

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

(*Onchorhynchus mykiss*)

مهدی سلطانی<sup>(۱)</sup>\*؛ طیبه ظریف منش<sup>(۲)</sup>؛ سید جلیل ذریه زهراء<sup>(۳)</sup>

msoltani@ut.ac.ir

۱- گروه بهداشت و بیماری های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۶۴۵۳

۲- گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران صندوق پستی: ۱۴۵۱۵-۷۷۵

۳- بخش بهداشت و بیماری های آبزیان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، تهران صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۱۶۶۱

تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۱

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۱

### چکیده

اثرات محرك ایمنی اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Bioss.) روی سیستم عامل مکمل و لیزوژیم خون ماهی قزلآلای رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*) با میانگین ( $\pm$  انحراف معیار) وزنی  $100 \pm 10$  گرم مورد بررسی قرار گرفت. ماهیان به روش خوراکی و با غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌لیتر اسانس آویشن به ازاء هر کیلوگرم غذا به مدت ۱۰ روز متوالی مورد تغذیه قرار گرفتند و مسیر جانی عامل مکمل و Alternative Complement Activity (CH50%) لیزوژیم خون آنها ۱۵، ۸ و ۲۹ روز پس از آخرین تجویز اسانس مورد سنجش قرار گرفت. به منظور مقایسه، یک گروه شاهد نیز بدون افزودن اسانس به جیره غذایی در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد که میانگین عامل مکمل در روزهای اول و هشتم نمونه‌برداری در گروه‌های تغذیه شده با غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌لیتر اسانس آویشن شیرازی به ازاء هر کیلوگرم غذا نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌دار داشته است اما در روزهای پانزده و بیست و نهم نمونه‌برداری بین گروه شاهد و گروه‌های تیمار تفاوت معنی‌دار دیده نشد. نتایج مربوط به میزان فعالیت لیزوژیم سرم در روزها و در تیمارهای مختلف نشان داد که تفاوت آماری معنی‌داری با گروه شاهد وجود نداشت.

**لغات کلیدی:** اسانس آویشن شیرازی، ماهی قزلآلای رنگین کمان، سیستم ایمنی ماهی

## 4 مقدمه

کرد. در ماهی، لیزوزیم بعنوان یک آنزیم با ویژگی‌های آنتی-بیوتیکی است که از گلbulول‌های سفید آزاد شده و فعالیت بیشتری نسبت به پستانداران دارد و در اکثر موارد به عنوان شاخص عملکرد اینمی غیراختصاصی استفاده می‌شود (Shailesh & Sahoo, 2008). همانند سیستم عامل مکمل، میزان، فعالیت لیزوزیم نیز تحت تاثیر فعالیت محرك‌های ایمنی است. استفاده از برخی گیاهان مانند زنجبیل و آلئورا در ماهی کپور موجب افزایش فعالیت لیزوزیم در آن‌ها می‌شود (Bairwa *et al.*, 2012). نتایج Ardo و همکاران (۲۰۰۸) نشان می‌دهد که میزان فعالیت لیزوزیم برای ماهی تیلاپیا که

به مدت ۷ روز با گیاهان چینی *Astragalus membranaceus* و *Lonicera japonica* تغذیه شد افزایش داشته است. Asadi و همکاران (۲۰۱۰) اثر گیاه *Nasturtium nasturtium* لیزوزیم و عامل مکمل در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که این عصاره موجب افزایش فعالیت سیستم عامل مکمل و لیزوزیم می‌شود. گیاه آویشن شیرازی نیز بعنوان یکی از گیاهان بومی ایران از زمان‌های گذشته در طب سنتی مورد استفاده بوده است. از این‌رو در سال‌های اخیر استفاده از آن بعنوان محرك ایمنی در صنعت آبریزپروری رو به افزایش است. در مطالعات مختلف فعالیت ضد باکتریایی (Navarrete *et al.*, 2010; Mahmoodi *et al.*, 2012; Maleknezhad *et al.*, 2012; al., 2012; Maleknezhad *et al.*, 2012; Khosravi *et al.*, 2012) آویشن بررسی شده است. در مطالعه‌ای که توسط Yilmaz و همکاران (۲۰۱۲) انجام شد تاثیر آویشن روی عملکرد رشد ماهی *Dicentrarchus labrax* و تغییر در برخی پارامترهای خونی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که جیره حاوی آویشن منجر به افزایش نگهداری نسبت انرژی و پروتئین در این ماهی موجب بهبود نگهداری نسبت انرژی و پروتئین در این ماهی می‌شود. در مطالعه‌ای که توسط Soltani و همکاران (۲۰۱۰) انجام شد تاثیر اسانس آویشن شیرازی روی پاسخ ایمنی ذاتی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که اسانس آویشن شیرازی روی تعدادی از فاكتورهای ایمنولوژیکی مانند تیتر آنتی بادی، تعداد کل گلبول‌های سفید خون و فعالیت باکتری‌کشی سرم در

داروهای طبیعی و گیاهی بدلیل عواملی مانند ارزش اقتصادی و کم هزینه بودن تولید آنها، نداشت اثرات تخریبی بر محیط‌زیست، کم بودن عوارض جانبی در مقایسه با داروهای شیمیایی، عدم ایجاد مقاومت نسبی در برابر عوامل بیماری‌زا، منحصر بودن در درمان برخی بیماری‌های خاص و وجود تجربیات مختلف بالینی در این زمینه منجر شده تا این منابع ارزشمند داروبی از ارزش و جایگاه خاصی در درمان برخوردار باشند (فاسمی پیر بلوطی و همکاران، ۱۳۹۰). تعدادی از گیاهان داروبی سبب تحریک اجزاء ایمنی غیراختصاصی از جمله سیستم عامل مکمل و لیزوزیم می‌شوند. سیستم عامل مکمل از حدود ۳۵ پروتئین مجزا تشکیل شده است که از مهمترین فعالیت‌های آن می‌توان به توانایی کشتن عوامل بیماریزا بوسیله ایجاد منفذ در سطح غشای آن‌ها اشاره کرد (Claier *et al.*, 2002). فعال‌سازی عامل مکمل از سه مسیر کلاسیک عامل مکمل (CCP) Alternative (ACP) Pathway و مسیر لکتین عامل مکمل Complement Pathway و مسیر لکتین تشکیل شده است. بررسی‌ها نشان می‌دهد که سیستم عامل مکمل در ماهیان قادر به تشخیص طیف وسیعتری از عوامل بیگانه در مقایسه با پستانداران است (Boshra *et al.*, 2006). سیستم عامل مکمل در ماهیان نه تنها بعنوان عامل تشخیص استرس کاربرد دارد بلکه دارای خاصیت ضد میکروبی نیز می‌باشد (سلطانی، ۱۳۸۷). بررسی Ji و همکاران (۲۰۰۷) نشان داد که میزان فعالیت سیستم عامل مکمل در ماهی *Pagrus major* در گروهی که با ترکیبی از چند گیاه داروبی ژاپنی تغذیه شده بود افزایش داشته است. نتایج نشان می‌دهد که افزودن ویتامین C به جیره غذایی گریه ماهی و ماهی *Salmo salar* منجر به افزایش فعالیت سیستم عامل مکمل می‌شود. همچنین فعالیت سیستم عامل مکمل در ماهی قزل‌آلای که لومامیزول به آنها تزریق شده است افزایش پیدا می‌کند (Sakai, 1999). لیزوزیم نیز بعنوان یک عامل مهم دفاعی در سیستم ایمنی غیراختصاصی در برابر عوامل میکروبی مهاجم واکنش نشان می‌دهد. در مهره‌داران عالی، لیزوزیم شامل مکانیسم‌های دفاعی گسترشده‌ای است که از جمله این مکانیسم‌ها می‌توان به اپسونیزاسیون، باکتریولیز و فعالیت محدود ضد ویروسی اشاره

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

برای سنجش میزان عامل مکمل از روش توصیه شده توسط Matsuyama و همکاران (۱۹۸۸) استفاده شد. بافرهای مورد استفاده در این آزمایش شامل Veronal buffer، EDTA-GVB و Alsever's، EGTA-MG-GVB، ۵x، ۵x Alsever's است. در کشتارگاه در شرایط استریل خون گوسفند به بافر اضافه می‌شود. برای انجام آزمایش عامل مکمل مقداری از خون گوسفند و بافر Alsever's را در لوله آزمایش ریخته و در دستگاه سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه و با ۳۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده و سرم خون آن حذف گردید و سلول‌های باقیمانده دو بار با بافر EGTA-MG-GVB شستشو داده و سپس از سلول‌های باقیمانده رقت ۲ درصد ۲۰۰۰ میکرولیتر از سلول‌های باقیمانده در پلت در ۱۰ میلی‌لیتر از بافر EGTA - MG - GVB تهیه گردید. از نمونه‌های سرم EGTA - MG - GVB بدست آمده از ماهیان در محلول بافر رقت‌های متوالی تهیه شد. برای هر نمونه (سرم) ۵ رقت شامل: ۱/۱۶، ۱/۸، ۱/۴، ۱/۳۲، ۱/۶۴ و ۱/۱۲۸ رقت ۱/۴ میزان ۳۷۵ میکرولیتر از بافر EGTA-MG-GVB اضافه کرده و به سایر رقت‌ها میزان ۲۵۰ میکرولیتر از بافر EGTA - MG - GVB اضافه می‌شود. سپس میزان ۱۲۵ میکرولیتر از نمونه سرم ماهی به لوله اول اضافه و با کمک سمپلر چند بار

۱۵

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

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

## مواد و روش کار

۸۰ عدد ماهی قزل‌آلای رنگین کمان سالم با میانگین (± انحراف معیار) وزن  $100 \pm 10$  از کارگاه تکثیر و پرورش با سابقه سلامت بهداشتی واقع در استان مازندران شهرستان ساری (سفیدآب) تهیه شد و به کارگاه مورد نظر در حومه شهرستان نوشهر (قزل چشم) انتقال داده شد. عمل سازگاری به مدت ده روز صورت گرفت و پس از آن ماهی‌ها به ۴ استخراج که تراکم هر کدام ۲۰ عدد ماهی بود انتقال یافتند و تغذیه با خوراک ماهی تهیه شده از شرکت فرادانه به میزان ۲ درصد وزن بدن در روز انجام شد. پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب مورد استفاده شامل: دمای آب ۱۶-۱۸ درجه سانتیگراد، سختی آب ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر، pH برابر ۸ و اکسیژن محلول حداقل ۶/۸ میلی‌گرم در لیتر بوده است.

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

حجمی از سرم رقیق شده (همان نمونه استفاده شده در لوله‌ها) که به ازای آن نیمی از گلوبول‌های قرمز تحلیل می‌رond بعنوان  $\text{CH}_{50}$  در نظر گرفته می‌شود. برای نقطه  $\text{CH}_{50}$  مقدار  $y$  برابر با  $1/5$  می‌باشد. بنابراین  $(y-1)/y$  برابر با یک می‌گردد که لگاریتم آن صفر است؛ از اینرو محل تقاطع خط رسم شده با محور  $x$ ‌ها همان  $\text{CH}_{50}$  می‌باشد (Inglis *et al.*, 2008).

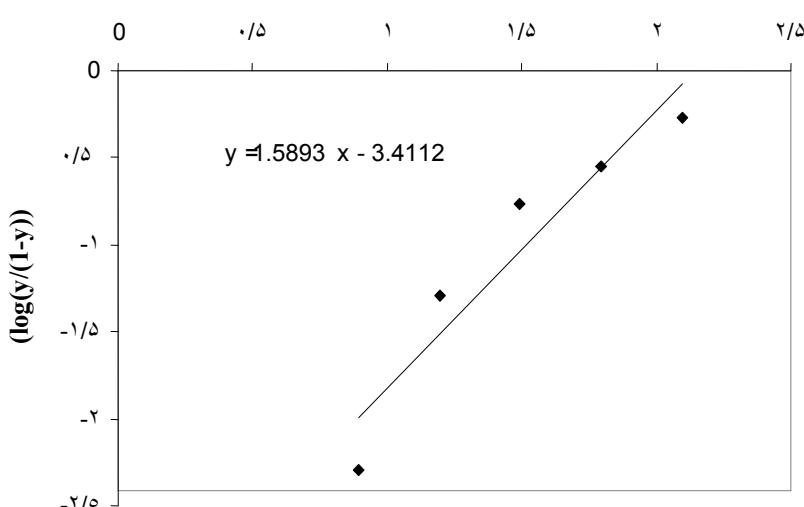
برای سنجش میزان لیزوژیم از روش توصیه شده توسط Amin و همکاران (۲۰۱۰) به شرح زیر استفاده شد. در یک PBS (Phosphate Buffer Saline) حل کرده تا به مک فارلین شماره ۱ برابر  $3 \times 10^{-4}$  سلول به ازاء هر میلی‌لیتر برسد. در مرحله بعد  $100\text{ }\mu\text{l}$  میکرولیتر از این سوسپانسیون را به محیط کشت Tryptic Soy Agar (TSA) آماده شده اضافه نموده و در پلت‌ها گوده‌هایی ایجاد و در درون گوده‌ها نمونه‌های سرم اضافه و به مدت ۱۸ ساعت آنها را انکوبه کرده و سپس میزان قطر مانع کنندگی (IZD) Inhibition Zone Diameter (IZD) از رشد باکتری توسط خط کشی با دقت  $1/10$  میلی‌متر اندازه‌گیری گردید. برای هر نمونه، نمودار مجدد مقادیر IZD در مقابل لگاریتم غلظت نمونه رسم می‌شود. با رسم بهترین خط عبوری از نقاط نمودار و تقاطع آن با محور لگاریتم غلظت نمونه‌ها، Minimum Inhibitory Concentration (MIC) لگاریتم

بافر و سرم با هم مخلوط گردید. سپس از لوله اول  $250\text{ }\mu\text{l}$  میکرولیتر برداشته و به لوله دوم انتقال داده و به همین ترتیب برای سایر لوله‌ها اقدام شد. در نهایت از لوله آخر میزان  $250\text{ }\mu\text{l}$  میکرولیتر حذف گردید. لوله‌ها را در انکوباتور در شرایط دمایی  $19^\circ\text{C}$  درجه و به مدت یک ساعت و  $30$  دقیقه قرار داده و پس از آن میزان  $1400\text{ }\mu\text{l}$  میکرولیتر از بافر EDTA-GVB به همه لوله‌ها اضافه کرده و در دستگاه سانتریفیوژ به مدت  $10$  دقیقه با  $3000$  دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و در مرحله آخر محتوای لوله‌ها در اسپکتروفوتومتر با طول موج  $414\text{ nm}$  خوانده شد. برای محاسبه درصد همولیز گلوبول‌های قرمز از رابطه زیر استفاده گردید.

$$\text{Percent RBC lysis} = [\text{RA of the well} / \text{RA of the } 100\% \text{ lysis well}] \times 100$$

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

### log of serum volume



نمودار ۱: نمودار لگاریتمی مقدار همولیز گلوبولهای قرمز بر حسب حجم سرم

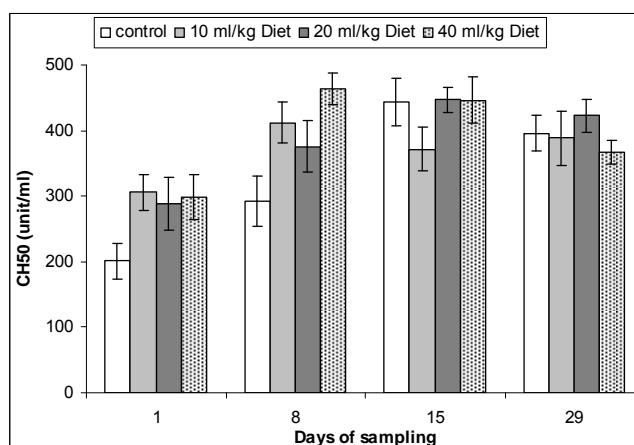
مقادیر برای گروه کنترل در ایام مذکور بترتیب برابر  $۲۰۰ \pm ۲۷$ ,  $۲۹۲ \pm ۳۸$ ,  $۴۴۲ \pm ۳۶$ ,  $۳۹۶ \pm ۲۷$  است. در نمودار ۲ مقایسه میانگین ( $\pm$  انحراف معیار) مقدار عامل مکمل در گروههای آزمایشی مختلف و برای روزهای مختلف نشان داده است.

نتایج میانگین فعالیت لیزوزیم ( $\pm$  انحراف معیار) در جدول ۱ نشان داده شده است. براساس این نتایج میانگین فعالیت ضد باکتریایی لیزوزیم در روز اول نمونه‌گیری بترتیب برای غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌لیتر به ازاء هر کیلوگرم غذا عبارت از  $۱/۱ \pm ۰/۹$ ,  $۱/۱۵ \pm ۰/۱۲$ ,  $۱/۰/۰/۸$ ,  $۱/۲ \pm ۰/۱۱$  میلی‌گرم بر لیتر بوده در حالیکه میزان آن برای گروه کنترل  $۱/۲ \pm ۰/۱۱$  میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد. در روزهای هشتم، پانزدهم و

بر حسب میلی‌گرم در لیتر (یا معادل آن میکروگرم در میلی‌لیتر) بدست می‌آید (Idonije *et al.*, 2011). نتایج حاصله با استفاده از برنامه Excel و آنالیز واریانس دو طرفه مقایسه و اختلافات مربوطه در حد  $P=0.05$  محاسبه گردید.

## نتایج

نتایج بدست آمده نشان داد که در روز اول نمونه‌گیری مقدار عامل مکمل بر حسب واحد در میلی‌لیتر در تیمارهای تغذیه شده با ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌لیتر انسانس آویشن شیرازی بترتیب برای  $۲۹۸ \pm ۳۴$ ,  $۲۸۸ \pm ۴۰$ ,  $۳۰۶ \pm ۲۷$ , در روز هشتم برابر  $۴۱۲ \pm ۳۲$ ,  $۴۶۳ \pm ۲۴$ ,  $۴۷۵ \pm ۳۹$ , در روز پانزدهم برابر  $۳۷۱ \pm ۳۳$ ,  $۴۴۶ \pm ۱۸$ ,  $۴۴۶ \pm ۳۴$  و در روز بیست و نهم برابر  $۳۶۷ \pm ۱۸$ ,  $۴۲۲ \pm ۲۵$ ,  $۳۸۱ \pm ۴۰$  می‌باشد. در حالیکه این



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

جدول ۱: میانگین ( $\pm$  انحراف معیار) میزان فعالیت لیزوزیم در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان پس از دریافت غلظت‌های مختلف انسانس آویشن شیرازی

	Minimal Inhibitory Concentration (mg/l)				غلظت انسانس آویشن شیرازی (میلی‌لیتر به ازاء کیلوگرم غذا)
	روز بیست و نهم	روز پانزدهم	روز هشتم	روز اول	
کنترل					
۱۰ میلیگرم در کیلوگرم جیره	$۱/۱ \pm ۰/۱۴$	$۱/۱۵ \pm ۰/۰۹$	$۱/۱ \pm ۰/۱۳$	$۱/۲ \pm ۰/۱۱$	
۲۰ میلیگرم در کیلوگرم جیره	$۱/۰ \pm ۰/۰۹$	$۱/۰ \pm ۰/۲$	$۰/۹۵ \pm ۰/۱۲$	$۱/۱ \pm ۰/۰۹$	
۴۰ میلیگرم در کیلوگرم جیره	$۱/۱ \pm ۰/۰۸$	$۱/۰ \pm ۰/۱$	$۱/۱ \pm ۰/۰۶$	$۱/۱۵ \pm ۰/۱۲$	
	$۱/۱ \pm ۰/۱۱$	$۱/۱۲ \pm ۰/۱۵$	$۰/۹۵ \pm ۰/۱$	$۱/۲ \pm ۰/۰۸$	

عامل مکمل در روزهای اول، هشتم، پانزدهم و بیست و نهم پس از تغذیه با اسانس آویشن شیرازی مورد سنجش قرار گرفت. نتایج حاصل از این اندازه‌گیری نشان داد که میزان فعالیت لیزوژریم سرم در تیمارهای مختلف و برای تمامی روزهای نمونه‌گیری افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروههای شاهد نداشته است.

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

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

## بحث

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

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

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

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

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

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

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

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

## منابع

- سلطانی، م.، ۱۳۸۷. ایمنی‌شناسی ماهیان و سخت‌پوستان. موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. صفحات ۶۳ تا ۸۴.
- سلطانی، م؛ اسفندیاری، م؛ خضرائی نیا، م. س. و سجادی، م.، ۱۳۸۸. ارزیابی اثرات انسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) بر میزان تفریخ تخم قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و درصد بقاء لارو آن در مقایسه با آب اکسیزنه و مالاشیت گرین. مجله تحقیقات دامپزشکی، شماره ۲، صفحات ۱۲۷ تا ۱۳۴.
- شيخزاده، ن؛ سلطانی، م؛ ابراهیم زاده موسوی، ح؛ خسروی، ع؛ باقری، ه؛ فتحی، ع. ا. و زرگر، ا.، ۱۳۸۸. مطالعه اثر انسانس اوکالیپتوس (*Eucalyptus globulus*) بر برخی فاکتورهای ایمنی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). مجله تحقیقات دامپزشکی، شماره ۱، صفحات ۴۷ تا ۵۴.

- Boshra H.; Li J. and Sunyer, J.O., 2006.** Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish & shellfish immunology*, 20:14-20.
- Claire M.; Holland H.; Lambris J.D., 2002.** The complement system in teleost. *Fish & shellfish immunology*, 12:399-420.
- Cray C., Rodriguez, M.; Zaias, J. and Altman, N.A., 2009.** Effects of storage temperature and time on clinical biochemical parameters from Rat serum. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 48:202–204.
- Idonije O.B.; Asika E.C.; Okhiai O.O. and Nweke, I.N., 2011.** Phytochemical, chromatographic and antimicrobial studies of the Ethanolic extract of the stem bark of *Pentaclethramacrophylla* (African Oil Bean Tree). *British Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2:283-289.
- Inglis J.E.; Radziwon K.A. and Maniero G.D., 2008.** The serum complement system: A simplified laboratory exercise to measure the activity of an important component of the immune system. *Advances in Physiology Education*, 32:317-321.
- Ji M.C., Takatoka O., Jeong G.S., Lee S.W., Ishimaru K., Seoka M and Takii K., 2007.** Dietary medicinal herbs improve growth and some non-specific immunity of red sea bream *Pagrus major*. *Fisheries Science* 73:63–69.
- Khosravi A.R.; Shokri H.; Sharifrohani M.; Ebrahimpour Mousavi, H.; Moosavi Z., 2012.** Evaluation of the antifungal activity of *Zataria multiflora*, *Geranium herbarium*, and *Eucalyptus camaldolensis* essential oils on *Saprolegniaparasitica*-infected Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Eggs. *Food borne Pathogens and Disease*, 9:674-679.
- Mahmoodi A., Roomiani L., Soltani M., Akhondzade Basti A., Kamali A., Tehrani S., 2012.** Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils and Extracts from *Rosmarinus officinalis*, *Zataria multiflora*, *Anethum graveolens* and *Eucalyptus globulus*. *Global Veterinaria*, 9:73-79.
- Maleknezhad H., Bazargani- Gilani B., Tukmechi A., Ebrahimi H., 2012.** A cytotoxicity and comparative antibacterial study on the effect of *Zataria multiflora* Boiss, *Trachyspermum copticum* essential oils, and Enrofloxacin on *Aeromonashydrophila*. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 2:188-195
- Matsuyama H.; Tanaka K.; Nakao M.; Yano T., 1988.** Characterization of the alternative complement pathway of carp. *Division Comparative Immunology*, 12:403–408.
- Navarrete, P., Toledo, I., Mardones, P., Opazo, R., Espejo, R., Romero, J., 2010.** Effect of Thymus vulgaris essential oil on intestinal bacterial microbiota of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) and bacterial isolates. *Aquaculture Research*, 41:667-668.
- Sahoo P.K., Kumari J. and Mishra, K., 2005.** Non-specific immune responses in juveniles of Indian major carps. *Applied Ichthyology*, 21:151-155.
- Sakai M., 1999.** Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172:63-92.
- Shailesh S. and Sahoo P.K., 2008.** Lysosome: An important defense molecule of fish innate

- immune system. *Aquaculture Research*, 39:223-239.
- Soltani M.; Sheikhzadeh, N.; Ebrahimzadeh-Mousavi H.A. and Zargar, A., 2010.** Effects of *Zataria multiflora* Essential oil on innate Immune responses of common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of fisheries and aquatic science*, 5. 191-199.
- Yilmaz S.; Ergun S. and SanverCelik E., 2012.** Effects of herbal supplements on growth performance of sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Change in body composition and some blood parameters. *Journal of Bioscience and Biotechnology*, 1:217-222.

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

**Soltani M.<sup>(1)\*</sup>; Zarifmanesh T.<sup>(2)</sup> and Zorriehzahra S.J.<sup>(3)</sup>**

msoltani@ut.ac.ir

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

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

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

Received: August 2012

Accepted: November 2012

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

### **Abstract**

Influence of dietary administration of *Zataria multiflora* Bioss was evaluated on complement component activity and lysozyme of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to determine stimulatory effect of essential oils. Fish weighting  $100\pm10$  g were fed with different doses of 10, 20 and 40 ml/kg food for a period of 10 days. Alternative Complement Activity (CH50%) and serum lysozyme activity were measured on days 1, 8, 15 and 29 after the essential oils administration. The obtained results showed that for first and eighth days of sampling, the complement component mean in treatment groups were significant higher than control group, while negligible difference is shown between treatment groups. For fifteenth and twenty ninth days of sampling, no significant difference was seen in the complement component mean among all examined groups. Also, the results of experiment show that for all of days of sampling, essential oils of *Zataria multiflora* Bioss have no effect on serum lysozyme activity.

---

\*Corresponding author