مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۶، دوره ۷۲، شماره ۲، ۲۵۹-۲۵۱
Journal of Veterinary Research. 72,2:251-259, 2017
Original Article

مقایسه تأثیر تجویز خوراکی و تزریقی عصاره گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea*) بر برخی شاخص‌های خونی و ایمنی ماهی کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*)

مجتبی علیشاهی[1*] مهرزاد مصباح[1] طاهره شیرالی[2]

۱) گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۲) فارغ التحصیل دکترای بهداشت آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

(دریافت مقاله: ۲۶ بهمن ماه ۱۳۹۵، پذیرش نهایی: ۱۹ فروردین ماه ۱۳۹۶)

چکیده

زمینه مطالعه: محرک‌های ایمنی با منشأ گیاهی در آبزی پروری دارای مزایای زیادی نسبت به واکسن‌ها و آنتی بیوتیک درمانی هستند. **هدف:** در این تحقیق اثر تجویز خوراکی و تزریقی سرخارگل (*Echinacea purpurea*) بر برخی پارامترهای ایمنی و خونی ماهی کپور علفخوار ارزیابی شد. **روش کار:** بدین منظور ۲۴۰ عدد ماهی آمور به چهار گروه در سه تکرار تقسیم شدند. تیمار اول عصاره اکیناسه را به میزان mg/kg.b.w ۴۰۰ به روش i.p دریافت نمودند. تیمار دوم میزان ۰/۵٪ پودر سرخارگل در خوراک روزانه خود دریافت نمودند. تیمار سوم و چهارم نیز بترتیب، به عنوان کنترل تزریقی و کنترل خوراکی در نظر گرفته شدند. ماهی‌ها به مدت ۴۰ روز نگهداری شده و در روزهای صفر، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ از ماهی‌ها خونگیری شده و شاخص‌های ایمنی سرم شامل: میزان فعالیت لایزوزیم، قدرت باکتری کشی، فعالیت کمپلمان و احیای نیتروبلوتترازولیوم (NBT) و شاخص‌های خونی شامل: هماتوکریت، هموگلوبین، تعداد گلبول‌های قرمز و تعداد و نسبت گلبول‌های سفید بررسی گردیدند. در روز ۴۰ تیمارها با باکتری آئروموناس هیدروفیلا مواجهه داده شدند. **نتایج:** نتایج نشان داد که میزان فعالیت لایزوزیم سرم، قدرت باکتری کشی سرم، فعالیت کمپلمان و احیای NBT در تیمار تزریقی افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد داشت ($p<0/05$) درحالیکه در تیمار خوراکی افزایش قدرت باکتری کشی سرم و احیای NBT در روز ۳۰ و ۴۰ مشاهده گردید ($p<0/05$). پارامترهای خونی مرتبط به گلبول‌های قرمز در هیچکدام از تیمارها تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند ($p>0/05$)، لیکن تعداد لوکوسیت‌ها و نسبت هتروفیل‌ها در تیمار تزریقی افزایشی را نسبت به تیمار شاهد نشان دادند ($p<0/05$). تلفات بعد از چالش در تیمار تزریقی کاهش معنی‌داری نسبت به تیمار کنترل داشت. **نتیجه‌گیری نهایی:** عصاره سرخارگل به عنوان کاندیدی برای تحریک ایمنی غیر اختصاصی ماهی مناسب به نظر می‌رسد.

واژه‌های کلیدی: سرخارگل اکیناسه پورپوره‌آ، ماهی آمور، شاخص‌های ایمنی، پارامترهای خونی

مقدمه

محرک‌های ایمنی ترکیبات زیستی و یا مواد شیمیایی سنتتیک هستند که واکنش‌های ایمنی را بوسیله افزایش عملکرد سلول‌های بیگانه‌خوار، افزایش تولید آنتی‌بادی، افزایش تولید سایتوکین‌ها و اجزای ایمنی هومورال تحریک می‌کنند (۲۴،۲۶). مواد محرک ایمنی که تاکنون در آبزیان مورد استفاده قرارگرفته‌اند شامل مواد سنتتیک مانند لوامیزول، مواد بیولوژیک مانند مشتقات باکتریایی، پلی ساکاریدها، فاکتورهای تغذیه‌ای و همچنین ترکیبات حیوانی و گیاهی می‌باشند (۲۳). استفاده از محرک‌های ایمنی با منشأ گیاهی مزایای فراوانی داشته و امروزه گرایش زیادی به استفاده از محرک‌های ایمنی با منشأ گیاهی در آبزیان ایجاد شده است(۴). گیاه اکیناسه از دیرباز توسط بومیان آمریکا در اوایل قرن ۱۷ برای درمان مارگزیدگی، بیماری‌های لثه و دهان، سرماخوردگی، سرفه، مسمومیت‌های خونی، گلودرد و درد معده و روده استفاده شده‌است (۲۱). Echinacea از کلمه یونانی echinos به معنی خارپشت یا جوجه تیغی دریایی گرفته شده‌است. زیرا سرشاخه‌های این گیاه از تعداد زیادی خارهای مخروطی پوشیده شده‌است. جنس اکیناسه شامل ۹ گونه است که گیاه سرخار گل آ *Echinacea purpurea* معروف‌ترین آن‌هاست (۱۲). اجزای شیمیایی گونه‌های اکیناسه شامل بخش‌های لیپوفیلیک، پلی‌ساکاریدهای محلول در آب، مشتقات اسید کافئیک و فلاونوئیدها است(۹). در مطالعات اثرات ضد التهابی، ضد ویروسی، ضد باکتریایی و تحریک سیستم ایمنی بویژه ایمنی غیراختصاصی گیاه سرخارگل نشان داده‌شده‌است. پلی ساکاریدهای موجود در این گیاه خاصیت محرک سیستم ایمنی و ترمیم بافت و پلی‌استیلن‌های آن دارای اثر ضد التهابی می‌باشند. سرخارگل همچنین دارای اثرات اسپاسمولیتیک بر روی اسپاسم ناشی از استیل کولین است (۳۲) با توجه به تکامل بیشتر ایمنی غیراختصاصی 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 (۳۰،۳۳). هر چند در سال‌های اخیر گرایش به استفاده از محرک‌های ایمنی در آبزی‌پروری توسعه زیادی یافته است (۲،۱۵) ولی گزارشات معدودی از استفاده از سرخارگل در ماهی منتشر شده است (۲۳)، لذا در این تحقیق اثرات تزریق داخل صفاقی و نیز تجویز خوراکی عصاره سرخارگل

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۶۱-۳۳۷۳۸۳۸۵ نمابر: ۰۲۱-۳۳۳۶۰۸۰۷ Email: alishahimoj@gmail.com

بر برخی فاکتورهای ایمنی غیراختصاصی ماهی کپور علفخوار که به علت گیاه‌خوار بودن رشد سریع و بازار پسندی بالا، بالاترین تولید را در بین کپورماهیان دارد، مد نظر قرارگرفت تا در صورت امکان بتوان از این گیاه در کنترل بیماری‌های مختلف و تقویت سیستم ایمنی ماهی استفاده نمود.

مواد و روش کار

تهیه ماهی: تعداد ۲۴۰ قطعه بچه ماهی آمور با وزن متوسط ۱۲/۳g±۴۱/۴ از یکی از مزارع پرورش ماهی پروژه آزادگان در حومه شهر اهواز خریداری و با استفاده از نایلون‌های مخصوص حمل بچه ماهی بهمراه اکسیژن خالص به بخش بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی انتقال یافت. ماهی‌ها به مدت ده روز به منظور سازش‌یابی (adaptation) با شرایط محیطی جدید و عادت یافتن به خوراک دستی در آکواریوم‌های ۲۰۰ لیتری نگهداری گردیدند.

تجویز سرخارگل: عصاره هیدروالکلی گیاه سرخارگل به روش پرکلاسیون استخراج گردیده و با استفاده از دستگاه لیوفیلایزر عصاره به پودر تبدیل گردید تجویز عصاره به ماهیان به دو روش تزریقی و خوراکی انجام گردید. جهت تزریق میزان مورد نیاز از عصاره در سرم فیزیولوژی حل و با فیلتر µ ۰/۲۲ استریل گردید. میزان ۴۰۰ mg/kgb.w از عصاره به روش داخل صفاقی به ماهیان تیمار تزریقی تجویز گردید. در تیمار خوارکی 5g پودر عصاره به یک کیلوگرم خوراک (0/5g) به صورت همگن اضافه گردید غذادهی روزانه به میزان ۳٪ وزن ماهی زنده (Biomass) انجام گرفت.

تیمار بندی ماهی‌ها: ماهی‌ها بصورت کاملاً تصادفی بصورت زیر به چهار گروه و هر گروه در سه تکرار تقسیم گردیدند:

گروه اول: تجویز عصاره سرخارگل بصورت تزریق داخل صفاقی، گروه دوم: تجویز عصاره سرخارگل بصورت خوراکی، گروه سوم : کنترل تزریق داخل صفاقی سرخارگل (تزریق شده با سرم فیزیولوژی فاقد عصاره)، گروه چهارم : کنترل تجویز خوراکی سرخارگل (تغذیه شده با خوراک فاقد عصاره)

نمونه‌گیری در روزهای صفر، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ بعد از شروع تجویز انجام گرفت. در هر مرحله ابتدا ماهی‌ها با استفاده از داروی بیهوشی MS۲۲۲ با دوز ۱۰۰ ppm بیهوش گردیده و سپس با استفاده از سرنگ انسولین واز طریق ساقه دمی خونگیری از ماهی‌ها بعمل آمد. مقداری از خون به لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد هپارین برای انجام آزمایشات خون شناسی در همان روز انتقال داده‌شد. سرم خون باقیمانده با استفاده از سانتریفوژ در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه، جداسازی شده و در دمای ۲۰ °C- تا زمان انجام آزمایشات ایمنی نگهداری گردید.

آزمایشات انجام شده روی نمونه‌ها (اندازه‌گیری لایزوزیم سرم): برای اندازه‌گیری میزان فعالیت لایزوزیم سرم از روش توصیه شده توسط Ellis در سال ۱۹۹۰و Obach و همکاران در سال ۱۹۹۳ با اندکی تغییرات استفاده‌گردید (۱۰،۲۰). در این روش از قدرت لایزوزیم در لیز باکتری گرام مثبت میکروکوکوس لیزودایکتیکوس (سیگما) استفاده می‌گردد..

بررسی قدرت باکتری کشی سرم: برای اندازه‌گیری قدرت باکتری کشی سرم از روش ارائه شده توسط Kajita و همکاران در سال ۱۹۹۰ و همچنین Barnes و همکاران در سال ۲۰۰۳ با کمی تغییرات استفاده گردید (۵،۱۶).

ابتدا باکتری آئروموناس هیدروفیلا به مدت ۴۸ ساعت در محیط TSB کشت داده‌شد و سپس سلول‌های باکتریایی با سانتریفوژ ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه جمع‌آوری و با افزودن مقداری بافر فسفات‌سدیم استریل به آن‌ها جذب نوری سوسپانسیون حاصله در طول موج ۵۴۰ nm نانومتر برابر ۱ تنظیم‌گردید. سپس تعداد باکتری به میزان ۱۰۵ باکتری در میلی‌لیتر در ژلاتین‌ورونال بافر استریل (pH ۷/۵= و حاوی ۰/۵ mmol/ml یون کلسیم و ۰/۱۵ mmol/ml یون منیزیم) تنظیم‌گردید.

سوسپانسیون باکتریایی حاصل به نسبت ۱:۱ با سرم ترکیب شده و بمدت ۹۰ دقیقه در دمای ۲۵ °C با حرکت ملایم انکوبه‌گردیدند. سپس ۵µl از مخلوط سرم و باکتری در محیط کشت TSA در سه تکرار کشت داده‌شد. محیط‌های کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ °C انکوبه گردیده و سپس به کمک دستگاه کلونی کانتر تعداد پرگنه باکتریایی رشد یافته در روی محیط کشت شمارش‌گردید. نتایج بصورت متوسط تعداد باکتری شمارش شده در هر سه تکرار برای هر نمونه گزارش‌گردید.

احیاء NBT: برای ارزیابی میزان احیای نیتروبلوتترازولیوم که نشان دهنده میزان انفجار تنفسی در لکوسیت‌های خون ماهی است، مقدار ۰/۱ml از خون هپارینه در داخل گودهای میکروپلیت تخت قرار داده شد و ۰/۱ml نیز محلول ۰/۲٪ NBT به آن اضافه شد. پلیت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شد و سپس ۰/۱ ml از مایع رویی برداشت، و به یک لوله آزمایش حاوی ۲ ml دی متیل فرمامید اضافه گردید. پس از سانتریفوژ نمونه، جذب نوری مایع رویی در طول موج ۶۲۰nm اندازه‌گیری شد (۱۴).

آزمایش فعالیت کمپلمان: برای اندازه گیری فعالیت کمپلمان از مسیر فرعی کمپلمان(ACP) مطابق با روش توصیه شده توسط Selvaraj و همکاران در سال ۲۰۰۵ استفاده گردید. در این روش از قدرت کمپلمان برای تخریب جدار گلبول‌های قرمز خون خرگوش و ایجاد همولیز استفاده می‌شود (۲۶).

اندازه‌گیری پارامترهای خون‌شناسی: جهت اندازه‌گیری پارامترهای خون‌شناسی از همان روش‌های معمول و متداول برای پارامترهای خون‌شناسی پستانداران با اصلاحاتی استفاده‌گردید (۱۱). هموگلوبین به روش استاندارد سیانومت‌هموگلوبین و جذب نوری محلول فوقانی در طول موج ۵۶۰nm به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و میزان هموگلوبین بر حسب گرم در دسی لیتر محاسبه‌گردید. میزان هماتوکریت

جدول ۱. شاخص‌های خونی ماهی آمور بعد از تجویز خوراکی و تزریقی عصاره سرخارگل. اطلاعات بر اساس میانگین ± انحراف معیار بیان شده است و تفاوت معنی‌دار با کنترل در سطح ۵٪ با علامت * مشخص شده است.

	تیمارها	روز صفر	روز۱۰	روز ۲۰	روز ۳۰	روز ۴۰
هماتوکریت (٪)	تیمار خوراکی	۳۴/۱۷±۵/۳۴	۳۷/۶۷±۵/۴۱	۳۵/۵۶±۳/۱۹	۳۵/۷۵±۴/۶	۳۳/۳۷±۵/۳۴
	تیمار تزریقی	۳۴/۱۷±۴/۳۴	۳۱/۱۷±۴/۹۶	۳۱/۷۸±۵/۰۲	۳۱/۶۷±۵/۶	۳۵/۲۳±۴/۳۴
	کنترل خوراکی	۳۳/۱۹±۴/۳۴	۳۲/۴۴±۳/۹۱	۳۳/۲۵±۳/۹	۳۴/۳۸±۲/۶۲	۳۳/۳۴±۴/۳۴
	کنترل تزریقی	۳۲/۱۸±۴/۳۴	۳۵/۷۵±۱۱/۸۴	۳۰/۶۷±۰/۵۸	۳۵/۰۰±۸/۷۲	۳۲/۳۷±۴/۳۴
هموگلوبین (g/dl)	تیمار خوراکی	۴/۱۴±۰/۹	۴/۱۳±۱/۴۴	۴/۱۵±۱/۴۵	۴/۵۴±۱/۵۶	۴/۲۱±۰/۲۹
	تیمار تزریقی	۴/۱۵±۱/۰۴	۴/۱۲±۱/۶۲	۳/۹۴±۱/۵۵	۴/۴۱±۱/۳	۴/۱۷±۱/۱۲
	کنترل خوراکی	۴/۱۷±۱/۲۲	۴/۲۴±۱/۸۴	۳/۹۴±۱/۳۰	۴/۸۸±۱/۰۳	۴/۲۳±۱/۳۳
	کنترل تزریقی	۴/۱۱±۱/۴۲	۴/۲۰±۱/۶۰	۳/۸۹±۰/۹۶	۴/۷۳±۱/۰۳	۴/۱۵±۱/۳۸
تعداد گلبول‌های قرمز (×۱۰^۶/ µl)	تیمار خوراکی	۱/۳۷±۰/۳۴	۱/۳۴±۰/۴۱	۱/۳۸±۰/۲۷	۱/۳۴±۰/۳۸	۱/۲۹±۰/۲۸
	تیمار تزریقی	۱/۳۹±۰/۳۳	۱/۳۶±۰/۴۸	۱/۴۱±۰/۴۰	۱/۳۲±۰/۵۱	۱/۳۱±۰/۴۳
	کنترل خوراکی	۱/۳۸±۰/۲۵	۱/۲۷±۰/۲۶	۱/۳۸±۰/۳۶	۱/۳۰±۰/۳۶	۱/۲۷±۰/۳۲
	کنترل تزریقی	۱/۳۵±۰/۴۱	۱/۲۹±۰/۱۵	۱/۳۲±۰/۰۸	۱/۳۵±۰/۴۷	۱/۳۳±۰/۴۴
تعداد گلبولهای سفید (×۱۰^۴/ µl)	تیمار خوراکی	۳/۸۵±۱/۱۱	۴/۰۴±۲/۰۳	۴/۰۱±۱/۱۴	۴/۱±۱/۱۵	۳/۹۲±۱/۲۳
	تیمار تزریقی	۴/۰۸±۱/۲	۵/۹۷±۲/۵۹*	۵/۸±۱/۲۷*	۵/۴۵±۰/۹۸*	۴/۱۸±۱/۲
	کنترل خوراکی	۳/۹۸±۱/۲۱	۴/۱۲±۱/۲۷	۴/۱۸±۱/۰۹	۳/۸۹±۱/۰۶	۳/۹۸±۱/۲۱
	کنترل تزریقی	۳/۹±۰/۹۸	۳/۷۶±۱/۱۳	۴/۰۲±۱/۱	۳/۷۶±۱/۱۳	۴/۱۵±۰/۹۸
هتروفیل(٪)	تیمار خوراکی	۶۰/۷۵±۶/۶۳	۶۱±۵/۲۵	۶۴/۸۳±۶/۶۳	۷۰/۸۳±۶/۱۸*	۶۹/۷±۶/۲۳*
	تیمار تزریقی	۶۱/۵۴±۶/۱۲	۷۲/۸۳±۷/۹۱*	۷۰/۱۷±۷/۴۹*	۷۱/۱±۴/۳۱*	۶۰/۲۳±۶/۱۲
	کنترل خوراکی	۵۸/۷۵±۶/۶۳	۶۱/۰۰±۱۰/۹۴	۵۷/۸۳±۶/۷۹	۶۴/۳۳±۸/۲۶	۵۸/۷۵±۶/۶۳
	کنترل تزریقی	۶۰/۷۵±۶/۶۳	۵۷/۵۰±۲/۱۲	۵۶/۰۰±۵/۰۰	۶۰/۵۰±۶/۳۶	۵۷/۷۵±۶/۶۳
لفنوسیت(٪)	تیمار خوراکی	۲۸/۶۳±۶/۱۳	۳۰/۱۱±۴/۶۸	۲۴/۸۳±۸/۶۱	۲۲/۱۷±۳/۳۷*	۲۱/۶۳±۶/۱۳*
	تیمار تزریقی	۲۵/۲۲±۴/۱۳	۱۹/۶۷±۴/۰۸*	۲۱/۸۳±۳/۷۶*	۲۰/۸۳±۴/۵۸*	۲۶/۲۲±۴/۱۳
	کنترل خوراکی	۲۷/۱۳±۵/۶۷	۳۱/۵۷±۱۰/۸۶	۲۵/۵۰±۲/۷۴	۳۱/۰۰±۴/۳۸	۲۷/۱۳±۵/۶۷
	کنترل تزریقی	۲۷/۱۱±۶/۲۳	۲۹/۰۰±۶/۰۰	۲۷/۵۰±۲/۹۷	۳۲/۰۰±۵/۶۶	۳۰/۱۱±۶/۲۳
ائوزینوفیل(٪)	تیمار خوراکی	۷/۶۶±۲/۶۴	۷/۱۷±۳/۷۱	۸/۵۰±۲/۱۸	۶/۹±۲/۶۷	۷/۶۶±۲/۶۴
	تیمار تزریقی	۸/۶۳±۲/۱۳	۶/۵۰±۳/۹۷	۶/۱۷±۳/۴۹	۷/۶۰±۲/۸۸	۸/۶۳±۲/۱۳
	کنترل خوراکی	۸/۶۳±۳/۱۳	۸/۵۷±۳/۶۰	۸/۰۰±۳/۲۱	۹/۰۰±۳/۰۸	۸/۶۳±۳/۱۳
	کنترل تزریقی	۸/۶۳±۲/۱۳	۹/۵۰±۲/۱۲	۷/۶۷±۳/۸۹	۸/۵۰±۳/۱۲	۹/۶۳±۲/۱۳
بازوفیل(٪)	تیمار خوراکی	۲/۹۸±۱/۴۸	۲/۱۲±۲/۷۱	۲/۵۰±۱/۱۸	۲/۴۰±۱/۶۷	۳/۵۶±۱/۴۵
	تیمار تزریقی	۳/۱۴±۲/۱۳	۲/۸۹±۲/۹۷	۲/۱۷±۲/۱	۳/۶۰±۲/۱	۳/۱۴±۲/۱۳
	کنترل خوراکی	۲/۹۸±۱۱۱	۲/۱۳±۱/۶۰	۳/۰۰±۲/۲۱	۲/۰۰±۲/۰۸	۲/۹۸±۱۱۱
	کنترل تزریقی	۳/۲۳±۱/۳۴	۱۳/۴۲±۱/۲۲	۱۲/۹۸±۲/۹۶	۱۴/۴۹±۸/۱۸	۳/۲۳±۱/۳۴

به روش میکروهماتوکریت سنجش گردید. شمارش کلی گلبول‌های قرمز (TRBC) و گلبول‌های سفید (TWBC) پس از رقیق نمودن خون به نسبت ۱ به ۲۰۰ با محلول رقیق کننده نات هریک و با استفاده از لام هماسیتومتر نئوبار صورت‌گرفت (۱۱). جهت شمارش تفریقی گلبول‌های سفید خونی شامل: لنفوسیت‌ها، مونوسیت‌ها، ائوزینوفیل‌ها و بازوفیل‌ها گسترش خونی تهیه و با استفاده از رنگ گیمسا رنگ‌آمیزی گردید (۱۸).

مواجهه با باکتری آئروموناس هیدروفیلا: بعد از پایان دوره تعداد ۱۰ قطعه ماهی در هر تکرار انتخاب و جهت مواجهه استفاده شدند. در هر تیمار باکتری زنده آئروموناس هیدروفیلا AH۰۴ که بصورت مولکولی جنس و گونه آن مشخص گردیده بود، به طریق داخل صفاتی، به میزان LD۵۰ (به میزان ۲×۱۰^{۸} باکتری در میلی لیتر) تزریق گردید و تعداد تلفات روزانه به مدت ۱۴ روز ثبت شد و با کشت از کلیه قدامی ماهی‌ها، باکتری مجدداً جداسازی و نقش باکتری در تلفات تأیید گردید. بعد از ۱۴ روز تلفات تجمعی در هر تیمار مشخص و نمودار تلفات تجمعی رسم گردید (۱).

آزمون آماری: ابتدا نرمال بودن توزیع داده‌ها در تیمارها با استفاده از آزمایش شاپیرو- ویلک و همگن بودن واریانس‌ها با آزمایش لون مشخص گردید. سپس برای مقایسه میانگین‌های هر تیمار با کنترل با استفاده از T student test در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ صورت گرفت.

جدول ۲. مقایسه شاخص‌های ایمنی ماهی آمور بعد از تجویز خوراکی و تزریقی عصاره سرخارگل. اطلاعات بر اساس میانگین ± انحراف معیار بیان شده است و تفاوت معنی‌دار با کنترل در سطح ۵٪ با علامت * مشخص شده است.

	تیمارها	روز صفر	روز۱۰	روز ۲۰	روز ۳۰	روز ۴۰
فعالیت لایزوزیم سرم (U/ml min)	تیمار خوراکی	۵۶/۲۵±۱۰/۲۷	۶۴/۶۷±۹/۲۱	۶۲/۵۶±۷/۸۵	۶۳/۷۵±۱۲/۳۲	۵۷/۳۷±۱۲/۲۷
	تیمار تزریقی	۴۸/۱۷±۱۴/۳۴	۷۹/۷۵±۱۱/۹۶*	۱۲۵/۷۸±۱۰/۰۲*	۱۰۵/۶۷±۱۰/۶*	۹۶/۲۳±۱۲/۳۴
	کنترل خوراکی	۵۹/۱۹±۱۱/۳۴	۵۶/۴۴±۱۰/۹۱	۵۰/۲۵±۱۰/۹	۶۱/۳۸±۱۰/۶۲	۶۸/۳۴±۱۲/۳۴
	کنترل تزریقی	۵۳/۱۸±۱۵/۳۴	۶۰/۷۵±۱۵/۸۴	۵۹/۶۷±۱۴/۵۸	۷۱/۰۰±۱۱/۷۲	۶۶/۳۷±۱۲/۳۴
قدرت باکتری کشی سرم	تیمار خوراکی	۶۳/۱۴±۷/۴۳	۵۶/۳۴±۷/۴۳	۵۳/۳۴±۵/۴۳	۵۰/۴±۵/۴۳*	۴۹/۳±۷/۵۶*
	تیمار تزریقی	۶۱/۲۶±۶/۱۲	۴۱/۴±۴/۶*	۴۰/۳۲±۶/۲*	۴۳/۴۱±۸/۳*	۶۰/۲۸±۶/۱۲
	کنترل خوراکی	۵۸/۴۵±۸/۳۴	۵۸/۲±۸/۲	۶۲/۳۴±۴/۳۰	۶۰/۸۸±۷/۳۲	۵۸/۲±۸/۲
	کنترل تزریقی	۵۹/۲۴±۷/۲۵	۵۷/۶±۶/۲۵	۶۱/۱۲±۶/۴۸	۵۸/۴±۶/۷	۵۷/۶±۶/۲۵
فعالیت کمپلمان (U/ml)	تیمار خوراکی	۳۵±۴/۲۵۵	۲۹±۴/۲۷۶	۳۱±۴/۲۷۲	۳۴±۴/۲۶۴	۳۶±۴/۲۴۳
	تیمار تزریقی	۳۲±۵/۲۷۶	* ۴۴±۸/۳۲۴	* ۴۳±۶/۳۱۱	۳۶±۵/۲۹۵	۲۹±۲/۲۷۵
	کنترل خوراکی	۳۷±۶/۲۶۵	۳۲±۵/۲۷۵	۴۲±۶/۲۶۵	۲۶±۴/۲۴۶	۲۷±۶/۲۶۵
	کنترل تزریقی	۴۱±۱۵/۲۶۲	۳۴±۳/۲۸۹	۳۳±۱۵/۲۴۵	۲۷±۱۵/۲۶۶	۴۲±۱۵/۲۵۵
فعالیت NBT (جذب نوری)	تیمار خوراکی	۰/۴۵±۰/۰۵	۰/۵۲±۰/۰۴	۰/۵۹±۰/۰۵*	۰/۵۷±۰/۰۵*	۰/۵۳±۰/۰۵
	تیمار تزریقی	۰/۵۱±۰/۰۵	* ۰/۸۲±۰/۰۶	۰/۷۸±۰/۰۷*	۰/۶۳±۰/۰۷*	۰/۵۲±۰/۰۸
	کنترل خوراکی	۰/۴۸±۰/۰۳	۰/۵±۰/۰۳	۰/۴۸±۰/۰۶	۰/۴۸±۰/۰۴	۰/۵۰±۰/۰۵
	کنترل تزریقی	۰/۴۷±۰/۰۴	۰/۴۸±۰/۰۶	۰/۴۴±۰/۰۵	۰/۴۴±۰/۰۴	۰/۵۲±۰/۰۷

نتایج

آزمایشات ایمنی‌شناسی: تجویز تزریقی عصاره سرخارگل باعث افزایش میزان فعالیت لایزوزیم سرم در روزهای ۱۰، ۲۰ و ۳۰ پس از تزریق گردید ($p<0/05$)، در صورتیکه تجویز خوراکی سرخارگل علیرغم افزایش نسبی، تفاوت معنی‌داری در میزان فعالیت لایزوزیم در مراحل مختلف نمونه گیری ایجاد نکرد ($p>0/05$).

تجویز عصاره سرخارگل در هر دو روش خوراکی و تزریقی، افزایش قدرت باکتری‌کشی سرم ماهی آمور را باعث شد. بطوریکه در تیمار تزریقی در هر سه مرحله نمونه‌گیری و در تیمار خوراکی در روز ۳۰ و ۴۰ افزایش معنی‌دار قدرت باکتری‌کشی سرم در مقایسه با تیمار کنترل مشاهده گردید($p<0/05$).

تجویز تزریقی عصاره سرخارگل باعث افزایش فعالیت کمپلمان سرم در روزهای ۱۰ و ۲۰ بعد از تجویز گردید ($p<0/05$)، در صورتیکه تجویز خوراکی تغییر معنی‌داری در میزان فعالیت کمپلمان نداشت ($p>0/05$).

میزان احیای نیتروبلوتترازولیوم نیز در تیمار تزریقی ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز بعد از تزریق عصاره سرخارگل افزایش معنی‌داری نسبت به کنترل داشت، و در تیمار خوراکی نیز این افزایش در روزهای ۲۰ و ۳۰ بعد از نمونه گیری مشاهده شد ($p<0/05$).

چالش باکتریایی: تجویز خوراکی و تزریقی عصاره سرخارگل در ماهی امور باعث افزایش معنی‌دار مقاومت ماهی نسبت به چالش با باکتری آئروموناس هیدروفیلا گردید ($p<0/05$). بطوریکه تلفات بعد از چالش ۱۴ روز بعد از تزریق در تیمارهای کنترل برابر ۱۰۰٪ بود، در صورتیکه در تیمار خوراکی و تزریقی به ترتیب برابر ۷۵٪ و ۴۰٪ بود.

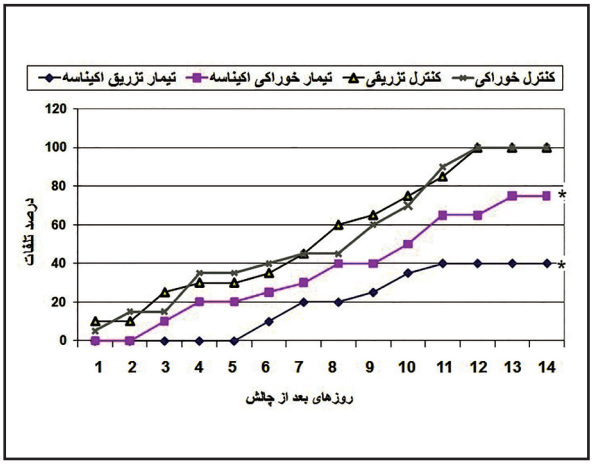
آزمایشات هماتولوژی: در این تحقیق حجم فشرده گلبولی (هماتوکریت)، تعداد گلبول‌های قرمز و میزان هموگلوبین در هیچ کدام از تیمارهای تزریقی و خوراکی در مراحل مختلف نمونه گیری نسبت به گروه کنترل تغییر معنی‌داری نشان نداد ($p>0/05$).

در تیمار تزریقی سرخارگل، افزایش تعداد گلبول‌های سفید خونی در ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز بعد از تزریق سرخارگل نسبت به گروه شاهد مشاهده‌گردید ($p<0/05$)، ولی در تیمار خوراکی سرخارگل، تغییر معنی‌داری در تعداد گلبول‌های سفید خونی نسبت به تیمار شاهد مشاهده نگردید ($p>0/05$).

شمارش تفریقی و نسبت گلبول‌های سفید در تیمارهای مختلف نشان داد که نسبت نوتروفیل در تیمار تزریقی در روزهای ۱۰، ۲۰ و ۳۰ نمونه گیری و در تیمار خوراکی در روز ۳۰ و ۴۰ نمونه‌گیری بطور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافت ($p<0/05$). برعکس کاهش نسبت لنفوسیت‌ها در تیمارهای فوق مشاهده گردید. نسبت ائوزینوفیل و مونوسیت تحت تأثیر تجویز خوراکی و تزریقی سرخارگل قرار نگرفت ($p>0/05$).

بحث

از آنجا که ماهی کپور علفخوار یا آمور یکی از ماهی‌های با ارزش اقتصادی بالا در صنعت آبزی‌پروری کشور می‌باشد، تلاش در افزایش قدرت ایمنی این ماهی در برابر بیماری‌های متعدد بخصوص بیماری ناشناخته چندین سال اخیر این گونه، که تلفات شدیدی را ایجاد نموده است اهمیت ویژه‌ای دارد. اخیراً استفاده از محرک‌های ایمنی در ماهی‌های پرورشی جهت افزایش فعالیت مکانیسم‌های دفاع غیراختصاصی و ایجاد



نمودار۱. تلفات بعد از چالش باکتریایی ماهی آمور بعد از تجویز خوراکی و تزریقی عصاره سرخارگل. تفاوت معنی‌دار با کنترل در سطح ۵٪ با علامت * مشخص شده است.

مقاومت در مقابل بیماری‌ها رایج شده‌است. این مواد به عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی بیوتیک‌ها معرفی شده‌اند (۲۵). از جمله محرک‌های ایمنی با منشأ گیاهی، گیاه سرخارگل می‌باشد که دارای اثرات ضدالتهابی، تقویت‌کننده سیستم ایمنی و اثرات ضدباکتریایی است. پلی‌ساکاریدهای موجود در اکیناسه عامل اصلی خاصیت محرک ایمنی آن شناخته شده‌اند (۷،۳۰). در این تحقیق نیز اثرات عصاره این گیاه در تحریک سیستم ایمنی غیراختصاصی ماهی آمور مشاهده شد. نتایج این تحقیق گویای تأثیر این گیاه در روش تزریقی و خوراکی بر برخی فاکتورهای ایمنی غیراختصاصی ماهی کپور علفخوار بود. بطوریکه افزایش میزان فعالیت لیزوزیم سرم که یکی از معتبرترین آزمایشات بررسی فعالیت ایمنی غیراختصاصی ماهی می‌باشد را باعث شده‌است. در این تحقیق تجویز داخل صفاقی عصاره سرخارگل در ماهی کپور علفخوار باعث افزایش فعالیت لایزوزیم در مراحل مختلف نمونه‌گیری شده‌است ($p<۰/۰۵$) که بیشترین افزایش در فاصله ۲۰ روز بعد از تزریق بوده‌است و بعد از روز ۲۰ کاهش تدریجی میزان فعالیت لایزوزیم مشاهده شد که با توجه به حذف تدریجی عصاره سرخارگل تزریقی، کاهش اثرات آن قابل توجیه است. نتایج مشابهی از تزریق لوامیزول در ماهی قزل آلا نیز حاصل شده‌است (۱۴). افزایش فعالیت لایزوزیم در شرایط مختلفی که توسعه فعالیت دفاع ایمنی ماهی را می‌طلبد (مثل عفونت‌ها، استرس‌های شدید محیطی) نیز گزارش شده است (۱۵). افزایش فعالیت لایزوزیم بعد از تجویز محرک‌های ایمنی (۳)، واکسن‌ها و برخی پروبیوتیک‌ها (۲۹،۳۰) به اثبات رسیده–است. در این شرایط افزایش میزان لایزوزیم سرم می‌تواند بدلیل افزایش تعداد و درصد سلول‌های تولیدکننده لایزوزیم از جمله نوترفیل در خون باشد (۲۸) که نتایج حاصل از شمارش تفریقی گلبول‌های سفید در این تحقیق خود موید این مطلب است. تجویز خوراکی سرخارگل بمدت ۴۰ روز تغییر معنی‌داری در میزان لایزوزیم سرم نسبت به تیمار کنترل ایجاد ننموده است ($p>۰/۰۵$). هر چند افزایش نسبی میزان فعالیت لایزوزیم در این تیمار مشاهده شد. البته نتایج مشابهی از عدم تأثیر برخی از محرک‌های ایمنی در روش خوراکی نیز گزارش‌شده است (۲۵). علل متعددی برای تفسیر این یافته می‌توان ذکر نمود که از آن جمله تغییر ماهیت این ماده در دستگاه گوارش ماهی به علت فرآیندهای هضم مکانیکی و آنزیمی قبل از جذب شدن به خون می‌باشد در صورتیکه ماده مؤثره این گیاه در روش تزریقی بطور مستقیم در اختیار سیستم ایمنی قرار گرفته است. علت دوم به غلظت عصاره سرخارگل و دوره زمانی در معرض قرارگیری عصاره می‌توان اشاره نمود. تأثیر عصاره سرخارگل بر لایزوزیم سرم را در روش تزریقی را می‌توان به مواد محرکه موجود در گیاه بویژه فلاونوئیدها و آلکالوئیدها نسبت داد این مواد با افزایش تولید برخی سایتوکین‌های تأثیر گذار در پاسخ ایمنی باعث ارتقای پاسخ ایمنی ماهی می‌گردند (۱۰). کلیه ارتباطات ایمنی توسط میانجی‌هایی به نام سایتوکین‌ها انجام می‌گیرد و گزارشات فراوانی از افزایش تولید این سایتوکین‌ها بدنبال استفاده از عصاره‌های گیاهی وجود دارد (۴).

از نکات مهم در استفاده از مواد محرک ایمنی یافتن دوز مناسب و طول دوره مجاورت با ماده محرک ایمنی می‌باشد بطوریکه کاهش یا افزایش دوز و یا طول دوره مجاورت (خارج از محدوده مناسب) سبب کاهش پاسخ‌های ایمنی یا سرکوب ایمنی می‌شود (۲۵).

قدرت باکتری‌کشی سرم که وضعیت ایمنی هومورال غیراختصاصی سرم در برابر عفونت‌های باکتریایی را نمایان می‌سازد، در این تحقیق مورد بررسی قرارگرفت. تجویز عصاره در هر دو روش خوراکی و تزریقی باعث افزایش قدرت باکتری‌کشی (باکتری آنروموناس هیدروفیلا) سرم گردید. بطوریکه در تیمار تزریقی در روزهای ۱۰، ۲۰ و ۳۰ بعد از تزریق عصاره سرخارگل، افزایش قدرت باکتری‌کشی سرم مشاهده گردیده‌است ($p<۰/۰۵$). در تیمار خوراکی نیز تجویز سرخارگل باعث افزایش تاخیری قدرت باکتری کشی سرم در روزهای ۳۰ و ۴۰ بعد از شروع تیمار گردیده‌است ($p<۰/۰۵$). لذا می‌توان نتیجه گرفت که تجویز عصاره سرخارگل چه به روش خوراکی و چه به روش تزریقی، افزایش قدرت باکتری‌کشی سرم را در ماهی علفخوار باعث می‌شود. احتمالا افزایش برخی فاکتورهای هومورال غیر اختصاصی مثل لیزوزیم، کمپلمان، آنتی بادی‌های طبیعی، پروتئین واکنشی C، آگلوتینین‌ها علت این افزایش قدرت باکتری‌کشی بوده است. با توجه به عدم تغییر فعالیت لایزوزیم و افزایش قدرت باکتری‌کشی سرم در تیمار خوراکی سرخارگل می‌توان فاکتورهای دیگر ایمنی هومورال غیراختصاصی، به‌جز لایزوزیم را در افزایش قدرت باکتری‌کشی سرم در روش خوراکی مؤثر دانست. افزایش تاخیری قدرت باکتری‌کشی سرم در تیمار خوراکی نسبت به تیمار تزریقی را می‌توان به روند اثر این دو روش نسبت داد. در روش تزریقی به علت دسترسی سریع مکانیسم‌های ایمنی به عصاره در سه مرحله اول نمونه گیری افزایش قدرت باکتری‌کشی سرم مشاهده شده است و در مراحل بعد کاهش یافته است، ولی در روش خوراکی قدرت باکتری‌کشی به‌تدریج افزایش یافته و در دو مرحله آخر

نمونه‌گیری این افزایش معنی‌دار گردیده‌است.

آزمایش احیای NBT یک آزمایش سریع برای تشخیص توانایی سلول‌های بیگانه‌خوار خون ماهی در تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در روند انفجار تنفسی می‌باشد. در تحقیق جاری تجویز تزریقی و خوراکی عصاره سرخارگل باعث افزایش احیای NBT گردید، که گویای بهبود فرآیند بیگانه خواری و انفجار تنفسی در این تیمارها می‌باشد.در تحقیق مشابه تزریق عصاره گیاه Ocimum sanctum افزایش احیای NBT را باعث شد، همچنین Gopalakannan و Venkatesan در سال ۲۰۰۶ نیز تجویز کیتین و کیتوزان را عامل افزایش احیای NBT و بهبود بیگانه‌خواری ماهی کپور گزارش نمودند (۱۲). Ispir و Dorucu در سال ۲۰۰۵ نیز افزایش بیگانه خواری و احیای NBT را بعد از تجویز محرک ایمنی لوامیزول گزارش نمودند (۱۴).

پروتئین‌های کمپلمان نیز یکی از فاکتورهای ایمنی غیر اختصاصی هستند که تأثیر بسزایی در پاسخ ایمنی ماهی دارند. افزایش فعالیت کمپلمان بدنبال استفاده از محرک‌های ایمنی غیراختصاصی به کرات گزارش شده‌است (۲۹). در این تحقیق تجویز تزریقی عصاره سرخارگل باعث افزایش فعالیت کمپلمان در روزهای ۱۰ و ۲۰ بعد از تزریق عصاره سرخارگل گردید. گزارشات متعددی از افزایش فعالیت کمپلمان بدنبال استفاده از محرک‌های ایمنی وجود دارد (۱۶،۲۴). البته گزارشاتی نیز از عدم تأثیر تجویز خوراکی عصاره‌ها بر میزان فعالیت کمپلمان نیز وجود دارد (۸،۲۶). در تحقیقی مشابه Pourgholam و همکاران در سال ۲۰۱۳ اثر ایمنی‌زایی عصاره سرخارگل را بر افزایش مقاومت ماهی قزل آلا در برابر بیماری استرپتوکوکوزیس گزارش نمودند، آن‌ها نیز افزایش گلبول‌های سفید خونی و فعالیت لایزوزیم سرم را گزارش نمودند (۲۲).

در تحقیق جاری حجم فشرده گلبولی (PCV) و تعداد گلبول‌های قرمز و میزان هموگلوبین در هیچکدام از تیمارهای تزریقی و خوراکی تغییر معنی‌داری نسبت به تیمار کنترل نشان نداد ($p>0/05$). این نتایج نشان‌دهنده عدم تأثیر سرخارگل بر فاکتورهای خونی مربوط به گلبول‌های قرمز می‌باشد. البته فاکتورهای خونی حیوانات خونسرد بویژه ماهی بر خلاف حیوانات خونگرم بطور قابل توجهی تحت تأثیر فاکتورهای مختلف، مثل استرس، دما، فصل، تغذیه و.... قرار گرفته و تابلوی خونی شاخص خوبی برای بررسی وضعیت سلامت یا ایمنی ماهی بشمار نمی‌رود (۱۵) در مورد تأثیر محرک‌های ایمنی بر فاکتورهای هماتولوژی تحقیقات متعددی انجام شده‌است. ولی نتایج متفاوتی از تأثیر محرک‌های ایمنی بر فاکتورهای هماتولوژی ماهی گزارش گردیده‌است، بطوریکه برخی از محققین بی تأثیر بودن کاربرد محرک‌های ایمنی بر فاکتورهای هماتولوژیک ماهی را گزارش نموده (۲۵) در صورتیکه برخی برعکس تغییر برخی فاکتورهای هماتولوژیک را در اثر استفاده از برخی از محرک‌های ایمنی مثل ویتامین C را گزارش نموده‌اند (۱۶،۱۹). برخی گزارشات حاکی از تأثیر سوء افزودنی‌های خوراکی بر شاخص‌های خونی ماهی می‌باشدرفرانس، در صورتیکه از نتایج تحقیق جاری می‌توان عدم تأثیر سوء این عصاره در روش تزریقی و خوراکی بر شاخص‌های خونی ماهی کپور علفخوار را نتیجه گرفت. در تحقیق حاضر نتایج تعداد گلبول‌های سفید خونی ماهی در تیمار تزریقی و خوراکی متفاوت بود. بطوریکه در تیمار تزریقی سرخارگل، افزایش تعداد گلبول‌های سفید خونی در روزهای ۱۰، ۲۰ و ۳۰ بعد از تزریق نسبت به گروه شاهد مشاهده‌گردید ($p<0/05$). ولی در تیمار خوراکی سرخارگل ، تغییر معنی‌داری در تعداد گلبول‌های سفید خونی نسبت به تیمار شاهد مشاهده نگردید. گلبول‌های سفید یکی از مهم‌ترین سلول‌هایی هستند که می‌توانند واکنش‌های ایمنی غیراختصاصی را در ماهیان تحریک‌کنند (۲۷) بنابراین با توجه به نقش گلبول‌های سفید خونی در سیستم دفاعی ماهی، تغییر تعداد این سلول‌ها تحت تأثیر محرک‌های ایمنی منطقی به‌نظر می‌رسد. از طرفی بسیاری از فاکتورهای ایمنی هومورال غیر اختصاصی ماهی توسط گلبول‌های سفید خونی ترشح می‌شوند، که افزایش این فاکتورهای هومورال تحت تأثیر افزایش تعداد لکوسیت‌های خونی بوده‌است. البته در مورد عدم تغییر تعداد لکوسیت‌ها در تیمار خوراکی سرخارگل، عدم تأثیر مناسب مواد مؤثره گیاه سرخارگل بعد از فرایند هضم و جذب گوارشی می‌تواند علت اصلی باشد، البته در عدم تأثیر، دوز سرخارگل نیز می‌تواند دخالت داشته باشد. افزایش تعداد گلبول‌های سفید خونی در عفونت‌های طبیعی و تجربی و در مواقع استفاده از واکسن‌ها و محرک‌های ایمنی متعدد گزارش شده‌است که نتایج مشابهی از این تحقیق گزارش شده‌است (۱۵،۱۶،۱۸). شمارش تفریقی و نسبت گلبول‌های سفید در تیمارهای مختلف نشان‌داد که علاوه بر افزایش تعداد لکوسیت‌ها، بطور کلی نسبت نوتروفیل‌هادر تیمار تزریقی (در روزهای ۱۰، ۲۰ و ۳۰) و تیمار خوراکی (روزهای ۳۰ و ۴۰) بطور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافته‌است که نتایج مشابهی از تحقیقات Selvaraj و همکاران در سال ۲۰۰۵ بعد از استفاده از بتا گلوکان در کپور گزارش‌گردید (۲۵). بر عکس کاهش نسبت لنفوسیت‌ها در تیمارهای فوق مشاهده شد، که با توجه به تأثیر بیشتر لنفوسیت‌ها در ایمنی اختصاصی و تحریک ایمنی غیراختصاصی توسط محرک‌های ایمنی این کاهش قابل توجیه‌است. که این نتایج با یافته‌های محققین دیگر در سایر ماهی‌ها مطابقت دارد (۱۷،۲۶).

بعنوان نتیجه‌گیری کلی و بر اساس یافته‌های این تحقیق می‌توان ادعا نمود که عصاره گیاه سرخارگل در روش خوراکی و تزریقی باعث تحریک برخی فاکتورهای ایمنی غیراختصاصی در ماهی کپور علفخوار می‌شود. از طرفی استفاده از عصاره اکینا سه به‌روش تزریقی تحریک ایمنی بیشتری نسبت به روش خوراکی در ماهی آمور می‌نماید و استفاده از این ماده تأثیر سوئی بر شاخص‌های خونی ماهی کپور علفخوار ندارد و می‌تواند به عنوان یک کاندید مناسب محرک ایمنی گیاهی در این ماهی مطرح باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی معاونت پژوهشـی دانشگاه شهید چمران اهـواز و از محـل پژوهانه نویسـندگان انجام گرفت. نگارنـدگان مقاله از همکاری دکتر مسعود قربانپور اسـتاد دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز در انجام آزمایشـات ایمنی شناسـی تحقیق صمیمانه تشکر می‌نمایند.

References

1. Alishahi, M., Karamifar, M., Mesbah, M., Zarei, M. (2014) Hemato-immunological responses of Heros severus fed diets supplemented with different levels of Dunaliella salina. Fish. Physiol. Biochem. 40: 57-65. DOI 10.1007/s10695-013-9823-5.
2. Alishahi, M., Ranjbar, M.M., Ghorbanpour, M., Peyghan, R., Mesbah, M., Razi jalali, M. (2010) Effects of dietary Aloe vera on specific and non-specific immunity in the *Cyprinus carpio*. J Vet Res. 2: 85-94.
3. Alvarez pellitero, P., Stija Bobadilla, A., Bermuolez, R., Quiroga, M.I. (2006) Levamisole activates several innate immune factors in Scophthalmus moximus (1) (Teleostei). J Immunopathol Pharmacol. 19: 727-738.
4. Ardo, L., Yin, G., Xu, P., Varadi, L., Szigeti, G., Jeney, Z., Jeney, G. (2008) Chinese 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.
5. Barnes, A.C., Young, F.M., Horne, M.T., Ellis, A.E. (2003) Streptococcus iniae: serological differences presence of capsule and resistance to immune serum killing. Dis Aquatic Org. 53: 241-247.
6. Bauer, R. (1996) Echinacea drugs-effects and active ingredients. (Article in German). Zeitschrift fur arztliche fortbildung (Jena). 90: 111-115.
7. Bauer, R., Wagner, H. (1991) Echinacea species as potential immunostimulatory drugs. In: Wagner H, Farnsworth NR, eds. Economic Med Plants Res. London, UK, Academic Press. 5: 253-321.
8. Baulny, M.O.D., Quentel, C., Fournier, V., Lamour, F., Gouvello, R.L. (1996) Effect of long-term oral administration of β 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.
9. Bone, K. (1997) Echinacea: what makes it work?. Alt Med Rev. 2: 87-93.
10. Ellis, A.E. (1990) Lysozyme assay. In: Techniques in Fish Immunology. Stolen, J.S., Fletcher, D.P., Anderson, B.S., Robertson, B.S. (eds.). SOS Publication, Fair Haven, NJ. p. 101-103.
11. Feldman, B.F., Zinkl, J.G., Jain, N.C. (2000) Schalm's Veterinary Hematology. (5th ed.) Lippincott Williams & Wilkins. London, UK.
12. Goldhaber-Fiebert, S., Kemper, K.J. (1999) Echinacea (E. angustifolia, E. pallida, E purpurea). (1st ed.) The Longwood Press. London, UK.
13. Gopalakannan, A., Venkatesan, A. (2006) Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of Aeromonas hydrophila infection in ponds. Aquaculture. 255: 179-187.
14. Ispir, U., Dorucu, 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.
15. Iwama, G., Nakanishi, T. (1996) The Fish Immune System. (1st ed.) Academic Press, London. UK, Chapter 3: innate Immunity in fish. p. 73-114.
16. Kajita, Y., Sakai, M., Atsuta, S., Kobayash, M. (1991) The immunonodulatory effects of levamisole on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Fish Pathol. 25: 93-8.
17. Khaksary Mahabady, M., Ranjbar, R., Arzi, A., Papahn, A.A., Najafzadeh, H. (2006) A comparison study of effects of Echinacea extract and levamisole on phenytoin-induced cleft palate in mice. Regul Toxicol Pharmacol. 46: 163-166.
18. Klontz, G.W. (1994) Fish hematology. In: Techniques in Fish Immunology. Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Rowley, A.F., Kelikoff, T.C., Kaatari,

S.L., Smith, S.A. (eds.). (1st ed.) Vol. 3. SOS Publications, Fair Haven, New Jersey, USA. p. 121-132.

19. Marian, M.P. (2014) Growth and immune response of juvenile greasy groupers (Epinephelus tauvina) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against Vibrio harveyi infections. Aquaculture. 237: 9-20.
20. Obach, A., Quentel, C., Bandin, L.F. (1993) Effects of alpha-tocopherol and dietary oxidized fish oil on the immune response of sea bass Dicentrarchus labrax. Dis Aquat Org. 15: 175-185.
21. O'Hara, M., Kiefer, D., Farrell, K., Kemper, K. (1998) A review of 12 commonly used medicinal herbs. Arch Fam Medicine. 7: 523-35.
22. Pourgholam, R., Sharif Rohani, M., Safari, R., Saeeidi, A.A. (2013) Binaeei M.(5); Najafeyan REffect of *Echinacea purpurea* extract on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and its resistance to Streptococcusis. Iran Sci Fish J. 22: 1-13.
23. Rao, V., Chakrabarti, R. (2009) Stimulation of immunity in Indian major carp (*Catla catla*) with herbal feed ingredients. Fish Shellfish Immunol. 18: 327-334.
24. Reverter, M., Bontemps, N., Lecchin, D., Banaigs, B. (2014) Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. Aquaculture. 433: 50-61.
25. Sakai, M. (1999) Current research status of fish immunostimultants. Aquaculture. 172: 63-92.
26. 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.
27. Soltani, M. (2007) Fish and Shellfish Immunology. (1st ed.) University of Tehran Press. Tehran, Iran.
28. Soltani, M., Pourgholam, R. (2007) Lysozyme activity of grass carp (Ctenopharingodon idella) following exposure to sublethal concentrations of organophosphate, diazinon. J Vet Res. 62: 49-52.
29. Swain, P.S., Dash, P.K., Sahoo. P., Routra, 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.
30. Taghizadeh, M., Jarvandi, S., Yasa, N. (2002) Overview of *Echinacea purpurea*. J Med Plant. 4: 13-25.
31. 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*). Fish Physiol Biochem. 33: 93-101.
32. Zapata, A., Diez, B., Cejalov, T., Gutierrez-defrias, C., Cortes, A. (2006) Ontogeny of immune system of fish. Fish Shellfish Immunol. 20: 126-136.

Comparison of oral and parenteral injection administration of *Echinacea purpurea* on some immunological and hematological paramers of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)

Alishahi, M.[1*], Mesbah, M.[1], Shirali, T.[2]

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

[2]*Graduated Student in Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran*

(Received 14 February 2017, Accepted 8 April 2017)

Abstract:

BACKGROUND: Herbal immunostimulants have numerous potential benefits in comparison to vaccines and drugs like antibiotics in aquaculture. **OBJECTIVES:** In this study, effects of administration of *Echinacea purpurea* in oral and intra peritoneal routs on some hematological and immunological parameters of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) were investigated. **METHODS:** A total of 240 healthy juvenile grass carp were randomly divided into four equal groups in triplicates. Group 1 received 400 mg/kg b.w. Echinacea in intra peritoneal injection. Group 2 received 0.5% Echinacea in their daily food. Group 3 and 4 were considered as injection control and oral control, respectively. Fish were bled on day 0, 10, 20, 30 and 40 of study. Sera samples were assayed for immunological parameters: lysozyme activity, serum bactericidal activity, complement activity and NBT reduction assay. Blood samples were also used for hematological parameters: (PCV, Hb, RBC, WBC and Leukocyte differentiated count). **RESULTS:** Results showed that serum lysozyme and bactericidal activity as well as complement and NBT reduction activity were significantly higher in i.p. treatment than the control group ($p<0.05$), while in oral treatment bactericidal and NBT reduction activity increased significantly on days 30 and 40 ($p<0.05$). Hematological assay shows no significant differences in PCV, Hb and RBC values at each sampling period in oral and injection compared to controls ($p>0.05$) but WBC count and rate of heterophils showed an increase in injection treatment group compared with the control ($p<0.05$). Mortality rate after challenged with *A. hydrophila* decreased in Echinacea treated treatments. **CONCLUSIONS:** This study indicates that administration of *E. purperea* stimulates some nonspecific immune responses in grass carp and therefore it can be recommended as an herbal immunostimulant in fish.

Keyword: *Echinacea purpurea*, *Ctenopharyngodon idella*, hematological parameter, immunological parameters

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Hematological parameters of grass carp following oral and injection administration of *Echinacea purpurea* extract. Data showed as Mean± SD and Significant differences ($p<0.05$) are marked by *.

Table 2. Immunological parameters of grass carp following oral and injection administration of *Echinacea purpurea* extract. Data showed as Mean± SD and Significant differences ($p<0.05$) are marked by *.

Figure 1. Cumulative mortality of grass carp challenged with *A. hydrophila* following oral and injection administration of E.purpurea. (* Showed significant differences with control group, $p< 0.05$).

***Corresponding author's email: alishahimoj@gmail.com, Tel: 061-33738385, Fax: 061-33360807**