تغییرات فاگوسیتوز در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) بدنبال استفاده از محرک های ایمنی کوئیل آ (Quil-A) و لوامیزول (Levamisole)

مصطفی اخلاقی و محمد انبارکی مطلق

akhlaghi@shirazu.ac. Ir

بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز،

شیراز صندوق پستی:۱۷۳۱- ۷۱۳۴۵

تاریخ ورود: فروردین ۱۳۸۲ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۸۳

چکیده

در این تحقیق از دو محرک ایمنی کوئیل آ (Quil-A) و لوامیزول (Levamisole) با دو روش غوطه‌ورسازی (کوئیل آ ۴۰ میلی‌گرم/ لیتر، لوامیزول ۵۰ میلی‌گرم/ لیتر) بمدت ۲ دقیقه و روش خوراکی (کوئیـــل آ ۵ و ۱۰ میلی‌گرم، لوامیزول ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم) به مدت ۲۰ روز برای ماهی کپور معمولی به وزن متوسط ۸۰ گرم استفاده شد. بیست روز پس از پایان تجویز محرک‌های ایمنی، مخمر کاندیدا آلبیکنس و باکتری باسیلوس سرئوس کشته شده و رنگ شده بصورت داخل رگی به ماهیها تزریق گردید و بعد از ۲ ساعت میزان فاگوسیتوز توسط لکوسیتهای خونی و فاگوسیت کننده‌های بخش قدامی کلیه پس از رنگ آمیزی به روش گیمسا مطالعه گردید. نتایج بدست آمده نشان داد فاگوسیتوز سلولهای مخمر توسط لکوسیت‌های خون در گروههای ماهیهای غوطه ور سازی شده در ۴۰ میلی‌گرم در میلی لیتر کوئیل آ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر لوامیزول و گروههای ماهیهائی که کوئیل آ به مقدار ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بصورت خوراکی دریافت کرده بودند بطور معنی‌داری افزایش یافته و با فاگوسیتوز گروه کنترل اختلاف داشت، در حالیکه فاگوسیتوز در گروه ماهیانی که بمیزان ۲۰ میلی‌گرم لوامیزول بصورت خوراکی دریافت کرده بودند هیچ اختلاف معنی‌داری را با کنترل نشان ندادند و گروهی که ۴۰ میلی‌گرم لوامیزول بصورت خوراکی دریافت کرده بودند بطور معنی داری فاگوسیتوز کمتری را نسبت به کنترل و سایر گروهها نشان دادند. در مقایسه نتایج بدست آمده از فاگوسیتوز سلولهای باکتری، نتایج مشابهی با فاگوسیتوز سلولهای مخمر بدست آمد. مطالعه فاگوسیتوز در بافت کلیه نیز نشانگر افزایش فعالیت فاگوسیتوز بدنبال استفاده از کوئیلآ و لوامیزول بصورت غوطه‌ورسازی و خوراکی بجز در میزان ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم لوامیزول بود.

لغات کلیدی: محرک‌های ایمنی، کوئیل آ، لوامیزول، فاگوسیتوز، کپور معمولی، *Cyprinus carpio*

مقدمه

باید خاطر نشان ساخت که در تکثیر و پرورش آبزیان پیشگیری یکی از ارکان ضروری و مهم است. از روشهای کارآمد امروزه، بالا بردن مقاومت از طریق تأثیر در سیستم ایمنی بدن ماهی می‌باشد که سعی بر تقویت سیستم ایمنی از طرق مختلف مثل واکسیناسیون و استفاده از مواد تشدیدکننده ایمنی نظیر، کوئیل آ، لوامیزول، گلوکان و غیره است که در سیستم‌های مدرن پرورش ماهی رایج شده است. استفاده از ترکیبات محرک ایمنی پاسخی به حل معضلات ناشی از مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد که دارای امتیاز فعال کردن پاسخ ایمنی اختصاصی و غیراختصاصی است (Fender & Amend, 1978). استفاده از محرک‌های ایمنی بعنوان روشی برای کنترل بیماریها و پرورش ماهی رهیافتی بی‌نظیر است، که البته تحقیقات کمی بر روی این مواد انجام شده است. امروزه تحقیقات بر روی محرک‌های ایمنی در درمان سرطان و ایدز تشدید شده است و توجه محققین دامپزشکی به استفاده از محرک‌های ایمنی برای فعال کردن حفاظت اولیه علیه بیماریها در حیوانات اهلی جلب شده است (Anderson, 1992).

فاگوسیتوز در ایمنی ماهیها نقش اساسی را در مکانیزم سلولی دفاع غیراختصاصی تشکیل می‌دهد (Anderson, 1992 ; Secombes, 1994). ماهیها خیلی بیشتر نسبت به پستانداران به مکانیزم‌های دفاع غیراختصاصی وابسته‌اند. در ماهیهای استخوانی کلیه و طحال مکانهای استقرار آنتی ژن بلع شده بوسیله سلولهای فاگوسیتوزی هستند.

در چند سال گذشته توجه زیادی به محرک‌های ایمنی مانند گلوکان، لیپوپلی ساکارايد، ب ث ژ، ویتامین ها، کیتین، نمک طعام و ترکیبات چهار تائی آمونیم شده است. از جمله این مواد می‌توان لوامیزول (Levamisole) را نام برد که بعنوان یک داروی ضد انگلهای کرمی است و اثر آن بعنوان محرک ایمنی در پستانداران شناخته شده است و نیز کوئیل آ (Quil-A) یک ساپونین گیاهی است که تحقیقات بر روی این ماده کمتر صورت گرفته است ولی در تحقیقات انجام شده به نقش آن بعنوان محرک ایمنی اشاره شده است (Anderson, 1992).

بررسی تغییرات ریزه‌خواری در ماهی کپور معمولی بعد از استفاده از محرکهای ایمنی لوامیزول و کوئیل آ هر کدام در دو میزان مختلف بصورت غوطه ورسازی و خوراکی با استفاده از مخمر کاندیدا آلبیکنس (*Candida albicans*) بعنوان نمونه آنتی ژنی از قارچها با سیلوس سرئوس (*Bacillu cereus*) بعنوان نمونه آنتی ژنی از باکتریها و تزریق داخل رگی آنها به ماهی کپور معمولی هدف این تحقیق بوده است. اثرات محرک‌های ایمنی فوق بر سلولهای فاگوسیت کننده در خون و بافت کلیه بررسی شد تا بتواند محققین و دست اندرکاران آبزی پروری را در استفاده از محرک‌های ایمنی در پیشگیری از بیماریهای ماهی در آینده رهنمون سازد.

مواد و روش کار

۱۷۵عدد ماهی کپور معمولی با وزن متوسط ۸۰ گرم از کارگاه تکثیر و پرورش کپور ماهیان مرودشت تهیه و در کیسه‌های پلاستیکی دو جداره حاوی اکسیژن به آزمایشگاه منتقل شدند. تعداد ۷ تانک هر کدام با حجم ۳۰۰ لیتر برای نگهداری ماهیها در طول آزمایشها مورد استفاده قرار گرفت. به منظور سازگاری با محیط جدید، ماهیها به مدت دو هفته قبل از شروع آزمایشها در این تانک ها در دمای ۲۲ تا ۲۳ درجه سانتیگراد نگهداری و با پلت‌های مخصوص کپور ماهیان، تغذیه شدند. ماهیها در این مدت به لحاظ سلامتی کنترل می‌شدند. هر روز به میزان ۱۰ درصد آب تانک‌ها تعویض می‌گردید و بصورت دائمی هوادهی می‌شد.

ماهیها در ۷ گروه ۲۵ تائی تقسیم شدند. گروههای ۱ و ۲ بترتیب شامل ماهیان دریافت کننده کوئیل آ (Quil-A. Superfos Biosector a/s, Denmark) به میزان ۴۰ میلی‌گرم در لیتر و دریافت کننده لوامیزول (داملران) به میزان ۵۰ میلی‌گرم در لیتر بصورت غوطه ورسازی بودند. گروههای ۳ و ۴ بترتیب شامل ماهیانی بودند که پس از عملیات بیهوشی، ماده محرک کوئیل آ محلول در آب مقطر به ترتیب به میزان ۵ میلی‌گرم و ۱۰ میلی‌گرم بصورت خوراکی از طریق لوله‌گذاری (Intubation) به آنها داده شد. گروههای ۵ و ۶ ماهیان دریافت کننده لوامیزول خوراکی به ترتیب به میزان ۲۰ میلی‌گرم و ۴۰ میلی‌گرم پس از بیهوشی از طریق لوله‌گذاری بودند. گروه کنترل (گروه هفتم) شامل ماهیانی بود که هیچ گونه داروئی دریافت نکردند (جدول ۱).

ماهیهای گروههای ۱ و ۲ را طی یک دوره ۲۰ روزه و هر روز یک بار در یک آکواریوم حاوی ۲۰ لیتر آب حاوی لوامیزول و کوئیل آ به مدت ۲ دقیقه غوطه‌ورسازی کرده و بعد دوباره ماهیها به تانک نگهداری خود بازگردانده می‌شدند. مدت زمان ۲ دقیقه بدلیل کاهش دادن استرس ناشی از غوطه ورسازی انتخاب گردید.

ماهیهای گروههای ۳ و ۴ را در طی یک دوره ۲۰ روزه، ابتدا در یک تانک حاوی ماده بیهوشی ام اس ۲۲۲ (۱ گرم در ۱۰ لیتر) در چند دقیقه بیهوش کرده و سپس توسط لوله‌گذاری با لوله نازک پلاستیکی به قطر ۲ میلی‌متر به ماهیان گروه ۳ یک میلی‌لیتر محلول حاوی ۵ میلی‌گرم ماده کوئیل آ و گروه ۴ یک میلی‌لیتر محلول حاوی ۱۰ میلی‌گرم از طریق مری وارد دستگاه گوارش آنها شد. ماهی‌های گروههای ۵ و ۶ را در طی دوره ۲۰ روزه ابتدا در تانک حاوی ماده بیهوشی در طی چند دقیقه بیهوش نموده و روزانه توسط لوله گذاری ۱ میلی‌لیتر محلول حاوی ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم به ترتیب به ماهیان گروه ۵ و گروه ۶ تجویز گردید. انتخاب دوره ۲۰ روزه استفاده از کوئیل آ و لوامیزول بدلیل پاسخ ایمنی غیر اختصاصی چشمگیر ماهی کپور معمولی در آزمایشهای اولیه بود.

۲۰ روز پس از پایان دوره غوطه‌ورسازی و خورانیدن محرک‌های ایمنی کوئیل آ و لوامیزول، هر کدام از گروهها را به دو گروه ۱۰ تایی ماهی تقسیم کرده و به یک گروه ۱۰ تایی از آنها هر کدام ۰/۱ میلی‌لیتر محلول آماده شده مخمر، که حاوی $۱۰^{۶} \times ۱$ سلول مخمری باشد و به گروه ۱۰ تایی دیگر

۱/۴ میلی‌لیتر از محلول آماده شده باکتری، که حاوی ۱×۱۰^{۶} سلول باکتری باسیلوس سرئوس بود، از طریق سیاهرگ دمی بوسیله سرنگ انسولین به تمامی ماهیها در گروههای مختلف تزریق گردید.

۵ عدد ماهی از هر گروه اصلی که از شروع آزمایش تلف و یا ضعیف بنظر می‌رسیدند حذف شدند. بدین ترتیب هر گروه آزمایشی در زمان نمونه برداری شامل ۲۰ عدد ماهی بود.

جدول ۱: گروههای مختلف ماهی که ۲۰ روز پس از دریافت ماده‌های محرک ایمنی در دو زیر گروه توسط مخمر (ک) و باسیل (ب) تزریق گردیدند

گروهها	زیر گروهها	روش استفاده از محرک ایمنی، مقدار و نوع مخمر یا باسیل تزریقی
۱	۱-ک	دریافت کننده کوئیل آ بصورت غوطه ورسازی (۴۰ mg/L) و تزریق شده با مخمر کاندیدا آلبیکنس
	۱- ب	دریافت کننده کوئیل آ بصورت غوطه‌ورسازی(۴۰ mg/L)و تزریق شده با باکتری باسیلوس سرئوس
۲	۲- ک	دریافت کننده لوامیزول بصورت غوطه ورسازی(۵۰ mg/L) و تزریق شده با مخمر کاندیدا آلبیکنس
	۲ – ب	دریافت کننده لوامیزول بصورت غوطه ورسازی(۵۰ mg/L) و تزریق شده با باکتری باسیلوس سرئوس
۳	۳ – ک	دریافت کننده کوئیل آ بصورت خوراکی (۵ میلی‌گرم) و تزریق شده با مخمر کاندیدا آلبیکنس
	۳ –ب	دریافت کننده کوئیل آ بصورت خوراکی(۵ میلی‌گرم) و تزریق شده با باکتری باسیلوس سرئوس
۴	۴- ک	دریافت کننده کوئیل آ بصورت خوراکی(۱۰ میلی‌گرم) و تزریق شده با مخمر کاندیدا آلبیکنس
	۴- ب	دریافت کننده کوئیل آ بصورت خوراکی(۱۰ میلی‌گرم) و تزریق شده با باکتری باسیلوس سرئوس
۵	۵ – ک	دریافت کننده لوامیزول بصورت خوراکی(۲۰ میلی‌گرم) و تزریق شده با مخمر کاندیدا آلبیکنس
	۵ – ب	دریافت کننده لوامیزول بصورت خوراکی(۲۰ میلی‌گرم) و تزریق شده با باکتری باسیلوس سرئوس
۶	۶ – ک	دریافت کننده لوامیزول بصورت خوراکی(۴۰ میلی‌گرم) و تزریق شده با مخمر کاندیدا آلبیکنس
	۶ – ب	دریافت کننده لوامیزول بصورت خوراکی(۴۰ میلی‌گرم) و تزریق شده با باکتری باسیلوس سرئوس
کنترل	کنترل ـ ک	هیچ دارویی دریافت ننمودند و تزریق شده با مخمر کاندیدا آلبیکنس
	کنترل ـ ب	هیچ دارویی دریافت ننمودند و تزریق شده با باکتری باسیلوس سرئوس

پس از گذشت ۲ ساعت از تزریق مخمر و باکتری به ماهیها، از همان گروهی که ابتدا با مخمر و باکتری تزریق شده بودند شروع به خونگیری شد، پس از خونگیری از هر ماهی و کشتن آنها توسط قیچی و تیغ جراحی استریل سطح بدن ماهی برش داده شد و توسط پنس و قیچی بخش قدامی کلیه ماهیها بطور جداگانه برداشته شده و درون پلیتی حاوی ۳ تا ۴ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی که برای هر گروه جداگانه در نظر گرفته شده بود گذاشته شد.

لام‌های آماده شده از خون و بافت کلیه توسط الکل متیلیک به مدت ۵ دقیقه ثابت گردیده و سپس به مدت ۲۰ دقیقه با رنگ گیمسا رنگ شدند. پس از رنگ آمیزی لام های خونی ماهیان، با بزرگنمایی ۱۰۰ میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند، بدین طریق که در چندین زمینه میکروسکوپی تعداد ۱۰۰ لکوسیت خونی شناسایی شده و میزان فاگوسیتوز در آنها بررسی و یادداشت گردید. سلولهای

خونی شامل هتروفیل، منوسیت، بازوفیل و ائوزینوفیل و سلولهای بافت کلیه شامل ماکروفاژها، سلولهای پرونفروز (Pronephros) و لکوسیت‌ها (Leuckocytes) بودند و میزان فاگوسیتوز در آنها بررسی و نتایج یادداشت گردید.

سلولهای فاگوسیت کننده که عمل فاگوسیتوز را انجام داده بودند شمارش شدند و نیز تعداد مخمر یا باسیلی که بلع شده بود شمارش گردید. در نتیجه میانگین درصد فاگوسیتوز در سلولهای فاگوسیت کننده محاسبه شد. در گسترش‌های تهیه شده از بافت کلیه نیز تعداد ۱۰۰ سلول فاگوسیت کننده بافتی شامل ماکروفاژها و سلولهای پرونفروز کلیوی شناسایی گردیده و به روش فوق درصد فاگوسیتوز و میانگین در صد مخمر یا باسیل فاگوسیت شده توسط هر سلول فاگوسیت کننده محاسبه گردید. برای بررسی و تجزیه و تحلیل آماری بین گروهها از برنامه SPSS و از آزمونهای آماری Independent T test, Paired T- test و با در نظر گرفتن ($P < ۰/۰۵$)، اختلاف معنی‌دار بین گروهها مشخص گردید.

نتایج

نتایج حاصله از این تحقیق بصورت متوسط میانگین و میانگین در صد فاگوسیتوز محاسبه شده که به تفکیک در جداول ۲ و ۳ نشان داده شده است.

جدول ۲: میانگین تعداد و درصد فاگوسیتوز لکوسیت های خونی در زیر گروههای مختلف تزریق شده بامخمرکاندیدا آلبیکنس و باکتری باسیلوس سرئوس در گسترش های خونی

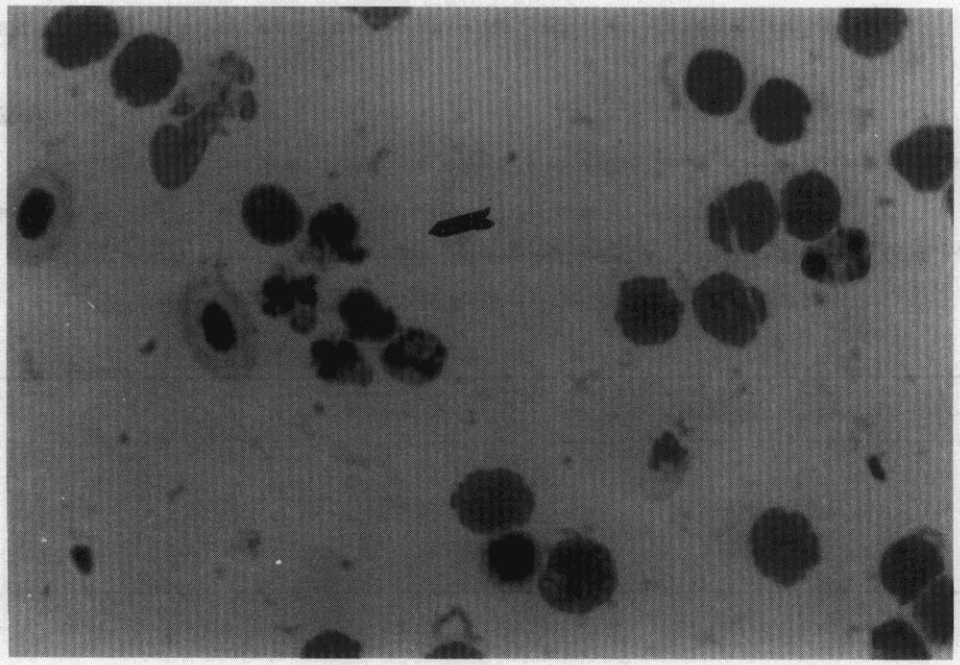
زیر گروهها	متوسط میانگین تعداد مخمر فاگوسیت شده توسط هر سلول فاگوسیت کننده ± انحراف معیار	میانگین درصد فاگوسیتوز در زیر گروههای مختلف ± انحراف معیار	زیر گروهها	متوسط میانگین تعداد باسیل فاگوسیت شده توسط هر سلول فاگوسیت کننده ± انحراف معیار	میانگین درصد فاگوسیتوز در زیر گروههای مختلف ± انحراف معیار
۱ - ک*	۳/۳ ± ۰/۳	$۹۳/۱^{a}$ ± ۴	۱ - ب*	۲/۱ ± ۰/۲	$۸۱/۶^{a}$ ± ۴
۲ ک	۱/۹ ± ۰/۲	$۸۳/۲^{b}$ ± ۲/۶	۲ - ب	۱/۴ ± ۰/۲	۷۹^{a} ± ۳/۵
۳ ک	۳/۲ ± ۰/۴	$۹۵/۲^{a}$ ± ۴/۶	۳ - ب	۱/۸ ± ۰/۲	$۸۷/۸^{a}$ ±۲/۳
۴ ک	۲/۵ ± ۰/۲	۹۵^{a} ± ۳/۴	۴ - ب	۱/۹ ± ۰/۰۹	$۸۵/۸^{a}$ ±۳/۵
۵ ک	۱/۳ ± ۰/۱	۶۸^{b} ± ۵/۴	۵ - ب	۱/۷ ± ۰/۱	$۶۵/۵^{b}$ ±۱۰/۲
۶ ک	۱/۴ ± ۰/۲	$۵۰/۶^{c}$ ± ۵/۷	۶ - ب	۱/۱ ± ۰/۲	$۴۵/۶^{c}$ ± ۳/۴
کنترل - ک	۱/۵ ± ۰/۲	$۶۷/۱^{b}$ ± ۵/۹	کنترل - ب	۱/۶ ± ۰/۳	$۶۱/۳^{b}$ ± ۶

***ک مخفف کاندیدا و ب مخفف باسیلوس می‌باشد. حروف مشابه اختلاف معنی داری ندارند.**

بررسی میانگین درصد فاگوسیتوز در زیر گروههای تزریق شده با مخمر کاندیدا آلبیکنس که در جدول ۲ آمده است نشان می دهد که اختلاف معنی‌داری بین تمام گروهها با کنترل بجز گروه لوامیزول خوراکی ۲۰ میلی‌گرم با گروه کنترل وجود دارد ($P<.۰/۰۵$). بین زیر گروه کوئیلآ غوطه‌ورسازی با زیر گروه کوئیل آ خوراکی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. زیر گروه لوامیزول خوراکی ۲۰ میلی‌گرم و زیر گروه لوامیزول خوراکی ۴۰ میلی‌گرم اختلاف معنی‌داری را نشان دادند.

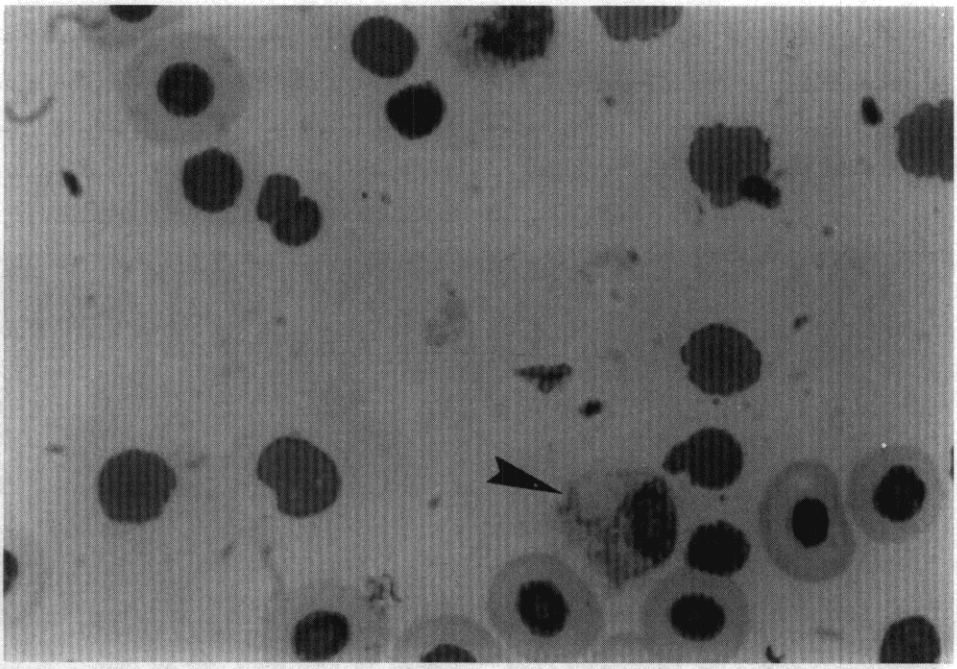
خوراکی ۲۰ میلی‌گرم و زیر گروه لوامیزول خوراکی ۴۰ میلی‌گرم اختلاف معنی‌داری را نشان دادند. اما بین زیر گروه کوئیل آ غوطه‌ورسازی با لوامیزول غوطه ورسازی اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید.

بررسی مقایسه‌ای میانگین درصد فاگوسیتوز در زیر گروههای مختلف تزریق شده با باکتری باسیلوس سرئوس با زیر گروه کنترل نشان داد بین زیر گروههای کوئیل‌آ غوطه‌ورسازی، لوامیزول غوطه‌ورسازی، کوئیل‌آ خوراکی ۵ میلی‌گرم، کوئیل‌آ خوراکی ۱۰ و لوامیزول خوراکی ۴۰ میلی‌گرم با زیر گروه کنترل اختلاف آماری معنی‌داری وجود دارد. اما بین زیر گروه لوامیزول خوراکی ۲۰ میلی‌گرم با زیر گروه کنترل اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۲). شکلهای ۱، ۲ و ۳ نحوه فاگوسیتوز سلولهای مخمر و باکتری را در خون و بافت کلیه نشان می‌دهند.



شکل ۱: چند لکوسیت خونی که سلولهای مخمر کاندیدا آلبیکنس را فاگوسیت کرده‌اند (پیکان) (رنگ آمیزی گیمسا x ۱۰۰۰)

بین زیر گروه کوئیل آ خوراکی ۵ میلی‌گرم با زیر گروههای لوامیزول خوراکی ۲۰ میلی‌گرم و لوامیزول خوراکی ۴۰ میلی‌گرم اختلاف معنی‌داری مشاهده شده ولی با زیر گروه کوئیل آ خوراکی۱۰ میلی‌گرم اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید. زیر گروه کوئیل‌آ خوراکی ۱۰ میلی‌گرم با لوامیزول خوراکی ۲۰ میلی‌گرم و زیر گروه لوامیزول خوراکی ۴۰ میلی‌گرم اختلاف آماری معنی‌داری را نشان دادند.



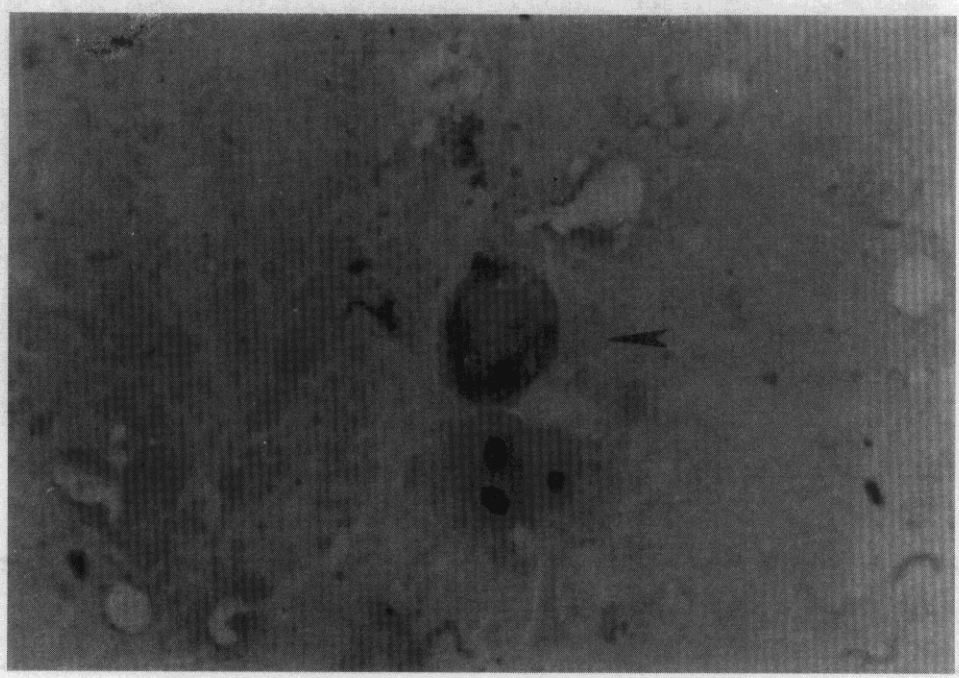
شکل ۲: یک هتروفیل باند در خون، ۴ باکتری باسیلوس سرئوس را فاگوسیت کرده است (پیکان) (رنگ آمیزی گیمسا X ۱۰۰۰)

جدول۳: درصد فاگوسیتوز و میانگین تعداد مخمر و باسیل فاگوسیت شده، در سلولهای بافتی بخش قدامی کلیه در زیر گروههای مختلف تزریق شده با سلولهای مخمر کاندیدا آلبیکنس و باسیلوس سرئوس

زیر گروهها	میانگین تعداد مخمر فاگوسیت شده توسط هر سلول فاگوسیت کننده± انحراف معیار	درصد فاگوسیتوز در سلولهای فاگوسیت کننده بافتی± انحراف معیار	زیر گروهها	میانگین تعداد باسیل فاگوسیت شده توسط هر سلول فاگوسیت کننده± انحراف معیار	درصد فاگوسیتوز در سلولهای فاگوسیت کننده بافتی± انحراف معیار
۱- ک*	۲/۲ ±۰/۲	۴۹^{a} ±۲/۲۵	۱ - ب*	۱/۷ ±۰/۱	۴۶^{a} ±۳/۲
۲ - ک	۱/۸ ±۰/۱۸	۴۶^{a} ±۱/۷	۲ - ب	۱/۵ ±۰/۰۸	۴۳^{a} ±۶/۷
۳ -ک	۲/۳ ±۰/۱۷	۵۳^{a} ±۴	۳ -ب	۱/۸ ±۰/۱۲	۵۷^{a} ±۴/۳
۴ -ک	۲/۱ ±۰/۱۲	۵۹^{a} ±۴/۲	۴ -ب	۱/۶ ±۰/۱	۵۲^{a} ±۲/۰۶
۵ -ک	۱/۴ ±۰/۱	۴۱^{a} ±۱/۸	۵ -ب	۱/۴ ±۰/۱۵	۴۲^{a} ±۳/۱
۶ -ک	۱/۲ ±۰/۱۱	۱۳^{b} ±۱/۷	۶ -ب	۱/۱ ±۰/۱	۱۴^{b} ±۲/۵
کنترل ـ ک	۱/۳ ±۰/۱۱	۲۹^{c} ± ۲	کنترل ـ ب	۱/۳ ±۰/۱۱	۳۲^{c} ±۳

*ک مخفف کاندیدا و ب مخفف باسیلوس می باشد. حروف مشابه اختلاف معنی داری ندارند.

نتایج بدست آمده از فاگوسیتوز سلولهای بافتی بخش قدامی کلیه در زیر گروههای تزریق شده با مخمر و باسیل نشان می دهد گروههای کوئیل آ و لوامیزول غوطه‌ور سازی همچنین گروههای خوراکی کوئیل آ و لوامیزول خوراکی بمیزان ۲۰ میلی‌گرم بطور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل، سلولهای فاگوسیتوز کننده را تحریک نموده‌اند. لوامیزول خوراکی بمیزان ۴۰ میلی‌گرم نتوانسته است تحریک ایمنی را نسبت به گروه کنترل افزایش دهد بلکه بطور معنی‌داری کاهش داده است.



شکل ۳: یک ماکروفاژ بافت کلیه که یک مخمر را فاگوسیت کرده است (پیکان)
(رنگ آمیزی گیمسا x ۱۰۰۰)

بحث

میانگین درصد فاگوسیتوز در گروه ماهیهای دریافت کننده کوئیل آ بصورت خوراکی با مقدار پائین چه در زیر گروهی که مخمر تزریق شده و چه در زیر گروهی که باسیل به آنها تزریق شده، از سایر گروهها بیشتر بوده است و اختلاف آماری معنی داری نیز با گروه کنترل نشان داد. کوئیل آ یک ساپونین (Saponin) و عصاره گیاهی است که توسط گرایسون (Grayson) جهت افزایش تصفیه باکتری یرسینیا روکری (*Yersinia rukeri*) بصورت حمام به ماهیها تجویز شد (Anderson, 1992). در پرورش ماهی استفاده از کوئیل آ به تنهایی، سبب افزایش مکانیزمهای دفاعی غیراختصاصی می‌گردد و اگر همراه واکسن بکار رود، افزایش پاسخ دفاع اختصاصی ماهی را نیز به همراه خواهد داشت تحقیقات نشان داده که این شیره گیاهی اتصالات بین سلولی را سست کرده که سبب سرعت و تسهیل جذب

آنتی ژن می‌گردد (Maharaj *et al*., 1986). این ماده نیز بعنوان یک آدجوانت (Adjuvant) برای شدت بخشیدن به جذب گاماگلوبولین انسانی(Human gamma globulin) از دیواره روده در ماهی تیلاپیا بکار رفته است بطوری که کمپلکس‌های محرک ایمنی (Immunostimulant) و میسل‌ها (Micells) بوسیله تکانهای شدید سانتریفوژ ساخته شده، این میسل ها اطراف گاماگلوبولین‌ها را احاطه کرده و سبب جذب آنها می‌شوند، بعد از تجویز خوراکی، پس از ۶ ساعت، سبب حداکثر غلظت آنتی ژن در بافتهای روده می‌شود (Jenkins & Harris, 1991). نتایجی که از گروههای دریافت کننده کوئیل آ بدست آمده نشان می‌دهد که میانگین درصد فاگوسیتوز در گروه دریافت کننده کوئیل آ خوراکی با مقدار کمتر (۵ میلی‌گرم) نسبت به گروه دریافت کننده کوئیلآ خوراکی با مقدار بالاتر (۱۰ میلی‌گرم) بیشتر بوده است، اما این دو گروه از نظر آماری با در نظر گرفتن ($P< ۰/۰۵$)، اختلاف معنی‌داری نشان ندادند. در گروه دریافت کننده کوئیلآ بصورت خوراکی نسبت به گروه دریافت کننده لوامیزول بصورت غوطه‌ورسازی (۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) افزایش درصد فاگوسیتوز سلولهای مخمر بچشم می‌خورد که این افزایش از نظر آماری با در نظرگرفتن($P <۰/۰۵$) معنی‌دار بوده است. این اختلاف می‌تواند بدلیل بزرگتر بودن سلولهای مخمر در مقایسه با باسیل و تحریک‌پذیری کمتر لکوسیت‌ها ناشی از محرک ایمنی لوامیزول باشد. این نتایج با گزارش منتشر شده توسط اخلاقی (۱۳۷۹) مطابقت دارد.

ماهیهای ایمن شده توسط محرک ایمنی لوامیزول و تزریق شده با مخمر کاندیدا آلبیکنس دارای میانگین درصد فاگوسیتوز در تمام زیر گروهها بجز زیر گروه دریافت کننده دوز بالای لوامیزول خوراکی در مقایسه با کنترل بودند. در زیر گروههای تزریق شده با باکتری باسیلوس سرئوس نیز همان افزایش میانگین درصد فاگوسیتوز در تمام زیرگروهها بجز زیر گروه دریافت کننده لوامیزول با دوز بالای خوراکی بچشم می‌خورد. در این مطالعه دوز بالای لوامیزول خوراکی ۴۰ میلی‌گرم، در ماهی کپور معمولی سبب سرکوب ایمنی و کاهش فاگوسیتوزشده که این نتیجه بدست آمده با نتایج (Siwicki & Anderson,1990) مطابقت دارد.

بیشترین مطالعات انجام شده درخصوص تعیین مقدار محرک ایمنی لوامیزول در محیط کشت سلولی (*In vitro*) انجام گرفته است. این تحقیق لوامیزول را روی ماهی (*In vivo*) و همچنین استفاده از مدت زمان ۲ دقیقه غوطه‌ورسازی مورد آزمایش قرار داده است که اهمیت آن به لحاظ به حداقل رساندن استرس ناشی از روش بکار گرفته می‌باشد. کاهش فاگوسیتوز بدلیل سرکوب ایمنی در گروه دریافت کننده دوز بالای خوراکی لوامیزول حتی در سلولهای فاگوسیت کننده بخش قدامی کلیه چه در زیر گروه تزریقی با مخمر و چه زیر گروه تزریقی با باسیل بچشم می‌خورد. میزان ۲۰ میلی‌گرم لوامیزول خوراکی نتوانست تغییر معنی‌داری را در فاگوسیتوز سلولهای خون و بافت کلیه ایجاد نماید که ممکن است بدلیل شروع اثر سرکوب ایمنی در این میزان باشد.

لوامیزول با مقدار ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر بمدت ۲ ساعت فعالیت اکسیداتیو نوتروفیلها و میزان فاگوسیتوز را در ماهی آزاد آتلانتیک (Findlay & Munday, 2000) و در ماهی کپور معمولی

(Siwicki, 1990) افزایش می‌دهد. همچنین در آزمایشگاه وقتی که سوسپانسیون سلولی ماهی کپور را در معرض لوامیزول قرار دادند میزان تکثیر لنفوسیت‌ها افزایش یافته است. لوامیزول به همراه واکسن سبب افزایش حفاظت علیه آنتی ژنهای بیگانه و افزایش فعالیت باکتری کشی، فعالیت کمپلمانها، فعالیت فاگوسیتی و افزایش سلولهای Natural Killer Cells می‌شود. تجویز هم زمان بصورت حمام محرک ایمنی لوامیزول و واکسن، نسبت به تجویز تنهایی حمام لوامیزول نتیجه بهتری نشان داده است (Anderson, 1992). اثر تحریک ایمنی غیر اختصاصی لوامیزول به تنهائی در مطالعه حاضر بخوبی نشان داده شده است. درصد فاگوسیتوز در گروه دریافت کننده لوامیزول بصورت غوطه‌ورسازی و نیز میانگین تعداد مخمر یا باکتری فاگوسیت شده در این گروه نسبت به دیگر گروههای دریافت کننده لوامیزول خوراکی بیشتر بوده و با در نظر گرفتن ($P < ۰/۰۵$)، افزایش معنی‌داری را با دو گروه دریافت کننده لوامیزول خوراکی نشان می‌دهد که نشان دهنده اثر تحریک‌کنندگی زیاد این مقدار از لوامیزول بصورت غوطه‌ورسازی در مدت کوتاه ۲ دقیقه‌ای روی عمل فاگوسیتوز در ماهی کپور معمولی نسبت به دزهای خوراکی استفاده شده می‌باشد.

لوامیزول یک ایزومر ـ لووتترامیزول (Levo-isomer of tetramisole) است. این ماده بعنوان دارویی است که برای درمان انگلهای کرمی در حیوانات نشخوار کننده به ثبت رسیده و بطور وسیع مورد استفاده قرار می‌گیرد. این ماده بعنوان یک محرک ایمنی در ماهی سبب تحریک و تفریق لنفوسیت‌های T و نیز تغییر در فعالیت فاگوسیتی شده و سبب افزایش قدرت ایمنی می‌گردد (Blaster,1992).

لوامیزول بدلیل خاصیت، ضد قارچی، ضد انگلی و نیز خاصیت محرک ایمنی و نداشتن هیچ تداخل دارویی با دیگر داروها، مورد توجه می‌باشد. بنظر می‌رسد که لوامیزول بعنوان آدجوانتی که با فعالیت دیگر داروها، در اهداف مختلف آنها، مداخله نمی‌کند شناخته شده است لیکن یکی از مشکلات استفاده از لوامیزول در محیط پرورش ماهی تعیین دوز دقیق آن است زیرا که اثرات این دارو به دوز آن بستگی دارد (Anderson, 1992). همچنین درمان لوامیزول در کپور سبب تحریک رشد و کاهش مرگ و میر آن شده است (Siwicki & Korwin, 1988).

بطور کلی این تحقیق نشان دهنده اثر تحریک ایمنی غیر اختصاصی و افزایش فاگوسیتوز توسط کوئیلآ و لوامیزول با مقادیر کم مورد استفاده بصورت غوطه ورسازی و خوراکی شده است. مدت زمان غوطه‌ورسازی به ۲ دقیقه کاهش یافت و نتایج حاصل شده قابل مقایسه با نتایج قبلی بدست آمده از غوطه‌ورسازی بیشتر از یکساعت تا طولانی مدت بود. از آنجا که محرک‌های ایمنی می‌توانند نقش مهمی را در دفاع غیر اختصاصی ماهی‌ها بعهده داشته باشند و این امر می‌تواند در پیشگیری از بیماریهای عفونی احتمالی نقش اساسی را ایفا نماید. نتایج این تحقیق توجه آبزی‌پروران و دست اندرکاران در این زمینه را به استفاده از این محرک‌های ایمنی و همچنین معرفی داروهای جدیدی که نقش تحریک ایمنی از خود نشان می‌دهند جلب می‌نماید.

تشکر و قدردانی

از همکاری مرکز تکثیر و پرورش ماهیهای گرمابی مرودشت تشکر می‌گردد. از خانم محترم کشاورزی که در آزمایشگاه کمکهای فراوانی نمودند و کارکنان آزمایشگاه کلینکال پاتولوژی و مرکزی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز قدردانی می‌گردد.

منابع

اخلاقی، م. ، ۱۳۷۹. اثر مواد محرک ایمنی کوئیلآ و لوامیزول بر ایمنی غیراختصاصی ماهی کپور معمولی به روش ارزیابی ریزه خواری گلبولهای سفید. خلاصه مقالات اولین همایش بهداشت و بیماریهای آبزیان ایران، اهواز، صفحه ۱۴.

Anderson, D.P. , 1992. Immunostimulants, adjuvants and vaccine carriers in fish: application to aquaculture. Ann. Review of Fish Dis. Vol. 2, pp.281-307.

Blaster, V.S. , 1992. Nutrition and disease in fish. Ann. review of fish dis. Vol. 2, pp.309-323.

Fender, D.C. and Amend, D.F. , 1978. Hyperosmotic infiltration: factors influencing uptake of bovine serum albumin by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Journal of Fish Res. Board Can. Vol. 35, pp.871-874.

Findlay, V.L. and Munday, B.L. , 2000. The Immuno-modulatory effects of levamisole on the non- specific Immune system of Atlantic salmen (*Salmo salar*) Journal of Fish Dis. Vol. 23, pp.369-378.

Jenkins, P.G. and Harris, J.E. , 1991. Enhanced enteric uptake of human gamma globulin by Quil-A saponin in *Orechromic mossabmicus*. Fish & Shellfish Immunol. Vol. 1, pp.279-295.

Maharaj, I. ; Froh, K.J. Campbell, J.B. , 1986. Immune responses of mice to inactivated rabies vaccine administred orally. Potentiation by *Quillaja saponin*. Canadian journal of Microbiol. Vol. 32, pp.414-420.

Secombes, G.J. , 1994. Enhancement of fish phagocyte activity. Fish & Shellfish Immunol. Vol. 4, pp.421-436.

Siwicki, A.K. , 1990. Effect of levamisole on lymphocyte and macrophage activity in carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Veterinary Science. Vol. 21, pp.95-100.

Siwicki, A.K. and Anderson, D.P. , 1990. In *vitro* Immuno stimulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spleen cells with levamisole. Dev. Comp. Immunol. Vol. 14, pp. 231-237.

Siwicki, A.K. and Korwin, M. , 1988. The influence of levamisole on the growth of carp (*Cyprinus carpio*) Larvae. Journal of Fish Biol. Vol. 4, pp.178-181.

Phagocytic changes in common carp (*Cyprinus carpio*) following administration of immunostimulants Quil-A and Levamisole

Akhlaghi M. and Anbaraki Motlagh M.

akhlaghi@shirazu.ac.ir

Aquatic Animal Health Unit, School of Veterinary Medicine, Shiraz, Iran

Received: March 2003 Accepted: May 2004

Keywords: Immunostimulants, Quil-A, Levamisole, Phagocytosis, Common carp

Abstract

In this research Quil-A and levamisole as immunostimulants were used both by immersion route (Quil-A, 40 mg/L and levamisole, 50 mg/L) and oral route (Quil-A 5, 10 mg and levamisole 20, 40mg) in common carp (*Cyprinus carpio*)(mean weight ~80g) daily for 20 days. After twenty days of treatment with immunostimulants, stained heat killed *Candida albicans* and *Bacillus cereus* were injected intravenously via caudal vein. Two hours after injection, blood and kidney tissue samples were collected. Phagocytosis rate of blood and kidney smears were studied using Gimsa staining. Results showed that phagocytosis of *Candida albicans* cells by blood leukocytes in immersion groups into 40mg/L and 50 mg/L levamisole and orally used 5 and 10 mg Quil-A groups were significantly increased in comparison with the control group. While fish given 20 mg levamisole orally did not show a significant difference with control group and phagocytosis in 40mg levamisole by oral administration was suppressed as showed significant difference with control and other groups. Phagocytosis of *Bacillus cereus* cells showed similar results to the *Candida albicans* cells. Phagocytosis rate in kidney tissue was also stimulated in all groups except for 20 and 40mg levamisole groups presumably due to immunosuppressive effect of high levamisole rate.