مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۱، دوره ۶۷، شماره ۲، ۱۴۲-۱۳۵

اثرات تحریک ایمنی و رشد لوامیزول، ارگوسان و سه عصاره گیاهی در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

مجتبی علیشاهی[1*] مهدی سلطانی[2] مهرزاد مصباح[1] اشکان زرگر[2]

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 آذر ماه ۱۳۹۰ ، پذیرش نهایی: ۸ اسفند ماه ۱۳۹۰)

چکیده

زمینه مطالعه: بهبود کارایی سیستم ایمنی ماهی یکی از روش های مهم پیشگیری از بیماری‌ها و تحریک رشد می باشد. در بین محرک های ایمنی، انواع طبیعی بویژه عصاره های گیاهی، به علت ایجاد آسیب کمتر به ماهی و محیط زیست اخیرا بیشتر مورد توجه بوده اند. **هدف:** در این تحقیق اثرات تحریک رشد و ایمنی دو ماده ارگوسان و لوامیزول با سه عصاره گیاهی سرخارگل *Echinacea purpurea*، کندر *Boswellia thurifera* و آویشن *Zataria multiflora* در ماهی کپور معمولی مورد بررسی قرار گرفت. **روش کار:** بدین منظور تعداد ۴۵۰ قطعه ماهی کپور معمولی (وزن ۱/۲۲g±۱۱/۱۲) به ۶ تیمار در سه تکرار تقسیم گردیدند: ۱- اکیناسه ۲- لوامیزول، ۳- آویشن، ۴- ارگوسان، ۵- کندر و ۶- کنترل. مواد مورد استفاده بصورت همگن با خوراک ماهی کپور مخلوط شده و به مدت ۶ هفته ماهی‌ها با خوراک مخصوص هر تیمار تغذیه گردیدند. شاخص های رشد در انتهای دوره بین تیمارهای مقایسه شده و بعد از خونگیری انتهای دوره فاکتورهای هماتولوژیک شامل هماتوکریت، هموگلوبین، تعداد گلبول های قرمز و سفید و اندیس های گلبولی (MCH، MCV و MCHC) بین تیمارها مقایسه گردید. ماهی های باقی مانده در روز ۴۲ تحقیق با باکتری زنده آئروموناس هیدروفیلا چالش داده شده و درصد تلفات بعد از چالش ثبت گردید. **نتایج:** تفاوت معنی‌داری در نرخ رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی در تمام تیمارها به جز تیمار آویشن، نسبت به تیمار شاهد وجود داشت ($p<0/05$). درصد تلفات بعد از چالش نیز در تمام تیمارها (به جز آویشن) کاهش معنی‌داری را نشان داد ($p<0/05$). در بین فاکتورهای خونی، فقط تفاوت معنی دار در تعداد گلبول های سفید خونی بین تیمارها مشاهده گردید ($p<0/05$). تعداد گلبول های سفید خونی در تیمار های اکیناسه، ارگوسان و لوامیزول به ترتیب برابر ۵۰۰mL±۷۷۵۰، ۵۹۰±۷۸۳۰ و ۸۱۰±۷۳۸۰ بود که بطور معنی‌داری از تیمار کنترل (۱۲۳mL±۶۳۸۰) بیشتر بود. سایر فاکتورهای خونی تحت تاثیر مواد مصرفی در تحقیق قرار نگرفتند. **نتیجه‌گیری نهایی:** دو عصاره گیاهی اکیناسه و کندر اثرات تحریک رشد و ایمنی قابل رقابت با ارگوسان و لوامیزول می‌باشند ولی عصاره آویشن تأثیری در رشد و مقاومت ماهی کپور معمولی ندارد.

واژه‌های کلیدی: ارگوسان، لوامیزول، سرخارگل، کندر، آویشن.

مقدمه

اخیرا استفاده از محرک‌های ایمنی در ماهی‌های پرورشی جهت افزایش فعالیت مکانیسم‌های دفاع غیر اختصاصی و ایجاد مقاومت در مقابل بیماری‌ها رایج شده است و بعنوان یک جایگزین مناسب برای آنتی بیوتیک‌ها معرفی شده اند. استفاده از آنتی بیوتیک‌ها از جهات مختلف تهدیدی برای انسان و محیط زیست می‌باشد. افزایش باکتری‌های مقاوم نسبت به آنتی بیوتیک‌ها، تخریب و تهدید محیط زیست بویژه در مواقعی که آنتی بیوتیک به آب‌های سطحی راه یابد، و عوارض جانبی این داروها بر بدن ماهی از جدی ترین تهدیدات استفاده از آنتی بیوتیک‌ها می‌باشند. (۱۲،۱۵). این محرک‌های ایمنی علاوه بر افزایش مقاومت در برابر بیماری‌ها، از طرق مختلف تحریک رشد را نیز باعث می‌شوند و از آنجا که افزایش رشد از مهمترین اهداف در آبزی پروری است، گرایش به استفاده از محرک‌های ایمنی و رشد روند فزاینده‌ای یافته است (۲۲).

در این تحقیق اثر دو محرک ایمنی و رشد (لوامیزول و ارگوسان) که گزارشات متعدد اثرات تحریک ایمنی آنها را به اثبات رسانده است، با سه عصاره گیاهی دارای اثرات تحریک ایمنی در حیوانات خونگرم (عصاره سرخارگل، آویشن و کندر) در ماهی کپور معمولی مقایسه گردیده است.

لوامیزول ابتدا بعنوان یک داروی ضدانگلی معرفی گردید، ولی امروزه از آن به عنوان یک ایمونوادجوانت نیز یاد می‌شود. اثرات تحریک ایمنی بدنبال تجویز لوامیزول به روش‌های مختلف، در ماهی کپور معمولی (۱۱)، قزل آلای رنگین کمان (۱۴)، سیم حلق کوتاه (۱۸) و سایر ماهی‌ها، گزارش گردیده است. بطوریکه امروزه استفاده از این دارو برای تحریک رشد و ایمنی ماهی رایج گردیده است (۴).

ارگوسان یک محصول جلبکی (حاصل از جلبک لامیناریا دیجیتاتا) است که حاوی حدود ۱٪ آلجینیک اسید و ۹۹٪ مواد حامل جلبکی می‌باشد. نقش آن در تحریک ایمنی و رشد ماهی و افزایش مقاومت در برابر استرس‌ها در گزارشات مختلف آورده شده است (۱۰،۱۹). آلجینیک اسید پلی ساکاریدی است که از دو نوع یورونیک اسید تشکیل شده است (۹). Gioacchini و همکاران در سال ۲۰۰۸ تظاهر بیشتر برخی ژن‌های

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

مربوط به پاسخ ایمنی و کاهش میزان کورتیزول سرم ماهی را بدنبال تجویز ارگوسان گزارش نمودند(۱۰). Peddie و همکاران در سال ۲۰۰۲ در سال در ماهی قزل آلا و Heidarieh و همکاران در سال ۲۰۱۰ در میگر اثر تحریک ایمنی و افزایش رشد و بازماندگی را بدنبال استفاده از ارگوسان گزارش نمودند(۱۳،۱۹).

در بین انواع محرک‌های ایمنی و رشد، محرک‌های ایمنی با منشاء گیاهی مزیت‌هایی از جمله عدم ایجاد مقاومت در عوامل بیماری‌زا، در دسترس بودن، خطر کمتر برای محیط و جانور و قیمت پایین تر را دارند (۷،۱۶،۲۰). گیاه سرخارگل *Echinacea pur purea* یکی از گیاهان دارای اثر تحریک ایمنی ثابت شده در حیوانات خونگرم بوده و افزایش کارایی سیستم ایمنی بدنبال تجویز فراورده‌های مختلف گیاه سرخارگل دراین حیوانات گزارش شده است(۶،۲۱،۲۶). اثرات این گیاه در تحریک ایمنی ماهی کپور علفخوار نیز تایید شده است(۴،۶).

«آویشن» از گیاهان تیره لابیاته ۲با نام علمی *Zataria multiflora* یکی از شناخته شده ترین گیاهان دارویی در طب سنتی ایران و اروپا می‌باشد. قسمت‌های درمانی این گیاه سرشاخه‌ها و برگ‌های خشک شده آن می‌باشد(۳۱). این گیاه علفی معطر دارای خواص دارویی بسیاری در دامپزشکی، از جمله اثرات ضد باکتریایی، ضد قارچی و تحریک ایمنی است (۳۱).

کندر (Boswellia thurifera) گیاهی دارویی است از راسته ناترک سانان (Sapindales) که دارای اثرات درمانی متعدد بویژه تحریک ایمنی است (۲۴). بطوری که در تحقیقات مختلف اثرات تحریک ایمنی و رشد فراورده‌های این گیاه بر سیستم ایمنی حیوانات خونگرم و انسان به کرات گزارش شده است (۸،۲۵). ولی اثرات استفاده از این گیاه در ماهی تا بحال بررسی نگردیده است.

ماهی کپور معمولی یکی از مهم‌ترین ماهیان پرورشی ایران و جهان است و بدلیل ویژگی‌های منحصر به فرد پرورشی تقریباً در تمام استان‌های دارای صنعت آبزی پروری (گرمابی) کشور کشت می‌شود. حوضه‌های دریای خزر، رودخانه تجن، رودخانه کارون و تمام حوضه‌های آبریز ایران پراکنش دارد. تلاش برای کاهش ضریب تبدیل غذایی و افزایش سرعت رشد و نیز افزایش مقاومت در برابر بیماری‌ها (بویژه عفونت‌های آئروموناسی) از مهمترین اهداف تحقیقات مرتبط با این گونه در دنیاست(۱۱). از اینرو در این تحقیق با توجه به گزارشات متعدد بهبود فاکتورهای رشد و تحریک پاسخ ایمنی توسط لوامیزول و ارگوسان در آبزیان مختلف، این اثرات در ترکیب اخیر با عصاره‌های گیاهی سرخارگل، آویشن و کندر که اثرات تحریک ایمنی آنها در آبزیان کمتر مورد توجه قرار گرفته است، مورد مقایسه قرار گرفتند.

مواد و روش کار

ماهی: تعداد ۴۵۰ قطعه بچه ماهی کپور معمولی (با وزن متوسط ۱/۲۲±۱۱/۱۲) از یکی از کارگاه‌های پرورش ماهیان گرمابی مجتمع پرورش ماهی آزادگان در اطراف شهرستان اهواز تهیه و به مدت یک هفته سازش‌دهی ماهی با شرایط آکواریوم و غذای دستی انجام شد.

مکان انجام تحقیق: تعداد ۱۸ آکواریوم ۱۰۰L در سالن آکواریوم تحقیقاتی بهداشت و بیماری‌های آبزیان در دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز برای انجام طرح در نظر گرفته شد. بعد از ضد عفونی و آماده‌سازی آکواریوم‌ها، آبگیری آنها صورت گرفت. شرایط فیزیکوشیمیایی آب مورد استفاده در تحقیق به قرار زیر بود. دما: ۱±۲۶ ^{o}C؛ اکسیژن محلول: ۸-۱۰ ppm؛ PH: ۷/۹±۰/۳ ؛ NO2< ۰/۰۱ ppm؛ NH3<۰/۱ppm و میزان تعویض روزانه آب ۱۰٪ حجم آب بود.

تهیه عصاره‌های کندر، آویشن و سرخارگل: تهیه عصاره‌ها در بخش فاماکولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز و آزمایشگاه فرماکوگنوزی دانشکده داروسازی دانشگاه جندی شاپور اهواز انجام شد. ۱۰۰g از هر گیاه جمع آوری شده، بعد از خشک نمودن در شرایط تاریکی، گیاهان آسیاب شده و پودر حاصل وزن گردید. سپس ۵ برابر وزن گیاه الکل به پودر حاصل اضافه شد. این مخلوط در ارلن به مدت ۳ روز در آزمایشگاه نگهداری گردید. ماده حاصل بوسیله مگنت مغناطیسی کاملاً مخلوط و بوسیله کاغذ صافی صاف گردید. عصاره الکلی خام بدست آمده با قیف بوخنر صاف شده و در بالن تقطیر ریخته شد، الکل عصاره خام در دستگاه تقطیر خارج شده و برای غلیظتر شدن، عصاره در بشر ریخته و در بنماری ۴۰ درجه قرار داده شد تا الکل آن بیشتر تبخیر گردد و غلظت عصاره به میزان مورد نظر برسد. دوز مصرفی عصاره‌ها و سایر محرک‌های ایمنی در این تحقیق ۰/۵٪ ماده خشک در خوراک مصرفی بود.

تهیه خوراک حاوی عصاره: میزان ۱۰۰g خوراک مخصوص ماهی کپور بر روی یک سینی گسترانیده شده و میزان مورد نیاز از هر ماده بر اساس اطلاعات منابع (برای عصاره‌ها و ارگوسان ۰/۵٪ خوراک و در مورد لوامیزول ۰/۲٪ خوراک) تنظیم گردید، بعد از حل شدن در آب (یا آب و الکل اتیلیک در مورد عصاره‌ها) به روی غذا اسپری گردید. این عمل بعد از بهم زدن خوراک چندین بار تکرار شده و سپس بمدت ۲۴ ساعت خوراک در هوای آزاد قرار داده شد، تا کاملاً خشک گردد. بعد از خشک شدن خوراک، اسپری ژلاتین برای حفظ ماده اضافه شده در آب روی خوراک صورت گرفت (در همه گروه‌ها) سپس خوراک‌ها، برچسب گذاری و تا زمان استفاده در یخچال ۴ ^{o}C نگهداری گردید.

تیمار بندی ماهی‌ها: ماهی‌ها بصورت کاملا تصادفی بصورت زیر بین ۱۸ آکواریوم ۱۰۰L (هر آکواریوم ۲۵ قطعه) تقسیم گردیدند. تیمارها شامل شش تیمار (هر تیمار در سه تکرار) به ترتیب زیر بود: ۱- تیمار ارگوسان، ۲- تیمار لوامیزول ۳- تیمار اکیناسه (سرخارگل)، ۴- تیمار آویشن، ۵- تیمار کندر و ۶- تیمار شاهد.

کلیه تیمارها با خوراک‌های مخصوص هر گروه به مدت ۶ هفته و با توجه به اشتهای ماهی‌های هر تیمار (حداکثر تا میزان روزانه ۴٪ وزن زنده

ماهی‌ها) تغذیه گردیدند.

آزمایشات انجام‌شده روی نمونه‌ها: وزن ماهی‌ها در هر تکرار در ابتدای تحقیق اندازه‌گیری شد. بعد از تغذیه تیمارها با خوراک‌های مشخص شده به مدت یک ماه، تعداد تلفات ماهی در طول تحقیق و وزن نهایی ماهی‌ها نیز ثبت گردید، میزان خوراک مصرفی هر تیمار نیز که بر اساس بیوماس و میزان اشتهای ماهی تنظیم می‌شد (حداکثر روزانه ۵٪) ثبت گردید.

بعد از اتمام تیمار و مشخص شدن وزن نهایی، وزن خوراک مصرف شده، فاکتورهای زیر در هر تیمار مشخص و ثبت گردید.

درصد افزایش وزن بدن: ۱۰۰ × [وزن اولیه / (وزن اولیه - وزن نهایی)] = درصد افزایش وزن بدن (Growth rate)

FCR یا ضریب تبدیل غذایی که از فرمول زیر محاسبه گردید: اختلاف وزن نهایی و وزن اولیه / میزان غذای مصرف شده= FCR (Food Conversion Rate)

نرخ رشد ویژه (SGR): زمان (روز) / (وزن اولیه - وزن نهایی) = SGR (Specific Growth Rate)

درصد بازماندگی یا میزان بقاء: ۱۰۰× [تعداد اولیه / (تعداد تلفات - تعداد اولیه)] =درصد بازماندگی (Survival Rate)

اندازه‌گیری پارامترهای خون‌شناسی: در انتهای دوره از هر تیمار از ۶ ماهی خونگیری شده و برای اندازه‌گیری پارامترهای خونشناسی نمونه‌ها از همان روش‌های معمول و متداول برای اندازه گیری پارامترهای خون‌شناسی ماهی استفاده گردید(۲۶). برای اندازه گیری هموگلوبین (Hb) از روش استاندارد سیانومت هموگلوبین، برای اندازه گیری هماتوکریت یا حجم فشرده گلبولی از روش میکروهماتوکریت استفاده شد. شمارش کلی گلبول‌های قرمز و گلبول‌های سفید به روش دستی و با استفاده از لام هماسیتومتر نئوبار انجام شد.

شاخص‌های گلبولی یعنی حجم متوسط گلبولی (MCV)، میزان متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH) و غلظت هموگلوبین گلبولی (MCHC) با استفاده از فرمول‌های استاندارد موجود محاسبه گردید.

MCV=(٪)هماتوکریت×۱۰/(ppm/m^3) تعداد گلبول‌های قرمز

MCHC=۱۰۰× (g/dL) هموگلوبین/ (٪) هماتوکریت

MCH=۱۰×(g/dL)هموگلوبین/(ppm/m^3) تعداد گلبول‌های قرمز

آلوده‌سازی با باکتری زنده: بعد از پایان دوره ۱۰ قطعه ماهی در هر تیمار با باکتری زنده آئروموناس هیدروفیلا به میزان دو برابر دوز ایجاد کننده ۵۰٪ تلفات به روش تزریق داخل صفاقی، تزریق گردیدند. به این منظور باکتری آئروموناس هیدروفیلا که در محیط TSB کشت داده شده بود به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰^{o}C انکوبه گردید، باکتری در فاز رشد لگاریتمی بوسیله سانتریفوژ از محیط جدا و در سرم فیزیولوژی استریل منتقل شد. با استفاده از لوله‌های مک فارلند غلظت باکتری در سرم فیزیولوژی به میزان ۲/۴×۱۰^{۷} تنظیم گردید تعداد تلفات روزانه به مدت یک هفته ثبت شده و در انتها تلفات تجمعی هر تیمار مشخص و مقایسه گردید.

نتایج

نتایج تحقیق در نمودارهای ۱ تا ۵ و جدول ۱ آورده شده است. همانطور که در نمودار ۱ قابل مشاهده است، بیشترین تلفات طول دوره در تیمار کنترل و آویشن دیده شد، ولی با وجود تفاوت ظاهری در بین تیمارها، تفاوت تلفات طول دوره بین تیمارها از نظر آماری معنی‌دار نبود($p>۰/۰۵$).

میزان رشد ویژه در تیمارهای مختلف در نمودار ۲ آورده شده است. میزان رشد ویژه در تیمارهای ارگوسان و لوامیزول افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نشان داد، در تیمار اکیناسه و کندر با وجود بهبود ضریب تبدیل غذایی، افزایش معنی‌دار نبود($p>۰/۰۵$).

مقایسه‌ی درصد افزایش وزن ماهیان تیمارهای مختلف در طی دوره پرورش ۶ هفته‌ای در نمودار ۳ آورده شده است. بیشترین درصد افزایش وزن در تیمار سرخارگل مشاهده گردید. در صورتی‌که کمترین میزان در تیمار آویشن و شاهد ثبت گردید. با تجویز این مواد با وجود ایجاد تفاوت ظاهری در درصد افزایش وزن ماهی کپور معمولی، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد($p>۰/۰۵$).

تجویز خوراکی عصاره‌ها تغییر ضریب تبدیل غذایی در تیمارها را نیز باعث شد($p<۰/۰۵$). تیمارهای ارگوسان، لوامیزول، اکیناسه(سرخارگل) و کندر به ترتیب کمترین ضریب تبدییل غذایی را داشتند، ولی تفاوت معنی‌داری بین دو تیمار آویشن و کنترل مشاهده نگردید($p>۰/۰۵$).

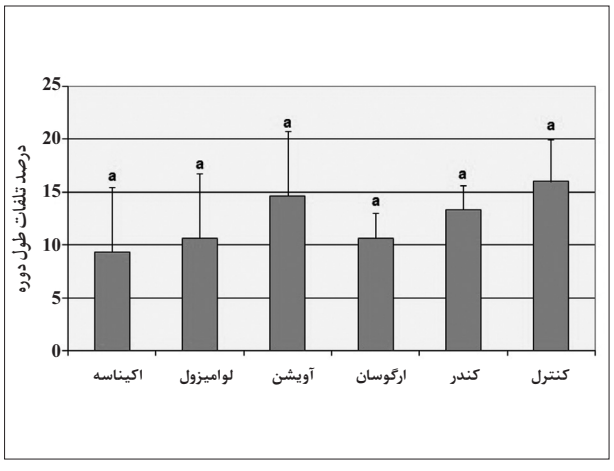
درصد تلفات بعد از چالش با باکتری زنده آئروموناس هیدروفیلا در تیمارهای مختلف در نمودار ۵ آورده شده است. تلفات بعد از چالش در تیمار ارگوسان، اکیناسه و لوامیزول کاهش معنی‌داری را نسبت به تیمار کنترل نشان داد($p<۰/۰۵$). آویشن و کندر تاثیری در میزان تلفات بعد از چالش ایجاد ننمودند($p>۰/۰۵$).

نتایج آزمایشات خون‌شناسی نمونه‌های اخذ شده از تیمارهای مختلف در جدول ۱ آورده شده است. نتایج نشان داد که هماتوکریت، هموگلوبین و تعداد گلبول قرمز تحت تاثیر تجویز محرک‌های ایمنی قرار نگرفته اند، ولی تعداد گلبول‌های سفید خونی در دو تیمار اکیناسه و ارگوسان بطور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است($p<۰/۰۵$). شاخص‌های گلبولی شامل حجم متوسط گلبولی (MCV)، میزان متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH) و غلظت هموگلوبین گلبولی (MCHC) نیز در بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند($p>۰/۰۵$).

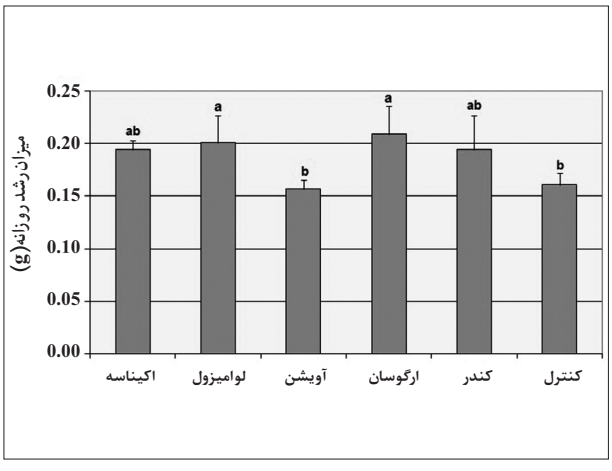
بیشترین تعداد گلبول سفید در تیمار ارگوسان و اکیناسه مشاهده گردید که نسبت به تیمار کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان داد($p<۰/۰۵$). در تیمار لوامیزول نیز افزایش نسبی در تعداد گلبول‌های سفید مشاهده شد، ولی در تیمار کندر و آویشن تاثیری مشاهده نگردید($p>۰/۰۵$).

بحث

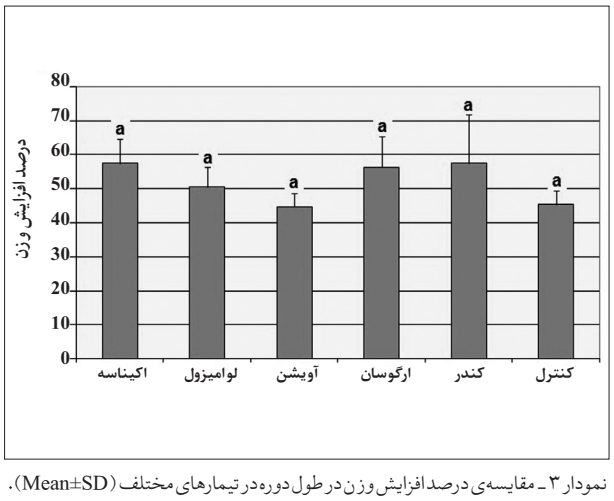
در این تحقیق علاوه بر تایید برخی اثرات تحریک ایمنی و رشد دو ماده



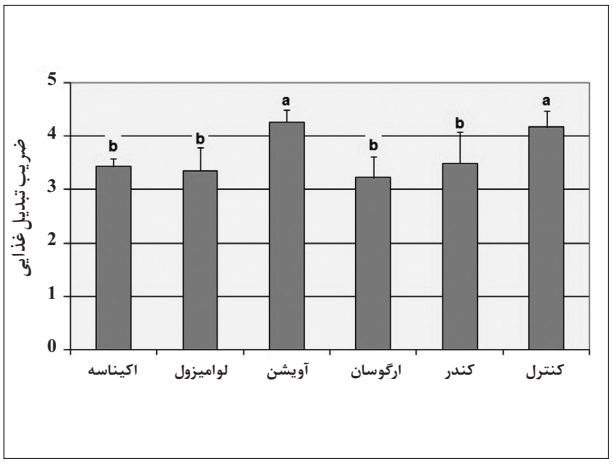
نمودار ۱ـ مقایسه درصد تلفات طول دوره بین تیمارهای مختلف (Mean±SD). حرف همنام روی میله انحراف معیار نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ بین میانگین‌هاست.



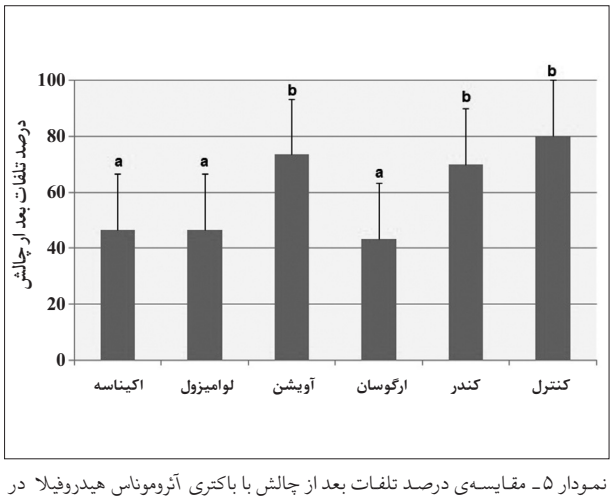
نمودار ۲ـ مقایسه‌ی میزان رشد روزانه در تیمارهای مختلف (Mean±SD). روف غیر همنام روی میله انحراف معیار نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.



نمودار ۳ـ مقایسه‌ی درصد افزایش وزن در طول دوره در تیمارهای مختلف (Mean±SD). حرف همنام روی میله انحراف معیار نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ بین میانگین‌هاست.



نمودار ۴ـ مقایسه‌ی ضریب تبدیل غذایی در تیمارهای مختلف (Mean±SD). حروف غیر همنام روی میله انحراف معیار نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.



نمودار ۵ـ مقایسه‌ی درصد تلفات بعد از چالش با باکتری آئروموناس هیدروفیلا در تیمارهای مختلف (Mean±SD). حروف غیر همنام روی میله انحراف معیار نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

ارگوسان و اکیناسه که در بسیاری از مقالات اثرات تحریک ایمنی و افزایش رشد آنها اثبات شده است (۴،۱۰،۱۱،۱۳،۱۹)، نشان داده شد که در برخی موارد اثرات عصاره‌های گیاهی استفاده شده مشابه این دو ماده است.

هر چند میزان بقای ماهی در بین تیمارها در طول دوره تحقیق تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ($p>0/05$)، ولی باید به این نکته توجه داشت که تاثیر محرک‌های ایمنی در میزان بقای ماهی معمولاً در دوره‌های طولانی‌تر (۶ ماه) باعث ایجاد تغییرات معنی‌دار می‌شود (۵،۱۱،۱۳،۱۴)، با این وجود کمترین تلفات در تیمار سرخارگل و ارگوسان مشاهده گردید، که تحریک ایمنی غیر اختصاصی را می‌توان دلیل این کاهش تلفات دانست.

در بین شاخص‌های رشد (میزان رشد ویژه، درصد افزایش وزن و ضریب تبدیل غذایی)، میزان رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی در بین تیمارها تفاوت معنی‌دار نشان دادند ($p<0/05$). این دو شاخص رشد در تیمارهای ارگوسان، لوامیزول، اکیناسه و کندر نسبت به گروه کنترل بهبود نسبی را نشان دادند، در صورتی که آویشن تاثیری در شاخص‌های رشد ماهی کپور

جدول ۱ـ مقایسه فاکتورهای خون شناسی بین تیمارهای مختلف (Mean±SD، حروف غیر همنام نشان دهنده‌ی تفاوت معنی دار در سطح ۰/۰۵ است).

پارامتر	سرخارگل	ارگوسان	لوامیزول	کندر	آویشن	کنترل
هماتوکریت (٪)	۳۵/۴۲±۳/۸۹ a	۳۶/۵۸±۴/۲۹ a	۳۴/۴۲±۳/۹۶ a	۳۶/۲۵±۴/۳۶ a	۳۶/۰۸±۵/۶۳ a	۳۴/۴۲±۵/۵۷ a
هموگلوبین(g/dl)	۷/۵۱±۰/۳۱ a	۷/۴۹±۰/۴ a	۷/۵۸±۰/۳۶ a	۷/۵۹±۰/۷ a	۷/۵۷±۰/۵۱ a	۷/۴۹±۰/۴۸ a
تعداد گلبول‌های قرمز ($\times 10^{6}$)	۱/۳۵±۰/۰۸ a	۱/۱۳±۰/۰۶ a	۱/۳۹±۰/۰۹ a	۱/۳۹±۰/۱ a	۱/۳۸±۰/۱۱ a	۱/۳۵±۰/۱۶ a
تعداد گلبول‌های سفید($\times 10^{3}$)	۷/۷۵±۰/۵۰ a	۷/۸۳±۰/۵۹ a	۷/۳۸±۰/۸۱ ab	۶/۶±۰/۴۳ b	۶/۸۱±۱/۳ b	۶/۲۸±۱/۲۳ b
(pg) MCH	۵۵/۷۴±۲/۹۷ a	۵۴/۳۱±۳/۵۵ a	۵۴/۷۳±۴/۵۶ a	۵۴/۷۶±۶/۷۵ a	۵۵±۶/۲۱ a	۵۵/۹۵±۶/۲۱ a
(fl) MCV	۲۶۲/۷۷±۲۷/۷ a	۲۶۵/۴۲±۳۵/۵ a	۲۴۸/۱۵±۲۸/۶ a	۲۶۱/۹۵±۴۲/۶ a	۲۶۱/۳۳±۴۰ a	۲۵۷/۵۴±۵۴/۶ a
(٪) MCHC	۲۱/۳۸±۲/۰۱ a	۲۰/۶۸±۲/۲۲ a	۲۲/۲۴±۲/۹۱ a	۲۱/۲۴±۳/۶۶ a	۲۱/۴۳±۳/۹۳ a	۲۲/۰۸±۲/۶۵ a

نداشت($p>0/05$). توجه به گزارشات مختلف از تحریک رشد و ایمنی متعاقب تجویز ارگوسان (۱۰،۱۳،۱۹) و لوامیزول (۴،۱۱،۱۸)، می‌توان ادعا نمود که عصاره گیاه سرخارگل و کندر نیز اثرات نسبتاً مشابه این دو ماده در ماهی کپور دارند. هر چند درصد افزایش وزن در بین تیمارها تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ($p>0/05$)، هرچند تفاوت ظاهری بین تیمارها قابل مشاهده است. احتمالاً برای مشاهده تاثیر مواد بر درصد افزایش وزن دوره‌های طولانی‌تر تجویز نیاز است.

تلفات بعد از چالش با باکتری زنده آئروموناس هیدروفیلا، در بین تیمارها نیز متفاوت بود($p<0/05$). کمترین تلفات به ترتیب در تیمار ارگوسان، سرخرگل و لوامیزول مشاهده گردید. در صورتیکه تلفات در تیمارهای آویشن و کندر تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نداشتند. با توجه به اثرات تحریک ایمنی لوامیزول (۱۴،۱۸) و ارگوسان (۱۹)، می‌توان ادعا نمود که عصاره سرخارگل دارای اثرات تحریک ایمنی و ایجاد مقاومت در برابر عفونت‌های باکتریایی، مشابه ارگوسان و سرخارگل می‌باشد. اثرات مشابه این عصاره در ماهی آمور (کپور علفخوار) نیز گزارش گردیده است (۲). نتایج این تحقیق در مورد عصاره سرخارگل، اثرات تحریک ایمنی مشابه حیوانات خونگرم (۶،۲۱،۲۶) در ماهی کپور را تایید می‌نماید.

در بین فاکتورهای هماتولوژی مورد بررسی (هماتوکریت، میزان هموگلوبین، تعداد گلبول‌های قرمز و تعداد گلبول‌های سفید)، تفاوت معنی‌دار فقط در تعداد گلبول‌های سفید خونی در بین تیمارهای مختلف مشاهده گردید. بطوریکه بیشترین تعداد گلبول سفید در تیمار ارگوسان و اکیناسه مشاهده گردید که نسبت به تیمار کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان داد($p<0/05$). در تیمار لوامیزول نیز افزایش نسبی در تعداد گلبول‌های سفید مشاهده شد، ولی در تیمار کندر و آویشن تفاوتی با گروه کنترل مشاهده نگردید($p<0/05$). افزایش تعداد گلبول‌های سفید بخشی از دفاع ایمنی ماهی می‌باشد. هر چند ایمنی سلولی و هومورال وابسته به تعداد گلبول‌های سفید خونی می‌باشد، ولی همیشه میزان محافظت ماهی در برابر عوامل عفونی با تعداد لکوسیت‌های ماهی ارتباط مستقیم ندارد (۲،۱۲،۲۸). احتمالاً تجویز سرخارگل و ارگوسان افزایش تکثیر گلبول‌های سفید خونی در بافت‌های خونساز ماهی را باعث شده است(۱۵).

تطابق تقریبی نتایج فاکتورهای رشد و میزان مقاومت در برابر عفونت باکتریایی در بین تیمارها تایید کننده این فرضیه است که با تقویت ایمنی ماهی می‌توان رشد ماهی را نیز تسریع نمود. البته شاید اجزای مواد مورد بررسی که در تحریک ایمنی ماهی نقش داشته اند، تحریک رشد را نیز باعث شده اند. تحقیقات مشابه روی محرک‌های ایمنی ماهی نیز چنین فرضیه‌ای را تایید می‌نماید(۱۱،۱۷،۱۸،۲۰،۲۹).

همانطور که در جدول ۱ مشخص است، سایر فاکتورهای خون شناسی مرتبط با گلبول‌های قرمز و شاخص‌های گلبولی (حجم متوسط گلبولی یا MCV، میزان متوسط هموگلوبین گلبولی یا MCH و غلظت هموگلوبین گلبولی یا MCHC) تحت تاثیر تجویز مواد و عصاره‌ها قرار نگرفتند ($p<0/05$). هر چند گزارشاتی در زمینه تاثیر محرک‌های ایمنی و رشد بر فاکتورهای هماتولوژی ماهی وجود دارد(۱۵)، ولی برخی محققین نیز فاکتورهای مربوط به گلبول‌های قرمز را بیشتر تحت تاثیر فاکتورهای محیطی مثل فصل، دما، شرایط تولید مثلی و آلودگی‌ها می‌دانند (۲۷،۲۸،۳۰).

با توجه به توسعه کمی پرورش ماهیان گرمابی در کشور و محدودیت‌های استفاده از آنتی بیوتیک‌ها و ضرورت استفاده از ظرفیت‌های مختلف در افزایش بهره‌وری در پرورش این ماهی‌ها، استفاده از محرک‌های رشد و ایمنی به عنوان راهکاری در توسعه کیفی این صنعت ضروری به نظر می‌رسد. نتایج این تحقیق علاوه بر تایید اثرات تحریک ایمنی و رشد دو ماده‌ی ارگوسان و لوامیزول، امکان استفاده از عصاره‌ی

گیاهی سرخارگل را برای تحریک رشد و ایمنی ماهی کپور معمولی امکان پذیر می‌داند.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز انجام پذیرفت. نویسندگان این تحقیق بر خود لازم می‌دانند از همکاری مجدانه سرکار خانم دکتر فروغ نامجویان عضو هیات علمی دانشکده داروسازی دانشگاه جندی شاپور اهواز تشکر و قدردانی نمایند.

References

1. Alishahi, M., Ghorbanpoor, M., Najafzadeh, H. (2009) Antibacterial effects of some medicinal plant extracts on *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia ruckery* and *Streptococcus iniae*. Iranian. Vet. J. 6: 21-30.
2. Alishahi, M., Soltani, M., Mesbah, M., Esmaili Rad, A. (2011) Effects of dietary *Silybum marianum* extract on some immune responses of Common carp (*Cyprinus carpio*). J. Vet. Res. 66: 255-263.
3. Alishahi, M., Ranjbar, M.M., Ghorbanpour, M., Peyghan, R., Mesbah, M., 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.
4. 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.
5. Bagni, M., Romano, N., Finoia, M.G., Abelli, L., Scapigliati, G. (2005) Short- and long-term effects of a dietary yeast β-glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Fish Shellfish Immunol. 18: 311-325.
6. Burger, R.A., Torres, A.R., Warren, R.P., Caldwell, W.D., Hughes, B.G. (1997) Echinacea-induced cytokine production by human macrophage. Int. immunopharmacol. 19: 371-9.
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. Chevrier, M.R., Ryan, A.E., Lee, D.Y.-W., Zhongze, M., Wu-Yan, Z., Via, C.S. (2005) Boswellia carterii extract inhibits TH1 cytokines and promotes TH2 cytokines in vitro. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 12: 575-580.
9. Ertsvag, H., Valla, S. (1998) Biosynthesis and applications of alginates. Polym. Degrad. Stab. 59: 85-91.
10. Gioacchini, G., Smith, P., Carnevali, O. (2008) Effects of Ergosan on the expression of cytokine genes in the liver of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to enteric red mouth vaccine. Vet. Immunol. Immunopathol. 123: 215-222.
11. Gopalakannan, A., Arul, V. (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.
12. 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.
13. Heidarieh, M., Afsharnasab, M., Soltani, M., Dashtyannasab, A., Rajabifar, S. Sheikhzadeh, N. (2010) Effects of ergosan and vibromax to prevent vibriosis and WSSV in *Litopeaneus vannamei*, J.Fish. Aquat. Sci. 5: 120-125.
14. Ispir, U., Dorueu, M. (2005) A study on the effects of levamisole on the immune system of Rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*, walbaum). Turkish J. Vet. Anim. Sci. 29: 1169-1176.
15. Iwama, G., Nakanishi, T. (1996) Innate immunity in fish. In: The Fish Immune System. Academic Press, London, UK. p. 73-114.

16. 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.
17. Jian, J., Wu, Z. (2003) Effects of traditional Chinese medicine on nonspecific immunity and disease resistance of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* (Richardson). Aquaculture. 218: 1-9.
18. Mulero, V., Esteban, M.A., Munoz, J., Meseguer, J., (1998) Dietary intake of levamisole enhances the immune response and disease resistance of the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata L.*) Fish Shellfish Immunol. 8: 49-62.
19. Peddie, S., Zou, J., Secombes, C.J. (2002) Immunostimulation in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intraperitoneal administration of Ergosan. Vet. Immunol. Immunopathol. 86: 101-113.
20. Raa, J. (1996) The use of immuno-stimulatory substances in fish and shellfish farming. Rev. Fish. Sci. 4: 229-288.
21. Roesler, J., Steinmi.iller, C., Kiderlin, A., Emmendorffer, A., Wagner, H., Lohmann-Matthes, M.L. (1991) Application of purified polysaccharides from cell cultures of the plant *Echinacea purpurea* to mice mediates protection against systemic infections with Listeria monocytogenes and *Candida albicans*. J. Immunopharmacol. 13: 27-37.
22. Sakai, M. (1999) Current research status of fish immunostimulants. Aquaculture. 172: 63-92.
23. Schaperclaus, W., Kulow, H., Schreckenbach, K. (1991) Hematological and serological technique. In: Fish Disease. Kothekar, VS. (ed.) (2nd ed.). Connaught circus, Gulab primlani, Oxonian press Pvt. Ltd. New Delhi, India. p. 71-108.
24. Sharma, M.L., Kaul, A., Khajuria, A., Singh, S., Singh, G.B. (1996) Immunomodulatory activity of boswellic acids (Pentacyclic triterpene acids) from *Boswellia serrata*. Phytother. Res. 10: 107-112.
25. Sharma, M.L., Khajuria, A., Kaul, A., Singh, S., Singh, G.B., Atal, C.K. (1995) Effect of salai guggal ex-Boswellia serrata on cellular and humoral immune responses and leucocyte migration. Agents Actions. 24: 161-164.
26. Steinmuller, C., Roesler, J., Grottrup, E., Franke, G., Wagner, H., Lohmann-Matthes, M.L. (1993) Polysaccharides isolated from plant cell cultures of *Echinacea purpurea* enhance the resistance of immunosuppressed mice against systemic infections with *Candida albicans* and Listeria monocytogenes. J. Immunopharmacol. 15: 605-14.
27. Swain, P., Dash, S., Sahoo, P.K., Routray, P. (2007) Non-specific immune parameters of brood Indian major carp Labeo rohita and their seasonal variations. Fish Shellfish Immunol. 22: 38-43.
28. Vinodhini, R., Narayanan, M. (2009) The impact of toxic heavy metals on the hematological parameters in common carp (*cyprinus carpio*). Iran. J. Environ. Health Sci. Eng. 8: 23-28.
29. Watanuki, H., Ota, K., Malina, A. C., Tassakka, A., Sakai, M. (2006) Immunostimulant effects of dietary Spirulina platensis on carp, *Cyprinus carpio*. Aquaculture. 258: 157-163.
30. Witeska, M.(1998) Changes in selected blood indices of common carp after acute exposure to cadmium. Acta Vet. Brno. 3: 289-293.
31. Zargary, A. (1993) Medicinal Plants of Iran. (4th ed.). Tehran University publications. Tehran, Iran.

J. Vet. Res. 67, 2:135-142, 2012

Immunostimulatory and growth stimulation effects of Ergosan, Levamisole and herbal extracts in *Cyprinus carpio*

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

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

[2]*Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.*

(Received 13 December 2011 , Accepted 27 February 2012)

Abstract:

BACKGROUND: Enhancement of the immune system seems to be the most promising method of preventing fish diseases and increasing growth rate. Biodegradable and biocompatible immunostimulants obtained from natural sources (particularly herbal extracts) have received great attention for fish. **OBJECTIVES:** In this study the immunostimulatory and growth stimulation effects of herbal extracts (*Echinacea purpurea*, *Boswellia thurifera*, *Zataria multiflora*), Ergosan and Levamisole were evaluated in common carp. **METHODS:** 450 fish (11.12±1.22 g) were randomly divided into 6 groups in triplicate and fed with experimental diet for 6 weeks. Fish in groups 1 to 5 were fed by food supplemented with *E. purpurea*, *B.thurifera*, *Z.multiflora*, Ergosan and Levamisole, respectively. Group 6 was fed with basal food without supplementation. The Growth performance indices were evaluated at the end of study and blood samples were collected from 6 fish in each group. packed cell volume, haemoglobin concentration, red blood cell counts, white blood cell counts mean corpuscular hemoglobin, mean corpuscular volume and mean corpuscular hemoglobin concentration were compared among the groups. In each group, thirty fish were challenged with live *Aeromonas hydrophila* on day 42 and mortality rate was studied. **RESULTS:** Mortality rate showed no significant difference among groups ($p>0.05$). Specific growth rate (SGR) and food conversion rate (FCR) showed significant increase in all groups except (*Zataria multiflora*) compared to the control. Post challenge mortality rate decreased in all groups except (*Zataria multiflora*) compared to the control ($p<0.05$). WBC values in Ergosan, *E. purpurea* and levamisole groups were 7830±590, 7750±500 and 7380±810 per mL respectively which, showed significant ($p<0.05$) increased compared to the control group (6380±123mL), However no significant changes were seen in the other haematological parameters ($p>0.05$). **CONCLUSIONS:** It can be concluded that extract of *E. purpurea* and *B.thurifera* have immunostimulatory and growth stimulation effects in common carp which are comparable with the effects of two well documented fish immunostimulants, Ergosan and Levamisole.

Key words: ergosan, levamizol, *Echinacea purpurea*, *Boswellia thurifera*, *Zataria multiflora*.

Figure Legends and Tabel Captions

Graph 1. Comparison of mortality rate among treatments (mean±SD). Different letters show significant difference ($p<0.05$).

Graph 2. Comparison of daily growth rate among treatments (mean±SD). Different letters show significant difference ($p<0.05$).

Graph 3. Comparison of weight increase rate among treatments (mean±SD). Different letters show significant difference ($p<0.05$).

Graph 4. Comparison of food conversion rate among treatments (mean±SD). Different letters show significant difference ($p<0.05$).

Graph 5. Comparison of mortality rate following challenge with *Aeromonas hydrophila* among treatments (mean±SD). Different letters show significant difference ($p<0.05$).

Table 1. Comparison of hematological parameters rate among treatments (mean±SD). Different letters show significant difference ($p<0.05$).

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