مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۰، دوره ۶۶، شماره ۳، ۲۶۳-۲۵۵

تأثیر تجویز خوراکی عصاره خار مریم *(Silybum marianum)* بر پاسخ‌های ایمنی ماهی کپور معمولی

مجتبی علیشاهی[1*] مهدی سلطانی[2] مهر زاد مصباح[1] امین اسمعیلی راد[1]

۱) بخش بیماری های آبزیان، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز - ایران.

۲) گروه بهداشت و بیماری های آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(دریافت مقاله: ۲۲ دی ماه ۱۳۸۹ ، پذیرش نهایی: ۱۸ خرداد ماه ۱۳۹۰)

چکیده

در این تحقیق اثر عصاره‌گیاه خار مریم بر برخی پاسخ های ایمنی و خون‌شناسی ماهی کپور معمولی مورد بررسی قرارگرفت. به این منظور ۲۸۰ قطعه ماهی کپور معمولی (میانگین وزن ۸/۲۲±۶۵/۱۲) به چهار تیمار تقسیم‌گردیدند. تیمار اول با باکتری کشته‌آئرومونas هیدروفیلا ایمن‌شده و با خوراک حاوی ۰/۵ درصد عصاره خار مریم تغذیه‌گردید. تیمار دوم ایمن نشده، ولی با خوراک حاوی عصاره تغذیه‌شد. تیمارسوم به روش فوق ایمن‌شده و با خوراک معمولی تغذیه‌شد، در صورتیکه تیمار چهارم ایمن نشده و با خوراک معمولی تغذیه‌گردید. به مدت ۴۰ روز در فواصل زمانی ۱۰ روزه نمونه‌گیری از خون آنها انجام‌گرفت. آزمایشات ایمنی‌شناسی شامل میزان فعالیت لایزوزیم‌سرم، میزان قدرت باکتری کشی‌سرم، فعالیت مسیر الترناتیو کمپلمان، میزان آنتی بادی ضد آئرومونas هیدروفیلا، میزان پروتئین تام و میزان IgM سرم ماهیان هر تیمار اندازه‌گیری گردید. برخی فاکتورهای خون شناسی (میزان هماتوکریت، هموگلوبین، تعدادگلبول‌های‌سفید وقرمزخونی، حجم‌متوسط‌گلبولی، وزن متوسط هموگلوبولین‌گلبولی و غلظت هموگلوبولین‌گلبولی) نیز در هر تیماراندازه‌گیری‌شد. در انتهای دوره تیمارها با باکتری آئرومونas هیدروفیلای‌زنده چالش داده‌شدند. و تلفات بعد از چالش ثبت‌گردید. نتایج مشخص‌ساخت که‌سطح لایزوزیم‌سرم و میزان پروتئین تام و میزان IgM سرم، تعدادگلبول‌های‌سفید و میزان هماتوکریت در هر دو تیمار ایمن و غیرا یمن تحت تاثیر تجویز عصاره خار مریم قرارگرفت ($p<0/05$). در صورتیکه تیترآنتی بادی ضدآئرومونas هیدروفیلا، فعالیت کمپلمان وسایر فاکتورهای خون‌شناسی در هر دوگروه ایمن و غیر ایمن تحت تاثیر تجویز عصاره قرار نگرفتند ($p<0/05$). میزان قدرت باکتری کشی‌سرم و تلفات بعد از چالش با باکتری آئرومونas هیدروفیلا نیز فقط در تیمار غیر ایمن تحت تاثیر تجویز عصاره خارمریم قرارگرفت($p<0/05$). بطور کلی می‌توان نتیجه‌گرفت که تجویز عصاره خار مریم بصورت خوراکی باعث تحریک برخی فاکتورهای ایمنی غیر اختصاصی می‌گردد، و این ماده به عنوان یک محرک ایمنی در ماهی قابل توصیه است.

واژه‌های کلیدی: سیلیمارین، ماهی کپور معمولی، پاسخ ایمنی، آئرومونas هیدروفیلا.

مقدمه

اخیرا استفاده از محرک‌های ایمنی در ماهی های پرورشی جهت افزایش فعالیت مکانیسم‌های دفاع غیر اختصاصی و ایجاد مقاومت در مقابل بیماری‌ها رایج شده است. این مواد بعنوان جایگزینی مناسب برای آنتی بیوتیک‌ها معرفی شده اند(۳۰).

با توجه به تکامل بیشتر ایمنی غیر اختصاصی ماهی نسبت به ایمنی اختصاصی و جایگاه ویژه محرک‌های ایمنی در تحریک ایمنی غیر اختصاصی، استفاده از محرک‌های ایمنی در آبزیان ارجحیت بیشتری نسبت به حیوانات خونگرم دارد(۴۳،۳۶). در بین محرک‌های ایمنی مختلف، محرک‌های ایمنی با منشاء گیاهی مزیت‌هایی از جمله در دسترس بودن، خطر کمتر برای محیط و جانور و قیمت پایین تر را دارند(۲۸). از طرفی در ماهی بعلت عدم تکامل ایمنی اختصاصی و پاسخ پادتنی ضعیف، استفاده از واکسن های تجارتی علاوه بر گران قیمت بودن، در مقایسه با حیوانات خونگرم کارایی کمتری دارند(۲۸). با عنایت به موارد فوق به نظر می رسد استفاده از محرک های ایمنی جایگزین مناسبی برای آنتی بیوتیک‌ها و حتی واکسیناسیون در پیشگیری و کنترل بیماری‌ها در ماهی باشد(۲۰،۳۰،۳۶،۳۸).

اخیراً استفاده از محرک‌های ایمنی با منشاء گیاهی در آبزیان گسترش یافته است بطوریکه درماهی *Pseudosciaena crocea*(۲۱)، ماهی کپور معمولی (۲۰)، ماهی قزل آلا (۱۲) ، تیلاپیا(۲۴) و ماهی طلایی (۹) استفاده از گیاهان دارویی باعث افزایش مقاومت و تحریک سیستم ایمنی ماهی گردیده است.

گیاه خار مریم Milk thistle با نام علمی *Silybum marianum* گیاهی از خانواده Asteraceae می‌باشد، که از ۲۰۰۰ سال پیش بدلیل خواص درمانی خاص مورد توجه انسان بوده است(۲۷)، ماده موثره‌ی عصاره این گیاه سیلیمارین Silimarine نام دارد(۴). سیلیمارین خود مجموعه‌ای از مواد شامل: silybin، silychristin و silydianin می‌باشد (۱۵)،این گیاه بومی جنوب اروپا و آسیا می‌باشد(۲۷). به این گیاه خواص آنتی اکسیدانی و حذف رادیکال‌های آزاد (۳۱،۳۲). خواص محافظت از سلول‌های کبدی(۲۳،۲۵،۳۱) پیشگیری و درمان سرطان‌ها(۳۴) و خواص تحریک و تعدیل ایمنی (۵،۴۰) نسبت داده می‌شود.

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۰۶۱۱-۳۳۳۰۰۶۷ نمابر: ۰۶۱۱-۳۳۶۰۸۰۷ Email: alishahim@scu.ac.ir

این گیاه در برخی نقاط ایران بصورت خود رو روئیده و به آن گیاه ماریتیغال گفته می‌شود. این گیاه در سطحی وسیع در استان خوزستان مشاهده شده و با شرایط اقلیمی منطقه کاملا سازگار می‌باشد و گیاهی کم نیاز محسوب می‌گردد(۴).

ماهی کپور معمولی به علت ویژگی‌های منحصر به فرد پرورشی در اکثر کشورهای دنیا کشت شده و در ایران نیز به عنوان یکی از گونه‌های با اهمیت اقتصادی بالا و پر طرفدار در اکثر مناطق کشور کشت می‌شود. از اینرو از این ماهی در تتحقیق جاری به عنوان نماینده ماهیان گرمابی استفاده گردید. با توجه به گزارش اثرات تحریک ایمنی عصاره این گیاه در حیوانات خونگرم و عدم مطالعه اثرات تحریک ایمنی این گیاه در آبزیان در این تحقیق اثرات تحریک ایمنی اختصاصی و غیر اختصاصی ماده موثره گیاه خارمریم (سیلیمارین) در ماهی کپور معمولی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

ماهی: تعداد ۲۸۰ قطعه بچه ماهی کپور معمولی (با وزن متوسط ۸/۲۲±۶۵/۱۲ گرم) از یکی از کارگاه‌های پرورش ماهیان گرمابی مجتمع پرورش ماهی آزادگان در اطراف شهرستان اهواز تهیه و به مدت یک هفته سازش دهی ماهی با شرایط آکواریوم و غذای دستی انجام شد.

مکان انجام تحقیق: تعداد ۴ آکواریوم ۲۵۰ لیتری مجهز به بیوفیلتر اکسترنال، دماسنج ترموستات دار و غذا ده اتوماتیک در سالن آکواریوم تحقیقاتی بهداشت و بیماری‌های آبزیان در دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز برای انجام تحقیق در نظر گرفته شد. شرایط فیزیکوشیمیایی آب مورد استفاده در تحقیق به قرار زیر بود. دما: ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد؛ اکسیژن محلول: ppm ۱۰-۸؛ PH برابر ۰/۳±۷/۹؛ NO2<۰/۰۱ ppm؛ NH3 <۰/۰۱ppm و میزان تعویض روزانه آب ۱۰درصد حجم آب بود.

تهیه سلیمارین و خوراک حاوی سیلیمارین: پودر خالص سیلیمارین از شرکت سیگما (آمریکا) تهیه گردید. برای تهیه خوراک حاوی سیلیمارین، ۲۰۰ گرم خوراک مخصوص ماهی کپور بر روی یک سینی گسترانیده شد. میزان ۱گرم پودر سیلیمارین (غلظت نهایی ۰/۵درصد) با ۱۰۰ میلی لیتر آب مخلوط و توسط اسپری روی خوراک پاشیده شد. این عمل بعد از به‌هم زدن خوراک چندین بار تکرار شد. برای حفظ بهتر سیلیمارین در خوراک در هنگام تغذیه ماهی، میزان ۱درصد محلول ژلاتین به همان روش روی خوراک اسپری گردید. و سپس بمدت ۴ ساعت خوراک در فور ۴۰ درجه قرار داده شد، تا کاملا خشک گردد. بعد از خشک شدن خوراک، در کیسه‌های نایلونی مشکی بسته بندی شده، لیبل گذاری و تا زمان استفاده در یخچال ۴ درجه سانتیگراد نگهداری گردید. خوراک کنترل نیز به همین روش ولی با آب فاقد سیلیمارین تیمار گردید. بدلیل حساسیت سیلیمارین به نور تا حد امکان مراحل در تاریکی انجام گرفت.

تیمار بندی ماهی‌ها: ماهی‌ها بصورت کاملا تصادفی بصورت زیر بین ۴ آکواریوم ۲۵۰ لیتری (هر آکواریوم ۷۰ قطعه) تقسیم گردیدند.

تیمار اول: ماهی‌ها با باکتری کشته آئروموناس هیدرو فیلا ایمن شده و با خوراک حاوی سیلیمارین تغذیه شدند (سیلیمارین ایمن).

تیمار دوم: ماهی‌ها ایمن سازی نشده و با خوراک حاوی سیلیمارین تغذیه گردیدند (سیلیمارین غیر ایمن).

تیمار سوم: ماهی‌ها با باکتری کشته آئروموناس هیدرو فیلا ایمن شده ولی با خوراک فاقد سیلیمارین تغذیه شدند (کنترل ایمن).

تیمار چهارم: ماهی‌ها ایمن نشده و با خوراک فاقد سیلیمارین تغذیه گردیدند (کنترل غیر ایمن).

تیمارها با خوراک‌های مخصوص هر گروه به مدت ۴۰ روز و روزانه با ۵ درصد وزن بیوماس تغذیه شدند.

تهیه واکسن و ایمن سازی: باکتری آئروموناس هیدرو فیلا(*AH04*)، اهدایی آزمایشگاه بیماری‌های ماهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، که با آزمایشات باکتریولوژیک و مولکولی جنس و گونه آن تایید شده بود، برای ایمن سازی ماهی‌ها مورد استفاده قرار گرفت. باکتری با حداقل دوز کشنده فرمالین(۰/۲درصد بمدت یک ساعت)، غیر فعال گردید. بعد از شستشوی کامل فرمالین، باکتری با تراکم 10^9 در میلی لیتر در سرم فیزیولوژی استریل رقیق گردید. برای ایمن سازی از این باکتری در روزهای صفر و ۱۴ به روش تزریق داخل صفاقی و به میزان ۰/۱ میلی لیتر به ازای هر ماهی در تیمارهای ایمن استفاده شد. در تیمارهای غیر ایمن تزریق به همین روش فقط با سرم فیزیولوژی انجام گرفت.

نمونه گیری: در روزهای صفر، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ تحقیق (اولین تزریق) و بعد از بیهوش نمودن ماهی توسط ماده بیهوشی MS222 با دوز ۳۰ میلی گرم در لیتر، بوسیله سرنگ انسولین با استفاده از ماده ضد انعقاد هپارین و از ورید ساقه دمی خونگیری انجام شد. در هر مرحله از ۶ ماهی و در دو میکروتیوب نمونه خون تهیه گردید. نمونه آزمایشات هماتولوژی سریعاً به آزمایشگاه فرستاده شد، نمونه مربوط به آزمایشات ایمنی به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شده و سپس سرم آن با سانتریفوژ در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه جداسازی گردید. سرم‌ها در ۲۰- درجه سانتیگراد تا زمان استفاده نگهداری شدند.

آزمایشات انجام شده روی نمونه‌ها: ۱- اندازه گیری لایزوزیم سرم

برای اندازه گیری میزان فعالیت لایزوزیم سرم از روش آگارز لیزوپلیت Agarose lysoplate Method توصیه شده توسط Røed et al در سال ۱۹۹۳ با مقداری تغییرات استفاده گردید(۲۹). در این روش ابتدا پودر آگارز به میزان ۱درصد در بافر ۰/۱ مول فسفات سیترات/ سیترات با pH=۵/۸ حل گردید. با حرارت دادن محلول به همراه هم زن 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 میلی‌گرم به ازای هر میلی لیتر 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 میلیمتر به فاصله ۲/۵ سانتیمتر در ژل بوسیله پانچ‌های خاص ایجاد شده و سرم نمونه در سه تکرار به گوده‌ها اضافه گردید. ژل‌ها به مدت ۲۴ ساعت در شرایط اطاقک مرطوب و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد انکوبه شده و سپس قطرهاله عدم رشد باکتری میکروکوک در اطراف گوده با خط کش دقیق، اندازه گیری شد. از رقت‌های متوالی لایزوزیم خالص مرغی (سیگما) نیز برای رسم نمودار فعالیت لایزوزیم به همین روش استفاده شده و در انتها میزان فعالیت لیز سلولی سرم‌های مورد آزمایش با نمودار استاندارد فعالیت لایزوزیم مرغی ترسم شده مقایسه گردید، و میزان فعالیت لایزوزیم هر نمونه مشخص گردید.

بررسی قدرت باکتری کشی سرم: برای اندازه گیری قدرت باکتری کشی سرم از روش توصیه شده توسط Kajita و همکاران در سال ۱۹۹۰ با کمی تغییرات استفاده گردید(۲۲).

ابتدا باکتری آئرومونas هیدروفیلا به مدت ۴۸ ساعت در محیط TSB کشت داده شد و سپس سلولهای باکتریایی با سانتریفوژ ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه جمع آوری 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 10^5 باکتری در میلی لیتر در ژلاتین ورونال بافر استریل (pH=۷/۵ و حاوی ۰/۵ میلی مول در میلی لیتر یون کلسیم و ۰/۱۵ میلی مول در میلی لیتر یون منیزیم) تنظیم گردید.

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

آزمایش مسیر فرعی کمپلمان(ACP): فعالیت ACP مطابق با روش توصیه شده توسط Selvaraj و همکاران در سال ۲۰۰۵ اندازه‌گیری گردید(۳۳). بطور خلاصه، ۵۰۰ میکرولیتر سرم کپور در بافر EGTA ژلاتین ورونال منیزیم دار بطور متوالی رقیق گردید. ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون گلبول قرمز گوسفندی (2×10^6 سلول در میلی لیتر) به هر لوله اضافه گردید. لوله‌ها به مدت ۹۰ دقیقه در ۱۵ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. فعالیت همولیز با اضافه نمودن بافر ۱۰ میلی مول EDTA ورونال بافر ژلاتین دار متوقف گردید. بعد از سانتریفوژ، میزان همولیز از روی میزان جذب نوری مایع بالایی هر لوله در ۴۱۴ نانومتر اندازه گیری گردید.

اندازه گیری پروتئین کل و گلوبولین سرم: میزان پروتئین کل سرم بر اساس روش Lowry et al در سال ۱۹۵۱ با استفاده از کیت استاندارد تخمین پروتئین شرکت زیست شیمی استفاده گردید.

برای تخمین گلوبولین، ۵۰ µL محلول سولفات آمونیوم اشباع بصورت قطره قطره به ۵۰ µL سرم اضافه شد. سانتریفیوژ در دور g ۸۰۰۰ 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. میزان گلوبولین سرم با کم کردن میزان پروتئین بدست آمده ثانویه از پروتئین کل سرم محاسبه گردید.

عیار آنتی بادی به روش میکروآگلوتیناسیون: تعیین عیار آنتی بادی ضد باکتری آئرومونas هیدروفیلا به روش توصیه شده توسط Swain و همکاران در سال ۲۰۰۶ و در پلیت های ۹۶ گوده‌ای U شکل انجام شد(۳۶). ابتدا رقت های بر مبنای دو و به میزان ۲۵ میکرولیتر از سرم در بافر فسفات نمکی (PBS) در سه تکرار (ردیف) تهیه شد. سپس ۲۵ میکرولیتر باکتری غیر فعال شده آئرومونas هیدروفیلا با غلظت 10^7 باکتری در میلی لیتر به هر گوده اضافه گردید. پلیت در دمای آزمایشگاه و با حفظ رطوبت به مدت یک شب انکوبه گردید. روز بعد نتایج قرائت گردید. آخرین رقتی از سرم که آگلوتیناسیون در آن اتفاق افتاده بود، به عنوان تیتر آنتی بادی ضد آئرومونas گزارش گردید. برای آنالیز آسانتر، نتایج بصورت لوگاریتم بر مبنای دو از رقت گزارش شد(۱).

محاسبه میزان بقای نسبی: بعد از پایان دوره ماهی های باقی مانده در هر تیمار به سه تکرار ده قطعه ای تقسیم شده و با باکتری زنده آئرومونas هیدروفیلا به میزان دو برابر دوز ایجاد کننده ۵۰ درصد تلفات ($2\times LD_{50}$) به روش داخل صفاقی، تزریق گردیدند. تعداد تلفات روزانه به مدت دو هفته ثبت شده و در انتها ضمن محاسبه تلفات تجمعی هر تیمار، علاوه بر بررسی میزان مقاومت هر تیمار در برابر عفونت تجربی، میزان کارایی واکسن در تیمارهای واکسینه با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید(۴).

(%تلفات در تیمار غیر واکسینه/ %تلفات در تیمار واکسینه)-۱=(RPS) درصد بقای نسبی

اندازه گیری پارامترهای خون‌شناسی: برای اندازه گیری پارامترهای خونشناسی از همان روش‌های معمول و متداول برای اندازه‌گیری پارامترهای خون شناسی پستانداران با اصلاحاتی استفاده گردید (۱۴).

در انتهای دوره از هر تیمار از ۶ ماهی خونگیری شده و برای اندازه گیری پارامترهای خونشناسی از همان روش های معمول و متداول برای اندازه گیری پارامترهای خون‌شناسی پستانداران با اصلاحاتی استفاده می‌گردید(۱۴). برای اندازه گیری هموگلوبین (Hb) از روش استاندارد سیانومت هموگلوبین، برای اندازه گیری هماتوکریت یا حجم فشرده گلبولی از روش میکروهماتوکریت و شمارش کلی گلبول های قرمز و گلبول های سفید به روش دستی و با استفاده از لام هماسیتومتر نئوبار انجام شد.

اندیس‌های گلبولی یعنی حجم متوسط گلبولی (MCV)، میزان متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH) و غلظت هموگلوبین گلبولی

(MCHC) با استفاده از فرمول های استاندارد موجود محاسبه گردید.

تعداد گلبول های قرمز (میلیون در میلیمتر مکعب) / ۱۰× هماتوکریت (درصد) =MCV

تعداد گلبول های قرمز (میلیون در میلیمتر مکعب) / هموگلوبین (گرم در دسی لیتر) × ۱۰=MCH

هماتوکریت (درصد) / هموگلوبین (گرم در دسی لیتر) ×۱۰۰=MCHC

آزمون آماری: برای آنالیز اطلاعات تحقیق از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۶ استفاده گردید. ابتدا از آزمون Leven statistic test برای بررسی هموژن بودن انحراف معیار اطلاعات استفاده گردید. پس از اطمینان از هموژنیتی انحراف معیار اطلاعات، اثر متقابل زمان بر گروه ها مورد ارزیابی قرار گرفت (Interaction). و با توجه به عدم تاثیر متقابل این دو فاکتور از آزمون T برای بررسی تفاوت میانگین تیمارهای تغذیه شده با سیلیماین و کنترل در دو گروه ایمن و غیر ایمن استفاده گردید. برای بررسی معنی دار بودن تفاوت میانگین ها از تست تکمیلی Duncan در سطح معنی داری ۰/۰۵ استفاده شد.

نتایج

نتایج فاکتورهای مختلف مورد بررسی در نمودارهای شماره تا ۱ تا ۵ و جدول شماره یک آورده شده است.

در مورد میزان فعالیت لایزوزیم سرم همانطور که در نمودار ۱ مشاهده می شود، در تیمارهای ایمن در روزهای ۲۰، ۳۰ و ۴۰ تجویز سیلیمارین باعث افزایش معنی دار فعالیت لایزوزیم سرم گردیده است ($p<0/05$). در تیمارهای غیر ایمن نیز این افزایش فعالیت فقط در روزهای ۳۰ و ۴۰ اتفاق افتاده است.

نتایج مربوط به بررسی قدرت باکتری کشی سرم در تیمارهای مختلف در نمودار ۲ آورده شده است. در تیمارهای غیر ایمن تجویز سیلیمارین خوراکی افزایش قدرت باکتری کشی در روزهای ۲۰، ۳۰ و ۴۰ نمونه گیری را باعث شده است ($p<0/05$)، ولی در تیمارهای ایمن تجویز سیلیمارین تاثیری در قدرت باکتری کشی سرم در مراحل مختلف نمونه گیری نداشته است ($p<0/05$).

در نمودار ۳ تیتر آنتی بادی ضد آئروموناس هیدروفیلا در سرم ماهی ها در تیمارهای مختلف نشان داده شده است. نمودار مشخص می نماید که علیرغم تفاوت معنی دار تیتر پادتن تیمارهای ایمن با غیر ایمن، تجویز سیلیمارین تفاوتی در تیتر آنتی بادی در تیمارهای ایمن و غیر ایمن ایجاد ننمود ($p<0/05$).

نتایج تلفات بعد از چالش با باکتری زنده آئروموناس هیدروفیلا در نمودار ۵ آورده شده است. همانطور که در نمودار مشخص است، تجویز سیلیمارین تاثیری در میزان مقاومت نسبت به عفونت با این باکتری در تیمارهای ایمن (سه تکرار) نداشته است، ولی در تیمار غیر ایمن کاهش معنی دار تلفات در طول دروه بعد از چالش را باعث شده است.

بحث

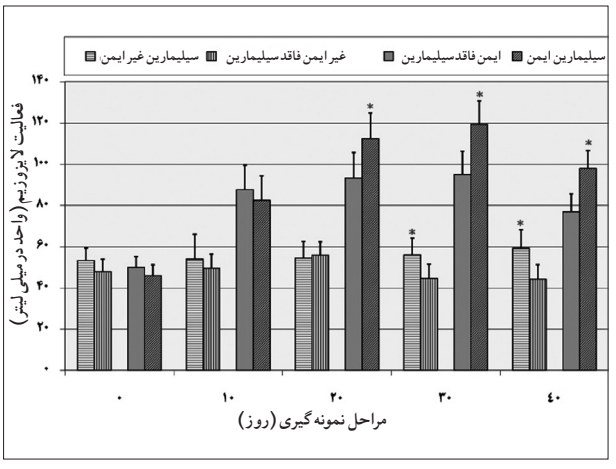
استفاده از محرک های ایمنی با منشاء گیاهی با توجه به مزیت های متعدد در سال های اخیر جایگاه ویژه ای در تحقیقات آبزی پروری یافته است (۱۲،۲۰). و بررسی تحریک ایمنی و افزایش مقاومت ماهی نسبت به بیماری ها بدنبال تجویز فراورده های مختلف گیاهی هدف بسیاری از تحقیقات قرار گرفته است (۲،۱۰،۱۱). گزارشات متعددی از اثرات تحریک سیستم ایمنی حیوانات خونگرم بعد از تجویز عصاره گیاه خارمریم وجود دارد (۵،۴۰). در این تحقیق نیز برخی تجویز عصاره گیاه خارمریم باعث تحریک برخی فاکتورهای ایمنی اختصاصی و غیر اختصاصی ماهی کپور معمولی گردید. بطوری که میزان فعالیت لایزوزیم سرم که به عنوان یک معرف با اهمیت ایمنی غیر اختصاصی در ماهی می باشد (۳۰)، در هر دو تیمار ایمن و غیر ایمن، ۲۰ روز بعد از تجویز خوراکی عصاره خار مریم (سیلیمارین) افزایش معنی داری نسبت به تیمار شاهد نشان داد ($p<0/05$). افزایش فعالیت لایزوزیم بعد از تجویز محرک های ایمنی (۶)، واکسن ها و برخی پروبیوتیک ها در ماهی گزارش گردیده است (۳۶،۴۲). همچنین افزایش فعالیت لایزوزیم سرم در ماهی کاراس (۹)، ماهی Large yellow croaker (۲۱) و ماهی کپور معمولی (۲۰) بعد از تجویز خوراکی عصاره های گیاهی بومی گزارش شده است.

قدرت باکتری کشی سرم در تیمارهای ایمن نسبت به تیمار غیر ایمن نیز افزایش نشان داد ($p<0/05$). با توجه به افزایش میزان آنتی بادی ضد باکتری آئروموناس هیدروفیلا در تیمارهای ایمن، می توان افزایش قدرت ضد باکتریایی در تیمارهای ایمن را به آنتی بادی در سرم این ماهی ها نسبت داد (۱). البته تجویز خوراکی عصاره خار مریم باعث افزایش قدرت ضد باکتریایی فقط در گروه غیر ایمن گردید ($p<0/05$). ولی در تیمار ایمن تفاوتی مشاهده نگردید ($p<0/05$). قدرت ضد باکتریایی سرم بیشتر تحت تاثیر مواد ضد میکروبی سرم، چون لایزوزیم، کمپلمان و دیگر مواد موثر در تخریب باکتری ها است. برخی گزارشات حاکی از تاثیر افزایش قدرت باکتری کشی سرم بعد از تجویز محرک های ایمنی است (۲۶) که نتایج این تحقیق با آنها انطباق دارد، ولی Kajita و همکاران در سال ۱۹۹۰ و Divyagnaneswari و همکاران در سال ۲۰۰۷ به ترتیب در ماهی تیلاپیا و قزل آلا، عدم تاثیر عصاره گیاه *Solanum trilobatum* در قدرت ضد باکتریایی سرم را گزارش نمودند (۱۱،۲۲)، که علت را می توان به ویژگی های عصاره و ماهی مورد بررسی نسبت داد.

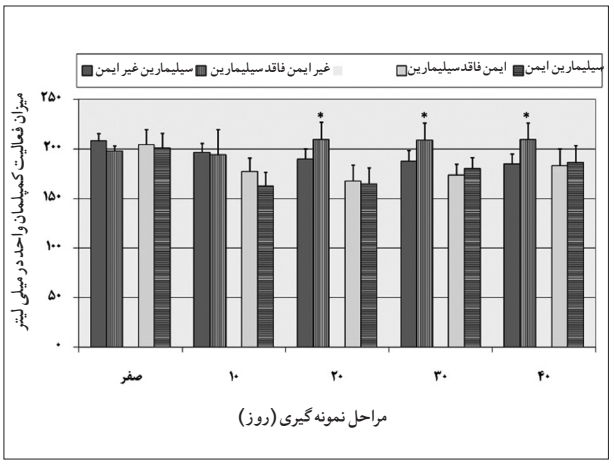
کمپلمان نیز یکی از فاکتورهای ایمنی غیر اختصاصی هستند که تاثیر بسزایی در پاسخ ایمنی ماهی دارد. افزایش فعالیت کمپلمان بدنبال استفاده از محرک های ایمنی غیر اختصاصی به کرات گزارش شده است (۳۶). در این تحقیق تجویز خوراکی عصاره خارمریم تاثیری در میزان

جدول ۱ـ مقایسه فاکتورهای هماتولوژیک و میزان پروتئین تام و IgM اندازه‌گیری شده در تیمارهای مختلف در مراحل نمونه‌گیری (**نشان دهنده تفاوت معنی دار نسبت به گروه شاهد در سطح ۰/۰۱ و *نشان دهنده تفاوت معنی دار نسبت به گروه شاهد در سطح ۰/۰۵ می باشد).

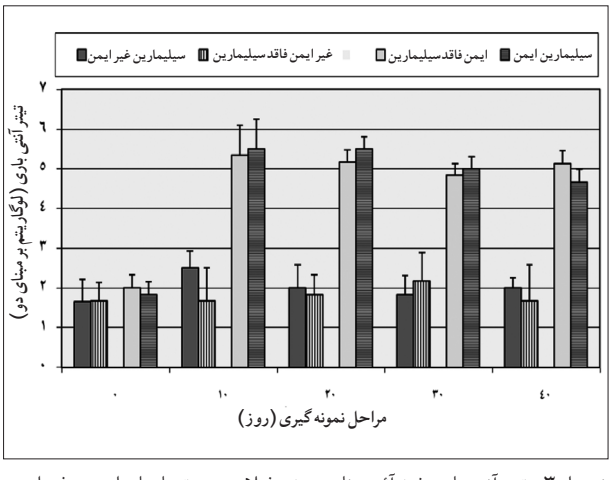
پارامترها	گروه	درمان	روز۰	روز۱۰	روز۲۰	روز۳۰	روز۴۰
PCV(٪)	غیرایمن	سیلیمارین	۲۶/۸۳±۳/۵۴	۲۴/۸۳±۳/۲	۲۷/۳±۳/۴	۳۱/۷±۴/۹	۳۱/۷±۲/۸
		شاهد	۲۶/۸۳±۳/۵۴	۲۵/۵±۴/۸	۲۳/۵±۱/۹	۲۹/۷±۵	۲۷/۸±۶/۸
	ایمن	سیلیمارین	۲۶/۸۳±۳/۵۴	۲۵/۵±۳/۹	۳۲/۵±۶/۶*	۳۴/۸±۴/۴*	۳۲/۱±۲/۵۴
		شاهد	۲۶/۸۳±۳/۵۴	۲۴/۳±۶/۵	۲۶/۷±۳/۱	۲۷/۸±۷/۴	۲۹/۵±۷/۷
Hb(g/dl)	غیرایمن	سیلیمارین	۴/۴۷±۱/۱۶	۴/۹±۱/۳	۷/۱±۱/۹	۷±۱/۳	۷/۱±۱/۵
		شاهد	۴/۴۷±۱/۱۶	۵/۴±۱/۲	۵/۲±۱/۱	۶±۱/۸	۶/۹±۱/۲
	ایمن	سیلیمارین	۴/۴۷±۱/۱۶	۵/۳±۱/۲	۷/۴±۱/۱	۶/۸±۱/۲	۷/۴±۱/۲
		شاهد	۴/۴۷±۱/۱۶	۵/۴±۱/۸	۵/۱±۲/۴	۵/۴±۱/۶	۶/۱±۲/۵
WBC ×1000	غیرایمن	سیلیمارین	۳/۹۷±۱/۸۴	۴/۱۵±۲/۴۲	۳/۲۷±۰/۹۶	۹/۶±۱/۷۷**	۸/۶۲±۱/۱۸**
		شاهد	۳/۹۷±۱/۸۴	۳/۵۳±۱/۱۶	۴/۲۳±۱/۳	۳/۹۷±۱/۲۱	۳/۹±۱/۱۲
	ایمن	سیلیمارین	۳/۹۷±۱/۸۴	۴/۹۸±۲/۱	۶/۹۲±۱/۶۵*	۷/۸±۱/۷۷*	۴/۸۸±۲/۱۸
		شاهد	۳/۹۷±۱/۸۴	۳/۵۲±۱/۲۱	۴/۴۳±۱/۱	۴/۰۱±۱/۲	۳/۹۳±۱/۴۷
$RBC \times 10^6$	غیرایمن	سیلیمارین	۱/۴۲±۱/۱۸	۱/۳۹±۱/۹۹	۱/۵۲±۲/۱	۱/۵۲±۱/۵	۱/۵۷±۲/۰۳
		شاهد	۱/۴۲±۱/۱۸	۱/۴۲±۱/۴	۱/۳۹±۰/۸۸	۱/۳۹±۱/۰۱	۱/۴۱±۱/۶۴
	ایمن	سیلیمارین	۱/۴۲±۱/۱۸	۱/۴۱±۳/۱	۱/۵۷±۱/۵۷	۱/۶۴±۰/۷۹	۱/۶۱±۲/۸۲
		شاهد	۱/۴۲±۱/۱۸	۱/۴۲±۱/۵۸	۱/۴۲±۱/۱۶	۱/۴۱±۱/۴۳	۱/۶۱±۲/۸۲
MCV(F^1)	غیرایمن	سیلیمارین	۱۹۱±۳۴/۱۵	۱۷۸/۱±۳۱/۵	۱۸۳/۸±۳۴/۷	۲۱۹±۲۷/۸	۱۹۵/۳±۱۵/۹
		شاهد	۱۹۱±۳۴/۱۵	۱۸۳/۷±۴۶	۱۶۷±۱۸/۶	۲۰۸±۳۳/۵	۱۹۹/۳±۵۲/۲
	ایمن	سیلیمارین	۱۹۱±۳۴/۱۵	۱۸۹/۱±۵۲/۸	۲۰۶/۸±۱/۱	۱۹۴±۴۱/۸	۲۱۱/۳±۴۶/۲
		شاهد	۱۹۱±۳۴/۱۵	۱۷۴/۷±۴۸	۱۸۸±۳۰/۶	۲۰۳/۷±۵۲/۵	۲۱۳/۳±۸۲/۲
MCH(Pg)	غیرایمن	سیلیمارین	۳۱/۷۸±۹/۱۷	۳۶/۹±۱۳/۴	۴۷/۵±۹/۶	۴۶/۷±۱۰/۴	۴۴/۳±۶/۵۴
		شاهد	۳۱/۷۸±۹/۱۷	۳۹/۱±۷/۷	۳۷/۸±۸/۸	۴۲/۷±۱۲/۴	۴۹/۴±۸/۳
	ایمن	سیلیمارین	۳۱/۷۸±۹/۱۷	۳۷/۹±۸/۱	۴۷/۵±۷/۶	۴۱/۷±۶/۴	۴۶/۸±۷/۵۴
		شاهد	۳۱/۷۸±۹/۱۷	۳۹/۸±۱۵/۵	۳۵/۵±۱۵/۶	۳۹/۱±۱۵/۴	۴۲/۴±۱۶/۳
MCHC(%)	غیرایمن	سیلیمارین	۱۷/۲۰±۶/۱۵	۲۰/۵±۶/۱	۲۶/۱±۷/۶	۲۱/۳±۴/۴	۲۲/۷±۴/۳
		شاهد	۱۷/۲۰±۶/۱۵	۲۲/۱±۶/۶	۲۲/۶±۳/۴	۲۰/۸±۵/۵۴	۲۶/۲±۸/۴
	ایمن	سیلیمارین	۱۷/۲۰±۶/۱۵	۲۱/۲±۶/۵	۲۳/۳±۴/۶	۲۲/۵±۴/۴	۲۲/۷±۴/۳
		شاهد	۱۷/۲۰±۶/۱۵	۲۶/۳±۱۸/۶	۱۹/۱±۸/۴	۲۰/۳±۱۱/۵۴	۲۲/۷±۱۳/۴
Total protein(g/dl)	غیرایمن	سیلیمارین	۳/۴۶±۰/۷	۴/۱±۰/۵	۴/۲۶±۰/۸*	۴/۱۸±۰/۶**	۴/۰۶±۰/۶۵*
		شاهد	۳/۶۸±۰/۶	۴/۴۶±۰/۵	۴/۴۶±۰/۵	۳/۳۲±۰/۵	۳/۳±۰/۳۳
	ایمن	سیلیمارین	۳/۹۶±۰/۸	۴/۸۶±۰/۵	۵/۰۲±۰/۷*	۴/۴۶±۰/۸	۴/۴۵±۰/۴۲*
		شاهد	۳/۸±۰/۵	۴/۳۶±۰/۳	۴/۲۸±۰/۳	۴/۲۸±۰/۳	۳/۹±۰/۵
IgM(g/dl)	غیرایمن	سیلیمارین	۱/۰۲±۰/۴	۱/۳۱±۰/۲۶	۱/۲۸±۰/۳۳	۱/۴۲±۰/۳۲*	۱/۲۶±۰/۴۲*
		شاهد	۱/۰۷±۰/۳۴	۰/۹۷±۰/۳۳	۱/۰۶±۰/۳۵	۰/۹۱±۰/۳	۰/۸۹±۰/۲۱
	ایمن	سیلیمارین	۱/۲۶±۰/۴۲	۱/۷±۰/۲۳	۱/۷۵±۰/۳۹*	۱/۴۹±۰/۴۳	۱/۴۱±۰/۳۴
		شاهد	۱/۱۵±۰/۲۳	۱/۴۳±۰/۲۷	۱/۲۲±۰/۱	۱/۲۲±۰/۳	۱/۲۶±۰/۲۱



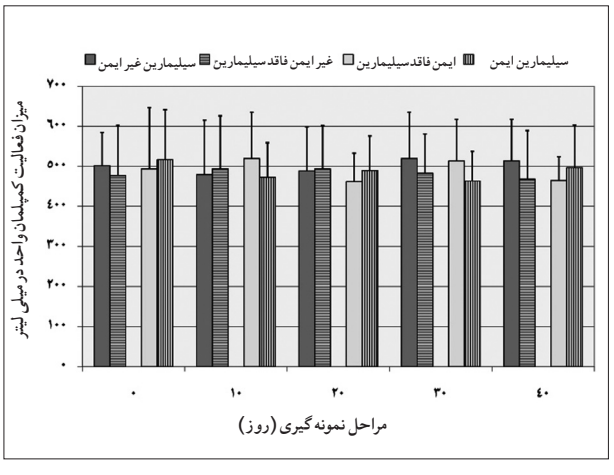
نمودار ۱ـ میزان فعالیت لایزوزیم سرم در تیمارهای ایمن و غیر ایمن در مراحل مختلف نمونه‌گیری (× نشان دهنده‌ی تفاوت معنی دار در سطح ۰/۰۵ با تیمار کنترل می باشد).



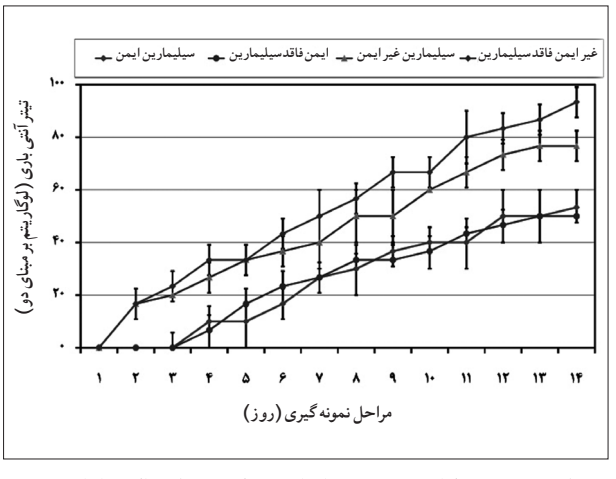
نمودار ۲ـ میزان فعالیت باکتری کشی سرم در تیمارهای ایمن و غیر ایمن در مراحل مختلف نمونه‌گیری (× نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ با تیمار کنترل می‌باشد).



نمودار ۳ـ تیتر آنتی بادی ضد آئروموناس هیدروفیلا در سرم تیمارهای ایمن و غیر ایمن در مراحل مختلف نمونه‌گیری (× نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ با تیمار کنترل می‌باشد).



نمودار ۴ـ میزان فعالیت کمپلمان سرم در تیمارهای ایمن و غیر ایمن در مراحل مختلف نمونه‌گیری (× نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ با تیمار کنترل می‌باشد).



نمودار ۵- درصد تلفات تجمعی تیمارهای مختلف بعد از چالش با باکتری زنده آئروموناس هیدروفیلا.

فعالیت کمپلمان ماهی کپور نداشت، و حتی این فاکتور تفاوتی در بین تیمارهای ایمن و غیر ایمن نیز نشان نداد. که با توجه به تحریک فاکتورهای ایمنی غیر اختصاصی دیگر، می‌توان احتمال مشکلات تکنیکی در انجام آزمایش اندازه گیری فعالیت کمپلمان را یکی از علل این اختلاف دانست، چرا که فعالیت کمپلمان به فاکتورهای محیطی مثل گرما حساس بوده و بخشی از فعالیت کمپلمان در طی تهیه نمونه و فریز و دفراست نمودن از بین رفته است. البته گزارشات مشابهی از تاثیر عصاره‌ها بر فاکتورهای ایمنی غیر اختصاصی و عدم تاثیر آنها بر میزان فعالیت کمپلمان نیز وجود دارد(۷،۳۳).

افزایش سطح پروتئین‌ها، بویژه گلوبولین سرم شاخص مناسبی برای بررسی وضعیت دفاع ایمنی ماهی می‌باشند (۳۵). در این تحقیق نیز میزان پروتئین تام و میزان IgM سرم در روز ۲۰، ۳۰ و ۴۰ افزایش معنی‌داری در تیمار غیر ایمن نسبت به تیمار شاهد نشان داد، ولی در تیمار ایمن فقط در روز ۲۰ افزایش معنی‌دار این دو فاکتور مشاهده گردید. گزارشاتی از

افزایش گلوبولین سرم بدنبال استفاده از محرک‌های ایمنی گیاهی وجود دارد (۳۸). البته برخی از گزاشات نیز علیرغم گزارش برخی ویژگی‌های تحریک ایمنی در برخی فرآورده‌های گیاهی، عدم تاثیر این عصاره‌ها بر میزان پروتئین تام و گلوبولین سرم را گزارش نموده‌اند (۱۹،۲۶).

یکی از ویژگی‌های اصلی محرک‌های ایمنی، افزایش بقای ماهی‌های واکسینه پس از چالش با آنتی ژن اختصاصی مورد استفاده است (۸،۱۶). البته در این تحقیق هر چند تجویز عصاره خارمریم در تیمار غیر ایمن افزایش بقاء نسبت به تیمار شاهد را باعث شد، ولی تجویز این عصاره اثری درکارایی واکسن آئرومونا‌س هیدرو فیلا و بقای ماهیان واکسینه شده بعد از چالش با باکتری زنده نداشت($p<0/05$). Kim و همکاران در سال ۱۹۹۹ با تجویز آلوئه ورا به ماهی Rockfish افزایش مقاومت در برابر عفونت با باکتری ویبریو آنگوایلاروم را گزارش نمودند. همچنین Alishahi و همکاران در سال ۲۰۰۹ نتایج مشابهی از تجویز آلوئه ورا در ماهی کپور گزارش کردند(۵)، که با نتایج تحقیق جاری در مورد تیمار غیرواکسینه تطابق دارد. نتایج مشابهی از کاربرد، گیاه رزمارینوس آفیسینالیس *Rosmarinus officinalis* (۲)، عصاره آبی گیاه اکلیپتا آلبا *Eclipta alba*(۱۰)، عصاره الکلی گیاه سولانوم تریبوباتوم *Solanum trilobatum* (۱۱) و نیز عصاره اکیناسه در ماهی آمور وجود دارد(۳) نیز در منابع مشاهده گردید که نسبتاً با یافته‌های این تحقیق انطباق دارد. البته عدم تاثیر این عصاره در کاهش تلفات تیمار ایمن بعد از چالش باکتریایی، با نتایج برخی تحقیقات روی عصاره‌های گیاهی همخوانی ندارد(۴۱). تفاوت ماهیت عصاره و نوع ماهی می تواند دلیل این عدم انطباق باشد.

تجویز خوراکی عصاره گل مریم در هر دو گروه ایمن و غیر ایمن، افزایش تعداد گلبول‌های سفید خونی در روز ۲۰، ۳۰ و ۴۰ نمونه گیری را نسبت به تیمار شاهد باعث شد($p<0/05$). در بین سایر فاکتورهای هماتولوژیک مورد بررسی فقط حجم فشرده گلبولی (PCV) در تیمار ایمن تغذیه شده با سیلیمارین و در روزهای ۲۰ و ۳۰ تحقیق، افزایش معنی‌داری نسبت به بقیه تیمارها نشان داد($p<0/05$). در صورتیکه بقیه فاکتورها(Hb، RBC، MCV، MCH و MCHC) با وجود تفاوت ظاهری نسبتاً زیاد، فاقد تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد در مراحل مختلف نمونه گیری بودند($p<0/05$). Selvaraj و همکاران در سال ۲۰۰۵ نیز درماهی کپور معمولی بعد از تجویز گلوکان و LPS باکتری، افزایش تعداد گلبول‌های سفید خونی را نسبت به تیمار شاهد گزارش نمودند(۳۳). همچنین Harikrishnan و همکاران در سال ۲۰۰۳ نیز افزودن مکمل‌های گیاهی به خوراک ماهی طلایی را باعث تغییر تعداد گلبول‌های سفید خونی دانستند(۱۸). البته گزارشاتی از عدم تاثیر محرک‌های ایمنی با منشاء گیاهی در ماهی کپور (۳۹) و تاس ماهی (۳۷) نیز وجود دارد. در مورد اندیس‌های گلبولی و سایر فاکتورهای هماتولوژیک مورد بررسی در این تحقیق نیز تحقیقات مشابه، نتایج متفاوت و گاهاً متناقضی داشته‌اند، بطوریکه (۱۳) تغییر این فاکتورها و (۱۷،۱۸) نیز عدم تغییر این فاکتورها را گزارش نموده‌اند. به عنوان نتیجه کلی این تحقیق می توان گفت که عصاره گیاه خارمریم با وجود عدم تاثیر روی ایمنی اختصاصی (تیتر آنتی بادی ضد آئرومونا‌س هیدروفیلا)، روی برخی از فاکتورهای ایمنی غیر اختصاصی موثر بوده است و افزایش مقاومت در برابر عفونت آئرومونا‌سی را نیز باعث شده است. لذا می توان از عصاره این گیاه به عنوان یکی از گزینه‌های محرک‌های ایمنی با منشاء گیاهی در ماهی کپور معمولی نام برد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز و از محل پژوهانه نگارندگان مقاله انجام شده است.

References

1. Aakre, R.,Wergeland, H.I., Aasjord, P.M., Endersen, C. (1994). Enhanced antibody response in Atlantic salmon (L.) to *Aeromonas salmonicida*. Fish Shellfish Immunol. 4: 47-61.
2. Abutbul, S., Golan-Goldhirsh. A., Barazani. O., Zilberg. D. (2004). Use of Rosmarinus officinalis as a treatment against *Streptococcus iniae* in tilapia. Aquaculture. 238: 97-105.
3. Alishahi, M., Ghorbanpour. M., Najafzadeh. H., Pashmforoush. M (2010). Antibacterial effects of some medicinal plant extracts on *Aeromonas hydrophila*, Yersinia rockery and *Streptococus iniae*. Iran. Vet. J. 6:21-30.
4. Alishahi M, and Buchmann K. (2006). Temperature-dependent protection against Ichthyophthirius multifiliis following immunization of rainbow trout using live theronts. Dis. Aquat. Org. 72: 269-273.
5. 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*).J.Vet.Res. 4: 85-91.
6. Alvarez-pellitero p., Stija - Bobadilla, A., Bermuolez. R. and Quiroga, M.I. (2006). Levamisole activates several innate immune factors in *Scophthalmus moximus* (1) (Teleostei). J. Immunopathol. Pharmacol. 19: 727-738.

7. Baulny, M.O.D., Quentel. C., Fournier. V., Lamour. F., Gouvello. R. L. (1996). Effect of long-term oral administration of b glucan as an immunostimulant or an adjuvant on some non-speciffc parameters of the immune response of turbot *Scophthalmus maximus*. Dis. Aquat. Org. 26: 139-147.
8. Brunt, J., Newaj-Fizul, A., Austin, B. (2007). The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish Dis. 30: 573-579.
9. Chen, X., Wu. Z., Yin, J., Li, L. (2003). Effects of four species of herbs on immune function of *Carassius auratus* gibelio. J. Fish. Sci. China. 10: 36-40.
10. Christybapita, D. M., Divyagnaneswari. A., Dinakaran. R. (2007). Oral administration of *Eclipta alba* leaf aqueous extract enhances the non-specific immune responses and disease resistance of *Oreochromis mossambicus*. Fish Shellfish Immunol. 23 : 840-852.
11. Divyagnaneswari, M. D., Christybapita. A., Dinakaran. R (2007). Enhancement of nonspecific immunity and disease resistance in *Oreochromis mossambicus* by *Solanum trilobatum* leaf fractions. Fish Shellfish Immunol. 23 : 249-259.
12. Dügenci, S. K., Arda, N., Candan. A. (2003). Some medicinal plants as immunostimulant for fish. J. Ethnopharmacol. 88: 99-106.
13. Ekanem, J.T.,Yusuf,o.k. (2008). Some biochemical and haematological effects of black seed (*Nigella sativa*) oil on Trypanosoma brucei-infected rats. Afr. J. Biotechnol. 4,3: 153-157
14. Feldman, B. F., Zinkl, J.G., Jain, N.C. (2000). Schalm's Veterinary Hematology. (5th ed.) Lippincott Williams & Wilkins,Maryland. USA.
15. Fraschini, F., Demartini. G., Esposti. D. (2002). Pharmacology of silymarin, Clin Drug Investig. 22: 51-65.
16. Gudmundsdóttir, B.K., Magnadóttir, B. (1997). Protection of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against an experimental infection of Aeromonas salmonicida sub sp. achromogenes. Fish Shellfish Immunol. 7: 55-69.
17. Harikrishnan, R., Balasundaram. C., Heo. M. S. (2009). Herbal supplementation diets effects on hematology and innate immunity in goldfish. Fish Shellfish Immunol. 28: 211-225.
18. Harikrishnan, R., Nisha. M. R., Balasundaram. C. (2003).Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. Aquaculture. 221: 41-50.
19. Ispir, U., Mustafa D. M. (2005). A Study on the Effects of Levamisole on the Immune System of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Turk. J. Vet. Anim. Sci. 29: 1169-1176.
20. Jain, J., Wu. Z. (2004). Influences of traditional Chinese medicine on non-specific immunity of Jian Carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). Fish Shellfish Immunol. 16 : 185-191.
21. Jain, J., 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.
22. Kajita Y, Sakai. M., Atsuta. S., Kobayash. M (1990). The immunonodulatory effects of levamisole on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Fish Pathol. 25:93-98.
23. Kidd, P., Head, K. (2005). A review of the bioavailability and clinical efficacy of milk thistle phytosome: a silybin phosphatidylcholine complex (Siliphos). Altern. Med. Rev. 10: 193-203.
24. Logambal, S. M., Venkatalakshmi. S., Michael. R. D. (2000). Immunostimulatory effect of leaf extract of *Ocimum sanctum* Linn. In *Oreochromis mossambicus* (Peters). Hydrobiologia. 430:113-20.
25. Loguercio, C., Federico, A., Trappoliere, M., Tuccillo, C., de Sio, I., Di Leva, A., Niosi, M.,(2007). The effect of a silybin vitamin E-phospholipid complex on nonalcoholic fatty liver disease: a pilot study. Dig. Dis. Sci. 52: 2387-2395.
26. Misra, C. K., Mukherjee. D., Meher. P. K. (2006). The immunomodulatory effects of tuftsin on the non-specific immune system of Indian Major carp, *Labeo rohita*. Fish Shellfish Immunol. 20: 728-738.
27. Pepping, J. (1999). Milk thistle: *Silybum marianum*,

Am. J. Health Syst. Pharm. 56: 1195-1195.

28. Raa, J. (1996). The use of immuno-stimulatory substances in fish and shellfish farming. Rev. Fish. Sci. 4: 229-288.
29. Røed, K. H., Fjalestad. K. T., Strømsheim. A. (1993). Genetic variation in lysozyme activity and spontaneous haemolytic activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture. 114: 19- 31.
30. Sakai, M. (1999). Current research status of fish immunostimulants. Aquaculture. 172: 63-92.
31. Scho?nfeld, V. J., Weisbrod, B., Muller, M.K. (1997). Silibinin, a plant extract with antioxidant and membrane stabilizing properties, protects exocrine pancreas from cyclosporin A toxicity. Cell. Mol. Life Sci. 53: 917-920.
32. Schu?mann, J., Prockl. J., Kiemer. A. K., Vollmar, A.M., Bang. R., Tiegs, G. (2003). Silibinin protects mice from T cell-dependent liver injury. J. Hepatol. 39: 333-340.
33. Selvaraj, V., Sampath. K., Sekar. V. (2005). Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. Fish Shellfish Immunol. 19: 293-306.
34. Singh, R. P., Agarwal, R. (2005). Prostate cancer prevention by silibinin. Curr. Cancer Drug Targets. 4: 1-11.
35. Siwicki, A. K., Anderson. D. P., Rumsey. G. L. (1994). Dietary intake of Immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. Vet. Immunol. Immunopathol. 41: 125-139.
36. Swain, P. S., Dash. P. K., Sahoo. P., Routray. S. K., Sahoo. S. D., Gupta. P.K., Meher. N.(2006). Non-specific immune parameters of brood Indian major carp *Labeo rohita* and their seasonal variations. Fish Shellfish Immunol. 22: 38-43.
37. Tatina, M., Bahmani. M., Soltani. M., Abtahi. B., Gharibkhani. M. (2010). Effects of different levels of dietary Vitamins C and E on some of hematological and biochemical parameters of sterlet (*Acipenser ruthenus*) J. Fish. Aquat. Sci. 5:1-11.
38. Vasudeva Rao, Y., Romesh. M., 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.
39. Watanuki. H, Ota. K Malina. A. C., Tassakka. A.R. Kato. T. (2006). Immunostimulant effects of dietary Spirulina platensis on carp, *Cyprinus carpio*. Aquaculture. 258: 157-163
40. Wilasrusmeebcef, C., Kitturac. S., Shahb. G., Siddiquib. J, Bruchbe. D., Kittur. D. S. (2002). Immunostimulatory effect of *Silybum Marianum* (milk thistle) extract. Med. Sci. Monit. 8: BR439-443.
41. Yin, G., Ardo. L., Thompson. K.D., Adams. A., Jeney. Z., Jeney. G. (2009). Chinese herba (*Astragalus radix* and *Ganoderma lucidum*) enhance immune response of carp, *Cyprinus carpio*, and protection against *Aeromonas hydrophila*. Fish Shellfish Immunol. 26: 140-145.
42. Yuan, C. D., Li. W., Chen. F., Sun. G., Wu. Y., Gon. J., Tang. M., Han. X. (2007). Administration of a herbal immunoregulation mixture enhances some immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*). *Springer Science+Business Media*. Fish. Physiol. Biochem. 33: 93-101.
43. Zapata, A. Diez. B., Cejalov. T., Gutierrez-defrias, C., Cortes, A. (2006). Ontogeny of immune system of fish, Fish Shellfish Immunol. 20:126-136.

EFFECTS OF DIETARY *SILYBUM MARIANUM* EXTRACT ON IMMUNE PARAMETERS OF THE COMMON CARP (*CYPRINUS CARPIO*)

Alishahi. M.[1*], Soltani, M.[2], Mesbah, M.[1], Esmaeilli Rad, A.[1]

[1]*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz-Iran.*

[2]*Department of Aquatic Animal's Health and Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran*

(Received 12 January 2011 , Accepted 8 June 2011)

Abstract:

In this study the effects of *Silybum. marianum* extract on some immune responses and hematological parameters of the common carp (*Cyprinus carpio*) were investigated. A total of 280 fish weighing 65.12 ± 8.22 g were randomly divided into four equal groups. Group1 was immunized with *Aeromonas hydrophila* bacteria and fed with a diet containing 0.5% *S. marianum* extract. Group 2 was non-immunized and fed with a diet containing 0.5% *S. marianum*. Group 3 was immunized with *A. hydrophila* and was fed with a *S. marianum*-free diet. Group 4was neither immunized nor fed with *S. marianum*. Blood samples were taken every 10 days for 40 days. Sera samples were analysed for lysozyme activity, serum bactericidal activity, alternative complement activity, total protein, IgM concentration and anti-*A. hydrophila* antibodies. Blood samples were also used for hematological parameters, PCV, Hb, WBC, RBC, MCV, MCH, and MCHC. 30 fish in triplicates were challenged with *A. hydrophila*. The results showed that the values for WBC, PCV, total protein, IgM levels, and lysozyme activity were significantly increased in the serum of *S. marianum*-treated fish ($p<0.05$). No significant differences were recorded in anti-*A. hydrophila* antibody levels, complement activity, or other hematological parameters in *S. marianum*-treated fish compared to controls ($p>0.05$). The RPS and serum bactericidal activity was only increased in the non-immunized, *S. marianum*-fed group when compared to non-immunized, *S. marianum*-free group. This study indicates that oral administration of *S. marianum* enhances some non-specific immune responses in *C. carpio,* and therefore it can be recommended as an herbal immunostimulant in fish.

Key words: *Silybum marianum, cyprinus carpio,* immune response, *Aeromonas hydrophila.*

***Corresponding author's email: alishahim@scu. ac. ir, Tel: 0611-3330067, Fax: 0611-3360807**