

مقایسه تجربی اثرات اسید اسکوربیک و تیامین در جلوگیری از ضایعات بافتی ناشی از سرب در برخی بافت‌های ماهی کپور (*Cyprinus carpio*)

فاطمه پورعلی^۱، زهرا موسوی^{۲*}، داور شاهسونی^۳، محمد عزیززاده^۴

۱- دانش‌آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۲- استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۳- استاد گروه بهداشت مواد غذایی و آبیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۴- دانشیار گروه علوم درمانگاهی بهداشت و پیشگیری بیماری‌های دامی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: zmoosavi@um.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۶/۵/۲۱ پذیرش نهایی: ۹۷/۱۰/۱۲)

چکیده

با توجه به تجمع فلز سرب در بافت‌های خوراکی ماهی، امنیت و سلامت غذای انسان نیز تحت تاثیر قرار می‌گیرد. مطالعه حاضر به منظور مقایسه تجربی اثرات اسید آسکوربیک و تیامین در جلوگیری از ضایعات بافتی ناشی از سرب در برخی بافت‌های ماهی کپور انجام شد. ماهیان به صورت تصادفی به ۴ گروه ۳۰ تایی تقسیم شدند. گروه ۱ به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. گروه ۲ استات سرب، گروه ۳ و ۴ علاوه بر سرب به ترتیب تیامین و اسید آسکوربیک نیز دریافت کردند. پس از کالبدگشایی، نمونه‌های بافتی از مغز، کبد و کلیه تهیه و برش‌های آماده شده، به روش هماتوکسیلین-انوزین رنگ آمیزی شد. در مقایسه آماری ضایعات بافت مغز شامل پرخونی، ادم و تغییرات ایسکمیک در گروه ۴ به صورت معنی‌داری کمتر از گروه‌های ۲ و ۳ بود. همچنین در کبد، پرخونی، هایپرپلازی کانون‌های ملانوماکروفاز، تغییرات دژنراتیو و گنجدگی‌های اسیدفست داخل هسته‌ای هپاتوسیت‌ها مشاهده گردید. شدت پرخونی در بافت کبد و تغییرات دژنراتیو هپاتوسیت‌ها در گروه ۳ به صورت معنی‌داری کمتر از گروه ۴ بود. هیچ‌یک از شاخص‌های پاتولوژیک کلیه شامل پرخونی، خونریزی، گنجدگی‌های اسیدفست داخل هسته‌ای، تورم و نکروز سلول‌های پوششی توبول‌ها و هایپرپلازی کانون‌های ملانوماکروفاز، بین گروه‌های ۳ و ۴ تفاوت معنی‌داری نشان ندادند، اما در مقایسه برخی ضایعات این دو گروه با گروه ۲، اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید. بر پایه نتایج ذکر شده می‌توان نتیجه‌گیری نمود که اسید آسکوربیک و تیامین می‌توانند در پیشگیری و درمان مسمومیت با سرب به عنوان یک گزینه مناسب در ماهیان مطرح باشند.

کلیدواژه‌ها: سرب، تیامین، اسید آسکوربیک، ضایعات بافتی، ماهی کپور.

مقدمه

سرب از فلزات سنگین می باشد که در محیط انتشار گسترده ای دارد و در آب و خاک وجود داشته و طیف وسیعی از اختلالات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی را موجب می گردد (Ajayi *et al.*, 2009). فلزات سنگین، عناصر کمیاب در محیط آبی هستند، اما امروزه به دلیل فعالیت های انسانی از جمله فعالیت های صنعتی، معدنی و کشاورزی، نفوذ بالایی به آب پیدا کرده اند که این عناصر به علت سمیت و فعالیت تجمعی، اثرات مخربی را بر اکوسیستم می توانند وارد کنند (Ajayi *et al.*, 2009, Al-Weher, 2008). فعالیت های انسانی موجب نفوذ مقادیر بالایی سرب به آب های رودخانه ای یا هر محیط آبی دیگر شده است. منشأ آلودگی می تواند ناشی از گیاهان دریایی، رسوبات دریایی در کف، گازوئیل نشتی از قایق ها، کارخانجات تولید کننده باتری ماشین، کودها، رنگ ها، فیلم عکاسی و فیلمبرداری نیز باشد. فاضلاب های شهری نیز، دارای مقادیر بالایی از نمک های فلزات سنگین می باشد (Ziegfeld, 1964).

سرب از طریق دستگاه تنفس و گوارش می تواند به بدن انسان راه پیدا کرده و ایجاد مسمومیت کند. مسمومیت با سرب، در بین حیوانات و انسان ها شایع است. خاصیت چربی دوستی سرب و از طرفی وجود بافت های چربی در ماهیان، توانایی دریافت سرب از محیط آبی را برای ماهیان، ساده و امکان پذیر می کند (Ghiasi *et al.*, 2001). تجمع فلز سرب در بافت های خوراکی ماهی، امنیت و سلامت غذای انسان را نیز تحت تاثیر قرار می دهد. طبق مطالعات انجام شده، ۷۰ تا ۸۰ درصد مسمومیت ها در انسان، از طریق خوراکی صورت می گیرد. از شایع ترین علایم بالینی که در اثر

مسمومیت مزمن با سرب در انسان رخ می دهد شامل: ضعف عضلانی، لرزش، سردرد، عصبانیت و لاغری و ... می باشد (Mokhtari, 2007; Hayes, 2001).

از آنجایی که سرب به سد خونی-مغزی راه پیدا نمی کند و این سد در کودکان کاملاً توسعه پیدا نکرده است، لذا کودکان نسبت به مسمومیت با سرب، حساسیت بیش تری نشان می دهند و این فلز موجب عدم رشد کافی و عدم توسعه ماده خاکستری مغز در کودکان شده و بهره هوشی آنان را کاهش می دهد (Järup, 2003; Warren, 2001).

با توجه به اثرات سوئی که مسمومیت با سرب، به خصوص در انسان ایجاد می کند، بحث درمان و پیش گیری از آن، اهمیت فراوانی پیدا کرده است. از طرفی هم میزان تاثیر برخی ترکیبات شلاته کننده که مورد استفاده قرار گرفته اند، هنوز در درمان این مسمومیت، به علت عوارض جانبی متعددی که به خصوص در مصرف طولانی مدت می تواند داشته باشد، مورد بحث و سوال است و به همین دلیل است که هنوز استفاده از این ترکیبات در دام ها مورد تایید نمی باشد. لذا لازم به نظر می رسد ترکیباتی جایگزین شوند که هم منشأ طبیعی داشته و عوارض جانبی آن ها کم باشد و هم اثرات مطلوبی در کاهش میزان فلزات سمی در بافت های خوراکی ماهیان داشته باشند. این امر از نظر بهداشت و سلامت آبزیان و همچنین از نظر کیفیت و امنیت غذایی و سلامت انسان نیز حائز اهمیت فراوان است. ترکیباتی مانند اسکوربیک (ascorbic acid) و تیامین (thiamine) که دارای فعالیت آنتی اکسیدانی می باشند، می توانند در زمینه پیش گیری و درمان

نگهداری شدند تا علاوه بر کاهش استرس، با محیط جدید سازگاری پیدا کنند. سپس ماهیان به ۴ گروه ۳۰ تایی تقسیم گردیدند. گروه ۱ به عنوان شاهد (محیط پاک) در نظر گرفته شد. در گروه دوم از روز ۱ آزمایش به میزان ۵ mg/lit استات سرب (محصول شرکت فلوکا-آلمان) به آب آکواریوم آن‌ها اضافه گردید (Shahsavani et al., 2009) و تا ۱۵ روز آزمایش ادامه داشت. ماهیان گروه سوم علاوه بر ۵ mg/lit استات سرب، به میزان ۵۰ میلی‌گرم در هر کیلو غذا (خریداری شده از کارخانه فرادانه) و تیامین (ویتامین B1) (محصول شرکت داروسازی نصر فریمان-ایران) (Shahsavani et al., 2009)، و گروه چهارم به میزان ۵۰۰ میلی‌گرم در هر کیلو غذا، اسید اسکوربیک (Vitamin C) (محصول شرکت C-Vet-فرانسه)، به همراه ۵ mg/lit استات سرب، به صورت مخلوط در جیره غذایی دریافت کردند (Wang et al., 2007). زمان آزمایش برای تمام گروه‌ها به مدت ۱۵ روز طول کشید. همچنین شرایط محیطی نظیر دما، اکسیژن، pH برای تمام گروه‌ها یکسان بود، بدین صورت که درجه حرارت آب در طول دوره آزمایش 21 ± 1 درجه سلسیوس، مقدار اکسیژن محیط $6-6.5$ ppm و $pH=7.5 \pm 0.5$ بود. در طول مدت آزمایش رفتار ماهیان شامل بی‌اشتهایی، تغییر رنگ، شنا و حرکت بدون تعادل، افتادن باله (fin clamping)، عمود بودن باله پستی، سرفه و میزان تلفات، مورد پایش قرار گرفت.

در پایان آزمایش به صورت تصادفی ۱۰ ماهی از هر گروه انتخاب و پس از آسان‌کشی به وسیله گل میخک، کالبدگشایی شده و از مغز، کبد و کلیه آن‌ها نمونه برداری صورت گرفت. نمونه‌های بافتی در داخل

مسمومیت با سرب، مطرح و مورد بحث قرار گیرند (Lukienko, 2000; Halliwell, 1987).

امروزه برای پیش‌گیری و درمان مسمومیت با سرب، استفاده از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مورد توجه همگان قرار گرفته است. آنتی‌اکسیدان‌های صنعتی دارای خاصیت سرطان‌زایی بوده (Anbudhasan et al., 2014) و به همین دلیل در سال‌های اخیر توجه زیادی به آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به‌ویژه از منابع گیاهی شده است و تحقیقات گسترده‌ای به منظور به کارگیری این ترکیبات به جای آنتی‌اکسیدان‌های صنعتی انجام شده است (Samad et al., 2007). با توجه به پیشرفت صنعت آبی‌پروری و افزایش بهره‌گیری از ماهیان به عنوان منبع پروتئین در ترکیب غذایی انسان از یک طرف و نیز افزایش انتشار سرب در محیط‌های آبی و ورود آن به زنجیره غذایی انسان از طرف دیگر، این امر را ایجاب کرد که تحقیقی صورت بگیرد و اثرات حفاظتی تیامین و اسید اسکوربیک، در جهت کاهش جلوگیری از آسیب‌های پاتولوژیکی در برخی از بافت‌های ماهی کپور، مانند کبد، کلیه و مغز مورد بررسی و ارزیابی قرار بگیرد.

مواد و روش‌ها

در دی ماه ۱۳۹۱، تعداد ۱۲۰ عدد ماهی کپور (*Cyprinus carpio*) معمولی به ظاهر سالم با علائم رفتاری طبیعی به وزن 60 ± 10 گرم از کارگاه پرورش ماهی گرمابی سبزوار تهیه و با نمک ۳ درصد به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی شدند. ماهیان به محیط جدید در بخش آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد منتقل و در محیط آکواریوم به مدت ۱۰ روز

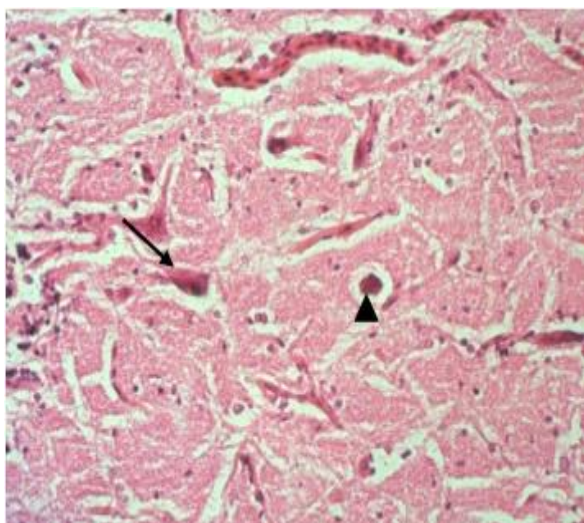
۰/۰۱ معنی دار تلقی گردید. برای آنالیز داده‌ها، از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ استفاده شد.

یافته‌ها

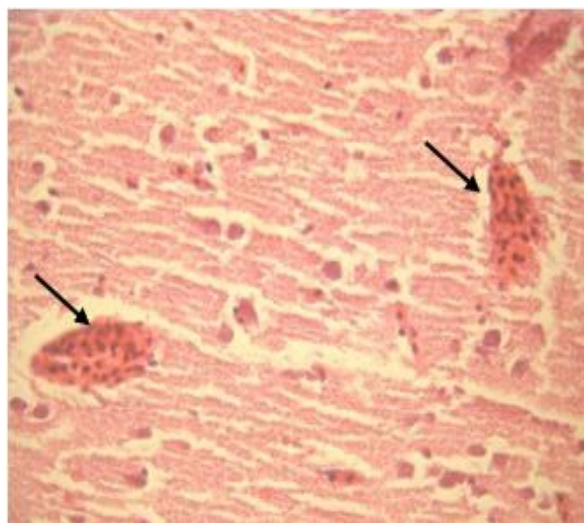
در آسیب‌شناسی بافتی مغز، ضایعاتی از جمله پرخونی در مننژ و پارانشیم مغز، ادم اطراف نوروئی و اطراف عروقی و تغییرات ایسکمیک نوروئها در گروه‌های ۲ (دریافت کننده سرب)، ۳ (تیمار با سرب و تیامین) و ۴ (تیمار با سرب و ویتامین C) در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد (شکل‌های ۱ تا ۴). شدت آسیب‌ها شامل پرخونی، ادم و تغییرات ایسکمیک نوروئها در گروه‌های مواجهه با سرب (گروه ۲)، تیمار با سرب و تیامین (گروه ۳) و دریافت‌کننده سرب و اسید اسکوریبک (گروه ۴) به صورت معنی‌داری ($p < 0/001$) بیشتر از گروه شاهد بود. اما شدت پرخونی، ادم و تغییرات ایسکمیک نوروئها در گروه مواجهه با سرب (گروه ۲) با گروه تیمار با سرب و تیامین (گروه ۳) تفاوت معنی‌داری نداشت. همچنین شدت پرخونی و ادم در گروه تیمار با سرب و اسید اسکوریبک (گروه ۴) به صورت معنی‌داری ($p < 0/003$) کمتر از گروه مواجهه با سرب (گروه ۲) بود. اما شدت پرخونی و ادم در گروه تیمار با سرب و اسید اسکوریبک به صورت معنی‌داری ($p < 0/007$) کمتر از گروه تیمار با سرب و تیامین بود (جدول ۱).

فرمالین بافر ۱۰ درصد پایدار گشتند. بعد از ۲۴ ساعت فرمالین تعویض گردید. سپس مراحل فرآوری نمونه‌های به دست آمده شامل آب‌گیری، شفاف‌سازی و غوطه‌وری طبق معمول انجام شده و طی مراحل بعدی از نمونه‌ها، بلوک‌های پارافینی تهیه گشت. سپس مقاطعی به ضخامت ۵ میکرون آماده شد. در ادامه پس از انجام رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، مقاطع با میکروسکوپ نوری مورد مشاهده آسیب شناسی قرار گرفتند. در هر مقطع بافتی، ۱۰ میدان میکروسکوپی بررسی شد و ضایعات، بر اساس شدت، درجه‌بندی شدند. به این صورت که عدد ۳ برای وجود ضایعه مورد نظر در بیش از ۷۵ درصد شان‌های مورد مطالعه (شدید)، عدد ۲ برای وجود ضایعه در ۲۵ تا ۷۵ درصد شان‌های مورد بررسی (متوسط)، عدد یک در صورت وجود ضایعه تا ۲۵ درصد شان‌ها (خفیف)، و صفر در صورت عدم وجود ضایعه لحاظ گردید (Shahsavani et al., 2009)

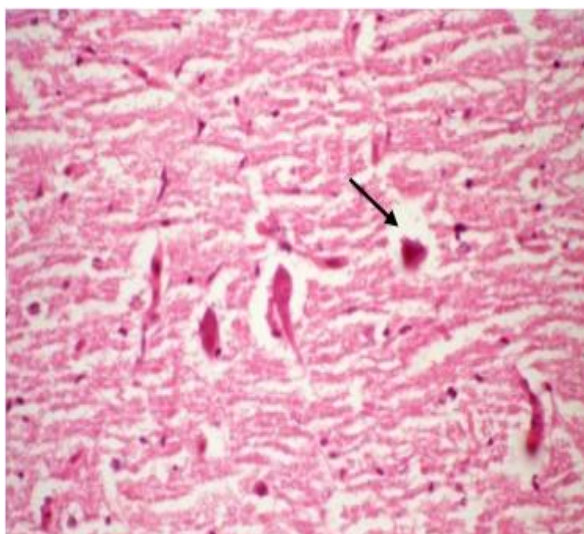
- تحلیل آماری داده‌ها: مقایسه گروه‌ها از نظر شدت ضایعات، با آزمون ناپارامتری کروسکال والیس (the kruskal-wallis) در سطح p کمتر از ۰/۰۱ انجام شد. مقایسه دوتایی گروه‌ها به علت تعدد مقایسه‌ها توسط آزمون یومان وایتنی (mann-withney U test) با تصحیح بونفرونی (bonferroni) و در سطح p کمتر از



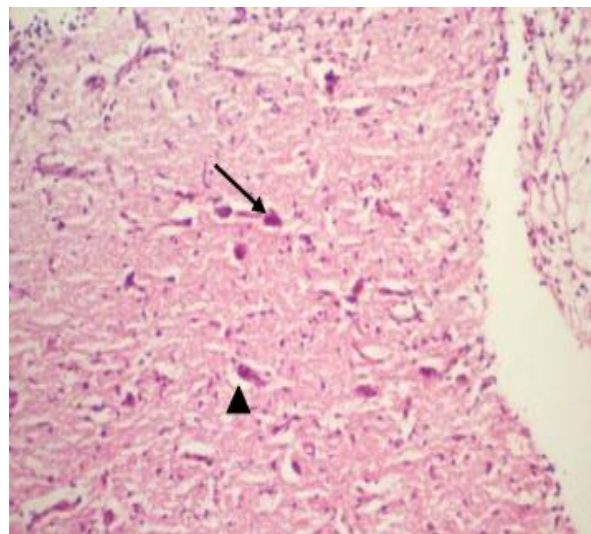
شکل ۳- پرخونی، ادم (نوک پیکان) و تغییرات ایسکمیک نرون‌ها (پیکان) در بافت مغز ماهیان گروه تیمار با سرب و ویتامین C (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین، درشت‌نمایی ۴۰۰×).



شکل ۱- پرخونی (پیکان‌ها) در بافت مغز ماهیان گروه مواجهه با سرب (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین، درشت‌نمایی ۴۰۰×)



شکل ۴- ادم و تغییرات ایسکمیک نرون‌ها (پیکان) در بافت مغز ماهیان گروه تیمار با سرب و ویتامین C (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین، درشت‌نمایی ۴۰۰×).



شکل ۲- ادم (نوک پیکان) و تغییرات ایسکمیک (پیکان) در بافت مغز ماهیان گروه مواجهه با سرب (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین، درشت‌نمایی ۲۰۰×).

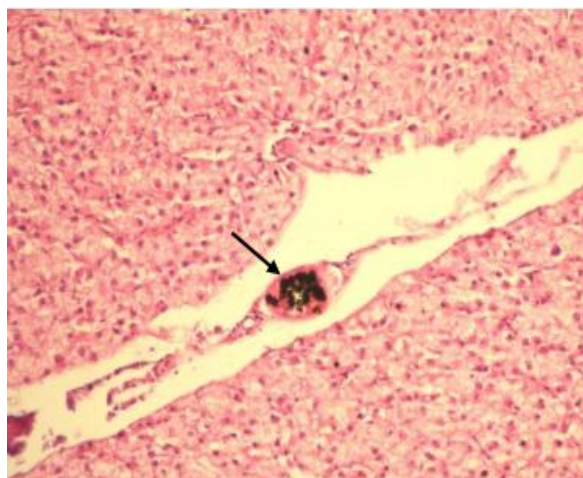
جدول ۱- شاخص‌های پاتولوژیک مغز در گروه‌های مورد مطالعه (میان، چارک اول و چارک سوم).

چارک سوم	چارک اول	میان	گروه*	شاخص پاتولوژیک
۰	۰	۰	۱	پرخونی
۳	۳	۳	۲	
۳	۲	۲	۳	
۲	۱	۱/۵	۴	ادم
۰	۰	۰	۱	
۳	۲	۳	۲	
۳	۲	۳	۳	
۲	۱	۲	۴	
۰	۰	۰	۱	
۳	۲	۲/۵	۲	
۳	۱/۷۵	۳	۳	تغییرات ایسکمیک
۲/۲۵	۱	۱/۵	۴	نورون‌ها

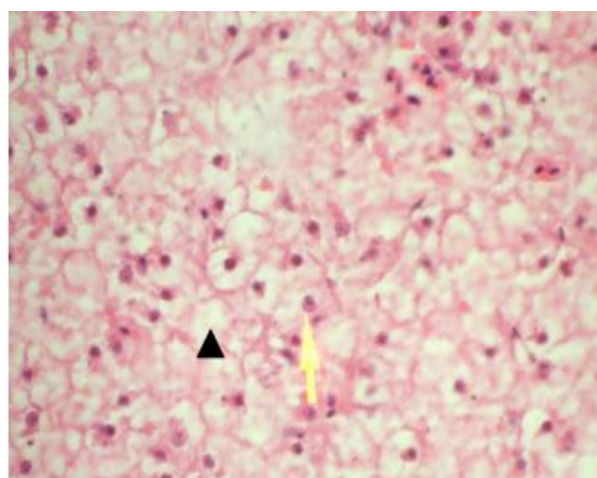
*گروه ۱: شاهد، گروه ۲: مواجهه با سرب، گروه ۳: تیمار با سرب و تیمین، گروه ۴: تیمار با سرب و اسید اسکوریبک.

شدت پرخونی، هایپرپلازی کانون‌های ملانوماکروفاز و دژنراسانس سلولی در گروه تیمار با سرب و تیمین (گروه ۳) به صورت معنی‌داری ($p < 0/002$) کمتر از گروه مواجهه با سرب (گروه ۲) بود. شدت هایپرپلازی کانون‌های ملانوماکروفاز در گروه تیمار با سرب و اسید اسکوریبک (گروه ۴) نیز به صورت معنی‌داری ($p < 0/001$) کمتر از گروه مواجهه با سرب (گروه ۲) بود. همچنین شدت پرخونی و دژنراسانس سلولی در گروه تیمار با سرب و تیمین (گروه ۳) به صورت معنی‌داری ($p < 0/001$) کمتر از گروه تیمار با سرب و اسید اسکوریبک (گروه ۴) بود (جدول ۲).

در مطالعه هیستوپاتولوژی مقاطع تهیه شده از بافت کبد ماهیان گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه شاهد، ضایعاتی شامل پرخونی، هایپرپلازی کانون‌های ملانوماکروفاز، تغییرات دژنراتیو هپاتوسیت‌ها و گنجیدگی‌های اسیدفست داخل هسته‌ای در سلول‌های کبدی مشاهده شد (شکل‌های ۵ و ۶). شدت پرخونی، هایپرپلازی کانون‌های ملانوماکروفاز و دژنراسانس سلولی در گروه مواجهه با سرب (گروه ۲) به صورت معنی‌داری ($p < 0/001$) بیشتر از گروه شاهد بود. همچنین شدت پرخونی و هایپرپلازی کانون‌های ملانوماکروفاز در گروه تیمار با سرب و تیمین (گروه ۳) به صورت معنی‌داری ($p < 0/005$) بیشتر از گروه شاهد بود. شدت پرخونی، هایپرپلازی کانون‌های ملانوماکروفاز و دژنراسانس سلولی در گروه تیمار با سرب و اسید اسکوریبک (گروه ۴) نیز به صورت معنی‌داری ($p < 0/002$) بیشتر از گروه شاهد بود. اما



شکل ۶- هایپرپلازی کانون‌های ملانوماکروفاژ (پیکان) در بافت کبد ماهیان گروه مواجهه با سرب (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ۲۰۰×).



شکل ۵- پرخونی، تغییرات دژنراتیو واکسولر (نوک پیکان) و گنجیدگی‌های اسیدفست داخل هسته‌ای (پیکان) در بافت کبد ماهیان گروه مواجهه با سرب (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ۴۰۰×).

جدول ۲- شاخص‌های پاتولوژیک کبد در گروه‌های مورد مطالعه (میانه، چارک اول و چارک سوم).

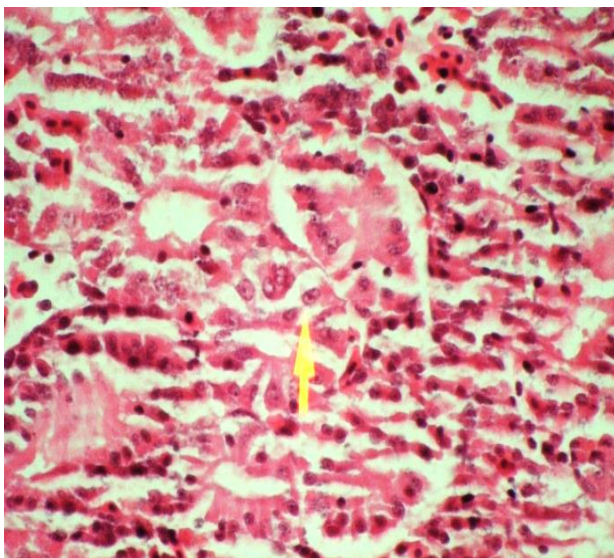
چارک سوم	چارک اول	میانه	گروه*	شاخص پاتولوژیک
۰/۲۵	۰	۰	۱	پرخونی
۳	۳	۳	۲	
۲	۱	۲	۳	
۳	۲	۳	۴	
۰	۰	۰	۱	هایپرپلازی کانون‌های ملانوماکروفاژ
۳	۳	۳	۲	
۱	۰	۱	۳	
۱/۲۵	۱	۱	۴	
۰	۰	۰	۱	تغییرات دژنراتیو هپاتوسیت‌ها
۳	۱	۱/۵	۲	
۱	۰	۰	۳	
۲/۲۵	۱/۷۵	۲	۴	
۰	۰	۰	۱	گنجیدگی‌های داخل هسته‌ای
۱	۰	۰	۲	
۰	۰	۰	۳	
۰	۰	۰	۴	

*گروه ۱: شاهد، گروه ۲: مواجهه با سرب، گروه ۳: تیمار با سرب و تیمار، گروه ۴: تیمار با سرب و اسید آسکوربیک.

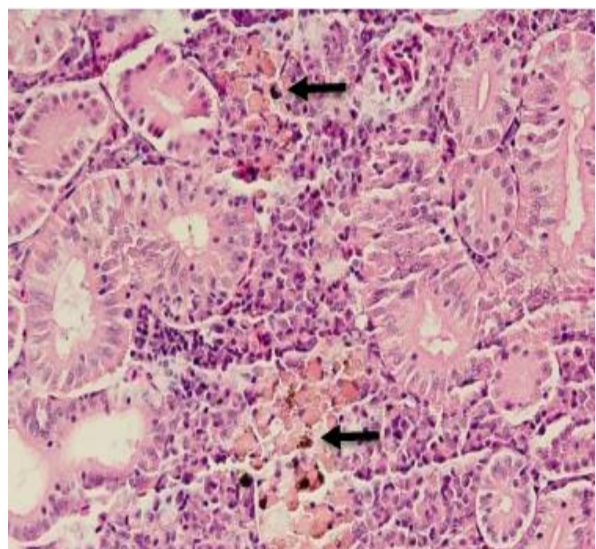
سلولی و وجود گنجیدگی اسیدفست داخل هسته‌ای در گروه تیمار با سرب و تیامین (گروه ۳) به صورت معنی‌داری ($p \leq 0/003$) کمتر از گروه مواجهه با سرب (گروه ۲) بود. همچنین شدت تورم سلولی و حضور گنجیدگی اسیدفست داخل هسته‌ای در گروه تیمار با سرب و اسید آسکوربیک (گروه ۴) نیز به صورت معنی‌داری ($p < 0/001$) کمتر از گروه مواجهه با سرب (گروه ۲) بود.

اما مطابق نتایج ثبت شده در جدول ۳، هیچ‌یک از شاخص‌های پاتولوژی در بافت کلیه، تفاوت معنی‌داری بین گروه تیمار با سرب و تیامین (گروه ۳) و گروه تیمار با سرب و اسید آسکوربیک (گروه ۴) نشان ندادند.

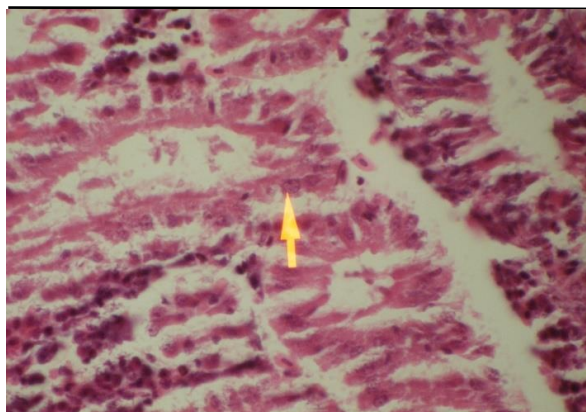
با بررسی مقاطع تهیه شده از بافت کلیه، تغییرات هیستوپاتولوژی شامل پرخونی، خونریزی، تورم سلول‌های پوششی توبول‌ها، هایپرپلازی کانون‌های ملانوماکروفاژ، گنجیدگی‌های اسیدفست داخل هسته‌ای در سلول‌های پوشاننده لوله‌های کلیوی و تغییرات نکروتیک در مقایسه با گروه شاهد مشاهده گردید (شکل‌های ۷ تا ۱۰). تمامی شاخص‌های پاتولوژیک کلیه در گروه مواجهه با سرب (گروه ۲) به صورت معنی‌داری ($p < 0/001$) بیشتر از گروه شاهد بود. همچنین تمام شاخص‌های پاتولوژیک کلیه به جز گنجیدگی اسیدفست داخل هسته‌ای در گروه تیمار با سرب و تیامین (گروه ۳) و گروه تیمار با سرب و اسید آسکوربیک (گروه ۴) به صورت معنی‌داری ($p < 0/001$) بیشتر از گروه شاهد بود. از طرف دیگر شدت تورم



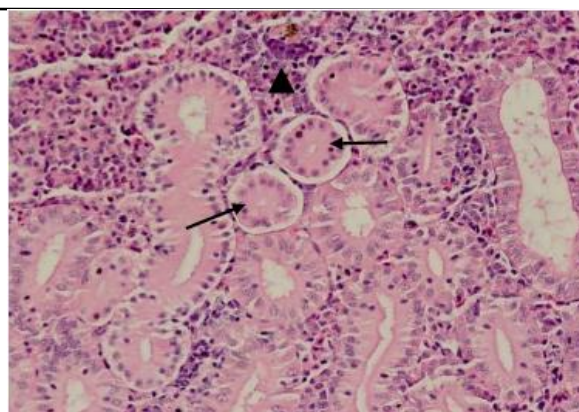
شکل ۸- خونریزی و حضور گنجیدگی‌های اسیدفست داخل هسته‌ای (پیکان) در بافت کلیه ماهیان گروه مواجهه با سرب (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی $\times 400$).



شکل ۷- پرخونی و هایپرپلازی کانون‌های ملانوماکروفاژ (پیکان‌ها) در بافت کلیه ماهیان گروه مواجهه با سرب (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی $\times 400$).



شکل ۱۰- گنجیدگی اسیدفست داخل هسته‌ای (پیکان) و نکروز در بافت کلیه ماهیان گروه تیمار با سرب و اسید آسکوربیک (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین، درشت‌نمایی ۴۰۰x).



شکل ۹- تورم سلول‌های پوششی لوله‌های کلیوی (پیکان‌ها) در ماهیان گروه مواجهه با سرب. نفرت بینابینی نیز به صورت موردی در این مقطع مشاهده می‌گردد (نوک پیکان) (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین، درشت‌نمایی ۴۰۰x).

جدول ۳- شاخص‌های پاتولوژیک کلیه در گروه‌های مورد مطالعه (میان، چارک اول و چارک سوم).

چارک سوم	چارک اول	میان	گروه*	شاخص پاتولوژیک
۰/۲۵	۰	۰	۱	پرخونی
۳	۳	۳	۲	
۳	۱/۷۵	۲	۳	
۳	۲	۳	۴	
۰/۲۵	۰	۰	۱	هایپرپلازی کانون‌های ملانوماکروفاز
۳	۳	۳	۲	
۳	۱/۷۵	۲/۵	۳	
۳	۲	۳	۴	
۰	۰	۰	۱	تورم سلول‌های پوششی لوله‌ها
۳	۲	۳	۲	
۲	۱	۱	۳	
۳	۲	۲	۴	
۰	۰	۰	۱	گنجیدگی‌های داخل هسته‌ای
۱	۱	۱	۲	
۰	۰	۰	۳	
۰	۰	۰	۴	
۰/۲۵	۰	۰	۱	خونریزی
۱	۳	۳	۲	
۳	۱/۷۵	۲	۳	
۳	۲	۲/۵	۴	

*گروه ۱: شاهد، گروه ۲: مواجهه با سرب، گروه ۳: تیمار با سرب و تیامین، گروه ۴: تیمار با سرب و اسید آسکوربیک.

بحث و نتیجه گیری

شاهسونی و همکاران در سال ۲۰۰۹، در مطالعه‌ای روی ماهی حوض با ایجاد سمیت تجربی با غلظت $8/5 \text{ mg/Kg}$ استات سرب به صورت محلول در آب به مدت ۲۱ روز، ضایعات ایجادشده در بافت مغز را پرخونی در مننژ و پارانشیم مغز، ادم و تغییرات ایسکمیک نوروها بیان نمودند (Shahsavani et al., 2009). در بررسی حاضر نیز، بعد از ۱۵ روز مواجهه با 5 mg/l استات سرب، تغییرات هیستوپاتولوژیک مشاهده شده در بافت مغز ماهیان شامل پرخونی در مننژ و پارانشیم مغز، ادم اطراف نوروها، اطراف عروقی و اطراف ماده سفید و تغییرات ایسکمیک در نوروها بود. در توجیه این موضوع نشان داده‌اند که تجمع سرب در عروق مغزی موجب تخریب بخش اندوتلیال عروق مغزی گشته و منجر به تغییرات دژنراتیو در بافت مغزی و بروز آنسفالوپاتی و خونریزی می‌گردد. از سوی دیگر این فلز با عبور از سد خونی-مغزی باعث افزایش حجم مایع مغزی-نخاعی و افزایش فشار داخل جمجمه‌ای می‌شود و در نتیجه موجب ادم در بافت عصبی شده و سبب کاهش جریان خون در هیپوتالاموس و قشر مخ می‌گردد. نرم و حفره‌ای شدن ماده خاکستری مغز و نکروز سلول‌های عصبی نیز در مسمومیت با سرب رخ می‌دهد (Baker, 1987; Feller, 1998).

خضرم و همکاران در سال ۲۰۱۲ در مطالعه‌ای اثرات نیترا سرب روی کبد ماهی سیکلید یا Cichlid fish (*Oreochromis niloticus*) را مورد بررسی قرار دادند و ضایعاتی از جمله اتساع و پرخونی عروق، واکوئله شدن هپاتوسیت‌ها، تغییرات دژنراتیو و نکروز

سلول‌های کبدی را مشاهده کردند که شدت این ضایعات مخصوصاً نکروز، در غلظت‌های بالاتر، شدیدتر گزارش شد. همچنین در غلظت 10 ppm نیترا سرب، هایپرپلازی کانون‌های ملانوماکروفاژ نیز مشاهده شد (Khidr et al., 2012). در مطالعه حاضر نیز ضایعات مشاهده شده در بافت کبد شامل پرخونی، هایپرپلازی کانون‌های ملانوماکروفاژ، تغییرات دژنراتیو هپاتوسیت‌ها و گنجدگی‌های اسیدفست داخل هسته‌ای سلول‌های کبدی بود. در توجیه علت موارد ذکر شده در بالا، تحقیقات نشان می‌دهد که سرب در فعالیت پروتئین‌های حیاتی نظیر سیتوکروم P450 و عملکرد میتوکندری اختلال ایجاد کرده و در نتیجه تنفس سلولی، واکنش‌های مربوط به فسفریلاسیون اکسیداتیو و سنتز ATP دچار مشکل شده و لذا موجب تغییرات دژنراتیو در هپاتوسیت‌ها می‌شود (Alvares et al., 1976).

در مهره‌داران خونسرد، کانون‌های ملانوماکروفاژ موجود در بافت‌های خون‌ساز طحال، کلیه و گاهاً کبد، به عنوان تجمعی از ماکروفاژها و سلول‌های پیگمان‌دار محسوب می‌شوند که از لحاظ عملکردی مشابه عقده‌های لنفاوی موجود در پرندگان و پستانداران می‌باشند. دریافت و ذخیره آهن در بیماری‌های همولیتیک، به دام انداختن آنتی‌ژن‌ها و تحویل آن‌ها به لنفوسیت‌ها و توقف تولیدات سمی و عامل تغییرات دژنراتیو سلولی بافت‌ها مانند رادیکال‌های آزاد و محصولات ناشی از کاتابولیسم سلولی از وظایف این کانون‌ها به حساب می‌آید. در شرایط استرس، اندازه و تعداد کانون‌های ملانوماکروفاژ افزایش پیدا می‌کند و یک مشخصه قابل اعتماد در موارد کمبود اکسیژن و

میلی گرم استات سرب در لیتر، ۳۰ و ۶۰ میلی گرم تیامین در لیتر گزارش دادند ضایعات ایجاد شده توسط سرب در بافت‌های مورد مطالعه با تجویز تیامین کاهش معنی‌داری را نشان دادند که میزان این کاهش در غلظت بالاتر تیامین، بیشتر نیز بود (Shahsavani *et al.*, 2009). در این مورد هم نقش مفید ویتامین‌های گروه B کمپلکس به ویژه تیامین در کاهش اثرات سمی سرب به خوبی مشخص شده است (Reddy *et al.*, 2010). از آنجایی که تیامین دارای یک حلقه پیریمیدینی و یک هسته تiazولی است، لذا از آن به عنوان یک عامل درمانی شلاته‌کننده در مسمومیت با سرب استفاده می‌شود (Kalia and Flora, 2005) و چون یک ویتامین محلول در آب است و به سرعت از بدن دفع می‌گردد، برای بدن غیرسمی محسوب می‌شود (Wang *et al.*, 2007).

در یک مطالعه که دالی و همکاران در سال ۱۹۹۰ انجام دادند، تجویز داخل وریدی اسید آسکوربیک سطوح سرب بافتی را در موش‌هایی که به طور مداوم در معرض سرب بودند، کاهش داد (Dalley *et al.*, 1990).

آنجلو و همکاران در سال ۲۰۰۲ در مطالعه‌ای نشان دادند که ترکیب تیامین و اسید آسکوربیک در درمان مسمومیت با سرب و خروج آن از بافت‌ها مؤثر است (Angelov *et al.*, 2002). در این خصوص گزارشاتی وجود دارد مبنی بر این که تجویز همزمان تیامین و اسید آسکوربیک در محافظت علیه مسمومیت تجربی با سرب در موش، مفیدتر از تجویز هر کدام از آن‌ها به تنهایی است (Wang *et al.*, 2007). در این ارتباط سه مکانیسم احتمالی برای نحوه عملکرد تیامین و اسید آسکوربیک

آلودگی‌های شیمیایی آب می‌باشد (Agius and Roberts, 2003).

جرار در سال ۲۰۰۳ در مطالعه‌ای تغییرات هیستوپاتولوژیک کلیه ناشی از مسمومیت با سرب را مورد بررسی قرار داد. برخی از ضایعات گزارش شده در این تحقیق شامل تغییرات دژنراتیو و نکروتیک سلول‌های توبولی، گنجیدگی داخل هسته‌ای و سیتوپلاسمی سلول‌های اپیتلیال، هایپرپلازی و آدنوم توپر لوله‌ای، گلومرولواسکلروز کانونی و قطعه‌ای، هیالینه‌شدن گلومرول‌ها و تغییرات ساختار گلومرول‌ها بود (Jarrar, 2003). در مطالعه حاضر نیز در بافت کلیه، پرخونی، خونریزی، تورم سلول‌های پوششی، هایپرپلازی سلول‌های ملانوماکروفاز، گنجیدگی‌های اسیدفست داخل هسته‌ای در سلول‌های پوشاننده لوله‌های کلیوی و تغییرات نکروتیک این سلول‌ها مشاهده گردید. در این ارتباط هم عقیده بر این است که کلیه از جمله بافت‌های هدف مهم در مسمومیت با سرب است. یک علامت بارز در مسمومیت با سرب در این بافت، تشکیل گنجیدگی‌های داخل هسته‌ای در سلول‌های پوششی لوله‌های پیچیده نزدیک کلیوی است (Booth and McDonald, 1988). پروتئین‌های اختصاصی کلیوی متصل‌شونده به سرب که توانایی تسهیل انتقال سرب به داخل هسته و اتصال به DNA را دارند، ممکن است به‌عنوان گیرنده‌های اختصاصی بافت برای سرب عمل کنند، بنابراین تجمع این پروتئین‌ها در لوله‌های کلیوی سبب ایجاد تغییرات نکروتیک و مرگ سلول‌ها می‌شود (Fowler and DuVal, 1991).

شاهسونی و همکاران در سال ۲۰۰۹ در مطالعه‌ای روی بافت‌های ماهیان حوض با تجویز ۸/۵

آسکوربیک استفاده شده، مدت زمان مسمومیت و طول دوره درمان، شیوه درمان و مسمومیت و یا عدم کنترل عوامل مخدوش گر باشد.

با توجه به تمام مطالب ذکر شده و نتایجی که در مطالعه حاضر حاصل شده، برای پژوهش های آینده افزایش طول دوره درمان، افزایش دوزهای مصرفی مربوط به تیامین و اسید آسکوربیک و استفاده همزمان و ترکیبی از این دو ویتامین پیشنهاد می گردد. همچنین، از آنجا که باید در تجویز خوراکی شلاتورها احتیاط به خرج داد، پیشنهاد می شود مطالعات بیش تری به منظور بررسی سایر روش های تجویز، صورت گیرد. همچنین پیشنهاد می گردد جذب اتمی سرب نیز بررسی گردد.

سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به خاطر تأمین هزینه اجرای این تحقیق و همچنین از آزمایشگاه ها و کارشناسان بخش های پاتولوژی و آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد که ما را در انجام این کار پژوهشی مساعدت نمودند، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می دارند که در این مطالعه هیچ گونه تضاد منافی ندارند.

علیه مسمومیت با سرب مطرح شده که عبارتند از: تعدیل کمبود تیامین و اسید آسکوربیک بدن، تغییر نفوذپذیری سلول که حذف سرب داخل سلولی را آسان می کند و ایجاد کمپلکس بین سرب و تیامین یا اسید آسکوربیک یا یکی از متابولیت های آن ها که می تواند دفع سرب از بدن را تسهیل کند (Ghazi-Khansari *et al.*, 1996).

یافته های مطالعه حاضر و سایر تحقیقات نشان می دهد سرب می تواند موجب آسیب شدید به بافت های نرم بدن ماهی گردد و ضایعات گسترده و شدید پاتولوژیک را در بافت های مختلف به وجود آورد. از آنجایی که در مطالعات انجام شده، تجویز تیامین و اسید آسکوربیک اثر تعدیل کنندگی بر آسیب های بافتی ناشی از سرب داشته است، در سال های اخیر بیشتر مورد توجه قرار گرفته اند (Angelov, 2002; Dalley, 1990).

در مطالعه حاضر گروهی از ماهیان مورد آزمایش که در معرض سرب قرار داشتند، ضایعات پاتولوژیک را با شدت بالا نشان دادند. همچنین کاهش شدت ضایعات در هر دو گروه درمان شده با تیامین و اسید آسکوربیک در بافت های مورد مطالعه، مشاهده گردید و به نظر می رسد که این دو ترکیب در تخفیف ضایعات ناشی از مسمومیت با سرب در بافت های مغز، کبد و کلیه ماهی کپور موثر می باشند. تفاوت بین نتایج تحقیقات مختلف، می تواند به دلیل اختلاف گونه ای نمونه ها، دوزهای متفاوت سرب، تیامین و اسید

منابع

- Agius, C. and Roberts, R. (2003). Melano macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases*, 26(9): 499-509.
- Ajayi, G., Adeniyi, T. and Babayemi, D. (2009). Hepatoprotective and some haematological effects of *Allium sativum* and vitamin C in lead-exposed wistar rats. *International Journal of Medicine and Medical Sciences*, 1(3): 64-67.
- Alvares, A.P., Fischbein, A., Sassa, Sh., Anderson, KE. and Kappas, A. (1976). Lead intoxication: Effects on cytochrome P450 mediated hepatic oxidations. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 19(2): 183-190.
- Al-Weher, S. (2008). Levels of heavy metal Cd, Cu and Zn in three fish species collected from the northern Jordan valley, Jordan. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 1(1): 41-46.
- Anbudhasan, P., Surendraraj, A., Karkuzhali, S. and Sathishkumaran, P. (2014). Natural antioxidants and its benefits. *International Journal of Food and Nutritional Sciences*, 3(6): 25-232.
- Angelove, A., Hisitev, H. and Belchev L. (2002). Influence of ascorbic acid, thiamine or their combination on lead poisoning I albino rats. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 5(4): 233-239.
- Baker, J.C. (1987). Lead poisoning in cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 3(1): 137-147.
- Booth, N.H. and McDonald, L.E. (1988). *Veterinary pharmacology and therapeutics*. Iowa State University Press, pp: 108-119.
- Dalley, J., Gupta, P. and Hung, C. (1990). A physiological pharmacokinetic model describing the disposition of lead in the absence and presence of L-ascorbic acid in rats. *Toxicology Letters*, 50(2): 337-348.
- Feller, W.R. (1998). *Small Animal Toxicology and Poisonings*. 1st ed., USA: Mosby, St Louis, pp: 167-172.
- Fowler, B.A. and DuVal, G. (1991). Effects of lead on the kidney: roles of high-affinity lead-binding proteins. *Environmental Health Perspectives*, 91(2): 77-80.
- Ghiasi, F. (2001). *The Mechanism of Regulation of Metals in Fish*. Iran: Tehran University, pp: 43-64. [In Persian]
- Ghazi-Khansari, M., Hajighasemkhan, A. and Ghazaie, S. (1996). Influences of thiamine and/or ascorbic acid on lead intoxication. *Acta Medica Iranica*, 34(3-4): 61-64.
- Halliwell, B., Wasil, M. and Grootveld, M. (1987). Biologically significant scavenging of the myeloperoxidase derived oxidant hypochlorous acid by ascorbic acid. *Federation of the European Biochemical Societies (FEBS) Letters*, 213(1): 15-17.
- Jarrar, B.M. (2003). Histological and histochemical alterations in the kidney induced by lead. *Annals of Saudi Medicine*, 23(1-2): 10-15.
- Järup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*, 68(1): 167-182.
- Hayes, W. (2001). *Principles and Methods of Toxicology*. 4th ed., Philadelphia: Taylor and Francis, pp: 491-520.
- Kalia, K. and Flora, S.J. (2005). Strategies for safe and effective therapeutic measures for chronic arsenic and lead poisoning. *Journal of Occupational Health*, 47(1): 1-27.
- Khidr, B.M., Mekkawy, I.A., Harabawy, A.S. and Ohaida A.S. (2012). Effect of lead nitrate on the liver of the cichlid fish (*Oreochromis niloticus*): a light microscope study. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 15(18): 854.
- Lukienko, P.I., Mel'nichenkoI, N.G., Zverinskii, S.V. and Zabrodskaia, V. (2000). Antioxidant properties of thiamine. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 130(3): 874-876.
- Mokhtari, N.G. (2007). The effect of orally administered lead on thyroid gland hormones' and liver enzymes' concentrations in rats. *Hormozgan Medical Journal*, 11(2): 115-120. [In Persian]

-
- Reddy, S.Y., Pullakhandam, R. and Kumar, B.D. (2010). Thiamine reduces tissue lead levels in rats: mechanism of interaction. *Biometals*, 23(2): 247-253.
 - Samad, L.H., Azizi, M. and Barzegar, M. (2007). Antioxidative effect of pomegranate seed phenolic components on soybean oil. *Journal of Agricultural Sciences*, 14(4): 193-200.
 - Shamsavani, D., Movassaghi, A.R. and Omid zahir, Sh. (2009). Therapeutic effect of thiamine on experimentally lead induced damages in Gold fish. *Journal of Veterinary Research*, 64(3): 237-242. [In Persian]
 - Shan, G., Tang, T. and Zhang, X. (2009). The protective effect of ascorbic acid and thiamine supplementation against damage caused by lead in the testes of mice. *Journal of Huazhong University of Science and Technology*, 29(1): 68-72.
 - Wang, C., Liang, J., Zhang, C., Bi, Y., Shi, X. and Shi, Q. (2007). Effect of ascorbic acid and thiamine supplementation at different concentrations on lead toxicity in liver. *Annals of Occupational Hygiene*, 51(6): 563-569.
 - Warren, C. (2001). *Brush with death: a social history of lead poisoning*. United States of America: John Hopkins University Press, pp: 27-40.
 - Ziegfeld, R.L. (1964). Importance and uses of lead. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 8(2): 202-212.

Experimental comparison of the effects of ascorbic acid and thiamine in prevention of lead induced tissue damages in selected tissues of common carp (*Cyprinus carpio*)

Pourali, F.¹, Moosavi, Z.^{2*}, Shahsavani, D.³, Azizzadeh, M.⁴

1- D.V.M. Graduate, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashad, Mashad, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashad, Mashad, Iran.

3- Professor, Department of Fish Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashad, Mashad, Iran.

4- Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashad, Mashad, Iran.

*Corresponding author's email: zmoosavi@um.ac.ir

(Received: 2017/8/12 Accepted: 2019/1/20)

Abstract

Due to accumulation of lead in edible tissues of fish, the safety and health of human food are also affected. This study was conducted to compare the effects of ascorbic acid and thiamine in prevention of lead induced tissue damages in selected tissues of common carp (*Cyprinus carpio*). Fish were divided randomly into 4 groups of 30 fish each. Group 1 was considered as control group. Group 2 received lead acetate while groups 3 and 4 received thiamine and ascorbic acid respectively in addition to lead. After necropsy, tissue specimens were collected from the brain, kidney and liver and the processed slides were stained with hematoxylin and eosin. Brain lesions in group 4 consisting of hyperemia, edema and ischemic cell changes were significantly lower in comparison to groups 2 and 3. In liver, hyperemia, hyperplasia of melano-macrophage centers, hepatocellular degeneration and intranuclear acid-fast inclusion bodies were observed. The severity of hyperemia and degeneration in group 3 was significantly lower in comparison to group 4. In the statistical comparison, none of the renal pathological indices including hyperemia, hemorrhage, intranuclear acid-fast inclusion bodies, necrotic changes, swelling of epithelial cells and hyperplasia of melano-macrophage centers revealed significant differences between groups 3 and 4 but compared to group 2, some lesions in these groups showed a significant difference. Based on the results, it can be concluded that ascorbic acid and thiamin might have some protective and therapeutic effects on lead poisoning in fish.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Lead, Thiamine, Ascorbic acid, Histopathology, Common carp.