Archive of SID

نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۱۱ تابستان ۱۳۹۵
DOI: 10.22034/vj.2016.106066

تاثیر عصاره دانه گیاه اسفرزه (*Plantago ovata*) بر فاکتورهای ایمنی غیر اختصاصی بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

• **محمدجواد محمدی (نویسنده مسئول)**
فارغ التحصیل دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات خوزستان
• **مجتبی علیشاهی**
عضو هئیت علمی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز
• **امیر آرمون**
دانشجوی دکترای بهداشت آبزیان دانشگاه شهید چمران اهواز
تاریخ دریافت: مرداد ۹۲ تاریخ پذیرش: خرداد ۹۳
Email: mohammadimjm@gmail.com

چکیده

ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) یکی از گونه‌های مهم صنعت آبزی پروری هست، که به صورت گسترده در اکثر کشورها پرورش داده می شـــود. استفاده از آنتی بیوتیک‌های تجاری برای کنترل بیماری‌های آبزیان بخصوص این گونه دارای اثرات جانبی مضری اســـت، که تلاش برای یافتن جایگزین های مناســـب را در آبزی پروری ضروری نموده است. در این تحقیق تاثیر عصاره اســـفرزه (*Plantago ovata*) بر تحریک سیســـتم ایمنی بچه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۳۶۰ قطعه بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان با وزن متوسط ۳۰±۵/۲۳ گرم به چهار تیمار در سه تکرار (هر تکرار ۳۰ قطعه ماهی) تقســـیم گردیدند. تیمارها با غذای حاوی درصدهای صفر (کنترل) ، ۰/۱ ، ۰/۵ و ۱ درصد عصاره گیاه به مدت ۶۰ روز تغذیه شـــدند. در انتهای دوره نمونه خون از تیمارها تهیه و فاکتورهای ایمنی (فعالیت لایزوزیم، آلبومین، قدرت باکتری کشی، پروتئین کل و ایمنوگلبولین(IgM) مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج نشان داد که برخی فاکتورهای ایمنی تحت تاثیر عصاره قرار گرفته‌اند. بطوری که فعالیت لیزوزیم در همه تیمارهای تغذیه شـــده با عصاره افزایش داشته و میزان پروتئین کل و IgM در دو تیمار ۱ و ۰/۵ درصد، نســـبت به تیمار کنترل افزایش معنی داری داشته اند (P<0.05). ولی اختلاف معنی داری در میزان آلبومین و قدرت باکتری کشی سرم بین تیمارها مشاهده نشد (P>0.05). نتایج حاکی از تاثیر مثبت گیاه اسفرزه در افزایش توان سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلا رنگین کمان می باشد.

کلمات کلیدی: قزل آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss*، اسفرزه *Plantago ovata*، فاکتورهای ایمنی

www.SID.ir

Archive of SID

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 111 pp: 97-105

Effects of ***Plantago ovata*** extract on none specific immune parameters of the juvenile ***Oncorhynchus mykiss***

By: Mohammadi, M.J., (Corresponding Author) Graduated student of Msc of Islamic Azad University Science and Research Khuzestan- Iran. Alishahi, M., Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz- Iran. and Aramoon, A., PhD student Aquatic Animal Health Shahid Chamran University of Ahvaz- Iran.

Email: mohammadimjm@gmail.com

Received: May 2015 Accepted: July 2015

Oncorhynchus mykiss is one of the most important species among all fish which are consumed in most countries. Applying antibiotics to control diseases in this species has side effects which necessitates researches to find other approachs. Therefore effects of *Plantago ovata* extract (POE) on *Oncorhynchus mykiss* immunity system was investigated as another alternative. 360 juvenile *Oncorhynchus mykiss* fishes with the average weight 30±5.23gr divide in to four treatments. Each treatment feed with POE with 0 (control group), 0.1, 0.5 and 1 percentage for 60 days. At the end of treatment blood samples were taken from 6 fish in each replicate and immunological parameters were compared among the groups. The results show that the immunological parameters including Lysozyme activity, total serum protein and globulin were affected significantly at doses 0.5 and 1 percent ($p<0.05$) while serum bactericidal activity and albumin was not affected ($P>0.05$). All and all it could be deduced that extract could affect immunological parameters and increasing it, hence addition of this extract to daily diet of *Oncorhynchus mykiss* could enhance immunity system.

Key words: *Oncorhynchus mykiss, Plantago ovata*, immunological parameters.

مقدمه

ماهی قزل آلای رنگین کمان یکی از گونه‌های مهم اقتصادی است، که به علت ویژگی‌های منحصر به فرد در اکثر نقاط دنیا پرورش داده می‌شود. پرورش متراکم این ماهی با استرس‌های مختلف همراه می‌باشد، که ماهی را در برابر بیماری‌های مختلف (ویروسی، باکتریایی، انگلی و قارچی) مستعد می‌نماید (Bahram et al., 2005). جهت پیشگیری از بروز این بیماری‌ها علاوه بر واکسیناسیون از مواد محرک سیستم ایمنی جهت کنترل بیماری در صنعت آبزی پروری استفاده می‌شود. محرک‌های سیستم ایمنی نسبت به مواد شیمیایی ایمن‌تر و مطمئن‌تر می‌باشند و تأثیر آن‌ها در مقایسه با واکسیناسیون از دامنه وسیع‌تری برخوردار است و جایگزین مناسبی برای آنتی بیوتیک‌ها معرفی شدند (Kajita et al., 1990; Sakaiet, 1998).

با توجه به تکامل بیشتر ایمنی غیراختصاصی ماهی نسبت به ایمنی اختصاصی و جایگاه ویژه محرک‌های ایمنی در تحریک ایمنی غیراختصاصی، استفاده از محرک‌های ایمنی در آبزیان ارجحیت بیشتری نسبت به حیوانات خون گرم دارد (Swain et al., 2006; Zapata et al., 2006). در بین محرک‌های ایمنی مختلف، محرک‌های ایمنی با منشاء گیاهی مزیت‌هایی از جمله در دسترس بودن، خطر کمتر برای محیط و جانور و قیمت پایین‌تر را دارند (Raa et al., 1996). از طرفی در ماهی بعلت عدم تکامل ایمنی اختصاصی و پاسخ پادتنی ضعیف، استفاده از واکسن‌های تجارتی علاوه بر گرانقیمت بودن در مقایسه با حیوانات خونگرم کارایی کمتری دارند (Raa et al., 1996). با عنایت به موارد فوق به نظر می‌رسد استفاده از محرک‌های ایمنی جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها و حتی واکسیناسیون در پیشگیری و کنترل بیماری‌های ماهیان باشند (Swain et al., 2006; Zapata et al., 2006) مطالعات گسترده‌ای در ارتباط با استفاده از گیاهان دارویی در تقویت سیستم ایمنی جانوران آزمایشگاهی صورت گرفته و نتایج بدست آمده از این تحقیقات نیز به خوبی موید نقش مثبت بسیاری از گیاهان دارویی در تقویت سیستم ایمنی جانوران می‌باشد (Rezaeipoor et al., 2000). به عنوان مثال خسروی و همکاران در سال ۱۳۸۶ بیان کردند که عصاره گیاه آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) و شمعدانی (*Granium pelagonium*) باعث تقویت سیستم ایمنی جانوران آزمایشگاهی می‌شود. مصرف گیاهان دارویی برای درمان و مقابله با عفونت‌های ویروسی، باکتریایی، قارچی و حتی پیشگیری از شیوع انگل‌های تک‌یاخته یکی دیگر از رویکردهای جدید استفاده از این ترکیبات گیاهان دارویی در فارماکولوژی کشورها است (Razavi et al., 2005; Ta-herzadeh et al., 2007; Manafer et al., 2005). اخیرا استفاده از عصاره گیاهان دارویی به عنوان ترکیبات ضد قارچ (Ebrahimzadeh Musavi et al., 2005)، ضد باکتری و همچنین به عنوان محرک سیستم ایمنی (Akhlaghi et al., 2003) و افزایش توان سیستم ایمنی ماهیان گسترش زیادی یافته است.

گیاه اسفرزه با نام علمی (*Plantago ovata*) یکی از گیاهان دارویی است. این گیاه متعلق به خانواده Plantaginaceae که دارای حدود ۲۵۰ گونه می‌باشد. این جنس دارای پراکنش جهانی بوده دو گونه مهم این جنس

www.SID.ir

Archive of SID

Plantago psyllium و *Plantago ovata* می‌باشند که هر دو در ایران تحت عنوان اسفرزه خوانده می‌شوند که دارای مصرف زیاد در صنعت و داروسازی هستند. گیاه اسفرزه بومی ایران، هند و کشورهای خاورمیانه است و در حال حاضر هندوستان بزرگترین صادرکننده بذر این محصول می‌باشد (Ebrahimzadeh Musavi et al., 1996) . از مصارف مهم این گیاه در طب سنتی می‌توان به استفاده جهت کاهش اوره خون، درمان سرفه، فشار خون بالا، کاهش دمای بدن، تولید ادرار در موارد ایجاد ادم، بهبود دستگاه ادراری و درد در هنگام ادرار، رفع یبوست و درمان بیماری‌های چشمی مثل خشکی و آب مروارید، قرمزی، تورم، حساسیت به نور، رفع اختلالات ریه با ایجاد عطسه و خلط و نیز جهت رفع مسمومیت و به صورت موضعی بهبود دمل‌ها اشاره نمود (Leung and Steven, 2002). ترکیب‌های موجود در دانه اسفرزه شامل، اسید بنزوئیک، اسید کافئیک، اسید فوماریک و اسیدآسکوربیک و اسیدهای آلی دیگر می‌باشد. هم‌چنین شامل آلکالوئیدها و آمینواسیدها و نیز قندها و ترکیبات پلی ساکاریدی می‌باشد (Zargari, 1996). دانه این گیاه دارای موسیلاژ (Mucilage) به میزان ۲۰ تا ۳۰ درصد، که بر روی دانه‌ها قرار گرفته و در اثر هیدرولیز تولید دگزیلوزان (D-xylose)، آرابینوز (Arabinose)، د-گالاکتوز (D-galactose)، د-گالاکتورونیک اسید (D-galacturonic acid) می‌نماید. همچنین دانه‌ها دارای روغن ثابت، پروتئین و مقدار بسیار کمی از ایریدوئید از جمله آکوبین هستند. موسیلاژ سطح دانه‌ها، تا ۸۵ درصد آرابینوکسیلاز و مقدار کمی رامنوز می‌باشد. (Sujata et al., 2011) با توجه به اینکه عصاره هیدروالکلی دانه گیاه اسفرزه (*Plantago ovata*) دارای خاصیت ضد باکتریایی ثابت شده (Rifat et al., 2006؛ Anjana et al., 2009 ؛ Sharifi et al., 2011) و ویژگی‌های مربوط به تحریک ایمنی در حیوانات خونگرم است (Rezaeipoor et al., 2000) لذا در این تحقیق تاثیر عصاره هیدروالکلی گیاه اسفرزه بر روی سیستم ایمنی غیر اختصاصی بچه ماهی قزل آلا رنگین کمان در شرایط مزرعه بررسی شد.

مواد و روش‌ها

روش عصاره‌گیری

روش مورد استفاده جهت استخراج عصاره گیاه، روش پرکولاسیون بوده است. طبق این روش ابتدا دانه‌های گیاه از عطاری در بازار خریداری شد و به آزمایشگاه مرکزی شرکت زرد بند انتقال داده شد گیاه را با نسبت ۱ به ۵ گیاه به الکل (وزن ماده خشک به حجم الکل) به مدت ۷۲ ساعت در الکل ۷۰ درصد قرار داده روزی سه بار مخلوط گیاه و الکل بهم زده شد تا کاملا مخلوط شوند این کار درون بن ماری و در دمای ۴۵ درجه انجام شد. بعد از آن مخلوط گیاه و الکل به وسیله کاغذ صافی، صاف شد و با استفاده از دستگاه روتاری اواپوراتور در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و در شرایط خلاء عصاره‌گیری شد (Ghasemi et al., 2010).

تهیه ماهی و غذا

تعداد ۳۶۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان سالم از نظر ظاهری و با میانگین ۵/۲۳±۳۰ گرم از یک مزرعه خصوصی خریداری و به سالن پرورش مرکز تحقیقات ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج انتقال داده شدند. ماهی‌ها به طور تصادفی در ۱۲ تانک فایبرگلاس ۲۵۰ لیتری در قالب چهار تیمار در سه تکرار (هر تکرار ۳۰ عدد ماهی) قرار داده شدند و به مدت یک هفته در تانک‌ها سازگاری با شرایط آزمایشگاهی صورت گرفت.

تهیه غذا بصورت تازه و بطور هفتگی و با افزودن عصاره هیدروالکلی دانه گیاه اسفرزه تهیه شده در شرکت زردبند صورت گرفت. این تحقیق طی یک دوره دو ماهه انجام شد، که تیمارها با خوراک حاوی صفر (شاهد)، ۰/۱ ، ۰/۵ و ۱ درصد عصاره اسفرزه تغذیه شدند. در پایان دوره به صورت تصادفی از هر تکرار تعداد ۵ ماهی و در مجموع از هر تیمار ۱۵ ماهی را جدا کرده و پس از بیهوش کردن با پودر گل میخک (Mehrabi, 1998) و با قطع ساقه دمی خونگیری انجام گرفت. سرم خون در دستگاه سانتریفیوژ با قدرت ۵۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه جداسازی شد و جهت انجام آزمایشات ایمنی‌شناسی به آزمایشگاه دامپزشکی دانشگاه شهید چمران انتقال داده شد. فاکتورهای ایمنی از قبیل فعالیت لایزوزیم، قدرت باکتری‌کشی، آلبومین، پروتئین کل و تغیرات سطح ایمنوگلبولین IgM بر روی نمونه‌های سرم انجام شد که نتایج حاصل از مقایسه ۴ تیمار به صورت نمودار در شکل‌های ۱ تا ۴ مشاهده می‌گردد.

فاکتورهای مورد آزمایش

اندازه‌گیری لایزوزیم سرم

برای اندازه گیری میزان فعالیت لایزوزیم سرم از روش آگارز لیزوپلیت توصیه شده توسط Roed و همکاران (۱۹۹۳) استفاده شد. در این روش ابتدا پودر آگارز به میزان ۱ درصد در بافر ۰/۱ مول فسفات سیترات/ سیترات با pH=۵/۸ حل گردید. با حرارت دادن محلول به همراه همزن مغناطیسی، بافر همراه آگارز به دمای جوش رسیده، به آرامی آگارز سرد گردید. وقتی دمای آگارز به حدود دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد رسید، میزان ۰/۲ میلی گرم به ازای هر میلی‌لیتر از پودر باکتری میکروکوکوس لیزودایکتیکوس (سیگما) به آگارز اضافه شده و قبل از تبدیل وضعیت آگارز از مایع به جامد، آگارز روی پتری دیش استریل ریخته شد، تا بصورت لایه‌ای به قطر حدود ۵ میلی‌متر، جامد گردد. چاهک‌هایی به قطر ۴ میلی متر به فاصله ۲/۵ سانتی‌متر در ژل به وسیلهٔ پانچ‌های خاص ایجاد شده و سرم نمونه در سه تکرار به گودها اضافه گردید. ژل‌ها به مدت ۲۴ ساعت در شرایط اطاقک مرطوب و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و سپس قطر هاله عدم رشد باکتری میکروکوک در اطراف گوده با خط کش دقیق، اندازه‌گیری و مورد مقایسه قرار گرفت (Roed et al., 1993).

بررسی قدرت باکتری‌کشی سرم

برای اندازه‌گیری قدرت باکتری‌کشی نمونه‌های سرم از روش توصیه شده توسط Kajita و همکاران (۱۹۹۰) استفاده شد. ابتدا باکتری آئرومونواس هیدروفیلا به مدت ۴۸ ساعت در محیط TSB کشت داده شد و سپس سلول‌های باکتریایی با سانتریفوژ ۳۰۰۰ دوردر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه جمع‌آوری و با افزودن مقداری بافر فسفات سدیم استریل به آن‌ها جذب نوری سوسپانسیون حاصله در طول موج ۵۴۰ نانومتر برابر ۱ تنظیم گردید. تعداد باکتری به میزان ۱۰۵ باکتری در میلی‌لیتر در ژلاتین ورونال بافر استریل (pH =۷/۵ و حاوی ۰/۵ میلی مول در میلی‌لیتر یون کلسیم و ۰/۱۵ میلی‌مول در میلی‌لیتر یون منیزیم) تنظیم گردید (Kajita et al., 1990).

نمونه‌های سرمی به نسبت ۱ به ۳ با بافر فوق رقیق گردیدند.

www.SID.ir

Archive of SID

سوسپانسیون باکتریایی حاصل به نسبت ۱:۱ با سرم رقیق شده ترکیب شده و بمدت ۹۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با حرکت ملایم انکوبه گردیدند. سپس ۵ میکرولیتر از مخلوط سرم و باکتری در محیط کشت TSA در سه تکرار کشت داده شد. محیط‌های کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیده و سپس به کمک دستگاه کلونی کانتر تعداد پرگنه باکتریایی رشد یافته در روی محیط کشت شمارش گردید. نتایج بصورت متوسط تعداد باکتری شمارش شده در هر سه تکرار برای هر نمونه گزارش گردید.

اندازه‌گیری آلبومین، پروتئین کل و گلوبولین سرم

میزان آلبومین با استفاده از روش BCG (bromocresol green method) و با استفاده از کیت‌های تشخیصی شرکت زیست شیمی محاسبه شد (Durgawale et al., 2005). پروتئین کل سرم بر اساس روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) و با استفاده از کیت استاندارد تخمین پروتئین شرکت زیست شیمی محاسبه گردید. برای تخمین گلوبولین، ۵۰ µL محلول سولفات آمونیوم اشباع بصورت قطره قطره به ۵۰ µL سرم اضافه شد. سانتریفیوژ در دور ۸۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه انجام شده و سپس ۲۰ µL از این نمونه با ۸۰ µL بافر بیکربنات-کربنات (pH =۹/۳) مخلوط شده و میزان پروتئین با کیت تخمین پروتئین استاندارد تعیین گردید سپس میزان گلوبولین سرم با کم کردن میزان پروتئین بدست آمده ثانویه (که تقریبا تماما آلبومین است) از پروتئین کل سرم محاسبه گردید (Lowry et al., 1951).

روش آماری

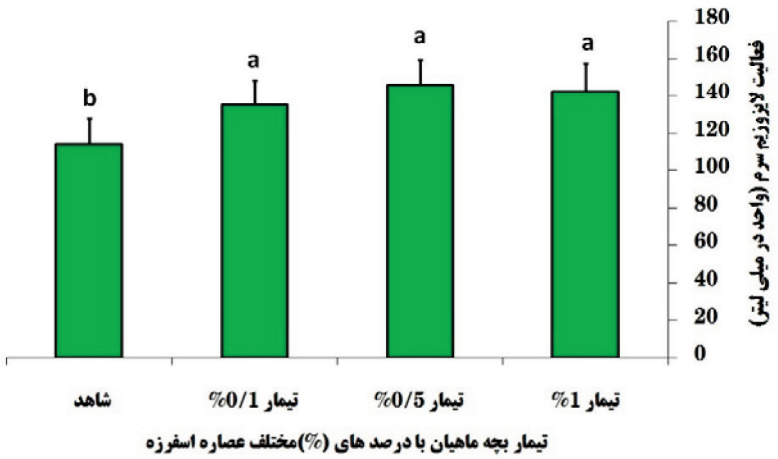
برای آنالیز آماری نتایج تحقیق از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۶ استفاده گردید. برای مقایسه‌ی میانگین‌ها در بین تیمارها و نیز معنی‌دار بودن تفاوت بین میانگین‌ها از روش آنالیز واریانس یکطرفه ANOVA و تست تکمیلی دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ استفاده شد. کلیه داده‌ها بصورت میانگین انحراف معیار (±SD) گزارش گردید.

نتایج

نتایج حاصل از تجزیه تحلیل داده‌ها در نمودارهای ۱ تا ۴ آورده شده است. همانطور که در نمودار ۱ مشخص است، فعالیت لایزوزیم سرم در همه تیمارهای تغذیه شده با عصاره نسبت به تیمار کنترل افزایش معنی‌داری داشته است ($P<0.05$). در مورد دو فاکتور پروتئین کل و IgM بیشترین میزان آنها در دو تیمار ۱ درصد مشاهده شد، که در تیمارهای ۱ و ۰/۵ درصد با تیمار کنترل اختلاف معنی‌داری داشته است ($p<0/05$)، ولی تیمار تغذیه شده با عصاره ۰/۱ درصد با تیمار کنترل اختلاف معنی‌داری نداشت ($p<0/05$) (نمودارهای ۲ و ۳). همچنین نتایج مربوط به قدرت باکتری کشی سرم و میزان آلبومین در نمودار ۴ و ۵ آورده شده است، اگرچه تغیراتی در قدرت باکتری کشی سرم و میزان آلبومین بین تمیارهای مختلف وجود دارد، ولی این اختلاف بین تیمارها و تیمار کنترل معنی‌داری نبود است ($p<0/05$).

بحث

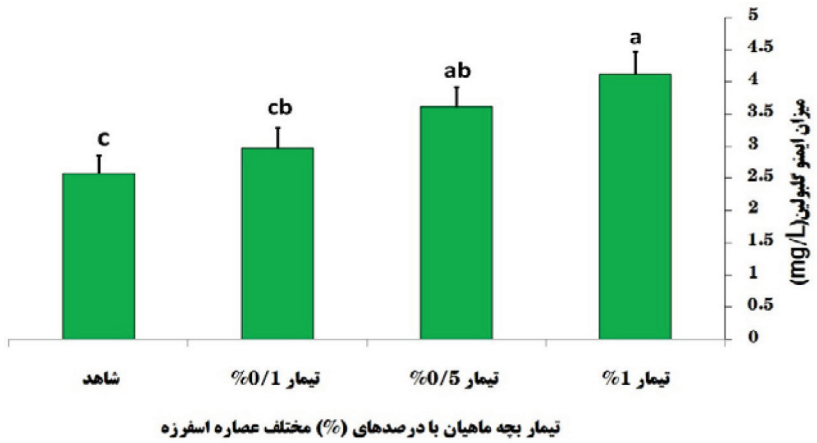
در دهه‌های اخیر، تحقیقات بسیاری بر روی افزایش توان سیستم ایمنی ماهی‌ها در مقابل عوامل بیماریزا انجام شده است. یکی از روش‌های معمول افزایش سطح توان سیستم ایمنی ماهی، استفاده از ترکیبات محرک سیستم ایمنی است. این ترکیبات شامل انواع مواد سنتتیک شیمیایی، انواع پروبیوتیک‌ها و نیز ترکیباتی با منشا گیاهی می‌باشد. محرک‌های ایمنی، عصاره‌های زیستی و مواد سنتزی می‌باشند، که با افزایش عملکرد سلول‌های فاگوسیتیک، فعالیت باکتری کشی (Cytotoxic) و تولید آنتی بادی موجب تحریک پاسخ ایمنی می‌گردند (Sakai, ۱۹۹۸). نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد. برخی فاکتورهای ایمنی بررسی شده مانند فعالیت لازوزیم سرم، پروتئین کل و ایمنوگلوبولین IgM تحت تاثیر عصاره



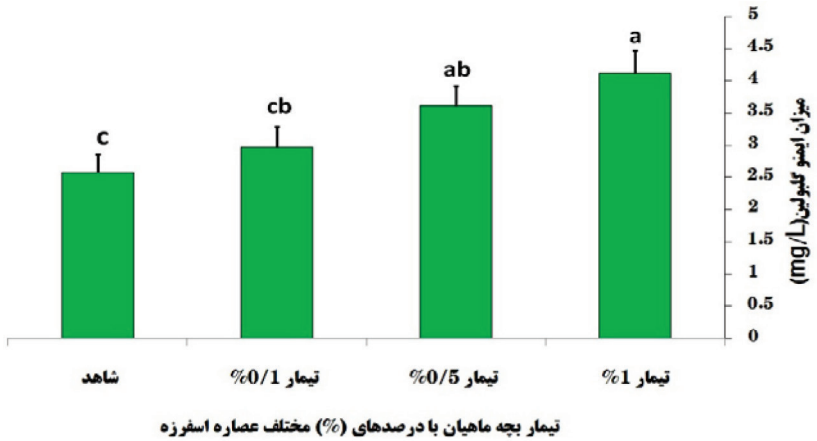
نمودار شماره ۱- فعالیت لایزوزیم سرم در بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان تحت تغذیه جیره غذایی حاوی عصاره گیاه اسفرزه. حروف غیر همنام نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۵۰ است.

www.SID.ir

Archive of SID



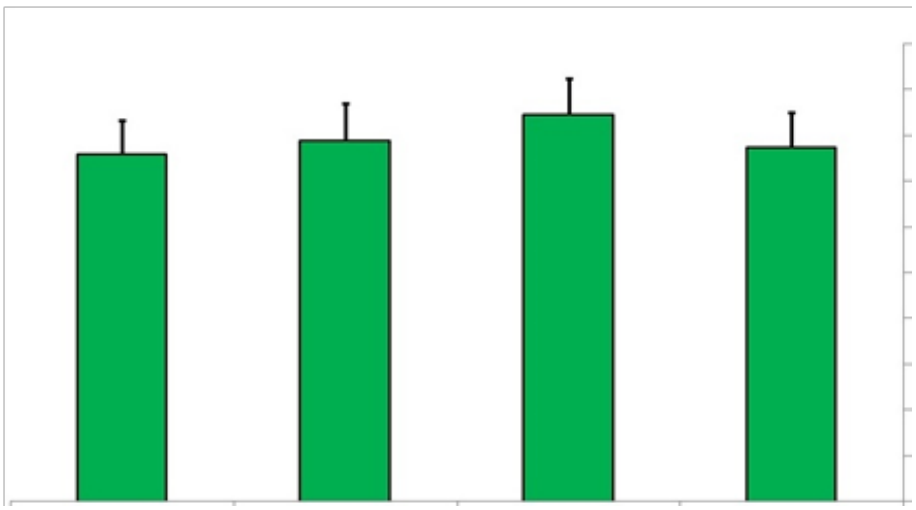
نمودار شماره ۲- میزان پروتئین کل در بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان تحت تغذیه جیره غذایی حاوی عصاره گیاه اسفرزه. حروف غیر همنام نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح ۰/۵۰ است.



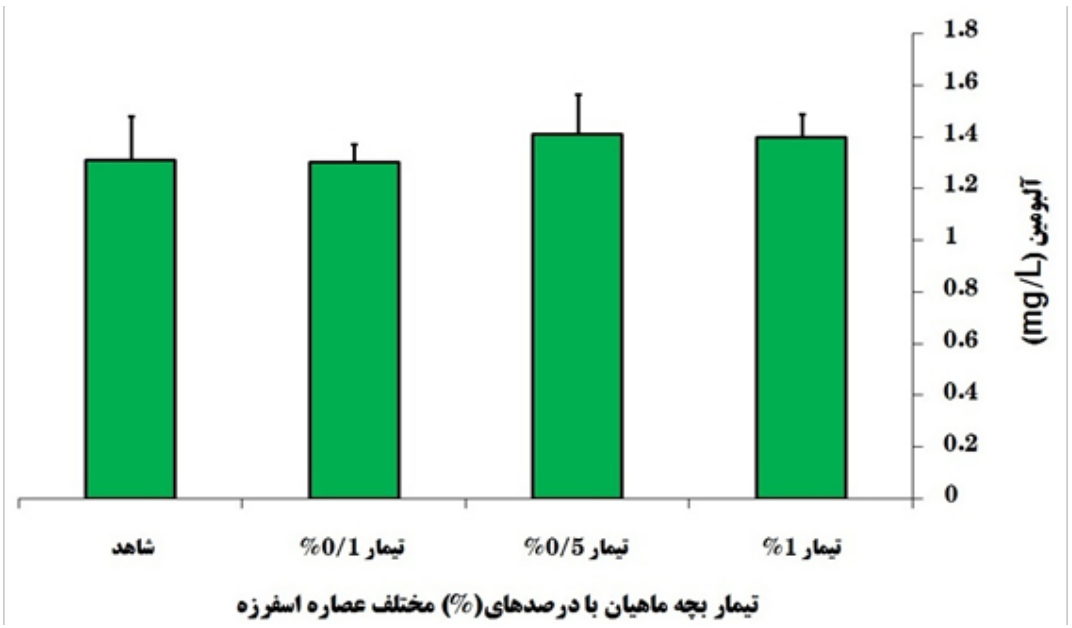
نمودار شماره ۳- تغییرات ایمنوگلبولین IgM در بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان تحت تغذیه جیره غذایی حاوی عصاره گیاه اسفرزه. حروف غیر همنام نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح ۰/۵۰ است.

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار شماره ۴- قدرت باکتری کشی سرم در بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان تحت تغذیه جیره غذایی حاوی عصاره گیاه اسفرزه. حروف غیر همنام نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح ۰/۵۰ است.



نمودار شماره ۵- میزان آلبومین سرم در بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان تحت تغذیه جیره غذایی حاوی عصاره گیاه اسفرزه. حروف غیر همنام نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح ۰/۵۰ است.

www.SID.ir

Archive of SID

اسفرزه قرار گرفته‌اند (p<۰/۰۵). به طوری که با افزایش میزان عصاره در تیمارهای مختلف این فاکتورهای ایمنی نیز افزایش یافته است. لایزوزیم یکی از اجزای مهم ایمنی غیر اختصاصی ماهی است که باعث تخریب جداره باکتری‌ها، فعال‌سازی کمپلمان و افزایش فعالیت بیگانه‌خواری، به عنوان اپسونین (تسهیل کننده بیگانه خواری)، در ماهی می‌گردد (Sakai, 1998). افزایش فعالیت لایزوزیم به مقابله بهتر سیستم ایمنی ماهی در برابر عوامل عفونی و استرس‌ها کمک می‌نماید. نتایج این تحقیق نشان داد، که فعالیت لازوزیم سرم در تمام تیمارهای تغذیه کرده با عصاره اسفرزه در مقایسه با تیمار کنترل افزایش معنی‌داری داشته است (p<۰/۰۵). این افزایش را می‌توان به قدرت تحریک‌پذیری مواد موثره موجود در عصاره گیاه نسبت داد، که باعث افزایش سطح لازوزیم شده است. این نتایج با نتایج تحقیقات مشابه مطابقت دارد بطور مثال Dugenci 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 (*Urtica dioica*) و زنجبیل (*Zingiber officinale*) سبب افزایش سطح ایمنی در بدن ماهی می‌گردد، Alishahi و همکاران (۲۰۱۱) بیان کردند؛ عصاره گیاه *Silybum marianum* برخی فاکتورهای ایمنی غیراختصاصی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) را تحریک می‌کند. افزایش فعالیت لایزوزیم سرم در ماهی کاراس (Chen et al., ۲۰۰۳) ماهی کروکر زرد (Jain et al., 2003) و ماهی کپور معمولی (Jain et al., 2004) بعد از تجویز خوراکی محرک‌های ایمنی طبیعی، واکسن ها و برخی پروبیوتیک‌ها نیز گزارش شده است. (Swain et al., 2006) در این تحقیق نیز افزایش فعالیت لایزوزیم سرم در تیمارها گویای بهبود وضعیت ایمنی و سلامتی ماهی است.

پروتئین‌های پلاسما در انواع مختلف موجودات مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و بر اساس عملکردشان به گروه‌های مختلف تقسیم‌بندی می‌شوند (Golaz et al., 1993). فراوانترین ماده حل شده در پلاسما را گروهی از پروتئین‌های پلاسما شامل آلبومین‌ها و گلوبولین‌ها تشکیل می‌دهند. از عملکرد عمده این پروتئین‌ها می‌توان به تنظیم فشار اسمزی خون، انتقال ترکیبات داخلی و خارجی مانند اسیدهای چرب آزاد، هورمون‌ها و داروها اشاره کرد. در ماهیان کپور در صورت کمبود این پروتئین‌ها، انتقال اسیدهای چرب توسط لیپوپروتئین‌های با چگالی بالا انجام می‌گیرد (Smith-palmer et al., 1996). نتایج مربوط به بررسی پروتئین‌های سرم (نمودارهای ۲ و ۳) در این تحقیق نشان داد، که میزان پروتئین کل و IgM در تیمارهای تغذیه شده با ۰/۵ و ۱ درصد عصاره افزایش داشته که این افزایش نسبت به تیمار کنترل معنی‌دار بوده است (p<۰/۰۵). ولی میزان آلبومین سرم (نمودار ۵) تغیرات معنی‌داری نداشته است (p<۰/۰۵). بیشترین تاثیر ایمنی پروتئین‌های سرم به عهده ایمونوگلوبولین‌های سرم است که در ماهی‌ها همه از نوع IgM است. افزایش سطح پروتئین کل و گلوبولین سرم شاخص مناسبی برای بررسی وضعیت دفاع ایمنی و سلامت ماهی می‌باشد (Siwicki et al., 1994). هر چند غلظت پادتن (آنتی بادی) ضد یک آنتی‌ژن خاص نشان دهنده ایمنی اختصاصی می‌باشد، ولی میزان پروتئین کل و ایمونوگلوبولین کل در ماهیان نشان دهنده‌ی ایمنی غیراختصاصی است. در بسیاری از مقالات از میزان IgM تام به عنوان شاخص ایمنی غیراختصاصی یاد شده است (Alishahi et al., 2010; Alishahi et al., 2011; Misra et al., 2006). آلبومین تقریبا در دفاع ایمونولوژیک بی‌تاثیر است و بیشتر در تنظیم فشار اسمزی خون و سایر فعالیت‌های بیولوژیک غیرایمن دخالت دارد، ولی دلیلی بر تاثیر آلبومین در ایمنی اختصاصی یا غیراختصاصی نیست. در این تحقیق بیشتر به پروتئین تام و گلبولین تام اشاره شده و میزان آلبومین سرم مدنظر نبوده است. لذا ارائه گزارش میزان آلبومین اشکالی در تحقیق ایجاد نمی‌نماید.

بطور کلی افزایش پروتئین‌های سرم نشان‌دهنده افزایش توان قدرت پاسخ دفاعی ماهی است. گزارشاتی از افزایش پروتئین کل و گلوبولین سرم بدنبال استفاده از محرک‌های ایمنی گیاهی وجود دارد که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد (Alishahi et al., 2010; Alishahi et al., 2011; Vasudeva et al., 2004) . البته برخی از گزاشات نیز عدم تاثیر عصاره‌های گیاهی بر میزان پروتئین کل را گزارش نموده‌اند، که با نتایج این تحقیق مغایرت دارد (Ispir and Mustafa, 2005; Misra et al., 2006)، که علت را می‌توان به ویژگی‌های عصاره گیاهی مورد استفاده و نیز گونه ماهی مورد بررسی نسبت داد.

میزان قدرت باکتری‌کشی سرم در این تحقیق علی‌رغم تغیراتی که داشته ولی معنی‌داری نبوده است (p<۰/۰۵). قدرت باکتری‌کشی سرم بیشتر تحت تاثیر مواد ضدمیکروبی سرم، لایزوزیم، کمپلمان و دیگر مواد موثر در تخریب دیواره سلولی باکتری‌ها است. همچنین در تحقیقات مشابه Kajita و همکاران (۱۹۹۰) و Divyagnaneswari و همکاران در سال ۲۰۰۷ به ترتیب در ماهی تیلاپیا و قزل آلا، عدم تاثیر عصاره گیاه *Solanum trilobatum* بر قدرت باکتریایی‌کشی سرم را گزارش نمودند (Divyagnaneswari et al., 2007; Kajita et al., 1990) که نتایج حاصل با یافته‌های این تحقیق همخوانی دارد. برخی گزارشات حاکی از تاثیر افزایش قدرت باکتری‌کشی سرم بعد از تجویز محرک‌های ایمنی است (Misra et al., 2006)، که با نتایج این تحقیق انطباق ندارد، که علت را می‌توان به ویژگی‌های عصاره و نوع ماهی مورد بررسی نسبت داد. احتمالا مواد موثره موجود در عصاره این گیاه توانایی اثرگذاری بر روی افزایش میزان قدرت باکتری‌کشی سرم را نداشته است. تاثیر تحریکی این عصاره بر سیستم ایمنی را می‌توان به مواد موثره آن نسبت داد، احتمالاً در مواد تشکیل‌دهنده این گیاه مواد محرکی وجود دارد که تجویز خوراکی آن‌ها بویژه در غلظت ۰/۵ و ۱ درصد مشهود است و افزایش معنی‌دار فاکتورهای ایمنی ماهی را باعث شده است. افزایش فاکتورهای ایمنی در این دوره پرورشی، موجب افزایش مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا، تحریکات محیطی و استرس‌ها گردیده، که این خود می‌تواند با افزایش فعالیت سوخت و سازی، نهایتاً بهبود رشد، کاهش میزان مرگ و میر و افزایش میزان بازماندگی را به دنبال داشته باشد. با این وجود می‌توان گیاه اسفرزه را به عنوان یک کاندید مناسب محرک سیستم ایمنی در ماهی قزل آلا مطرح کرد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از مهندس عباس انصاری کارشناس آزمایشگاه شرکت زردبند، کلیه کارکنان مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد شهید مطهری یاسوج و همچنین جناب آقای مهندس سبزواری و سرکار خانم مهندس جوپاش کارشناسان آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی دانشگاه چمران که در انجام مراحل این کار مساعدت لازم را بعمل آوردند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع مورد استفاده

1 - Akhlaghi, M. and Anbaraki Motlagh, M. (2003). Phagocytosis of changes in common carp (*Cyprinus carpio*) following the use of immune stimulants Quil-A and levamisole. *Journal of Fisheries,* No. 13, Vol 3, pp. 1-12.

2 - Alishahi, M. Ranjbar, M.M. Ghorbanpour, M. Peyghan, R. Mesbah, M. and Razi jalali, M. (2010). Effects of dietary *Aloe vera* on specific and nonspecific immunity of Common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Veterinary Researches,* 4;3, 85-91.

3 - Alishahi, M. Soltani, M. Mesbah, M. and Esmaeilli Rad, A. (2011). Effects of dietary *Silybum marianum* extract on immune parameters of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal Veterinary Research,* 66, 3: 255-263.

4 - Anjana S, Rani V, Padmini R. (2009). Antibacterial activity of some medicinal plants used by tribals against uti causing pathogens. *World Applied Sciences Journal*, 7(3): 332-9.

5 - Askari, H. Farahnaki, A. Larry Amin, M. Majzubi, M. and Mesbahi Gh.R. (2007).the Hydrocolloid extracted shell and rheological characteristics of the *Plantago ovata.* International Congress of Food Science and Technology.

6 - Bahram, S. Vahabzadeh Roodsari, H. Nazari, R.M. and Javadian, R. (2005). Efect of Levamisole on survival rate of the Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) fry. *Journal of marine science and technology*. 4(1-2), 1-9.

7 - Chen, X. Wu, Z. Yin, J. and Li, L. (2003) Effects of four species of herbs on immune function of *Carassius auratus gibelio*. *Journal Fish Science,* 10, 36–40.

8 - 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 and shellfish immunology*, 23 : 249-259.

9 - Dugenci, S.K. Arda, Cand N. and A. (2003). Some medicinal plants as immuno stimulants for fish. *Journal of Ethnopharamacology,* 88: 99–106.

10 - Durgawale, P. Kanase, S. Shukla P.S. and Sontakke, S. (2005). Asensitive and economical modified method for estimation of cerebrospinal fluid proteins. *Indian Journal of Clinical Biochemistry,* 20, 174–177.

11 - Ebrahimzadeh Mousavi, H.A. . Mirmasoumi, M. and Seyed Fakhr Tabatabai, M. (1996). Mucilage production of callus formation in cultured leaves isolated fragments .87 - and roots four species plantain. *Journal of Agricultural Science*. C. [28]. Number 3. P 96.

11 - Ebrahimzadeh Mousavi, H.A. Sharif Rohani, M. Khosravi, A.R. Mehrabi, Y. and Akhondzadeh A. (2005). Evaluation of eucalyptus essential oil (*Eucaliptus camaldolensis* Dehnh) to control fungal infections of rainbow trout eggs. *Journal of Medicinal Plant,* 5 (20): 42-47.

13 - Elgayyar, M. Draughon, F. A. Golden, D. A. and Mount, J. R. (2001). Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms, *Journal Food Protection,* 64, 1019 -1024.

14 - Ghasemi Pirbaluti, A. Pir Ali, E. Pishkar, Gh.R. Jalali, S.M.A, Raisi, M. Jafarian Dehkordi, M. and Behzad H. (2010). Effect of some medicinal plants essential oils on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Quarterly Herbs*, Second Year, Issue 2, Summer 1390, pp. 149-155.

15 - Golaz, O. Hughes, G.J. Frutiger, S. Paquet, N. Bairoch, A. Pasquali, C. Sanchez, J. C. Tissot, J.D. Appel, R.D. Walzer, C. Balant, L. and Hochstrasser, D.F. (1993). Plasma and red bloodcell protein maps: update. *Electrophoresis*, 14: 1223–1231.

16- Gvindachari, T. R. Suresh, G. Gopalakrishnan, G. Masilamani, S. and Banumathi, B. (2000). Antifungal activity of some tetranortriterpenoids. *Fitoterapia*; 71, 317-320.

17 - Hans, F. (1999). Medicinal plants. Rouzbahan Publications, Tehran, Fifth Edition, p 54.

18 - Ispir, U. and Mustafa D. M. (2005). A Study on the Effects of Levamisole on the Immune System of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Turkey Journal Veterinary Animal Science*, 29. 1169-1176.

19 - Jain, J. and Wu, Z. (2004). Influences of traditional Chinese medicine on non-specific immunity of Jian Carp (*Cyprinus carpio*). *Fish and Shellfish Immunology,* 16 : 185-191.

20 - 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.

21 - Jeney, G. Galeotti, M. and Volpatti, D. (1994). Effects of immunostimulation on the non-specific immune response of sea bass, *Dicentrarchus labrax*, L. International Symposium on Aquatic Animal Health.; Sept. 4-8.

22 - 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.

23 - Khosravi, A.R. Marcelo, F.Shokri, H. and Raiat Ramak, Y. (2006). Evaluate the effects of *Z. multiflora* essential oil, Geranium Plargunium, and lemon on immune function in animals laboratory. *Journal of Veterinary Research, University of Tehran.* Number 64, year 4. 12 - 119 pp.

24 - Leung, A.X. and Steven, F. (2002). Encyclopedia of common natural ingredients- used in food, drugs and Libster M. Herb guide

www.SID.ir

Archive of SID

for nurses. *Delmar Thomson Learning. Inc*; USA:; 450-7.

25 - Lowry, O.H. Rosebrough, N.J. Farrand A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*; 193, 265–275.

26 - Manafr, R. Maleki, R. Atashbar, B. and Aq, N. (2005).using the *Azadirachta indica* seed extract against ciliophora and unicellular algae invasion in intensive culture *Dunaliella tertiolecta*. *Magazine in livestock and aquaculture research and development*, No. 71. Pp 82-88.

27 - Mehrabi, Y. (1998). A preliminary study of the effects of anesthesia flower powder clove (*Syzygium aromaticum*) on rainbow trout. *Research and development.* No. 40.41, 42: 160-162.

28 - Misra, C. K. Mukherjee, D. and Meher, P. K. (2006). The immunomodulatory effects of tuftsin the non-specific immune system of Indian Major carp, *Labeo rohita*. *Fish and shellfish immunolgy,* 20 : 728-738 .

29- Raa, J. (1996). The use of immuno-stimulatory substances in fish and shellfish farming. Reviews in. *Fisheries Science.* 4: 229-288.

30 - Raa, J. (2000). The use of stimulant in fish and shellfish feeds. University of troms Norway, 1548-1560.

31 - Razavi, S.M. Azizollahi, B. and Rahim Huda (2005). Antiviral effects of garlic extract on herpes simplex virus using cell culture. *Journal faculty at Shahid Beheshti University of Medical Sciences,* Volume 24, Issue 1, Pp 86-93.

32 - Rezaeipoor, R. Saeidnia, S. and Kamalinejad, M. (2000). The effect of Plantago ovata on humoral immune responses in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology,* 72, 283-286.

33 - Rifat UZ-Zaman ,Akhtar MS, Khan MS. (2006). In vitro antibacterial screening of *Anethum graveolens* L. Fruit *Cichorium intybus* L. leaf. *Plantago ovata* L. Seed husk and *Polygonum viviparum* L . Root extracts against *Helicobacter pylori* . *Int J Pharmacol;* 2: 674-77.

34 - Roed, K.H. Fjalestad, K.T. and Strømsheim, A. (1993). Genetic variation in lysozyme activity and spontaneous haemolytic activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*; 114, 19–31.

35 - Sakai, M. (1998). Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*; 172: 63-92.

36- Sharifi, A. Naghmachi, M. Jahedi, S. Khosravani, S.A.M. (2011). A study on antimicrobial effects of *Plantago psyllium*. *Armaghan Danesh.* Volume 16 , Number 2 (62); Page(S) 191 To 199.

35 - Siwicki, A. K. Anderson, D. P. and Rumsey, G. L. (1994). Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects nonspecific immunity and protection against furunculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology,* 41, 125–139.

36 - Smith-palmer, A. Stewart, J. and Fyfe, L. (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences aginst five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology,* 26(2): 118-22.

37 - Sujata, S. Rashmi, S. Neeraj, K. and Rajnish, K. (2011). Wound healing activity of ethanolic extract of *Plantago ovata* (Ispaghula) seeds. *Journal of Applied Pharmaceutical Science,* 01 (07); 108-111.

38 - Swain, P. S., Dash, P. K. Sahoo, P. Routray, S. K. Sahoo, S. D. Gupta, P.K. and Meher. N. (2006). Nonspecific immune parameters of brood Indian major carp *Labeo rohita* and their seasonal variations. *Fish and Shellfish Immunology,* 22: 38-43.

39 - Taherzadeh, M. Zandi, K. Yaghubi, R. Tajbakhsh, S. and Rastian, Z. (2007). Effect of antiviral mangrove plant (Forssk. Vieh *Avicennia marina*) on the polio virus in cell line. *Journal of Medicinal and Aromatic Plants.* Volume 24, Issue 1, Pp 38-46.

40 - Üspur, U. and Mustafa, D.R.C. (2005). A study on the effects of levamisole on the immune System of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Turkish Journal of Veterinary Animal Science,* 29 : 1169-1176.

41 - Vasudeva, Rao, Y. Romesh, M. and Singh, Chakrabarti, R. (2004). Potentiation of antibody production in Indian major carp *Labeo rohita*, rohu, by *Achyranthes aspera* as a herbal feed ingredient. *Aquaculture*, 238: 67-73.

42 - 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.

43 - Zapata, A. Diez, B. Cejalov, T. Gutierrez-defrias, C. and Cortes, A. (2006). Ontogeny of immune system of fish, *Fish and Shellfish Immunology,* 20:126-136.

44 - Zargari, A. (1996). Medicinal plants. 6th ed. University of Tehran Institute.;194-205. (March).

www.SID.ir