اثرات غلظت‌های سمی عصاره خام آلوئه‌ورا بر برخی شاخص‌های خونی، ایمنی و بافت‌های ماهی کپور معمولی، *Cyprinus carpio*

*مجتبی علیشاهی[۱]، بختیار حیدری[۲] و بابک محمدیان[۳]

[۱]استادیار بخش بیماری‌های آبزیان، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، [۲]دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، [۳]دانش‌آموخته دکتری عمومی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۰/۵ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۲/۲/۲۹

چکیده

در این پژوهش اثرات غلظت‌های بالای عصاره خام آلوئه‌ورا در ماهی کپور معمولی، *Cyprinus carpio* بررسی گردید. به این منظور، تعداد ۲۵۰ قطعه بچه‌ماهی کپور (۱/۲±۲۰ گرم) در معرض غلظت‌های مختلف عصاره خام آلوئه‌ورا قرار گرفتند و تلفات به‌صورت روزانه تا ۹۶ ساعت ثبت گردید. بعد از مشخص شدن LC50 ۹۶ ساعته عصاره خام آلوئه‌ورا با استفاده از نرم‌افزار پروبیت، غلظت‌های ۰/۱٪، ۰/۱٪ و ۰/۲٪ این غلظت، (۰/۸، ۰/٤ و ۰/۲ گرم در لیتر) به همراه تیمار بدون آلوئه‌ورا به‌عنوان کنترل، در آکواریوم‌های جداگانه فراهم شد تعداد ۲۵ ماهی به هر تیمار اضافه شده و به‌مدت ۲۱ روز پرورش با شرایط مشابه انجام گردید. در انتهای دوره از ماهی‌های هر تیمار خون‌گیری به‌عمل آمده و فاکتورهای هماتولوژیک شامل: هماتوکریت، هموگلوبین، تعداد گلبول‌های قرمز و شاخص‌های گلبولی و تعداد گلبول‌های سفید خونی، فاکتورهای ایمنی شامل: فعالیت لیزوزیم و قدرت باکتری‌کشی سرم و فعالیت مسیر آلترناتیو کمپلمان بین تیمارها مقایسه گردید. نمونه‌های بافتی از بافت‌های آبشش، کبد، کلیه و طحال از ۵ ماهی در هر تیمار تهیه گردیده و ضایعات بافت‌شناسی بررسی شد. نتایج نشان داد که فعالیت PCV، Hb، RBC، MCW و فعالیت لیزوزیم سرم در ماهیانی که در معرض ۰/۸ گرم در لیتر آلوئه‌ورا قرار گرفته بودند در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌دار کاهش یافت ($P<0/05$) اما روی پارامترهای دیگری که در معرض آلوئه‌ورا قرار گرفته بودند، اثر معنی‌دار نداشت ($P>0/05$). در بررسی هیستوپاتولوژیک نیز به‌جز ضایعات مختصر آبشش، در سایر بافت‌ها ضایعه پاتولوژیکی مشاهده نگردید. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که بر خلاف اثر مثبت عصاره آلوئه‌ورا در ماهی، این اثرات کاملاً وابسته به غلظت آلوئه‌ورا می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: عصاره آلوئه‌ورا، ماهی کپور معمولی، سمیت، فاکتورهای خونی، فاکتورهای ایمنی

مقدمه

ماهی‌ها با توجه به قرار گرفتن در رده‌های پایین تکاملی نسبت به حیوانات خون‌گرم، سیستم ایمنی غیرمتکاملی دارند به‌طوری‌که ایمنی غیراختصاصی (قابل تحریک توسط محرک‌های ایمنی) در این موجودات کارایی و نقش بیش‌تری در دفاع ایمنی نسبت به سیستم ایمنی اختصاصی (قابل تحریک توسط واکسن‌ها) دارد، بنابراین به‌نظر می‌رسد که استفاده از محرک‌های ایمنی نقش مؤثری در پاسخ‌های ایمنی ماهیان داشته باشد (Cerezuela و همکاران، ۲۰۰۹). از طرف دیگر، به‌علت محدودیت‌های موجود در کاربرد آنتی‌بیوتیک‌ها و همچنین کارایی کم واکسن‌ها در آبزیان، توجه به محرک‌های ایمنی

*مسئول مکاتبه: alishahimoj@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

به‌عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها بیش‌تر شده است (Roa، ۱۹۹٦). محرک‌های ایمنی مختلفی مانند بتاگلوکان، کیتین، کیتوزان، لاکتوفرین به‌عنوان تقویت‌دهنده سیستم ایمنی در ماهیان استفاده می‌شوند که این مواد محرک ایمنی غیراختصاصی، سبب تحریک ایمنی در ماهی‌ها می‌شوند (Stafford و همکاران، ۲۰۰٤). همچنین محرک‌های ایمنی با منشأ گیاهی نیز به‌علت برتری‌های خاص خود، مانند خطر کم‌تر برای محیط زیست و در دسترس و ارزان‌قیمت بودن و امکان کشت در سطح وسیع بیش‌تر مورد توجه بوده‌اند (Galina و همکاران، ۲۰۰۹). در آبزیان نیز پژوهش در زمینه استفاده از محرک‌های ایمنی با منشأ گیاهی در سال‌های اخیر توسعه‌یافته است (Alishahi و همکاران، ۲۰۱۰؛ Bilen و همکاران، ۲۰۱۱). گیاه صبر زرد با نام علمی آلوئه‌ورا[1] متعلق به خانواده سوسنیان می‌باشد که نام این خانواده اخیراً به Aloacea تغییر یافته است (Miranda و همکاران، ۲۰۰۹). گیاه آلوئه‌ورا متشکل از دو فراورده شامل شیرابه زرد رنگ و ژل می‌باشد و ترکیبات تشکیل‌دهنده آن شامل آنتراکینون‌ها، ساکاریدها، ویتامین‌ها، آنزیم‌ها، مواد معدنی و بسیاری ترکیبات دیگر است که در این میان بیش‌ترین خاصیت تحریک ایمنی به آسمانان که ترکیبی پلی‌ساکاریدی است، نسبت داده می‌شود (Choi و Chung، ۲۰۰۳). برخی اثرات دارویی این گیاه شامل اثرات ترمیم ضایعات پوستی و زخم، اثرات ضدویروسی و ضدباکتریایی می‌باشد. به‌علاوه اثرات تحریک ایمنی و رشد این گیاه در حیوانات خون‌گرم ثابت شده است (Tan و Vanitha، ۲۰۰٤؛ Pugh و همکاران، ۲۰۰۱).

گزارش‌های زیادی مبنی بر استفاده از این گیاه در پرورش آبزیان موجود نمی‌باشد، اما اخیراً اثرات این گیاه در تحریک ایمنی ماهی کپور معمولی (Alishahi و همکاران، ۲۰۱۰؛ Kim و همکاران، ۱۹۹۹) اثرات ضدباکتریایی در برابر عوامل بیماری‌زای آبزیان و تحریک رشد و ترمیم زخم در ماهی کپور معمولی گزارش شده است (Tan و Vanitha، ۲۰۰٤؛ Pugh و همکاران، ۲۰۰۱). با توجه به این‌که عصاره‌های گیاهی ترکیبات پیچیده و گاهی ناشناخته‌ای به‌همراه دارند که احتمال اثرات جانبی مضر این ترکیبات نیز قابل‌توجه است، ضروری به‌نظر می‌رسد هم‌زمان با بررسی‌های روی اثرات مثبت درمانی عصاره‌ها، به اثرات احتمالی منفی آن‌ها نیز توجه شود. چنین مطالعاتی قبل از پیشنهاد استفاده از این عصاره‌ها در سطح صنعتی ضروری بوده و در مورد بسیاری از عصاره‌های گیاهی که امروزه تجاری شده‌اند، چنین مطالعاتی برای بررسی اثرات سوء احتمالی آن‌ها انجام شده است (Winkaler و همکاران، ۲۰۰۷؛ Banaee و همکاران، ۲۰۱۱؛ Beyraghdar و همکاران، ۲۰۱۱). بر خلاف گزارش اثرات مناسب تحریک ایمنی و افزایش مقاومت این گیاه در آبزیان، متأسفانه هنوز پژوهشی در زمینه اثرات سمی احتمالی این عصاره در ماهی انجام نشده است، بنابراین در این پژوهش ضمن بررسی سمیت این عصاره در روش حمام طولانی‌مدت برای ماهی کپور معمولی، تأثیر غلظت‌های بالای این عصاره بر برخی فاکتورهای خونی، ایمنی و بافت‌های حیاتی ماهی کپور معمولی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

ماهی و شرایط تحقیق: از تعداد ۲۵۰ ماهی کپور معمولی[2] با وزن متوسط ۱/۲±۲۰ گرم در مرحله اول پژوهش برای تعیین غلظت کشنده آلوئه‌ورا و تعداد ۱۰۰ قطعه ماهی با وزن متوسط ٦۰ گرم برای مرحله دوم پژوهش، اندازه‌گیری فاکتورهای خونی، ایمنی و اثرات هیستوپاتولوژیک استفاده گردید. مشخصات آب مورد استفاده در پژوهش به قرار زیر بود:

1- *Aloe vera*

2- *Cyprinus carpio*

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱- مشخصات آب محل پژوهش در طول مراحل انجام پژوهش.

مشخصات آب محل پژوهش	میانگین	انحراف معیار
دما (درجه سانتی‌گراد)	۲٤	۱
pH	۸/۱	۰/٤٥
هدایت الکتریکی EC (میکروزیمنس بر سانتی‌مترمربع)	۹۸۰	٤٥
اکسیژن محلول	۸	۱
NH_3 (میلی‌گرم در لیتر)	<۰/۰۱	<۰/۰۰۱
NO_2 (میلی‌گرم در لیتر)	<۰/۰۱	<۰/۰۰۱
NO_3 (میلی‌گرم در لیتر)	۰/۰۸۹	۰/۰۰۹

تعیین غلظت کشنده عصاره آلوئه‌ورا: در این پژوهش از عصاره خام آلوئه‌ورا اهدایی شرکت کشت و تولید گیاهان دارویی باریج اسانس استفاده گردید. به‌منظور تعیین سمیت غلظت‌های بالای آلوئه‌ورا در ماهی کپور معمولی از روش استاندارد OECD[1] استفاده گردید (Stafford و همکاران، ۲۰۰٤). به این منظور ابتدا مطالعه اولیه‌ای انجام شد و ۸ غلظت متوالی عصاره، به‌طوری‌که غلظت ایجادکننده ۱۰۰ درصد تلفات و دوز غیرکشنده در بین این غلظت‌ها واقع گردد، در نظر گرفته شد. غلظت‌های مورد استفاده شامل ۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ٤، ۸ و ۱٦ گرم در لیتر (براساس ماده خشک عصاره خام) بود. غلظت‌های آلوئه‌ورا در آکواریوم‌های جداگانه ایجاد گردیده و به هر آکواریوم ۱۰ قطعه ماهی اضافه شد (آزمایش در ۳ تکرار انجام شد). تلفات به‌صورت روزانه و به‌مدت ٤ روز ثبت گردید. بعد از ثبت نتایج و مشخص شدن تلفات تجمعی در طول ٤ روز، نتایج با استفاده از نرم‌افزار Probit مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

آزمایش‌های مسمومیت مزمن: براساس غلظت به‌دست آمده در مرحله قبل، غلظت‌های $^1/_5$، $^1/_{10}$ و $^1/_{20}$ LC50 ۹٦ ساعته، (به‌ترتیب غلظت‌های ۰/۸، ۰/٤ و ۰/۲ گرم در لیتر) در آکواریوم‌های ۱۲۰ لیتری ایجاد گردید. به هر آکواریوم تعداد ۲۵ قطعه ماهی کپور با وزن متوسط حدود ٦۰ گرم اضافه شد (یک آکواریوم نیز به‌عنوان کنترل بدون اضافه نمودن آلوئه‌ورا به آب در نظر گرفته شد). ماهی‌ها به‌مدت ۲۱ روز در آکواریوم‌ها نگهداری گردیدند. تعویض روزانه آب هر آکواریوم ۳۰ درصد با آب هم غلظت بود. در طول دوره پژوهش تلفات ثبت شد.

نمونه‌گیری: در انتهای هفته سوم از هر تیمار ٦ ماهی خون‌گیری شده و فاکتورهای خونی و ایمنی مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس ماهی‌ها با استفاده از میزان ۱ گرم در لیتر MS222 آسان‌کشی شده و از آبشش، کلیه، کبد و طحال ماهی‌های هر تیمار نمونه بافتی تهیه گردیده و در بافر فرمالین ۱۰ درصد (حجم محلول پایدارکننده حداقل ۱۰ برابر حجم نمونه) تثبیت گردید. مقاطع بافت‌شناسی با استفاده از روش معمول تهیه مقاطع بافتی آبزیان تهیه شد (Ayas و همکاران، ۲۰۰۷).

اندازه‌گیری پارامترهای هماتولوژیک: به این منظور از روش‌های اندازه‌گیری پارامترهای خون‌شناسی پستانداران با تغییرات اندکی استفاده گردید (Feldman و همکاران، ۲۰۰۰). برای اندازه‌گیری هموگلوبین (Hb) از روش استاندارد سیانومت هموگلوبین، برای اندازه‌گیری هماتوکریت یا حجم فشرده گلبولی[2] از روش میکروهماتوکریت و شمارش کلی گلبول‌های قرمز و گلبول‌های سفید به روش دستی و با استفاده از لام هماسیتومتر نئوبار انجام شد. اندیس‌های گلبولی

1- Organization for Economic Cooperation and Development

2- Packed Cell Volume (PCV)

Archive of SID
www.SID.ir

یعنی حجم متوسط گلبولی (MCV)، میزان متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH) و غلظت هموگلوبین گلبولی (MCHC) نیز با استفاده از رابطه‌های استاندارد موجود محاسبه شد (Thrall، ۲۰۰٤).

اندازه‌گیری فاکتورهای ایمنی

فعالیت لیزوزیم سرم: میزان فعالیت لایزوزیم سرم با استفاده از روش توصیه شده توسط Sahoo و همکاران (۲۰۰۵) اندازه‌گیری شد در این روش از قدرت لیز لیزوزیم بر باکتری میکروکوکوس لیزودایکتیکوس[1] به روش نورسنجی استفاده می‌گردد. ابتدا نمودار استاندارد فعالیت لیزوزیم رسم شده و میزان فعالیت لیزوزیم سرم با انطباق جذب نوری سرم‌ها با منحنی استاندارد مشخص شد.

قدرت باکتری‌کشی سرم: با استفاده از روش توصیه شده توسط Kajita و همکاران (۱۹۹۰) با اندکی تغییرات اندازه‌گیری قدرت باکتری‌کشی سرم انجام شد. ابتدا باکتری آئروموناس هیدروفیلا در محیط TSB کشت داده شد و تعداد باکتری به‌میزان 10^5 باکتری در میلی‌لیتر در ژلاتین ورونال بافر استریل (pH=۷/۵ و شامل یون کلسیم و منیزیم) تنظیم گردید. نمونه‌های سرمی با سوسپانسیون باکتریایی به‌دست آمده به نسبت ۱:۱ مخلوط شده و بعد از ۹۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۵ میکرولیتر از مخلوط سرم و باکتری در محیط کشت TSA کشت داده شده و بعد از ٢٤ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به کمک دستگاه کلونی کانتر تعداد پرگنه باکتریایی رشدیافته در روی محیط کشت شمارش گردید (مراحل در ۳ تکرار انجام گرفت).

فعالیت مسیر آلترناتیو کمپلمان[2] (ACH_{50}): رقت‌های متوالی سرم در بافر ورونال شامل ۱۰ میلی‌مول اتیلن گلیکول تترا استیک اسید[3]، ۱۰ میلی‌مول دی‌کلرید منیزیم[4] و ژلاتین ۰/۱ درصد) تهیه شد، سپس سوسپانسیون ($cell\ ml^{-1}$ ۱۰^۸ × ۲/۵) گلبول قرمز گوسفند در همان بافر، به هر رقت سرم اضافه شده و در دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۹۰ دقیقه انکوبه شدند. فعالیت همولیتیک با افزودن بافر ۱۰ میلی‌مولار mM EDTA-GVB ۱۰ (بافر ورونال شامل ۱۰ میلی‌مول اتیلن دی‌آمین تتر، استیک اسید[5] و ژلاتین ۰/۱ درصد) متوقف شد. بعد از سانتریفیوژ، مایع رویی در طول موج ٤١٤ توسط اسپکتوفتومتر خوانده شد. درصد لیز (y) از تقسیم طول موج خوانده شده بر ۱۰۰ درصد لیز (لیز در آب مقطر) به‌دست آمد. نمودار لگاریتمی نقاط y/۱−y و عکس رقت بر روی صفحه لگاریتمی[6] رسم و سپس عکس رقتی که ۵۰ درصد همولیز را داشت ($ACH50\ (unit\ ml^{-1})$ از منحنی به‌دست آمده خوانده شد (Matsuyama و همکاران، ۱۹۸۸).

آزمون آماری: برای تعیین غلظت کشنده آلوئه‌ورا از نرم‌افزار پروبیت[7] ویرایش ۱/۵ استفاده شد. برای آنالیز اطلاعات مرحله دوم پژوهش از نرم‌افزار SPSS ویرایش ١٦ استفاده گردید. ابتدا از آزمون لون[8] برای بررسی هموژن بودن انحراف معیار اطلاعات استفاده گردید. پس از اطمینان از هموژنیتی داده‌ها، تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه[9] استفاده گردید. برای بررسی مقایسه میانگین‌ها از آزمون چنددامنه‌ای دانکن[10] در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ استفاده شد.

1- *Micrococcus lysodeichthicus*
2- Alternative compelement hemolysis test

3- EGTA
4- $MgCl_2$
5- EDTA
6- log log graph paper
7- Probit
8- Leven statistic test
9- One-way ANOVA
10- Duncan

Archive of SID
www.SID.ir

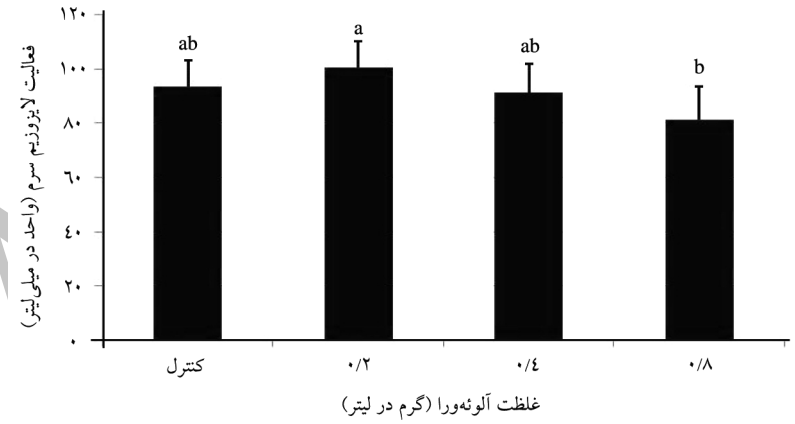
نتایج

تلفات طول دوره مجاورت ۳ هفته‌ای ماهی کپور با غلظت‌های مورد استفاده در پژوهش نشان‌دهنده تأثیر نسبی این غلظت‌ها در تلفات ماهی کپور است، به‌طوری‌که در تیمارهای کنترل و غلظت ۰/۲ گرم در لیتر تلفاتی مشاهده نگردید و یک قطعه تلفات در تیمار ۰/٤ و سه قطعه در تیمار ۰/۸ گرم در لیتر مشاهده گردید (جدول ۲).

جدول ۲- نتایج سمیت حاد عصاره آلوئه‌ورا در ماهی کپور معمولی در مدت ۹٦ ساعت.

LC	غلظت آلوئه (گرم در لیتر)	حداقل غلظت با اطمینان ۹۵ درصد	حداکثر غلظت با حدود اطمینان ۹۵ درصد
$LC_{۱۰}$	۲/۵۷۵	۱/٦۸۱	۳/۱۳۰
$LC_{۱۵}$	۲/۸۰٦	۱/۹٤	۳/۳٤۷
$LC_{۵۰}$	٤/۰۱٦	۳/۳۹۵	٤/٦۵۳
$LC_{۸۵}$	۵/۸۰۵	٤/۹۸۸	۷/۷۰۵
$LC_{۹۰}$	٦/۳۲٦	۵/۳۵۷	۸/۸۵۳

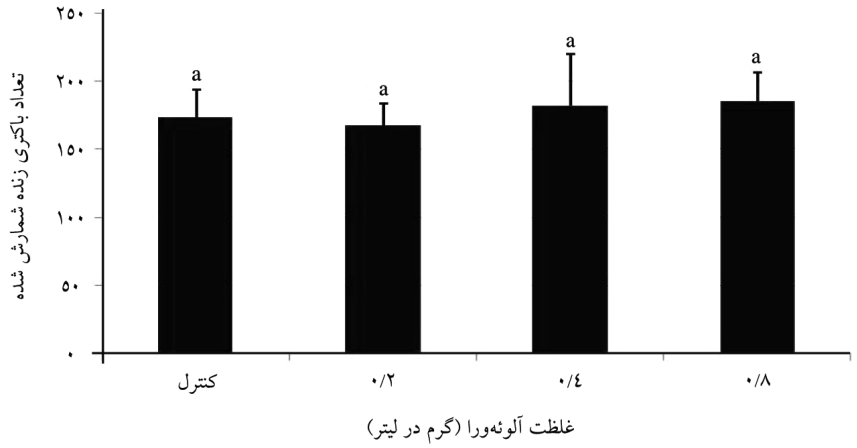
نتایج مربوط به تأثیر غلظت‌های بالای آلوئه‌ورا بر فاکتورهای ایمنی ماهی در شکل‌های ۱ تا ۳ آورده شده است. مقایسه فعالیت لیزوزیم سرم تیمارهای مختلف در طی دوره پرورش ۳ هفته‌ای در شکل ۱ آمده است. فعالیت لیزوزیم سرم نیز در تیمار ۰/۸ گرم در لیتر آلوئه کاهش معنی‌داری نسبت به کنترل نشان داد ($P<۰/۰۵$). هر چند در غلظت ۰/۲ گرم در لیتر آلوئه افزایش فعالیت لیزوزیم نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). اما در تیمار ۰/٤ تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$).



شکل ۱- مقایسه فعالیت لیزوزیم سرم تیمارهای مختلف در مدت ۳ هفته (میانگین ± انحراف معیار).
تذکر: حروف غیرمشترک نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

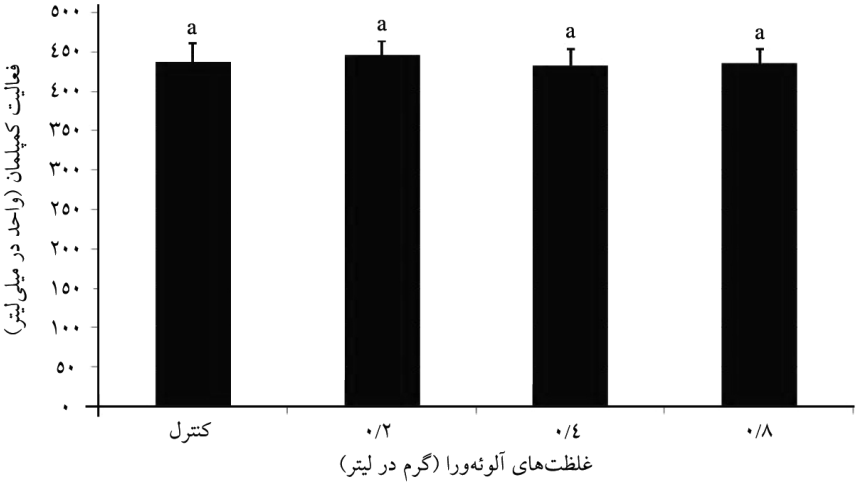
میزان قدرت فعالیت باکتری‌کشی تیمارهای مختلف نیز در انتهای هفته سوم در شکل ۲ آمده است است. بر خلاف کاهش قدرت باکتری‌کشی سرم در تیمار ۰/۸ گرم در لیتر، این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P>۰/۰۵$).

www.SID.ir



شکل ۲- مقایسه فعالیت باکتری‌کشی تیمارهای مختلف در انتهای هفته سوم (میانگین ± انحراف معیار).

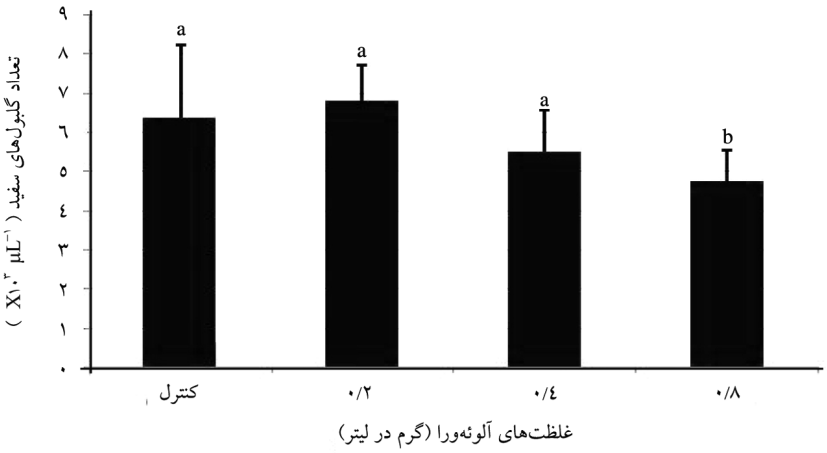
میزان فعالیت کمپلمان تیمارهای مختلف در طول دوره ۳ هفته‌ای در شکل ۳ آورده شده است. میزان فعالیت کمپلمان تیمارها تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند (P>۰/۰۵).



شکل ۳- مقایسه فعالیت لیزوزیم سرم تیمارهای مختلف در مدت ۳ هفته.

نتایج بررسی‌های هماتولوژیک نمونه‌های اخذ شده از تیمارهای مختلف در شکل ٤ و جدول‌های ۳ و ٤ آورده شده است. نتایج نشان داد که غلظت‌های ۰/۲ و ۰/٤ گرم در لیتر آلوئه‌ورا تأثیر معنی‌داری بر فاکتورهای خونی ماهی کپور نداشته، ولی هماتوکریت، هموگلوبین، تعداد گلبول‌های قرمز و حجم متوسط گلبولی (MCV) در تیمار ۰/۸ گرم در لیتر آلوئه کاهش معنی‌داری نسبت به تیمار کنترل نشان داد (P<۰/۰۵).

www.SID.ir



شکل ٤- مقایسه تعداد گلبول‌های سفید بین تیمارهای مختلف (میانگین ± انحراف معیار) در انتهای هفته سوم.

همان‌طورکه در شکل ٤ آمده است، غلظت ۰/۸ گرم در لیتر آلوئه‌ورا باعث کاهش معنی‌دار تعداد گلبول‌های سفید گردیده است (P<۰/۰۵). هر چند تفاوت معنی‌داری در تعداد گلبول‌های سفید در سایر غلظت‌های آلوئه مشاهده نگردید.

جدول ۳- مقایسه فاکتورهای خون‌شناسی مربوط به پژوهش در بین تیمارهای مختلف (میانگین ± انحراف معیار).

غلظت‌ها / فاکتور خونی	کنترل	۰/۲ گرم در لیتر آلوئه	۰/٤ گرم در لیتر آلوئه	۰/۸ گرم در لیتر آلوئه
هماتوکریت (درصد)	۳۲/۱۷±۲/۹۳^{b}	۲۹/٦۷±٥/۳۲^{b}	۳۱/۳۳±٥/۸۹^{b}	۲٤/۸۳±٤/۰۲^{a}
هموگلوبین (گرم بر دسی‌لیتر)	٥/۸۰±۰/۹۹^{b}	٥/۸٤±۱/۰۱^{b}	٦/۱۰±۰/۸۸^{b}	٥/۰۲±۰/۷٤^{a}
تعداد گلبول‌های قرمز (۱۰^{٦} ×)	۱/۲۸±۰/۱۱^{b}	۱/۲۲±۰/۱۹^{b}	۱/۳۱±۰/۱٤^{b}	۱/۰۸±۰/۱۱^{a}
MCH (پیکوگرم)	۱۹/٦۲±٤/۲۰^{a}	۲۰/۲٦±٥/٥۹^{a}	۲۰/۰۳±٤/٥٦^{a}	۱۸/۸۸±۲/۷٤^{a}
MCV (fl)	۲٥۳/۲±۳۱/۲۰^{b}	۲٤۷/٥±٥۷/۰۲^{b}	۲٤۲/۷±٥٦/۳۱^{b}	۲۱۸/٤±۳۰/٤٤^{a}
MCHC (گرم بر دسی‌لیتر)	٤٥/٦۳±۷/۹٦^{a}	٤۸/۰۰±٥/۷٤^{a}	٤٦/٥۳±٥/۰٤^{a}	٤٦/٦۲±٦/۲٥^{a}

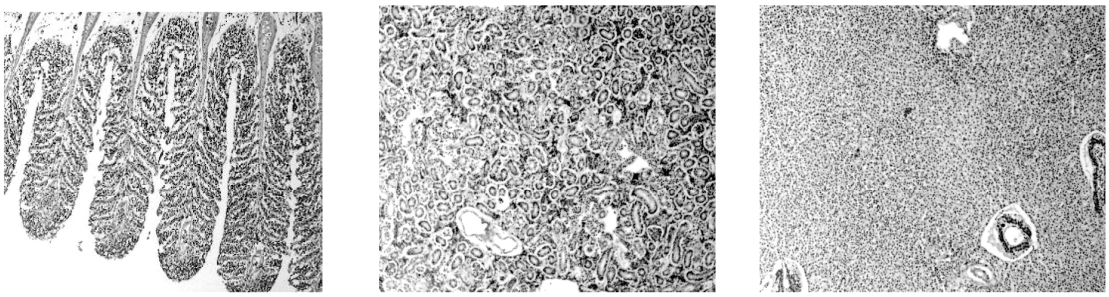
نتایج شمارش تفریقی گلبول‌های سفید خونی در جدول ٤ آورده شده است. همان‌طورکه در جدول مشاهده می‌شود، تفاوت معنی‌داری در نسبت گلبول‌های سفید خونی بین تیمارها مشاهده نگردید (P>۰/۰۵).

جدول ٤- تعداد و انواع گلبول‌های سفید خون در تیمارهای مختلف پس از پایان دوره ۳ هفته‌ای (میانگین ± انحراف معیار).

غلظت‌ها / نوع گلبول سفید	کنترل	۰/۲ گرم در لیتر آلوئه	۰/٤ گرم در لیتر آلوئه	۰/۸ گرم در لیتر آلوئه
تعداد گلبول‌های سفید (۱۰^{۳} ×)	٦/۳۸±۱/۸٤^{a}	٦/۸۳±۰/۹۱^{a}	٥/٥۱±۱/۰۷^{a}	٤/۷۸±۰/۷۹^{a}
لنفوسیت	۷٥/۸۳±٤/۹٦^{a}	۷٤/٥۰±۳/۷۸^{a}	۷٦/۳۳±٥/٦٥^{a}	۷۸/٦۷±۳/۰۸^{a}
مونوسیت	۱/۸۳±۲/۳۲^{a}	۱/۱۷±۰/۷٥^{a}	۲/٥۰±۱/۰٥^{a}	۲/٦۷±۲/۰۷^{a}
ائوزینوفیل	۰/۸۳±۱/۳۳^{a}	۰/٥۰±۰/٥٥^{a}	۰/۸۳±۰/۷٥^{a}	۰/٥۰±۰/٥٥^{a}
هتروفیل	۲۱/۱۷±۳/٤۳^{a}	۲۲/٥۰±۱/۷٦^{a}	۲۰/٥۰±۳/۸۳^{a}	۱۸/۳۳±۱/۸٦^{a}

Archive of SID
www.SID.ir

نتایج هیستوپاتولوژی: در بررسی هیستوپاتولوژیک بافت‌ها، در مقایسه با گروه کنترل و منابع موجود، به‌جز هیپرپلازی سلول‌های Pavement آبشش در تیمار ۰/۸ گرم در لیتر آلوئه، هیچ‌گونه ضایعه غیرطبیعی مشاهده نگردید (شکل ۵).



A B C

شکل ۵- نمونه‌های تهیه شده از ماهی‌های تیمار شده با بالاترین غلظت آلوئه (۰/۸ گرم در لیتر).
(A) بافت آبشش (بزرگنمایی ۱۰۰) هیپرپلازی سلول‌های Pavement آبشش،
(B) بافت کلیه (بزرگنمایی ٤۰۰) و (C) بافت کبد (بزرگنمایی ٤۰۰)

بحث

استفاده از گیاهان دارویی در دامپزشکی آبزیان در دهه اخیر توسعه زیادی یافته است، این مواد با اثرات دارویی متفاوت از جمله اثرات ضدباکتریایی، ضدویروسی، ضدقارچی، بیهوش‌کنندگی، تحریک ایمنی و.... در آبزیان کاربرد دارند (Tan و Vanitha، ۲۰۰٤). اخیراً استفاده از گیاه آلوئه‌ورا در آبزیان به‌عنوان یک ماده ضدباکتریایی (Kim و همکاران، ۱۹۹۹)، محرک ایمنی، تحریک‌کننده رشد و تسریع‌کننده روند ترمیم زخم توسعه زیادی یافته است (Alishahi و همکاران، ۲۰۱۰؛ Tan و Vanitha، ۲۰۰٤؛ Pugh و همکاران، ۲۰۱۱)، ولی اثرات جانبی و سمیت احتمالی این گیاه در آبزیان بررسی نشده است. نتایج این پژوهش مشخص ساخت که کاربرد عصاره خام این گیاه به‌صورت حمام سمیت به‌نسبت بالایی در ماهی داشته و LC50 ۹٦ ساعته عصاره این گیاه در آب ٤/۰۱٦ گرم در لیتر (٤۰۱٦ ppm) بود. در مورد تأثیر غلظت‌های بالای آلوئه بر فاکتورهای خونی ماهی کپور نیز مشخص گردید که غلظت‌های ۰/۲ و ۰/٤ گرم در لیتر آلوئه‌ورا تأثیر معنی‌داری بر فاکتورهای خونی ماهی کپور نداشته (P>۰/۰۵)، ولی هماتوکریت، هموگلوبین، تعداد گلبول‌های قرمز و حجم متوسط گلبولی (MCV) در تیمار ۰/۸ گرم در لیتر آلوئه‌ورا کاهش معنی‌داری نسبت به تیمار کنترل نشان داد (P<۰/۰۵). این تغییرات را می‌توان به کاهش خون‌سازی در بافت‌های خون‌ساز ماهی و یا تغییر شکل و کاهش عمر گلبول‌های قرمز خونی نسبت داد (Morgan و همکاران، ۱۹۸۰). در مطالعات مشابه نیز کاهش فاکتورهای خون‌شناسی وابسته به گلبول‌های قرمز، بعد از مسمومیت با مواد شیمیایی در ماهی گزارش شده است. مثلاً غلظت‌های تحت کشنده بره موم که اثرات تحریک ایمنی در ماهی دارد، تأثیر منفی بر فاکتورهای خونی ماهی قزل‌آلا داشته است (Beyraghdar و همکاران، ۲۰۱۱)، البته علیشاهی و

Archive of SID
www.SID.ir

همکاران (۲۰۱۰) در ماهی کپور و در ماهی قزل‌آلا، بهبود برخی پروفایل‌های گلبولی در ماهی کپور تغذیه شده با خوراک شامل عصاره خام آلوئه‌ورا را گزارش نمودند (Soltani و همکاران، ۲۰۱۲)، بنابراین می‌توان اثر عصاره آلوئه‌ورا در روش‌های مختلف تجویز و غلظت‌های تجویز بسیار متفاوت دانست. در مورد تأثیر غلظت‌های مختلف آلوئه‌ورا بر تعداد و نسبت گلبول‌های سفید خونی، نیز در تیمارهای ۰/۲ و ۰/٤ گرم در لیتر آلوئه‌ورا تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد، ولی غلظت ۰/۸ گرم در لیتر کاهش تعداد گلبول‌های سفید خونی را در ماهی کپور باعث گردید (P<۰/۰۵). با توجه به نقش تعداد گلبول‌های سفید خونی در پاسخ ایمنی، می‌توان علاوه‌بر احتمال اختلال در بافت‌های خون‌ساز ماهی، نوعی سرکوب ایمنی غیراختصاصی در تیمار ۰/۸ گرم در لیتر آلوئه‌ورا را دلیل این امر دانست. البته تفاوت معنی‌داری در نسبت گلبول‌های سفید خونی بین تیمارها مشاهده نگردید (P>۰/۰۵). نکته قابل‌توجه در افزایش تعداد گلبول‌های سفید خونی در تیمار ۰/۲ گرم در لیتر نسبت به کنترل است که دوباره تأثیر متفاوت آلوئه‌ورا را در غلظت‌های مختلف روی فاکتورهای خونی ماهی تأیید می‌نماید، به‌طوری‌که غلظت‌های پایین آلوئه‌ورا بهبود ایمنی و غلظت‌های بالا نوعی سرکوب ایمنی را باعث می‌شوند. گزارش‌های متعددی از نوعی لکوپنی (کاهش WBC) به‌دنبال مسمومیت‌های مزمن با مواد بیولوژیک در ماهی وجود دارد (Beyraghdar و همکاران، ۲۰۱۱؛ Banaee و همکاران، ۲۰۱۱). نتایج این پژوهش نشانگر تأثیر وابسته به دوز عصاره آلوئه‌ورا بر پاسخ‌های ایمنی غیراختصاصی ماهی کپور معمولی بود، به‌طوری‌که غلظت ۰/۸ گرم در لیتر آلوئه‌ورا کاهش معنی‌دار فعالیت لیزوزیم سرم ماهی کپور معمولی را باعث گردید. ولی غلظت ۰/۲ گرم در لیتر این عصاره باعث افزایش فعالیت لیزوزیم سرم ماهی شد. فعالیت لیزوزیم سرم یکی از شاخص‌های مهم ارزیابی وضعیت پاسخ ایمنی ماهی می‌باشد (Sahoo و همکاران، ۲۰۰۵؛ Alishahi، ۲۰۰۹). افزایش فعالیت لیزوزیم بعد از تجویز محرک‌های ایمنی شیمیایی (Alvarez-Pellitero و همکاران، ۲۰۰٦)، واکسن‌ها و برخی پروبیوتیک‌ها در ماهی گزارش گردیده است (Yuan و همکاران، ۲۰۰۷). گزارش‌های متعددی از افزایش فعالیت لیزوزیم سرم به‌دنبال استفاده از عصاره‌های گیاهی وجود دارد (Jain و Wu، ۲۰۰۳). احتمالاً کاهش فعالیت لیزوزیم سرم در غلظت ۰/۸ گرم در لیتر به‌دلیل تأثیر منفی آن بر فیزیولوژی ماهی و ایجاد استرس در ماهی است. Kakuta و همکاران (۱۹۹٦) بیان نمودند که افزایش غلظت محرک‌های ایمنی در آبزیان می‌تواند اثر عکس داشته و کاهش شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی ماهی را باعث شوند.

هر چند قدرت باکتری‌کشی سرم در دو غلظت ۰/٤ و ۰/۸ گرم در لیتر آلوئه‌ورا کاهش نشان داد، ولی این کاهش از نظر آماری معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). دلیل تفاوت نتایج فعالیت لیزوزیم سرم و قدرت باکتری‌کشی سرم را می‌توان به تداخل عمل فاکتورهای مختلفی چون لیزوزیم، پادتن‌های طبیعی، پروتئین‌های سیستم کمپلمان و... نسبت داد که بر قدرت باکتری‌کشی سرم اثر می‌گذارند. احتمالاً تأثیر غلظت‌های بالای عصاره آلوئه‌ورا بر این فاکتورها یکسان نیست. البته Divyagnaneswari و همکاران (۲۰۰۷) چنین تفاوتی را بعد از تجویز عصاره گیاه *Solanum trilobatum* در ماهی قزل‌آلا را گزارش نمودند. Heidi و همکاران (۲۰۰٦) نیز تجویز لیپو پلی‌ساکارید باکتریایی را که

Archive of SID
www.SID.ir

یک محرک ایمنی است، در غلظت بالا باعث سرکوب پاسخ ایمنی بچه‌ماهی کپور دانستند. فعالیت سیستم کمپلمان تحت‌تأثیر غلظت‌های مختلف آلوئه‌ورا قرار نگرفت (P>۰/۰۵). البته با توجه به تفاوت‌های مشاهده شده در سایر فاکتورهای مورد بررسی، احتمالاً نبود حساسیت کافی این آزمایش برای اندازه‌گیری فعالیت کمپلمان در ماهی کپور معمولی را دلیل این امر دانست (Alishahi و همکاران، ۲۰۱۱).

بر خلاف تأثیر منفی غلظت‌های بالای عصاره آلوئه‌ورا بر فاکتورهای ایمنی و خونی ماهی کپور، بررسی‌های هیستوپاتولوژیکی بافت‌های مختلف ماهی (کلیه، کبد و آبشش و طحال) بیانگر نبود ایجاد ضایعات پاتولوژیک در اندام‌های بالا بود. احتمالاً برای مشاهده ضایعات پاتولوژیک باید یا مدت مجاورت ماهی با غلظت‌های بالای آلوئه‌ورا افزایش یابد و یا غلظت‌های بالاتر آلوئه‌ورا استفاده گردد، ولی از آن‌جا که استفاده از غلظت‌های بالاتر یا مدت مجاورت طولانی‌تر هم از نظر کاربردی و هم از نظر اقتصادی توجیهی ندارد، می‌توان احتمال ایجاد اثرات پاتولوژیک روی بافت‌ها با غلظت‌های معمول آلوئه‌ورا را منتفی دانست.

به‌طورکلی می‌توان نتیجه گرفت که بر خلاف اثرات تحریک ایمنی عصاره گیاه آلوئه‌ورا در ماهی، غلظت‌های بالای ۰/۸ گرم در لیتر این عصاره تأثیر منفی بر برخی فاکتورهای خونی و ایمنی ماهی کپور داشته، بنابراین قبل از تجویز این عصاره در هر گونه ماهی باید به غلظت مناسب آن توجه داشت.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز انجام گرفت. نگارندگان از همکاری جناب آقای دکتر مهدی زارعی در مراحل انجام پژوهش سپاسگزاری می‌نمایند.

منابع

1.Alishahi, M., 2009. Fish and shellfish immunology, published by Shahid Chamran University, translation of Swain, P., Sahoo, P.K., and Ayyappan, S., 2006. Narenda Publishing House, India.
2.Alishahi, M., Ghorbanpour, M., Najafzade, H., and Pashmforoush, M., 2010. Antibacterial effects of some medical plant extracts on *Aeromonas hydrophila*, Yersinia ruckery and Streptococcus iniae. Iran. J. Vet. 6 (2), 21-30.
3.Alishahi, M., Soltani, M., Mesbah, M., and Esmaeili-rad, A., 2011. Effects of dietary Silybum marianum extract on some immune responses of Common carp (*Cyprinus carpio*). J. Vet. Res. 66 (3), 255-264.
4.Alvarez-Pellitero, P., Stija-Bobadilla, A., Bermuolez, R., and Quiroga, M.I., 2006. Levamisole activates several innate immune factors in *Scophthalmus moximus* (1) (Teleostei). J. Imm. Pharm. 19 (4), 727-738.
5.Ayas, Z., Ekmekci, G., Ozmen, M., and Yerli, S.V., 2007. Histopathological changes in the livers and kidneys of fish in Sariyar Reservoir, Turkey. Environmental Toxicology and Pharmacology. 23, 242-249.
6.Banaee, M., Sureda, A., Mirvaghefi, A.R., and Rafei, G.R., 2011. Effects of long-term silymarin oral supplementation on the blood biochemical profile of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fish Physiology and Biochemistry, 37 (4), 885-896.
7.Beyraghdar, K.O., Ebrahimi, D.E., Mahboobi, S.N., and Samie, A., 2011. Long-term effects of Propolis on serum biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Ecotoxicology and Environmental Safety, 74, 315-318.

Archive of SID
www.SID.ir

8.Bilen, S., Bulut, M., and Bilen, A.M., 2011. Immunostimulant effects of Cotinuscoggyria on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish & Shellfish Immunology, 30, 451-455.
9.Cerezuela, R., Cuesta, A., Meseguer, J., and Esteban, M.A., 2009. Effects of dietary vitamin d3 administration on innate immune parameters of seabream (*Sparus aurata* L.). Fish & Shellfish Immunology, 26, 243-248.
10.Choi, S., and Chung, M.H., 2003. A review on the relationship between Aloe vera components and their biologic effects. Seminars in integrative medicine, 1, 53-62.
11.Divyagnaneswari, M.D., Christybapita, A., and Dinakaran, R., 2007. Enhancement of nonspecific immunity and disease resistance in Oreochromis mossambicus by *Solanum trilobatum* leaf fractions. Fish & shellfish immunology, 23, 249-259.
12.Feldman, B.F., Zinkl, J.G., and Jain, N.C., 2000. Schalm's Veterinary Hematology. 5th ed, Lippincott Williams & Wilkins, Maryland, USA, pp. 1120-1124.
13.Galina, J., Yin, G., Ardol, L., and Jeney, Z., 2009. The use of immunostimulating herbs in fish. An review of research. fish physiology & biochemistry, 35, 669-676.
14.Heidi, B.T., Huttenhuis, A., Ribeiro, S.P., Timothy, J., Bowden, C., Anja, J., and Taverne, T., 2006. The effect of oral immuno-stimulation in juvenile carp (*Cyprinus carpio* L.) Fish & Shellfish Immunology, 21, 261-271.
15.Jain, J., and Wu, Z., 2003. Effect of traditional Chinese medicine on non-specific immunity and disease resistance of large yellow croaker *Psedcosciaena crocea*. Aquaculture, 218, 1-9.
16.Kajita, Y., Sakai, M., Atsuta, S., and Kobayash, M., 1990. The immunonodulatory effects of levamisole on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Fish Pathology, 25, 93-98.
17.Kakuta, I., Kurokura, H., Nakamura, H., and Yamauchi, K., 1996. Enhancement of nonspecific defense activity of the skin mucus of red sea bream by oral administration of bovine lactoferin, Suisanzoshoku, 44, 197-202.
18.Kim, H.K., Hwang, W.J., and Bai, S.C., 1999. Resistance to *Vibrio alginolyticus*in juvenile rockfish *Sebastesschlegeli* fed diets containing different doses of aloe, Aquaculture 180, 13-21.
19.Matsuyama, H., Tanaka, K., Nakao, M., and Yano, T., 1988. Characterization of the alternative complement pathway of carp. Dev. Com. Imm. J. 12, 403-408.
20.Miranda, M., Maureira, H., Rodriguez, K., and Vega-Galvez, A., 2009. Influence of temperature on the drying kinetics, physiochemical properties and antioxidant capacity of Aloe vera (*Aloe barbadensis miller*) gel. Food engineering. 91, 297-304.
21.Morgan, D.P., Roberts, R.J., Walter, A.W., and Stockdale, E.M., 1980. Anemia associated with exposure to lindane, Archives and Environmental Health, 35, 307-310.
22.Pugh, N., Ross, S.A., El-Sohly, M.A., and Pasco, D.S., 2001. Characterization of aloeride, a new high-molecular-weight polysaccharide from Aloe vera with potent immunostimulatory activity. J. Agric. Food Chem. 49 (2), 1030-1034.
23.Raa, J., 1996. The use of immuno-stimulatory substances in fish and shellfish farming. Reviews in Fisheries Science, 4, 229-288.
24.Sahoo, P.K., Kumari, J., and Mishra, B.K., 2005. Non-species immune responses in juveniles of Indian major carps. J. Appl. Ichthy. 21, 151-155.
25.Soltani, B., 2012. Effects of Aloe vera extract on some growth, hematological and immunological indices of *Oncorhynchus mykiss*, M.Sc. Thesis of Azad University, Branch of Ahvaz, Fisheries and natural resources faculty.
26.Stafford, J.L., Wilson, E.C., and Belosevic, M., 2004. Recombinant transferrin induces nitric oxide response in goldfish and murine macrophages. Fish & Shellfish Immunology, 17, 171-185.
27.Tan, B.K., and Vanitha, J., 2004. Immunomodulatory and antimicrobial effects of some traditional Chinese medicinal herbs: a review. Current Medicinal Chemistry, 11 (11), 1423-1430.
28.Thrall, M.A., 2004. Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. Lippincott Williams & Wilkins, USA, 241 (402), 277-288.

Archive of SID
www.SID.ir

29. Winkaler, E.U., Santos, T.R.M., Machado, N.J.G., and Martinez, C.B.R., 2007. Acute lethal and sublethal effects of neem leaf extract on the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus* Comparative Biochemistry and Physiology, Part C. 145, 236-244.
30. Yuan, C.D., Li, W., Chen, F., Sun, G., Wu, Y., Gon, J., Tang, M., and Han, X., 2007. Administration of a herbal immunoregulation mixture enhances some immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*). Springer Science Business Media, 4, 43-47.

Archive of SID

www.SID.ir