Journal of Animal Biology, Winter 2025; 17(2):1-10

ISSN: 1735-9724

Research Article

Histomorphology of Kidney and Hematological Indices of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* on Replacement of Blood Powder Instead of Fish Meal in the Diet

Amal Moshashai[1], Rahim Abdi[*1], Rahim Peyghan[2]

1- Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran
2- Department of Clinical Sciences and Excellence Center of Warm Water Fish Health and Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
*Corresponding author: abdir@kmsu.ac.ir

Received: 24 November 2024 Accepted: 10 February 2025

DOI:

Abstract

The present study aimed to investigate the effect of replacing blood powder with fish powder on the histomorphology of kidney tissue and some blood indices of Nile tilapia. After preparation, the fish were fed with designed diets for 8 weeks, including control, 25, 50, 75, and 100% blood powder. After this period, the fish were anesthetized and blood was collected from the caudal peduncle with a heparin syringe. While opening the abdominal cavity, five-millimeter samples were taken from the kidney. After placing in a 10% buffered formalin fixative solution and undergoing dehydration with alcohol, clarification with xylene, and paraffin blocking, sections were made to a thickness of 4-6 microns with a microtome. They were then stained with hematoxylin-eosin and finally studied with a light microscope. Results showed that in the group receiving blood powder, numerous complications such as hyaline accumulation, epithelial rupture, Bowman's capsule dilation, hyperemia, increased melanomacrophage centers, and glomerular necrosis and tubules were observed. As the percentage of blood powder in the diet increased, so did the severity of the lesions. With increasing the replacement of blood powder instead of fish powder in the diet, the number of red blood cells, the percentage of hematocrit, and the amount of hemoglobin show a decreasing trend. The number of lymphocytes, monocytes, and neutrophils increased with increasing levels of blood powder. There was a significant difference between treatments, especially at high levels ($p < 0.05$). According to the results of this study, blood powder can be tolerated and replaced up to 75% of the diet for this species.

Keywords: Histomorphology, Kidney, Blood powder, Blood Powder, Nile tilapia.

زیست‌شناسی جانوری، سال هفدهم، شماره دوم، زمستان ۱۴۰۳، صفحات ۱۱۴-۱۰۱

ISSN:۱۷۳۵-۹۷۲۴

مقاله پژوهشی

بررسی هیستومورفولوژی کلیه و برخی شاخص‌های خون‌شناسی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) طی جایگزینی پودر خون بجای پودر ماهی در جیره غذایی

امل مشعشعی[۱]، رحیم عبدی[۱*]، رحیم پیغان[۲]

۱- گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران

۲- گروه علوم درمانگاهی و قطب علمی بهداشت ماهیان گرمابی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

*مسئول مکاتبات: abdir@kmsu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۲۲

DOI:

چکیده

مطالعه حاضر با هدف تأثیر جایگزینی پودر خون به‌جای پودر ماهی بر هیستومورفولوژی بافت کلیه و برخی شاخص‌های خونی تیلاپیای نیل صورت گرفت. ماهیان تیلاپیا پس از آماده‌سازی به مدت ۸ هفته با جیره‌های طراحی شده شامل کنترل، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد پودر خون تغذیه شدند. پس از این مدت ماهیان بیهوش شده و خون‌گیری از ساقه دمی با سرنگ هپارینه انجام گرفت. ضمن باز کردن محوطه شکمی نمونه‌های به ابعاد پنج میلی‌متر از کلیه برداشت شد. پس از قرار دادن در محلول ثبوتی فرمالین بافر ۱۰ درصد و پس از طی مراحل آبگیری با الکل، شفاف‌سازی با گزیلول، بلوک‌گیری با پارافین، برش‌گیری به ضخامت ۶-۴ میکرون با میکروتوم انجام گرفت. در ادامه ضمن رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین و درنهایت مطالعه با میکروسکوپ نوری بر روی آنها انجام گرفت. نتایج نشان داد که در گروه دریافت کننده پودر خون تغییرات متعددی مانند تجمع هیالن، کنده شدن اپیتلیوم، اتساع کپسول بومن، پرخونی، افزایش مراکز ملانوماکروفاژ و نکروز گلومرول و توبول‌ها مشاهده گردید که هرچه بر مقدار درصد پودر خون جیره افزوده شده بر شدت ضایعات وارده نیز افزوده گردید. با افزایش میزان جایگزینی پودرخون بجای پودرماهی در جیره تعداد گلبول‌های قرمز، درصد هماتوکریت، میزان هموگلوبین خون روند کاهشی و تعداد لنفوسیت‌ها، مونوسیت و نوتروفیل‌ها با افزایش سطح پودر خون روند افزایشی نشان دادند و بین تیمارها بویژه در سطوح بالا اختلاف معنی‌دار مشاهده شد (p <۰/۰۵). بنابر نتایج این تحقیق پودر خون در جیره غذایی تا حدود ۷۵ درصد برای گونه مورد نظر قابل تحمل و جایگزینی در جیره می‌باشد.

کلمات کلیدی: هیستومورفولوژی، کلیه، پودر خون، خون شناسی، تیلاپیای نیل.

مقدمه

ماهی تیلاپیا از اعضای خانواده سیکلید و از راسته سوف‌ماهیان بوده که داری بدنی مستطیلی شکل با فلس‌های ریز می‌باشد. بیشتر تیلاپیاهایی که در آبزی پروری پرورش داده می‌شوند از جنس اورئوکرومیس می‌باشند (۲، ۵). به طور معمول تیلاپیا در برابر شوری زیاد، درجه‌ی حرارت بالای آب، اکسیژن محلول پایین و غلظت‌های بالای آمونیاک نسبت به بیشتر ماهیان پرورشی آب شیرین قدرت تحمل بیشتری دارد (۲۹). امروزه تیلاپیا به عنوان گونه‌ای بومی در بیشر ملیت-های آسیا شناخته می‌شود. مهمترین شاخص پرورش این ماهیان رشد سریع، مقاومت بالا در برابر طیف وسیعی از شرایط زیست محیطی، مقاومت نسبت به

بیماری‌ها، تحمل بالا در برابر کیفیت پایین آب، قدرت تولیدمثل بالا و دوره کوتاه تولیدمثلی در اسارت، تغذیه از مواد غذایی کم ارزش، دسترسی آسان به منابع غذایی و امکان استفاده از غذای مصنوعی پس از جذب کیسه زرده می‌باشد بطوری که در حال حاضر پرورش تیلاپیا در جهان پس از کپورماهیان در درجه-ی دوم اهمیت قرار دارد (۳، ٤). صنعت آبزی‌پروری در حال حاضر به سرعت در جهان در حال توسعه می‌باشد، از این رو به منظور افزایش تولید آبزیان به صورت موفقیت‌آمیز نیاز به یک برنامه مدیریتی خوب می‌باشد. از مهمترین مسائل در پرورش آبزیان به صورت مصنوعی توجه به امر تغذیه می‌باشد به طوری که در آبزی پروری بیش از نیمی از هزینه‌های جاری یک مزرعه پرورشی ماهی به این امر اختصاص داده می‌شود. شیوع بیماری‌ها در ماهیان معمولا زمانی اتفاق می‌افتد که در اثر تغییر فاکتورهای مثل تغذیه تحت استرس قرار می‌گیرند (۷، ۹). مقدار زیادی از فراورده های غنی از پروتئین از صنایع فرآوری مانند پوست، استخوان و خون حاصل از کشتارگاه بازیابی و استفاده از آنها به عنوان عناصر کاربردی در سیستم-های غذایی یک جاگزین بسیار هیجان‌انگیز و امیدوارکننده است با توسعه فناوری‌های آنزیمی برای بازیابی و اصلاح پروتئین تولید طیف گسترده‌ای از مواد غذایی و محصولات صنعتی از دورریز صنایع جانبی امکان پذیر خواهد بود. پودر خون ارزانترین فرآورده به دست آمده از ضایعات حیوانی به شمار آمده که به دلیل دارا بودن پروتئین بالاو قابلیت هضم مناسب به طور گسترده‌ای در جیره آبزیان به کار می رود (٦). در آبزیان اندام‌های مختلفی از جمله کلیه در تنظیم اسمزی و تعادل آب و الکترولیت‌ها دخالت دارند. مطالعات مختلف نشان داد که با توجه به شرایط تکاملی و زیستی ماهیان در ساختار کلیه تغییراتی از نظر بافتی و فیزیولوزیکی به وجود آمده است. بررسی بافت‌شناسی و تعیین ساختارهای پایه کلیه ماهیان دارای اهمیت فراوانی در مطالعات تشخیص آسیب‌شناسی و پیشگیری از بیماری‌های مختلف داشته باشد. لذا آگاهی از ساختمان بافت-شناسی کلیه در ماهیان قبل از بررسی ضایعات پاتولوژیک و بیماری‌ها ضروری است، تا از این طریق تغییرات ایجاد شده در بافت‌ها را مورد ارزیابی قرار داد. همچنین شناخت ساختار اندام‌های موجودات در شرایطی مانند دریافت تغذیه جدید می‌تواند درک بهتری از سازش‌ها با شرایط اکولوژیک مختلف فراهم نماید (۸). یکی از حیاتی‌ترین بخش‌های بدن جانداران، خون می‌باشد، لذا آگاهی از وضعیت خونی ماهیان و بخصوص شناخت اثر محیط‌های جدید پرورشی بر شاخص‌های خونی می‌تواند ما را در پیشبرد اهدافی همانند حفظ، تکثیر، نگهداری و پرورش این ماهیان یاری نماید. خون به عنوان یک بافت سیال و دسترسی آسان، یکی از مهمترین مایعات بیولوژیک بدن بوده که تحت تأثیر حالات مختلف فیزیولوژیک و پائولوژیک ترکیبات آن دستخوش نوسان و تغییر می‌گردد. ویژگی های خون شناسی ماهیان یکی از مهمترین شواهد مراحل فیزیولوژیک آنها و منعکس کننده ارتباط خصوصیات اکوسیستم آبی و سلامتی آنها می‌باشد. به همین دلیل آگاهی از دامنه طبیعی پارامترهای خونی یک ماهی می‌تواند به عنوان شاخص زیستی مورد استفاده قرار گیرد (۱۰). بنابراین با توجه به قیمت مناسب، سهل الوصول بودن و دارا بودن پروتیین پودر خون نسبت به پودرماهی مطالعه اخیر به منظور بررسی مقدماتی امکان جایگزینی آن بجای پودر ماهی در جیره غذایی و تاثیر آن بر بافت‌شناسی کلیه و برخی فاکتورهای خونی تیلاپیای نیل به مرحله اجرا درآمده است.

مواد و روش‌ها

برای انجام این تحقیق پس از انتقال ماهی‌های تیلاپیا به آکواریوم های ۱۰۰ لیتری از قبل ضدعفونی شده موجود در بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان جهت هوادهی و تامین اکسیژن در هر یک از آکواریوم‌ها دو عدد سنگ هوا که به منبع هواده متصل بود، نصب گردید و تنها در هنگام غذادهی، هوادهی موقتاً قطع و سپس مجدداً برقرار می‌شد. آب مورد نیاز از آب لوله کشی شهری که قبلا با قرار دادان در مخزن کلرزدایی شده بود استفاده گردید و به مدت دو هفته سازگاری انجام پذیرفت (۱۲ و ۲۲). پس از این مدت ۱۵۰قطعه ماهی با وزن حدود ۰/۵±۳۰ گرم بطور تصادفی به ۵ گروه با سه تکرار شامل گروه شاهد دریافت کننده جیره تجاری فاقد پودر خون، گروه A دریافت‌کننده جیره تجاری حاوی ۲۵ درصد پودر خون، گروه B دریافت‌کننده جیره تجاری حاوی ۵۰ درصد پودر خون، گروه C دریافت‌کننده جیره تجاری حاوی ۷۵ درصد پودر خون، گروه D دریافت‌کننده جیره تجاری حاوی ۱۰۰ درصد پودر خون با پروتئین پایه ۴۰ درصد در تمامی گروه‌ها به مدت ۸ هفته دسته بندی شدند. برای آماده سازی جیره مورد نیاز و به منظور بالا بردن قابلیت هضم در ابتدا به خوبی با یک دیگر مخلوط شده و ترکیب حاصل با اقلام با ذرات درشت‌تر یعنی پودر ماهی و پودر خون با درصدهای ذکر شده ترکیب شدند. در پایان به مخلوط حاصل مقدار مساوی آب و سپس کمی روغن سویا اضافه شد تا اینکه یک مخلوط خمیری همگن به دست آید. سپس خمیر حاصل بوسیله چرخ گوشت به پلت تبدیل شد. پس از خشک شدن رشته‌های چرخ شده روی سینی به مدت ۲۴ ساعت در معرض جریان هوا قرارداده شدند تا رطوبت موجود در آنها به کمتراز۱۰درصد برسد. سپس این رشته‌ها خرد و شکسته شده و جیره متناسب با سایز دهان ماهیان کمتر از ۲ میلی متر (مطابق استاندارد سازمان شیلات ایران) ساخته شد. پلت‌های آماده شده تا زمان مصرف در کیسه‌های پلاستیکی در دمای۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. باید در نظر داشته باشیم که تیمارهای غذایی برای گروه‌های مختلف ازلحاظ میزان پروتئین و انرژی یکسان بودند. میانگین پروتئین خام ۵ ±۴۰ درصد و انرژی ۲ ±۲۰ مگاژول که بر اساس نیازمندی ماهی تیلاپیا در محدوده وزنی حاضر اندازه‌گیری شدند (۱۳). در طول مدت آزمایش سنجش خصوصیات فیزیکو شیمیایی آب از قبیل شوری، دما، pH و اکسیژن محلول به ترتیب با استفاده از رفرکتومتر نوری (Horiba U-10، ژاپن)، ترمومتر دیجیتالی (Horiba U-10، ژاپن)، دستگاه قابل‌حمل سنجش pH مدلebro.PHT-3140 انجام شد (۱۱). همچنین اکسیژن محلول با استفاده از دستگاه دیجیتال اندازه‌گیری اکسیژن مدل -1609 TECPEL DO بطور روزانه اندازه‌گیری می‌شد. همچنین جهت اندازه‌گیری فاکتورهای آمونیاک، نیتریت، نیترات و سختی کل آب از دستگاه کالریمتر هک (مدل ۸۹، شرکت هک، آمریکا) استفاده گردید. در طول مدت نگهداری و آزمایش، آب اکواریوم‌ها به میزان ۲۰ درصد حجم آکواریوم به صورت روزانه و پس از اتمام تغذیه جهت جلوگیری از افزایش آمونیاک و متابولیت‌های دیگر از ناحیه کف سیفون و تخلیه می‌گردید. غذا دهی ماهیان به میزان ۳ درصد وزن بدن در دو نوبت صبح و عصر با غذای تهیه شده انجام می‌گرفت (۲۸). به منظور مطالعات بافتی نمونه‌هایی به ابعاد پنج میلی متر از بافت کلیه جدا و درون سبدهای نمونه‌گیری قرار داده شد و بعد از نامگذاری در محلول ثبوتی فرمالین بافر ۱۰ درصد قرار گرفته و پس از ۴۸ ساعت اقدام به تعویض فرمالین نمونه‌ها و جایگرینی آنها با الکل ۷۰ درصد انجام شد (۱۴). در ادامه جهت انجام پاساژ بافتی نمونه‌ها پس از ثبوت، طبق روش معمول

بافتی آماده و پس از گذراندن مراحل پاساژ بافتی شامل آبگیری توسط الکل با درصدهای صعودی سپس شفاف سازی بوسیله محلول گزیلول وآغشتگی به پارافین در دمای ۵۸-۶۰ درجه سانتیگراد با استفاده از دستگاه پاساژ بافت (مدل RX-11B,Tissue Tekrotary, Japan) انجام و در نهایت نمونه‌ها برای انجام قالب‌گیری آماده‌سازی شدند). در نهایت برش-های با ضخامت ۶-۴ میکرون تهیه شده بوسیله میکروتوم مدل LEICA-RM2245 ساخت کشور آلمان، رنگ‌آمیزی عمومی هماتوکسیلین-ائوزین که توسط میکروسکوپ نوری مجهز به لنز Dino-Lite و سیستم کامپیوتر مجهز به نرم افزار داینو کپچر بررسی و عکسبرداری بر روی آنها انجام گرفت (۳۰). برای اندازه‌گیری فاکتورهای خونی پس از بیهوش نمودن ماهی‌ها با قرار دادن آنها در محلول پودر گل میخک به میزان ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر خونگیری به وسیله سرنگ و سرسوزن شماره ۲۱ از طریق ورید ساقه دمی به میزان ۲ سی‌سی صورت گرفت. برای شمارش گلبول‌های سفید از رقیق سازی ۲۰ میکرولیتر خون در ۰/۴ میلی‌لیتر محلول Lewis و بررسی نمونه روی لام نئوبار استفاده شد و سپس عدد به دست آمده در ۵۰ ضرب شد تا تعداد گلبول‌های سفید در هر میلی‌متر مکعب خون تعیین شود. شمارش گلبول‌های قرمز پس از رقیق‌سازی نمونه خون به نسبت ۱ به ۲۰۰ در محلول Lewis، در مربع میانی لام نئوبار انجام و برای تعیین تعداد گلبول‌های قرمز در هر میلی متر مکعب خون عدد حاصله در ۱۰۰۰۰ ضرب شد. سنجش هموگلوبین از روش سیانومت هموگلوبین انجام گرفت، بدین ترتیب که پس از حل کردن ۲۰ میکرولیتر نمونه خون در ۵ میلی‌لیتر محلول درابکین و قرار دادن نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی، قرائت شاخص جذب نوری در طول موج ۵۴۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفوتومتر Unico UV/Vis (2100، آمریکا) و مقایسه شاخص جذب با منحنی استاندارد انجام گرفت (۱۷). برای تعیین هماتوکریت از روش میکروهماتوکریت استفاده شد. لوله‌های هماتوکریت حاوی خون به صورت متقارن در میکروسانتریفیوژ (Nuve NF 048، ترکیه) قرار داده شدند و پس از ۵ دقیقه ساتریفیوژ با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه، اندازه گیری فاز جدا شده گلبول‌های قرمز در لوله‌های میکروهماتوکریت به وسیله خط کش مخصوص انجام و مقدار هماتوکریت بر حسب درصد تعیین شد. همچنین شاخص‌های MCV، MCH، MCHC بر اساس داده‌های حاصل از شمارش گلبول‌های قرمز و سنجش هموگلوبین و هماتوکریت اندازه‌گیری شدند (۲۵). داده‌های بدست آمده بر اساس میانگین ± خطای معیار از میانگین آماری گزارش گردیدند. همچنین برای آنالیز آماری داده‌ها از نرم افزار SPSS ver. 21 استفاده شد. برای مقایسه از آزمون آنووای یک طرفه استفاده و گروه‌ها بر اساس تغذیه‌های متفاوت مورد مقایسه قرار گرفتند. در مواردی که تداخل بین تیماری وجود داشت جزئیات مقایسه درون‌گروهی و بین گروهی ارائه و در مواردی که اختلاف آماری بین گروه‌ها معنی دار بود از پس آزمون توکی برای مشخص نمودن اختلاف معنی دار بین تک تک گروه ها استفاده شد. در تمامی موارد (p <۰/۰۵) به عنوان معنی دار بودن در نظر گرفته شد (۲۴).

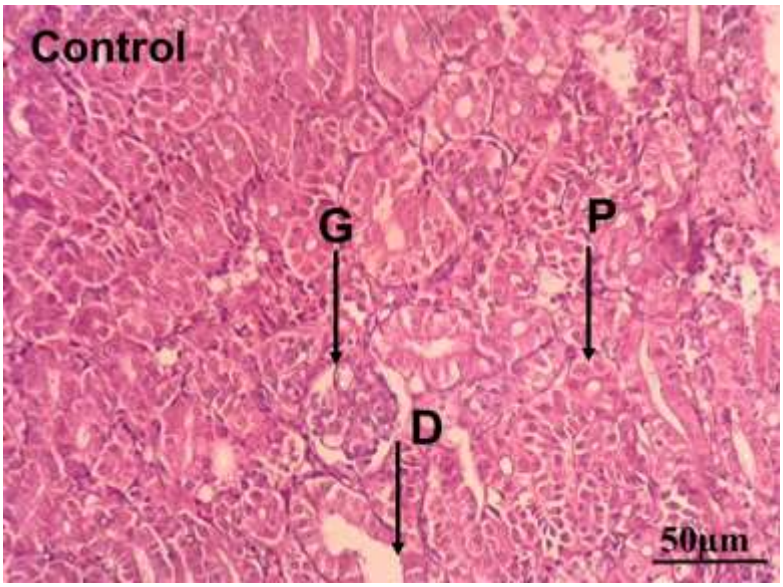
نتایج

نتایج ماکروسکوپی: نتایج حاصل از مطالعات ماکروسکوپی بر روی بافت کلیه تیلاپیای نیل در گروه کنترل نشان داد که کلیه به رنگ قرمز تیره در مجاورت ستون فقرات و به صورت خارج صفاقی در بالای کیسه شنا و در امتداد ستون فقرات از ناحیه سر تا انتهای خلفی بدن کشیده شده و همانند سایر ماهیان

استخوانی حقیقی شامل راس و بدنه بوده است. در مطالعات میکروسکوپی مشخص گردید که این بافت در سطح خارجی توسط کپسول بسیار ظریفی از بافت همبند سست به همراه و یک ردیف سلول مزوتلیایی پوشیده شده بود.

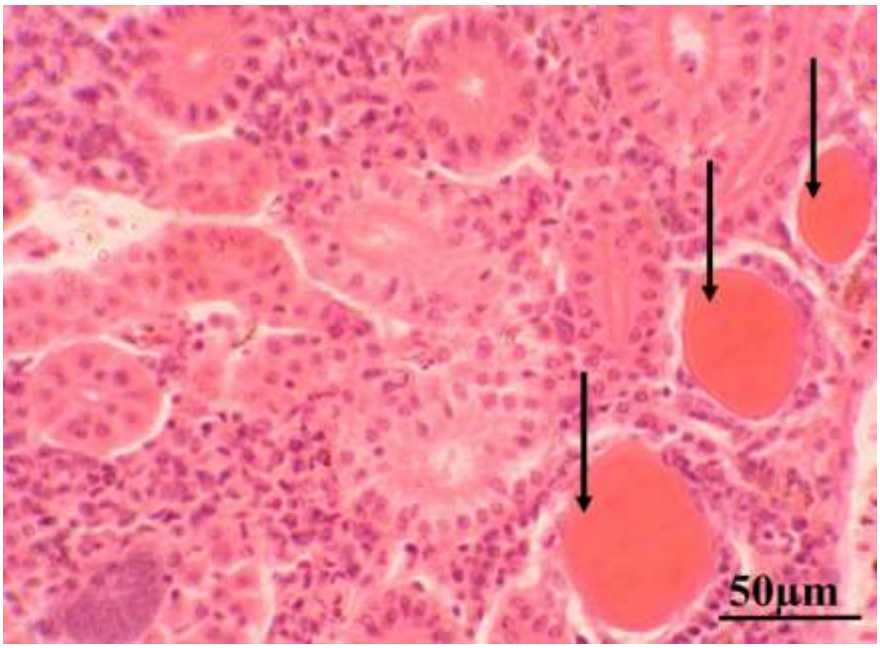
نتایج میکروسکوپی: در این مطالعه تاثیر غلظت‌های مختلف جیره حاوی پودر خون بر قسمت های مهم بخش دفعی کلیه مورد بررسی قرار گرفته است. بخش دفعی کلیه شامل نفرون‌ها که شامل جسمک کلیوی که به شکل ساختارهای کروی شکل در سراسر بافت کلیه به صورت پراکنده مشاهده شدند. جسمک‌ها از گلومرول و کپسول بومن تشکیل شده هر جسمک کلیوی دارای دو قطب عروقی و ادراری می‌باشد که در مقابل یک دیگر قرار داشتند. همچنین مجاری جمع کننده ادرار که شامل لوله‌های ادراری که شامل بخش پروکسیمال، دیستال و لوله‌های جمع‌کننده ادراری می باشند. در نتیجه در معرض قرار دادن ماهی‌های تیلاپیا در معرض جیره حاوی درصدهای بالای پودر خون تغییرات بافتی شامل تجمع هیالن، کنده شدن اپیتلیوم، اتساع کپسول بومن، پرخونی، افزایش مراکز ملانوماکروفاژ و نکروز گلومرول و توبول‌ها مشاهده گردید که هر چه بر مقدار درصد پودر خون جیره افزوده شده بر شدت ضایعات وارده نیز افزوده گردید (شکل‌های ۱ تا ۷، جدول ۱).

نتایج خون‌شناسی: بر اساس نتایج جدول ۲ میزان پودر خون جیره بر پارامترهای خون شناسی تیلاپیای نیل از جمله تعداد گلبول‌های قرمز، تعداد گلبول‌های سفید، درصد هماتوکریت، میزان هموگلوبین، لنفوسیت، نوتروفیل و اندیس‌های خونی تاثیر معنی دار داشته است. تعداد گلبول‌های قرمز، درصد هماتوکریت، میزان هموگلوبین خون روند کاهشی و تعداد لنفوسیت ها، مونوسیت و نوتروفیل‌های تیلاپیای نیل **با** افزایش سطح پودر خون روند افزایشی نشان دادند. بطوری که کمترین عدد مربوط به تیمار شاهد و بیشترین عدد مربوط به تیمار ۱۰۰ درصد دریافت کننده پودر خون بوده است.



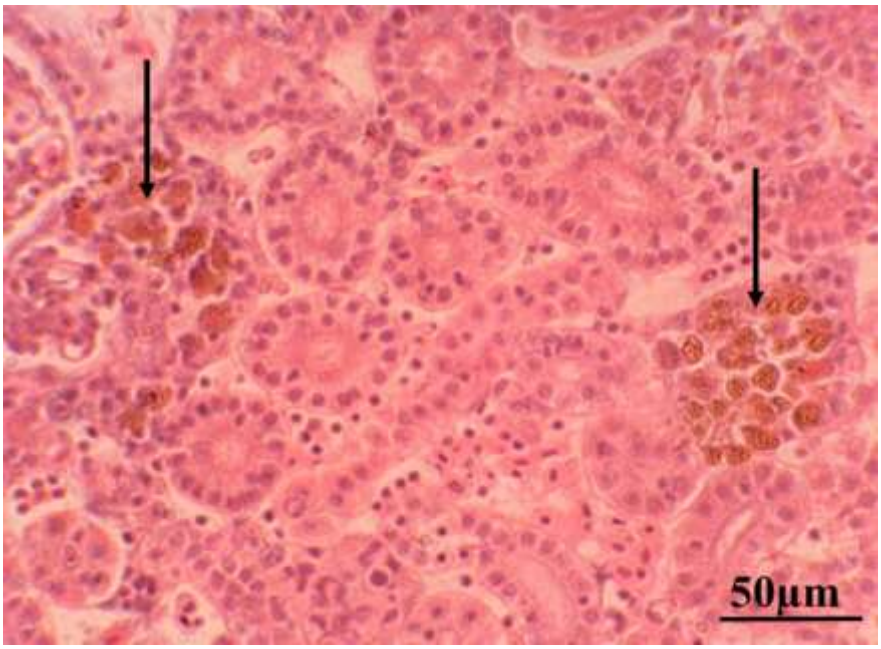
شکل ۱- میکروگراف بافت کلیه تیلاپیای نیل گروه کنترل (بزرگ‌نمایی ۴۰ و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین). گلومرول (G)، توبول دیستال (D) و توبول پروگسیمال (P)

Fig. 1. Histological micrograph of Nile tilapia kidneys of the control group (H&E, x40). Glomerulus (G), distal tubule (D), and proximal tubule (P).



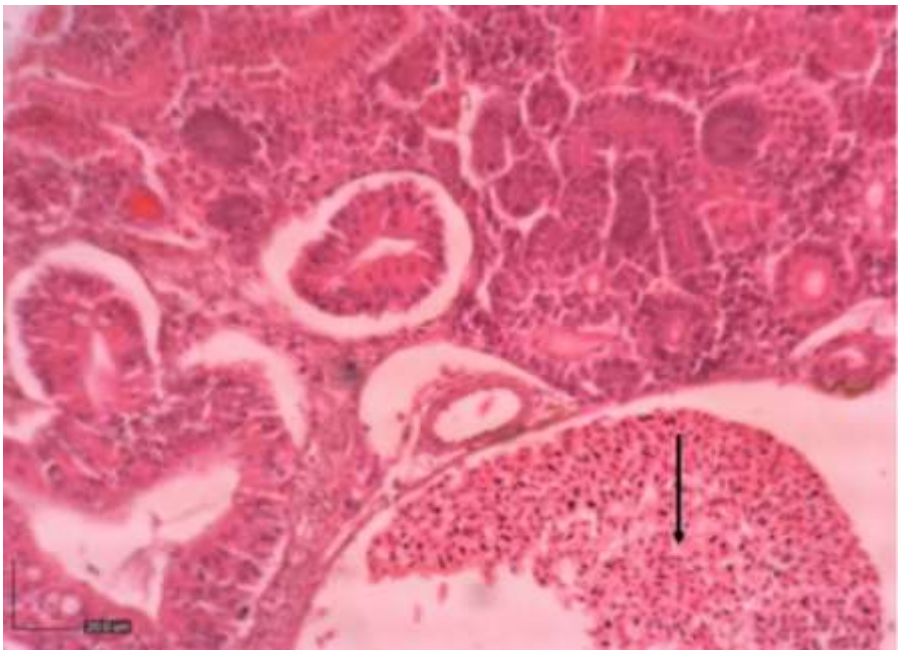
شکل ۲- میکروگراف بافتی مربوط به کلیه تیلاپیای نیل گروه ۱۰۰ درصد دریافت کننده پودر خون (بزرگ‌نمایی ٤٠ و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین). این تصویر تجمع ذرات هیالن (پیکان ها) در بافت کلیه تیلاپیای نیل را نشان می‌دهد.

Fig. 2. Histological micrograph of Nile tilapia kidney of the group receiving 100% blood powder (H&E, x40). This image shows the accumulation of hyaline particles (arrows) in the kidney tissue of Nile tilapia.



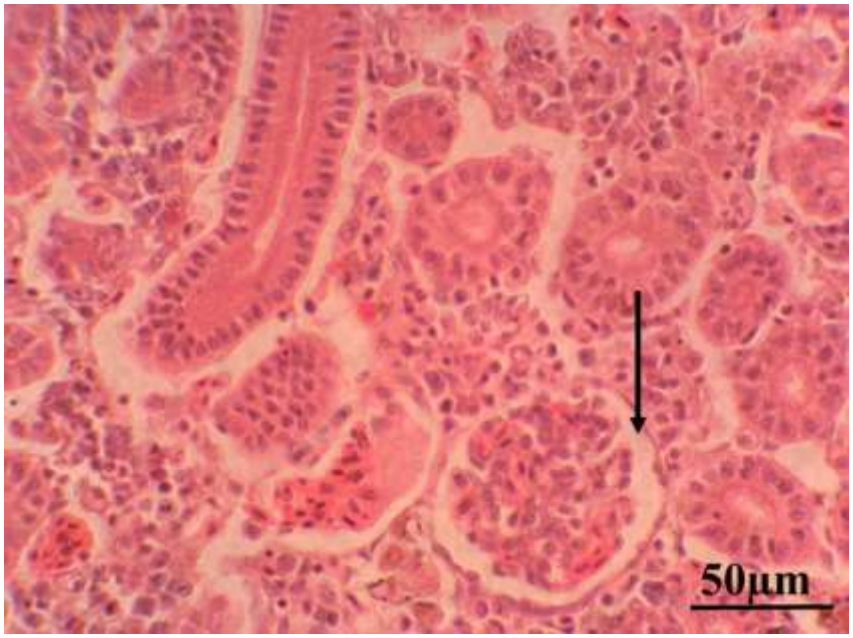
شکل ۳- میکروگراف بافتی مربوط به کلیه تیلاپیای نیل ۱۰۰ درصد دریافت کننده پودر خون(بزرگ‌نمایی ٤٠ و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین). این تصویر افزایش مراکز ملانوماکروفاژ (پیکانها) در بافت کلیه تیلاپیای نیل را نشان می‌دهد.

Fig. 3. Tissue micrograph of Nile tilapia kidney receiving 100% blood powder (H&E, x40). This image shows the increase of melanoma-macrophage centers (arrows) in the kidney tissue of Nile tilapia.



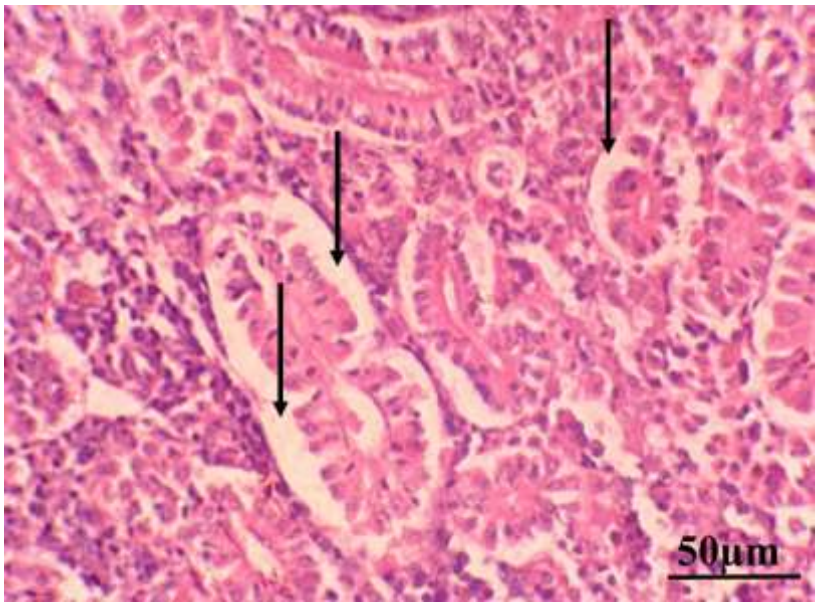
شکل ٤- میکروگراف بافتی مربوط به کلیه تیلاپیای نیل ۱۰۰ درصد دریافت کننده پودر خون (بزرگ‌نمایی ٤۰ و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین). این تصویر پرخونی عروقی (پیکان) در بافت کلیه تیلاپیای نیل را نشان می‌دهد.

Fig. 4. Tissue micrograph of Nile tilapia kidney receiving 100% blood powder (H&E, x40). This image shows the vascular hyperemia (arrow) in the kidney tissue of Nile tilapia.



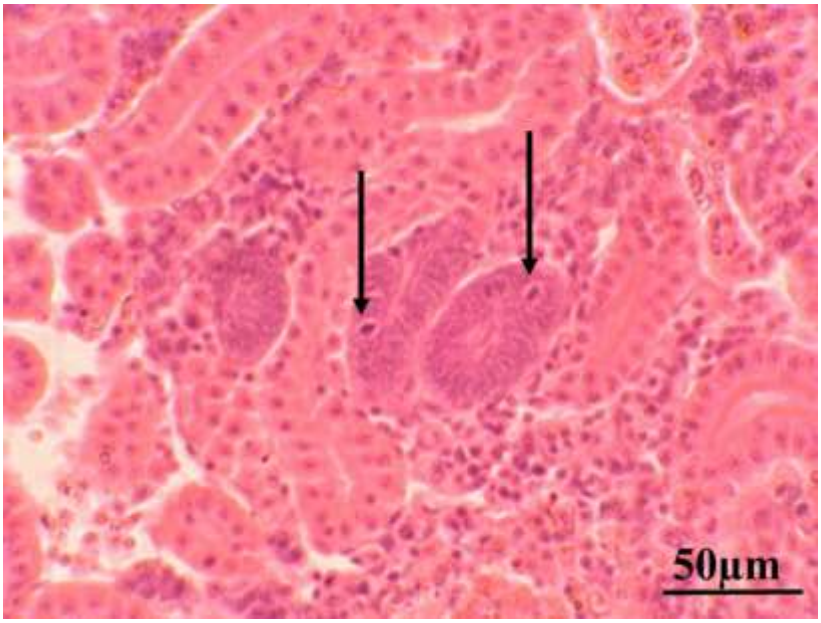
شکل ٥- میکروگراف بافتی مربوط به کلیه تیلاپیای نیل ۱۰۰ درصد دریافت کننده پودر خون (بزرگ‌نمایی ٤۰ و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین). این تصویر اتساع فضای ادراری (پیکان) در بافت کلیه تیلاپیای نیل را نشان می‌دهد.

Fig. 5. Tissue micrograph of Nile tilapia kidney receiving 100% blood powder (H&E, x40). This image shows the expansion of the urinary space (arrow) in the kidney tissue of Nile tilapia.



شکل ٦- میکروگراف بافتی مربوط به کلیه تیلاپیای نیل ۱۰۰ درصد دریافت کننده پودر خون (بزرگ‌نمایی ٤٠ و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین). این تصویر کنده شدن اپیتلیوم (پیکان‌ها) در بافت کلیه تیلاپیای نیل را نشان می‌دهد.

Fig. 6. Tissue micrograph of Nile tilapia kidney receiving 100% blood powder (H&E, x40). This image shows the epithelium (arrows) in the kidney tissue of Nile tilapia.



شکل ۷- میکروگراف بافتی مربوط به کلیه تیلاپیای نیل ۱۰۰ درصد دریافت‌کننده پودر خون (بزرگ‌نمایی ٤٠ و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین). این تصویر نکروز توبول (پیکان‌ها) در بافت کلیه تیلاپیای نیل را نشان می‌دهد.

Fig. 7. Tissue micrograph of Nile tilapia kidney receiving 100% blood powder (H&E, x40). This image shows tubule necrosis (arrows) in the kidney tissue of Nile tilapia.

جدول ۱- تغییرات بافتی تیلاپیای نیل به دنبال جایگزینی پودر خون به جای پودرماهی در جیره غذایی در تیمارهای مختلف در مدت ۸ هفته.

Table 1. Tissue changes in Nile tilapia following replacement of blood meal in the diet in different treatments for 8 weeks.

Factor	Control	A	B	C	D
Aggregation of hyaline particles	-	+	++	++	+++
Melanomacrophage centers	-	+	++	++	+++
Hyperemia	-	+	++	++	+++
Dilation of the urinary space	-	-	-	+	++
Epithelial detachment	-	-	+	++	+++
Tubular necrosis	-	-	+	++	+++

جدول ۲- شاخص های خونی تیلاپیای نیل به دنبال جایگزینی پودر خون به جای پودرماهی در جیره غذایی در تیمارهای مختلف در مدت ۸ هفته (حروف نامشابه در هر ردیف نشان از وجود اختلاف معنی دار بین گروه های مختلف در سطح (P <۰/۰۵) می‌باشد).

Table 2. Blood indices of Nile tilapia following replacement of blood meal with fish meal in the diet in different treatments for 8 weeks (different letters in each row indicate significant differences between different groups at the (P < 0.05) level).

Factor	Control	A	B	C	D
RBC (×10 ^{6} mm)	2.94±0 .37 ^{a}	2.63±0.27 ^{a}	2.36±0.53 ^{a}	1.76±0.33 ^{b}	1.13±0.27 ^{b}
WBC (×10 ^{3} mm)	11.41±1.57 ^{a}	11.82±1.33 ^{a}	12.44±1.51 ^{b}	12.85±1.66 ^{b}	13.21±1.62 ^{c}
Hematocrit (%)	24.31±1.31 ^{a}	23.33±1.47 ^{a}	22.46±1.37 ^{a}	21.11±1.26 ^{b}	20.39±1.38 ^{b}
Hemoglobin (gr/dl)	8.11±0.36 ^{a}	7.79±0.32 ^{a}	7.61±0.66 ^{a}	6.51±0.77 ^{b}	5.81± 0.64 ^{b}
MCV (fl)	117.61±28.12 ^{a}	121.44±21.8 ^{a}	127.55±23.14 ^{b}	131.63±23.68 ^{b}	135.66±24.11 ^{b}
MCH (pg)	56.41±3.35 ^{a}	57.44±4.22 ^{a}	57.98±4.66 ^{a}	60.39±5.45 ^{b}	61.44±5.34 ^{b}
MCHC (gr)	23.11±1.36 ^{a}	22.19±1.33 ^{a}	20.71±1.86 ^{b}	19.15±1.55 ^{b}	18.32±1.66 ^{c}
Lymphocyte (%)	64.54±4.41^{a}	61.34±4.56 ^{a}	58.51±4.71 ^{b}	53.56±4.49 ^{b}	49.43±3.21 ^{c}
Monocyte (%)	1.15±0.13 ^{a}	2.43±0.76 ^{a}	2.95±0.63 ^{a}	3.33±0.27 ^{b}	4.18±0.19 ^{b}
Neutrophil (%)	21.28±1.38 ^{a}	26.22±1.73 ^{a}	31.24± 1.37 ^{a}	36.22±2.18 ^{b}	45.58±3.31 ^{c}

بحث

ضایعات کشتارگاهی دام و طیور مثل پودر خون و پودر پر به عنوان منبع پروتئین حیوانی یک جایگزین کم‌هزینه به جای پودرماهی در جیره غذایی آبزیان به شمارآمده و از لحاظ ترکیبات اسیدهای آمینه و چرب بر پروتئین‌های گیاهی برتری و علاوه‌بر آن فاکتورهای ضد تغذیه‌ای منابع پروتئین گیاهی نیز در آنها وجود ندارد (۱، ۲۰). در این مطالعه تاثیر غلظت‌های مختلف جیره حاوی پودر خون بجای پودر ماهی بر قسمت های مهم بخش دفعی کلیه و هماتولوژی ماهی تیلاپیای نیل مورد بررسی قرار گرفته است. کلیه، اندامی حیاتی است که نقش بسیار مهمی در تنظیم الکترولیت‌ها و آب بدن و همچنین حفظ و نگهداری هموستاز بدن موجودات ایفا می‌کند. نقش چند منظوره کلیه‌ها در ماهی ترکیبی از عملکرد ریه‌ها، کلیه‌ها و روده در مهره‌داران است که به‌وسیله ساختارهای پیچیده منعکس می‌گردد. از نظر تنظیم مواد معدنی، نقش اصلی کلیه، در ماهیان آب شیرین دفع مقدار زیادی از آب اسمزی انباشته شده و حذف یون‌های اضافی استخراج شده از غذا به ویژه کلسیم، سولفات و فسفات است (۲۱). در نتیجه در معرض قرار دادن ماهی‌های تیلاپیا در معرض جیره حاوی درصدهای مختلف پودر خون تغییرات بافتی از جمله تجمع هیالن مشاهده شد. ایجاد دانه‌های هیالن، به شکل گرانول‌های ائوزینوفیلی بزرگ در درون سلول مشخص می‌شوند، این گرانول‌ها ممکن است درون سلول به دلیل عدم جذب مجدد پروتئین‌های پلاسمایی ایجاد شود که به آسیب جسمک‌های کلیوی می‌انجامد. اتساع کپسول بومن، نکروز گلومرول و

توبول‌ها از دیگر تغییرات مشاهده شده بود. تحلیل رفتن گلومرول‌ها منتج به افزایش فضای بومن و در نتیجه اختلال در فرآیند فیلتراسیون و افزایش حجم ادرار دفعی در ماهی‌ها می‌گردد. ادامه یافتن آسیب‌های سلول‌های توبولی در نهایت می‌تواند به نکروز سلولی ختم شود. در مطالعه حاضر، افزایش قابل توجهی در تعداد تجمعات ملانوماکروفاژی در کلیه ماهیان مورد مطالعه مشاهده شد. پیش از این افزایش مراکز ملانوماکروفاژی کلیوی در گونه‌هایی که در معرض سطوح بالای مواد شیمیایی قرار داشتند، گزارش شده بود (۲۳ و ۲۶). این مراکز ملانوماکروفاژی در به دام انداختن آنتی‌ژن‌ها و معرفی آنها به لنفوسیت‌ها و جداسازی محصولات تجزیه سلولی عمل می‌کنند. علاوه بر در مطالعه‌ای بیان نمودند که افزایش تعداد مراکز ملانوماکروفاژی، منجر به افزایش فعالیت‌های فاگوسیتوزی و کیموتاکسیک و به دنبال آن مهاجرت لوکوسیت‌ها به درون بافت‌ها و تراکم لوکوسیتی در آنها می‌شود. بنابراین افزایش مراکز ملانوماکروفاژی به عنوان شاخص استرس محیطی مورد توجه قرار گرفته است (۱۵، ۱۹). یکی دیگر از ضایعات مشاهده شده کنده شدن اپیتلیوم بافت کلیه بویژه در درصدهای بالای پودرخون بود. بافت اپیتلیوم از سلول‌های چندضلعی اجتماع یافته‌ای تشکیل شده‌است که پوشش سلولی سطوح داخلی کلیه را می‌پوشاند. این بافت در بالای بافت همبند قرار گرفته و این دولایه توسط غشای پایه از هم جدا می‌شوند. از آنجایی که کلیه اندام دفاعی هم محسوب می‌شود و در سم زدایی و دفع آلاینده‌ها همکاری دارد بنابراین تغییرات در اندازه و ساختار سلول‌های اپیتلیوم و انسداد فضای لومن بازدارنده به عنوان یک این عملکرد در چنین مواردی می‌باشد. پرخونی نیز با تجمع گلبول‌های قرمز به صورت منتشر در اطراف لوبول های ادراری از دیگر ضایعات مشاهده شده طی جایگزینی پودر خون به جای پودر ماهی در جیره غذایی ماهی تیلاپیا بوده که در بیشتر تحقیقات انجام گرفته بر روی گونه‌های متعدد در معرض آلودگی و عناصر سنگین گزارش شده است. پرخونی بدلیل افزایش جریان خون بافتی در کلیه ماهیان دریافت گننده مقدار بالای پودر خون که این موضوع ناشی از افزایش جریان خون بدلیل واکنش طبیعی بدن یا در هنگام تحریک سیستم ایمنی در بدن ماهی گزارش گردید (۲۷). بررسی‌های خون شناسی یا هماتولوژی می‌تواند اطلاعات ارزشمندی را جهت نظارت، کنترل و پایش سلامت ماهی در شرایط پرورشی قرار دهد. بر اساس نتایج مطالعه حاضر بین تیمارهای آزمایشی از نظر تعداد گلبول‌های قرمز و سفید، هموگلوبین، هماتوکریت، شاخص‌های MCV، MCH، MCHC، تعداد لنفوسیت‌ها، مونوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها در برخی گروه‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده گردید. کاهش میزان گلبول‌های قرمز و کاهش همزمان هموگلوبین و هماتوکریت می‌تواند نشان‌دهنده‌ی کم‌خونی ماهی در نتیجه مهار ساخت گلبول‌های قرمز در اندام‌های خون‌ساز باشد (۱۶). گلبول‌های قرمز ماهی سلول‌های هسته‌دار هستند که برخلاف پستانداران حاوی اندامک‌هایی در سیتوپلاسم خود می‌باشند. جدا از نقش شناخته شده آنها در تبادل گاز، اخیراً مجموعه‌ای از نقش‌های بیولوژیکی جدید برای گلبول‌های قرمز هسته‌دار مرتبط با پاسخ ایمنی گزارش شده است. گلبول‌های قرمز هسته‌دار می‌توانند فاگوسیتوز و به عنوان سلول‌های ارائه دهنده آنتی ژن عمل کنند. آنها می‌توانند به الگوهای مولکولی مرتبط با پاتوژن مختلف پاسخ داده، فعالیت لکوسیت را تعدیل کرده و فاکتورهای شبه سیتوکین را آزاد کنند (۱۸). در این بررسی سطح هموگلوبین تا ۲۵ درصد جایگزینی پودر خون نسبت به تیمارهای شاهد افزایش یافت اما با افزودن پودر خون به نسبت‌های ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد با کاهش روبه رو شد. وجود

تفاوت معنی‌دار در سطح هموگلوبین و درصد هماتوکریت در مطالعه حاضر بر ایجاد اختلال فیزیولوژیکی در اثر فرایند جایگزینی دلالت دارد. گلبول‌های سفید خون ماهی از مهم‌ترین مکانیزم‌های دفاعی سلولی بدن جانوران به شمار می‌روند. انواع مختلف لکوسیت‌های خونی شامل نوتروفیل، بازوفیل، ائوزینوفیل، منوسیت و لنفوسیت‌ها می‌باشند. چهار گروه نخست در عمل فاگوسیتور و لنفوسیت‌ها بیشتر در ایمنی اختصاصی سلولار نقش دارند. استرس باعث تغییر در تعداد و ترکیب گلبول‌های سفید خون ماهی می‌شود (۱۹). در این تحقیق میزان گلبول‌های سفید، منووسیت‌ها، نوتروفیل‌ها، MCV ها و MCH ها با افزودن پودر خون نسبت به گروه شاهد افزایش یافتند اما میزان لنفوسیت نسبت به گروه شاهد با کاهش رو به رو شد. معمولا استرس‌های کوتاه مدت باعث افزایش تعداد گلبول‌های سفید و درصد نوتروفیل‌ها و کاهش درصد لنفوسیت‌ها می‌شوند. این پاسخ باعث می‌شود که بدن در حالت ایمنی فعال قرار گرفته و از بروز عفونت‌های ناشی از عوامل بیماریزای فرصت-طلب جلوگیری کند. بنابراین افزایش تعداد گلبول‌های سفید می‌تواند در نتیجه یک واکنش محافظتی بدن در طول استرس باشد. همچنین افزایش میزان MCV و MCH به عنوان نشانه‌ای از بی‌نظمی و اختلال در فعالیت اندام‌های خون‌ساز مانند طحال و کبد و بروز مسمومیت و کم خونی تلقی شود (۳۰).

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که با توجه به هزینه بالای پودر ماهی، به صرفه بودن و تهیه آسان پودر خون همچنین نتایج مطالعات خونی و میکروسکوپی استفاده از آن در جیره غذایی تا حدود ۷۵ درصد جیره برای گونه مورد نظر قابل تحمل و قابل جایگزینی در ترکیب غذایی می‌باشد.

منابع

1. Aanyu, M., Betancor, M.B., Monroig, O. 2020. The effects of combined phytogenics on growth and nutritional physiology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 519:734867.

2. Abdelhamed, H., Ibrahim, I., Baumgartner, W., Lawrence, M.L., Karsi, A. 2017. Characterization of histopathological and ultrastructural changes in channel catfish experimentally infected with virulent *Aeromonas hydrophila*. *Frontier Microbiology*, 8:1519.

3. Adeniran, A., Adeyemo, O.K., Emikpe, B., Alarape, S. 2017. Organosomatic indices, haematological and histological assessment as biomarkers of health status in feral and cultured *Clarias gariepinus*. *African Journal Biomedical Research*, 20(2):189-194.

4. Ahmad Mohamad, S. 2009. Effect of different artificial on growth rate condition and histological structure of Nile tilapia (*Oreochromus niloticus*). *Research Journal of Fish Hydrobiology*, 4(1):29- 34.

5. Ahmed, S.A., Ibrahim, R.E., Farroh, K.Y., Moustafa, A.A., Al-Gabri, N. A., Alkafafy, M., Amer, S.A. 2021. Chitosan vitamin E nanocomposite ameliorates the growth, redox, and immune status of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared under different stocking densities. *Aquaculture*, 541:736804.

6. Ale, A., Bacchetta, C., Rossi, A.S., Galdoporpora, J., Desimone, M.F., Fernando, R., Cazenave, J. 2018. Nanosilver toxicity in gills of a neotropical fish: Metal accumulation, oxidative stress, histopathology and other physiological effects. *Ecotoxicology Environment Safty*, 148:976-984.

7. Amerm, S.A., Ahmedm, S.A., Ibrahimm, R.E., Al-Gabrim, N.A., Osmanm, A., Sitohym, M. 2020. Impact of partial substitution of fish meal by methylated soy protein isolates on the nutritional, immunological, and health

15. Hassaan, M.S., Goda, M.A.S., Kumar, V. 2017. Evaluation of the nutritive value of fermented deoiled Physic nut, Jatropha curcas seed meal for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* fingerlings. *Aquaculture Nutrition*, 23(3):571-584.

16. Hill, J.C., Alam, M.S., Watanabe, W.O., Carroll, P.M., Seaton, P.J., Bourdelais, A.J. 2019. Replacement of menhaden fish meal by poultry by-product meal in the diet of juvenile red porgy. *North American Journal of Aquaculture*, 81(1):81-93.

17. Kabir, K..A., Verdegem, M.C.J., Verreth, J.A.J., Phillips, M.J., Schrama, J.W. 2019. Effect of dietary protein to energy ratio, stocking density and feeding level on performance of Nile tilapia in pond aquaculture. *Aquaculture*, 511:634200.

18. Khodabakhshian, M., Shirali, S., Abdi, R. 2022. Microscopic survey of Balbiani bodies in Yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*), Abu Mullet (*Planiliza abu*), Common carp (*Cyprinus carpio*) and Benni (*Barbus sharpeyi*). *Journal of Animal Research*, 34(4):375-389.

19. Li, Y., Kortner, T.M., Chikwati, E.M., Belghit, I., Lock, E.J., Krogdahl, A. 2020. Total replacement of fish meal with black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal does not compromise the gut health of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 520:734967.

20. Moallem, Z., Abdi, R., Movahedinia, A., Shirali, S., Salati, A.P. 2015. Gonad histology and gonadosomatic index variations during gonadal development of wild female *Tenualosa ilisha*. *Journal Persian Gulf*, 6(19):53-58.

21. Mohamed, M., Abdi, R., Ronagh, M.T., Salari-Aliabadi, M.A., Basir, Z. 2021. Comparative histomorphology of epidermis of head and caudal peduncle in *Otolithes ruber*, *Huso huso* and *Pangasius hypophthalmus* fish. *Iranian Journal Aquatic Animal Health*, 7(1):10-20.

aspects of Nile tilapia, Oreochromis niloticus fingerlings. *Aquaculture*, 518:734871.

8. Amiripour, L., Abdi, R., Movahedini,a A., Sahraian, MR. 2015. Study of liver and intestine tissue structure in orange spotted grouper (*Epinephelus coioides*) during larval development. *Journal of Oceanography*, 6(23):87-92.

9. Basir, Z., Peyghan, R. 2016. The process of kidney gradual changes in, *Tenualosa ilisha* during migration from sea to the river. *Journal of Persian Gulf*, 7(26): 47-56.

10. Basir, Z., Peyghan, R. 2021. The Effect of Replacement of Poultry by-Product with Fish Meal in the Diet of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) on their Intestine Histology. *Journal of Veterinary Research*, 76(4):467-475.

11. Besson, M., Feeney, W.E., Moniz, I., Francois, L., Brooker, R.M., Holzer, G., Metian, M., Roux, N., Laudet, V., Lecchini, D. 2020. Anthropogenic stressors impact fish sensory development and survival via thyroid disruption. *Nature Communications*, 11:1-10.

12. Dastan, V., Abdi, R., Movahedinia, A., Salari-Aliabadi, M.A. 2017. Study of gill and kidney tissue changes in *Tenualosa ilisha* during migration from sea to the Karun and Bahmanshir rivers. *Iranian Fisheries Science Journal*, 25(4):53-62.

13. El-Naby, F.S.A., Naiel, MAE., Al-Sagheer, A.A., Negm, S.S. 2019. Dietary chitosan nanoparticles enhance the growth, production performance, and immunity in *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 501:82-89.

14. Hasanzadeh, S., Abdi, R., Salari-Aliabadi, M.A. Movahedinia, A., Basir, Z. 2018. Comparative histomorphology of esophagus and intestine in two carnivorous and phytoplankton feeder fish of Persian Gulf. *Journal of Animal Environment*, 10(4):381-388.

22. Mohamed, M., Abdi, R., Ronagh, M.T., Salari- Aliabadi, MA., Basir, Z. 2020. Comparative histomorphometry of dorsal, ventral and lateral skin in macroscopy, microscopy and free scale fish. *Iranian Veterinary Journal*, 16(2):47-53.

23. Moradkhani, A., Abdi, R., Salari-Aliabadi, M.A., Nabavi, S., Basir, Z. 2020. Quantification and description of gut-associated lymphoid tissue in, shabbout, *Arabibarbus grypus* (actinopterygii: cypriniformes: cyprinidae), in warm and cold season. *Acta Ichthyology et Piscatoria*, 50(4):423-432. [In Persian]

24. Nochalabadi, A., Morovvati, H., Abdi, R. 2023. Histomorphometry of Liver and some Blood Factors of Nile Tilapia, Oreochromis niloticus Exposed to Different Concentrations of Ammonia. *Pollution*, *9*(3): 1225-1235.

25. Nochalabadi, A., Morovvati, H., Abdi, R. 2023. The Effect of different concentrations of ammonia on histomorphometry of kidney and some blood factors of Nile tilapia, Oreochromis niloticus. *Iranian Veterinary Journal*, 19(3):64-71.

26. Pourkhadje, M., Abdi R., Zolgharnein, H., Hoseinzade, Sahafi, H., Morovvati, H. 2014. Effects of different salinity on number and area of chloride cells in gill of juvenile grouper (*Epinephelus coioides*). *Iranian Journal of Fisherise Science*, 23(2):1-10.

27. Roshanfekr, K., Abdi, R., Salari-Aliabadi, MA., Basir, Z. 2017. The impact of spent mushroom compost and fertilizer on esophagus histological indices of some cultured warm water species. *Journal of Animal Biology*, 10(1):23-33.

28. Roshanfekr, K., Abdi, R., Salari-Aliabadi, M.A., Basir, Z. 2018. The impact of spent mushroom compost and fertilizer on changes of intestinal tissue of cultured warm water species. *Journal of Animal Physiology Development*, 4(32):11-25.

29. Wardani, WW., Alimuddin, A., Zairin, M., Setiawati, M., Nuryati, S., Suprayudi, MA., 2020. Evaluation of cysteamine supplementation in red tilapia (Oreochromis sp.) diet: Serum insulin and somatostatin, IGF-1 and GLUT4 genes expression, growth performance, and robustness against stress. *Aquaculture*, 528:735514.

30. Younis, EM., Abdel-Warith, AA., AL-Asgan, NA. 2012. Hematological and enzymatic responses of Nile tilapia, Oreochromis niloticus, during short and long term sublethal exposure to zinc. *African Journal of Biotechnology*, 11:4442-4446.