Archive of SID

اثر لوامیزول بر پاسخ ایمنی و تغییرات هیستوپاتولوژیکی در تراکم بالای ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

سعید مشکینی[1*]، علی‌اصغر تهرانی[2]، ناصر آق[3]

۱. استادیار، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
۲. استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
۳. استادیار، پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

دریافت: ۱۵ شهریور ماه ۹۳ **پذیرش:** ۲۵ فروردین ماه ۹۴

چکیده

در این پژوهش اثر لوامیزول بر پاسخ‌های ایمنی و تغییرات هیستوپاتولوژیکی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسی قرار گرفت. ۱۵۰۰ قطعه ماهی ۵۰ گرمی قزل‌آلای رنگین‌کمان تهیه شد و به طور تصادفی در پنج تیمار تقسیم گردیدند و با جیره حاوی ۰ (گروه شاهد)، ۱۰۰، ۲۵۰ ، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم لوامیزول در هر کیلوگرم غذا به مدت ۴۵ روز تغذیه و سپس به مدت ۱۵ روز دیگر همه تیمارها (با تراکم دو برابر) با غذای فاقد لوامیزول تغذیه شدند. برای ارزیابی فاکتورهای ایمنیِ فعالیت کمپلمان و فعالیت لیزوزیم سرم در روزهای ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰، نمونه سرم از تمام تیمارها تهیه شد و پس از اندازه‌گیری، نتایج با نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۱۵ مورد ارزیابی و تجزیه‌وتحلیل قرار گرفتند. در پایان دوره آزمایش از بافت‌های آبشش، کلیه و کبد ماهیان برای بررسی اثرات آسیب‌شناسی بافتی لوامیزول، نمونه‌های بافتی تهیه شد. نتایج بیانگر ارتقای سطح فعالیت کمپلمان و فعالیت لیزوزیم سرم در تیمار تغذیه‌شده با ۱۰۰۰ میلی‌گرم لوامیزول در کیلوگرم غذا بود. طبق نتایج بررسی‌های آسیب‌شناسی کمترین تغییرات هیستوپاتولوژیکی بافت کلیه در تیمارهای تغذیه شده با مقادیر بالای لوامیزول خصوصاً ۱۰۰۰ میلی‌گرم لوامیزول در هر کیلوگرم غذا و کمترین تغییرات هیستوپاتولوژیکی بافت آبشش در تیمارهای شاهد و ۱۰۰۰ میلی‌گرم لوامیزول در هر کیلوگرم غذا و کمترین تغییرات هیستوپاتولوژیکی بافت کبد در تیمار شاهد مشاهده شد. در پایان تحقیق مقدار ۱۰۰۰ میلی‌گرم لوامیزول به‌عنوان بهترین تیمار برای تحریک پاسخ‌های ایمنی و کاهش اثرات آسیب‌شناسی بافتی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تشخیص داده شد.

واژه‌های کلیدی: قزل‌آلای رنگین‌کمان، لوامیزول، پاسخ‌های ایمنی، تغییرات آسیب‌شناسی بافتی.

مقدمه

در جیره غذایی ماهیان می‌توان موادی افزود که با استفاده از آن‌ها، میزان رشد ماهیان بیشتر می‌شود و می‌توان در زمان کمتری به محصول نهایی با همان کیفیت و حتّی باکیفیت بالاتری دست‌یافت و نیز می‌توان با استفاده از این مواد قدرت مقابله آبزیان در برابر تنش‌های مختلف را به میزان قابل‌ملاحظه‌ای بالا برد. این مواد با عنوان محرک‌های رشد و ایمنی شناخته شده‌اند و درعین‌حال که نمی‌توانند جایگزین مواد مغذی مؤثر در جیره غذایی ماهیان باشند، در افزایش جذب مواد غذایی، افزایش میزان رشد و بالا بردن مقاومت آبزیان در برابر تنش‌های مختلف بسیار مؤثرند (۲۳).

سال‌هاست که از داروها و آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان آلودگی‌های مختلف ماهیان، مانند آلودگی‌های باکتریایی استفاده می‌شود، اما رویارویی با موضوع مقاومت باکتری‌ها در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها و تجمع این مواد در بدن ماهیان پرورشی و همچنین اثرات آلایندگی این داروها بر محیط‌زیست از مهم‌ترین مشکلات پرورش ماهی و

* پست الکترونیک نویسنده‌ی مسؤول: s.meshkiniy@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

دیگر آبزیان است. این امر سبب شده تا در سال‌های اخیر استفاده از آنتی‌بیوتیکها رو به کاهش نهد و استفاده از محرک‌های ایمنی برای پیش‌گیری از بیماری‌ها و بالا بردن مقاومت آبزیان در برابر انواع تنش‌ها روندی صعودی به خود گیرد (۴). تاکنون گزارش‌های زیادی از تأثیر تحریک‌آمیز محرک‌هایی مانند گلوکان، لاکتوفرین، کیتین، کیتوزان، لوامیزول و دیگر محرک‌های ایمنی بر سیستم ایمنی ماهیان و میگوها گزارش شده است. این محرک‌ها موجب تسهیل عمل سلول‌های بیگانه‌خوار شده، فعالیت‌های ضد باکتریایی آن‌ها را افزایش می‌دهند و همچنین باعث تحریک سلول‌های طبیعی کشنده (Natural killer cells) و پاسخ‌های آنتی‌بادی در ماهیان می‌شوند (۱۸). محرک‌های ایمنی موجب افزایش تولید اینترفرون‌ها، اینترلوکین‌ها و پروتئین‌های کمپلمان می‌شوند که خود موجب افزایش فعالیت لنفوسیت‌های B و T می‌گردند (۲۰). محرک‌های ایمنی قادرند مقاومت تقریباً بلندمدتی را در ماهیان ایجاد کرده و موجب فعال شدن ماکروفاژها -که در ماهیان نقش مهمی در ایمنی سلولی دارند- گردند (۱۳ و ۱۹)؛ بنابراین نقش محرک‌های ایمنی در مدیریت پیش‌گیری بیماری‌های آبزیان و بالا بردن مقاومت آن‌ها در برابر تنش‌های مختلف انکارناپذیر است (۱۶)؛ با وجودی که استفاده از محرک‌های ایمنی نتایج مطلوب و جالب‌توجهی را ارایه داده است اما نمی‌توان از آثار و عوارض جانبی احتمالی این مواد بر بافت‌های بدن آبزیان به‌طور کامل چشم‌پوشی کرد؛ لذا بررسی آثار جانبی و خصوصاً تغییرات آسیب‌شناسی بافتی ناشی از محرک‌های رشد و ایمنی در آبزیان ضروری به نظر می‌رسد (۷).

لوامیزول دارویی ضد کرم در پستانداران است (۱۹) و در گونه‌های مختلف آبزیان نقش محرک ایمنی آن به اثبات رسیده است (۱۸، ۲۱ و ۲۲)؛ بنابراین در پژوهش حاضر، کوشش شد تا در کنار نقش تأثیر لوامیزول بر پاسخ‌های ایمنی، تغییرات آسیب‌شناسی بافتی احتمالی آن در اندام‌های حساسی مانند آبشش، کلیه و کبد قزل‌آلای رنگین‌کمان (که از گونه‌های تجاری و مهم آبزی‌پروری در ایران و جهان است) مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش کار

۱۵۰۰ قطعه بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ۵۰ گرمی از شهرستان ارومیه تهیه شد و پس از یک هفته سازگاری با شرایط محیطِ آزمایش، به‌صورت تصادفی و به تعداد مساوی در ۱۵ حوضچه ۳۰۰ لیتری پلی‌اتیلنی با حجم آبگیری ۱۰۰ لیتر و با تراکم ۵۰ kg/m۳ تقسیم شدند. ماهیان در پنج تیمار غذایی (یک گروه شاهد و چهار گروه تیمار با مقادیر ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم لوامیزول در هر کیلوگرم غذا) و با سه تکرار به مدت دو ماه (۴۵ روز تحت تیمار با لوامیزول و ۱۵ روز بدون لوامیزول و با تراکم دو برابر) پرورش داده شدند.

برای تغذیه ماهیان از غذای تجاری (Growth Food Trout GFT-1) شرکت چینه تهران با ترکیب ۴۰ درصد پروتئین، ۱۴ درصد چربی، ۱۱ درصد رطوبت، ۱۰ درصد خاکستر، ۴ درصد فیبر و ۱/۱ درصد فسفر استفاده شد. برای تهیه جیره روزانه حاوی لوامیزول، غذای هر تیمار با توجه به میانگین وزن، دمای آب و با استفاده از جدول استاندارد غذادهی (۱۴) تعیین گردید و مقدار لوامیزول لازم برای هر تیمار با توجه به مقادیر ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم غذا، با ترازوی دیجیتالی (با دقت ۰/۰۰۱گرم) وزن و در ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. محلول‌های لوامیزول تهیه شده با آب‌پاش مخصوص هر تیمار روی غذای آن تیمار اسپری و پس از خشک شدن غذا در دمای اتاق تا زمان استفاده در دمای ۴°C نگه‌داری شدند. در گروه شاهد، تنها ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر روی غذا اسپری شد تا تنها تفاوت غذای آن با سایر گروه‌ها در مقدار لوامیزول غذا باشد.

میزان فعالیت کمپلمان سرم بر اساس همولیز گلبول‌های قرمز خرگوش و با روش (Boesen و همکاران. ۱۹۹۹, Amar و همکاران. ۲۰۰۰) اندازه‌گیری شد (۴ و

www.SID.ir

Archive of SID

۶). گلبول‌های قرمز خرگوش سه مرتبه با بافر اتیلن گلیکول تتراستیک اسید - منیزیم - ژلاتین ورنال (0.01M، pH= 7) (Sigma, E 4678, St. Louis, USA شسته شد و تعداد سلول‌های آن به کمک لام نئوبار در هر میلی‌لیتر بافر در حدِ ۲ × ۱۰^۸ Cell/ml تنظیم شد؛ سپس نمونه‌های سرم ابتدا ۱۰۰ مرتبه با بافر یاد شده رقیق شد و بر اساس جدول استاندارد (۶)، حجم‌های متفاوتی از آن در هفت لوله آزمایش استریل ریخته شد و حجم همه لوله‌ها به کمک بافر به ۲۵۰ میکرولیتر رسانده شد و سرانجام به همه لوله‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر گلبول قرمز خرگوش اضافه گردید. مخلوط یاد شده در دمای ۲۰°C درجه به مدت ۹۰ دقیقه انکوبه گردید و در پایان به هرکدام از لوله‌ها ۳/۱۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۸۵ درصد کلرید سدیم افزوده شد. لوله‌ها با دور ۱۶۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه و دمای ۴°C سانتریفیوژ شد و چگالی نوری محلول رویی به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ۴۱۴ nm قرائت گردید. برای محاسبه میزان فعالیت راه جایگزین کمپلمان با استفاده از کاغذ شطرنجی منحنی لیز رسم شد. طبق تعریف، فعالیت کمپلمان نمونه عبارت است از: حجمی از سرم که سبب ۵۰ درصد همولیز گلبول‌های قرمز شود، که از رابطه زیر محاسبه می‌شود (۴).

$$\text{میزان فعالیت راه جایگزین کمپلمان}_{(U/ml)} = k \times (\text{فاکتور رقت}) \times ۰/۵$$

در رابطه‌ی مذکور k مقداری از سرم برحسب میلی‌لیتر است که موجب ۵۰ درصد همولیز می‌شود، ۰/۵ عدد ثابت و فاکتور رقت در این آزمایش ۰/۰۱ است، چون سرم ۱۰۰ مرتبه رقیق شده است.

مقدار فعالیت لیزوزیم سرم با روش Clerton و همکاران در سال ۲۰۰۱ و Kim و Austin در سال ۲۰۰۶ و بر مبنای لیز باکتری گرم مثبت حساس به آنزیم لیزوزیم؛ یعنی (Micrococous lysodeikticus) (Sigma, M 3770, St. Louis, USA) اندازه‌گیری شد (۹ و ۱۵). مقدار ۱۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری یاد شده با غلظت ۰/۲ mg/ml در بافر سیترات سدیم ۰/۰۲ مولار (pH = ۵/۵)، به ۱۵ میکرولیتر نمونه سرم در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای افزوده و بلافاصله جذب نوری نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه با فواصل ۳۰ ثانیه در طول موج ۴۵۰ nm با دستگاه الایزاخوان (اوارنس، آمریکا) قرائت شد. طبق تعریف یک واحد فعالیت لیزوزیم برابر با میزان سرمی است که موجب کاهش جذب نوری به میزان ۰/۰۰۱ در دقیقه شود (U/min).

در پایان دوره آزمایش از ماهیان هر تیمار تعداد شش نمونه انتخاب شد و پس از بیهوشی آن‌ها با محلول ۱۵۰mg/lit پودر گُل میخک بافت‌های آبشش، کلیه و کبد آن‌ها برداشته شد و پس از شست‌وشو در سرم فیزیولوژی در فرمالین ۱۰ درصد فیکس گردید (۷). برای تهیه لام‌های بافتی، ابتدا بافت‌ها با اتیل‌الکل با غلظت‌های بالارونده (اتانول ۶۰ درصد تا الکل مطلق) آبگیری و با استفاده از روغن سدر و گزیلول شفاف‌سازی شد؛ سپس نمونه‌ها در پارافین مایع قالب‌گیری شدند و برش‌های نواری شکل باضخامت ۵ میکرون به‌وسیله میکروتوم تهیه و به روی لام منتقل شدند و بارنگ‌های هماتوکسین و ائوزین رنگ‌آمیزی گردیدند (۷). لام‌های بافتی رنگ‌آمیزی شده، با میکروسکوپ نوریِ مجهز به دوربین عکس‌برداری، مورد بررسی آسیب‌شناسی قرار گرفتند.

با نرم‌افزار SPSS۱۵ و روش Case Summaries میانگین، انحراف، خطای معیار و دامنه‌ی مقادیر شاخص‌های ایمنی و شدت تغییرات هیستوپاتولوژیکی تعیین شدند. از آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA و آزمون تکمیلی Duncan و t-Test برای مقایسه میانگین‌های شاخص‌های ایمنی و شدت تغییرات هیستوپاتولوژیکی در

www.SID.ir

Archive of SID

تیمارهای مختلف استفاده شد، مقدار P کمتر از ۰/۰۵ به‌عنوان تفاوت معنی‌دار تلقی گردید.

نتایج

همان‌گونه که در جدول ۱ نشان داده‌شده تیمار لوامیزول ۱۰۰۰ میلی‌گرم به‌جز روز صفر (آغاز آزمایش) در تمامی روزهای نمونه‌برداری با بیشترین میزان فعالیت کمپلمان، با گروه شاهد تفاوت معنی‌دار نشان داده است؛ همچنین این تیمار در روزهای ۳۰، ۴۵ و ۶۰ با دیگر تیمارهای لوامیزول نیز تفاوت معنی‌داری (P<۰/۰۵) نشان داده است.

طبق جدول ۲ در روز ۱۵، ۳۰ و ۴۵ میانگین‌های فعالیت لیزوزیم، اختلاف آماری با یکدیگر ندارند؛ اما در روز ۶۰ (با تراکم دو برابر) تمام تیمارهای لوامیزول با گروه شاهد تفاوت معنی‌دار نشان می‌دهند که بیشترین میانگین فعالیت لیزوزیم در تیمار لوامیزول ۱۰۰۰ مشاهده شده است.

جدول ۱- میانگین فعالیت کمپلمان سرم (± انحراف معیار) (U/ml) در تیمارهای مختلف

روزهای نمونه‌برداری	تیمارها (غلظت لوامیزول)				
	۰ mg	۱۰۰ mg	۲۵۰ mg	۵۰۰ mg	۱۰۰۰ mg
روز صفر	۴۳۹±۱۹	۴۳۹±۹۱	۴۳۹±۹۱	۴۳۹±۹۱	۴۳۹±۹۱
روز ۱۵	۴۶۸±۴۲ abcd	۸۸۸±۲۵ a	۸۹۵±۸۵ b	۷۵۵ ±۲۱ c	۹۰۲ ±۷۶ d
روز ۳۰	۴۸۵±۵۳ abcd	۸۹۰±۲۸ b	۸۸۲±۵۹ c	۸۹۵±۴۶ d	۱۰۶۳±۴۲ abcd
روز ۴۵	۵۰۵±۱۴ abcd	۹۸۳±۱۲۵ b	۹۵۵±۱۳۵ c	۹۹۸±۳۷۴ d	۱۱۳۵±۷۰ abcd
روز ۶۰ (تراکم ۲ برابر)	۴۷۲±۷۰ abcd	۸۷۵±۱۰۷ b	۸۹۸±۱۰۸ c	۹۶۵±۷۹ d	۱۰۷۷±۷۲ abcd

حروف لاتین متفاوت در هر ردیف وجود اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) را نشان می‌دهد.

همان‌گونه که در جدول ۳ پیداست کمترین میزان آسیب‌های بافتی اندام‌های آبشش و کلیه در تیمار ۱۰۰۰ میلی‌گرم لوامیزول در کیلوگرم غذا و کمترین میزان آسیب‌های بافتی کبد در تیمار شاهد مشاهده شده است.

بحث

استفاده از محرک‌های ایمنی یکی از روش‌هایی است

جدول ۱- میانگین فعالیت لیزوزیم سرم (± انحراف معیار) (U/min) در تیمارهای مختلف

روزهای نمونه‌برداری	تیمارها (غلظت لوامیزول)				
	۰ mg	۱۰۰ mg	۲۵۰ mg	۵۰۰ mg	۱۰۰۰ mg
روز صفر	۶۴۰±۹۸	۶۴۰±۹۸	۶۴۰±۹۸	۶۴۰±۹۸	۶۴۰±۹۸
روز ۱۵	۶۸۸±۸۱	۷۱۳±۱۱۰	۸۲۹±۳۱	۶۹۴±۹۱	۶۹۲±۳۴
روز ۳۰	۶۳۸±۲۴	۷۰۳±۹۶	۶۵۴±۹۹	۸۹۳±۴۲	۷۱۵±۶۶
روز ۴۵	۶۶۰±۱۱۰	۶۳۷±۱۳۳	۷۵۴±۵۴	۷۸۷±۱۶۴	۶۷۲±۶۷
روز ۶۰ (تراکم ۲ برابر)	۶۶۳±۳۸ abcd	۸۳۰±۶۷ a	۸۳۶±۳۹ b	۸۱۸±۶۲ c	۸۴۰±۴۴ d

حروف لاتین متفاوت در هر ردیف وجود اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) را نشان می‌دهد.

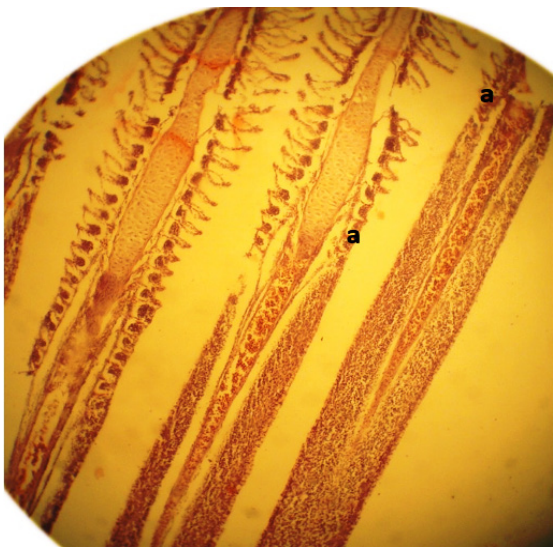
www.SID.ir

Archive of SID

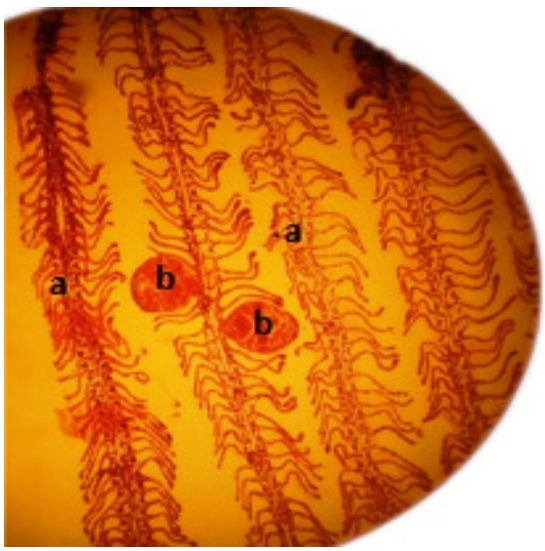
جدول۳- میزان تغییرات آسیب‌شناسی بافتی ماهیان قزل‌آلای تحت تیمار غلظت‌های مختلف لوامیزول

اندام	تغییرات آسیب‌شناسی بافتی	تیمارها (غلظت لوامیزول)				
		۰ mg	۱۰۰ mg	۲۵۰ mg	۵۰۰ mg	۱۰۰۰ mg
آبشش‌ها	اِدِم	+	++	++	++	+
	افزایش حجم سلول‌های کلراید	+	++	+	+	+
	چسبندگی لاملاها	+	++	+	++	+
	چماقی شدن آبشش‌ها	++	++	++	++	++
	نکروز غضروفی	–	–	–	+	–
	از بین رفتن تیغه‌های ثانویه	+	++	++	+	+
	آنوریسم آبشش‌ها	+	+	+	+	+
کلیه	پرخونی بافت کلیه	+++	++	++	++	++
	تورم سلولی	+++	++	++	++	++
	تورم آبکی	++	++	++	+	+
	نکروز بافتی کلیه	++	++	++	+	+
	نفوذ سلولی منوسیت‌ها	+++	+++	+++	++	++
	هیالینه شدن	+	+	+	+	–
کبد	پرخونی	+	+	+	+	+
	تورم سلولی	+	+	+	++	++
	دژنرسانس بافت کبد	–	+	++	++	+++
	نکروز بافتی کبد	+	+	++	+	++

ـ عدم مشاهده؛ + خفیف؛ ++ متوسط؛ +++ شدید



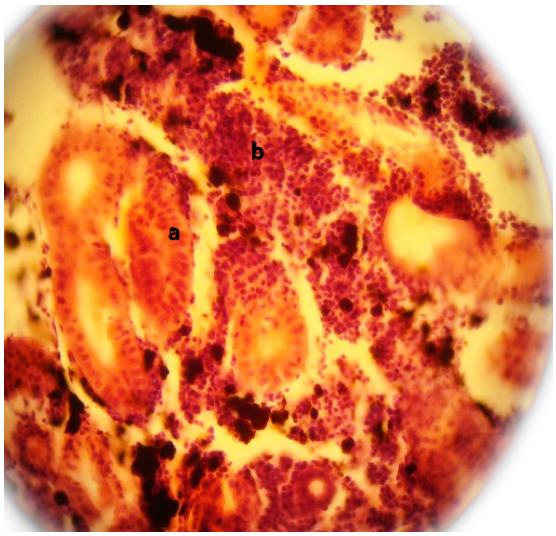
شکل ۱- آتروفی یا فقدان تیغه های ثانویه. بهم فشردگی و ضخیم شدن رشته‌های آبششی همراه با سلول‌های آماسی (a) ۱۰۰mg لوامیزول (رنگ‌آمیزی H&E؛ بزرگ‌نمایی ×۱۰۰)



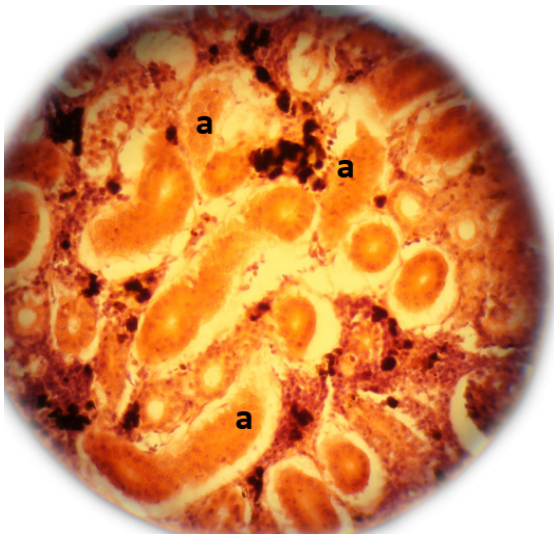
شکل۲- همجوشی نوک تیغه های ثانویه آبششی (a) به همدیگر و بهم چسبیدن و آنوریسم (b) تیغه های ثانویه ۱۰۰mg لوامیزول (رنگ‌آمیزی H&E؛ بزرگ‌نمایی ×۱۰۰)

www.SID.ir

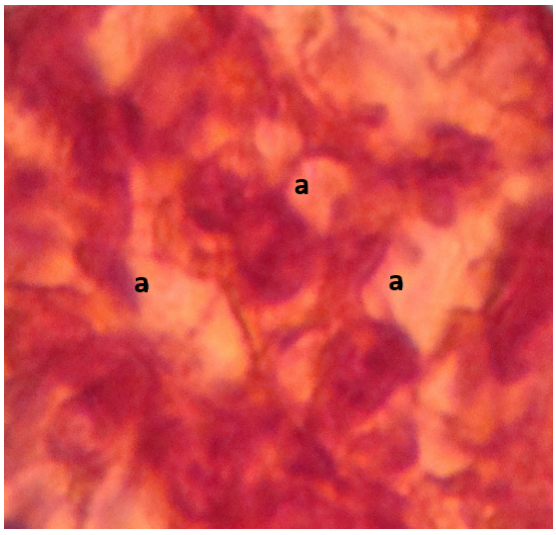
Archive of SID



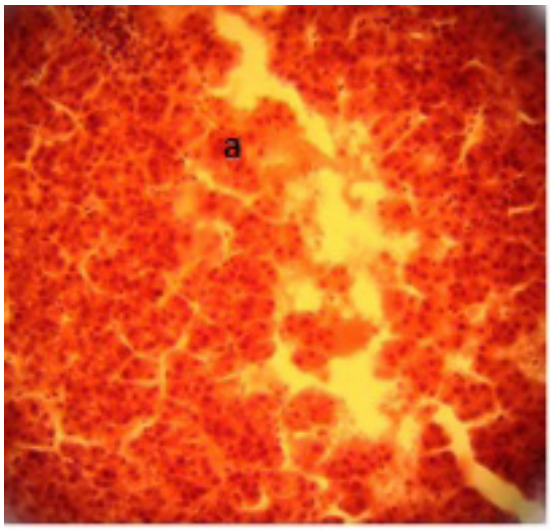
شکل ۳- تورم سلولی (a) و نفوذ سلول‌های آماسی (b) در بافت بینابینی توبول‌های کلیه در تیمار شاهد (رنگ‌آمیزی H&E؛ بزرگ‌نمایی ×۴۰۰)



شکل ۴- نکروز توبولار (a) در بافت کلیه در تیمار شاهد (رنگ‌آمیزی H&E؛ بزرگ‌نمایی ×۴۰۰)



شکل ۵- دژنراسیون و وجود واکوئل‌های چربی (a) در سلول‌های کبدی در تیمار ۱۰۰۰ mg لوامیزول (رنگ‌آمیزی H&E؛ بزرگ‌نمایی ×۴۰۰)



شکل ۶- نکروز سلول‌های کبدی (a) در تیمار ۱۰۰۰ mg لوامیزول (رنگ‌آمیزی H&E؛ بزرگ‌نمایی ×۴۰۰)

که برای تقویت پاسخ‌های ایمنی و کنترل بیماری‌ها در آبزی‌پروری به کار می‌رود (۱۱). محرک‌های ایمنی از طریق افزایش فعالیت سیستم کمپلمان خون (۱۰ و ۲۵)، افزایش فعالیت لیزوزیم سرم، کبد، کلیه و هم‌چنین ایمونوگلبولین تام سرم، پراکسیداز و سوپراکسیداز سرم (۳، ۱۵، ۱۶، ۱۹ و ۲۰)، تولید آنتی‌بادی بیشتر توسط لنفوسیت‌های خون (۸ و ۱۶) و تأثیر بر تعداد سلول‌های سفید خون موجب افزایش مقاومت ماهیان در برابر تنش‌هایی مانند تراکم بالا، دما و شوری (۱۷) می‌شوند و سرانجام در تولید نهایی مزارع پرورش آبزیان نقش بسزایی دارند. در این پژوهش مقادیر مختلف لوامیزول به‌عنوان یک محرک ایمنی موجب تفاوت‌های معنی‌داری در فعالیت کمپلمان سرم در

www.SID.ir

Archive of SID

تیمارهای مختلف شده است که این موضوع خصوصاً در مقادیر بالای لوامیزول محسوس‌تر است؛ به‌طوری‌که در بین تیمارهای موجود بیشترین مقدار فعالیت کمپلمان سرم در تیمار تغذیه‌شده با ۱۰۰۰ میلی‌گزم لوامیزول دیده می‌شود که با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان داده است؛ همچنین در روز ۶۰ (با تنش‌تراکم دو برابر) که ماهیان با غذای فاقد لوامیزول تغذیه شدند هم تیمار لوامیزول ۱۰۰۰ میلی‌گرم با بیشترین میزان فعالیت کمپلمان سرم با گروه شاهد و بقیه تیمارها تفاوت معنی‌دار نشان داده است که بیانگر ماندگاری تأثیر لوامیزول بر فعالیت کمپلمان سرم (حداقل تا ۱۵ روز پس از قطع این محرک ایمنی از غذای ماهیان و در تراکم دو برابر) در این پژوهش است (جدول ۱).

به استناد نتایج به‌دست آمده از پژوهشگران مختلف، لوامیزول به صورت‌های مختلف ازجمله غوطه‌وری و خوراکی موجب بهبود و ارتقای پاسخ‌های ایمنی در آبزیان می‌شود؛ به‌طوری‌که Findlay و Munday در سال ۲۰۰۰ با غوطه‌وری ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) در محلول حاوی ۲/۵ mg/L لوامیزول به مدت ۲ ساعت، افزایش فعالیت سلول‌های بیگانه‌خوار ازجمله ماکروفاژها، افزایش یون سوپراکساید و در پایان تحریک سیستم ایمنی غیراختصاصی این ماهی را گزارش کردند (۱۳)؛ همچنین Shahidi و همکاران در سال ۲۰۱۱ گزارش کردند که لوامیزول در صورت مصرف خوراکی موجب افزایش فعالیت آنتی باکتریال سرم (به‌واسطه افزایش لیزوزیم سرم) در ماهیان می‌شود و از ابتلای آن‌ها به عفونت‌های باکتریایی جلوگیری می‌کند (۲۲). در این تحقیق نیز مصرف خوراکی لوامیزول در قزل‌آلای رنگین‌کمان افزایش فعالیت لیزوزیم سرم را در پی داشته است. Wijendra و Pathiratne در سال ۲۰۰۷ گزارش کردند که افزودن مقدار ۵ میلی‌گرم لوامیزول به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در جیره غذایی کپور هندی (Labeo rohita Hamilton, 1822) موجب افزایش قابل‌ملاحظه و معنی‌داری در فعالیت لیزوزیم سرم این ماهی نسبت به گروه شاهد پس از ۲۱ روز شده است (۲۴). در پژوهش حاضر همان‌گونه که در جدول ۲ درج شده است در پایان دوره تحقیق (روز ۶۰ با تراکم دو برابر) لوامیزول خصوصاً در مقادیر بالا موجب بروز تغییرات معنی‌داری در میزان فعالیت لیزوزیم سرم نسبت به گروه شاهد شده است که این تغییر در تیمار تغذیه شده با ۱۰۰۰ میلی‌گرم لوامیزول در کیلوگرم غذا بیشترین میزان بوده است و پایداری تأثیر لوامیزول برافزایش فعالیت لیزوزیم سرم را حداقل تا ۱۵ روز پس از قطع این محرک ایمنی از جیره غذایی و در تراکم بالای ماهیان نشان می‌دهد؛ البته لوامیزول در گونه‌های مختلف با مقادیر متفاوت موجب تحریک پاسخ‌های ایمنی می‌شود، به‌طوری‌که در این پژوهش بهترین مقدار لوامیزول برای تحریک پاسخ‌های ایمنی قزل‌آلای رنگین‌کمان ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم غذاست؛ درحالی‌که بر اساس گزارش Maqsood و همکاران در سال ۲۰۰۹ که کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) را با مقادیر ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم لوامیزول در کیلوگرم غذا تغذیه کردند، مقدار ۲۵۰ میلی‌گرم بهتر از بقیه مقادیر موجب افزایش پروتئین کل سرم، فعالیت لیزوزیم سرم و بازمانی ۸۹/۶ درصدی ماهی کپور معمولی در برابر باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* (*Aeromonas hydrophila*) شد (۱۶).

عوامل مختلفی می‌توانند موجب تغییرات و صدمات بافتی در ماهیان شوند که از جمله این عوامل می‌توان به تنش‌های مختلف محیطی، ورود عوامل صنعتی و زباله‌های خانگی و شهری به منابع آبی مورد استفاده در آبزی‌پروری اشاره کرد که برخی حاوی آلاینده‌هایی مثل فلزات سنگین نیکل و کادمیوم هستند و در موارد زیادی سبب افزایش ترشح موکوس، نکروز و هیپرپلازی سلول‌های کلراید آبششی می‌گردند (۷ و ۲۳) و در بعضی موارد کنترل آن‌ها از دست پرورش‌دهندگان خارج است (۱۳ و ۲۳)؛ استفاده از برخی داروها و مواد درمانی نیز به‌صورت ضمنی موجب آسیب‌های بافتی در اندام‌های مختلف آبزیان می‌شوند که بررسی این آسیب‌ها و شدت آن‌ها به منظور تصمیم‌گیری

www.SID.ir

Archive of SID

برای به‌صرفه بودن استفاده از آن‌ها اهمیت زیادی دارد. در این پژوهش مشخص شد که حضور لوامیزول در جیره غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان علاوه برداشتن آثار محرک ایمنی همچون افزایش فعالیت کمپلمان سرم و افزایش فعالیت لیزوزیم سرم، بر تغییرات آسیب‌شناسی بافتی در اندام‌هایی مانند کبد، کلیه و آبشش نیز مؤثر است؛ البته با بررسی تأثیر مقادیر مختلف لوامیزول بر تغییرات آسیب‌شناسی بافتی مشخص گردید که به کار بردن مقادیر مختلف لوامیزول در جیره غذایی این ماهی تأثیرات متفاوتی هم بر بافت‌ها مختلف ماهی در پِی خواهد داشت. بررسی عمومی مراکز تکثیر و پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان در ایران (۲) نشان داده است که اغلب مراکز تکثیر و پرورش قزل‌آلا با مشکل ضایعات آسیب‌شناسی بافتی روبرو هستند.

ضایعات آبششی بیشتر به‌صورت پرخونی عروق، تورم لایه پایه‌ای رشته‌های ثانویه آبششی، هیپرپلازی و چسبندگی رشته‌های آبششی و در مواردی چماقی شدن رشته‌های آبششی ثانویه دیده می‌شود (۱). در این پژوهش ماهیان تیمار پنجم (۱۰۰۰ میلی‌گرم لوامیزول در کیلوگرم غذا) همانند تیمار شاهد کمترین تغییرات آسیب‌شناسی بافت آبشش را در پِی داشته‌اند (جدول۳) و بیشترین میزان این تغییرات آسیب‌شناسی در تیمار دوم (۱۰۰ میلی‌گرم لوامیزول در کیلوگرم غذا) مشاهده شد (شکل ۱ و ۲).

تغییرات بافتی کلیه، در مزارع ماهیان پرورشی قزل‌آلا بیشتر به‌صورت دژنراسیون سلول‌های کلیوی، نکروز و تخریب لوله‌های کلیوی و بافت خون‌ساز در قسمت قدامی کلیه، پرخونی عروق کلیوی، افزایش رنگ‌دانه‌های ملانین، نفوذ و افزایش سلول‌های آماسی مشاهده شده است (۲). ضایعات و تغییرات بافتی کلیوی در بسیاری از بیماری‌های ماهیان شایع بوده و بیماری‌های باکتریایی کلیوی و بیماری‌های ارتشاحی کلیوی (پرولیفراتیو) از شایع‌ترین آن‌هاست (۵). نفریت بینابینی در بین ماهی‌های مورد بررسی در این تحقیق به صورت نفوذ منتشر سلول‌های تک‌هسته‌ای آماسی (منوسیت‌ها) در بافت بینابینی کلیه و تغییرات توبول‌های کلیه به‌صورت تورم سلولی و نکروز توبولی (بیشتر در تیمار شاهد) مشاهده شد (شکل ۳ و ۴) که می‌تواند به علت آنوکسی حاصل از پرخونی و تورم ناحیه گلومرولی کلیه پدید آید و یا مستقیماً به وسیله عوامل سمی و یا دارویی ایجاد شود (۱۲). این تغییرات بافتی کلیه در تیمارهای شاهد و لوامیزول ۱۰۰ میلی‌گرم و ۲۵۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم غذا شدیدتر از بقیه تیمارها بود؛ این در حالی است که تیمار تغذیه‌شده با ۱۰۰۰ میلی‌گرم لوامیزول تغییرات بافتی کمتری نسبت به تیمار شاهد و نتایج مطلوب‌تری را نشان داده است (جدول۳). این موضوع می‌تواند نشان‌دهنده‌ی نقش لوامیزول در کاهش آسیب‌های بافتی در بافت کلیوی ماهی قزل‌آلا در مزارع پرورش ماهی باشد.

ضایعات کبدی در مزارع پرورش ماهی بیشتر به‌صورت پرخونی عروق کبدی، نفوذ چربی در هپاتوسیت‌ها، پرخونی و اتساع سینوزوئیدها، افزایش منوسیت‌ها در سینوزوئیدها و نیز افزایش ملانوماکروفاژها، دژنرسانس واکوئولی هپاتوسیت‌ها و همچنین نکروز کانونی دیده می‌شود (۲). جراحات کبدی در پژوهش پیش رو عمدتاً به‌صورت نفوذ چربی در داخل سلول‌ها و نکروز برخی سلول‌های کبدی مشاهده شد (شکل ۵ و ۶). نفوذ چربی در سلول‌های کبدی در بیشتر ماهی‌های پرورشی موجب بزرگ شدن کبد، گرد شدن لبه‌های تیز آن و قهوه‌ای یا زرد شدن و نیز ذخیره مقدار زیاد چربی در آن می‌شود. در این پژوهش کمترین میزان آسیب‌دیدگی بافت کبدی ماهیان در تیمار شاهد و بیشترین شدت صدمات بافت کبدی درمجموع در تیمارهای لوامیزول با غلظت بالا دیده شد (جدول۳)؛ دلیل این موضوع را می‌توان به نقش تصفیه‌کنندگی کبد نسبت داد که در غلظت‌های بالای لوامیزول میزان آسیب‌دیدگی بافتی آن نیز افزایش می‌یابد.

با توجه به داده‌های به دست آمده از مطالعه حاضر و همچنین نقش لوامیزول در ارتقای سطح پاسخ‌های ایمنی و پایین بودن تغییرات آسیب‌شناسی بافتی این محرک

www.SID.ir

Archive of SID

ایمنی، خصوصاً در اندام مهم و حیاتی کلیه، استفاده از این ماده به مقدار ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌عنوان محرک ایمنی توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی گروه آرتمیا و آبزیان پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه و از محل اعتبارات پژوهشی معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه اجرا گردیده است که بدین وسیله از آن‌ها سپاسگزاری به عمل می‌آید.

منابع

۱- خوشنود، زهرا؛ خدابنده، صابر و مسافر خورجستان، سعیده؛ اثرات هورمون کورتیزول بر سلول‌های کلراید آبششی در بچه تاسماهی ایرانی Acipenser persicus؛ مجله یاخته؛ ۱۳۸۸؛ ۱۱ (۴): ۴۲۴-۴۳۱.

۲- شریف پور، عیسی و ذریه زهرا، سید جلیل؛ آسیب‌شناسی تلفات بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی در برخی مزارع تکثیر و پرورش ماهیان سرد آبی کشور؛ مجله علمی شیلات ایران؛ ۱۳۸۵؛ شماره ۵ (۱): ۸۹-۱۰۰.

3- Ai, Q; Mai, K; Xu, W; Duan, Q; Tan, B. and Liufu, Z; Effects of dietary vitamin C on growth and immune response of Lateolabrax japonicas. Aquaculture; 2004; 242: 489-500.

4- Amar, E; Kiron, V. and Satoh, S; Effect of dietary beta-carotene on the immune response of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Fish Sci.; 2000; 66: 1068-1075.

5- Bendele, R.A. and Klontz, G; The pathology of fishes Histopathology of teleost kidney disease; University of Wisconsin; Press Madison. 1975; pp: 365-383.

6- Boesen, J; Maganga, F. and Odgaard, R; Norms, organizations and actual practices in relation to land and water management in Ruaha River Basin; In: Granfelt, T; Managing the Globalized Environment; Intermediate Technology Publications (ITP), London. 1999. pp: 51-85

7- Camargo, M.P. and Martinez, B.R; Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in urban stream. Neotrop. Ichthyol.; 2007; 5(3): 327-336.

8- Cha, S; Lee, J; Song, C; Lee, K. and Jeon, Y; Effects of chitosan-coated diet on improving water quality and innate immunity in the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquaculture; 2008; 278 (1-4): 110-118.

9- Clerton, P; Troutaud, D. and Verlha, V; Dietary vitamin E and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocyte functions: effect on gut and on head kidney leucocytes. Fish Shellfish Immun.; 2001; 11: 1-13.

10- Dautremepuits, C; Betoulle, S; Paris-Palacios, S. and Vernet, G; Humoral immune factors modulated by copper and chitosan in healthy or parasitised carp (*Cyprinus carpio L.*) by Ptychobothri-

www.SID.ir

Archive of SID

11- Dugenci, K.S; Arda, N. and Canadan, A; Some medicinal plants as immunostimulants for fish. J Ethnopharmacol.; 2003; 88: 99–106.

12- Engstad, R.E; Robertsen, B. and Frivold, E; Yeast glucan induces increase in Lysozyme and complement-mediated hemolytic activity in Atlantic salmon blood. Fish Shellfish Immun.; 1992; 2 (4): 287-297.

13- Findlay, V.L. and Munday, B.L; Immunomudiolatory effects of Levamisole on nonspecific immune system of Atlantic salmon. J Fish Dis 2000; 23: 369-378.

14- Hardy, R.W; Rainbow Trout, Oncorrhynchus mykiss; In: Carl, D. and Webster, C; Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture. Eds.; London; CABI publishing. 2002; pp: 184-202.

15- Kim, D.H. and Austin, B; Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotics. Fish Shellfish Immun.; 2006; 21(5): 513-524.

16- Maqsood, S; Samoon, M.H. and Singh, P; Immunomodulatory and growth promoting effect of dietary Levamisole in common carp fingerlings against challenge of Aeromonas hydrophila. Turk J Fish Aquat Sci; 2009; 9: 111-120.

17- Meshkini, S; Tafy, A.A; Tokmechi, A. and Farhangpajooh, F; Effect of Chitosan on hematological parameters and stress resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Vet. Res. Forum; 2012; 3 (1): 49-54.

18- Mulero, V; Esteban, M.A. and Munoz, J; Dietary intake of Levamisole enhances the immune responses and disease resistance of the marine teleost gilthead seabream (Sparus aurata L.). Fish Shellfish Immun.; 1998; 8: 49-62.

19- Roberts, R.J; The immunology of teleost. In: Roberts, R.J.; Eds.; Fish Pathol.; Vol. 1: W. B. Saunders; London England. 2001; pp: 133-150.

20- Sakai, M; Current research status fish immunostimulants. Aquaculture; 1999; 172: 63-92.

21- Salah, M.A; Osama, A.A; Amina, M. and Hala, G; Efficiency of Levamisole in improving the immune response of Catfish (Clarias gariepenus) to Aeromonas hydrophila Vaccine. Mediterranean Aquaculture Journal (MAJ); 2010; 1(1): 8-17.

22- Shahidi, A; Vahabzade, H. and Zamini, A; The effect of Levamisole on the immune response of fingerling grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). International conference on medical, biological and pharmaceutical sciences (ICMBPS"20011); Pattaya Dec.; 2011

www.SID.ir

Archive of SID

23- Sukhoverkhov, F.M; The effect of cobalt, vitamin, tissue preparations and antibiotics on carp production. 2006; http://www.FAO.com.

24- Wijendra, G.D. and Pathiratne, A; Evaluation of immune responses in Indian carp, Labeo rohita fed with Levamisole incorporated diet. J. Sci. Univ. Kelaniya; 2007; 3: 17-28.

25- Yuan, C.H; Li, D; Chen, W; Sun, F; Wu, G; Gong, Y; Tang, J; Shen, M. and Han, X; Administration of a herbal immunoregulation mixture enhances some immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*). Fish Physiol. Biochem.; 2007; 33: 93-101.

www.SID.ir

Archive of SID

The effect of Levamisole on the immune response and histopathological conversions in high density of rainbow trout (*Oncorrhynchus mykiss*)

Meshkini, S.[1*]; Tehrani, A.S.[2]; Agh, N.[3]

1. Assistant Professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia-Iran.
2. Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia-Iran.
3. Assistant Professor of Artemia and Aquatic Animals Institute, University of Urmia, Urmia-Iran.

Recieved: 6 September 2014 ***Accepted:*** 14 April 2015

Summary

In this investigation, we evaluated the effects of Levamisole on histopathological changes and immune responses of rainbow trout. 1500 fish (average weight 150 g) were obtained from a local fish farm of Urmia and were divided in 5 treatments and were fed on a diet supplemented with Levamisole at 0 (control), 100, 250, 500 and 1000 mg kg-1 diet for a period of 45 days. Then the fishes of all groups were fed on commercial diet without Levamisole and were exposed density stress by 2 folds (150 kg/m3) for the following 15 days. Blood samples were collected from all treatments on days 15, 30, 45 and 60 to evaluate the compliment activity and lysozyme activity of serum; and the results were analyzed by SPSS15 software. At the end of trial, tissue samples of gill, kidney and liver were also collected to test the histopathologic effects of Levamisole. At the end of the trial period, results showed increased levels of lysozyme activity and complement activity (P<0/05) in the treatment were fed at higher doses of Levamisol 1000 mg kg-1 diet. According of analyzing histopathologic samples, minimum adverse effects in kidney tissues were detected at higher concentrations of Levamisole, especially in the control group and Levamisole 1000 mg kg-1 diet, and the gill tissues suffered least adverse effects in the control group. At the end of trial period higher doses of Levamisol 1000 mg kg-1 diet were identified the best treatment to induce immune responses and decrease of histopathologic effects in rainbow trout.

Keywords: Rainbow trout, Levamisole, Immune responses, Histopathological changes.

* Corresponding Author email: s.meshkiniy@ gmail.com

www.SID.ir