مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۴، دوره ۷۰، شماره ۴، ۴۵۴- ۴۴۷
Original Article
Journal of Veterinary Research. 70,4: 447-454, 2015

اثر عصاره آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss) و پونه (*Mentha pulegium* L) بر تغییرات فاگوسیتوز، لیزوزیم، انفجار تنفسی و گلبول‌های خون در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

پریا اکبری[1*] محبوبه قرقانی پور[2] محمد سعید فریدونی[3]
۱) دانشکده علوم دریایی، گروه شیلات، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار- ایران
۲) دانشکده زیست شناسی، دانشگاه پیام نور اصفهان، اصفهان- ایران
۳) واحد بهداشت و بیماریهای آبزیان، دانشکده دامپزشکی شیراز، دانشگاه شیراز، شیراز- ایران

(دریافت مقاله: ۲۸ مرداد ماه ۱۳۹۴، پذیرش نهایی: ۲۰ مهر ماه ۱۳۹۴)

چکیده

زمینه مطالعه: بهبود کارایی سیستم ایمنی ماهی یکی از روش‌های پیشگیری از بیماریها و تحریک رشد می‌باشد. **هدف:** هدف از این تحقیق، بررسی اثر تجویز خوراکی عصاره آویشن شیرازی (Boiss *Zataria multiflora*) و پونه (*Mentha pulegium* L.) بر تغییرات لیزوزیم، فاگوسیتوز، انفجار تنفسی و گلبول‌های سفید و قرمز خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با میانگین وزنی ۱۰۰±۱۰g بود. **روش کار:** ۲۱۰ قطعه ماهی در قالب یک طرح تصادفی شامل ۷ تیمار و ۳ تکرار برای هر تیمار به‌مدت ۱۴ روز متوالی مورد تغذیه قرار گرفتند. تیمارها شامل یک جیره پایه آزمایش (گروه شاهد) و سطوح ۲۰،۵۰mg/kg و ۱۰۰ برای عصاره‌های آویشن شیرازی و پونه بود. شمارش گلبول‌های سفید /قرمز خون (به روش لام نئوبار)، فعالیت لیزوزیم سرم (به روش کدورت سنجی)، فعالیت فاگوسیتوز (به روش فاگوسیتوز سلول مخمر) و انفجار تنفسی (به روش احیاء نیتروبلو تترازولیوم) بافت رأس کلیه ماهی‌ها پس از پایان روز ۱۴ مورد سنجش قرار گرفت. **نتایج:** نتایج حاصل از این تحقیق، نشان داد که بیشترین میزان فعالیت فاگوسیتوزی و انفجار تنفسی در گروه تغذیه شده با غلظت ۵۰mg/kg عصاره آویشن شیرازی مشاهده شد و نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری داشته است ($p<0/05$). بیشترین تعداد گلبول سفید و میزان فعالیت لیزوزیم در گروه تغذیه شده با غلظت ۱۰۰mg/kg آویشن شیرازی مشاهده شد ($p<0/05$). ولی گلبول‌های قزمز در بین گروه شاهد و گروه‌های تیمار تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ($p>0/05$). همچنین بیشترین میزان فعالیت فاگوسیتوزی در گروه تغذیه شده با غلظت ۱۰۰mg/kg عصاره پونه مشاهده شد ($p<0/05$). ولی میزان فعالیت لیزوزیم، تعداد گلبول‌های قرمز و سفید خون و میزان انفجار تنفسی در بین گروه شاهد و گروه‌های تیمار تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند ($p>0/005$). **نتیجه‌گیری نهایی:** براساس نتایج حاضر، غلظت ۵۰mg/ kg و ۱۰۰ عصاره آویشن شیرازی و غلظت ۱۰۰mg/kg عصاره پونه تأثیر مثبتی بر تحریک سیستم ایمنی ذاتی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان دارد. اما اثر عصاره آویشن شیرازی) با غلظت ۱۰۰mg/kg بهتر ازعصاره پونه است.

واژه‌های کلیدی: سیستم ایمنی، پونه، قزل‌آلای رنگین‌کمان، فعالیت فاگوسیتوز، آویشن شیرازی

مقدمه

نقش مهم سیستم ایمنی در حفظ سلامت آبزیان و تضمین بقاء و رشد مناسب آنها در طول دوره پرورش، سبب شده تا محققین به استفاده از انواع ترکیبات شیمیایی و طبیعی محرک و تقویت کننده سیستم ایمنی تمایل نشان دهند (۱). ماهی‌ها مانند سایر مهره داران رده‌های پایین تر خود برای مبارزه با عوامل بیماریزا عمدتا به سیستم ایمنی غیر اختصاصی متکی هستند. لذا محرک‌های ایمنی در ماهی‌های پرورشی جهت افزایش فعالیت مکانیسم‌های دفاع غیر اختصاصی و ایجاد مقاومت در مقابل بیماریها، مورد استفاده قرار می‌گیرند و به‌عنوان یک جایگزین مناسب برای آنتی بیوتیک‌ها معرفی شده‌اند. افزایش باکتری‌های مقاوم نسبت به آنتی بیوتیک‌ها و عوارض جانبی این داروها بر بدن ماهی از جدی ترین تهدیدهای استفاده از آنتی بیوتیک‌ها می‌باشد (۲،۱۱). در بین محرک‌های ایمنی، عصاره‌های گیاهی بعلت در دسترس بودن، قیمت پایین، عدم ایجاد مقاومت در برابر عوامل بیماریزا و آسیب کمتر به ماهی و محیط زیست مورد توجه قرار گرفته اند (۷،۱۲،۱۵).

آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) از خانواده نعناعیان (Lamiacea)، یکی از شناخته شده ترین گیاهان دارویی در طب سنتی ایران و اروپا می‌باشد. قسمت‌های درمانی گیاه، سرشاخه‌ها و برگ‌های خشک شده آن می‌باشد (۲) از خواص دارویی آن در دامپزشکی می‌توان به اثرات ضد باکتریایی، ضد قارچی آن اشاره نمود (۲،۲۶). پونه (*Mentha pulegium*) از خانواده نعناعیان (Lamiacea)، حاوی اسانس روغنی فرار یا روغن منتول (به‌عنوان ترکیبات اصلی)، تانن، مواد رزینی، قندی و ویتامین می‌باشد. عصاره برگ‌ها و گل‌های پونه و همچنین ساقه‌های آن با توجه به خواص ضد میکروبی می‌توانند جایگزین مناسبی برای بسیاری از آنتی بیوتیک‌ها باشند (۲).

همراه با توسعه صنعت پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و افزایش تراکم ماهی در واحد سطح

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۵۴-۵۴۱۲۲۳۴۰ نمابر: ۰۵۴-۵۴۱۲۲۳۴۰ Email: paria.akbary@gmail.com

شیوع بیماریهای عفونی در این مزارع گسترش یافته است لذا تلاش برای افزایش مقاومت در برابر بیماریها، از مهمترین اهداف تحقیقات مرتبط با این گونه در دنیاست (۱۶).

تحقیقات زیادی که در زمینه اثرات مثبت آویشن شیرازی و پونه، در کنترل بیماریهای میکروبی و تقویت سیستم ایمنی انسان و جانوران آزمایشگاهی شده است (۵،۲۰،۲۱،۲۵)، اثرات چندین گیاه دارویی از جمله داروا‌ش (*Viscum album*)، گزنه (*Zataria multiflora*) و زنجبیل (*Granium pelagonium*) بر سیستم ایمنی قزل‌آلای رنگین‌کمان (۱۰) و کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*)(۲) صورت گرفته است به استثنای مطالعه ای که در زمینه اثر آویشن شیرازی بر تحریک ایمنی ماهی کپور معمولی (۲۴) صورت گرفته است تاکنون مطالعه‌ای در زمینه اثر آویشن شیرازی و پونه بر سیستم ایمنی ماهیان صورت نگرفته است. همچنین مکانیسم عمل عصاره پونه به‌عنوان محرک ایمنی بخوبی تشریح نشده و تاکنون هیچ تحقیقی در زمینه تأثیر عصاره پونه بر سیستم ایمنی ماهی‌ها صورت نگرفته است. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر عصاره پونه و آویشن شیرازی بر فعالیت لیزوزیم، فاگوسیتوز، انفجار تنفسی و تعداد گلبول‌های سفید و قرمز خون در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌عنوان یکی از گونه‌های مهم پرورشی می‌باشد.

مواد و روش کار

گیاه آویشن شیرازی از اطراف شهر شیراز، گیاه پونه از اطراف شهرستان سمیرم جمع‌آوری و در مرکز هرباریوم دانشگاه شیراز هویت آن مورد تأیید قرار گرفتند (۱۵) سپس سر شاخه‌های آنها در فضای آزاد خشک و توسط دستگاه آسیاب کاملاً به حالت پودر تبدیل شدند. ۵۰ g از پودر حاصل با ۴۰۰ cc الکل متانول ۹۶٪ مخلوط و با دستگاه همزن کاملاً بهم زده شد. وبا دستگاه سوکسله عصاره‌گیری انجام شد و عصاره‌ها در دمای ۴°C تا زمان مصرف نگهداری شد(۱۱).

این بررسی در زمستان ۱۳۹۱، در دانشکده دامپزشکی شیراز انجام شد. ۲۱۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین ورنی ۱۰g±۱۰۰ از مزرعه پرورش شش پیر سپیدان شیراز خریداری و قبل از شروع آزمایش، ۷ روز با شرایط محیط سازگارشدند.

به‌منظور اجرای این تحقیق، ۲۱ عدد وان فایبرگلاس ۱۰۰ لیتری که با آب لوله کشی شهری که قبلا در مخزن ۱۰۰۰ لیتری کلرزدایی شده پر شدند. طی دوره آزمایش، میانگین دمای آب ۰/۵°C±۱۵/۸، اکسیژن محلول ۰/۱mg/l ± ۵/۵ و pH ۰/۱۸± ۷/۸ برآورد شد. پس از پایان دوره سازش پذیری، ماهی‌ها بصورت تصادفی شمارش شده و با تراکم ۱۰ قطعه به ازای هر وان به وان‌ها اضافه شدند. در این طرح تیمارها شامل یک جیره پایه آزمایش (گروه شاهد) و سطوح ۲۰،۵۰ mg/kg و ۱۰۰ برای عصاره‌های آویشن شیرازی و پونه بود.

ماهی‌ها با تیمارهای فوق بمدت ۱۴ روز به میزان ٪۵ وزن بدن خود ۳ بار در روز تغذیه شدند. در پایان دوره آزمایش، از هر تکرار ۳ قطعه ماهی انتخاب و نمونه‌های خون توسط سرنگ‌های ۵ mL از ساقه دمی آنها گرفته شد. بخشی از خون گرفته شده (به منظور شمارش گلبول‌های قرمز و سفید خون) وارد میکروتیوپ‌های حاوی ۵۰µL هپارین (ماده ضد انعقادخون) گردید و بخشی از آن نیز وارد میکروتیوپ‌های فاقد هپارین (به منظور جداسازی سرم خون) گردید. سرم خون با کمک دستگاه سانتریفوژ با دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۵ min جداسازی و در دمای ۲۰°C- نگهداری شد.

پس از خونگیری، بافت کلیه ماهی‌ها تحت شرایط استریل از بدن ماهی جدا شده و در داخل لوله‌های محتوی ۴۰۰ µL محیط ۱۵-L (Merck, Germany) و ۵۰۰µL سرم گوساله ٪۲ (Razi Institute, Iran) به همراه ۱۰ µL/mL هپارین که حجم نهایی به ۱ mL رسیده وارد شدند و سپس به مدت ۳۰ min در کنار یخ نگهداری شدند. سپس از یک مش نایلونی با سوراخ‌هایی به قطر ۱۰۰ µm استریل شده عبور داده شد. محتویات عبور کرده از مش را به داخل میکروتیوب‌های حاوی ۱mL از محلول ۱۵-L و سرم گوساله ٪۲ همراه با جنتامایسین وارد نموده و محلول پرکل ۳۴ تا ۵۱ (v/v) درصد رقیق شده با محلول نمک (HBSS, sigma) Hank Balanced-salted solution به آن اضافه کرده و میکروتیوپ‌ها در دور ۴۰۰ به مدت۲۵ min در دمای ۴°C سانتریفوژشدند. سپس توسط یک میکروپیپت لایه سلولی واقع شده در حدفاصل بین رسوب پایینی و مایعات فوقانی را جمع‌آوری کرده و آنرا مجدداً به داخل محیطی متشکل از ۱۵ -L و سرم گوساله و جنتامایسین وارد نموده و به آن ۱۰۰µL محلول HBSS اضافه کرده و آنرا جهت شستشو مجدداً به مدت ۱۰min در دمای ۴°C در دور ۴۰۰ سانتریفوژ کرده سپس مایع رویی را خالی کرده و برای بار دیگر طبق روش قبلی شستشو می‌دهیم. برای مشاهده و شمارش ماکروفاژها تعداد ۵۰µL از سوسپانسیون سلولی به دست آمده را برداشته و به آن ۱۰µL از محلول رنگی ٪۰/۲ تریپان بلواضافه کرده. وبطور کامل مخلوط نموده و آن را جهت شمارش تعداد ماکروفاژهای موجود در سوسپانسیون در زیر یک لامل بر روی لام هموسیتومتر قرار داده و توسط عدسی۴۰× میکروسکوپ تعداد ماکروفاژها شمارش شدند(۱۳).

جهت شمارش گلبول‌های قرمز و سفید خون، ۰/۰۲ mL خون به ۴mL محلول رقیق کننده نات- هریک (Natt- Herrik) اضافه شد. سپس یک قطره از خون حاوی محلول رقیق کننده روی لام نئوبار قرار داده شد، و شمارش گلبول‌های سفید و قرمز توسط میکروسکوپ نوری صورت گرفت (۶).

سنجش فعالیت لیزوزیم براساس روش Demers و Boyne (۹) بر پایه تجزیه باکتری‌های گرم مثبت حساس به لیزوزیم (میکرو کوکوس لیزودکتیکوس (*Micrococcus lysodeikticus*) (Sigma) با تغییر جزیی صورت گرفت. به‌منظور عمل رقیق سازی لیزوزیم، از سفیده تخم

مرغ (Sigma) رقت‌های ۰µL تا ۲۰ در بافر سیترات- فسفات ۰/۱ مولار با pH ۵/۸ برای استانداردسازی استفاده شد. سپس ۲۵µL از نمونه سرم رقیق نشده را به هر یک از خانه‌های میکروپلیت (۹۶ خانه) اضافه کرده برای هر یک از نمونه سرم ۳ خانه مورد استفاده قرار گرفت.سپس ۱۷۵ µL از سوسپانسیون باکتری میکروکوکوس لیزودکتیکوس به خانه‌ها اضافه شد ه و بعد از مخلوط شدن میزان کاهش جذب نور در نمونه‌ها از ۳۰s تا ۱۵min در طول موج ۴۵۰nm با استفاده از میکروپلیت ریدر قرائت شد. در پایان میزان لیزوزیم موجود در هر نمونه با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه گردید.

تعیین فعالیت فاگوسیتوزی ماکروفاژهای بافت کلیه بر اساس روش Kim و Austin (۱۳) با اندکی تغییر صورت گرفت. ۱mL از سوسپانسیون سلولی ماکروفاژها (۱۰۶ cell/mL) از هر ماهی روی یک لام شیشه ای تمیز قرار داده شد و سپس به مدت ۱ ساعت در دمای ۱۸°C در یک اطاقک مرطوب به‌منظور چسبیدن سلول‌ها به لام شیشه ای قرار گرفت. سپس لام دو بار توسط محیط ۱۵- L شسته شده تا سلول‌هایی که به لام شیشه ای چسبیده نشده جدا گردند. سپس به منظور تهیه سوسپانسیون سلولی مخمر رنگ آمیزی شده با رنگ قرمز کانگو، کلونی‌های مخمر بر روی آگار خونی به طریق استریل جمع‌آوری و وارد محلول نرمال سالین شده سپس به میزان ۱٪ محلول باکتریایی پودر رنگ قرمز کنگو به سوسپانسیون مخمر اضافه و خوب به هم زده شد. و به مدت ۲۰ min دقیقه در دمای ۱۲۰°C در اتوکلاو استریل شد. سپس ۱mL از سوسپانسیون سلولی مخمر (cell/ ۱۰۸ mL) رنگ آمیزی شده با رنگ قرمز کونگو را به لام شیشه‌ای اضافه کرده و مجددا به مدت ۱ ساعت در اتوکلاو در دمای ۱۸ °C به‌منظور عمل فاگوسیتوز شدن مخمر توسط ماکروفاژها قرار داده سپس لام دو بار توسط محیط ۱۵- L شسته شده و در مجاورت هوا خشک گردید بمدت۳ min در متانول خالص (۹۶٪) فیکس و بمدت ۱۵min در محلول رنگی گیمسا (Sigma) قرار داده تا رنگ آمیزی گردد. و مجدداً شستشوی آنرا انجام داده. سپس اسلاید بدست آمده را در زیر میکروسکوپ (عدسی ۱۰۰×) قرار داده و تعداد ۲۰۰ سلول را شمارش کرده تا ماکروفاژهایی که مخمرها را بلعیده‌اند مشخص گردند. سپس فعالیت فاگوسیتوز طبق فرمول زیر محاسبه گردید.

۱۰۰×تعداد کل سلول‌ها/تعداد سلول‌های فاگوسیت کننده=PA(فعالیت فاگوسیتوزی)

تعداد ماکروفاژهای فاگوسیت کننده/تعداد مخمرهای فاگوسیت شده=شاخص فاگوسیتوزی

تعیین فعالیت انفجار تنفسی به روش Secombes و Chung (۱۹) با کمی تغییر صورت گرفت. ۱۰۰ µL از سوسپانسیون سلولی حاوی ماکروفاژ به هر خانه میکروپلیت (۹۶ خانه ته صاف) اضافه شد. سپس پلیت را به مدت ۲ ساعت در گرمخانه ۲۰°C در تاریکی قرار گرفته تا ماکروفاژها به کف خانه‌های پلیت بچسبند. آنگاه محلول رویی را تخلیه کرده و دوبار با محلول محیط ۱۵- L شستشو داده سپس ۶۰mL از محلول نیتروبلوتترازولیوم (Nitro blue tetrazolium) (Merck, Germany) ٪ ۰/۱ را همراه با ۲۰µL از آنزیم سوپراکسایددیسموتازو ۲۰µL (Superoxide dismutase) (Sigma, Aldrich,USA) از محلول سوسپانسیون سلولی حاوی ماکروفاژ را به هر کدام از خانه پلیت‌های U شکل اضافه کرده و آنگاه پلیت را به مدت ۴۵ min در گرمخانه ۱۸°C قرار داده و سپس محلول رویی را تخلیه نموده و دوبار با نرمال سالین شستشو داده و ۵۰ µL متانول ۷۰٪ به هر خانه اضافه نموده تا روند انجام واکنش به طور کامل متوقف گردد. و ماکروفاژها فیکس شده و پس از گذشت۳۰min متانول را خالی کرده و در هوای آزاد خشک شده، آنگاه به هر کدام از خانه‌ها ۱۲۰µL از محلول هیدروکسید پتاسیم و ۱۴۰ µL از محلول دی متیل سولفوکساید ۵٪ (Merck, Germany) اضافه نموده و جذب نوری پلیت را توسط دستگاه قرائت الیزا در طول موج ۶۲۰nm قرائت گردید.

ابتدا نرمال بوده داده‌ها با آزمون کالموگروف- اسمیرنوف و همگنی واریانس‌ها با آزمون لون (Leven) بررسی شد. تجزیه وتحلیل داده‌ها با استفاده از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (One- Way ANOVA) و جهت مقایسه میانگین‌ها (میانگین±خطای معیار) از آزمون دانکن در سطح اعتماد ۵٪ (p=۰/۰۵) استفاده شد.تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم افزار (SPSS Version۱۶) انجام گرفت.

نتایج

عصاره آویشن شیرازی: جدول ۱ تغییرات میانگین فعالیت لیزوزیم، گلبول‌های سفید و قرمز خون در غلظت‌های مختلف آویشن شیرازی و شاهد را نشان می‌دهد. بیشترین میزان فعالیت لیزوزیم در تیمار تغذیه شده با غذای کنسانتره به همراه ۱۰۰mg/kg عصاره مذکور مشاهده شد تیمار ۲ و ۳ در فعالیت لیزوزیم اختلاف معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد و ۱ نشان داد (p<۰/۰۵). میانگین گلبولهای قرمز خون در بین تیمارها اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (p>۰/۰۵). بیشترین تغییرات میانگین گلبول‌های سفید در تیمار ۳ مشاهده شد و تیمارهای تغذیه شده با غلظت‌های مختلف از این عصاره در گلبول سفید خون تفاوت معنی‌داری را با تیمار شاهد نشان دادند (p<۰/۰۵). بیشترین میزان فعالیت انفجار تنفسی در تیمار۲ مشاهده شد و اختلاف معنی‌داری را با سایر تیمارها نشان داد (p<۰/۰۵). بین تیمار ۳، تیمار۱ و شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (p>۰/۰۵).

عصاره پونه: جدول ۲ تغییرات فعالیت لیزوزیم، انفجار تنفسی و گلبول‌های سفید و قرمز خون در غلظت‌های مختلف عصاره پونه و تیمار شاهد را نشان می‌دهد . میزان موارد فوق در بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند (p>۰/۰۵).

نمودار ۲ شاخص فاگوسیتوزی در تیمارهای مختلف را نشان می‌دهد.

جدول ۱. تغییرات میانگین فعالیت لیزوزیم، گلبول‌های قرمز و سفید در بین تیمارهای مختلف عصاره آویشن شیرازی و شاهد. حروف نامشابه درهر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($p<0/05$). تیمار ۱) غذای کنسانتره به همراه ۲۰ mg/kg، تیمار ۲) غذای کنسانتره به همراه ۵۰ mg/kg و تیمار ۳) غذای کنسانتره به همراه ۱۰۰ mg/kg عصاره آویشن شیرازی.

تیمار	فعالیت انفجار تنفسی (O.D) جذب نوری	فعالیت لیزوزیم (µg/mL)	گلبول‌های سفید ($\times10^3$)	گلبول‌های قرمز ($\times10^4$)
شاهد (کنترل)	۰/۱۲±۰/۰۰۵ [a]	۷±۱/۵۱ [a]	۴۴/۶۲±۲/۵۵ [a]	۶۳/۶۲±۱/۲۸ [a]
۱	۰/۰۸±۰/۰۰۵ [b]	۷/۵۰±۱/۶۰ [a]	۵۰/۵۰±۲/۴۴ [b]	۶۴/۵۰±۲/۴۴ [a]
۲	۰/۱۹±۰/۰۰۲ [c]	۹/۲۵±۱/۳۸ [b]	۵۷/۶۲±۳/۷۳ [b]	۶۴/۷۵±۳/۴۱ [a]
۳	۰/۱۰±۰/۰۰۶ [ab]	۱۲/۳۷±۱/۰۶ [c]	۵۶/۵۰±۱/۱۸ [c]	۶۴/۳۷±۲/۸۷ [a]

جدول ۲. تغییرات میانگین فعالیت لیزوزیم، انفجار تنفسی و گلبول‌های سفید و قرمز ر در تیمارهای مختلف عصاره پونه و شاهد. حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است ($p>0/05$). تیمار ۱) غذای کنسانتره به همراه ۲۰ mg/kg ، تیمار۲) غذای کنسانتره به همراه ۵۰ kg mg/ و تیمار ۳) غذای کنسانتره به همراه ۱۰۰ mg/kg عصاره پونه.

تیمار	فعالیت انفجار تنفسی (O.D) جذب نوری	فعالیت لیزوزیم (mL/µg)	گلبول‌های سفید($\times10^3$)	گلبول‌های قرمز ($\times10^4$)
شاهد (کنترل)	۰/۱۲±۰/۰۰۵ [a]	۷±۱/۵۱ [a]	۴۴/۶۲±۲/۵۵ [a]	۶۱/۶۲±۱/۲۸ [a]
۱	۰/۰۹±۰/۰۲۴ [a]	۶/۳۷±۲/۳۸ [a]	۴۵/۷۵±۳/۲۴ [a]	۶۳/۳۷±۱/۷۶ [a]
۲	۰/۰۸±۰/۰۰۲ [a]	۷/۲۲±۲ [a]	۴۶/۲۲±۳/۸۰ [a]	۶۲/۷۷±۲/۲۲ [a]
۳	۰/۰۷±۰/۰۰۲ [a]	۵/۲۵±۱/۳۸ [a]	۴۳ ±۱/۷۷ [a]	۶۰/۷۵±۱/۶۶ [a]

بیشترین شاخص فاگوسیتوزی در تیمار ۳ مشاهده شد ($p<0/05$). بین تیمارهای ۱ و ۲ با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p>0/05$).

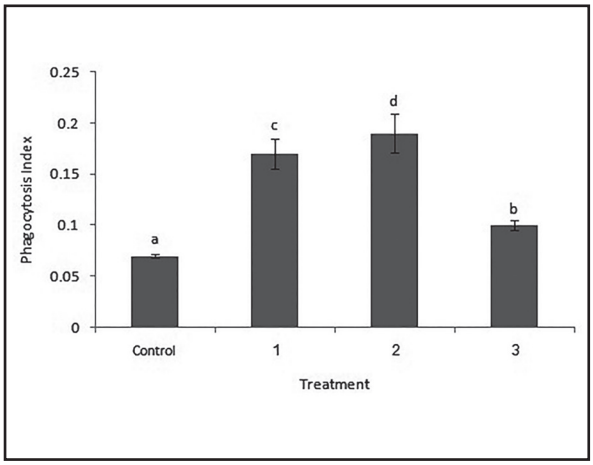
بحث

در صنعت آبزی پروری، ماهی‌ها در طول دوره پرورش با استرس‌های مختلفی روبرو هستند. از جمله درجه حرارت آب که کاهش درجه حرارت در طول فصل زمستان منجر به کاهش فعالیت سیستم ایمنی غیر اختصاصی در ماهی‌ها می‌گردد. استفاده از محرک‌های ایمنی می‌تواند منجر به افزایش پاسخ سیستم ایمنی و بهبود وضعیت سلامت ماهی در برابر میکروارگانیسم‌های بیماریزا گردد (۴،۲۳).

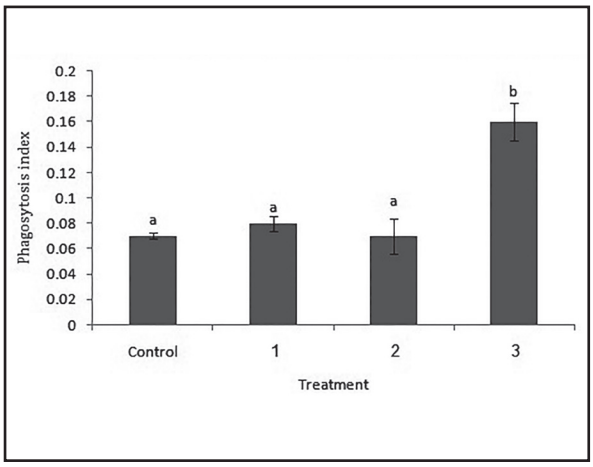
لذا در این تحقیق، برخی از پاسخ‌های ایمنی غیر اختصاصی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) بعد از مصرف خوراکی عصاره آویشن شیرازی و عصاره پونه، به‌عنوان محرک ایمنی، با غلظت‌های مختلف (۲۰، ۵۰، ۱۰۰ mg/kg) به همراه غذای کنسانتره مورد بررسی قرار گرفته است.

لیزوزیم یکی از ترکیبات هومورال سیستم ایمنی غیر اختصاصی است که منجر به شکسته شدن پیوند بتا ۴-۱ بین ان- استیل مورامیک اسید و ان- استیل گلوکز آمین در دیواره سلولی (لایه پپتیدوگلیکان) باکتری‌های گرم مثبت می‌گردد و بدین صورت از تهاجم این باکتری‌ها جلوگیری بعمل می‌آورد (۸،۲۲). تحقیقات متعدد نشان داد که میزان لیزوزیم سرم خون در ماهی کپور هندی روهو (*Labeo rohira*) تغذیه شده با دوز ۵٪ دانه گیاه *Achyrathes aspera* (۱۵) و مارماهی ژاپنی (*Anguilla japonica*) (۸) تغذیه شده با دوز ۱٪ Korean mistletoe در مقایسه با دوزهای ۰/۱٪ و ۰/۵٪ افزایش یافته که با نتایج حاصل از این تحقیق که نشان داد که بیشترین میزان فعالیت لیزوزیم در تیمارهای تغذیه شده با غلظت‌های بالای عصاره آویشن شیرازی (۵۰ mg/kg و ۱۰۰) در مقایسه با غلظت پایین عصاره (۲۰mg/kg) افزایش یافته ($p<0/05$) و بیشترین میزان لیزوزیم در تیمار ۳ مشاهده شده است همخوانی داشت. بررسی‌ها نشان می‌دهد که با افزایش تعداد سلول‌های بیگانه خوار، میزان لیزوزیم نیز افزایش می‌یابد (۱۷) در حالیکه نتایج حاصل از این تحقیق، نشان داد که میزان فعالیت لیزوزیم در تیمارهای تغذیه شده با غلظت‌های مختلف عصاره پونه (*M. pulegium*) تفاوت معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد نشان ندادند ($p>0/05$). می‌توان نتیجه گرفت که ممکن است ترکیبات عصاره پونه تعداد فاگوسیت‌های ترشح کننده لیزوزیم را تغییر نداده باشد. Soltani و همکاران در سال ۲۰۱۰ (۲۲) با بررسی اثر اجرای خوراکی اسانس روغنی آویشن شیرازی بر سیستم ایمنی ماهی کپور معمولی گزارش نمودند که استفاده از دوزهای مختلف این اسانس روغنی (۳۰،۶۰،۱۲۰ mg/L) تأثیری بر افزایش فعالیت لیزوزیم نداشته است. که با نتایج حاصل از این تحقیق بر روی عصاره پونه همخوانی دارد.

همچنین نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که گلبول‌های قرمز خون در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با دوزهای ۲۰،۵۰ mg/kg و ۱۰۰ عصاره آویشن شیرازی اختلاف معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد نشان نداد ($p>0/05$). اما تعداد گلبول‌های سفید در تیمارهای تغذیه شده با غلظت‌های مختلف عصاره نسبت به تیمار شاهد بیشتر شده و در تیمار ۳ بیشترین تعداد گلبول‌های سفید مشاهده شد ۱/۱۸±۱۰۳×۵۶/۵۰ که با نتایج بدست آمده از تحقیق Sahu و همکاران در سال ۲۰۰۷ (۱۸) همخوانی دارد. بطوریکه. آنها گزارش کردند که میزان گلبول‌های سفید خون بچه ماهی کپور هندی روهو (*Lebeo rohita*) بعد از تغذیه با انبه



نمودار ۱. تغییرات میانگین شاخص فاگوسیتوزی بین غلظت‌های مختلف عصاره آویشن شیرازی و شاهد.



نمودار۲. تغییرات شاخص فاگوسیتوزی بین غلظت‌های مختلف عصاره پونه و شاهد.

Magnifera indica نسبت به گروه شاهد افزایش یافت. همچنین نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که تعداد گلبول‌های سفید خون در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با دوزهای مختلف عصاره پونه اختلاف معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد نشان نداد ($p>0/05$). که با نتایج بدست آمده از تحقیق Sahu و همکاران در سال ۲۰۰۷ (۱۸) مغایرت داشت. می‌توان استنباط نمود که شاید دوز و میزان دوره استفاده از عصاره در این تحقیق، به اندازه‌ای نبوده که منجر به افزایش فعالیت لیزوزیم وتعداد گلبول‌های سفید خون گردد (۲۱).

وظیفه اصلی سلول‌های قرمز خون یا اریتروسیت‌ها حمل و انتقال گاز در سراسر بدن است. تعیین تعدادسلول‌های قرمز خون اهمیت زیادی در فیزیولوژی و کلینیک داشته و تعداد گلبول‌های قرمز در یک گونه ماهی به وضع بهداشت و سلامت ماهی بستگی دارد (۱۱). لذا به نظر می‌رسد که می‌توان از این فاکتور به‌عنوان یک اندیکاتور جهت تأیید وضعیت بهداشت و سلامت ماهیان در تیمارهای مختلف تا پایان دوره آزمایش استفاده نمود. وظیفه اصلی لکوسیت‌ها یا سلول‌های سفید خون دفاع از بدن در برابر عفونت، فاگوسیتوز و هضم مواد خارجی است (۱۸،۲۲). این تحقیق نشان داد که استفاده از عصاره آویشن شیرازی با غلظت‌های مختلف منجر به افزایش تعداد گلبول‌های سفید خون نسبت به تیمار شاهد شد و بیشترین تعداد گلبول‌های سفید در تیمار ۳ مشاهده شد در حالیکه بین تیمار ۱و ۲ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p>0/05$). Soltani و همکاران در سال ۲۰۱۰ (۲۲) گزارش نمودند که میزان گلبولهای سفید در کپور معمولی تغذیه شده با غلظت‌های ۳۰mg/l و ۶۰ اسانس روغنی آویشن شیرازی در مقایسه با گروه شاهد و غلظت ۱۲۰mg/l این عصاره بیشتر بود که با نتایج حاصل از این تحقیق بر روی آویشن شیرازی همخوانی دارد.

فعالیت‌فاگوسیتوزی‌توسط‌سلول‌های‌فاگوسیتیک‌یکی‌ازمکانیسم‌های دفاعی مهم در مقابل باکتری‌های بیماریزا می‌باشد. سلول‌های فاگوسیتوز در جریان فعالیت انفجار تنفسی خود توانایی تولید آنیون‌های سوپر اکسید را دارند که این اشکال اکسیژن سمی و منجر به از بین بردن باکتری‌ها می‌گردند (۱۸). در مطالعه حاضر، اضافه نمودن عصاره آویشن شیرازی به جیره غذایی با دوز ۵۰mg/kg منجر به افزایش معنی‌داری در میزان فعالیت انفجار تنفسی سلول‌های فاگوسیتوزی در مقایسه با تیمار شاهد در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان شد ($p<0/05$). که با نتایج بدست آمده از تحقیق بر روی کپور هندی روهو (*Lebeo rohita*) تغذیه شده با انبه *Magnifera indica* (۱۸) و تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) تغذیه شده با دو عصاره گیاهان دارویی چینی *Astragalus membranaceus* و *Lonicera japonica* (۳) همخوانی دارد. اما اضافه نمودن عصاره پونه به جیره غذایی با دوزهای مختلف منجر به افزایش معنی‌داری در میزان فعالیت انفجار تنفسی سلول‌های فاگوسیتوزی در مقایسه با تیمار شاهد در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نشد. همچنین نتایج حاصل از فعالیت فاگوسیتوزی در این تحقیق نشان داد که بیشترین میزان فعالیت فاگوسیتوزی در تیمار ۲ (تغذیه شده با ۵۰ mg/kg عصاره آویشن شیرازی) و در تیمار ۳ (تغذیه شده با ۱۰۰ mg/kg عصاره پونه) مشاهده شد که با نتایج بدست آمده از تحقیق‌های مشابه همخوانی داشت (۳،۱۸).

در کل نتایج نشان داد که عملکرد عصاره آویشن شیرازی با غلظت ۱۰۰mg/kg بر روی فعالیت لیزوزیم و فاگوسیتوزی بهتر از عصاره پونه بود. اما به مطالعه بیشتری در زمینه نقش هر یک از ترکیبات موجود در عصاره آویشن شیرازی در افزایش فعالیت سیستم ایمنی ودسترسی به دوز مناسب و طول دوره مصرف عصاره پونه نیاز است.

تشکروقدردانی

بدین وسیله از کارشناسان محترم مرکز آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی شیراز به جهت فراهم نمودن کلیه امکانات و تسهیلات برای اجرای پروژه قدردانی می‌گردد.

References

1. Ahmadi, K., Vosoghi, A.A., Mirvaghefi, A.R., Attai Mehr, B., Banaei, M. (2010) Effect of dietary extract of *Silybum mariamum* as medicinal herb on some non specific factors in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Mar Biol J Islamic Azad University, Ahvaz Branch. 2: 19-26.
2. Alishahi, M., Soltani, M., Mesbah, M., Zargar, A. (2012) Immunostimulatory and growth stimulation effects of Ergosan, levamisole and herbal extracts in *Cyprinus carpio*. J Vet Res. (University of Tehran). 2: 135-142.
3. Ardo, L., Yin, G., Xu, P.,Varadi, L., Szigeti, G., Jeney, Z., Jeney, G. (2008) Chines herbs (Astragalus membranaceus and *Lonicera japonica*) and boron enhance the non- specific immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and resistance against Aeromonas hydrophila. Aquaculture. 275: 26-33.
4. Bagni, M., Romano, N., Finoia, M.G., Abelli, L., Scapigliati, G., Tiscar, P.G., Sarti, M., Marino, G. (2005) Short- and long term effects of a dietary yeast b- glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass *Dicentrarhus labrax*. Fish Shellfish Immunol. 18: 311-325.
5. Basti, A.A., Misaghi, A., Khaschabi, D. (2005) Growth response and modeling of the effects of *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil, PH and temperature on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. LWT- Food Sci Technol. 40: 973-981.
6. Blaxhall, P.C., Daisley, K.W. (1973) Routine haematological methods for use with fish blood. J Fish Biol. 5: 771-781.
7. Chen, X., Wu, Z., Yin, J. (2003) Effects of four species of herbs on immune function of *Carassius auratus* gibelio. J Fish Sci China. 10: 36-40.
8. Choi, S.H., Park, K.H., Yoon, T.J., Kim, J.B., Jang, Y.S., Choe, C.H. (2008) Dietary Koren mistletoe enhances cellular non- specific immune responses and survival of Japanese eel (*Anguilla japonica*). Fish Shellfish Immunol. 24: 67-73.
9. Demers, N.E., Boyne, C.J. (1996) Plasma proteins of rainbow trout immediate response to acute stress in models for environment toxicology biomarkers immunostimulants. J Fish Dis. 20: 721-732.
10. Dügenci, S.K., Arda, N., Candan, A. (2003) Some medicinal plants as immunostimulant for fish. J Ethnopharmacol. 88: 99-106.
11. 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.
12. Jian, J., Wu, Z. (2004) Influences of traditional Chinese medicine on nonspecific immunity of Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). Fish Shellfish Immunol. 16: 185-191.
13. Kim, D.H., Austin, B. (2006) Innate immune responses in rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) induced by probiotics. Fish Shellfish Immunol. 21: 513-524.
14. Mozaffarian, V. (1996) Encyclopedia of Iranian plants. Farhang moaser publication, Tehran, Iran, (in Persian).
15. Rao, Y.V., Das, B.K., Pradhan, J., Chakrabrti, R. (2006) Effect of *Achyronthes aspera* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. Fish Shellfish Immunol. 20: 263-273.
16. Ravelo C., Magariños B., Herrero M.C., Costa L., Toranzo A.E., Romald J.L. (2006) Use of adjuvanted vaccines to lengthen the protection agaist Lactococcusis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. 251: 153-158.
17. Sahoo, P.K., Kumarij, J., Mishra, K. (2005) Non-specific immune responses in juveniles of Indian major corporative. J Appl Ichtyol. 21: 151-155,
18. Sahu, S., Das, B.K., Pradhan, J., Mohaptra, B.G., Mishra, B.K., Sarangi, N.N. (2007) Effect of Magnifera indica kernel as a foodadditive on immunity and resistance of *Aeromonas hydrophila* in *Lebeo rohita* fingerlings. Fish Shellfish Immunol. 23: 109-118.
19. Secombes C.J., Chung, S. (1988) Analysis of events occurring within teleost macrophages during the respiratory burst. Comp Biochem Physiol. 89: 539-544.

20. Sharififar, F., Moshafi, M.H., Mansouri, S.H., Khodashenas, M., Khoshnoodi, M. (2007) In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. Food Control. 18: 800-805
21. Shokri, H., Asadi, F., Bahonar, A.R., Khosravi, A.R. (2006) The role of *Zataria multiflora* essential (Iranian herb) on innate immunity of animal model. Iranian J Immunol. 3: 164-168.
22. Soltani, M., Sheikhzadeh, N., Ebrahimzadeh-Mousavi, H.A., Zargar, A. (2010) Effect of Zataria multiflora essential oil on innate immune responses of common carp (*Cyprinus carpio*). J Fish Aquat Sci. 5: 191-199.
23. Tort, L., Rotllant,J., Liarte, C., Acerete, L., Hernandeza, A., Ceulemans, S., Coutteau, P., Padros, F. (2004) Effects of temperature decrease on feeding rates, immune indicators and histopathological changes of gilthead sea bream *Sparus auratus* fed with an experimental diet. Aquaculture. 229: 55-65.
24. Usavi, H.A., Zargar, A. (2010) Effect of Zataria multiflora essential oil on innate immune responses of common carp (*Cyprinus carpio*). J Fish Aquat Sci. 5: 191-199.
25. Vigo, A., Cepeda, A., Gualilla, O., Perez- Fernandez, R. (2004) In vitro anti- inflammatory effect of *Eucalyptus globulus* and *Thymus vulgaris*. Nitric oxid inhibition in 1774 A. 1 murine macrophage. J Pharm Pharmacol. 56: 257-263.
26. Zargary, A. (1993) Medicinal Plants of Iran. (4th ed.). Tehran University publications. Tehran, Iran.

Effects of *Zataria multiflora* Boiss and *Mentha pulegium* Lextracts on Phagocytosis, Lysozyme, Respiratory Burst and Blood Cells of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum)

Akbary, P.[1*], Ghareghani poor, M.[2], Fereidouni, M.S.[3]

[1]*Chabahar Maritime University, Deparment of Marine Sciences, Fisheries Groups, Chabahar- Iran*
[2]*Department of Biology, Payam Noor University of Isfahan, Isfahan- Iran*
[3]*Aquatic Animal Health Unit, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz- Iran*
(Received 19 August 2015, Accepted 12 October 2015)

Abstract:

BACKGROUND: Enhancement of the immune system seems to be the most promising method of preventing fish diseases and increasing growth rate. **OBJECTIVES:** The purpose of the present study was to investigate the influence of dietary administration of *Zataria multiflora* Boiss and *Menthapulegium* L extracts on phagocytosis, lysozyme, respiratory burst and total white and red blood cells (WBC/RBC) of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **METHODS:** Two hundred and ten fish (100±10 g) were used in a completely randomized design with 7 treatment and 3 replicates in a 2 weeks period (from 0 to 14 d). The basal diet supplemented with 0 (control), 20, 50 and 100 mg/kg food *Z. multiflora* and *M.pulegium* extracts. At the end of the experiment (after 14 days), samples from kidney and blood of the fish were collected in order to determine WBC/RBC (by neubauer chamber), serum lysozyme activity (by turbid metric assay, phagocytosic (by number of yeast cells phagocytosed method) and respiratory burst activities (by reduction of nitroblue tetrazolium method) of head kidney tissue. **RESULTS:** The results indicated that the highest ratio of phagocytosis and respiratory burst activity was observed in 50 mg/kg extract concentration of *Z. multiflora* ($p<0.05$). The highest WBC lysozyme activities were seen in 100 mg/ kg extract concentration of *Z. multiflora*. No significant difference was shown between RBC in treatment groups and control group ($p>0.05$). The highest ratio of phagocytosis activity was observed in 100 mg/kg extract concentration of *M. pulegium* ($p<0.05$). No significant difference was observed between WBC /RBC, lysozyme, respiratory burst means in treatment groups and control group ($p>0.05$). **CONCLUSIONS:** It can be concluded that 50 and 100 mg/ kg of the methanol *Z. multiflora* and 100 mg/ kg *M. pulegium* have positive effects on stimulating of innate immune system in *O.mykiss*, but the influence of *Z. multiflora* extract with100 mg/ kg concentration is better than M. pulegium extract.

Keyword: immunity system, *Mentha pulegium*, *Oncorhynchus mykiss*, phagocytosis activity, *Zataria multiflora*

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Changes of respiratory burst activity, plasma lysozyme activity and total white and red blood cells (WBC/RBC) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Data are expressed as the mean of five fish±SEM. Group 1, 2 and 3 fed with 20, 50 and 100 mg/kg feed of *Z.multiflora* extract respectively. Identical superscript letters indicate no significant differences between groups.

Table 2. Changes of respiratory burst activity, plasma lysozyme activity and total white and red blood cells (WBC/RBC) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Data are expressed as the mean of five fish±SEM. Group 1,2 and 3 fed with 20, 50 and 100 mg/kg feed of *Mentha pulegium* L extract respectively. Identical superscript letters indicate no significant differences between groups.

Graph 1. Mean concentrations of liver cholesterol (a), triglyceride (b) and glycogen(c) obtained the starved and fed groups in grey mullet, *Mugilce phalus*.

Graph 2. Mean concentrations of liver ALT, alanine aminotransferase, (a) and AST, aspartate aminotransferase (b) obtained the starved and fed groups in grey mullet, *Mugilce phalus*.

***Corresponding author's email: paria.akbary@gmail.com, Tel: 054-54122340, Fax: 054-54122340**