مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۹، دوره ۶۵، شماره ۱، ۶۶-۶۱

مطالعه پارامترهای خونی و بیوشیمی سرمی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) متعاقب مواجهه با غلظت کم کادمیوم

فرزاد غیاثی [۱] سیدسعید میرزرگر [۲*] جمیله سالارآملی [۳] علیرضا باهنر [۴] حسینعلی ابراهیم زاده موسوی [۲]

۱) گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی دانشگاه کردستان، سنندج ــ ایران.
۲) گروه بهداشت و بیماری های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران ــ ایران.
۳) مرکز تحقیقات سم شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران ــ ایران.
۴) گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران ــ ایران.

(دریافت مقاله: ۱۷ اسفند ماه ۱۳۸۷ ، پذیرش نهایی: ۲۸ تیر ماه ۱۳۸۸)

چکیده

غلظت بالای فلزات سنگین یا تماس طولانی مدت با غلظت‌های پایین این فلزات می‌تواند روی شاخصه‌های خونی و بیوشیمیایی ماهیان مؤثر باشد. از اینرو در مطالعه فعلی تأثیر طولانی کادمیوم برشاخصه‌های مذکور مورد مطالعه قرارگرفت. ۶۰ قطعه ماهی کپور معمولی (*cyprinus carpio*) به ظاهر سالم با وزن متوسط ۷۰۰گرم به دوگروه شده و به دو تانک فایبرگلاس ۱۰۰۰ لیتری تحت‌شرایط کنترل شده (آب ساکن چاه توأم با هوادهی مستمر و تحت‌شرایط کیفی معین) منتقل گردیدند. ماهیان گروه تیمار در مواجهه با غلظت کم کادمیوم ppb) ۳۰) قرار گرفتند. ماهیان گروه شاهد در تماس با کادمیوم قرار نگرفتند. خونگیری از ماهیان در هر دوگروه شاهد و تیمار در روزهای ۱۵ و ۳۰ پس از مواجهه (به تعداد ۵ قطعه از هرگروه باسه تکرار) از ناحیه وریدساقه ی دمی انجام‌شد. متعاقباً پارامترهای خون‌شناسی شامل شمارش کلی گلبول های قرمز، شمارش کلی و تفریقی گلبول های سفید، هماتوکریت، مقادیر پروتئین تام، آلبومین، گلبولین، نسبت آلبومین به گلبولین و مقادیر آنزیم های LDH، ALT، AST و ALP اندازه‌گیری شدند. بر اساس نتایج بدست‌آمده تعداد گلبول های سفید (WBC ×104/µl) به طور معناداری در روز ۱۵ بعد از مواجهه با کادمیوم کاهش پیدا کرده بودند (p<۰/۰۵). همچنین تعداد گلبول های سفید در ماهیان گروه تیمار به شکل معناداری در روز ۳۰ پس از مواجهه، کاهش پیدا کرده بودند (p<۰/۰۵). بر اساس اندازه‌گیری های آنزیم های سرمی، مقدار آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) در روز ۳۰ پس از مواجهه در گروه شاهد به طور معناداری افزایش یافته بود (p<۰/۰۵). در ماهیان گروه تیمار مقدار LDH در روز سی ام پس از مواجهه افزایش پیدا کرده بود. در سایر پارامترهای خون‌شناسی و مقادیر آنزیم های سرمی ماهیان گروه تیمار اختلاف معناداری در مقایسه با گروه شاهد مشاهده نشد. این بررسی نشان داد که دوره مواجهه غلظت کم کادمیوم عامل مهمی در افزایش سطوح LDH در ماهی کپور معمولی بود.

واژه‌های کلیدی: پارامترهای خون‌شناسی، آنزیم‌های سرمی، کپور معمولی، غلظت کم، کادمیوم.

مقدمه

امروزه فلزات سنگین منبع مهم آلودگی برای موجودات آبزی می باشند (۱). دربین فلزات سنگین، کادمیوم به عنوان یک آلوده کننده مهم آب‌های شیرین مطرح می‌باشد. کادمیوم از طریق لوله‌های گالوانیزه، صنایع الکترونیک، پساب‌های غنی از کادمیوم مربوط به کودهای شیمیایی که در کشاورزی استفاده می شوند و سوخت‌های فسیلی (نفت، گازوئیل، بنزین) به محیط زیست افزوده می‌شود و بدین ترتیب به سلامتی و زیست کلیه موجودات آسیب می رساند (۹). با توجه به این‌که نیمه عمر کادمیوم ۳۳-۱۷ سال می‌باشد، این فلز در بدن تجمع پیدا کرده و ضایعات مختلفی در اندام‌ها ایجاد می‌کند. اثرات سمی کادمیوم از برهم زدن تعادل اسمزی تا مرگ می تواند متغیر باشد (۹،۱۸).

بر اساس گزارش‌های متعدد در منابع علمی، مسمومیت‌های مزمن با فلزات سنگین در ماهیان موجب بروز اثراتی همچون کاهش رشد و تولید مثل، اثرات هیستوپاتولوژیک، تغییرات فاکتورهای خون شناسی، ضایعات تخم، جنین و لاروها در گونه‌های مختلف ماهیان می‌گردد (۱۵،۱۶،۱۷،۲۱،۲۵، ۶،۸،۱۲).

پارامترهای خون شناسی شاخص‌های مهمی برای ارزیابی وضعیت فیزیولوژیک ماهیان می‌باشد. بر اساس تحقیقات انجام شده در حیوانات خون گرم تغییرات شاخص‌های دیگر می توانند بیانگر اثر برخی مواد بر ترکیب موجود زنده باشند. برخلاف باور عمومی خون شناسی یک ابزار ارزشمند در تشخیص و پیشگیری بیماری ماهیان می باشد (۲۳).

همچنین آنزیم‌های سرمی علاوه بر عوامل بیماری زای عفونی و مسمویت‌ها تحت تأثیر فاکتورهای فیزیولوژیک و محیطی نیز قرار می‌گیرند. نحوه فعالیت این آنزیم‌ها در گونه‌های مختلف ماهیان در شرایط مختلف متفاوت است (۲۳،۲۹).

با توجه به امکان وقوع مسمویت‌های مزمن و تحت کشنده در استخرهای پرورش کپور ماهیان، بویژه گونه کپور معمولی (common carp) که از مهم ترین گونه‌های سیستم پرورش گرم آبی در کشور ما می‌باشد و در نظر گرفتن خصوصیات بیولوژیک این گونه پرورشی همچون مقاومت نسبت به تغییرات محیطی و چگونگی تغذیه، به عنوان گونه ی مناسبی برای ارزیابی آلودگی در نظر گرفته شد و با توجه به اهمیت بررسی پارامترهای خون شناسی و آنزیم‌های سرمی در مواجهه با آلودگی‌های محیطی (۴،۱۰،۱۱،۱۶،۱۷،۲۰،۲۷،۲۹) مبادرت به ایجاد مسمومیت تجربی با غلظت کم

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۱۱۱۷۱۸۷-۰۲۱، نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email: zargarm@ut.ac.ir

کادمیوم(۳۰ppb) در کپور ماهیان و ارزیابی تغییرات ایجاد شده در پارامترها و مقادیر مورد نظر گردید.

مواد و روش کار

تعداد ۶۰ قطعه ماهی از گونه کپور معمولی به ظاهر سالم (با وزن متوسط ۷۰۰ گرم) از استخرهای پرورش ماهی جهاد دانشگاهی مؤسسه تحقیقات امین آباد دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه گردید. ماهیان پس از آماده سازی به حوضچه های فایبر گلاس و نیرو انتقال یافته به مدت یک هفته تحت آداپتاسیون با محیط جدید قرار گرفتند

ماهیان بطور تصادفی به دو گروه مساوی شاهد (گروه۱) و تیمار (گروه ۲) تقسیم و در حوضچه های فایبر گلاس ۱۰۰۰ لیتری قرار داده شدند. ۲۴ ساعت قبل از انتقال ماهی ها نسبت به شستشو و ضد عفونی و آب گیری حوضچه ها با آب چاه و هوا دهی اقدام گردید. میزان آب در طول مدت آزمایش ثابت بود و تعویض صورت نمی گرفت. هوا دهی از طریق پمپ هواده و سنگ هوا بطور مستمر انجام شد. شرایط و کیفیت آب استخرها مشابه بود و در طول آزمایش ماهیان مشابه شرایط زمستان گذرانی کپور ماهیان(wintering) تغذیه دستی نمی شدند. فاکتورهای کیفی آب با استفاده از کیت های شیمیایی شرکت کاریزاب اندازه‌گیری می شدند که بطور میانگین عبارت بودند از: سختی آب $CaCO_3$ mg/lit ۳۲۰/۶، اکسیژن محلول ۸mg/lit، pH=۷ و درجه حرارت متوسط آب برابر ۲ ± ۱۶ درجه سانتیگراد.

مسمومیت تجربی: جهت ایجاد مسمومیت تجربی تحت کشنده در ماهیان (µg/lit)۳۰ppb کلرور کادمیوم کلرید کادمیوم منو هیدراته ($CdCl_2$ H_2o) ساخت شرکت (Merck) آلمان، به حوضچه شماره ۲ (تیمار) اضافه گردید ماهیان حوضچه شماره یک به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شدند و هیچ نوع ماده ای به آب آن ها اضافه نشد.

نمونه‌گیری: خونگیری از ماهیان ۱۵ و ۳۰ روز پس از مواجهه با کادمیوم انجام شد. در هر نوبت تعداد ۵ قطعه ماهی از هر حوضچه (شاهد و تیمار) صید شده و اقدام به خونگیری می گردید. نمونه‌گیری ها در هر مورد با سه تکرار توأم بودند

خونگیری: خونگیری با استفاده از سرنگ و سر سوزن نمره ۲۰ از طریق ورید ساقه دمی انجام شد. حدود ۲ میلی لیتر از نمونه های خون به دست آمده در داخل لوله های حاوی ماده ضد انعقاد هپارین برای مطالعات خون شناسی و بقیه خون ماهی برای تهیه سرم و مطالعات آنزیمی استفاده شد.

روش‌های خون شناسی: جهت ارزیابی پارامترهای خون شناسی و اندازه‌گیری فاکتورهای خونی و بیو شیمیایی از روش های متداول خون شناسی ماهیان استفاده شد. جهت شمارش گلبول های قرمز (RBC) و گلبول های سفید (WBC) شمارش تفریقی گلبول های سفید و هماتوکریت از روش Svobodova و همکاران در سال ۱۹۹۱ (۲۴) با استفاده از دستگاه شمارش گلبولی (مدل: ایتالیا ,Hema Screen 18,Hospitex) موجود در آزمایشگاه مرکزی تحقیقات دکتر رستگار دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران استفاده شد. برای اندازه‌گیری پروتیین تام از روش بیوره(Buret) با استفاده از کیت‌های تجاری (پارس آزمون، ایران) و جهت اندازه‌گیری آلبومین از روش برموکرزول سبز (Green Bromocresol) استفاده شد. گلبولین با کسر نمودن مقدار آلبومین از پروتیین تام محاسبه گردید.

روش‌های اندازه‌گیری آنزیمی سرمی: به منظور اندازه‌گیری آنزیم‌های سرمی: (لاکتات دهیدروژناز LDH)، اسپارات آمینو ترانسفراز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آلکالین فسفاتاز (ALP) به ترتیب روش های DGKC (P-L)، IFCC، IFCC، DGKC با استفاده از دستگاه آنالایزر اپندروف (eppendorf) ساخت کشور آلمان (بر اساس دستور العمل کارخانه سازنده) به کار رفتند. کیت های تجاری مورد نیاز برای آنزیم‌های مورد نظر از شرکت پارس آزمون (ایران) تهیه گردیدند.

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های بدست آمده به شکل میانگین ± انحراف معیار تعداد ماهیان در هر گروه نمایش داده شدند پارامترهای خون شناسی، بیوشیمیایی، و مقادیر آنزیم‌های سرمی با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) مقایسه شدند. جهت بررسی معنی دار بودن مقادیر بین گروه‌ها (شاهد و تیمار) از تست (T-test) T دو طرفه استفاده گردید و مقادیر $p \leq ۰/۰۵$ به‌عنوان مبنای معنی‌دار بودن تفاوت‌ها مدنظر واقع شد.

نتایج

۱ـ مقادیر مربوط به سلول‌های خونی و فاکتورهای بیو شیمیایی در کپور ماهیان گروه‌های مختلف: نتایج اندازه‌گیری پارامترهای خون شناسی ماهیان کپور در دو گروه ۱ (شاهد) و گروه ۲ (تیمار) که پس از ۱۵ و ۳۰ روز مواجهه با غلظت کم کادمیوم (۳۰ppb) بدست آمده در جدول۱ نمایش داده شده است. بر اساس آنالیز آماری و مقایسه گروه‌های شاهد و تیمار در زمان‌های نمونه برداری مشخص گردید که تعداد گلبول های سفید WBC(µl/l ×۱۰^۴) بطور معنی دار ($p<۰/۰۵$) از میزان ۱/۳۲ ± ۳/۹۸ به ۰/۳ ± ۲/۵۲ کاهش یافته است. همچنین با مقایسه تعداد گلبول های سفید شمارش شده مشخص گردید که تعداد گلبول های سفید گروه ۲ (تیمار) پس از ۱۵ روز مواجهه با غلظت کم کادمیوم (۳۰ ppb) از مقدار ۰/۳ ± ۲/۵۲ به میزان ۰/۳۳ ± ۱/۷ در گروه ۲ (تیمار) پس از گذشت پانزده روز (روز سی ام مواجهه با کادمیوم) کاهش یافته است ($p<۰/۰۵$). تغییرات معنی‌دار دیگری در سایر مقادیر و نسبت‌های بدست آمده پارامترهای خون شناسی اندازه‌گیری مشاهده نگردید ($p>۰/۰۵$).

۲ـ مقادیر آنزیم‌های سرمی بدست آمده در کپور ماهیان گروه‌های مختلف: نتایج اندازه‌گیری آنزیم‌های سرمی در کپور ماهیان گروه‌های شاهد و ماهیانی که در معرض غلظت کم کادمیوم (۳۰ ppb) قرار گرفته بودند (گروه‌های تیمار) در جدول۲ نمایش داده شده است. براساس نتایج بدست آمده مشخص گردید که مقدار آنزیم LDH در ماهیان گروه ۲ (تیمار) که به مدت ۳۰ روز در معرض کادمیوم قرار گرفته بودند ۱۴۰/۸۲ ± ۸۲۷/۸ نسبت به ماهیان

جدول ۱- میانگین ± انحراف معیار (Mean ± SD) پارامترهای خون شناسی اندازه‌گیری شده درماهیان کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در دو گروه شاهد (عدم مواجهه با کادمیوم) و تیمار (مواجهه با کادمیوم): آلبومین (A)، گلبولین (G)، آلبومین/ گلبولین (A/G)، پروتیین تام (TP)، هماتو کریت (Hct)، میانگین شمارش گلبول‌های قرمز (RBC)، میانگین شمارش گلبول‌های سفید (WBC)، لنفوسیت‌ها ، هتروفیل‌ها و منوسیت‌ها براساس نمونه برداری‌ها ۱۵ و ۳۰ روز پس از مواجهه با کلرورکادمیوم به میزان ۳۰ قسمت در بیلیون(ppb ۳۰) *مقادیر اندازه‌گیری شده در گروه تیمار که بطور معنی‌داری ($p<0/05$) کمتر از گروه شاهد بود.

زمان نمونه برداری	۱۵ روز پس از مواجهه با کادمیوم		۳۰ روز پس از مواجهه با کادمیوم	
پارامترهای خون شناسی (واحد)	گروه۱ (شاهد)	گروه۲ (تیمار)	گروه۱ (شاهد)	گروه۲ (تیمار)
آلبومین (g/dl)	۰/۶۵±۰/۵۸	۰/۵۶±۰/۱۱	۰/۵۷±۰/۰۶	۰/۵۲±۰/۰۸
گلبولین (g/dl)	۱/۲±۰/۱۲	۱/۲۸±۰/۲۲	۱/۲±۰/۱	۱/۲۲±۰/۱۳
آلبومین / گلبولین (نسبت)	۰/۵۴±۰/۰۷	۰/۴۶±۱۶	۰/۴۷±۰/۰۳	۰/۴۲±۰/۰۵
پروتیین تام (g/dl)	۱/۸۵±۰/۱۳	۱/۸۴±۰/۱۳	۱/۷۷±۰/۱۵	۱/۷۴±۰/۱۹
هماتوکریت (٪)	۳۲±۶/۵۸	۲۹/۲±۴/۶	۳۰/۳۳±۱/۱۵	۲۹±۳/۳۲
RBC ($\times 10^6/\mu l$)	۱/۵۶±۰/۱۸	۱/۷۲±۰/۶۱	۱/۷۷±۰/۳۸	۱/۶۹±۰/۲
WBC ($\times 10^4/\mu l$)	۳/۹۸±۱/۳۲	۲/۵۲±۰/۳*	۲/۱±۰/۳۶	۱/۷±۰/۳۳*
میانگین لنفوسیتها ($\times 10^3/\mu l$)	۳۴/۰۳±۰/۴۵	۲۱/۸۷±./۳۲	۱۶/۹۴±۱/۸۰	۱۲/۹۲±۰/۱۶
میانگین هتروفیل‌ها ($\times 10^3/\mu l$)	۵/۳۷±۰/۴۵	۲/۷۲±./۳۷	۳/۷۸	۳/۸۰±۰/۲۰
میانگین منوسیت‌ها ($\times 10^3/\mu l$)	۰/۸۰	۱	۰/۶۹±۰/۰۸	۰/۴۵±۰/۰۴

جدول ۲- میانگین ± انحراف معیار (Mean ± SD) آنزیم‌های سرمی اندازه گیری شده (برحسب واحد بین المللی در لیتر) در دو گروه شاهد(عدم مواجهه با کادمیوم) و تیمار (مواجهه باکادمیوم) ماهیان کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) ۱۵ و ۳۰ روز پس از مواجهه با غلظت تحت کشنده ؛۳۰ قسمت در بیلیون کادمیوم (۳۰ppb). LDH: لاکتات دهیدروژناز، ALT: آلانین آمینوترانسفراز ،AST: آسپارتات آمینو ترانسفراز، ALP: آلکالین فسفاتاز * مقادیری از گروه تیمارکه بطور معنی‌داری با گروه شاهد متفاوت هستند ($p<0/05$).

زمان نمونه برداری	۱۵ روز پس از مواجهه با کادمیوم		۳۰ روز پس از مواجهه با کادمیوم	
مقادیر آنزیم‌های سرمی (U/L)	گروه۱ (شاهد)	گروه۲ (تیمار)	گروه۱ (شاهد)	گروه۲ (تیمار)
LDH	۶۳۲±۳۱۲/۹۲	۳۸۴±۲۹/۸۸	۴۳۰±۶۹/۳۵	۸۲۷/۸±۱۴۰/۸۲*
ALT	۳۶/۲۵±۲۲/۰۲	۱۸/۸±۱۱/۵	۱۴/۳۳±۹/۴۵	۳۳/۲±۲۹/۱۹
AST	۱۳۹/۵±۹۴/۰۷	۴۸/۸±۱۷/۷۳	۴۲/۳۳±۵/۵	۵۳/۶±۱۹/۵۱
ALP	۱۲۷/۷۵±۳۶/۱۸	۱۰۳/۴±۸۳/۲	۳۵/۶۷±۲۱/۱۳	۹۵/۴±۵۵/۵۱

گروه۱ (شاهد) که در معرض کادمیوم قرار نگرفته بودند (۴۳۰±۶۹/۳۵) بطور معنی‌داری افزایش یافته بود ($p<0/05$).

همچنین مشخص گردید که آنزیم LDH در سرم کپور ماهیان گروه ۲ (تیمار) که به مدت ۱۵ روز در معرض کادمیوم قرار گرفته بودند (۳۸۴±۲۹/۸۸) پس از گذشت سی روز از زمان مواجهه (به میزان ۸۲۷/۸±۱۴۰/۸۲) به شکل معنی‌داری افزایش یافت.

تغییرات معنی‌دار دیگر در بقیه مقادیر آنزیم‌های سرمی کپور ماهیان در گروه‌های تیمار نسبت به شاهد و در سایر زمان‌های نمونه برداری مشاهده نگردید ($p>0/05$) از جانب دیگر مقادیر آنزیم‌های ALT، AST، ALP و در گروه‌های تیمار پس از گذشت ۱۵ روز افزایش یافت (جدول ۲) اما این افزایش معنی‌دار نبودند ($p>0/05$).

بحث

کادمیوم یک عنصر غیر ضروری است که در مقادیر بیش از حد مجاز می‌تواند موجب اثرات سمی مهمی بر روی ارگانیسم‌های آبی گردد (۱۳،۱۹،۲۱،۲۶) مسمومیت با کادمیوم طیف وسیعی از اثرات پاتولوژیک را در آن‌ها ایجاد می‌کند (۶،۹،۱۳،۱۴،۱۹) بطور کلی فلزات سنگین در شرایط مختلف با مقادیر متفاوت موجب بروز تغییرات گوناگون در بافت‌ها، پارامترهای خونی، پاسخ‌های ایمنی، رشد جنین و لاروها می‌گردد که بررسی آن‌ها می‌تواند در مطالعه آلودگی‌های منابع آبی و تشخیص و پیشگیری از مسمومیت‌های محیطی مورد استفاده قرار گیرند(۴،۶،۱۱،۱۳،۱۵،۱۷،۱۸،۲۰،۲۵،۲۸) شاخص‌های خون شناسی از پارامترهای با اهمیت ارزیابی موقعیت فیزیولوژیک ماهی می‌باشد و تغییرات آن تابع گونه ماهی، سن، بلوغ جنسی و بیماری‌ها می‌باشد (۲۶). برخلاف باور عمومی بررسی‌های هماتولوژیک (خون شناسی) در ماهیان می‌تواند در تشخیص و پیشگیری بیماری‌های ماهیان مفید واقع شود (۲۳).

آنمی (کم خونی) یکی از اثرات سمی شناخته شده در اثر مواجهه با فلزات سنگین در ماهیان می‌باشد(۲۲) غلظت‌های ۱۰ قسمت در بیلیون (ppb ۱۰) کادمیوم، سرب، جیوه و روی در مدت یک الی دو ماه موجب درجاتی از کم خونی در ماهیان استخوانی شده است (۷). اثرات فلزات سنگین بر روی گلبول‌های سفید متغیرتر است. کادمیوم موجب لنفوپنی وابسته به دوز در ماهیان cunners شده و یک لنفوسیتوز در ماهیان سوف صید شده از رودخانه آلوده به کادمیوم گزارش شده است (۲۲). بر اساس گزارشات Mikryakov و Lapirora در سال ۱۹۹۷، کاهش تعداد گلبول‌های سفید (WBC) در خون تاسماهی سیبری *Acipenser baeri* وابسته به میزان کادمیوم و زمان تماس با آن است که با نتایج بدست آمده در این تحقیق همخوانی دارد. بر اساس نتایج حاصله کاهش میانگین گلبول‌های سفید شمارش شده(WBC) در کپور ماهیان در روز سی ام پس از مواجهه با کادمیوم نسبت به روز پانزدهم مشاهده گردید. یعنی با افزایش زمان مواجهه کاهش تعداد گلبول‌های سفید در گروه تیمار مشاهده گردید. براساس نتایج، تعداد میانگین لنفوسیت‌ها در گروه تیمار در روز سی ام پس از مواجهه نسبت به گروه شاهد کاهش یافته بود. همچنین این کاهش نسبت به گروه تیمار روز پانزدهم پس از مواجهه نیز مشاهده گردید. از طرفی افزایش تعداد میانگین هتروفیل‌ها در گروه تیمار روز سی ام پس از مواجهه نسبت به گروه شاهد و تیمار روز پانزدهم وجود داشت. کاهش تعداد میانگین لنفوسیت‌ها موجب افت توان دفاعی بدن می‌شود. گزارش های دیگری در مورد کاهش تعداد WBC ناشی از مواجهه با کادمیوم وجود دارد.

Palakova و همکاران در سال ۱۹۹۲ گزارش نمودند که تغییر در تعداد گلبول های سفید (WBC) خون ماهی کپور معمولی وابسته به مدت مواجهه با کادمیوم است و در ابتدا افزایش WBC (لنفوسیت و منوسیت) و بعد از ۱۱ روز کاهش تعداد WBC مشاهده گردید (۱۹). Jahnsson-Sjobeck و Larsson در سال ۱۹۸۷ مشاهده نمودند که در ماهی فلاندر در ابتدای تماس با کادمیوم افزایش در WBC بوجود آمد اما وقتی مدت تماس ۹ هفته بطول انجامید تعداد گلبول های سفید بدلیل کاهش لنفوسیت ها کاهش یافت (۱۰).

کاهش WBC خون سگ ماهی (dog fish) ۲۶-۲۴ ساعت متعاقب مواجهه با میزان ۲۵ میکروگرم در لیتر (ppb ۲۵) کادمیوم توسط Tort و همکاران در سال ۱۹۹۰، مشاهده شده است (۲۷).

بر اساس نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر به غیر از تعداد گلبول های سفید (WBC) در سایر پارامترهای خون شناسی و بیو شیمیایی تغییر معنی داری در کپور ماهیان تحت تأثیر غلظت کم کادمیوم نسبت به ماهیان گروه شاهد ایجاد نشد اما در سایر گزارشات تغییراتی در برخی پارامترها و بعضی گونه ها مشاهده می گردد. Mishra و Srivasrava در سال ۱۹۸۰ گزارش نمودند که میزان کشنده کادمیوم باعث افزایش تعداد گلبول های قرمز و میزان هموگلوبین خون بسیاری از گونه های ماهیان می شود (۱۷).

افزایش RBC و هموگلوبین و کاهش در صد هماتوکریت سگ ماهی (dog fish) در مواجهه با میزان ppb۲۵ کادمیوم توسط Tort و Torres در سال ۱۹۸۸ گزارش شده است (۲۶) در غلظت ppb۵۰ پس از گذشت ۹۶ ساعت پارامترها به میزان طبیعی خود باز گشتند (۲۷) بر اساس گزارش Haux و Larsson در سال ۱۹۸۴ میزان ppb۱۰ کادمیوم در هماتوکریت را در ماهی قزل آلای رنگین کمان کاهش می دهد (۶).

بر اساس تحقیقات Palakova و همکاران در سال ۱۹۹۲، مواجهه ماهی کپور معمولی با میزان تحت کشنده کادمیوم ppb۲۰ تغییرات معنی داری در تعداد گلبول های قرمز، میزان هموگلوبین و درصد هماتوکریت ایجاد نکرده است (۱۹) که با یافته های گزارش حاضر همخوانی دارد.

Ruparella- و همکاران در سال ۱۹۹۰ نشان دادند که میزان کاهش گلبول های قرمز و هموگلوبین در تیلاپیلای موزامبیک (*Oreochromis mossambicus*) وابسته به زمان تماس ۴۵-۱ روز و میزان کادمیوم ۱۰-۰/۰۱ میکروگرم در لیتر بوده است (۲۰) بر اساس تحقیق Health در سال ۱۹۸۷، کادمیوم ممکن است باعث بد شکلی و غیر طبیعی شدن گلبول های قرمز شود (۷). مطالعات Christensen و همکاران در سال ۱۹۹۷ نشان داد که تغییر در میزان گلوکز سرم در ارتباط با کلرور کادمیوم، مدت مواجهه و گونه ماهی می باشد. میزان mg/l۱۰۶ کادمیوم پس از گذشت دو هفته باعث تغییرات گلوکز خون ماهی سالمون در تماس با این ماده نشده است (۴).

در حالی که بر اساس مشاهدات Lowe-Indle و Niimi در سال ۱۹۸۴ میزان mg/l۱۰ کادمیوم مقادیر گلوکز و لاکتات خون را تغییر داده است (۱۴) که با گزارش محقق قبلی متفاوت می باشد.

Yammawaki و همکاران در سال ۱۹۸۶ ماهیان کپور ۱۳۰ گرمی را در معرض مقادیر ۴۲، ۱۰ و ۲ قسمت در بیلیون (ppb) کلرور کادمیوم برای مدت ۱۵، ۲۹، ۶۴ و ۱۲۰ روز قرار دادند. کادمیوم تأثیر بسیار اندکی بر شمارش RBC، میزان هموگلوبین، درصد هماتوکریت و ALP داشت در حالیکه مقدار های پروتیین تام، آلبومین، گلبولین و گلوکز، کاهش و آنزیم های AST، ALT و LDH افزایش یافته بود.

آنزیم های ALT، AST، ALP و LDH از جمله آنزیم هایی هستند که بطور معمول در تشخیص بیماری های انسانی بکار برده می شوند. این آنزیم ها در حالت طبیعی در غشای سلولی سیتوپلاسم و میتوکندری ها وجود دارند. در صورت آسیب دیدن غشای سلولی و یا نکروز سلول این آنزیم ها به بیرون راه پیدا کرده و میزان آن ها در سرم خون افزایش می یابد البته ذکر این نکته ضروری است که آنزیم های سرمی تحت تأثیر فاکتورهای فیزیولوژیک و محیطی نیز قرار می گیرند. برای مثال نوع جیره غذایی، دمای محیط، سن ماهی، و شوری آب در میزان آنزیم های سرمی و فعالیت آن ها مؤثر است لذا همواره مقایسه موارد مورد مطالعه با گروه شاهد ضرورت دارد . آنزیم های آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپارتات – آمینوترانسفراز (AST) در بافت کبدی تجمع می یابند ومقادیر این آنزیم ها در بیماری های حاد نکروتیک کبدی وابسته به تماس ماهیان با سموم کبدی (همچون تترا کلرید کربن) افزایش یافته است. افزایش مقادیر این آنزیم ها در بیماری های مزمن کبدی موثق نیست. همچنین مقادیر آلبومین سرم در بیماری های کبدی پایین می رود (۳). با توجه به این که در مسمومیت های ناشی از فلزات سنگین در ماهیان یکی از اندام های مهم درگیر معمولاً کبد می باشد (۱،۱۳،۱۴،۱۸،۲۵) لذا احتمال افزایش مقادیر آنزیم های ذکر شده بخصوص در مسمومیت های حاد (کشنده) قابل پیش بینی است. واکنش کادمیوم با آنزیم ها بوسیله بلوک گروه سولفیدریل SH- باعث ایجاد اثرات توکسیک می شود. به علاوه کادمیوم باعث مهار آنزیم های حاوی روی شده که نهایتاً باعث بهم خوردن تعادل یون و آب می شود (۱۸). افزایش مقادیر آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) در مسمومیت حاد با آمونیاک در کپور معمولی گزارش شده است که به علائم بالینی تشنج در ماهیان نسبت داده شده است . روش خون گیری در ماهیان ممکن است موجب افزایش مقادیر LDH در نمونه های بدست آمده گردد (۲۳).

کادمیوم در برخی گونه های ماهی همچون نوعی سس ماهی *Barbus conchius* باعث مهار آنزیم های اسیدفسفاتاز، گلوتامیک پیرورویک ترانس آمیناز کلیه و همچنین افزایش در فعالیت فسفاتاز قلیایی شده است (۵).

بررسی مقادیر آنزیم های سرمی نشان داد مقادیر آنزیم LDH در گروه تیمار ۳۰ روز پس از مواجهه با کادمیوم افزایش معنی دار پیدا کرده بود که این افزایش هم نسبت به گروه تیمار در روز پانزدهم پس از مواجهه بود و هم نسبت به ماهیان گروه شاهد در همان زمان (روز سی ام پس از مواجهه) افزایش را نشان می داد. البته در مقادیر سایر آنزیم های سرمی (ALT، AST و ALP) نیز بین ماهیان گروه شاهد با تیمار افزایش مشاهده گردید اما این تفاوت به شکل

معنی‌داری نبود. افزایش این آنزیم‌ها را به آسیب‌های سلولی در بافت‌های هدف که در مسمومیت با کادمیوم در گیر می‌شوند همچون کبد، کلیه و آبشش (۱،۲،۱۰،۱۴،۱۸،۲۱،۲۵) می‌توان نسبت داد. افزایش آنزیم‌های AST، ALP و LDH در کپور ماهیانی که در معرض مقادیر ۱۰،۴۲ و ۲ قسمت در بیلیون کلرید کادمیوم برای ۱۵، ۲۹، ۶۴ و ۱۲۰ روز قرار داشتند گزارش شده است (۲۸).

بر اساس نتایج حاصله غلظت کم کادمیوم (۳۰ ppb) پس از گذشت ۱۵ و ۳۰ روز مواجهه کپور ماهیان، موجب کاهش تعداد گلبول‌های سفید (WBC) می‌شود ودوره مواجهه عامل مهمی برای کاهش WBC در این گونه محسوب می‌شود. همچنین متعاقب ۳۰ روز پس از وقوع مسمومیت؛ افزایش آنزیم‌های سرمی ALT، AST، ALP و LDH به وقوع می‌پیوندد که این افزایش در مورد آنزیم LDH به شکل معنی‌داری حاصل شد.

با عنایت به ایجاد اختلالات مهم در فعالیت‌های طبیعی ماهیان در اثر بروز مسمومیت‌های مزمن با فلزات سنگین همچون کادمیوم که بر سلامتی، رشد و تولید مثل تأثیر گذار می‌باشد؛ انجام اقدامات لازم جهت جلوگیری از آلودگی آب استخرهای پرورش کپور ماهیان که از مهم‌ترین ماهیان پرورشی در کشور ما می‌باشند، به فلزات سنگین و سایر آلاینده‌ها توصیه می‌گردد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات کارشناسان آزمایشگاه مرکزی تحقیقات دکتر رستگار، مرکز تحقیقات سم شناسی و آزمایشگاه بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران قدر دانی به‌عمل می‌آید. این تحقیق با اعتبارات ویژه(گرانت) معاونت پژوهشی دانشگاه تهران انجام گرفته است.

References

1. Adeyemo, O. K. (2008) Histological alterations observed in the liver and brain of *Clarias gariepinus* exposed to chronic sublethal dose of lead. Bull.Eur. Ass. Fish Pathol. 28: 105-114.
2. Bernet, D., Schmidt , H., Meier, W., Burkhardt , H., Wahli, T. (1999) Histology in fish: proposal for protocol to assess aquatic pollution. J. Fish Dis. 22:25.
3. Casillas, E., Myers, M.S., Rhodes, L.D., McCain , B.B. (1986) Serum chemistry of diseased English sole, *Parophrys ventulus*, Giard, from polluted areas of Puget Sound , Washington J. Fis. Dis. 8: 437-449 .
4. Christensen, G.M., Hunt, E.P., Fiant, J. (1977) The effect of methylmercuric chloride, cadmium chloride and lead nitrate on six biochemical factors of the brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Toxicol. Appl. Pharmacol. 42:523-527.
5. Gill, T.S., Pant, J.C. (1987) Haematological and pathological effects of chromium toxicossis in freshwater fish *Barbus conchonius* Ham. Water. Air. Soil. Pollut. 35:241-250.
6. Haux, C., Larrson, A. (1984) Long-term sublethal physiological effects on rainbow trout, *Salmo gairdneri*, during exposure to cadmium and after subsequent recovery . Aquat. Toxicol. 5:129-142.
7. Health, A. G. (1983) Water pollution and Fish Physiology CRC Press Inc. Delhi, India. pp. 113-115.
8. James, R. (1992) Utilization of *Eichornia crassipes* for reduction of mercury toxicity on food transformation in *Hetropneustes fossilis*. Aqua.Trop. 7:146-186.
9. Jensen, A., Bro-Rasmussen, F. (1992) Environmental cadmium in Europe . Rev. Environ. Contam. Toxicol. 125:101-181.
10. Johansson - Sjobeck, M.L., Larsson, A. (1978) The effects of cadmium on the hematology and on the activity of delta-aminolevulic acid dehydrates (ALA-D) in blood and hematopoietic tissues of the flounder *pleuronectes flesus* . Environ. Res. 17: 1991-2004.
11. Kapata-Zopumbos, K., Llipoulou - Georguda, Ki , J., Kotsanis, N. (2000) Changes in selected haematological parameters at early stages of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, Subjected to metal

toxicants: arsenic, cadmium and mercury. J. Appl Ichthyol. 16: 276-278.

12. Kulkarini, R.S., Veeresh, V.U., Sindhe, V. R. (2002) Ovarian changes in response to heavy metal exposure to the fish , *Notopterus notopterus* (palls). J. Environ. Biol. 23:137-171.
13. Larsson, A., Haux, C. (1982) Altered carbohydrate metabolism in fish exposed to sublethal levels of cadmium. J. Environ. Biol. 3:71-81.
14. Lowe-Inde, L., Niimi A. I. (1984) Short-term and long-term effects of cadmium on glycogen reserves and liver size in rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Richardson). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 13: 759-764.
15. Metin,C. (2001) Effects of aqueous cadmium on embryos and larvae of mirror carp. Indian J. Anim. Sci. 71:885-888.
16. Mikryakov, V. R., Lapirova, T.B. (1997) Influence of salts of some heavy metals on the differential blood count in Juvenile *Acipenser baeri*. J. Ichthyol. 37: 458-470.
17. Mishra, S., Srivastava, A. K. (1980) The acute toxic effects of copper on the blood of a teleost. Ecotoxicol. Environ. Saf. 4:191-194.
18. Molgar, M.J., Poze, M., Garcla, M.A., Alonso, J., Mlguez, B. (1997) The toxic and accumulative effects of short-term exposure to cadmium in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Vet. Hum. Toxicol. 3:79-83.
19. Palackova, 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 (1st ed.) FAO and Fishing News Book, Oxford, UK. pp.53-58.
20. Ruparella ,S.G., Verma, Y., Saiyed, S.R., Rawal, U. M. (1990) Effect of cadmium on blood of tilapia *Oreochromis mossambicus* (peters) during prolonged exposure. Environ. Contam. Toxicol. 45:305-312.
21. Singhal, R.N., Jain, M. (1997) Cadmium - Induced changes in histology of kidneys in common carp, *Cyrinus carpio* (*Cyprinidae*) Bull. Environ. Contam. Toxicol. 58:456-462.
22. Stoskopf, S. K. (1993) General Medicine: Immunology In Fish Medicine. Edited by Stoskopf, M.K. (1st ed.) W.B. Saunders Company. Philadelphia, USA. pp.145-155.
23. Stoskopf, M. K. (1993) Clinical pathology of Carp, Gold fish and Koi: In Fish Medicine. Edited by M.K. Stoskopf, (1st ed.) W.B. Sounders Company. Philadelphia, USA. pp.450-453.
24. Svobodova, Z., Pravda, D., Palackova, Y. (1991) Unified methods of haematological examination of fish. Research Institue of Fish Culture and Hydrobiology, Vodrany, Czechoslovakia. pp. 31.
25. 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 . Environ. Pollut. 121:307-320.
26. Tort, L., Lernandes Pascual, M. D. (1990) Haematological effects in dogfish (*Scyliorhinus canicula*) after short-term sublethal cadmium exposure. Acta Hydrochim. Hydrobiol. 18:379-383.
27. Tort, L., Torres , P., Hidalg., J. (1988) The effects of sublethal concentration of cadmium on haematological parameters in dog fish (*Scyliorhinus canicula*) J. Fish Biol. 32:279-282.
28. Yamawaki, K.W., Hoshimoto, K., Fujii, J., Koyama, T., Ikeda and Ozaki, H. (1986) Hemochemical changes in carp exposed to low cadmium concentrations. Bull. Asia. Fish. Soci. 1: 56-60.

J. Vet. Res. 65, 1:61-66, 2010J.Vet.Res. 62,4:335-337,2007

STUDY ON HEMATOLOGY AND SERUM BIOCHEMISTRY OF COMMON CARP (*CYPRINUS CARPIO*) AFTER LOW CADMIUM CONCENTRATION EXPOSURE

Ghiasi , F.[1], Mirzargar, S.S.[2]*, Salar Amoli, J.[3], Bahonar, A.[4], Ebrahimzadeh Mousavi, H.A.[2]

[1]*Department of Fisheries Sciences, Faculty of Natural Resources, University of Kordestan, Sanandaj-Iran.*

[2]*Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.*

[3]*Toxicology Research Center, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran.*

[4]*Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran.*

(Received 7 March 2009 , Accepted 19 July 2009)

Abstract:

High concentration of heavy metals or long time exposure to low concentrations of these metals can usually decrease the hematological indices in fish. Therefore the aim of this study was to indicate changes in hematology and serum chemistry of common carp (*cyprinus carpio*) after low cadmium concentration exposure. 60 apparently healthy common carp (mean weight of 700g) divided in two groups and transfred to 1000 liter indoor fiberglass tanks under controlled conditions. Treatment group was exposed to low concentration of cadmium (30ppb). Blood were exsanguinated randomly from 5 fish in each group through the caudal vein at days 15 and 30 of exposure. The hematological and biochemical parameters (WBC, RBC, different count, hematocrit, total protein, albumin and globulin concentrations, albumin: globulin ratio, LDH, ALT, and AST) were determined. Results revealed that WBC counts decreased significantly on the 15th day of exposure ($p<0.05$). Furthermore, WBC counts decreased significantly on the 30th day of exposure ($p<0.05$). The levels of LDH after day 30 of exposure, significantly increased in the test group compared to the controll. In the test group, LDH levels significantly increased at the 30th day of exposure. No significant differences have been observed between control and test groups in respect to the other parameters. This study showed that the exposure time for sublethal concentration of cadmium is an important factor for increasing the LDH levels in common carp.

Key words: hematology, biochemistry, common carp, low concentration, cadmium.

***Corresponding author's email: zargarm@ut.ac.ir, Tel: 021-61117187, Fax: 021-66933222**