



دانشکده دامپزشکی

ارائه شده جهت دریافت درجه دکتری عمومی دامپزشکی

عنوان

بررسی اثر عصاره خام گیاه صبرزرد (*Aloe vera*) بر برخی فاکتورهای ایمنی
غیر اختصاصی و میزان محافظت بعد از چالش با دوز کشنده باکتری
cyprinus carpio آئروموناس هیدروفیلا در ماهی کپور معمولی

نگارنده

محمد مهدی رنجبر

اساتید راهنما

دکتر مجتبی علیشاهی

دکتر مسعود قربانپور

استاد مشاور

دکتر مهرزاد مصباح

تیر ماه ۱۳۸۹



دانشکده دامپزشکی

پایان نامه دکتری عمومی دامپزشکی

عنوان

بررسی اثر عصاره خام گیاه صبرزرد (*Aloe vera*) بر برخی
فاکتورهای ایمنی غیر اختصاصی و میزان محافظت بعد از چالش با دوز
کشنده باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در ماهی کپور
معمولی *cyprinus carpio*

نگارش

محمد مهدی رنجبر

دکتر مجتبیٰ علیشاهی

استاد راهنما (استادیار دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز)

دکتر مسعود قربانپور

استاد راهنما (استاد دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز)

دکتر مهرزاد مصباح

استاد مشاور (استادیار دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز)

دکتر رحیم پیغان

داور (استاد دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز)

دکتر مهری غفوریان

داور (دانشیار دانشکده پزشکی، دانشگاه جندی شاپور اهواز)

دکتر یزدان مظاهری

ناظر تحصیلات تکمیلی (دانشیار دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز)

بسمه تعالی

دانشگاه شهید چمران اهواز

دانشکده دامپزشکی

پایان نامه دوره دکتری حرفه‌ای

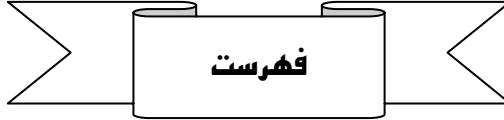
(نتیجه ارزشیابی پایان نامه دکترای حرفه‌ای دامپزشکی)

بدینوسیله گواهی می‌شود پایان نامه آقای محمد مهدی رنجبر دانشجوی دکترای عمومی دامپزشکی به شماره دانشجویی ۸۲۷۹۲۳ تحت عنوان :

« بررسی اثر عصاره خام گیاه صبرزد (*Aloe vera*) بر برخی فاکتورهای ایمنی غیر اختصاصی و میزان محافظت بعد از چالش با دوز کشنده باکتری *Aeromonas hydrophila* در ماهی کپور معمولی *cyprinus carpio* »

جهت اخذ درجه دکترای دامپزشکی در تاریخ ۸/۴/۸۹ توسط هیات داوران مورد ارزشیابی قرار گرفت و با درجه عالی تصویب گردید.

امضاء	مرتبه علمی	۱- اعضاء هیات داوران
.....	استادیار	الف- استاد راهنمای اول: دکتر مجتبی علیشاهی
.....	استاد	ب- استاد راهنمای دوم: دکتر مسعود قربانپور
.....	استادیار	ج- مشاور: دکتر مهرزاد مصباح
.....	استاد	د- داور اول : دکتر رحیم پیغان
.....	دانشیار	ه- داور دوم : دکتر مهري غفوریان
.....	استادیار	و - نماینده تحصیلات تکمیلی دانشگاه (استاد ناظر) : دکتر یزدان مظاهری
.....	دانشیار	۲- مدیر گروه علوم درمانگاهی: دکتر علیرضا غدیری
.....	استادیار	۳- معاون پژوهشی و نماینده تحصیلات تکمیلی دانشکده : دکتر سیدرضا فاطمی طباطبایی
.....	استاد	۴- مدیر تحصیلات تکمیلی دانشگاه : دکتر رحیم پیغان



صفحه	عنوان
	فصل اول / مقدمه و هدف
۲	مقدمه و هدف
	فصل دوم / مروری بر منابع
۶	۱-۲ کلیاتی پیرامون ماهی کپور
۷	۱-۱-۲- شاخه طنابداران
۷	۲-۱-۲- زیر شاخه مهره‌داران
۷	۲-۱-۳- فوق رده آرواره‌داران
۸	۲-۱-۴- گرید ماهیان
۸	۲-۱-۵- رده ماهیان استخوانی
۸	۲-۱-۶- زیررده ماهیان شعاع باله
۹	۲-۱-۷- فوق راسته استاریوفیز
۹	۲-۱-۸- راسته کپور شکلان
۹	۲-۱-۹- خانواده کپور ماهیان
۱۰	۲-۱-۱۰- کپور معمولی
۱۱	۲-۱-۱۱ ارزش اقتصادی ماهی کپور

۱۱	۲-۲ آشنایی با سیستم ایمنی ماهی
۱۲	۱-۲-۲ مکانیسم های دفاع غیر لنفوئیدی
۱۴	۲-۲-۲ مولکول های دفاع غیر اختصاصی هومورال
۱۵	۱-۲-۲-۲ لایزوزیم
۱۸	۲-۲-۲-۲ کمپلمان
۱۹	۳-۲ مکانیسم های دفاع سلولی غیر اختصاصی
۲۰	۴-۲ محرک های ایمنی در آبزیان
۲۳	۵-۲: گیاه صبر زرد <i>Aloe vera</i>
۲۴	۱-۵-۲: ترکیبات موجود
۲۵	۲-۵-۲: اثرات درمانی
۲۶	۳-۵-۲- اسمانان
۲۷	۴-۵-۲ باکتری آئروموناس هیدروفیلا
۲۷	۵-۵-۲ تحقیقات داخل کشور
۲۷	فصل سوم: مواد و روش کار
۳۰	۱-۳ مواد و تجهیزات مورد استفاده در طرح
۳۰	۱-۱-۳ تجهیزات
۳۰	۲-۱-۳ مواد مصرفی
۳۱	۲-۳ مراحل انجام تحقیق
۳۱	۱-۲-۳ مکان انجام تحقیق

۳۲	۲-۲-۳ تهیه عصاره ها
۳۲	۳-۲-۳ تهیه خوراک حاوی عصاره
۳۳	۴-۲-۳ تهیه ماهی
۳۴	۵-۲-۳ تیمار بندی ماهیها
۳۴	۶-۲-۳ تهیه واکسن و ایمن سازی
۳۴	۷-۲-۳ تغذیه با خوراک حاوی عصاره
۳۴	۸-۲-۳ خون گیری
۳۵	۳-۳ آزمایشات انجام شده روی نمونه ها
۳۵	۱-۳-۳ اندازه گیری لایزوزیم سرم
۳۶	۲-۳-۳ بررسی قدرت باکتری کشی سرم
۳۶	۳-۳-۳ اندازه گیری فعالیت مسیر آلترناتیو کمپلمان
۳۷	۴-۳-۳ آزمایش مسیر فرعی کمپلمان (ACP)
۳۷	۵-۳-۳ تعیین LD50 باکتری آئروموناس هیدروفیلا
۳۸	۶-۳-۳ محاسبه میزان بقای نسبی RPS
۳۹	۷-۳-۳ آزمون آماری
۴۰	فصل چهارم: نتایج
۴۱	۱-۴ میزان لایزوزیم سرم
۴۲	۲-۴ قدرت باکتری کشی سرم

۴۳	۳-۴ فعالیت سیستم کمپلمان
۴۴	۴-۴ میزان بقای نسبی یا RPS
۴۶	فصل پنجم: بحث
۴۷	بحث
۵۱	پیشنهادات
۵۱	فصل ششم: منابع
۵۲	منابع
	چکیده انگلیسی

فهرست جداول

صفحه	عنوان
۶	جدول ۱-۲: رده بندی ماهی کپور معمولی
۲۳	جدول ۲-۲: محرک های ایمنی در آبزیان

فهرست نمودارها

صفحه	عنوان
۴۱	نمودار ۱-۴: نتایج مربوط به فعالیت لایزوزیم سرم در تیمارهای ایمن بر اساس $\text{Mean}\pm\text{SD}$
۴۲	نمودار ۲-۴: میانگین میزان فعالیت لایزوزیم سرم در گروه های ایمن و غیر ایمن در چهار مرحله نمونه گیری
۴۳	نمودار ۳-۴: قدرت باکتری کشی سرم بر اساس تعداد زنده شمارش شده در محیط کشت بر اساس $\text{Mean}\pm\text{SD}$
۴۴	نمودار ۴-۴: فعالیت کمپلمان در تیمارهای چهار گانه در مراحل مختلف نمونه گیری
۴۵	نمودار شماره ۴-۵: نمودار تلفات تجمعی در تیمارهای مختلف در مدت ۱۴ روز بعد از چالش
۴۵	نمودار شماره ۴-۶: درصد بقای نسبی در ۴ تیمار مورد تحقیق در طول ۱۴ روز دوره بعد از چالش

فهرست تصاویر

صفحه

عنوان

۲۵

شماره ۱-۲: گیاه صبر زرد

چکیده پایان نامه

نام خانوادگی: رنجبر	نام: محمد مهدی
<p>عنوان پایان نامه: بررسی اثر عصاره خام گیاه صبرزرد (<i>Aloe vera</i>) بر برخی فاکتورهای ایمنی غیر اختصاصی و میزان محافظت بعد از چالش با دوز کشنده باکتری <i>آئروموناس هیدروفیلا</i> در ماهی کپور معمولی <i>Cyprinus carpio</i></p>	
<p>استاد راهنمای اول: دکتر مجتبی علیشاهی</p> <p>استاد راهنمای دوم: دکتر مسعود قربانپور</p>	
<p>درجه تحصیلی: دکترای عمومی رشته: دامپزشکی گرایش: دامپزشکی</p>	
<p>دانشگاه: دانشگاه شهید چمران</p>	
<p>دانشکده: دامپزشکی</p>	
<p>تاریخ فارغ التحصیلی: تعداد صفحه: ۶۲</p>	
<p>واژه های کلیدی: آلوئه ورا، کپور معمولی، <i>آئروموناس هیدروفیلا</i>، ایمنی غیر اختصاصی، لایزوزیم</p>	
<p>در این تحقیق اثرات تحریک ایمنی تجویز خوراکی عصاره خام گیاه صبر زرد در ماهی کپور معمولی ارزیابی گردید. بدین منظور ۳۰۰ قطعه ماهی کپور به ۴ گروه مساوی تقسیم گردیدند. گروه اول با باکتری کشته <i>آئروموناس هیدروفیلا</i> ایمن شده و با عصاره <i>آلوئه ورا</i> تغذیه گردید. گروه دوم نیز با همین باکتری ایمن شده ولی با خوراک معمولی تغذیه شد. گروه سوم فقط با خوراک حاوی <i>آلوئه ورا</i> تغذیه گردید. گروه چهارم نیز به عنوان کنترل (غیر ایمن تغذیه شده با خوراک معمولی) در نظر گرفته شد. نمونه خون هر دو هفته در طول ۸ هفته تهیه گردید. نمونه ها از نظر برخی فاکتورهای ایمنی (فعالیت لایزوزیم، فعالیت ضد باکتریایی سرم، فعالیت کمپلمان) بررسی گردیدند. در انتهای دوره ۲۰ ماهی از هر تیمار با باکتری زنده <i>آئروموناس هیدروفیلا</i> چالش داده شد و درصد بقای نسبی بین تیمارها مقایسه گردید. نتایج مشخص نمود که درصد بقای نسبی در تیمارهای تغذیه شده با <i>آلوئه</i> افزایش معنی</p>	

داری یافته است، فعالیت لایوزیم تیمارهای تغذیه شده با آلوئه ورا نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری نشان داد ($P < 0,05$). تفاوتی در فعالیت کمپلمان و قدرت ضد باکتریایی سرم بین تیمارهای تغذیه شده با آلوئه ورا در مقایسه با تیمارهای تغذیه شده با خوراک فاقد آلوئه ورا مشاهده نگردید ($P > 0,05$). این مطالعه نشان داد که تجویز خوراکی آلوئه ورا باعث تحریک برخی پاسخ‌های ایمنی غیر اختصاصی و مقاومت در برابر عفونت آئروموناسی در ماهی کپور معمولی می‌گردد.

مقدمه و هدف

نیازهای تغذیه‌ای انسان به خصوص نیاز به پروتئینی باعث شده است که انسان از دیرباز به اهلی نمودن حیوانات و ازدیاد پرورش آنها همت گمارد. در این میان آبزیانی چون ماهی و میگو از سهم بسزایی برخوردار بوده و پرورش ماهی با توجه به رشد سریع جمعیت در سال‌های اخیر رونق چشمگیری یافته است (۷ و ۱۶).

در بیشتر کشورهای اروپایی و آسیایی و در برخی نواحی آمریکای مرکزی، ماهی کپور معمولی^۱ یکی از مهمترین ماهیان پرورشی به شمار می‌آید و از معدود گونه‌های ماهی است که می‌توان آن را به عنوان ماهی اهلی به شمار آورد. ماهی کپور نسبت به اعمال مختلف مانند برداشت محصول، رقم‌بندی بر حسب اندازه، نقل و انتقال و غیره و نیز نسبت به تغییرات درجه حرارت و میزان اکسیژن بسیار مقاوم است.

^۱ *Cyprinus carpio*

استفاده از آنتی بیوتیک‌های تجاری برای درمان بیماری‌ها در آبزیان تبعات متعددی را در بر دارد، که از آن جمله، افزایش سویه‌های باکتریایی مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها در آبزیان و نیز در انسان (بواسطه مصرف گوشت ماهی)، آسیب به محیط زیست، هزینه بالا و مشکلات اجرایی مصرف می‌باشد (۴۰). به همین دلیل جستجو برای یافتن موارد جایگزین هدف بسیاری از تحقیقات قرار گرفته است.

با توجه به ساختار اولیه و ساده سیستم ایمنی ماهی و نقش پررنگ تر ایمنی ذاتی (غیر اختصاصی) نسبت به ایمنی اختصاصی، استفاده از محرک‌های ایمنی که ایمنی غیر اختصاصی را تحریک می‌نمایند، جایگاه مناسب تری در ماهی نسبت به حیوانات تکامل یافته‌تر، مثل پستانداران، یافته است (۱۱، ۴۰ و ۵۴).

از طرفی به دلیل عدم تکامل سیستم ایمنی اختصاصی در ماهی، استفاده از واکسن‌ها در مقایسه با حیوانات خونگرم کارایی و حفاظت کمتری برای پیشگیری از بیماری‌های ماهی داشته و قیمت بالای واکسن‌ها و روش‌های تجویز پرهزینه باعث محدودیت‌های جدی در استفاده از واکسن‌ها در ماهی بوده است (۱۲).

به همین دلیل اخیراً استفاده از محرک‌های ایمنی در ماهی‌های پرورشی، به عنوان جایگزینی برای آنتی بیوتیک‌ها، افزایش فعالیت مکانیسم‌های دفاع غیر اختصاصی و ایجاد مقاومت در مقابل استرس‌ها، بویژه بیماری‌ها رایج شده است (۱۱، ۵۲ و ۵۴).

در بین محرک‌های ایمنی متعدد، محرک‌هایی که از گیاهان مشتق شده اند مزیت‌های نسبی در مقایسه با بقیه محرک‌های ایمنی در ماهی دارند، عدم ایجاد مقاومت در باکتری‌ها، آسیب کمتر به محیط زیست، قیمت پایین تر و در دسترس بودن از این ویژگی‌هاست. در گزارشات متعدد به

ویژگی‌های دارویی خاص گیاه *آلوئه ورا* (صبر زرد) ، بویژه تحریک سیستم ایمنی در حیوانات خونگرم اشاره شده است و به عنوان یکی از محرک‌های ایمنی گیاهی معروف شده است (۲۹,۵۵). از آنجا که تا به حال تحقیقی در مورد بررسی اثرات تحریک ایمنی گیاه *آلوئه ورا* در ماهی انجام نشده است، بررسی اثرات تحریک ایمنی این گیاه در روش خوراکی در ماهی کپور معمولی هدف این تحقیق قرار گرفت.

فصل دوم

کلیات

۱-۲- کلیاتی پیرامون ماهی کپور

ماهی کپور معمولی از گروه مهره‌داران، رده ماهیان استخوانی، زیررده ماهیان استخوانی دیرینه، راسته استاریوفیزی، زیر راسته کپورسانان و خانواده کپور ماهیان و جنس و گونه کپور معمولی

است (جدول ۱-۲) (۱۴).

کپور معمولی با نام علمی *Cyprinus carpio*، در ابتدا بومی ناحیه آسیای مرکزی بوده و طی قرن‌های متمادی به نواحی مختلف جهان گسترش طبیعی پیدا کرده و یا توسط انسان منتقل شده است (۴).

جدول شماره ۲-۱- رده بندی ماهی کپور معمولی (۱۱)

نام فارسی	نام لاتین	نام طبقه	طبقه بندی
طنابداران	Chordata	شاخه	Phylum
مه‌ره داران	Vertebrata	زیر شاخه	Subphylum
آرواره داران	Gnathostomata	فوق رده	Superclass
ماهیان	Pisces	گروه	Grade
ماهیان استخوانی	Osteichthyes	رده	Class
ماهیان شعاع باله	Actinoptergii	زیر رده	Subclass
نئوپترجی	Neoptergii	تحت زیر رده	Infraorder
ماهیان استخوانی	Teleosti	گروه	Group
استاریو فیزی	Ostariophysii	فوق راسته	Superorder
کپور ماهی شکلان	Cypriniformes	راسته	Order
سپیرینوئید	Cyprinoidei	زیر راسته	Suborder
کپور ماهیان	Cyprinidae	خانواده	Family
کپور	Cyprinus	جنس	Genus

۲-۱-۱- شاخه طنابداران^۲

شامل سه ریز شاخه غلاف‌داران^۳، بی‌سران^۴ و مه‌ره‌داران^۵ می‌باشد. مشخصات این شاخه عبارتند از: داشتن لوله عصبی، طناب پشتی، تقارن جانبی و دو طرفه بدن و وجود شکاف‌های احشایی در قسمت قدامی لوله گوارش که حداقل در مرحله رویانی معتبرند (۶).

۲-۱-۲- زیر شاخه مه‌ره‌داران

2 - Chordata -
3 - Tunicata
4 - Acrania
5 - Vertebrata

این زیرشاخه شامل دو فوق رده دهان گردان^۶ و آرواره داران^۷ است و داشتن جمجمه، لنز، ستون مهره و گردش خون بسته، خصوصیات اصلی زیر شاخه مهره داران است (۶).

۲-۱-۳- فوق رده آرواره داران

شامل ۷ رده می باشد. یک رده از آنها که پلاکودرمها^۸ (از ماهیان زره دار دوران اول) می باشند، کاملاً منقرض شده است (۶). همه اعضاء این فوق رده دارای آرواره بوده و معمولاً اندامهای آنها جفت می باشد (۵). این فوق رده شامل دو گریدها^۹ و ماهیان^{۱۰} می شود.

-
- 6 - Agnatha
 - 7 - Genatostomata
 - 8 - Placoderms
 - 9 - Terapoda
 - 10 - Fishes

۲-۱-۴- گرید ماهیان

در تألیفات اخیر حدود ۲۳۲۵۰ گونه ماهی توصیف شده، اما چون هر سال گونه‌های جدیدی توصیف می‌شوند، لذا تخمین زده شده که تعداد کل گونه‌های ماهی به ۳۰ هزار گونه یا بیشتر برسد (۷) اعضاء این گروه دارای باله‌های زوج، آبشش و پوست پولک دار هستند (۵).

۲-۱-۵- رده ماهیان استخوانی^{۱۱}

شامل ۴ زیر رده است (۶). که اکثراً دارای اسکلت استخوانی، پولک‌های پوستی، آبشش و باله هستند (۵).

۲-۱-۶- زیررده ماهیان شعاع باله^{۱۲}

شامل سه گروه کوندروستی^{۱۳}، هولوستی^{۱۴}، تلئوستی^{۱۵} می‌باشد. در طی تکامل بسیار سریع این گروه در جهات مختلف، به سختی می‌توان فهرست کاملی از صفات مشترک آنها ذکر کرد (۶). در اکثر اعضاء این گروه باله‌های زوج، به وسیله شعاع‌های پوستی نگه‌داری می‌شوند؛ کیسه‌های بینی^{۱۶} آنها فقط به سمت بیرون باز می‌شوند. تلئوست‌ها یا ماهیان استخوانی حقیقی که در تحت ریز رده^{۱۷} نئوپترجی^{۱۸}، از این رده قرار دارند، با نزدیک به ۲۰ هزار گونه، معرف مهم‌ترین گروه مهره داران کنونی بوده و تشکیل دهنده عنصر اساسی، اجتماعات آبهای شیرین و دریایی می‌باشند (۶).

۲-۱-۷- فوق راسته استاریوفیز^{۱۹}

11 - Osteichthyes
12 - Actinoptergii
13 - Chondrostei
14 - holostei
15 - Teleostei
16 - Nasal sacs
17 - Infra class
18 - Neoptergii
19 - Ostariophys

در اعضای این فوق راسته، سطح شکمی مهره‌ها به هم جوش خورده و بخش کناری مهره‌ها به هم پیوسته شده و به شکل استخوانچه، بین کیسه شنا و گوش قرار گرفته است. کیسه شنا، دو یا سه بخش بوده که بیشتر بوسیله مجرای کیسه شنا^{۲۰} به مری راه می‌یابد(۵).

۲-۱-۸- راسته کپور شکلان^{۲۱}

نزدیک به ۲۷۰۰ گونه‌ای که در این راسته قرار دارند، از نظر ظاهر خارجی متنوع و گوناگون هستند، اما بیشتر آنها دارای دهان قابل بیرون زدن و فاقد دندان هستند و دندان‌های حلقی ویژگی یافته دارند(۸).

۲-۱-۹- خانواده کپور ماهیان^{۲۲}

خانواده ماهیان قنات یا کپور بزرگ‌ترین خانواده در بین ماهیان با ۲۱۰ جنس و ۲۰۱۰ گونه است(۹).

اعضای این خانواده را می‌توان براساس داشتن دندان حلقی (در یک تا سه ردیف که هرگز تعداد آنها در هر ردیف از هشت عدد تجاوز نمی‌کند) و لب‌های نازک (معمولاً در مرز آرواره فوقانی تنها استخوان پیش فکی دیده می‌شود) تشخیص داد. اگر چه بیشتر آنها تنها دارای شعاع‌های نرم در باله‌های خود هستند، اما شعاع‌هایی که تغییر شکل یافته و به خار تبدیل شده‌اند، در بعضی از اشکال وجود دارد، که جالب توجه‌ترین آنها کپور معمولی و ماهی طلایی^{۲۳} هستند. تعداد کروموزوم‌های کپور ماهیان ۲۸، ۵۰ عدد و گاهی ۴۸ عدد است. کپور ماهیان با در نظر گرفتن تعداد گونه همگی دارای طرح و شکلی هستند که تفاوت آنها عمدتاً مربوط به طرح و زمینه کلاسیک این

20 - *Pneumaticduct*

21 - Order: *CYPRINIFORMES*

22 - Family: *Cyprinidae*

23 - *Carasius auratus*