

اثرات حمام عصاره هیدروالکلی گزنه (*Urtica dioica*) بر شاخص‌های ایمنی و خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) آلوده شده با قارچ ساپروولگنیا

نرگس عالیشاه^۱، فرید فیروزبخش^{۱*}، زبینه محرابی^۱

*f.firouzbakhsh@sanru.ac.ir

۱- گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۸

تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹۸

چکیده

این مطالعه با هدف کاربرد عصاره هیدروالکلی گزنه در کنترل بیماری ساپروولگنیوز و بررسی تأثیر آن بر فراسنجه‌های خونشناسی، بیوشیمیایی سرم و ایمنی قزل‌آلای رنگین‌کمان آلوده شده با ساپروولگنیا انجام شد. ۱۸۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزن 27 ± 22 گرم در ۶ تیمار آزمایشی به طور تصادفی تقسیم بندی شدند. گروه‌های آزمایشی ابتدا با فلس برداری از ناحیه ساقه دمی مستعد بیماری شدند و سپس با ژئوسپور ساپروولگنیا (با دوز 3×10^5 ژئوسپور در هر لیتر) به مدت ۴ ساعت حمام داده شدند. ماهیان پس از آلوده سازی در تانک‌های ۱۰۰ لیتری قرار گرفتند و چهار تیمار بترتیب ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر عصاره هیدروالکلی گزنه روزانه به مدت ۱ ساعت در طول ۱ هفته دریافت کردند. در پایان یک هفته حمام دهی با غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی گزنه (هفته اول) و در پایان یک هفته پس از قطع حمام دهی (هفته دوم)، فراسنجه‌های خونشناسی (گلبول قرمز، گلبول سفید، هماتوکریت و هموگلوبین)، فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم (آلبومین، گلبولین و توتال پروتئین) و فراسنجه‌های ایمنی (فعالیت لیزوزیم، سیستم کمپلمان و فعالیت انفجارتنفسی) و همچنین درصد تلفات در تمامی تیمارها بررسی شدند. نتایج بدست آمده نشان داد میزان ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر عصاره هیدروالکلی گزنه سبب افزایش معنی‌دار فراسنجه‌های خونشناسی، بیوشیمیایی سرم و ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مبتلا به ساپروولگنیوز می‌شود ($p < 0.05$). همچنین دوزهای ۵۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر عصاره هیدروالکلی گزنه با افزایش مقاومت ماهیان در برابر ساپروولگنیوز باعث کاهش معنی‌دار تلفات نسبت به تیمار کنترل شدند. از اینرو، استفاده از عصاره هیدروالکلی گزنه با دوز ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر با روش حمام درمانی جهت بهبود شاخص‌های خون شناسی و ایمنی و همچنین کنترل ساپروولگنیوز در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان توصیه می‌گردد.

واژگان کلیدی: گزنه، خون‌شناسی، ساپروولگنیوز، قزل‌آلای رنگین‌کمان، حمام‌درمانی

*نویسنده مسئول

مقدمه

بیماری‌های قارچی بعد از بیماری‌های باکتریایی یکی از مهم‌ترین عوامل زیان‌آور در صنعت آبی‌پروری بشمار می‌آیند (Bruno and Woo, 1994). ساپروولگنیوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های قارچی ماهیان آب شیرین و تخم آنهاست. تا سال ۲۰۰۲ عفونت‌های ناشی از ساپروولگنیوز معمولاً با مالاشیت‌گرین تحت کنترل قرار می‌گرفت، اما به دلیل ویژگی‌های سرطان‌زایی و جهش‌زایی این ماده، ممنوعیت استفاده از آن در بسیاری از کشورهای جهان به طور چشمگیری برای ماهیان خوراکی اعمال شده است (Meyer and Jorgenson, 1983). استفاده از داروهای ضد قارچ شیمیایی علاوه بر عوارض جانبی، مقاومت دارویی و همچنین ایجاد آلودگی‌های زیست محیطی، هزینه‌های زیادی به پرورش دهندگان تحمیل خواهد کرد. از سویی، توجه عمومی به مصرف محصولات ارگانیک، محققین را بر آن داشته است تا درصدد دستیابی به ترکیبات جایگزین طبیعی، مؤثر، ارزان، بی‌ضرر و سازگار با محیط زیست برآیند. گیاهان به عنوان یک ذخیره ارزشمند می‌توانند در این زمینه گره گشا باشند. گزنه (*Urtica dioica*) یکی از گیاهانی است که جهت تقویت سیستم ایمنی غیر اختصاصی ماهیان پرورشی استفاده می‌شود. گیاه دارویی گزنه از خانواده Urticaceae است که در اروپا، آسیا، آفریقا و آمریکای شمالی و در نواحی مرطوب می‌روید (Borchers et al., 2000). خواص مختلف گزنه از جمله: کاهش فشار خون، کاهش قند خون، محرک ایمنی، ضد سرطان، ضد التهاب، آنتی‌اکسیدان، ضد درد، ضد ویروس، ضد باکتری و ضد قارچ توسط محققان به اثبات رسیده است (Tapwal et al., 2011) که می‌تواند ناشی از ترکیبات مختلف موجود در این گیاه نظیر فلاونوئیدها، اسیدهای چرب، کاروتن، پروتئین، ویتامین و مواد معدنی باشد (Bombardelli and Morazzoni, 1997). در مطالعاتی متعدد اثرات مثبت گیاه گزنه بر ایمنی ماهیان پرورشی مشخص شده است. از آن جمله می‌توان به اثرات مفید گیاه گزنه (*U. dioica*) بر افزایش ایمنی و مقاومت ماهی (*Labeo victorinus*) (Victoria Labeo) در مواجهه با *Aeromonas hydrophila* اشاره کرد (Ngugi et al., 2015). همچنین اثر مهارکنندگی عصاره گزنه بر رشد قارچ ساپروولگنیوز پارازیتیکا در شرایط *in vitro* مورد بررسی قرار گرفت و خاصیت ضد قارچی آن تأیید شد (Firouzbaksh et al., 2015). با توجه به اینکه تاکنون پژوهشی پیرامون استفاده از عصاره گیاه گزنه به روش درمان در آب و بررسی اثرات آن بر عملکرد سیستم ایمنی در مواجهه با بیماری قارچی ساپروولگنیوز در آبزیان صورت نگرفته است، مطالعه حاضر با هدف بهبود شاخص‌های خونی و ایمنی و همچنین کنترل

بیماری ساپروولگنیوز در ماهی قزل آلائی رنگین کمان آلوده به ساپروولگنیوز تحت حمام درمانی با عصاره هیدروالکی گزنه طراحی شده است.

مواد و روش کار

آماده سازی ژئوسپور قارچ ساپروولگنیوز

جهت آلوده‌سازی ماهیان با قارچ، از قارچ ساپروولگنیوز جدا شده از ماهی قزل آلائی رنگین کمان در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری استفاده شد. به منظور جداسازی ژئوسپور قارچ، قطعات مدور آگار (به قطر ۱ سانتی‌متر) به همراه رشته‌های قارچی از پلیت به لوله‌های آزمایش حاوی آب مقطر استریل و بذر شاهدانه منتقل و به مدت یک هفته در دمای ۲۰-۱۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از تشکیل ژئوسپورانژیوم، برای جداسازی ژئوسپور، محتوی لوله‌ها سانتریفیوژ (۳۰۰g و به مدت ۱۰ دقیقه) و پس از آن فاز رویی جدا سازی شد و سپس شمارش ژئوسپور بالام هماسیتومتر انجام گرفت (Firouzbaksh et al., 2014).

آلوده سازی ماهیان با قارچ ساپروولگنیوز

۱۸۰ قطعه بچه ماهی قزل آلائی رنگین کمان با میانگین وزنی ۲۷/۲۲± گرم و عاری از هر گونه بیماری و دارای گواهی سلامت به منظور ضدعفونی سطح بدن آنها از آلودگی‌های احتمالی، در حمام نمک ۵٪ قرار گرفتند. سپس طبق روش Mehrabi و همکاران (۲۰۱۹) پس از بیهوش کردن ماهیان با پودر گل میخک (۲۰۰ میلی گرم بر لیتر)، برای ایجاد استرس، کاهش موکوس روی بدن ماهی و همچنین افزایش نفوذپذیری قارچ، فلس برداری از ناحیه ساقه دم ماهیان و به طول ۳ سانتی‌متر انجام شد. سپس ماهیان در دسته‌های ۵ تایی داخل توری (با سایز مش ۶ میلی‌متر) قرار گرفتند و به مدت ۱ دقیقه داخل آب به آرامی تکان داده شدند. پس از آن موکوس اضافی سطح بدن ماهیان با آب شستشو داده شد. سپس ماهیان در ۶ تیمار (هر تیمار در قالب ۳ تکرار ۱۰ تایی) به مخازن مدور پلاستیکی ۳۰۰ لیتری با حجم آبگیری ۷۵ لیتر حاوی دوز مشخص از ژئوسپور ساپروولگنیوز (3×10^5 zoospore/l) همراه با هوادهی منظم منتقل شدند و به مدت ۴ ساعت به روش ساکن و بدون ورودی و خروجی آب حمام داده شدند. پس از پایان حمام ۴ ساعته با ژئوسپور ساپروولگنیوز، ماهیان در تانک‌های پلاستیکی مدور با حجم آبگیری ۱۰۰ لیتر قرار گرفتند. ۳ روز قبل از حمام ماهیان با ژئوسپور، غذادهی ماهیان قطع شد و همچنین ۳ روز بعد از پایان حمام ماهیان با ژئوسپور، غذادهی و تعویض آب انجام نشد و پس از آن تا پایان دوره آزمایش،

(al., 2006) براساس لیز باکتری گرم مثبت حساس به آنزیم لیزوزیم *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma, M3770) اندازه‌گیری شد. جهت سنجش فعالیت انفجار تنفسی لوکوسیت (NBT)، مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از خون هپارینه در داخل میکروتیوب قرار داده شد و ۰/۱ میلی‌لیتر نیز محلول ۰/۲ درصد NBT به آن اضافه گردید. به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از مخلوط حاصل برداشته شده و به یک لوله آزمایش حاوی ۱ میلی‌لیتر دی متیل فرم‌آمید اضافه شد. پس از سانتریفوژ نمودن نمونه، جذب نوری مایع رویی در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Sahoo et al., 2005). برای سنجش میزان عامل مکمل (ACH50) از روش توصیه شده توسط Matsuyama و همکاران (۱۹۸۸) استفاده شد. در این روش به هر ۰/۵ میلی‌لیتر سرم رقیق سازی شده در بافر (EGTA-MG- 2.5×10^8 GVB10Mm)، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون (cell ml⁻¹ 10Mm EGTA- گلبول قرمز گوسفند در بافر MG-GVB اضافه شد. بعد از سانتریفوژ، مایع رویی در طول موج ۴۱۴ نانومتر توسط اسپکتوفوتومتر قرائت شد. درصد لیز (y) از تقسیم طول موج خوانده شده بر ۱۰۰ درصد لیز (لیز در آب مقطر) بدست آمد.

روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۳ انجام شد. نرمال بودن داده‌ها بر اساس آزمون Kolmogorov- Smirnov بررسی شد. مقایسه بین میانگین‌ها با روش آنالیز واریانس یک طرفه و اختلاف بین میانگین‌ها با کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۵ صورت گرفت. برای رسم نمودارها از برنامه Excel استفاده شد.

نتایج

شاخص‌های خون‌شناسی

بر اساس نتایج نشان ارائه شده در جدول ۱، در هفته اول (پایان یک هفته حمام دهی با عصاره گزنه) و هفته دوم (پایان یک هفته پس از قطع حمام‌دهی با عصاره گزنه) نمونه‌برداری، تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره هیدروالکلی گزنه افزایش معنی‌داری ($p < 0.05$) در میزان هموگلوبین نسبت به گروه‌های شاهد و سایر تیمارهای گزنه نشان داد. همچنین بیشترین میزان هموگلوبین در پایان یک هفته حمام دهی با غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی گزنه (هفته اول) و در پایان یک هفته پس از قطع حمام‌دهی (هفته دوم) در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر ثبت شد ($p < 0.05$). افزایش معنی‌دار در تعداد

ماهیان با جیره تجاری پایه (شرکت بیضاء) و سه نوبت در روز (صبح، ظهر و عصر) و به میزان ۲/۵٪ وزن بدن تغذیه شدند. طی این مدت، تعویض آب به میزان ۵۰ درصد حجم تانک‌ها به طور روزانه انجام شد. پس از مشاهده نشانه‌های بالینی ساپروگلنیوز (ظهور توده‌های پنبه‌ای-کرک مانند در ناحیه فلس‌برداری شده ساقه دم‌ی ماهیان) حداقل در ده درصد ماهیان هر تیمار، حمام درمانی با عصاره هیدروالکلی گزنه (شرکت گیاه اسانس، گرگان، ایران)، با دوزهای ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در چهار تیمار با ۳ تکرار به صورت روزانه به مدت یک ساعت طی یک هفته انجام شد. یک گروه کنترل مثبت (آلوده شده با قارچ و بدون درمان) با ۳ تکرار و یک گروه کنترل منفی (بدون آلوده‌سازی و بدون درمان) با ۳ تکرار نیز در نظر گرفته شد. شرایط فیزیکی و شیمیایی آب مورد استفاده در تانک‌ها در طول دوره آزمایش شامل دما، 15 ± 0.79 درجه سانتی‌گراد، pH، 7.3 ± 0.2 ، اکسیژن محلول، 7.14 ± 0.13 میلی‌گرم بر لیتر و همچنین سختی آب، ۶۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کربنات کلسیم ثبت شد.

خونگیری و انجام آزمایش‌ها

خونگیری در دو نوبت و با فاصله یک هفته، در پایان یک هفته حمام دهی با غلظت‌های مختلف (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ ppm و ۲۰۰) عصاره هیدروالکلی گزنه (هفته اول) و در پایان یک هفته پس از قطع حمام دهی (هفته دوم) انجام شد. در هر بار نمونه‌گیری تعداد ۳ ماهی از هر تکرار به طور تصادفی صید و بعد از بیهوشی با پودرگل میخک (۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر)، خونگیری از ساقه دم‌ی ماهیان با استفاده از سرنگ حاوی ماده ضد انعقاد هپارین انجام شد. شمارش گلبول‌های سفید و قرمز با استفاده از لام هموسیستمتر و محلول رقیق کننده نات، هریک (حاوی ۳/۸۸ گرم کلرید سدیم، ۲/۵۰ گرم سولفات سدیم، ۱/۷۴ گرم فسفات سدیم، ۰/۲۵ گرم فسفات پتاسیم، ۷/۵۰ میلی‌لیتر فرمالین ۳۷٪ و ۰/۱ گرم متیل ویوله حل شده در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) انجام شد (Stoskopf, 1993). هماتوکریت به روش میکروهماتوکریت (Borges, 2004) و اندازه‌گیری هموگلوبین به روش سیانومت هموگلوبین (Houston, 1990) انجام گرفت. سرم استحصال شده از خون به منظور سنجش فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم و ایمنی به فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد انتقال یافت. پروتئین تام و آل‌بومین به روش (Bradford, 1976) بوسیله کیت‌های آزمایشگاهی تجاری (زیست‌شیمی، تهران، ایران) و گلوبولین از تفاضل غلظت‌های پروتئین تام و آل‌بومین اندازه‌گیری شد (Nayak et al., 2008). فعالیت لیزوزیم با استفاده از روش Kumari et

نسبت به سایر تیمارها و گروه کنترل ثبت شد. از لحاظ تعداد گلبول‌های سفید، تیمارهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر در هفته اول و تیمار ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر در هفته دوم، افزایش معنی داری ($p < 0.05$) نسبت به سایر تیمارها و گروه‌های شاهد نشان دادند. بیشترین تعداد گلبول سفید نیز در هفته اول و دوم در تیمار ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر ثبت شد ($p < 0.05$) (جدول ۱).

گلبول‌های قرمز تیمارهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر در هر دو هفته نسبت به تیمارهای شاهد مشاهده شد ($p < 0.05$). درصد هماتوکریت در هفته اول افزایش معنی‌داری ($p < 0.05$) در تیمار ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر نسبت به گروه‌های شاهد و سایر تیمارهای عصاره گزنه به جز تیمار ۵۰ میلی گرم بر لیتر نشان داد ($p < 0.05$) بیشترین میزان هماتوکریت در هفته دوم در تیمار ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر با اختلاف معنی‌دار ($p < 0.05$)

جدول ۱: شاخص‌های خون شناسی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان آلوده به قارچ ساپروولگنیا در پایان یک هفته حمام دهی با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ عصاره ی هیدروالکلی گزنه (هفته اول) و در پایان یک هفته پس از قطع حمام دهی (هفته دوم). ppm مختلف)

Table 1: Blood indices of rainbow trout infected with saprolegnia at the end of a week of bathing with different concentrations (50, 100, 150 and 200 ppm) of hydroalcoholic extract of nettle (first week) and at the end of one week after Stop of bathing (second week).

شاخص خونی	تیمار	هفته اول	هفته دوم
هموگلوبین (g/dL)	کنترل منفی	۷/۲۳±۰/۲۸ ^c	۷/۲۰±۰/۰۴ ^c
	کنترل مثبت	۷/۶۷±۰/۳۸ ^{bc}	۷/۶۳±۰/۰۷ ^b
	۵۰ ppm	۷/۸۹±۰/۳۶ ^{bc}	۷/۸۹±۰/۳۶ ^b
	۱۰۰ ppm	۸/۹۹±۰/۳۳ ^a	۸/۶۶±۰/۳۱ ^a
	۱۵۰ ppm	۸/۲۲±۰/۵۴ ^b	۷/۹۰±۰/۰۴ ^b
	۲۰۰ ppm	۷/۴۴±۰/۲۴ ^c	۷/۸۵±۰/۰۱ ^b
گلبول سفید ($\times 10^3 \mu\text{L}$)	کنترل منفی	۱۵/۰۶±۰/۱۱ ^c	۱۷/۰۰±۰/۲۰ ^b
	کنترل مثبت	۱۳/۵۰±۱/۵۱ ^d	۱۵/۹۰±۰/۶۵ ^b
	۵۰ ppm	۱۵/۹۶±۰/۵۷ ^c	۱۷/۳۶±۲/۲۱ ^b
	۱۰۰ ppm	۲۲/۱۳±۱/۱۷ ^a	۲۳/۰۳±۱/۳۵ ^a
	۱۵۰ ppm	۱۵/۷۶±۰/۳۲ ^c	۱۵/۴۰±۰/۹۱ ^b
	۲۰۰ ppm	۱۸/۶۰±۰/۵۲ ^b	۱۸/۳۳±۲/۵۴ ^b
گلبول قرمز ($\times 10^6 \mu\text{L}$)	کنترل منفی	۰/۷۵±۰/۰۲ ^b	۰/۷۸±۰/۰۸ ^{ab}
	کنترل مثبت	۰/۶۹±۰/۰۱ ^b	۰/۷۶±۰/۰۳ ^b
	۵۰ ppm	۰/۹۵±۰/۱۲ ^a	۰/۹۷±۰/۱۳ ^a
	۱۰۰ ppm	۰/۹۳±۰/۱۴ ^a	۰/۹۶±۰/۱۴ ^a
	۱۵۰ ppm	۰/۷۵±۰/۰۴ ^b	۰/۷۹±۰/۰۵ ^{ab}
	۲۰۰ ppm	۰/۸۶±۰/۰۹ ^{ab}	۰/۹۳±۰/۱۱ ^{ab}
هماتوکریت (%)	کنترل منفی	۳۲/۰۰±۱/۰۰ ^c	۳۱/۶۶±۰/۵۷ ^c
	کنترل مثبت	۳۶/۳۳±۱/۵۲ ^b	۳۴/۰۰±۲/۰۰ ^{bc}
	۵۰ ppm	۳۷/۶۶±۱/۵۲ ^{ab}	۳۶/۶۶±۲/۰۸ ^b
	۱۰۰ ppm	۳۹/۶۶±۱/۱۵ ^a	۳۹/۳۳±۰/۵۷ ^a
	۱۵۰ ppm	۳۵/۰۰±۱/۰۰ ^b	۳۴/۶۶±۱/۱۵ ^b
	۲۰۰ ppm	۳۶/۶۶±۲/۵۱ ^b	۳۵/۳۳±۱/۵۲ ^b

شاخص های بیوشیمیایی سرم

با توجه به جدول شماره ۲، در هفته اول (پایان یک هفته حمام دهی با عصاره گزنه) و هفته دوم (پایان یک هفته پس از قطع حمام دهی با عصاره گزنه) بیشترین میزان پروتئین تام در تیمار ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر ثبت شد که در مقایسه با گروه های شاهد و سایر تیمارهای عصاره گزنه اختلاف معنی دار ($p < 0.05$) داشت. همچنین بیشترین میزان آلبومین در هفته اول و دوم در تیمار ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر مشاهده شد که در هفته اول فقط با گروه های شاهد و تیمار ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر و در هفته دوم

با همه تیمارها اختلاف معنی دار نشان داد ($p < 0.05$). از لحاظ میزان گلوبولین، در هفته اول و دوم نمونه برداری، فقط تیمار ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر افزایش معنی داری ($p < 0.05$) نسبت به گروه های شاهد نشان داد. بیشترین میزان نسبت آلبومین/گلوبولین در هفته دوم در تیمار ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر ثبت شد که با گروه های شاهد و همه تیمارهای عصاره گزنه بجز تیمار ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر اختلاف معنی دار ($p < 0.05$) نشان داد (جدول ۲).

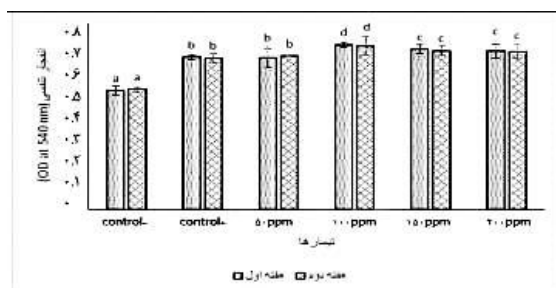
جدول ۲: شاخص های بیوشیمیایی سرم ماهیان قزل آلائی رنگین کمان آلوده به قارچ ساپروولگنیا در پایان یک هفته حمام دهی با غلظت ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ عصاره ی هیدروالکلی گزنه (هفته اول) و در پایان یک هفته پس از قطع حمام دهی (هفته دوم). ppmهای مختلف)

Table 2: Biochemical Indices of rainbow trout infected with saprolegnia at the end of a week of bathing with different concentrations (50, 100, 150 and 200 ppm) of hydroalcoholic extract of nettle (first week) and at the end of one week after Stop of bathing (second week)

شاخص خونی	تیمار	هفته اول	هفته دوم
پروتئین تام (g/dL)	کنترل منفی	۳/۶۹±۰/۱۲ ^b	۳/۷۱±۰/۰۰ ^b
	کنترل مثبت	۳/۶۴±۰/۳۲ ^b	۳/۸۳±۰/۰۵ ^b
	۵۰ ppm	۳/۸۴±۰/۰۸ ^b	۳/۷۲±۰/۱۸ ^b
	۱۰۰ ppm	۴/۹۳±۰/۲۰ ^a	۴/۲۷±۰/۱۳ ^a
	۱۵۰ ppm	۳/۷۰±۰/۴۱ ^b	۳/۸۸±۰/۰۷ ^b
	۲۰۰ ppm	۳/۴۷±۰/۳۶ ^b	۳/۷۹±۰/۱۶ ^b
آلبومین (g/dL)	کنترل منفی	۱/۷۵±۰/۰۷ ^b	۱/۷۱±۰/۰۱ ^c
	کنترل مثبت	۱/۷۶±۰/۱۲ ^b	۱/۸۶±۰/۰۳ ^b
	۵۰ ppm	۱/۸۹±۰/۰۷ ^{ab}	۱/۸۰±۰/۰۱ ^{bc}
	۱۰۰ ppm	۲/۰۳±۰/۰۶ ^a	۲/۱۲±۰/۰۹ ^a
	۱۵۰ ppm	۱/۹۷±۰/۰۱ ^a	۱/۹۰±۰/۰۶ ^b
	۲۰۰ ppm	۱/۸۱±۰/۰۸ ^b	۱/۸۲±۰/۰۹ ^{bc}
گلوبولین (g/dL)	کنترل منفی	۱/۹۴±۰/۰۵ ^b	۲/۰۰±۰/۰۱ ^b
	کنترل مثبت	۱/۸۸±۰/۲۰ ^b	۱/۹۷±۰/۰۲ ^b
	۵۰ ppm	۱/۹۵±۰/۱۵ ^b	۱/۹۱±۰/۰۹ ^b
	۱۰۰ ppm	۲/۹۰±۰/۱۵ ^a	۲/۱۴±۰/۰۳ ^a
	۱۵۰ ppm	۱/۷۳±۰/۴۲ ^b	۱/۹۷±۰/۰۴ ^b
	۲۰۰ ppm	۱/۶۵±۰/۲۸ ^b	۱/۰۶±۰/۰۷ ^b
آلبومین/گلوبولین	کنترل منفی	۰/۹۰±۰/۰۱ ^{ab}	۰/۸۵±۰/۰۱ ^c
	کنترل مثبت	۰/۹۴±۰/۰۴ ^{ab}	۰/۹۴±۰/۰۰ ^b
	۵۰ ppm	۰/۹۷±۰/۱۲ ^{ab}	۰/۹۴±۰/۰۱ ^b
	۱۰۰ ppm	۰/۶۹±۰/۰۱ ^b	۰/۹۹±۰/۰۳ ^a
	۱۵۰ ppm	۱/۱۹±۰/۳۵ ^a	۰/۹۶±۰/۰۴ ^{ab}
	۲۰۰ ppm	۱/۱۱±۰/۱۲ ^a	۰/۹۲±۰/۰۱ ^b

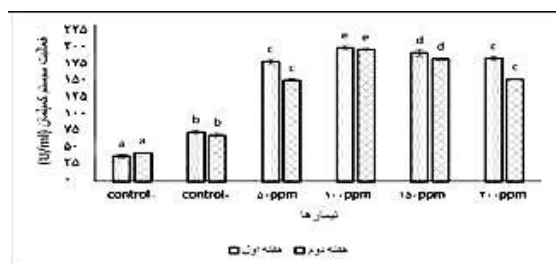
شاخص‌های ایمنی

بیشترین میزان فعالیت لیزوزیم سرم (شکل ۱) و فعالیت انفجار تنفسی لوکوسیت‌ها (شکل ۲) در هفته اول (پایان یک هفته حمام دهی با عصاره گزنه) و هفته دوم (پایان یک هفته پس از قطع حمام دهی با عصاره گزنه) در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد که در هر دو هفته اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشت ($p < 0.05$). همچنین تیمارهای ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نسبت به گروه‌های کنترل اختلاف معنی‌دار آماری ($p < 0.05$) در هر دو هفته نمونه‌برداری نشان دادند. از لحاظ فعالیت سیستم کمپلمان (شکل ۳)، همه تیمارهای حمام داده شده با عصاره گزنه افزایش معنی‌داری نسبت به گروه‌های کنترل در هر دو هفته نشان دادند و بیشترین میزان فعالیت سیستم کمپلمان در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر ثبت شد که با سایر تیمارهای عصاره گزنه اختلاف معنی‌دار داشت ($p < 0.05$).



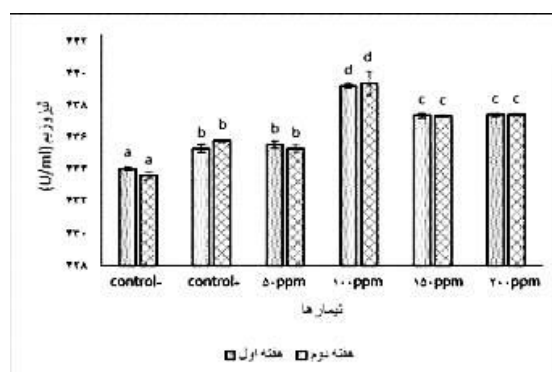
شکل ۲: فعالیت انفجار تنفسی لوکوسیت ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان آلوده به قارچ ساپرولگنیا در پایان یک هفته حمام دهی با غلظت‌های مختلف (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ ppm) عصاره ی هیدروالکی گزنه (هفته اول) و در پایان یک هفته پس از قطع حمام دهی (هفته دوم).

Figure 2: Leukocyte respiratory burst activity of rainbow trout infected with saprolegnia at the end of a week of bathing with different concentrations (50, 100, 150 and 200 ppm) of hydroalcoholic extract of nettle (first week) and at the end of one week after Stop of bathing (second week).



شکل ۳: فعالیت سیستم کمپلمان ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان آلوده به قارچ ساپرولگنیا در پایان یک هفته حمام دهی با غلظت‌های مختلف (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ ppm) عصاره ی هیدروالکی گزنه (هفته اول) و در پایان یک هفته پس از قطع حمام دهی (هفته دوم).

Figure 3: Complement system activity of rainbow trout infected with saprolegnia at the end of a week of bathing with different concentrations (50, 100, 150 and 200 ppm) of hydroalcoholic extract of nettle (first week) and at the end of one week after Stop of bathing (second week).



شکل ۱: فعالیت لیزوزیم سرم ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان آلوده به قارچ ساپرولگنیا در پایان یک هفته حمام دهی با غلظت‌های مختلف (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ ppm) عصاره هیدروالکی گزنه (هفته اول) و در پایان یک هفته پس از قطع حمام دهی (هفته دوم).

Figure 1: Serum lysozyme activity of rainbow trout infected with saprolegnia at the end of a week of bathing with different concentrations (50, 100, 150 and 200 ppm) of hydroalcoholic extract of nettle (first week) and at the end of one week after Stop of bathing (second week).

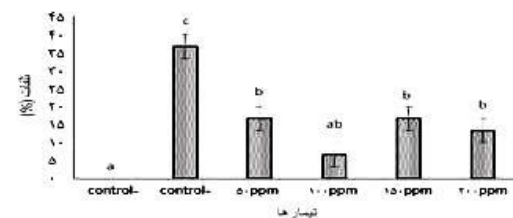
تلفات

با توجه به شکل ۴، پس از گذشت ۱۴ روز از رویارویی ماهیان با زئوسپور ساپرولگنیا، کاهش معنی‌دار ($p < 0.05$) درصد تلفات در تمامی تیمارهای تحت حمام درمانی با عصاره گزنه نسبت به گروه شاهد مثبت مشاهده شد. بیشترین و کمترین درصد تلفات بترتیب در گروه شاهد مثبت (۳۶/۶۶٪) و تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر گزنه (۶/۶۶٪) مشاهده شد. در گروه کنترل منفی (بدون

بحث

شاخص‌های خونی و بیوشیمیایی سرم به طور عمده به عنوان شاخص شرایط فیزیولوژیک یا پاسخ به استرس (Cataldi et al., 1998) و همچنین در تحلیل وضعیت سیستم ایمنی بدن ماهی مطرح می‌باشند (Tavares-Dias and Moraes, 2007). بهبود شاخص‌های خون‌شناسی، بیوشیمیایی سرم و ایمنی قزل‌آلای رنگین کمان با بکارگیری گزنه در مطالعات گذشته گزارش شده است (Awad et al., 2013; Awad and Austin, 2010). طبق نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر، اثر مثبت عصاره گزنه بر افزایش شاخص‌های خون‌شناسی در هفته‌های پس از حمام‌دهی مشاهده شد.

مطالعات نشان داده‌اند که گزنه غنی از ویتامین C و آهن است (Allardice, 1993). این احتمال وجود دارد که عملکرد گزنه بر شاخص‌های خون‌شناسی به دلیل تأثیر ویتامین C موجود در آن بر افزایش جذب آهن از روده ماهی باشد (Lim et al., 2000). بطوریکه در طب سنتی از گیاه گزنه به عنوان داروی ضد کم خونی استفاده می‌شود (Wetherilt, 1992). نتایج مشابه در بهبود شاخص‌های خون‌شناسی در مطالعات مختلف گزارش شده است که از آن جمله می‌توان به اثر آلوئه‌ورا (Aloe barbadensis) بر تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) (Gabriel et al., 2015)، اثر عصاره آبی-الکلی برگ زیتون بر ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) (Karimi Pashaki et al., 2019)، اثر عصاره نعنا فلفلی بر قزل‌آلای رنگین کمان (Adel et al., 2015)، اثر ریحان (*Ocimum basilicum*) بر کپور معمولی (Amirkhani and Firouz bakhsh, 2015) و اثر گزنه بر فیل ماهی (Binaii et al., 2014) و قزل‌آلای رنگین کمان (Awad et al., 2013) اشاره کرد. هماتوکریت، غلظت هموگلوبین و گلبول قرمز، نشان‌دهنده ظرفیت حمل اکسیژن می‌باشند (Graham et al., 1985). بهبود شاخص‌های گلبول قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت در ماهیان حمام شده با گزنه بر توانایی این گیاه در تحریک تولید گلبول‌های قرمز تأکید دارد که متعاقب آن به افزایش توانایی حمل اکسیژن و قدرت دفاعی بدن در برابر استرس‌های فیزیولوژیک منجر می‌شود. هماتوکریت خون به عنوان یک شاخص مهم و رایج در تعیین سلامت و بیماری ماهیان مورد استفاده قرار می‌گیرد (Houston and Rupert, 1976). بر اساس برخی مطالعات میزان هماتوکریت در ماهی تحت تأثیر استرس‌های فیزیکی افزایش می‌یابد (Barton et al., 1985)، این افزایش ممکن است به علت جذب آب در گلبول‌های قرمز باشد (Miligan and Wood, 1982).



شکل ۴: درصد تلفات در تیمارهای ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان پس از آلوده سازی با ساپرولگنیا در پایان یک هفته پس از قطع حمام دهی (روز ۱۴ پس از آلوده سازی با قارچ ساپرولگنیا)
Figure 4: Percentage of losses in rainbow trout treatments after infection with saprolegnia at the end of a week after bathing for 14 days.



شکل ۵: عدم رشد قارچ در تیمار حمام شده با ۱۰۰ میلی گرم در لیتر عصاره گزنه پس از ۱۴ روز آلوده سازی با ساپرولگنیا

Figure 5: Non-growth of fungi in the treated group with 100 mg / l nettle extract after 14 days of infection with saprolegnia.



شکل ۶: رشد متراکم قارچ در ساقه دمی و تخریب باله در ماهی گروه کنترل مثبت پس از ۱۴ روز آلوده سازی با ساپرولگنیا

Figure 6: Dense growth of fungi in peduncle and Destruction of fins in Positive control group after 14 days of infection with saprolegnia.

در این تحقیق نیز میزان هماتوکریت پس از چالش ماهیان با قارچ ساپروولگنیا افزایش یافت. افزایش میزان هماتوکریت را نیز جهت افزایش منابع اکسیژن برای اندام‌ها در پاسخ به درخواست متابولیک بیشتر طی استرس ایجاد شده، می‌توان توجیه نمود. تعداد گلبول‌های سفید خون بازتابی از توانایی میزبان جهت پاسخ ایمنی و مبارزه با بیماری می‌باشد بطوریکه گونه‌های با سطح بالاتر گلبول‌های سفید به طور مؤثرتری قادر به مبارزه با عفونت‌ها خواهند بود (Douglass and Jane, 2010). در مطالعه حاضر افزایش معنی‌دار تعداد گلبول‌های سفید در هفته اول بعد از حمام درمانی با عصاره گزنه در تمام تیمارهای حمام داده شده مشاهده شد. داده‌های منتشره از مطالعات مختلف بیانگر تأثیر گیاهان دارویی به عنوان محرک ایمنی و افزایش دهنده تعداد گلبول‌های سفید می‌باشد (Binaii et al., 2010; Harikrishnan et al., 2014).

پروتئین‌های خون یکی از شاخص‌های مکانیسم دفاعی هومورال محسوب می‌شوند و به عنوان یک شاخص بالینی در ارزیابی سلامت و وضعیت استرس در گونه‌های آبزیان مطرح می‌باشند (Peyghan et al., 2014). آلبومین سرم فراوان‌ترین پروتئین در پلاسماي خون است و عملکرد آن به عنوان حامل انواع مواد مغذی، متابولیت‌ها و البته به عنوان حامل اصلی عنصر روی در پلاسما شناخته شده است (Peters, 1995). در نتیجه افزایش در میزان آلبومین، نشانه‌ای از بهبود فراسنجه‌های بیوشیمیایی در ماهی است (Ngugi et al., 2015). در مطالعه حاضر افزایش در شاخص‌های بیوشیمیایی سرم شامل پروتئین تام، آلبومین و گلوبولین در تیمارهای حمام داده شده با عصاره گزنه مشاهده شد و بیشترین میزان این شاخص‌ها در تیمار ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر ثبت شد. در برخی از مطالعات پیشین نیز گیاه گزنه سبب افزایش سطح پروتئین پلاسما، آلبومین و گلوبولین در گونه‌های مختلف شده است (Saeidi Asl et al., 2017; Awad et al., 2013; Binaii et al., 2014; Gabor et al., 2010). افزایش سطوح پروتئین‌های پلاسما می‌تواند منجر به افزایش پاسخ‌های ایمنی غیراختصاصی شود و در نهایت سیستم ایمنی را تقویت نماید. لیوزوزیم یکی از ترکیبات هومورال سیستم ایمنی غیراختصاصی است که باعث تخریب جداره باکتری‌ها، فعال‌سازی سیستم کمپلمان و افزایش فعالیت بیگانه‌خواری به عنوان اپسونین (تسهیل کننده بیگانه‌خواری) در ماهی می‌گردد (Sakai, 1999). افزایش فعالیت لیوزوزیم به مقابله بهتر سیستم ایمنی ماهی در برابر عوامل عفونی و استرس‌ها کمک می‌نماید. نتایج این تحقیق نشان داد که فعالیت لیوزوزیم سرم در ماهیان تحت تیمار حمام دهی با عصاره گزنه افزایش معنی داری نسبت به گروه شاهد داشته است. این

افزایش را می‌توان به قدرت تحریک پذیری مواد مؤثره موجود در عصاره گیاه گزنه نسبت داد که سبب افزایش سطح لیوزوزیم شده است.

فاگوسیتوز یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های دفاعی در برابر عوامل بیماری زاست. سلول‌های فاگوسیت‌کننده ماهی قادر به تولید سوپراکساید (O_2^-) طی فرآیندی تحت عنوان انفجار تنفسی می‌باشند. رادیکال آزاد اکسیژن یکی از فاکتورهای اختصاصی در انفجار تنفسی هست که توسط برخی از سلول‌های فاگوسیتوزی مثل نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها تولید می‌شود (Secombes and Fletcher, 1992). در مطالعه حاضر، افزایش فعالیت فاگوسیتوزی در تیمارهای تحت درمان با گزنه می‌تواند به دلیل وجود فلاونوئیدهای گلیکوزیدی گزنه باشد که موجب افزایش انفجار اکسیداتیو نوتروفیل‌ها می‌شود (Akabay et al., 2003). در پژوهش‌های محققین، افزودن عصاره آلونه (۲ میلی گرم بر لیتر) به آب منجر به افزایش فعالیت انفجار تنفسی در *Brycon amazonicus* (*matrinxã*) شد (Zanuzzo et al., 2012). کمپلمان‌ها در واقع پروتئین‌های فاز حاد سیستم ایمنی محسوب می‌شوند و غلظت آنها معمولاً پس از نکرز سلولی و مرگ بافتی تغییر می‌کند. به عبارتی، تغییر سطح کمپلمان‌ها به عنوان یک پاسخ فاز حاد سیستم ایمنی نوعی واکنش سیستمیک تعمیم یافته محسوب می‌شود که می‌توان آن را به التهاب و پاسخ ایمنی ذاتی مربوط دانست (Naghdi badi and Makizadeh Tafti, 2007). در مطالعه حاضر فعالیت سیستم کمپلمان در ماهیان حمام داده شده با عصاره گزنه نسبت به گروه شاهد افزایش یافت. نتایج مشابه در باره تأثیر عصاره‌های گیاهی به عنوان محرک بر شاخص‌های دفاعی گزارش شده است. برای مثال، Dügenci و همکاران (۲۰۰۳) در بررسی اثرات چند گونه گیاه دارویی بر سطح ایمنی ماهی قزل‌آلا به این نتیجه رسیدند که عصاره گیاهانی نظیر داروаш (*Viscum album*)، گزنه (*U. dioica*) و زنجبیل (*Zingiber officinale*) سبب افزایش سطح ایمنی در بدن ماهی می‌گردد.

در مطالعه‌ای دیگر بهبود پاسخ‌های ایمنی قزل‌آلای رنگین کمان با بکارگیری عصاره گزنه مورد تأیید قرار گرفت (Saeidi et al., 2017). بهبود پارامترهای ایمنی خون با استفاده از گیاه دارویی گزنه می‌تواند به دلیل ترکیبات فلاونوئیدها، کاروتنوئیدها و ویتامین C موجود در آن باشد که به طور عمومی اثرات سودمندی بر سیستم ایمنی دارند (Houston and Rupert, 1976)، تاکنون اثر اسانس اکالیپتوس (*Eucalyptus camaldolensis*) (Ebrahimzadeh et al., 2006) و اسانس شمعدانی (*Geranium*)

همچنین Zahran و Risha (۲۰۱۳) دریافتند که حمام دهی تیلایای نیل (*O. niloticus*) با پرمگنات پتاسیم (KMnO_4 , 2.5 ppm) باعث افزایش مقاومت ماهیان مواجهه شده با *Saprolegnia ferax* و کاهش تلفات آنها (۴۰٪) نسبت به گروه کنترل (۹۲/۵٪) شد. در مطالعات Firouzbakhsh و همکاران (۲۰۱۴b) تغذیه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با جیره مکمل شده با سینبیوتیک، سبب کاهش تلفات ماهیان در مواجهه با ساپروولگنیا پارازیتیکا از ۸۸٪ در گروه کنترل به ۲۷-۴۴٪ در تیمارهای تغذیه شده با سینبیوتیک شد. با توجه به نتایج مشاهده شده از مطالعه حاضر، حمام عصاره گزنه می‌تواند به عنوان یک عصاره دارویی با افزایش پارامترهای ایمنی، موجب افزایش توان سیستم ایمنی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان گردد. همچنین این عصاره دارویی (دوز ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر) می‌تواند راهکار مناسبی برای پیشگیری اثرات سوء احتمالی ناشی از تضعیف سیستم ایمنی باشد و در نهایت منجر به پیشگیری، مقاومت و بازماندگی بیشتر ماهیان در برابر ساپروولگنیوز در مزارع پرورشی شود.

منابع

- Adel, M., Pourgholam, R., Zorriehzahra, S.J. and Ghiasi, M., 2015. The effect of different level of *Mentha piperita* on some of the hematological, biochemical and immune parameters of *Oncorhynchus mykiss*. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 24(1):37-46. DOI: 10.22092/ISFJ.2014.103049.
- Akbay, P., Basaran, A.A., Undeger, U. and Basaran, N., 2003. In vitro immunomodulatory activity of flavonoid glycosides from *Urtica dioica*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 17(1):34-37. DOI:10.1002/ptr.1068.
- Allardice, P., 1993. A-Z of companion planting. Harper Collins Publishers, UK. 208P.
- Amirkhani, N. and Firouzbakhsh, F., 2015. Protective effects of basil (*Ocimum basilicum*) ethanolic extract supplementation diets against experimental *Aeromonas hydrophila* infection in common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture Research*, 46(3):716-724. DOI:10.1111/are.12217.
- herbarum (Rohani et al., 2006) در کنترل آلودگی‌های قارچی آبزیان مورد تأیید قرار گرفته است. نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر نیز نشان داد که تیمارهای تحت درمان با حمام عصاره گزنه در مواجهه با قارچ ساپروولگنیا، علائم قارچ زدگی کمتری را نسبت به گروه کنترل نشان دادند و همچنین تلفات این تیمارها به طور معنی داری پایین‌تر از گروه کنترل بود.
- خواص بازدارندگی یا قارچ ایستایی گیاهان را می‌توان به وجود متابولیت‌های ثانویه متنوع و متفاوت در آنها نسبت داد. Gülçin و همکاران (۲۰۰۴) فعالیت ضدقارچی و ضد میکروبی گزنه را با وجود ترکیبات فنولی موجود در آن مانند کارواکرول و تیمول اثبات کرده‌اند. همچنین مطالعات نشان داده است که گیاهان غنی از فلاونوئید و ترکیبات ترپنی با افزایش فعالیت ویتامین C و با اثر ضدباکتریایی خود موجب تقویت سیستم ایمنی و تولید آنتی‌بادی می‌شوند (Catoni et al., 2008). فلاونوئیدها می‌توانند از طریق حذف رادیکال‌های آزاد و با خواص آنتی اکسیدانی خود استرس اکسیداتیو را کاهش دهند و موجب افزایش فعالیت سلول‌های لنفاوی شوند (Pietta and Simonetti, 1998; Zhu et al., 2000).
- بررسی ماکروسکوپی روند رشد رشته‌های قارچی ساپروولگنیا روی بدن ماهیان درگیر شده، نشان داد که در ماهیان تحت تیمار با عصاره گزنه، سرعت رشد قارچ کاهش و در واقع کنترل شده است. همچنین حمام عصاره گزنه باعث بهبود زخم ایجاد شده در محل فلس‌برداری ماهیان تحت تیمار حمام دهی در مقایسه با گروه کنترل شد. تأثیر مثبت گیاه گزنه در روند التیام زخم را می‌توان با ترکیبات موجود در آن ارتباط داد. Cummings و Olsen (۲۰۱۱) و Randall و همکاران (۱۹۹۹) بیان داشتند که این گیاه دارای ترکیبات مختلف از جمله مقادیر زیادی هیستامین می‌باشد. همچنین مطالعات مختلفی از تأثیر هیستامین بر افزایش سرعت التیام وجود دارد. در این رابطه، Numata و همکاران (۲۰۰۶) بیان داشتند که هیستامین از طریق فعالسازی فاکتور رشد فیبروبلاستی، منجر به افزایش آنژیوژنز در بافت التیامی و موجب تسریع در روند التیام زخم‌های جلدی می‌شود. در تحقیقی دیگر، Ghosh و همکاران (۲۰۰۱) بیان نمودند که هیستامین از طریق افزایش تولید فاکتور رشد اندوتلیال عروقی، منجر به افزایش میزان بافت همبند در فرآیند التیام زخم می‌شود.
- در مطالعه Zanuzzo و همکاران (۲۰۱۵) حمام‌دهی مولدین (*Bryconoma zonicus*) با آلوه ورا (۰/۱ گرم بر لیتر) به مدت ۲۴ ساعت بعد از استرس تخم‌کشی، با افزایش فعالیت انفجار تنفسی نسبت به گروه کنترل، منجر به افزایش مقاومت آنها شد و از بروز زخم‌های پوستی جلوگیری کرد.

- Awad, E. and Austin, B., 2010. Use of lupin, *Lupinus perennis*, mango, *Mangifera indica*, and stinging nettle, *Urtica dioica*, as feed additives to prevent *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of fish diseases*, 33(5):413-420. DOI:10.1111/j.1365-2761.2009.01133.x.
- Awad, E., Austin, D. and Lyndon, A.R., 2013. Effect of black cumin seed oil (*Nigella sativa*) and nettle extract (Quercetin) on enhancement of immunity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture*, 388:193-197. DOI:10.1016/j.aquaculture.2013.01.008.
- Barton, B.A., Weirter, G.S. and Schreck, C.B., 1985. Effect of prior acid exposure on physiological responses of juvenile rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to acute handling stress. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42(4): 710-717. DOI:10.1139/f85-091.
- Binaii, M., Ghiasi, M., Farabi, S.M.V., Pourgholam, R., Fazli, H., Safari, R., Alavi, S.E., Taghavi, M.J and Bankehsaz, Z., 2014. Biochemical and hemato-immunological parameters in juvenile beluga (*Huso huso*) following the diet supplemented with nettle (*Urtica dioica*). *Fish and Shellfish Immunology*, 36(1): 46-51. DOI:10.1016/j.fsi.2013.10.001.
- Bombardelli, E. and Morazzoni, P., 1997. *Urtica dioica* L. *Fitoterapia* 68(5): 387-402.
- Borchers, AT., Keen, C.L., Stern, J.S. and Gershwin, M.E., 2000. Inflammation and Native American medicine: the role of botanicals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72(2): 339-347. DOI:10.1093/ajcn/72.2.339.
- Borges, A., Scotti, L.V., Siqueira, D.R., Jurinitz, D.F. and Wassermann, G.F., 2004. Hematologic and serum biochemical values for jundiá (*Rhamdia quelen*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 30(1): 21-25. DOI: 10.1007/s10695-004-5000-1.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2): 248-254. DOI:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Bruno, D.W. and Woo, B.P., 1994. Viral, Bacterial and Fungal Infections. Edited by P.T.K. 4. Woo and D.W. Bruno. CABI Publishing, Waling ford, Oxon, UK. pp 599-559.
- Cataldi, E., Di Marco, P., Mandich, A. and Cataudella, S., 1998. Serum parameters of Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* (Pisces: Acipenseriformes): effects of temperature and stress. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A Molecular and Integrative Physiology*, 121(4): 351-354. DOI:10.1016/S1095-6433(98)10134-4.
- Catoni, C., Schaefer, H.M. and Peters, A., 2008. Fruit for health: the effect of flavonoids on humoral immune response and food selection in a frugivorous bird. *Functional Ecology*, 22(4): 649-654. DOI: 10.1111/j.1365-2435.2008.01400.x.
- Cummings, A.J. and Olsen, M., 2011. Mechanism of action of stinging nettles. *Wilderness and Environmental Medicine*, 22(2): 136-139. DOI:10.1016/j.wem.2011.01.001.
- Douglass, J.W. and Jane, K.W., 2010. Schalm's Veterinary Hematology. John Wiley and Sons, Blackwell Publishing Ltd, 1232P.
- Düğenci, S.K., Arda, N. and Candan, A., 2003. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. *Journal of Ethnopharmacology*, 88(1): 99-106. DOI:10.1016/S0378-8741(03)00182-X.
- Ebrahimzadeh Mousavi, H., Rohani, M.S., Khowsravi, A.R., Mehrabi, Y. and Basti, A., 2006. The Evaluation of *Eucaliptus*

- camaldolensis* Dehnh. Esscence Application in Control of Fungal Pollution of Trout Eggs. *Journal of Medicinal Plants*, 4(20): 42-47.
- Firouzbakhsh, F., Afsarian, M.H., Hooshangi, S. and Badali, H., 2014.** Evaluation of in vitro antifungal activity of *Foeniculum*, *Achillea*, *Satureja*, *Cinnamomum* and *Artemisia* against *Saprolegnia parasitica*. *Arak Medical University Journal*, 17(5):60-69. DOI:10.1111/j.1365-2109.2012.03261.x.
- Firouzbakhsh, F., Zolfaghari, A., Mehrabi, Z. and Khalesi, M.K., 2015.** In vitro antifungal activity of Nettle (*Urtica dioica*) and Basil (*Ocimum basilicum*) extracts on *Saprolegnia parasitica*. *Journal Animal Environment*, 7(3): 211-216.
- Gabor, E.F., Şara, A. and Barbu, A., 2010.** The effects of some phytoadditives on growth, health and meat quality on different species of fish. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, 43(1):61-65.
- Gabriel, N.N., Qiang, J., He, J., Ma, X.Y., Kpundeh, M.D. and Xu, P., 2015.** Dietary *Aloe vera* supplementation on growth performance, some haemato-biochemical parameters and disease resistance against *Streptococcus iniae* in tilapia (GIFT). *Fish and Shellfish Immunology*, 44(2): 504-514. DOI:10.1016/j.fsi.2015.03.002.
- Ghosh, A.K., Hirasawa, N. and Ohuchi, K., 2001.** Enhancement by histamine of vascular endothelial growth factor production in granulation tissue via H2 receptors. *British Journal of Pharmacology*, 134(7): 1419-1428. DOI:10.1038/sj.bjp.0704372.
- Graham, M.S., Haedrich, R.L. and Fletcher, G.L., 1985.** Hematology of three deep-sea fishes: a reflection of low metabolic rates. *Comparative and Biochemistry and Physiology*. Part A: *Comparative Physiology*, 80(1): 79-84. DOI:10.1016/0300-9629(85)90682-6.
- Gülçin, I., Küfrevioğlu, Ö.İ., Oktay, M. and Büyükokuroğlu, M.E., 2004.** Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *Journal of Ethnopharmacology*, 90(2-3): 205-215. DOI:10.1016/j.jep.2003.09.028.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C. and Heo, M.S., 2010.** Herbal supplementation diets on hematology and innate immunity in goldfish against *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*, 28(2): 354-361. DOI:10.1016/j.fsi.2009.11.013.
- Houston, A.H. and Rupert, R., 1976.** Immediate response of the hemoglobin system of the goldfish, *Carassius auratus*, to temperature change. *Canadian Journal of Zoology*, 54(10): 1737-1741. DOI:10.1139/z76-201.
- Houston, A.H., 1990.** Blood and circulation. In: Schreck, C.B. and Moyle, P.B., (eds.) *Methods for fish biology*. American Fisheries Society, Bethesda, MD, USA. pp 273-334.
- Karimi Pashaki, A., Ghasemi, M., Zorrieh Zahra, S.J., Shrif Rohani, M. and Hosseini, S.M., 2019.** Effect of diets containing aqueous-alcoholic extract of olive leaf (*Olea europaea* L.) on growth performance and some blood and immune parameters in common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 27(2):71-80. DOI:10.220092/ISFJ.2018.116698.
- Kumari, J., Sahoo, P.K., Swain, T., Sahoo, S.K., Sahu, A.K. and Mohanty, B.R., 2006.** Seasonal variation in the innate immune parameters of the Asian catfish (*Clarias batrachus*). *Aquaculture*, 252(2-4): 121-127. DOI:10.1016/j.aquaculture.2005.07.025.
- Lim, C., Klesius, P.H., Li, M.H. and Robinson, E.H., 2000.** Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, hematology,

- immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge. *Aquaculture*, 185(3-4):313-327. DOI:10.1016/S0044-8486(99)00352-X.
- Matsuyama, H., Tanaka, K., Nakao, M. and Yano, T., 1988.** Characterization of the alternative complement pathway of carp. *Developmental and Comparative Immunology*, 12(2): 403-408. DOI: 10.1016/0145-305X(88)90015-8.
- Mehrabi, Z., Firouzbakhsh, F., Rahimi-Mianji, G. and Paknejad, H., 2019.** Immunostimulatory effect of Aloe vera (*Aloe barbadensis*) on non-specific immune response, immune gene expression, and experimental challenge with *Saprolegnia parasitica* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 500 :330-338. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2019.01.025
- Meyer, F.P. and Jorgenson, T.A., 1983.** Teratological and other effects of malachite green on development of rainbow trout and rabbits. *Transactions of the American Fisheries Society*, 112(6): 818-824. DOI:10.1577/1548-8659(1983)112%3C818:TAOEOM%3E2.0.CO; 2.
- Miligan, CL. and Wood, C.M., 1982.** Disturbances in haematology, fluid volume distribution and circulatory function associated with low environmental pH in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Journal of Experimental Biology*, 99(1): 397-415.
- Naghdi badi, H. and Makizadeh Tafti, M., 2007.** A review on Thymus species *Journal of Medical Plants*, 7: 1-13.
- Nayak, S.K., Swain, P., Nanda, P.K., Dash, S., Shukla, S., Meher, P.K. and Maiti, N.K., 2008.** Effect of endotoxin on the immunity of Indian major carp, *Labeo rohita*. *Fish and Shellfish Immunology*, 24(4): 394-399. DOI:10.1016/j.fsi.2007.09.005.
- Ngugi, C.C., Oyoo-Okoth, E., Mugo-Bundi, J., Orina, P.S., Chemoiwa, E.J. and Aloo, P.A., 2015.** Effects of dietary administration of stinging nettle (*Urtica dioica*) on the growth performance, biochemical, hematological and immunological parameters in juvenile and adult Victoria Labeo (*Labeo victorinus*) challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*, 44(2): 533-541. DOI:10.1016/j.fsi.2015.03.025.
- Numata, Y., Terui, T., Okuyama, R., Hirasawa, N., Sugiura, Y., Miyoshi, I., Watanabe, T., Kuramasu, A., Tagami, H. and Ohtsu, H., 2006.** The accelerating effect of histamine on the cutaneous wound-healing process through the action of basic fibroblast growth factor. *Journal of Investigative Dermatology*, 126(6): 1403-1409. DOI:10.1038/sj.jid.5700253.
- Peters, J.r. T., 1995.** All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications. Academic press. San Diego, California, USA. 434P.
- Peyghan, R., Khadjeh, G.H. and Enayati, A., 2014.** Effect of water salinity on total protein and electrophoretic pattern of serum proteins of grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. In *Veterinary research forum: an international quarterly journal* (Vol. 5, No. 3, p. 225). Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran, 5(3):225-229.
- Pietta, P. and Simonetti, P., 1998.** Dietary flavonoids and interaction with endogenous antioxidants. *IUBMB Life*, 44(5): 1069-1074. DOI:10.1080/15216549800202132.
- Randall, C., Meethan, K., Randall, H. and Dobbs, F., 1999.** Nettle sting of *Urtica dioica* for joint pain—an exploratory study of this complementary therapy. *Complementary Therapies in Medicine*, 7(3): 126-131. DOI:10.1016/S0965-2299(99)80119-8.

- Rohani, MS., Ebrahimzadeh, MH., Khosravi, A.R., Mokhayer, B., Mirzargar, S.S. and Mehrabi, Y.E., 2006. Evaluation of *Geranium herbarum* essence application in control of fungal contamination in rainbow trout eggs. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 61(3): 269-272.
- Saeidi Asl, M.R., Adel, M., Caipang, C.M.A. and Dawood, M.A., 2017. Immunological responses and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles following dietary administration of stinging nettle (*Urtica dioica*). *Fish and Shellfish Immunology*, 71:230-238. DOI: 10.1016/j.fsi.2017.10.016. Epub 2017 Oct 7.
- Sahoo, P.K., Kumari, J. and Mishra, B.K., 2005. Non-specific immune responses in juveniles of Indian major carps. *Journal of Applied Ichthyology*, 21(2): 151-155. DOI:10.1111/j.1439-0426.2004.00606.x.
- Sakai, M., 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172(1-2): 63-92. DOI:10.1016/S0044-8486(98)00436-0.
- Secombes, C.J. and Fletcher, T.C., 1992. The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. *Journal of Fish Diseases*, 2: 53-71. DOI:10.1016/0959-8030(92)90056-4.
- Stoskopf, M.K., 1993. Fish medicine. WB Sanders Company, Philadelphia. USA. 220P.
- Tapwal, A., Garg, S., Gautam, N., Kumar, R., 2011. In vitro antifungal potency of plant extracts against five phytopathogens. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(6): 1093-1098. DOI:10.1590/S1516-89132011000600003.
- Tavares-Dias, M. and Moraes, F.R.D., 2007. Leukocyte and thrombocyte reference values for channel catfish (*Ictalurus punctatus* Raf), with an assessment of morphologic, cytochemical, and ultrastructural features. *Veterinary Clinical Pathology*, 36(1): 49-54. DOI:10.1111/j.1939-165X.2007.tb00181.x.
- Wetherilt, H., 1992. Evaluation of *Urtica* species as potential sources of important nutrients. *In Developments in Food Science*, 29: 15-25. DOI:10.1016/B978-0-444-88834-1.50007-7.
- Zahrn, E. and Risha, E., 2013. Protective role of adjuvant and potassium permanganate on oxidative stress response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) challenged with *Saprolegnia ferax*. *SpringerPlus*, 2(1): 94. DOI:10.1186/2193-1801-2-94.
- Zanuzzo, F.S., Biller-Takahashi, J.D. and Urbinati, E.C., 2012. Effect of *Aloe vera* extract on the improvement of the respiratory activity of leukocytes of matrinxa during the transport stress. *Rev. Revista Brasileira de Zootecnia*, 41(10): 2299-2302. DOI:10.1590/S1516-35982012001000023.
- Zanuzzo, F.S., Zaiden, S.F., Senhorini, J.A., Marzocchi-Machado, C.M. and Urbinati, E.C., 2015. *Aloe vera* bathing improved physical and humoral protection in breeding stock after induced spawning in matrinxa (*Brycon amazonicus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 45(1): 132-140. DOI:10.1016/j.fsi.2015.02.017.
- Zhu, Q.Y., Huang, Y. and Chen, Z.Y., 2000. Interaction between flavonoids and α -tocopherol in human low density lipoprotein. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 11(1): 14-21. DOI:10.1016/S0955-2863(99)00065-0.

Bathing effects of nettle (*Urtica dioica*) hydroalcoholic extract on immunological and hematological indices in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected with *Saprolegnia* fungal

Alishah N.¹; Firouzbakhsh F.^{1*}; Mehrabi, Z.¹

*f.firouzbakhsh@sanru.ac.ir

1-Department of Fisheries, Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

Abstract

The aim of this study was to investigate the effects of nettle (*Urtica dioica*) hydroalcoholic extract (NHE) on saprolegniasis control, serum biochemistry, immunological and hematological indices of rainbow trout infected with *Saprolegnia*. Rainbow trout (n=180, weight=22±0.27g) were randomly distributed in six treatments. Experimental groups were first made prone to the disease by scaling the caudal peduncle, and then were exposed to bathing with *S. zoospores* (3×10^5 /L) for 4 hours. After infection, fish were stocked in 100 L tanks and received four treatments (50, 100, 150, and 200 mg/L of NHE) daily for 1 hour during 1 week. At the one-week bathing with NHE (first week), and a week after the bathing (second week), parameters of hematology [red blood cells (RBCs), white blood cells (WBCs), hematocrit, and hemoglobin], serum biochemistry (albumin, globulins, and total protein), immunity parameters (lysozyme activity, complement system, and respiratory burst activity), and mortality rate were examined in all treatments. Results showed that 100 mg/L of NHE significantly increased hematological, serum biochemical and immunity parameters in rainbow trout infected with saprolegnia ($p < 0.05$). Also, doses 50, 150 and 200 mg/L of NHE significantly reduced mortality rate with increasing fish resistance to saprolegniasis compared the control. Hence, the use of NHE at a dose of 100 mg/L with bath therapy is recommended to improve hematological and immunological parameters, and to control of saprolegniasis in this species.

Keywords: Nettle, Hematology, Saprolegniasis, Bath therapy, Rainbow trout

*Corresponding author