فصلنامه علمی
دوره۲، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۲، صفحه ۲۲- ۱۱

اثر غلظت‌های تحت کشنده کادمیوم بر برخی شاخص‌های خون‌شناسی بچه ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*)

مرضیه عروجعلی[۱]، فاطمه پیکان حیرتی[۲*]، نصراله محبوبی صوفیانی[۳] و سالار درافشان[۲]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- استادیار، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- استاد، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

دریافت: ۱۳۹۱/۰۹/۲۵ پذیرش : ۱۳۹۲/۰۳/۲۱

* نویسنده مسئول مقاله: تلفن: ۰۳۱۱-۳۹۱۲۸۴۱، E-mail: fheyrati@cc.iut.ac.ir

چکیده:

در یک آزمایش ۲۱ روزه، تاثیر غلظت های تحت کشنده کادمیوم بر برخی شاخص‌های خونی ۶۰ قطعه بچه ماهی استرلیاد با میانگین وزنی ۰/۹۵ ± ۴۱/۶۹ گرم و طولی ۰/۱۴ ± ۲۳/۹۸ سانتی‌متر در ۴ گروه ۱۶، ۳۲ و ۶۴ µg/L وصفر (شاهد) با ۳ تکرار بررسی شد. شاخص‌های اولیه خونی شامل شمارش گلبول‌های قرمز و سفید، هماتوکریت، هموگلوبین، شاخص‌های ثانویه خونی شامل متوسط حجم گلبول قرمز (MCV)، میانگین هموگلوبین هر گلبول قرمز (MCH) و میانگین غلظت هموگلوبین گلبول قرمز (MCHC)، شمارش افتراقی گلبول‌های سفید و نسبت گلبول سفید به گلبول قرمز در پایان دوره ارزیابی شد. از بین عوامل مورد بررسی، تنها دو شاخص هماتوکریت و هموگلوبین در گروه‌های ۳۲µg/L و ۶۴ در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معناداری افزایش یافت (p<۰/۰۵). روند افزایش هموگلوبین با افزایش غلظت آلاینده محسوس بود (p<۰/۰۵). دیگر عوامل خون‌شناسی تفاوتی را در بین گروه‌های آزمایشی نشان نداد (p>۰/۰۵). افزیش معنادار دو شاخص هماتوکریت و هموگلوبین می‌تواند بیانگر ایجاد استرس و اثر مخرب کادمیوم بر بافت‌های خون‌ساز باشد که بررسی تاثیر درازمدت آلودگی کادمیوم را ضروری می‌سازد.

کلید واژه: فلز سنگین، ماهیان خاویاری، فراسنجه‌های خونی

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-05-05]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1392.2.2.5.1]

مقدمه

آلاینده‌های بسیاری هر روز به محیط زیست وارد می‌شوند. فلزهای سنگین به‌عنوان یکی از خطرناک‌ترین آلاینده‌ها در محیط‌های آبی به‌دلیل پایداری‌شان در محیط‌زیست و تمایل‌شان به تجمع در بدن موجودات آبزی مطرح‌اند. فلزهای سنگین به‌طور طبیعی در محیط‌های آبی وجود دارند، اما مقادیر آن‌ها به‌دلیل فعالیت‌های صنعتی، کشاورزی و معدن افزایش یافته است، در نتیجه موجودات آبزی در مواجهه با سطح بالایی از فلزهای سنگین قرار گرفته‌اند.

فلزهای سنگین در ماهیان موجب تغییرات رفتاری از جمله تغییر در راهبردهای تغذیه، شنا، فرار شکار و شکارچی، تولیدمثل، یادگیری، استرس‌های تنفسی، تغییر رشد، تغییر شاخص‌های خونی (Al-Attar, 2005) تجمع در اندام‌های حیاتی (Fatih Fidan et al., 2008)، تغییر در بیان متالوتیونین، اختلال در تنظیم اسمزی و آسیب‌های بافتی (Alvarado et al., 2006) می‌شود. مقدار کشندگی کادمیوم (LC5096 h) در محدوده $0/5\mu g\ dm^{-3}$ تا $mg\ dm^{-3}$ ۲۱/۱ متفاوت است (Vinodhini & Narayanan, 2009). که این مقادیر می‌تواند تحت تأثیر عوامل درونی مانند گونه ماهی و یا سن، چرخه رسیدگی جنسی، بیماری (Vosyliene, 1999) و شرایط بیرونی باشد.

کادمیوم عنصری با عدد اتمی ٤٨ و جرم اتمی ١١٢/٤ متعلق به گروه II واسطه است، این فلز از جمله عناصر فلزی سنگین با وزن مخصوص بیش از ۵ گرم بر سانتی-متر مکعب، (٨/٦٥ برابر بیش‌تر از وزن آب) جز فلزهای نادر و کمیاب و یکی از مهم‌ترین فلزهای سنگین سمی پس از مس و جیوه است (Fatih Fidan et al.,2008). این فلز از طریق حفاری معادن، استخراج و ذوب فلزها، صنایع آب‌کاری فلزها و ساخت PVC که حاوی ترکیبات آلی کادمیوم هستند، به محیط‌های آبی وارد می‌شود (Kaoud et al., 2011).

کادمیوم توانایی تجمع بالایی در موجودات زنده دارد. آبشش، کلیه، مجرای گوارشی و کبد اولین اندام-های هدف برای تجمع کادمیوم هستند. به‌سبب توانایی تجمع بالا، این اندام‌ها متحمل تغییرات پاتوبیولوژیک و بافت‌شناسی می‌شوند. بیش‌ترین تجمع کادمیوم در کلیه گزارش شده است. کلیه حیاتی‌ترین اندام بدن است و نقش مهمی در همئوستازی بدن دارد، در واقع کلیه فقط مسئول بازجذب انتخابی نیست، بلکه در حفظ حجم و pH مایعات بدن و خون نیز مؤثر است. کلیه قدامی به‌عنوان اندام خون‌ساز در ماهیان تلقی می‌شود. رأس کلیه مهم‌ترین محل تولید گلبول‌های قرمز و سفید محسوب می‌شود. مسمومیت با کادمیوم باعث تغییرات دژنره شدن و نکروز سلول‌های لوله‌های کلیوی می‌شود (Jalaludeen et al., 2012).

مطالعات خون‌شناسی اغلب در تشخیص تغییرات فیزیولوژیک موجود زنده در پی مواجهه با استرس‌های محیطی مختلف، به‌عنوان مثال مواجهه با فلزها استفاده می‌شوند. سنجش تغییرات به‌خصوص فراسنجه‌های فیزیولوژیک و عوامل بیوشیمیایی خون ماهیان در مواجهه با آلاینده‌ها، امکان پیش‌بینی آثار مزمن را بر بقا، تولیدمثل و رشد ممکن می‌سازد. بنابراین خون-شناسی می‌تواند به‌عنوان یک شاخص کارا در بررسی وضعیت سلامت کل موجود در نظر گرفته شود (Al-Attar, 2005; Vosyliene, 1999). یون‌های فلزی که از طریق آبشش وارد خون می‌شوند، ممکن است بر سلول‌های خونی اثر بگذارند. کادمیوم در خون ماهی سبب آسیب تمام انواع سلول‌های خونی و عدم تعادل الکترولیتی پلاسما می‌شود. همچنین کادمیوم با اثر روی

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-05-05]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1392.2.2.5.1]

غشا و هسته موجب تغییرات مورفولوژیک سلول‌های خونی، از بین رفتن غشای سلولی، منقوط شدن بازوفیلیک سیتوپلاسم، تجمع مواد کروماتینی و خارج شدن بخشی از هسته از غشای سلول می‌شود. برخی گزارش‌ها حاکی از کاهش تعداد گلبول‌های سفید، افزایش نابودی لنفوسیت‌ها و در نتیجه کاهش توانایی فاگوسیتوز گلبول‌های سفید در اثر کادمیوم است (Witeska et al., 2006).

پس از قرار گرفتن تاسماهیان در فهرست کنوانسیون بین‌المللی، نظارت بر گونه‌های در معرض خطر انقراض و کاهش صید آن‌ها، توجه برخی کشورها به پرورش ماهیان خاویاری معطوف شد.

استرلیاد *Acipenser ruthenus*، یکی از انواع ماهیان خاویاری ساکن در آب شیرین روسیه است که امروزه برای توسعه و ترویج آبزی‌پروری به بسیاری مناطق دنیا از جمله ایران معرفی شده است (Tatina et al., 2010). از عوامل اثرگذار در کاهش ماهیان خاویاری در خزر، آلودگی محیطی گزارش شده است. بنابراین با توجه به اهمیت استرلیاد و همچنین وجود گزارش‌های متعدد درخصوص افزایش نگرانی‌های حاصل از ورود حجم قابل توجهی از آلاینده‌ها به دریای خزر، افزایش بیش از حد غلظت آلاینده‌ها به‌ویژه فلزهای سنگین در رودخانه‌های حوضه جنوبی، مصب‌ها و رسوبات ساحلی جنوبی دریای خزر (Zahedi et al., 2011) و محدودیت این نوع مطالعات بر ماهیان غضروفی-استخوانی، این مطالعه به‌منظور ارزیابی آثار آلودگی آب به فلز سنگین کادمیوم بر شاخص‌های هماتولوژیک استرلیاد طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌کار

تعداد ٦٠ قطعه بچه ماهی استرلیاد با وزن متوسط ٠/٩٥٧ ± ٤١/٦٩ گرم و طول ٠/١٤ ± ٢٣/٩٨ سانتی-متر (mean ± SE) از مرکز تکثیر و پرورش استان اصفهان به مزارع پرورش ماهی گروه شیلات دانشگاه صنعتی اصفهان منتقل شد. پس از گذشت یک هفته، غذادهی به میزان ٢ درصد وزن بدن و دو بار در روز (در ساعت ٩ صبح و ٤ بعد از ظهر) با غذای پلت تجاری GFT1[1] مخصوص قزل‌آلای رنگین‌کمان ساخت شرکت فرادانه انجام گرفت. بچه‌ماهیان برای آداپتاسیون به‌مدت ١٠ روز تا پیشاز آزمایش بهینه نگهداری شدند. شرایط مسمومیت مصنوعی با کلرید کادمیوم مطابق دستورالعمل (Alvarado et al., 2006) با کمی تغییرات به شرح زیر صورت گرفت. برای ایجاد مسمومیت از کلرید کادمیوم منوهیدراته ($CdCl_2$ H_2o)، ساخت شرکت مرک آلمان استفاده شد. محلول استوک با انحلال کلرید کادمیوم محاسبه شده در ١٠٠٠ میلی‌لیتر آب مقطر تهیه و برای دستیابی به غلظت مورد نظر، حجم مشخصی از استوک برداشته شد. آزمایش سمیت در شرایط آزمایشگاهی نیمه ثابت انجام گرفت و میزان کلرید کادمیوم خارج شده محاسبه و روزانه این مقدار از طریق ظروف حاوی استوک تعبیه شده برای هر تیمار جبران می‌شد (Alvarado et al.,2006). تعداد ١٥ قطعه بچه ماهی برای هر غلظت، ٥ ماهی در هر تکرار (٣ تیمار با ٣ تکرار) در نظر گرفته شد. مقدار مصرفی کادمیوم در تیمارها عبارتند از: صفر (گروه شاهد)، ١٦، ٣٢ و ٦٤ میگروگرم بر لیتر که به‌ترتیب با کدهای ٠cd، ١٦cd، ٣٢cd و ٦٤cd مشخص شد. دوز تحت کشنده کادمیوم در این مطالعه بر اساس یافته‌های دیگر محققان

1. Growth Food Trout

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-05-05]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1392.2.2.5.1]

درخصوص تعیین LC50 96h کادمیوم برای ماهی شیپ *Acipenser nudiventris* تعیین شد (Mohamad Nezhad Shamshoki et al., 2004). عوامل کیفی آب نظیر اکسیژن محلول، درجه حرارت، pH و EC به‌طور روزانه و میزان نیترات، فسفات، قلیائیت، سختی (Radojevic & Bashkin, 1998) و میزان کادمیوم محلول (Standard method, 1999) به‌صورت هفتگی اندازه‌گیری شدند. غذادهی در مدت آزمایش سمیت دو بار در روز به میزان ۲ درصد وزن بدن در ساعات ۹ صبح و ٤ بعد از ظهر صورت گرفت. خون‌گیری از ماهیان در پایان ۲۱ روز پس از بیهوش کردن ماهیان با MS222 با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از ناحیه پشتی باله مخرجی، با استفاده از سرنگ ۲/۵ میلی-لیتری آغشته به ماده ضدانعقاد EDTA پنج درصد انجام شد. ظروف حاوی نمونه‌های خون ماهیان در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل و شاخص‌های خون-شناسی اندازه‌گیری شدند.

ویژگی‌های مرسوم خون‌شناسی نظیر تعداد گلبول‌های قرمز و سفید با استفاده از لام نئوبار و استفاده از محلول دیس (شامل رنگ بریلیانت کریزل آبی (۰/۰۱ گرم)، سیترات سدیم (۳/۸ گرم)، فرمالین ۳۷ درصد (۰/۲ میلی‌لیتر) و آب مقطر تا حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر) و پیپت ملانژور قرمز و سفید (برحسب مورد) تعیین شد. درصد هماتوکریت Hct با پر کردن لوله‌های میکروهماتوکریت به میزان حداقل ۲/۳ حجم لوله از خون کامل و سانتریفیوژ ۵ دقیقه در ۷۰۰۰rpm تعیین گردید. میزان هموگلوبین Hb (گرم در دسی‌لیتر)، با استفاده از روش سیانومت هموگلوبین Cyanomethemoglobin در طول موج ٥٤٠ نانومتر اندازه‌گیری شد (Houston, 1990). براساس این روش، ابتدا مقداری از محلول سیانید و پتاسیم فری سیانید، به‌عنوان ماده لیزکننده به نمونه اضافه می‌شود. سیانید آهن، آهن هموگلوبین را از حالت فرو $(Fe)^{2+}$ به حالت فریک $(Fe)^{3+}$ تبدیل کرده و مت هموگلوبین ایجاد می‌کند که با سیانیدپتاسیم ترکیب می-شود و رنگدانه پایدار «سیان مت هموگلوبین» را تولید می‌کند. چگالی نوری محلول با روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری می‌شود که مقدار به‌دست آمده متناسب با غلظت هموگلوبین است (Kazemi et al., 2010). به‌منظور شمارش افتراقی گلبول‌های سفید لام اسمیر (گسترش خونی) تهیه و سپس با رنگ‌آمیزی به‌وسیله محلول گیمسا سلول‌های خونی قابل شناسایی شدند. شمارش افتراقی گلبول‌ها با استفاده گسترش خونی رنگ-آمیزی شده و مطابق شکل گلبول‌ها با کلید شناسایی مرتبط صورت گرفت (Kazemi et al., 2010)

شاخص‌های ثانویه خون‌شناسی شامل حجم متوسط گلبول‌های قرمز (MCV)، مقدار متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MCH) و غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MCHC) براساس روابط زیر نیز محاسبه شد (Al-Attar, 2005).

$$MCV\ (\mu m^3) = Hct/RBC \times 10$$
$$MCH\ (pg/cell) = Hb/RBC \times 10$$
$$MCHC\ (g/dl) = Hb/Hct \times 100$$

برای مقایسه‌های آماری، ابتدا پراکنش طبیعی داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف–اسمیرنف سنجیده شد.در صورت طبیعی نبودن داده‌ها، نسبت به انجام آن با روش‌های استاندارد اقدام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS، از طریق آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون چند دامنه دانکن صورت گرفت. سطح معناداری در تمام آزمون‌ها $p < ۰/۰۵$ و داده‌ها به‌صورت mean ± SE بیان شد. برای

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-05-05]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1392.2.2.5.1]

رسم نمودارها از نرم افزار Excel (2007) استفاده گردید.

نتایج

وزن و طول ماهیان پس از بیهوشی با MS222 با غلظت ppm ۱۰۰ به‌ترتیب ۰/۹۵ ± ۴۱/۶۹ گرم و ۰/۱۴ ± ۲۳/۹۸ سانتی‌متر به‌دست آمد. طی مدت آزمایش اکسیژن محلول ۰/۰۷mg/lit ± ۷-۶/۵، درجه حرارت ۱/۱ ± ۱۳/۲۵درجه سانتی‌گراد، pH ۰/۰۲ ± ۸/۴۳، EC آب ۰/۹۸ ± ۴۵۵ میکروزیمنس، سختی آب ۱/۲۹ ± ۱۷۵میلی‌گرم در لیتر کربنات کلسیم، نیترات ۰/۳۵ ± ۲/۱۶ و فسفات ۰/۰۰۳ ± ۰/۰۱۶ بر حسب میلی‌گرم در لیترو قلیائیت ۱/۷۲ ± ۱۱۰/۳۶ میلی‌گرم بر لیتر بود.

تعداد گلبول‌های قرمز خون در گستره ۲۹۱۰۰۰۰-۲۴۱۴۹۰۰ به‌ازای هر میلی‌متر مکعب اندازه‌گیری شد (جدول ۱). اگرچه مقادیر این شاخص، افزایش تدریجی ازCd۰ تا Cd٦٤ را نشان داد، اما مقایسه آماری تفاوت معناداری را بین تعداد گلبول‌های قرمز خون در گروه-های مختلف آزمایشی نشان نداد (جدول ۱، $p > ۰/۰۵$). مقایسه تعداد گلبول سفید در بین گروه‌های مختلف آزمایشی، افزایش نسبی این شاخص را در گروه Cd١٦، ۵۴۳۰/٦٤ ± ۲۲۲۵۵ سلول در میلی‌متر مکعب در مقایسه با دیگر گروه‌های آزمایشی را نشان داد، اما مقایسه آماری قادر به تعیین تفاوت معنادار بین گروه‌ها نبود (جدول ۱، $p > ۰/۰۵$). مقادیر هماتوکریت (درصد) در بین گروه‌های مختلف آزمایشی تفاوت معناداری را نشان داد (شکل ۱، $p <۰/۰۵$) به‌طوری که بیش‌ترین مقدار هماتوکریت ۱/۹۱ ± ۳۰/۵۷ درصد در گروه Cd٦٤ و کم‌ترین آن ۱/۲۲ ± ۲۴/۷۸درصد در گروه Cd۰ (شاهد) اندازه‌گیری شد (شکل ۱، $p <۰/۰۵$). مقادیر هماتوکریت در گروه Cd١٦ معادل ۰/٦٦ ± ۲۸/٦٨درصد اندازه‌گیری شد که اختلاف معناداری را با دیگر گروه‌های آزمایشی نشان نداد (شکل۱ ،$p > ۰/۰۵$). مقادیر هموگلوبین (g/dl) در گستره ۱۰/۴۷-۸/۲۴ قرار داشت (شکل ۱). روند افزایشی مقادیر هموگلوبین با افزایش غلظت آلاینده محسوس بود به‌طوری که بیش‌ترین مقادیر هموگلوبین خون در گروه‌های Cd۳۲ و Cd٦٤ به‌ترتیب معادل ۰/٦۳ ± ۱۰/۰۱ و ۰/۵۷ ± ۱۰/۴۷ اندازه‌گیری شد که به‌طور معناداری بیش‌تر از گروه Cd۰ (شاهد) ۰/۳۸ ± ۸/۴۲ بود (شکل ۱، $p < ۰/۰۵$).

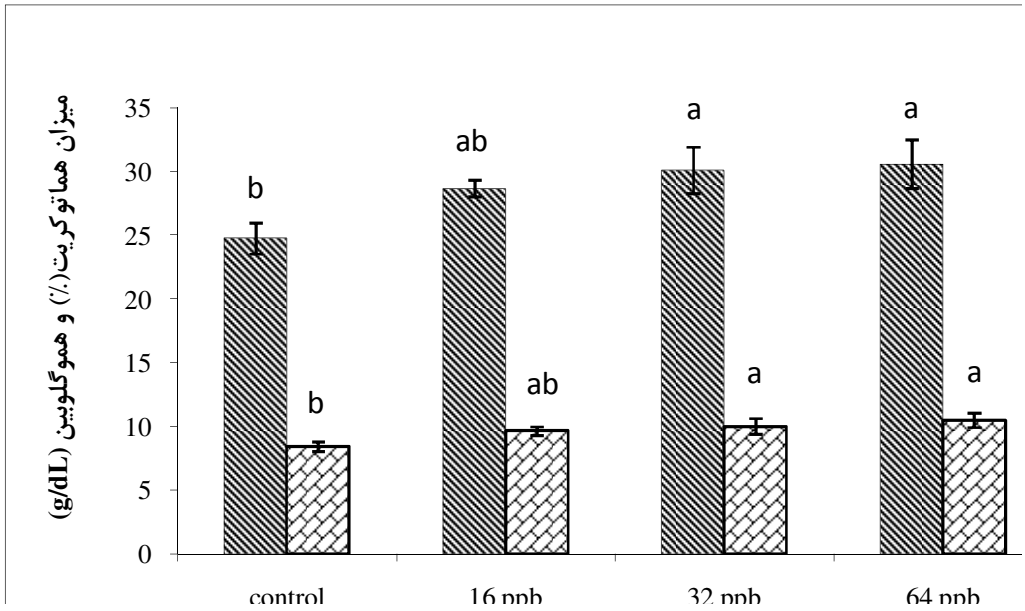
در گسترش خونی رنگ‌آمیزی شده با گیمسا، انواع گلبول‌های سفید شامل لنفوسیت، منوسیت، نوتروفیل، بازوفیل و ائوزینوفیل براساس شکل هسته و نوع رنگ‌آمیزی قابل تفکیک بودند (شکل ۲). به‌طور کلی لنفوسیت‌ها بخش اعظم گلبول‌های سفید خون حدود ۸۸ درصد را به خود اختصاص داده‌اند (جدول ۲). پس از لنفوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها در محدوده ۹- ۷/۸ درصد از کل گلبول‌های سفید را به خود اختصاص دادند (جدول ۲). سه دسته دیگر گلبول‌های سفید شامل منوسیت، ائوزینوفیل و بازوفیل فراوانی اندکی (حدود ۱ درصد برای هر دسته) به خود اختصاص داده‌اند (جدول ۲). بررسی آماری نشان داد که اختلاف معناداری در هیچ‌یک از انواع گلبول‌های سفید بین گروه‌های آزمایشی وجود نداشت (جدول ۲، $p>۰/۰۵$).

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-05-05]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1392.2.2.5.1]

جدول ۱ میانگین ± انحراف معیار(mean ± SE) شاخصه‌های خون‌شناسی در استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) تحت تأثیر غلظت‌های تحت کشنده با کادمیوم.

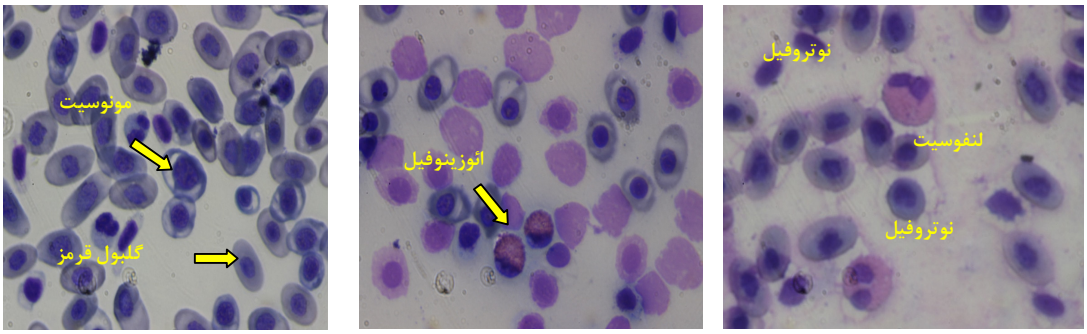
شاخص / گروه‌های آزمایشی (غلظت کادمیوم)	شاهد (Cd)	۱۶ Cd	۳۲ Cd	٦٤ Cd
تعداد گلبول قرمز (mm^{-3})	۲٤۱٤۹۰۰±۱۰۷۰۹٦	۲۷۷۲۰۰۰±۲۱۳۰٤٦	۲۸٦۹۵۰۰±۲٤۰۳۹٤	۲۹۱۰۰۰۰±۱۹۵۱۹۲
تعداد گلبول سفید (mm^{-3})	۱۲۱۲۰±۲۸۸۸/٤۲	۲۲۲۵۵±۵٤۳۰/٦٤	۱٤۹۸۵±۲۹۵۸/٤۱	۱٤۲٦۰±۳۸۲۰/۹۷
MCV (فمتولیتر)	۱۰۲/٤۸±٤۳/۲٤	۱۰۳/۲٦±۷۱/۲۳	۱۰۹/۱۸±٤۷/۵٤	۱۰۵/٦۲±۳۵/۹۸
MCH (پیکوگرم/سلول)	۳٤/۹۱±۱۹/۱٤	۳٤/۷۷±۲٤/۳۲	۳٦/۳۸±۱۵/۰۳	۳٦/۲٦±۲۱/۸۵
MCHC(g/100ml)	۳٤/۰۵±۰/٤۹	۳۳/٦±۰/۱۵	۳۳/۲۱±۰/٤۸	۳٤/٤۸±۰/٦۱
نسبت گلبول سفید به گلبول قرمز (درصد)	۰/۵۲±۰/۰۹	۰/۸۳±۰/۲۱	۰/٦٤±۰/۱۹	۰/۵۵±۰/۱٦



شکل ۱ میانگین مقادیر هماتوکریت (Hct درصد) و هموگلوبین (Hb g/dL). وجود حداقل یک حرف مشابه در هر شاخص بیانگر نبود اختلاف معنادار است (p>۰/۰۵).

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-05-05]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1392.2.2.5.1]



شکل ۲ گسترش خونی تهیه شده از خون بچه ماهی خاویاری، انواع گلبول‌های سفید و قرمز در شکل دیده می‌شود. (بزرگ‌نمایی ٤٠٠ برابر).

جدول ۲ میانگین ± انحراف معیار (mean ± SE) درصد انواع گلبول‌های سفید در استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) تحت تأثیر غلظت‌های تحت کشنده با کادمیوم.

گروه‌های آزمایشی (غلظت کادمیوم) / شاخص	شاهد (Cd)	١٦ Cd	٣٢ Cd	٦٤ Cd
لنفوسیت (درصد)	٨٨/٢١±٠/٤٦	٨٧/٨٢±٠/٨٦	٨٨/٤٠±٠/٨٩	٨٨/٨٠±٠/٧٥
مونوسیت (درصد)	١/٣٠±٠/٢١	٠/٨±٠/٢	١±٠/٢١	٠/٩±٠/٢٧
نوتروفیل (درصد)	٨/٢٠±٠/٥٩	٨/٩٠±٠/٩٢	٩±٠/٧١	٧/٨١±٠/٦٧
ائوزینوفیل (درصد)	١±٠/٢١	١/٤٠±٠/٢٢	١±٠/١٤	١/٣٠±٠/٢١
بازوفیل (درصد)	١/٤٠±٠/٣	١/٥٠±٠/٢٦	١/٢٠±٠/٢	١/٢٠±٠/٢٩

در مقایسه شاخص‌های ثانویه خون‌شناسی شامل MCV، MCH و MCHC، افزایش جزئی در حجم گلبول قرمز (MCV) از گروه شاهد به گروه ٦٤Cd مشاهده شد (جدول ١). اگر چه مقایسه آماری تفاوت معناداری را در این شاخص بین گروه‌های آزمایشی نشان نداد (جدول ١، $p>0/05$) اما میزان هموگلوبین گلبولی در گلبول‌های قرمز در گستره ٣٦/٣٨ – ٣٤/٧٧ پیکوگرم در هر سلول قرار داشت. اگر چه همانند MCV، روند افزایشی جزئی در این شاخص از گروه شاهد به ٦٤Cd مشاهده شد، اما همانند قبل این تغییرات نیز معنادار نبود (جدول ١، $p>0/05$). مقادیر MCHC بر حسب g/dl محاسبه شد. نتایج نشان داد که مقادیر این شاخص در گستره ٣٤/٤٨ – ٣٣/٢١ قرار داشت و از نظر این شاخص نیز تفاوت معناداری بین گروه‌های مختلف آزمایشی مشاهده نشد (جدول ١، $p>0/05$). نسبت تعداد گلبول‌های سفید به گلبول قرمز ٠/٨– ٠/٥درصد بود. با این وجود این نسبت نیز تفاوت معناداری را بین گروه‌های مختلف آزمایشی نشان نداد (جدول ١، $p>0/05$).

بحث

کادمیوم عنصری غیرضروری است که در مقادیر بیش از حد مجاز می‌تواند موجب آثار سمی مهلکی بر ارگانیسم-های آبی شود. مسمومیت با کادمیوم طیف وسیعی از آثار پاتولوژیک را در آن‌ها ایجاد می‌کند. به‌طور کلی فلزهای

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-05-05]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1392.2.2.5.1]

سنگین در شرایط مختلف با مقادیر متفاوت، موجب بروز تغییرات گوناگون در شاخص‌های خونی و پاسخ‌های ایمنی می‌شود که بررسی آن‌ها می‌تواند در مطالعه آلودگی‌های منابع آبی و تشخیص و پیشگیری از مسمومیت‌های محیطی به‌کار رود. با این وجود تغییر عوامل خونی بسیار متأثر از وضعیت فیزیولوژیک آبزی و عواملی چون گونه ماهی، سن، بلوغ جنسی، بروز بیماری‌ها و حضور آلاینده‌هاست (Houston, 1990; Kazemi et al., 2010).

درخصوص تأثیر فلزهای سنگین بر تعداد گلبول‌های قرمز، هماتوکریت و میزان هموگلوبین در ماهیان گزارش‌های متناقضی منتشر شده است.افزایش تعداد گلبول قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین در سگ ماهی *Scyliorhinus canicula* تیمار شده با ۵۰ میلی‌گرم در لیتر پس از ٤ روز در معرض قرارگیری با کادمیوم در مقایسه با گروه شاهد (Tort & Hernandez-Pacual, 1990) و افزایش تنها تعداد گلبول قرمز درلای ماهی *Tinca tinca* تیمار شده با ٤/٥ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم با ٩٦ ساعت مواجهه (Witeska, 2006) گزارش شده است. کاهش تعداد گلبول قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین در ماهی فلاندر *Pleuronectes flesus* تیمار شده با غلظت ٥، ٥٠ و ٥٠٠ میکروگرم بر لیتر کادمیوم به‌مدت ٤ و ٩ هفته (Johansson-Sjobeck & Larsson, 1978) و در تیلاپیا *Oreochromis niloticus* تیمار شده با ٥/٥ میلی‌گرم بر لیتر کادمیوم برای مدت ١، ٣ و ٥ هفته(Al-Attar, 2005) گزارش شده است. در حالی‌که عدم تغییر در تعداد گلبول قرمز فلاندر زمستانی *Pseudopleuronectes americanus* در مواجهه با کادمیوم با غلظت‌های ٥-١٠ میکروگرم بر لیتر به‌مدت ٦٠ روز (Calabrese et al., 1975) نیز گزارش شده است.به‌طور کلی، تعداد گلبول‌های قرمز خون در گونه‌های مختلف متفاوت است. این مطالعه افزایش تدریجی بدون تغییر معنادار در تعداد گلبول‌های قرمز مشاهده شد (جدول ١).

افزایش تدریجی در تعداد گلبول قرمز می‌تواند به‌دلیل اختلال خفیف در آبشش و کاهش اکسیژن جذبی و در نتیجه افزایش نیاز اکسیژنی ماهی در شرایط استرس باشد (Witeska, 2006).در آزمایش حاضر، میزان هموگلوبین و هماتوکریت به‌طور معناداری با افزایش غلظت آلاینده افزایش یافت. اگرچه افزایش میزان هماتوکریت یا هموگلوبین در وهله اول می‌تواند متأثر از افزایش تعداد گلبول‌های قرمز خون باشد (Sandnes et al., 1987)، اما به‌دلیل آن‌که در این تحقیق میزان گلبول‌های قرمز تغییرات معناداری را نشان نداده‌اند، نمی‌توان از این توجیه برای توصیف افزایش هماتوکریت و هموگلوبین بهره برد. به‌نظر می‌رسد افزایش نیاز اکسیژنی ماهی در مواجه با آلودگی همراه با اثر مخرب کادمیوم بر ساختار آبشش (Orojalai, 2012) و کاهش امکان جذب اکسیژن منجر به افزایش فعالیت بافت‌های خون‌ساز و به‌تبع آن افزایش میزان هموگلوبین و هماتوکریت خون شود. از طرف دیگر، شاید تخریب ساختار بافت‌های خون‌ساز نظیر بخش قدامی کلیه در بروز تغییرات در شاخص‌های هماتولوژیک مؤثر باشد، اگرچه در این تحقیق، این آثار ارزیابی نشدند.

تعداد گلبول‌های سفید در ماهیان معمولاً در گستره ٢٠٠٠٠ تا ١٥٠٠٠٠ عدد در میلی‌متر مکعب قرار دارد با این وجود، اتفاق نظر دقیقی در خصوص تعداد مطلق این نوع سلول‌های خونی در ماهیان وجود ندارد (Kazemi et al., 2010). این پدیده می‌تواند به‌دلیل تغییر در شرایط زیستی گونه‌های مختلف ماهی، یا حتی با توجه به سن و شرایط رسیدگی جنسی تغییر کند. گروه‌های مختلف گلبول‌های سفید مشاهده شده در این تحقیق، معمولاً در ماهیان قابل تشخیص هستند. معمولاً لنفوسیت و نوتروفیل دو دسته اصلی سلول‌های سفید خون، به‌ترتیب عملکرد ایجاد سازوکار ایمنی از طریق تولید پادتن و عمل فاگوسیتوز فعال را بر عهده دارند. منوسیت‌ها، ائوزینوفیل‌ها و بازوفیل‌ها هر

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-05-05]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1392.2.2.5.1]

یک نقش‌های متفاوتی نظیر بیگانه‌خواری، ترشح هیستامین و ایجاد حالت ضد حساسیت دارند و به‌طور کلی مقاومت در برابر عوامل بیگانه را ایفا می‌کنند (Houston, 1990). اگرچه در این تحقیق نسبت انواع گلبول‌های سفید در مواجه با غلظت‌های مختلف کادمیوم تغییر نیافت، اما ممکن است در شرایط بروز استرس و هجوم عوامل بیماری‌زا، ماهی قادر به بروز پاسخ مناسب علیه عوامل نباشد. نتیجه‌گیری قطعی در این خصوص نیازمند مطالعات تکمیلی و چالش ماهی با عوامل بیماری‌زاست.

در این مطالعه، تعداد گلبول‌های سفید در بین گروه‌ها، تغییر معناداری را پس از ۲۱ روز در معرض‌گذاری با غلظت‌های تحت کشنده با کادمیوم نشان نداد. با این وجود، اغلب گزارش‌ها بیانگر کاهش تعداد گلبول‌های سفید در مواجهه با آلودگی با فلزهای سنگین نظیر کادمیوم به‌دلیل تخریب بافت خون‌ساز ماهی است، از آن جمله می‌توان به گزارش‌های موجود برای قزل‌آلای رنگین‌کمان *Oncorhynchus mykiss* (Thuvander, 1989) و *Dicentrarchus labrax* (Lemaire- Gony et al., 1995) اشاره کرد. کاهش در تعداد گلبول‌های قرمز در ماهی *Heteropneustes fossilis* در مواجهه با کادمیوم نیز مشاهده شد. در واقع با ترشح کورتیزول در طی استرس تکثیرلنفوسیت‌ها کاهش یافت، کورتیزول نیز بر ترومبوسیت‌ها اثر گذاشته و تعداد آن‌ها را نیز کاهش داده است (Radhakrishnan, 2010). در کپور معمولی میزان ترومبوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها در مواجهه با کادمیوم مشاهده شد (witeska, 2001) در ماهی *Tinca tinca* در مواجهه کوتاه مدت کادمیوم نیز تغییر معناداری در تعداد ترمبوسیت‌ها رخ نداد (Witeska, 2006). افزایش تعداد گلبول‌های سفید در ماهی *Channa orientalis* در مواجهه با کادمیوم گزارش شده است که علت افزایش را افزایش لکوسیت‌ها و نقش آن‌ها در دفاع ایمنی بدن بیان کردند (Borane, 2013). با این وجود Jahnsson-Sjobck و Larsson (۱۹۸۷) بیان کردند که تغییر تعداد گلبول‌های سفید بسیار متأثر از دوره در معرض‌گذاری با کادمیوم است، به‌طوری که با تغییر زمان در معرض‌گذاری در فلاندر زمستانی، تغییرات افزایشی یا کاهشی در تعداد گلبول‌های سفید مشاهده شد. نبود اختلاف معنادار تعداد گلبول‌های سفید و نوع آن‌ها در بین تیمارهای مختلف شاید به‌دلیل کوتاه بودن دوره در معرض‌گذاری یا مقدار اندک ماده آلاینده بوده است، به‌طوری که شاید هنوز اختلالی در بافت‌های خون‌ساز ماهی ایجاد نشده باشد. اگر چه این اظهارنظر نیازمند بررسی تکمیلی بافت‌های خون‌ساز نظیر بخش قدامی کلیه است.

افزایش متناسب MCV و MCH در گروه‌های مختلف آزمایشی در جدول ۱ می‌تواند بیانگر این مسئله باشد که افزایش حجم گلبولی به‌دلیل افزایش محتوای هموگلوبین گلبولی رخ داده است.با این وجود در مطالعه حاضر، هیچ یک از شاخص‌های ثانویه خون‌شناسیMCV، MCH وMCHC تحت تأثیر کامیوم قرار نگرفتند. Johansson-Sjobeck & Larsson (۱۹۷۸) نیز عدم بروز تغییرات در این سه شاخص خونی را برای ماهی فلاندر *P. flesus* گزارش کرد. با این وجود کاهش MCV، MCH و MCHC در تیلاپیای نیل *O. niloticus* در مواجهه با کادمیوم مشاهده شد که علت آن برای MCV، به رهاسازی سلول‌های خونی نابالغ از بافت‌های خون‌ساز و برای کاهش MCH و MCHC، به‌ترتیب به افزایش گلبول‌های قرمز خون همراه با کاهش محتوای هموگلوبین و کاهش میزان دو شاخصه هماتوکریت و هموگلوبین نسبت داده شد (Atef & Attar, 2005).

اکثر اندازه‌گیری‌های متداول خون‌شناسی در طی استرس شامل تعداد سلول‌های خونی قرمز و سفید، مقدار

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-05-05]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1392.2.2.5.1]

هماتوکریت و هموگلوبین و شاخص‌های ثانویه خون است. در مطالعات خون‌شناسی انجام شده روی اثر کادمیوم در ماهیان استخوانی، نتایج متفاوتی به‌دست آمده که می‌تواند به‌دلیل نوع گونه، زمان مواجهه، غلظت فلز و دیگر شرایط فیزیکوشیمایی آب باشد. برای نتیجه‌گیری کلی این تحقیق می‌توان بیان کرد با توجه به این‌که کلیه قدامی بافت اصلی خون‌ساز در ماهیان است، کادمیوم در کلیه تجمع می‌یابد و منجر به دژنره شدن این بخش حیاتی می‌شود. در نتیجه کادمیوم بر تولید و رهاسازی گلبول‌های قرمز و سفید نیز اثر گذاشته و به دلیل استرس ناشی از آلودگی کادمیوم، کورتیزول ترشح می‌شود که این هورمون نیز در کاهش میزان تکثیر و رهاسازی لنفوسیت‌ها و ترمبوسیت‌ها نقش دارد (Radhakrishnan, 2010). در این مطالعه مشخص شد حضور کادمیوم محلول در آب در غلظت‌های بسیار اندک باعث مرگ ماهی نمی‌شود، اما منجر به بروز اختلالاتی در شاخص‌های خونی می‌شود. این احتمال وجود دارد که تحمیل شرایط استرسی توأم با حضور فلز سنگین نظیر درجه حرارت بالا، شناگری زیاد و کمبود اکسیژن به‌همراه آثار سوء ناشی از در معرض‌گذاری با کادمیوم بر شاخص‌های خونی، منجر به کاهش قابلیت حیات و در نهایت تلفات آبزی شود. پیشنهاد می‌گردد آثار توأم آلاینده-های محیط زیستی نظیر کادمیوم همراه با حضور سایر عوامل استرس‌زا، نظیر بیهوشی، تراکم، کمبود اکسیژن و درجه حرارت بالا ارزیابی شود.

منابع

Alvarado, N. E., Quesada, I., Hylland, K., Marigomez, I. and Soto, M. 2006. Quantitative changes in metallothionein expression in target cell-types in the gills of turbot *Scophthalmus maximus* exposed to Cd, Cu, Zn and after a depuration treatment. *Aquatic Toxicology*, 77: 64-77.

Al-Attar, A. M. 2005. Changes in haematological parameters of the fish, *Oreochromis niloticus* treated with sublethal concentration of cadmium. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 8: 421-424.

American Public Health Association, American Water Works Association. 1999. Standard methods for the examination of water and wastewater. Water Environment Federation.

Borane, V. R. 2013. Protective role of ascorbic acid on the cadmium induced changes in hematology of the freshwater fish, *Channa orientalis* (Schneider). *Advances in Applied Science Research*, 4(2): 305-308.

Calabrese, A., Thurberg, F. P., Dawson, M. A. and Wenzloff, D. R. 1975. Sublethal physiologicalstress induced by cadmium and mercury in the winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*.In Sublethal Effects of Toxic Chemicals on Aquatic Animals, (J. H. Koeman and J. J. T. W. A. Strik, Eds.), 15-21.

Radojevic, M. and Bashkin, V. N. 1998. Pratical environmental analysis. RSC publication, 466 p.

Fatih Fidan, A., Hakki Cigerci, I., Konuk, M., Kucukkurt, I., Aslan, R. and Dundar, Y. 2008. Determination of some heavy metal levels and oxidative status in *Carassius carassius* L., 1758 from Eber Lake. *Environmental Monitoring and* Assessment, 147: 35-41.

Houston, A. H. 1990. Blood and circulation in method for fish biology. edited by C.B. Schreck and P.B. Moyle. American Fisheries Society Bethesda, Maryland, USA, 273-334 pp.

Johansson-Sjobeck, M. L. and Larsson, A. 1978. The effects of cadmium on the hematology and on the activity of delta-aminolevulic acid dehydrates (ALAD) in blood and hematopoietic tissues of the flounder *Pleuronectes flesus*. *Environmental Research*, 17: 1991-2004.

Jalaludeen, M. D., Arunachalam, M., Raja, M., Nandagopal, S., Showket Ahmad Bhat, Sundar, S.,Palanimuthu, D. 2012. Histopathology of the gill, liver and kidney tissues of the freshwater fish tilapia mossambica exposed to cadmium sulphate. *International Journal of Advanced Biological Research*, 2 (4): 572-578

Kaoud, H. A., Zaki, M. M., El-Dahshan, A. R., Sherein, S. and El Zorba, Y. 2011. Amelioration the toxic effects of cadmium-exposure in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* by using *Lemna gibba* L., *Life Science Journal*, 8:185-195.

Kazemi, R., Pourdehghani, M., Yousefi Jourdehi, A., Yarmohammadi, M. and Nasri Tajan, M. 2010. Cardiovascular System

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-05-05]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1392.2.2.5.1]

Tort, L. and Hernandez-Pascual, M. D. 1990. Haematological effects in dogfish *Scyliorhinus canicula* after short-term sublethal cadmium exposure. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 18: 379-383.

Thuvander, A. 1989. Cadmium exposure of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson: effects on immune functions. *Journal of Fish Biology*, 35: 521-529.

Vinodhini, R. and Narayanan, M. 2009. The impact of toxic heavy metals on the heamatological parameters in common carp *Cyprinus carpio* L. Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering, 6: 23-28.

Vosyliene, M. Z. 1999. The effect of heavymetals on haematological indices of fish. *Acta Zoologica Lituanica Hydrobiologia*, 9: 76-82.

Witeska, M., Jezierska, B. and Wolnicki, J. 2006. Respiratory and hematological response of tench, *Tinca tinca* (L.) to a short-term cadmium exposure. *Aquaculture International*, 14: 141-152.

Witeska, M. 2001. Changes in the common carp blood cell picture after acute exposure to cadmium. *Acta Zoologica Lituanica*, Volumen 11, Numerus 4: 366-371.

Zahedi, S., Mirvaghefi, A. R., Rafiee,Gh. R., Mojazi Amiri, B., Hedayati, M., Makhdoomi, Ch. And Zarei Dengasraki, M. 2011. The effects of exposure to sub-lethal copper and cadmiumconcentrations on biochemical factors of one year oldPersian sturgeon, *Acipenser persicus*. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 20: 61-72.

Physiology of Aquatic Animals and Applied Techniqes of Fish Haematology. Bazargan, 194 p.

Lemaire-Gony, S., Lemaire, P. and Pulsford, A. L. 1995. Effects of cadmium and benzo (a) pyrene on the immune system, gill ATPase and EROD activity of European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquatic Toxicology*, 31: 297-313.

Mohamad Shamshoki, M., Nezami Balochi, Sh., Esmaili Sari, A., Khara, H. and Pazhand, Z. 2004. Determination of lethal concentration sublethal LC50 96 the heavy metals lead, zinc and cadmium on fish *Acipenser nudiventris*. *Journal of Marine Science and Technology*, 9 p.

Orojali, M. 2012. The Sublethal Effects of cadmium on Some Hematological Parameters and Gill Histopathology in Sterlet (*Acipenser ruthenus*). M.Sc. Thesis, Departent of Natural Resources, Isfahan University of Technology, 81 pages.

Radhakrishnan, M. V. 2010. Immunological effect of cadmium in *Heteropneustes fossilis* bloch. *Global veterinaria*, 4 (6): 544-547.

Sandnes, K., Lio, O. and Waagboe, R. 1987. Normal range of some blood chemistry parameters in adult formed Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Journal of Fish Biology*, 32: 129-135.

Tatina M., Bahmani M., Soltani M., Abtahi, B. and Gharibkhani M., 2010. Effect of different levels of dietary vitamins C and E on some of haematological and biochemical parameters of sterlet *Acipenser ruthenus*. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 5: 1-11.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-05-05]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1392.2.2.5.1]

Cadmium sub-lethal concentration effects on the haematological parameters of sterlet (*Acipenser ruthenus*)

Marziyeh Orojali[1], Fatemeh Paykan Heyrati[*2], Nassrollah Mahboobi Soofiani[3] and Salar Dorafshan[2]

1- Graduated M.Sc.student, Fisheries Department, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
2- Assistant Professor, Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
3- Professor, Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

Received: 15.12.2012 Accepted: 11.06.2013

*Corresponding author: 0311-3912841, e-mail: fheyrati@cc.iut.ac.ir

Abstract: The effect of sublethal concentrations of cadmium on some haematological parameters of juvenile sterlet, *Acipenser ruthenus*. For this purpose, 60 fish (41.69 ± 0.95 g and 23.98 ± 0.14 cm) were randomly divided into four experimental groups and exposed to 0 (control), 16, 32 and 64 µg/L Cd concentration, each in 3 replicates for 21 days. The hematological parameters, including red and white blood counts, differential white blood count, hematocrit (Hct), hemoglobin (Hb), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) and white to red cells ratio were determined using standard methods. The highest level of Hct (30.57 ± 1.91%) was observed in fish exposed to 64 µg/L ($p<0.05$). The highest mean values of Hb (10.01 ± 0.63 and 10.47 ± 0.57 g/dL) were measured in the fish exposed to 32 and 64 µg/L of Cd, respectively, which was significantly higher than Hb values in the control (8.24 ± 0.38 g/dL). For the rest of parameters, there were no significant differences between fish exposed to different Cd doses ($p>0.05$). The results indicated at least some deleterious effects of sublethal concentration of Cd on some hematological parameters of sterlet, which maybe reflecting the stress response as well as deleterious effects on haemopoietic tissues.The study of long term effects of Cd exposure of starlet is suggested.

Keywords: Heavy metal, Sturgeon, Hematological parameters

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-05-05]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1392.2.2.5.1]