

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**GYÓGYNÖVÉNYKIVONATOK ALKALMAZÁSA HALAK EGÉSZSÉGI
ÁLLAPOTÁNAK ÉS TERMÉSZETES IMMUNVÁLASZÁNAK JAVÍTÁSÁRA**

Ardó László

Témavezetők: Dr. Jeney Galina PhD; Dr. Stündl László PhD



DEBRECENI EGYETEM

Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2013

1. A doktori értekezés előzményei és célkitűzései

Napjainkban általánosan elfogadott az az elmélet, amely szerint a halbetegségek kialakulásához az alábbi három tényező egyidejű jelenléte szükséges: kórokozó, környezeti stressz és a hal legyengült szervezete. A halbetegségek megelőzésében és gyógyításában tehát három főirányt lehet követni, amelyek a három tényező valamelyikének az eltávolítására vagy megszüntetésére irányulnak.

A kórokozók eltávolításának leggyakrabban alkalmazott módszere a különféle antibiotikumok és kemoterápiás szerek használata. Alkalmazásuk legnagyobb hátránya, hogy többségük felhalmozódik a halban vagy a vízi környezetben, emiatt a halbetegségek kezelésére csak kevés vegyszert vagy gyógyszert engedélyeztek. Az antibiotikumos kezelések további hátránya, hogy elősegítik a rezisztens kórokozók kialakulását és gyengítik a halak immunrendszerét.

A második irány a vízi környezeti stressz csökkentése, amelynek egyik lehetősége a víz minőségének javítása, de ezt egyre inkább akadályozza a természetes, felszíni vizek romló minősége. A zsúfoltság és a szállítás okozta stressz kivédése pedig az iparszerű haltenyésztés, különösen az intenzív rendszerű halnevelés körülményei között gyakran megoldhatatlan feladatot jelent.

A halbetegségek megelőzésének legígéretesebb módszere a halak ellenálló-képességének növelése, amely oltóanyagok (vakcinák) valamint a természetes immunrendszert erősítő anyagok, az immunstimulátorok alkalmazásával valósítható meg. A vakcinálást tartják a leghatékonyabb eljárásnak, azonban egy oltóanyag csak egy adott patogénnel szemben hatásos, és a sejteken belül élősködő kórokozók (pl. a *Renibacterium salmoninarum*) ellen máig sem sikerült hatékony vakcinát kifejleszteni.

A vakcinákkal ellentétben az immunstimulátorok nem a specifikus, hanem a természetes immunválaszt erősítik, emiatt a hatásuk rövid távú és nem járulnak hozzá az immunológiai memória kialakulásához. Ennek ellenére hatékonyan alkalmazhatók a halak betegségekkel szembeni ellenálló-képességének növelésére. Az immunstimulátorok változatos szerkezetű vegyületek. Poliszacharidok, peptidek, alkaloidok egyaránt vannak közöttük. A gyakorlatban injekció, fürdetés vagy etetés útján alkalmazhatók, amelyek közül az utóbbi a legelterjedtebb és legpraktikusabb módszer. Néhány immunstimulátor hatásának pontos molekuláris mechanizmusát is ismerjük, és különböző termékneveken a kereskedelmi forgalomban is kaphatók a természetes immunválaszt javító szerek.

A népi gyógyászatban régóta ismert bizonyos gyógynövények immunrendszert erősítő hatása, habár az aktív komponensek izolálása és azonosítása csak a 19. század végén kezdődött. A gyógynövényeknek különösen fontos szerepük van a kínai és indiai népi gyógyászatban, ahol már több mint 4000 éve alkalmazzák őket. A tradicionális orvoslás mindkét országban nagyobb hangsúlyt helyez a betegségek megelőzésére, mint gyógyításukra. Ezzel magyarázható, hogy sok immunstimuláló hatású gyógynövényt használnak, amelyek biológiailag aktív komponenseinek azonosítása és hatásmechanizmusuk kutatása napjainkban jelentős fellendülést mutat. Az utóbbi években egyre több kísérletet végeznek velük gazdasági szempontból fontos halfajokon, mivel a gyógynövényekből készült kivonatok a hagyományos immunstimulátorok mellett alkalmasak lehetnek a haltenyésztésben alkalmazott antibiotikumok és kemoterápiás szerek kiváltására.

A Halászati és Öntözési Kutatóintézet (HAKI) immunológiai kutatócsoportja közel 20 éve foglalkozik az immunstimulátorok kutatásával. Ezen a kutatási irányon belül kezdődött 2004-ben a gyógynövénykivonatok immunstimuláló hatásának vizsgálata. A doktori értekezésben ezeket a vizsgálatokat ismertetem.

Célkitűzések:

- Három kínai gyógynövény (*Astragalus membranaceus*, *Ganoderma lucidum* és *Lonicera japonica*) önmagukban vagy egymással kombináltan alkalmazott kivonatainak vizsgálata pontyokon és nílusi tilápiákon
- A gyógynövénykivonatoknak a vakcinálás hatékonyságára gyakorolt hatásának vizsgálata
- A gyógynövénykivonatok és egy nyomelem, a bór együttes, természetes immunválaszra gyakorolt hatásának vizsgálata
- A kísérleti eredmények alapján leghatékonyabbnak bizonyult gyógynövény vagy gyógynövény-kombináció kiválasztása
- A kiválasztott gyógynövény vagy gyógynövény-kombináció gyakorlati használhatóságának tesztelése félüzemi körülmények között pontyokon, nílusi tilápiákon és afrikai harcsákon.

2. A kutatás módszerei

2.1. Kísérleti elrendezések

A halakat ezekben a kísérletekben a HAKI recirkulációs halnevelő rendszerében tartottuk, 400 literes tartályokban. A kísérleti tápok elkészítéséhez kereskedelmi forgalomban kapható, porrá őrölt gyógynövénykivonatokat használtunk. Az *Astragalus*, a *Ganoderma* és a *Lonicera* kivonatait kukoricacsíra olajjal vittük fel a tápszemcsékre. Hasonló módon rögzítettük a tápszemcsékhez a bőrt tartalmazó tápkiegészítőt is. Kontrollként gyógynövényeket és bőrt nem tartalmazó tápokot használtunk. A napi takarmányadag a biomassa 2%-a volt. A kísérletek végén a halakat *Aeromonas hydrophila* baktériummal fertőztük egy elkülönített recirkulációs rendszerben.

2.1.1. Az *Astragalus*, a *Lonicera* és a *Ganoderma* kivonatainak hatása a tilápia természetes immunválaszára

A 3 hónapos, $70,9 \pm 10,5$ g egyedi átlagtömegű tilápiákat 4 csoportra osztottuk, csoportonként 50 db hallal. A halakat a következő gyógynövényeket tartalmazó tápokkal etettük: *Astragalus* 1,0%; *Ganoderma* 1,0%; *Astragalus* 0,5%+*Ganoderma* 0,5% és a kontroll táp. A halakat három hétig etettük. Ezt követően 20-20 db halat mindegyik csoportból mesterségen fertőztünk *A. hydrophila*-val (3×10^7 sejt/ml, ami LD₅₀-nek felel meg, i. p. 0,1 ml/hal), és az elhullást egy hétig figyeltük.

2.1.2. Az *Astragalus* és a *Ganoderma* kivonatainak hatása a ponty természetes immunválaszára és az *A. hydrophila* elleni vakcinálás hatékonyságára

Ebben a kísérletben nyolc csoportot állítottunk be, csoportonként 60 db hallal. A négy hónapos pontyok egyedi átlagtömege a kísérlet kezdetén $56,9 \pm 7,9$ g volt. A halakat a következő gyógynövényeket tartalmazó tápokkal etettük: *Astragalus* 1,0%; *Ganoderma* 1,0%; *Astragalus* 0,5% + *Ganoderma* 0,5% és a kontroll táp. Az első négy csoportban a halakat *Aeromonas hydrophila*/A. *salmonicida* elleni vakcinával (Shering Plough Ltd, Essex, Nagy-Britannia) oltottuk be kétszer, először a kísérlet elején, majd második hetet követően. A második 4 csoportban lévő halakat nem vakcináltuk, csak a fent leírt tápokot kapták. A halakat öt hétig etettük. Ezt követően 30-30 db halat

mindegyik csoportból mesterségen fertőztünk *A. hydrophila*-val ($1,2 \times 10^8$ sejt/ml, ami LD_{80-100} -nak felel meg, i.p. 0,1 ml/hal), és az elhullást egy hétig figyeltük.

2.1.3. Kétféle gyógynövénykivonat (*Astragalus* és *Lonicera*) és egy nyomelem, a bór hatása a ponty természetes immunválaszára

A 4 hónapos, $59,0 \pm 9,6$ g egyedi átlagtömegű pontyokat 4 csoportra osztottuk, csoportonként 60 db hallal. A halakat a következő gyógynövényeket tartalmazó tápokkal etettük: *Astragalus* 0,1% + bór (B); *Lonicera* 0,1% + B; *Astragalus* 0,1% + *Lonicera* 0,1 % + B és a kontroll táp. A bór koncentrációja 4 mg/kg, volt. A halakat négy hétig etettük. Ezt követően 20-20 db halat mindegyik csoportból mesterségen fertőztünk *A. hydrophila*-val (5×10^7 sejt/ml, amely LD_{50} -nek felel meg, i. p. 0,1 ml/hal) és az elhullást egy hétig figyeltük.

2.1.4. Az *Astragalus* és a *Lonicera* kivonatainak hatása a tilápia természetes immunválaszára önmagukban, illetve bórral kiegészítve

A 3 hónapos, $79 \pm 11,6$ g egyedi átlagtömegű tilápiákat 6 csoportra osztottuk, csoportonként 50 db hallal. A halakat a következő kísérleti tápokkal etettük: *Astragalus* 0,1%; *Lonicera* 0,1%; *Astragalus* 0,1% + B; *Lonicera* 0,1% + B; *Astragalus* 0,1% + *Lonicera* 0.1% + B és a kontroll táp. A bór koncentrációja most is 4 mg/kg volt. A halakat négy hétig etettük, ezt követően 20-20 db halat mindegyik csoportból mesterségen fertőztünk *A. hydrophila*-val (3×10^7 sejt/ml, ami LD_{50} -nek felel meg, i. p. 0,1 ml/hal) és az elhullást egy hétig figyeltük.

2.2. Félüzemi próbák

A félüzemi próbákat szintén a HAKI recirkulációs halnevelő rendszerében végeztük. A pontyok és a tilápiák 200-200 egyedből kialakított kísérleti csoportjait 500 literes, az afrikai harcsák 49 egyedből álló csoportjait pedig 20 literes kádakban neveltük. A halakat mindhárom kísérletben a következő összetételű tápokkal etettük: *Astragalus* 0,1% + *Lonicera* 0.1%; *Astragalus* 0,1% + *Lonicera* 0.1% + B és a kontroll táp. A bór koncentrációja 2 mg/kg volt. A napi takarmánymennyiség a tilápiáknál a biomassa tömegének 4%-a, pontyoknál 8%-a volt, míg az afrikai harcsánál a kezdeti

8%-ról fokozatosan 3%-ra csökkentettük. A takarmányozást most is önetetőikkel végeztük. A kísérleti tápokot a HAKI tápüzem készítette. A tilápiákat és pontyokat tilápia táppal, az afrikai harcsákat pedig harcsatáppal etettük.

A kísérletek kezdetén a tilápiák egyedi átlagtömege $23 \pm 0,7$ g, a pontyoké $2,6 \pm 0,1$ g, az afrikai harcsáké pedig $6,6 \pm 0,4$ g volt. A halak kis mérete miatt ezekben a kísérletekben csak egyszer vettünk mintát, a tilápiáknál hat hétig, a pontyoknál és az afrikai harcsáknál pedig négy hétig tartó etetés után. A halakat ezekben a kísérletekben nem fertőztük.

2.3. Az immunválasz és az ellenálló-képesség meghatározására alkalmazott laboratóriumi módszerek

2.3.1. Vérmintavétel a kísérleti halakból

A laboratóriumi kísérleteknél hetente egyszer, csoportonként 5 db halból vettünk vérmintát. A félüzemi kísérletekben csak egyszer, a kísérlet végén volt vérmintavétel, csoportonként 10 db halból. A minták térfogata minden kísérletben 1 ml volt. A vérvétel előtt a halakat literenként 40g norcaicumot és 10 ml adrenalint (Tonogént) tartalmazó altatóval elaltattuk. Egy halból csak egy mintát vettünk, hogy elkerüljük a többszöri vérvétel okozta stresszhatást. A mintavételek előtt véralvadásgátlóként heparinnal kezeltünk minden olyan eszközt, amely érintkezett a vérrel (injekciós tűk, fecskendők, transzfer pipetták, Eppendorf-csövek).

2.3.2. Fehérvérsejtek és vérplazma izolálása a vérmintákból

A vérmintákból sűrűséggradiens-centrifugálással izoláltuk a fehérvérsejteket és a vérplazmát. Szilikonizált centrifugacsövekbe 1-1 ml Histopaque 1.119-et (Sigma) töltöttünk, amelyre 1-1 ml Histopaque 1.077-et (Sigma) rétegeztünk. Mindkét réteg 120 μ l Bacto Hemagglutination Buffert tartalmazott (Difco, USA). A vérmintákat óvatosan a Histopaque 1.077-re rétegeztük, majd 4°C-on, 700 G erővel centrifugáltuk. A centrifugálás időtartama a tilápiákból és afrikai harcsákból származó minták esetében 30 perc, a pontyokból származó minták esetében pedig 35 perc volt. A centrifugálás után a fehérvérsejtek a két Histopaque réteg között gyűltek össze, a vérplazma pedig a gradiens felett. A vérplazmát eltávolítottuk és további vizsgálatok céljára -20 °C-on

lefagyasztottuk. A fehérvérsejteket is eltávolítottuk, és centrifugacsövekben Hank-féle sóoldatban (Hank's Balanced Salt Solution, HBSS, Sigma) centrifugálással mostuk. A sejtszuszpenziók térfogatát ezután HBSS-sel 1 ml-re állítottuk be. Bürker-kamrában megszámoltuk a sejteket, és a sejtek koncentrációját ez alapján minden mintában 1×10^7 sejt/ml-re állítottuk be.

2.3.3. A fehérvérsejtek fagocitáló aktivitásának mérése

A mérés során a sejtek kongóvörössel megfestett élesztősejteket fagocitálnak. Az élesztősejteket fagocitált fehérvérsejtek tömegük alapján elválaszthatók az inaktív sejtektől és a megmaradt élesztősejtektől. Műanyag centrifugacsövekben minden mintából 1 ml fehérvérsejt-szuszpenziót kevertünk 1 ml, kongóvörössel festett élesztő-szuszpenzióhoz. 60 perces, szobahőmérsékleten történt inkubációt követően a sejtszuszpenziók alá 3 ml Percoll 1.055-öt (Sigma) rétegeztük. A mintákat 20°C-on, 850 G erővel 3 percig centrifugáltuk, ezzel elválasztottuk a fehérvérsejteket a megmaradt élesztősejtektől. A fehérvérsejteket eltávolítottuk és HBSS-ben centrifugálással mostuk. A sejteket 1 ml tripszin-EDTA oldatban (5,0 g/l tripszin és 2,0 g/l EDTA, Sigma) szuszpendáltuk fel, és 37°C-on egy éjszakán keresztül inkubáltuk, majd lemértük a minták fényelnyelését 510 nm hullámhosszon, a tripszin-EDTA oldatot használva referenciaként.

2.3.4. A fehérvérsejtek respirációs aktivitásának mérése (sejten kívül)

Az izolált fehérvérsejtek sejten kívüli (extracelluláris) respirációs aktivitását (oxidatív szabadgyök-termelését) a ferricitokró-m-c redukciója alapján határoztuk meg. A sejtkoncentráció beállítása után a sejteket 96 üregű mikrotiter-lemezekre osztottuk szét. Egy üreg 100 μ l sejtszuszpenziót tartalmazott. A mérést három párhuzamossal végeztük. A mintákhoz azonos mennyiségű, 2 μ g/ml koncentrációjú ferricitokró-m-c oldatot adtunk, amely 1 μ g/ml koncentrációban forbol-mirisztilsav-acetátot (phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA, Sigma) tartalmazott. A reakció specificitásának ellenőrzésére egy másik mintasorhoz olyan ferricitokró-m-c oldatot adtunk, amely a PMA-n kívül 300 U/ml koncentrációban szuperoxid-dizmutázt (SOD, Sigma) is tartalmazott. A mintákat sötétben, szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk, majd megmértük a fényelnyelésüket 550 nm hullámhosszon. A csak PMA-val kezelt minták

fényelnyelés értékeiből kivontuk a PMA/SOD-dal kezelt minták értékeit, az eredményt megszoroztuk 15,87-dal, így megkaptuk a termelt szuperoxid-gyökök (O_2^-) mennyiségét nanomólban.

2.3.5. A fehérvérsejtek respirációs aktivitásának mérése (sejten belül)

A fehérvérsejtek sejten belüli (intracelluláris) respirációs aktivitásának meghatározására a nitroblue-tetrazolium (NBT, Sigma) nevű festék oxidációján alapuló módszert használtuk. A sejtek koncentrációját most is 1×10^7 sejt/ml-re állítottuk be, de nem HBSS-sel, hanem L-15 sejttenyésztő tápoldattal (Sigma). A koncentráció beállítása után a sejteket 96 üregű mikrotiter-lemezekre osztottuk szét. Egy üreg 100 μ l sejtuszpenziót tartalmazott. A mérést négy párhuzamossal végeztük. A sejteket először két óráig 19 °C hőmérsékleten inkubáltuk, majd eltávolítottuk a táptalajt, amelynek helyére üregenként 100 μ l NBT oldatot (2 mg/ml NBT és 10 μ l/ml forbol-mirisztilsav-acetát (PMA)) pipettáztunk. Egyórás, szobahőmérsékleten történt inkubáció után az NBT oldatot leöntöttük, és a sejteket öt percig 100%-os metanolban fixáltuk, majd háromszor 70%-os etanolban mostuk, ezután 20 percig levegőn, elszívófülke alatt szárítottuk. A sejtek által felvett NBT az oxidatív szabadgyökök hatására vízben oldhatatlan, kék színű formazánná alakult, amelyet üregenként 120 μ l 2M kálium-hidroxid és 140 μ l dimetil-szulfoxid hozzáadásával oldottunk fel. A türkizkék színű oldat fényelnyelését spektrofotométerrel, 620nm hullámhosszon mértük. A fényelnyelés intenzitása egyenesen arányos a termelt szabadgyökök mennyiségével.

2.3.6. A vérplazma lizozimaktivitásának mérése

A méréshez *Micrococcus lysodeikticus* baktériumokat (Sigma) szuszpendáltunk fel foszfátpufferben (0,05M; pH 6,2), 0,02% (w/v) koncentrációban. Standard sorozatkéntként liofilizált tojásfehérje-lizozim (Sigma) 0,5; 1; 2,5; 5; 10 és 20 μ g/ml-es oldatait használtuk. Minden mérés előtt új standard görbét vettünk fel. A mérést három párhuzamossal végeztük. Mikrotiter-lemez üregeibe 50-50 μ l vérplazmát vagy standard oldatot pipettáztunk, amelyhez 250 μ l *Micrococcus*-szuszpenziót adtunk. A szuszpenziók fényelnyelését spektrofotométerrel, 531 nm hullámhosszon mértük két alkalommal, a *Micrococcus*-szuszpenzió hozzáadása után azonnal és 20 perccel később. A lizozim a baktériumokat a baktériumok sejtfalát elbontja, a baktériumokat elpusztítja

(lizálja), emiatt a második mérés fényelnyelés-értékei alacsonyabbak az első mérés értékeinél. Az előbbi értékeket kivonva az utóbbiakból a standard görbe segítségével kiszámítottuk a vérplazmaminták lizozimkoncentrációját.

2.3.7. A vérplazma fehérjeszintjének meghatározása

A vérplazma összes fehérjeszintjét a Biuret-reakción alapuló kolorimetriás módszerrel határoztuk meg, amelyhez egy előre összeállított diagnosztikai reagenskészletet (Reanal) használtunk. A mérést három párhuzamossal végeztük. Mikrotiter-lemez üregeibe 10-10 µl vérplazmát vagy standard oldatot pipettáztunk, amelyhez 300 µl hígított Biuret reagenst adtunk. 20 perces, szobahőmérsékleten történt inkubáció után spektrofotométerrel, 550 nm hullámhosszon lemértük az oldatok fényelnyelését. A fehérjekoncentrációt az alábbi képlet segítségével számoltuk ki: $y = A_m / A_{st} * x$, ahol y a minta fehérjekoncentrációja, A_m a minta fényelnyelése, A_{st} a standard oldat fényelnyelése, x pedig a standard oldat ismert koncentrációja.

2.3.8. A vérplazma immunoglobulin-szintjének meghatározása

A vérplazmában lévő összes immunoglobulin koncentrációját az előzőhöz hasonló módszerrel határoztuk meg. Mikrotiter-lemez üregeibe 50-50 µl vérplazmát és ugyanennyi polietilén-glikolt (PEG, Sigma) pipettáztunk. Szobahőmérsékleten két óráig inkubáltunk, majd a lemezeket lecentrifugáltuk 1000 G erővel, 15 percig. Ezután meghatároztuk a felülúszó fázis fehérjekoncentrációját a fentebb ismertetett módszerrel. A mérést most is három párhuzamossal végeztük. Ezt az értéket kivontuk a fehérjekoncentrációból, ezzel megkaptuk a vérplazma immunoglobulin-koncentrációját.

2.3.9. Halak fertőzése *Aeromonas hydrophyla* baktériummal

A kísérletek végén (a félüzemi kísérletek kivételével) minden csoportból azonos számú halat fertőztünk az *A. hydrophila* baktérium egy virulens törzsével (B2/12). A 4°C-on, szilárd táptalajon tartott baktériumokat 10 ml TSB (Tryptic Soy Broth, Fluka) tápoldatba oltottuk, majd 28°C-on egy napig inkubáltuk. A folyadékkultúrát lecentrifugáltuk, a kiülepedett baktériumokat felszuszpendáltuk 10 ml PBS (Phosphate Buffered Saline) oldatban, majd centrifugálással mostuk. A baktériumok

koncentrációját a szuszpenzió 610 nm-en mutatott fényelnyelése alapján PBS-sel az LD₅₀ koncentrációra állítottuk be. Ez az a dózis, amely a kísérleti állatok 50%-ának elhullását okozza. Értékét mindig előzetes kísérletekkel határoztuk meg. A halak hasüregébe 0,1 ml baktériumszuszenziót oltottunk, majd egy héten keresztül regisztráltuk az elhullást és kiszámoltuk a megmaradási értékeket. A kísérlet végén a túlélő halakat túlaltatással elpusztítottuk. Valamennyi haltetemet (a fertőzés és a túlaltatás miatt elhullottakat is) klórmésszel fertőtlenítettük. A fertőzőes kísérlethez használt 8 köbméteres recirkulációs haltartó rendszer vizét a kísérletek ideje alatt a rendszerbe épített ultraibolya (UV) fényű lámpával fertőtlenítettük, leeresztés előtt pedig 24 óráig 14 liter háztartási hipóval kezeltük.

2.3.10. Az *Aeromonas hydrophila* elleni specifikus antitestek szintjének meghatározása

A pontyokkal elvégzett első kísérletben a gyógynövénykivonatok hatását nemcsak a halak természetes immunválaszára vizsgáltuk, hanem az *A. hydrophila* elleni vakcinálás hatékonyságára is. A valamennyi vakcinált csoport halaiból és a nem vakcinált kontroll halakból vett vérplazma-mintákban egy indirekt ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) módszerrel határoztuk meg a baktérium elleni specifikus antitestek szintjét. Mikrotiter-lemezek üregeibe *A. hydrophila* baktériumokból készített szuszpenziót pipettáztunk, amelynek optikai denzitását (610 nm hullámhosszon) PBS oldattal 1,0 értékre állítottuk be. Egy éjszakán át 4°C-on inkubáltunk, ezalatt a baktériumok kitapadtak az üregek falára. A szuszpenziót ezután eltávolítottuk, a lemezeket a megfelelő pufferrel háromszor mostuk. A vérplazmamintákból PBS-sel hígítási sorokat készítettünk 1/32-es hígítástól egészen 1/4096-ig. A hígított vérplazmamintákból 100-100 µl-t a lemezek üregeibe pipettáztunk, majd a lemezeket egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk. A megfelelő pufferrel elvégzett ötszöri mosást követően az üregekbe 100-100 µl antitest-szuszenziót adtunk. Az általunk használt monoklonális antitestet a gyártó (Aquatic Diagnostics Ltd., Stirling, Nagy-Britannia) a ponty antitestek ellen fejlesztette ki, és tormagyökér-peroxidázzal konjugálta. Egyórás, szobahőmérsékleten történt inkubáció és az ezt követő mosás után az üregekbe 100-100 µl színeképzőt (Tetrametil-benzidin-hidroklorid (TMB), foszfát pufferben oldva) pipettáztunk, majd szobahőmérsékleten tíz percig inkubáltunk. A reakciót 50 µl 2M kénsav hozzáadásával állítottuk le. A keletkezett sárga színű oldat fényelnyelését spektrofotométerrel, 450 nm hullámhosszon mértük. Egy reakciót akkor tekintettünk

pozitívnak, ha a fényelnyelése legalább háromszor magasabb volt a negatív kontroll értékénél. Az értékeléshez a végpontot használtuk, vagyis a mintáknak azt a legnagyobb hígítását, amely még pozitív reakciót adott.

2.3.11. Statisztikai elemzés

A méréseket mintánként három vagy négy párhuzamossal végeztük, kivéve a fagocitáló aktivitás meghatározását, amelynél minden mintát csak egyszer mértünk le. Az adatok feldolgozása során a párhuzamosok átlagával számoltunk. Minden mintavételkor csoportonként öt haltól vettünk mintát, ezek adataiból számtani átlagot számoltunk. Az egyes csoportok mérési eredményei közötti különbségeket egytényezős variancia-analízissel és Student-Newman-Keuls próbával, $p < 0,05$ szignifikanciaszinten értékeltük, kivéve a megfelelő vakcinált és nem vakcinált csoportok értékeit, mert ezeket t-próbával hasonlítottuk össze. Az adatokat oszlopdiagramokon ábrázoltuk, amelyeken az adatok számtani átlagát és a standard hibát (Standard Error of Mean, SEM) tüntettük fel.

Az adatok statisztikai kiértékeléséhez és az ábrák megrajzolásához az SPSS., Inc. által kifejlesztett SigmaStat és SigmaPlot számítógépes programokat használtuk.

3. Az értekezés új tudományos eredményei

1. Tilápiákkal elvégzett első kísérletünkben az *Astragalus* és a *Ganoderma* keveréke bizonyult a leghatékonyabb immunstimulátornak, mivel jelentős mértékben javította a fehérvérsejtek fagocitáló-, és a vérplazma lizozimaktivitását is, és az *A. hydrophila* fertőzés utáni mortalitás is ebben a csoportban volt a legalacsonyabb. Az önmagában alkalmazott *Astragalus*- és *Ganoderma*-kivonatnak ennél enyhébb, de még mindig pozitív hatása volt az immunválasz paramétereire és a bakteriális fertőzéssel szembeni ellenálló-képességre is.

2. Pontyokkal elvégzett egyik kísérletünkben az *Astragalus*, a *Ganoderma* és a két gyógynövény kombinációja is egyértelműen pozitív hatással volt a nem vakcinált halak természetes immunválaszára, amely jellemzően a fehérvérsejtek fagocitáló és légzési aktivitásának, illetve a vérplazma lizozimaktivitásának növekedésében mutatkozott meg. A vakcinált csoportokban az immunválasz paramétereire gyakorolt pozitív hatás nem volt ennyire egyértelmű. Az *A. hydrophila* fertőzés után viszont az összes kezelt csoportban alacsonyabb volt a mortalitás, mint a kontrollnál. Az *A. hydrophila* elleni specifikus antitestek szintjére a gyógynövénykivonatok nem voltak számottevő hatással.

3. Pontyokkal elvégzett következő kísérletünkben a haltápokat kétféle gyógynövénykivonat (*Astragalus* és a *Lonicera*) mellett egy nyomelemmel, a bórral is kiegészítettük. A kísérleti tápok jellemzően pozitív hatással voltak a fehérvérsejtek fagocitáló- és kisebb mértékben a respirációs aktivitására is, illetve csökkentették az *A. hydrophila* fertőzés utáni mortalitást. A leghatékonyabb immunstimulátornak ismét a kétféle gyógynövénykivonat kombinációja bizonyult, mivel ez a kezelés javította leginkább a természetes immunválasz jellemzőit (különösen a fagocitáló aktivitást), illetve csökkentette a bakteriális fertőzést követő elhullást.

4. A tilápiákkal elvégzett utolsó kísérletben a bóros kiegészítéssel és anélkül alkalmazott gyógynövénykivonatok (*Astragalus*, *Lonicera* és a kettő kombinációja) hatását hasonlítottuk össze. A természetes immunválasz jellemzőit (különösen a fehérvérsejtek fagocitáló aktivitását) az önmagában vagy bóros kiegészítéssel együtt alkalmazott *Astragalus* kivonat javította leginkább. Az *A. hydrophila* fertőzést követő

mortalitás valamennyi kezelt csoportban alacsonyabb volt, mint a kontrollnál. Az előző kísérletekhez hasonlóan most is a kétféle gyógynövény (most bórral kiegészített) kombinációja javította leginkább a fertőzéssel szembeni ellenálló-képességet.

5. A fent leírt kísérletek eredményei alapján egyértelmű volt, hogy a gyógynövénykivonatok egymással kombinálva hatásosabb immunstimulátorok, mint önmagukban alkalmazva. A leghatékonyabbnak az *Astragalus* és a *Lonicera* 0,1-0,1% koncentrációban alkalmazott kombinációja bizonyult, ezért ezt választottuk ki a félüzemi próbákhoz. Három félüzemi próbát végeztünk el, egyet tilápiákkal, egyet pontyokkal és egyet afrikai harcsákkal. Minden kísérletben egy kontroll és két kezelt csoportot állítottunk be. Az utóbbiak közül az egyikben a gyógynövénykivonatokat bórral is kiegészítettük.

6. A félüzemi próbák során az egyes halfajok eltérő módon reagáltak a kezelésekre. Az afrikai harcsa esetében a természetes immunválasz paraméterei jellemzően pozitív irányban változtak, a pontynál viszont ilyen változás nem volt megfigyelhető az adott időpontban. A tilápia esetében a sejtes paraméterek a kezelések hatására növekedtek, a humorális paraméterek viszont alacsony szinten maradtak. A bórral kiegészített tápok a félüzemi próbák során kevesebb alkalommal okoztak szignifikáns növekedést az immunológiai paraméterekben, mint a csak gyógynövénykivonatokat tartalmazó tápok. A növekedési mutatókra ugyanakkor a ponty és a tilápia esetében a bórral kiegészített és a bór nélküli tápoknak is kedvező hatása volt.

4. Az eredmények gyakorlati hasznosíthatósága

A már régóta ismert, kereskedelmi forgalomban kapható immunstimulátorok (Ergosan, Levamizol, QAC, Vitastim, stb.) mellett a gyógynövénykivonatok is alkalmasak a tenyésztett halak egészségi állapotának és természetes immunválaszának javítására. A gyógynövénykivonatok a többi immunstimulátorhoz hasonlóan olcsók, természetes eredetűek, nagy mennyiségben alkalmazva sem okoznak környezetszennyezést és nem alakítanak ki rezisztenciát. A haltenyésztési gyakorlatban a legegyszerűbb módon, etetés útján alkalmazhatók. A gyógynövénykivonatokkal kiegészített haltápok etetése különösen akkor javasolt, ha a halakat olyan betegség támadja meg, amely ellen nem létezik oltóanyag, és amely ellen természetes immunválasz erősítése elegendő.

Az immunstimulátorokkal, köztük a gyógynövénykivonatokkal kiegészített tápok alkalmazása ezen kívül olyan esetekben ajánlott, amikor a halakat valamilyen előre látható stresszhatás éri. A stressznek súlyos negatív hatása van a halak ellenálló-képességére. Immunstimulátorok alkalmazásával ez a hatás jelentős mértékben csökkenthető. Bizonyos kórokozók, például az általunk modellnek választott *Aeromonas hydrophila*, kizárólag legyengült szervezetű halakat tudnak megbetegíteni. A tavi haltenyésztésben a leggyakoribb ilyen előre látható stresszhatás tavasszal éri a halakat, amikor a teletetés után a nevelőtavakba kerülnek át. A teletetéstől amúgy is legyengült szervezetű halak számára az áthelyezés súlyos stresszt jelent, amely fogékonyra teszi őket a fertőző halbetegségekre. Immunstimulátorokkal kiegészített táp etetésével a betegségek kitörésének veszélye mérsékelhető, vagy ha ezt nem sikerült elkerülni, a veszteségek csökkenthetők. Az immunstimulátoros táp etetését a művelet tervezett időpontja előtt 2-4 héttel ajánlott elkezdni.

Az intenzív rendszerű haltenyésztésnek számos olyan művelete van, amely a halak számára kisebb vagy nagyobb stresszhatást jelent. Ilyen például a halak mérése, válogatása vagy áthelyezése. Megfelelően megválasztott idejű immunstimulátoros kezelés alkalmazásával ezek negatív hatása jelentős mértékben csökkenthető. Nehézséget jelent viszont, hogy az egyes halfajok eltérő módon reagálnak az immunstimulátoros kezelésekre, ezért a hatékony dózist és alkalmazási időt minden halfaj esetén külön meg kell állapítani, amelyet a mi kísérleteink is igazoltak.

5. A doktori értekezés témájában megjelent saját publikációk:

Lektorált folyóiratban megjelent közlemények:

Ardó, L., Yin, G., Jeney, Zs., Xu, P. és Jeney, G. (2007): Kétféle kínai gyógynövényt (*Ganoderma lucidum* és *Lonicera japonica*) tartalmazó haltáp hatása a nílusi tilápia (*Oreochromis niloticus*) természetes immunrendszerére (előzetes eredmények). *Agrártudományi közlemények* 26. különszám, 9-14.

Ardó, L., Yin, G., Xu, P., Váradi, L., Szigeti, G., Jeney, Zs, 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. IF: 1,678

Yin, G., Ardó, L., Thompson, K. D., Adams, A., Jeney, Z., Jeney, G. (2009): Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Ganoderma lucidum*) enhance immune response of carp, *Cyprinus carpio* and protection against *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology* 26(1), 140-145. IF: 3,161

Jeney, G., Yin, G., Ardó, L., Jeney, Z. (2009): The use of immunostimulating herbs in fish. An overview of research. *Fish Physiology and Biochemistry* 35(4), 672-682. IF: 1,232.

Nemzetközi konferencia-kiadványban megjelent közlemény:

Yin G., Ardó, L., Jeney Z., Xu P. and Jeney G. (2007): Chinese herbs (*Lonicera japonica* and *Ganoderma lucidum*) enhance non-specific immune response of tilapia, *Oreochromis niloticus*, and protection against *Aeromonas hydrophila*. *Proceedings of Conference of Diseases in Asian Aquaculture*, 269-281.

Nem lektorált folyóiratban megjelent közlemény:

Jeney, G., Ardó, L., Váradi, L., Jeney, Zs. (2010): Gyógynövénykivonatok alkalmazása a halbetegségek megelőzésére. *Halászat* 103, 65-69.

Előadások és poszterek hazai és nemzetközi konferenciákon:

Ardó, L., Yin, G., Pao, X., Váradi, L., Szigeti, G., Jeney, Z., Jeney, G. (2006): Gyógynövénykivonatokkal és bórral kiegészített haltáp hatása a nílusi tilápia (*Oreochromis niloticus*) természetes immunrendszerére. XXX. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, p. 59-60.

Ardó, L., Yin, G., Xu, P., Szigeti, G., Jeney, Z. and Jeney, G. (2007): Effect of two Chinese herbal extracts (*Astragalus membranaceus* and *Lonicera japonica*) and two trace elements (boron and selenium) on non-specific immune response of common carp, *Cyprinus carpio*. 7th Nordic Symposium on Fish Immunology, Stirling, Nagy-Britannia, p. 83.

Ardó, L., Yin, G., Pao, X., Váradi, L., Szigeti, G., Jeney, Z., Jeney, G. (2007): Kétféle gyógynövénykivonat (*Astragalus membranaceus* és *Lonicera japonica*) és két nyomelem (bór és szelén) hatása a ponty (*Cyprinus carpio* L.) természetes immunrendszerére. XXXI. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, p. 39-40.

Ardó, L., Yin, G., Jeney, Zs., Jeney, G. (2008): Pontyok természetes immunválaszáinak javítása gyógynövénykivonatok és nyomelemek alkalmazásával. 50. Georgikon Napok, Keszthely, p. 61.