Archive of SID

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119417]
Downloaded from isfj.ir at 11:37 +0330 on Sunday September 22nd 2019

اثرات حمام عصاره هیدروالکلی گزنه (*Urtica dioica*) بر شاخص‌های ایمنی و خونی ماهی قزل آلای رنگین کمان(*Oncorhynchus mykiss*) آلوده شده با قارچ ساپرولگنیا

نرگس عالیشاه[1]، فرید فیروزبخش[*1]، زیبنده محرابی[1]

[*]f.firouzbakhsh@sanru.ac.ir

۱- گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹۸

چکیده

این مطالعه با هدف کاربرد عصاره هیدروالکلی گزنه درکنترل بیماری ساپرولگنیوز و بررسی تأثیر آن برفراسنجه های خونشناسی، بیوشیمیایی سرم و ایمنی قزل‌آلای رنگین کمان آلوده شده با ساپرولگنیا انجام شد. ۱۸۰ قطعه ماهی قزل الای رنگین کمان با میانگین وزن ۰/۲۷±۲۲ گرم در ۶ تیمار آزمایشی به طور تصادفی تقسیم بندی شدند. گروه‌های آزمایشی ابتدا با فلس برداری از ناحیه ساقه دمی مستعد بیماری شدند و سپس با زئوسپور ساپرولگنیا (با دوز^{5}۱۰×۳ زئوسپور در هر لیتر) به مدت ۴ ساعت حمام داده شدند. ماهیان پس ازآلوده سازی در تانک‌های۱۰۰ لیتری قرار گرفتند و چهار تیمار بترتیب۵۰ ، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره هیدروالکلی گزنه روزانه به مدت ۱ ساعت در طول ۱ هفته دریافت کردند. در پایان یک هفته حمام دهی با غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی گزنه (هفته اول) و در پایان یک هفته پس از قطع حمام‌دهی (هفته دوم)، فراسنجه‌های خون‌شناسی (گلبول قرمز، گلبول سفید، هماتوکریت و هموگلوبین)، فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم (آلبومین، گلبولین و توتال پروتئین) و فراسنجه‌های ایمنی (فعالیت لیزوزیم، سیستم کمپلمان و فعالیت انفجارتنفسی) و همچنین درصد تلفات در تمامی تیمارها بررسی شدند. نتایج بدست آمده نشان داد میزان۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره هیدروالکلی گزنه سبب افزایش معنی‌دار فراسنجه های خون‌شناسی، بیوشیمیایی سرم و ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مبتلا به ساپرولگنیوز می‌شود ($p<۰/۰۵$). همچنین دوزهای۵۰ ،۱۵۰ و۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره هیدروالکلی گزنه با افزایش مقاومت ماهیان در برابر ساپرولگنیوز باعث کاهش معنی‌دار تلفات نسبت به تیمار کنترل شدند. از اینرو، استفاده از عصاره هیدروالکلی گزنه با دوز ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر با روش حمام درمانی جهت بهبود شاخص‌های خون شناسی و ایمنی و همچنین کنترل ساپرولگنیوز در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان توصیه می‌گردد.

واژگان کلیدی: گزنه، خون‌شناسی، ساپرولگنیوز، قزل‌آلای‌رنگین‌کمان، حمام‌درمانی

[*]نویسنده مسئول

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119417]
Downloaded from isfj.ir at 11:37 +0330 on Sunday September 22nd 2019

مقدمه

بیماری‌های قارچی بعد از بیماری‌های باکتریایی یکی از مهم‌ترین عوامل زیان‌آور در صنعت آبزی‌پروری بشمار می‌آیند (Bruno and Woo, 1994). ساپرولگنیوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های قارچی ماهیان آب شیرین و تخم آنهاست. تا سال ۲۰۰۲ عفونت‌های ناشی از ساپرولگنیا معمولاً با مالاشیت‌گرین تحت کنترل قرار می‌گرفت، اما به دلیل ویژگی‌های سرطان‌زایی و جهش‌زایی این ماده، ممنوعیت اســتفاده از آن در بسیاری از کشورهای جهان به طور چشمگیری برای ماهیان خوراکی اعمال شده اســت (Meyer and Jorgenson, 1983). استفاده از داروهای ضد قارچ شیمیایی علاوه بر عوارض جانبی، مقاومت دارویی و همچنین ایجاد آلودگی‌های زیست محیطی، هزینه‌های زیادی به پرورش دهندگان تحمیل خواهد کرد. از سویی، توجه عمومی به مصرف محصولات ارگانیک، محققین را بر آن داشته است تا درصدد دستیابی به ترکیبات جایگزین طبیعی، مؤثر، ارزان، بی ضرر و سازگار با محیط زیست برآیند. گیاهان به عنوان یک ذخیره ارزشمند می‌توانند در این زمینه گره گشا باشند. گزنه (*Urtica dioica*) یکی از گیاهانی است که جهت تقویت سیستم ایمنی غیر اختصاصی ماهیان پرورشی استفاده می‌شود. گیاه دارویی گزنه از خانواده Urticaceae است که در اروپا، آسیا، آفریقا و آمریکای شمالی و در نواحی مرطوب می‌روید (Borchers *et al*., 2000). خواص مختلف گزنه از جمله: کاهنده فشار خون، کاهنده قند خون، محرک ایمنی، ضد سرطان، ضد التهاب ،آنتی‌اکسیدان، ضد درد، ضد ویروس، ضد باکتری و ضد قارچ توسط محققان به اثبات رسیده است (Tapwal *et al*., 2011) که می‌تواند ناشی از ترکیبات مختلف موجود در این گیاه نظیر فلاونوئیدها، اسیدهای چرب، کاروتن، پروتئین، ویتامین و مواد معدنی باشد (Bombardelli and Morazzoni, 1997). در مطالعاتی متعدد اثرات مثبت گیاه گزنه بر ایمنی ماهیان پرورشی مشخص شده است. از آن جمله می‌توان به اثرات مفید گیاه گزنه (*U. dioica*) بر افزایش ایمنی و مقاومت ماهی Victoria Labeo (*Labeo victorianus*) در مواجهه با *Aeromonas hydrophila* اشاره کرد (Ngugi *et al*., 2015). همچنین اثر مهارکنندگی عصاره گزنه بر رشد قارچ ساپرولگنیا پارازیتیکا در شرایط *in vitro* مورد بررسی قرار گرفت و خاصیت ضد قارچی آن تأیید شد (Firouzbakhsh *et al*., 2015). با توجه به اینکه تاکنون پژوهشی پیرامون استفاده ازعصاره گیاه گزنه به روش درمان در آب و بررسی اثرات آن بر عملکرد سیستم ایمنی در مواجهه با بیماری قارچی ساپرولگنوزیس در آبزیان صورت نگرفته است، مطالعه حاضر با هدف بهبود شاخص‌های خونی و ایمنی و همچنین کنترل بیماری ساپرولگنیوز در ماهی قزل آلای رنگین کمان آلوده به ساپرولگنیا تحت حمام درمانی با عصاره هیدروالکلی گزنه طراحی شده است.

مواد و روش کار

آماده سازی زئوسپور قارچ ساپرولگنیا

جهت آلوده‌سازی ماهیان با قارچ، از قارچ ساپرولگنیا جدا شده از ماهی قزل آلای رنگین کمان در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری استفاده شد. به منظور جداسازی زئوسپور قارچ، قطعات مدور آگار (به قطر ۱ سانتی‌متر) به همراه رشته های قارچی از پلیت به لوله‌های آزمایش حاوی آب مقطر استریل و بذر شاهدانه منتقل و به مدت یک هفته در دمای ۲۰-۱۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از تشکیل زئوسپورانژیوم، برای جداسازی زئوسپور، محتوی لوله‌ها سانتریفیوژ (۳۰۰۰g و به مدت ۱۰ دقیقه) و پس ازآن فاز رویی جدا سازی شد و سپس شمارش زئوسپور بالام هماسیتومتر انجام گرفت (Firouzbakhsh *et al*., 2014).

آلوده سازی ماهیان با قارچ ساپرولگنیا

۱۸۰ قطعه بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان با میانگین وزنی ۲۲±۰/۲۷ گرم و عاری از هر گونه بیماری و دارای گواهی سلامت به منظور ضدعفونی سطح بدن آنها از آلودگی های احتمالی، در حمام نمک ۵٪ قرار گرفتند. سپس طبق روش Mehrabi و همکاران (۲۰۱۹) پس از بیهوش کردن ماهیان با پودر گل میخک (۲۰۰ میلی گرم بر لیتر)، برای ایجاد استرس، کاهش موکوس روی بدن ماهی و همچنین افزایش نفوذپذیری قارچ، فلس برداری از ناحیه ساقه دمی ماهیان و به طول ۳ سانتی‌متر انجام شد. سپس ماهیان در دسته‌های ۵ تایی داخل توری (با سایز مش ۶ میلی‌متر) قرار گرفتند و به مدت ۱ دقیقه داخل آب به آرامی تکان داده شدند. پس از آن موکوس اضافی سطح بدن ماهیان با آب شستشو داده شد. سپس ماهیان در ۶ تیمار (هر تیمار در قالب ۳ تکرار ۱۰ تایی) به مخازن مدور پلاستیکی۳۰۰ لیتری با حجم آبگیری ۷۵ لیتر حاوی دوز مشخص از زئوسپور ساپرولگنیا (۳×۱۰^{۵}zoospore/l) همراه با هوادهی منظم منتقل شدند و به مدت ۴ ساعت به روش ساکن و بدون ورودی و خروجی آب حمام داده شدند. پس از پایان حمام ۴ ساعته با زئوسپور ساپرولگنیا، ماهیان در تانک‌های پلاستیکی مدور با حجم آبگیری ۱۰۰ لیتر قرار گرفتند. ۳ روز قبل از حمام ماهیان با زئوسپور، غذادهی ماهیان قطع شد و همچنین ۳ روز بعد از پایان حمام ماهیان با زئوسپور، غذادهی و تعویض آب انجام نشد و پس از آن تا پایان دوره آزمایش،

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119417]
Downloaded from isfj.ir at 11:37 +0330 on Sunday September 22nd 2019

ماهیان با جیره تجاری پایه (شرکت بیضاء) و سه نوبت در روز (صبح، ظهر و عصر) و به میزان ٪۲/۵ وزن بدن تغذیه شدند. طی این مدت، تعویض آب به میزان ۵۰ درصد حجم تانک‌ها به طور روزانه انجام شد. پس از مشاهده نشانه‌های بالینی ساپرولگنیوز (ظهور توده‌های پنبه ای-کرک مانند در ناحیه فلس‌برداری شده ساقه دمی ماهیان) حداقل در ده درصد ماهیان هر تیمار، حمام درمانی با عصاره هیدروالکلی گزنه (شرکت گیاه اسانس، گرگان، ایران)، با دوزهای ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر در چهار تیمار با ۳ تکرار به صورت روزانه به مدت یک ساعت طی یک هفته انجام شد. یک گروه کنترل مثبت (آلوده شده با قارچ و بدون درمان) با ۳ تکرار و یک گروه کنترل منفی (بدون آلوده‌سازی و بدون درمان) با ۳ تکرار نیز در نظر گرفته شد. شرایط فیزیکی و شیمیایی آب مورد استفاده در تانک‌ها در طول دوره آزمایش شامل دما، ۱۵±۰/۷۹ درجه سانتی‌گراد، pH، ۷/۳±۰/۲، اکسیژن محلول، ۷/۱۴±۰/۱۳ میلی گرم بر لیتر و همچنین سختی آب، ۶۰۰ میلی گرم بر لیتر کربنات کلسیم ثبت شد.

خونگیری و انجام آزمایش‌ها

خونگیری در دو نوبت و با فاصله یک هفته، در پایان یک هفته حمام دهی با غلظت های مختلف (۵۰ ppm، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰) عصاره هیدروالکلی گزنه (هفته اول) و در پایان یک هفته پس از قطع حمام دهی (هفته دوم) انجام شد. در هر بار نمونه‌گیری تعداد ۳ ماهی از هر تکرار به طور تصادفی صید و بعد از بیهوشی با پودرگل میخک (۲۰۰ میلی گرم بر لیتر)، خونگیری از ساقه دمی ماهیان با استفاده از سرنگ حاوی ماده ضد انعقاد هپارین انجام شد. شمارش گلبول‌های سفید و قرمز با استفاده از لام هموسیتومتر و محلول رقیق کننده نات، هریک (حاوی ۳/۸۸ گرم کلرید سدیم، ۲/۵۰ گرم سولفات سدیم، ۱/۷۴ گرم فسفات سدیم، ۰/۲۵ گرم فسفات پتاسیم، ۷/۵۰ میلی لیتر فرمالین ٪۳۷ و ۰/۱ گرم متیل ویوله حل شده در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر) انجام شد (Stoskopf, 1993). هماتوکریت به روش میکروهماتوکریت (Borges, 2004) واندازه‌گیری هموگلوبین به روش سیانومت هموگلوبین (Houston, 1990) انجام گرفت. سرم استحصال شده از خون به منظور سنجش فراسنجه های بیوشیمیایی سرم و ایمنی به فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد انتقال یافت. پروتین تام وآلبومین به روش (Bradford, 1976) بوسیله کیت‌های آزمایشگاهی تجاری (زیست‌شیمی، تهران، ایران) و گلوبولین از تفاضل غلظت‌های پروتئین تام وآلبومین اندازه‌گیری شد (Nayak *et al*., 2008). فعالیت لیزوزیم با استفاده از روش Kumari *et al*., 2006) براساس لیز باکتری گرم مثبت حساس به آنزیم لیزوزیم *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma, M3770) اندازه‌گیری شد. جهت سنجش فعالیت انفجار تنفسی لوکوسیت (NBT)، مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از خون هپارینه در داخل میکروتیوب قرار داده شد و ۰/۱ میلی‌لیتر نیز محلول ۰/۲ درصدNBT به آن اضافه گردید. به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از مخلوط حاصل برداشته شده و به یک لوله آزمایش حاوی ۱ میلی‌لیتر دی متیل فرم‌آمید اضافه شد. پس از سانتریفوژ نمودن نمونه، جذب نوری مایع رویی در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه گیری شد (Sahoo *et al*., 2005). برای سنجش میزان عامل مکمل (ACH50) از روش توصیه شده توسط Matsuyama و همکاران (۱۹۸۸) استفاده شد. در این روش به هر ۰/۵ میلی‌لیتر سرم رقیق سازی شده در بافر (-EGTA-MG GVB10Mm)، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون (2.5×10^{8} cell ml^{-1}) گلبول قرمز گوسفند در بافر -10Mm EGTA MG-GVB اضافه شد. بعد از سانتریفوژ، مایع رویی در طول موج ۴۱۴ نانومتر توسط اسپکتوفتومتر قرائت شد. درصد لیز (y) از تقسیم طول موج خوانده شده بر ۱۰۰ درصد لیز (لیز در آب مقطر) بدست آمد.

روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۳ انجام شد. نرمال بودن داده ها بر اساس آزمون Kolmogorov- Smirnov بررسی شد. مقایسه بین میانگین‌ها با روش آنالیز واریانس یک طرفه و اختلاف بین میانگین‌ها با کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری ٪۵ صورت گرفت. برای رسم نمودارها از برنامه Excel استفاده شد.

نتایج

شاخص های خون شناسی

بر اساس نتایج نشان ارائه شده در جدول ۱، در هفته اول (پایان یک هفته حمام دهی با عصاره گزنه) و هفته دوم (پایان یک هفته پس از قطع حمام‌دهی با عصاره گزنه) نمونه‌برداری، تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره هیدروالکلی گزنه افزایش معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) در میزان هموگلوبین نسبت به گروه‌های شاهد و سایر تیمارهای گزنه نشان داد. همچنین بیشترین میزان هموگلوبین در پایان یک هفته حمام دهی با غلظت های مختلف عصاره هیدروالکلی گزنه (هفته اول) و در پایان یک هفته پس از قطع حمام‌دهی (هفته دوم) در تیمار۱۰۰ میلی گرم بر لیتر ثبت شد ($p<۰/۰۵$). افزایش معنی‌دار در تعداد

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119417]
Downloaded from isfj.ir at 11:37 +0330 on Sunday September 22nd 2019

گلبول‌های قرمز تیمارهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر در هر دو هفته نسبت به تیمارهای شاهد مشاهد شد ($p<۰/۰۵$). درصد هماتوکریت در هفته اول افزایش معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) در تیمار ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر نسبت به گروه‌های شاهد و سایر تیمارهای عصاره گزنه به جز تیمار ۵۰ میلی گرم بر لیتر نشان داد ($p<۰/۰۵$) بیشترین میزان هماتوکریت در هفته دوم در تیمار ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر با اختلاف معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) نسبت به سایر تیمارها و گروه کنترل ثبت شد. از لحاظ تعداد گلبول های سفید، تیمارهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر در هفته اول و تیمار ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر در هفته دوم، افزایش معنی داری ($p<۰/۰۵$) نسبت به سایر تیمارها و گروه‌های شاهد نشان دادند. بیشترین تعداد گلبول سفید نیز در هفته اول و دوم در تیمار۱۰۰ میلی گرم بر لیتر ثبت شد ($p<۰/۰۵$) (جدول ۱).

جدول۱: شاخص های خون شناسی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان آلوده به قارچ ساپرولگنیا در پایان یک هفته حمام دهی با غلظت های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰) عصاره ی هیدروالکلی گزنه (هفته اول) و در پایان یک هفته پس از قطع حمام دهی (هفته دوم).ppmمختلف (

Table 1: Blood indices of rainbow trout infected with saprolegnia at the end of a week of bathing with different concentrations (50, 100, 150 and 200 ppm) of hydroalcoholic extract of nettle (first week) and at the end of one week after Stop of bathing (second week).

شاخص خونی	تیمار	هفته اول	هفته دوم
	کنترل منفی	۷/۲۳±۰/۲۸^{c}	۷/۲۰±۰/۰۴^{c}
	کنترل مثبت	۷/۶۷±۰/۳۸^{bc}	۷/۶۳±۰/۰۷^{b}
هموگلوبین (g/dL)	۵۰ppm	۷/۸۹±۰/۳۶^{bc}	۷/۸۹±۰/۳۶^{b}
	۱۰۰ppm	۸/۹۹±۰/۳۳^{a}	۸/۶۶±۰/۳۱^{a}
	۱۵۰ppm	۸/۲۲±۰/۵۴^{b}	۷/۹۰±۰/۰۴^{b}
	۲۰۰ppm	۷/۴۴±۰/۲۴^{c}	۷/۸۵±۰/۰۱^{b}
	کنترل منفی	۱۵/۰۶±۰/۱۱^{c}	۱۷/۰۰±۰/۲۰^{b}
	کنترل مثبت	۱۳/۵۰±۱/۵۱^{d}	۱۵/۹۰±۰/۶۵^{b}
	۵۰ppm	۱۵/۹۶±۰/۵۷^{c}	۱۷/۳۶±۲/۲۱^{b}
گلبول سفید ($\times10^{3}\mu L$)	۱۰۰ppm	۲۲/۱۳±۱/۱۷^{a}	۲۳/۰۳±۱/۳۵^{a}
	۱۵۰ppm	۱۵/۷۶±۰/۳۲^{c}	۱۵/۴۰±۰/۹۱^{b}
	۲۰۰ppm	۱۸/۶۰±۰/۵۲^{b}	۱۸/۳۳±۲/۵۴^{b}
	کنترل منفی	۰/۷۵±۰/۰۲^{b}	۰/۷۸±۰/۰۸^{ab}
	کنترل مثبت	۰/۶۹±۰/۰۱^{b}	۰/۷۶±۰/۰۳^{b}
	۵۰ppm	۰/۹۵±۰/۱۲^{a}	۰/۹۷±۰/۱۳^{a}
گلبول قرمز ($\times10^{6}\mu L$)	۱۰۰ppm	۰/۹۳±۰/۱۴^{a}	۰/۹۶±۰/۱۴^{a}
	۱۵۰ppm	۰/۷۵±۰/۰۴^{b}	۰/۷۹±۰/۰۵^{ab}
	۲۰۰ppm	۰/۸۶±۰/۰۹^{ab}	۰/۹۳±۰/۱۱^{ab}
	کنترل منفی	۳۲/۰۰±۱/۰۰^{c}	۳۱/۶۶±۰/۵۷^{c}
	کنترل مثبت	۳۶/۳۳±۱/۵۲^{b}	۳۴/۰۰±۲/۰۰^{bc}
	۵۰ppm	۳۷/۶۶±۱/۵۲^{ab}	۳۶/۶۶±۲/۰۸^{b}
هماتوکریت (%)	۱۰۰ppm	۳۹/۶۶±۱/۱۵^{a}	۳۹/۳۳±۰/۵۷^{a}
	۱۵۰ppm	۳۵/۰۰±۱/۰۰^{b}	۳۴/۶۶±۱/۱۵^{b}
	۲۰۰ppm	۳۶/۶۶±۲/۵۱^{b}	۳۵/۳۳±۱/۵۲^{b}

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119417]
Downloaded from isfj.ir at 11:37 +0330 on Sunday September 22nd 2019

شاخص های بیوشیمیایی سرم

با توجه به جدول شماره ۲، در هفته اول (پایان یک هفته حمام دهی با عصاره گزنه) و هفته دوم (پایان یک هفته پس از قطع حمام‌دهی با عصاره گزنه) بیشترین میزان پروتئین تام در تیمار ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر ثبت شد که در مقایسه با گروه‌های شاهد و سایر تیمارهای عصاره گزنه اختلاف معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) داشت. همچنین بیشترین میزان آلبومین در هفته اول و دوم در تیمار ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر مشاهده شد که در هفته اول فقط با گروه‌های شاهد و تیمار ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر و در هفته دوم با همه تیمارها اختلاف معنی دار نشان داد($p<۰/۰۵$).. از لحاظ میزان گلوبولین، در هفته اول و دوم نمونه برداری، فقط تیمار ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر افزایش معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) نسبت به گروههای شاهد نشان داد. بیشترین میزان نسبت آلبومین/ گلوبولین در هفته دوم در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر ثبت شد که با گروه‌های شاهد و همه تیمارهای عصاره گزنه بجز تیمار ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر اختلاف معنی دار ($p<۰/۰۵$) نشان داد (جدول ۲).

جدول۲: شاخص های بیوشیمیایی سرم ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان آلوده به قارچ ساپرولگنیا در پایان یک هفته حمام دهی با غلظت ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰) عصاره ی هیدروالکلی گزنه (هفته اول) و در پایان یک هفته پس از قطع حمام‌دهی (هفته دوم).ppmهای مختلف (

Table 2: Biochemical Indices of rainbow trout infected with saprolegnia at the end of a week of bathing with different concentrations (50, 100, 150 and 200 ppm) of hydroalcoholic extract of nettle (first week) and at the end of one week after Stop of bathing (second week)

شاخص خونی	تیمار	هفته اول	هفته دوم
	کنترل منفی	۳/۶۹±۰/۱۲^{b}	۳/۷۱±۰/۰۰^{b}
	کنترل مثبت	۳/۶۴±۰/۳۲^{b}	۳/۸۳±۰/۰۵^{b}
پروتئین تام (g/dL)	۵۰ppm	۳/۸۴±۰/۰۸^{b}	۳/۷۲±۰/۱۸^{b}
	۱۰۰ppm	۴/۹۳±۰/۲۰^{a}	۴/۲۷±۰/۱۳^{a}
	۱۵۰ppm	۳/۷۰±۰/۴۱^{b}	۳/۸۸±۰/۰۷^{b}
	۲۰۰ppm	۳/۴۷±۰/۳۶^{b}	۳/۷۹±۰/۱۶^{b}
	کنترل منفی	۱/۷۵±۰/۰۷^{b}	۱/۷۱±۰/۰۱^{c}
	کنترل مثبت	۱/۷۶±۰/۱۲^{b}	۱/۸۶±۰/۰۳^{b}
	۵۰ppm	۱/۸۹±۰/۰۷^{ab}	۱/۸۰±۰/۱۰^{bc}
آلبومین(g/dL)	۱۰۰ppm	۲/۰۳±۰/۰۶^{a}	۲/۱۲±۰/۰۹^{a}
	۱۵۰ppm	۱/۹۷±۰/۰۱^{a}	۱/۹۰±۰/۰۶^{b}
	۲۰۰ppm	۱/۸۱±۰/۰۸^{b}	۱/۸۲±۰/۰۹^{bc}
	کنترل منفی	۱/۹۴±۰/۰۵^{b}	۲/۰۰±۰/۰۱^{b}
	کنترل مثبت	۱/۸۸±۰/۲۰^{b}	۱/۹۷±۰/۰۲^{b}
گلبولین(g/dL)	۵۰ppm	۱/۹۵±۰/۱۵^{b}	۱/۹۱±۰/۰۹^{b}
	۱۰۰ppm	۲/۹۰±۰/۱۵^{a}	۲/۱۴±۰/۰۳^{a}
	۱۵۰ppm	۱/۷۳±۰/۴۲^{b}	۱/۹۷±۰/۰۴^{b}
	۲۰۰ppm	۱/۶۵±۰/۲۸^{b}	۱/۰۶±۰/۰۷^{b}
	کنترل منفی	۰/۹۰±۰/۰۱^{ab}	۰/۸۵±۰/۰۱^{c}
آلبومین/گلبولین	کنترل مثبت	۰/۹۴±۰/۰۴^{ab}	۰/۹۴±۰/۰۰^{b}
	۵۰ppm	۰/۹۷±۰/۱۲^{ab}	۰/۹۴±۰/۰۱^{b}
	۱۰۰ppm	۰/۶۹±۰/۰۱^{b}	۰/۹۹±۰/۰۲^{a}
	۱۵۰ppm	۱/۱۹±۰/۳۵^{a}	۰/۹۶±۰/۰۴^{ab}
	۲۰۰ppm	۱/۱۱±۰/۱۲^{a}	۰/۹۲±۰/۰۱^{b}

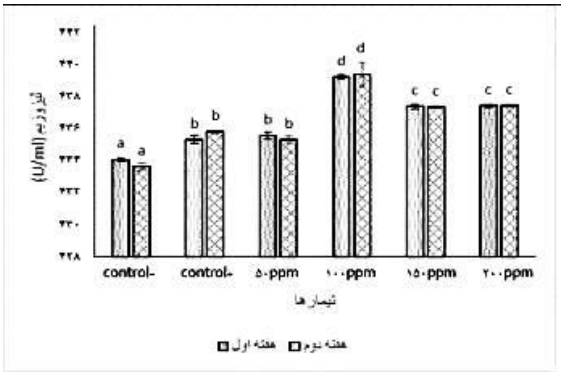
www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119417
Downloaded from isfj.ir at 11:37 +0330 on Sunday September 22nd 2019

شاخص‌های ایمنی

بیشترین میزان فعالیت لیزوزیم سرم (شکل۱) و فعالیت انفجار تنفسی لوکوسیت‌ها (شکل۲) در هفته اول (پایان یک هفته حمام دهی با عصاره گزنه) و هفته دوم (پایان یک هفته پس از قطع حمام‌دهی با عصاره گزنه) در تیمار ۱۰۰میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد که در هر دو هفته اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشت ($p<۰/۰۵$). همچنین تیمارهای ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نسبت به گروه‌های کنترل اختلاف معنی‌دار آماری ($p<۰/۰۵$) در هر دو هفته نمونه‌برداری نشان دادند. از لحاظ فعالیت سیستم کمپلمان (شکل۳)، همه تیمارهای حمام داده شده با عصاره گزنه افزایش معنی‌داری نسبت به گروه‌های کنترل در هر دو هفته نشان دادند و بیشترین میزان فعالیت سیستم کمپلمان در تیمار ۱۰۰میلی گرم بر لیتر ثبت شد که با سایر تیمارهای عصاره گزنه اختلاف معنی‌دار داشت ($p<۰/۰۵$).

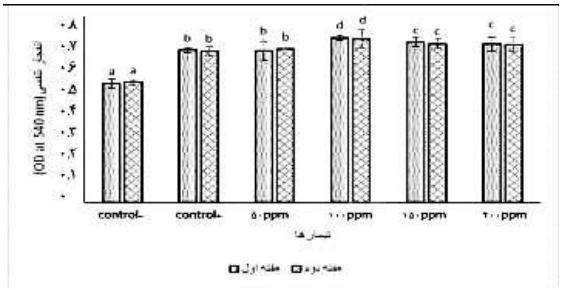


شکل ۱: فعالیت لیزوزیم سرم ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان آلوده به قارچ ساپرولگنیا در پایان یک هفته حمام دهی با غلظت های مختلف (ppm ۵۰ ، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰) عصاره هیدروالکلی گزنه (هفته اول) و در پایان یک هفته پس از قطع حمام دهی (هفته دوم).

Figure 1: Serum lysozyme activity of rainbow trout infected with saprolegnia at the end of a week of bathing with different concentrations (50, 100, 150 and 200 ppm) of hydroalcoholic extract of nettle (first week) and at the end of one week after Stop of bathing (second week).

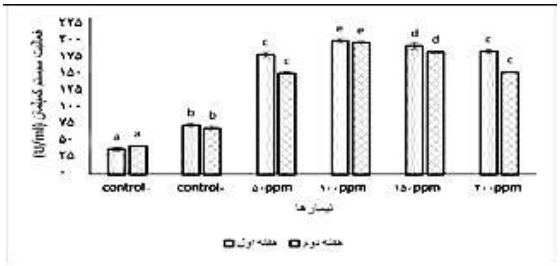
تلفات

با توجه به شکل ۴، پس از گذشت ۱۴ روز از رویارویی ماهیان با زئوسپور ساپرولگنیا، کاهش معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) درصد تلفات در تمامی تیمارهای تحت حمام درمانی با عصاره گزنه نسبت به گروه شاهد مثبت مشاهده شد. بیشترین و کمترین درصد تلفات بترتیب در گروه شاهد مثبت (٪۳۶/۶۶) و تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر گزنه (٪۶/۶۶) مشاهده شد. در گروه کنترل منفی (بدون آلودگی و بدون درمان) هیچگونه تلفاتی مشاهده نشد. کاهش سرعت رشد قارچ و همچنین تسریع التیام زخم در ماهیانی که با ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره گزنه حمام شده بودند، مشاهده شد. حمام دهی با عصاره گزنه مانع از گسترش قارچ زدگی در محل فلس‌برداری ماهیان تحت تیمار (شکل ۵) و عدم دریافت حمام گزنه در گروه کنترل باعث رشد و گسترش قارچ به بافت ماهی شده است (شکل ۶).



شکل ۲: فعالیت انفجار تنفسی لوکوسیت ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان آلوده به قارچ ساپرولگنیا در پایان یک هفته حمام دهی با غلظت های مختلف (ppm ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰) عصاره ی هیدروالکلی گزنه (هفته اول) و در پایان یک هفته پس از قطع حمام دهی (هفته دوم).

Figure 2: Leukocyte respiratory burst activity of rainbow trout infected with saprolegnia at the end of a week of bathing with different concentrations (50, 100, 150 and 200 ppm) of hydroalcoholic extract of nettle (first week) and at the end of one week after Stop of bathing (second week).



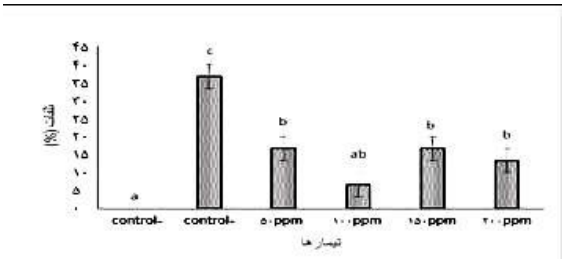
شکل ۳: فعالیت سیستم کمپلمان ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان آلوده به قارچ ساپرولگنیا در پایان یک هفته حمام دهی با غلظت های مختلف (ppm ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰) عصاره ی هیدروالکلی گزنه (هفته اول) و در پایان یک هفته پس از قطع حمام دهی (هفته دوم).

Figure 3: Complement system activity of rainbow trout infected with saprolegnia at the end of a week of bathing with different concentrations (50, 100, 150 and 200 ppm) of hydroalcoholic extract of nettle (first week) and at the end of one week after Stop of bathing (second week).

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119417]
Downloaded from isfj.ir at 11:37 +0330 on Sunday September 22nd 2019



شکل ۴: درصد تلفات در تیمارهای ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان پس از آلوده سازی با ساپرولگنیا در پایان یک هفته پس از قطع حمام دهی (روز ۱۴ پس از آلوده سازی با قارچ ساپرولگنیا)

Figure 4: Percentage of losses in rainbow trout treatments after infection with saprolegnia at the end of a week after bathing for 14 days.

شکل ۵ : عدم رشد قارچ در تیمار حمام شده با ۱۰۰میلی گرم در لیتر عصاره گزنه پس از ۱۴ روز آلوده سازی با ساپرولگنیا

Figure 5: Non-growth of fungi in the treated group with 100 mg / l nettle extract after 14 days of infection with saprolegnia.

شکل ۶: رشد متراکم قارچ در ساقه دمی و تخریب باله در ماهی گروه کنترل مثبت پس از ۱۴ روز آلوده سازی با ساپرولگنیا

Figure 6: Dense growth of fungi in peduncle and Destruction of fins in Positive control group after 14 days of infection with saprolegnia.

بحث

شاخص‌های خونی و بیوشیمیایی سرم به طور عمده به عنوان شاخص شرایط فیزیولوژیک یا پاسخ به استرس (Cataldi *et al*., 1998) و همچنین در تحلیل وضعیت سیستم ایمنی بدن ماهی مطرح می‌باشند (Tavares-Dias and Moraes, 2007). بهبود شاخص‌های خون‌شناسی، بیوشیمیایی سرم و ایمنی قزل آلای رنگین کمان با بکارگیری گزنه در مطالعات گذشته گزارش شده است (Awad *et al*., 2013; Awad and Austin, 2010). طبق نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر، اثر مثبت عصاره گزنه بر افزایش شاخص‌های خون‌شناسی در هفته‌های پس از حمام‌دهی مشاهده شد.

مطالعات نشان داده‌اند که گزنه غنی از ویتامین C و آهن است (Allardice, 1993). این احتمال وجود دارد که عملکرد گزنه بر شاخص‌های خون‌شناسی به دلیل تأثیر ویتامین C موجود در آن بر افزایش جذب آهن از روده ماهی باشد (Lim *et al*., 2000) بطوریکه در طب سنتی از گیاه گزنه به عنوان داروی ضد کم خونی استفاده می‌شود (Wetherilt, 1992). نتایج مشابه در بهبود شاخص‌های خون‌شناسی در مطالعات مختلف گزارش شده است که از آن جمله می‌توان به اثر آلوئه‌ورا (*Aloe barbadensis*) بر تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) (Gabriel *et al*., 2015)، اثر عصاره آبی– الکلی برگ زیتون بر ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) (Karimi Pashaki *et al*., 2019)، اثر عصاره نعنا فلفلی بر قزل‌آلای رنگین کمان (Adel *et al*., 2015)، اثر ریحان (*Ocimum basilicum*) بر کپور معمولی (Amirkhani and Firouzbakhsh, 2015) و اثر گزنه بر فیل ماهی (Binaii *et al*., 2014) و قزل‌آلای رنگین‌کمان (Awad *et al*., 2013) اشاره کرد. هماتوکریت، غلظت هموگلوبین و گلبول قرمز، نشان‌دهنده ظرفیت حمل اکسیژن می‌باشند (Graham *et al*., 1985). بهبود شاخص‌های گلبول قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت در ماهیان حمام شده با گزنه بر توانایی این گیاه در تحریک تولید گلبول‌های قرمز تأکید دارد که متعاقب آن به افزایش توانایی حمل اکسیژن و قدرت دفاعی بدن در برابر استرس‌های فیزیولوژیک منجر می‌شود. هماتوکریت خون به عنوان یک شاخص مهم و رایج در تعیین سلامت و بیماری ماهیان مورد استفاده قرار می‌گیرد (Houston and Rupert, 1976). بر اساس برخی مطالعات میزان هماتوکریت در ماهی تحت تأثیر استرس‌های فیزیکی افزایش می‌یابد (Barton *et al*., 1985)، این افزایش ممکن است به علت جذب آب در گلبول‌های قرمز باشد (Miligan and Wood, 1982).

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119417]
Downloaded from isfj.ir at 11:37 +0330 on Sunday September 22nd 2019

در این تحقیق نیز میزان هماتوکریت پس از چالش ماهیان با قارچ ساپرولگنیا افزایش یافت. افزایش میزان هماتوکریت را نیز جهت افزایش منابع اکسیژن برای اندام‌ها در پاسخ به درخواست متابولیک بیشتر طی استرس ایجاد شده، می‌توان توجیه نمود. تعداد گلبول های سفید خون بازتابی از توانایی میزبان جهت پاسخ ایمنی و مبارزه با بیماری می‌باشد بطوریکه گونه‌های با سطح بالاتر گلبول‌های سفید به طور مؤثرتری قادر به مبارزه با عفونت‌ها خواهند بود (Douglass and Jane, 2010). در مطالعه حاضر افزایش معنی‌دار تعداد گلبول‌های سفید در هفته اول بعد از حمام درمانی با عصاره گزنه در تمام تیمارهای حمام داده شده مشاهده شد. داده های منتشره از مطالعات مختلف بیانگر تأثیر گیاهان دارویی به عنوان محرک ایمنی و افزایش دهنده تعداد گلبول های سفید می باشد (Binaii *et al*., 2014; Harikrishnan *et al*., 2010).

پروتئین‌های خون یکی از شاخص‌های مکانیسم دفاعی هومورال محسوب می‌شوند و به عنوان یک شاخص بالینی در ارزیابی سلامت و وضعیت استرس در گونه های آبزیان مطرح می‌باشند (Peyghan *et al*., 2014). آلبومین سرم فراوان‌ترین پروتئین در پلاسمای خون است و عملکرد آن به عنوان حامل انواع مواد مغذی، متابولیت‌ها و البته به عنوان حامل اصلی عنصر روی در پلاسما شناخته شده است (Peters, 1995). در نتیجه افزایش در میزان آلبومین، نشانه‌ای از بهبود فراسنجه‌های بیوشیمیایی در ماهی است (Ngugi *et al*., 2015). در مطالعه حاضر افزایش در شاخص‌های بیوشیمیایی سرم شامل پروتئین تام، آلبومین و گلوبولین در تیمارهای حمام داده شده با عصاره گزنه مشاهده شد و بیشترین میزان این شاخص ها در تیمار ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر ثبت شد. در برخی از مطالعات پیشین نیز گیاه گزنه سبب افزایش سطح پروتئین پلاسما، آلبومین و گلوبولین درگونه‌های مختلف شده است (Saeidi Asl *et al*., 2017; Awad *et al*., 2013; Binaii *et al*., 2014; Gabor *et al*., 2010) افزایش سطوح پروتئین‌های پلاسما می‌تواند منجر به افزایش پاسخ‌های ایمنی غیراختصاصی شود و در نهایت سیستم ایمنی را تقویت نماید. لیزوزیم یکی ازترکیبات هومورال سیستم ایمنی غیراختصاصی است که باعث تخریب جداره باکتری‌ها، فعال‌سازی سیستم کمپلمان و افزایش فعالیت بیگانه‌خواری به عنوان اپسونین (تسهیل کننده بیگانه‌خواری) در ماهی می گردد (Sakai, 1999). افزایش فعالیت لیزوزیم به مقابله بهتر سیستم ایمنی ماهی در برابر عوامل عفونی و استرس‌ها کمک می‌نماید. نتایج این تحقیق نشان داد که فعالیت لیزوزیم سرم در ماهیان تحت تیمار حمام دهی با عصاره گزنه افزایش معنی داری نسبت به گروه شاهد داشته است. این افزایش را می‌توان به قدرت تحریک پذیری مواد مؤثره موجود در عصاره گیاه گزنه نسبت داد که سبب افزایش سطح لیزوزیم شده است.

فاگوسیتوز یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های دفاعی در برابر عوامل بیماری زاست. سلول‌های فاگوسیت‌کننده ماهی قادر به تولید سوپراکساید (O_2^-) طی فرآیندی تحت عنوان انفجار تنفسی می‌باشند. رادیکال آزاد اکسیژن یکی از فاکتورهای اختصاصی در انفجار تنفسی هست که توسط برخی از سلول های فاگوسیتوزی مثل نوتروفیل ها و ماکروفاژها تولید می شود (Secombes and Fletcher, 1992). در مطالعه حاضر، افزایش فعالیت فاگوسیتوزی در تیمارهای تحت درمان با گزنه می‌تواند به دلیل وجود فلاونوئیدهای گلیکوزیدی گزنه باشد که موجب افزایش انفجار اکسیداتیو نوتروفیل‌ها می‌شود (Akbay *et al*., 2003). در پژوهش‌های محققین، افزودن عصاره آلوئه ورا (۲ میلی گرم بر لیتر) به آب منجر به افزایش فعالیت انفجار تنفسی در matrinxã (*Brycon amazonicus*) شد (Zanuzzo *et al*., 2012). کمپلمان‌ها در واقع پروتئین‌های فاز حاد سیستم ایمنی محسوب می‌شوند و غلظت آنها معمولاً پس از نکروز سلولی و مرگ بافتی تغییر می‌کند. به عبارتی، تغییر سطح کمپلمان‌ها به عنوان یک پاسخ فاز حاد سیستم ایمنی نوعی واکنش سیستمیک تعمیم یافته محسوب می‌شود که می‌توان آن را به التهاب و پاسخ ایمنی ذاتی مربوط دانست (Naghdi badi and Makizadeh Tafti, 2007). در مطالعه حاضر فعالیت سیستم کمپلمان در ماهیان حمام داده شده با عصاره گزنه نسبت به گروه شاهد افزایش یافت. نتایج مشابه در باره تأثیر عصاره‌های گیاهی به عنوان محرک بر شاخص‌های دفاعی گزارش شده است. برای مثال، Dügenci و همکاران (۲۰۰۳) در بررسی اثرات چند گونه گیاه دارویی بر سطح ایمنی ماهی قزل‌آلا به این نتیجه رسیدند که عصاره گیاهانی نظیر داروا‌ش (*Viscum album*)، گزنه (*U. dioica*) و زنجبیل (*Zingiber officinale*) سبب افزایش سطح ایمنی در بدن ماهی می‌گردد.

در مطالعه‌ای دیگر بهبود پاسخ های ایمنی قزل آلای رنگین کمان با بکارگیری عصاره گزنه مورد تأیید قرار گرفت (Saeidi Asl *et al*., 2017). بهبود پارامترهای ایمنی خون با استفاده از گیاه دارویی گزنه می‌تواند به دلیل ترکیبات فلاوونوئیدها، کاروتنوئیدها و ویتامین C موجود در آن باشد که به طور عمومی اثرات سودمندی بر سیستم ایمنی دارند (Houston and Rupert, 1976)، تاکنون اثر اسانس اکالیپتوس (*Eucaliptus camaldolensis*) (Ebrahimzadeh Mousavi *et al*., 2006)، و اسانس شمعدانی (*Geranium*

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119417]
Downloaded from isfj.ir at 11:37 +0330 on Sunday September 22nd 2019

herbarum) (Rohani *et al*., 2006) در کنترل آلودگی‌های قارچی آبزیان مورد تأیید قرار گرفته است. نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر نیز نشان داد که تیمارهای تحت درمان با حمام عصاره گزنه در مواجهه با قارچ ساپرولگنیا، علائم قارچ زدگی کمتری را نسبت به گروه کنترل نشان دادند و همچنین تلفات این تیمارها به طور معنی داری پایین‌تر از گروه کنترل بود.

خواص بازدارندگی یا قارچ ایستایی گیاهان را می‌توان به وجود متابولیت‌های ثانویه متنوع و متفاوت در آنها نسبت داد. Gülçin و همکاران (۲۰۰۴) فعالیت ضدقارچی و ضد میکروبی گزنه را با وجود ترکیبات فنولی موجود در آن مانند کارواکرول و تیمول اثبات کرده‌اند. همچنین مطالعات نشان داده است که گیاهان غنی از فلاونوئید و ترکیبات ترپنی با افزایش فعالیت ویتامین C و با اثر ضدباکتریایی خود موجب تقویت سیستم ایمنی و تولید آنتی‌بادی می‌شوند (Catoni *et al*., 2008). فلاونوئیدها می‌توانند از طریق حذف رادیکال‌های آزاد و با خواص آنتی اکسیدانی خود استرس اکسیداتیو را کاهش دهند و موجب افزایش فعالیت سلول‌های لنفاوی شوند (Pietta and Simonetti, 1998; Zhu *et al*., 2000).

بررسی ماکروسکوپی روند رشد رشته‌های قارچی ساپرولگنیا روی بدن ماهیان درگیر شده، نشان داد که در ماهیان تحت تیمار با عصاره گزنه، سرعت رشد قارچ کاهش و در واقع کنترل شده است. همچنین حمام عصاره گزنه باعث بهبود زخم ایجاد شده در محل فلس‌برداری ماهیان تحت تیمار حمام دهی در مقایسه با گروه کنترل شد. تأثیر مثبت گیاه گزنه در روند التیام زخم را می‌توان با ترکیبات موجود در آن ارتباط داد. Cummings و Olsen (۲۰۱۱) و Randall و همکاران (۱۹۹۹) بیان داشتند که این گیاه دارای ترکیبات مختلف از جمله مقادیر زیادی هیستامین می باشد. همچنین مطالعات مختلفی از تأثیر هیستامین بر افزایش سرعت التیام وجود دارد. در این رابطه، Numata و همکاران (۲۰۰۶) بیان داشتند که هیستامین از طریق فعالسازی فاکتور رشد فیبروبلاستی، منجر به افزایش آنژیوژنز در بافت التیامی و موجب تسریع در روند التیام زخم‌های جلدی می‌شود. در تحقیقی دیگر، Ghosh و همکاران (۲۰۰۱) بیان نمودند که هیستامین از طریق افزایش تولید فاکتور رشد اندوتلیال عروقی، منجر به افزایش میزان بافت همبند در فرآیند التیام زخم می‌شود.

در مطالعه Zanuzzo و همکاران (۲۰۱۵) حمام‌دهی مولدین (*Bryconama zonicus*) matrinxã با آلوئه ورا (۰/۱ گرم بر لیتر) به مدت ۲۴ ساعت بعد از استرس تخم کشی، با افزایش فعالیت انفجار تنفسی نسبت به گروه کنترل، منجر به افزایش مقاومت آنها شد و از بروز زخم های پوستی جلوگیری کرد.

همچنین Zahran و Risha (۲۰۱۳) دریافتند که حمام دهی تیلاپیای نیل (*O. niloticus*) با پرمنگنات پتاسیم (KMnO4, 2.5 ppm) باعث افزایش مقاومت ماهیان مواجهه شده با *Saprolegnia ferax* و کاهش تلفات آنها (۴۰٪) نسبت به گروه کنترل (۹۲/۵٪) شد. در مطالعات Firouzbakhsh و همکاران (۲۰۱۴b) تغذیه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با جیره مکمل شده با سینبیوتیک، سبب کاهش تلفات ماهیان در مواجهه با ساپرولگنیا پارازیتیکا از ۸۸٪ در گروه کنترل به ۲۷-۴۴٪ در تیمارهای تغذیه شده با سینبیوتیک شد. با توجه به نتایج مشاهده شده از مطالعه حاضر، حمام عصاره گزنه می‌تواند به عنوان یک عصاره دارویی با افزایش پارامترهای ایمنی، موجب افزایش توان سیستم ایمنی ماهیان قزل الای رنگین کمان گردد. همچنین این عصاره دارویی (دوز ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر) می‌تواند راهکار مناسبی برای پیشگیری اثرات سوء احتمالی ناشی از تضعیف سیستم ایمنی باشد و در نهایت منجر به پیشگیری، مقاومت و بازماندگی بیشتر ماهیان در برابر ساپرولگنیوز در مزارع پرورشی شود.

منابع

Adel, M., Pourgholam, R., Zorriehzahra, S.J. and Ghiasi, M., 2015. The effect of different level of *Mentha piperita* on some of the hematological, biochemical and immune parameters of *Oncorhynchus mykiss*. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 24(1):37-46.DOI: 10.22092/ISFJ.2014.103049.

Akbay, P., Basaran, A.A., Undeger, U. and Basaran, N., 2003. In vitro immunomodulatory activity of flavonoid glycosides from *Urtica dioica*. Phytotherapy Research: *An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 17(1):34-37. DOI:10.1002/ptr. 1068.

Allardice, P., 1993. A-Z of companion planting. Harper Collins Publishers, UK. 208P.

Amirkhani, N. and Firouzbakhsh, F., 2015. Protective effects of basil (*Ocimum basilicum*) ethanolic extract supplementation diets against experimental *Aeromonas hydrophila* infection in common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture Research*, 46(3):716-724. DOI:10.1111/are. 12217.

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119417]
[Downloaded from isfj.ir at 11:37 +0330 on Sunday September 22nd 2019]

Awad, E. and Austin, B., 2010. Use of lupin, *Lupinus perennis*, mango, *Mangifera indica*, and stinging nettle, *Urtica dioica*, as feed additives to prevent *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout,*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of fish diseases*, 33(5):413-420. DOI:10.1111/j.1365-2761.2009.01133.x.

Awad, E., Austin, D. and Lyndon, A.R., 2013. Effect of black cumin seed oil (*Nigella sativa*) and nettle extract (Quercetin) on enhancement of immunity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture*, 388:193-197. DOI:10.1016/j.aquaculture.2013.01.008.

Barton, B.A., Weirter, G.S. and Schreck, C.B., 1985. Effect of prior acid exposure on physiological responses of juvenile rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to acute handling stress. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42(4): 710-717. DOI:10.1139/f85-091.

Binaii, M., Ghiasi, M., Farabi, S.M.V., Pourgholam, R., Fazli, H., Safari, R., Alavi ,S.E., Taghavi, M.J and Bankehsaz, Z,. 2014 .Biochemical and hemato-immunological parameters in juvenile beluga (*Huso huso*) following the diet supplemented with nettle (*Urtica dioica*). *Fish and Shellfish Immunology*, 36(1): 46-51. DOI:10.1016/j.fsi.2013.10.001.

Bombardelli, E. and Morazzoni, P, 1997. *Urtica dioica* L. Fitoterapia 68(5): 387-402.

Borchers, AT., Keen ,C.L., Stern , J.S. and Gershwin , M.E., 2000. Inflammation and Native American medicine: the role of botanicals. *The American Jjournal of Clinical Nutrition*, 72(2): 339-347. DOI:10.1093/ajcn/72.2.339.

Borges, A., Scotti, L.V., Siqueira, D.R., Jurinitz, D.F. and Wassermann, G.F., 2004. Hematologic and serum biochemical values for jundiá (*Rhamdia quelen*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 30(1): 21-25. DOI: 10.1007/s10695-004-5000-1.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2): 248-254. DOI:10.1016/0003-2697(76)90527-3.

Bruno, D.W. and Woo, B.P., 1994. Viral, Bacterial and Fungal Infections. Edited by P.T.K 4. Woo and D.W. Bruno. CABI Publishing, Waling ford, Oxon, UK. pp 599-559.

Cataldi, E., Di Marco, P., Mandich, A. and Cataudella, S., 1998. Serum parameters of Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* (Pisces: Acipenseriformes): effects of temperature and stress. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A Molecular and Integrative Physiology*, 121(4): 351-354. DOI:10.1016/S1095-6433(98)10134-4.

Catoni, C., Schaefer, H.M. and Peters, A., 2008. Fruit for health: the effect of flavonoids on humoral immune response and food selection in a frugivorous bird. *Functional Ecology*, 22(4): 649-654. DOI: 10.1111/j.1365-2435.2008.01400.x.

Cummings, A.J. and Olsen, M,. 2011. Mechanism of action of stinging nettles. *Wilderness and Environmental Medicine*, 22(2): 136-139. DOI:10.1016/j.wem.2011.01.001.

Douglass, J.W. and Jane, K.W., 2010. Schalm's Veterinary Hematology. John Wiley and Sons, Blackwell Publishing Ltd, 1232P.

Dügenci, S.K., Arda, N. and Candan, A., 2003. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. *Journal of Ethnopharmacology*, 88(1): 99-106. DOI:10.1016/S0378-8741(03)00182-X.

Ebrahimzadeh Mousavi, H., Rohani, M.S., Khowsravi, A.R., Mehrabi, Y. and Basti,A ., 2006. The Evaluation of *Eucaliptus*

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119417]
Downloaded from isfj.ir at 11:37 +0330 on Sunday September 22nd 2019

camaldolensis Dehnh. Esscence Application in Control of Fungal Pollution of Trout Eggs. *Journal of Medicinal Plants*, 4(20): 42-47.

Firouzbakhsh, F., Afsarian, M.H., Hooshangi, S. and Badali, H., 2014. Evaluation of in vitro antifungal activity of *Foeniculum*, *Achillea*, *Satureja*, *Cinnamomum* and *Artemisia* against *Saprolegnia parasitica*. *Arak Medical University Journal*, 17(5):60-69. DOI:10.1111/ j.1365-2109.2012.03261.x.

Firouzbakhsh, F., Zolfaghari,A., Mehrabi, Z. and Khalesi, M.K., 2015. In vitro antifungal activity of Nettle (*Urtica dioica*) and Basil (*Ocimum basilicum*) extracts on *Saprolegnia parasitica*. *Journal Animal Environment*, 7(3): 211-216.

Gabor, E.F., Şara, A. and Barbu,A., 2010. The effects of some phytoadditives on growth, health and meat quality on different species of fish. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, 43(1):61-65.

Gabriel, N.N., Qiang, J., He, J., Ma, X.Y., Kpundeh, M.D. and Xu, P. 2015. Dietary *Aloe vera* supplementation on growth performance, some haemato-biochemical parameters and disease resistance against *Streptococcus iniae* in tilapia (GIFT). *Fish and Shellfish Immunology*, 44(2): 504-514. DOI:10.1016/j.fsi.2015.03.002.

Ghosh, A.K., Hirasawa, N. and Ohuchi, K., 2001. Enhancement by histamine of vascular endothelial growth factor production in granulation tissue via H2 receptors. *British Journal of Pharmacology*, 134(7): 1419-1428. DOI:10.1038/sj.bjp.0704372.

Graham, MS., Haedrich, R.L. and Fletcher, G.L,. 1985. Hematology of three deep-sea fishes: a reflection of low metabolic rates. *Comparative and Biochemstry and Physiology. Part A: Comparative Physiology*, 80(1): 79-84. DOI:10.1016/0300-9629(85)90682-6.

Gülçin, I., Küfrevioğ lu, Ö.İ., Oktay, M. and Büyükokuroğ lu, M.E., 2004. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica L.*). *Journal of Ethnopharmacology*, 90(2-3): 205-215. DOI:10.1016/j.jep.2003.09.028.

Harikrishnan, R., Balasundaram, C. and Heo,M.S., 2010. Herbal supplementation diets on hematology and innate immunity in goldfish against *Aeromonas hydrophila*. *Fish Fish and Shellfish Immunology*, 28(2): 354-361. DOI:10. 1016/j.fsi.2009.11.013.

Houston, A.H. and Rupert, R., 1976. Immediate response of the hemoglobin system of the goldfish, *Carassius auratus*, to temperature change. *Canadian Journal of Zoology*, 54(10): 1737-1741.DOI:10.1139/z76-201.

Houston, A.H., 1990. Blood and circulation. In: Schreck, C.B. and Moyle, P.B., (eds.) Methods for fish biology. American Fisheries Society, Bethesda, MD, USA. pp 273-334.

Karimi Pashaki, A., Ghasemi, M., Zorrieh Zahra, S.J., Shrif Rohani, M. and Hosseini, S.M., 2019. Effect of diets containing aqueous-alcoholic extract of olive leaf (*Olea eurcpaea L.*) on growth performance and some blood and immune parameters in common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 27(2):71-80. DOI:10.220092/ISFJ. 2018.116698.

Kumari, J., Sahoo, P.K., Swain, T., Sahoo, S.K., Sahu, A.K. and Mohanty, B.R., 2006. Seasonal variation in the innate immune parameters of the Asian catfish (*Clarias batrachus*). *Aquaculture*, 252(2-4): 121-127. DOI:10.1016/j.aquaculture.2005.07.025.

Lim, C., Klesius, P.H., Li, M.H. and Robinson, E.H., 2000. Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, hematology,

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119417]
Downloaded from isfj.ir at 11:37 +0330 on Sunday September 22nd 2019

immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge. *Aquaculture*, 185(3-4):313-327. DOI:10.1016/S0044-8486(99)00352-X.

Matsuyama, H., Tanaka, K., Nakao, M. and Yano, T., 1988. Characterization of the alternative complement pathway of carp. *Developmental and Comparative Immunology*, 12(2): 403-408. DOI: 10.1016/ 0145-305X(88)90015-8.

Mehrabi, Z., Firouzbakhsh, F., Rahimi-Mianji, G. and Paknejad, H., 2019. Immunostimulatory effect of Aloe vera (*Aloe barbadensis*) on non-specific immune response, immune gene expression, and experimental challenge with *Saprolegnia parasitica* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss). Aquaculture*, *500* :.330-338.DOI: 10.1016/j.aquaculture.2019.01.025

Meyer, F.P. and Jorgenson, T.A., 1983. Teratological and other effects of malachite green on development of rainbow trout and rabbits. *Transactions of the American Fisheries Society*, 112(6): 818-824. DOI:10.1577/1548-8659(1983)112%3C818:TAOEOM%3E2.0.CO; 2.

Miligan, CL. and Wood, C.M., 1982. Disturbances in haematology, fluid volume distribution and circulatory function associated with low environmental pH in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Journal of Experimental Biology*, 99(1): 397-415.

Naghdi badi, H. and Makizadeh Tafti, M., 2007. A review on Thymus species *Journal of Medical Plants*,7: 1-13.

Nayak, S.K., Swain, P., Nanda, P.K., Dash, S., Shukla, S., Meher, P.K. and Maiti, N.K., 2008. Effect of endotoxin on the immunity of Indian major carp, *Labeo rohita*. *Fish and Shellfish Immunology*, 24(4): 394-399. DOI:10.1016/j.fsi.2007.09.005.

Ngugi, C.C., Oyoo-Okoth, E., Mugo-Bundi, J., Orina, P.S., Chemoiwa, E.J. and Aloo, P.A ., 2015. Effects of dietary administration of stinging nettle (*Urtica dioica*) on the growth performance, biochemical, hematological and immunological parameters in juvenile and adult Victoria Labeo (*Labeo victorianus*) challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*, 44(2): 533-541. DOI:10.1016/ j.fsi.2015.03.025.

Numata, Y., Terui, T., Okuyama, R., Hirasawa, N., Sugiura, Y., Miyoshi, I., Watanabe, T., Kuramasu, A., Tagami, H.and Ohtsu, H., 2006. The accelerating effect of histamine on the cutaneous wound-healing process through the action of basic fibroblast growth factor. *Journal of Investigative Dermatology*, 126(6): 1403-1409. DOI:10.1038/sj.jid. 5700253.

Peters, J.r. T., 1995. All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications. Academic press.San Diego, California, USA. 434P.

Peyghan, R., Khadjeh, G.H. and Enayati, A., 2014. Effect of water salinity on total protein and electrophoretic pattern of serum proteins of grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. In Veterinary research forum: an international quarterly journal(Vol. 5, No. 3, p. 225). Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran, 5(3):225-229.

Pietta, P. and Simonetti, P., 1998. Dietary flavonoids and interaction with endogenous antioxidants. *IUBMB Life*, 44(5): 1069-1074. DOI:10.1080/15216549800202132.

Randall, C., Meethan, K., Randall, H. and Dobbs, F., 1999. Nettle sting of *Urtica dioica* for joint pain—an exploratory study of this complementary therapy. *Complementary Therapies in Medicine*, 7(3): 126-131. DOI:10.1016/S0965-2299(99)80119-8.

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119417]
Downloaded from isfj.ir at 11:37 +0330 on Sunday September 22nd 2019

Rohani, MS., Ebrahimzadeh, MH., Khosravi, A.R., Mokhayer, B., Mirzargar, S.S. and Mehrabi, Y.E., 2006. Evaluation of *Geranium herbarum* escence application in control of fungal contamination in rainbow trout eggs. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 61(3): 269-272.

Saeidi Asl, M.R., Adel, M., Caipang, C.M.A. and Dawood, M.A., 2017. Immunological responses and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles following dietary administration of stinging nettle (*Urtica dioica*). *Fish and Shellfish Immunology*, 71:230-238. DOI: 10.1016/j.fsi.2017.10.016. Epub 2017 Oct 7.

Sahoo, P.K., Kumari, J. and Mishra, B.K., 2005. Non-specific immune responses in juveniles of Indian major carps. *Journal of Applied Ichthyology*, 21(2): 151-155. DOI:10.1111/j.1439-0426.2004.00606.x.

Sakai, M., 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172(1-2): 63-92. DOI:10.1016/S0044-8486(98)00436-0.

Secombes, C.J. and Fletcher, T.C., 1992. The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. *Journal of Fish Diseases*, 2: 53-71. DOI:10.1016/0959-8030(92)90056-4.

Stoskopf, M.K., 1993. Fish medicine. WB Sanders Company, Pilladelphia. USA. 220P.

Tapwal, A., Garg, S., Gautam, N., Kumar, R., 2011. In vitro antifungal potency of plant extracts against five phytopathogens . *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(6): 1093-1098. **.**DOI:10.1590/S1516-89132011000600003.

Tavares-Dias, M. and Moraes, F.R.D., 2007. Leukocyte and thrombocyte reference values for channel catfish (*Ictalurus punctatusRaf*), with an assessment of morphologic, cytochemical, and ultrastructural features. *Veterinary Clinical Pathology*, 36(1): 49-54. DOI:10.1111/j.1939-165X.2007.tb00181.x.

Wetherilt, H., 1992. Evaluation of *Urtica* species as potential sources of important nutrients. *In Developments in Food Science*, 29: 15-25. DOI:10.1016/B978-0-444-88834-1.50007-7.

Zahran, E.and Risha, E., 2013. Protective role of adjuvant and potassium permanganate on oxidative stress response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) challenged with *Saprolegnia ferax*. *SpringerPlus*, 2(1): 94. DOI:10.1186/2193-1801-2-94.

Zanuzzo, F.S., Biller-Takahashi, J.D. and Urbinati, E.C., 2012. Effect of *Aloe vera* extract on the improvement of the respiratory activity of leukocytes of matrinxa during the transport stress. Rev. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 41(10): 2299-2302. DOI:10.1590/S1516-35982012001000023.

Zanuzzo, F.S., Zaiden, S.F., Senhorini, J.A., Marzocchi-Machado, C.M.and Urbinati, E.C., 2015. *Aloe vera* bathing improved physical and humoral protection in breeding stock after induced spawning in matrinxã (*Brycon amazonicus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 45(1): 132-140. DOI:10.1016/ j.fsi.2015.02.017.

Zhu, Q.Y., Huang, Y. and Chen, Z.Y., 2000. Interaction between flavonoids and α-tocopherol in human low density lipoprotein. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 11(1): 14-21. DOI:10.1016/S0955-2863(99)00065-0.

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119417]

Downloaded from isfj.ir at 11:37 +0330 on Sunday September 22nd 2019

Bathing effects of nettle (*Urtica dioica*) hydroalcoholic extract on immunological and hematological indices in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected with *Saprolegnia* fungal

Alishah N.[1]; Firouzbakhsh F. [1*]; Mehrabi, Z.[1]

[*]f.firouzbakhsh@sanru.ac.ir

1-Department of Fisheries, Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

Abstract

The aim of this study was to investigate the effects of nettle (*Urtica dioica*) hydroalcoholic extract (NHE) on saprolegniasis control, serum biochemistry, immunological and hematological indices of rainbow trout infected with *Saprolegnia*. Rainbow trout (n=180, weight=22±0.27g) were randomly distributed in six treatments. Experimental groups were first made prone to the disease by scaling the caudal peduncle, and then were exposed to bathing with *S.* zoospores (3×10^5/L) for 4 hours. After infection, fish were stocked in 100 L tanks and received four treatments (50, 100, 150, and 200 mg/L of NHE) daily for 1 hour during 1 week. At the one-week bathing with NHE (first week), and a week after the bathing (second week), parameters of hematology [red blood cells (RBCs), white blood cells (WBCs), hematocrit, and hemoglobin], serum biochemistry (albumin, globulins, and total protein), immunity parameters (lysozyme activity, complement system, and respiratory burst activity), and mortality rate were examined in all treatments. Results showed that 100 mg/L of NHE significantly increased hematological, serum biochemical and immunity parameters in rainbow trout infected with saprolegnia ($p< 0.05$). Also, doses 50, 150 and 200 mg/L of NHE significantly reduced mortality rate with increasing fish resistance to saprolegniasis compared the control. Hence, the use of NHE at a dose of 100 mg/L with bath therapy is recommended to improve hematological and immunological parameters, and to control of saprolegniasis in this species.

Keywords: Nettle, Hematology, Saprolegniasis, Bath therapy, Rainbow trout

[*]Corresponding author

www.SID.ir