Veterinary Clinical Pathology, Vol.13, No. 49, Spring 2019

"Research article" **DOI: 10.30495/JVCP.2019.664879**

Experimental comparison of the effectsof 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.

"مقاله پژوهشی" DOI: 10.30495/JVCP.2019.664879

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[٤]

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 آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

٤- 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: ۹٦/۵/۲۱ 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 به‌صورت تصادفی به ٤ گروه ۳۰تایی تقسیم شدند. گروه ۱ به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. گروه ۲ استات سرب، گروه ۳ و ٤ 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، به‌روش هماتوکسیلین- ائوزین رنگ‌آمیزی شد. در مقایسه آماری ضایعات بافت مغز شامل پرخونی، ادم و تغییرات ایسکمیک در گروه ٤ به صورت معنی‌داری کمتر از گروه‌های ۲ و ۳ بود. همچنین در کبد، پرخونی، هایپرپلازی کانون‌های ملانوماکروفاژ، تغییرات دژنراتیو و گنجیدگی‌های اسیدفست داخل هسته‌ای هپاتوسیت‌ها مشاهده گردید. شدت پرخونی در بافت کبد و تغییرات دژنراتیو هپاتوسیت‌ها در گروه ۳ به‌صورت معنی‌داری کمتر از گروه ٤ بود. هیچ‌یک از شاخص‌های پاتولوژیک کلیه شامل پرخونی، خونریزی، گنجیدگی‌های اسیدفست داخل هسته‌ای، تورم و نکروز سلول‌های پوششی توبول‌ها و هایپرپلازی کانون‌های ملانوماکروفاژ، بین گروه‌های ۳ و ٤ 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 پشیگیری 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 می‌باشد که در محیط انتشار گسترده‌ای دارد و در آب و خاک وجود داشته و طیف وسیعی از اختلالات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی را موجب می‌گردد (Ajayi *et al.*, 2009). فلزات سنگین، عناصر کمیاب در محیط آبی هستند، اما امروزه به دلیل فعالیت‌های انسانی از جمله فعالیت‌های صنعتی، معدنی و کشاورزی، نفوذ بالایی به آب پیدا کرده‌اند که این عناصر به علت سمیّت و فعالیت تجمعی، اثرات مخربی را بر اکوسیستم می‌توانند وارد کنند (Ajayi *et al.*, 2009, Al-Weher, 2008). فعالیت‌های انسانی موجب نفوذ مقادیر بالایی سرب به آب‌های رودخانه‌ای یا هر محیط آبی دیگر شده است. منشأ آلودگی می‌تواند ناشی از گیاهان دریایی، رسوبات دریایی در کف، گازوئیل نشتی از قایق‌ها، کارخانجات تولید کننده باتری ماشین، کودها، رنگ‌ها، فیلم عکاسی و فیلمبرداری نیز باشد. فاضلاب‌های شهری نیز، دارای مقادیر بالایی از نمک‌های فلزات سنگین می‌باشند (Ziegfeld, 1964).

سرب از طریق دستگاه تنفس و گوارش می‌تواند به بدن انسان راه پیدا کرده و ایجاد مسمومیت کند. مسمومیت با سرب، در بین حیوانات و انسان‌ها شایع است. خاصیت چربی‌دوستی سرب و از طرفی وجود بافت‌های چربی در ماهیان، توانایی دریافت سرب از محیط آبی را برای ماهیان، ساده و امکان پذیر می‌کند (Ghiasi *et al.*, 2001). تجمع فلز سرب در بافت‌های خوراکی ماهی، امنیت و سلامت غذای انسان را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهد. طبق مطالعات انجام شده، ۷۰ تا ۸۰ درصد مسمومیت‌ها در انسان، از طریق خوراکی صورت می‌گیرد. از شایع‌ترین علایم بالینی که در اثر مسمومیت مزمن با سرب در انسان رخ می‌دهد شامل: ضعف عضلانی، لرزش، سردرد، عصبانیت و لاغری و ... می‌باشد (Mokhtari, 2007; Hayes, 2001).

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

با توجه به اثرات سوئی که مسمومیت با سرب، به خصوص در انسان ایجاد می‌کند، بحث درمان و پیش‌گیری از آن، اهمیت فراوانی پیدا کرده است. از طرفی هم میزان تاثیر برخی ترکیبات شلاته‌کننده که مورد استفاده قرار گرفته‌اند، هنوز در درمان این مسمومیت، به علت عوارض جانبی متعددی که به خصوص در مصرف طولانی مدت می‌تواند داشته باشد، مورد بحث و سوال است و به همین دلیل است که هنوز استفاده از این ترکیبات در دام‌ها مورد تایید نمی‌باشد. لذا لازم به‌نظر می‌رسد ترکیباتی جایگزین شوند که هم منشأ طبیعی داشته و عوارض جانبی آن‌ها کم باشد و هم اثرات مطلوبی در کاهش میزان فلزات سمی در بافت‌های 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 اسید آسکوربیک (ascorbic acid) و تیامین (thiamine) که دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشند، می‌توانند در زمینه پیش‌گیری و درمان

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. آنتی اکسیدان‌های صناعی دارای خاصیت سرطان‌زایی بوده (Anbudhasan *et al.*, 2014) و به‌همین 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 صناعی انجام شده است (Samad *et al.*, 2007). با توجه به پیشرفت صنعت آبزی‌پروری 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 اسیدآسکوربیک، در جهت کاهش و 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 ماهی‌کپور (*Cyprinus carpio*) معمولی به ظاهر سالم با علائم رفتاری طبیعی به وزن ۱۰±۶۰ گرم از کارگاه پرورش ماهی گرمابی سبزوار تهیه و با نمک ۳ درصد به مدت ۱۵دقیقه ضدعفونی شدند. ماهیان به محیط جدید در بخش آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد منتقل و در محیط آکواریوم به مدت ۱۰ روز نگه‌داری شدند تا علاوه بر کاهش استرس، با محیط جدید سازگاری پیدا کنند. سپس ماهیان به ٤ 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 mg/lit ۵ 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 mg/lit ۵ استات سرب، به میزان ۵۰ میلی‌گرم در هر کیلو غذا (خریداری‌شده 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 mg/lit ۵ استات سرب، به‌صورت 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 ۱±۲۱ درجه سلسیوس، مقدار اکسیژن محیط ppm ٦/٥-٦ و pH=۷/۵±۰/۵ بود. در طول مدت آزمایش رفتار ماهیان شامل بی‌اشتهایی، تغییر رنگ، شنا و حرکت بدون تعادل، افتادن باله (fin clamping)، عمود بودن باله پشتی، سرفه و میزان تلفات، مورد پایش قرار گرفت.

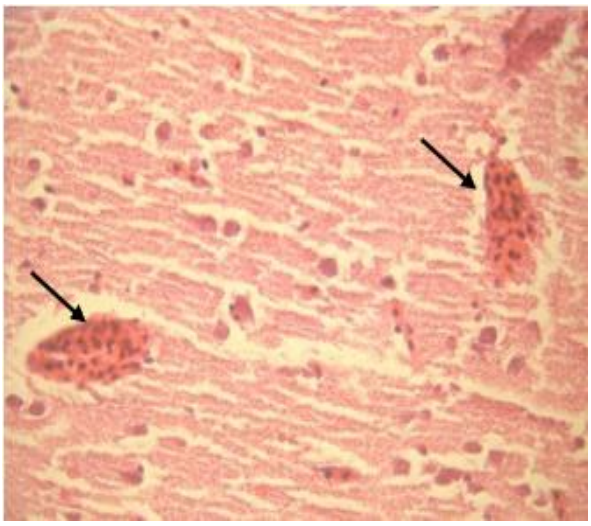
در پایان آزمایش به صورت تصادفی ۱۰ ماهی از هر گروه انتخاب و پس از آسان‌کشی به وسیله گل میخک، کالبدگشایی شده و از مغز، کبد و کلیه آن‌ها نمونه برداری صورت گرفت. نمونه‌های بافتی در داخل

فرمالین بافر ۱۰ درصد پایدار گشتند. بعد از ۲٤ ساعت فرمالین تعویض گردید. سپس مراحل فرآوری نمونه‌های به‌دست 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)

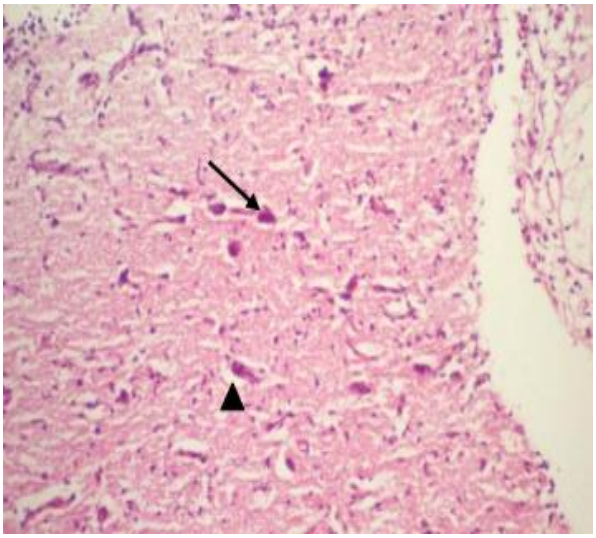
- **تحلیل آماری داده‌ها:** مقایسه گروه‌ها از نظر شدت ضایعات، با آزمون ناپارامتری کروسکال والیس (the kruskal-wallis) در سطح p کمتر از ۰/۰۱ انجام شد. مقایسه دوتایی گروه‌ها به علت تعدد مقایسه‌ها توسط آزمون یومان وایتنی (mann-withney U test) با تصحیح بونفرونی (bonferroni) و در سطح p کمتر از ۰/۰۱ معنی‌دار تلقی گردید. برای آنالیز داده‌ها، از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ استفاده شد.

یافته‌ها

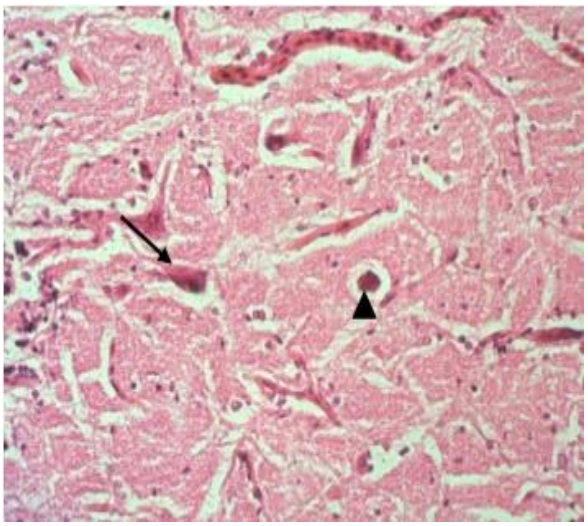
در آسیب‌شناسی بافتی مغز، ضایعاتی از جمله پرخونی در منتژ و پارانشیم مغز، ادم اطراف نورونی و اطراف عروقی و تغییرات ایسکمیک نورون‌ها در گروه‌های ۲ (دریافت کننده سرب)، ۳ (تیمار با سرب و تیامین) و ٤ (تیمار با سرب و ویتامین C) در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد (شکل‌های ۱ تا ٤). شدت آسیب‌ها شامل پرخونی، ادم و تغییرات ایسکمیک نورون‌ها در گروه‌های مواجهه با سرب (گروه ۲)، تیمار با سرب و تیامین (گروه ۳) و دریافت‌کننده سرب و اسید آسکوربیک (گروه ٤) به‌صورت معنی‌داری (p<۰/۰۰۱) بیشتر از گروه شاهد بود. اما شدت پرخونی، ادم و تغییرات ایسکمیک نورون‌ها 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 آسکوربیک (گروه ٤) به صورت معنی‌داری (p<۰/۰۰۳) کمتر از گروه مواجهه با سرب (گروه ۲) بود. اما شدت، پرخونی و ادم در گروه تیمار با سرب و اسید آسکوربیک به صورت معنی‌داری (p<۰/۰۰۷) کمتر از گروه تیمار با سرب و تیامین بود (جدول ۱).



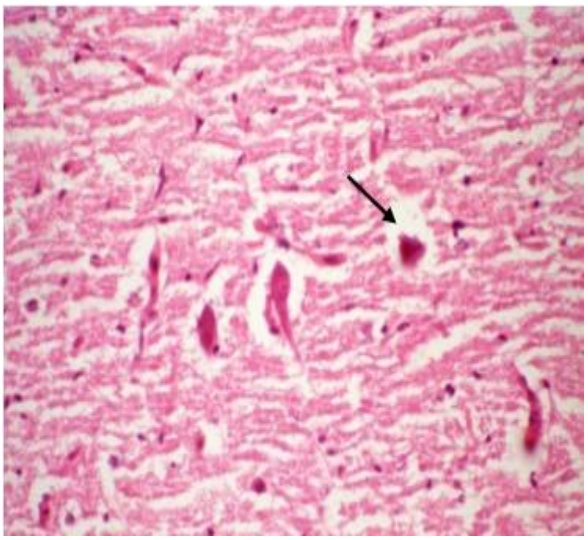
شکل ۱- پرخونی (پیکان‌ها) در بافت مغز ماهیان گروه مواجهه با سرب (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ×٤٠٠)



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



شکل ۳- پرخونی، ادم (نوک پیکان) و تغییرات ایسکمیک نرون‌ها (پیکان) در بافت مغز ماهیان گروه تیمار با سرب و تیامین (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ×٤٠٠).



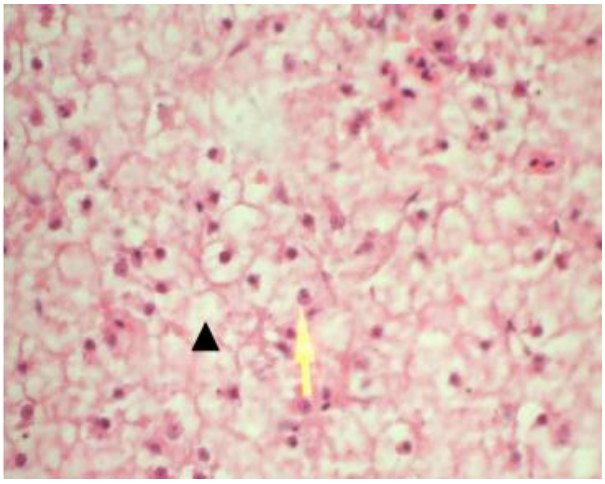
شکل ٤- ادم و تغییرات ایسکمیک نرون‌ها (پیکان) در بافت مغز ماهیان گروه تیمار با سرب و ویتامین C (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ×٤٠٠).

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

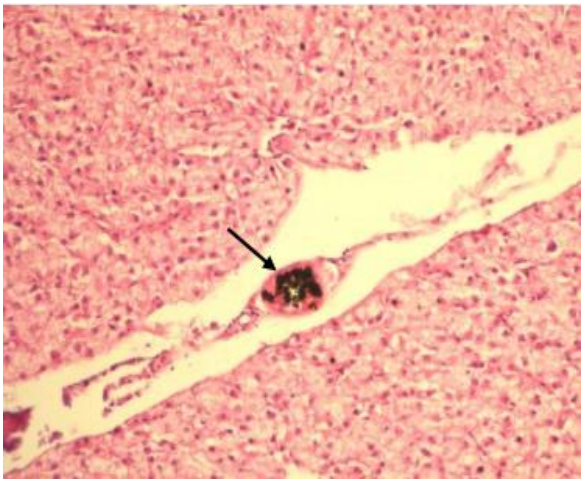
شاخص پاتولوژیک	گروه*	میانه	چارک اول	چارک سوم
پرخونی	۱	۰	۰	۰
	۲	۳	۳	۳
	۳	۲	۲	۳
	٤	۱/٥	۱	۲
ادم	۱	۰	۰	۰
	۲	۳	۲	۳
	۳	۳	۲	۳
	٤	۲	۱	۲
تغییرات ایسکمیک نورون‌ها	۱	۰	۰	۰
	۲	۲/٥	۲	۳
	۳	۳	۱/۷٥	۳
	٤	۱/٥	۱	۲/۲٥

*گروه ۱: شاهد، گروه ۲: مواجهه با سرب، گروه ۳: تیمار با سرب و تیامین، گروه ٤: تیمار با سرب و اسید آسکوربیک.

در مطالعه هیستوپاتولوژی مقاطع تهیه‌شده از بافت کبد ماهیان گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه شاهد، ضایعاتی شامل پرخونی، هایپرپلازی کانون‌های ملانوماکروفاژ، تغییرات دژنراتیو هپاتوسیت‌ها و گنجیدگی‌های اسیدفست داخل هسته‌ای در سلول‌های کبدی مشاهده شد (شکل‌های ۵ و ٦). شدت پرخونی، هایپرپلازی کانون‌های ملانوماکروفاژ و دژنرسانس سلولی در گروه مواجهه با سرب (گروه ۲) به صورت معنی‌داری ($p<۰/۰۰۱$) بیشتر از گروه شاهد بود. همچنین شدت پرخونی و هایپرپلازی کانون‌های ملانوماکروفاژ در گروه تیمار با سرب و تیامین (گروه ۳) به صورت معنی‌داری ($p<۰/۰۰٥$) بیشتر از گروه شاهد بود. شدت پرخونی، هایپرپلازی کانون‌های ملانوماکروفاژ و دژنرسانس سلولی در گروه تیمار با سرب و اسید آسکوربیک (گروه ٤) نیز به صورت معنی‌داری ($p<۰/۰۰۲$) بیشتر از گروه شاهد بود. اما شدت پرخونی، هایپرپلازی کانون‌های ملانوماکروفاژ و دژنرسانس سلولی در گروه تیمار با سرب و تیامین (گروه ۳) به‌صورت معنی‌داری ($p<۰/۰۰۲$) کمتر از گروه مواجهه با سرب (گروه ۲) بود. شدت هایپرپلازی کانون‌های ملانوماکروفاژ در گروه تیمار با سرب و اسید آسکوربیک (گروه ٤) نیز به‌صورت معنی‌داری ($p<۰/۰۰۱$) کمتر از گروه مواجهه با سرب (گروه ۲) بود. همچنین شدت پرخونی و دژنرسانس سلولی در گروه تیمار با سرب و تیامین (گروه ۳) به صورت معنی‌داری ($p<۰/۰۰۱$) کمتر از گروه تیمار با سرب و اسید آسکوربیک (گروه ٤) بود (جدول ۲).



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



شکل ٦- هایپرپلازی کانون‌های ملانوماکروفاژ (پیکان) در بافت کبد ماهیان گروه مواجهه با سرب (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ×۲۰۰).

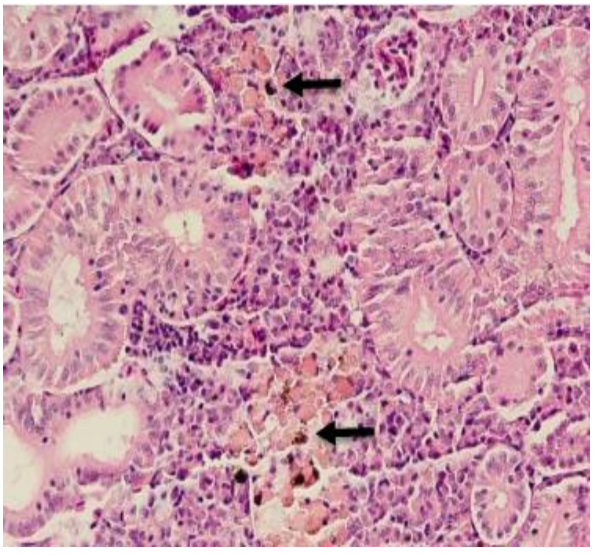
جدول ۲- شاخص‌های پاتولوژیک کبد در گروه‌های مورد مطالعه (میانه، چارک اول و چارک سوم).

شاخص پاتولوژیک	گروه*	میانه	چارک اول	چارک سوم
پرخونی	۱	۰	۰	۰/۲۵
	۲	۳	۳	۳
	۳	۲	۱	۲
	٤	۳	۲	۳
هایپرپلازی کانون های ملانوماکروفاژ	۱	۰	۰	۰
	۲	۳	۳	۳
	۳	۱	۰	۱
	٤	۱	۱	۱/۲۵
تغییرات دژنراتیو هپاتوسیت‌ها	۱	۰	۰	۰
	۲	۱/۵	۱	۳
	۳	۰	۰	۱
	٤	۲	۱/۷۵	۲/۲۵
گنجیدگی‌های داخل هسته‌ای	۱	۰	۰	۰
	۲	۰	۰	۱
	۳	۰	۰	۰
	٤	۰	۰	۰

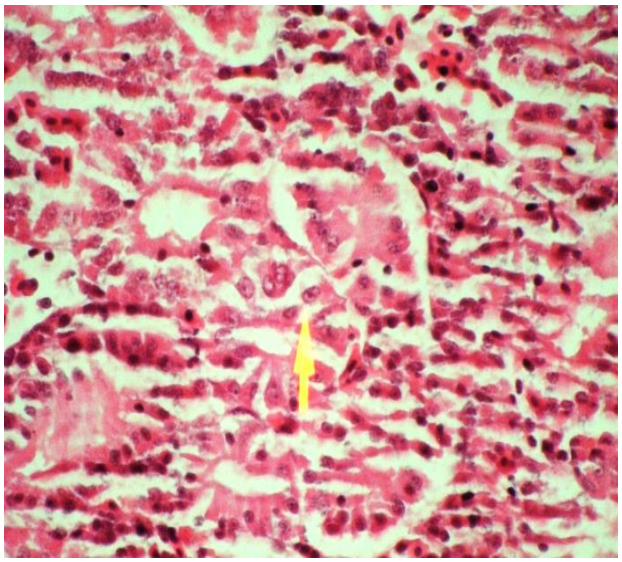
*گروه ۱: شاهد، گروه ۲: مواجهه با سرب، گروه ۳: تیمار با سرب و تیامین، گروه ٤: تیمار با سرب و اسید آسکوربیک.

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) به‌صورت معنی‌داری ($p<۰/۰۰۱$) 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 ٤) به‌صورت معنی‌داری ($p<۰/۰۰۱$) بیشتر از گروه شاهد بود. از طرف دیگر شدت تورم سلولی و وجود گنجیدگی اسیدفست داخل هسته‌ای در گروه تیمار با سرب و تیامین (گروه ۳) به‌صورت معنی‌داری ($p\leq۰/۰۰۳$) 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 ٤) نیز به صورت معنی‌داری ($p<۰/۰۰۱$) کمتر از گروه مواجهه با سرب (گروه ۲) بود.

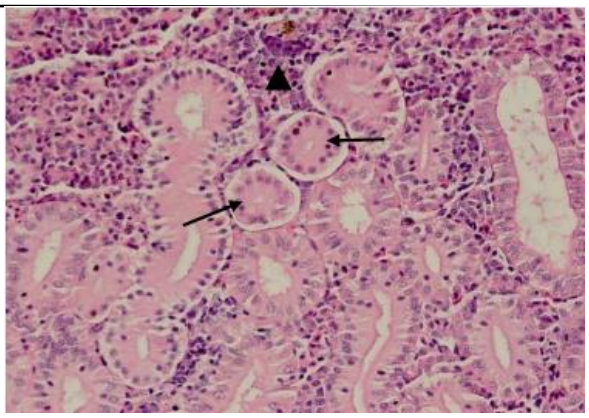
اما مطابق نتایج ثبت‌شده در جدول ۳، هیچ‌یک از شاخص‌های پاتولوژی در بافت کلیه، تفاوت معنی‌داری بین گروه تیمار با سرب و تیامین (گروه ۳) و گروه تیمار با سرب و اسید آسکوربیک (گروه ٤) نشان ندادند.



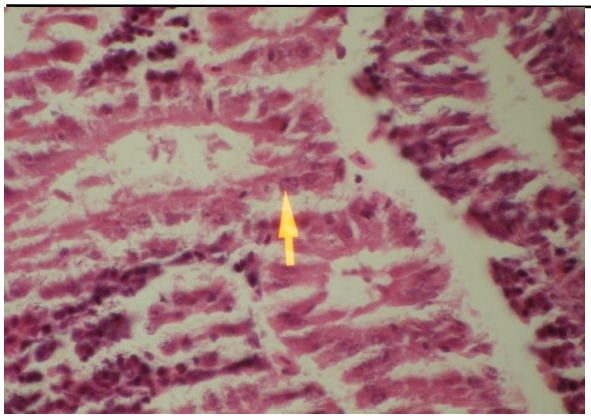
شکل ۷- پرخونی و هایپرپلازی کانون‌های ملانوماکروفاژ (پیکان‌ها) در بافت کلیه ماهیان گروه مواجهه با سرب (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ×٤۰۰).



شکل ۸- خونریزی و حضور گنجیدگی‌های اسیدفست داخل هسته‌ای (پیکان) در بافت کلیه ماهیان گروه مواجهه با سرب (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ×٤۰۰).



شکل ۹- تورم سلول‌های پوششی لوله‌های کلیوی (پیکان‌ها) در ماهیان گروه مواجهه با سرب. نفریت بینابینی نیز به صورت موردی در این مقطع مشاهده می‌گردد (نوک پیکان) (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ×٤٠٠).



شکل ۱۰- گنجیدگی اسیدفست داخل هسته‌ای (پیکان) و نکروز در بافت کلیه ماهیان گروه تیمار با سرب و اسید آسکوربیک (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ×٤٠٠).

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

شاخص پاتولوژیک	گروه*	میانه	چارک اول	چارک سوم
پرخونی	۱	۰	۰	۰/۲۵
	۲	۳	۳	۳
	۳	۲	۱/۷۵	۳
	٤	۳	۲	۳
هایپرپلازی کانون های ملانوماکروفاژ	۱	۰	۰	۰/۲۵
	۲	۳	۳	۳
	۳	۲/۵	۱/۷۵	۳
	٤	۳	۲	۳
تورم سلول‌های پوششی لوله‌ها	۱	۰	۰	۰
	۲	۳	۲	۳
	۳	۱	۱	۲
	٤	۲	۲	۳
گنجیدگی‌های داخل هسته‌ای	۱	۰	۰	۰
	۲	۱	۱	۱
	۳	۰	۰	۰
	٤	۰	۰	۰
خونریزی	۱	۰	۰	۰/۲۵
	۲	۳	۳	۱
	۳	۲	۱/۷۵	۳
	٤	۲/۵	۲	۳

*گروه ۱: شاهد، گروه ۲: مواجهه با سرب، گروه ۳: تیمار با سرب و تیامین، گروه ٤: تیمار با سرب و اسید آسکوربیک.

بحث و نتیجه‌گیری

شاهسونی و همکاران در سال ۲۰۰۹، در مطالعه‌ای روی ماهی حوض با ایجاد سمیت تجربی با غلظت ۸/۵ 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 نورون‌ها بیان نمودند (Shahsavani *et al.*, 2009). در بررسی حاضر نیز، بعد از ۱۵ روز مواجهه با ۵ mg/l استات سرب، تغییرات هیستوپاتولوژیک مشاهده شده در بافت مغز ماهیان شامل پرخونی در مننژ و پارانشیم مغز، ادم اطراف نورونی، اطراف عروقی و اطراف ماده سفید و تغییرات ایسکمیک در نورون‌ها 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).

خضر و همکاران در سال ۲۰۱۲ در مطالعه‌ای اثرات نیترات 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 ۱۰ ppm نیترات 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 گنجیدگی‌های اسیدفست داخل هسته‌ای سلول‌های کبدی بود. در توجیه علت موارد ذکرشده در بالا، تحقیقات نشان می‌دهد که سرب در فعالیت پروتئین‌های حیاتی نظیر سیتوکروم P_{450} و عملکرد میتوکندری اختلال ایجاد کرده و در نتیجه تنفس‌سلولی، 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 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 گزارش‌شده 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 ملانوماکروفاژ، گنجیدگی‌های اسیدفست داخل هسته‌ای در سلول‌های پوشاننده لوله‌های کلیوی و تغییرات نکروتیک این سلول‌ها مشاهده گردید. در این ارتباط هم عقیده براین 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 میلی‌گرم استات سرب در لیتر، ۳۰ و ۶۰ میلی‌گرم تیامین در لیترگزارش 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 Bکمپلکس 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 تیازولی 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 موش هایی 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 مسمویت 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 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 می‌کند و ایجاد کمپلکس بین سرب و تیامین یا اسید آسکوربیک یا یکی از متابولیت های آن‌ها که می تواند دفع سرب از بدن را تسهیل کند (Ghazi-Khansari *et al.*, 1996).

یافته‌های مطالعه حاضر و سایر تحقیقات نشان می‌دهد 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 تعدیل‌کنندگی بر آسیب‌های بافتی ناشی از سرب داشته است، در سال‌های 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 درمان‌شده با تیامین و اسید آسکوربیک در بافت‌های مورد مطالعه، مشاهده گردید و به‌نظر می‌رسد که این دو ترکیب در تخفیف ضایعات ناشی از مسمومیت با سرب در بافت‌های مغز، کبد و کلیه ماهی کپور موثر می‌باشند. تفاوت بین نتایج تحقیقات مختلف، می‌تواند به دلیل اختلاف گونه‌ای نمونه‌ها، دوزهای متفاوت سرب، تیامین و اسید آسکوربیک استفاده شده، مدت زمان مسمومیت و طول دوره درمان، شیوه درمان و مسمومیت و یا عدم کنترل عوامل مخدوش‌گر باشد.

با توجه به تمام مطالب ذکرشده و نتایجی که در مطالعه حاضر حاصل شده، برای پژوهش‌های آینده افزایش طول دوره درمان، افزایش دوزهای مصرفی مربوط به تیامین و اسید آسکوربیک و استفاده همزمان و ترکیبی از این دو ویتامین پیشنهاد می‌گردد. همچنین، از آنجا که باید در تجویز خوراکی شلاتورها احتیاط به خرج داد، پیشنهاد می‌شود مطالعات بیش‌تری به منظور بررسی سایر روش‌های تجویز، صورت گیرد. همچنین پیشنهاد می‌گردد جذب اتمی سرب نیز بررسی گردد.

سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به خاطر تأمین هزینه اجرای این تحقیق و همچنین از آزمایشگاه‌ها و کارشناسان بخش‌های 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 می‌دارند که در این مطالعه هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

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.
- Hayes, W. (2001). Principles and Methods of Toxicology. 4th ed., Philadelphia: Taylor and Francis, pp: 491-520.
- 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.
- 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 Zabrodskaya, 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 componends on soybean oil. Journal of Agricultural Sciences, 14(4): 193-200.
- Shahsavani, 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.