

## اثر مس ( $\text{Cu}^{+2}$ ) بر تغییرات شاخص‌های خونی ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*) پرورشی

سمیه شکوهی<sup>۱\*</sup>، سورنا ابدالی<sup>۲</sup>، حسین نگارستان<sup>۳</sup>، ایوب یوسفی جوردی<sup>۴</sup>

۱-۲- گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

۳- گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

۴- موسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر، رشت

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۱/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۵/۱۸

### چکیده

در این تحقیق، به منظور بررسی سمیت حاد فلز سنگین مس بر شاخص‌های خونی ماهی فیتوفاگ، ۱۳۵ قطعه ماهی در مجاورت غلظت‌های ۰، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات مس ( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ) قرار گرفتند. نتایج نشان داد تعداد گلبول‌های سفید خون (WBC) با افزایش غلظت نیترات مس و با گذشت زمان به طور معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) کاهش یافت. تعداد گلبول‌های قرمز (RBC) اختلاف معنی‌داری نشان نداد ( $P > 0/05$ ). سطوح هموگلوبین خون با افزایش غلظت نیترات مس و با گذشت زمان به طور معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) کاهش یافت. میزان هماتوکریت، میانگین تغییرات حجم متوسط سلولی (MCV)، تغییرات سطوح متوسط هموگلوبین ذره‌ای (MCH) و میانگین تغییرات غلظت هموگلوبین ذره‌ای (MCHC) در تیمارهای مورد مطالعه با گذشت زمان کاهش معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) نشان داد. سطوح تری‌گلیسرید به طور معنی‌داری تغییر کرد، اما سطوح کلسترول معنی‌دار نبود ( $P > 0/05$ ). سطوح گلوکز پلاسمای خون با افزایش غلظت نیترات مس در زمان ۱۲ و ۲۴ ساعت اختلاف معنی‌داری داشت ( $P < 0/05$ ). سطوح پروتئین کل در زمان ۲۴ ساعت در تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) را نشان داد. نتایج شمارش افتراقی گلبول‌های سفید نشان داد تعداد لنفوسیت‌ها به طور معنی‌داری ( $P \geq 0/05$ ) کاهش یافت. تعداد نوتروفیل‌ها و منوسیت‌ها با گذشت زمان و با افزایش غلظت نیترات مس به طور معنی‌داری افزایش یافت ( $P < 0/05$ ). بر اساس نتایج حاصل، غلظت‌های تحت حاد نیترات مس تغییرات معنی‌داری بر بسیاری از شاخص‌های مورد مطالعه ایجاد کرد و سمیت شدیدی بر ماهی فیتوفاگ برجای گذاشت که با افزایش غلظت و زمان مجاورت تشدید گردید. بنابراین، می‌توان گفت این گونه مقاومت کمی در برابر غلظت‌های تحت حاد مس دارد.

واژگان کلیدی: مس، شاخص‌های خونی، *Hypophthalmichthys molitrix*

## مقدمه

فلزات سنگین از منابع کشاورزی، شهری و صنعتی به آب وارد شده و بدین طریق به ماهی و انسان منتقل می‌شوند. ماهیان شاخص‌های زیستی (بیومارکر) آسان و قابل اعتمادی از آلودگی مس در پیکره‌های آبی هستند. (Taylor et al., 2000; Lodhi et al., 2006). معمولاً، شاخص‌های بیوشیمیایی برای تشخیص اثر تحت‌کشنده مواد سمی مختلف از جمله فلزات سنگین در ماهیان بکار می‌روند (Theodorakis et al., 1992). اثر غلظت‌های تحت‌کشنده فلزات سنگین بر فرایند فیزیولوژیکی در ماهیان بخوبی مطالعه نشده است. ماهی فیتوفاگ با نام انگلیسی Silver carp و نام علمی *Hypophthalmichthys molitrix* یکی از مهم‌ترین گونه‌های ماهیان گرمابی می‌باشد که به واسطه رشد سریع، قابلیت سازگاری وسیع و گوشت لذیذ از گونه‌های غالب در ترکیب ماهیان گرمابی پرورشی به شمار می‌رود (نظری، ۱۳۷۵).

مس یکی از عناصر سنگین و سمی برای ماهی است، ولی ترکیبات آن در پرورش ماهی، برای از بین بردن جلبک‌ها و همچنین در پیشگیری و درمان برخی از بیماری‌های ماهیان، کاربرد دارد. اثر مس به صورت نیترات مس که به عنوان جلبک‌کش به کار برده می‌شود، بر آبشش‌ها تا ۳ برابر بیشتر از سایر فلزات سنگین گزارش شده است. با توجه به اینکه تغییرات غلظت فلزات سنگین در محیط‌های آبی، اثرات سوء زیستی قابل توجهی روی موجودات آبی به ویژه انواع ماهی‌ها دارد، تأثیر فلزات سنگین در حیات موجودات آبی بسیار حائز اهمیت است (امینی رنجبر، ۱۳۸۲). آلودگی آب با ترکیبات یا عناصر فلزات سنگین، منجر به مسمومیت خونی ماهیان و به دنبال آن تلفات مستقیم و یا مسمومیت مزمن و تغییرات مهم در فیزیولوژی ماهیان می‌شود که نتیجه آن عدم توانایی جانور برای ادامه حیات خواهد بود (جلالی و آقازاده، ۱۳۸۵). خون به عنوان یک شاخص مهم، نشان دهنده‌ی وضعیت فیزیولوژیک اندام‌های بدن است.

آنالیز پارامترهای هماتولوژی، سرولوژی و بیوشیمیایی خون در تشخیص بیماری‌های خونی، سم‌شناسی متابولیک و کنترل روند زیستی موجودات زنده از جمله آبیان کمک‌کننده می‌باشد (غلامیان، ۱۳۸۳). برخی از پارامترهای خونی به عنوان شاخص آلودگی فلزات در محیط آبی محسوب می‌شوند (Shah & Altindag, 2005). اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیک خون می‌تواند به عنوان یک ابزار تشخیصی در سم‌شناسی و پایش زیستی به کار رود. تغییر در میزان و سطوح این پارامترها می‌تواند منعکس‌کننده پاسخ‌های ماهیان به تغییرات در محیط زندگی آنها باشد (Satheeshkumar et al., 2010). از آنجا که اطلاعات کافی در مورد اثر فلز مس بر گونه فیتوفاگ پرورشی وجود ندارد و با توجه به اهمیت موضوع، این مطالعه با هدف بررسی اثرات فیزیولوژیکی فلز سنگین مس بر بافت‌های هدف و برخی فاکتورهای سیتولوژیکی، سرولوژیکی و بیوشیمیایی خون به انجام رسید.

## مواد و روش‌ها

به منظور انجام طرح مذکور ۱۳۵ قطعه ماهی فیتوفاگ پرورشی با میانگین وزن  $52/6 \pm 8/1$  گرم و طول  $17/2 \pm 2$  سانتی‌متر انتخاب شدند. در مجموع ۳ گروه، شامل گروه شاهد و تیمارهای با غلظت ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات مس و هر گروه با سه تکرار در نظر گرفته شد. تعداد ۱۵ قطعه ماهی پس از سازگاری با محیط، بر اساس تیمارهای مورد نظر در ۹ آکواریوم ۱۰۰ لیتری حاوی ۹۰ لیتر آب چاه (بدون خروجی و مجهز به هوادهی) در آکواریوم‌ها رهاسازی شدند و ۲۴ ساعت زیر نظر گرفته شدند. میانگین دمای آب  $24 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد، میانگین اکسیژن محلول  $5/2 \pm 0/8$ ، میانگین شوری آب  $1 \pm 0/02$  در هزار و میانگین pH معادل  $8 \pm 0/2$  تنظیم گردید. به منظور تهیه غلظت‌های مورد نظر، ابتدا محلول استوک ۴ گرم در لیتر فلز مس تهیه شد، سپس حجم معینی

### آنالیز آماری

آنالیز آماری، داده‌ها با استفاده از برنامه آماری SPSS14.0 تحت ویندوز و به روش آنالیز واریانس یک طرفه (One - way ANOVA) در سطح ۵ درصد اطمینان انجام شد و نتایج به صورت خطای استاندارد  $\pm$  میانگین ارائه گردید.

### نتایج

#### نتایج تغییرات شاخص‌های سیتولوژیک خون

تعداد گلبول‌های سفید خون (WBC) با افزایش غلظت نیترات مس و با گذشت زمان بطور معنی داری ( $P < 0.05$ ) کاهش یافت و کمترین میزان آن ( $500 \pm$ ) در مجاورت با غلظت ۵ میلی گرم در لیتر مشاهده گردید. گلبول‌های قرمز خون ماهیان در مجاورت غلظت‌های مختلف نیترات مس با افزایش غلظت و زمان مجاورت سیر نزولی داشت، ولی اختلاف معنی داری مشاهده نشد ( $P \geq 0.05$ ). کمترین تعداد گلبول‌های قرمز ( $150000 \pm 161000$  عدد در هر میلی متر مکعب خون) در تیمار با غلظت ۵ میلی گرم در لیتر نیترات مس در زمان ۲۴ ساعت مشاهده گردید. میزان هموگلوبین خون با افزایش غلظت نیترات مس و با گذشت زمان به طور معنی داری ( $P < 0.05$ ) کاهش یافت و کمترین میزان آن ( $4/8 \pm 0/2$ ) گرم در دسی لیتر) در تیمار با غلظت ۵ میلی گرم در لیتر در زمان ۲۴ ساعت به دست آمد. میزان هماتوکریت خون با افزایش غلظت نیترات مس و با زمان افزایش یافت و بین تیمار با غلظت ۵ میلی گرم در لیتر با گروه شاهد در زمان ۲۴ ساعت اختلاف معنی دار ( $P < 0.05$ ) مشاهده گردید، به طوری که کمترین آن ( $28 \pm 3/1$ ) درصد) در گروه شاهد و بیشترین ( $36 \pm 4$ ) درصد) در تیمار با غلظت ۵ میلی گرم در لیتر در زمان ۲۴ ساعت ارزیابی گردید. میانگین تغییرات حجم متوسط سلولی با افزایش غلظت سم در زمان‌های مختلف بدون اختلاف معنی دار ( $P \geq 0.05$ ) بود. میانگین تغییرات

از محلول ذخیره (۱۱۱ سی سی برای غلظت ۵ میلی گرم در لیتر و ۲۲۲ سی سی برای غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر) به اکواریوم‌ها معرفی شد.

#### نمونه‌گیری از خون

نمونه برداری از ماهیان ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از مجاورت با فلز انجام شد. خون‌گیری با استفاده از سرنگ‌های ۲ میلی‌لیتری، از ناحیه سیاهرگ دمی (caudal vein) و از پشت باله مخرجی انجام شد و در هر مرحله ۲ میلی‌لیتر خون از ماهیان گرفته شد. اندازه‌گیری شاخص‌های سیتولوژیک خون از قبیل شمارش گلبول‌های سفید و قرمز با استفاده از لام نئوبار و با محلول رنگی رقیق کننده ریکس به ترتیب با رقت یک بیستم و یک دویستم انجام شد. از نمونه‌های خونی گسترش تهیه گردید و با رنگ گیمسای ۱۰ درصد به مدت ۳۰ دقیقه رنگ آمیزی شدند و با استفاده از میکروسکوپ نوری شمارش افتراقی لکوسیت‌ها صورت گرفت. میزان هماتوکریت به روش میکروهماتوکریت و سطوح هموگلوبین با استفاده از کیت پارس آزمون و با طول موج ۵۴۶ نانومتر به روش اسپکتروفوتومتری اندازه‌گیری شد. جدا سازی پلاسما از خون توسط سانتریفوژ (مدل ۲۰۰ Labofuge ساخت شرکت Heraeus Sepatech، ساخت کشور آلمان) به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور انجام گرفت. سپس با استفاده از میکروسمپلر، پلاسما به اپندورف‌های شماره‌گذاری شده و با مشخصات کامل منتقل و تا زمان سنجش پارامترهای مورد نظر در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  - نگهداری شدند (Pottinger & Carrick, 2001). میزان گلوکز به صورت آنزیمی و کالریمتریک با روش فتومتریک با طول موج ۵۴۶ نانومتر و غلظت کلسترول، تری گلیسرید، پروتئین کل و آلبومین با دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل UV/VIS - ۶۵۰۵، شرکت Jenway، ساخت انگلیس) و بکارگیری کیت پارس آزمون (ساخت ایران) با طول موج ۵۴۰ نانومتر و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد.

غلظت هموگلوبین ذره‌ای در تیمارهای مورد مطالعه در زمان ۱۲ ساعت اختلاف معنی‌داری ( $P \geq 0.05$ ) نشان نداد. در حالی که در زمان ۲۴ ساعت بین غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر و تیمار شاهد کاهش معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) وجود داشت. تغییرات میانگین هموگلوبین ذره‌ای در زمان ۱۲ ساعت بین تیمارها اختلاف معنی‌داری ( $P \geq 0.05$ ) نشان نداد. در حالی که تیمار با غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر در زمان ۲۴ ساعت کاهش معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) نسبت به تیمار شاهد نشان داد (جدول ۱).

جدول ۱- میانگین تغییرات شاخص‌های سیتولوژیک خون در غلظت‌های مختلف نیترات مس در زمان‌های مختلف

شاخص	زمان مجاورت			۱۲ ساعت			۲۴ ساعت		
	غلظت (mg/lit)	۰	۵	۱۰	۰	۵	۱۰	۰	۵
گلبول سفید (n/mm <sup>3</sup> )	۱۸۰۰۰ ± ۵۱۶ <sup>b</sup>	۱۶۶۶۶ ± ۱۹۶ <sup>a</sup>	۱۴۱۶۶ ± ۵۹۶۰ <sup>a</sup>	۱۷۵۰۰ ± ۱۶۰۷ <sup>b</sup>	۷۰۰۰ ± ۵۰۰ <sup>a</sup>	۱۲۲۵۴۲ ± ۱۱۰۲۰۱	۱۱۳۱۷۳ ± ۱۱۰۲۰۱	۱۶۱۰۰۰۰ ± ۱۵۰۰۰۰	۱۵۷/۱ ± ۲۰ <sup>a</sup>
گلبول قرمز (n/mm <sup>3</sup> )	۲۰۰۰۰۰۰ <sup>a</sup>	۱۸۹۰۰۰۰ <sup>a</sup>	۱۸۰۰۰۰۰ <sup>a</sup>	۱۹۹۰۰۰۰ <sup>a</sup>	۱۶۱۰۰۰۰ <sup>a</sup>	۳۲/۶ ± ۲/۴ <sup>a</sup>	۳۲ ± ۳/۴ <sup>a</sup>	۳۶ ± ۴ <sup>b</sup>	۱۵۷/۱ ± ۲۰ <sup>a</sup>
هموگلوبین (gr/dl)	۸/۷ ± ۰/۸ <sup>b</sup>	۷/۴ ± ۰/۹ <sup>a</sup>	۷ ± ۰/۱ <sup>a</sup>	۸/۷ ± ۰/۵ <sup>b</sup>	۴/۸ ± ۰/۲ <sup>a</sup>	۱۸۲/۳ ± ۱۳/۲ <sup>a</sup>	۱۷۰ ± ۱۵ <sup>a</sup>	۲۸ ± ۳/۲ <sup>a</sup>	۱۵۷/۱ ± ۲۰ <sup>a</sup>
هماتوکریت (/)	۲۸ ± ۳/۲ <sup>a</sup>	۳۲ ± ۳/۴ <sup>a</sup>	۳۲/۶ ± ۲/۴ <sup>a</sup>	۲۸ ± ۴/۹ <sup>a</sup>	۳۶ ± ۴ <sup>b</sup>	۲۵/۳ ± ۳/۲ <sup>b</sup>	۲۴/۹ ± ۱/۱ <sup>a</sup>	۲۵/۳ ± ۳/۲ <sup>b</sup>	۱۵۷/۱ ± ۲۰ <sup>a</sup>
MCV	۱۸۲/۳ ± ۱۳/۲ <sup>a</sup>	۱۷۰ ± ۱۵ <sup>a</sup>	۱۹۰ ± ۲۱/۶ <sup>a</sup>	۱۸۲ ± ۱۴/۹ <sup>a</sup>	۱۵۷/۱ ± ۲۰ <sup>a</sup>	۲۴/۹ ± ۱/۱ <sup>a</sup>	۲۴/۹ ± ۱/۱ <sup>a</sup>	۲۵/۳ ± ۳/۲ <sup>b</sup>	۱۵۷/۱ ± ۲۰ <sup>a</sup>
MCHC	۲۵/۳ ± ۳/۲ <sup>a</sup>	۲۶/۵ ± ۰/۸ <sup>a</sup>	۲۴/۹ ± ۱/۱ <sup>a</sup>	۲۵/۳ ± ۳/۲ <sup>b</sup>	۱۵۷/۱ ± ۲۰ <sup>a</sup>	۲۴/۹ ± ۱/۱ <sup>a</sup>	۲۴/۹ ± ۱/۱ <sup>a</sup>	۲۵/۳ ± ۳/۲ <sup>b</sup>	۱۵۷/۱ ± ۲۰ <sup>a</sup>
MCH	۴۷ ± ۹/۹ <sup>a</sup>	۵۰/۵ ± ۴/۴ <sup>a</sup>	۵۲/۲ ± ۳ <sup>a</sup>	۴۶/۵ ± ۹/۸ <sup>b</sup>	۳۰/۴ ± ۳/۴ <sup>a</sup>	۴۶/۵ ± ۹/۸ <sup>b</sup>	۵۲/۲ ± ۳ <sup>a</sup>	۴۶/۵ ± ۹/۸ <sup>b</sup>	۳۰/۴ ± ۳/۴ <sup>a</sup>

\*همه ماهیان در مجاورت غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر تا ساعت ۲۴ تلف شدند. a,b: حروف متفاوت نشانه اختلاف معنی‌دار در زمان ۱۲ ساعت است. a,b: حروف متفاوت نشانه اختلاف معنی‌دار در زمان ۲۴ ساعت است.

خون و آلبومین در غلظت‌های مختلف در ۱۲ و ۲۴ ساعت نمایش داده شده است.

نتایج تغییرات شاخص‌های بیوشیمیایی در جدول (۲) نتایج میزان شاخص‌های بیوشیمیایی خون شامل تری‌گلیسیرید، کلسترول، گلوکز، پروتئین

جدول ۲- میانگین تغییرات شاخص‌های بیوشیمیایی خون در غلظت‌های مختلف نیترات مس در زمان‌های مختلف

شاخص	زمان مجاورت			۱۲ ساعت			۲۴ ساعت		
	غلظت (mg/lit)	۰	۵	۱۰	۰	۵	۱۰	۰	۵
تری‌گلیسیرید (mg/dl)	۱۳۵ ± ۵ <sup>a</sup>	۱۳۴/۲ ± ۱۹ <sup>a</sup>	۱۳۵/۷ ± ۱۶/۴ <sup>a</sup>	۱۳۴/۵ ± ۵ <sup>b</sup>	۲۰/۶ ± ۷ <sup>a</sup>	۱۲۵/۳ ± ۱۴/۹ <sup>a</sup>	۱۲۲ ± ۱۲ <sup>a</sup>	۱۲۴ ± ۹/۱ <sup>a</sup>	۱۱۳ ± ۱۵۰۰۰۰ <sup>a</sup>
کلسترول (mg/dl)	۸۷/۶ ± ۵/۲ <sup>c</sup>	۵۲/۱ ± ۴/۵ <sup>b</sup>	۳۴/۹ ± ۳/۴ <sup>a</sup>	۸۸ ± ۷/۲ <sup>b</sup>	۶۴/۷ ± ۹/۶ <sup>a</sup>	۱۲۵/۳ ± ۱۴/۹ <sup>a</sup>	۱۲۲ ± ۱۲ <sup>a</sup>	۱۲۴ ± ۹/۱ <sup>a</sup>	۱۱۳ ± ۱۵۰۰۰۰ <sup>a</sup>
گلوکز (mg/dl)	۳/۴ ± ۰/۲ <sup>a</sup>	۴/۲ ± ۰/۵ <sup>a</sup>	۴/۱ ± ۰/۱ <sup>a</sup>	۳/۴ ± ۰/۱ <sup>b</sup>	۰/۵ ± ۰/۲ <sup>a</sup>	۱۲۵/۳ ± ۱۴/۹ <sup>a</sup>	۱۲۲ ± ۱۲ <sup>a</sup>	۱۲۴ ± ۹/۱ <sup>a</sup>	۱۱۳ ± ۱۵۰۰۰۰ <sup>a</sup>
پروتئین کل (mg/dl)	۴/۸ ± ۰/۲ <sup>b</sup>	۲/۶ ± ۰/۲ <sup>a</sup>	۲ ± ۰/۱ <sup>a</sup>	۴/۸ ± ۰/۱ <sup>a</sup>	۵/۹ ± ۰/۱ <sup>b</sup>	۱۲۵/۳ ± ۱۴/۹ <sup>a</sup>	۱۲۲ ± ۱۲ <sup>a</sup>	۱۲۴ ± ۹/۱ <sup>a</sup>	۱۱۳ ± ۱۵۰۰۰۰ <sup>a</sup>
آلبومین (mg/dl)	۴/۸ ± ۰/۲ <sup>b</sup>	۲/۶ ± ۰/۲ <sup>a</sup>	۲ ± ۰/۱ <sup>a</sup>	۴/۸ ± ۰/۱ <sup>a</sup>	۵/۹ ± ۰/۱ <sup>b</sup>	۱۲۵/۳ ± ۱۴/۹ <sup>a</sup>	۱۲۲ ± ۱۲ <sup>a</sup>	۱۲۴ ± ۹/۱ <sup>a</sup>	۱۱۳ ± ۱۵۰۰۰۰ <sup>a</sup>

\*همه ماهیان در مجاورت غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر تا ساعت ۲۴ تلف شدند. a,b,c: حروف متفاوت نشانه اختلاف معنی‌دار در زمان ۱۲ ساعت است. a,b: حروف متفاوت نشانه اختلاف معنی‌دار در زمان ۲۴ ساعت است.

افزایش غلظت نیترات مس به طور معنی‌داری کاهش ( $P < 0.05$ ) یافت. به طوری که بیشترین میزان لنفوسیت‌ها ( $91 \pm 1/2$  درصد) مربوط به گروه شاهد و کمترین ( $68 \pm 6/6$  درصد) میزان آن مربوط به بالاترین غلظت نیترات مس (۱۰ میلی گرم در لیتر) در زمان ۱۲ ساعت بود (جدول ۳).

همان گونه که جدول (۲) نشان می‌دهد میزان تری گلیسیرید، پروتئین کل و کلسترول در ۱۲ ساعت اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نداشت در حالی که میزان گلوکز و آلبومین خون تیمارها با گروه شاهد در ۱۲ ساعت اختلاف معنی‌داری نمایش می‌دهد.

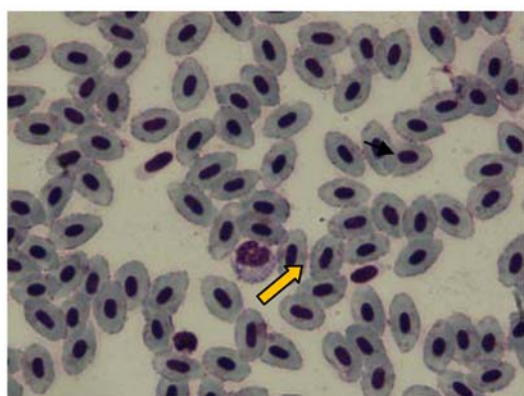
نتایج حاصل از بررسی لکوسیت‌های خون  
تعداد لنفوسیت‌های خون ماهیان با گذشت زمان و

جدول ۳- میانگین تغییرات تعداد لکوسیت‌های خون در غلظت‌های مختلف نیترات مس در زمان‌های مختلف

شاخص	زمان مجاورت			۱۲ ساعت			۲۴ ساعت		
	غلظت (mg/lit)								
	۰	۵	۱۰	۰	۵	۱۰	۰	۵	۱۰
لنفوسیت (%)	$91 \pm 3^b$	$85/3 \pm 6/2^b$	$67/6 \pm 6/6^a$	$90 \pm 2^a$	$84/3 \pm 6^a$	$67/6 \pm 6/6^a$	$90 \pm 2^a$	$84/3 \pm 6^a$	$67/6 \pm 6/6^a$
نوتروفیل (%)	$5/3 \pm 1/8^a$	$11 \pm 1^b$	$26/6 \pm 2^c$	$5/3 \pm 1^a$	$13 \pm 1^b$	$26/6 \pm 2^c$	$5/3 \pm 1^a$	$13 \pm 1^b$	$26/6 \pm 2^c$
مونوسیت (%)	$3/6 \pm 0/2^c$	$3/6 \pm 0/4^b$	$4/3 \pm 0/6^a$	$3/6 \pm 0/3^b$	$2 \pm 0/6^a$	$4/3 \pm 0/6^a$	$3/6 \pm 0/3^b$	$2 \pm 0/6^a$	$4/3 \pm 0/6^a$

\*همه ماهیان در مجاورت غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر تا ساعت ۲۴ تلف شدند. a,b,c: حروف متفاوت نشانه اختلاف معنی‌دار در زمان ۱۲ ساعت است. a,b: حروف متفاوت نشانه اختلاف معنی‌دار در زمان ۲۴ ساعت است.

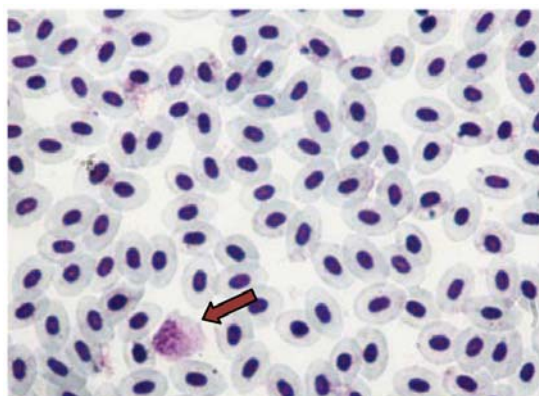
سفید (لنفوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها، مونوسیت‌ها و منوسیت‌ها) در مقایسه با گروه شاهد مشاهده گردید (شکل‌های ۱ الی ۷).



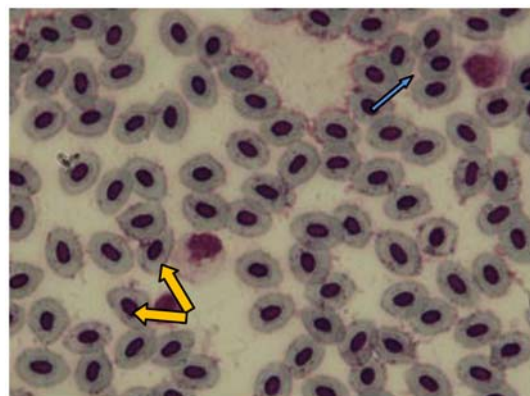
شکل ۱- وضعیت گلبول‌های قرمز (فلش کوچک) و نوتروفیل (فلش قطور) در گروه شاهد ( $20 \times$ , H&E)

جدول (۳) نشان می‌دهد که تعداد نوتروفیل‌های خون ماهیان با گذشت زمان و با افزایش غلظت نیترات مس به طور معنی‌داری افزایش یافته است ( $P < 0.05$ ). در حالی که تعداد مونوسیت‌های خون ماهیان با افزایش غلظت نیترات مس در زمان ۱۲ ساعت افزایش معنی‌داری نداشت ( $P < 0.05$ ).

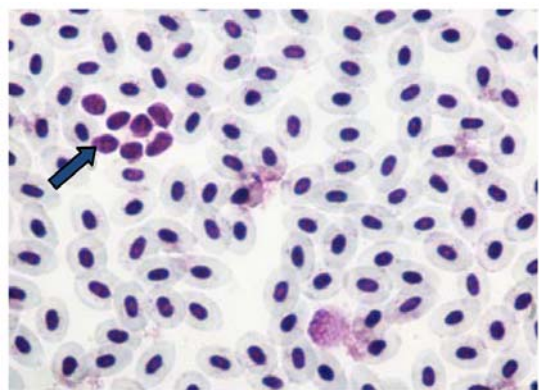
نتایج اثر مس بر شکل گلبول‌های قرمز و لکوسیت‌ها گلبول‌های قرمز (اریتروسیت‌ها) ماهی فیتوفاگ، بیضی شکل دارای سیتوپلاسم اسیدوفیلیک و هسته‌های کشیده با کروماتین تقریباً همولوگ در مرکز آن بودند (شکل ۱). بر اساس نتایج گلبول‌های قرمز ماهیانی که در مجاورت مس قرار گرفته بودند، به صورت کروی تغییر شکل داده و هسته‌های کوچکتری داشتند (شکل ۲). در تیمارهای مختلف و در مجاورت غلظت‌های مختلف نیترات مس عوارضی از قبیل تورم و اشکی شدن گلبول‌های قرمز، دژنره شدن گلبول‌های



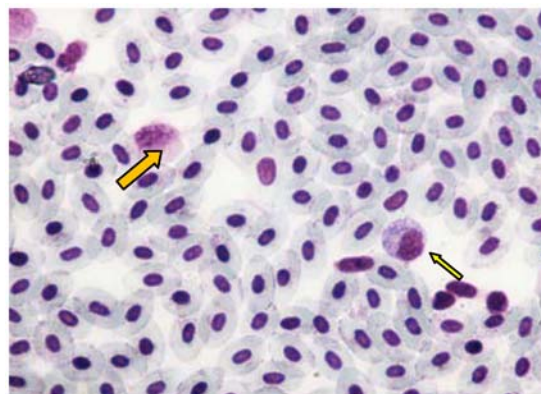
شکل ۵- آسیب نوتروفیل (فلش) در مجاورت ۱۰ میلی گرم در لیتر نیترات مس (۱۲ ساعت) (۲۰X, H&E)



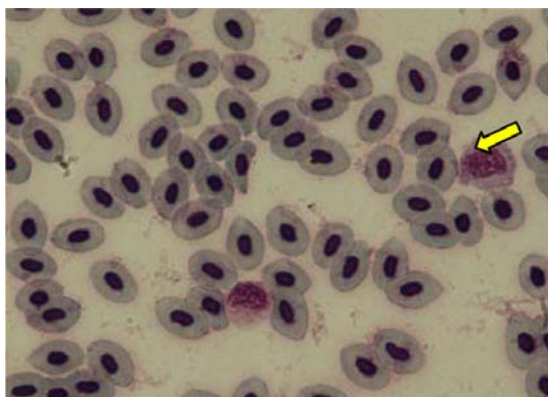
شکل ۲- تورم و تغییر شکل گلبول‌های سفید (فلش قطور) و قرمز (فلش کوچک) در مجاورت ۵ میلی گرم در لیتر نیترات مس پس از ۱۲ ساعت (۲۰X, H&E)



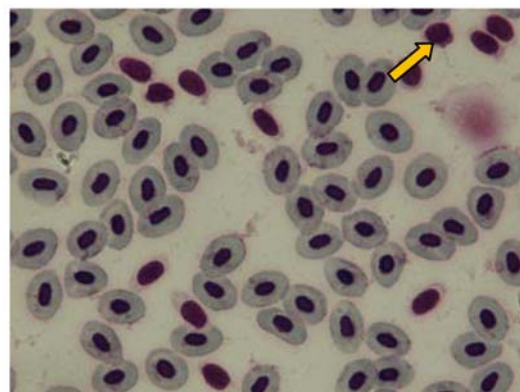
شکل ۶- تجمع لنفوسیت‌ها (فلش) در مجاورت ۱۰ میلی گرم در لیتر نیترات مس (۱۲ ساعت) (۲۰X, H&E)



شکل ۳- وضعیت نوتروفیل (فلش قطور) و نوتروفیل (فلش نازک) در مجاورت غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر نیترات مس پس از ۱۲ ساعت (۲۰X, H&E)



شکل ۷- مونوسیت (فلش) در غلظت ۵ میلی گرم در لیتر نیترات مس پس از ۱۲ ساعت (۲۰X, H&E)



شکل ۴- ترومبوسیت‌ها (فلش) در مجاورت ۵ میلی گرم در لیتر نیترات مس پس از ۱۲ ساعت (۲۰X, H&E)

### بحث و نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که میزان هموگلوبین (Hb) با افزایش غلظت مس و با گذشت زمان به طور معنی داری کاهش، ولی درصد هماتوکریت (Hct) افزایش یافت. در حالی که تعداد گلبول‌های قرمز (RBC) تغییر معنی داری نشان نداد. تعداد گلبول‌های سفید (WBC)، میانگین غلظت هموگلوبین ذره‌ای (MCHC) و میانگین هموگلوبین ذره‌ای (MCH) به طور معنی داری از ساعت صفر تا ۲۴ کاهش یافت ( $P < 0.05$ ). نتایج شمارش افتراقی لکوسیت‌ها نشان داد که با افزایش غلظت مس و با گذشت زمان، تعداد لنفوسیت‌ها کاهش و تعداد نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها افزایش یافت ( $P < 0.05$ ). با توجه به نتایج اثر سمیت مس بر ماهی فیتوپاگ از طریق تغییرات پاتولوژیکی در خون و بافت ناشی از القای نوعی آنمی بود. Serezli و Delihasan (۲۰۱۱)، اثرات حاد مس و سرب بر برخی پارامترهای خونی در گونه (*Salmo coruhensis*) را طی یک دوره مجاورت کوتاه مدت در برابر غلظت‌های بالای ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر مورد مطالعه قرار دادند و دریافتند که تعداد لکوسیت‌ها و اریتروسیت‌ها پس از مجاورت با غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر، ابتدا کاهش و پس از ۴۸ ساعت تعداد اریتروسیت‌ها به حالت اولیه بازگشت. در حالی که تعداد لکوسیت‌ها در مجاورت مس افزایش یافت و اثر مس باعث افزایش سطوح هموگلوبین و هماتوکریت گردید. Mazon و همکاران (۲۰۰۲)، اثر سمیت حاد مس بر گونه *Prochilodus scrofa* را بررسی نموده و افزایش معنی دار در میزان هماتوکریت و گلبول‌های قرمز را گزارش دادند. در تحقیق حاضر، افزایش گلبول‌های قرمز به دلیل افزایش میزان هموگلوبین کل، فقط در ماهیانی که در معرض غلظت‌های بالای مس قرار گرفته بودند، دیده شد (جدول ۱).

مطابق نتایج پژوهش حاضر، افزایش در میزان هماتوکریت توسط Schjolden و همکاران (۲۰۰۷) در *Carassius crassius* نیز مشاهده گردید. Singh و

همکاران (۲۰۰۸)، اثر مس بر پروفیل خون خامه ماهی (*Channa punctatus*) آب شیرین را مورد مطالعه قرار دادند و دریافتند که میزان هموگلوبین (Hb)، هماتوکریت (PCV) و تعداد گلبول‌های قرمز (RBC) در پایان دوره ۴۵ روز به طور معنی داری در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافته بود، در حالی که تعداد گلبول‌های سفید (WBC) افزایش داشت. Georgieva و همکاران (۲۰۱۰)، اثرات کلینیکی، هماتولوژیکی و مورفولوژیکی سمیت مس در ماهی کاراس (*Carassius gibelio*) را مورد مطالعه قرار دادند و دریافتند که با افزایش غلظت مس از ۰ به ۲ میلی گرم در لیتر میزان هماتوکریت، MCV، MCH و MCHC تغییرات معنی داری را نشان داد. پارامترهای میانگین حجم یاخته قرمز (MCV)، میانگین هموگلوبین یاخته قرمز (MCH) و میانگین غلظت هموگلوبین خون (MCHC) عوامل وابسته به تعداد یاخته‌های قرمز، درصد هماتوکریت و غلظت هموگلوبین خون بوده، تابع تغییرات آنها هستند. وضعیت تغذیه‌ای، سن و شرایط محیطی، فاکتورهای اصلی پاسخگویی به تغییرات شاخص‌های یاخته‌های خونی در ماهیان است (Tavares-Dias & Moraes, 2007). مشابه نتایج تحقیق حاضر، Witeska (۲۰۰۵)، در مطالعه اثرات هماتولوژیکی و ایمونولوژیکی فلزات سنگین بر ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، با قرار دادن ماهیان در مجاورت ۵ میلی گرم در لیتر فلز سنگین مس به مدت ۹۶ ساعت دریافتند که ماهیان دچار استرس شده و درصد هماتوکریت آن‌ها بدون ایجاد تغییرات معنی دار در تعداد گلبول‌های قرمز افزایش یافت که به دلیل بادکردگی و تغییر شکل گلبول‌های قرمز از حالت بیضوی به کروی و بروز پدیده اریتروپویتیک ناشی از افزایش تعداد گلبول‌های قرمز نابالغ بود. درصد هماتوکریت و پارامترهای وابسته به آنها عمومی‌ترین شاخص‌های خون شناسی جهت تشخیص کم خونی در ماهیان هستند که به تغذیه، سن (Tavares-Dias & Moraes, 2007) و بیماری وابسته می‌باشد. غلظت



شود (De Pedro *et al.*, 2005). پروتئین، چربی و کربوهیدرات از منابع اصلی تأمین انرژی در ماهیان هستند. بنابراین تغییر و نوسان در میزان پروتئین، کلسترول و تری گلیسرید می‌تواند در ارتباط به مصرف آنها برای تأمین انرژی لازم برای انجام فعالیت‌های حیاتی بدن باشد (Emad *et al.*, 2005). در تحقیق حاضر، میزان تری گلیسرید در تیمار ۵ میلی گرم در لیتر در زمان ۲۴ ساعت در مقایسه با گروه شاهد به شدت کاهش یافت و اختلاف معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) نشان داد، این کاهش می‌تواند به دلیل مصرف بالای آن برای تأمین انرژی به منظور مقابله با استرس ناشی از سمیت فلز مس باشد. میزان کلسترول اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد نداشت ( $P \geq 0.05$ ). کلسترول ماده پیش ساخت هورمون‌های استروئیدی است که غلظت آن در خون تحت شرایط استرس، افزایش می‌یابد و ممکن است فراهم کننده افزایش ساخت هورمون کورتیزول باشد (Hoseini & Ghelichpour, 2011). سطوح غلظت تری گلیسرید و کلسترول به عنوان شاخص‌های اصلی وضعیت سلامت ماهیان استخوانی عالی مطرح می‌باشد (Gul *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2009)، بطوری که تغییر در غلظت کلسترول بیانگر سوخت و ساز در کبد است. افزایش بیش از حد کلسترول بیانگر بی نظمی سوخت و ساز چربی و لیپوپروتئین بویژه تخریب کارایی فیزیولوژیک کبد است (Gul *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2009). مقدار گلوکز سرم خون شاخص مناسبی برای پاسخ‌های ثانویه استرسی ماهی به شرایط نامناسب محیطی (Yousefi *et al.*, 2011) است. در تحقیق حاضر، میزان گلوکز پلاسمای خون با افزایش غلظت نیترات مس در زمان ۱۲ و ۲۴ ساعت بطور معنی داری کاهش یافت ( $P < 0.05$ ) (جدول ۲). مقدار گلوکز خون بسته به گونه ماهی در محدوده ۳۵۰-۳۵ میلی گرم در دسی لیتر (Ahmadifar *et al.*, 2010) متغیر می‌باشد. گلوکز اصلی‌ترین ماده حاصل از سوخت و ساز مواد کربوهیدراتی می‌باشد (Zhou *et al.*, 2009) که

هموگلوبین خون ماهیان بهترین شاخص تغییرات محیطی است (Bani & Haghi Vayghan, 20011) و معمولاً در محدوده ۱۰ - ۵ گرم در دسی لیتر قرار دارد. در تحقیق حاضر، تعداد گلبول‌های سفید خون بطور معنی داری کاهش یافت که ناشی از کاهش تعداد لنفوسیت‌ها بود و درصد نوتروفیل‌ها افزایش یافته بود. افزایش تعداد گلبول‌های قرمز به منظور آماده کردن ماهی جهت تأمین انرژی افزوده مورد نیاز جهت مقابله با استرس ناشی از مجاورت با فلز سنگین مس می‌باشد. در حالیکه تغییرات مشاهده شده در گلبول‌های سفید بیانگر اثر سرکوب کنندگی ایمنی توسط استرس القائی ناشی از فلز سنگین است (Witeska, 2005). رها سازی نوتروفیل‌ها به خون سبب بروز بیماری نوتروفیلیا (Neutrophilia) می‌شود و به عنوان پاسخ ایمنی غیر اختصاصی به انواع عوامل استرس زا محسوب می‌شود (Singh *et al.*, 2008). درصد این سلول‌ها معمولاً در سمیت‌های حاد مس کاهش می‌یابد (Nussey *et al.*, 1995; Svobodova *et al.*, 1994) و گزارش شده است که در سمیت‌های مزمن افزایش می‌یابد. یاخته‌های لنفوسیت با تولید آنتی بادی‌های ویژه و افزایش آن در ماکروفاژها سیستم دفاعی و ایمنی بدن ماهی را در برابر شرایط نامساعد و بد محیطی ارتقاء می‌بخشند (Mikryakov *et al.*, 2014). Gail و همکاران (۱۹۹۹)، در مطالعه اثر مس بر پارامترهای سیستم ایمنی ماهی قزل آلی رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*) دریافتند که هر نوع سلول لکوسیت در شمارش افتراقی پاسخ مختص به خود را در مجاورت مس نشان می‌دهد. به طوریکه تعداد لنفوسیت‌ها در همه غلظت‌ها کاهش یافت در حالیکه نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها در همه غلظت‌ها افزایش یافتند. اثر منفی فلزات سنگین بر ماهیان به اختلال ایجاد شده در فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی آنها مربوط می‌شود (Viella *et al.*, 1999). بیوشیمی پلاسمای خون ماهی می‌تواند در تشخیص وضعیت سلامت ماهی استفاده



- Mohammadi Zarejabad, A. 2010. Effects of different dietary prebiotic inulin levels on blood serum enzymes, hematologic, and biochemical parameters of great sturgeon (*Huso huso*) juveniles. *Comparative Clinical Pathology*, 20(5):447-451.
- Bani, A. & Haghi Vayghan, A. 2011. Temporal variations in haematological and biochemical indices of the Caspian kutum, *Rutilus frisii kutum*. *Ichthyology Research*, 58 (2), 126-133.
- De Pedro, N., Guijarro, A.E., Lopez – Patino, M.A., Marinez – Alvarez, R. & Delgado Daily, M. 2005. Seasonal variation in hematological and blood biochemical parameters in Tench (*Tinca tinca*). *Aquatic Research*, 36: 185 – 196.
- Dick, P.T. & D.G. Dixon. 1985. Changes in circulating blood cell levels of rainbow trout, *Salmo gardener* Richardson, following acute and chronic exposure to copper. *Journal of Fish Biology*, 26: 475-480.
- Emad, H., Abou, E-N., Khalid, M., Moselhy, E. & Mohamed, A.H. 2005. Toxicity of cadmium and cooper and their effect on some biochemical parameters of marine fish *Mugil seheli*. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 31: 60-71.
- Gail M. D., Daniel, S., Jonathan T. H. & Howard, C. B. 1999. Alterations in physiological parameters of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with exposure to copper and copper/zinc mixtures. *Journal of ecotoxicology and environmental safety*, 42: 253–264.
- Georgieva, E., Arnaudov, A. and Velcheva, I. 2010. Clinical, hematological and morphological studies on ex- siyu induced copper intoxication in Crucian carp (*Carassius gibello*). *Journal of Central European Agriculture*, 11:165-172).
- Gopal, V., Parvathy, S. & Balasubra, P. R. 1997. Effect of heavy metals on the blood protein biochemistry of the fish *Cyprinus carpio* and its use as a bio - indicator of pollution stress. *Environmental Monitoring and Assessment*, 48: 117–124.
- Gul, Y., Gao, Z. X., Qian, X.Q. & Wang, W. M. 2011. Hematological and serum biochemical characterization and comparison of wild and cultured northern snakehead (*Channa argus* Cantor, 1842). *Journal of Applied Ichthyology*, 27: 122–128.
- تغییرات روزانه آن با تغییرات هورمون‌های کورتیزول و تیروئید در ارتباط است. میزان پروتئین کل در زمان ۲۴ ساعت در تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) را نشان داد و به کمترین میزان رسید. سطوح آلبومین پلاسماي خون در زمان ۱۲ و ۲۴ ساعت نوسانات معنی‌داری نشان داد ( $P < 0.05$ ). Gopal و همکاران (۱۹۹۷)، اثر فلزات سنگین بر بیوشیمی پروتئین خون ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) را به عنوان یک شاخص زیستی استرس‌زا مورد مطالعه قرار دادند و دریافتند که سطوح پروتئین کل و گلوبولین سرم خون ماهیان از ساعت ۲ تا ۲۰ افزایش و سپس تا ساعت ۷۲ کاهش یافت. آن‌ها دریافتند که هم غلظت‌های کشنده و تحت کشنده فلزات سنگین روند مشابهی دارند و نشان دادند که اندازه گیری غلظت پروتئین و آلبومین به عنوان یک شاخص پاسخ به عوامل استرس‌زای محیطی مطرح می‌باشد. Emad و همکاران (۲۰۰۵)، سمیت مس و اثرات آن بر برخی از پارامترهای بیوشیمیایی ماهی انگشت قد کفال دریایی *Mugil seheli* را مورد بررسی قرار دادند و بیان داشتند که سطح گلوکز پس از ۴ روز در مجاورت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر مس با گذشت زمان افزایش یافت و پس از ۴ روز به بالاترین سطح خود رسید. همچنین میزان توتال پروتئین و تری گلیسرید و کلسترل پلاسما نسبت به شاهد افزایش یافت.

## منابع

- امینی رنجبر، ن. ۱۳۸۲. حذف بیولوژی فلزات سنگین کروم و روی توسط سرخس آزولا. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال.
- جلالی، ب. و آقازاده، م. ۱۳۸۵. مسمومیت ماهیان در اثر فلزات سنگین و اهمیت آن در بهداشت عمومی. انتشارات مان کتاب ایران.
- نظری، ر. ۱۳۷۵. بررسی کاربرد هورمونهای غده هیپوفیز ماهی اسبله در تکثیر کپور ماهیان. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران.
- Ahmadifar, A., Akrami, R., Ghelichi, A. &

- Sciences*, 29: 1163 – 1168.
- Singh, D., Nath, K., Trivedi, S.P. & Sharma, Y.K. 2008. Impact of copper on haematological profile of freshwater fish, *Channa punctatus*. *Journal of Environmental Biology*, 29: 253-257.
- Svobodova, Z., Vykusova, B. & Machova, J. 1994. The effects of pollutants on selected haematological and biochemical parameters in fish. In: R. Müller & R. Lloyd (eds.), *Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish*. Fishing News Books, London.
- Taylor, J.C., Geer, L.N., Wood, C.M. & Donald, D.G. Mc. 2000. Physiological effects of chronic copper exposure to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in hard and soft water, evaluation of chronic indicators. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19: 2298-2308.
- Tavares-Dias, M. & Moraes, F.R. 2007. Hematological and biochemical reference intervals for farmed channel catfish. *Journal of Fish Biology*, 71: 383–388.
- Theodorakis, C. W., D'Surney, S. J., Bickham, J. W., Lyne, T. B., Bardley, B. P., Hawkins, W. E., Farkas, W. L., Mc. Carthy, J. F. and Shugart, L. R. 1992. Sequential expression of biomarkers in Bluegill Sunfish exposed to contaminated sediment. *Ecotoxicology*, 1: 45-73
- Viella, S., Ingrassi, L., Lionetto, M., Schettino, T., Zonno, V. & Stroelli, C. 1999. Effect of cadmium and zinc on the Na/H exchanger on the brush 34 B.K. Hassan border membrane vesicles isolated from eel kidney tankular cells. *Aquatic Toxicology*, 48: 25-36.
- Witeska, M. 2005. Stress in fish– hematological and immunological effects of heavy metals. *Electronic Journal of Ichthyology*, 1:35 - 41.
- Yousefi, M., Abtahi, B. & Abdian Kenari, A. 2011. Hematological, serum biochemical parameters, and physiological responses to acute stress of Beluga sturgeon (*Huso huso*, Linnaeus 1785) juveniles fed dietary nucleotide. *Comparative Clinical Pathology*, 21(5): 1043-1048.
- Zhou, X., Li, M., Abbas, K. & Wang, W. 2009. Comparison of hematology and serum biochemistry of cultured and wild Dojo loach *Misgurnus anguillicaudatus*. *Fish Physiology Biochemistry*, 35:435–441.
- Hoseini, S.M. & Ghelichpour, M. 2011. Efficacy of clove solution on blood sampling and hematological study in Beluga, *Huso huso* (L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(2):493-498.
- Lodhi, H.S., Khan, M.A., Verma, R.S. & Sharma, U.D. 2006. Acute toxicity of copper sulphate to fresh water prawns. *Journal of Environmental Biology*, 27: 585-588.
- Mazon, A.F., Monteiro, E.A., Pinheiro, G.H. & Fernandez, M. N. 2002. Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in the freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. *Brazilian Journal of Biology*, 62: 621-31.
- Mikryakov, D., Mikryakov, V. & Silkina, N. I. 2014. Effect of dexamethasone on oxidative processes in the immunocompetent organs of sterlet *Acipenser ruthenus* L. *Inland Water Biology*, 7(4): 397-400.
- Nussey, G., Van Vuren, J. H. J. & Du Preez, H. H. 1995. Effect of copper on the differential white blood cell counts of the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 111:381-388.
- Pottinger, T. G & Carrick, T. R. 2001. ACTH does not mediate divergent stress responsiveness in Rainbow trout. *Comparative biochemistry & physiology*, 129: 399-404.
- Satheeshkumar, P., Ananthan, G., Senthilkumar, D. & Jeevanantham, K. 2010. Comparative investigation on hematological and biochemical studies on wild marine teleost fishes from Vellar estuary, southeast coast of India. *Journal of Comparative Clinical Pathology*, 10: 1091 – 1095.
- Schjolden, J., Sorensen, J., Nilsson, G.E. & Poleo, A.B. 2007. The toxicity of copper to Crucian carp (*Carassius carassius*) in soft water. *Science of the Total Environment*, 384: 239-251.
- Serezli, A. S. & Delihasan, F. 2011. Acute effects of copper and lead on some blood parameters on Coruh trout (*Salmo coruhensis*). *African Journal of Biotechnology*, 10: 3204-3209.
- Shah, S. I. & Altindag, A. 2005. Alternation of immunological parameters of tench (*Tinca tinca*) after acute and chronic exposure to lethal and sub lethal treatments with mercury, cadmium and lead. *Tur Vetand Ani*