

ارزیابی اثرات آلودگی‌های انگلی روی فاکتورهای خونی، ایمنی، استرس و بافت آبشش ماهی فیتوفاک (*Hypophthalmichthys molitrix*)

- جاوید محرمی: گروه شیلات، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران
- حسین خارا*: گروه شیلات، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران
- محدثه احمدنژاد: پژوهشکده آبی‌پروری آب‌های داخلی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرانزلی، ایران

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۸

چکیده

به دلیل تلفات بچه‌ماهیان فیتوفاک در طی یک دوره پرورش از اردیبهشت تا اواخر مرداد ماه ۱۳۹۶ از ۳ مزرعه (هر یک با ۳ استخر): (۱) آلوده به انگل، (۲) به ظاهر سالم، (۳) مبتلا به عوامل ناشناخته تلفات، بچه‌ماهیان فیتوفاک مزارع پرورش ماهیان گرمابی شهرستان رشت نمونه‌برداری صورت گرفت (از هر مزرعه ۳۰ عدد). نمونه‌ها به صورت زنده به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه ابتدا عمل خونگیری به منظور اندازه‌گیری فاکتورهای خونی، ایمنی و استرس با قطع ساقه دم انجام گرفت. سپس ماهیان زیست‌سنجی شده و بررسی‌های انگل‌شناسی و بافت‌شناسی آبشش صورت پذیرفت. از گروه ماهیان آلوده به انگل *Chilodonella* sp.، *Dactylogyrus* sp.، *Diplostomum spathaceum* و *Trichodina* sp. و در گروه ماهیان مبتلا به عوامل ناشناخته تلفات فقط *Dactylogyrus* sp. در زیر میکروسکوپ مشاهده شدند. نتایج نشان داد که سطوح گلبول‌های سفید، گلبول‌های قرمز، هموگلوبین سرم، هماتوکریت، لایزوزیم، ایمنوگلوبولین کل در گروه ماهیان مبتلا به سندرم، در گروه ماهیان آلوده به انگل گلوکز، کورتیزول و در گروه ماهیان سالم IgM بیش‌ترین بود. از لحاظ بافت‌شناسی آبشش در گروه ماهیان آلوده به انگل و ماهیان مبتلا به عوامل ناشناخته بیش‌ترین ضایعات دیده شد. ضمن این‌که به کمک بافت‌شناسی از آبشش ماهیان آلوده به انگل *Dactylogyrus*، *Trichodina* و *Trichophyra* و در ماهیان مبتلا به سندرم ناشناخته انگل‌های *Dactylogyrus* و اسپور تک‌یاخته‌ای *Dermocystidium* دیده شدند. در مجموع نتایج نشان داد که وضعیت سلامتی ماهیان فیتوفاک تحت تاثیر عوامل انگلی قرار می‌گیرد.

کلمات کلیدی: فیتوفاک (*Hypophthalmichthys molitrix*)، انگل، خون، آبشش



مقدمه

خانواده کپورماهیان بزرگ‌ترین خانواده ماهیان استخوانی را با بیش از ۲۴۰۰ گونه و ۲۲۰ جنس تشکیل می‌دهند (Sanders و همکاران، ۲۰۰۳). در بین کپورماهیان، ماهی فیتوفاگ بیش‌ترین درصد را در ترکیب پرورش ماهیان گرمابی به خود اختصاص می‌دهد، به‌طوری‌که حداقل ۵۰٪ ترکیب را شامل می‌شود. این گونه دارای رشد سریع بوده و در پرورش توام ماهیان مفید می‌باشد (فریدپاک، ۱۳۸۵). بشر همواره سعی داشته که از سایر موجودات به‌منظور بقای خود بهره برد. طی سالیان اخیر با افزایش پرورش آبزیان، شناسایی انگل‌های آبزیان نیز از اهمیت بیش‌تری برخوردار گشته است. به‌دلیل تأکید بر افزایش تراکم در محیط‌های پرورش، پیش‌گیری از حضور آلودگی‌ها از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد. انگل‌ها از جمله شایع‌ترین عوامل بیماری‌زای ماهیان بوده که جزء شرایط اصلی تولید مناسب آبزیان در واحد سطح محسوب می‌شوند (فیضی و همکاران، ۱۳۹۲). ماهیان میزبان طیف وسیعی از انگل‌ها هستند که از نظر سیستماتیک، زیستگاه و چرخه زندگی با یکدیگر تفاوت دارند (Barber و همکاران، ۲۰۰۰). مطالعه تنوع انگلی در ماهیان به‌منظور بررسی زیست‌شناسی این انگل‌ها و جلوگیری از مشکلات حاصل از شیوع آن مفید خواهد بود (Neary و همکاران، ۲۰۱۲). با توجه به روند رو به توسعه آبی‌پروری در بخش ماهیان گرمابی و توجه به عوامل موثر روی میزان و بازده تولید، یکی از جنبه‌های مهم و اثرگذار، بروز بیماری‌های انگلی در این گروه از ماهیان است. تعداد کمی از انگل‌ها به‌طور جدی برای ماهیان مضر می‌باشند (جلالی‌جعفری، ۱۳۷۷). انگل‌ها سبب کاهش رشد، مرگ و میر، تأخیر در بلوغ جنسی و عقیم شدن ماهیان شده و شرایط را برای بروز بیماری‌های میکروبی، ویروسی و قارچی فراهم می‌سازند (عباسی و همکاران، ۱۳۸۶). از جمله انگل‌های ماهیان گرمابی می‌توان به اعضای خانواده تریکودینیده، چیلودونلیده، داکتیلوژیریده و دیپلوستوماتیده اشاره کرد (جلالی‌جعفری، ۱۳۷۷). اعضای خانواده تریکودینیده در تراکم زیاد ماهیان و سایر عوامل استرس‌زای محیطی باعث مرگ میزبانان خود می‌شوند (Lom و Dykova، ۱۹۹۲). اکثر گونه‌های این خانواده متعلق به جنس تریکودینا است که عامل بیماری تریکودینوز و انگل پوست و آبشش ماهیان سردآبی و گرمابی می‌باشد (Wootton و Gaze، ۱۹۹۸). اعضای خانواده چیلودونلیده انگل‌های سطحی ماهیان هستند. به‌طور عمده جنس چیلودونلا در آب‌های سرد فعال است. اعضای خانواده داکتیلوژیریده انگل ماهیان استخوانی آب شیرین و دریایی محسوب می‌شوند از مهم‌ترین جنس‌های این خانواده جنس داکتیلوژیروس است. خانواده مهم دیگر خانواده دیپلوستوماتیده است که جنس

دیپلوستوموم از جنس‌های مهم این خانواده است که متاسرکر انگل دیپلوستوموم اسپاتاسئوم به‌عنوان عامل بیماری کوری انگلی در ماهیان پرورشی ایران شناخته شده است (جلالی‌جعفری، ۱۳۷۷). خون از حیاتی‌ترین اجزای موجودات زنده است (Feist و همکاران، ۲۰۰۴) و از جمله پارامترهای مهم جهت مطالعه سلامت ماهیان بررسی شاخص‌های خونی می‌باشد (Kavitha و همکاران، ۲۰۱۰). اطلاع از فاکتورهای خونی ماهیان و تغییرات آن‌ها در بیماری‌ها ابزار مهمی جهت تشخیص بیماری‌ها می‌باشد (شاهسونی و همکاران، ۱۳۸۰) که می‌تواند کمک شایانی در تعیین شرایط بهداشتی ماهیان کند (Abdel-Tawwab و همکاران، ۲۰۰۵). تغییر در فاکتورهای خون‌شناسی به بیوتوب آبزیان، گونه ماهی، سن، بلوغ جنسی و وضعیت سلامتی وابسته می‌باشد (Patriche و همکاران، ۲۰۱۱). فاکتورهای بیوشیمیایی خون جهت بررسی شاخص‌های استرس ماهیان استفاده می‌شود (Francesco و همکاران، ۲۰۱۲). افزایش تراکم ماهی سبب بروز استرس در ماهیان می‌شود (Li و همکاران، ۲۰۱۲). ماهیان در صورت بروز استرس به روش‌های مختلف تعادل هومئوستازی بدن را حفظ کرده که ترشح کورتیزول یکی از این روش‌هاست (Acerete و همکاران، ۲۰۰۴). ترشح کورتیزول در جهت پاسخ به استرس ارزیابی می‌شود (Abreu و همکاران، ۲۰۰۸). علی‌رغم این‌که ماهیان از ابتدائی‌ترین مهره‌داران محسوب می‌شوند اما از سیستم ایمنی پیشرفته‌ای برخوردار بوده که با سیستم ایمنی پستانداران و پرندگان شباهت فراوانی دارد اما این سیستم ایمنی به‌شدت متأثر از درجه حرارت آب می‌باشد (Zapata و همکاران، ۱۹۹۷). ایمنی در ماهیان به‌صورت اختصاصی و غیراختصاصی می‌باشد (Whyte، ۲۰۰۷). آبشش دارای نواحی سطحی وسیعی می‌باشد (Wang و همکاران، ۲۰۱۳) و نقش موثری در تنظیم یونی (کوهکن، ۱۳۹۵) و تبادل گازهای تنفسی اصلی (Takabe و همکاران، ۲۰۱۲) دارد. ماهیان می‌توانند با افزایش تیغه‌های آبششی و نزدیک‌تر کردن فاصله بین آن‌ها و افزایش طول تیغه‌ها، ناحیه سطحی آبشش‌ها را افزایش داده و در نتیجه اکسیژن بیش‌تری را دریافت نمایند (Bowden و همکاران، ۲۰۱۴). آبشش از حساس‌ترین اندام‌های ماهی می‌باشد (کبریتی و همکاران، ۱۳۸۹). بافت آبشش اندام مهمی برای مطالعات آسیب‌شناسی بافتی است (Farkas و همکاران، ۲۰۱۱). آسیب‌شناسی بافتی روشی مفید برای بررسی سلامت آبزیان می‌باشد (Hao و همکاران، ۲۰۱۳). تاکنون مطالعاتی درباره اثرات آلودگی‌های انگلی روی فاکتورهای خونی، ایمنی و بافت آبشش ماهیان انجام شده است که می‌توان به مطالعه روی تغییرات خونی سیاه‌ماهی (Capeota رودخانه شیرود (سارنگ، ۱۳۸۵)، اثر آلودگی‌های انگلی روی برخی از فاکتورهای خونی ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*)

زیست‌سنجی با دقت یک سانتی‌متر و وزن ماهیان با ترازوی دیجیتالی با حساسیت ۰/۱ گرم اندازه‌گیری شد (Nikolsky, ۱۹۶۳). ماهیان فیتوفاگ (با وزن میانگین ۶۷/۹۱ گرم و طول ۱۹/۵ سانتی‌متر) به صورت زنده با استفاده از مخازن آب مجهز به کپسول اکسیژن، به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس ماهیان چند ساعت در شرایط مطلوب نگهداری شدند تا استرس وارد شده به ماهیان رفع گردد. پس از انجام مراحل بی‌هوشی توسط پودر گل میخک، جهت بررسی شاخص‌های خونی و فاکتورهای ایمنی و استرس از طریق قطع ساقه دم (Stolen) و همکاران، ۱۹۹۷) به میزان ۲ سی‌سی خون اخذ گردید. مقدار ۰/۵ سی‌سی خون به داخل تیوب‌های اپندروف هپارینه (جهت انجام مطالعات فاکتورهای خونی) و ۱/۵ سی‌سی به داخل تیوب‌های اپندروف غیرهپارینه (جهت انجام مطالعات فاکتورهای ایمنی) ریخته شد. نمونه‌ها در یک کلمن حاوی یخ خشک و به دور از تکان‌های شدید به یک آزمایشگاه هماتولوژی معتبر (آزمایشگاه تخصصی ویرومد) منتقل شدند. برای تهیه سرم، ۱ میلی‌لیتر خون از ۳ ماهی از هر تکرار دریافت شد (کازمی و همکاران، ۱۳۸۹) و به مدت دو ساعت در دمای معمولی اتاق قرار گرفته و پس از انعقاد با سرعت ۳۵۰۰ دور در ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید (Panigrahi و همکاران، ۲۰۰۵). سپس نمونه‌های سرم در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. ارزیابی شاخص‌های خونی WBC و RBC به وسیله یک پیپت ملانژور سفید برای گلبول سفید و یک پیپت ملانژور قرمز برای گلبول قرمز و شمارش با استفاده از محلول رقیق‌کننده Rees و لام نئوبار پیشرفته انجام شد (Klontz, ۱۹۹۴):

= تعداد گلبول قرمز در میلی‌متر مکعب خون

$$10000 \times (\text{تعداد گلبول قرمز در } 5 \text{ مربع کوچک}) \times X$$

= تعداد گلبول سفید در میلی‌متر مکعب خون

$$50 \times (\text{تعداد گلبول سفید در } 4 \text{ مربع کوچک}) \times X$$

تشخیص افتراقی گلبول‌های سفید به وسیله متانول ۹۶٪ و محلول ۱۰٪ گیمسا جهت رنگ‌آمیزی و شمارش انواع گلبول‌های سفید نظیر نوتروفیل‌ها، لنفوسیت‌ها، مونوسیت‌ها و ائوزینوفیل‌ها به روش زیگزاک با استفاده از دستگاه شمارنده دستی انجام شد (Klontz, ۱۹۹۴). اندازه‌گیری هموگلوبین به روش سیان مت‌هموگلوبین و با استفاده از اسپکتروفوتومتر (مدل VIS-۲۱۰۰ ساخت شرکت Unico آمریکا) با طول موج ۵۴۰ نانومتر انجام شد (Klontz, ۱۹۹۴). در نهایت مقدار هموگلوبین به وسیله منحنی استاندارد که قبلاً تهیه شده بود و براساس رابطه زیر محاسبه گردید (Daisley و Blaxhall, ۱۹۸۳):

$$\text{غلظت استاندارد} \times (\text{OD استاندارد} / \text{OD نمونه}) = \text{Hb (g/dl)}$$

برای تعیین درصد هماتوکریت از روش میکروهماتوکریت استفاده

شد. لوله‌ها در داخل میکروسانتریفوژ (مدل D-78532 Tuttlingen

مهاجر به رودخانه تجن (رشیدی، ۱۳۸۶)، ضایعات آبششی ناشی از آلودگی انگلی در ماهیان کپور علف‌خوار (*Ctenopharyngodon idella*) (حسین‌پور حموله و همکاران، ۱۳۸۹)، انگل‌های مونوژن ماهیان آب شیرین در برخی از استخرهای پرورشی در سطح استان اصفهان (فیضی و همکاران، ۱۳۹۲)، ارتباط بین آلودگی انگلی و فاکتورهای خونی سوف سفید (*Sander lucioperca*) صید شده از سواحل بندر انزلی (موحد و همکاران، ۱۳۹۳)، اثر آلودگی‌های انگلی روی برخی فاکتورهای خونی اردک ماهی (*Esox lucius*) تالاب انزلی (جمال‌زاد فلاح و همکاران، ۱۳۹۳)، اثر ضایعات آسیب‌شناسی بافتی جراحات ایجاد شده در ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalichthys molitrix*) و ماهی آمور (*Ctenopharyngodon idella*) آلوده به انگل لرنه‌آ سیپریناسه‌آ در برخی از مزارع پرورشی ماهیان گرمابی شهرستان شوشتر (گلچین‌منشادی و همکاران، ۱۳۹۴)، تغییرات شاخص‌های خونی و ایمنی ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*) در مواجهه با رابدو ویروس کارپو (امیدوار و همکاران، ۱۳۹۵)، ضایعات ناشی از انگل‌های مونوژن روی بافت آبشش و سلول‌های کلراید ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*) (واحدی و پازوکی، ۱۳۹۶)، پارامترهای خونی سیاه‌ماهیان (*Capoeta capoeta gracilis*) آلوده به انگل پوستودیپلوستوم کتیکولا (*Posthodiplostomum cuticola*) (نهر زرین‌گل استان گلستان (مظاهری کوهانستانی و همکاران، ۱۳۹۶) و تاثیر عفونت‌های انگلی روی پارامترهای خون‌شناسی و ایمنی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) (Panjvini و همکاران، ۲۰۱۶) اشاره کرد. براساس بررسی‌های مختلف صورت گرفته انگل‌ها موجب اثرات سوء روی فاکتورهای مختلف خونی و آبشش ماهیان می‌شوند. به طوری که در نهایت موجب تلفات ماهیان می‌گردند. از طرفی، در طی چندسال گذشته تلفات ماهی فیتوفاگ ناشی از سندرم ناشناخته تشدید شده است. به همین دلیل در این تحقیق اثرات آلودگی‌های انگلی و سندرم ناشناخته روی فاکتورهای خونی-ایمنی، شاخص‌های استرس و بافت آبششی ماهی فیتوفاگ مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این تحقیق طی یک دوره پرورش از اردیبهشت ماه تا اواخر مرداد ماه ۱۳۹۶ در سه مزرعه پرورش ماهیان گرمابی واقع در شهرستان رشت انجام شد (مزرعه شماره ۱: ماهیان فیتوفاگ آلوده به انگل، مزرعه شماره ۲: ماهیان فیتوفاگ به ظاهر سالم و مزرعه شماره ۳: ماهیان فیتوفاگ مبتلا به عوامل ناشناخته تلفات). در مجموع از هر مزرعه ۳۰ عدد بچه ماهی فیتوفاگ به صورت تصادفی صید گردید. نمونه‌برداری با تورسالیک انجام شد. طول ماهیان با استفاده از تخته



از نمونه‌های سرم مخلوط و جذب نوری پس از ۱۵ و ۱۸۰ ثانیه به روش طیف‌سنجی استفاده شد و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۷۰ نانومتر خوانده شد. بافر فسفات سدیم به‌عنوان بلانک استفاده شد (Ellis, ۱۹۷۷). به‌منظور یافتن نمونه‌های انگلی ابتدا سطح بدن ماهی و باله‌ها بررسی شده و سپس بررسی قسمت‌های داخلی انجام شد و زیر سرپوش آبششی، بین کمان‌های آبششی، حذقه چشم و روده با دقت بررسی و انگل‌های مشاهده شده شمارش گردیدند (Yamaguti, ۱۹۶۴). سپس با استفاده از سوزن انگل‌ها خارج و با سرم فیزیولوژی شسته و با روش بستن نمونه بین دو لام و در فرمالین ۱۰٪ به‌مدت دو هفته فیکس شدند و با رنگ کارمن آلوم رنگ و تثبیت شدند (Malek و Mobedi, ۲۰۰۱) و سپس از لام‌های انگلی تهیه شده با میکروسکوپ و استریومیکروسکوپ عکس‌برداری انجام شد و نهایتاً با استفاده از کلیدهای معتبر نمونه‌های انگلی شناسایی شدند (Bykhovsky-Pavloskaya و همکاران, ۱۹۶۴؛ Dick و Poole, ۱۹۸۵). جهت بررسی هیستوپاتولوژیک آبشش ماهیان، از سه گروه ماهیان (ماهیان سالم، ماهیان آلوده به انگل و ماهیانی فاقد علائم حاصل از استخرهای دارای تلفات ناشی از آلودگی) به اندازه یک سانتی‌متر از بافت آبششی را برداشته و در محلول بوئن فیکس شد. نمونه‌های فیکس شده توسط الکل ۱-بوتانول در درجات ۵۰، ۷۰، ۸۰ و ۹۶ آبیگری شده و در مرحله بعدی عمل شفاف‌سازی (جایگزینی کلروفرم به‌جای الکل و جذب چربی بافت) صورت گرفت. پس از شفاف نمودن، نمونه‌های بافت آبششی به‌وسیله پارافین مذاب پارافینه و قالب‌گیری شدند (بهمنی و کاظمی, ۱۳۷۷؛ پوستی و همکاران, ۱۳۸۲). با استفاده از میکروتوم از قالب‌های پارافینه حاوی بافت آبشش برش‌های بافتی به‌ضخامت ۷ میکرون (Fedorov و Akhundov, ۱۹۹۵) تهیه و برش‌های بافتی به‌روش اتوزین‌هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی شدند. نمونه بافت‌ها پس از رنگ‌آمیزی به‌وسیله میکروسکوپ نوری (مدل N-۱۸۰M، شرکت NOVEL، چین) مجهز به دوربین MD130، شرکت OME-TOP system، تایوان) و متصل به کامپیوتر مورد مطالعه قرار گرفتند (حلاجیان و همکاران, ۱۳۹۰). طرح کلی این تحقیق به‌صورت طرح کاملاً تصادفی بود. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS ۱۸ و رسم نمودارها با استفاده از برنامه Excel ۲۰۱۳ صورت پذیرفت. در ابتدا نرمال بودن داده‌ها با آزمون (شاپیرو-ویلک) تست گردید. در صورت نرمال بودن توزیع داده‌ها، برای مقایسه میانگین داده‌ها بین تیمارهای مختلف از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه (Oneway ANOVA) و برای جداسازی گروه‌های همگن از آزمون توکی در سطح احتمال ۵٪ استفاده شد. برای داده‌های غیرنرمال از آزمون غیرپارامتریک کروسکال والیس و در مقایسه جفتی از آزمون من-ویتنی استفاده گردید.

ساخت شرکت Hettrich (آلمان) قرار داده شد و به‌مدت زمان ۵ دقیقه با دور ۷۰۰۰ سانتریفوژ گردید (Houston, ۱۹۹۰). پس از اندازه‌گیری فاکتورهای خونی با استفاده از اعداد به‌دست آمده و روابط ریاضی می‌توان شاخص‌های خونی زیر را محاسبه نمود (Klontz, ۱۹۹۴):

$$M.C.H = \frac{Hb(\text{gr}\%) \times 10}{RBC / \text{million}} \quad M.C.V = \frac{HCT(\%) \times 10}{RBC / \text{million}}$$

$$M.C.H.C = \frac{Hb \times 100}{HCT}$$

سطوح کورتیزول پلاسمای به‌روش (RIA) (Rotllant و همکاران, ۲۰۰۱) و اکش رقابتی بین آنتی‌ژن نشان‌دار شده با ید ۱۲۵ با آنتی‌ژن موجود در نمونه پلازما جهت اتصال به آنتی‌بادی موجود در فاز جامد با استفاده از دستگاه گاماکانتر LKB ساخت فنلاند و کیت Immuntotech (کمپانی Immuntotech، ماری فرانسه) تعیین شد. سطوح لاکتات با استفاده از روش رنگ‌سنجی آنزیمی به‌وسیله ELISA و کیت Sigma اندازه‌گیری شد (Acerete و همکاران, ۲۰۰۴). سطوح گلوکز با استفاده از کیت Glucose C2-test Wako براساس روش آنزیمی به‌وسیله Mutarotase و گلوکز اکسیداز تعیین شد (Kubokawa و همکاران, ۱۹۹۹). برای محاسبه غلظت ایمونوگلوبولین کل نمونه سرم مطابق با روش Biuret اندازه‌گیری شد: ۰/۱ میلی‌لیتر از هر نمونه سرم با ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول پلی اتیلن گلیکول ۳۲٪ مخلوط شد (PEG, 10) برای مدت ۲ ساعت برای پایین آوردن مولکول ایمونوگلوبولین انکوباسیون شد. رسوب ایمونوگلوبولین توسط سانتریفیوژ (Eppendorf Centrifuge ۵۴۱۵R, EppendorfAG, Hamburg, Germany) در ۵۰۰۰ دور در ۴ درجه سانتی‌گراد برداشته شد. پروتئین کل در مایع شناور اندازه‌گیری شد. مقدار ایمونوگلوبولین مطابق فرمول زیر محاسبه شد (Siwicki و Anderson, ۱۹۹۳؛ Amar و همکاران, ۲۰۰۰):

= (میلی‌گرم در میلی‌لیتر) ایمونوگلوبولین کل
 پروتئین کل تیمار شده با پلی اتیلن گلیکول - پروتئین کل در نمونه سرم
 اندازه‌گیری ایمونوگلوبولین M با استفاده از دستگاه Elisa araeader (Awareness, USA) مدل Stat fax ۲۱۰۰ و به‌روش Turbidometric (کدورت‌سنجی) انجام گردید. در این روش IgM با آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال موجود در محلول‌های تامپون تشکیل کمپلکس داده و باعث کدر شدن محلول می‌شوند. شدت کدورت ایجاد شده با مقدار IgM رابطه مستقیم داشته و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل ۲۱۰۰- VIS ساخت شرکت Unico آمریکا) در طول موج ۳۴۰ نانومتر با بلانک (آب مقطر) خوانده شد (Ellis, ۱۹۷۷). برای اندازه‌گیری سطوح لایزوزیم در سرم خون، ۱/۷۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری *Micrococcus lysodeikticus* (سیگما) (معادل مقدار ۰/۳۷۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از بافر فسفات سدیم ۰/۰۵ مولار با pH برابر ۶/۲) با ۲۵۰ میکرولیتر

نتایج

در این مطالعه در مجموع ۹۰ عدد ماهی با وزن میانگین ۶۷/۹۱ گرم و طول ۱۹/۵ سانتی متر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی آلودگی انگلی ماهیان فیتوفاگ در مزرعه شماره ۱ (ماهیان فیتوفاگ آلوده به انگل) وجود انگل‌های دیپلوستوموم (*Diplostomum spathaceum*)، داکتیلوژیروس (*Dactylogyrus* sp.)، چیلودونلا (*Chilodonella* sp.) و تریکودینا (*Trichodina* sp.) را نشان داد (جدول ۱).

جدول ۱: انگل‌های جدا شده از مزرعه شماره ۱ (ماهیان فیتوفاگ آلوده به انگل)

گونه انگلی	تعداد انگل در هر ماهی آلوده
<i>Diplostomum spathaceum</i>	۱ تا ۲ عدد
<i>Dactylogyrus</i> sp.	۳ تا ۵ عدد
<i>Chilodonella</i> sp.	۱ تا ۲ عدد
<i>Trichodina</i> sp.	۲ تا ۳ عدد

از لحاظ فاکتورهای خونی نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که سطوح گلبول‌های سفید در ماهیان مبتلا به سندرم ناشناخته بیش از ماهیان سالم و آلوده به انگل بود ولی با توجه به آزمون واریانس یک طرفه بین تیمارها اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نگردید ($P > 0.05$). بیش‌ترین مقدار گلبول‌های قرمز در ماهیان مبتلا به سندرم ناشناخته دیده شد و براساس آزمون واریانس یک طرفه بین تیمارها اختلاف معنی‌دار آماری وجود داشت و با توجه به آزمون توکی ماهیان آلوده با ماهیان سالم و هم‌چنین با ماهیان مبتلا به سندرم ناشناخته اختلاف معنی‌دار آماری داشت ($P < 0.05$). میزان هموگلوبین و هماتوکریت در ماهیان آلوده به انگل کم‌تر از دو تیمار دیگر بوده و با توجه به آزمون واریانس یک طرفه بین تیمارها اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده شد. براساس آزمون توکی نیز ماهیان آلوده به انگل با ماهیان سالم و هم‌چنین، با ماهیان مبتلا به سندرم ناشناخته اختلاف معنی‌دار آماری داشتند ($P < 0.05$). مقادیر MCV و MCHC در بین سه گروه از ماهیان با توجه به آزمون واریانس یک طرفه تفاوت معنی‌داری نداشت ($P > 0.05$) و در ماهیان آلوده به انگل بیش‌ترین مقدار را دارا بود. مقدار MCH در ماهیان آلوده به انگل بیش از دو تیمار دیگر بود. به طوری که، براساس آزمون کروسکال والیس بین آن‌ها اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده شد و با توجه به آزمون من ویتنی مشخص شد که ماهیان آلوده به انگل با ماهیان سالم و هم‌چنین با ماهیان مبتلا به سندرم ناشناخته اختلاف معنی‌دار آماری دارند ($P < 0.05$). بین تیمارها با توجه به آزمون واریانس یک طرفه از نظر میزان نوتروفیل، لنفوسیت و

مونوسیت و با توجه به آزمون کروسکال والیس از نظر میزان ائوزینوفیل اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نگردید ($P > 0.05$) (جدول ۲). بیش‌ترین میزان کورتیزول در ماهیان آلوده به انگل دیده شد در حالی که کم‌ترین آن در ماهیان مبتلا به سندرم ناشناخته مشاهده شد. با توجه به آزمون واریانس یک طرفه بین تیمارها اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده شد ($P < 0.05$). براساس آزمون توکی بین ماهیان آلوده به انگل با ماهیان سالم و هم‌چنین، با ماهیان مبتلا به سندرم ناشناخته اختلاف معنی‌دار آماری وجود داشت ($P < 0.05$). بیش‌ترین مقدار گلوکز و لاکتات خون در ماهیان آلوده به انگل و سالم مشاهده شد. با توجه به آزمون واریانس یک طرفه و توکی بین ماهیان دارای سندرم ناشناخته و دو گروه دیگر اختلاف معنی‌دار آماری وجود داشت ($P < 0.05$) (جدول ۳). میزان لایوزیم و ایمونوگلوبولین کل در ماهیان مبتلا به سندرم ناشناخته بیش از دو گروه دیگر بود. به طوری که، با توجه به آزمون واریانس یک طرفه و توکی بین تیمارها اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده شد ($P < 0.05$). در ماهیان سالم بیش‌ترین میزان IgM دیده شد، در حالی که کم‌ترین میزان آن متعلق به ماهیان آلوده به انگل بود و ماهیان مبتلا به سندرم ناشناخته در رده میانی قرار داشتند. با توجه به آزمون من ویتنی هر سه تیمار با یکدیگر اختلاف معنی‌دار آماری داشتند ($P < 0.05$) (جدول ۴). هیستوپاتولوژیک مورد بررسی کیفی قرار گرفت. در تمام ماهیان فیتوفاگ سالم، جدا شدن اپیتلیوم لاملا، به هم چسبیدن نسبی و کامل لاملا، هایپرتروفی اپیتلیوم، هایپرپلازی موضعی و منتشر، پیچ‌خوردگی نوک لاملا، خون‌ریزی، نکروز و پارگی اپیتلیوم تنفسی مشاهده شد، در حالی که تلائن‌کنازی یا آنورسم فقط در ۶۶/۶ درصد از ماهیان این گروه مشاهده گردید. در تمام ماهیان مبتلا به سندرم ناشناخته، جدا شدن اپیتلیوم لاملا، هایپرتروفی اپیتلیوم، هایپرپلازی موضعی و منتشر، پیچ‌خوردگی نوک لاملا، خون‌ریزی، نکروز و پارگی اپیتلیوم تنفسی مشاهده شد، در حالی که به هم چسبیدن نسبی و کامل لاملا فقط در ۶۶/۶ درصد از ماهیان این گروه مشاهده شد. در تمام ماهیان آلوده به انگل، به هم چسبیدن نسبی و کامل لاملا، هایپرتروفی اپیتلیوم، هایپرپلازی موضعی و منتشر، پیچ‌خوردگی نوک لاملا، خون‌ریزی، نکروز و پارگی اپیتلیوم تنفسی مشاهده شد، در حالی که جدا شدن اپیتلیوم لاملا و تلائن‌کنازی یا آنورسم فقط در ۶۶/۶ درصد از ماهیان این گروه مشاهده شد (جدول ۵). در گروه ماهیان به ظاهر سالم، خون‌ریزی بسیار شدید بود، به هم چسبیدن کامل لاملا و هایپرپلازی موضعی و منتشر به میزان شدید وجود داشت، جدا شدن اپیتلیوم لاملا، به هم چسبیدن نسبی لاملا، هایپرتروفی اپیتلیوم و پیچ‌خوردگی نوک لاملا به میزان متوسط مشاهده شد و ضایعات تلائن‌کنازی یا آنورسم، نکروز و پارگی اپیتلیوم تنفسی به میزان خفیف وجود داشت.



جدول ۲: مقایسه فاکتورهای خونی ماهیان فیتوفاگ در تیمارهای مختلف

پارامترها	تیمار	مزرعه شماره ۱ (ماهیان آلوده به انگل)	مزرعه شماره ۲ (ماهیان به ظاهر سالم)	مزرعه شماره ۳ (ماهیان مبتلا به عوامل ناشناخته تلفات)
تعداد گلبول سفید (هزار در مترمکعب)		۳۶۲۰ ± ۴۲۸/۹ ^a	۳۶۴۰ ± ۴۶۱/۵ ^a	۳۹۵۰ ± ۴۲۰/۳ ^a
تعداد گلبول قرمز (میلیون در مترمکعب)		۱۳۴۳۰۰۰ ± ۱۱۵۳۷۸/۶ ^a	۱۵۷۰۰۰۰ ± ۱۵۲۸۰۷/۱ ^b	۱۶۶۰۰۰۰ ± ۷۰۷۱۰/۷ ^b
هموگلوبین (گرم/دسی‌لیتر)		۷/۴۳ ± ۰/۶۷ ^a	۸/۴۶ ± ۰/۷۵ ^b	۸/۸۸ ± ۰/۴۶ ^b
هماتوکریت (درصد)		۲۹/۴ ± ۳/۰۳ ^a	۳۴ ± ۳/۸۷ ^b	۳۶ ± ۲/۱۶ ^b
MCV (فیلومتر)		۲۱۸/۴ ± ۵/۵۸ ^a	۲۱۶ ± ۴/۰۶ ^a	۲۱۶/۷۵ ± ۴/۲۷ ^a
MCH (پیکوگرم)		۵۵/۲ ± ۱/۰۳ ^b	۵۳/۴ ± ۰/۵۵ ^a	۵۳ ± ۰/۸۲ ^a
MCHC (درصد)		۲۵/۳ ± ۰/۵۹ ^a	۲۴/۸۸ ± ۰/۶۸ ^a	۲۴/۶۲ ± ۰/۲۲ ^a
نوتروفیل (درصد)		۱۸/۸۰ ± ۱/۸۷ ^a	۱۸/۲۰ ± ۳/۱۹ ^a	۱۹ ± ۱/۴۱ ^a
لنفوسیت (درصد)		۷۶/۱۰ ± ۲/۹۹ ^a	۷۷/۸۰ ± ۴/۶۰ ^a	۷۷ ± ۱/۸۳ ^a
مونوسیت (درصد)		۴/۲۰ ± ۱/۰۳ ^a	۳/۶۰ ± ۱/۸۲ ^a	۳/۲۵ ± ۰/۹۶ ^a
ائوزینوفیل (درصد)		۰/۹۰ ± ۰/۷۴ ^a	۰/۵۵ ± ۰/۴۰ ^a	۰/۹۶ ± ۰/۷۵ ^a

حروف لاتین مشترک، نشان‌دهنده عدم اختلاف بین تیمارها است ($P > 0.05$). حروف لاتین غیرمشترک، نشان‌دهنده اختلاف بین تیمارها است ($P < 0.05$).

جدول ۳: مقایسه فاکتورهای استرس ماهیان فیتوفاگ در تیمارهای مختلف

پارامترها	تیمار	مزرعه شماره ۱ (ماهیان آلوده به انگل)	مزرعه شماره ۲ (ماهیان به ظاهر سالم)	مزرعه شماره ۳ (ماهیان مبتلا به عوامل ناشناخته تلفات)
کورتیزول (نانوگرم/میلی لیتر)		۷۵/۶۷ ± ۱۱/۰۲ ^b	۴۲/۶۷ ± ۳/۲۲ ^a	۲۹ ± ۵/۵۷ ^a
گلوکز (میلی گرم/دسی لیتر)		۸۴ ± ۸ ^b	۷۷/۳۳ ± ۱۲/۷۴ ^b	۳۷/۶۷ ± ۷/۰۲ ^a
لاکتات (میلی گرم/دسی لیتر)		۵۲ ± ۳/۶۱ ^b	۵۶/۶۷ ± ۵/۵۱ ^b	۱۹/۳۳ ± ۵/۶۹ ^a

حروف لاتین مشترک، نشان‌دهنده عدم اختلاف بین تیمارها است ($P > 0.05$). حروف لاتین غیرمشترک، نشان‌دهنده اختلاف بین تیمارها است ($P < 0.05$).

جدول ۴: مقایسه فاکتورهای ایمنی ماهیان فیتوفاگ در تیمارهای مختلف

پارامترها	تیمار	مزرعه شماره ۱ (ماهیان آلوده به انگل)	مزرعه شماره ۲ (ماهیان به ظاهر سالم)	مزرعه شماره ۳ (ماهیان مبتلا به عوامل ناشناخته تلفات)
لایزوزیم (u/ml/min)		۳۸/۳۳ ± ۴/۱۶ ^a	۴۵/۳۳ ± ۶/۵۱ ^a	۵۰/۶۷ ± ۱۰/۶ ^b
IgM (میلی گرم/دسی لیتر)		۲۳ ± ۱/۷۳ ^a	۳۸/۳۳ ± ۳/۲۲ ^c	۳۲ ± ۳ ^b
ایمنوگلوبولین کل (میلی گرم/دسی لیتر)		۱۷/۱۷ ± ۱/۴۶ ^a	۱۹/۳۷ ± ۰/۸۵ ^a	۲۹/۳۷ ± ۲/۱۰ ^b

حروف لاتین مشترک، نشان‌دهنده عدم اختلاف بین تیمارها است ($P > 0.05$). حروف لاتین غیرمشترک، نشان‌دهنده اختلاف بین تیمارها است ($P < 0.05$).

جدول ۵: مقایسه تعداد ماهیان مبتلا به ضایعات مختلف بافت آبخش در تیمارهای مختلف

درصد ماهیان	ضایعه بافتی	جدا شدن اپیتلیوم لاملا	به هم چسبیدن نسبی لاملا	به هم چسبیدن کامل لاملا	هایپر تروفی اپیتلیوم	هایپر پلازی موضعی و منتشر	تلائنکتازی یا آنوریسم	پیچ خوردگی نوک لاملا	خونریزی	نکروز	پارگی اپیتلیوم تنفسی
مزرعه شماره ۱ (ماهیان آلوده به انگل)	۶۶/۶	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۶۶/۶	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
مزرعه شماره ۲ (ماهیان به ظاهر سالم)	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۶۶/۶	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
مزرعه شماره ۳ (ماهیان مبتلا به عوامل ناشناخته تلفات)	۱۰۰	۶۶/۶	۶۶/۶	۶۶/۶	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

چسبیدن نسبی و کامل لاملا، هایپر پلازی موضعی و منتشر، تلانژکتازی یا آنوریسم و نکروز به میزان متوسط وجود داشت و هایپر تروفی اپیتلیوم

در گروه ماهیان فیتوفاگ مبتلا به سندروم ناشناخته، خونریزی و پیچ خوردگی نوک لاملا شدید بود، جدا شدن اپیتلیوم لاملا، به هم



ماهیان) و اسپورهای درموسیستیدیوم (در ۳۳/۳ درصد ماهیان) و در گروه ماهیان آلوده، انگل داکتیلوژیروس (در ۶۶/۶ درصد ماهیان)، انگل مژه‌دار تریکودینیوم (در ۳۳/۳ درصد ماهیان) و تریکوفیرا (در ۳۳/۳ درصد ماهیان) مشاهده شدند، در حالی که در مقاطع بافت آبشش گروه ماهیان سالم هیچ‌گونه انگلی مشاهده نشد. ضمن این‌که، اسپورهای درموسیستیدیوم در ماهیان گروه ماهیان سالم نیز مشاهده نشدند (جدول ۷).

و پارگی اپیتلیوم تنفسی به میزان خفیف وجود داشت. در گروه ماهیان فیتوفاگ آلوده به انگل، پیچ‌خوردگی نوک لاملا و نکروز شدید بود، جدا شدن اپیتلیوم لاملا، به هم چسبیدن نسبی و کامل لاملا، تلانژکتازی یا آنوریسم، خونریزی و پارگی اپیتلیوم تنفسی به میزان متوسط وجود داشت و هایپر تروفی اپیتلیوم و هایپر پلازی موضعی و منتشر به میزان خفیف وجود داشت (جدول ۶). هم‌چنین، در مقاطع بافتی آبشش گروه ماهیان مبتلا به سندروم، انگل داکتیلوژیروس (در ۶۶/۶ درصد

جدول ۶: مقایسه شدت نسبی ضایعات بافتی آبشش در تیمارهای مختلف

نوع ضایعه	مزرعه شماره ۱ (ماهیان آلوده به انگل)	مزرعه شماره ۲ (ماهیان به ظاهر سالم)	مزرعه شماره ۳ (ماهیان مبتلا به عوامل ناشناخته تلفات)
جدا شدن اپیتلیوم لاملا	++	++	++
به هم چسبیدن نسبی لاملا	++	++	++
به هم چسبیدن کامل لاملا	++	+++	++
هایپر تروفی اپیتلیوم	+	++	+
هایپر پلازی موضعی و منتشر	+	+++	++
تلانژکتازی یا آنوریسم	++	+	++
پیچ‌خوردگی نوک لاملا	+++	++	+++
خونریزی	++	++++	+++
نکروز	+++	+	++
پارگی اپیتلیوم تنفسی	++	+	+

+ (خفیف)، ++ (متوسط)، +++ (شدید)، ++++ (بسیار شدید)

جدول ۷: درصد فراوانی انگل‌های مشاهده شده در مقاطع بافت آبشش در تیمارهای مختلف

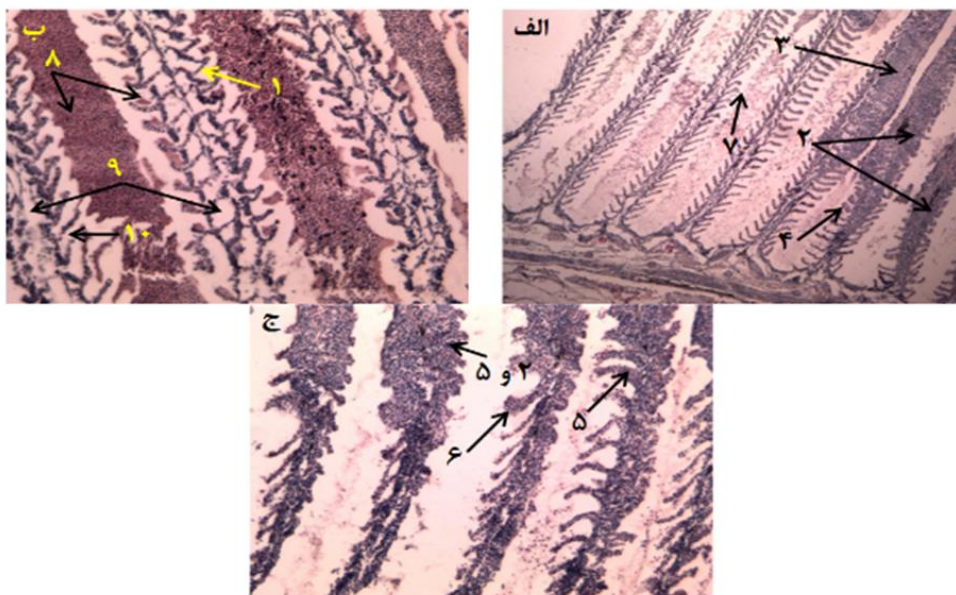
تیمار	انگل‌های بافت	داکتیلوژیروس	اسپورهای درموسیستیدیوم	تریکودینیوم	تریکوفیرا
مزرعه شماره ۱ (ماهیان آلوده به انگل)	۶۶/۶	۰	۰	۳۳/۳	۳۳/۳
مزرعه شماره ۲ (ماهیان به ظاهر سالم)	۰	۰	۰	۰	۰
مزرعه شماره ۳ (ماهیان مبتلا به عوامل ناشناخته تلفات)	۶۶/۶	۰	۳۳/۳	۰	۰

بحث

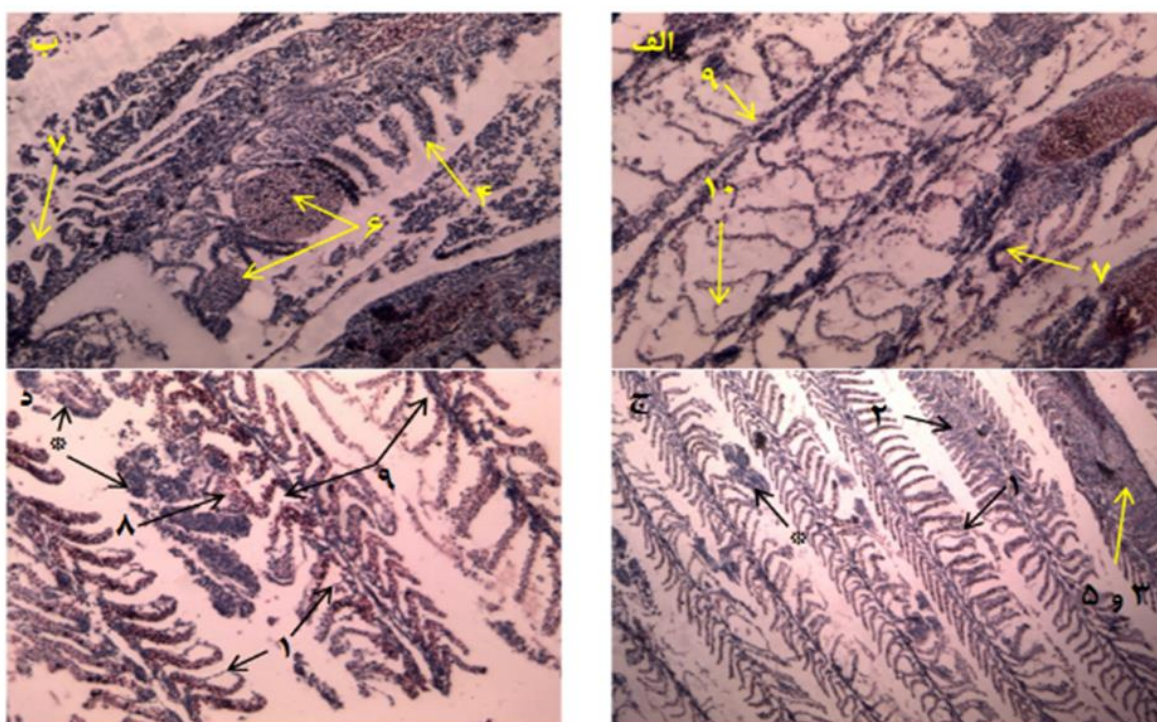
تعداد گلبول قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین به طور فزاینده‌ای کاهش می‌یابد (جلالی جعفری، ۱۳۷۷). ارزیابی پارامترهای خونی و بیوشیمیایی سبب کسب اطلاعات ارزشمند در مورد سلامت موجودات از جمله ماهیان می‌شود (Bani و Haghi-Vayghan, ۲۰۱۱) که تعیین فاکتورهای سلولی و بیوشیمیایی خون یکی از این روش‌هاست. به عنوان مثال، گلبول‌های قرمز باعث انتقال اکسیژن و دی‌اکسید کربن شده (Evans, ۲۰۰۹) و برای ارزیابی شرایط استرس‌زا و بروز بیماری‌های مزمن در ماهیان استفاده می‌شوند (Moraes و Tavares-Dias, ۲۰۰۷). هم‌چنین، گلبول‌های سفید در سیستم ایمنی نقش دارند (Clauss و همکاران، ۲۰۰۸) و تغییر در تعداد و شکل آن‌ها نشان‌دهنده بروز بیماری در ماهیان می‌باشد (کازمی و همکاران، ۱۳۸۹).

این بررسی با هدف ارزیابی اثرات آلودگی‌های انگلی روی فاکتورهای خونی، ایمنی و بافت آبشش ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*) انجام گردید. طبق بررسی‌های انجام شده در این تحقیق روی ماهیان فیتوفاگ مزارع آلوده به انگل، انگل‌های *Diplostomum spathaceum*، *Dactylogyrus sp.*، *Chilodonella sp.* و *Trichodina sp.* جدا سازی شدند. در حالی که در استخرهای سالم و هم‌چنین، استخرهای مبتلا به عوامل ناشناخته تلفات نمونه انگلی مشاهده نشد. بسیاری از بیماری‌های عفونی (باکتریایی، ویروسی و کم‌تر انگلی) سبب ایجاد تغییراتی در فاکتورهای خونی ماهیان می‌شوند و شاخص‌هایی نظیر

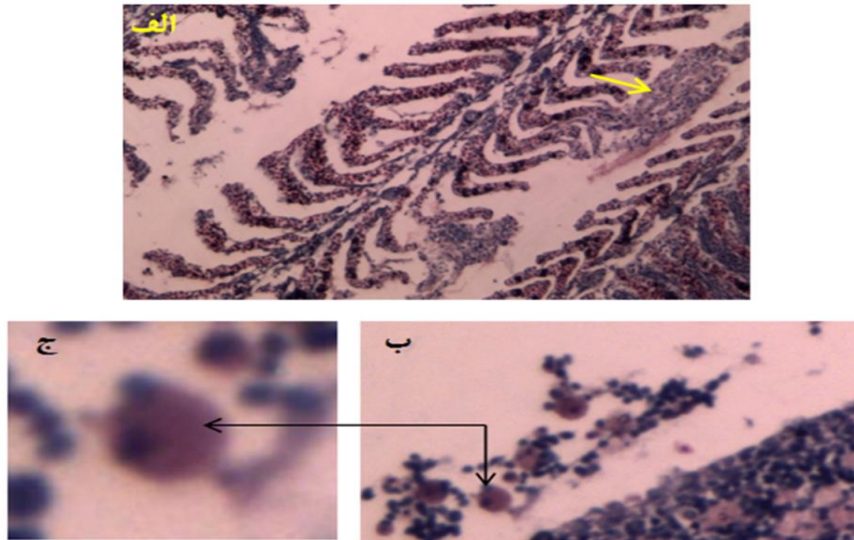




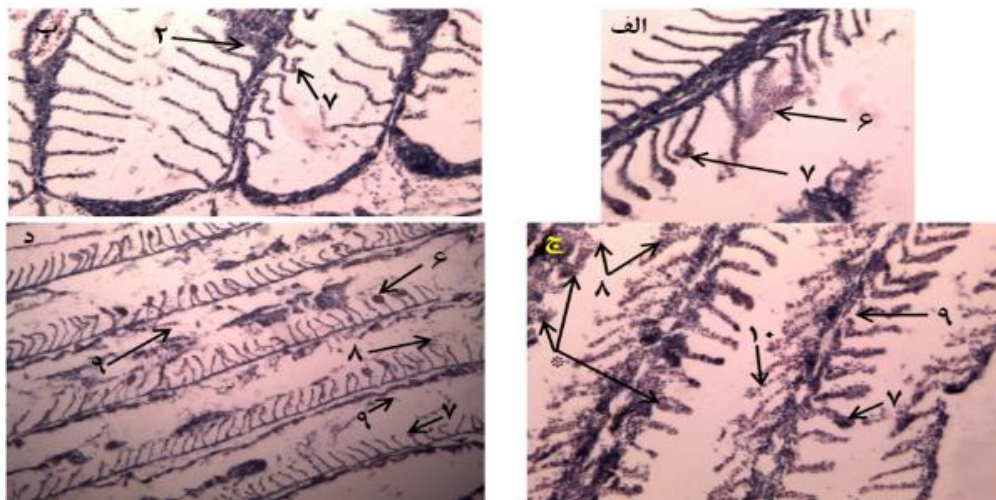
شکل ۱: مقطع بافت آبشش ماهی فیتوفاگ در گروه سالم (رنگ آمیزی اتوزین-هماتوکسیلین: الف: $\times 40$ ، ب و ج: $\times 100$). ۱- جدا شدن اپیتلیوم لاملا، ۲- به هم چسبیدن نسبی لاملا، ۳- به هم چسبیدن کامل لاملا، ۴- هایپر تروفی اپیتلیوم، ۵- هایپر پلازی موضعی و منتشر، ۶- آنورسم، ۷- پیچ خوردگی نوک لاملا، ۸- خونریزی، ۹- نکروز، ۱۰- پارگی اپیتلیوم تنفسی



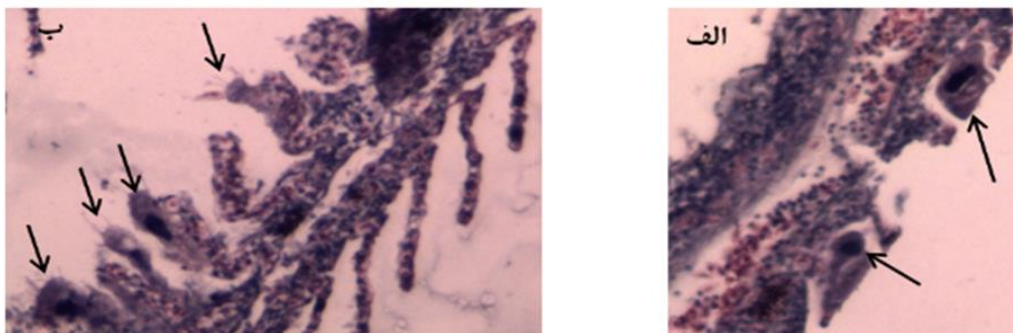
شکل ۲: مقطع بافت آبشش ماهی فیتوفاگ در گروه ماهیان مبتلا به عوامل ناشناخته تلفات (رنگ آمیزی اتوزین-هماتوکسیلین: ج: $\times 40$ ، الف، ب و د: $\times 100$). ۱- جدا شدن اپیتلیوم لاملا، ۲- به هم چسبیدن نسبی لاملا، ۳- به هم چسبیدن کامل لاملا، ۴- هایپر تروفی اپیتلیوم، ۵- هایپر پلازی موضعی و منتشر، ۶- آنورسم، ۷- پیچ خوردگی نوک لاملا، ۸- خونریزی، ۹- نکروز، ۱۰- پارگی اپیتلیوم تنفسی



شکل ۳. مقطع بافت آبشش ماهی فیتوفاگ در گروه ماهیان مبتلا به عوامل ناشناخته تلفات (رنگ آمیزی اتوزین-هماتوکسیلین: الف: $\times 100$ ، ب: $\times 400$). الف. فلش زرد نشان دهنده انگل داکتیلوژیروس (*Dactylogyrus*)، ب. فلش مشکی نشان دهنده اسپورهای درموسیستیدیوم (*Dermocystidium*)، ج. تصویر بزرگ شده از اسپور درموسیستیدیوم



شکل ۴. مقطع بافت آبشش ماهی فیتوفاگ در گروه ماهیان آلوده به انگل (رنگ آمیزی اتوزین-هماتوکسیلین: د: $\times 40$ ، الف، ب و ج: $\times 100$). ۲- به هم چسبیدن نسبی لاملا، ۶- آنوریسم، ۷- پیچ خوردگی نوک لاملا، ۸- خونریزی، ۹- نکروز، ۱۰- پارگی اپیتلیوم تنفسی، * انگل تک یاخته‌ای مژه دار تریکودینیوم (*Trichodinium*)



شکل ۵. مقطع بافت آبشش ماهی فیتوفاگ در گروه ماهیان آلوده به انگل (رنگ آمیزی اتوزین-هماتوکسیلین: الف و ب: $\times 400$). الف. فلش‌های مشکی نشان دهنده انگل تک یاخته‌ای مژه دار تریکودینیوم (*Trichodinium*)، ب. فلش‌های مشکی نشان دهنده انگل تک یاخته‌ای مژه دار تریکوفیرا (*Trichophyra*)

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که سطوح گلبول‌های سفید در ماهیان مبتلا به سندرم ناشناخته به ترتیب بیش از ماهیان سالم و آلوده به انگل بود ولی اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نگردید. این عدم تفاوت در مقادیر نوتروفیل، لنفوسیت مونوسیت و نوتروفیل هم دیده شد. گلچین‌منشادی و خاج (۱۳۹۵) نیز تفاوت معنی‌داری در تعداد گلبول‌های سفید ماهی حمری (*Carasobarbus luteus*) آلوده به انگل کنتراسکوم مشاهده نکردند، اگرچه در ماهیان آلوده به انگل برخلاف این تحقیق بیش‌ترین مقدار مشاهده گردید. این در حالی است که انگل‌ها باعث افزایش میزان گلبول‌های سفید و نوتروفیل در ماهی سیم دریای خزر (*Abramis brama*) شدند (حیات‌بخش و همکاران، ۱۳۹۰) و در ماهی سوف سفید دریای خزر نیز مقدار گلبول‌های سفید و نوتروفیل در ماهیان آلوده بیشتر بود. چون در ماهیان بیمار به‌منظور تولید پادتن، گلبول‌های سفید بیش‌تری تولید می‌شود و مقادیر لنفوسیت هم به‌علت کاهش ایمنی بدن کاهش می‌یابد (موحد و همکاران، ۱۳۹۳). به‌نظر می‌رسد که عمل اصلی لنفوسیت این است که به‌عنوان سلول‌های عمل‌کننده برای مکانیسم‌های ایمنی خاص از طریق تولید پادتن عمل می‌کند. هم‌چنین، شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد لنفوسیت‌های ماهی فعالیت بیگانه‌خواری دارند یا این که سلول‌های دارای این توانایی (مثل ماکروفاژها) را افزایش می‌دهند (ستاری، ۱۳۸۱). افزایش گلبول سفید در کپور معمولی آلوده به انگل نیز گزارش شده است (Panjvini و همکاران، ۲۰۱۶). در هر صورت بالا بودن میزان گلبول‌های سفید در ماهیان مبتلا به سندرم ناشناخته می‌تواند بیان‌کننده نوعی شرایط زیستی و غیرزیستی نامناسب باشد. میزان گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت در ماهیان آلوده به انگل از ماهیان سالم و مبتلا به سندرم ناشناخته کم‌تر بود و بیش‌ترین میزان آن در ماهیان مبتلا به سندرم ناشناخته دیده شد. در مقابل مقدار MCHC و MCH در ماهیان آلوده به انگل بیش از دو تیمار دیگر بود. در حالی که MCV هیچ تفاوتی نداشت. کم‌بودن مقدار گلبول‌های قرمز و هماتوکریت در مارماهی اروپایی (*Anguilla anguilla*) مبتلا به انگل *Anguillicola crassus* (Boon و همکاران، ۱۹۹۰)، ماهی حمری آلوده به انگل کنتراسکوم (گلچین‌منشادی و خاج، ۱۳۹۵) و کاهش میزان هماتوکریت در ماهیان پاکوی سیاه (Tambaqui) آلوده به انگل *Dolops carvalhoi* (Tavares-Dias و همکاران، ۲۰۰۷) گزارش شده است. هم‌چنین، نتایج حاصل از مطالعه روی ماهی سفید مهاجر به رودخانه تجن نشان داد که ماهیانی که دارای آلودگی بیش‌تری بودند، با کاهش هماتوکریت و هموگلوبین و افزایش MCV مواجه شدند (خارا و همکاران، ۱۳۹۰). مطالعه روی ماهی *Channa striatus* آلوده به انگل *Alitropus typus* نشان داد که حضور انگل باعث کاهش هماتوکریت، هموگلوبین و گلبول قرمز و افزایش MCHC و MCH شد

مطالعات بیان‌کننده ارتباط بین سطوح گلوکز و کورتیزول با استرس بوده (Chen و همکاران، ۱۹۹۵؛ Pacheco و Santos، ۲۰۰۱) و سطوح کورتیزول (Carrick و Pottinger، ۲۰۰۲؛ Fevolden و همکاران، ۲۰۰۲) و گلوکز (ابراهیمی و همکاران، ۱۳۹۰) نشان‌دهنده وجود استرس در ماهیان هستند. بروز استرس در ماهیان می‌تواند موجب بالا رفتن مقادیر گلوکز خون شود (Affonso و همکاران، ۲۰۰۷). بیش‌ترین مقدار کورتیزول و گلوکز خون در گروه ماهیان فیتوفاگ آلوده به انگل اندازه‌گیری شد، در حالی که کم‌ترین

آن در ماهیان مبتلا به سندرم ناشناخته دیده شد. این اختلافها ناشی از استرسهای ناشی از انگلها می باشد. با این حال، مطالعه روی ماهی *Boops boops* نشان داد که در ماهیان آلوده به انگل مقادیر گلوکز به طور معنی داری در مقایسه با ماهیان سالم کاهش یافت (Özdemir و همکاران، ۲۰۱۶). مطالعه رعناي اخوان و همکاران (۱۳۹۱) روی ماهی طلائی (*Carassius auratus*) نشان داد که سطوح کورتیزول و گلوکز در ماهیان استرس دیده به طور معنی داری نسبت به ماهیان شاهد تا ۴۸ ساعت پس از استرس بالاتر بود که نشان دهنده تاثیر زمان استرس روی کورتیزول بود. هم چنین، هایپرگلیسمی یک پاسخ معمول به استرس حاد در ماهیان است (Wendelaar Bonga، ۱۹۹۷). مطالعه روی گونه *Clarias batrachus* نشان داد که سطوح گلوکز سرم با کاهش دما افزایش می یابد (Joshi و Tandon، ۱۹۷۴). هم چنین، مطالعه روی گربه ماهی نقره ای (*Rhamdia quelen*) نشان داد که در دمای بالاتر میزان بیش تر گلوکز (هایپرگلیسمی) و در دمای پایین تر، میزان کم تر گلوکز (هیپوگلیسمی) وجود دارد (Lermen و همکاران، ۲۰۰۴). لایوزیم ماهیان یک مولکول دفاعی گسترده در سیستم ایمنی ذاتی است که برای حفاظت در مقابل عوامل بیماریزای ماهی مهم است (Sahoo و Saurabh، ۲۰۰۸). مطالعات نشان می دهد که ایمنی ماهیان نسبت به انگلها ضعیف است. به عبارتی ماهی به کرات می تواند به یک انگل در طول حیات خود مبتلا شود. به دلیل آن که انگلها مهاجرند، تغییر مکان می دهند، دارای چرخه زندگی هستند و از تنوع ساختمان شیمیایی بافتی زیادی برخوردارند (اورمزدی، ۱۳۷۸). به طور کلی، از لحاظ فاکتورهای ایمنی ماهیان فیتوفاگ آلوده به انگل دارای کم ترین مقادیر سه فاکتور ایمنی IgM، لایوزیم و ایمنوگلوبولین کل بودند. مطالعه روی ماهی *Boops boops* (Özdemir و همکاران، ۲۰۱۶) و *Dicentrarcus labrax* (Henry و همکاران، ۲۰۰۹) نشان داد که در ماهیان آلوده به انگل، فعالیت لایوزیم به طور معنی داری در مقایسه با ماهیان سالم کاهش یافت. کاهش فعالیت لایوزیم در ماهیان آلوده به انگل ممکن است به ماهیانی مرتبط باشد که حساسیت بالایی به عوامل بیماریزا دارند (Alvarez-Pellitero، ۲۰۰۸). فعالیت لایوزیم در ماهی *Sparus aurata* آلوده به انگل *Polysporoplasma sparis* به طور معنی داری کاهش یافت که ناشی از پاسخ طبیعی عوامل بیماریزا بود (Karagouni و همکاران، ۲۰۰۵). مطالعه رعناي اخوان و همکاران (۱۳۹۱) روی ماهی طلائی (*Carassius auratus*) نشان داد فعالیت لایوزیم پلاسما در ماهیانی که در معرض ۳ بار استرس قرار گرفته بودند به میزان قابل توجهی در ۱۲ و ۴۸ ساعت پس از استرس افزایش یافت و بالاتر از میزان آن در ماهیان گروه شاهد بود. آبشش به طور مستقیم در معرض عوامل محیطی بوده (Schlenk و Benson، ۲۰۰۱) و عوارض بافتی موجب حساسیت

ماهیان به بیماریهای ثانویه و مرگ و میر می شود (Haaparanta و همکاران، ۱۹۹۷). تغییرات اندامهای تنظیم کننده اسمز نشان دهنده آسیب به سلامت حیوان می باشد (Camargo و Martinez، ۲۰۰۷). بررسیهای هیستوپاتولوژیکی بافت آبشش علائم مختلفی را در آبشش ماهیان نشان می دهد که این علائم در همه تیمارها وجود دارد و کم و زیاد بودن علائم است که تفاوت ایجاد می نماید و این علائم در گروه ماهیان فیتوفاگ آلوده به انگل و ماهیان مبتلا به سندرم ناشناخته به دلیل وجود انواع مختلف انگلها بیش تر بود و شامل جدا شدن اپیتلیوم لاملا، به هم چسبیدن نسبی و کامل لاملا، هایپر تروفی اپیتلیوم، هایپر پلازی موضعی و منتشر، پیچ خوردگی نوک لاملا، خونریزی، نکروز و پارگی اپیتلیوم و تلاژکتازی بود. مطالعه روی دو گونه *Astyanax fasciatus* و *Cyanocharax albunus* نشان داد که تغییرات اصلی شامل تغییر ساختار اپیتلیوم، واکنش سازی، هایپر پلازی اپیتلیوم لاملا و تغییر ساختار و وقوع آنوریسم در لاملا ثانویه بود. شدیدترین تغییرات در ارتباط با شدیدترین محیط و نشان دهنده حضور عوامل استرسزا در آب بود (Flores-Lopes و Thomaz، ۲۰۱۱). واحدی و پازوکی (۱۳۹۶) در بررسی بافت آبشش ماهی سفید دریای خزر آلوده به انگلهای مونوژن ضایعاتی نظیر تخریب رشته ها و چسبندگی تیغه های آبششی، هایپر تروفی سلول های اپیتلیال و هایپر پلازی تیغه های آبششی، جدا شدن اپیتلیوم از غشای پایه تیغه ها، آنوریسم و بروز حالت چماقی را گزارش کردند. هم چنین، تعداد کل سلول های کلراید در حضور انگلها کاهش ولی اندازه آنها تغییری نداشت. گلچین منشادی و همکاران (۱۳۹۴) در ماهی فیتوفاگ و آمور مبتلا به انگل *lernaea cyprinacea* واکنش التهابی به صورت نفوذ سلول های تک هسته ای، هایپر پلازی بافت پوششی پوست، تزاید فیبروبلاست، افزایش رنگدانه ملانین، نکروز عضلانی، پرخونی، رگ زایی و خونریزی را مشاهده نمودند. هم چنین، حسین پورحموله و همکاران (۱۳۸۹) اثر هیستوپاتولوژیکی انگل های *Dactulogyrus* sp. و *Trichodina* sp. را در ماهی آمور به صورت هایپر پلازی، تخریب، خونریزی، ادم و تلاژکتازی بیان نمودند. چنین وضعیتی در ماهی آمور مبتلا به انگل *Dactulogyrus lamlatus* (Molnar، ۱۹۷۲) گزارش شده است. تغییرات آبشش می تواند در ارتباط با افزایش در فعالیت اندامهایی که در معرض محیط در حال تغییر هستند، فاصله انتشار حاصل از آب اطراف به مویرگها و افزایش بافت (گلبول های خون) در فضاهای خونی لاملا ثانویه باشد (Antonio و همکاران، ۲۰۰۷؛ Ayoola، ۲۰۰۸a، ۲۰۰۸b، ۲۰۱۱؛ Saber، ۲۰۱۱). تغییرات تیغه های آبششی می تواند سبب افزایش فاصله انتشار آب اطراف به مویرگها و افزایش بافت در تیغه های ثانویه و مختل شدن انتشار اکسیژن شود (Elahee و Bhagwant، ۲۰۰۲). بروز استرس شدید سبب تجمع خون



- در آبشش شده، که ممکن است همراه با تغییراتی در رگ‌های خونی باشد. در نتیجه، سلول‌های پیلار آسیب دیده باعث افزایش جریان خون در داخل تیغه و اتساع کانال حاشیه‌ای، تجمع خون و حتی آنوریسم می‌شود (Martinez و همکاران، ۲۰۰۴). هم‌چنین، پارگی اپیتلیوم آبششی سبب خونریزی می‌شود (Temminck و همکاران، ۱۹۸۳). هم‌جوشی لاملار حاصل از هایپرپلازی لاملار سبب هم‌جوشی در مویرگ‌های لاملاری موجود در اپیتلیوم هایپرپلازی می‌شود. به دلیل تغییرات در قوام موکوسی، تیغه‌های ثانویه به هم چسبیده که این پاسخ به همراه تعدادی از محرک‌ها مانند عفونت انگلی تک‌یاخته‌ای (Goldes و همکاران، ۱۹۸۸)، اثرات مزمن آلومینیوم (باران اسیدی) و کاهش درجه حرارت رخ می‌دهد (Karlsson-Norrgren و همکاران، ۱۹۸۶a؛ Karlsson-Norrgren و همکاران، ۱۹۸۶b؛ Saber، ۲۰۱۱). در یک نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت که فاکتورهای خونی، ایمنی و استرس ماهیان فیتوفاگ تحت تاثیر عوامل مختلف زنده و غیرزنده قرار دارند، که با بررسی‌های هیستوپاتولوژیک آبشش نقش انگل‌ها در ایجاد این ضایعات در ماهیان آلوده به انگل و حتی ماهیان مبتلا به سندرم ناشناخته مشخص تر شد. هم‌چنین، پیشنهاد می‌شود که مشابه این مطالعه روی سایر ماهیان دارای ارزش اقتصادی و پرورش انجام شود.
- ### تشکر و قدردانی
- بدین‌وسیله نگارندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از همکاری صمیمانه آقای مهندس سجاد کاظمی و تمامی دوستانی که در به ثمر نشستن این تحقیق تلاش نموده‌اند ابراز می‌دارند.
- ### منابع
۱. ابراهیمی، م.ح.؛ ایمان‌پور، م.ر. و عدلو، م.ن.، ۱۳۹۰. اثرات دما بر رشد، بازماندگی و بعضی فاکتورهای خونی در ماهی گورامی عظیم الجثه (*Osphronemus goramy*). مجله زیست‌شناسی ایران. جلد ۲۴، شماره ۵، صفحات ۶۴۸ تا ۶۵۴.
 ۲. امیدوار، ص.؛ قاسمی، م.؛ امیدوار، ز.؛ حقیقی‌کارسیدانی، س. و زلفی‌نژاد، ک.، ۱۳۹۵. تغییرات شاخص‌های خونی و ایمنی ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*) در مواجهه با رابدو ویروس کارپیو. نشریه توسعه آبی‌پروری. شماره ۴، صفحات ۲۷ تا ۳۸.
 ۳. اورمزدی، ه.، ۱۳۷۸. تک‌یاخته‌شناسی پزشکی. انتشارات جهاد دانشگاهی. ۳۲۹ صفحه.
 ۴. بهمنی، م. و کاظمی، ر.، ۱۳۷۷. مطالعه بافت‌شناسی روی گناد تاس‌ماهیان پرورشی جوان. مجله علمی شیلات ایران. شماره ۱، صفحات ۱ تا ۱۶.
 ۵. پوستی، آ.؛ ادیب‌مرادی، م. و فضیلی، آ.، ۱۳۸۲. بافت‌شناسی مقایسه‌ای و تکنیک‌های بافت‌شناسی. انتشارات دانشگاه تهران. ۵۴۶ صفحه.
 ۶. جلالی‌جعفری، ب.، ۱۳۷۷. انگل‌ها و بیماری‌های انگلی ماهیان آب شیرین. انتشارات معاونت تکثیر و پرورش آبزیان، شیلات ایران. ۵۶۴ صفحه.
 ۷. جمال‌زاد فلاح، ف.؛ خارا، ح.؛ دقیق‌روحی، ج. و صیادبورانی، م.، ۱۳۹۳. اثر آلودگی‌های انگلی روی برخی فاکتورهای خونی اردک ماهی (*Esox lucius*) تالاب انزلی. مجله پژوهش‌های جانوری (مجله زیست‌شناسی ایران). شماره ۱، صفحات ۲۲ تا ۳۶.
 ۸. حسین‌پورحموله، م.؛ پیغان، ر. و محمدیان، ب.، ۱۳۸۹. بررسی ضایعات آبششی ناشی از آلودگی انگلی در ماهیان کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*). مجله زیست‌شناسی دریا (بیولوژی دریا). دوره ۲، شماره ۱، صفحات ۴۷ تا ۵۵.
 ۹. حلاجیان، ع.؛ کاظمی، ر.؛ محسنی، م.؛ دژندیان، س.؛ یوسفی‌جوردی، آ.؛ بهمنی، م.؛ پوردهقانی، م.؛ یزدانی، م.ع. و یگانه، ه.، ۱۳۹۰. تکه‌برداری به‌روش جراحی و مطالعه بافت‌شناسی گناد تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) پرورشی. مجله تحقیقات دامپزشکی. شماره ۳، صفحات ۲۲۹ تا ۲۳۳.
 ۱۰. حیات‌بخش، م.ر.؛ خارا، ح.؛ صیادبورانی، م.؛ احمدنژاد، م.؛ دقیق‌روحی، ج.؛ موحد، ر. و رهبر، م.، ۱۳۹۰. بررسی فاکتورهای خونی ماهی سیم دریای خزر (*Abramis brama orientalis*) (سواحل بندر انزلی). مجله علوم زیستی. شماره ۲، صفحات ۴۷ تا ۵۷.
 ۱۱. خارا، ح.؛ رشیدی‌کارسالاری، ز.؛ سعیدی، ا.ع.؛ بهروزی، ش.؛ رهبر، م. و احمدنژاد، م.، ۱۳۹۰. بررسی شیوع آلودگی‌های انگلی ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) مهاجر به رودخانه تجن و تاثیر آن‌ها روی برخی فاکتورهای خونی. زیست‌شناسی دریا (بیولوژی دریا). شماره ۹، صفحات ۳۱ تا ۳۹.
 ۱۲. رشیدی، ز.، ۱۳۸۶. اثر آلودگی‌های انگلی روی برخی فاکتورهای خونی ماهی سفید مهاجر به رودخانه تجن. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان. ۱۴۵ صفحه.
 ۱۳. رعنائی‌اخوان، س.؛ اسلاملو، خ. و جمال‌زاد فلاح، ف.، ۱۳۹۱. اثر استرس‌های حاد بر تغییرات کورتیزول، آنتی‌پروتئاز و پارامترهای خونی ماهیان طلائی (*Carassius auratus*). مجله توسعه آبی‌پروری. شماره ۲، صفحات ۲۳ تا ۳۵.
 ۱۴. سارنگ، ا.، ۱۳۸۵. بررسی تغییرات خونی سیاه‌ماهی (*Capoeta capoeta gracilis*) آلوده به انگل *Clinostomum complanatum* در رودخانه شیروود. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان. ۱۱۵ صفحه.
 ۱۵. ستاری، م.، ۱۳۸۱. ماهی‌شناسی (۱) تشریح و فیزیولوژی. انتشارات نقش مهر. ۶۵۹ صفحه.



۱۶. شاهسونی، د؛ وثوقی، غ.ح. و خضرایبی‌نیا، پ.، ۱۳۸۰. تعیین برخی شاخص‌های خونی ماهیان خاویاری انگشت قد (قره‌برون و ازون‌برون) در استان گیلان. مجله پژوهش و سازندگی. شماره ۵۰، صفحات ۱۴ تا ۱۸.
۱۷. عباسی، ک؛ مرادخواه، س. و سرپناه، ان.، ۱۳۸۶. شناسایی و توزیع فون ماهیان در رودخانه سیاه درویشان (حوضه تالاب انزلی). مجله پژوهش و سازندگی. شماره ۱۹، صفحات ۲۷ تا ۳۹.
۱۸. فریدپاک، ف.، ۱۳۸۵. تکثیر مصنوعی و پرورش ماهی‌های گرمابی. انتشارات علمی آریزان. ۲۹۸ صفحه.
۱۹. فیضی، ز؛ جلالی‌جعفری، ب. و نبی‌زاده، ف.، ۱۳۹۲. بررسی انگل‌های مونوژن ماهیان آب شیرین در برخی از استخرهای پرورشی در سطح استان اصفهان. نشریه دامپزشکی (پژوهش و سازندگی). شماره ۹۹، صفحات ۲ تا ۷.
۲۰. کاظمی، ر؛ پوردهقانی، م؛ یوسفی‌جوردی، ا؛ یار محمدی، م. و نصری‌تجن، م.، ۱۳۸۹. فیزیولوژی دستگاه گردش خون آریزان و فنون کاربردی خون‌شناسی ماهیان. انتشارات بازرگان رشت. ۱۹۴ صفحه.
۲۱. کبریتی، م؛ پیغان، ر. و محمدیان، ب.، ۱۳۸۹. بررسی تلفات و ضایعات پاتولوژیکی ناشی از حمام نمک ۲۴ ساعته در آبشش ماهیان انگشت‌قد کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*). فصلنامه تالاب. دوره ۶، شماره ۲، صفحات ۴۹ تا ۵۶.
۲۲. کوهکن، ا.، ۱۳۹۵. آسیب‌شناسی بافت آبشش ماهی بنی (*Barbus sharpeyi*) در مواجهه با سطوح مختلف شوری. مجله پاتوبیولوژی مقایسه‌ای. شماره ۱، صفحات ۱۸۵۵ تا ۱۸۶۲.
۲۳. گلچین‌منشادی، ع.ر؛ عامری، م. و صادقی‌لیمنجوب، ر.، ۱۳۹۴. بررسی ضایعات آسیب‌شناسی بافتی جراحات ایجاد شده در ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*) و ماهی آمور (*Ctenopharyngodon idella*) آلوده به انگل لرنته‌آ سیپریناسه‌آ در برخی از مزارع پرورشی ماهیان گرمابی شهرستان شوشتر. مجله پاتوبیولوژی مقایسه‌ای ایران. دوره ۱۲، شماره ۳، صفحات ۱۶۹۹ تا ۱۷۰۶.
۲۴. گلچین‌منشادی، ع.ر. و خاج، ح.، ۱۳۹۵. مطالعه تغییرات برخی از فاکتورهای خونی ماهی حمیری (*Carasobarbus luteus*) و مقایسه آن با ماهیان آلوده به مرحله لاروی انگل کنتراسکوم. آسیب‌شناسی درمانگاهی دامپزشکی. دوره ۳۷، شماره ۱، صفحات ۲۹ تا ۳۷.
۲۵. مظاهری‌کوهانستانی، ز؛ حاجی‌مرادلو، م.ع. و قربانی، ر.، ۱۳۹۶. بررسی پارامترهای خونی سیاه‌ماهیان (*Capoeta capoeta gracilis*) آلوده به انگل پوستودیپلوستومم کوتیکولا (*Posthodiplostomum cuticola*) نهر زرین گل استان گلستان. مجله زیست‌شناسی جانوری تجربی. شماره ۱، صفحات ۷۰ تا ۹۳.
۲۶. موحد، ر؛ خارا، ح؛ صیادبورانی، م؛ احمدنژاد، م. و رهبر، م.، ۱۳۹۳. بررسی ارتباط بین آلودگی انگلی و فاکتورهای
- خونی سوف سفید (*Sander lucioperca*) صید شده از سواحل بندر انزلی. مجله آریزان و شیلات. شماره ۱۸، صفحات ۶۵ تا ۷۶.
۲۷. واحدی، ز. و یازوکی، ج.، ۱۳۹۶. ضایعات ناشی از انگل‌های منوزن بر روی بافت آبشش و سلول‌های کلراید ماهی سفید دریای خزر. نشریه دامپزشکی (پژوهش و سازندگی). شماره ۱۱۴، صفحات ۱۶۲ تا ۱۷۲.
۲۸. Abdel-Tawwab, M.; Mousa, M.A.A.; Sharaf, S.M. and Ahmad, M.H., 2005. Effect of Crowding Stress on Some Physiological Functions of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) Fed Different Dietary Protein Levels. International Journal of Zoological Research. Vol. 1, No. 1, pp: 41-47.
۲۹. Abreu, J.S.; Sanabria-Ochoa, A.I.; Goncalves, F.D. and Urbinati, E.C., 2008. Stress responses of juvenile Matrinxa (*Brycon amazonicus*) after transport in a closed system under different loading densities. Ciencia Rural. Vol. 38, No. 5, pp: 1413-1417.
۳۰. Acerete, L.; Balasch, J.C.; Espinosa, E.; Josa, A. and Tort, L., 2004. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) Subjected to stress by transport and handling. Aquaculture. Vol. 237, pp: 167-178.
۳۱. Achuthan Nair, G. and Balakrishnan Nair, N., 1983. Effect of infestation with the Isopod, *Alitropus Typus* M. Edwards (Crustacea; Flabellifera; Aegidae) on the Hematological Parameters of the Host fish *Channa striatus* (Bloch). Aquaculture. Vol. 30, pp: 11-19.
۳۲. Affonso, E.G.; Silva, E.C.; Tavares-Dias, M.; Menezes, G.C.; Carvalho, S.M.; Nunes, E.S.S.; Ituassu, D.R.; Roubach, R.; Ono, E.A.; Fim, J.D.I. and Marcon, J.L., 2007. Effect of high level of dietary vitamin C on the blood responses of matrinxa (*Brycon amazonicus*). Comprative Biochemistry and physiology. Vol. 147, pp: 383-388.
۳۳. Akhundov, M.M. and Fedorov, K., 1995. Effect of exogenous estradiol on ovarian development in juvenile starlet (*Acipenser ruthenus*). Journal of Ichthyology. Vol. 33, pp: 109-120.
۳۴. Alvarez-Pellitero, P., 2008. Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. Veterinary Immunology and Immunopathology. Vol. 126, pp: 171-198.
۳۵. Amar, E.C.; Kiron, V.; Satoh, S.; Okamoto, N. and Watanabe, T., 2000. Effects of dietary b-carotene on the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fisheries Science. Vol. 66, pp: 1068-1075.
۳۶. Antonio, F.F.; Jorge, V.F.C.; Sofia, G.S.; Sandra, M.M.; Joao, C. and Pedro, M., 2007. Histopathological changes in liver and gills epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. Pesquisa Veterinária Brasileira - Brazilian Journal of Veterinary Research. Vol. 27, No. 3, pp: 103-109.
۳۷. Ayoola, S.O., 2008a. Histopathological effects of glyphosate on juvenile African catfish (*Clarias gariepinus*). Journal of Agriculture and Environmental Sciences. Vol. 4, No. 3, pp: 362-367.
۳۸. Ayoola, S.O., 2008b. Toxicity of glyphosate herbicides on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juvenile. African Journal of Agricultural Research. Vol. 3, No. 2, pp: 825-834.
۳۹. Bani, A. and Hghi-Vayghan, A., 2011. Temporal variations in haematological and biochemical indices of the Caspian kutum, *Rutilus frisii kutum*. Ichthyological Research. Vol. 58, pp: 126-۱۳۳.



۵۳. Feist, G.; Van Enennaam, J.P.; Doroshov, S.I.; Schreck, C.B. and Schneider, R.P., 2004. Early identification of sex in cultured white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) using plasma steroid levels. *Aquaculture*. Vol. 232, pp: 581-590.
۵۴. Fevolden, S.E.; Røed, K.H. and Fjalestad, K.T., 2002. Selection response of cortisol and lysozyme in rainbow trout and correlation to growth. *Aquaculture*. Vol. 205, pp: 61-75.
۵۵. Flores-Lopes, F. and Thomaz, A.T., 2011. Histopathologic alterations observed in fish gills as a tool in environmental monitoring. *Brazilian Journal of Biology*. Vol. 71, No. 1, pp: 179-188.
۵۶. Francesco, F.; Satheshkumar, P.; Senthil Kumar, D.; Caterina, F. and Giuseppe, P., 2012. A Comparative study of hematological and blood chemistry of Indian and Italian Grey Mullet (*Mugil cephalus* Linneaus 1758). *HOAJ Biology*. pp: 1-5.
۵۷. Gaze, W.H. and Wootten, R., 1998. Ectoparasitic species of the genus *Trichodina* (*Ciliophora: Peritrichida*) parasitising British freshwater fish. *Folia Parasitologica*. Vol. 45, No. 3, pp: 177-190.
۵۸. Goldes, S.A.; Ferguson, H.W.; Moccia, R.D. and Daoust, P.Y., 1988. Histological effects of the inert suspended clay kaolin on the gills of juvenile rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Journal of Fish Diseases*. Vol. 11, pp: 23-34.
۵۹. Haaparanta, A.; Voltinen, E.T. and Hoffman, R.W., 1997. Gill anomalies of perch and roach from four lakes differing in water quality. *Journal of Fish Biology*. Vol. 50, pp: 575-591.
۶۰. Hao, L.; Chen, L.; Hao, J. and Zhong, M., 2013. Bioaccumulation and sub-acute toxicity of zinc nanoparticles in juvenile carp (*Cyprinus carpio*): A comparative study with its bulk counterparts. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Vol. 91, pp: 52-60.
۶۱. Henry, M.A.; Alexis, M.N.; Fountoulaki, E.; Nengas, I. and Rigos, G., 2009. Effects of a natural parasitological infection (*Lernanthropus kroyeri*) on the immune system of European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Parasite Immunology*. Vol. 31, No. 12, pp: 729-740.
۶۲. Houston, A.H., 1990. Blood and circulation. In *Methods in fish biology*. Edited by CB Schreck and PB Moyle. American Fisheries Society. Bethesda, Maryland. 335 p.
۶۳. Karagouni, E.; Athanassopoulou, F.; Tsagozis, P.; Ralli, E.; Moustakareas, T.; Lytra, K. and Dotsika, E., 2005. The impact of a successful anti-myxosporean treatment on the phagocyte functions of juvenile and adult *Sparus aurata* L. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. Vol. 18, No. 1, pp: 121-132.
۶۴. Karlsson-Norrgren, L.; Dickson, W.; Ljungberg, O. and Runn, P., 1986a. Acid water and aluminium exposure: gill lesions and aluminium accumulation in farmed brown trout, *Salmo trutta*. *Journal of Fish Diseases*. Vol. 9, pp: 1-10.
۶۵. Karlsson-Norrgren, L.; Björklund, I.; Ljungberg, O. and Runn, P., 1986b. Acid water and aluminium exposure:
۴۰. Barber, I.; Hoare, D. and Krause, J., 2000. Effects of parasites on fish behavior: a review and evolutionary perspectives. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. Vol. 10, pp: 131-165.
۴۱. Bhagwant, S. and Elahee, K.B., 2002. Pathologic gill lesions in two edible lagoon fish species, *Mulloidichthys flavolineatus* and *Mugil cephalus*, from the bay of poudre d'or, Mauritius. Western Indian Ocean. *Journal of Marine Science*. Vol. 1, No. 1, pp: 35-42.
۴۲. Blaxhall, P.C. and Daisley, K.W., 1983. Routine haematological methods for use with fish blood. *Fish Biology*. Vol. 5, pp: 771-781.
۴۳. Boon, J.H.; Cannaearts, V.H.M.; Augustijn, H.; Machiels, M.A.M.; Decharleroy, D. and Ollevier, F., 1990. The effect of different infection levels with infective Larvae *Anguillicola crassus*. *Aquaculture*. Vol. 87, pp: 243-253.
۴۴. Bowden, A.J.; Gardiner, N.M.; Couturier, C.S.; Stecyk, J.A.; Nilsson, G.E.; Munday, P.L. and Rummer, J.L., 2014. Alterations in gill structure in tropical reef fishes as a result of elevated temperatures. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Vol. 175, pp: 64-71.
۴۵. Bozorgnia, A.; Hosseinfard, M. and Alimohammadi, R., 2011. Acute Effects of Different Temperature in the Blood Parameters of Common Carp (*Cyprinus carpio*). 2nd International Conference on Environmental Science and Technology IPCBEE. 6, IACSIT Press, Singapore. pp: 52-55.
۴۶. Bykhovskiy-Pavloskaya, I.F.; Gushev, A.V.; Dubinia, M.N.; Izyumova, N.A.; Smirnova, T.S.; Sokolovskaya, I.L.; Shulman, S.S. and Epshtein, V.M., 1964. Key to the parasite of Freshwater Fishes of the U.S.S.R. *Izdatel'stvo Akademii Nauk S.S.S.R Moskva- Leningrad*. Program for scientific Translation, Jerusalem. 919 p.
۴۷. Camargo, M.M. and Martinez, C.B., 2007. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotropical Ichthyology*. Vol. 5, pp: 327-336.
۴۸. Chen, G.R.; Sun, L.T.; Lee, Y.H. and Chang, C.F., 1995. Characteristics of blood in common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to low temperatures. *Journal of Applied Aquaculture*. Vol. 5, pp: 21-31.
۴۹. Clauss, T.M.; Dove, A.D.M. and Arnold, J.E., 2008. Hematologic Disorders of Fish. *Veterinary Clinician of North America Exotic Animal Practice*. Vol. 11, No. 3, pp: 445-462.
۵۰. Ellis, A.E., 1977. The Leucocytes of fish: A review. *Journal of Fish Biology*. Vol. 11, pp: 453-491.
۵۱. Evans, G.O., 2009. *Animal Hematotoxicology*. CRC Press. Boca Raton. 204 p.
۵۲. Farkas, J.; Christian, P.; Gallego-Urrea, J.A.; Roos, N.; Hasselov, M.; Tollefsen, K.E. and Thomas, K.V., 2011. Uptake and effects of manufactured silver nanoparticles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill cells. *Aquatic Toxicology*. Vol. 101, pp: 117-125.



- Fisheries and Aquatic Sciences. Vol. 12, pp: 15-20.
۷۸. **Nikolsky, G.V., 1963.** The Ecology of fishes. Academic Press, London. 350 p.
۷۹. **Özdemir, G.; Şanver Çelik, E.; Yılmaz, S.; Gürkan, M. and Kaya, H., 2016.** Histopathology and Blood Parameters of Bogue Fish (*Boops boops*, Linnaeus 1758) Parasitized by *Ceratomyxa oestroides* (Isopoda: Cymothoidae). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. Vol. 16, pp: 585-596.
۸۰. **Pacheco, M. and Santos, M.A., 2001.** Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. Ecotoxicology Environmental Safty. Vol. 49, pp: 64-75.
۸۱. **Panigrahi, A.; Kiron, V.; Puangkaew, J.; Kobayashi, T.; Stath, S. and Sugita, H., 2005.** The Viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. Vol. 243, pp: 241-254.
۸۲. **Panjvini, F., Abarghuei, S., Khara, H. and Mohammadi Parashkoh, H., 2016.** Parasitic infection alters haematology and immunity parameters of common carp, *Cyprinus carpio*, Linnaeus, 1758. Journal of Parasitic Diseases. Vol. 40, No. 4, pp: 1540-1543.
۸۳. **Patriche, T.; Patriche, N.; Bocioc, E. and Coadă, M.T., 2011.** Serum biochemical parameters of farmed carp (*Cyprinus carpio*). Aquaculture, Aquarium, Conservation and Legislation – International Journal of the Bioflux Society. Vol. 4, pp: 137-140.
۸۴. **Poole, B.C. and Dick, T.A., 1985.** Parasite recruitment by stocked walleye, *Stizostedion vitreum* (Mitchill), fry in small boreal Lake in central Canada. Journal of Wildlife Diseases. Vol. 21, No. 4, pp: 371-376.
۸۵. **Pottinger, T.G. and Carrick, T.R., 2002.** Stress responsiveness affects dominant – subordinate relationships in rainbow trout. Hormones and Behavior. Vol. 40, pp: 419-4۲۷.
۸۶. **Rotllant, J.; Balm, P.H.M.; Perez-Sanchez, J.; Wendelaar-Bonga, S.E. and Tort, L., 2001.** Pituitary and interrenal function in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., Teleostei) after handling and confinement stress. General and Comparative Endocrinology. Vol. 121, pp: 333-342.
۸۷. **Saber, T.H., 2011.** Histological Adaptation to Thermal Changes in Gills of Common Carp Fishes *Cyprinus carpio*. Rafidain journal of science. Vol. 22, No. 1, pp: 46-55.
۸۸. **Sanders, G.E.; Batts, W.N. and Winton, J.R., 2003.** Susceptibility of Zebra fish (*Danio rerio*) to a Model Pathogen, Spring Viraemia of Carp Virus. Comparative Medicine. Vol. 53, No. 5, pp: 514-521.
۸۹. **Saurabh, S. and Sahoo, P.K., 2008.** Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. Aquaculture Research. Vol. 39, No. 3, pp: 223-239.
- experimentally induced gill lesions in brown trout, *Salmo trutta*. Journal of Fish Diseases. Vol. 9, pp: 11-26.
۶۶. **Kavitha, C.; Malarvizhi, S.; Senthil, K. and Ramesh, M., 2010.** Toxicological effects of arsenate exposure on hematological, Biochemical and liver transaminases activity in an Indian major carp, *Catla catla*. Food and Chemical Toxicology. Vol. 48, pp: 2848-۲۸۵۴.
۶۷. **Klontz, G.W., 1994.** Fish Hematology. In Techniques in Fish Immunology. Edited by JS Stolen, TC Fletcher, AF Rowley, TC Kelikoff, SL Kaattari and SA Smith. SOS Publications. pp: 121-132.
۶۸. **Konstantinov, A.S. and Zdanovich, V., 1986.** Peculiarities of fish growth in relation to temperature fluctuation. Journal of Ichthyology. Vol. 26, pp: 65-74.
۶۹. **Krajnovic-Ozertic, M., 1991.** Hematological and Biochemical Characteristics of Reared Sea Bass (*Dicentrarchus Labrax L.*). Acta biol. Jogos. Ichthyologie. Vol. 23, pp: 25-34.
۷۰. **Kubokawa, K.; Watanabe, T.; Yoshioka, M. and Iwata, M., 1999.** Effects of acute stress on plasma cortisol, sex steroid hormone and glucose levels in male and female sockeye salmon during the breeding season. Aquaculture. Vol. 172, pp: 335-349.
۷۱. **Lermen, C.L.; Lappe, R.; Crestani, M.; Vieira, V.P. and Gioda, C.R., 2004.** Effect of different temperature regimes on metabolic and blood parameters of silver catfish *Rhamdia quelen*. Aquaculture. Vol. 239, pp: 497-504.
۷۲. **Li, P.; Lewis, D.H. and Gatlin, D.M., 2004.** Dietary oligonucleotides from yeast RNA influence immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. Fish and shellfishimmunology. Vol. 16, No. 5, pp: 561-569.
۷۳. **Lom, J. and Dykova, I., 1992.** Protozoan Parasites of Fishes. Elsevier Science Publisher Amsterdam. 320 p.
۷۴. **Malek, M. and Mobedi, I., 2001.** Occurrence of *Clinostomum complanatum* (Rudolphi, 1819) (Digenea: Clinostomatidae) in (Osteichthys: Cyprinidae) from Shiroud River, Iran. Iranian Journal of Public Health. Vol. 30, pp: 95-98.
۷۵. **Martinez, C.B.R.; Nagae, M.Y.; Zaia, C.T.B.V. and Zaia, D.A.M., 2004.** Morphological and physiological acute effects of lead in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Brazilian Journal of Biology. Vol. 64, No. 4, pp: 797-807.
۷۶. **Molnar, K., 1972.** Studies on gill parasitosis of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) caused by *D. lamellatus* Achmerow: HistoPatological changes. Acta veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae. Vol. 22, No. 1, pp: 9-24.
۷۷. **Neary, E.T.; Develi, N. and Ozgul, G., 2012.** Occurrence of Dactylogyrus species (Platyhelminths, Monogenean) on Cyprinids in Almus Dam Lake, Turkey. Turkish Journal of



۱۰۲. Zapata, A.G.; Torroba, M. and Varas, A., 1997. Vitaminize E. Immunity in fish larvae. Development Biology Standard. Vol. 90, pp: 23-32.
۹۰. Schlenk, D. and Benson, W.H., 2001. Target organ toxicity in marine and fresh water teleosts. Taylor and Fransis. pp: 1-90.
۹۱. Siwicki, A.K. and Anderson, D.P., 1993. Nonspecific defence mechanisms assay in fish. II. Potential killing activity of neutrophils and macrophages, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin (T-Ig) levels in serum. Fish Diseases Diagnosis and Prevention's Methods. FAO Project GCP/INT/526/JPN, IFI Olsztyn. pp: 105-112.
۹۲. Stolen, J.S.; Fletcher, T.C.; Rowley, A.F.; Zelikoff, J.T.; Kattari, S.L. and Smith, S.A., 1997. Techniques in fish Immunology. 2nd eds. SOS Publication. Fairhaven, USA. 222 p.
۹۳. Takabe, S.; Teranishi, K.; Takaki, S.; Kusakabe, M.; Hirose, S.; Kaneko, T. and Hyodo, S., 2012. Morphological and functional characterization of a novel Na⁺/K⁺-ATPase immunoreactive, follicle-like structure on the gill septum of Japanese banded houndshark, *Triakis scyllium*. Cell and Tissue Research. Vol. 348, pp: 141-153.
۹۴. Tandon, R.S. and Joshi, B.D., 1974. Effect of trypanosome infection on blood glucose levels of some fresh water teleosts. Journal of the Inland Fisheries Society of India. Vol. 6, pp: 81-82.
۹۵. Tavares-Dias, M. and Moraes, F.R., 2007. Leukocyte and thrombocyte reference values for channel catfish (*Ictalurus punctatus*) with an assessment of morphological, cytochemical, and ultrastructural features. Veterinary Clinical Pathology. Vol. 36, pp: 49-54.
۹۶. Tavares-Dias, M.; Ruas de Moraes, F.; Onaka, E.M. and Bonadio Rezende, P.C., 2007. Changes in blood parameters of hybrid tambacu fish parasitized by *Dolops carvalhoi* (Crustacea, Branchiura), a fish louse. Veterinarski Arhiv. Vol. 77, pp: 355-363.
۹۷. Temmink, J.; Bowmieister, P.; Jong, P. and Van der Berg, J., 1983. An ultrastructural study of chromate-induced hyperplasia in the gill of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Aquatic Toxicology. Vol. 4, pp: 165-179.
۹۸. Wang, P.; Lin, C.; Hwang, L.; Huang, C.; Lee, T. and Hwang, P., 2013. Differential responses in gills of euryhaline tilapia, *Oreochromis mossambicus*, to various hyperosmotic shocks. Comparative Biochemistry and Physiology. Vol. 152, pp: 544-551.
۹۹. Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. Physiological Reviews - American Journal of Physiology. Vol. 77, pp: 591-625.
۱۰۰. Whyte, S.K., 2007. The innate immune response of finfish: A review of current knowledge. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 23, pp: 1127-1151.
۱۰۱. Yamaguti, S., 1964. Systema helminthum, The Digenetic Trematodes of vertebrate. Part II. Interscience Publisher. New York. 800 p.

