اثر عصاره دانه اسپند(*Peganum harmala L*) بعنوان مکمل غذایی بر برخی پارامترهای ایمنی غیراختصاصی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

پریا اکبری[1*]، محبوبه قرقانی پور[2] و محمد سعید فریدونی[3]

[1] چابهار، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، دانشکده علوم دریایی، گروه شیلات

[2] اصفهان، دانشگاه پیام نور، دانشکده زیست شناسی

[3] شیراز، دانشگاه شیراز، دانشکده دامپزشکی، واحد بهداشت و بیماریهای آبزیان

تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۳/۵/۲۷

چکیده

محرکهای ایمنی، ارتباط ویژه ای با مکانیسم احتمالی سیستم ایمنی در ماهیها دارد. هدف از این تحقیق، بررسی اثر محرک ایمنی عصاره دانه اسپند (*Peganum harmala* L) بر تغییرات لیزوزیم، فاگوسیتوز، انفجار تنفسی و گلبولهای خون ماهی قزل آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با میانگین (± انحراف معیار) ۱۰ ± ۱۰۰گرم می‌باشد. ماهیها به روش خوراکی با غلظت های ۱۰۰،۱۵۰ ، ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره دانه اسپند (*P.harmala*) بمدت ۱۴ روز متوالی مورد تغذیه قرارگرفتند. بمنظور مقایسه، یک گروه شاهد نیز بدون افزودن عصاره به جیره غذایی در نظر گرفته شد. شمارش گلبولهای سفید/ قرمز و فعالیت لیزوزیم خون همچنین فعالیت فاگوسیتوز و انفجار تنفسی کلیه ماهیها پس از آخرین تجویز عصاره مورد سنجش قرارگرفت. نتایج حاصل از این تحقیق، نشان داد که بیشترین میزان فعالیت لیزوزیم در گروه تغذیه شده با غلظت ۱۰۰و۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده شد و نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری داشته است ($P<0/05$). بیشترین تعداد گلبول سفید و قرمز، در گروه تغذیه شده با غلظت ۱۰۰ مشاهده شد ($P<0/05$). فعالیت فاگوسیتوز و انفجار تنفسی در بین گروه شاهد و گروههای تیمار تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ($P>0/005$). براساس نتایج حاضر، غلظت ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره دانه اسپند (*P.harmala*) تاثیر مثبتی بر فعالیت لیزوزیم خون در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان دارد.

واژه‌های کلیدی: *Peganum harmala*، سیستم ایمنی، فعالیت فاگوسیتوز، *Oncorhynchus mykiss*

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۵۴۳۱۲۷۲۳۴۰ ، پست الکترونیکی: paria.akbary@gmail.com

مقدمه

نقش مهم سیستم ایمنی در حفظ سلامت آبزیان و تضمین بقاء و رشد مناسب آنها در طول دوره پرورش، سبب شده تا محققین با استفاده از انواع ترکیبات شیمیایی و طبیعی محرک و تقویت کننده سیستم ایمنی تمایل نشان دهند (۱). ماهیها مانند سایر مهره‌داران رده‌های پایین‌تر خود برای مبارزه با عوامل بیماری‌زا عمدتاً به سیستم ایمنی غیراختصاصی متکی هستند. لذا محرکهای ایمنی در ماهیهای پرورشی جهت افزایش فعالیت مکانیسم‌های دفاع غیراختصاصی و ایجاد مقاومت در مقابل بیماریها، مورد استفاده قرار می‌گیرند. و بعنوان یک جایگزین مناسب برای آنتی بیوتیک‌ها معرفی شده‌اند. افزایش باکتریهای مقاوم نسبت به آنتی بیوتیک‌ها، و عوارض جانبی این داروها بر بدن ماهی از جدی‌ترین تهدیدهای استفاده از آنتی بیوتیک-ها می‌باشد (۲، ۱۵،۹). در بین محرکهای ایمنی، عصاره‌های گیاهی بعلت در دسترس بودن، قیمت پایین، عدم ایجاد

مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا و آسیب کمتر به ماهی و محیط زیست مورد توجه قرارگرفته‌اند (۱۴،۱۰،۶).

اسپند (*Zataria multiflora*) از خانواده Zygophyllaceae است و یکی از شناخته شده‌ترین گیاهان دارویی در طب سنتی ایران و اروپا می‌باشد. این گیاه حاوی مواد ضد میکروبی از نوع لانوئیدها و آلکالوئیدها می‌باشد که این مواد در بخشهای مختلف آن زیاد یافت می‌شود از جمله آلکالوئیدهای مهم آن می‌توان به آلکالوئید هارمین، هارمالین، هارمالول و کینازولین اشاره کرد (۱۳)، از خواص دارویی آن در دامپزشکی می‌توان به اثرات ضد باکتریایی آن اشاره نمود (۲۰،۱۹).

پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) طی سالیان اخیر با شتاب زیادی توسعه یافته است. استخرهای پرورشی جدید ساخته شده‌اند و میزان تولید در واحد سطح افزایش چشمگیری پیدا کرده است. همراه چنین توسعه‌ای که افزایش تراکم ماهی را در واحد سطح طلب می‌نماید، انواع بیماریهای عفونی با سرعت هرچه تمامتر در جمعیت ماهیان پرورشی گسترش می‌یابند. لذا تلاش برای افزایش مقاومت در برابر بیماریها، از مهمترین اهداف تحقیقات مرتبط به این گونه در دنیاست (۲۰).

تحقیقات زیادی که در زمینه اثرات مثبت این گیاه، در کنترل بیماریهای میکروبی و تقویت سیستم ایمنی انسان و جانوران آزمایشگاهی شده است (۲۰،۱۹). اما هیچ تحقیقی در زمینه تاثیر این گیاه بر سیستم ایمنی ماهیها وجود ندارد.

هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر عصاره دانه اسپند (*P.harmala*) بر فعالیت لیزوزیم، فاگوسیتوز، انفجار تنفسی و تعداد گلبولهای سفید و قرمز خون در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*O. mykiss*) بعنوان یکی از گونه‌های مهم پرورشی می‌باشد.

مواد و روشها

دانه گیاه عصاره اسپند (*P. harmala*) از عطاری شیراز تهیه و در مرکز هرباریوم دانشگاه شیراز هویت آن مورد تایید قرار گرفت (۱۲). سپس سر شاخه‌های آن در فضای آزاد خشک و توسط دستگاه آسیاب کاملاً به حالت پودر تبدیل شد. ۵۰gr از پودر حاصل با ۴۰۰ میلی لیتر الکل متانول ۹۶ درصد مخلوط و با دستگاه همزن کاملاً بهم زده شد. و با دستگاه سوکسله عصاره گیری انجام شد و عصاره‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان مصرف نگهداری شد.

این بررسی در زمستان ۱۳۹۱، در دانشکده دامپزشکی شیراز انجام شد. ۱۰۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O.mykiss*) با میانگین وزنی ۱۰± ۱۰۰ گرم از مزرعه پرورش شش پیر سپیدان شیراز خریداری و قبل از شروع آزمایش، ۷ روز با شرایط محیط سازگار شدند.

بمنظور اجرای این تحقیق، ۴ عدد وان فایبرگلاس ۱۰۰ لیتری که با آب لوله‌کشی شهری که قبلاً در مخزن ۱۰۰۰ لیتری کلرزدایی شده پر شدند. طی دوره آزمایش، میانگین دمای آب ۰/۵± ۸/ ۱۵درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۰/۱± ۵/۵ میلی‌گرم بر لیتر و اسیدیته ۰/۱۸±۷/۸ برآورد شد. پس از پایان دوره سازش پذیری، ماهیها بصورت تصادفی شمارش شده و با تراکم ۱۰ قطعه به ازای هر وان به وانها اضافه شدند. در این طرح از چهار رژیم غذایی استفاده شد. رژیم غذایی بکار رفته در این تحقیق شامل تیمار کنترل (شاهد) که تنها از غذای کنسانتره (شرکت تعاونی تولید ۲۱ بیضاء شیراز) تغذیه کرده، (تیمار ۱) که از غذای کنسانتره حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره دانه اسپند (۲۰،۱۹) *P. harmala*) (تیمار ۲) از غذای کنسانتره حاوی ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره دانه اسپند (*P. harmala*) و (تیمار ۳) از غذای کنسانتره حاوی ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره دانه اسپند (*P. harmala*) تغذیه شدند.

ماهیها با تیمارهای فوق بمدت ۱۴ روز به میزان ۵٪ وزن بدن خود ۳ با در روز تغذیه شدند. در پایان دوره آزمایش،

جمع آوری خون و جداسازی بافت کلیه از تمام ماهیها بمنظور اندازه‌گیری فعالیت فاگوسیتوز، انفجار تنفسی، لیزوزیم و شمارش گلبولهای سفید و قرمز خون صورت گرفت.

شمارش گلبولهای قرمز و سفید خون بروش لام نئوبار صورت گرفت و تعداد گلبولهای قرمز و سفید در هر میلی‌متر مکعب خون با استفاده از فرمولهای زیر محاسبه شد (۴).

تعداد گلبولهای قرمز در یک میلی‌متر مکعب خون نمونه= تعداد گلبولهای شمرده شده در ۵ مربع کوچک (N)× ۵ (مربع بزرگ)× ۱۰ (ارتفاع لام و لامل)×۲۰۰ (رقت خون)= N×۱۰۰۰۰

تعداد گلبولهای سفید در هر میلی‌متر مکعب خون= تعداد گلبولهای سفید شمارش شده در سطح میلی مترمکعب ۰/۱ (N) ×۱۰ (ارتفاع لام و لامل)×۲۰ (رقت خون)= N×۲۰۰

سنجش فعالیت لیزوزیم براساس روش درمیس و بوین در سال (۱۹۹۶) بر پایه تجزیه باکتریهای گرم مثبت حساس به لیزوزیم (میکروکوکوس لیزودکتیکوس (*Micrococcus lysodeikticus*) با تغییر جزیی صورت گرفت. بمنظور عمل رقیق سازی لیزوزیم، از سفیده تخم‌مرغ (Sigma) رقت‌های ۰ تا ۲۰ میکرولیتر در بافر سیترات- فسفات ۰/۱ مولار با اسیدیته ۵/۸ برای استاندارد سازی استفاده شد. سپس ۲۵ میکرولیتر از نمونه سرم رقیق‌سازی نشده را به هر یک از خانه‌های میکروپلیت (۹۶ خانه) اضافه کرده برای هر یک از نمونه سرم ۳ خانه مورد استفاده قرارگرفت. سپس ۱۷۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری میکروکوکوس لیزودکتیکوس (*Micrococcus lysodeikticus*) (Sigma) به خانه‌ها اضافه شده و بعد از مخلوط شدن میزان کاهش جذب نور در نمونه‌ها از ۳۰ ثانیه تا ۱۵ دقیقه در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از میکروپلیت ریدر قرائت شد. در پایان میزان لیزوزیم موجود در هر نمونه با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه گردید (۸).

تعیین فعالیت فاگوسیتوزی ماکروفاژهای بافت کلیه توسط روش کیم و آستین در سال ۲۰۰۶ با اندکی تغییر صورت گرفت. ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون سلولی ماکروفاژها (10^6سلول بر میلی‌لیتر) از هر ماهی روی یک لام شیشه‌ای تمیز قرار داده شد و سپس به مدت ۱ ساعت در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد در یک اطاقک مرطوب بمنظور چسبیدن سلول‌ها به لام شیشه‌ای قرارگرفت. سپس لام دو بار توسط محیط L -۱۵ شسته شده تا سلولهایی که به لام شیشه‌ای چسبیده نشده جدا گردند. ۱ میلی‌لیتراز سوسپانسیون سلولی مخمر (10^8سلول بر میلی‌لیتر) رنگ‌آمیزی شده با رنگ قرمز کونگو را به لام شیشه‌ای اضافه کرده و مجدداً به مدت ۱ ساعت در اتوکلاو در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد بمنظور عمل فاگوسیتوز شدن مخمر توسط ماکروفاژها قرار داده سپس لام دو بار توسط محیط L -۱۵ شسته شده و در مجاورت هوا خشک گردید بمدت ۳ دقیقه در متانول خالص (۹۶ درصد) فیکس و بمدت ۱۵ دقیقه در محلول رنگی گیمسا (Sigma) قرارداده تا رنگ‌آمیزی گردد. و مجدداً شستشوی آنرا انجام داده. سپس اسلاید بدست آمده را در زیر میکروسکوپ (با عدسی۱۰۰×) قرار داده و تعداد۲۰۰ سلول را شمارش کرده تا ماکروفاژهایی که مخمرها را بلعیده‌اند مشخص گردند. سپس فعالیت فاگوسیتوز طبق فرمول زیر محاسبه گردید (۱۱).

$$\text{PA (فعالیت فاگوسیتوزی)} = \frac{\text{تعداد سلول های فاگوسیت کننده}}{\text{تعداد کل سلول ها}} \times ۱۰۰$$

$$\text{شاخص فاگوسیتوزی} = \frac{\text{تعداد مخمرهای فاگوسیت شده}}{\text{تعداد ماکروفاژهای فاگوسیت کننده}}$$

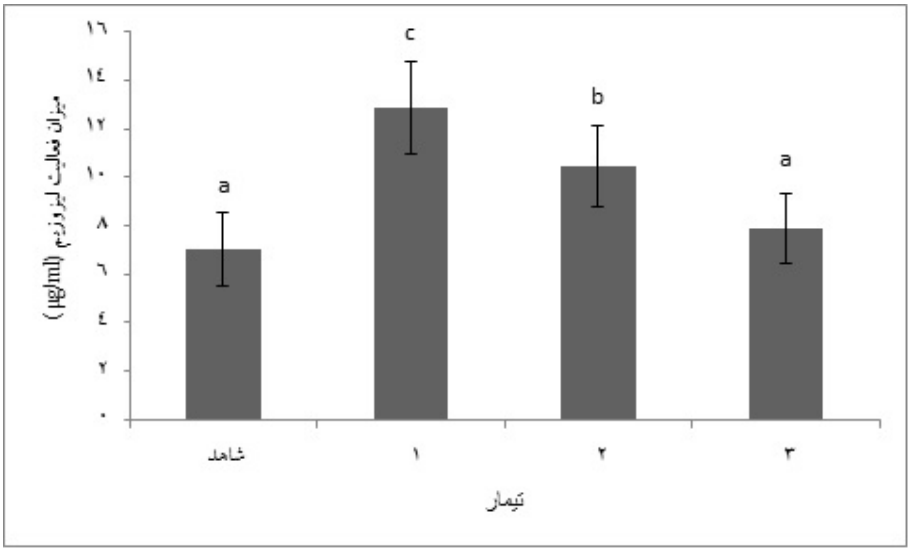
تعیین فعالیت انفجار تنفسی به روش سکومبر و چانگ در سال ۱۹۸۸با کمی تغییر صورت گرفت. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی حاوی ماکروفاژ به هر خانه

میکروپلیت (۹۶ خانه ته صاف) اضافه شد. سپس پلیت را به مدت ۲ ساعت در گرمخانه ۲۰ درجه سانتی‌گراد در تاریکی قرارگرفته تا ماکروفاژها به کف خانه‌های پلیت بچسبند. آنگاه محلول رویی را تخلیه کرده و دوبار با محلول محیط L ۱۵ـ شستشو داده سپس ۶۰ میلی‌لیتراز محلول نیتروبلوتترازولیوم (Nitro blue tetrazolium) (Merck, Germany) ۰/۱درصد را همراه با ۲۰ میکرولیتر از آنزیم سوپراکسایددیسموتازو (Superoxide dismutase) (Sigma, Aldrich,USA) ۲۰ میکرولیتر از محلول سوسپانسیون حاوی باکتری‌های خرد شده را به هر کدام از خانه پلیت‌های U شکل اضافه کرده و آنگاه پلیت را به مدت ۴۵ دقیقه در گرمخانه ۱۸ درجه سانتی‌گراد قرارداده و سپس محلول رویی را تخلیه نموده و دوبار با نرمال سالین شستشو داده و ۵۰ میکرولیتر متانول ۷۰ درصد به هر خانه اضافه نموده تا روند انجام واکنش به طور کامل متوقف گردد. و ماکروفاژها فیکس شده و پس از گذشت ۳۰ دقیقه متانول را خالی کرده و در هوای آزاد خشک شده، آنگاه به هر کدام از خانه‌ها ۱۲۰ میکرولیتر از محلول هیدروکسید پتاسیم و ۱۴۰ میکرولیتر از محلول دی متیل سولفوکساید (Merck, Germany) اضافه نموده و جذب نوری پلیت را توسط دستگاه قرائت الیزا در طول موج ۶۲۰ نانومتر قرائت گردید (۱۸).

ابتدا نرمال بوده داده‌ها با آزمون کالموگروف- اسمیرنوف و همگنی واریانس‌ها با آزمون لون (Leven) بررسی شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از روش آنالیز واریانس یکطرفه (One-Way ANOVA) و جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح اعتماد ۵ درصد (p=۰/۰۵) استفاده شد. تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS (منبعVersion16) انجام گرفت.

نتایج

نمودار۱ تغییرات میانگین فعالیت لیزوزیم را در غلظت‌های مختلف عصاره دانه اسپند (*P.harmala*) نشان می‌دهد. بیشترین میزان فعالیت لیزوزیم در تیمار تغذیه شده با غذای کنسانتره بهمراه ۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره دانه اسپند (*P.harmala*) (تیمار۱) مشاهده شد و اختلاف معنی‌داری را با تیمارهای دیگر نشان داد (P<۰/۰۵). همچنین بین (تیمار ۳) تغذیه شده با غذای کنسانتره بهمراه ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره دانه اسپند (*P.harmala*) و تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵).



نمودار ۱- تغییرات میانگین فعالیت لیزوزیم در بین تیمارهای مختلف

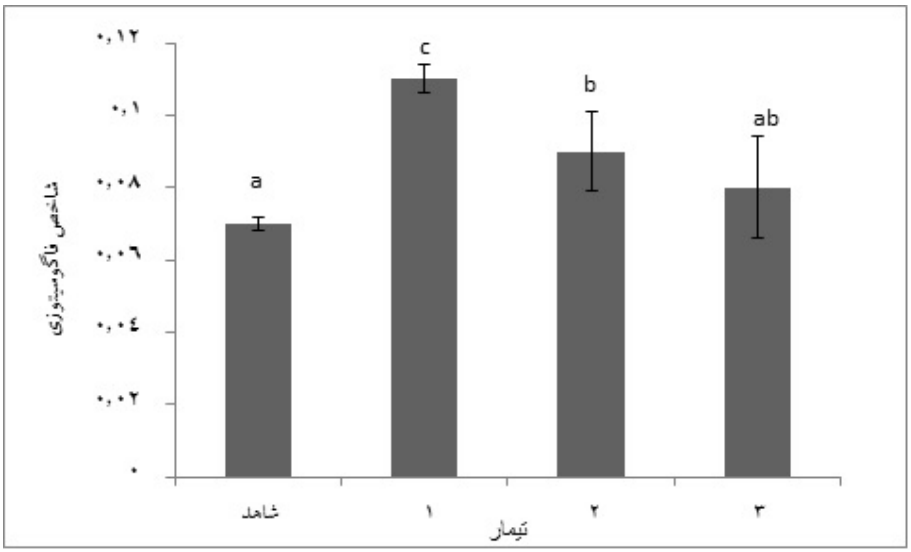
جدول ۱ تغییرات میانگین فعالیت انفجار تنفسی و گلبولهای سفید و قرمز خون را در تیمارهای مختلف نشان می‌دهد. بیشترین میزان گلبولهای سفید و قرمز خون در (تیمار ۱) (تغذیه شده با غذای کنسانتره بهمراه میلی‌گرم بر کیلوگرم ۱۰۰ عصاره اسپند (*P.harmala*)) مشاهده شد و اختلاف معنی‌داری را با تیمار شاهد نشان داد (P<۰/۰۵). و در بین سایر تیمارها با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). از نظر عددی بیشترین میزان فعالیت انفجار تنفسی در (تیمار ۱) مشاهده شد اما اختلاف معنی‌داری را با تیمار شاهد و ۲ (تغذیه شده با غذای کنسانتره بهمراه ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره دانه اسپند (*P.harmala*)) نشان نداد (P>۰/۰۵).

جدول ۱- تغییرات میانگین فعالیت انفجار تنفسی و گلبولهای سفید و قرمز خون را در تیمارهای مختلف

تیمار	فعالیت انفجار تنفسی (O.D) جذب نوری	گلبولهای سفید($\times 10^3$)	گلبولهای قرمز ($\times 10^4$)
شاهد (کنترل)	۰/۱۲±۰/۰۰۵ a	۴۴/۶۲±۲/۵۵ a	۶۳/۶۲±۱/۲۸ a
۱	۰/۱۲±۰/۰۰۷ a	۵۷/۵۵±۱/۰۲ b	۷۱/۳۳±۴/۰۹ b
۲	۰/۱۱±۰/۰۰۸ a	۴۸/۶۶±۲/۶۴ a	۶۳/۳۳±۱/۵۰ a
۳	۰/۰۷±۰/۰۰۶ b	۴۶/۰±۴/۸۷ a	۵۹/۱۱±۴/۲۸ a

حروف نامشابه درهر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵). تیمار ۱) غذای کنسانتره بهمراه ۱۰۰mg/kg، تیمار۲) غذای کنسانتره بهمراه ۱۵۰ mg/kg و تیمار ۳) غذای کنسانتره بهمراه ۳۰۰ mg/kg عصاره دانه اسپند (*P. harmala*).

تغییرات میانگین شاخص فاگوسیتوزی در بین تیمارهای مختلف در نمودار ۲ نشان داده شده است. بیشترین میزان آن در تیمار تغذیه شده با غذای کنسانتره بهمراه ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره دانه اسپند (*P.harmala*) (تیمار۱) مشاهده شد و تفاوت معنی داری را نسبت به تیمارهای دیگر نشان داد (P<۰/۰۵).



نمودار۲- تغییرات میانگین شاخص فاگوسیتوزی در بین تیمارهای مختلف

بحث

در صنعت آبزی پروری، ماهیها در طول دوره پرورش با استرسهای مختلفی روبرو هستند همچنین کاهش درجه حرارت در طول فصل زمستان منجر به کاهش فعالیت سیستم ایمنی غیراختصاصی در ماهیها می‌گردد. استفاده از محرکهای ایمنی می تواند منجر به افزایش پاسخ سیستم ایمنی و بهبود وضعیت سلامت ماهی در برابر میکروارگانیسمهای بیماری‌زا گردد (۲۲،۴). لذا در این تحقیق، برخی از پاسخهای ایمنی غیراختصاصی ماهی قزل-آلای رنگین کمان (*O. mykiss*) بعد از مصرف خوراکی عصاره دانه اسپند (*P.harmala*)، بعنوان محرک ایمنی، با غلظت‌های مختلف (۱۰۰، ۱۵۰، ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بهمراه غذای کنسانتره مورد بررسی قرارگرفته است.

لیزوزیم یکی از ترکیبات هومورال سیستم ایمنی غیراختصاصی است که منجر به شکسته شدن پیوند بتا ۴-۱ بین ان- استیل مورامیک اسید و ان- استیل گلوکز آمین در دیواره سلولی (لایه پپتیدوگلیکان) باکتریهای گرم مثبت می‌گردد و بدین صورت از تهاجم این باکتریها جلوگیری بعمل می‌آورد (۷، ۲۱). تحقیقات متعدد نشان داد که میزان لیزوزیم سرم خون ماهی کپور هندی روهو (*Labeo rohira*) پس از تغذیه از دانه گیاه *Achyrathes aspera* (۱۴) در مارماهی ژاپنی (*Anguilla japonica*) (۷) بعد از تغذیه با *Korean mistletoe* افزایش یافت. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که میزان فعالیت لیزوزیم در تیمارهای تغذیه شده با غلظتهای ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره دانه اسپند (*P.harmala*) تفاوت معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد نشان دادند ($P<۰/۰۵$) و بیشترین میزان لیزوزیم در تیمار ۱ (تغذیه شده با ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره) مشاهده شد (نمودار ۱). بررسی‌ها نشان می‌دهد که با افزایش تعداد سلولهای بیگانه خوار، میزان لیزوزیم نیز افزایش می‌یابد (۱۶)، که با نتایج بدست آمده از این تحقیق همخوانی دارد. می‌توان گفت که ترکیبات عصاره دانه اسپند (*P.harmala*) تعداد فاگوسیتهای ترشح کننده لیزوزیم را تغییر داده است (۲۱).

همچنین نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که بیشترین تعداد گلبولهای سفید و قرمز خون در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان تغذیه شده با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره دانه اسپند (*P.harmala*) مشاهده شد و اختلاف معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد نشان داد ($P<۰/۰۵$). که با نتایج بدست آمده از تحقیق بچه‌ماهی کپور هندی روهو (*Lebeo rohita*) بعد از تغذیه با *Magnifera indica* (۱۷) و کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) تغذیه شده با اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) (۲۱)

فعالیت فاگوسیتوزی توسط سلولهای فاگوسیتیک یکی از مکانیسمهای دفاعی مهم در مقابل باکتریهای بیماری‌زا می-باشد. سلولهای فاگوسیتوز در جریان فعالیت انفجار تنفسی خود توانایی تولید آنیون‌های سوپر اکسید را دارند که این اشکال اکسیژن سمی و منجر به از بین بردن باکتریها می-گردند (۱۷،۵) در مطالعه حاضر، اضافه نمودن عصاره دانه اسپند (*P.harmala*) به جیره غذایی با دوز ۱۵۰،۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم منجر به تفاوت معنی‌داری در میزان فعالیت انفجار تنفسی سلولهای فاگوسیتوزی در مقایسه با تیمار شاهد در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان نشده ($P>۰/۰۵$)، که با نتایج بدست آمده از تحقیق بر روی کپور هندی روهو (*Lebeo rohita*) تغذیه شده با *Magnifera indica*(۱۷) و تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) تغذیه شده با دو عصاره گیاه *Astragalus membranaceus* و *Lonicera japonica* (۳) مغایرت دارد. همچنین نتایج حاصل از فعالیت فاگوسیتوزی در این تحقیق نشان داد که بیشترین میزان فعالیت فاگوسیتوزی در تیمار ۲ (تغذیه شده با ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره) مشاهده شد که با نتایج بدست آمده از تحقیق‌های مشابه همخوانی داشت (۱۷،۳).

در نتیجه این مطالعه نشان داد که عصاره دانه اسپند (*P.harmala*) با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم می‌تواند منجر به افزایش توانایی سیستم ایمنی غیراختصاصی در شرایط استرس (کاهش دما) گردد اما مطالعه بیشتری در زمینه نقش هر یک از ترکیبات موجود عصاره دانه اسپند (*P.harmala*) در افزایش فعالیت سیستم ایمنی نیاز است.

تشکرو قدردانی

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

منابع

1. Ahmadi, K., Vosoghi, A. A., Mirvaghefi, A. R., Attai Mehr, B., and Banaei, M., 2010. Effect of dietary extract of *Silybum mariamum* as medicinal herb on some nonspecific factors in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Marine Biology Journal of Islamic Azad University, Ahvaz Branch. 2, PP: 19-26.
2. Alishahi, M., Soltani, M., Mesbah, M., and Zargar, A., 2012. Immunostimulatory and growth stimulation effects of Ergosan, levamisole and herbal extracts in *Cyprinus carpio*. Journal of Veterinary Research. 2, PP:135-142
3. Ardo, L., Yin, G., Xu, P., Varadi, L., Szigeti, G., Jeney, Z., and Jeney, G., 2008. Chines herbs (Astragalus membranaceus and Lonicera japonica) and boron enhance the non- specific immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and resistance against *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture. 275, PP: 26-33
4. Atamanalp, M., Angis, S., Oguzhan, P., and Aksakal, E., 2008. Alterations in Hematological Parameters of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Exposed to DDVP, Israel . Journal of Aquaculture Bamidgeh. 60, PP: 9-12.
5. Bagni, M., Romano, N., Finoia, M. G., Abelli, L., Scapigliati, G., and et al. 2005. Short- and long term effects of a dietary yeast b- glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass *Dicentrarhus labrax*. Fish & Shellfish Immunology. 18, PP: 311-325
6. Chen, X., Wu, Z., and Yin, J., 2003. Effects of four species of herbs on immune function of *Carassius auratus* gibelio. Journal of Fisheries Science, China. 10, PP: 36-40.
7. Choi, S. H., Park, K. H., Yoon, T. J., Kim, J. B., Jang, Y. S., and Choe, C. H., 2008. Dietary Koren mistletoe enhances cellular non- specific immune responses and survival of Japanese eel (*Anguilla japonica*). Fish & Shellfish Immunology. 24, PP: 67-73
8. Demers, N. E., and Boyne, C. J., 1996. Plasma proteins of rainbow trout immediate response to acute stress in models for environment toxicology biomarkers immunostimulants. Journal of Fish Disease. 20, PP: 721-732.
9. Harikrishnan, R., Nisha, M. R., and Balasundaram, C., 2003. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. Aquaculture. 221, PP: 41-50.
10. Jian, J., and Wu, Z., 2004. Influences of traditional Chinese medicine on nonspecific immunity of Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). Fish & Shellfish Immunology.16, PP: 185-191
11. Kim, D. H., and Austin, B., 2006. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss,* Walbaum 1792) induced by probiotics. Fish & Shellfish Immunology. 21, PP: 513-524
12. Mozaffarian, V., 1996. Encyclopedia of Iranian plants. Farhang Moaser Publication, Tehran, Iran, (in Persian).
13. Nahiad,T., 1990. Aminoacid and carbohydrate contents of *Peganum harmala* seeds. Pakistan Journal of Biochemistry. 2(2), PP: 63-6. Cited in chemistry Abstract. 75, PP: 45656
14. Rao, Y. V., Das, B. K., Pradhan, J., and Chakrabrti, R., 2006. Effect of *Achyronthes aspera* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila.* Fish & Shellfish Immunology. 20, PP: 263-273.
15. Ravelo, C., Magariños, B., Herrero, M. C., Costa, L., Toranzo, A. E., and Romald J. L., 2006. Use of adjuvanted vaccines to lengthen the protection agaist Lactococcusis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. 251, PP: 153-158.
16. Sahoo, P. K., Kumarij, J., and Mishra, K., 2005. Non- specific immune responses in juveniles of Indian major corporative. Journal of Applied Ichthyology. 21, PP:151-155,
17. Sahu, S., Das, B. K., Pradhan, J., Mohaptra, B. G., Mishra, B. K., and Sarangi, N. N., 2007. Effect of *Magnifera indica* kernel as a food

additive on immunity and resistance of *Aeromonas hydrophila* in *Lebeo rohita* fingerlings. Fish & Shellfish Immunology. 23, PP: 109-118.

18. Secombes, C. J., and Chung, S., 1988. Analysis of events occurring within teleost macrophages during the respiratory burst. Comparative. Biochemistry. Physiology. 89, PP: 539-544.
19. Shahverdi, A. R., Ostad, S. N., Khodaee, S., Bitarafan, L., Monsef-Esfahani, H. R., Jamalifar, H., Nikavar, B., and Mohseni, M., 2008. Antimicrobial and cytotoxicity potential of *Peganum harmala* smoke. Pathology Magazine. 4, PP: 236-240.
20. Shouda, M., Osman, S., Salama, D., and Ayub, A., 2008. Toxical effect of *P. harmala* leaves on the Cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis* and its parasitoids microplitis. Pakistan Journal of Biology Science. 1, PP: 546-552.
21. Soltani, M., Sheikhzadeh, N., Ebrahimzadeh-Mousavi, H. A., and Zargar, A., 2010. Effect of Zataria multiflora essential oil on innate immune responses of common carp (*Cyprinus carpio*).Journal of Fisheries Aquatic Science. 5, PP: 191-199.
22. Tort, L., Rotllant, J., Liarte, C., Acerete, L., Hernăndeza, A., Ceulemans, S., Coutteau, P., and Padros, F., 2004. Effects of temperature decrease on feeding rates, immune indicators and histopathological changes of gilthead sea bream *Sparus auratus* fed with an experimental diet. Aquaculture. 229, PP: 55

Effect of the seed extract of *Peganum harmala L* supplemented diet on several of non-specific immunity parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum)

Akbary P.[1], Ghareghani Poor M.[2] and Fereidouni M.S.[3]

[1] Fisheries Groups, Marine Sciences Dept., Chabahar Maritime University, Chabahar, I.R. of Iran

[2] Biology Dept., Payam Noor University, Isfahan, I.R. of Iran

[3] Aquatic Animal Health Units, School of Veterinary Medicine, Shirazu University, Shiraz, I.R. of Iran

Abstract

Immunostimulants have a special relationship with possible mechanism of immunity system of fish. The present study investigated Influence of dietary administration of *Peganum harmal L,* on phagocytosis, lysozyme, respiratory burst and blood cells of rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)* to determine stimulatory effect of methanol extract. Fish weighting 100±10 g were fed with different doses of 10, 50 and 40 mg/kg food for a period of 14 days. There was a control group fed only with commercial food. After 14 days, samples from kidney and blood of the fish were collected in order to determine phagocytosic, respiratory burst activity and lysozyme, total white and red blood cells(WBC/RBC) respectively. Results of present study indicated that the highest ratio of lysozyme activity was observed in 20 and 50 mg/kg extract concentration of *P.harmala* ($P<0.05$). The highest WBC and RBC were seen in 20 mg/kg extract concentration of *P.harmala*. No significant difference was shown between phagocytosis and respiratory burst activity in treatment groups and control group ($P>0.05$). It can be concluded that 20 and 50 mg/kg of the *P.harmala* extract have positive effects on lysozyme activity in *O.mykiss*.

Key words: *Peganum harmala*; immunity system; phagocytosis activity, *Oncorhynchus mykiss*