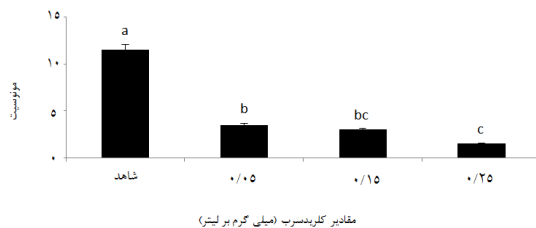
شکل ۵- تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان گلبول قرمز خون (میلی گرم بر لیتر) در ماهی کپور معمولی. حروف انگلیسی غیر مشترک بالای هر ستون، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها می‌باشد ( $p < 0.05$ ).



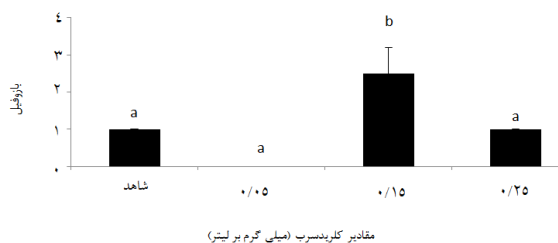
شکل ۶- تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان هماتوکریت خون (میلی گرم بر لیتر) در ماهی کپور معمولی. حروف انگلیسی مشترک بالای هر ستون، نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها می‌باشد ( $p > 0.05$ ).



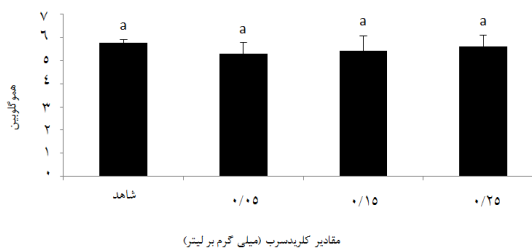
شکل ۷- تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان لنفوسیت خون (میلی گرم بر لیتر) در ماهی کپور معمولی. حروف انگلیسی غیر مشترک بالای هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها می‌باشد ( $p < 0.05$ ).



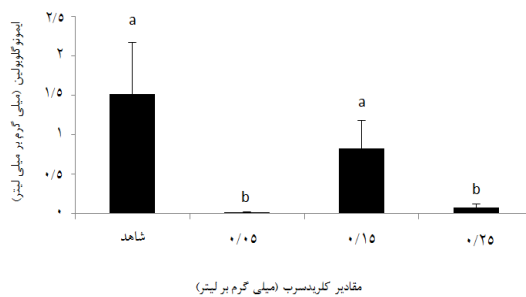
شکل ۸- تأثیر سطوح مختلف تحت کشنده کلریدسرب بر میزان مونوسیت (میلی گرم بر لیتر) در ماهی کپور معمولی. حروف انگلیسی غیر مشترک بالای هر ستون، نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می باشد ( $p < 0.05$ ).



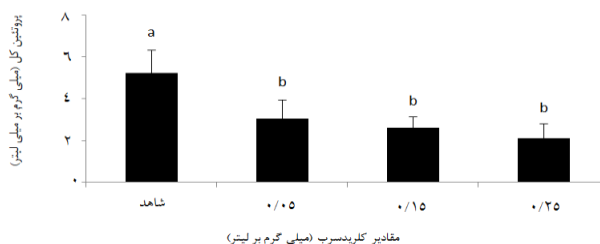
شکل ۹- تأثیر سطوح مختلف تحت کشنده کلریدسرب بر میزان بازوفیل (میلی گرم بر لیتر) در ماهی کپور معمولی. حروف انگلیسی غیر مشترک بالای هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می باشد ( $p < 0.05$ ).



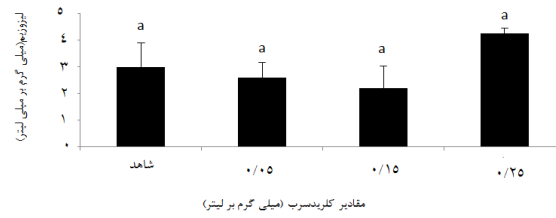
شکل ۱۰- تأثیر سطوح مختلف تحت کشنده کلریدسرب بر میزان هموگلوبین (میلی گرم بر لیتر) در ماهی کپور معمولی. حروف انگلیسی مشترک بالای هر ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می باشد ( $p > 0.05$ ).



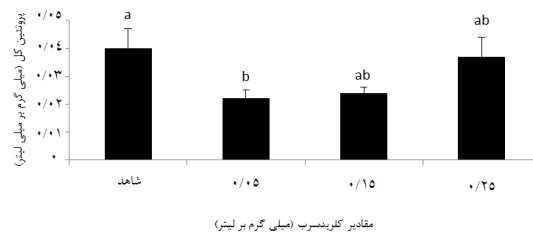
شکل ۱۱- تأثیر سطوح مختلف تحت کشنده کلریدسرب بر میزان ایمونوگلوبولین (میلی گرم بر لیتر) در ماهی کپور معمولی. حروف انگلیسی غیر مشترک بالای هر ستون، نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می باشد ( $p < 0.05$ ).



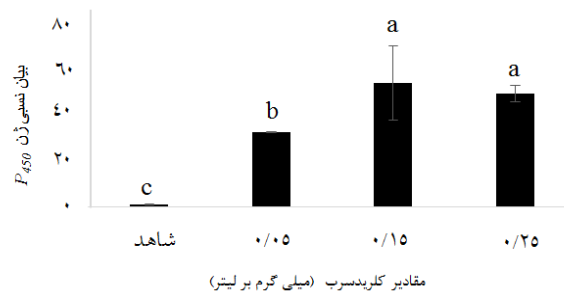
شکل ۱۲- تأثیر سطوح مختلف تحت کشنده کلریدسرب بر میزان پروتئین محلول سرم (میلی گرم بر لیتر) در ماهی کپور معمولی. حروف انگلیسی غیر مشترک بالای هر ستون، نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می باشد ( $p < 0.05$ ).



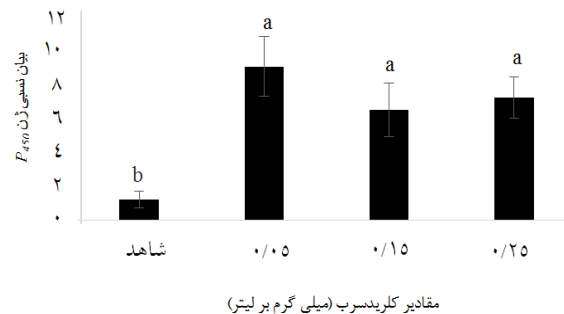
شکل ۱۳- تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان لیتوزیم (میلی گرم بر لیتر) در ماهی کپور معمولی. حروف انگلیسی مشترک بالای هر ستون، نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌داری در بین تیمارها می‌باشد ( $p > 0.05$ ).



شکل ۱۴- تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان پروتئین کل موکوس (میلی گرم بر میلی لیتر) در ماهی کپور معمولی. حروف انگلیسی غیر مشترک بالای هر ستون، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها می‌باشد ( $p < 0.05$ ).



شکل ۱۵- تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان بیان ژن P450 در کبد ماهی کپور معمولی. حروف انگلیسی غیر مشترک بالای هر ستون، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها می‌باشد ( $p < 0.05$ ).



شکل ۱۶- تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان بیان ژن P450 در آبشش ماهی کپور معمولی. حروف انگلیسی غیر مشترک بالای هر ستون، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها می‌باشد ( $p < 0.05$ ).

#### ۴ | بحث و نتیجه‌گیری

موجب سرعت بخشیدن واکنش‌های شیمیایی در سلول‌ها می‌شوند (Bacanskas et al., 2004; Gravato et al., 2006; Levesque et al., 2002). این آنزیم‌ها در ماهی‌ها و دیگر موجودات نقش مهمی را در متابولیسم کربوهیدرات‌ها و آمینواسیدها بازی می‌کنند و از این آنزیم‌ها می‌توان به‌عنوان یک شاخص بسیار خوب در محیط‌های دریایی آلوده به فلزات سنگین استفاده نمود. باید توجه نمود تنوع در میزان پاسخ

در مطالعه حاضر نتایج نشان داد که پس از مواجهه کپور معمولی با سم کلریدسرب و با گذشت مدت زمان چهارده روز از آزمایش، دو آنزیم ALT و AST به‌صورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد کاهش یافتند و آنزیم ALP به‌صورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد با افزایش غلظت، افزایش یافته است. نوعی از آنزیم‌ها به‌نام آمینو ترانسفرازها با انتقال یک گروه آمین از یک مولکول دهنده به یک مولکول گیرنده

هماتوکریت، لنفوسیت، هموگلوبین افزایش و میزان گلبول قرمز و منوسیت کاهش یافت. همچنین میزان شاخص‌های بیوشیمیایی سرم و موکوس مثل ایمونوگلوبین، پروتئین کل سرم و لیزوزیم کاهش و میزان پروتئین کل موکوس افزایش یافت. بر اساس گزارشات میکرباکوف و لاپیرورا (Mikryakov and Lapirora, 1997)، کاهش تعداد گلبول سفید در خون تاس‌ماهی سبیری (*Acipenser baeri*) وابسته به میزان کادمیوم و زمان تماس با آن است. پالاکووا و همکاران (Palakova et al., 1992)، گزارش کردند که تغییر در تعداد گلبول سفید خون ماهی کپور معمولی وابسته به مدت مواجهه با کادمیوم است و در ابتدا افزایش لنفوسیت و منوسیت و بعد از ۱۱ روز کاهش تعداد آن‌ها مشاهده گردید. در تضاد با نتایج مطالعه حاضر، افزایش گلبول قرمز و هموگلوبین و کاهش درصد هماتوکریت در سگ‌ماهی (*Dog fish*) در مواجهه با میزان ۲۵ ppb کادمیوم توسط تارت و همکاران (Tort et al., 1988) گزارش شده است. همچنین، براساس گزارش هاکس و لارسون (Haux and Larsson, 1984)، میزان ۱۰ ppb کادمیوم در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان سبب کاهش هماتوکریت گردید. با توجه به نتایج به‌دست آمده از این تحقیق در مقایسه با تحقیق سایر محققان، دلیل تفاوت نتایج می‌تواند به‌دلیل شرایط نگهداری متفاوت و استرس ماهیان اشاره کرد که لزوم به بررسی بیشتر دارد.

سیتوکروم‌ها پروتئین‌های آهن‌داری هستند که ناقل‌های اصلی الکترون‌ها محسوب می‌شوند و در آن‌ها اتم آهن با دریافت الکترون‌ها از حالت اکسید شده  $Fe^{3+}$  به حالت  $Fe^{2+}$  احیا شده در می‌آید. آنزیم‌های سیتوکروم  $P_{450}$  در اغلب بافت‌های بدن وجود دارند. این آنزیم‌ها توسط آلاینده‌هایی که وارد بدن شده‌اند القاء می‌شوند و پس از واکنش با آلاینده‌های چربی‌دوست سبب افزایش حلالیت این آلاینده‌ها در آب شده و سبب دفع آن‌ها از بدن می‌شوند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بیان ژن  $P_{450}$  در هر دو بافت کبد و آبشش در روز ۱۴ پس از در معرض قرارگیری با سم کلریدسرب به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. هوانگ و همکاران (Huang et al., 2014)، افزایش بیان  $P_{450}$  در بافت کبد در مواجهه با سرب تا روز سوم و سپس کاهش بیان آن را در مواجهه در مدت زمان طولانی‌تر تا روز هشتم را به مکانیسم سازگاری نسبت داد. در مطالعه حاضر اگر چه بیان  $P_{450}$  در هر دو بافت کبد و آبشش افزایش را نشان داد، اما میزان بیان آن در کبد به‌طور معنی‌داری بالاتر از آبشش بود که می‌تواند به فراهم بودن شرایط برای فعالیت پروتئین کیناز که القاکننده بیان این ژن می‌باشد، در بافت متابولیکی کبد نسبت داده شود (Ghosh et al., 2012). در تضاد با نتایج مطالعه حاضر می‌توان به بررسی بیان ژن  $P_{450}$  در بافت‌های کبد، آبشش، کلیه و پوست ماهی بادکنکی (*Takifugu obscurus*) اشاره کرد که علی‌رغم بالابودن میزان بیان این ژن در بافت‌های کبد و آبشش، میزان بیان آن در سایر بافت‌ها قابل چشم‌پوشی بود؛ چرا که این بافت‌ها در متابولیسم مواد آلاینده در ماهی نقش چندانی نداشتند (Kim et al., 2008; Miranda et al., 2006). در تحقیق حاضر، ممکن است بالابودن میزان بیان ژن  $P_{450}$  در بافت کبد به نقش متابولیسمی کبد نسبت داده شود؛ چرا که آبشش اولین اندامی است که به جهت موقعیت قرارگرفتن،

ترانسمینازها را در مطالعات مختلف به نوع و غلظت فلز و مدت زمان در معرض قرارگیری موجود در برابر فلز نسبت داده شده است (Atrosh et al., 2000; Rajamanickam and Muthuswamy, 2008; Zikic et al., 2001). این‌گونه از آنزیم‌ها در سلول‌های قرمز خون نیز وجود دارند و تغییرات ایجاد شده در میزان جریان خون پس از قرار گرفتن موجود در معرض آلودگی‌ها می‌تواند منجر به افزایش فعالیت این‌گونه از آنزیم‌ها شود (Haschek et al., 2010). تغییر مقدار و فعالیت آنزیم می‌تواند با فاصله زمانی مختلف از شروع آلودگی رخ دهد و گاهی چندین روز تا چندین هفته بین القای آلودگی و تغییر در پیک آنزیمی وقفه ایجاد شود (Kumar et al., 2005). در تحقیق حاضر تغییرات در فعالیت آنزیم‌های ALT و AST در پلاسمای خون به‌عنوان شاخصی در اختلالات بافتی ایجاد شده توسط استرس‌ها استفاده شد. این دو آنزیم اغلب در واکنش‌های انتقال آمین در کبد، سلول‌های قلبی و بافت‌های ماهیچه‌ای دخالت دارند (Shalaby., 2007). بنابراین می‌توان احتمال داد که کاهش ایجاد شده در فعالیت این دو آنزیم در مطالعه حاضر احتمالاً به‌دلیل آسیب‌های ایجاد شده در اثر کلریدسرب به بافت کبد و کلیه استرس ماهی باشد. نتایج مطالعه حاضر هم سو با نتایج سایر تحقیقات روی سایر ماهیان و مهره‌داران عالی‌تر در ارتباط با افزایش سطوح پلاسمایی آنزیم‌های ALT و AST در مواجهه با سم کادمیم بود (Shalaby., 2007)

آنزیم‌های فسفاتاز از جمله آلکالین فسفاتاز در مطالعات بالینی و سم‌شناسی بسیار کاربرد دارند. در مطالعات اکوتوکسیکولوژی این آنزیم‌ها می‌توانند به‌عنوان نشانگر القاء سمیت به‌کار روند، چون حساسیت بالایی به ترکیبات فلزی دارند و تأثیر معنی‌دار در فعالیت این آنزیم‌ها در زمان تخریب سلولی پس از قرارگیری موجود با انواع مختلفی از فلزات سنگین به اثبات رسیده است (Baghshani and Shahsavani, 2013; Nunes, 2011; Khandan barani and Miri, 2017). همچنین این آنزیم در هیدرولیز ترکیبات فسفات‌ه نقش داشته و به‌عنوان ترانس فسفوریلاز عمل می‌کنند (Haschek et al., 2010). افزایش آلکالین فسفاتاز در خون ماهیان در مطالعه حاضر در پی مواجهه با کلریدسرب محیطی احتمالاً به‌دلیل تخریب بافت کبد، کلیه و آبشش و رها سازی آنزیم آلکالین فسفاتاز موجود در سیستم‌های غشای این بافت‌ها به داخل خون می‌باشد (Ochmanski and Barabasz, 2000). همسو با نتایج مطالعه حاضر، در مطالعه بررسی اثر Gallium بر فعالیت‌های آنزیمی کپور معمولی نیز، افزایش مقادیر آلکالین فسفاتاز گزارش شده است. شدت این افزایش فعالیت به میزان و مدت زمان در معرض قرارگیری موجود با فلز سنگین مرتبط دانسته شد و دلیل آن آسیب‌های بافتی وارده همانند: اختلالات کبدی، کارکرد غیر معمولی کلیه، و آسیب‌های بافت استخوانی بیان شده است (Yang and Hon-Chen, 2003).

شاخص‌های خون‌شناسی از پارامترهای با اهمیت ارزیابی موقعیت فیزیولوژیک ماهی می‌باشد و تغییرات آن تابع گونه ماهی، سن، بلوغ جنسی و بیماری‌ها می‌باشد (Tort et al., 1988). نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نشان داد که با افزایش دوز و مدت زمان در معرض قرارگیری با کلریدسرب میزان شاخص‌های خونی مثل: گلبول سفید،

- Baghshani, H., Shahsavani, D. 2013. Effects of lead acetate exposure on metabolic enzyme activities in selected tissues of common carp, *Cyprinus carpio*. *Comparative Clinical Pathology*, 22: 903-907.
- Cizdziel J., Hinners T., Cross C., Pollard J. 2003. Distribution of mercury in the tissues of five species of fresh water fish from Lake Mead, USA. *Journal of Environmental Monitoring*, 5: 802-807.
- Demirak A., Yilmaz F., Levent Tuna A., Ozdemi N. 2006. Heavy metals in water, sediment and tissues of *Leuciscus Cephalus* from a stream in southwestern Turkey. *Chemosphere*, 63 (9): 1451-1458.
- Dong X., Zhu L., Wang J., Wang J., Xie H., Hou X., Jia W. 2009. Effects of atrazine on cytochrome P<sub>450</sub> enzymes of zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 77(3): 404-412.
- Esmaeeli S. 2002. Pollutants, hygiene and standards in the environment. *Naghs Mehr Publications*, 23-27.
- Flawor B. A., Dural G. 2001. Effect of lead on the Kidney of fish, role of high affinity. lead-binding proteins. *Enviro Health prespects*, 91: 77-80.
- Gilbertson M., Carpenter D.O. 2004. An ecosystem approach to the health effects of mercury in the Great Lakes basin ecosystem. *Environmental Research*, 95: 240-246.
- Goodwin T. H., Young A. R., Holmes M. G. R., Old G. H., Hewitt N. G., Leeks J. L., Packman J. C., Smith B. P. G. 2003. The temporal and spatial variability of sediment transport and yields within the Bradford Beck catchment, West Yorkshire. *Science of the Total Environment*, 314-316: 475-494.
- Gravato C., Teles M., Oliveira M., Santos M. A. 2006. Oxidativ estress, liver biotransformation and genotoxic effects induced by copper in *Anguilla anguilla*. The influence of pre-exposure to  $\beta$ -naphthoflavone. *Chemosphere*, 65: 1821-1830.
- Ghosh, M.C., Ray, A.K. 2012. Regulation of cytochrome P4501A by protein kinase C: the role of heat shock protein70. *Journal of cell communication and signaling*, 6(1):37-44.
- Haschek W. M., Walling M. A., Rousseaux, C. 2010. *Fundamental of toxicologic pathology*. Academic Press, pp: 686.
- Haux C., Larrson A. 1984. Long-term Sublethal physiological effects on rainbow trout, *Salmo gairdneri*, during exposure to cadmium and after subsequent recovery. *Aquatic Toxicology*. 5: 129-142.
- Hazel, CR., Meith, SJ. 1970. *The International Journal of Applied and Basic Nutritional Sciences*, 21 (4): 530-536.
- Hedayati, A., Jahanbakhshi, A. and Ghaderi romazi, F., 2013. *Aquatic toxicology*. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources Publications. 210p.
- Hedayati, A., Ghorbani, R., Bagheri, T., Ahmadvand, Sh. And Jahanbakhshi, A., 2013. Investigation of the lethal toxicity effects of ZnO (ZnONPs), CuANPs, TiO<sub>2</sub>NPs and the effects of their lethal toxicity on biochemical blood factors and gill tissue of goldfish (*Carassius auratum*), Common carp (*Cyprinus carpio*) and Siberian roach (*Rutilus rutilus*). *Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural*
- ساختار بسیار منشعب و در نتیجه سطح وسیع آن، به دلیل حجم زیاد آبی که از آن عبور می‌کند، بلافاصله از محیط آلوده آسیب دیده باشد (Da Cuna et al., 2011; Negro., 2015). همسو با نتایج تحقیق حاضر، دانگ و همکاران (Dong et al., 2009) افزایش بیان ژن P<sub>450</sub> را در ماهی زبرا در مواجهه با سم اندوسولفان با افزایش غلظت از ۱۰ μg/l به ۱۰۰ μg/l گزارش کردند.
- باتوجه به افزایش آنزیم ALP و کاهش AST و ALT در مطالعه حاضر، می‌توان بیان داشت که سم کلریدسرب اثرات مخربی بر بافت کبد ماهی کپور معمولی داشت. کاهش تولید گلبول‌های قرمز به دلیل آسیب بافتی کلیه بوده، اما باتوجه به افزایش گلبول سفید، هماتوکریت، لنفوسیت، بازوفیل، هموگلوبین در مقایسه با کاهش مونوسیت می‌توان این‌گونه نتیجه‌گیری کرد که مونوسیت‌ها در مقایسه با سایر سلول‌های سفید خون در مواجهه با کلریدسرب آسیب‌پذیری بیشتری دارند. این نتایج بیانگر این است که سایر سلول‌های سفید خون در مقایسه با مونوسیت‌ها در مواجهه با کلریدسرب کمتر آسیب‌پذیر می‌باشند که خود نشان دهنده نسبت‌های متفاوتی از تخریب انواع گلبول‌های سفید در اثر تیمار با کلریدسرب می‌باشند. از سویی دیگر، کاهش سطوح پروتئین کل سرم، ایمونوگلوبولین، لیزوزیم و افزایش سطح پروتئین کل موکوس نشان‌دهنده عدم سازش ماهیان با استرس وارد شده می‌باشد. بنابراین، شدت‌های بیشتر عوارض این آلاینده قابل پیش‌بینی است؛ زیرا این فرضیه با درنظر گرفتن افزایش تجمع‌زیستی فلز در کبد و همچنین روند افزایشی (فسفاتازها) و کاهشی (ترانس‌آمینازها) سطوح آنزیم‌های کبدی در پلاسما قابل اثبات می‌باشد.

### پست الکترونیک نویسندگان

عرفان برارزادآرایی:

hkolangi@gmail.com

حامد پاک‌نژاد:

marinebiology1@gmail.com

علی‌اکبر هدایتی:

rsafari@gau.ac.ir

رقیه صفری:

alihajibeglou@gmail.com

عباسعلی حاجی‌بگلو:

### REFERENCES

- Antilla A., Heikila P., Nykyri E. 1996. Risk of nervous system cancer among workers exposed to lead. *Occupational and Environmental Medicine*, 38: 131-136.
- Ashraf W. 2006. Levels of selected heavy metals in *Tuna Fish*. *Arabian Journal of Science Technology*, 31 (1A): 89-92.
- Atroshi F., Rizzo A., Sankari S., Biese L., Westermarck T., Veijalainen, P. 2000. Liver enzyme activities of rats exposed to ochratoxin A and T-2 toxin with antioxidants. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicolog*, 64: 586-592.
- Bacanskas L. R., Whitaker J., Di Giulio R. T. 2004. Oxidative stress in two populations of killifish (*Fundulus Heteroclitus*) with differing contaminant exposure histories. *Marine Environmental Research*, 56: 597-601.

- Resources Research Project, Vice Chancellor for Research and Technology, Faculty of Fisheries and Environment, Department of Fisheries. 29p.
- Huang G.Y., Ying G.G., Liang Y.Q., Liu S.S., Liu U.S. 2014. Expression patterns of metallothionein, cytochrome P<sub>450</sub>1A and vitellogenin in western mosquitofish (*Gambusia affinis*) in response to heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 105: 97-102.
- Itakura T., Elkady M., Mitsu R., Kaminishi Y. 2005. Complementary DNA cloning and constitutive expression of cytochrome P<sub>450</sub> ic1 in the gills of carp (*Cyprinus carpio*). *Environmental Sciences: An International Journal of Environmental Physiology and Toxicology*, 12 (2): 111-120.
- James R. 1992. Utilization of *Eichornia Crassipes* for reduction of mercury toxicity on food transformation in *Heteropneustes fossilis*. *Journal of Aquaculture in the Tropics*, 7: 146-186.
- Kar D., Sur P., Mandal S. K., Saha T., Kole R. K. 2008. Assessment of heavy metal pollution in Surface water. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 5 (1): 119-124.
- Khajeh Gh.M., Mesbah M., Nikmehr S., Sabzevarizadeh M. 2010. Effect of sex on the haematological parameters of reared shirboat fish (*Barbus grypus*). *Veterinary Research*, 65(3): 217-224.
- Kim S.G., Park D.K., Jang S.W., Lee J.S., Kim S.S., Chung M.H. 2008. Effects of Dietary Benzo[a]pyrene on Growth and Hematological Parameters in Juvenile Rockfish, *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 81: 470-474.
- Kulkarni R.S., Veeresh V.U., Sindhe V.R. 2002. Ovarian changes in response to heavy metal exposure to the fish, *Notopterus notopterus* (palls). *Journal of Environmental Biology*, 23: 137-171.
- Kumar M., Sharma M.K., Kumar A. 2005. *Spirulina fusiformis*: a food supplement against mercury induced hepatic injury. *Journal of Health Sciences*, 51: 424-430.
- Khandan Barani H., Miri M. 2017. Changes in metabolic enzyme levels under the influence of heavy metals zinc and cadmium in Sistan whitefish (*Schizothorax zarudnyi*). *Journal of Aquatic Ecology*, 6(4): 39-51/
- Levesque H.M., Moon T.W., Campbell P.G.C., 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.
- Metin C. 2001. Effects of aqueous cadmium on embryos and larvae of mirror carp. *Indian Journal of Animal Sciences*, 71: 885-888.
- Mikryakov V.R., Lapirova T.B. 1997. Influence of salts of some heavy metals on the differential blood count in Juvenile *Acipenser baeri*. *Journal of Ichthyology*, 37: 458-470.
- Mishra S., Srivastava A.K. 1980. The acute toxic effects of copper on the blood of a teleost. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 4: 191-194.
- Miranda C.L., Chung W.G., Wang-Buhler J.L., Musafia-Jeknic T., Baird W.M., Buhler D.R. 2006. Comparative in vitro metabolism of benzo[a]pyrene by recombinant zebrafish CYP1A and liver microsomes from beta-naphthoflavone-treated (Rainbow trout). *Aquatic Toxicology*, 80: 101-108.
- Miandare H.K., Farahmand H., Akbarzadeh A., Ramezanpour, S., Kaiya, H., Miyazato, M., Rytönen, K.T., Nikinmaa, M. 2013. Developmental transcription of genes putatively associated with growth in two sturgeon species of different growth rate. *General and Comparative Endocrinology*, 182: 41-47.
- Namroodi S., Buzarpour S., Harsij M., Paknejad H. 2018. The effect of sub-lethal concentration of cadmium on the expression of cytochrome (CYP1A) P450 gene in liver and gill tissues of common carp *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758. *Journal of Applied Ichthyological Research*, 6(2): 61-72.
- Nazerian S., Gholipour H., Jafarian H., Esmaeili A. 2013. Effect of Dietary Garlic Powder on Some Hematological Indices of Beluga (*Huso huso*). *Breeding and Aquaculture Science*. 1: 69-78.
- Ochmanski W., Barabasz, W. 2000. Aluminum occurrence and toxicity for organisms *Przegl. Lek.*, 57: 665-668.
- Palakova J., Parvda D., Fasaic K., Celechovska O. 1992. Sublethal effects of cadmium on carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings, in sublethal chronic effects of pollutants on fresh water. Edited by R. Muller and R. Lloyd (1sted.) FAO and Fishing News Book, Oxford, UK, pp: 53-58.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., Dempfle, L. 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research*, 30(9), e36-e36.
- Rajamanickam V., Muthuswamy, N. 2008. The Impact of Toxic heavy metals on the Hematological Parameters in Common carp (*Cyprinus carpio*). *Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 6 (1): 23-28.
- Rissodefaerney C., Devaus A., Lafaurie M., Girard J.P., Bailly B., Rahmani, R. 2001. Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes through generation of reactive oxygen species. *Aquatic toxicology (Amsterdam)*, 53 (1): 65-76.
- Ramakers C., Ruijter J.M., Deprez R.H.L., Moorman A.F. 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience letters*, 339(1): 62-66.
- Sastry K.V., Gupta P.K. 2003. Alteration in the activities for three peptidases and lipase in the digestive system of the fish *Channa punctatus* exposed to lead nitrate. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 21: 190-195.
- Shalaby A.M. 2007. Effect of EDTA on Toxicity Reduction of Cadmium in Relation to Growth, Some Haematological and Biochemical Profile of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 2 (2): 100-109.
- Singhal R.N., Jain M. 1997. Cadmium Induced changes in histology of kidneys in common carp, *Cyprinus carpio* (Cyprinidae). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 58: 456-462.

- Siroka Z., Drastichova J. 2004. Biochemical markers of Aquatic Environment contamination-Cytochrome *P<sub>450</sub>* in fish. A review. Acta vet. Brno, 73: 123-132.
- Sudagara M., Mohammadzarejabad A., Mazandarania R., Pooralimotlagha S. 2009. The Efficacy of Clove Powder as an Anesthetic and Its Effects on Hematological Parameters on Roach (*Rutilus Rutilus*). Journal of Aquaculture Feed Science and Nutrition, 1: 1-5.
- Thophon S., Kruatrachue M., Upatham G.S., Pokethitiyook P., Sahaphog S., Jaritkhuan S. 2003. Histopathological alteration of white Sea bass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. Environmental Pollution, 121: 307-320.
- Topuzoglu G., Erbay A.R., Karul A.B., Yensel N. 2003. Concentrations of copper, Zinc, and magnesium in sera from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. Biological Trace Element Research, 95 (1): 7-10.
- Tort L., Torres P., Hidalgo J. 1988. The effects of sublethal concentration of cadmium on haematological parameters in dog fish (*Scyliorhinus canicula*) Journal of Fish Biology, 32: 279-282.
- Turkmen M., Turkmen A., Tepe Y., Ates A. 2009. Determination of metals in fish species from Aegean and Mediterranean Seas. Food Chemistry, 113: 233-237.
- Yang J., Hon-Chen C. 2003. Effects of gallium on common carp, *Cyprinus carpio*; Acute test, serum biochemistry and erythrocyte morphology. Chemosphere, 53: 877-882.
- Zikic R.V., Stajn S., Pavlovic Z., Ognjanovic B.I., Saicic Z.S. 2001. Activities of superoxide dismutase and catalase in erythrocyte and plasma transaminases of goldfish (*Carassius auratus Gibelio* Bloch) exposed to cadmium. Physiological Research, 50: 105-111.

#### نحوه استناد به این مقاله:

براززاد آرابی ع.، پاک‌نژاد ح.، هدایاتی ع.ا.، صقری ر.، حاجی‌بگلو ع. ۱۴۰۱. بررسی اثرات تحت‌کشنده کلرید سرب ( $PbCl_2$ ) بر شاخص‌های خونی، آنزیم‌های کبدی و بیان ژن سیتوکروم *P<sub>450</sub>* در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus Carpio*). نشریه پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی، (۲) ۱۰: ۶۴-۷۶.

<https://doi.org/10.22034/jair.10.2.71>

Bararзад E., Paknejad H., Hedayati A., Safari R., Hajibaglou A. 2022. Investigating the Sublethal Effects of Lead Chloride ( $PbCl_2$ ) on Blood Indices, Liver Enzymes and Cytochrome *P<sub>450</sub>* Gene Expression in Common Carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Applied Ichthyological Research, 10(2): 64-76. <https://doi.org/10.22034/jair.10.2.71>

## Investigating the Sublethal Effects of Lead Chloride (PbCl<sub>2</sub>) on Blood Indices, Liver Enzymes and Cytochrome *P*<sub>450</sub> Gene Expression in Common Carp (*Cyprinus carpio*)

Bararзад E<sup>1</sup>., Paknejad H<sup>2\*</sup>., Hedayati A<sup>2</sup>., Safari R<sup>3</sup>., Hajibaglou A<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> M.Sc. student, Dept. of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

<sup>2</sup> Associate Prof., Dept. of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

<sup>3</sup> Assistant Prof., Dept. of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

### Type:

Original Research Paper

<https://doi.org/10.22034/jair.10.2.71>

### Paper History:

Received: 03-06-2021

Accepted: 04-12- 2021

### Corresponding author:

Paknejad H. Associate Prof., Dept. of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

Email: [hkolangi@gmail.com](mailto:hkolangi@gmail.com)

### Abstract

The aim of this study was to investigate the sub-lethal effects of Lead Chloride (PbCl<sub>2</sub>) on blood indices, liver enzymes, cytochrome *P*<sub>450</sub> gene expression in common carp. For this purpose, Fish with a mean weight of 733±0.33 g were prepared and divided into 3 treatments and a control group and exposed to effective concentrations (0.05, 0.15, 0.25 mg/l) of sublethal toxicity for a period of 14 days. At the end of the experiment, sampling was done randomly. The results showed that the level of AST and ALT enzymes significantly decreased compared to the control group, while the level of ALP increased significantly. The results of hematology test showed that the level of white blood cells, hematocrit and hemoglobin did not change significantly with increasing the concentration of lead chloride compared to the control group; but they had a slight upward trend compared to the control group. Also, the amount of red blood cells, monocytes, total protein and serum immunoglobulin decreased significantly compared to the control group. Levels of lymphocytes, basophils and total mucus protein increased significantly compared to the control group. Mucus lysozyme had a slight decreasing trend compared to the control group but had no significant effect. The expression of P450 gene in liver and gills increased significantly compared to the control group. In this study, the relative expression of cytochrome *P*<sub>450</sub> gene in liver tissue was significantly higher than gill tissue. In general, it was found that lead chloride has destructive effects on the liver of common carp.

**Keywords:** Common carp, Aspartate transaminase, Alanin transaminase, lead Chloride toxin, P450 gene.