



Original Research Paper

Evaluation of blood biochemical parameters and tissue damage of gill and liver of rainbow trout in acetaminophen

Fahimeh Tollabian ^{*1}, Morteza Kamali ²

¹ Department of Fisheries, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Khazar Institute of Higher Education, Mahmudabad, Iran

² Department of Aquaculture, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran

Key Words

Immunity
Acetaminophen
Complement
Lysozyme
Cortisol
Rainbow trout

Abstract

Introduction: The aim of this study was to evaluate the biochemical factors of blood and tissue damage of gills and liver of rainbow trout in 14-day exposure to acetaminophen.

Materials & Methods: For this purpose, 300 pieces of rainbow trout juveniles with an average weight (12.52 ± 2.5) were prepared and experimental treatments including 5 treatments and 3 replications were designed.

Results: Based on the obtained results, a significant increase in serum lysozyme and complement (ACH50) enzyme activity was observed in juvenile fish during exposure to acetaminophen. The amount of cortisol and glucose also showed a significant decrease in the amount of these indicators so that the highest amount of cortisol and glucose measured in the control group and the lowest amount was observed and recorded in treatment 5. The results of the study of tissue damage showed that in gill tissue, curvature and club formation of the tip of the secondary gill blade were due to the effects of low concentration (0.01 mg / l) of acetaminophen. At moderate concentrations (0.1 and 1) mg / l, hyperplasia, hypertrophy, clubbing of the tip of the secondary gill blade and welding of the secondary blade were observed. Liver tissue examination showed the most severe liver tissue lesions in fish exposed to 10 mg / l acetaminophen.

Conclusion: The presence of acetaminophen caused damage to gill tissue and liver in rainbow trout juveniles. However, it increased blood safety markers such as lysozyme and complement and also significantly reduced cortisol. Which showed a decrease in stress levels in fish exposed to different levels of acetaminophen.

* Corresponding Author's email: fahimeh.tbn@gmail.com

Received: 23 July 2021; Reviewed: 23 August 2021; Revised: 25 October 2021; Accepted: 25 November 2021

(DOI): [10.22034/AEJ.2021.312933.2681](https://doi.org/10.22034/AEJ.2021.312933.2681)

مقاله پژوهشی

ارزیابی شاخص‌های بیوشیمیایی خون و آسیب‌های بافتی آبشش و کبد بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در رویارویی با استامینوفن

فهیمة طالبیان*^۱، مرتضی کمالی^۲

^۱ گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، موسسه آموزش عالی خزر، محمودآباد، ایران
^۲ گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

چکیده

کلمات کلیدی

مقدمه: مطالعه حاضر با هدف ارزیابی فاکتورهای بیوشیمیایی خون و آسیب‌های بافتی آبشش و کبد بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در مواجهه ۱۴ روزه با استامینوفن بود. **مواد و روش‌ها:** به این منظور تعداد ۳۰۰ قطعه بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی (۱۲/۵۲±۲/۵) تهیه و تیمارهای آزمایش شامل ۵ تیمار و ۳ تکرار طراحی گردید.

استامینوفن
کمپلمان
لیزوزیم
کورتیزول
قزل‌آلای رنگین‌کمان

نتایج: افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم لیزوزیم و کمپلمان (ACH50) سرم خون در بچه‌ماهیان طی مواجهه با استامینوفن مشاهده شد. میزان کورتیزول و گلوکز نیز کاهش معنی‌داری در میزان این شاخص‌ها نشان داد به طوری که بیش‌ترین میزان کورتیزول و گلوکز اندازه‌گیری شده در گروه شاهد و کم‌ترین میزان آن نیز در تیمار ۵، مشاهده و ثبت گردید. نتایج حاصل از بررسی آسیب‌های بافتی نشان می‌داد در بافت آبششی خمیدگی و چماقی شکل شدن راس تیغه ثانویه آبشش از اثرات غلظت کم (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) استامینوفن بود. در غلظت متوسط (۱ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر هایپریپلازی، هایپرتروفی، چماقی شکل شدن راس تیغه ثانویه آبشش و جوش خوردگی تیغه ثانویه مشاهده شد. در بررسی بافت کبد شدیدترین ضایعات بافت کبد در ماهیان قرار گرفته در معرض ۱۰ میلی‌گرم در لیتر استامینوفن مشاهده شد.

بحث و نتیجه‌گیری: وجود استامینوفن سبب بروز آسیب به بافت آبشش و کبد در بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان شده بود با این حال سبب افزایش شاخص‌های ایمنی خون مانند لیزوزیم و کمپلمان (ACH50) شده و همچنین سبب کاهش معنی‌دار کورتیزول شده بود که نشان‌دهنده کاهش سطح استرس در ماهیان مواجهه شده با سطوح مختلف استامینوفن بود.

مقدمه

زیست آبی تخلیه شده و چنانچه این مواد در مرحله تصفیه فاضلاب حذف و یا تجزیه زیستی نشوند به محیط زیست وارد می‌شوند (۱۸). استامینوفن به‌عنوان پرکاربردترین و محبوب‌ترین مسکن در سطح جهانی گزارش شده است (۱۹، ۲۰). استفاده گسترده از این دارو، استامینوفن را به یکی از آلاینده‌های مهم در صنعت آبی‌پروری مبدل کرده است که نشأت گرفته از صنایع دارویی و انسانی می‌باشد. تا کنون در آب‌های سطحی و آب‌های زیر زمینی مقادیری از این دارو مشاهده شده است. Folarin و همکاران، تأثیر استفاده از غلظت بالای استامینوفن در جیره غذایی گربه‌ماهی آفریقایی (*Clarias gariepinus*) را بر روی شاخص‌های کبدی (ALP، AST و ALT) و شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی این ماهی بررسی و نشان دادند که استفاده از استامینوفن در جیره این ماهی سبب بروز آسیب کبدی و کاهش قابل ملاحظه شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی شامل کاتالاز و گلوکاتایون S-ترانسفراز (GST) شده است (۲۱). هم‌چنین Erhunmwunse و همکاران، تأثیر حاد استامینوفن را بر رشد و عملکرد قلب لارو گربه‌ماهی آفریقایی مورد بررسی قرار دادند و در این مطالعه نشان دادند که استامینوفن توانایی ایجاد اختلال در عملکرد قلب، ناهنجاری در رشد و اختلال در شنا را دارد و رشد لاروها را به خطر می‌اندازد (۲۲). تأثیرات بیولوژیکی بالقوه سطوح کم استامینوفن در محیط زندگی موجودات آبی هنوز به‌طور کامل مشخص نشده است که در چه سطحی حالت سمی داشته و در سطوح کم چه تأثیرات مثبت و یا منفی در سیستم ایمنی و رشد آبیان دارد. لذا تحقیق حاضر با هدف ارزیابی شاخص‌های بیوشیمیایی خون و آسیب‌های بافتی آبشش و کبد بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در رویارویی با استامینوفن انجام گرفت.

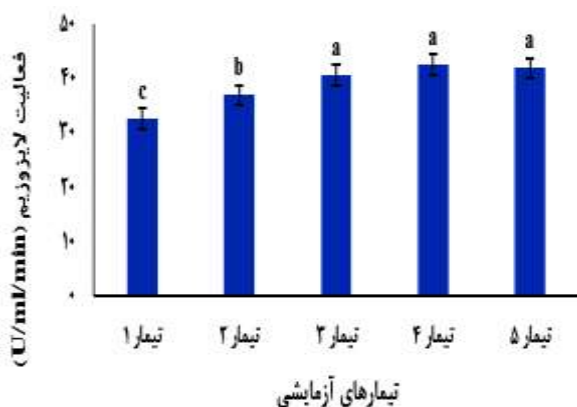
مواد و روش‌ها

در دی و بهمن ماه سال ۱۳۹۹، تعداد ۳۰۰ قطعه بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان از مراکز تکثیر پرورش ماهیان سردابی تهیه و پس از انتقال به آزمایشگاه پرورش آبیان دانشگاه خزر محمودآباد و سپری شدن دوره آدپتاسیون (به‌مدت ۱۴ روز) بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در یک طرح تصادفی به ۵ تیمار آزمایشی با سه تکرار برای هر تیمار تقسیم گردیدند. تیمارهای طراحی شده شامل؛ تیمار یک (گروه شاهد با غلظت صفر)، تیمار دو (غلظت ۰/۰۱)، تیمار سه (غلظت ۰/۱)، تیمار چهار (غلظت ۱) و تیمار پنج (غلظت ۱۰) میلی‌گرم بر لیتر استامینوفن در نظر گرفته شد. داخل هر تانک ۲۰ عدد ماهی قرار داده شد. در طول دوره مواجهه ماهی با غلظت‌های استامینوفن، سایر شرایط فیزیکیوشیمیایی آب برای تمامی تیمارها

براساس آمار ارائه شده توسط سازمان خوار و بار کشاورزی در سال ۲۰۵۰ به‌طور میانگین جمعیت جهان به حدود ۱۰ میلیارد نفر خواهد رسید و تقاضا برای مواد غذایی پروتئینی و دیگر مواد غذایی افزایش خواهد داشت که در صورت عدم مدیریت صحیح، تشدید گرسنگی و فقر در جهان را در پی خواهد داشت. در حالی که تولید گوشت قرمز و دیگر محصولات کشاورزی به‌علت تغییرات اقلیمی با محدودیت رو به رو خواهد بود (۱)، تلاش‌ها در زمینه آبی‌پروری به سمت افزایش رشد و افزایش ایمنی می‌باشد (۲، ۳). علاوه بر ادامه این مطالعات، تحقیقات جدیدی بر روی مواد دارویی انجام می‌گیرد که از طرق مختلف می‌توانند وارد محیط زندگی موجودات آبی شوند و افزایش روز افزون استفاده از آن‌ها منجر به انتشار آن‌ها به محیط‌های آبی شده است (۴، ۵، ۶، ۷، ۸). استامینوفن (Acetaminophen) یا پاراستامول (Paracetamol) یک داروی ترکیبی با فرمول بسته $C_8H_9NO_2$ و وزن مولکولی ۱۵۱/۱۷ می‌باشد. این دارو از سال ۱۹۵۹ بدون نسخه به‌عنوان مسکن در دسترس مردم قرار گرفت، از آن زمان به یک داروی معمول‌خانگی تبدیل شده است (۹، ۱۰). نیمه عمر استامینوفن در خون ۳ ساعت بوده و حداکثر غلظت پلاسمایی آن نیز ۳۰ دقیقه الی ۲ ساعت است و نیمه‌عمر بیش‌تر از ۴ ساعت با نکرور کبدی و نیمه عمر بیش‌تر از ۱۲ ساعت نیز سبب اغماء می‌شود (۱۱، ۱۲). مکانیسم اثر این دارو مهار مسیر سیکلو اکسیژناز و وقفه بیوسنتز پروستاگلاندین از آراشیدونیک اسیداست. استامینوفن در کبد متابولیزه می‌شود و بخش عمده‌ای از متابولیت‌های آن از طریق ادرار دفع می‌شود. بخشی از دارو توسط آنزیم‌های سیتوکروم p450 به ترکیب حد واسط فعال NAPQI (N-acetyl-p-benzoquinone imine) که با اتصال به گلوکاتایون به سرعت سم‌زدایی می‌شود (۱۳). قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) از خانواده آژادماهیان و راسته آژادماهی‌سانان می‌باشد (۱۴). ایران علاوه بر تقاضای بالای مصرف داخلی از حدود ۲/۸ میلیون دلار درآمد ارزی خود در ۸ ساله منتهی به سال ۱۳۸۷، به‌میزان ۷۲/۷ درصد صادرات قزل‌آلای تازه و سرد شده و ۲۷/۳ درصد صادرات به‌صورت منجمد داشته است (۱۵). از طرفی یکی از عمده‌ترین مخاطراتی که پرورش‌دهندگان ماهی با آن مواجه هستند، کاهش میزان زنده‌مانی آبی با بروز برخی بیماری‌ها و استرس حاصل از محیط به‌ویژه در مراحل اولیه زندگی است، لذا تقویت و ارتقای سیستم ایمنی و دفاعی بدن ماهیان به‌ویژه در گونه‌های با ارزش و اقتصادی از اصلی‌ترین نیازهای پرورش‌دهندگان و مهم‌ترین رویکردهای محققان در این راستا می‌باشد (۱۶، ۱۷). مواد دارویی پس از مصرف بیماران از طریق فاضلاب به محیط

نتایج

بر اساس نتایج به دست آمده مواجهه با استامینوفن تاثیر معنی داری در میزان فعالیت این آنزیم در سرم خون بچه ماهیان قزل آلاهی رنگین کمان داشته است ($p < 0.05$). به طوری که بیشترین میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم در تیمارهای ۳، ۴ و ۵ مشاهده و کمترین میزان آن نیز در گروه شاهد، مشاهده و ثبت گردید ($p < 0.05$) (شکل ۱). اندازه‌گیری کورتیزول نشان داد که مواجهه با استامینوفن تاثیر معنی داری در میزان این هورمون در سرم خون بچه ماهیان قزل آلاهی رنگین کمان داشته است ($p > 0.05$). به طوری که بیشترین میزان هورمون کورتیزول در گروه شاهد مشاهده و کمترین میزان آن نیز در تیمار ۵، مشاهده و ثبت گردید ($p < 0.05$). علاوه بر این میان تیمارهای ۴ و ۳ نیز اختلاف معنی داری در میزان هورمون کورتیزول اندازه‌گیری شده مشاهده نگردید ($p > 0.05$) (شکل ۲). میزان فعالیت کمپلمان ACH50 در سرم خون نشان داد که مواجهه با استامینوفن تاثیر معنی داری در میزان فعالیت کمپلمان ACH50 در سرم خون بچه ماهیان قزل آلاهی رنگین کمان داشته است ($p > 0.05$). به طوری که بیشترین میزان فعالیت آن در تیمار ۵ و کمترین میزان آن نیز در گروه شاهد، مشاهده و ثبت گردید ($p < 0.05$) (شکل ۳). مواجهه با استامینوفن تاثیر معنی داری در میزان غلظت گلوکز در سرم خون بچه ماهیان قزل آلاهی رنگین کمان داشته است ($p > 0.05$). به طوری که بیشترین میزان فعالیت آن در تیمار شاهد و کمترین میزان آن نیز در تیمار ۵، مشاهده و ثبت گردید ($p < 0.05$) (شکل ۴).



شکل ۱: میانگین (\pm انحراف معیار) فعالیت لیزوزیم (U/ml/min) بچه ماهیان قزل آلاهی رنگین کمان در مواجهه با استامینوفن در پایان دوره آزمایشی
حروف لاتین غیرهمنام تفاوت معنی دار را نشان می‌دهد ($p < 0.05$)

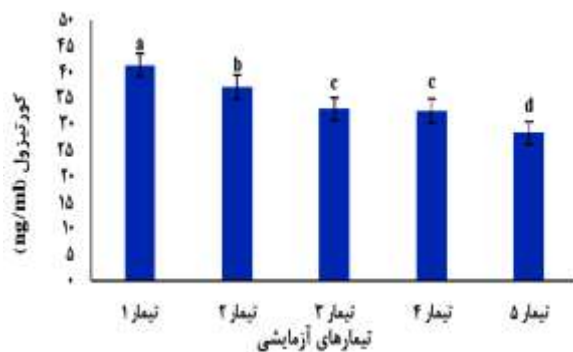
به طور مشابه تنظیم گردید. غذادهی در حد سیری انجام گرفت. به منظور تهیه غلظت‌های مختلف استامینوفن، پودر خالص استامینوفن (Sigma) به غلظت ۱ g/L تهیه و در هر ۱۰ لیتر آب به ترتیب ۰، ۰/۷، ۷ و ۷۰۰ میلی‌گرم از این محلول به تانک‌های ذخیره‌سازی اضافه گردید. پس از اتمام دوره پرورش از یک روز قبل از خونگیری غذادهی تمامی ماهیان قطع گردید. تعداد ۳ قطعه ماهی از هر تکرار به صورت تصادفی صید و پس از بی‌هوشی با پودر گل میخک (۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) از سیاهرگ ساقه‌دمی با استفاده از سرنگ ۲ سی‌سی فاقد ماده ضد انعقاد خونگیری انجام شد. نمونه‌های گرفته شده با دور ۵۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند تا سرم از خون جدا شود (۲۳).

سنجش پارامترهای بیوشیمیایی سرم: پارامترهای بیوشیمیایی خون شامل کورتیزول، گلوکز، لیزوزیم و کمپلمان (ACH50) سرم خون با استفاده از کیت‌های تجاری (پارس آزمون) و کیت هورمونی ایمونوتک (ساخت کشور فرانسه) به روش فتومتریک اندازه‌گیری شد (۲۴). میزان گلوکز سرم خون با روش آنزیماتیک GOD-PAP و بر اساس روش Teuscher و Richterich انجام شد (۲۵) و کورتیزول نیز خون با روش رادیوایمونواسی و با استفاده از کیت‌های هورمونی ایمونوتک ساخت کشور فرانسه انجام شد. غلظت لیزوزیم سرم خون نیز با استفاده از روش کدورت‌سنجی (Turbidimetric) بر اساس روش Ellis تعیین شد (۲۶) و در آخر فعالیت راه میانبر کمپلمان سرم بر اساس همولیز گلبول‌های قرمز خرگوش (RaRBC) و به کمک روش Whaley و North (۲۷) و Amar و همکاران (۲۸) اندازه‌گیری گردید (۲۹).

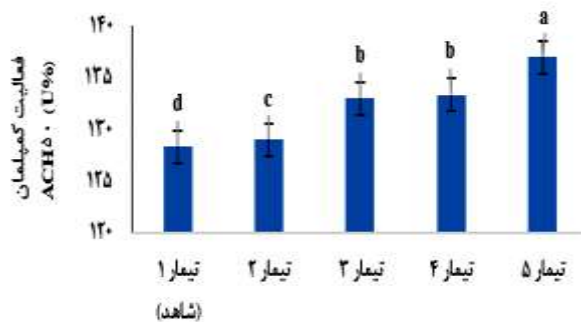
نمونه‌برداری از بافت: به منظور نمونه‌برداری از بافت‌های آبشش و کبد بچه ماهیان قزل آلاهی رنگین کمان ۲۴ ساعت قبل از نمونه‌برداری غذادهی قطع و از هر تکرار ۳ قطعه ماهی صید و با استفاده از پودر گل میخک (۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بی‌هوش گشته و پس از بی‌هوشی از هر قطعه ماهی نمونه‌های مربوط به آبشش و کبد اخذ گردید. تهیه مقاطع میکروسکوپی و رنگ‌آمیزی به روش هماتوکسیلین و ائوزین (H & E) مطابق با روش‌های استاندارد صورت پذیرفته و مقاطع تهیه شده با میکروسکوپ نوری مطالعه گردیدند (۳۰).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: تجزیه و تحلیل داده‌ها به روش آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون دانکن جهت مقایسه میانگین‌ها انجام شد. اختلاف بین میانگین‌ها در تیمارهای مختلف با سطح اطمینان $P < 0.05$ تعیین شد. برای عملیات آماری از نرم‌افزار SPSS ۱۶ استفاده گردید. تمام داده‌های متن بر اساس میانگین \pm انحراف معیار، محاسبه شد.

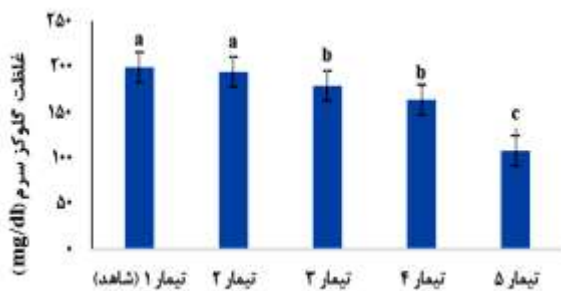
آزمایش (آبشش و کبد) ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در طول دوره سمیت در جدول ۱ خلاصه شده و این تغییرات در شکل‌های ۵ و ۶ نشان داده شده است. بافت‌شناسی طبیعی آبشش در ماهیان گروه شاهد در روز چهارم در شکل ۵ نشان داده شده است که به خوبی سلول‌های کلراید، سلول‌ستونی (پیلار)، رشته‌های آبششی و سلول‌های اپیتلیالی با ساختار طبیعی قابل مشاهده‌اند. تجزیه و تحلیل بافت شناختی با استفاده از میکروسکوپ نوری نشان داد که استامینوفن موجود در آب در غلظت‌های مختلف، آسیب‌های متفاوتی در آبشش ایجاد می‌کند. این تغییرات در آبشش در دوزهای بالاتر استامینوفن مشهودتر بود. در دوره سمیت، بعد از ۹۶ ساعت (روز چهارم) در مواجهه با غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر استامینوفن مانند تیمار شاهد، تغییرات خاصی در آبشش ماهیان مشاهده نگردید. مواجهه با غلظت‌های ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر استامینوفن، آبشش ماهیان تیمار شده خمیدگی تیغه ثانویه آبشش را نشان دادند (شکل ۵). در این آزمایش، در دوز ۱۰ میلی‌گرم در لیتر، ضایعات آشکارتری در آبشش ماهیان مورد آزمایش عبارت بودند از: جوش خوردگی (چسبندگی) تیغه‌های آبششی، چماقی‌شکل شدن راس تیغه آبششی، ادم (خیز) و جداشدگی اپیتلیالی. در روز چهاردهم آبشش ماهیان مورد آزمایش در گروه شاهد از نظر بافت‌شناسی طبیعی بودند (شکل ۵). آشکارترین ضایعات آسیب‌شناختی آبشش ماهیانی که در معرض استامینوفن به میزان ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر به مدت ۱۴ روز قرار گرفتند شامل چماقی شدن و خمیدگی رشته‌های ثانویه آبششی و کوتاهی تیغه ثانویه آبشش بود. با افزایش غلظت استامینوفن در آب میزان آسیب بافت آبشش افزایش یافت و تغییرات بافت‌شناختی از جمله هایپرپلازی و هایپرتروفی، کوتاهی تیغه ثانویه آبشش، خمیدگی تیغه آبششی، جدا شدگی اپیتلیال تیغه ثانویه آبشش و در برخی از قسمت‌های آبشش آنوریسم مشاهده شد (شکل ۵-F). مطالعه حاضر نشان داد که استامینوفن در مدت ۱۴ روز در غلظت‌های کم، متوسط و زیاد اثرات مختلف آسیب‌شناختی آشکاری بر بافت آبشش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان برجای گذاشت. خمیدگی و چماقی‌شکل شدن راس تیغه ثانویه آبشش از اثرات غلظت کم (۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر) استامینوفن بود. در غلظت متوسط (۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر هایپرپلازی، هایپرتروفی، چماقی شکل شدن راس تیغه ثانویه آبشش و جوش خوردگی تیغه ثانویه مشاهده شد (شکل ۵-D و E). در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر استامینوفن علاوه بر هایپرپلازی و هایپرتروفی سلول‌های آبششی، کوتاهی و جوش خوردگی تیغه ثانویه، خمیدگی تیغه ثانویه، چماقی شکل شدن راس تیغه ثانویه آبشش و آنوریسم دیده شد (شکل ۵)



شکل ۲: میانگین (± انحراف معیار) کورتیزول (ng/ml) بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در مواجهه با استامینوفن در پایان دوره آزمایش حروف لاتین غیرهمنام تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهد (p<۰/۰۵)



شکل ۳: میانگین (± انحراف معیار) فعالیت کمپلمان ACH50 (U%) بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در مواجهه با استامینوفن در پایان دوره آزمایش حروف لاتین غیرهمنام تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهد (p<۰/۰۵)



شکل ۴: میانگین (± انحراف معیار) غلظت گلوکز سرم (mg/dl) بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در مواجهه با استامینوفن در پایان دوره آزمایش حروف لاتین غیرهمنام تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهد (p<۰/۰۵)

بررسی آسیب‌شناسی بافت آبشش: در آبشش‌های تحت تیمار آسیب قابل مشاهده خمیدگی تیغه ثانویه و در برخی موارد چماقی شدن راس تیغه بوده است. تغییرات بافت‌شناختی در بافت‌های مورد

جدول ۱: یافته‌های هیستوپاتولوژیکی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بعد از مواجهه با تیمارهای مختلف استامینوفن و گروه شاهد

ضایعات و آسیب‌های بافتی										اندام/تیمار
نکروز	آنوریسم	جداشدگی اپیتلیالی	کوتاهی تیغه‌ها	جوش خوردگی	چماقی شدن	هایپر تروفی	هایپرپلازی	ادم	خمیدگی	آبشش
استامینوفن (میلی گرم در لیتر) روز چهارم										
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۰
-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	۰/۰۱
-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	۰/۱
-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	۱
-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	۱۰
استامینوفن (میلی گرم در لیتر) روز چهاردهم										
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۰
-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	۰/۰۱
-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	۰/۱
-	+	+	+	+	++	+	+	+	++	۱
+	++	+	++	++	+++	++	+	+	+++	۱۰
نکروز	واکونولاسیون	هسته پیکنوتیک	تجمع سلول خونی	نکروز هیپاتوسیت	احتقان (پُر خونی)	اتساع سینوزوئیدها	نواحی کانونی ملانوماکروفازها	دژنراسیون سیتوپلاسمی	کبد	
استامینوفن (میلی گرم در لیتر) روز چهارم										
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۰
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۰/۰۱
-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	۰/۱
-	+	+	+	+	++	+	++	-	+	۱
+	++	++	++	+	+++	++	++	+	+	۱۰
استامینوفن (میلی گرم در لیتر) روز چهاردهم										
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۰
-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	۰/۰۱
-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	۰/۱
+	+	++	++	-	++	++	+	+	+	۱
+	++	++	+++	+	+++	+++	++	++	++	۱۰

*بدون تغییر (-)، تغییر ملایم (+)، تغییر متوسط (++) و تغییر شدید (+++)

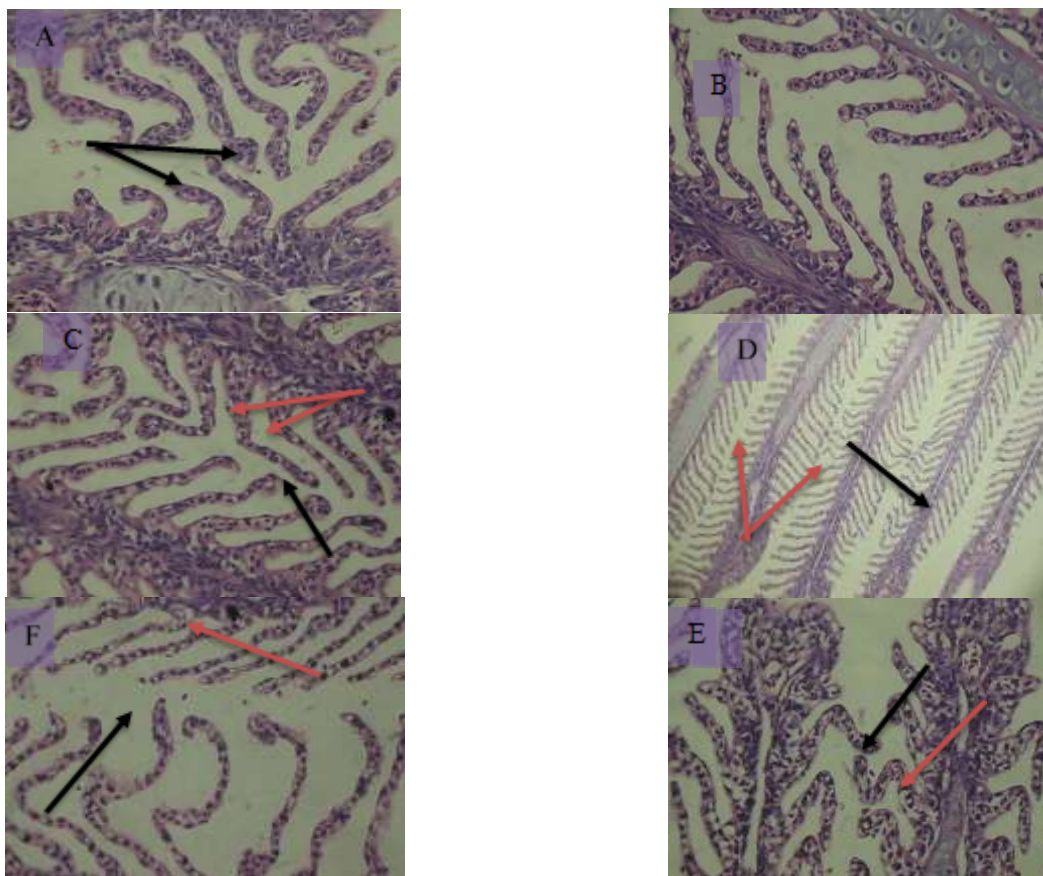
بررسی آسیب‌شناسی بافت کبد: در روز چهارم مواجهه

استامینوفن، مقاطع میکروسکوپی بافت کبد ماهیان گروه شاهد ساختار طبیعی را نشان دادند (شکل ۶). ضایعات بافتی مشاهده شده در ماهیان در معرض استامینوفن در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر شامل تجمع پراکنده و محدود مراکز ملانوماکروفاز و تجمع سلول‌های قرمز خون در عروق کبدی بود. در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر تعداد سلول‌های حاوی هسته پیکنوتیک و تجمع سلول‌های قرمز خون در

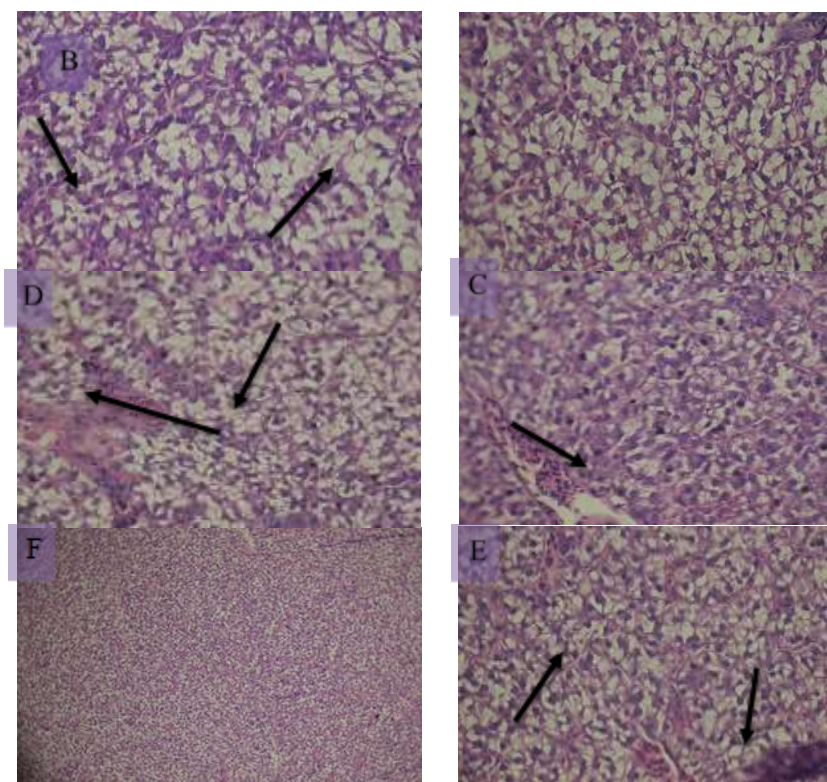
عروق کبدی افزوده و اتساع سینوزوئیدها مشاهده شد (شکل ۶-E). شدیدترین ضایعات بافت کبد در ماهیان قرارگرفته در معرض ۱۰ میلی‌گرم در لیتر استامینوفن مشاهده شد که علاوه بر تجمع سلول‌های قرمز خون در عروق کبدی، احتقان سینوزوئیدها و هسته پیکنوتیک در کبد دیده شد (شکل ۶). در روز چهاردهم بافت‌شناسی کبد گروه شاهد بافت‌شناسی طبیعی را نشان داد (شکل ۶-A). در دوره ۱۴ روزه مواجهه، ماهیان در معرض ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر استامینوفن

بافتی از جمله تجمع ملانوماکروفاژها، اتساع سینوزوئیدها، و تجمع سلول‌های خونی را نشان داد. مواجهه ماهیان با استامینوفن در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر به تجمع ملانوماکروفاژها، احتقان سینوزوئید و هسته پیکنوتیک پراکنده و واکنش‌های فزونی‌رنگی کمان مشاهده گردید.

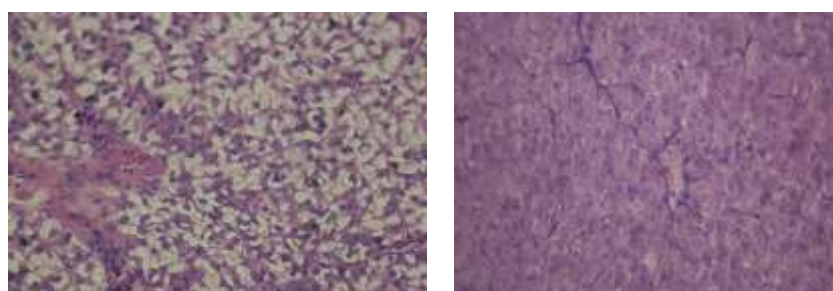
تغییرات آن‌چنانی که به‌عنوان ضایعات بافتی یا آسیب بافتی باشد، مشاهده نگردید. اما در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر مواجهه، ماهیان دچار شروع دژنراسیون سیتوپلاسمی اندک شدند و تجمع ملانوماکروفاژها در بافت کبد مشاهده شد (شکل ۶-B). کبد ماهیان قرار گرفته در معرض غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر استامینوفن ضایعات



شکل (۵) هیستوپاتولوژی آبشش بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در مواجهه با سطوح مختلف استامینوفن به همراه گروه شاهد. در تمامی اشکال فلش مشکی بیانگر چماقی شدن راس تیغه‌های آبششی و فلش قرمز رنگ نیز بیانگر وجود خمیدگی در تیغه ثانویه می‌باشد. شکل (A) آبشش تیمار شاهد با بزرگ‌نمایی (GB) ۴۰۰، شکل (B) آبشش تیمار غلظت ۰/۱ (تیمار اول) بزرگ‌نمایی ۴۰۰ خمیدگی تیغه ثانویه چماقی شدن راس تیغه، شکل (C) آبشش تیمار غلظت ۱۰ میلی‌گرم استامینوفن با بزرگ‌نمایی ۱۰۰، شکل (D) آبشش تیمار با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم با بزرگ‌نمایی ۴۰۰، شکل (E) آبشش تیمار با غلظت ۱ میلی‌گرم استامینوفن با بزرگ‌نمایی ۴۰۰، شکل (F) آبشش تیمار با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بزرگ‌نمایی ۴۰۰

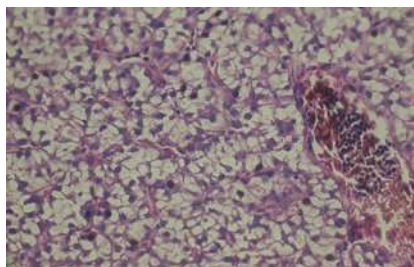


شکل ۶: هیستوپاتولوژی کبد بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در مواجهه با سطوح مختلف استامینوفن به همراه گروه شاهد. در تمامی اشکال فلش‌های مشکی بیانگر احتقان و جمع شدن خون در سینوزوئیدهای کبد می‌باشند. (A). تیمار شاهد بزرگ‌نمایی ۴۰۰ (B) کبد تیمار با غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر استامینوفن با بزرگ‌نمایی ۴۰۰. شکل (C). کبد تیمار با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر استامینوفن بزرگ‌نمایی ۴۰۰. شکل (D). کبد تیمار با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر استامینوفن بزرگ‌نمایی ۴۰۰. شکل (E). کبد تیمار غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر استامینوفن بزرگ‌نمایی ۴۰۰. شکل (F) کبد تیمار غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر استامینوفن با بزرگ‌نمایی ۱۰۰

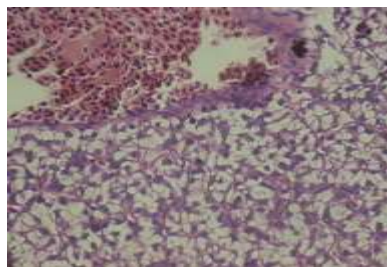


شکل ۸: تصویر پر خونی

شکل ۷: تصویر کبد طبیعی



شکل ۱۰: هسته‌های پیکنوتیک و شروع واکنش واکنش واکنش واکنش



شکل ۹: تجمع سلول‌های نکرولی و هسته پیکنوتیک

بحث

یکی از ابزارها، تجزیه اجزاء اصلی خون قند خون است که تاثیر عواملی مانند محیط، تغذیه، استرس و آلاینده‌ها را بر ماهی آشکار می‌سازد (۳۱). نتایج به‌دست آمده از اندازه‌گیری میزان غلظت گلوکز در سرم خون کاهش معنی‌داری را نشان داد به طوری که کم‌ترین میزان گلوکز اندازه‌گیری شده در تیمار ۵ و بیش‌ترین میزان آن در گروه شاهد ثبت گردید. ثابت شده است که دوزهای بالای استامینوفن توسط سیستم P-450 سیتوکروم به یک متابولیت سمی به نام ان-استیل پارابنزوکینون-ایمین (N-Acetyl-P-benzoquinoneimine [NAPQI]) تبدیل می‌گردد که این متابولیت با اتصال به گلوپروتئین به اسید مرکاپتوریک محلول در آب تبدیل و از طریق کلیه دفع می‌شود البته در مواردی که مقدار دارو زیاد باشد تولید بیش از حد متابولیدهای سمی سبب اتمام گلوپروتئین‌های در دسترس شده و در نهایت موجب نکرولی کبدی می‌گردد (۳۲، ۳۳). لذا آسیب کبدی طی قرار گرفتن در دوز بالای استامینوفن و هم‌چنین نقش کبد در تولید گلوکز بدن می‌توان علت احتمالی کاهش معنی‌دار گلوکز سرم خون را طی مواجهه بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با سطوح مختلف استامینوفن توجیه نمود. در همین راستا Remyła و همکاران، با بررسی تاثیر مواجهه با کلرید کادمیوم در ماهی کاتلا پرداخته و نشان دادند که میزان گلوکز سرم خون در ماهی کاتلا در مواجهه با کلرید کادمیوم کاهش معنی‌داری داشته است (۳۴)، که نتیجه حاصله با نتایج حاصل از مطالعه حاضر هم‌سو می‌باشد. لایوزیم و کمپلمان اندازه‌گیری شده نیز افزایش معنی‌داری را نشان داد به طوری که بیش‌ترین میزان فعالیت لایوزیم و کمپلمان اندازه‌گیری شده در تیمار ۵ و کم‌ترین میزان آن در گروه شاهد ثبت گردید با این حال غلظت مواجهه با داروی استامینوفن رابطه‌ای مستقیم با افزایش میزان فعالیت آنزیم لایوزیم و فعالیت کمپلمان نداشت به طوری که بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم لایوزیم در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر استامینوفن بود. نوع ماده آلاینده و حساسیت جانوران به آن‌ها نیز در میزان الفاء فعالیت آنزیم‌های ایمنی مثل لایوزیم مؤثر است. معمولاً در بررسی آلاینده‌ها

و تاثیر آن‌ها بر سیستم دفاعی و بافت هر دو روش حاد و مزمن استفاده می‌شود. افزایش معنی‌دار فعالیت لایوزیم و کمپلمان در سرم خون ماهیان قرار گرفته در معرض استامینوفن نشان‌دهنده افزایش شاخص‌های ایمنی خون در این بچه‌ماهیان می‌باشد. Kim و همکاران، در مطالعه‌ای نشان دادند که میزان کورتیزول خون و فعالیت لایوزیم سرم خون شب‌دیزماهی (*Anoplopoma fimbria*) که در مواجهه با آمونیاک در سطح ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر قرار گرفته بود به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش داشته است (۳۵). Wu و همکاران، گزارش کرده بودند که میزان فعالیت لایوزیم تیلاپپای در مواجهه با کادمیوم به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش داشته است (۳۶). سیستم کمپلمان نقش کلیدی در ایمنی غیراختصاصی دارد و در فاگوسیتوزیس، کموتاکسی و لیز سلولی دخالت دارد (۳۷). Bulut و همکاران، در مطالعه‌ای نشان دادند که مواجهه با دوز بالای فرمالین در محیط آبی قزل‌آلای رنگین‌کمان سبب افزایش معنی‌داری میزان فعالیت لایوزیم سرم خون در این ماهی شده است (۳۸). بررسی مطالعات هم‌راستا نشان داد نتایج به‌دست آمده با نتایج حاصل از آن‌ها هم‌سو می‌باشد که نشان‌دهنده صحت و سقم نتایج به‌دست آمده است. هورمون کورتیزول از جمله هورمون‌های مهم در پاسخ به تنش‌های استرسی، تنظیم اسمزی، سیستم ایمنی و رشد ماهیان می‌باشد که توسط قشر غده فوق کلیوی در غده آدرنال ترشح می‌شود (۳۹). نتایج به‌دست آمده از اندازه‌گیری میزان کورتیزول نشان داد که مواجهه با استامینوفن سبب کاهش معنی‌داری در میزان این هورمون در سرم خون بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان شده است. به طوری که بیش‌ترین میزان هورمون کورتیزول در گروه شاهد مشاهده و کم‌ترین میزان آن نیز در تیمار ۵، مشاهده و ثبت گردید. نکته جالب توجه در مطالعه حاضر کاهش معنی‌دار غلظت کورتیزول بدن بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان بعد از مواجهه با سطوح استامینوفن نسبت به گروه شاهد بود به طوری که با افزایش دوز میزان کورتیزول نیز بیش‌تر کاهش یافت. بر طبق مطالعات دیگر کاهش میزان کورتیزول نشان‌دهنده کاهش استرس و ایجاد تعادل فیزیولوژیک در بدن بوده و در رشد بیش‌تر ماهی مؤثر است (۴۰).

منابع

1. **FAO. 2018.** The State of World Fisheries and Aquaculture 2018. Meeting the sustainable development goals. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
2. **Saghaei, A., Ghotbeddin, N. and Ghatrami, E.R., 2015.** Evaluation of growth performance and body composition of Oscar fish (*Astronotus ocellatus*) in response to the consumption of dietary intake of garlic (*Allium sativum*). Bioflux Society. 8: 485-490.
3. **Dawood, M.A., Koshio, S. and Esteban, M.Á., 2018.** Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. Reviews in Aquaculture. 10(4): 950-974.
4. **Bottoni, P. and Caroli, S., 2018.** Presence of residues and metabolites of pharmaceuticals in environmental compartments, food commodities and workplaces: A review spanning the three-year period 2014-2016. Microchemical Journal. 136: 2-24.
5. **Balakrishna, K., Rath, A., Praveenkumarreddy, Y., Guruge, K.S. and Subedi, B., 2017.** A review of the occurrence of pharmaceuticals and personal care products in Indian water bodies. Ecotoxicology and environmental safety. 137: 113-120.
6. **Li, Y., Zhu, G., Ng, W.J. and Tan, S.K., 2014.** A review on removing pharmaceutical contaminants from wastewater by constructed wetlands: design, performance and mechanism. Science of the Total Environment. 468: 908-932.
7. **Patel, M., Kumar, R., Kishor, K., Mlsna, T., Pittman, Jr C.U. and Mohan, D., 2019.** Pharmaceuticals of emerging concern in aquatic systems: chemistry, occurrence, effects, and removal methods. Chemical reviews. 119(6): 3510-3673.
8. **Schafhauser, B.H., Kristofco, L.A., de Oliveira, C.M.R. and Brooks, B.W., 2018.** Global review and analysis of erythromycin in the environment: occurrence, bioaccumulation and antibiotic resistance hazards. Environmental pollution. 238: 440-451.
9. **Lehmborg, L.J. and Fung, C.V., 2010.** Benefits of music participation for senior citizens: A review of the literature. Music Education Research International. 4(1): 19-30.
10. **Adis, W., 2014.** McNeil, a Johnson & Johnson subsidiary FDA case study. Communications of the IIMA. 14(3): 2.
11. **David, A., Chaker, J., Léger, T., Al-Salhi, R., Dalgaard, M.D., Styrisshave, B., Bury, D., Koch, H.M., Jégou, B. and Kristensen, D.M., 2021.** Acetaminophen metabolism revisited using non-targeted analyses: Implications for human biomonitoring. Environment International. 149: 106388.
12. **Mazaleuskaya, L.L., Sangkuhl, K., Thorn, C.F., FitzGerald, G.A., Altman, R.B. and Klein, T.E., 2015.** PharmGKB summary: pathways of acetaminophen metabolism at the therapeutic versus toxic doses. Pharmacogenetics and genomics. 25(8): 416.
13. **Ramachandran, A. and Jaeschke, H., 2017.** Mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity and their translation to the human pathophysiology. Journal of clinical and translational research. 3(1): 157.
14. **Sattari, M., 2003.** Fisheries (2). Haghshenas Publications. 875 p. (In Persian)
15. **Adeli, A., Ghafari, T., Ojagh, S. and Vahedi, M., 2019.** An evaluating of factors affecting on purchase and sale trends in fish markets in ports of Guilan Province. Iranian Scientific Fisheries Journal. 28(3): 5-65. (In Persian)

آسیب‌شناسی بافت‌ها: ساختمان ظریف آبشش‌ها به‌روش‌های

مختلفی به ترکیبات شیمیایی پاسخ می‌دهد، که به نوع، شدت عامل و مدت زمان تماس بستگی دارد. در اکثر موارد ضایعات در میان کمان آبششی انتشار پیدا می‌کند، هرچند که عوامل اختصاصی روی سلول‌های خاصی اثر می‌کنند. در تحقیق حاضر مطالعه نشان داده شد که استامینوفن در مدت ۱۴ روز در غلظت‌های کم، متوسط و زیاد اثرات مختلف آسیب‌شناختی آشکاری بر بافت آبشش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان برجای گذاشت. خمیدگی و چماقی‌شکل شدن راس تیغه ثانویه آبشش از اثرات غلظت کم (۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر) استامینوفن بود. در غلظت متوسط (۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) هایپرپلازی، هایپرتروفی، چماقی‌شکل شدن راس تیغه ثانویه آبشش و جوش خوردگی تیغه ثانویه مشاهده شد. در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر استامینوفن علاوه بر هایپرپلازی و هایپرتروفی سلول‌های آبششی، کوتاهی و جوش خوردگی تیغه ثانویه، خمیدگی تیغه ثانویه، چماقی‌شکل شدن راس تیغه ثانویه آبشش و آنوريسم دیده شد. آبشش‌ها اولین اندامی هستند که پس از قرار گرفتن در معرض هرگونه ماده خارجی تحریک شده و عکس‌العمل دفاعی نشان می‌دهند (۴۱). ضایعه آبششی مشاهده شده در این مطالعه شامل هایپرپلازی، هایپرتروفی، چماقی شکل شدن راس تیغه ثانویه آبشش و جوش خوردگی تیغه ثانویه مشاهده شد. این سلول‌ها ترشح کننده موکوس بوده و به‌عنوان یک واکنش دفاعی در پاسخ به شرایط غیرمطلوب یا بهینه‌نبودن آب‌بروز می‌نمایند. بروز ضایعات آبششی فوق ارتباطی با تأثیر مواد دارویی مورد استفاده در مطالعه داشته زیرا در گروه شاهد هیچ عارضه‌ای مشاهده نگردید. کبد ماهیان قرارگرفته در معرض غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر استامینوفن ضایعات بافتی از جمله تجمع ملانوماکروفاژها، اتساع سینوزوئیدها و تجمع سلول‌های خونی را نشان داد. مواجهه ماهیان با استامینوفن در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر به تجمع ملانوماکروفاژها، احتقان سینوزوئید و هسته پیکنوتیک پراکنده و واکوئلاسیون در کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مشاهده گردید.

براساس نتایج به‌دست آمده غلظت بالای استامینوفن در محیط آبی بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان سبب مسمومیت ماهی با احتمال بروز آسیب آبششی و کبدی به ماهی می‌شود با این حال نتایج حاصل از بررسی شاخص‌های ایمنی خون نتایج عکس نتایج آسیب‌شناسی بافت را نشان می‌داد به‌طوری‌که در تیمارهای مواجه شده با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر استامینوفن کاهش معنی‌دار کورتیزول و افزایش معنی‌دار شاخص فعالیت کمپلمان و لیوزیم مشاهده شد که نشان دهنده افزایش سیستم ایمنی در این ماهی می‌باشند.

32. He, G.L., Feng, L., Cai, L., Zhou, C.J., Cheng, Y., Jiang, Z.S., Pan, M.X. and Gao, Y., 2017. Artificial liver support in pigs with acetaminophen-induced acute liver failure. *World journal of gastroenterology*. 23(18): 3262.
33. Eguia, L. and Materson, B.J., 1997. Acetaminophen related acute renal failure without fulminant liver failure. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 17(2): 363-370.
34. Remya, S.R., Ramesh, M., Sajwan, K.S. and Kumar, K.S., 2008. Influence of zinc on cadmium induced haematological and biochemical responses in a freshwater teleost fish *Catla catla*. *Fish physiology and biochemistry*. 34(2): 169.
35. Kim, J.H., Park, H.J., Hwang, I.K., Han, J.M., Kim, D.H., Oh, C.W., Lee, J.S. and Kang, J.C., 2017. Toxic effects of juvenile sablefish, *Anoplopoma fimbria* by ammonia exposure at different water temperature. *Environmental toxicology and pharmacology*. 54: 169-176.
36. Wu, S.M., Shih, M.J. and Ho, Y.C., 2007. Toxicological stress response and cadmium distribution in hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.) upon cadmium exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 145(2): 218-226.
37. Magnadóttir, B., Lange, S., Gudmundsdóttir, S., Børgwald, J. and Dalmo, R.A., 2005. Ontogeny of humoral immune parameters in fish. *Fish & Shellfish Immunology*. 19(5): 429-439.
38. Bulut, C., Kubilay, A., Akçimen, U. and Ceylan, M., 2012. The effects on cortisol, glucose and lysozyme activity in different concentration of formaldehyde in rainbow trout. *Journal of Fisheries Sciences*. 6(4): 321-330.
39. Pankhurst, N.W., 2016. Reproduction and Development. In: Schreck, C.B., Tort, L., Farrell, A.P. and Brauner, C.J., (Eds.), *Biology of Stress in Fish*. *Fish Physiology*. Academic Press. 35: 295-331.
40. Das, C., Thraya, M. and Vijayan, M.M., 2018. Nongenomic cortisol signaling in fish. *General and comparative endocrinology*. 265: 121-127.
41. Afzali, F., Sharifpour, A., Soltani, M. and Abtahi, B., 1389. Investigation of tissue changes in the liver, kidneys and gills of rainbow trout caused by bathing with an antiseptic agent. *Journal of Renewable Natural Resources Research*. 1: 64-71.
16. Dawood, M.A., 2021. Nutritional immunity of fish intestines: Important insights for sustainable aquaculture. *Reviews in Aquaculture*. 13(1): 642-663.
17. Syahidah, A., Saad, C.R., Daud, H.M. and Abdelhadi, Y.M., 2015. Status and potential of herbal applications in aquaculture: A review. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 14(1): 27-44. (In Persian)
18. Sayadi, M.H., Trivedy, R.K. and Pathak, R.K., 2010. Pollution of pharmaceuticals in environment. I *Control Pollution*. 26(1): 89-94.
19. Kristensen, D.M., Mazaud-Guittot, S., Gaudriault, P., Lesné, L., Serrano, T., Main, K.M. and Jégou, B., 2016. Analgesic use- prevalence, biomonitoring and endocrine and reproductive effects. *Nature Reviews Endocrinology*. 12(7): 381-393.
20. Hudec, R., Božeková, L. and Tisoňová, J., 2012. Consumption of three most widely used analgesics in six European countries. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*. 37(1): 78-80.
21. Folarin, O.S., Otitololu, A.A. and Amaeze, N.H., 2018. Comparative ecotoxicological assessment of acetaminophen and diclofenac using freshwater African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*. 22(9): 1519-1525.
22. Erhunmwunse, N.O., Tongo, I. and Ezemonye, L.I., 2021. Acute effects of acetaminophen on the developmental, swimming performance and cardiovascular activities of the African catfish embryos/larvae (*Clarias gariepinus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 208: 111482.
23. Hedayati, A., Jahanbakhshi, A. and Qaderir Mazi, F., 2014. *Aquatic toxicology*. First Edition, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources Publications, Gorgan, Iran. 210 p. (In Persian)
24. Sarhadi, I., Alizadeh Doughikollae, E., Ahmadifar, E. and Adineh, H., 2019. Effect of dietary supplementation of *Artemisia annua* extract on some hematological and serum biochemical parameters of common carp (*Cyprinus carpio*). *Iranian Scientific Fisheries Journal*. 28(2): 1-11 (In Persian)
25. Teuscher, A. and Richterich, R., 1971. Determination of plasma glucose by hexokinase-glucose-6-phosphate dehydrogenase method. *Schweiz Med Wochenschr*. 101(11): 390-398. (In German)
26. Ellis, A.E., 1990. *Lysozyme Assays. Techniques in Fish Immunology*. 101-103.
27. Whaley, K. and North, J., 1997. Haemolytic assays for whole complement activity and individual components. *Complement: A Practical Approach*. 1: 19-47.
28. Amar, E.C., Kiron, V., Satoh, S., Okamoto, N. and Watanabe, T., 2000. Effects of dietary β -carotene on the immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fisheries Science*. 66: 1068-1075.
29. Bakhshi, F., Najdegerami, E., Manaffar, R., Tokmechi, A., Rahmani Farah, K. and Shalizer Jalali, A., 2018. Growth performance, haematology, antioxidant status, immune response and histology of common carp (*Cyprinus carpio* L.) fed biofloc grown on different carbon sources. *Aquaculture Research*. 49(1): 393-403.
30. Pourmoghim, H., Ghaffarpour, Gh.H. and Malboobi, J., 2003. HLA-B5 antigen in Iranian patients with Behcet's disease: A case-control study. *Iranian Journal of Dermatology*. 6(3): 4-7.
31. Yousefian, M., Sheikholeslami, A. and Kor Davood, M., 2011. Serum biochemical parameter of male, immature and female Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). *Aust J Basic Appl Sci*. 5(5): 476-481.