بررسی تأثیر لوامیزول بر سیستم ایمنی و مقاومت در برابر تنش تراکم در قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

سعید مشکینی[1*]، نوروز دلیرژ[2] و علی اکبر طافی[3]

[1] ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی و پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی

[2] ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه میکروبیولوژی

[3] ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات و آبزیان

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۴/۳/۲

چکیده

با وجود تنش‌های مختلف در مزارع پرورش ماهی، تقویت سیستم ایمنی ماهیان در برابر این تنش‌ها امری ضروری بنظر می‌رسد. این تحقیق بمنظور بررسی اثر لوامیزول بر سیستم ایمنی قزل‌آلای رنگین‌کمان در شرایط تنش تراکم انجام گرفت. بدین منظور ۱۰۰۰ قطعه ماهی‌قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی ۶±۱۵۰ گرم از یکی از مزارع پرورش ماهی ارومیه تهیه شد و در قالب پنج تیمار و با جیره حاوی ۰، ۱۰۰، ۲۵۰ ، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم لوامیزول در هر کیلوگرم غذا و با تراکم ۳۳ کیلوگرم در مترمکعب به مدت ۴۵ روز تغذیه شدند و سپس تا روز ۶۰ همه تیمارها با جیره فاقد لوامیزول و تحت تنش تراکم دو و سه برابر دوره پرورش قرارگرفتند. در روزهای ۰، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و۶۰ از تمام گروه‌های ماهیان مورد آزمایش نمونه سرم برای ارزیابی فاکتورهای غلظت ایمونوگلوبولین تام، فعالیت کمپلمان و فعالیت لیزوزیم تهیه گردید. نتایج به دست آمده نشان داد در روز ۶۰ (پایان آزمایش) در ماهیان تحت تنش تراکم دو و سه برابر، تیمار حاوی ۱۰۰۰ میلی‌گرم لوامیزول در یک کیلوگرم غذا، افزایش معنی‌دار ($P < ۰/۰۵$) فعالیت لیزوزیم سرم، ایمونوگلبولین تام سرم و فعالیت سیستم کمپلمان سرم را نسبت به گروه شاهد نشان داد. بنابراین با توجه به نتایج این تحقیق استفاده از لوامیزول حداکثر با غلظت ۰/۱ درصد جیره‌غذایی به عنوان محرک ایمنی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مواقع بروز تنش تراکم بالا پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: قزل‌آلای رنگین‌کمان، لوامیزول، سیستم ایمنی، تنش تراکم

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۴۴۴۳۲۲۹۶ ،پست الکترونیکی: s.meshkiniy@gmail.com

مقدمه

امروزه پرورش‌دهندگان آبزیان برای استفاده از حداکثر ظرفیت محیط‌های پرورشی جهت تولید بیشتر، تراکم آبزیان را در محیط‌های پرورشی بالا می‌برند. با افزایش تراکم آبزیان، تنش‌ها و بیماری‌ها هم افزایش یافته و لذا مقاوم نمودن آبزیان پرورشی در برابر این تنش‌ها امری ضروری است. بنابراین امروزه تقویت سیستم ایمنی بدن ماهیان بویژه در گونه‌های با ارزش و اقتصادی، از اصلی‌ترین نیازهای پرورش‌دهندگان و مهمترین رویکرد محققان دراین راستا می‌باشد. علاوه براین، بروز و شیوع بیماری‌ها در کنار پیشرفت و توسعه صنعت آبزی پروری، از لحاظ اقتصادی این صنعت را تحت تأثیر قرار داده، بطوریکه کنترل برخی از بیماری‌ها را به امری دشوار تبدیل نموده است (۲۸).

استفاده از محرک‌های ایمنی فرصت‌های جدیدی برای توسعه سلامت و کاهش بیماری‌ها و مرگ‌ومیرها در برابر تنش‌های مختلف در آبزی‌پروری به وجود آورده است.

تأثیر مواد شیمیایی، ترکیبات باکتریایی، پلی‌ساکاریدها و عصاره‌های گیاهی و جانوری به عنوان محرک ایمنی در گونه‌های متفاوتی از آبزیان گزارش شده است (۲۱، ۱۲). این محرک‌ها سبب تسهیل عمل بیگانه‌خواری سلول‌های فاگوسیت کننده از جمله ماکروفاژها و افزایش فعالیت ضد باکتریایی و ضدویروسی آنها و بالا بردن توان مقاومت آبزی در برابر شرایط تنشزای محیطی می‌شوند (۲۴، ۱۵، ۹). محرک‌های ایمنی باعث ایجاد ایمنی بلند مدت در آبزیان شده و نقش آنها در مدیریت پیشگیری بیماری‌های آبزیان انکارناپذیر می‌باشد (۲۰).

لوامیزول یک داروی ضدکرم بوده که برای درمان آلودگی با نماتودها در انسان و حیوانات بکار می‌رود (۲۵). لوامیزول به عنوان یک محرک ایمنی غیراختصاصی موثر در آبزیانی همچون کپور معمولی *(Cyprinus carpio)* قزل‌آلای رنگین‌کمان *(Oncorhynchus mykiss)*، سیبریم سرآبششی (*Sparus aurata*) و ماهی آزاد اقیانوس اطلس *(Salmo salar)* نیز معرفی شده‌است (۲۱، ۱۳، ۷). لوامیزول باعث افزایش مقاومت و بقای ماهیان در برابر آلودگی‌های مختلف و تنش‌های محیطی می‌شود و بطور کلی می‌توان از آن به عنوان یک محرک ایمنی مهم در تقویت سیستم ایمنی ماهیان نام برد (۲۷).

ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان *(Oncorhynchus mykiss)* به عنوان یکی از عمده‌ترین گونه‌های ماهیان پرورشی در اکثر کارگاه‌های تکثیر و پرورش ماهیان سرد آبی، در بیشتر نقاط جهان شناخته شده‌است. لذا اهمیت دادن به حل مشکلات پیش روی پرورش‌دهندگان این گونه با ارزش از طریق انجام مطالعات و تحقیقات مختلف روی این ماهی می‌تواند در نهایت به تولید بیشتر آن منجرگردد. از اینرو هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر مقادیر مختلف لوامیزول به عنوان یک محرک ایمنی بر سیستم ایمنی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان و افزایش مقاومت این گونه در برابر تنش تراکم می‌باشد.

مواد و روشها

تهیه بچه ماهیان و شرایط پرورشی: تعداد ۱۰۰۰ قطعه بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ۱۵۰ گرمی از یکی از مزارع پرورش ماهی ارومیه تهیه شده و پس از یک هفته سازگاری با شرایط محیط آزمایش و اطمینان از سلامتی ظاهری آنها، در سالن تکثیر و پرورش ماهیان پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه در دانشگاه ارومیه به تعداد مساوی در ۱۵ حوضچه ۵۰۰ لیتری پلی‌اتیلنی استوانه‌ای با حجم آبگیری ۳۰۰ لیتر (تراکم ۳۳ کیلوگرم در مترمکعب) تقسیم گردیدند. طی دوره پرورش اندازه‌گیری اکسیژن (بطور روزانه بوسیلهٔ دستگاه دیجیتالی اکسی‌متر ساخت شرکت CRISON اسپانیا مدل P ۴۵)، غلظت یون هیدروژن مثبت (پی اِچ) و دمای آب (بطور روزانه بوسیلهٔ دستگاه دیجیتالی پی اِچ متر شرکت Elmetron مدل CP-۴۱۱)، نیتریت، نیترات و آمونیاک آب (بصورت هفتگی و با دستگاه فتومتر ۷۵۰۰ ساخت شرکت پالین انگلستان) و جمع‌آوری تلفات به صورت روزانه صورت گرفت. آب جاری مورد نیاز برای پرورش ماهیان از یک حلقه چاه عمیق با میزان اکسیژن محلول ۸/۵ میلی‌گرم در لیتر و دمای ۱۳ درجه سانتی‌گراد تأمین گردید.

گروه‌های آزمایشی و نحوه تیمار دارویی: ماهیان در پنج تیمار غذایی (یک گروه شاهد و چهار گروه تیمار با مقادیر ۱۰۰ ، ۲۵۰ ، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم لوامیزول در هر کیلوگرم غذا) و با سه تکرار به مدت دو ماه (۴۵ روز تحت تیمار با لوامیزول و ۱۵ روز بدون لوامیزول و با تراکم ۲ و ۳ برابر حالت معمول پرورش یا به عبارتی بترتیب با تراکم ۶۶ و ۹۹ کیلوگرم در مترمکعب) مورد پرورش قرارگرفتند.

تهیه جیره غذایی و غذادهی: غذای ماهیان از نوع تجارتی GFT-1 (Growth Food Trout) شرکت چینه تهران با ترکیب ۴۰ درصد پروتئین، ۱۴ درصد چربی، ۱۱ درصد رطوبت، ۱۰ درصد خاکستر، ۴ درصد فیبر و ۱/۱ درصد فسفر تهیه شده و مقدار مورد نیاز هر گروه از ماهیان با

توجه به میانگین وزن، دمای آب و با استفاده از جدول استاندارد غذادهی (۱۶) تعیین گردید. برای تهیه جیره حاوی لوامیزول، روزانه غذای هر تیمار با ترازوی دیجیتالی (با دقت ۰/۰۰۱ گرم) وزن شده و سپس مقدار لوامیزول لازم برای هر تیمار با توجه به مقادیر ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و۱۰۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم غذا، با ترازوی دیجیتالی وزن و در ۱۵ سی‌سی آب مقطر حل گردید و با آب پاش مخصوص هر تیمار، روی غذای آن تیمار اسپری گردید. پس از خشک شدن غذا در دمای اتاق، تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۱۸). در گروه شاهد، فقط ۱۵ سی‌سی آب مقطر روی غذا اسپری شد تا تنها تفاوت غذای آن با سایر گروه‌ها در مقدار لوامیزول غذا باشد. غذادهی ماهیان در ۴ وعده بین ساعات ۸ صبح تا ۶ عصر و در فواصل مساوی صورت گرفت.

خونگیری و تهیه سرم: در طول تحقیق هر پانزده روز یکبار از همه تیمارها تعداد ۱۵ قطعه ماهی (۵ قطعه از هر تکرار) بطور تصادفی انتخاب و پس از بیهوشی با محلول ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر پودر گل‌میخک، از طریق قطع ساقه دمی از آنها خونگیری شد (۱۸). پس از جداسازی سرم، نمونه‌ها تا زمان اندازه‌گیری پارامترهای ایمنی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۲۴).

اندازه‌گیری فعالیت لیزوزیم سرم: فعالیت لیزوزیم سرم براساس روش کلرتون و همکاران و کیم و آستین و بر مبنای لیز باکتری گرم مثبت حساس به آنزیم لیزوزیم یعنی *Micrococous lysodeikticus*(Sigma, M 3770, USA) اندازه‌گیری شد (۱۷، ۱۰). مقدار ۱۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری *میکروکوکوس لیزودیکتیکوس* با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در بافر سیترات‌سدیم ۰/۰۲ مولار (۵/۵ = پی اِچ)،، به ۱۵ میکرولیتر نمونه سرم در چاهک‌های یک میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای افزوده شد. بلافاصله جذب نوری نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه با فواصل ۳۰ ثانیه در طول موج ۴۵۰ نانومتر با الایزا نگار (اوارنس، آمریکا) قرائت گردید. طبق تعریف یک واحد فعالیت لیزوزیم برابر با میزان سرمی است که باعث کاهش جذب نوری به میزان ۰/۰۰۱ در دقیقه گردد (واحد بین المللی/ دقیقه).

اندازه‌گیری ایمونوگلبولین تام سرم: برای اندازه‌گیری ایمونوگلوبولین تام سرم از روش سویکی و همکاران استفاده شد (۲۳) و اساس کار بر روش رنگ‌سنجی بِرَدفورد استوار بوده که میزان جذب نوری محلولCoomassie Brilliant Blue G-250 (به عنوان ماده رنگ‌پذیر) هنگام اتصال با پروتئین‌های سرم در طول موج ۵۹۵ نانومتر برای محاسبه میزان پروتئین‌ها به کار می‌رود (۶). در این روش از غلظت‌های ۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin) به عنوان محلول استاندارد استفاده گردید.

اندازه‌گیری فعالیت مسیر جایگزین کمپلمان (Alternative pathway complement assay): فعالیت راه جایگزین کمپلمان براساس همولیز گلبول‌های قرمز خرگوش بوسیله سرم و به روش بوسِن و همکاران و اَمار و همکاران اندازه‌گیری شد (۵، ۴). در این روش گلبول‌های قرمز خرگوش سه مرتبه با بافر اتیلن‌گلیکول تترااستیک اسید – منیزیوم – ژلاتین ورنال (۰/۰۱ مولار، ۷ = پی اِچ) (آمریکا، ۴۶۷۸ E، سیگما) شسته شده و تعداد سلول‌های آن به کمک لام نئوبار به تعداد ۲×۱۰^{۸} سلول در هر میلی‌لیتر از بافر ذکر شده تنظیم گردید. سپس نمونه‌های سرم ابتدا ۱۰۰ مرتبه با بافر فوق‌الذکر رقیق شده و براساس جدول استاندارد آماده سازی نمونه سرم جهت اندازه‌گیری فعالیت کمپلمان (۵) حجم‌های متفاوتی از آن در هفت لوله آزمایش استریل ریخته شده، حجم همه لوله‌ها به کمک بافر به ۲۵۰ میکرولیتر رسانده شد. سرانجام به همه لوله‌ها ۱۰۰میکرولیتر گلبول قرمز خرگوش اضافه گردید. مخلوط فوق در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه انکوبه شده و در پایان به هرکدام از لوله‌ها ۳/۱۵

میلی‌لیتر محلول ۰/۸۵ درصد کلرید سدیم افزوده شد. سپس لوله‌ها با دور ۱۶۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و دانسیته نوری محلول رویی به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ۴۱۴ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای محاسبه میزان فعالیت راه جایگزین کمپلمان با استفاده از کاغذ شطرنجی منحنی لیز رسم و فعالیت کمپلمان نمونه از رابطه زیر محاسبه گردید (۴):

Alternative pathway total hemolytic complement assay (U/ml) = k × (فاکتور رقت) × 0/5

در رابطه فوق k مقداری از سرم بر حسب میلی‌لیتر است که موجب ۵۰ درصد همولیز می‌شود، ۰/۵ عدد ثابت بوده و فاکتور رقت در این آزمایش ۰/۰۱ می‌باشد، چون سرم ۱۰۰ مرتبه رقیق شده‌است.

تَنِش‌های تراکم: در پایان روز ۴۵ تحقیق، برای ارزیابی اثر لوامیزول بر تقویت قدرت دفاعی ماهیان در برابر شرایط تنشی تراکم بالا، تمام ماهیان هر تیمار در دو حوضچه به صورت جداگانه یکی با تراکم دو و دیگری با تراکم سه برابر حالت دوره پرورشی قبلی تقسیم گردیدند. در حوضچه‌های تنشی تغذیه ماهیان همه تیمارها فقط با غذای کنسانتره مورد نظر (بدون افزودن لوامیزول) تا روز ۶۰ ادامه یافت. در روز اول شروع تنش ابتدا در هر ۳ ساعت یکبار و در روزهای بعد به صورت روزانه تلفات ماهیان شمارش و ثبت شد.

روش‌های آماری: در این تحقیق جهت تحلیل آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS 15 و آزمون One way ANOVA و آزمون Tukey در سطح معنی‌دار (P<۰,۰۵) استفاده گردید(۱۸) و جدولها و نمودارها به ترتیب با نرم‌افزارهای Microsoft Word 2003 و Microsoft Excel 2003 ترسیم گردیدند.

نتایج

جدول ۱ نتایج آماری تأثیر غلظت‌های مختلف لوامیزول بر میانگین فعالیت لیزوزیم سرم در ماهیان مورد آزمایش در روزهای ثابت را نشان می‌دهد که بطورکلی تیمار لوامیزول ۱۰۰۰ نسبت به دیگر تیمارها طی دوره تحقیق شرایط مطلوب‌تری را نشان می دهد. بطوریکه این تیمار در روزهای ۴۵ و ۶۰ (با تنش تراکم دو و سه برابر) دارای بیشترین مقدار فعالیت لیزوزیم بوده که نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان داده است.

جدول ۲ نتایج آماری تأثیر غلظت‌های مختلف لوامیزول بر میانگین مقدار ایمونوگلوبولین تام سرم در ماهیان مورد آزمایش در روزهای ثابت را نشان می‌دهد. همانطور که در این جدول مشاهده می‌شود در روزهای ۱۵ و ۳۰ بین تیمارها اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نمی‌شود، اما در روزهای ۴۵ و ۶۰ (با تنش تراکم دو و سه برابر) تیمار لوامیزول ۱۰۰۰ از شرایط بهتری برخوردار بوده و با گروه شاهد و لوامیزول ۲۵۰ تفاوت معنی‌دار نشان داده است.

جدول ۱- میانگین فعالیت لیزوزیم سرم (± انحراف معیار) (واحد بین المللی/ دقیقه) در تیمارهای مختلف در روزهای ثابت

روزهای نمونه‌برداری	تیمارهای مختلف				
	LV0	LV100	LV250	LV500	LV1000
روز ۰	563±60	563±60	563±60	563±60	563±60
روز ۱۵	591±113	611±100	620±106	651±145	655±95
روز ۳۰	609±72	644±98	652±54	669±127	678±72
روز ۴۵	622±80[a]	690±28	720±47	790±59	821±40[a]
روز ۶۰ (تراکم ۲ برابر)	656±30[ab]	780±23	864±79	898±76[a]	956±65[b]
روز ۶۰ (تراکم ۳ برابر)	666±60[a]	706±30	701±30	748±66	876±19[a]

حروف یکسان در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار (P<۰,۰۵) می‌باشد

جدول ۲- میانگین مقدار ایمونوگلوبولین تام سرم (± انحراف معیار) (میلی گرم / میلی لیتر) در تیمارهای مختلف در روزهای ثابت

روزهای نمونه‌برداری	تیمارهای مختلف				
	LV0	LV100	LV250	LV500	LV1000
روز صفر	2.23±0.31	2.23±0.31	2.23±0.31	2.23±0.31	2.23±0.31
روز ۱۵	3.12±0.53	3.15±0.48	3.28±0.56	3.25±0.47	3.31±0.38
روز ۳۰	3.21±0.33	3.31±0.49	3.34±0.31	3.30±0.25	3.34±0.30
روز ۴۵	3.34±1.30[a]	3.64±0.87	3.31±0.23	3.62±0.29	4.21±1.39[a]
روز ۶۰ (تراکم ۲ برابر)	3.39±0.13[a]	3.73±0.12	3.64±0.33	4.08±0.20	4.47±0.45[a]
روز ۶۰ (تراکم ۳ برابر)	3.42±0.81[a]	3.64±0.15	3.33±0.64[b]	3.79±0.20	4.43±1.10[ab]

حروف یکسان در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار (P<۰,۰۵) می‌باشد

جدول ۳ نتایج آماری تأثیر غلظت‌های مختلف لوامیزول بر فعالیت کمپلمان سرم ماهیان در روزهای ثابت را نشان می‌دهد که براساس آن تیمار لوامیزول ۱۰۰۰ در روز ۶۰ با تنش تراکم دو و سه برابر دارای بیشترین مقدار فعالیت کمپلمان بوده و تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد و لوامیزول ۱۰۰ نشان می‌دهد.

در نمودار ۱ درصد بقای تیمارهای مختلف طی دوره تحقیق و پس از اعمال تنش‌های تراکم دو و سه برابر نشان داده شده‌است. همان گونه که در این نمودار نشان داده شده بیشترین درصد بقا متعلق به تیمار لوامیزول ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره غذایی می‌باشد که با بقیه تیمارها دارای اختلاف معنی‌دار (P<۰,۰۵) است.

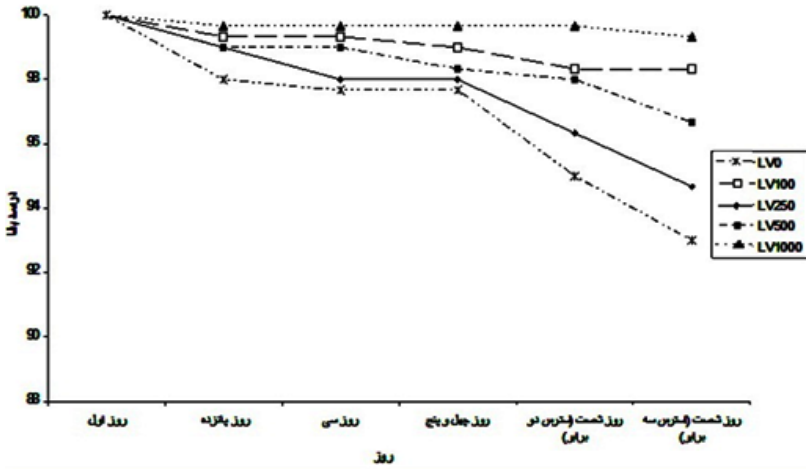
جدول ۳- میانگین فعالیت سیستم کمپلمان سرم (± انحراف معیار) (واحد بین المللی/ میلی لیتر) در تیمارهای مختلف در روزهای ثابت

روزهای نمونه‌برداری	تیمارهای مختلف				
	LV0	LV100	LV250	LV500	LV1000
روز صفر	442±68	442±68	442±68	442±68	442±68
روز ۱۵	718±121	746±129	794±110	944±215	986±92
روز ۳۰	795±708	871±140	882±63	973±233	992±73
روز ۴۵	869±141	920±147	971±28	988±40	1145±148
روز ۶۰ (تراکم ۲ برابر)	872±32[ab]	928±53[cd]	1160±92	1235±80[bc]	1368±111[ad]
روز ۶۰ (تراکم ۳ برابر)	887±35[a]	924±85[b]	977±163	989±103	1260±39[ab]

حروف یکسان در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار (P<۰,۰۵) می‌باشد

بحث و نتیجه گیری

استفاده از محرک‌های ایمنی یکی از روش‌هایی است که برای افزایش رشد، تقویت پاسخ‌های سیستم ایمنی و کنترل بیماری‌ها در صنعت آبزی‌پروری بکار می‌رود. تأثیر محرک‌هایی مانند کوئیل‌آ، گلوکان، لاکتوفرین، عصاره *آلوئه ورا*، کیتوزان و لوامیزول بر روی سیستم ایمنی اختصاصی و غیراختصاصی آبزیان مختلفی گزارش شده‌است و تأثیر این مواد بر شاخص‌های مختلفی از جمله تعداد سلول‌های سفیدخون، فعالیت کمپلمان، فعالیت لیزوزیم سرم و لیزوزیم کبد و کلیه و همچنین ایمونوگلبولین تام سرم و نیز پراکسیداز و سوپراکسیداز سرم مورد بررسی و تحقیق قرارگرفته است (۱۷، ۲).



نمودار۱ – میانگین تغییرات درصد بقا در تیمارهای مختلف طی دوره تحقیق

یکی از مهمترین اثرات محرک‌های ایمنی افزایش فعالیت لیزوزیم سرم می‌باشد (۱۹، ۱) بطوریکه محققان مختلفی تأثیر محرک‌های ایمنی مختلف بر فعالیت لیزوزیم سرم را در گونه‌های متفاوتی از آبزیان گزارش نموده‌اند (۱۴، ۱۱، ۸، ۳). ویجندرا و پاتیراتنه در سال ۲۰۰۷ گزارش نمودند که افزودن مقدار ۵ میلی‌گرم لوامیزول به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در جیره غذایی کپور هندی (*Labeo rohita*) باعث افزایش قابل‌ملاحظه و معنی‌داری در فعالیت لیزوزیم سرم این ماهی نسبت به گروه شاهد پس از ۲۱ روز شده است (۲۶).

در تحقیق پیش‌رو تغییرات میزان فعالیت لیزوزیم تا روز ۳۰ تفاوت معنی‌داری را در بین تیمارهای مختلف نشان نداده است اما از روز ۴۵ تا پایان آزمایش تیمار تغذیه شده با ۱۰۰۰میلی‌گرم لوامیزول با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری ($P<۰,۰۵$) را نشان داده و بیشترین میزان فعالیت لیزوزیم در این تیمار در روز ۶۰ و با تنش تراکم دو برابر مشاهده گردید (جدول ۱).

در تحقیقی که صلاح و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام دادند تأثیر ۱۵۰ میلی‌گرم لوامیزول در یک کیلوگرم جیره غذایی گربه‌ماهی (*Clarias gariepenus*) مورد بررسی قراردادند و دریافتند که لوامیزول در ماهیانی که در شرایط عادی و غیرتنشی قراردارند. تغییرات معنی‌داری در پاسخ‌های ایمنی ماهی ایجاد نمی‌کند اما در ماهیانی که با باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* (*Aeromonas hydrophyla*) مورد تزریق قرارگرفتند لوامیزول باعث افزایش معنی‌دار در تعداد کل گلبول‌های سفید خون، افزایش فعالیت بیگانه‌خواری در سلول‌های بیگانه‌خوار خون، افزایش سطح پروتئین کل و ایمونوگلبولین تام سرم شده و به میزان ۹۰ درصد سبب بهبود وضعیت ایمنی ماهیان مورد آزمایش نسبت به گروه شاهد گردید که این موضوع بیانگر نقش محرک ایمنی بودن لوامیزول در مواقع بروز تنش‌ها در ماهیان می‌باشد (۲۲).

بنابر نتایج تحقیق حاضر میزان ایمونوگلبولین تام سرم تا روز ۳۰ تفاوت‌های معنی‌داری را در هیچکدام از تیمارها نشان نداده اما از روز ۴۵ تا پایان دوره آزمایش، خصوصاً در روز ۶۰ با تنش تراکم دو برابر، تیمار تغذیه شده با ۱۰۰۰ میلی‌گرم لوامیزول تفاوت‌های معنی‌داری($P<۰,۰۵$) را با گروه شاهد نشان داده است (جدول ۲). به عبارت دیگر با ایجاد شرایط تنش تراکم خصوصاً تراکم دو برابر در ماهیان لوامیزول تأثیر خود را بر سیستم ایمنی ماهیان به خوبی و بهتر از شرایط بدون تنش نشان داده که با نتایج و یافته‌های صلاح و همکاران در ۲۰۱۰ همخوانی دارد. چنین شرایطی بطورکلی در مورد فعالیت لیزوزیم و فعالیت

کمپلمان سرم در این تحقیق هم مشاهده گردید (جداول ۱، ۳).

ویجندرا و پاتیراتنه در سال ۲۰۰۷ با افزودن مقدار ۵ میلی‌گرم لوامیزول به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در جیره غذایی کپور هندی (*Labeo rohita*) بی‌تأثیر بودن این ماده را بر پروتئین کل، ایمونوگلبولین و فعالیت کمپلمان سرم گزارش نمودند. ایشان در تحقیق خود بیان نموده‌اند که احتمالاً دلیل بی‌تأثیر بودن لوامیزول بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده توسط آنها، مقدار کم لوامیزول (۵ میلی‌گرم لوامیزول به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) بوده است و پیشنهاد نموده‌اند که در تحقیقات دیگر از مقادیر بیشتر لوامیزول برای تقویت سیستم ایمنی ماهی کپور هندی (*Labeo rohita*) استفاده گردد. اما در تحقیق حاضر حضور غلظت‌های مختلف لوامیزول سبب گردیده تا بیشترین میزان فعالیت سیستم کمپلمان در تیمار ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره غذایی (۰/۱ درصد) و در روز ۶۰ با تنش تراکم دو برابر مشاهده گردد که با گروه شاهد تفاوت معنی‌دار (P<۰,۰۵) دارد (۲۶).

بررسی تنش‌های تراکم دو و سه برابر در روز ۶۰ نشان می دهد که به استثنای تیمار شاهد در تیمارهای تحت تأثیر لوامیزول، افزایش تنش تراکم از دو به سه برابر، کاهش فعالیت لیزوزیم، میزان ایمونوگلبولین تام سرم و فعالیت سیستم کمپلمان سرم را به همراه دارد. این موضوع می‌تواند ناشی از محدودیت شرایط فیزیکوشیمیایی آب باشد به این معنی که در شرایط فیزیکوشیمیایی یکسان، در تراکم‌های بالاتر اوضاع بحرانی‌تر بوده و ماهیان تنش بیشتری را تجربه خواهند نمود که بر سیستم ایمنی و میزان پاسخ‌های ایمنی آنها تأثیرگذار می‌باشد. با توجه به اینکه در طی مدت زمانِ اعمال تنش‌های تراکم، ماهیان با غذای فاقد لوامیزول تغذیه شده‌اند این امکان وجود دارد که تنش تراکم سه برابر (در مقایسه با تراکم دو برابر) مانع از تقویت بیشتر پاسخ‌های ایمنی شده باشد. اما به هر حال در هر دو تنش تراکم مقادیر هر سه فاکتور ایمنی (فعالیت لیزوزیم، میزان ایمونوگلبولین تام سرم و فعالیت کمپلمان) در تیمار ۱۰۰۰ میلی‌گرم لوامیزول در کیلوگرم غذا نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌دار (P<۰,۰۵) نشان داده است (جداول۱، ۲ ، ۳).

محرک‌های ایمنی با افزایش فعالیت سیستم کمپلمان خون، افزایش فعالیت لیزوزیم سرم، تولید آنتی‌بادی بیشتر توسط لنفوسیت‌های خون باعث افزایش مقاومت ماهیان در برابر تنش‌هایی نظیر تراکم، دما و شوری شده و در افزایش تولید نهایی مزارع پرورش آبزیان نقش بسزایی دارند (۱۸). در این تحقیق هم نقش مهم محرک ایمنی لوامیزول در بهبود پاسخ‌های ایمنی و خصوصاً بالا بردن مقاومت و بقای قزل‌آلای رنگین‌کمان در برابر تنش تراکم نشان داده شده است (نمودار۱).

بطورکلی بهترین و مطلوبترین حالت از نظر هر سه شاخص ایمنی بررسی شده در این تحقیق در تیمار ۱۰۰۰ میلی‌گرم لوامیزول در کیلوگرم غذا در روز ۶۰ و با تنش تراکم دو برابر بوده که نتایج درصد بقای ماهیان در طول تحقیق (نمودار ۱) موید این موضوع است. لذا با توجه به نتایج این تحقیق استفاده از لوامیزول با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره غذایی (۰/۱ درصد) به عنوان محرک ایمنی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مواقع بروز تنش تراکم بالا پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در تاریخ ۱۳۹۱/۴/۲۴ و با کد ۰۱۱/آ/۸۶ و حمایت مالی پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه و از محل اعتبارات پژوهشی مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه اجرا گردیده است.

منابع

۱. طافی، ع. ا.، مشکینی، س.، و توکمه‌چی، ا.، ۱۳۹۲. مطالعه تأثیر کیتوزان بر برخی از پاسخ‌های ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)و افزایش مقاومت آن به دنبال رویاروئی تجربی با *آئروموناس هیدروفیلا*، مجله پژوهش‌های جانوری (مجله زیست شناسی ایران)، جلد ۲۶، شماره ۴، صفحات ۴۶۸ – ۴۷۷.

۲. عطائی مهر، ب.، باقری، پ.، امتیازجو، م.، و یوسفی سیاهکلرودی، س.، ۱۳۹۳. بررسی اثر گیاه *آلوئه ورا* (*Aloe vera*) بر تغییرات میزان ایمونوگلبولین‌های IgM، IgA و IgG، پروتئین کل و شمارش تفریقی گلبول‌های سفید ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، مجله پژوهش‌های جانوری (مجله زیست‌شناسی ایران)، جلد ۲۷، شماره ۱، صفحات ۸۹– ۹۹.

3. Ai, Q., Mai, K., Xu, W., Duan, Q., Tan, B., and Liufu, Z., 2004. Effects of dietary vitamin C on growth and immune response of Japanese sea bass, *Lateolabrax japonicas*, Aquaculture, 242, PP: 489-500.

4. Amar, E.C., Kiron, V., Satoh, S., Okamoto, N., and Watanab, E.T., 2000. Effect of dietary beta-carotene on the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Fish Sci, 66, PP: 1068-1075.

5. Boesen, J., Maganga, F.P., and Odgard, R., 1999. Norms, organizations and actual practices in relation to land and water management in Ruaha River Basin, Tanzania. In: Granfelt, T., (Ed.), Managing the Globalized Environment. Intermediate Technology Publlications, London. pp: 88-113.

6. Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Annals of Clinical Biochemistry, 72, PP: 248-254.

7. Cerezuela, R., Cuesta, A., Meseguer, J., and Esteban, M.A., 2009. Effects of dietary vitamin D3 administration on innate immune parameters of seabream (*Sparus auratus* L.). Fish and Shellfish Immunology, 164, PP: 1-6.

8. Cha, S., Lee, J., Song, C., Lee, K., and Jeon, Y., 2008. Effects of chitosan-coated diet on improving water quality and innate immunity in the olive flounder. Paralichthys olivaceus, Aquaculture, 278 (1-4), PP: 110-118.

9. Chaiyakosa, S., Charernjiratragul, W., Umsakul, K., and Vuddhakul, V., 2007. Comparing the efficiency with chlorine for reducing *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp. Food Control, 18, PP: 1031-1035.

10. Clerton, P., Troutaud, D., Verlha, V., Gabraudan, J., and Deschaux, P., 2001. Dietary vitamin E and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocyte functions: effect on gut and on head kidney leucocytes. Fish and Shellfish Immunology, 11, PP: 1-13.

11. Dautremepuits, C., Betoulle, S., Paris-Palacios, S., and Vernet, G., 2004. Humoral immune factors modulated by copper and chitosan in healthy or parasitised carp (*Cyprinus carpio* L.) by *Ptychobothrium sp*. (Cestoda). Aquatic Toxicology, 64 (4), PP: 325-338.

12. Dugenci, K.S., Arda, N., and Canadan, A., 2003. Some medicinal plants as immunostimulants for fish. Journal of Ethnopharmacology, 88, PP: 99–106.

13. Findlay, V.L., and Munday, B.L., 2000. The immunomudiolatory effects of levamisole on the nonspecific immune system of Atlantic salmon, *Salmo salar* L, Journal of Fish Diseases, 23, PP: 369-378.

14. Gopalakannan, A., and 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(1-4), PP: 179-187.

15. Haq, A., Lobo, P., Al-Tufail, M., Rama, N., and AL-Sedair, Y.S., 1999. Immunomodulatory effect of Nigella sativa proteins fractionated by ion exchange chromatography. International Journal of Immunopharmacology, 21, PP: 283–295.

16. Hardy, R.W., 2002. Rainbow Trout, Oncorhynchus mykiss In: Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture. Eds., Carl D. Webster, Chorn Lim, London, CABI publishing, PP: 184-202.

17. Kim, D.H., and Austin, B., 2006. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotics. Fish shellfish Immunology, 21(5), PP: 513-524.

18. Meshkini, S., Tafy, A.A., Tokmechi, A., and Farhangpajou, F., 2012. Effect of Chitosan on hematological parameters and stress resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Veterinary Research Forum, 3 (1), PP: 49-54.

19. Pirarat, N., Kobayashi, T., Katagiri, T., Maita, M., and End, M., 2006. Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Veterinary immunology and Immunopathology, 113, PP: 339-347.

20. Roberts, R.J., 2001. The immunology of teleost. In: Roberts R.J., Eds., Fish pathology, Vol.1, W. B., Saunders, London, England, PP: 133-150.

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

22. Salah, M.A., Osama, A.A., Amina, M., and Hala, G., 2010. Efficiency of levamisole in improving the immune response of Catfish (*Clarias gariepenus*) to *Aeromonas hydrophila* Vaccine: Clinico-Pathological Studies. Mediterranean Aquaculture Journal, 1(1), PP: 8-17.

23. Siwicki, A.K., Anderson, D.P., and Rumsey, G.L., 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. Immunology and Immunopathology, 41, PP: 125-139.

24. Soltanian, S., Francois, J.M., Dhont, J., Arnouts, S., Sorgeloos, P., and Bossier, P., 2007. Enhanced disease resistance in Artemia by application of commercial β-glucans sources and chitin in a gnotobiotic Artemia challenge test. Fish and Shellfish Immunology, 23, PP: 1304-1314.

25. Treves-Brown, K.M., 2000. Applied Fish Phamacology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecght, the Netherland, 309 p.

26. Wijendra, G., and Pathiratne, A., 2007. Evaluation of immune responses in an Indian Carp, *Labeo rohita* (Hamilton) fed with levamisole incorporated diet. J., Sci. Univ. Kelaniya, 3, PP: 17-28.

27. Yuan, C.H., Li, D., Chen, W., Sun, F., Wu, G., Gong, Y., Tang, J., Shen, M., and Han, X., 2007. Administration of a herbal immunoregulation mixture enhances some immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*), Fish Physiol Biochem, 33, PP: 93-101.

28. Yunxia, Q., Jianzhong, S., and Guoliang, W., 2001. A review of principal bacterial diseases of mari-culture fish. Transation of Oceanology and Limnology, 2, PP: 78-87.

Evaluate effect of Levamisole on immune system and resistance against density stress in rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)*

Meshkini S.[1], Delirezh N.[2] and Tafi A.A.[3]

[1] **Food Hygiene and Quality Control Dept., Faculty of Veterinary Medicine & Artemia and Aquatic Animal Institute, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran**

[2] **Microbiology Dept., Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran**

[3] **Fishery Dept., Faculty of Natural Resources, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran**

Abstract

Because of existing different stresses in fish farms, there is necessary to corroborate immune system of fishes against stresses. In the present study effects of Levamisole on immune responses of rainbow trout were evaluated. For this purpose 1000 pieces fish (average weight of 150 g) were obtained from a local fish farm of Urmia and were divided in 5 test groups (33 kg/m^3 density) and were fed on diet supplemented with Levamisole at 0, 100, 250, 500 and 1000 mg per kg of diet for a period of 45 days. Then the fishes of all groups were fed on commercial diet without Levamisole and were exposed density stress by 2-3 folds for the following 15 days. Blood samples were collected from all groups on days 0, 15, 30, 45 and 60 to evaluate the serum total immunoglobulin, complement system activity and lysozyme activity. The results showed that, at the end of trial (day 60) Significantly ($P < 0/05$) higher lysozyme and complement system activity as well as immunoglobulin level were observed in samples fed on higher doses of Levamisole (especially 1000 mg per kg group) when fishes were exposed density stresses 2 and 3 folds. According the results of this Study we conclude that extreme 0/1% Levamisole could serve as an immunostimulator in outbreak of high density stresses in rainbow trout.

Key words: Rainbow Trout, Levamisole, Immune System, Density Stress.