نشریه پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی
Journal homepage: http://jair.gonbad.ac.ir
وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
دانشگاه گنبد کاووس

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

عرفان برارزاد آرایی[1]، حامد پاک‌نژاد*[2]، سید علی‌اکبر هدایتی[2]، رقیه صفری[3]، عباسعلی حاجی‌بگلو[3]

[1] دانشجوی کارشناسی‌ارشد، گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
[2] دانشیار، گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
[3] استادیار، گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

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

چکیده

هدف از این تحقیق بررسی اثرات تحت‌کشنده کلرید سرب بر شاخص‌های خونی، آنزیم‌های کبدی و بیان ژن سیتوکروم P_{450} در ماهی کپورمعمولی بود. به این منظور ۸۰ قطعه بچه‌ماهیان کپور با میانگین وزنی۰/۳۳± ۷ گرم تهیه و در ۳ تیمار و یک گروه شاهد در معرض غلظت‌های مؤثر (۰/۰۵، ۰/۱۵ و ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر) سمیت تحت‌کشنده به‌مدت ۱۴ روز قرار گرفتند و در انتهای دوره نمونه‌برداری به‌صورت تصادفی انجام شد. نتایج نشان داد که میزان آنزیم AST و ALT به‌صورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد کاهش یافت ($p<0/05$). میزان آنزیم ALP به‌صورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش یافت ($p<0/05$). نتایج آزمایش خون‌شناسی 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 گلبول‌قرمز، منوسیت، پروتئین کل و ایمونوگلوبولین سرم به‌صورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد کاهش یافتند ($p <0/05$). میزان لنفوسیت، بازوفیل و پروتئین کل موکوس به‌صورت 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 که معنی‌دار نبود ($p>0/05$). میزان بیان ژن P_{450} در کبد و آبشش به‌صورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش یافت ($p>0/05$). در این مطالعه بیان نسبی ژن سیتوکروم P_{450} به‌طور معنی‌داری در بافت کبد از بافت آبشش بالاتر بود ($p<0/05$) به‌طورکلی مشخص گردید که کلریدسرب دارای آثار مخربی بر کبد ماهی کپورمعمولی است.

واژه‌های کلیدی:
ماهی کپورمعمولی، آسپارتات ترانس آمیناز، آلانین ترانس آمیناز، کلریدسرب، سیتوکروم P_{450}

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 درصورتی‌که 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). به‌طورکلی 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 موثر 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; Kulkarini *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

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2025-03-19]
[DOI: 10.22034/jair.10.2.71]

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 عبارتنداز: انحنای 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 فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در خون ماهی‌هایی که در معرض دوره‌های کوتاهی از استرس‌های تحت‌کشنده قرار گرفته‌اند موجب پیشرفت روش‌هایی به‌منظور پیش بینی اثرات آلاینده‌ها بر تولیدمثل، رشد و یا حتی چگونگی تحمل استرس را ایجاد کرد (Rissodefaverney, 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_{450} 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. مقدار جذب عناصر سنگین در بافت‌های مختلف آبزیان (عضله، کبد، کلیه، تخمدان و آبشش) تفاوت داشته و با میزان قابلیت تجمع زیستی فلز، شرایط فیزیولوژیک و عادات غذایی آبزی مرتبط است. (Cizdziel *et al*., 2003; Gilbertson and Carpenter, 2004).

هدف از این تحقیق بررسی اثرات تحت‌کشنده کلریدسرب ($PbCl_2$) بر شاخص‌های خونی،آنزیم‌های کبدی و بیان ژن P_{450} در ماهی کپورمعمولی (*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

تیماربندی ماهی کپورمعمولی با کلریدسرب: بچه‌ماهیان کپورمعمولی با میانگین وزنی ۰/۳۳± ۷ گرم تهیه و در شرایطی با نور طبیعی و تعویض آب به‌صورت یک روز در میان، به مدت دو هفته جهت سازگاری نگه‌داری شدند. در شروع آزمایش بچه‌ماهیان به‌طور کاملاً تصادفی در ۸ تانک تقسیم شدند. هر تانک شامل۲۰ قطعه بچه‌ماهی کپورمعمولی 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 هر۸ آکواریوم یکسان‌سازی شد. غذادهی در کل دوره تا حد سیری انجام می‌شد.

تعیین غلظت کشندگی حاد یا LC_{50}: بر این اساس قبل از شروع آزمایش با بررسی غلظت‌های مشابه مقادیر نزدیک به LC_{50} با بررسی دامنه های 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_{50} کلریدسرب، ماهیان کپورمعمولی در چهار تیمار با دو تکرار (یک گروه به‌عنوان شاهد و در هر تیمار پنج ماهی) به‌صورت تصادفی در آکواریوم-های پنجاه لیتری قرار گرفتند. با شروع آزمایش کشندگی حاد، هیچ-گونه تعویض آبی در مخازن آزمایش صورت نگرفت و غلظت سم نیز تجدید نشد.

بررسی شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب: در طی آزمایش سعی گردید که شرایط فیزیکوشیمیایی آب یکسان نگه‌داری شود. هوادهی در تمامی تانک‌ها به گونه‌ای که حداقل آشفتگی در آب ایجاد شود صورت گرفت (Hedayati *et al*., 2013). دمای آب ۲۱-۱۹ درجه سانتی‌گراد، پی‌اچ۷/۹-۷/۶، 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 به‌اینکه آکواریوم‌ها با حجم ۵۰ لیتر آبگیری 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_{50} با محدوده اطمینان ۹۵٪ مطابق دستورالعمل اصلاح یافته Finney توسط بودو و ریبیر (Boudou and Ribeyre, 1997) با روش Probit Analysis در نرم‌افزار SPSS-16 محاسبه شد.

آزمایش سمیت تحت حاد: پس از محاسبه LC_{50} 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 کپورمعمولی به‌صورت تصادفی در ۸ آکواریوم ۸۰ لیتری با حجم آبگیری 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_{50} 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

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2025-03-19]
[DOI: 10.22034/jair.10.2.71]

متوقف شد. شرایط تیمارها روزانه بررسی و هوادهی به‌طور منظم انجام شد. در نوبت‌های غذادهی، هوادهی موقتا قطع و سپس مجددا 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 تعداد۳ 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 ml ۲ هپارینه، از ساقه دمی صورت می‌گرفت. نمونه‌های خون با دور rpm ۱۰۰۰۰ 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 اسپکتروفتومتر 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).

نمونه‌گیری بافت جهت مطالعات بیان ژن: به‌منظور بررسی بیان ژن P_{450}، 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_{450} 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 میلی گرم نمونه بافت کبد، آبشش با استفاده از کیت استخراج RNX- Plus بر اساس پروتوکل 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.

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در بررسی بیان P_{450} در ماهی کپورمعمولی تحت‌تأثیر کلریدسرب.

ژن	شماره دسترسی در NCBI	پرایمر(3′-5′)	اندازه محصول(bp)	کارایی پرایمر(٪)
P_{450}	AB048939.1	F:GCTGAGAGAAAAGATCGGAATGGA R: AGACGTACAGTGAGGAATGGTGA	۱۳۶	۹۶
Beta actine	M24113.1	F: TCTTGGGTATGGAGTCTTGCG R: GTCAGCAATGCCAGGGTACA	۱۳۷	۹۵

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 نمونه¬های cDNA مخلوط از تیمارهای متفاوت هر پلت تهیه و با هر دو آغازگر هدف و رفرنس در ۴ تکرار تکثیر شدند و جهت تخمین کارآیی و تکرارپذیری آزمایش برای هر آغازگر منحنی استاندارد ترسیم و کارآیی 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_{450} 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 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 تحت‌تأثیر کلریدسرب، آسپارتات آمینو ترانسفراز (AST): تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان آنزیم آسپارتات آمینو ترانسفراز در ماهی کپورمعمولی در شکل ۱ آمده است. همان‌طور که مشاهده می‌گردد میزان آنزیم آسپارتات آمینو ترانسفراز با افزایش میزان غلظت‌های تحت‌کشنده به‌صورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد کاهش یافت ($p<0/05$). 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.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2025-03-19]
[DOI: 10.22034/jair.10.2.71]

آلکالین فسفاتاز (ALP): تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز در ماهی کپورمعمولی در شکل ۳ آمده است. با توجه به شکل ۳ مشاهده می گردد که میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز با افزایش میزان غلظت‌های تحت‌کشنده به‌صورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد روند افزایشی داشت ($p<۰/۰۵$). 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 کپورمعمولی در شکل ۲ آمده است. باتوجه به شکل، میزان آنزیم آلانین آمینو ترانسفراز با افزایش میزان غلظت‌های تحت‌کشنده به‌صورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد کاهش یافت ($p<۰/۰۵$). به‌جز تیمار شاهد در بقیه تیمارها با افزایش غلظت کلریدسرب میزان ALT روند ناچیز افزایشی داشته است.

میزان پارامترهای خونی تحت‌تأثیر سم کلریدسرب، گلبول‌سفید تحت‌تأثیر سم کلریدسرب: تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلرید-سرب بر میزان گلبول‌سفید خون در ماهی کپورمعمولی در شکل ۴ نشان داده شده است. سطوح مختلف کلریدسرب بر میزان گلبول سفید خون ماهی کپورمعمولی تأثیر معنی‌داری نداشت ($p>۰/۰۵$). میزان گلبول سفید در تمامی تیمارها به‌جز تیمار شاهد، روند ناچیز افزایشی داشت.

میزان گلبول قرمز تحت‌تأثیر سم کلریدسرب: تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان گلبول قرمز خون در ماهی کپورمعمولی در شکل ۵ آمده است. همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود سطوح مختلف کلریدسرب بر میزان گلبول قرمز خون ماهی کپورمعمولی تأثیر معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$). غلظت‌های مختلف کلریدسرب روند یکنواخت افزایشی یا کاهشی نشان نداد؛ اما در مجموع نسبت به تیمار شاهد روند ناچیز کاهشی داشت.

میزان هماتوکریت تحت‌تأثیر سم کلریدسرب: تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان هماتوکریت در ماهی کپورمعمولی در شکل ۶آورده شده است. باتوجه به شکل ۶، سطوح مختلف کلریدسرب بر میزان هماتوکریت تأثیر معنی‌داری نداشت ($p>۰/۰۵$). به‌جز تیمار شاهد در تمامی تیمارها با افزایش غلظت کلریدسرب، میزان هماتوکریت افزایش یافت.

میزان لنفوسیت خون تحت‌تأثیر سم کلریدسرب: تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان لنفوسیت در ماهی کپورمعمولی 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 ($p<۰/۰۵$). غلظت‌های مختلف کلریدسرب روند یکنواخت افزایشی را از گروه شاهد به سمت تیمار ۳ نشان داد.

میزان مونوسیت تحت‌تأثیر سم کلریدسرب: همان‌طور که در شکل ۸ مشاهده می‌شود میزان مونوسیت با افزایش میزان غلظت‌های تحت-کشنده به‌صورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد کاهش یافت ($p<۰/۰۵$). به‌جز تیمار شاهد در سایر تیمارها با افزایش غلظت کلریدسرب میزان مونوسیت کاهش یافت.

میزان بازوفیل تحت‌تأثیر سم کلریدسرب: باتوجه به شکل ۹ مشاهده می‌گردد که سطوح مختلف سم کلریدسرب بر میزان بازوفیل تأثیر معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$). 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 تحت‌تأثیر سم کلریدسرب: تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان هموگلوبین در ماهی کپورمعمولی در شکل ۱۰ نشان داده شده است. باتوجه به شکل ۱۰، سطوح مختلف کلریدسرب بر میزان هموگلوبین تأثیر معنی‌داری نداشت ($p>۰/۰۵$). 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 تحت-کشنده کلریدسرب بر میزان ایمونوگلوبولین در ماهی کپورمعمولی در شکل ۱۱ آورده شده است. براساس شکل ۱۱، سطوح مختلف سم کلریدسرب بر میزان ایمونوگلوبولین تأثیر معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$). 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 کپورمعمولی 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 ($p<۰/۰۵$). 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 تحت-کشنده کلریدسرب بر میزان لیزوزیم در ماهی کپورمعمولی در شکل ۱۳ آورده شده است. همان طور که از شکل ۱۳ مشخص می گردد، سطوح مختلف کلریدسرب بر میزان لیزوزیم تأثیر معنی‌داری نداشت ($p>۰/۰۵$). 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 کپورمعمولی در شکل ۱۴ نشان داده شده است. با توجه به شکل ۱۴، سطوح مختلف سم کلریدسرب بر میزان پروتئین کل تأثیر معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$). 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

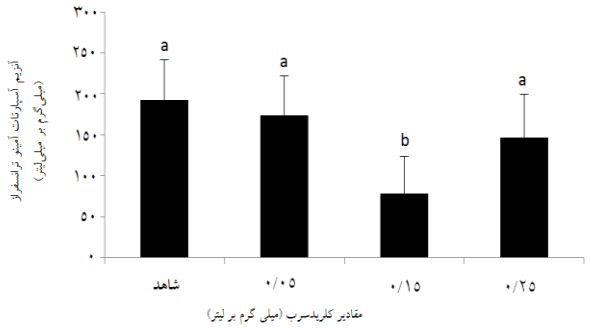
[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2025-03-19]

[DOI: 10.22034/jair.10.2.71]

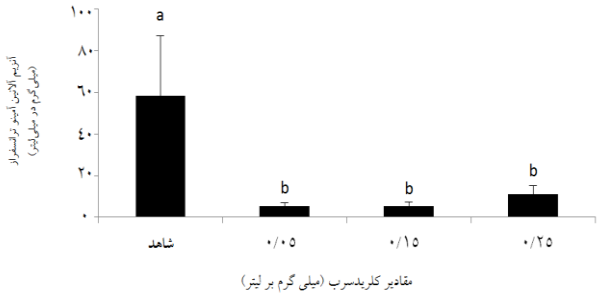
کاهشی نشان نداد اما، در مجموع بالاترین غلظت کلرید سرب (به‌جز تیمار شاهد) منجر به بالاترین میزان پروتئین کل موکوس شد.

میزان بیان ژن P_{450} تحت‌تأثیر کلریدسرب در کبد: تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان بیان ژن P_{450} در کبد ماهی کپورمعمولی در شکل ۱۵ آمده است. با توجه به شکل ۱۵، میزان بیان ژن P_{450} با افزایش میزان غلظت‌های تحت‌کشنده به‌صورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش یافت ($p<۰/۰۵$).

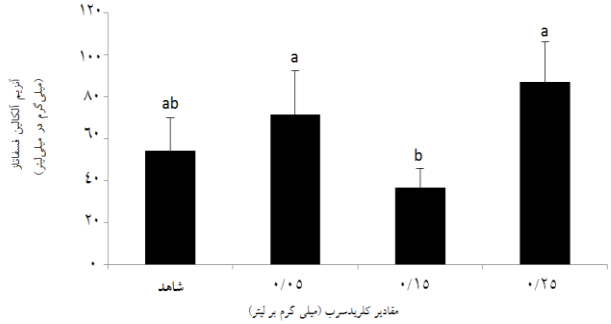
میزان بیان ژن P_{450} تحت‌تأثیر کلریدسرب در آبشش: تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان بیان ژن P_{450} در آبشش ماهی کپورمعمولی در شکل ۱۶ مشاهده می‌گردد. با توجه به شکل ۱۶، میزان بیان ژن P_{450} با افزایش میزان غلظت‌های تحت‌کشنده در تیمار ۱ به‌صورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش یافت ($p<۰/۰۵$).



شکل ۱- تأثیر سطوح مختلف حت‌کشنده کلریدسرب بر میزان آنزیم آسپارتات آمینو ترانسفراز (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در ماهی کپورمعمولی. حروف انگلیسی غیر مشترک بالای هر ستون، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها می‌باشد ($p<۰/۰۵$).



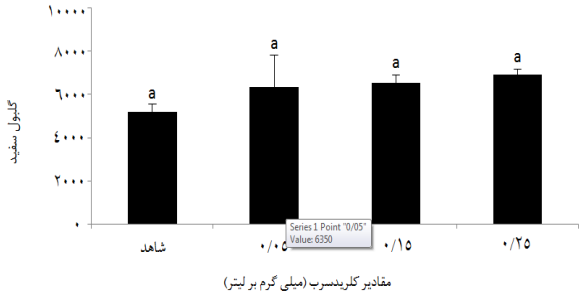
شکل۲- تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان آنزیم آلانین آمینو ترانسفراز (میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در ماهی کپورمعمولی. حروف انگلیسی غیر مشترک بالای هر ستون، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها می‌باشد ($p<۰/۰۵$).



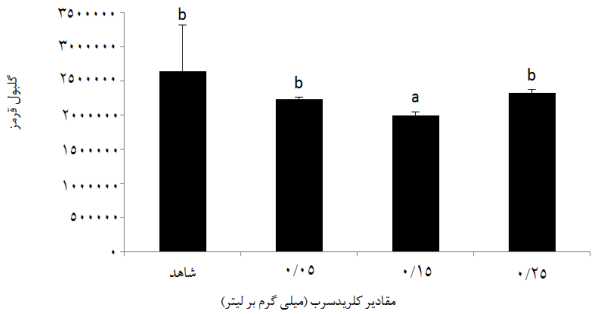
شکل۳- تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز (میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در ماهی کپورمعمولی. حروف انگلیسی غیر مشترک بالای هر ستون، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها می‌باشد ($p<۰/۰۵$).

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2025-03-19]

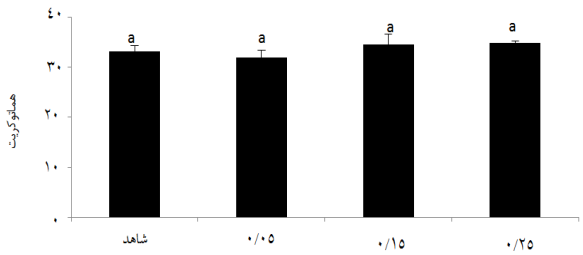
[DOI: 10.22034/jair.10.2.71]



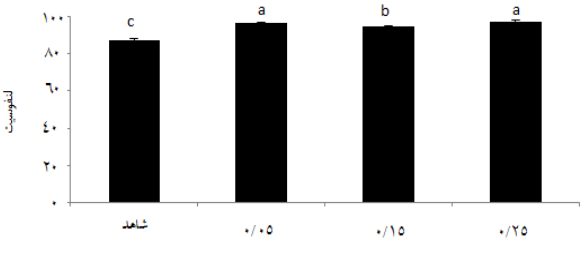
شکل ۴- تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان گلبول‌سفید خون (میلی‌گرم بر لیتر) در ماهی کپورمعمولی. حروف انگلیسی مشترک بالای هر ستون، نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها می‌باشد (p>۰/۰۵).



شکل۵- تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان گلبول قرمز خون (میلی‌گرم بر لیتر) در ماهی کپورمعمولی. حروف انگلیسی غیر مشترک بالای هر ستون، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها می‌باشد (p<۰/۰۵).



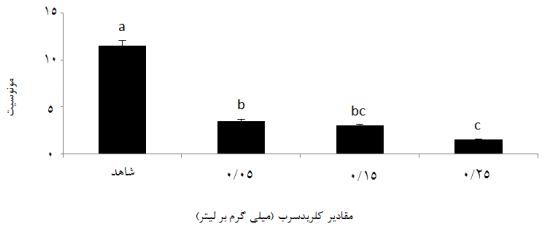
شکل۶) تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان هماتوکریت خون (میلی‌گرم بر لیتر) در ماهی کپورمعمولی. حروف انگلیسی مشترک بالای هر ستون، نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها می‌باشد (p>۰/۰۵).



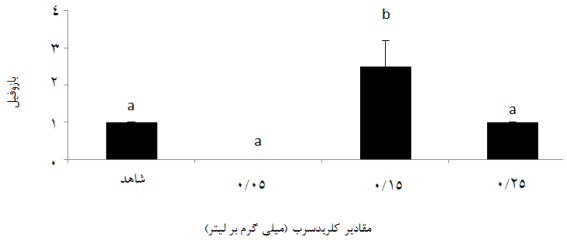
شکل۷) تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان لنفوسیت خون (میلی‌گرم بر لیتر) در ماهی کپورمعمولی. حروف انگلیسی غیر مشترک بالای هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها می‌باشد (p<۰/۰۵).

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2025-03-19]

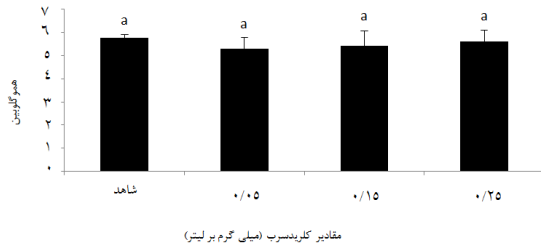
[DOI: 10.22034/jair.10.2.71]



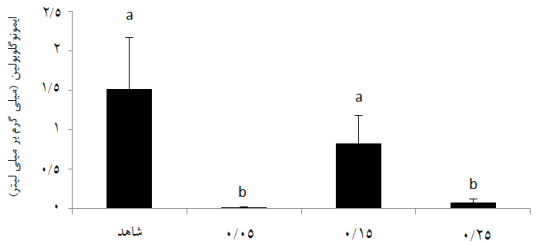
شکل ۸- تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان مونوسیت (میلی‌گرم بر لیتر) در ماهی کپورمعمولی.
حروف انگلیسی غیر مشترک بالای هر ستون، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها می‌باشد (p<۰/۰۵).



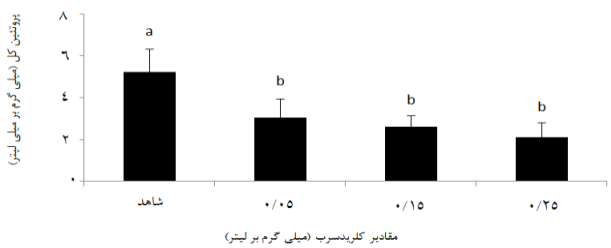
شکل ۹- تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان بازوفیل (میلی‌گرم بر لیتر) در ماهی کپورمعمولی.
حروف انگلیسی غیر مشترک بالای هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها می‌باشد (p<۰/۰۵).



شکل ۱۰- تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان هموگلوبین (میلی‌گرم بر لیتر) در ماهی کپورمعمولی.
حروف انگلیسی مشترک بالای هر ستون نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها می‌باشد (p>۰/۰۵).

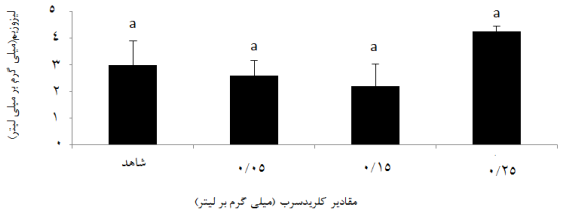


شکل ۱۱- تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان ایمونوگلوبولین (میلی‌گرم بر لیتر) در ماهی کپورمعمولی.
حروف انگلیسی غیر مشترک بالای هر ستون، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها می‌باشد (p<۰/۰۵).

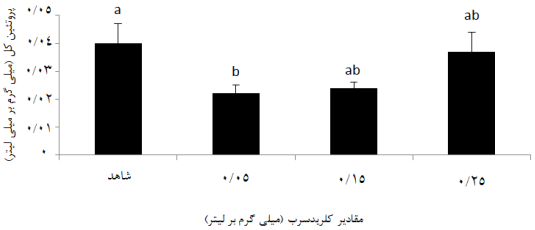


شکل ۱۲- تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان پروتئین محلول سرم (میلی‌گرم بر لیتر) در ماهی کپورمعمولی.
حروف انگلیسی غیر مشترک بالای هر ستون، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها می‌باشد (p<۰/۰۵).

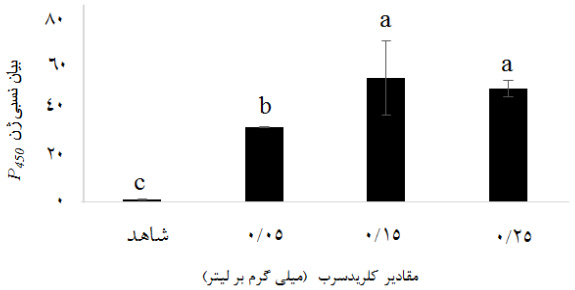
[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2025-03-19]
[DOI: 10.22034/jair.10.2.71]



شکل ۱۳- تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان لیزوزیم (میلی‌گرم بر لیتر) در ماهی کپورمعمولی. حروف انگلیسی مشترک بالای هر ستون، نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌داری در بین تیمارها می‌باشد (p>۰/۰۵).



شکل ۱۴- تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان پروتئین کل موکوس (میلی‌گرم بر میلی لیتر) در ماهی کپورمعمولی. حروف انگلیسی غیر مشترک بالای هر ستون، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها می‌باشد (p<۰/۰۵).



شکل ۱۵- تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان بیان ژن P_{450} در کبد ماهی کپورمعمولی. حروف انگلیسی غیرمشترک بالای هر ستون، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها می‌باشد (p<۰/۰۵).

شکل ۱۶- تأثیر سطوح مختلف تحت‌کشنده کلریدسرب بر میزان بیان ژن P_{450} در آبشش ماهی کپورمعمولی. حروف انگلیسی غیرمشترک بالای هر ستون، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها می‌باشد (p<۰/۰۵).

۴ | بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر نتایج نشان داد که پس از مواجهه کپورمعمولی با سم کلریدسرب و با گذشت مدت زمان چهارده روز از آزمایش، دو آنزیم AST و ALT 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 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

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2025-03-19]
[DOI: 10.22034/jair.10.2.71]

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 بافت های 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 فسفاتازی 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 کپورمعمولی 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، 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 میکریاکوف و لاپیرورا (Mikryakov and Lapirora, 1997)، کاهش تعدادگلبول سفید در خون تاس‌ماهی سیبری (*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 کپورمعمولی 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 ppb ۲۵ کادمیوم توسط تارت و همکاران (Tort *et al*., 1988) گزارش شده است. همچنین، براساس گزارش هاکس و لارسون (Haux and Larsson, 1984)، میزان ppb ۱۰ 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 شده 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،

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2025-03-19]
[DOI: 10.22034/jair.10.2.71]

ساختار بسیار منشعب و در نتیجه سطح وسیع آن، به‌دلیل 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_{450} را در ماهی زبرا در مواجهه با سم اندوسولفان با افزایش غلظت از µg/l ۰/۰۱ به µg/l ۱۰ 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 به‌دلیل 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: ----------

حامد پاک‌نژاد: hkolangi@gmail.com

علی‌اکبر هدایتی: marinebiology1@gmail.com

رقیه صفری: rsafari@gau.ac.ir

عباسعلی حاجی‌بگلو: alihajibeglou@gmail.com

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.

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_{450} enzymes of zebrafish (*Danio rerio*). Chemosphere, 77(3): 404-412.

Esmaeeli S. 2002. Pollutants, hygiene and standards in the environment. Naghsh 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 β-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, TiO2NPs 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

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2025-03-19]

[DOI: 10.22034/jair.10.2.71]

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_{450}1A and vitellogeningenesin 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 cyticrome P_{450} ic1 in the gills off 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 *Hetropneustes 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 Enviromental Science and Technology, 5 (1): 119-124.

Khajeh Gh.M., Mesbah M., Nikmehr S., Sabzevarizadehm 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.

Kulkarini 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-naphthoflavonetreated (Rainbow trout). Aquatic Toxicology, 80: 101-108.

Miandare H.K., Farahmand H., Akbarzadeh A., Ramezanpour, S., Kaiya, H., Miyazato, M., Rytkönen, 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. Lioyd (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.

Rissodefaverney 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., Gapta P.K. 2003. Alteration in the activities for three peptidases and lipase in the digestive system of the fish *Channa punctatus* exposed to lead nitate. 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 Toxicolog, 58: 456-462.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2025-03-19]

[DOI: 10.22034/jair.10.2.71]

Siroka Z., Drastichova J. 2004. Biochemical markers of Aquatic Environment contamination-Cytocherome P_{450} in fish. Areview. Actavet. Brno, 73: 123-132.

Sudagara M., Mohammadizarejabada 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 alternation 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., Hidalg 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 metalsin 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. Chemospher, 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:

برارزادآرایی ع.، پاک‌نژاد ح.، هدایتی ع.ا.، صقری ر.، حاجی‌بگلو ع. ۱۴۰۱. بررسی اثرات تحت‌کشنده کلریدسرب ($PbCl_2$) بر شاخص‌های خونی،آنزیم‌های کبدی و بیان ژن سیتوکروم P_{450} در ماهی کپورمعمولی (*Cyprinus Carpio*). نشریه پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی، ۱۰(۲): ۷۶-۶۴.
https://doi.org/10.22034/jair.10.2.71

Bararzad 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_{450} 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

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2025-03-19]

[DOI: 10.22034/jair.10.2.71]

Investigating the Sublethal Effects of Lead Chloride ($PbCl_2$) on Blood Indices, Liver Enzymes and Cytochrome P_{450} Gene Expression in Common Carp (*Cyprinus carpio*)

Bararzad E[1]., Paknejad H[2*]., Hedayati A[2]., Safari R[3]., Hajibaglou A[3].

[1] M.Sc. student, Dept. of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
[2] Associate Prof., Dept. of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
[3] 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

Abstract

The aim of this study was to investigate the sub-lethal effects of Lead Chloride (PbCl2) on blood indices, liver enzymes, cytochrome P_{450} gene expression in common carp. For this purpose, Fish with a mean weight of 7 33±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, whileThe 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_{450} 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 transaminasem lead Chloride toxin, P450 gene.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2025-03-19]

[DOI: 10.22034/jair.10.2.71]