مجله علمی شیلات ایران ۳۰(٤) ۹۵-۱۰۵ (DOI): 10.22092/ISFJ.2021.125190
(DOR): 20.1001.1.10261354.1400.30.4.8.9

مقاله علمی – پژوهشی:

مطالعه اثر تروگزروتین خوراکی بر مقاومت در برابر انگل *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* (*Ichthyophthirius multifilis*) در ماهی‌قرمز (*Carassius auratus*)

شلاله موسوی*[۱]، نجمه شیخ‌زاده[۱]، امین مرندی[۲]

shalaleh.mousavi@tabrizu.ac.ir*

۱- گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
۲- گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱٤۰۰ تاریخ پذیرش: شهریور ۱٤۰۰

چکیده

تروگزروتین با فرمول شیمیایی $C_{33}H_{42}O_{19}$ که به عنوان ویتامین P_4 شناخته می‌شود، یک مشتق تری‌هیدروکسی اتیله شده از بیوفلاونوئید طبیعی روتین (Rutin) است. اثرات مثبت تروگزروتین در بهبود عملکرد رشد، شاخص‌های فیزیولوژیک و ایمنی در مطالعات گذشته مشخص شده است. این مطالعه نیز به منظور ارزیابی اثر تروگزروتین بر مقاومت در برابر انگل خارجی *Ichthyophthirius multifilis* در ماهی قرمز انجام گرفت. بدین منظور، ماهی‌ها با میانگین وزن اولیه ۰/۰۸±۲/۷۴ گرم در ۸ تانک شیشه‌ای و چهار گروه آزمایشی شامل یک گروه کنترل و سه گروه تیمار توزیع شدند. در دوره آزمایشی، ماهی‌ها با جیره‌های حاوی ۰، ۰/۱، ۰/۳ و ۰/۵گرم افزودنی تروگزروتین به ازاء هر کیلوگرم جیره، به مدت ۸۰ روز تغذیه شدند. در پایان دوره، ماهی‌ها در معرض تعداد ۴۰۰۰ ترونت ایک به ازای هر ماهی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که علائم مختلف، از جمله پرخونی و زخم باله‌ها، در گروه شاهد در مقایسه با گروه‌های تیمار برجسته است. تعداد کل تروفونت‌های انگل نیز در ماهیان تیمار شده با مقادیر ۰/۳ و ۰/۵ گرم در کیلوگرم تروگزروتین در مقایسه با ماهی‌های گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<0/05$). نتایج مطالعه حاضر نشان‌دهنده تأثیر مثبت تروگزروتین خوراکی بر مقاومت در برابر انگل خارجی *I. multifiliis* در ماهی قرمز است.

لغات کلیدی: تروگزروتین، ماهی قرمز، انگل، *Ichthyophthirius multifilis*

*نویسنده مسئول

مقدمه

پرورش ماهیان زینتی همواره از دیرباز مورد توجه و استقبال علاقه مندان آبزیان بوده است. امروزه گسترش و سود آوری صنعت آبزی‌پروری در حوزه ماهیان زینتی، مستلزم سرمایه‌گذاری، توجه و تمرکز بیشتری بر مطالعات علمی و تحقیقاتی است (Sheikhzadeh and Marandi, 2021). *Ichthyophthirius multifilis* ، به عنوان عامل بیماری لکه سفید، انگل بیماری‌زای مژه‌داری است که انتشاری جهانی دارد و تهدیدی جدی برای بسیاری از ماهیان آب شیرین و آکواریومی به‌شمار می‌رود. آلودگی با این انگل، می‌تواند باعث ایکتیوفتیریازیس شود و ضررهای اقتصادی قابل توجهی را به صنعت آبزی‌پروری تحمیل کند به‌طوری‌که انگل ایک پتانسیل نابودی تمامی ماهیان یک مزرعه را نیز داراست (Buchmann *et al.*, 2001). این انگل باعث سوراخ شدن پوست و از بین رفتن سلول‌های پوششی سطح بدن می‌شود و در صورت آلودگی آبشش، ماهی دچار اختلالات تنفسی می‌گردد. ماهی‌های آلوده، بدن خود را به اشیاء موجود در آکواریوم، دیوارۀ استخرها و صخره‌های رودخانه‌ها تماس می‌دهند و در نتیجه، زمینه را برای بروز عفونت‌های ثانویه فراهم می‌کنند. چرخه زندگی انگل شامل مراحل تروفونت (انگلی)، تومونت (تولیدمثلی) و ترونت (عفونت‌زا) می‌باشد (Moyses *et al.*, 2015). ماهی قرمز به عنوان یکی از میزبان‌های ایک مطرح است و می‌تواند به‌راحتی با این انگل درگیر شود (Mousavi *et al.*, 2009; Iqbal and Hussain, 2013; Moyses *et al.*, 2015). در حال حاضر، درمان‌ها علیه انگل ایک به حمام‌های شیمیایی محدود می‌شوند، ولی بروز مقاومت‌های دارویی گسترده در برخی بیماری‌ها، به یکی از چالش‌های جدی در این صنعت تبدیل شده است به‌طوری‌که در برخی موارد، مقاومت‌های دارویی ایجاد شده، توجیه استفاده از داروها در آبزیان را به حداقل می‌رساند و ملزم استفاده از ترکیبات مناسب جهت پیشگیری از بیماری‌ها می‌گردد (سلطانی، ۱۳۸۷).

در سالیان اخیر، با توجه به اهمیت بالای حفاظت از محیط زیست و استفاده از مواد فاقد باقی‌ماندگی در محیط زیست، کاربرد مواد محرک ایمنی گیاهی در آبزی‌پروری رو به افزایش بوده است (Ardo *et al.*, 2008؛ پورغلام و همکاران، ۱۳۹۲؛ عادل و همکاران، ۱۳۹۴؛ لطفی و همکاران، ۱۳۹۹). مواد محرک ایمنی، گروه نسبتاً وسیعی از ترکیبات با منشاء طبیعی یا سنتتیک را در بر می‌گیرند که با تحریک سیستم ایمنی غیراختصاصی ماهیان از طریق مکانیسم‌های مختلف، سبب افزایش مقاومت آنها در برابر عوامل عفونی می‌گردند (Harikrishnan *et al.*, 2011). یکی از این مواد محرک ایمنی، ترکیبی به نام تروگزروتین با فرمول شیمیایی $C_{33}H_{42}O_{19}$ است که به عنوان ویتامین P_4 نیز شناخته می‌شود. در واقع، این ترکیب، یک مشتق تری‌هیدروکسی اتیله شده از ترکیب روتین است (Fan *et al.*, 2009). بر اساس مطالعات اپیدمیولوژیک صورت گرفته در سال‌های گذشته، مصرف ترکیبات حاوی فلاونوئید نظیر تروگزروتین، توانسته است اثرات قابل توجهی را در بهبود کارایی بخش‌های مختلف بدن بر جای گذارد که از آن جمله می‌توان به بهبود چاقی مرتبط به دیابت، بهبود سیستم قلبی-عروقی (کاهش خطرات ناشی از بیماری‌های عروق کرونری) و سیستم عصبی، پیشگیری از تشکیل ضایعات توموری (در ریه، معده، کولون و پروستات) و ناباروری، بهبود پاسخ‌های التهابی، سیستم ایمنی و آنتی‌اکسیدانی و حفاظت انسان و حیوانات آزمایشگاهی (به‌ویژه موش) در برابر نور خورشید اشاره کرد (Formica and Regelson, 1995; Gui *et al.*, 2015). با این وجود، در آبزیان، مطالعات محدودی در زمینه اثرات روتین در برخی از گونه‌های ماهیان صورت گرفته است که از آن جمله، می‌توان به پژوهش انجام شده در زمینۀ بررسی تاثیرات سینرژیستی محدود روتین اضافه شده به جیره، بر خواص مغذی ویتامین C در گربه‌ماهی کانالی (*Ictalurus punctatus*) انگشت‌قد (Bai and Gatlin, 1992)، تحقیق در زمینۀ بررسی تاثیر جیره‌ی غنی شده با روتین بر پارامترهای خونی، شاخص‌های اکسیداتیو و بیان هورمون هیپوفیزی در گربه‌ماهی نقره‌ای (*Rhamdia quelen*) (Pês *et al.*, 2016)، مطالعه در زمینۀ بررسی تاثیرات پیش التهابی/ضد التهابی جیره غنی شده با روتین بر کبد ماهیان تیلاپیای نیل

(*Oreochromis niloticus*) جوان (Zheng *et al.*, 2017) و پژوهش در زمینهٔ بررسی سطوح مختلف روتین اضافه شده به جیره غذایی، بر فعالیت برخی از آنزیم‌های کبدی و شاخص‌های استرس اکسیداتیو در قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در معرض اکسی‌تتراسایکلین (Nazeri *et al.*, 2017) اشاره کرد. در تحقیقات اخیر، اثرات مثبت تروگزروتین بر ایمنی مخاطی ماهی قرمز نشان داده شد (شیخ‌زاده و همکاران، ۱۴۰۰). با توجه به پتانسیل مناسب این ترکیب در بهبود ایمنی مخاطی پوست و از سوی دیگر، اهمیت ایمنی مخاطی در کنترل بیماری ایک، در مطالعه حاضر استفاده خوراکی از تروگزروتین در ماهی قرمز در کنترل این بیماری انگلی مورد ارزیابی قرار گرفت تا میزان بهره‌وری این ترکیب در تقویت سیستم ایمنی و افزایش مقاومت در برابر آلودگی با انگل *I. multifilis* در این ماهی مشخص گردد.

مواد و روش کار

ماهی و طراحی مطالعه

مطالعه حاضر در کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان زینتی سافیش، واقع در شهرستان مرند استان آذربایجان شرقی انجام گرفت. در این پژوهش ۶۴ قطعه بچه ماهی سالم با متوسط وزن ۰/۰۸±۲/۷۴ گرم (انحراف معیار±میانگین) و متوسط طول ۰/۰۸±۴/۸۶ سانتیمتر، پس از ۱۰ روز سازگاری اولیه، به طور تصادفی در ۸ تانک شیشه‌ای با ابعاد ۹۰×۴۰×۴۰ سانتی‌متر ذخیره‌سازی شدند. ماهی‌های مورد مطالعه، مجموعاً در چهار گروه آزمایشی شامل یک گروه کنترل و سه گروه تیمار با دو تکرار و در هر تکرار ۸ قطعه ماهی، به صورت کاملاً تصادفی توزیع شدند. میانگین درجه حرارت آب ۲۵/۵- ۲۴/۵ درجه سانتی‌گراد ، pH آب برابر ۷/۲، آمونیاک کمتر از ۰/۰۱ میلی گرم بر لیتر، نیتریت کمتر از ۰/۱ میلی گرم بر لیتر، نیترات برابر ۸-۷ میلی گرم بر لیتر و نوردهی به میزان ۸ ساعت در روز بود. تغذیه ماهی‌ها با خوراک تجاری گرانولی ساخت شرکت Energy تایلند و به میزان ۲/۵ ٪ وزن بدن به صورت روزانه (در سه وعده) انجام گرفت. پس از دوره ۱۰ روزه سازگاری، جهت آماده‌سازی خوراک در گروه‌های تیمار، از نمونه تجاری تروگزروتین ساخت شرکت Merck) آلمان استفاده شد. در گروه‌های تیمار، تروگزروتین به میزان ۰/۱، ۰/۳ و ۰/۵ گرم در کیلوگرم، به جیره غذایی ماهی‌ها اضافه شد. دوزهای انتخاب شده بر اساس اثرات مثبت ایجاد شده با این ترکیب در مطالعه قبل بود (Zheng *et al.*, 2017). جهت افزودن تروگزروتین به خوراک ماهی، از روش اسپری سطحی استفاده شد به‌طوری‌که تروگزروتین با دوزهای مورد نظر در ۰/۵ سی‌سی روغن گیاهی حل شد. در گروه کنترل نیز جهت یکسان‌سازی، تنها روغن گیاهی بر خوراک اسپری گردید. پس از خشک شدن پلت‌ها، تا زمانی که خوراک به مصرف ماهی‌ها برسد، داخل کیسه‌های پلاستیکی جداگانه ریخته شده و داخل یخچال در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگه‌داری گردیدند. تهیه ترونت‌های *I.multifilis* و ایجاد آلودگی تجربی ماهی‌های آلوده به انگل ایک که وجود انگل در آنها با تهیه گسترش تخریشی پوست به کمک میکروسکوپ نوری به اثبات رسیده بود، با دوز بالای عصاره گل‌میخک (۵۰ میکرولیتر در لیتر) آسان‌کشی شدند و به مدت ۴ ساعت در آب تازه در داخل تانک دیگر رها شدند تا تروفونت‌ها بدن ماهی‌های بیمار را ترک کنند. سپس، ماهی‌های مرده خارج شدند و تومونت‌های کیسه‌دار شده به مدت یک شب در داخل تانک‌ها ماندند تا به مرحله توموسیت و سپس آزادسازی ترونت‌ها برسند. در روز بعد، آب حاوی ترونت های آزاد شده با دور ۱۵۰۰ در دقیقه و به مدت ۵ دقیقه سانتریوفوژ شد و شمارش تعداد انگل‌ها در لام هموسیتومتر انجام شد و تراکم براساس تعداد ترونت‌های موجود در هر میلی لیتر رسوب تعیین گردید (Jørgensen *et al.*, 2018).

انجام چالش و نمونه برداری

در مطالعه قبلی (Ling *et al.*, 2010) میزان ترونت‌های انگل ایک جهت درگیری ۱۰۰٪ ماهی‌های قرمز در حدود ۴۰۰۰ ترونت به‌دست آمد. بنابراین، میزان ۴۰۰۰ ترونت به ازاء هر ماهی قرمز (مجموعاً حدود ۳۲۰۰۰ ترونت در هر آکواریوم) به هر آکواریوم اضافه شد. مجاورت ماهی‌ها با ترونت‌های انگل در روز ۸۰ غذادهی با تروگزروتین انجام

شد. جهت تماس بیشتر ماهی‌ها با انگل، تعویض آب به مدت ۲ روز انجام نشد تا تماس انگل‌ها با سطح بدن ماهی‌ها تسهیل گردد. ۱۰ روز بعد از چالش ماهی‌ها با انگل، ماهی‌های موجود در تمامی تانک‌ها آسان‌کشی شدند و به صورت جداگانه در زیر لوپ و میکروسکوپ جهت شمارش تروفوزوایت‌های انگل مورد بررسی قرار گرفتند.

بررسی انگل‌شناسی

الف) بررسی ماکروسکوپی: بدین منظور ماهی‌های گروه کنترل و گروه تیمار در روز ۹۰ با عصاره گل میخک (۵۰ میکرولیتر در لیتر) آسان‌کشی شدند. سپس به صورت ماکروسکوپی از نظر وجود ضایعات در پوست و باله‌ها مورد بررسی قرار گرفتند و وجود ضایعات نظیر خونریزی در باله‌ها، التهاب و رنگ‌پریدگی در آبشش‌ها و لکه‌های سفیدی در سطح پوست و باله‌های ماهیان مورد توجه و بازبینی قرار گرفت (Jørgensen *et al.*, 2018).

ب) بررسی میکروسکوپی: به منظور بررسی دقیق‌تر، باله‌ها و مناطقی از پوست که ضایعاتی در آنها دیده می‌شد، با میکروسکوپ نوری مورد بازبینی قرار می‌گرفت. بدین منظور، نخست ماهی‌ها داخل پتری‌دیش‌ها قرار گرفتند و مقداری آب یا محلول ایزوتونیک نمک طعام به آن ظروف افزوده شد. سپس، به منظور یافتن انگل‌ها، پوست و باله‌ها به‌وسیلهٔ میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت و تعداد انگل‌ها در واحد سطح مورد شمارش قرار گرفت. همچنین از ضایعات پوستی، گسترش مرطوب تهیه شده و از نظر وجود انگل با میکروسکوپ نوری بازبینی شد.

روش تجزیه و تحلیل آماری داده ها

نتایج به صورت خطای استاندارد (±SEM) میانگین گزارش شده است. ارزش آماری داده‌ها با آزمون آماری یک‌طرفه واریانس‌ها (ANOVA) مورد ارزیابی قرار گرفت که به این منظور از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ استفاده شد. همچنین داده‌ها با تحلیل آماری LSD (Least Significant Differences)، جهت مقایسه میانگین‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. معنی‌دار بودن تفاوت داده‌ها در شرایط $p<۰/۰۵$ مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج

بررسی ماکروسکوپی

در بررسی ماکروسکوپی، ضایعاتی مانند خونریزی و پرخونی در پوست و باله‌ها، التهاب و رنگ‌پریدگی در آبشش‌ها، لکه‌های سفیدی در سطح پوست و باله‌ها و تخریب یا بد شکل شدن باله‌ها در تعدادی از ماهی‌های گروه کنترل و گروه تیمار با دوز پایین تروگزروتین مشاهده شد (شکل ۱). در گروه‌های تیمار با دوز متوسط و بالا ضایعات بسیار ناچیزی دیده شد.

بررسی میکروسکوپی

نتایج شمارش انگل‌ها در ماهی‌های گروه کنترل در جدول ۱ و گروه‌های تیمار با دوز پایین، دوز متوسط و دوز بالای تروگزروتین در جدول ۲ ارائه شده است.

بر اساس نتایج ارائه شده در جدول و شکل ۲، از نظر تعداد ماهی آلوده در هر گروه و میزان آلودگی در هر ماهی، آلودگی کمتری در گروه‌های تیمار دوز متوسط و بالای تروگزروتین در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). اما مصرف دوز پایین تروگزروتین نتوانست تعداد تروفونت‌های انگل را در مقایسه با گروه کنترل کاهش دهد ($p<۰/۰۵$). در بررسی‌های میکروسکوپیک و ماکروسکوپیک نیز نتایج موید اثرات مفید دوزهای متوسط و بالای تروگزروتین در کاهش ضایعات ناشی از انگل شامل پرخونی و ضایعات پوستی در مقایسه با گروه کنترل بود.

شکل ۱: ضایعات ماکروسکوپی قابل مشاهده در ماهی‌های گروه کنترل. پرخونی در پوست (محصور در دایره خط چین)، خونریزی در باله‌ها (محصور در دایره) و تخریب باله دمی(محصور در مستطیل خط چین) مشخص است.

Figure 1: Macroscopic lesions visible in fish of the control group: hyperemia in the skin (enclosed in a dashed circle), bleeding in the fins (enclosed in a circle) and destruction of the caudal fin (enclosed in a dashed rectangle).

جدول ۱: تعداد انگل‌ها در میدان‌های دید میکروسکوپی در ماهیان گروه کنترل (C) و تیمار تروگزروتین با دوز پایین (T_A)

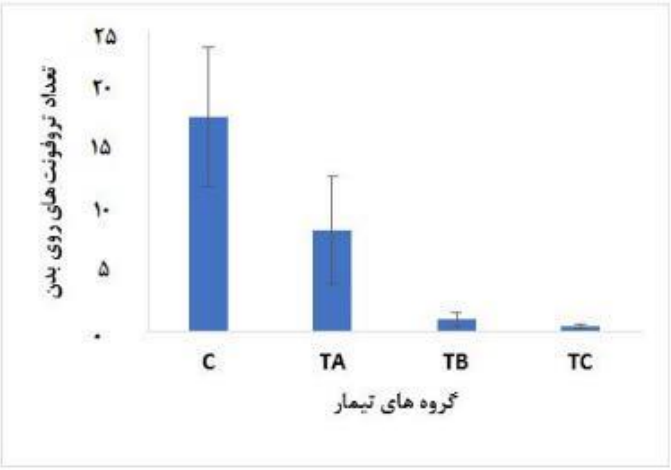
Table 1: Number of parasites in the microscopic fields in the fish of the control group (C) and treated fish with low dose of troxerutin (T_A)

ماهی	تعداد انگل‌های مشاهده شده در میدان‌های دید				ماهی	تعداد انگل‌های مشاهده شده در میدان‌های دید			
	اول	دوم	سوم	مجموع		اول	دوم	سوم	مجموع
C_1	۱۴	۱۰	۱۳	۳۷	T_{A1}	۹	۹	۳	۲۱
C_2	۳	۴	۰	۷	T_{A2}	۱۲	۴۶	۱۰	۶۸
C_3	۶۳	۱۶	۱	۸۰	T_{A3}	۰	۰	۰	۰
C_4	۰	۰	۰	۰	T_{A4}	۲	۰	۰	۲
C_5	۰	۰	۰	۰	T_{A5}	۰	۰	۰	۰
C_6	۱	۶	۰	۷	T_{A6}	۶	۶	۶	۱۸
C_7	۰	۰	۰	۰	T_{A7}	۱	۰	۰	۱
C_8	۲	۹	۰	۱۱	T_{A8}	۰	۰	۰	۰
C_9	۰	۰	۰	۰	T_{A9}	۰	۰	۰	۰
C_{10}	۲	۳	۰	۵	T_{A10}	۰	۰	۰	۰
C_{11}	۲	۱	۳	۶	T_{A11}	۰	۰	۰	۰
C_{12}	۲	۱۶	۰	۱۸	T_{A12}	۱	۱۰	۱۰	۲۱
C_{13}	۱۷	۲۲	۱۲	۵۱	T_{A13}	۰	۰	۱	۱
C_{14}	۲	۳	۰	۵	T_{A14}	۰	۰	۰	۰
C_{15}	۸	۳	۵	۱۶	T_{A15}	۰	۰	۰	۰
C_{16}	۱۵	۱۸	۹	۴۲	T_{A16}	۱	۰	۲	۳

جدول ۲: تعداد انگل‌ها در میدان‌های دید میکروسکوپی در ماهیان گروه تیمار تروگزروتین با دوز متوسط (T_B) و دوز بالا (T_C)

Table 2: Number of parasites in microscopic fields in the treated fish with medium dose (T_B) and high dose (T_C) of troxerutin

ماهی	تعداد انگل‌های مشاهده شده در میدان‌های دید				ماهی	تعداد انگل‌های مشاهده‌شده در میدان‌های دید			
	اول	دوم	سوم	مجموع		اول	دوم	سوم	مجموع
T_{B1}	۰	۰	۱	۱	T_{C1}	۰	۰	۰	۰
T_{B2}	۰	۰	۰	۰	T_{C2}	۰	۱	۰	۱
T_{B3}	۳	۵	۱	۹	T_{C3}	۰	۰	۰	۰
T_{B4}	۰	۰	۰	۰	T_{C4}	۰	۰	۰	۰
T_{B5}	۰	۰	۰	۰	T_{C5}	۰	۰	۲	۲
T_{B6}	۰	۱	۰	۱	T_{C6}	۰	۰	۰	۰
T_{B7}	۰	۰	۰	۰	T_{C7}	۰	۰	۰	۰
T_{B8}	۰	۰	۰	۰	T_{C8}	۰	۰	۰	۰
T_{B9}	۰	۳	۰	۳	T_{C9}	۰	۰	۰	۰
T_{B10}	۰	۰	۰	۰	T_{C10}	۱	۰	۰	۱
T_{B11}	۱	۰	۰	۱	T_{C11}	۰	۰	۰	۰
T_{B12}	۰	۰	۰	۰	T_{C12}	۰	۰	۰	۰
T_{B13}	۰	۰	۰	۰	T_{C13}	۰	۰	۰	۰
T_{B14}	۰	۰	۱	۱	T_{C14}	۰	۰	۰	۰
T_{B15}	۰	۰	۰	۰	T_{C15}	۲	۰	۱	۳
T_{B16}	۰	۰	۰	۰	T_{C16}	۰	۰	۰	۰



شکل ۲. میانگین تعداد انگل‌های مشاهده شده در ماهیان گروه کنترل و تغذیه شده با دوزهای مختلف تروگزروتین. C: گروه کنترل بدون دریافت تروگزروتین. TA: گروه تیمار مصرف کننده دوز پایین تروگزروتین. TB: گروه تیمار مصرف کننده دوز متوسط تروگزروتین. TC: گروه تیمار مصرف کننده دوز بالای تروگزروتین. حروف مختلف نشان دهندهٔ وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه هاست (p<۰/۰۵).

Figure 2: Mean number of parasites observed in the control and treated fish with different doses of troxerotin. C: Control group without receiving troxerotin. TA: treated fish with low dose of troxerutin. TB: treated fish with medium dose of troxerutin. TC: treated fish with high dose of troxerutin. Different letters are significantly different (p< 0.05).

بحث

جمع‌بندی نتایج حاصل در بررسی انگل شناسی مطالعه حاضر، نشان‌دهنده اثر محافظت‌کننده و موثر افزودنی تروگزروتین خوراکی در کاهش آلودگی به انگل ایک است. از نظر تعداد ماهی‌های آلوده در هر گروه و میزان بار آلودگی در هر ماهی، در گروه تیمار آلودگی کمتری در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد که با نتایج مطالعات مربوط با مصرف فلاوونوئیدها و سایر ترکیبات گیاهی در کاهش فعالیت انگل‌ها هم‌خوانی دارد. برای مثال، استفاده از عصاره متانولی ریشه گیاه بوپلوروم (Bupleurum)، عصاره‌های آبی و متانولی دارچین، عصاره متانولی بوته ادویه چینی (*Lindera aggregata*) و عصاره‌های متانولی و اتیل استات کاج فرنگی (*Pseudolarix kaempferi*) در جیرهٔ مصرفی ماهی قرمز آلوده به انگل منوژن (*Dactylogyrus intermedium*)، ماندگاری صد درصدی در ماهیان آلوده به این انگل منوژن را به‌دنبال داشت (Ji *et al.*, 2012). در مطالعه دیگری، کارایی استفاده از عصاره اتانولی *Artemisia annua* علیه انگل منوژن *Heterobranchus longifilis* گزارش شد (Ekanem and Brisibe, 2010). همچنین در مطالعه دیگری، مصرف جیره‌ی حاوی گیاهی به نام *Suaeda maxima* در ماهی کفشک زیتونی (*Paralichthys olivaceus*) آلوده شده با انگل تک‌یاخته‌ای *Miameensis avidus*، علاوه بر تقویت دستگاه ایمنی، موجب کاهش تلفات به میزان ۴۰ درصد نیز گردید (Gibson and Rastall, 2005). اما اطلاعات موجود در مورد کنترل انگل *I. multifilis* از طریق مصرف فلاوونوئیدها و سایر ترکیبات گیاهی در ماهی محدود است.

Jaafar و همکاران (۲۰۱۱) به مطالعه اثرات ۱-۳ بتاگلوکان علیه انگل *I. multifilis* در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان جوان پرداختند. مقادیر مورد استفاده بتاگلوکان ۰ ٪، ۰/۲ ٪، ۲ ٪ و ۵ ٪ به مدت ۵۶ روز بود. از روز ۴۵ مطالعه، گروه دریافت‌کنندهٔ ۵ ٪ بتاگلوکان، آلودگی به ترونت کمتری را نسبت به گروه کنترل داشتند ($p<۰/۰۵$). گروه‌های دریافت‌کنندهٔ ۰/۲ ٪ و ۲ ٪ بتاگلوکان، در طول دوره مطالعه دارای نوسان در میزان لیزوزیم پلاسمای خود بودند درحالی‌که گروه دریافت‌کننده دوز بالای بتاگلوکان افزایش مداوم لیزوزیم پلاسما را نشان داد و افزایش میزان لیزوزیم در کاهش میزان آلودگی به انگل موثر اعلام شد. وجود ترکیبات متعددی از جمله آگلوتینین‌ها، لیزین‌ها، لیزوزیم، پروتئین مرحله حاد، پادتن‌های طبیعی، دستگاه کمپلمان و برخی آنزیم‌های دیگر در ترشحات مخاط، موجب می‌شود تا ماهیان با روش‌های مختلف و به‌وسیله این درشت‌مولکول‌های پروتئینی، از خود دفاع کنند (Iwama and Nakanishi, 1996). برای مثال، طبق مطالعات متعدد، مشخص شده است که ترشحات مخاطی دارای خاصیت ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد قارچی و ضد انگلی هستند. Liang و همکاران (۲۰۱۵) به بررسی اثرات کووانون G و O، دو فلاوونوئید مستخرج از ریشه گیاه توت سفید علیه انگل *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* در کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*) پرداختند. این دو فلاوونوئید در دوز ۲ میلی‌گرم در لیتر موجب مرگ تمام ترونت‌های انگل شدند و مقادیر ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر موجب کاهش قدرت بیماری‌زائی ترونت‌ها گردیدند. در مطالعه‌ای دیگر، Song و همکاران (۲۰۱۵) اثرات ضدانگلی دو ترکیب پسورالیدین و ایزوپسورالین استخراج‌شده از گیاه بابچی (*Psoralea corylifolia*) علیه انگل *I. multifilis* را در شرایط آزمایشگاهی و بدن ماهی مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد که اثرات ضدانگلی پسورالیدین بیشتر از ایزوپسورالین بود به طوری که درشرایط آزمایشگاهی، پسورالیدین در غلظت ۰/۸ میلی‌گرم در طی ۴ ساعت قادر به از بین بردن تمام ترونت‌های انگل و در غلظت ۱/۲ میلی‌گرم در لیتر قادر به حذف کیست‌های تومونت انگل بود. در بدن ماهی غلظت ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر پسورالیدین موجب کاهش معنی‌دار ترونت‌های انگل گردید.

همان‌طوری‌که گفته شد، مخاط نقش مهمی در دفاع علیه عوامل بیماری‌زا ایفاء می‌کند که لیزوزیم از مهم‌ترین عوامل دفاعی داخل مخاط محسوب می‌شود و نقش مهمی در ایجاد مقاومت در برابر انواع بیماری‌های انگلی خارجی

در گونه‌های مختلف ماهی ایفاء می‌کند (Parida *et al.*, 2018). برای مثال، در مطالعه‌ای، به دنبال پاسخ‌های التهابی ناشی از انگل سخت‌پوست *Argulus siamensis* در کپور روهو (*Labeo rohita*)، افزایش سطح لیزوزیم G در بافت‌های مختلف از جمله پوست، نشان داده شد (Kar *et al.*, 2015). محققین نشان دادند که میزان لیزوزیم پلاسما متعاقب تزریق داخل صفاقی تروفونت‌های زنده انگل *I. multifilis* به ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان افزایش می‌یابد (Alishahi and Buchmann, 2006). در مطالعه شیخ زاده و همکاران (۱۴۰۰) نیز استفاده از تروگزروتین به‌ویژه در دوز متوسط و بالا سبب بهبود فاکتورهای ایمنی و ساختار بافت شناسی در ماهی‌قرمز گردید به‌طوری‌که افزایش معنی‌داری در میزان بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی نظیر لیزوزیم و فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا در پوست ماهیان مشخص گردید. بررسی مقاطع بافتی پوست ماهی‌ها نیز نشان داد که تروگزروتین از توانایی ویژه‌ای جهت افزایش تراکم سلول‌های هشدار دهنده و نسبت حجمی این سلول‌ها به اپیدرم پوست برخوردار است. با توجه به این نتایج به‌نظر می‌رسد که ترکیب تروگزروتین با تحریک ایمنی مخاطی پوست قادر به افزایش مقاومت ماهی در برابر انواع بیماری‌های عفونی جلدی از جمله انگل ایک باشد. در حال حاضر، درمان‌ها علیه انگل ایک، محدود به حمام‌های شیمیایی هستند. از این‌رو، تولید یک ترکیب خوراکی پیشگیرانه که به‌راحتی تجویز می‌شود، گام مهمی در جهت کنترل این بیماری گسترده است (Pieters *et al.*, 2008). با توجه به نتایج، به‌نظر می‌رسد که مصرف خوراکی تروگزروتین نقش موثری در از بین بردن انگل ایک ایفاء می‌کند و می‌تواند به عنوان جایگزینی مناسب در کنترل انگل ایک مدنظر قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز انجام گرفته است.

منابع

پورغلام، ر.، شریف‌روحانی، م.، صفری، ر.، سعیدی، ع.، بینایی، م.، نجفیان، ر.، بانکه‌ساز، ز.، تقوی، م.، سپهداری، ا.، ۱۳۹۲. اثر عصاره سرخار گل (*Echinacea purpurea*) بر برخی شاخص‌های ایمنی و بازماندگی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در برابر *استرپتوکوک اینیایی* (*Streptococcus iniae*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۲ (۳): ۱-۱۲. DOI: 10.22092/isfj.2017.110128

سلطانی، م.، ۱۳۸۷. ایمنی شناسی ماهیان و سخت‌پوستان. موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، ایران. ۲۶۴ ص.

شیخ زاده، ن.، موسوی، ش. و مرندی، ا.، ۱۴۰۰. اثرات تروگزروتین بر بیان mRNA ژن های کد کننده لیزوزیم و فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا و بافت شناسی پوست ماهی‌قرمز (*Carassius auratus*). نشریه توسعه آبزی‌پروری (در دست انتشار).

عادل، م.، پورغلام، ر.، ذریه زهرا، س.ج.، قیاسی، م.، ۱۳۹۴. تاثیر سطوح مختلف عصاره نعناع فلفلی بر برخی شاخص‌های خونی، بیوشیمیایی و ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۴ (۱): ۳۷-۴۷. DOI: 10.22092/ISFJ.2014.103049

لطفی، ک.، حسینی شکرابی، س.پ.، شمسایی مهرجان، م.، ۱۳۹۹. اثر افزودنی پودر فلفل پاپریکا (*Capsicum annum*) بر عملکرد رشد و برخی فاکتورهای ایمنی ماهی زبرا (*Danio rerio*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۹ (۵): ۶۷-۷۸. (DOI): 10.22092/ISFJ.2021.123163

Alishahi, M. and Buchmann, K., 2006. Temperature-dependent protection against *Ichthyophthirius multifliis* following immunisation of rainbow trout using live theronts. *Diseases of Aquatic Organisms*, 72: 269-273. DOI: 10.3354/dao072269.

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(1-4): 26-33. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2007.12.022.

Bai, S.C. and Gatlin, D.M., 1992. Dietary rutin has limited synergistic effects on vitamin C nutrition of fingerling channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 10(3): 183-188. DOI: 10.1007/BF00004512.

Buchmann, K., Sigh, J., Nielsen, C.V. and Dalgaard, M., 2001. Host responses against the fish parasitizing ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*. *Veterinary Parasitology*, 100(1-2): 105-116. DOI: 10.1016/s0304-4017(01)00487-3.

Ekanem, A.P. and Brisibe, E.A., 2010. Effects of ethanol extract of *Artemisia annua L*. against monogenean parasites of *Heterobranchus longifilis*. *Parasitology Research*, 106(5): 1135-1139. DOI:10.1007/s00436-010-1787-0.

Fan, S.H., Zhang, Z.F., Zheng, Y.L., Lu, J., Wu, D.M., Shan, Q., Hu, B. and Wang, Y.Y., 2009. Troxerutin protects the mouse kidney from d-galactose-caused injury through anti-inflammation and anti-oxidation. *International Immunopharmacology*, 9(1): 91-96. DOI: 10.1016/j.intimp.2008.10.008.

Formica, J.V. and Regelson, W., 1995. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology*, 33(12): 1061-1080. DOI: 10.1016/0278-6915(95)00077-1.

Gibson, G. and Rastall, R., 2005. Gastrointestinal infections and the protective role of probiotics and prebiotics. *Food Science and Technology Bulletin*, 1: 1-17. DOI: 10.1616/1476-2137.3664.

Gui, Y., Li, A., Chen, F., Zhou, H., Tang, Y., Chen, L., Chen, S. and Duan, S., 2015. Involvement of AMPK/SIRT1 pathway in anti-allodynic effect of troxerutin in CCI-induced neuropathic pain. *European Journal of Pharmacology*, 769: 234-241. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.11.023.

Harikrishnan, R., Balasundaram, C. and Heo, M.S., 2011. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture*, 317(1-4): 1-15. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2011.03.039.

Iqbal, Z.A.F.A.R. and Hussain, U.Z.M.A., 2013. Parasitic infection of an ornamental fish, Shubunkin, *Carassius auratus* L. imported to Pakistan. *Biologia (Pakistan)*, 59(2): 281-286.

Iwama, G. and Nakanishi, T., 1996. The fish immune system: organism, pathogen, and environment. Fish physiology, Academic Press, USA. 395 P.

Jaafar, R.M., Skov, J., Kania, P.W. and Buchmann, K., 2011. Dose dependent effects of dietary immunostimulants on rainbow trout immune parameters and susceptibility to the parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Journal of Aquaculture Research and Development*, 3: S3-001. DOI: 10.4172/2155-9546.S3-001.

Ji, J., Lu, C., Kang, Y., Wang, G.X. and Chen, P., 2012. Screening of 42 medicinal plants for in vivo anthelmintic activity against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). *Parasitology Research*, 111(1): 97-104. DOI: 10.1007/s00436-011-2805-6.

JØrgensen, L.V.G., Korbut, R., Jeberg, S., Kania, P.W. and Buchmann, K., 2018. Association between adaptive immunity and neutrophil dynamics in zebrafish (*Danio rerio*) infected by a parasitic ciliate. *PLOS ONE*, 13(9): 203-297. DOI: 10.1371/journal.pone.0203297.

Kar, B., Mohanty, J., Hemaprasanth, K.P. and Sahoo, P.K., 2015. The immune response in rohu, *Labeo rohita* (Actinopterygii: Cyprinidae) to *Argulus siamensis* (Branchiura: Argulidae) infection: kinetics of immune gene expression and innate immune response. *Aquaculture Research*, 46(6): 1292-1308. DOI: 10.1111/are.12279.

Liang, J.H., Fu, Y.W., Zhang, Q.Z., Xu, D.H., Wang, B. and Lin, D.J., 2015. Identification and effect of two flavonoids from root bark of *Morus alba* against *Ichthyophthirius multifiliis* in grass carp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(5): 1452-1459. DOI: 10.1021/jf505544e.

Ling, F., Wang, J.G., Liu, Q.F., Li, M., Ye, L.T. and Gong, X.N., 2010. Prevention of *Ichthyophthirius multifiliis* infestation in goldfish (*Carassius auratus*) by potassium ferrate (VI) treatment. *Veterinary Parasitology*, 168(3-4): 212-216. DOI: 10.1016/j.vetpar.2009.11.009.

Mousavi, H.E., Mood, S., Omrani, B., Mokhayer, B., Ahmadi, M., Soltani, M., Mirzargar, S., Masoumian, M. and Pazooki, J., 2009. Gill ectoparasites of goldfish (*Carassius auratus*, pearl scale variety) imported into Iran. *Bull Eur Assoc Fish Pathol*, 29(5): 175-180.

Moyses, C.R.S., Spadacci-Morena, D.D., Xavier, J.G., Antonucci, A.M. and Lallo, M.A., 2015. Ectocommensal and ectoparasites in goldfish *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) in farmed in the State of São Paulo. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 24(3): 283-289. DOI: 10.1590/S1984-29612015054.

Nazeri, S., Farhangi, M. and Modarres, S., 2017. The effect of different dietary inclusion levels of rutin (a flavonoid) on some liver enzyme activities and oxidative stress indices in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) exposed to Oxytetracycline. *Aquaculture Research*, 48(8): 4356-4362. DOI: 10.1111/are.13257.

Parida, S., Mohapatra, A., Kar, B., Mohanty, J. and Sahoo, P.K., 2018. Transcriptional analysis of immune-relevant genes in the mucus of *Labeo rohita*, experimentally infected with *Argulus siamensis*. *Acta parasitologica*, 63(1): 125-133. DOI: 10.1515/ap-2018-0014.

Pês, T.S., Saccol, E.M., Ourique, G.M., Londero, É.P., Gressler, L.T., Finamor, I.A., Rotili, D.A., Golombieski, J.I., Glanzner, W.G., Llesuy, S.F. and

Gonçalves, P.B., 2016. Effect of diets enriched with rutin on blood parameters, oxidative biomarkers and pituitary hormone expression in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 42(1): 321-333. DOI: 10.1007/s10695-015-0140-z.

Pieters, N., Brunt, J., Austin, B. and Lyndon, A.R., 2008. Efficacy of in-feed probiotics against *Aeromonas bestiarum* and *Ichthyophthirius multifiliis* skin infections in rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss, Walbaum). Journal of Applied Microbiology*, 105(3): 723–732. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2008.03817.x.

Sheikhzadeh, Najmeh., Marandi, Amin., 2021. Influence of dietary troxerutin on growth performance in goldfish (*Carassius auratus*). 5th International Congress of Developing Agriculture, Natural Resources, Environment and Tourism of Iran, 05-07 January 2021.

Song, K., Ling, F., Huang, A., Dong, W., Liu, G., Jiang, C., Zhang, Q. and Wang, G., 2015. *In vitro* and *in vivo* assessment of the effect of antiprotozoal compounds isolated from *Psoralea corylifolia* against *Ichthyophthirius multifiliis* in fish. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 5(2): 58-64. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2015.04.001.

Zheng, Y., Zhao, Z., Fan, L., Meng, S., Song, C., Qiu, L., Xu, P. and Chen, J., 2017. Dietary supplementation with rutin has pro-/anti-inflammatory effects in the liver of juvenile GIFT tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 64: 49-55. DOI: 10.1016/j.fsi.2017.03.014.

Study of the effect of oral troxerutin on resistance against *Ichthyophthirius multifilis* in goldfish *(Carassius auratus*)

Mousavi Sh.[1*]; Sheikhzadeh N.[1]; Marandi A.[2]

[*]shalaleh.mousavi@tabrizu.ac.ir

1-Department of Food Hygiene and Aquatic Animals, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
2-Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

Abstract

Troxerutin ($C_{33}H_{42}O_{19}$), known as vitamin P4, is a tri-hydroxyethylated derivative of natural bioflavonoid rutin. In the previous studies, the beneficial effects of troxerutin in enhancing the growth performance, physiological and immunological indices were proved. This study was designed to evaluate the effect of troxerutin on resistance against the exoparasite *Ichthyophthirius multifilis* in goldfish. Fish with mean weight 2.74±0.08 g were distributed in eight glass tanks and four experimental groups, including one control group and three treatment groups. During the feeding trail, fish were fed on diets supplemented with different levels of 0, 0.1, 0.3 and 0.5 g kg^{-1} troxerutin for 80 days. At the end of the trial, fish were exposed to theronts stage of I. multifilis at 4,000 theronts per fish. Results showed that different signs, including hyperemia and fin erosions, were prominent in the control group in comparison with the treated fish. Total numbers of parasite trophonts were also significantly decreased in the fish treated with 0.3 and 0.5 g kg^{-1} troxerutin compared to the control fish. These data indicated a positive effect of dietary troxerutin on disease resistance against exoparasite *Ichthyophthirius multifilis* in goldfish.

Keywords: Troxerutin, Goldfish, Parasite, *Ichthyophthirius multifilis*

[*]Corresponding author