

"مقاله پژوهشی"

تأثیر نیکل محلول در آب بر متابولیسم آهن و بیوستز هم در کپور معمولی
(*Cyprinus carpio*)پوریا بزرگ زاده^۱، مهدی شمسایی مهرجان^{۱*}، نیما پورنگ^۲، سید پژمان حسینی شکرایی^۱

۱- گروه شیلات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱/۱۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۲۳

چکیده

نیکل از جمله عناصر ضروری برای تمامی موجودات زنده نظیر میکروارگانیسم‌ها، گیاهان و حیوانات محسوب می‌شود. با این حال، در مقادیر فراتر از غلظت مورد نیاز، نیکل نیز به عنوان یک عامل مسمومیت‌زا سبب بروز عوارض نامطلوب در موجودات زنده می‌شود. در این مطالعه، پس از تعیین LC50-96h نیکل برای کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، تیمارهای تحت کشنده نیکل شامل ۰ (شاهد)، ۰/۰۵۵، ۰/۲۷۵، ۰/۵۷۲، ۱/۶۸۷، و ۲/۹۰۹ میلی‌گرم بر لیتر طی دوره ۳۰ روزه در نظر گرفته شد. نتایج به دست آمده حاکی از عدم تغییر معنی‌دار شاخص‌های خون در اثر مواجهه با نیکل در ماهی کپور معمولی بود. ولی شاخص MCHC در اثر حضور نیکل کاهش معنی‌داری در مقایسه با شاهد از خود نشان داد. در حالیکه که نیکل سبب کاهش معنی‌دار آهن سرم و ترانسفرین در تیمارهای ۱/۶۸۷، و ۲/۹۰۹ میلی‌گرم بر لیتر شد، میزان اشباعیت ترانسفرین، ظرفیت تام ترانسفرین برای اتصال با آهن، سرولوپلاسمین خون کاهش معنی‌داری در اثر مواجهه با نیکل از خود نشان داد. نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که علیرغم عدم بروز اثرات منفی نیکل بر شاخص‌های خونی، این عنصر در مقادیر استفاده شده سبب بروز اثرات نامطلوب بر متابولیسم آهن بعنوان یکی از اجزای ضروری در بیوستز هم گردید.

کلمات کلیدی: نیکل، آهن، عناصر کمیاب، فلزات ضروری، کپور معمولی.

مقدمه

افزایش جمعیت، توسعه صنایع مختلف و گسترش روز افزون مزارع کشاورزی باعث ورود حجم بالایی از آلاینده‌های مختلف به اکوسیستم‌های آبی شده است (Lamanso *et al.*, 1991). ورود طیف وسیعی از آلاینده‌ها از جمله فلزات به آب‌های شیرین در دهه‌های اخیر بعنوان یک مسئله نگران کننده تبدیل شده است (Vutukuru, 2005). فلزات غیر ضروری معمولاً سموم قوی هستند و جذب زیستی آنها در بافت‌ها منجر به مسموم شدن، کاهش باروری، آسیب بافتی و اختلال در عملکرد موجودات زنده می‌شود (Ribeiro *et al.*, 2000; Damek-Poprawa and Sawicka-Kapusta, 2003). فلزات پس از ورود به آب، می‌توانند یا جذب ذرات رسوب شوند و یا در بدن موجودات آبی انباشته شوند. ماهیان ممکن است عناصر حل شده و فلزات سنگین را از آب جذب کنند. در نتیجه امکان تجمع مقادیر قابل توجهی از این عناصر در بافت‌های مختلف وجود خواهد داشت و بالطبع سبب ایجاد اثرات سمی در اندام‌های حیاتی می‌گردد. علاوه بر این، ممکن است ماهیان غلظت‌های قابل توجهی از فلزات را حتی در آب‌هایی که این فلزات کمتر از حد تشخیص هستند، جذب نمایند (Samanta *et al.*, 2005). بنابراین در مواردی ماهیان می‌توانند گزینه مناسبی برای سنجش آلودگی اکوسیستم‌های آبی به انواع فلزات نیز باشند (Dural *et al.*, 2007).

بطور کلی، فلزات سنگین شامل عناصر بالقوه سمی (کادمیم، سرب و غیره)، احتمالاً ضروری (وانادیوم، کبالت) و عناصر نیمه ضروری (مس، روی، آهن، منگنز، سلنیم و نیکل) هستند (Muñoz-Olivas and Cámara, 2001). بطور کلی فلزات سمی حتی در

غلظت‌های اندک نیز سبب بروز عوارض نامطلوب و حتی مرگ و میر می‌شوند. در مقابل فلزات نیمه ضروری تنها در صورتیکه در مقادیر فراتر از حد مجاز و یا در دوره‌های طولانی‌تر مصرف شوند، می‌توانند اثرات سمی از خود بروز دهند (یونسی‌پور و همکاران، ۱۳۹۳).

نیکل از جمله عناصر ضروری برای تمامی موجودات زنده نظیر میکروارگانیسم‌ها، گیاهان و حیوانات محسوب می‌شود و در ساختار آنزیم‌ها و پروتئین‌ها وجود دارد (Poonkothai and Vijayavathi, 2012). با این حال، در مقادیر فراتر از غلظت مورد نیاز، نیکل نیز به عنوان یک عامل مسموم‌زای فیزیولوژیکی، ژنتیکی و ایمنی سبب بروز عوارض نامطلوب، جهش و حتی سرطان در موجودات زنده می‌شود (Vijayavel *et al.*, 2009; Valko *et al.*, 2005; Kubrak *et al.*, 2013). اگر چه مکانیسم دقیق سمیت ناشی از نیکل کاملاً مشخص نیست، اما شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد نیکل باعث تولید متابولیت‌های اکسیداتیو و مهار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بدن ماهی می‌شود (Kubrak *et al.*, 2013; Prophete *et al.*, 2006). جذب و تجمع نیکل در اندام‌های مختلف می‌تواند منجر به تغییرات متابولیکی، اختلال در میزان ضروری موجود در بافت (Misra *et al.*, 1990; Funakoshi *et al.*, 1996) و پراکسیداسیون لیپید (Misra *et al.*, 1990; Rodriguez *et al.*, 1991) شود. بنابراین، با توجه به موارد ذکر شده می‌توان نتیجه‌گیری نمود که در مواقع حضور نیکل در اکوسیستم‌های آبی و یا مزارع پرورشی در مقادیر بالا، بروز مسمومیت مزمن و یا حتی حاد محتمل است که

به محل سنتز متالوپروتئین‌های مختلف از جمله هم منتقل می‌کند (Boffi *et al.*, 2003).

تولید گلبول قرمز در ماهیان استخوانی برعکس پستانداران در مغز استخوان انجام نمی‌شود. بلکه طحال و کلیه قدامی در اکثر ماهیان جایگاه تولید گلبول‌های قرمز خون است (Hevesy *et al.*, 1964). اریتروپویزیز که با بلوغ اریتروبلاست‌ها همراه است، نیازمند بیوسنتز هم است (Ponka, 1997; Shafizadeh and Paw, 2004). گروه هم به عنوان مسئول حمل گازهای تنفسی (و البته نقش‌های متنوع دیگر) است که دارای آهن در ساختار خود است (Hentze *et al.*, 2010). بیوسنتز هم مجموعه‌ای از واکنش‌های آنزیمی است که در سیتوزول و میتوکندری انجام می‌شود (Chung *et al.*, 2012). مرحله آخر بیوسنتز هم با فعالیت آنزیم فروکیلتاز در میتوکندری است که عبور آهن از غشا میتوکندری را کاتالیز می‌کند.

ماهی از جمله موجوداتی است که بدلیل حضور در محیط‌های آبی در ارتباط دائم با آلاینده‌های مختلف است. بررسی شاخص‌های خونی، سریع‌ترین روش ردیابی و آشکار ساختن تغییرات نامطلوب در ماهی محسوب می‌شود. سرعت اثرات سمی فلزات سنگین، مرتبط با عمل انتقال خون است. از آن جا که به وسیله خون، فلزات به تمام بخش‌های بدن پخش می‌شوند، بنابراین، سنجش اثرات سمی فلزات سنگین از طریق نتایج حاصل از بررسی شاخص‌های خونی تسهیل می‌گردد (Brucka-Jastrzebska and Protasowicki, 2005). بنابراین، هدف از این تحقیق تعیین تأثیر مقادیر مختلف نیکل بصورت محلول در آب بر فرآیند بیوسنتز هم و متابولیسم آهن - بعنوان یکی از اصلی‌ترین

خود می‌تواند بعنوان یک معضل محیطی سبب کاهش رشد و اختلال در فرآیندهای فیزیولوژیک آبزیان شود و بالطبع صنعت آبزی‌پروری را تحت تأثیر قرار دهد. این امر با توسعه روزافزون جمعیت و افزایش فعالیت‌های شیلاتی و آبزی‌پروری پر رنگ‌تر خواهد شد (Rahman *et al.*, 2012).

جذب آهن به‌طور عمده از روده و به مقدار ناچیزی از طریق آبشش صورت می‌گیرد (Andersen, 1997; Bury *et al.*, 2001). در pH خنثی، آهن جذب شده شکل غیر-قابل حل هیدروکسید فریک را ایجاد می‌کند (Aisen *et al.*, 2001). فری‌ردوکتاز در سلول‌های مسواکی روده جانوران از جمله ماهیان آهن فریک را به فرس تبدیل می‌کند (McKie *et al.*, 2001; Bury *et al.*, 2003). سپس DMT^۱ آهن دو ظرفیتی را به داخل منتقل می‌کند (Trinder *et al.*, 2002; Donovan *et al.*, 2000). غشاء بازولترال سلول اپیتلیال آهن را برخلاف شیب الکتروشیمیایی با کمک IREG^۳ به جریان خون منتقل می‌کند (Donovan *et al.*, 2002). آهن دو ظرفیتی جذب شده در سطح غشاء خارج سلولی توسط سرولوپلاسمین و همولوگ آن (هفایستین) به آهن فریک تبدیل می‌شود (Winzerling *et al.*, 1997). سرولوپلاسمین پروتئینی است که در کبد سنتز می‌شود و در ساختار خود ۶ اتم مس دارد. این پروتئین و همولوگ آن نقش فروکسیداز را در بدن ایفا می‌کنند (Hellman and Gitlin, 2002). آهن فریک سپس در جریان خون به آپوترانسفرین متصل می‌شود (Moore *et al.*, 1987) و این پروتئین آهن را

^۲ Divalent metal transporter 1

^۳ Iron-regulated transporter 1

مکانیسم‌های خون‌سازی در بدن موجودات زنده در کپور معمولی طی دوره زمانی میان مدت است.

سمیت حاد تعداد ۴۹ قطعه ماهی در ۷ تیمار مورد استفاده قرار گرفت.

موارد و روش‌ها

تهیه ماهی کپور معمولی

تعداد کل ماهیان مورد نیاز در این پروژه حدود ۱۲۵ عدد بود. در طی مدت سازگاری ماهیان به میزان ۳٪ وزن بدن بصورت روزانه با استفاده از جیره غذایی معمول ماهی کپور تغذیه شدند، و درجه حرارت مطلوب ۱۸-۲۲ درجه سانتی‌گراد، تناوب تاریکی و روشنایی نیز بصورت ۱۲ ساعته در نظر گرفته شد. اکسیژن در محدوده ۶ الی ۶/۵ ppm و pH در حدود ۸-۷ حفظ گردید.

تعیین غلظت کشنده (LC50-96h) نیکل

برای تعیین میزان دقیق LC₅₀^۴ از پروتکل OECD No. 203 استفاده شد. براساس این پروتکل، تعداد حداقل ۷ ماهی به محفظه‌هایی با حجم ۱۰ الی ۱۵ لیتر آب معرفی گردید. غلظت نیکل بر اساس نسبت جرم اتمی به وزن نمک فلز تعیین و غلظت‌های متوالی با نسبت تصاعد هندسی به تعداد حداقل ۵ غلظت انتخاب شد. مدت زمان انجام آزمایش ۹۶ ساعت بود و فاکتورهای کیفی آب نظیر دما، اکسیژن محلول، سختی، شوری و pH و غیره کنترل شد. تعداد تلفات در هر روز شمارش و ثبت گردید و در نهایت با استفاده از نرم افزار پروبیت (یا پکیج مربوطه در برنامه SPSS) مورد آنالیز قرار گرفت و در نهایت LC₅₀-96h برای نیکل به محاسبه گردید (Zar, 1999). در آزمایش

تیمار بندی

این آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام شد. در این تحقیق، پس از تعیین غلظت کشنده نیکل برای این گونه، ۵ تیمار مختلف (شامل ۱، ۵، ۱۰، ۳۰ و ۵۰٪) از LC₅₀ ۹۶ ساعته انتخاب شد. ماهیان سازگار شده با شرایط آزمایش به مدت ۳۰ روز به طور پیوسته در معرض تیمارهای فوق قرار گرفتند. تعویض آب به طور یک روز در میان به میزان ۵٪ بود. غذادهی به میزان ۳٪ وزن بدن بصورت روزانه با استفاده از جیره غذایی معمول ماهی کپور انجام شد و محیط آزمایش دقیقاً مشابه شرایط سازگاری ماهی در نظر گرفته شد. در ادامه، تعداد ۹۰ ماهی جوان کپور معمولی با میانگین وزنی ۱۷/۲۳ ± ۱۸۳/۲۶ گرم با تراکم ۱۵ عدد در هر مخزن نگهداری شد. یک مخزن به عنوان شاهد و مابقی مخازن (۵ مخزن) به عنوان سایر تیمارها در نظر گرفته شد. تغذیه به صورت یکسان در هر کدام از مخازن انجام گرفت و در نهایت نمونه برداری آزمایشات مربوطه صورت پذیرفت.

نمونه برداری

در ادامه شاخص‌های مرتبط با متابولیسم آهن و خون شناسی نیز مورد بررسی قرار گرفت. اندازه‌گیری هر یک از این پارامترها بر اساس روش‌های معمول هماتولوژی و بیوشیمیایی صورت گرفت. در انتهای دوره پرورش، ماهیان بیهوش شده (۶ عدد برای هر تیمار) و با استفاده از سرنگ از ناحیه ساقه دمی به مقدار لازم خون‌گیری انجام پذیرفت (حداقل ۲ میلی‌لیتر).

⁴ Median lethal concentration

منیزیم^۸ استفاده شد. در این روش در واقع ظرفیت ترانسفرین با افزودن آهن اشباع گردید. سپس آهن اضافی با کربنات منیزیم رسوب داده شد و توسط سانتیفریوژ در ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه عمل جداسازی انجام پذیرفت. سپس مقدار آهن مایع رویی که حاوی ترانسفرین اشباع از آهن (کل آهن پیوند شده به ترانسفرین) است مورد ارزیابی قرار گرفت. روش اندازه گیری از این مرحله به بعد مشابه اندازه گیری آهن سرم است. مقدار TIBC بر حسب $\mu\text{g dl}^{-1}$ گزارش شد (Burtis et al., 2012).

برای تعیین ظرفیت آهن اشباع نشده ترانسفرین موسوم به UIBC^۹ از تفریق مقدار آهن سرم از TIBC استفاده شد. بنابراین UIBC نیز بر حسب $\mu\text{g dl}^{-1}$ مورد محاسبه قرار گرفت (Burtis et al., 2012).

$$\text{UIBC}(\mu\text{g dl}^{-1}) = \text{TIBC}(\mu\text{g dl}^{-1}) - \text{Serum Fe}(\mu\text{g dl}^{-1})$$

اندازه گیری مس و سرولوپلاسمین

اساس اندازه گیری مس تشکیل کمپلکس رنگی از مس توسط یک کروموژن اختصاصی^{۱۰} در محیط اسیدی است. در این روش مس در محیط اسیدی از سرولوپلاسمین جدا می شود. شدت رنگ ایجاد شده متناسب با غلظت مس سرم است و در طول موج ۵۷۸ نانومتر در مقابل بلانک توسط اسپکتروفوتومتر قابل اندازه گیری است. مقدار مس اندازه گیری شده در سرم بر حسب $\mu\text{g dl}^{-1}$ محاسبه و گزارش شد (Burtis et al., 2012).

خون به دست آمده به دو قسمت حاوی ماده ضد انعقاد سیترات سدیم و فاقد ماده ضد انعقاد تقسیم شد. خون جمع آوری شده به منظور جداسازی سرم در ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتیفریوژ گردید. جهت اندازه گیری پارامترهای هماتولوژی از خون تازه استفاده شد و نمونه سرم در فریزر ۷۰- تا زمان اندازه گیری با دستگاه نگه داری شد.

شاخص های سرمی مرتبط با متابولیسم آهن

از خون حاوی ماده ضد انعقاد سیترات سدیم برای تعیین شاخص های خون شناسی استفاده گردید و سایر پارامترهای مرتبط با متابولیسم آهن در نمونه سرم استحصالی مورد استفاده قرار گرفت.

اندازه گیری آهن سرم

آهن سرم با استفاده از روش فروزین^۵ مورد بررسی قرار گرفت. در این روش آهن متصل به پروتئین در $\text{pH} = 4/5$ به صورت آزاد در آمده و آهن آزاد شده به صورت احیا در می آید و سپس با فروزین ایجاد کمپلکس ارغوانی رنگ می نماید. شدت رنگ ایجاد شده متناسب با غلظت آهن سرم است. جذب در طول موج ۵۶۲ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در مقابل بلانک قرائت شد و بر حسب $\mu\text{g dl}^{-1}$ محاسبه گردید (Burtis et al., 2012).

ظرفیت اتصال تام آهن (TIBC) و ظرفیت اتصال آهن اشباع نشده (UIBC)

برای اندازه گیری ظرفیت کل ترانسفرین^۶ برای اتصال با آهن یا TIBC^۷ از روش رسوب کربنات

⁷- Total Iron Binding Capacity

⁸- Magnesium carbonate precipitating method

⁹- Unsaturated Iron Binding Capacity

¹⁰- 3,5-Di Br-PAESA

⁵- Ferrozine

⁶- Transferrin

گرفته شد و گزارش گردید (Schalm *et al.*, 1975). برای شمارش تعداد گلبول قرمز در حجم خون از خون حاوی ماده ضد انعقاد استفاده گردید. با استفاده از پیت ملائزور قرمز ۰/۵ واحد خون با ۲۰۰ ml سرم فیزیولوژیک ۰/۹٪ مخلوط و با استفاده از لام شمارش توما تعداد گلبول‌های قرمز در ۱۶ مربع کوچک شمارش شدند. عدد حاصل برحسب cell mm^{-3} گلبول قرمز است (Schalm *et al.*, 1975)

شاخص‌های خون‌شناسی

به‌منظور بررسی تغییرات احتمالی ناشی از استرس - های اعمال شده، شاخص‌های خونی از جمله متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MCH)^{۱۳}، متوسط حجم گلبول قرمز (MCV)^{۱۴} و غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MCHC)^{۱۵} بر اساس فرمول‌های زیر محاسبه شد (Schalm *et al.*, 1975).

$$\text{MCH (pg)} = \frac{\text{Hb (g dl}^{-1}) \times 10}{\text{RBC (million cells mm}^{-3})}$$

$$\text{MCV (fl)} = \frac{\text{Hct (\%)} \times 10}{\text{RBC (million cells mm}^{-3})}$$

$$\text{MCHC (g dl}^{-1}) = \frac{\text{Hb (g dl}^{-1}) \times 100}{\text{Hct (\%)}}$$

پارامترهای کیفی آب

در این آزمایش، میزان DO با استفاده از WTW, Microprocessor Oximeter, OXI 196 و همچنین روش دستی اندازه‌گیری گردید. بدلیل حساسیت در این قسمت اکسیژن متر با استفاده از محلول استاندارد بلانک و ۱۰۰٪ اشباعیت کالیبره می‌شد. دما و pH به ترتیب با استفاده از ترمومتر و pH متر اندازه‌گیری

برای اندازه‌گیری سرولوپلاسمین سرم از روش کالریمتری استفاده شد. به این منظور، میزان سرولوپلاسمین پس از افزودن سوبسترا^{۱۱} در حضور یک سورفکتانت و pH اسیدی کمپلکس رنگی ایجاد کرد. شدت رنگ ایجاد شده در طول موج ۵۷۸ نانومتر در مقابل بلانک توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت و بر حسب $\mu\text{g dl}^{-1}$ گزارش شد (Burtis *et al.*, 2012).

محاسبه میزان ترانسفرین و درصد ترانسفرین اشباع^{۱۲}

درصد ترانسفرین اشباع و میزان ترانسفرین در سرم به‌صورت غیر مستقیم با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه شد (Burtis *et al.*, 2012).

$$\text{Trf saturation (\%)} = \frac{\text{Serum Fe } (\mu\text{g dl}^{-1}) \times 100}{\text{TIBC } (\mu\text{g dl}^{-1})}$$

$$\text{Serum Trf } (\mu\text{g dl}^{-1}) = 0.7 \times \text{TIBC } (\mu\text{g dl}^{-1})$$

فراسنجه‌های خون‌شناسی

میزان هموگلوبین خون ماهی با استفاده از روش رنگ‌سنجی سیانومت هموگلوبین اندازه‌گیری گردید. مقدار جذب در ۵۴۶ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در مقابل بلانک قرائت گردید و با استفاده از فرمول زیر مقدار هموگلوبین بر حسب $\mu\text{g dl}^{-1}$ محاسبه شد (Burtis *et al.*, 2012). با استفاده از لوله میکروهماتوکریت از هر ماهی دو نمونه خون جمع‌آوری شد. لوله‌های هماتوکریت توسط دستگاه میکروهماتوکریت به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس درصد هماتوکریت با استفاده از خط کش مخصوص تعیین و برای هر ماهی از دو نمونه میانگین

¹³- Mean Corpuscular Hemoglobin

¹⁴- Mean Corpuscular Volume

¹⁵- Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration

¹¹- N,N Dimethylaminoethyl Ferrocene

¹²- Transferrin Saturation (Trf Sat)

نتایج

محدوده پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب در طول آزمایش در جدول ۱ ارائه شده است. جدول ۲ نیز ارائه دهنده میزان غلظت کشنده نیکل در زمان‌های مختلف برای ماهی کپور معمولی است.

جدول ۱: پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب در طول دوره آزمایش

پارامتر	محدوده
pH	۷/۶۹-۷/۹۳
هدایت الکتریکی	۴۴۸-۴۸۸ $\mu\text{s}/\text{cm}$
اکسیژن محلول	۵/۷-۶/۵ mg/l
دما	۲۲/۲-۲۳/۴ $^{\circ}\text{C}$
NO_2^-	۰/۰۵۷-۰/۰۸۰ mg/l
NO_3^-	۷/۵۲-۹/۳۴ mg/l
NH_4^+	<۰/۱ mg/l
PO_4^{3-}	۷۸/۹۲-۷۹/۶۲ $\mu\text{g}/\text{l}$
سختی	۲۳۲-۲۸۴ $\text{mg CaCO}_3/\text{l}$
Ca^{2+}	۱۸۸-۲۴۶ mg/l
Mg^{2+}	۱۶-۳۲ mg/l
TS	۳۴۹/۲-۳۸۲/۶ mg/l
TDS	۳۲۰/۸-۴۲۱/۶ mg/l
TSS	۵/۸۰-۶/۱۸ mg/l

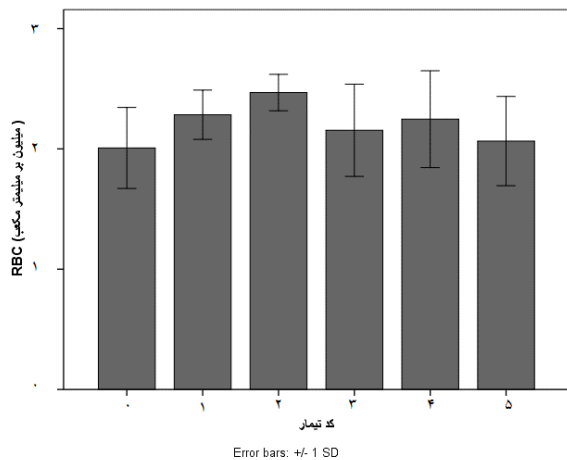
گردید. میزان EC با استفاده از روش دستی کلرید پتاسیم اندازه گیری شد. میزان آمونیوم و ترکیبات نیتراته با استفاده از روش اسید بوریک و معرف مخلوط و همچنین روش اسپکتروفتومتری تعیین گردیدند. اندازه گیری فسفات با استفاده از روش رنگ سنجی با استفاده از معرف آنتی مویان تارتارات و مولیبدات پتاسیم انجام شد. جامدات محلول و معلق با استفاده از روش دستی فیلتر نمودن آب اندازه گیری شد. سختی کل نیز با استفاده از معرف EDTA و ECBT اندازه-گیری شد. تعیین میزان کلسیم نیز با استفاده از معرف موروکسید تعیین مقدار شده و میزان منیزیم نیز با استفاده از موارد بیان شده محاسبه گردید (APHA, 2005).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

در ابتدا به منظور بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون نرمالیت شاپیرو-ویلک استفاده گردید. در مرحله بعد از آزمون‌های مقایسه میانگین‌ها یک طرفه (ANOVA) برای مقایسه بین تیمارها استفاده شد و سپس با توجه به تأیید آزمون لون از آنالیزهای تکمیلی دانکن جهت مقایسه داده‌ها در نرم افزار SPSS استفاده شد. سطح معنی داری در تمامی موارد ۵٪ در نظر گرفته شده است. اعداد بر حسب میانگین \pm انحراف معیار گزارش شده است.

جدول ۲: غلظت کشنده نیکل (LC50) به همراه درصد تلفات در تیمارهای مختلف مسمویت حاد را نشان می‌دهد.

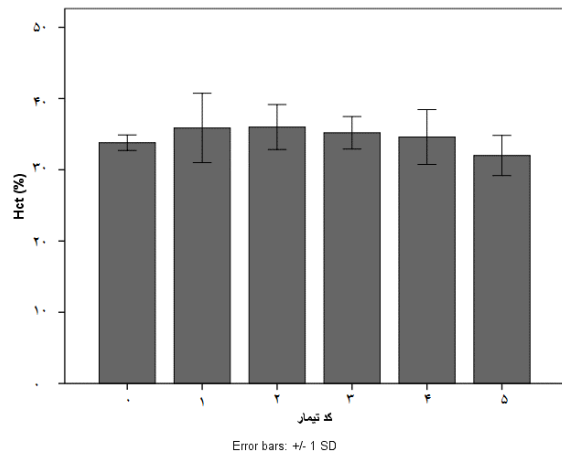
مدت زمان در معرض قرار گیری (ساعت)	غلظت نیکل (mg/l)						
LC50 (mg/l)	۰	۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴
(۹۵٪ حدود اطمینان)	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۲۴	۰	۰	۱۲/۵	۱۲/۵	۲۵	۱۲/۵	۱۰۰
۴۸	۰	۱۲/۵	۱۲/۵	۱۲/۵	۵۰	۳۷/۵	۱۰۰
۷۲	۰	۱۲/۵	۲۵	۳۷/۵	۵۰	۶۲/۵	۱۰۰
۹۶	۰	۲۵	۲۵	۳۷/۵	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰



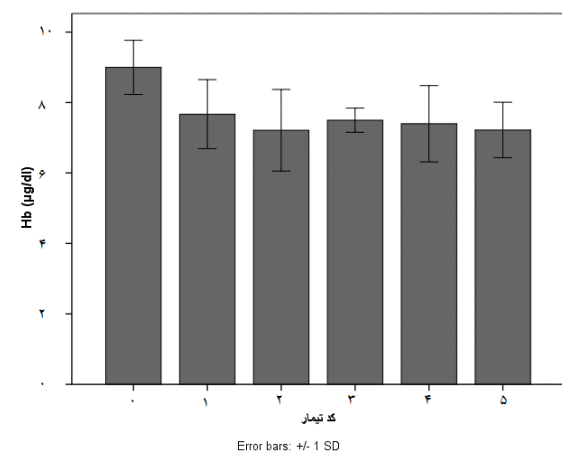
شکل ۳: تعداد گلبول قرمز خون در ماهی کپور معمولی را نشان می‌دهد. هر یک از ستون‌ها نشان دهنده میانگین \pm انحراف معیار ۵ اندازه‌گیری است. حروف الفبای انگلیسی نشان دهنده وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف است ($p < 0.05$).

پس از محاسبه شاخص‌های خونی در ماهی کپور متعاقب تیمارهای مختلف نیکل مشخص شد که اختلاف معنی‌داری در خصوص شاخص MCH و MCV قابل مشاهده نیست. تنها اختلاف معنی‌دار در مورد MCHC مشاهده شد. به این صورت که تمامی تیمارهای نیکل سبب کاهش معنی‌دار ($p < 0.05$) این شاخص در مقایسه با گروه شاهد شده است. در خصوص سایر مقایسات اختلاف معنی‌داری در این شاخص بین تیمارهای نیکل مشاهده نشد (شکل‌های ۴ الی ۶).

نتایج به دست آمده نشان داد که در اثر تیمارهای مختلف نیکل طی مدت زمان ۳۰ روز تأثیر معنی‌داری بر پارامترهای خونی از جمله غلظت هموگلوبین، درصد هماتوکریت و تعداد گلبول قرمز در ماهی کپور معمولی مشاهده نشد (شکل‌های ۱ الی ۳).

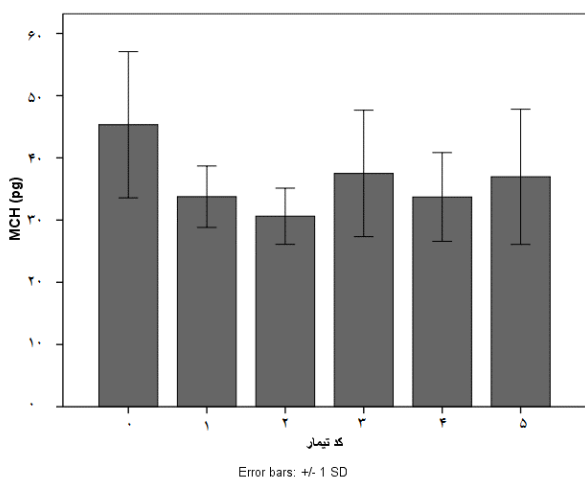


شکل ۱: درصد هماتوکریت خون ماهی کپور معمولی را نشان می‌دهد. هر یک از ستون‌ها نشان دهنده میانگین \pm انحراف معیار ۵ اندازه‌گیری است. حروف الفبای انگلیسی نشان دهنده وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف است ($p < 0.05$).

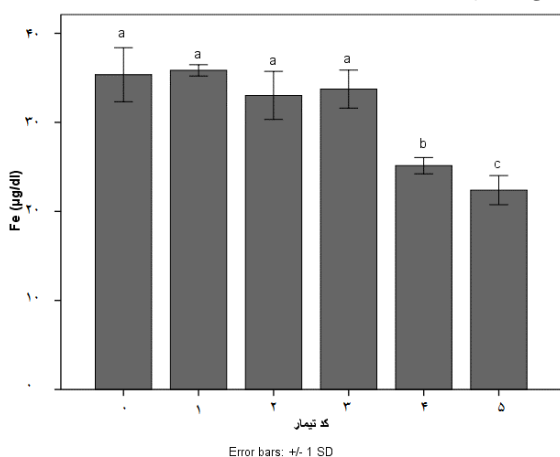


شکل ۲: غلظت هموگلوبین خون را نشان می‌دهد. هر یک از ستون‌ها نشان دهنده میانگین \pm انحراف معیار ۵ اندازه‌گیری است. حروف الفبای انگلیسی نشان دهنده وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف است ($p < 0.05$).

این نحو که ماهیان تیمار ۵ دارای کمترین میزان آهن سرم بوده‌اند.

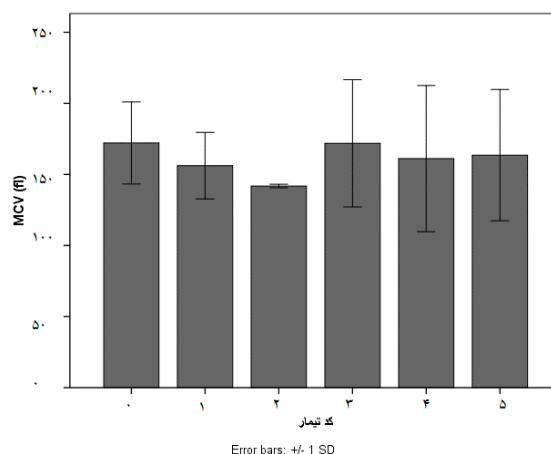


شکل ۶: شاخص خونی MCHC در تیمارهای نیکل را نشان می‌دهد. هریک از ستون‌ها نشان دهنده میانگین \pm انحراف معیار ۵ اندازه‌گیری است. حروف الفبای انگلیسی نشان دهنده وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف است ($p < 0.05$).

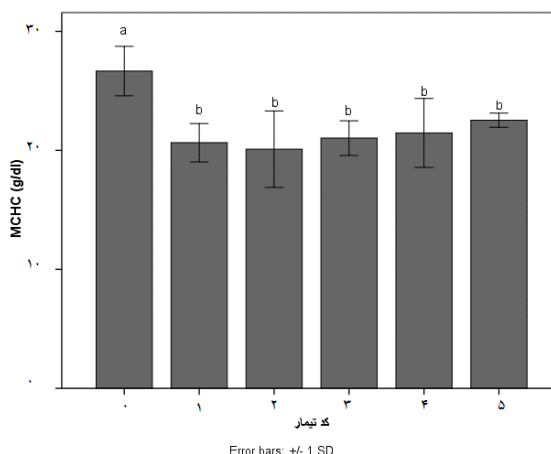


شکل ۷: میزان آهن سرم را نشان می‌دهد. هریک از ستون‌ها نشان دهنده میانگین \pm انحراف معیار ۵ اندازه‌گیری است. حروف الفبای انگلیسی نشان دهنده وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف است ($p < 0.05$).

ظرفیت تام ترانسفرین برای آهن نیز در تیمارهای ۱ و ۲ با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان نداده است. در حالیکه تیمارهای ۳، ۴ و ۵ با شاهد افزایش معنی‌داری ($p < 0.05$) در مقایسه با تیمار شاهد بوده‌اند.

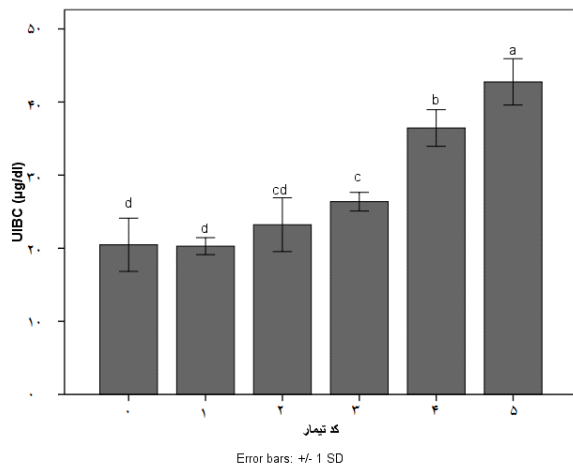


شکل ۴: شاخص خونی MCV را نشان می‌دهد. هریک از ستون‌ها نشان دهنده میانگین \pm انحراف معیار ۵ اندازه‌گیری است. حروف الفبای انگلیسی نشان دهنده وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف است ($p < 0.05$).

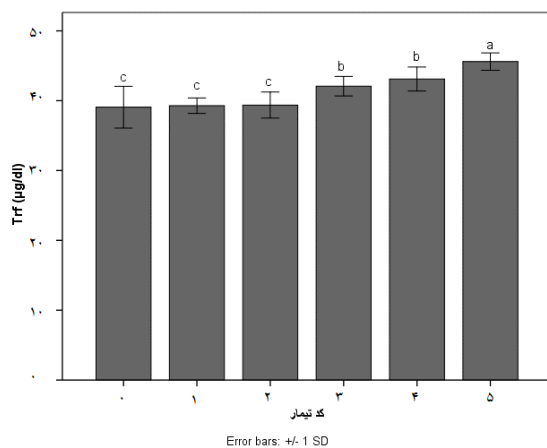


شکل ۵: شاخص خونی MCHC را نشان می‌دهد. هریک از ستون‌ها نشان دهنده میانگین \pm انحراف معیار ۵ اندازه‌گیری است. حروف الفبای انگلیسی نشان دهنده وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف است ($p < 0.05$).

تغییرات میزان آهن سرم متعاقب تیمار بندی با نیکل بصورت محلول در آب در شکل ۷ نشان داده شده است. نتایج به دست آمده حاکی از کاهش معنی‌دار ($p < 0.05$) محتوای آهن خون تنها در تیمارهای ۴ و ۵ نیکل است. مابقی تیمارها در مقایسه با گروه شاهد فاقد اختلاف معنی‌دار است. در مقام مقایسه، تیمارهای ۴ و ۵ نیز با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ($p < 0.05$) دارند به



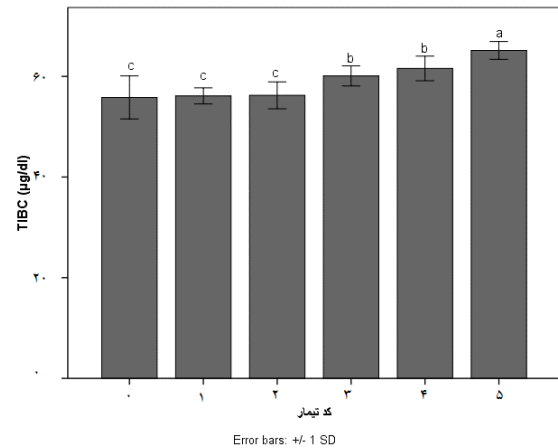
شکل ۹: ظرفیت اتصال آهن اشباع نشده (UIBC) را نشان می‌دهد. هریک از ستون‌ها نشان دهنده میانگین \pm انحراف معیار ۵ اندازه‌گیری است. حروف الفبای انگلیسی نشان دهنده وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف است ($p < 0.05$).



شکل ۱۰: سطح سرمی ترانسفرین را نشان می‌دهد. هریک از ستون‌ها نشان دهنده میانگین \pm انحراف معیار ۵ اندازه‌گیری است. حروف الفبای انگلیسی نشان دهنده وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف است ($p < 0.05$).

درصد اشباعیت مولکول ترانسفرین در اثر مواجهه با نیکل روند کاهشی داشته است ($p < 0.05$). بنحوی که میزان این کاهش در تیمارهای ۳، ۴ و ۵ در مقایسه با شاهد معنی‌دار ($p < 0.05$) بوده است (شکل ۱۱).

تیمار ۵ نیز بیشتری میزان TIBC را از خود نشان داده است (شکل ۸).

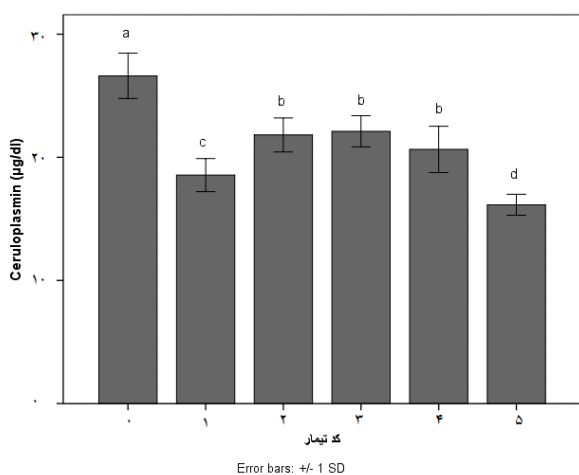


شکل ۸: ظرفیت تام ترانسفرین برای اتصال با آهن TIBC را نشان می‌دهد. هریک از ستون‌ها نشان دهنده میانگین \pm انحراف معیار ۵ اندازه‌گیری است. حروف الفبای انگلیسی نشان دهنده وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف است ($p < 0.05$).

ظرفیت اتصال آهن اشباع نشده (UIBC) در ماهی کپور معمولی پس از مجاورت با مقادیر مختلف نیکل افزایش یافته است. این افزایش تنها در تیمارهای ۳، ۴ و ۵ در مقایسه با شاهد بطور معنی‌دار ($p < 0.05$) بوده است. بعبارت دیگر با افزایش غلظت نیکل، شاخص UIBC نیز بطور معنی‌داری ($p < 0.05$) افزایش یافته است و بیشترین مقدار در گروه ۵ قابل مشاهده است (شکل ۹).

نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که میزان ترانسفرین سرم خون ماهی کپور معمولی در اثر تیمارهای ۱ و ۲ نیکل اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نداشته است در حالیکه تیمارهای ۳، ۴ و ۵ با شاهد اختلاف معنی‌داری ($p < 0.05$) از خود نشان داده است (شکل ۱۰).

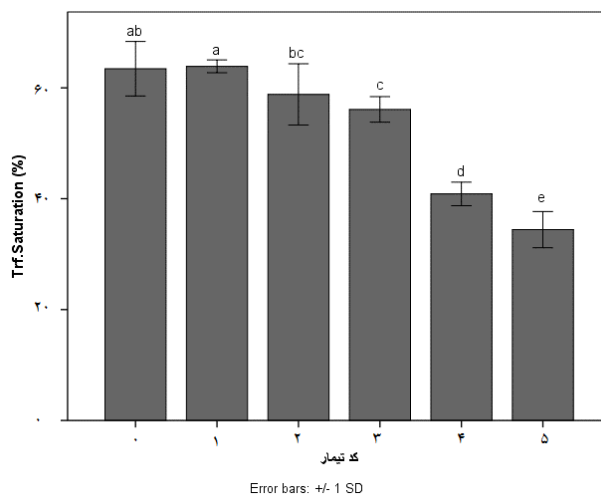
شکل ۱۳ میزان سرولوپلاسمین سرم ماهی کپور معمولی متعاقب مجاورت با نیکل را نشان می‌دهد. نتایج به دست آمده حاکی از کاهش معنی‌داری ($p < 0.05$) سطح این آنزیم در تمامی تیمارهای نیکل در مقایسه با گروه شاهد است. کمترین میزان این آنزیم نیز در تیمار ۵ نیکل مشاهده شده است ($p < 0.05$).



شکل ۱۳. سطح سرمی سرولوپلاسمین را نشان می‌دهد. هریک از ستون‌ها نشان دهنده میانگین \pm انحراف معیار ۵ اندازه‌گیری است. حروف الفبای انگلیسی نشان‌دهنده وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف است ($p < 0.05$).

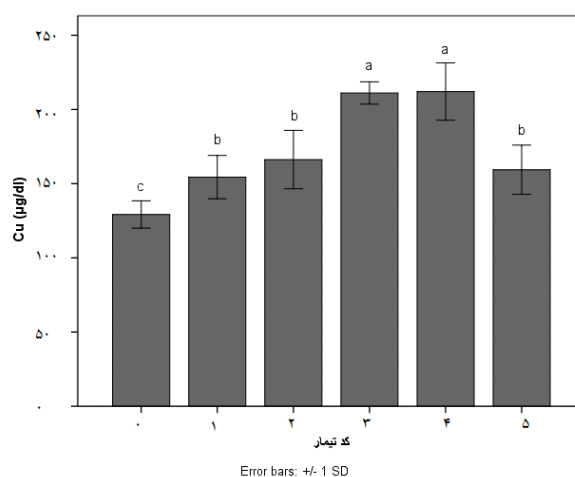
بحث

متغیرها یا شاخص‌های خون‌شناسی در تعیین میزان تأثیر غلظت‌های تحت‌کشنده آلاینده‌هایی مانند فلزات سنگین در آبزیان ابزار مؤثر و کارآمدی هستند (Witeska, 2003). بررسی شاخص‌های هماتولوژیکی اجازه می‌دهد تا سریع‌ترین تغییرات در ماهی قابل تشخیص باشد. الگوهای هماتولوژیکی مختل شده خیلی سریع قابل تشخیص هستند (حتی زودتر از تغییر در رفتار ماهی و یا ضایعات بوجود آمده). سرعت سمیت فلزات سنگین به عملکرد انتقال خون مربوط می‌شود و خون این فلزات را به تمام اعضای بدن توزیع می‌کند. ارزیابی اثرات سمی فلزات با بررسی فراسنجه‌های



شکل ۱۱. درصد اشباعیت ترانسفرین سرم را نشان می‌دهد. هریک از ستون‌ها نشان دهنده میانگین \pm انحراف معیار ۵ اندازه‌گیری است. حروف الفبای انگلیسی نشان‌دهنده وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف است ($p < 0.05$).

محتوای مس سرم در اثر نیکل به طور معنی‌داری افزایش یافته است ($P < 0.05$). این افزایش در تمامی تیمارهای نیکل در مقایسه با شاهد مشهود است. بیشترین میزان این افزایش در تیمارهای ۳ و ۴ مشاهده شده است که در مقایسه با سایر تیمارهای از جمله تیمار شاهد نیز اختلاف معنی‌داری ($p < 0.05$) داشته است (شکل ۱۲).



شکل ۱۲. محتوای مس خون ماهی کپور معمولی در اثر مواجهه با نیکل را نشان می‌دهد. هریک از ستون‌ها نشان دهنده میانگین \pm انحراف معیار ۵ اندازه‌گیری است. حروف الفبای انگلیسی نشان‌دهنده وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف است ($p < 0.05$).

خونی شامل گلبول قرمز (RBC)، گلبول سفید (WBC)، هموگلوبین (Hb) و هماتوکریت (Hct) به آسانی قابل انجام است (Al-Ghanim, 2011).

اگر ماهی به مدت کوتاهی در معرض غلظت اندک فلزات سنگین قرار گیرد، اغلب باعث افزایش شاخص‌های خونی (تعداد اریتروسیت، غلظت هموگلوبین، درصد هماتوکریت و غلظت گلوکز) می‌شود که نشان‌دهنده شروع واکنش استرس ناشی مواد شیمیایی در ماهی است که سبب برهم ریختن تعادل اسمزی و تغییر در سیستم تنظیم تبادل یون می‌گردد. این امر به نوبه خود سبب کاهش pH خون و افزایش حجم اریتروسیت‌ها و متعاقباً افزایش هماتوکریت می‌شود. استرس هم چنین باعث افزایش اپی نفرین و انقباض طحال شده که منجر به آزادسازی اریتروسیت‌ها به خون و سپس افزایش درصد هماتوکریت می‌گردد. غلظت بالای فلزات سنگین یا زمان طولانی‌تر قرارگیری ماهی در معرض غلظت تحت کشندگی فلزات سنگین معمولاً شاخص‌های فوق‌الذکر را کاهش می‌دهد. کاهش تعداد اریتروسیت یا درصد هماتوکریت نشان‌دهنده بدتر شدن حالت موجود زنده و گسترش آنمی در آن است (Vosyliene, 1999).

آهن یک ریز مغذی حیاتی جهت بسیاری از فعالیت‌های فیزیولوژیکی از جمله خون‌سازی، متابولیسم اکسیداتیو و پاسخ‌های ایمنی سلولی است؛ لذا حفظ غلظت آهن در محدوده نرمال و طبیعی آن بسیار حائز اهمیت است (van Vliet et al., 2002). در مطالعه حاضر، تیمارهای تحت کشنده نیکل ۴ و ۵ منجر به کاهش چشمگیر میزان آهن خون در مقایسه با گروه شاهد شدند که این امر می‌تواند به دلیل رقابت نیکل با

آهن در اتصال به ترانسفرین صورت گرفته باشد (Quarles et al., 2011). از این رو، افزایش میزان ترانسفرین خون در این تیمارها می‌تواند به عنوان راه حلی جهت مقابله با کاهش آهن صورت گرفته در نظر گرفته شود. میزان آهن و ترانسفرین خون در پایین‌ترین غلظت نیکل نیز تغییرات مشابهی را از خود نشان دادند. منتها این تغییرات معنی‌دار نبودند.

کاملاً اثبات شده است که فاکتورهای بسیاری از جمله میزان ترانسفرین خون در تنظیم متابولیسم آهن تأثیرگذار هستند. در شرایط نرمال بدن جاندار با تغییر میزان ترانسفرین خون به نوسانات میزان آهن پاسخ می‌دهد تا میزان آن را در حد نرمال حفظ کند و این فرآیند می‌تواند مکانیسم احتمالی در افزایش میزان ترانسفرین مشاهده شده باشد. کاهش آهن جیره غذایی ماهی سیم دریایی (*Dicentrarchus labrax*) موجب افزایش میزان بیان ژن ترانسفرین خون ماهی شد. در حالی که افزایش میزان آهن جیره غذایی تغییرات معنی‌داری را در بیان این ژن‌ها به دنبال نداشت (Neves et al., 2009). از سوی دیگر، کاریکویربورد و همکاران، ۲۰۰۴ نشان دادند که افزایش میزان آهن غذای قزل‌آلا (*Oncorhynchus mykiss*) موجب افزایش میزان ترانسفرین خون ماهی شد و کاهش آهن موجود در جیره غذایی تغییر معناداری را به دنبال نداشت (Carriquiriborde et al., 2004).

افزایش میزان ترانسفرین در مواجهه با فلزات سنگین در مطالعات دیگری نیز گزارش شده است. میزان محتوای ترانسفرین خون ماهی تیلایپای نیل (*O. niloticus*) پس از ۱۴ روز برخورد با ترکیب کادمیم و روی افزایش یافته بود (Firat and Kargm, 2010). در مطالعه دیگری نیز میزان بیان ژن ترانسفرین ماهی

بیان می‌کند زمانی که عناصر کمیاب به مخلوط آهن و ترانسفرین افزوده می‌شود افزایش قابل توجهی در سرعت و میزان آهن اتصال یافته به ترانسفرین رخ می‌دهد (Moshtaghi *et al.*, 1994). Schumann و همکاران (۱۹۹۷) و Piomelli و همکاران (۱۹۷۳) نشان دادند اگرچه محتوای ترانسفرین موش‌های آزمایشگاهی در اثر ۳۰ روز تغذیه با جیره غذایی فاقد منیزیم تغییر نمی‌کند، اما محصولات نهایی مصرف آهن از جمله تولید هموگلوبین کاهش می‌یابد. علاوه بر این، میزان ظرفیت آهن غیر اشباع در موش‌های آزمایشگاهی پس از ۶۰ روز تغذیه با جیره فاقد عناصر معدنی کاهش یافت (Moon, 2011). در نهایت می‌توان از این مطالعات نتیجه گرفت که کمبود عناصر مغذی در طولانی مدت می‌تواند شاخص‌های آهن را بر هم بزند و موجب کم‌خونی شود. در مطالعه حاضر، افزایش در محتوای ترانسفرین خون همراه با ظرفیت تام آهن در تیمارهای نیکل مشاهده شد اگرچه این تغییرات تنها در تیمار ۵ معنی‌دار بود. درصد اشباعیت ترانسفرین نیز کاهش نسبتاً کمی را تیمارهای بالای نیکل نشان داد که همراه با افزایش ظرفیت آهن اشباع نشده بود. از آنجایی که مطالعه مشابهی در این خصوص تا کنون صورت نگرفته مقایسه نتایج امکان‌پذیر نیست.

در واقع احتمالاً همانطور که پرنه و زممل ۱۹۸۹ بیان کردند حضور نیکل موجب افزایش نرخ اتصال آهن به ترانسفرین شده به گونه‌ای که آهن فرصت کافی جهت این اتصال را پیدا نکند. بنابراین، می‌توان اینگونه نتیجه‌گیری کرد که هر چه میزان آهن به مقدار کمتری کاهش یابد، نیاز به افزایش میزان ترانسفرین خون کمتر خواهد بود (Parent and Zemel, 1989).

اسکولپین (*Trachidermus fasciatus*) پس از ۲۴ ساعت مواجهه با مخلوطی از فلزات سنگین در خون و طحال افزایش یافته است که این مشاهدات همسو با نتایج حاصل از این مطالعه است (Liu *et al.*, 2012). ظرفیت تام آهن شاخصی است که حداکثر توانایی پروتئین‌های خون جهت انتقال آهن را نشان می‌دهد و به دلیل آنکه ۹۵٪ میزان آهن خون توسط پروتئین ترانسفرین جابجا می‌شود این شاخص به عنوان یک روش غیر مستقیم برای بررسی میزان ترانسفرین خون در نظر گرفته می‌شود. لذا افزایش در میزان این شاخص را می‌توان بیان‌کننده تلاش جاندار در تولید میزان ترانسفرین بیشتر جهت بهبود جذب و انتقال آهن در نظر گرفت (Moshtaghi *et al.*, 2013). این امر تصدیق‌کننده میزان بیشتر ظرفیت تام آهن مشاهده شده در تیمارهای نیکل است تا جابجایی آهن را تسهیل کند. از آنجایی که محتوای ترانسفرین موجود در خون به عنوان شاخصی از وضعیت آهن بدن در نظر گرفته می‌شود، می‌توان میزان اشباعیت ترانسفرین را نیز به عنوان مکانیسم نشان‌دهنده وضعیت آهن دانست. میزان اشباعیت ترانسفرین به مقدار زیادی وابسته به میزان آهن و محتوای ترانسفرین خون است (Aarabi *et al.*, 2011)؛ از این رو، همانطور که انتظار می‌رفت در تمامی تیمارهای نیکل مطالعه حاضر درصد اشباعیت ترانسفرین کاهش یافته که نشان‌دهنده اتصال نیکل به جایگاه‌های اتصال ترانسفرین است.

مدل‌سازی کینتیکی در مطالعات مکمل‌های غذایی بر محتوای ترانسفرین نشان می‌دهد که اتصال آهن به ترانسفرین در سه مرحله صورت می‌گیرد که آخرین مرحله وابسته به غلظت عنصر است. به این ترتیب، تأثیرات آلوستریک فلزات بر ترانسفرین مطرح شد که

سرولوپلاسمین نقش فیزیولوژیکی حیاتی در تبدیل آهن فروس به فریک جهت اتصال به ترانسفرین دارد به گونه‌ای که در مطالعات کلینیکی ثابت شده است افرادی که فاقد ژن سرولوپلاسمین هستند در متابولیسم آهن خود دچار اختلال می‌شوند. سرولوپلاسمین همچنین حامل ۹۵ درصد مس بدن نیز هست. لذا ارتباط نزدیکی بین متابولیسم آهن و عنصر مس مطرح شده است (Hellman and Gitlin, 2002). در مطالعه حاضر، کاهش قابل توجهی در محتوای سرولوپلاسمین و مس سرم به دنبال تمام تیمارهای نیکل مشاهده شد که می‌تواند نشان دهنده اختلال در عملکرد طبیعی کبد به عنوان اصلی‌ترین اندام سنتز کننده این آنزیم است. در طول مطالعات قبلی به خوبی ثابت شده است که محتوای سرولوپلاسمین و مس سرم و کبد در طول شرایط کبود آهن افزایش می‌یابد و باعث افزایش انتقال آهن از انبارهای ذخیره‌سازی، مانند کبد می‌شود تا انتقال آن به سایت‌های گلبول‌سازی به حداکثر برسد (Ranganathan et al., 2011). از آنجا که آهن خون نسبت به تیمارهای نیکل کاهش یافت، انتظار می‌رفت که سطح سرولوپلاسمین و مس نیز در این مطالعه افزایش یابد. با این حال، آسیب‌های کبدی ممکن است بیان و تولید mRNA مربوط به سرولوپلاسمین را دچار اختلال کرده باشد. این فرضیه نیاز به بررسی بیشتر دارد. پس از تزریق کادمیم (۱/۵-۰/۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به موش‌های آزمایشگاهی نر، افزایش سطح سرولوپلاسمین و مس خون مشاهده شد که میزان این افزایش به دوز کادمیم تزریق شده ارتباط مستقیم داشت. قرار گرفتن در معرض کادمیم و روی (۵ میلی‌لیتر در لیتر روی، ۱ میلی‌گرم در لیتر کادمیم) منجر به افزایش سطح سرولوپلاسمین پس از ۱۴ روز خواهد شد

(Firat and Kargm, 2010). در مقابل، ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر استات سرب و یا ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کلرید کادمیوم در آب آشامیدنی موش صحرایی به مدت ۹ هفته منجر به افت قابل توجهی در سطح سرمی و کلیه سرولوپلاسمین شد. علاوه بر این، در سال ۲۰۱۳ مشتاقی و همکاران اثرات حاد و مزمن سرب را در رات نر نژاد ویستار بررسی کردند که در این مطالعه هر دو تیمار منجر به کاهش قابل توجه غلظت‌های سرولوپلاسمین و مس در خون شدند. این آزمایشات قابل توجه است. زیرا از آنها می‌توان نتیجه گرفت که نه تنها نوع ماده سمی و غلظت آن مهم است، بلکه مدت زمان قرار گرفتن در معرض آلاینده نیز در میزان و نوع اثرات نقش مهمی دارد (Moshtaghi et al., 2013).

با توجه به نتایج مشاهده شده در تیمارهای نیکل، بدیهی است که مانند آنچه تحقیقات قبلی گزارش داده بودند، جذب مس از طریق آبشش ماهی دچار اختلال شده است. مطالعات اولیه در مورد مکانیسم‌های انتقال مس نشان می‌دهد که جذب آنها به پارامترهای زیادی از جمله سختی آب (سطح یون‌های کلسیم و منیزیم) بستگی دارد. به عبارت دیگر، هرچه میزان سختی آن بیشتر باشد، قابلیت دسترسی زیستی به مس کمتر خواهد بود. به نظر می‌رسد این مورد به عنوان مکانیسم احتمالی زمینه‌ساز کاهش محسوس مس سرم ماهیانی که در معرض نیکل قرار گرفتند، محسوب شود. ساز و کار اساسی این پدیده ممکن است مربوط به کاهش مشاهده شده مس در ماهیان مورد آزمایش باشد. در این رابطه، Ranganathan و همکاران (۲۰۱۱) نشان داد که بدن در شرایط کمبود مس به جای هلو سرولوپلاسمین با نیمه عمر تقریباً ۵ روز، آپو سرولوپلاسمین که دارای نیمه عمر کمتر از ۶ ساعت است، سنتز می‌کند

می‌یابد (Alkahem, 1994; De Luca *et al.*, 2007; Palermo *et al.*, 2015). از طرف دیگر، تلاش برای بررسی مزایای مکمل‌های غذایی نیکل صورت گرفته است. در این آزمایشات، همراه با آزمایش حاضر، هیچ تغییر قابل توجهی در تعداد گلبول قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت مشاهده نشده است.

میانگین حجم گویچه‌های قرمز (MCV) نشانه‌ای از وضعیت یا اندازه گلبول‌های قرمز خون است و طبیعی یا غیرطبیعی بودن تقسیم سلولی را در گلبول قرمز نشان می‌دهد (Fazio, 2019) از آنجا که در مطالعه حاضر هیچ تغییر معناداری در این پارامتر و همچنین در تعداد گلبول قرمز مشاهده نشد، می‌توان نتیجه گرفت که غلظت‌های بررسی شده نیکل احتمالاً تأثیر سوئی، مانند تورم یا کوچک شدن بر گلبول قرمز خون ماهی کپور ندارند. میانگین هموگلوبین سلولی (MCH) هر گونه تغییر در مقدار هموگلوبین موجود در هر گلبول قرمز را نشان می‌دهد، در حالی که میانگین غلظت هموگلوبین سلولی (MCHC) میانگین وزن هموگلوبین را بر اساس حجم گلبول قرمز بیان می‌کند (Fazio, 2019). لذا این پارامتر نه از نظر حجم خون و نه از طریق تعداد سلول‌های موجود در خون تحت تأثیر قرار نخواهد گرفت، بلکه فقط زمانی که سلول‌های خونی جدید با غلظت هموگلوبین متفاوت به خون آزاد شوند، تغییر خواهد کرد. در مطالعه حاضر، این دو پارامتر نیز در تمام تیمارهای بررسی شده بدون تغییر باقی مانده‌اند، به نظر می‌رسد اگرچه آلودگی با نیکل در محیط‌های آبی می‌تواند غلظت هموگلوبین را تغییر دهد و به نوعی سنتز هموگلوبین را دچار اختلال کند، اما مقاومت گلبول قرمز و توانایی آنها برای کنار آمدن با این اختلال می‌تواند بر شرایط غلبه کند. بنابراین، شاخص‌های خونی

(Ranganathan *et al.*, 2011). بنابراین، ممکن است در تیمارهای نیکل بیشتر آنزیم‌های سرولوپلاسمین سنتز شده از نوع آپو بوده و به سرعت کاتابولیزه شده باشند. این فرضیه در تیمارهای حد وسط نیکل نیاز به بررسی بیشتر دارد، زیرا این تیمارها به نوعی کمبود مس را برطرف و از کاهش سرولوپلاسمین جلوگیری کرده است.

داده‌های حاصل از تیمارهای نیکل کاهش محدودی در سطح هموگلوبین قرمز ماهی کپور معمولی را نشان نداد (فاقد معنی داری از نقطه نظر آمار) که با نتایج سایر مطالعات که به بررسی انواع فلزات سنگین پرداختند، مطابقت دارد (Gromysz-Kalkowska *et al.*, 2004). بیشتر این مطالعات همچنین کاهش قابل توجهی در میزان گلبول قرمز و هماتوکریت خون را گزارش کرده‌اند که در آزمایشات ما مشاهده نشده است. نویسندگان این آزمایشات پیشنهاد کردند که فلزات بررسی شده توسط کاهش غلظت آهن سرم بر سیستم خونساز تأثیر می‌گذارند و با کاهش تولید هموگلوبین مانع تشکیل سلولهای قرمز خون می‌شوند. تفاوت بین نتایج مطالعه حاضر و نتایج حاصل از نویسندگان ذکر شده فوق ممکن است به عنوان مثال، به دلیل وضعیت بیولوژیکی حیوانات و همچنین نوع، مقادیر و زمان قرار گرفتن در معرض ماده سمی باشد. علاوه بر این، سن حیوانات مورد مطالعه و توانایی وابسته به سن آنها برای سازگاری با آلودگی‌های محیطی نیز احتمالاً می‌تواند بر نتایج ارائه شده در بالا تأثیر گذار باشد.

تاکنون تلاش‌های زیادی برای درک پیامدهای ناشی از کمبود نیکل بر پارامترهای خون شناسی انجام شده است. تحقیقات زیادی نشان داده است که تعداد گلبول قرمز و هموگلوبین به دنبال کمبود نیکل کاهش

- of the fish, *Oreochromis niloticus*. Journal of the University of Kuwait, 21, 243-251.
6. Andersen, O., 1997. Accumulation of waterborne iron and expression of ferritin and transferrin in early developmental stages of brown trout (*Salmo trutta*). Fish Physiology and Biochemistry, 16(3), 223-231.
 7. APHA, (WPCF). 2005. Standard Methods For Examination of Water And Wastewater, 21th Ed. APHA Press, New York, USA, 1325 p.
 8. Boffi, F., Ascone, I., Della Longa, S., Girasole, M., Yalovega, G., Soldatov, A., Varoli-Piazza, A., Castellano, A.C., 2003. X-ray absorption near-edge spectroscopy of transferrins: a theoretical and experimental probe of the metal site local structure. European Biophysics Journal, 32(4), 329-341.
 9. Brucka-Jastrzebska, E., Protasowicki, M., 2005. Effects of cadmium and nickel exposure on haematological parameters of common carp, *Cyprinus carpio* L. Acta Ichthyologica et Piscatoria, 1(35), 29-38.
 10. Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E., 2012. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics, 6th Edition. Elsevier Health Sciences, USA, 1867 p.
 11. Bury, N.R., Grosell, M., Wood, C.M., Hogstrand, C., Wilson, R., Rankin, J.C., Busk, M., Lecklin, T., Jensen, F.B., 2001. Intestinal iron uptake in the European flounder (*Platichthys flesus*). Journal of Experimental Biology, 204(21), 3779-3787.
 12. Bury, N.R., Walker, P.A., Glover, C.N., 2003. Nutritive metal uptake in teleost fish. Journal of Experimental Biology, 206(1), 11-23.
 13. Carriquiriborde, P., Handy, R., Davies, S., 2004. Physiological modulation of iron metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed low and high iron diets. Journal of Experimental Biology, 207, 75-86.
 14. Chung, J., Chen, C., Paw, B.H., 2012. Heme metabolism and erythropoiesis. Current Opinion in Hematology, 19(3), 156-171.
 15. Costa, M., Davidson, T.L., Chen, H., Ke, Q., Zhang, P., Yan, Y., Huang, C., Kluz, T.,

در ماهی کپور معمولی در مواجهه با نیکل به سختی می‌توانند به عنوان پاسخ‌های فیزیولوژیکی محسوب شوند. در حالیکه این عنصر در غلظت‌های مورد استفاده توانسته است تا اندازه‌ای اثر دوگانه‌ای در زمینه متابولیسم آهن به عنوان جز ضروری در بیوسنتز آهن ایفا نماید.

سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می‌دانیم که از زحمات تمام کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نماییم.

منابع

۱. یونسی‌پور، ح.، نصراله زاده ساروی، ح.، ساداتی پور، م.ت.، ۱۳۹۳. بررسی تجمع زیستی فلزات سنگین ضروری (آهن، مس و روی) و نیمه ضروری (نیکل، کبالت و منگنز) در بافت خوراکی ماهی کپور (*Cyprinus carpio*) دریای خزر. توسعه آبی‌پروری، ۸(۱)، ۹۵-۱۰۶.
2. Aarabi, M., Mirhashemi, S., Ani, M., Moshtaghi, A., 2011. Comparative binding studies of titanium and iron to human serum transferrin. Asian Journal of Biochemistry, 6(2), 191-199.
3. Aisen, P., Enns, C., Wessling-Resnick, M., 2001. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 33(10), 940-959.
4. Al-Ghanim, K.A., 2011. Impact of nickel (Ni) on hematological parameters and behavioral changes in *Cyprinus carpio* (common carp). African Journal of Biotechnology, 10(63), 13860-13866.
5. Alkahem, H.F., 1994. The toxicity of nickel and the effects of sublethal levels on haematological parameters and behaviour

24. Hellman, N.E., Gitlin, J.D., 2002. Ceruloplasmin metabolism and function. Annual Review of Nutrition, 22(1), 439-458.
25. Hentze, M.W., Muckenthaler, M.U., Galy, B., Camaschella, C., 2010. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. Cell, 142(1), 24-38.
26. Hevesy, G., Lockner, D., Sletten, K., 1964. Iron metabolism and erythrocyte formation in fish. Acta physiologica Scandinavica, 60(3), 256-266.
27. Kubrak, O.I., Husak, V.V., Rovenko, B.M., Poigner, H., Kriews, M., Abele, D., Lushchak, V.I., 2013. Antioxidant system efficiently protects goldfish gills from Ni²⁺-induced oxidative stress. Chemosphere, 90(3), 971-976.
28. Lamanso, R., Cheung, Y., Chan, K., 1991. Metal concentration in the tissues of rabbitfish collected from Tolo Harbour in Hong kong. Marine Pollution Bullten, 39, 123-134.
29. Liu, Y., Yu, S., Chai, Y., Zhu, Q., 2012. Transferrin gene expression in response to LPS challenge and heavy metal exposure in roughskin sculpin (*Trachidermus fasciatus*). Fish & shellfish immunology, 32(1), 223-229.
30. McKie, A.T., Barrow, D., Latunde-Dada, G.O., Rolfs, A., Sager, G., Mudaly, E., Mudaly, M., Richardson, C., Barlow, D., Bomford, A., 2001. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. Science, 291(5509), 1755-1759.
31. Misra, M., Rodriguez, R.E., Kasprzak, K.S., 1990. Nickel induced lipid peroxidation in the rat: correlation with nickel effect on antioxidant defense systems. Toxicology, 64(1), 1-17.
32. Moon, S.-M., 2011. Changes of Electrolytes, Hematological Indices, and Cytokines following Dietary Magnesium Deficiency in Rats. Biomedical Science Letters, 17(3), 203-209.
33. Moore, M.R., Goldberg, A., YEUNG-LAIWAH, A.A., 1987. Lead effects on the heme biosynthetic pathway relationship to toxicity. Annals of The New York Academy of Sciences, 502, 1-10.
2005. Nickel carcinogenesis: epigenetics and hypoxia signaling. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 592(1-2), 79-88.
16. Damek-Poprawa, M., Sawicka-Kapusta, K., 2003. Damage to the liver, kidney, and testis with reference to burden of heavy metals in yellow-necked mice from areas around steelworks and zinc smelters in Poland. Toxicology, 186(1-2), 1-10.
17. De Luca, G., Gugliotta, T., Parisi, G., Romano, P., Geraci, A., Romano, O., Scuteri, A., Romano, L., 2007. Effects of nickel on human and fish red blood cells. Bioscience Reports, 27(4), 265-273.
18. Donovan, A., Brownlie, A., Dorschner, M.O., Zhou, Y., Pratt, S.J., Paw, B.H., Phillips, R.B., Thisse, C., Thisse, B., Zon, L.I., 2002. The zebrafish mutant gene chardonnay (*cdy*) encodes divalent metal transporter 1 (DMT1). Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 100, 4655-4659.
19. Dural, M., Göksu, M.Z.L., Özak, A.A., 2007. Investigation of heavy metal levels in economically important fish species captured from the Tuzla lagoon. Food Chemistry, 102(1), 415-421.
20. Fazio, F., 2019. Fish hematology analysis as an important tool of aquaculture: a review. Aquaculture, 500, 237-242.
21. Firat, Ö., Kargin, F., 2010. Individual and combined effects of heavy metals on serum biochemistry of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 58, 151-157.
22. Funakoshi, T., Kuromatsu, K., Kojima, S., 1996. Effect of nickel on enzymatic activities in the mouse pancreas. Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology, 92(2), 245-252.
23. Gromysz-Kalkowska, K., Kanoniuk, D., Szubartowska, E., Unkiewicz-Winiarczyk, A., 2004. Influence of drinking water-administered aluminium on morphology and respiratory function of blood in rats. Polish Journal of Environmental Studies, 13(5), 515-519.

44. Quarles, C.D., Marcus, R.K., Brumaghim, J.L., 2011. Competitive binding of Fe³⁺, Cr³⁺, and Ni²⁺ to transferrin. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 16(6), 913-921.
45. Rahman, M.S., Molla, A.H., Saha, N., Rahman, A., 2012. Study on heavy metals levels and its risk assessment in some edible fishes from Bangshi River, Savar, Dhaka, Bangladesh. *Food Chemistry*, 134(4), 1847-1854.
46. Ranganathan, P.N., Lu, Y., Jiang, L., Kim, C., Collins, J.F., 2011. Serum ceruloplasmin protein expression and activity increases in iron-deficient rats and is further enhanced by higher dietary copper intake. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 118(11), 3146-3153.
47. Ribeiro, C.O., Pelletier, E., Pfeiffer, W., Rouleau, C., 2000. Comparative uptake, bioaccumulation, and gill damages of inorganic mercury in tropical and nordic freshwater fish. *Environmental Research*, 83(3), 286-292.
48. Rodriguez, R.E., Misra, M., North, S.L., Kasprzak, K.S., 1991. Nickel-induced lipid peroxidation in the liver of different strains of mice and its relation to nickel effects on antioxidant systems. *Toxicology Letters*, 57(3), 269-281.
49. Samanta, S., Mitra, K., Chandra, K., Saha, K., Bandopadhyay, S., Ghosh, A., 2005. Heavy metals in water of the rivers Hooghly and Haldi at Haldia and their impact on fish. *Journal of Environmental Biology*, 26(3), 517-523.
50. Schalm, O.W., Jain, N.C., Carroll, E.J. (1975). *Veterinary hematology*: Lea & Febiger Press, Philadelphia, USA, 807 p.
51. Schumann, K., Lebeau, A., Gresser, U., Gunther, T., Vormann, J., 1997. On the origin of the increased tissue iron content in graded magnesium deficiency states in the rat. *British Journal of Nutrition*, 77(3), 475-490.
52. Shafizadeh, E., Paw, B.H., 2004. Zebrafish as a model of human hematologic disorders. *Current Opinion in Hematology*, 11(4), 255-261.
- York Academy of Sciences, 514(1), 191-203.
34. Moshtaghi, A., Taghikhani, M., Sandughchin, M., 1994. Cadmium interaction with iron metabolism, in vitro and in vivo studies. *Journal of Islamic Academy of Sciences*, 7(3), 145-150.
35. Moshtaghi, A.A., Malekpouri, P., Moshtaghi, M., Mohammadi-nejad, M., Ani, M., 2013. Protective effects of copper against aluminum toxicity on acetylcholinesterase and catecholamine contents of different regions of rat's brain. *Neurological Sciences*, 34(9), 1639-1650.
36. Muñoz-Olivas, R., Cámara, C., 2001. Speciation related to human health. Trace element speciation for Environment, Food and Health, 331, 53-65.
37. Neves, J.V., Wilson, J.M., Rodrigues, P.N., 2009. Transferrin and ferritin response to bacterial infection: the role of the liver and brain in fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 33(7), 848-857.
38. Palermo, F.F., Risso, W.E., Simonato, J.D., Martinez, C.B., 2015. Bioaccumulation of nickel and its biochemical and genotoxic effects on juveniles of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 116, 19-28.
39. Parent, M.E., Zemel, M.B., 1989. Magnesium potentiation of iron-transferrin binding. *Life sciences*, 44(15), 1007-1012.
40. Piomelli, S., Jansen, V., Dancis, J., 1973. The hemolytic anemia of magnesium deficiency in adult rats. *Blood*, 41(3), 451-459.
41. Ponka, P., 1997. Tissue-specific regulation of iron metabolism and heme synthesis: distinct control mechanisms in erythroid cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 89(1), 1-25.
42. Poonkothai, M., Vijayavathi, B.S., 2012. Nickel as an essential element and a toxicant. *International Journal of Environmental Sciences*, 1(4), 285-288.
43. Prophete, C., Carlson, E., Li, Y., Duffy, J., Steinetz, B., Lasano, S., Zelikoff, J., 2006. Effects of elevated temperature and nickel pollution on the immune status of Japanese medaka. *Fish and Shellfish Immunology*, 21(3), 325-334.

53. Trinder, D., Oates, P., Thomas, C., Sadleir, J., Morgan, E., 2000. Localisation of divalent metal transporter 1 (DMT1) to the microvillus membrane of rat duodenal enterocytes in iron deficiency, but to hepatocytes in iron overload. *Gut*, 46(2), 270-276.
54. Valko, M., Morris, H., Cronin, M., 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12(10), 1161-11208.
55. van Vliet, A.H., Ketley, J.M., Park, S.F., Penn, C.W., 2002. The role of iron in *Campylobacter* gene regulation, metabolism and oxidative stress defense. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(2), 173-186.
56. Vijayavel, K., Gopalakrishnan, S., Thiagarajan, R., Thilagam, H., 2009. Immunotoxic effects of nickel in the mud crab *Scylla serrata*. *Fish & Shellfish Immunology*, 26(1), 133-139.
57. Vosylienė, M.Z., 1999. The effect of heavy metals on haematological indices of fish (survey). *Acta Zoologica Lituanica*, 9(2), 76-82.
58. Vutukuru, S., 2005. Acute effects of hexavalent chromium on survival, oxygen consumption, hematological parameters and some biochemical profiles of the Indian major carp, *Labeo rohita*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2(3), 456-462.
59. Winzerling, J.J., Law, H, J., 1997. Comparative nutrition of iron and copper. *Annual Review of Nutrition*, 17(1), 501-526.
60. Witeska, M., 2003. The effects of metals (Pb, Cu, Cd, and Zn) on hematological parameters and blood cell morphology of common carp. *Rozprawa Naukowa*, 72, 113-120.
61. Zar, J.H., 1999. *Biostatistical Analysis*, 4th edition, Prentice Hall International Editions, New Jersey, USA, 663 p.