View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Aquatic Commons

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110083]
Downloaded from isfj.ir at 9:01 +0330 on Tuesday December 12th 2017

مطالعه تاثیر اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) بر میزان فعالیت سیستم عامل مکمل و لیزوزیم خون ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*)

مهدی سلطانی[1]* ؛ طیبه ظریف منش[2] ؛ سید جلیل ذریه زهرا[3]

msoltani@ut.ac.ir

١- گروه بهداشت و بیماری های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران صندوق پستی:٦٤٥٣-١٤١٥٥

٢- گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران صندوق پستی:٧٧٥-١٤٥١٥

٣- بخش بهداشت و بیماری های آبزیان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، تهران صندوق پستی:١٦٦١-١٤١٥٥

تاریخ دریافت: مرداد ١٣٩١ تاریخ پذیرش: آبان ١٣٩١

چکیده

اثرات محرک ایمنی اسانس آویشن شیرازی (***Zataria multiflora* Bioss.**) روی سیستم عامل مکمل و لیزوزیم خون ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (***Oncorhynchus mykiss***) با میانگین (±انحراف معیار) وزنی ١٠±١٠٠ گرم مورد بررسی قرار گرفت. ماهیان به روش خوراکی و با غلظت‌های ١٠، ٢٠ و ٤٠ میلی‌لیتر اسانس آویشن به ازاء هر کیلوگرم غذا به مدت ١٠ روز متوالی مورد تغذیه قرار گرفتند و مسیر جانبی عامل مکمل **(CH50%) Alternative Complement Activity** و لیزوزیم خون آنها ١، ٨، ١٥ و ٢٩ روز پس از آخرین تجویز اسانس مورد سنجش قرار گرفت. به منظور مقایسه، یک گروه شاهد نیز بدون افزودن اسانس به جیره غذایی در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد که میانگین عامل مکمل در روزهای اول و هشتم نمونه‌برداری در گروه‌های تغذیه شده با غلظتهای ١٠، ٢٠ و ٤٠ میلی‌لیتر اسانس آویشن شیرازی به ازاء هر کیلوگرم غذا نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌دار داشته است اما در روزهای پانزده و بیست و نهم نمونه‌برداری بین گروه شاهد و گروه‌های تیمار تفاوت معنی‌دار دیده نشد. نتایج مربوط به میزان فعالیت لیزوزیم سرم در روزها و در تیمارهای مختلف نشان داد که تفاوت آماری معنی‌داری با گروه شاهد وجود نداشت.

لغات کلیدی : اسانس آویشن شیرازی، ماهی قزل آلای رنگین کمان، سیستم ایمنی ماهی

*نویسنده مسئول

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110083]
Downloaded from isfj.ir at 9:01 +0330 on Tuesday December 12th 2017

مقدمه

داروهای طبیعی و گیاهی بدلیل عواملی مانند ارزش اقتصادی و کم هزینه بودن تولید آنها، نداشتن اثرات تخریبی بر محیط‌زیست، کم بودن عوارض جانبی در مقایسه با داروهای شیمیایی، عدم ایجاد مقاومت نسبی در برابر عوامل بیماری‌زا، منحصر بودن در درمان برخی بیماری‌های خاص و وجود تجربیات مختلف بالینی در این زمینه منجر شده تا این منابع ارزشمند دارویی از ارزش و جایگاه خاصی در درمان برخوردار باشند (قاسمی پیر بلوطی و همکاران، ۱۳۹۰). تعدادی از گیاهان دارویی سبب تحریک اجزاء ایمنی غیراختصاصی از جمله سیستم عامل مکمل و لیزوزیم می‌شوند. سیستم عامل مکمل از حدود ۳۵ پروتئین مجزا تشکیل شده است که از مهمترین فعالیت‌های آن می‌توان به توانایی کشتن عوامل بیماریزا بوسیله ایجاد منفذ در سطح غشای آن‌ها اشاره کرد (Claier *et al*., 2002). فعال‌سازی عامل مکمل از سه مسیر کلاسیک عامل مکمل (CCP) Classic Complement Pathway، مسیر جانبی عامل مکمل (ACP) Alternative Complement Pathway و مسیر لکتین عامل مکمل (LCP) Lectin Complement Pathway تشکیل شده است. بررسی‌ها نشان می‌دهد که سیستم عامل مکمل در ماهیان قادر به تشخیص طیف وسیعتری از عوامل بیگانه در مقایسه با پستانداران است (Boshra *et al*., 2006). سیستم عامل مکمل در ماهیان نه تنها بعنوان عامل تشخیص استرس کاربرد دارد بلکه دارای خاصیت ضد میکروبی نیز می‌باشد (سلطانی، ۱۳۸۷). بررسی Ji و همکاران (۲۰۰۷) نشان داد که میزان فعالیت سیستم عامل مکمل در ماهی *Pagrus major* در گروهی که با ترکیبی از چند گیاه دارویی ژاپنی تغذیه شده بود افزایش داشته است. نتایج نشان می‌دهد که افزودن ویتامین C به جیره غذایی گربه ماهی و ماهی *Salmo salar* منجر به افزایش فعالیت سیستم عامل مکمل می‌شود. همچنین فعالیت سیستم عامل مکمل در ماهی قزل‌آلا که لوامیزول به آنها تزریق شده است افزایش پیدا می‌کند (Sakai, 1999). لیزوزیم نیز بعنوان یک عامل مهم دفاعی در سیستم ایمنی غیراختصاصی در برابر عوامل میکروبی مهاجم واکنش نشان می‌دهد. در مهره‌داران عالی، لیزوزیم شامل مکانیسم‌های دفاعی گسترده‌ای است که از جمله این مکانیسم‌ها می‌توان به اپسونیزاسیون، باکتریولیز و فعالیت محدود ضد ویروسی اشاره کرد. در ماهی، لیزوزیم بعنوان یک آنزیم با ویژگی‌های آنتی-بیوتیکی است که از گلبول‌های سفید آزاد شده و فعالیت بیشتری نسبت به پستانداران دارد و در اکثر موارد به عنوان شاخص عملکرد ایمنی غیراختصاصی استفاده می‌شود (Shailesh & Sahoo, 2008). همانند سیستم عامل مکمل، میزان، فعالیت لیزوزیم نیز تحت تاثیر فعالیت محرک‌های ایمنی است. استفاده از برخی گیاهان مانند زنجبیل و آلوئه‌ورا در ماهی کپور موجب افزایش فعالیت لیزوزیم در آن‌ها می‌شود (Bairwa *et al*., 2012). نتایج Ardo و همکاران (۲۰۰۸) نشان می‌دهد که میزان فعالیت لیزوزیم برای ماهی تیلاپیا که به مدت ۷ روز با گیاهان چینی *Astragalus membranaceus* و *Lonicera japonica* تغذیه شد افزایش داشته است. Asadi و همکاران (۲۰۱۰) اثر گیاه *Nasturtium nasturtium* را روی فاکتورهای ایمنی از جمله لیزوزیم و عامل مکمل در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که این عصاره موجب افزایش فعالیت سیستم عامل مکمل و لیزوزیم می‌شود. گیاه آویشن شیرازی نیز بعنوان یکی از گیاهان بومی ایران از زمان-های گذشته در طب سنتی مورد استفاده بوده است. از اینرو در سال‌های اخیر استفاده از آن بعنوان محرک ایمنی در صنعت آبزی‌پروری رو به افزایش است. در مطالعات مختلف فعالیت ضد باکتریایی (Navarrete *et al*., 2010; Mahmoodi *et al*., 2012; Maleknezhad *et al*., 2012)، ضد قارچی (Khosravi *et al*., 2012) آویشن بررسی شده است. در مطالعه‌ای که توسط Yilmaz و همکاران (۲۰۱۲) انجام شد تاثیر آویشن روی عملکرد رشد ماهی *Dicentrachus labrax* و تغییر در برخی پارامترهای خونی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که جیره حاوی آویشن منجر به افزایش نسبت بازده پروتئین، مقدار پروتئین فیله و موجب بهبود نگهداری نسبت انرژی و پروتئین در این ماهی می‌شود. در مطالعه‌ای که توسط Soltani و همکاران (۲۰۱۰) انجام شد تاثیر اسانس آویشن شیرازی روی پاسخ ایمنی ذاتی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که اسانس آویشن شیرازی روی تعدادی از فاکتورهای ایمنولوژیکی مانند تیتر آنتی بادی، تعداد کل گلبول‌های سفید خون و فعالیت باکتری‌کشی سرم در

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110083]
Downloaded from isfj.ir at 9:01 +0330 on Tuesday December 12th 2017

گروه‌های آزمایش شده خصوصاً در دوزهای ۳۰ppm و ۶۰ppm مؤثر است. همچنین سلطانی و همکاران (۱۳۸۸) اثرات اسانس آویشن شیرازی بر میزان تفریخ تخم ماهی قزل-آلای رنگین کمان و درصد بقاء لارو آن در مقایسه با آب اکسیژنه و مالاشیت گرین را مورد بررسی قرار دادند.

اگرچه خاصیت ضد قارچی اسانس آویشن شیرازی کاربرد آن را در آبزی‌پروری میسر ساخته است، اما مطالعات اندکی در مورد اثرات احتمالی تقویتی یا تضعیفی آن روی سیستم ایمنی غیراختصاصی ماهیان انجام شده است و بویژه اثرات آن روی سیستم عامل مکمل و میزان لیزوریم سرم ماهیان نامعلوم است. لذا هدف از این مطالعه ارزیابی تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی بر میزان فعالیت فاکتورهای مذکور در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان می‌باشد.

مواد و روش کار

۸۰ عدد ماهی قزل‌آلای رنگین کمان سالم با میانگین (±انحراف معیار) وزن ۱۰±۱۰۰ از کارگاه تکثیر و پرورش با سابقه سلامت بهداشتی واقع در استان مازندران شهرستان ساری (سفیدآب) تهیه شد و به کارگاه مورد نظر در حومه شهرستان نوشهر (قزل چشمه) انتقال داده شد. عمل سازگاری به مدت ده روز صورت گرفت و پس از آن ماهی‌ها به ۴ استخر که تراکم هر کدام ۲۰ عدد ماهی بود انتقال یافتند و تغذیه با خوراک ماهی تهیه شده از شرکت فرادانه به میزان ۲ درصد وزن بدن در روز انجام شد. پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب مورد استفاده شامل: دمای آب ۱۶- ۱۸ درجه سانتیگراد، سختی آب ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر، pH برابر ۸ و اکسیژن محلول حداقل ۶/۸ میلی‌گرم در لیتر بوده است.

اسانس آویشن از شرکت دارویی باریج اسانس (کاشان، ایران) با درصد خلوص ۸۵ درصد تهیه گردید. اسانس در غلظت‌های۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌لیتر به ازاء هر کیلوگرم غذا به خوراک ماهی تهیه شده از شرکت فرادانه بصورت دستی مخلوط با روغن گیاهی مایع (۱ درصد) افزوده شد. آزمایش شامل ۴ تیمار و هر تیمار شامل ۲۰ عدد ماهی قزل‌آلای رنگین کمان بود. پلت حاوی اسانس به مدت ۱۰ روز متوالی به مصرف ماهی‌ها رسید. میزان غذادهی روزانه ۲ درصد وزن بدن منظور و در گروه کنترل نیز غذای بدون اسانس استفاده گردید.

بعد از ۱۰ روز مصرف اسانس، از هر تیمار ۵ ماهی بصورت تصادفی در روزهای ۱، ۸، ۱۵ و ۲۹پس از اتمام مصرف اسانس نمونه‌گیری بعمل آمد. برای اینکار پس از بیهوشی ماهیان با اسانس گل میخک به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، از ساقه دمی ماهیان خونگیری و پس از جداسازی سرم‌ها تا زمان انجام آزمایشات عامل مکمل و لیزوزیم در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردیدند. فاصله زمانی بین منجمد کردن نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش کمتر از یک هفته بوده است. بررسی‌ها نشان می‌دهد که اگر مدت زمان نگهداری نمونه‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد بیشتر از ۹۰ روز باشد عمل منجمد کردن روی میزان آنزیم‌ها از جمله لیزوزیم تاثیر منفی خواهد گذاشت (Cray *et al.*, 2009). از آنجاییکه مدت زمان نگهداری نمونه‌ها در شرایط دمایی ۲۰- درجه سانتیگراد از اهمیت بالایی در صحت نتایج برخوردار است ذکر این نکته ضروری است که در انجام آزمایشات مورد نظر مدت زمان بین منجمد کردن نمونه‌ها تا انجام آزمایشات کمتر از یک هفته بوده است.

برای سنجش میزان عامل مکمل از روش توصیه شده توسط Matsuyama و همکاران (۱۹۸۸) استفاده شد. بافرهای مورد استفاده در این آزمایش شامل Veronal buffer 5x، EGTA-MG-GVB، Alsever's و EDTA-GVB است. در کشتارگاه در شرایط استریل خون گوسفند به بافر Alsever's اضافه می‌شود. برای انجام آزمایش عامل مکمل مقداری از خون گوسفند و بافر Alsever's را در لوله آزمایش ریخته و در دستگاه سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه و با ۳۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده و سرم خون آن حذف گردید و سلول-های باقیمانده دو بار با بافر EGTA–MG-GVB شستشو داده و سپس از سلول‌های باقیمانده رقت ۲ درصد (۲۰۰ میکرولیتر از سلولهای باقیمانده در پلت در ۱۰ میلی‌لیتر از بافر EGTA – MG- GVB) تهیه گردید. از نمونه‌های سرم بدست آمده از ماهیان در محلول بافر EGTA – MG- GVB رقت‌های متوالی تهیه شد. برای هر نمونه (سرم) ۵ رقت شامل: ۱/۴، ۱/۸، ۱/۱۶، ۱/۳۲ و ۱/۶۴ تهیه گردید. سپس به لوله با رقت ۱/۴ میزان ۳۷۵ میکرولیتراز بافر EGTA–MG-GVB اضافه کرده و به سایر رقت‌ها میزان ۲۵۰ میکرولیتر از بافر EGTA – MG-GVB اضافه می‌شود. سپس میزان ۱۲۵ میکرولیتر از نمونه سرم ماهی به لوله اول اضافه و با کمک سمپلر چند بار

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110083]
Downloaded from isfj.ir at 9:01 +0330 on Tuesday December 12th 2017

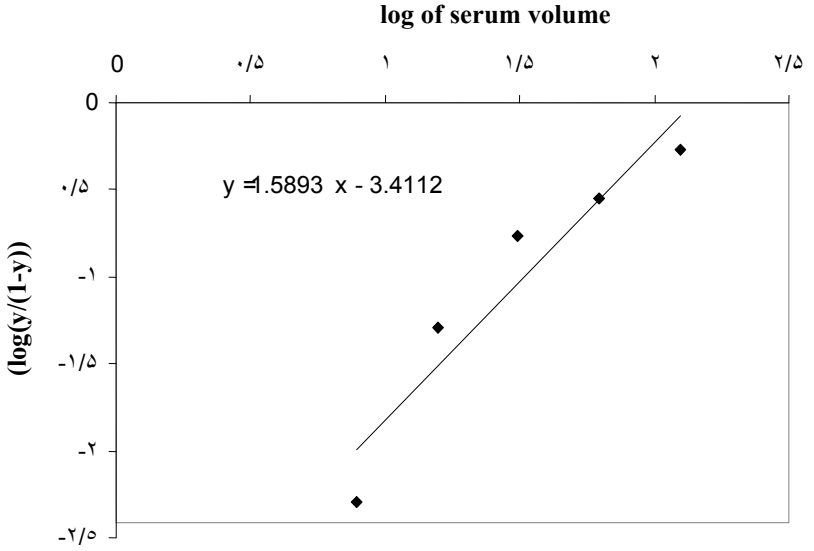
بافر و سرم با هم مخلوط گردید. سپس از لوله اول ۲۵۰ میکرولیتر برداشته و به لوله دوم انتقال داده و به همین ترتیب برای سایر لوله‌ها اقدام شد. در نهایت از لوله آخر میزان ۲۵۰ میکرولیتر حذف گردید. لوله‌ها را در انکوباتور در شرایط دمایی ۱۹ درجه و به مدت یک ساعت و ۳۰ دقیقه قرار داده و پس از آن میزان ۱۴۰۰ میکرولیتر از بافر EDTA-GVB به همه لوله‌ها اضافه کرده و در دستگاه سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و در مرحله آخر محتوای لوله‌ها در اسپکتروفتومتر با طول موج ۴۱۴nm خوانده شد. برای محاسبه درصد همولیز گلبول‌های قرمز از رابطه زیر استفاده گردید.

Percent RBC lysis= [RA of the well / RA of the 100% lysis well] ×100

در رابطه فوق پارامتر Relative Absorbance (RA) میزان جذب در هر لوله است. نمودار درصد لیز نموداری حلقوی (Sigmoid) است. از اینرو اکثر محققین ترجیح می‌دهند تا با استفاده از عملیات ریاضی و تغییر متغیرهای محورهای مختصات بصورت لگاریتمی، نتایج حاصل را بصورت یک نمودار خطی ارائه کنند (نمودار ۱) (Inglis *et al.*, 2008). برای این منظور، محور افقی برحسب لگاریتم حجم سرم نشان داده می‌شود. محور عمودی نیز به $\log (y/(1-y))$ تغییر می‌یابد که y همان مقادیر جذب خوانده‌شده در لوله‌ها می‌باشد.

حجمی از سرم رقیق‌شده (همان نمونه استفاده شده در لوله‌ها) که به ازای آن نیمی از گلبول‌های قرمز تحلیل می‌روند بعنوان CH_{50} در نظر گرفته می‌شود. برای نقطه CH_{50} مقدار y برابر با ۰/۵ می‌باشد. بنابراین $y/(1-y)$ برابر با یک می‌گردد که لگاریتم آن صفر است؛ از اینرو محل تقاطع خط رسم شده با محور xها همان CH_{50} می‌باشد (Inglis *et al.*, 2008).

برای سنجش میزان لیزوزیم از روش توصیه شده توسط Amin و همکاران (۲۰۱۰) به شرح زیر استفاده شد. در یک لوله آزمایش باکتری میکروکوکوس را در PBS (Phosphate Buffer Saline) حل کرده تا به مک فارلین شماره ۱ برابر ۳×۱۰^{۸} سلول به ازاء هر میلی‌لیتر برسد. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون را به محیط کشت Tryptic Soy Agar (TSA) آماده شده اضافه نموده و در پلت‌ها گوده‌هایی ایجاد و در درون گوده‌ها نمونه‌های سرم اضافه و به مدت ۱۸ ساعت آنها را انکوبه کرده و سپس میزان قطر ممانعت کنندگی Inhibition Zone Diameter (IZD) از رشد باکتری توسط خط کشی با دقت ۰/۱ میلی‌متر اندازه‌گیری گردید. برای هر نمونه، نمودار مجذور مقادیر IZD در مقابل لگاریتم غلظت نمونه رسم می‌شود. با رسم بهترین خط عبوری از نقاط نمودار و تقاطع آن با محور لگاریتم غلظت نمونه ها، لگاریتم Minimum Inhibitory Concentration (MIC)



نمودار ۱: نمودار لگاریتمی مقدار همولیزگلبولهای قرمز برحسب حجم سرم

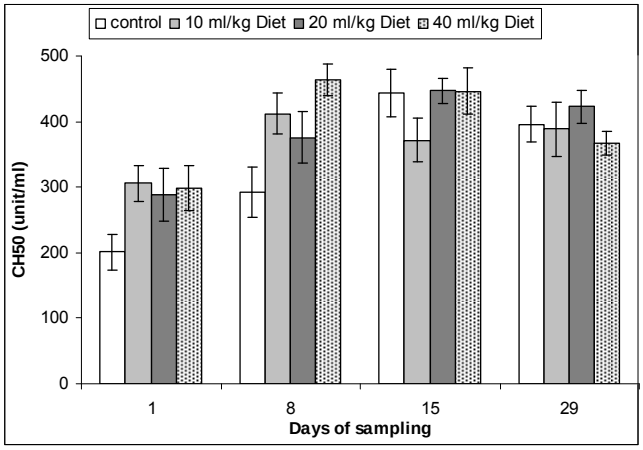
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110083]
Downloaded from isfj.ir at 9:01 +0330 on Tuesday December 12th 2017

برحسب میلی‌گرم در لیتر (یـا معـادل آن میکروگـرم در میلـی لیتر) بدست می‌آید (Idonije *et al*., 2011). نتایج حاصله بـا استفاده از برنامه Excel و آنالیز واریـانس دو طرفـه مقایسـه و اختلافات مربوطه در حد P=0.05 محاسبه گردید.

نتایج

نتایج بدست آمده نشـان داد کـه در روز اول نمونـه‌گیـری مقدار عامل مکمل برحسب واحـد در میلـی‌لیتـردر تیمارهـای تغذیه شده با ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌لیتر اسانس آویشـن شـیرازی بترتیـب برابـر ۲۷±۳۰۶، ۴۰±۲۸۸، ۳۴±۲۹۸، در روز هشـتم برابـــر۳۲±۴۱۲، ۳۹±۳۷۵، ۲۴±۴۶۳، در روز پـــــانزدهم برابـر۳۳±۳۷۱، ۱۸±۴۴۶، ۳۴±۴۴۶ و در روز بیسـت و نهـم برابر۴۰±۳۸۱، ۲۵±۴۲۲، ۱۸±۳۶۷ می‌باشد. در حالیکـه ایـن مقادیر برای گروه کنترل در ایام مذکور بترتیب برابر ۲۷±۲۰۰، ۳۸±۲۹۲، ۳۶±۴۴۲و ۲۷±۳۹۶ اسـت. در نمـودار ۲ مقایسـه میانگین (± انحراف معیار) مقدار عامـل مکمـل در گـروه‌هـای آزمایشی مختلف و برای روزهای مختلف نشان داده شده است.

نتایج میانگین فعالیت لیزوزیم (± انحراف معیار) در جدول ۱ نشان داده شده است. براساس ایـن نتـایج میـانگین فعالیـت ضد باکتریایی لیزوزیم در روز اول نمونـه‌گیـری بترتیـب بـرای غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌لیتـر بـه ازاء هـر کیلـوگرم غـذا عبـارت از ۰/۹±۱/۱، ۰/۱۲±۱/۱۵، ۰/۰۸±۱/۲میلـی‌گـرم بـر لیتر بوده در حالیکه میزان آن بـرای گـروه کنتـرل ۰/۱۱±۱/۲ میلی‌گرم بر لیتر می باشد. در روزهای هشتم، پانزدهم و



نمودار ۲: مقایسه میانگین (± انحراف معیار) مقدار عامل مکمل در گروه‌های آزمایشی مختلف و برای روزهای مختلف

جدول ۱: میانگین (± انحراف معیار) میزان فعالیت لیزوزیم در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان پس از دریافت غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی

غلظت اسانس آویشن شیرازی (میلی لیتر به ازاء کیلوگرم غذا)	Minimal Inhibitory Concentration (mg/l)			
	روز اول	روز هشتم	روز پانزدهم	روز بیست ونهم
کنترل	۱/۲±۰/۱۱	۱/۱±۰/۱۳	۱/۱۵±۰/۰۹	۱/۱±۰/۱٤
۱۰ میلیگرم در کیلوگرم جیره	۱/۱±۰/۰۹	۰/۹۵±۰/۱۲	۱/۰±۰/۲	۱/۰±۰/۰۹
۲۰ میلیگرم در کیلوگرم جیره	۱/۱۵±۰/۱۲	۱/۱±۰/۰٦	۱/۰±۰/۱	۱/۱±۰/۰۸
٤۰ میلیگرم در کیلوگرم جیره	۱/۲±۰/۰۸	۰/۹۵±۰/۱	۱/۱۲±۰/۱۵	۱/۱±۰/۱۱

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110083]
Downloaded from isfj.ir at 9:01 +0330 on Tuesday December 12th 2017

و بیست و نهم این مقادیر تفاوت معنی‌داری با روز اول نمونه‌برداری نشان نداده‌اند ($P>0.05$). همانگونه که در جدول دیده می‌شود تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های تیمار با گروه شاهد در روزهای مختلف نمونه‌برداری وجود ندارد ($P>0.05$).

بحث

نتایج نشان می‌دهد که میانگین عامل مکمل در روزهای اول و هشتم نمونه‌برداری در گروه‌های تغذیه شده با ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌لیتر اسانس آویشن شیرازی به ازاء هر کیلوگرم غذا نسبت به گروه شاهد افزایشی معنی‌دار دارد. نکته دیگری که باید بدان اشاره شود این است که اگرچه استفاده از اسانس آویشن شیرازی سبب می‌شود که مقادیر عامل مکمل افزایش یابد اما از نظر آماری مقادیر اسانس آویشن استفاده شده در جیره غذایی تاثیری بر نتایج ندارند و نتایج برای تیمارهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌لیتر تقریباً یکسان است. برای روز اول نمونه-برداری، میانگین عامل مکمل در تیمارهای مختلف نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهد. برای روز هشتم نمونه‌برداری نیز روند نتایج تقریباً با روز اول یکسان است. میزان عامل مکمل در گروه شاهد از سه تیمار دیگر کمتر است (حدود ۴۰ درصد) و مقدار اندازه‌گیری شده برای سه تیمار دیگر تقریباً یکسان است که تاکید مجددی بر عدم تاثیر غلظت آویشن شیرازی روی نتایج حاصله در محدوده غلظت‌های مورد مطالعه در این بررسی می‌باشد. برای روز پانزدهم نمونه‌برداری به نظر می‌رسد که مقادیر عامل مکمل بین گروه شاهد و سایر گروه‌های تیمار تقریبا یکسان بوده و تفاوت قابل ملاحظه‌ای در آن‌ها مشاهده نمی‌شود. نتایج میانگین میزان عامل مکمل در روز بیست و نهم نشان می‌دهد که تفاوتی معنی‌داری بین گروه‌های تیمار و گروه شاهد وجود ندارد. از موارد فوق می‌توان این چنین استنباط کرد که اسانس آویشن شیرازی بیشترین تاثیر را در هفته اول پس از اتمام غذادهی داشته است و بتدریج با گذشت زمان این تاثیر کمتر شده است بطوریکه در روز بیست و نهم عملاً هیچ تفاوتی میان گروه‌های مختلف مشاهده نمی‌شود. از اینرو توصیه می‌شود که برای حفظ اثر مثبت این اسانس روی عامل مکمل، آویشن شیرازی بطور دائم و مستمردر جیره غذایی ماهی استفاده گردد. لیزوزیم نیز به عنوان یکی دیگر از پارامترهای غیراختصاصی مهم می‌باشد که در این مطالعه به آن پرداخته شده است. این پارامتر نیز مانند عامل مکمل در روزهای اول، هشتم، پانزدهم و بیست و نهم پس از تغذیه با اسانس آویشن شیرازی مورد سنجش قرار گرفت. نتایج حاصل از این اندازه‌گیری نشان داد که میزان فعالیت لیزوزیم سرم در تیمارهای مختلف و برای تمامی روزهای نمونه‌گیری افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه‌های شاهد نداشته است.

بطور کلی در ماهیان، مانند پستانداران فعالیت مسیر جانبی عامل مکمل تحت تاثیر پروتئین‌ها و بخصوص پروتئین C3 می‌باشد. از سوی دیگر ترکیبات گیاهی که شامل گروه‌های هیدروکسیل، آمین، کربوهیدرات یا پروتئین هستند سبب افزایش مقدار عامل مکمل می‌شوند (Bobadilla *et al*., 2005). تاثیر ویتامین E روی فعالیت عامل مکمل ماهی قزل-آلای رنگین کمان مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که جیره‌هایی که دچار کمبود ویتامین E یا بیش از حد نیاز آن هستند فعالیت مسیر جانبی عامل مکمل در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان کاهش می‌یابد که احتمالاً بدلیل عدم تعادل ایجاد شده بین ویتامین E و سایر آنتی اکسیدان‌ها است (Boshra *et al*., 2006). بررسی‌ها نشان می‌دهد که افزایش میزان لیزوزیم عموماً در نتیجه افزایش تعداد سلولهای بیگانه‌خوار است (Sahoo *et al*, 2005). از آنجا که مقدار لیزوزیم سرم با تغذیه اسانس آویشن شیرازی تغییر نکرده است می‌توان نتیجه گرفت که ممکن است ترکیبات اسانس آویشن شیرازی تعداد فاگوسیت‌های ترشح کننده لیزوزیم را تغییر نداده باشد یا مقدار لیزوزیم سنتز شده در سلول افزایش پیدا نکرده باشد، که این نتیجه با نتایج شیخ زاده و همکاران (۱۳۸۸) همخوانی دارد. در مطالعه‌ای که توسط Bobadilla و همکاران (۲۰۰۵) صورت گرفت اثر جیره‌های غذایی حاوی مقادیر متفاوت پروتئین گیاهی روی مکانیسم دفاع غیر اختصاصی در ماهی *Gilthead sea bream* مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که مقدار لیزوزیم در بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری ندارد اما میزان فعالیت مسیر جانبی عامل مکمل در گروهی که جیره غذایی آن حاوی ۵۰ درصد پروتئین گیاهی بوده نسبت به گروه‌های دیگر افزایش معنی‌داری داشته است که می‌تواند تا حدودی بدلیل تحریک تولیدات عامل مکمل باشد. در ماهی قزل‌آلا جیره غذایی که حاوی ۱۰۰ درصد پروتئین گیاهی بوده مقدار فعالیت جانبی مسیر عامل مکمل کاهش پیدا کرده است. استفاده از مواد

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110083]
Downloaded from isfj.ir at 9:01 +0330 on Tuesday December 12th 2017

گیاهی یا ترکیباتی که کمترین مشکلات زیست محیطی را در بر داشته و برای گونه‌های پرورشی نیز واجد حداقل عارضه باشد یکی از نیازهای امروز تکثیر و پرورش می‌باشد. از جمله گیاهانی که اخیراً مورد توجه محققین قرار گرفته است گیاه آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Bioss) می‌باشد. نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان می‌دهد که ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از قرار گرفتن در معرض غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی طی زمان‌های مختلف واکنش‌های متفاوتی را از نظر میزان عامل مکمل از خود نشان داده‌است. دلیل احتمالی نتایج تحقیق حاضر این است که ترکیبات موجود در آویشن بر میزان پروتئین‌های سرم ماهی تاثیر مثبتی داشته که سبب افزایش مقدار فعالیت مسیر جانبی عامل مکمل شده است که البته این افزایش در بازه زمانی مشخصی اتفاق افتاده است. در واقع اسانس آویشن تاثیر مثبتی را نشان داده و سبب افزایش عامل مکمل شده است اما میزان غلظت آویشن در محدوده مورد مطالعه تاثیری را بر نتایج حاصله در این بررسی نشان نداده است لذا استفاده از آویشن شیرازی در مزارع ماهیان علاوه بر اینکه خاصیت ضد میکروبی مورد اشاره توسط سایر محققین را دارد می‌تواند برخی فاکتورهای ایمنی از جمله عامل مکمل را نیز تحریک نموده و افزایش دهد.

منابع

سلطانی. م.، ۱۳۸۷. ایمنی‌شناسی ماهیان و سخت‌پوستان. موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. صفحات ۶۳ تا ۸۴.

سلطانی. م.؛ اسفندیاری. م.؛ خضرائی نیا. م. س. و سجادی. م.، ۱۳۸۸. ارزیابی اثرات اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) بر میزان تفریخ تخم قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhyncus mykiss*) و درصد بقاء لارو آن در مقایسه با آب اکسیژنه و مالاشیت گرین. مجله تحقیقات دامپزشکی. شماره ۲، صفحات ۱۲۷ تا ۱۳۴.

شیخ‌زاده. ن.؛ سلطانی. م.؛ ابراهیم زاده موسوی. ح.؛ خسروی. ع.؛ باقری. ه.؛ فتحی، ع .ا. و زرگر، ا.، ۱۳۸۸. مطالعه اثر اسانس اوکالیپتوس (*Eucalyptus globules*) بر برخی فاکتورهای ایمنی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). مجله تحقیقات دامپزشکی. شماره۱، صفحات ۴۷ تا ۵۴.

قاسمی پیر بلوطی. ع.؛ پیر علی. ا.؛ پیشکار. غ. ر.؛ جلالی، س. م .ع.؛ رئیسی. م.؛ جعفریان دهکردی. م. و حامد. ز. ب.، ۱۳۹۰. اثر اسانس چند گیاه دارویی بر سیستم ایمنی ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhyncus mykiss*). فصلنامه‌ی داروهای گیاهی. شماره ۲، صفحات ۱۴۹ تا ۱۵۵.

Asadi M.S., Mirvaghefei A.R., Nematollahi M.A., Banaee M., Ahmadi K., 2012. Effects of Watercress (Nasturtium nasturtium) extract on selected immunological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Opan Veterinary Journal, 2:32-39.

Amin M.; Kalantar E.; N. Mohamadsaeid ; B.Ashan, 2010. Antibacterial effect and physicochemical properties of essential oil *Zataria multiflora* Bioss. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 3:439-442.

Ardó L.; Yin G.; Xu P.; Váradi L.; Szigeti G.; Jeney Z. and Jeney G., 2008. Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lonicera japonica*) and boron enhance the non-specific immune response of Nile tilapia (*Oreochro misniloticus*) and resistance against *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture, 275:26-33.

Bairwa M.K.; Jakhar J.K.; Satyanarayana Y.; Devivaraprasad R.A., 2012. Animal and plant originated immunostimulants used in aquaculture. Journal of Natural Product and Plant Resources. 2:397-400.

Bobadilla A.S.; lopis S.P; Requeni P.G; Medale F.; Kaushik S.; Sanchez J.P., 2005. Effect of fish meal replacement by plant protein sources on non-specific defense mechanisms and oxidative stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Aquaculture, 249:387-400.

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110083]
Downloaded from isfj.ir at 9:01 +0330 on Tuesday December 12th 2017

Boshra H.; Li J. and Sunyer, J.O., 2006. Recent advances on the complement system of teleost fish. Fish & shellfish immunology, 20:14-20.

Claire M.; Holland H.; Lambris J.D., 2002. The complement system in teleost. Fish & shellfish immunology, 12:399-420.

Cray C., Rodriguez, M.; Zaias, J. and Altman, N.A., 2009. Effects of storage temperature and time on clinical biochemical parameters from Rat serum. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, 48:202–204.

Idonije O.B.; Asika E.C.; Okhiai O.O. and Nweke, I.N., 2011. Phytochemical, chromatographic and antimicrobial studies of the Ethanolic extract of the stem bark of Pentaclethramacrophylla (African Oil Bean Tree). British Journal of Pharmacology and Toxicology, 2:283-289.

Inglis J.E.; Radziwon K.A. and Maniero G.D., 2008. The serum complement system: A simplified laboratory exercise to measure the activity of an important component of the immune system. Advances in Ehysiology Education, 32:317-321.

Ji M.C., Takatoka O., Jeong G.S., Lee S.W., Ishimaru K., Seoka M and Takii K., 2007. Dietary medicinal herbs improve growth and some non-specific immunity of red sea bream Pagrus major. Fisheries Science 73:63–69.

Khosravi A.R.; Shokri H.; Sharifrohani M.; Ebrahimzadeh Mousavi, H.; Moosavi Z., 2012. Evaluation of the antifungal activity of *Zataria multiflora*, *Geranium herbarium*, and *Eucalyptus camaldolensis* essential oils on Saprolegniaparasitica–infected Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Eggs. Food borne Pathogens and Disease, 9:674-679.

Mahmoodi A., Roomiani L., Soltani M., AkhondzadeBasti A., Kamali A., Tehrani S., 2012. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils and Extracts from Rosmarinusofficinalis, Zataria multiflora, Anethumgraveolens and Eucalyptus globulus. Global Veterinaria, 9:73-79.

Maleknezhad H., Bazargani- Gilani B., Tukmechi A., Ebrahimi H., 2012. A cytotoxicity and comparative antibacterial study on the effect of ZatariamultifloraBoiss, Trachyspermumcopticum essential oils, and Enrofloxacin on Aeromonashydrophila. Avicenna Journal of Phytomedicine, 2:188-195

Matsuyama H.; Tanaka K.; Nakao M.; Yano T., 1988. Characterization of the alternative complement pathway of carp. Division Comparative Immunology, 12:403–408.

Navarrete, P., Toledo, I., Mardones, P., Opazo, R., Espejo, R., Romero, J, 2010. Effect of Thymus vulgaris essential oil on intestinal bacterial microbiota of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) and bacterial isolates. Aquaculture Research, 41:667-668.

Sahoo P.K., Kumari J. and Mishra, K., 2005. Non-specific immune responses in juveniles of Indian major corporative Applied Ichthyology, 21:151-155.

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

Shailesh S. and Sahoo P.K., 2008. Lysosyme: An important defense molecule of fish inate

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110083]

Downloaded from isfj.ir at 9:01 +0330 on Tuesday December 12th 2017

immune system. Aquaculture Research, 39:223-239.

Soltani M.; Sheikhzadeh, N.; Ebrahimzadeh-Mousavi H.A. and Zargar, A., 2010. Effects of *Zataria multiflora* Essential oil on innate Immune responses of common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of fisheries and aquatic science, 5. 191-199.

Yilmaz S.; Ergun S. and SanverCelik E., 2012. Effects of herbal supplements on growth performance of sea bass (*Dicentrar chuslabrax*): Change in body composition and some blood parameters. Journal of Bioscience and Biotechnology, 1:217-222.

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110083]

Downloaded from isfj.ir at 9:01 +0330 on Tuesday December 12th 2017

Effect of *Zataria multiflora* essential oils on rainbow trout (*Oncorhynchus mykis*) complement component activity and lysozyme

Soltani M.[(1)*]; Zarifmanesh T.[(2)] and Zorriehzahra S.J. [(3)]

msoltani@ut.ac.ir

1-Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, P.O.Box: 14155-6453 Tehran-Iran

2-Department of Fisheries, Science and Research branch of Islamic Azad University, P.O.Box: 14515-775 Tehran-Iran

3- Iranian Fisheries Research Organization, P.O.Box: 14155-6116 Tehran-Iran

Received: August 2012 Accepted: November 2012

Keywords: Essential Oils of *Zataria multiflora*, *Oncorhynchus mykiss*, Fish Immune System

Abstract

Influence of dietary administration of *Zataria multiflora* Bioss was evaluated on complement component activity and lysozyme of rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)* to determine stimulatory effect of essential oils. Fish weighting 100±10 g were fed with different doses of 10, 20 and 40 ml/kg food for a period of 10 days. Alternative Complement Activity (CH50%) and serum lysozyme activity were measured on days 1, 8, 15 and 29 after the essential oils administration. The obtained results showed that for first and eighth days of sampling, the complement component mean in treatment groups were significant higher than control group, while negligible difference is shown between treatment groups. For fifteenth and twenty ninth days of sampling, no significant difference was seen in the complement component mean among all examined groups. Also, the results of experiment show that for all of days of sampling, essential oils of *Zataria multiflora* Bioss have no effect on serum lysozyme activity.

*Corresponding author