

بررسی تاثیر مقادیر مختلف عصاره الکلی بره‌موم زنبور عسل در ترمیم زخم پوستی و پاسخ ایمنی و بقاء ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

نسرین چوبکار^{۱*}، عباسعلی ساری^۲، علیرضا بلندنظر^۳، هاشم حشمتی^۴، فروغ محمدی^۵، نسترن شهبازیان^۶، امیرمحمد امامی راد^۷، پیام یاری^۸

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمانشاه، دانشکده کشاورزی، گروه شیلات، کرمانشاه، ایران.

۲- دانشگاه بوعلی سینا، گروه پیراپزشکی، همدان، ایران.

۳- موسسه تحقیقات باريج اسانس، کاشان، ایران.

۴- دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گروه بهداشت، گرگان، ایران.

۵- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمانشاه، دانشکده کشاورزی، گروه دامپزشکی، کرمانشاه، ایران.

۶- اداره دامپزشکی، بخش بهداشت آبزیان، کرمانشاه، ایران.

۷- دانشگاه پیام نور، گروه مهندسی شیمی، تهران، ایران.

۸- کارشناسی ارشد شیلات، اهواز، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: Nchoobkar20@gmail.com

(دریافت مقاله: ۹۲/۹/۲۳ پذیرش نهایی: ۹۳/۴/۳)

چکیده

آنتی‌بیوتیک‌ها جهت تقویت سیستم ایمنی و نیز ترمیم زخم‌ها در آبزیان کاربرد زیادی دارند، اما به دلیل تاثیرات سوء و ایجاد باقی‌مانده دارویی، محققین به دنبال جایگزینی این مواد با مواد طبیعی می‌باشند. یکی از این ترکیبات که خواص درمانی زیادی دارد بره‌موم زنبور عسل است. هدف از این مطالعه ارزیابی تاثیر غلظت‌های مختلف بره‌موم بر ترمیم زخم پوستی و پاسخ سیستم ایمنی در ماهی کپور معمولی می‌باشد. عصاره بره‌موم از شرکت باريج اسانس کاشان تهیه گردید و غلظت‌های صفر، ۲، ۵ و ۱۰ درصد آن به همراه مواد حامل (مواد افزوده به بره‌موم به منظور انحلال در آب) بر روند ترمیم زخم پوستی ماهی کپور معمولی و پاسخ ایمنی و نیز بقاء آنها مورد بررسی قرار گرفت. این مطالعه در یک دوره ۲۱ روزه و به روش حمام کوتاه مدت و یک بار در روز انجام شد. در مقایسه با تیمار کنترل، استفاده از بره‌موم زنبور عسل در غلظت ۲ درصد تاثیر معنی‌داری در روند ترمیم زخم پوستی و نیز تحریک سیستم ایمنی در ماهی کپور پرورشی داشت ($P < 0.05$). در استفاده از غلظت‌های بالاتر بره‌موم، ترمیم زخم مشاهده شد اما افزایش در تعداد سلول‌های خونی (گلبول قرمز، نوتروفیل و ائوزینوفیل) و افزایش تلفات ماهی را نیز به همراه داشت. استفاده از بره‌موم زنبور عسل به شکل افزودنی در آب در غلظت‌های پایین موثر بوده و سبب تحریک سیستم ایمنی می‌گردد.

نشریه آسیب‌شناسی درمانگاهی دامپزشکی، ۱۳۹۲، دوره ۷، شماره ۴، پیاپی ۲۸، صفحات ۳۰۰-۳۰۷

کلید واژه‌ها: بره‌موم، ماهی کپور معمولی، ترمیم زخم پوستی، سیستم ایمنی، بقاء

مقدمه

زخم در اثر آفتاب سوختگی، صدمات مکانیکی و بیماری‌های مختلف پوستی (به‌خصوص در بچه ماهیان) ایجاد می‌گردد و معمولاً توام با عفونت‌های ثانویه میکروبی می‌باشد. زخم‌های پوستی علاوه بر تاثیر سوء در بازارپسندی ماهی، در موارد شدید سبب مرگ و میر در ماهیان نیز می‌گردد (Ferguson and Leigh, 1998).

یکی از اهداف علم پزشکی، ترمیم زخم در مدت زمان کوتاه‌تر و با عوارض جانبی کمتر است. کوتاه کردن زمان بهبود زخم به دلیل کاهش احتمال عفونت و یا عوارض زخم و کاهش هزینه‌ها از اهمیت به‌سزایی برخوردار می‌باشد (Sabistan, 1991).

کاربرد گسترده ترکیبات طبیعی و گیاهی در درمان طیف زیادی از بیماری‌های انسان موجب شد تا امکان استفاده از این ترکیبات در درمان بیماری‌های سایر موجودات زنده مورد بررسی قرار گیرد. این ترکیبات ارزان و فاقد عوارض جانبی برای موجود زنده و انسان می‌باشند. لذا استفاده از آنها از نظر زیست محیطی نیز از اهمیت به‌سزایی برخوردار است (کاظم پور و همکاران، ۱۳۸۴).

استفاده از داروهای شیمیایی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها، همواره مشکلاتی را نظیر ظهور گونه‌های میکروبی مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، ایجاد باقی‌مانده دارویی در محصولات و تاثیر سوء بر مصرف‌کنندگان در برداشته است.

در حال حاضر به دلیل جوان بودن صنعت آبی‌پروری و کمبود نیروی متخصص در زمینه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، اکثر موارد کاربرد داروها و مواد شیمیایی خارج از سیستم صحیح تشخیص و تجویز

رسمی صورت گرفته و بدون در نظر گرفتن باقی‌مانده‌های دارویی و اثرات آلاینده‌گی آنها در طبیعت و همچنین عوارض سوء این مواد روی انسان (سرطان‌ها، ناقص‌الخلقه‌زایی و ...) و سایر اجزاء اکوسیستم آب و خاک، مصرف می‌شوند (علیشاهی و همکاران، ۱۳۹۰).

ترکیبات طبیعی دارویی با وجود تاثیر کند اثر بسیار پایدارتری در مقایسه با سایر داروها دارند. این مواد به علت دارا بودن مواد مؤثره مختلف، می‌توانند در درمان بسیاری از بیماری‌ها کاربرد داشته باشند، بدون آنکه مجموعه مواد مؤثره آنها با هم تداخل اثر داشته باشند. همچنین این مواد مؤثره همواره از یک حالت تعادل بیولوژیک برخوردارند و لذا در بدن انباشته نشده و اثرات جانبی بر جای نمی‌گذارند (توکلی و همکاران، ۱۳۸۹ و شوهانی و همکاران، ۱۳۸۸).

یکی از این مواد طبیعی، بره‌موم زنبورعسل (propolis) است. بره‌موم ماده‌ای است با خواص دارویی که امروزه در برخی کشورها از محلول الکلی آن، جهت درمان انواع بیماری‌های انسانی و دامی استفاده می‌شود (اشراقی و والافر، ۱۳۸۲). این ماده در کشور ما به صورت ناشناخته باقی مانده و فقط مقدار اندکی از آن به خارج از کشور صادر می‌شود. بره‌موم در درمان بیماری‌های مختلفی مانند آرتريت و دردهای عضلانی، مشکلات تنفسی، بیماری‌های پوستی، سوختگی‌ها، زخم‌ها، تبخال، سندرم خستگی مزمن، سرفه و سرماخوردگی، مشکلات دندانی، بیماری‌های گوش، آلرژی، مشکلات زنانه، اختلالات گوارشی و التهاب کولون به‌کار رفته و در حفظ سلامت بدن و سیستم ایمنی کاربرد داشته است (بصیری، ۱۳۸۷ و سیدی، ۱۳۸۸).

باریج اسانس کاشان مشتمل بر PEG400، کرودرت، آب، پروپیلن گلوکز و اتانول می‌باشد.

طرح آزمایش

روزانه ۱ میلی‌لیتر از محلول‌های مختلف در غلظت‌های مورد بررسی صفر، ۲، ۵ و ۱۰ درصد در ۵ تیمار و ۳ تکرار استفاده گردید. یک تیمار تحت عنوان مواد حامل (مواد افزوده به بره موم به منظور انحلال در آب) نیز در نظر گرفته شد.

آماده‌سازی تانک آزمایش

ابتدا تانک‌هایی با ظرفیت ۳۵ لیتر آب انتخاب و در آن از آب لوله‌کشی شهر که ۴۸ ساعت پس از آبیگری به منظور ته‌نشینی کلر صورت گرفته است استفاده گردید. از فیلتر اسفنجی (MA-F009) شرکت ماهیران مجهز به ورودی و خروجی هوا، لوله خروجی هوا و آب، مخزن پخش هوا و سرپوش کارتریج اسفنج و بخاری (MH-71R) شرکت ماهیران و پمپ فیلتر اسفنجی smart pump-SB-1350 در هر آکواریوم استفاده گردید که از ۴۸ ساعت پیش از انتقال ماهیان آماده سازی شدند.

ماهیان مورد آزمایش از یک مزرعه ماهیان گرمابی در قصر شیرین در استان کرمانشاه خریداری شده و با استفاده از پمپ‌های هوادهی انتقال داده شد. مکان آزمایش، آزمایشگاه شیلات دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه (۱۳۹۲) در نظر گرفته شد. پس از هم‌دماسازی آب تانک‌ها با آب کیسه‌های حامل ماهی از کارگاه، انتقال ماهیان به این تانک‌ها صورت گرفت. ۲۴ ساعت اولیه بدلیل استرس ناشی از جابجایی غذادهی صورت نگرفت.

همچنین بر اساس مطالعات صورت گرفته عصاره اتانولی بره‌موم دارای ویژگی‌های متعددی از جمله خواص ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضدالتهابی، ضدویروسی، محرک سیستم ایمنی و نیز بی‌حس‌کنندگی می‌باشد (Paintz and Metzne, 1979). مهدیزاده و همکاران، (۱۳۸۳).

در این تحقیق تاثیر غلظت‌های مختلف بره‌موم (تهیه شده از شرکت دارویی باریج اسانس کاشان) صفر (شاهد)، ۲، ۵ و ۱۰ درصد و نیز مواد حامل، بر روند ترمیم زخم پوستی، پاسخ ایمنی و بقاء در بچه‌ماهی کپور معمولی مورد بررسی قرار گرفت.

کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) به علت ویژگی‌های منحصر به فرد در بیشتر کشورهای دنیا پرورش داده می‌شود و در ایران نیز یکی از گونه‌های با اهمیت و پرطرفدار ماهیان گرمابی به شمار می‌آید.

هدف از این مطالعه بررسی تاثیر بره‌موم بر روند بهبود زخم و پاسخ سیستم ایمنی (با توجه به تعداد گلبول‌های سفید و قرمز و شمارش افتراقی آنها) در ماهی کپور معمولی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه اسانس بره موم زنبور عسل

برای استفاده بهتر از خواص بره‌موم، به عصاره‌گیری آن نیاز است. محلول دارای ۷۰ درصد الکل (اتانول)، فعال‌ترین محلول برای عصاره‌گیری بره‌موم است هرچند که عصاره‌گیری با پروپیلن‌گلیکول و آب نیز انجام می‌شود (بصیری، ۱۳۸۷؛ سیدی، ۱۳۸۸). ظرف پلاستیکی برای توزیع بره موم به دلیل عدم واکنش انتخاب گردید. ترکیبات مواد حامل بره‌موم از شرکت

محل زخم در زیر باله پشتی ماهیان بر پهلوئی بالایی (سمت چپ بدن) انتخاب گردید. طول زخم $1 \pm 7/67$ و عرض $1 \pm 3/4$ میلی متر مربع در نظر گرفته شد. از بلند کردن فلس و لایه زیرین آن توسط تیغ اسکالپل استریل استفاده شد و سپس با سرم فیزیولوژی سدیم کلراید $0/9$ درصد استریل (شرکت ثامن ایران- مشهد) شستشو و به همان تانک انتقال داده شده تا به هوش بیایند. 24 ساعت پس از ایجاد زخم از حمام کوتاه مدت بره موم در غلظت‌های صفر، 2 ، 5 و 10 درصد و نیز مواد حامل استفاده گردید و سپس با ساچوک در نظر گرفته شده برای هر تانک ماهی به تانک مربوطه انتقال داده شد. این کار روزانه در ساعت معینی در روز انجام گردید. در طول انجام طرح، سطح زخم (طول زخم \times عرض زخم) در روزهای 0 ، 8 ، 13 ، 17 و 22 با کولیس دیجیتال اندازه‌گیری شد و سپس جهت بررسی دقیق‌تر روند ترمیم نسبی زخم‌ها از آزمایشات هیستوپاتولوژیک و تهیه مقاطع بافتی از نمونه‌ها و آزمایش خون استفاده گردید. درصد ترمیم زخم نیز با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد بهبودی زخم} = \frac{\text{سطح زخم در روز اول} - \text{سطح زخم در روز مورد نظر}}{\text{سطح زخم در روز اول}} \times 100$$

(توکلی و همکاران، ۱۳۸۹)

میکرولیتر) گردید. هپارین 5000 واحد در میلی لیتر از شرکت داروسازی کاسپین به منظور جلوگیری از انعقاد خون استفاده گردید. خونگیری از ماهی در روزهای صفر، 10 و 20 انجام شد (لازم به ذکر است تیمارهای با تلفات زیاد از مطالعه خارج شدند).

48 ساعت پس از انتقال ماهی و رفع استرس، کار طرح شروع گردید. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با 5 تیمار و 3 تکرار، هر تیمار شامل 25 قطعه ماهی کپور 8 ± 15 گرمی با غلظت‌های درمانی صفر، 2 ، 5 و 10 درصد و مواد حامل (موادی که توسط شرکت باریج اسانس کاشان برای انحلال این ترکیب روغنی به آب اضافه گردیده است) به صورت محلول انجام گردید. روزانه 2 بار غذاهای کنسانتره (لوفاک فرانسوی با ترکیب غذایی 41 درصد پروتئین، $6/5$ درصد چربی، 5 درصد فیبر و 12 درصد رطوبت) در ماهیان انجام شد.

اطلاعات آب مورد استفاده مشتمل بر درجه حرارت 26 درجه سلسیوس، اکسیژن 10 ppm، pH 7 تا $7/5$ بود. طول دوره 21 روز در نظر گرفته شد. تلفات و ویژگی‌های رفتاری و شکلی نیز در ماهیان در هر روز ثبت گردید.

ایجاد زخم در ماهیان و چگونگی انجام طرح

ماهیان هر تانک با پودر گل میخک به میزان 3 گرم در 10 لیتر آب، بیهوش شدند.

خونگیری

جهت خونگیری هر ماهی به صورت جداگانه گرفته شد. پس از بیهوش نمودن با استفاده از اسانس گل میخک بلافاصله بدن ماهی را خشک کرده و سپس با استفاده از یک سرنگ استریل اقدام به خونگیری از انتهای ورید ساقه دم به میزان $0/5$ میلی لیتر (500

بررسی میزان بقا در تیمارهای مختلف

$$\text{درصد بقا (SP)} = \frac{\text{تعداد ماهیان موجود} \times 100}{\text{تعداد ماهیان اولیه}}$$

روش آماری

به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار آماری Spss17 استفاده شد. ابتدا از تجزیه واریانس یک‌طرفه (ANOVA) جهت مقایسه میانگین‌ها استفاده شد و در مواردی که بین میانگین‌ها اختلاف معنی داری وجود داشت از آزمون Tukey جهت جدا کردن آنها استفاده گردید. نتایج در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($p < 0.05$) از لحاظ آماری متفاوت قلمداد گردید.

یافته‌ها

مطالعه سطح زخم

سطح زخم در روزهای مورد نظر با کولیس دیجیتالی ثبت گردید (جدول ۱).

در هر مرحله از ۴ ماهی در هر تانک در میکروتیوب‌ها پاره شده، نمونه خونی تهیه شد. نمونه مورد نظر در کنار یخ خشک سریعاً به آزمایشگاه برای مطالعات خونی انتقال داده شد و در آنجا به روش رنگ‌آمیزی و لام نئوبار اقدام به شمارش آنها گردید.

بررسی بافتی

در روزهای صفر و ۱۰، سه نمونه از هر تیمار به صورت تصادفی انتخاب شد و نمونه بافتی به شکل مربع از تمام ضخامت محل ترمیم زخم به همراه پوست سالم اطراف زخم با استفاده از قیچی و اسکالپل گرفته شد (بنایی و همکاران، ۱۳۹۰) و به منظور جلوگیری از اتولیز بافتی در فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفت. همچنین به منظور مطالعات بافت شناسی، با استفاده از دستگاه میکروتوم از نمونه‌ها مقاطع بافتی به قطر ۶ میکرومتر تهیه گردید و رنگ آمیزی نمونه‌ها با استفاده از هماتوکسیلین - ائوزین انجام گرفت.

جدول ۱- متوسط سطح زخم بر حسب سانتی‌متر مربع در تیمارهای مورد نظر بره‌موم در روزهای مختلف نمونه‌برداری

روز	روز ۰	روز ۸	روز ۱۳	روز ۱۷	روز ۲۲
شاهد	۰/۲۶	۰/۲۱ ^a	۰/۱۳ ^a	۰/۱۰ ^a	۰/۰۶ ^a
حامل	۰/۲۶	۰/۲۱ ^a	۰/۱۳ ^a	۰/۱۰ ^a	*
۲ درصد	۰/۲۶	۰/۱۵ ^b	۰/۰۹ ^b	۰/۰۴ ^b	۰/۰۱ ^b
۵ درصد	۰/۲۶	۰/۱۱ ^c	۰/۰۶ ^c	*	*
۱۰ درصد	۰/۲۶	۰/۰۸ ^d	۰/۰۵ ^c	*	*

حروف مختلف در هر ستون، معنی‌دار بودن اختلاف را از نظر آماری نشان می‌دهد ($p < 0.05$).

* به دلیل تلفات زیاد، از مطالعه حذف شدند.

مقایسه میانگین سطح زخم در روز ۸

آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد که در روز ۸ میانگین سطح زخم در پنج گروه شاهد، حامل، ۲، ۵ و ۱۰ درصد از نظر آماری اختلاف معنی‌داری دارد ($p < 0.05$).

لازم به ذکر است در تیمار ۱۰ درصد بره‌موم به میزان زیاد و به نسبت کمتر در تیمار ۵ درصد پس از حمام دادن در برخی نمونه‌ها خونریزی پوستی و در تیمار ۱۰ درصد، حرکات شدید به دور خود مشاهده گردید که در برخی روزها تلفات هم مشاهده شد.

همچنین در آزمون تعقیبی Tukey نشان داده شد که میانگین سطح زخم فقط در گروه شاهد با گروه حامل اختلاف معنی داری ندارد ($p > 0.05$).

مقایسه میانگین سطح زخم در روز ۱۳

آزمون آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که در روز ۱۳ میانگین سطح زخم در ۵ گروه شاهد، حامل، ۲، ۵ و ۱۰ درصد از نظر آماری اختلاف معنی داری دارد ($p < 0.05$).

همچنین در آزمون Tukey نشان داده شد که میانگین سطح زخم نیز فقط در گروه شاهد با گروه حامل اختلاف معنی داری ندارد ($p > 0.05$).

مقایسه میانگین سطح زخم در روز ۱۷

آزمون آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که در روز ۱۷ میانگین سطح زخم در ۳ گروه شاهد، حامل و ۲ درصد از نظر آماری اختلاف معنی داری دارد ($p < 0.05$). همچنین در آزمون Tukey نشان داده شد که میانگین سطح زخم در گروه شاهد با گروه حامل اختلاف معنی داری ندارد ($p > 0.05$).

مقایسه میانگین سطح زخم بین دو گروه شاهد و ۲ درصد در روز ۲۲

آزمون T مستقل نشان داد که در دو گروه شاهد و ۲ درصد از نظر آماری تفاوت معنی داری وجود دارد ($p < 0.05$). نتایج مربوط به مطالعه خونی (جدول ۲ تا ۴).

جدول ۲- شمارش تفریقی گلبول‌های خونی در ماهی کپور معمولی در روز ۱۰ در غلظت‌های مختلف بره‌موم

فاکتور خونی تیمار	هتروفیل	لمفوسیت	مونوسیت	ائوزوفیل	بازوفیل	گلبول قرمز ($\times 10^6$)	گلبول سفید ($\times 10^3$)
شاهد	21 ± 0.81^a	$70/75+2/62^a$	$4/75+1/5^a$	$3+1/15^a$	$1+0^a$	$3/35+0.23^a$	$24/23+0.18^a$
حامل	$20 \pm 1/41^a$	$73/5+2/12^a$	$3/5+0/7^a$	$2+0^a$	$1+0^a$	$4/25+0.07^b$	$21/9+0.28^a$
۲	$20/25 \pm 3/30^c$	$73/5+4/65^c$	$4/25+0/5^a$	$1/5+0/57^b$	$1+0^a$	$3/57+0.27^a$	$25/53+3/19^a$
۵	$19/5 \pm 0/7^c$	$75/5+0/7^c$	$4+0^a$	$1+0^b$	$1+0^a$	$4/35+0.21^b$	$27/6+0.2/82^a$
۱۰	$29/5 \pm 0/7^b$	$6+0^b$	$4/5+0/7^a$	$4+0^c$	$2+0^a$	$4/65+0.07^b$	$28/2+1/41^a$

جدول ۳- شمارش افتراقی گلبول‌های خونی در ماهی کپور معمولی در روز ۱ در تیمار شاهد (با ایجاد زخم) و مخزن (بدون زخم)

فاکتور خونی تیمار	هتروفیل	لمفوسیت	مونوسیت	ائوزوفیل	بازوفیل	گلبول قرمز ($\times 10^6$)	گلبول سفید ($\times 10^3$)
شاهد	$22/75+1/2$	$70/75+0/95$	$3/25+0/5$	$2/25+0/75$	$1+0$	$3/21+0.08$	$23/13+2/05$
مخزن	$28/5+0/7$	$68/5+0/7$	$1/5+7/70$	$1+0$	$1+0$	$2/95+0.07$	$26/7+5/65$

جدول ۴- شمارش افتراقی گلبول‌های خونی در ماهی کپور معمولی در روز ۲۰ در غلظت‌های مختلف بره‌موم (تیمارهای با تلفات پایین مورد بررسی قرار گرفته است)

فاکتور خونی تیمار	هتروفیل	لمفوسیت	مونوسیت	ائوزوفیل	بازوفیل	گلبول قرمز ($\times 10^6$)	گلبول سفید ($\times 10^3$)
۲درصد	$23/25+2/21$	$69/5+3/1$	$3/5+1/29$	$2/75+0/5$	$1/25+0/5$	$4/05+0/2$	$26/67+1/8$

حروف مختلف در هر ستون، معنی دار بودن اختلاف را از نظر آماری نشان می‌دهد ($p < 0.05$).

مقایسه تعداد گلبول‌های قرمز خون در روز ۱۰ (جدول ۲)

آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد که میانگین تعداد گلبول‌های قرمز خون در ۵ گروه شاهد، حامل، ۲ درصد، ۵ درصد و ۱۰ درصد از نظر آماری تفاوت معنی‌داری دارد ($p < 0/05$).

آزمون تعقیبی Tukey نشان داد که میانگین تعداد گلبول‌های قرمز خون در گروه شاهد و گروه حامل تفاوت معنی‌داری دارد ($p < 0/05$) و فقط گروه شاهد و گروه ۲ درصد تفاوت معنی‌داری ندارد ($p > 0/05$).

مقایسه تعداد سلول‌های هتروفیل در روز ۱۰ (جدول ۲)

آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد که میانگین تعداد سلول‌های هتروفیل در ۵ گروه شاهد، حامل، ۲ درصد، ۵ درصد و ۱۰ درصد از نظر آماری تفاوت معنی‌داری دارد ($p < 0/05$).

آزمون تعقیبی Tukey نشان داد که در میانگین تعداد سلول‌های هتروفیل در گروه شاهد و حامل با گروه ۱۰ درصد تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($p < 0/05$). همچنین در گروه ۵ درصد با ۱۰ درصد تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($p < 0/05$).

مقایسه تعداد لمفوسیت‌ها در روز ۱۰ (جدول ۲)

آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد که میانگین تعداد لمفوسیت‌ها در ۵ گروه شاهد، حامل، ۲ درصد، ۵ درصد و ۱۰ درصد از نظر آماری تفاوت معنی‌داری دارد ($p < 0/05$).

آزمون تعقیبی Tukey نشان داد که میانگین تعداد لمفوسیت‌ها در گروه شاهد و ۱۰ درصد و نیز گروه حامل و ۱۰ درصد تفاوت معنی‌داری دارد ($p < 0/05$). همچنین در گروه ۲ درصد با گروه ۱۰ درصد و نیز در

گروه ۵ درصد و گروه ۱۰ درصد تفاوت آماری معنی‌داری وجود دارد ($p < 0/05$).

مقایسه تعداد سلول‌های مونوسیت در روز ۱۰ (جدول ۲)

آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد که میانگین تعداد مونوسیت‌ها در ۵ گروه شاهد، حامل، ۲ درصد، ۵ درصد و ۱۰ درصد از نظر آماری تفاوت معنی‌داری ندارد ($p > 0/05$).

مقایسه تعداد سلول‌های ائوزینوفیل در روز ۱۰ (جدول ۲)

آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد که میانگین تعداد ائوزینوفیل‌ها در ۵ گروه شاهد، حامل، ۲ درصد، ۵ درصد و ۱۰ درصد از نظر آماری تفاوت معنی‌داری دارد ($p < 0/05$).

آزمون تعقیبی Tukey نشان داد که میانگین تعداد ائوزینوفیل‌ها در گروه ۲ درصد و ۱۰ درصد و نیز در گروه ۵ درصد و ۱۰ درصد تفاوت معنی‌داری دارد ($p < 0/05$).

مقایسه تعداد گلبول‌های سفید خون در روز ۱۰ (جدول ۲)

آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد که میانگین تعداد گلبول‌های سفید در ۵ گروه شاهد، حامل، ۲، ۵ و ۱۰ درصد از نظر آماری تفاوت معنی‌داری ندارد ($p > 0/05$).

مقایسه میانگین تعداد تلفات (جدول ۵)

آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد که میانگین تعداد تلفات در ۵ گروه شاهد، حامل، ۲، ۵ و ۱۰ درصد از نظر آماری اختلاف معنی‌داری دارد ($p < 0/05$).

آزمون تعقیبی Tukey نشان داد که میانگین تعداد تلفات در گروه شاهد و حامل با گروه ۱۰ درصد اختلاف معنی‌داری دارد ($p < 0/05$).

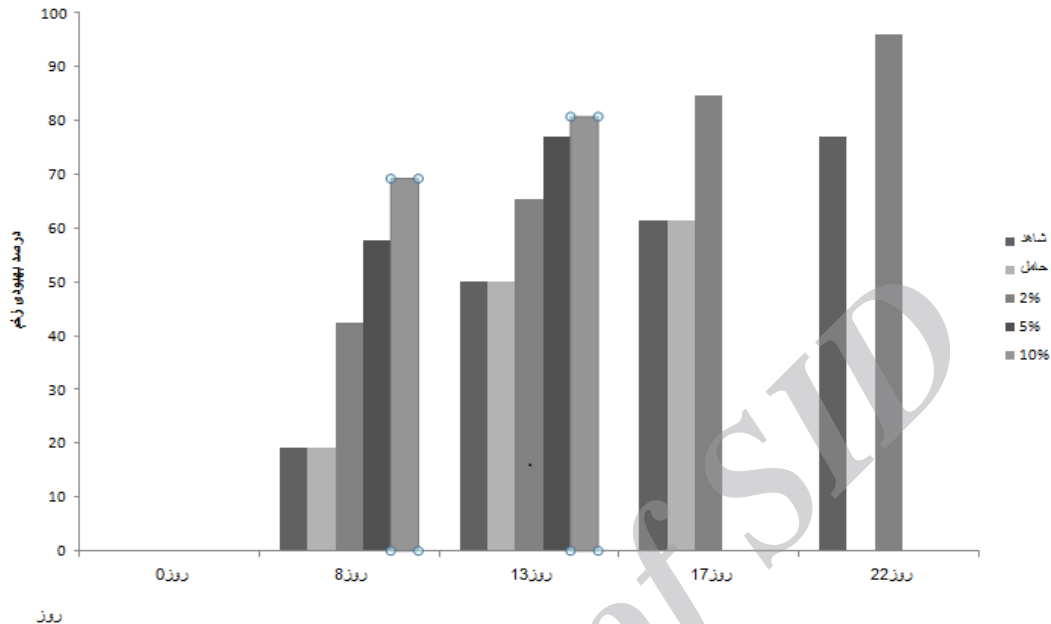
جدول ۵- تلفات ماهیان در روزهای مختلف نمونه برداری در تیمارهای مختلف (درصد)

روز	تیمار	شاهد	حامل	۲	۵	۱۰
۱	۹۸/۶	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۴/۶
۲	۹۶	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۸۵/۳
۳	۹۶	۹۸/۶	۹۸/۶	۹۸/۶	۹۸/۶	۷۷/۳
۴	۹۶	۹۴/۶	۹۸/۶	۹۸/۶	۹۸/۶	۷۳/۲
۵	۶/۹۴	۹۲	۹۸/۶	۹۸/۶	۹۶	۶۸
۶	۹۲	۹۲	۹۲	۷۳/۳	۸۹/۳	۶۶/۶
۷	۹۲	۸۹/۳	۸۹/۳	۹۷/۳	۸۱/۳	۶۲/۶
۸	۹۲	۸۸	۸۸	۹۶	۷۷/۳	۴۸
۹	۹۰/۶	۸۶/۶	۸۶/۶	۹۶	۷۰/۶	۴۴
۱۰	۸۹/۳	۷۴/۶	۷۴/۶	۹۴/۶	۶۵/۳	۲۸
۱۱	۸۸	۷۴/۶	۷۴/۶	۹۴/۶	۶۱/۳	۲۴
۱۲	۸۸	۶۴	۶۴	۹۳/۳	۵۶	۱۰/۶
۱۳	۸۴	۶۱/۳	۶۱/۳	۹۲	۵۲	
۱۴	۸۴	۵۸/۶	۵۸/۶	۹۲	۵۲	
۱۵	۸۴	۵۸/۶	۵۸/۶	۸۴	۴۸	
۱۶	۸۴	۵۶	۵۶	۷۷/۳	۴۵/۳	
۱۷	۸۴	۶۸	۶۸	۴۱/۳	۴۱/۳	
۱۸	۸۲/۶	۶۲/۶	۶۲/۶			
۱۹	۸۲/۶	۵۴/۶	۵۴/۶			
۲۰	۸۲/۶	۴۶/۶	۴۶/۶			

درصد بهبودی زخم

درصد ترمیم زخم نیز با استفاده از رابطه موجود در روش کار محاسبه گردیده و نتایج در نمودار ۱ ارائه

گردیده است. در روزهای پایانی فقط در گروه شاهد و ۲درصد میزان بقا محاسبه گردید و بقیه تیمارها بدلیل تلفات زیاد حذف شدند.



نمودار ۱- مقایسه درصد بهبودی زخم در تیمارهای مختلف بره‌موم در ماهیان کپور در روزهای مختلف نمونه‌برداری

نتایج مطالعات بافتی

در استفاده از غلظت‌های ۲، ۵ و ۱۰ درصد از بره‌موم روند التیام شکل گرفته که به ترتیب در غلظت ۲ درصد بره‌موم، التیام خفیف‌تر و در غلظت ۵ درصد، از التیام متوسط و در ۱۰ درصد از التیام بهتری برخوردار بوده و لایه‌های عضلانی زیرین در حال نوزایش می‌باشند.

در تیمار شاهد: روند التیام آغاز و بافت همبند در محل تشکیل شد. نکرروز در عضلات و افزایش رگ‌های خونی در محل مشاهده گردید.

در تیمار حامل: اپیدرم جدید شکل گرفته ولی از ضخامت کافی برخوردار نبوده و تعداد سلول‌های جامی شکل بافت پوششی پوست نیز اندک بود.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج مشاهدات بافتی و خونی نشان داد که در مقایسه با تیمار کنترل، استفاده از بره‌موم زنبور عسل در غلظت ۲ درصد تاثیر معنی‌داری در روند ترمیم زخم پوستی و نیز تحریک سیستم ایمنی در ماهی کپور پرورشی دارد.

تغییرات خصوصیات خون ماهیان در پاسخ به شرایط زیست محیطی، پاسخی است بر استرس‌های محیطی و می‌تواند به‌عنوان یک شاخص مهم زیستی مد نظر قرار گیرد. اجزاء سلول‌های خون شامل گلبول‌های قرمز (اریتروسیت‌ها) و گلبول‌های سفید (لوکوسیت‌ها) می‌باشد.

دامنه طبیعی گلبول قرمز در این نوع ماهی ۲/۵ تا ۳/۵ میلیون و در مورد گلبول سفید ۲۰ تا ۳۲ هزار است که

در مطالعه بیرقदार (۱۳۸۷) تأثیر سطوح مختلف عصاره الکلی بره موم در سطوح صفر (شاهد)، ۰/۵، ۱/۵، ۴/۵ و ۹ گرم عصاره بره موم بر پارامترهای رشد و ترکیب شیمیایی لاشه (رطوبت، پروتئین و چربی)، شاخص‌های سلامت (فاکتورهای خونی هموگلوبین و همتوکریت) و پارامترهای بیوشیمیایی سرم و نیز سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از عصاره الکلی بره موم در جیره بر عملکرد رشد و سلامت ماهیان مورد آزمایش تأثیر نداشت، اما استفاده از این ماده با تغییر نوتروفیل سبب تحریک سیستم ایمنی گردید (بیرقदार کشکولی، ۱۳۸۷). در تحقیق حاضر نیز تعداد نوتروفیل در تیمار ۱۰ درصد به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است.

میانگین سطح زخم، ابتدا در تیمار ۱۰ درصد و سپس در تیمارهای ۲ و ۵ درصد بهتر بود اما در طول دوره علی‌رغم بهبود زخم در تیمار ۵ و ۱۰ درصد در مقایسه با تیمار ۲ درصد در بررسی کلیه پارامترهای مورد مطالعه، بهترین تیمار، غلظت ۲ درصد بره موم بود.

در تیمار ۲ و ۵ درصد تعداد لمفوسیت اختلاف معنی‌داری نداشت اما تعداد لمفوسیت‌ها در تیمار ۱۰ درصد کاهش یافت. تعداد لمفوسیت در ارتباط با پاسخ‌های ایمنی میزبان می‌باشد.

اِئوزینوفیل در تیمار ۱۰ درصد بیشتر از بقیه تیمارها افزایش یافت که می‌تواند واکنش به این ترکیب را نشان دهد زیرا، اِئوزینوفیل در آلرژی‌ها و مشکلات پوستی و حتی استرس‌ها افزایش دارد (Sforcin, 2007).

تلفات در مجموع در تیمار ۱۰ درصد بیشتر بود که تا روز ۱۲ فقط ۱۰/۶ درصد زنده ماندند و در تیمار ۵

این دو پارامتر در ماهی مورد آزمایش در روز ۱ عادی بوده اما در روز ۱۰ نمونه‌برداری در تیمار ۲، ۵ و ۱۰ درصد تعداد گلبول‌های قرمز به‌ویژه در تیمار ۵ و ۱۰ درصد بیشتر از حد مجاز اما در گلبول سفید در حد مجاز مشاهده گردید. در روز ۲۰ مطالعه فقط تیمار ۲ درصد از نظر تعداد گلبول‌ها در حد قابل قبولی بودند بطوری‌که تعداد گلبول‌های سفید در حد طبیعی اما تعداد گلبول‌های قرمز اندکی افزایش یافت.

افزایش دما در ماهیان کپور سرگنده، کپور نقره‌ای، ماهی حوض و کپور معمولی موجب افزایش گلبول‌های قرمز می‌شوند. قندخون ماهی کپور معمولی با تغییرات اکسیژن و استرس، حرارت و همچنین افزایش شوری آب ارتباط معنی‌داری دارد (رحیمی بشر و همکاران، ۱۳۸۶). در این تحقیق نیز استفاده از بره موم در غلظت‌های ۱۰ و بمیزان کمتر ۵ درصد سبب فعالیت شدیدتر ماهیان و احتمالاً افزایش دما در بدن آنها گردید که افزایش در تعداد گلبول قرمز و کمی خونریزی پوستی هم مشاهده شد.

تعداد لوکوسیت‌ها بعنوان شاخص سلامت در ماهی محسوب می‌شود. بره موم سبب افزایش نوتروفیل در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان گردیده و نیز عصاره خارمریم در کپور معمولی به‌صورت خوراکی سبب افزایش تعداد گلبول سفید می‌گردد (علیشاهی و همکاران، ۱۳۹۰) اما در این تحقیق در دامنه طبیعی گلبول سفید تاثیر معنی‌داری مشاهده نگردید.

در ماهی سفید افزایش دما و کاهش اکسیژن سبب افزایش گلبول قرمز می‌گردد و استرس ناشی از تاثیر شوینده در ماهی حوض سبب افزایش گلبول قرمز می‌شود (شاهسونی و همکاران، ۱۳۸۲).

خاصیت ضد التهابی بوده و در مجموع بره‌موم به‌عنوان افزایش‌دهنده فاکتورهای محافظتی و آنتی‌اکسیدانی عمل می‌کند (Pillai et al., 2010) و سبب تحریک سیستم ایمنی و اثرات ضد سرطانی در موش می‌گردد. همچنین، سیستم‌های آنزیمی و متابولیسم سلولی تشکیل کلاژن را تحریک کرده و سبب بهبود زخم سوختگی می‌گردد این تاثیرات به‌دلیل وجود آرژینین در بره‌موم است (Ghisalberti, 1979).

مطالعات اندکی در مورد ترمیم زخم‌های ماهی با مواد طبیعی انجام شده است. مثلاً عصاره گیاه اکالیپتوس در کپور علف‌خوار سبب تسریع بهبود زخم پوستی و کاهش بار باکتریایی و تحریک سیستم ایمنی گردید (غفوری روزبهانی و همکاران، ۱۳۹۲).

استفاده از سیر در ترمیم زخم ماهی کپور سبب گردید زخم‌ها پس از ۳ هفته بهبود یابند در صورتی که در تیمار شاهد پس از ۴ هفته بهبودی حاصل نشده بود (کاظم‌پور و همکاران، ۱۳۸۴). در تحقیق حاضر نیز تسریع در بهبود زخم‌های پوستی در ماهی کپور مشاهده گردید.

از مجموع نتایج چنین برمی‌آید که استفاده از ۲ درصد بره‌موم بهترین نتایج را از نظر بهبود زخم و فاکتورهای خونی و بقاء به‌دنبال دارد و به‌نظر می‌رسد استفاده از بره‌موم را بایستی در غلظت‌های کمی بالاتر از ۲ درصد به‌طور دیگری و یا با ترکیبات غذایی همراه کرد تا خونریزی، تلفات و ... از بین برود که همگی می‌توانند زمینه‌ای برای مطالعات آینده باشد.

فعالیت ضدباکتریایی بره‌موم بر اساس روش استخراج، حلال‌ها، منطقه جغرافیایی و فصل متفاوت است. روش‌های مختلف حل کردن بره‌موم در فعالیت

درصد تا روز ۱۷، ۱/۳ درصد، در تیمار ۲ درصد تا روز ۲۰، ۶/۶ درصد، در تیمار حامل تا روز ۱۶، ۵۶ درصد و در تیمار شاهد تا روز آخر دوره ۸۲/۶ درصد باقی‌مانده بود (روزهای متفاوتی که ذکر گردید به‌دلیل تلفات زیاد آخر دوره در تیمار مورد بررسی در نظر گرفته شده است).

فیتوبیوتیک‌ها تیمار جدیدی از تولیدات طبیعی با تاثیرات مفید روی حیوانات و کیفیت تولیدات آنها هستند. در مرغ تخم‌گذار تغذیه شده با اسانس پونه کوهی و بره‌موم تفاوت معنی‌داری در طعم و بوی این تخم‌مرغ‌ها با تیمار شاهد که معمولی و بدون افزودنی تغذیه شده بودند، ایجاد شد. همچنین کاهش بار باکتریایی کلی فرم نیز ایجاد گردید و تغذیه با بره‌موم سبب وزن سنگین‌تر تخم‌مرغ‌ها و با اسانس سبب کاهش وزن زرده گردید (Arpasova et al., 2013). بره‌موم در درازمدت در صورت همراه شدن با ترکیبات غذایی می‌تواند بر وزن ماهیان هم بررسی گردد (خالقی‌میران و همکاران، ۱۳۸۹).

استفاده از بره‌موم در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان سبب کاهش در مرگ‌ومیر تخم ماهی، رشد عضلانی سریع در مقایسه با تیمار شاهد و در مجموع به‌عنوان عاملی در بهبود پرورش ماهی است (Velotto et al., 2010).

بره‌موم حاوی فلاونوئید و ترکیبات فنولی است. فلاونوئیدها به‌عنوان آنتی‌اکسیدان در کاهش استرس ناشی از بیماری‌ها و سموم مطرح هستند (Kakoolaki et al., 2013). تاثیر عصاره اتانولی بره‌موم روی موش صحرایی سبب بهبود زخم معده و کاهش pH معده گردید. فلاونوئید و ترکیبات فنولی موجود در آن سبب

آن تاثیر می‌گذارد (Sforcin, 2007). لذا، می‌توان تحقیقات روی موجودات را با انواع مختلف آن بررسی نمود.

دانشگاه به جهت تصویب این طرح تحقیقاتی سپاسگزاری کرده و همچنین از شرکت باریج اسانس کاشان به جهت تامین بره موم مورد استفاده در طرح تشکر و قدردانی می‌گردد و از دانشجویان رشته شیلات آقایان سعید پهلوانی و محمد صالح تمسکی و خانم‌ها الهام نظافتیان و محیا رضایی‌منش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

سپاسگزاری

این تحقیق از طرح پژوهشی تصویب شده در دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه استخراج گردیده و با اعتبارات پژوهشی این واحد به انجام رسیده است که بر خود لازم می‌دانیم از شورای محترم پژوهشی این

منابع

- اشراقی، س. و والا، ش. (۱۳۸۲). اثر ضدباکتریایی بره موم بر گونه‌های بیماری نوکاردیا. مجله دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، سال ۱۱، شماره ۲، صفحات: ۴۸-۴۲.
- بنایی، م.، میرواقفی، الف.، مجازی امیری، ب.، رفیعی، غ. و نعمت‌دوست، ب. (۱۳۹۰). بررسی خون‌شناسی و آسیب‌شناسی بافتی در مسمومیت تجربی با دیازینون در ماهی کپور معمولی. نشریه شیلات مجله منابع طبیعی ایران، دوره ۶۴، شماره ۱، صفحات: ۱-۱۳.
- بصیری، م. ر. (۱۳۸۷). فرآوری محصولات زنبورعسل. انتشارات آموزش عالی علمی کاربردی جهاد دانشگاهی.
- بیرقدارکشکولی، الف. (۱۳۸۷). تأثیر عصاره موم بر عملکرد جیره، بازماندگی و برخی فاکتورهای خونی بچه ماهیان انگشت قد قزل آلی رنگین کمان، پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه صنعتی اصفهان.
- توکلی، م.، عرب، ف.، محمودی، م.، جعفری، ه.، توکلیان، و. و کمالی، م. (۱۳۸۹). اثر عصاره هیدر الکلی درمنه کوهی بر روند بهبود زخم پوستی موش صحرائی. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دوره ۲۰، شماره ۷۷، صفحات: ۲۴-۱۷.
- خالقی میران، م.، کریمی، م.، بسامی، م. و رجبی، ج. (۱۳۸۹). تأثیر فیتویوتیک جمع‌آوری شده توسط زنبور عسل بر سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی، اولین همایش ملی فن‌آوری‌های نوین در کشاورزی و منابع طبیعی.
- رحیمی بشر، م.، تهرانی فرد، الف.، قاسمی نژاد، الف.، علیپور، و. و فلاح، م. (۱۳۸۶). تعیین برخی از فاکتورهای خونی ماهی سفید دریای خزر در مراحل مختلف رشد گنادی. مجله علوم زیستی واحد لاهیجان - سال اول، پیش شماره ۳، زمستان ۱، صفحات: ۵۶-۴۵.
- سیدی، م. (۱۳۸۸). بره موم داروی طبیعی از کندوی زنبور عسل. نشر نصح.

- شاهسونی، د.، مهري، م. و نصری، ن. (۱۳۸۲). بررسی تاثیر ماده شوینده آنیونی شامپو بر پارامترهای خونی ماهی حوض. مجله پژوهش و سازندگی، شماره ۶۱، صفحات: ۹۹-۱۰۳.
- شوهانی، ب.، همتی، الف. و طاهری مقدم، م. (۱۳۸۸). بررسی اثر التیام بخشی عصاره هیدر الکلی گیاه تشنه‌داری (*Scrophularia striata*) بر روی زخم باز پوستی خرگوش. دانشگاه علوم پزشکی ایلام، دوره ۱۷، شماره ۴، صفحات: ۹-۱۶.
- علیشاهی، م.، سلطانی، م.، مصباح، م. و اسماعیلی، الف. (۱۳۹۰). تاثیر تجویز خوراکی عصاره خار مریم بر پاسخ ایمنی ماهی کپور معمولی. مجله تحقیقات دامپزشکی، دوره ۶۶، شماره ۳، صفحات: ۲۵۵-۲۶۳.
- غفوری روزبھانی، ه.، زمینی، ع.، وهابزاده ح. و فرخ روز، م. (۱۳۹۲). بررسی اثرات ضد باکتریایی اسانس گیاه اکالیپتوس در بهبود زخم‌های ماهی و کاهش بار باکتریایی پوست بچه ماهیان کپور علفخوار. همایش گیاهان دارویی، تهران، ایران.
- کاظم‌پور، ی.، رضایی، م. و کیوانی، ی. (۱۳۸۴). تاثیر عصاره سیر گل خطمی و بابونه در ترمیم زخم‌های سطحی ماهی کپور معمولی. مجله پژوهش و سازندگی، شماره ۶۶، صفحات: ۹۷-۹۳.
- مهدیزاده، م.، پوررضا، ج.، جوکار، الف. و طهماسبی، غ. (۱۳۸۳). اثر استفاده از بره موم در جیره بر روی عملکرد و سیستم ایمنی مرغان تخمگذار تجارتي. مجله پژوهش و سازندگی، دوره ۱۷، شماره ۳، صفحات: ۷۳-۶۷.
- Arpasova, H., Kacaniova, M., Hascik, P., Cubon, J. and Fikselova, M. (2013). The influence of oregano Essential oil and bee products on qualitative parameters and microbiological indicators of table eggs content. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1;1107-1127.
- Ferguson, M.W. and Leigh, I.M. (1998). *Wound healing textbook of dermatology*. 6th ed. London: Blackwell Science, 1: 337-343.
- Ghisalberty, E. L. (1979). Propolis: A review. *Bee World* 60, pp: 59-84.
- Kakoolaki, Sh., Cakir, O., Ciftci, O. and Ozdemir, I. (2013). Role of propolis on oxidative stress in fish brain. *Basic and Clinical Neuro Science*, 4(2): 45-50.
- Paintz, M. and Metzner, J. (1979). Local anesthetic effect of propolis and some of its constituent's. *Pharmazie*, 34(12): 839-841.
- Pillai, M. (2010). Antiulcerogenic and ulcer healing effects of Indian propolis in experimental rat ulcer models. *Journal of Api Product and Api Medical Science*, 2(1): 21-28.
- Sabistan, W. (1991). *Textbook of surgery*. 14th ed. New York: WB Saunders Company, pp. 171-173.
- Sforzin, J.M. (2007). Propolis and the immune system. *Journal Ethnopharmacol*, 113(1): 1-14.
- Velotto, S., Vitale, C., Varricchio, E. and Crasto, A. (2010). Effect of Propolis on the fish muscular development and histomorphometrical characteristics. *Veterinary Journal. BRNO*, pp: 543-554.