

## بررسی تاثیر آلکیل بنزن سولفانات خطی (LABS) بر برخی از پارامترهای بیوشیمیایی سرم خون ماهی قرمز (*Carassius auratus*)

داور شاهسونی<sup>(۱)</sup>؛ مهرداد مهری<sup>(۲)</sup> و احمد بیجارچی<sup>(۳)</sup>

davar a Ferdowsi.un.ac.ir

۱-۲ گروه آموزشی علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد،

صندوق پستی: ۹۱۷۷۵-۱۷۹۳

۳- دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد صندوق پستی: ۹۱۷۷۵-۱۷۹۳

تاریخ ورود: فروردین ۱۳۸۳ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۸۴

### چکیده

موجودات آبی بطور مداوم در معرض خطرات ناشی از آلودگی‌های محیط زیست قرار دارند. یکی از مواد آلوده کننده LABS یا آلکیل بنزن سولفانات خطی است که به میزان زیادی مورد استفاده قرار می‌گیرد. به منظور مطالعه اثر این ماده آلوده کننده بر پارامترهای سرمی ماهی قرمز، ۱۵۲ عدد ماهی قرمز (۱۸ تا ۲۰ سانتیمتر) به تعداد مساوی در ۴ گروه تقسیم گردیدند. گروه یک بعنوان شاهد و ۳ گروه دیگر بعنوان گروههای مورد آزمایش به مدت ۲۱ روز بترتیب در معرض مقادیر ۵، ۱۰ و ۱۵ ppm ماده LABS قرار گرفتند. در پایان آزمایش از ماهیها خونگیری بعمل آمد و مقادیر اوره، اسید اوریک، کراتینین، AST (آسپارات آمینوترانسفراز)، ALT (آلانین آمینو ترانسفراز) و فسفر با روشهای مربوطه مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند. نتایج حاصل با استفاده از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن مورد مقایسه قرار گرفتند. میزان اوره در گروه ۱ و ۲ بطور معنی‌داری از گروه شاهد کمتر ( $P < 0.05$ ) و میزان اسید اوریک در گروه ۲ بطور معنی‌داری از گروه شاهد بیشتر بود ( $P < 0.05$ ). میزان کراتینین در گروه ۳ و میزان فسفر در گروه ۲ و ۳ بطور معنی‌داری از گروه شاهد بیشتر بود ( $P < 0.05$ ). میزان AST در گروه ۲ بطور معنی‌داری از گروه شاهد کمتر ( $P < 0.05$ ) و میزان ALT در گروه ۱، ۲ و ۳ بطور معنی‌داری از گروه شاهد کمتر بود ( $P < 0.05$ ).

**کلمات کلیدی:** آلکیل بنزن سولفانات خطی، آلوده‌کننده‌ها، ماهی قرمز، سرم خون

## مقدمه

آلودگی محیط زیست یکی از مسائلی است که بشر امروزی با آن درگیر است. این ضرورت که مبارزه در جهت حفظ محیط زیست و پاک نگهداشتن آن از خطر آلودگی یک امر ضروری می باشد، امروزه بیشتر مورد تاکید قرار می گیرد. آلودگی ها می توانند در چرخه ها و بخشهای مختلف محیط اثر کنند. آب، خاک، هوا و موجودات زنده جزئی از این چرخه ها می باشند. هر چند که رابطه نزدیک هر یک از این اجزاء لزوم جلوگیری از آلودگی هر یک از این اجزاء را لازم می داند ولی اثر مستقیم تر آلودگی در موجودات هر یک از این چرخه ها و بخشها خود حائز اهمیت است. در این تحقیق اثر یکی از آلاینده های آبی به نام آلکیل بنزن سولفانات خطی (LABS) که عمده ترین ترکیب اصلی مواد شوینده آلی آنیونی می باشد و اثر آن بر تغییرات عوامل سرم خون ماهی قرمز بررسی گردید. این امر از آن جهت مهم ارزیابی می شود، که هر ساله مواد شوینده زیادی از نوع آنیونی، کاتیونی و غیره توسط انسان به پساب فاضلاب شهری و صنعتی اضافه می گردد و این فاضلابها بدون تصفیه فیزیکی و شیمیایی به آبهای آزاد، رودخانه ها و دریاچه ها وارد شده و باعث مسمومیت هزاران موجود زنده در این آبها می شوند که در بسیاری از موارد باعث تلفات شدید می گردند. مواد شوینده در غلظتهای زیاد موجب آسیبهای بافتی شدید (آبشش، کبد و کلیه) در موجودات آبی بخصوص ماهیان می شوند. آبشش و کلیه دو اندام مهم در تنظیم الکترولیت های بدن محسوب می گردند و از طرفی بافت کلیه بعنوان بافت مهم خونساز در ماهیان مطرح می باشد. آسیب این دو اندام تغییرات شدیدی را در پارامترهای خونی و سرمی ایجاد می کنند (Abel, 1974). Chattopadhyay & Konar (۱۹۸۴) اذعان داشتند که ۱۰ تا ۲۰ ppm مواد سمی موجب کاهش دریافت غذا و رشد در ماهی *Tilapia mossambica* می گردد. شاهسونی و همکاران در سال ۱۳۸۲ تحقیقی بر روی ماهی قرمز انجام دادند و دریافتند که مقدار ۱۰ و ۱۵ ماده شوینده آنیونی موجب نکروز و هیپرپلازی سلولهای کلراید در بافت آبشش می گردد. همچنین مشخص شده است که مواد شوینده آنیونی موجب نکروز و خونریزی در بافت کلیه و کبد می گردند (شاهسونی و موثقی، ۱۳۸۲).

## مواد و روش کار

در این تحقیق چون ماهی قرمز علاوه بر مقاوم بودند از لحاظ بافت شناسی، آناتومیک و فیزیولوژیک بسیار شبیه دیگر گونه های خانواده کپور ماهیان می باشد لذا بعنوان الگوی آزمایشی انتخاب گردید. جهت بررسی اثرات ماده آلکیل بنزن سولفانات بر پارامترهای سرم یک گروه بعنوان شاهد و ۳ گروه تحت آزمایش در نظر گرفته شد. تعداد ۱۵۲ عدد ماهی قرمز (۱۸ تا ۲۰ سانتیمتر) انتخاب و با محلول نمک ۳ درصد به مدت ۱۵ دقیقه ضد عفونی گردیدند. سپس ماهیان به ۴ گروه ۳۸ تایی تقسیم شدند. به محیط گروه اول ۵ ppm، به گروه دوم ۱۰ ppm و به گروه سوم ۱۵ ppm آلکیل بنزن سولفانات خطی (LABS) اضافه گردید. ماهیان به مدت ۲۱ روز تحت آزمایش قرار گرفتند. دمای آب در طول آزمایش

۲۳ درجه سانتیگراد و اکسیژن محلول ۶ تا ۶/۵ میلیگرم در لیتر و سختی آب آکواریوم ۱۳۵ میلی گرم در لیتر بود. هر ۳ روز یکبار آب آکواریوم تعویض و مقدار معین شده به آب آکواریوم هر گروه اضافه می‌گردید (حجم آب آکواریوم ۲۰۰ لیتر). بعد از پایان دوره آزمایش از قلب ماهیان خونگیری بعمل آمد و برای جلوگیری از ایجاد استرس بلافاصله بعد از خارج کردن ماهیان از آکواریوم، بوسیله چکش پلاستیکی ضربه‌ای به ناحیه سر ماهی وارد کرده و آنها را بیهوش نموده و سپس خونگیری از آنها صورت می‌گرفت.

در آزمایش اولیه ۴۰-۳۵ ppm آلکیل بنزن سولفانات خطی در مدت ۲۴ ساعت، ۵۰ درصد از ماهیانی که تحت آزمایش بودند را تلف نمود. به همین منظور در این تحقیق مقادیر کمتری انتخاب شد تا بررسی بالینی و سرمی در ماهی قرمز مورد بررسی قرار گیرد. برای اندازه‌گیری فاکتورهای سرمی بعد از جدا کردن سرم خون مقادیر پارامترهای مورد مطالعه توسط دستگاه اتوآنالایزر AR1000 (امریکایی) و با استفاده از کیت‌های شرکت پارس آزمون (تهران - ایران) اندازه‌گیری شد. روشهای مورد استفاده برای اندازه‌گیری پارامترهای مورد مطالعه به شرح زیر بودند:

میزان اوره و اسید اوریک توسط روش آنزیمی، میزان کراتینین توسط روش ژافه اصلاح شده، فسفر توسط روش UV و مقادیر آنزیمهای ALT و AST به وسیله روش IFCC اندازه‌گیری شدند.

نتایج حاصل با استفاده از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن مورد مقایسه قرار گرفتند.

## نتایج

نتایج این تحقیق بیانگر این نکته است که شاخصهای سرمی ماهی قرمز در اثر حضور آلکیل بنزن سولفانات تحت تاثیر قرار می‌گیرد. میزان اوره در گروه ۱ و ۲ بطور معنی‌داری از گروه شاهد کمتر بود ( $P < 0.05$ )، همین‌طور میزان اسید اوریک در گروه ۲ بطور معنی‌داری از گروه شاهد میزان بیشتری ( $P < 0.05$ ) را نشان می‌داد. میزان کراتینین در گروه ۳ و میزان فسفر در گروه ۲ و ۳ بطور معنی‌داری از گروه شاهد بیشتر بودند ( $P < 0.05$ ). ALT در گروه ۱، ۲ و ۳ بطور معنی‌داری از گروه شاهد کمتر بود ( $P < 0.05$ ) و میزان ALT در گروه ۱، ۲ و ۳ بطور معنی‌داری از گروه شاهد کمتر بود ( $P < 0.05$ ) (جدول ۱).

در گروه ۲ و ۳ علائم بالینی در برخی از ماهیان قابل مشاهده بود که عبارت بودند از:

خونریزی زیر جلدی پراکنده در روی باله پشتی و سینه‌ای، زخمهای جلدی، کراتیت چشم، کم‌خونی آبشش، پوسیدگی باله‌ها، لاغری، استسقاء، رفتارهای عصبی و نامتعادل، جمع شدن ماهیان در اطراف سنگ هوا، بی‌اشتهایی، افزایش موکوس در سطح بدن و آبشش دیده می‌شود.

جدول ۱: پارامترهای سرمی در ماهیان قرمز در گروههای مختلف

گروهها	شاهد	گروه ۱ ppm	گروه ۲ ۱۰ ppm	گروه ۳ ۱۵ ppm
اوره (mg/dl)	۵/۴۱ ± ۰/۸۱	۲/۳۷ ± ۰/۲۷*	۳/۲۱ ± ۰/۵۷ *	۳/۶۹ ± ۰/۰۵
اسید اوریک (mg/dl)	۰/۶۰ ± ۰/۰۴	۰/۷۵ ± ۰/۰۵	۰/۹۵ ± ۰/۰۶*	۰/۵۵ ± ۰/۰۳
کراتینین (mg/dl)	۰/۰۴ ± ۰/۰۱	۰/۰۸ ± ۰/۰۱	۰/۱۰ ± ۰/۰۳	۰/۵۲ ± ۰/۱۸*
AST (u/l)	۴۲۶/۶۶ ± ۴۳/۱۱	۳۷۱/۵۳ ± ۱۹/۹۶	۲۶۷/۴۳ ± ۲۳/۸۹*	۲۲۳/۸۰ ± ۳۵/۰۴
ALT (u/l)	۱۱/۱۶ ± ۲/۷۸	۱/۸۰ ± ۰/۹۴ *	۲/۷۰ ± ۱/۴۷*	۰/۳۳ ± ۰/۲۵*
فسفر (mg/dl)	۳/۸۹ ± ۰/۲۴	۴/۹۹ ± ۰/۲۵	۶/۴۵ ± ۰/۵۴*	۵/۳۶ ± ۰/۲۹*

\* اختلاف معنی دار نسبت به گروه شاهد میانگین ± خطای معیار (X ± SE)

## بحث

Field و همکاران (۱۹۸۳) در تحقیقی که بر روی سرم ماهی کپور انجام دادند میزان اوره را ۶/۳ (mg/dl)، اسید اوریک ۱/۴ (mg/dl)، مقدار کراتینین ۰/۵۶ (mg/dl) و مقدار فسفر ۱/۷ (mg/dl) گزارش نمودند. Zeitoun (۱۹۷۸) اعلام کرد در مسمومیت با کلرین میزان فسفر، منیزیم، کلسیم، مس و روی در ماهی قزل آلا رنگین کمان افزایش می یابد. Yurkowski و همکاران (۱۹۸۵) اذعان داشتند قزل آلاهای رنگین کمان که دچار نفروکلسینوز بودند میزان کراتینین سرم افزایش و میزان هماتوکریت و هموگلوبین آنها کاهش را نشان می داد. Ghatak و Konar (۱۹۹۰) در آزمایشی که روی کرم، پلانکتون جانوری و ماهی انجام دادند، دریافتند ترکیبی از آلوده کننده و آن هپتان اثر سمی شدیدتری در موجودات ایجاد می کنند، بطوریکه حرکات ماهی نامنظم، موجب کاهش حرکات در پلانکتونهای جانوری می گردد و همین طور موجب تخریب بافت پوششی کرمها می گردد. Turoboyski و همکاران (۱۹۸۴) اعلام کردند که میزان ۱۰۰۰ ppm آلوده کننده بسیار سمی بوده، بعد از ۳ روز آزمایش موجب ۱۰۰ درصد تلفات در گاماروس ها شده است. میزان ۱۰۰ ppm موجب کاهش همولنف در گاماروس ها شده که ناشی از عدم تنظیم اسمزی در موجود می باشد، ولی در میزان ۱۰ ppm تغییرات خاصی در گاماروس مشاهده نگردید. Chattopadhyay و Konar (۱۹۸۴) اذعان داشتند که ۱۰ ppm تا ۲۰ آلوده کننده موجب کاهش دریافت غذا و رشد در ماهی *Tilapia mossambica* می گردد. Karan و Poleski (۱۹۹۹) در تحقیقی ماهیان کپور را در معرض تری فلورالین (جلبک کش) ۰/۰۴۵ میلی گرم در لیتر قرار دادند و دریافتند میزان ALT، AST و ALP در سرم خون ماهی کاهش

را نشان می‌دهد. Sarkar و Konar (۱۹۹۳) با آزمایشاتی که با آلوده کننده‌ها، نفت، فلزات سنگین و حشره‌کشها روی ماهی انجام دادند، دریافتند که این مواد بصورت مجزا و یا ترکیبی می‌توانند موجب کاهش رشد، باروری و همین طور تاخیر در بلوغ جنسی ماهیان شوند. Karan و Poleski (۱۹۹۸) اعلام کردند ماهیان کپوری که در مجاورت سولفات مس ( $4/0-0/25$  میلی گرم در لیتر) قرار داشتند افزایش AST و ALT در سرم آنها اتفاق می‌افتد. Mullick و Konar (۱۹۹۲) اعلام نمودند. در ماهی Oreochromis که در تماس با آلوده کننده، حشره‌کش و فلزات سنگین قرار می‌گیرد مصرف غذا بطور معنی داری کاهش می‌یابد و حرکات ناموزون از خود نشان داده و تعداد تنفس آن افزایش می‌یابد.

میزان اسید اوریک در گروه‌های ۱ و ۲ نسبت به گروه شاهد با افزایش مقدار LABS افزایش می‌یابد و در گروه ۳ کاهش می‌دهد. در گروه‌های ۱ و ۲ آزمایش به دلیل درگیری اولیه کلیه ناشی از بوجود آمدن کیستهای هیالن و عدم تراوش این ماده از ادار به دلیل بزرگ بودن بملکول آن افزایش ولی در گروه ۳ آزمایش بدلیل درگیری شدید آبشش (ورود آب به بدن) و کلیه و دفع زیاد، باعث افت مقدار آن در گروه ۳ آزمایش شده است. در تست فسفر افزایش مقدار آن در گروه‌های ۱ و ۲ آزمایش نسبت به گروه شاهد می‌تواند مرتبط با افزایش مصرف انرژی در ماهیها برای فائق آمدن بر مسمومیت باشد و کاهش در گروه ۳ احتمالاً بر اثر ورود زیاد آب به بدن یا ترشح زیاد کلیوی ناشی از آسیب بافتی دانست. در تست اوره کاهش مقدار در ۳ گروه آزمایش را نسبت به گروه شاهد می‌توان مرتبط با دفع این ماده به خاطر افزایش فیلتراسیون گلوامرولی دانست از طرفی می‌توان درگیری چرخه‌های مرتبط با فسفر و اوره (سیکل) در کبد را یکی از عوامل تاثیرپذیر در این مسمومیت دانست. افزایش مقدار کراتینین بطور متوالی در ۳ گروه آزمایش نیز می‌تواند مرتبط با تغییرات در سیستم انرژی رسانی ماهیچه‌ای باشد که افزایش آن در بین گروهها نشان دهنده افزایش مصرف انرژی و سوخت و ساز در ماهیان را به دنبال دارد.

در آزمایشهای ALT و AST تغییراتی در ۳ گروه آزمایش نسبت به گروه شاهد نشان می‌دهد که احتمالاً LABS موجب کاهش فعالیت آنزیمی کبد و کاهش در میزان مقدار دو آنزیم در هر ۳ گروه آزمایشی شده است که می‌تواند حاکی از روند دژنره شدن بافت کبد باشد، از طرفی می‌توان آن را به تغییرات پاتولوژیک بافت کلیه و یا آسیب بافت پوست و آبشش نسبت داد، که موجب برهم خوردن تعادل اسمزی و عدم تنظیم در ورود و خروج آب در بدن ماهی می‌گردد. این نکته قابل ذکر است که اندازه‌گیری و تفسیر پارامترهای سرمی خون ماهیان در حالت مسمومیتها کار بسیار دشواری می‌باشد که می‌تواند متأثر از عوامل مختلفی مثل حساسیت گونه‌ای، سختی آب، pH، شکسته شدن اولین سد دفاعی بدن (پوست) و یا آسیب آبشش و غیره باشد. اکثر ماهیان نسبت به محیطشان هیپراسموتیک یا هیپواسموتیک می‌باشند و این مسئله در آسیب‌های جلدی موجب خروج و یا ورود حجم زیادی از آب به بافت بدن می‌گردد که این فرآیند موجب رقیق یا غلیظ شدن پارامترهای سرمی می‌شود. نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که تغییر در رفتار و عدم دریافت غذا در ماهیان و برخی از تغییرات

سرمی در گروههای مختلف آزمایشی، با نتایج آزمایشات برخی از محققین که قبلاً ذکر گردیده مطابقت دارد، بطوریکه در مسمومیت‌ها برخی از آنزیم‌های سرم دچار تغییرات شدیدی می‌شوند که معمولاً با کاهش همراه می‌باشد. Zeitoun (۱۹۸۷) اعلام نمود که مسمومیت با کلرین باعث می‌گردد میزان فسفر سرم خون ماهی قزل‌آلا افزایش یابد که در این تحقیق میزان فسفر در گروه ۲ و ۳ بطور معنی‌داری از گروه شاهد بیشتر بود. Karan و Poleski (۱۹۹۹) اذعان داشت که مسمومیت با تری فلورالین موجب کاهش میزان ALT، AST و ALP در سرم خون ماهی کپور می‌شود بطوریکه در این تحقیق میزان AST در گروه ۲ و میزان ALT در گروه‌های ۱، ۲ و ۳ آزمایش بطور معنی‌داری از گروه شاهد کمتر بود. گزارشات در مورد تغییرات در میزان اوره، اسید اوریک و کراتینین در موارد مسمومیت در دسترس نمی‌باشد که با این تحقیق مورد مقایسه قرار بگیرد ولی در این زمینه نیاز به تلاش و تحقیقات بیشتری می‌باشد.

## منابع

- شاهسونی، د؛ موثقی، ا.ر. و مقصودلو، ع. ، ۱۳۸۲. بررسی بالینی و آسیب‌شناسی اثرات ماده شوینده آنیونی بر آبشش ماهی حوض. مجله دامپزشکی دانشگاه تهران. دوره ۵۸. صفحات ۲۹ تا ۳۲.
- شاهسونی، د. و موثقی، ا.ر. ، ۱۳۸۲. بررسی بالینی آسیب‌شناسی کبدی-کلیوی ناشی از ماده شوینده آنیونی در ماهی قرمز. مجله پژوهش و سازندگی. شماره ۱. صفحات ۱۰۰ تا ۱۰۳.
- Abel, P.D. , 1974. Toxicity of synthetic detergents to fish and aquatic invertebrates. Journal of Fish . Biol. Vol. 6, No. 3, pp.279-298.
- Chattopadhyay, D.N. and Konar, S.K. , 1984. Influence of an anionic detergent on fish. Limnological, Vol.15, No. 2, pp.529-533.
- Field, J. ; Elveljem, C.A. and Juday, C. , 1983. A study of blood constituents of carp and trout. Journal of Biol. Chem. Vol. 148, pp.261-269.
- Ghatak, D.B. and Konar, S.K. , 1990. Acute toxicity of a mixture of anionic detergent parnol J and petrochemical n-heptan to plankton, worm and fish. Impacts of Environment on Animal and Aquaculture. pp.233-235.
- Karan, V. and Poleski, V. , 1998. Functional enzymes activity and gill histology of carp after copper sulfate exposure and recovery. Ecotoxicol Enviro Saf. Vol. 40, No.1-2, pp.49-55.
- Mullick, S. and Konar, S.K. , 1992. Influence of mixtures of detergent, petroleum product, heavy metals, pesticides, nitrogen and phosphate on feeding and respiratory

- rates of the fish. *Oreochromis mossambicus*. Environ. Ecol, Vol.10, No.4, pp.969-977.
- Poleski, V. and Karan, V. , 1999.** Effects of trifluraline on carp: biochemical and histological evaluation. Ecotoxicol Environ. Vol. 43, No. 2, pp.213:-21.
- Sarkar, U.K. and Konar, S.K. , 1993.** Sublethal effects of detergent, heavy metal, pesticide, petroleum product in three combines on fish. Environ. Ecol, Vol.11, No. 3, pp.609-615.
- Turoboyski, k. ; Styczynska, J. and Jurewicz, E. , 1984.** The effects of the detergent on survival and osmoregulation of *Gammarus zaddachi sexton*. Environ. Ecol, Vol.2, No. 4, pp.257-261.
- Yurkowski, M. ; Gillespie, D.C. and Lockhart, W.L. , 1985.** Nephrocalcinosis and blood chemistry in mature rainbow trout, *Salmo gairdneri*, Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences. No. 1348.
- Zeitoun, I.H. , 1978.** The recovery and hematological rehabilitation of chlorine stressed adult rainbow trout, *Salmo gairdneri*, Environ. Biol. Fishes. Vol. 3, pp.355-359.

## Effects of Anionic detergent (LABS) on serum biochemical parameters in *Carassius auratus*

Shahsavani D.<sup>(1)</sup> ; Mohry M.<sup>(2)</sup> and Bijarchi A.<sup>(3)</sup>

davar@Ferdowsi.un.ac.ir

1,2- Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Mashhad University, P.O.Box: 1793-91775 Mashhad, Iran

3- Faculty of Veterinary Medicine, Mashhad University, P.O.Box: 1793-91775 Mashhad, Iran

Received: April 2004 Accepted: June 2005

**Keywords:** Anionic Detergent, *Carassius auratus*, Serum, Pollution

### Abstract

Water pollution due to chemical substances such as anionic detergents causes different disorders in aquatic animals. We studied the effects of anionic detergents on biochemical parameters of gold fish using 152 fish (18-20cm) which were divided into four groups. Group one was used as control and the other three were exposed to 5, 10 and 15 ppm of anionic detergents for 21 days respectively. Sampling of the fish serum was conducted on day 21 and the levels of urea, uric acid, creatinin, AST, ALT and phosphorous were determined. An ANOVA with multiple-range Duncan test were used for data analysis. Urea levels were significantly lower in test groups 1 and 2 and uric acid level was significantly higher in group 2 compared to those of the control ( $P<0.05$ ). Creatinin level of group 3 and phosphorous level of groups 2 and 3 were significantly higher than those of the control ( $P<0.05$ ). AST level was significantly lower in group 2 compared to control ( $P<0.05$ ). As for ALT level in groups 1, 2 and 3, tests showed a significantly lower level compared to those of the control group ( $P<0.05$ ).