اثر افزودن تیمول به آب بر شاخص‌های خون‌شناسی و ایمنی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در دوره حمل و نقل

سید سعید میرزرگر*[1]، علی طاهری میرقائد[1]، سید مرتضی حسینی[2]، ملیکا قلیچ‌پور[1]، مهسا شهبازی[1]، مرتضی یوسفی[3]

[1]گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

[2]مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آبهای داخلی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران.

[3]گروه دامپزشکی، دانشگاه RUND، مسکو، روسیه.

*نویسنده مسئول: zargarm@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۳/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۵/۷

چکیده

تاکنون اسانس‌های گیاهی متفاوتی در حمل‌ونقل ماهی‌ها استفاده شده است که نتایج متناقضی از نظر آرام‌بخشی و کاهش استرس حمل داشته‌اند. در مطالعه حاضر از تیمول که یک ترکیب فنولی دارای اثرات آرام‌بخشی می‌باشد، در حمل کپورهای معمولی استفاده شده است. به این منظور غلظت‌های صفر (گروه شاهد)، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر تیمول به کیسه های پلاستیکی حمل ماهی اضافه و ماهی‌ها به مدت ۳ ساعت حمل شدند. سپس بلافاصله از هر پلاستیک دو قطعه ماهی به طور تصادفی صید و نمونه خون آن‌ها از ورید دمی گرفته شد. تعداد گلبول‌های قرمز و سفید، میزان هموگلوبین (Hb)، MCV، MCH، MCHC، درصد هماتوکریت (HTC)، نوتروفیل، مونوسیت و ائوزینوفیل اندازه‌گیری شد. همچنین میزان فعالیت کمپلمان، لیزوزیم و ایمنوگلوبولین کل مشخص گردید. نتایج نشان داد تعداد گلبول-های قرمز، MCV، MCH، MCHC، درصد مونوسیت و ائوزینوفیل خون پس‌از حمل‌ونقل تفاوت معنی‌داری در گروه‌های حاوی و فاقد تیمول نداشتند. کم‌ترین مقدار هموگلوبین و هماتوکریت خون در تیمار تیمول ۵ میلی‌گرم بود. تعداد گلبول سفید و درصد نوتروفیل‌ها و لنفوسیت‌ها، اینوگلوبولین، لیزوزیم و کمپلمان پلاسما در گروه ۵ میلی‌گرم تیمول تفاوتی با گروه شاهد نداشت. اما تعداد گلبول سفید، نوتروفیل، لیزوزیم و کمپلمان در گروه ۱۰ میلی‌گرم تیمول به‌طور معنی داری بیشتر از گروه شاهد بود. همچنین درصد لنفوسیت‌ها در این گروه کمتر از گروه شاهد بود. به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت افزودن ۵ میلی‌گرم و ۱۰ میلی‌گرم تیمول در هر لیتر آب حمل‌ونقل ماهی کپور معمولی به‌ترتیب باعث کاهش و افزایش استرس حمل‌ونقل می‌شود.

واژگان کلیدی: کپورمعمولی، حمل و نقل، استرس، تیمول.

مقدمه

حمل‌ونقل باعث ایجاد استرس در ماهی و تغییر در پارامترهای کیفی آب می‌شود. یکی از روش‌های حمل ماهی استفاده از کیسه‌های پلاستیکی حاوی آب و اکسیژن خالص است (Carneiro and Urbinati, 2001)، اما این نوع حمل‌ونقل اثرات منفی بر سلامت ماهی دارد. به‌عنوان مثال، آمونیاک آب را افزایش می‌دهد، پی‌اچ و اکسیژن محلول آب را کاهش می-دهد (Parodi *et al*., 2014) و پاسخ‌های استرسی مانند افزایش سطح کورتیزول، گلوکز و گلبول‌های خون را ایجاد می‌کند (Taheri Mirghaed and Ghelichpour, 2019). استرس نیز باعث سرکوب سیستم ایمنی ماهی و حساسیت در برابر بیماری‌ها می‌شود (Tort, 2011). با توجه به موارد فوق، کنترل کیفیت آب و پاسخ‌های استرس و ایمنی ماهی در هنگام حمل‌ونقل ضروری است. غلظت کم داروهای بیهوشی فعالیت بدنی ماهی را کاهش می‌دهد و بنابراین می‌تواند استرس را در حین حمل‌ونقل کاهش دهد (Becker *et al*., 2012; Parodi *et al*., 2014; Zeppenfeld *et al*., 2014). برای دستیابی

به مزایای استفاده از مواد بیهوش‌کننده در حین حمل ماهی، روش استفاده از آن‌ها باید بهینه‌سازی شود. در این خصوص، اختلافات بین گونه‌ای، نوع و غلظت ماده بیهوش‌کننده عوامل مهمی هستند. نتایج مثبت و منفی استفاده از بیهوشی در خلال حمل ماهی ارائه شده است. به‌عنوان مثال، استفاده از اسانس یا عصاره *Lippia alba* (Azambuja *et al*., 2011)، *Aloysia triphylla* (Zeppenfeld *et al*., 2014) و *Candalia buxifolia* (Salbego *et al*., 2015) در حین حمل‌ونقل به‌طور قابل توجهی استرس و شرایط اکسیداتیو را در گربه‌ماهی (*Rhamdia quelen*) کاهش داده است. از طرف دیگر، استفاده از اسانس *Aloysia gratissima* و *Ocimum gratissimum* در ماهی کفشک (*Paralichthys orbignyanus*) (Benovit *et al*., 2012) و لینالول در کپور معمولی (Mazandarani *et al*., 2017) باعث تشدید استرس در ماهی در خلال حمل شده است. چنین تناقضاتی نشان می‌دهند که برای بهینه-سازی استفاده از داروهای بیهوشی در حین حمل-ونقل ماهی، اثرات داروهای بیهوشی مختلف در گونه-های مختلف ماهی باید بررسی شود.

تیمول یک ترکیب فنلی است که در برخی از گونه‌های گیاهی از جمله *Thymus vulgaris* و *Origanum heracleoticum* یافت می‌شود (Yousefi *et al*., 2018). تیمول اثرات مفیدی روی ماهی دارد. به‌عنوان مثال، استفاده از تیمول در جیره غذایی گربه ماهی (*R. quelen*) رشد، فعالیت آنتی-اکسیدانی و همچنین مقاومت به بیماری در را بهبود می‌بخشد (Bianchini *et al*., 2017). از طرف دیگر، تیمول دارای خاصیت بیهوشی در ماهی است (Aydın and Barbas, 2020). تیمول با غلظت ۱۵۰-۲۵ میلی‌گرم در لیتر ماهی کپور معمولی را بیهوش می‌کند و سیستم آنتی‌اکسیدانی این گونه را بهبود می‌بخشد (Yousefi *et al*., 2018). با این حال، هیچ داده‌ای در مورد اثرات مفید بالقوه تیمول بر ماهی در هنگام حمل‌ونقل وجود ندارد. بنابراین در این تحقیق اثر افزودن تیمول به آب بر شاخص‌های خون‌شناسی و ایمنی ماهی کپور معمولی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از ۲۴۰ قطعه ماهی کپور معمولی ۵۰ گرمی استفاده شد. ماهیان با تراکم بیست قطعه در ۱۲ تانک ۳۰۰ لیتری حاوی ۱۵۰ لیتر آب قرار داده شدند. ماهی‌ها به‌مدت ۲۰ روز به‌منظور سازگاری در این تانک‌ها نگه‌داری و دو نوبت در هر روز با غذای تجاری کپور (شرکت ۲۱ بیضا) به میزان ۲٪ تغذیه شدند.

بعد از گذشت بیست روز، ماهیان صید و در پلاستیک حمل‌ونقل حاوی ۴ لیتر آب و ۸ لیتر اکسیژن خالص قرار داده شدند. سپس پلاستیک‌ها به چهار گروه تقسیم و به‌ترتیب به آن‌ها صفر میلی‌گرم تیمول (گروه شاهد)، ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر تیمول (گروه تیمول ۲/۵)، ۵ میلی‌گرم در لیتر تیمول (گروه تیمول ۵) و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر تیمول (گروه تیمول ۱۰) اضافه شد. درب پلاستیک‌ها بسته شده و به‌مدت ۳ ساعت حمل شدند. پس از حمل، از هر پلاستیک ۲ ماهی صید شده و خون‌گیری شد. به‌منظور خون-گیری از ماهی‌ها، بیهوشی با یوجینول به‌میزان ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر انجام شد. خون‌گیری (حدود ۱/۵ میلی‌لیتر) از ورید دمی توسط سرنگ انجام شد و نمونه‌های خون در لوله هپارینه جمع‌آوری شدند. بخشی از خون بلافاصله برای مطالعات خون‌شناسی استفاده شد. مابقی آن نیز سانتریفیوژ گردید (۷۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۷ دقیقه) و پلاسمای آن به-منظور بررسی شاخص‌های ایمنی مورد استفاده قرار گرفت.

تعداد گلبول‌های قرمز و سفید با استفاده از لام نئوبار و محلول رقیق‌کننده دایس انجام شد. شمارش افتراقی گلبول‌های سفید پس از تهیه لام و رنگ-آمیزی با گیمسا انجام شد (Blaxhall and Daisley, 1973). هماتوکریت با استفاده از روش

میکروهماتوکریت و سانتریفیوژ و هموگلوبین با استفاده از کیت تجاری زیست‌شیمی اندازه‌گیری گردید (Blaxhall and Daisley, 1973). حجم متوسط گلبول قرمز (MCV)، هموگلوبین متوسط گلبول قرمز (MCH) و غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MCHC) بر اساس فرمول‌های مربوطه محاسبه شدند (Seiverd, 1964).

اندازه‌گیری فعالیت لیزوزیم پلاسما به‌روش کدورت‌سنجی انجام شد (Ellis, 1990). به این منظور از باکتری *Micrococcus lysodeikticus* سوسپانسیون شده در بافر فسفات سدیم ۰/۰۵مولار (پی اچ = ۶/۲) با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم باکتری در هر میلی‌لیتر استفاده شد. ۵۰ میکرولیتر پلاسما و ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتریایی را در یک میکروتیوب ریخته و مخلوط گردید. مخلوط را در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده و جذب نوری پس از ۰/۵ و ۶ دقیقه در طول موج ۵۳۰ نانومتر قرائت شد.

اندازه‌گیری فعالیت کمپلمان به‌روش همولیتیک انجام شد (Yano, 1992). به این منظور از گلبول قرمز گوسفند به‌عنوان هدف استفاده شد. گلبول قرمز دفیبرینه خریداری شده از شرکت داروا‌ش (ایران) استفاده شده و با نسبت ۱ به۱ (گلبول به بافر) در میکروتیوب حاوی بافر ورونال-ژلاتین-EGTA-منیزیوم (بافر باربیتال با پی اچ۷/۷-۳/۴ +۱۰ میلی مول EGTA + ۱۰ میلی‌مول $MgCl_2$ + ۰/۱ درصد ژلاتین) ریخته شد. خون سه بار با این بافر شسته شده و در نهایت با غلظت ۲×۱۰^{۸} سلول در میلی‌لیتر در این بافر نگهداری شد. ۶ غلظت مختلف (۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۳ درصد) از هر نمونه پلاسما با استفاده از بافر ورونال-ژلاتین آماده شد. ۱۲۵ میکرولیتر از هر یک از غلظت‌ها در یک تیوب جداگانه ریخته شد. به هر تیوب ۵۰ میکرو لیتر گلبول قرمز اضافه گردید. سپس تیوب‌ها به‌مدت ۱۲۰ دقیقه در دمای ۲۰ درجه قرار داده شدند. پس از این مدت به تیوب‌ها ۱/۵۷۵میلی‌لیتر بافر ورونال حاوی۱۰ میلی‌مول EDTA و ۰/۱ درصد ژلاتین اضافه کرده تا فعالیت همولیتیک متوقف گردد. بعد جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۱۴ نانومتر قرائت شد و فعالیت کمپلمان براساس روش Yano (۱۹۹۲) محاسبه شد.

جهت اندازه‌گیری ایمونوگلبولین کل از روش ترسیبی استفاده‌شد (Siwicki, 1993). ابتدا میزان پروتئین پلاسما به‌روش بیورت اندازه‌گیری شد. سپس به ۱۰۰میکرولیتر پلاسما ۱۰۰ میکرولیتر پلی‌اتیلن-گلایکول ۱۲ درصد اضافه شد و نمونه‌ها به‌مدت ۲ ساعت و به‌صورت مداوم در دمای اتاق توسط دستگاه شیکر مخلوط شدند. غلظت پروتئین در قسمت بالایی محلول مجددا توسط روش بیورت اندازه‌گیری شد. غلظت ایمونوگلبولین‌ها از تفریق غلظت پروتئین در نمونه اولیه و غلظت پروتئین پس از افزودن پلی‌اتیلن-گلایکول به‌دست آمد.

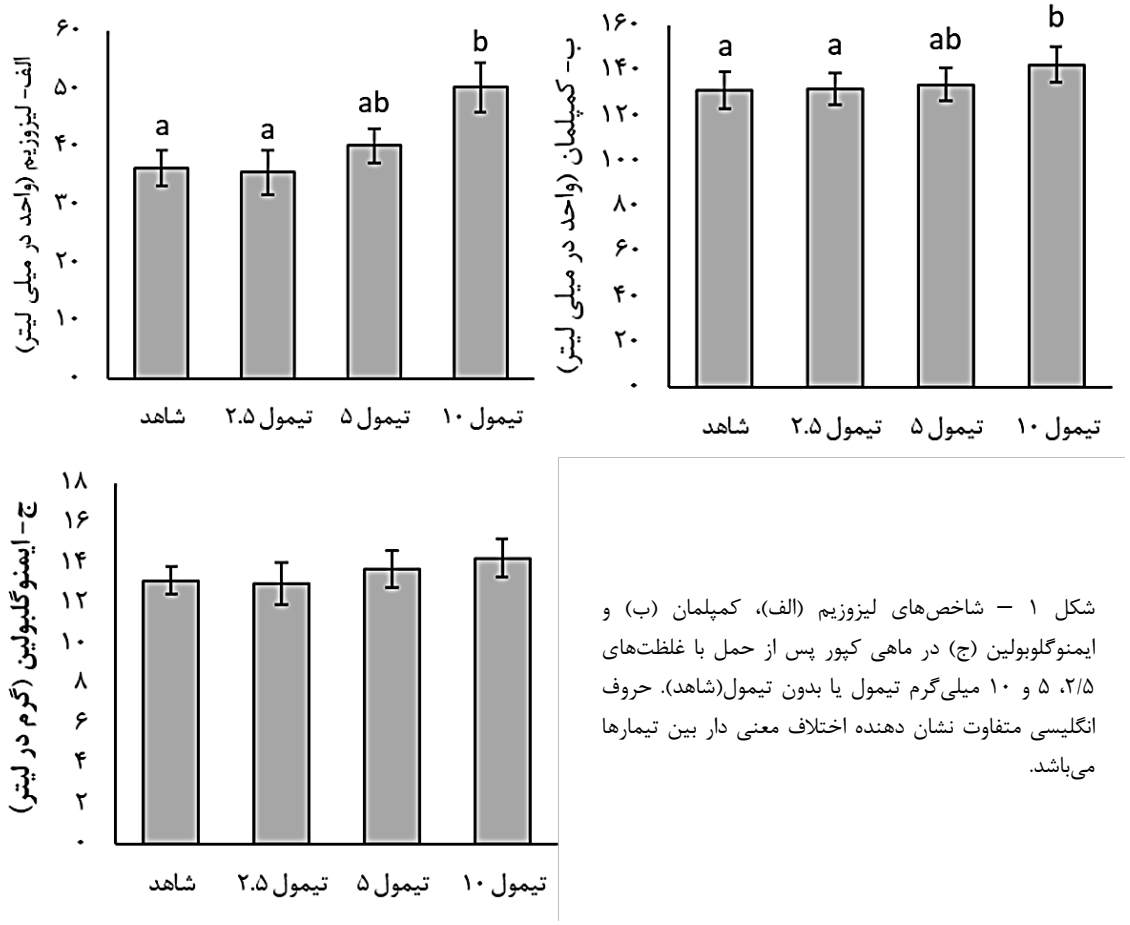
تجزیه و تحلیل آماری: داده‌ها با استفاده از آزمون One-way ANOVA آنالیز شده تا اثر تیمول بر آن‌ها مشخص گردد. در صورت معنی‌دار بودن اثر تیمول، مقایسه بین تیمارها با استفاده از آزمون Duncan انجام شد. سطح معنی‌داری معادل ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. کلیه آنالیزها در نرم افزار SPSS v.22 انجام گردید.

نتایج

اختلاف معنی‌داری در تعداد گلبول‌های قرمز، MCV، MCH، MCHC، درصد مونوسیت و ائوزینوفیل خون بین تیمارهای آزمایشی پس از حمل‌ونقل مشاهده نشد (جدول ۱). کمترین مقدار هموگلوبین و هماتوکریت خون در تیمار تیمول ۵ مشاهده شد که به‌طور معنی‌داری کمتر از تیمار شاهد و تیمول ۱۰ بود. بیشترین تعداد گلبول سفید و درصد نوتروفیل‌ها و کمترین درصد لنفوسیت‌ها در تیمار تیمول ۱۰ مشاهده شد که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار داشت. ولی تعداد گلبول سفید، درصد نوتروفیل‌ها و درصد لنفوسیت‌ها بین تیمارهای شاهد، تیمول ۲/۵ و

جدول ۱ – شاخص‌های خون‌شناسی کپور معمولی پس از حمل‌ونقل با غلظت‌های ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم تیمول یا بدون تیمول (شاهد). حروف انگلیسی متفاوت در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می باشد.

شاخص‌های خون‌شناسی	شاهد	تیمول ۲/۵	تیمول ۵	تیمول ۱۰
تعداد گلبول قرمز (میلیون سلول در میلی‌متر مکعب)	۱/۲۸ ± ۰/۰۵	۱/۲۶ ± ۰/۰۷	۱/۱۹ ± ۰/۰۸	۱/۲۷ ± ۰/۰۸
هموگلوبین (میلی گرم در دسی لیتر)	۷/۵۰ ± ۰/۳۳ b	۷/۲۷ ± ۰/۴۵ ab	۶/۸۲ ± ۰/۲۹a	۷/۳۲ ± ۰/۴۱ b
هماتوکریت (درصد)	۴۵/۳ ± ۳/۰۲b	۴۱/۸ ± ۲/۸۶b	۳۸/۵ ± ۱/۸۷a	۴۱/۵ ± ۱/۸۷b
MCV (فمتولیتر)	۳۳۸ ± ۱۶/۲	۳۳۱ ± ۹/۵۲	۳۲۳ ± ۸/۷۱	۳۲۸ ± ۱۱/۵
MCH (پیکوگرم)	۴۸/۵ ± ۱/۸۹	۵۷/۶ ± ۱/۴۳	۷۵/۳ ± ۱/۸۳	۵۷/۶ ± ۰/۶۸
MCHC (میلی‌گرم در دسی لیتر)	۱۷/۲ ± ۰/۶۲	۱۷/۴ ± ۰/۷۹	۱۷/۷ ± ۰/۲۷	۱۷/۶ ± ۰/۶۵
تعداد گلبول سفید (سلول در میلی‌متر مکعب)	۴۱۱۷ ± ۶۴۳ a	۴۰۵۰ ± ۵۸۲ a	۴۰۵۰ ± ۵۱۷a	۵۶۷۵ ± ۸۶۴b
نوتروفیل (درصد)	۱۱/۷ ± ۱/۰۳a	۱۱/۸ ± ۱/۱۷a	۱۲/۵ ± ۰/۵۵ a	۱۴/۸ ± ۰/۹۸b
لنفوسیت (درصد)	۸۳/۸ ± ۱/۹۴ b	۸۳/۵ ± ۲/۲۶b	۸۱/۸ ± ۱/۱۷b	۷۹/۷ ± ۱/۰۳a
مونوسیت (درصد)	۴/۰۰ ± ۰/۸۹	۴/۰۰ ± ۰/۸۹	۴/۱۷ ± ۰/۷۵	۴/۸۳ ± ۰/۷۵
ائوزینوفیل (درصد)	۰/۵۰ ± ۰/۵۵	۰/۸۳ ± ۰/۴۱	۱/۵۰ ± ۰/۵۵	۰/۶۷ ± ۰/۵۲



شکل ۱ – شاخص‌های لیزوزیم (الف)، کمپلمان (ب) و ایمنوگلوبولین (ج) در ماهی کپور پس از حمل با غلظت‌های ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم تیمول یا بدون تیمول(شاهد). حروف انگلیسی متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارها می‌باشد.

تیمول ۵ اختلاف معنی‌داری نداشتند (جدول ۱).

حمل‌ونقل اثر معنی‌داری بر غلظت ایمنوگلبولین پلاسما در تیمارهای مختلف نداشت (شکل ۱). تیمار تیمول ۱۰ بیشترین مقدار لیزوزیم و کمپلمان پلاسما پس از حمل‌ونقل را داشت که با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشت. ولی تیمارهای تیمول ۲/۵ و تیمول ۵ اختلاف معنی‌داری را با تیمار شاهد در این شاخص‌ها نشان ندادند (شکل ۱).

بحث

شاخص‌های خون‌شناسی یکی از مهم‌ترین ابزارهای ارزیابی سلامت و استرس در ماهی هستند (Clauss

et al., 2008). در خلال استرس، نیاز به دریافت اکسیژن و دفع دی‌اکسیدکربن در ماهی افزایش یافته و به همین دلیل نیاز است که ماهی ظرفیت تبادل گاز خود را افزایش دهد. به این منظور، افزایش هموگلوبین و هماتوکریت خون یکی از شایع‌ترین پاسخ‌های استرس در ماهی‌ها هستند (Fazio, 2019). در این تحقیق کمترین افزایش میزان هموگلوبین و هماتوکریت در تیمار تیمول ۵ مشاهده شد که نشان‌دهنده استرس کمتر در این تیمار است. این یافته‌ها با نتایج تحقیق Chagas و همکاران (۲۰۱۲) همخوانی دارد؛ به‌طوری‌که آن‌ها نشان دادند حمل‌ونقل ماهی *Colossoma macropomum* باعث افزایش هموگلوبین خون می‌شود. همچنین، Santos و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که افزودن عصاره درخت چای به آب حمل‌ونقل ماهی *C. macropomum* باعث کاهش هموگلوبین خون می‌شود. در بررسی Boaventura و همکاران (۲۰۲۱) نیز افزودن اسانس *O. gratissimum* به میزان ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر موجب کاهش هموگلوبین خون ماهی *Lophiosilurus alexandri* پس از حمل شده است. اما در مطالعه Ferreira و همکاران (۲۰۲۱) غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر از *O. gratissimum* در حمل تیلاپیای نیل باعث کاهش هماتوکریت بلافاصله پس از حمل شد.

گلبول‌های سفید خون نقش مهمی در ایمنی ذاتی ماهی بازی می‌کنند؛ زیرا آن‌ها نقش‌های ایمنی متنوعی در بدن دارند. گلبول‌های سفید در فعالیت بیگانه‌خواری، تولید آنتی‌بادی، تولید مواد ضدباکتریایی و ... نقش دارند (Miller *et al*., 1998). به همین دلیل یکی از ابزارهای مناسب جهت ارزیابی ایمنی ماهی هستند. استرس باعث تغییر در تعداد و ترکیب گلبول‌های سفید خون ماهی می‌شود (Barton, 2002). معمولا استرس‌های کوتاه‌مدت باعث افزایش تعداد گلبول‌های سفید و درصد نوتروفیل‌ها و کاهش درصد لنفوسیت‌ها می‌شوند (Barton, 2002). این پاسخ باعث می‌شود که بدن در حالت ایمنی فعال قرار گرفته و از بروز عفونت‌های ناشی از عوامل بیماریزای فرصت طلب جلوگیری می‌کند. در راستای این نتایج، Ellsaesser و Clem (۱۹۸۶) و Ainsworth و همکاران (۱۹۹۱) گزارش نمودند که حمل‌ونقل گربه‌ماهی کانال منجربه کاهش درصد لنفوسیت‌ها و افزایش درصد نوتروفیل‌ها می‌شود. Sutthi و Van Doan (۲۰۲۰) نیز نشان دادند که حمل‌ونقل ماهی تیلاپیای نیل منجربه کاهش درصد لنفوسیت‌ها می‌شود. براساس نتایج این تحقیق می‌توان گفت که تیمار تیمول ۱۰ استرس بیشتری نسبت‌به سایر تیمارها تجربه نموده که منجربه تغییر در ترکیب گلبول‌های سفید خون شده است.

شاخص‌های ایمنی خونی معیارهای مناسبی از وضعیت ایمنی، استرس و سلامت ماهی هستند (Katzenback, 2015). لیزوزیم یک آنزیم ضدباکتریایی است که توسط نوتروفیل‌ها ترشح می‌شود و باعث تخریب ساختار دیواره باکتری‌ها می‌شود (Watts *et al*., 2001). پروتئین‌های کمپلمان نقش مهمی در لیز کردن سلول‌های بیگانه دارند و در کبد ساخته می‌شوند (Nakao *et al*., 2011). ایمنوگلبولین‌ها توسط لنفوسیت‌ها ترشح شده و در ایجاد حافظه ایمنی نقش دارند (Salinas *et al*., 2011). پاسخ شاخص‌های ایمنی خونی به استرس به شرایط آزمایشگاهی و نوع استرس بستگی دارد. به‌عنوان مثال حمل‌ونقل ماهی کپور با تراکم ۱۶۰ گرم در لیتر به‌مدت ۵ ساعت منجربه کاهش معنی‌دار لیزوزیم، کمپلمان و توتال ایمنوگلبولین خون شد (Taheri Mirghaed and Ghelichpour, 2019). ولی حمل‌ونقل همین گونه با تراکم ۱۰۰ گرم در لیتر به‌مدت ۴ ساعت منجربه افزایش لیزوزیم و کمپلمان شد و اثری بر ایمنوگلبولین نداشت (Hoseini *et al*., 2019). بر این اساس می‌توان گفت که افزایش لیزوزیم و کمپلمان در تیمار تیمول ۱۰ نشان‌دهنده افزایش استرس در این تیمار است. در نهایت براساس نتایج این تحقیق می‌توان گفت که افزودن ۵ میلی‌گرم تیمول در آب حمل‌ونقل ماهی کپور معمولی

باعث کاهش استرس حمل‌ونقل می‌شود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مرکز مطالعات و همکاریهای علمی بین المللی (CISSC) وزارت علوم، تحقیقات و فنآوری کشور به انجام رسیده است

منابع

Ainsworth A.J., Dexiang C., Waterstrat P. R. 1991. Changes in peripheral blood leukocyte percentages and function of neutrophils in stressed channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health* 3, 41-47.

Aydın B., Barbas L. A. L. 2020. Sedative and anesthetic properties of essential oils and their active compounds in fish: A review. *Aquaculture* 520, 734999.

Azambuja C.R., Mattiazzi J., Riffel A.P.K., Finamor I.A., de Oliveira Garcia L., Heldwein C.G., Llesuy S. F. 2011. Effect of the essential oil of *Lippia alba* on oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) subjected to transport. *Aquaculture* 319, 156-161.

Barton B.A. 2002. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology 42*, 517-525.

Becker A.G., Parodi T.V., Heldwein C.G., Zeppenfeld C.C., Heinzmann B.M., Baldisserotto B. 2012. Transportation of silver catfish, *Rhamdia quelen*, in water with eugenol and the essential oil of *Lippia alba*. *Fish Physiology and Biochemistry* 38, 789-796.

Benovit S.C., Gressler L.T., de Lima Silva L., de Oliveira Garcia L., Okamoto M.H., dos Santos Pedron J., Baldisserotto B. 2012. Anesthesia and transport of Brazilian flounder, *Paralichthys orbignyanus*, with essential oils of *Aloysia gratissima* and *Ocimum gratissimum*. *Journal of the World Aquaculture Society* 43, 896-900.

Bianchini A.E., Garlet Q.I., Da Cunha J.A., Bandeira Junior G., Brusque I.C.M., Salbego J., Baldisserotto B. 2017. Monoterpenoids (thymol, carvacrol and S-(+)-linalool) with anesthetic activity in silver catfish (*Rhamdia quelen*): evaluation of acetylcholinesterase and GABAergic activity. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 50(12).

Blaxhall P. C., Daisley K. W. 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology* 5, 771-781.

Boaventura T.P., Souza C.F., Ferreira A L., Favero G.C., Baldissera M.D., Heinzmann B.M., Luz R.K. 2021. The use of *Ocimum gratissimum* L. essential oil during the transport of *Lophiosilurus alexandri*: water quality, hematology, blood biochemistry and oxidative stress. *Aquaculture* 531, 735964.

Carneiro P.C.F., Urbinati E.C. 2001. Salt as a stress response mitigator of matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther), during transport. *Aquaculture Research* 32, 297-304.

Chagas E.C., de Araújo L.D., Boijink C.D.L., Inoue L.A.K.A., Gomes L.D.C., Moraes F.R. 2012. Tambaqui responses to stress due to transport after feeding with β-glucan supplemented diets. *Biotemas* 25, 221-227.

Clauss T.M., Dove A.D., Arnold J.E. 2008. Hematologic disorders of fish. *Veterinary Clinics of North America: Exotic animal practice* 11, 445-462.

Ellis A.E. 1990. Lysozyme assays. *Techniques in Fish Immunology* 1, 101-103.

Ellsaesser C.F., Clem L.W. 1986. Haematological and immunological changes in channel catfish stressed by handling and transport. *Journal of Fish Biology* 28, 511-521.

Fazio F. 2019. Fish hematology analysis as an important tool of aquaculture: a review. *Aquaculture* 500, 237-242.

Ferreira A.L., Favero G.C., Boaventura T.P., de Freitas Souza C., Ferreira N.S., Descovi S.N., Luz R.K. 2021. Essential oil of *Ocimum gratissimum* (Linnaeus, 1753): efficacy for anesthesia and transport of *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiology and Biochemistry* 47, 135-152.

Hoseini S.M., Yousefi M., Hoseinifar S.H., Van Doan H. 2019. Cytokines' gene expression, humoral immune and biochemical responses of common carp (*Cyprinus carpio*, Linnaeus, 1758) to transportation density and recovery in brackish water. *Aquaculture* 504, 13-21.

Katzenback B.A. 2015. Antimicrobial peptides as mediators of innate immunity in

teleosts. *Biology* 4, 607-639.

Mazandarani M., Hoseini S.M., Dhegihan Ghomshani M. 2017. Effects of linalool on physiological responses of *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) and water physico-chemical parameters during transportation. *Aquaculture Research* 48, 5775-5781.

Miller N., Wilson M., Bfufltén E., Stuge T., Warr G., Ciem W. 1998. Functional and molecular characterization of teleost leukocytes. *Immunological Reviews* 166, 187-197.

Nakao M., Tsujikura M., Ichiki S., Vo T.K., Somamoto T. 2011. The complement system in teleost fish: progress of post-homolog-hunting researches. *Developmental and Comparative Immunology* 35, 1296-1308.

Parodi T.V., Cunha M.A., Becker A.G., Zeppenfeld C.C., Martins D.I., Koakoski G., Barcellos L.G., Heinzmann B.M., Baldisserotto B., 2014. Anesthetic activity of the essential oil of *Aloysia triphylla* and effectiveness in reducing stress during transport of albino and gray strains of silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Fish Physiology and Biochemistry* 40,323-334.

Salbego J., Becker A.G., Parodi T.V., Zeppenfeld C.C., Gonçalves J.F., Loro V.L., Baldisserotto B. 2015. Methanolic extract of *Condalia buxifolia* added to transport water alters biochemical parameters of the silver catfish *Rhamdia quelen*. *Aquaculture* 437, 46-50.

Salinas I., Zhang Y.A., Sunyer J.O. 2011. Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. *Developmental & Comparative Immunology* 35, 1364-1365

Santos E.L.R., Rezende F.P., Moron S.E. 2020. Stress-related physiological and histological responses of tambaqui (*Colossoma macropomum*) to transportation in water with tea tree and clove essential oil anesthetics. *Aquaculture* 523, 7351

Seiverd C. E. 1964. Hematology for medical technologists. *Academic Medicine* 39, 867.

Siwicki A.K. 1993. Nonspecific defense mechanisms assay in fish. II. Potential killing activity of neutrophils and macrophages, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin (Ig) level in serum. *Fish Diseases Diagnosis and Preventions Methods*.

Sutthi N., Van Doan H. 2020. *Saccharomyces crevices* and *Bacillus* spp. effectively enhance health tolerance of Nile tilapia under transportation stress. *Aquaculture* 528, 735527.

Taheri Mirghaed A., Ghelichpour M. 2019. Effects of anesthesia and salt treatment on stress responses, and immunological and hydromineral characteristics of common carp (*Cyprinus carpio*, Linnaeus, 1758) subjected to transportation. *Aquaculture* 501, 1-6.

Tort L. 2011. Stress and immune modulation in fish. *Developmental and Comparative Immunology 35*, 1366-1375.

Watts M., Munday B.L., Burke C.M. 2001. Immune responses of teleost fish. *Australian Veterinary Journal 79*, 570-574.

Yano T. 1992. Assays of hemolytic complement activity. *Techniques in Fish Immunology* 131-141.

Yousefi M., Hoseini S.M., Vatnikov Y.A., Nikishov A.A., Kulikov E.V. 2018. Thymol as a new anesthetic in common carp (*Cyprinus carpio*): Efficacy and physiological effects in comparison with eugenol. *Aquaculture* 495, 376-383.

Zeppenfeld C.C., Toni C., Becker A.G., dos Santos Miron D., Parodi T.V., Heinzmann B. M., Baldisserotto B. 2014. Physiological and biochemical responses of silver catfish, *Rhamdia quelen*, after transport in water with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton. *Aquaculture* 418, 101-107.

Effects of adding Thymol to water on hematological and immunological parameters of common carp (*Cyprinus carpio*) during transportation

Seyed Saeed Mirzargar*[1], Ali Taheri Mirghaed[1], Seyyed Morteza Hoseini[2], Melika Ghelichpour[1], Mahsa Shahbazi[1], Morteza Yousefi[3]

[1]Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.
[2]Inland Waters Aquatics Resources Research Center, Iranian Fisheries Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Gorgan, Iran.
[3]Department of Veterinary Medicine, Peoples' Friendship University of Russia (RUDN 11 University), Moscow, 117198, Russian Federation.
*Corresponding author: zargarm@ut.ac.ir
Received: 2021/5/31 Accepted: 2021/7/30

Abstract
Various herbal essences have been used in transportation of fish with conflicting results based on their sedative and anti-stress potency. Thymol, a phenolic compound with sedative effects, was used during transportation of common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles in this study. Fish were divided to four groups and 0, 2.5, 5 and 10 mg/l Thymol was added to transportation plastic bags of each group, respectively. The plastic bags were transported for 3 hours. Then, 2 fish were chosen randomly from each bag and blood samples were taken from the caudal vein. WBC and RBC, MCV, MCH, MCHC were measured and percentages of HCT, Neutrophil, Monocyte and Eosinophil were determined. Furthermore, activity of complement, lysozyme and total immunoglobulin were assessed. The results showed that there was no significant difference among the groups contained Thymol and the control group regarding RBC, MCV, MCH, MCHC, Monocytes and Eosinophils after transportation. The lowest Hb and HTC were observed in 5 mg/l thymol group. WBCs, Neutrophils, Lymphocytes, immunoglobulins, lysozymes and complement showed no significant difference in 5 mg/l group, compared to the control group. However, WBCs, Neutrophils, Lysozymes and complement were higher in the 10 mg/l thymol group than the control. Besides, Lymphocytes were lower in 10 mg/l thymol group than the control. It is concluded that adding 5 and 10 mg/l Thymol to the water can, respectively, reduce and increase the transportation stress in common carp.

Keywords: Common Carp, Transportation, Stress, Thymol.