

**DEBRECENI EGYETEM
AGRÁR- ÉS GAZDÁLKODÁSTUDOMÁNYOK CENTRUMA
MEZŐGAZDASÁG-, ÉLELMISZERTUDOMÁNYI ÉS KÖRNYEZETGAZDÁLKODÁSI KAR
ÁLLATTENYÉSZTÉSI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

Doktori Iskola vezető:

DR. KOVÁCS ANDRÁS
egyetemi tanár, az MTA doktora

TÉMAVEZETŐK:

Dr. Jeney Galina Ph.D.
Dr. Stündl László Ph.D.

DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS

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

Készítette:

ARDÓ LÁSZLÓ
doktorjelölt

Debrecen

2013

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	3
1.1. A fertőző halbetegségek ellen alkalmazott hagyományos védekezési módszerek és azok korlátai	3
1.2. Célkitűzések	6
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
2.1. A halak természetes immunrendszere	7
2.1.1. A természetes immunitás jelentősége	7
2.1.2. A halak immunrendszerének szervei	8
2.1.3. A természetes immunrendszer sejtes elemei	10
2.1.4. A természetes immunrendszer humorális elemei	12
2.2. Immunstimulátorok	15
2.2.1. Az immunstimulátorok általános jellemzése	15
2.2.2. Fontosabb immunstimulátorok	17
2.3. Gyógynövények, mint immunstimulátorok	23
2.3.1. A gyógynövények alkalmazása a népi gyógyászatban	23
2.3.2. Immunstimulátorként használható gyógynövények	24
2.4. Az <i>Aeromonas hydrophila</i> baktérium	30
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	32
3.1. Kísérleti elrendezések	32
3.2. Félüzemi próbák	34
3.3. Az immunválasz és az ellenálló-képesség meghatározására alkalmazott laboratóriumi módszerek	35
3.3.1. Vérmintavétel a kísérleti halakból	35
3.3.2. Fehérvérsejtek és vérplazma izolálása a vérmintákból	35
3.3.3. A fehérvérsejtek fagocitáló aktivitásának mérése	36
3.3.4. A fehérvérsejtek respirációs aktivitásának mérése (sejten kívül)	36
3.3.5. A fehérvérsejtek respirációs aktivitásának mérése (sejten belül)	37
3.3.6. A vérplazma lizozimaktivitásának mérése	37
3.3.7. A vérplazma fehérjeszintjének meghatározása	38
3.3.8. A vérplazma immunoglobulin-szintjének meghatározása	38
3.3.9. Halak fertőzése <i>Aeromonas hydrophila</i> baktériummal	39
3.3.10. Az <i>A. hydrophila</i> elleni specifikus antitestek szintjének meghatározása	39
3.3.11. Statisztikai elemzés	40

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS	41
4.1. A kísérletek eredményei	41
4.1.1. Az <i>Astragalus</i> , a <i>Lonicera</i> és a <i>Ganoderma</i> kivonatainak hatása a tilápia természetes immunválaszára	41
4.1.2. Az <i>Astragalus</i> és a <i>Ganoderma</i> kivonatainak hatása a ponty természetes immunválaszára és az <i>A. hydrophila</i> elleni vakcinálás hatékonyságára	43
4.1.3. Kétféle gyógynövénykivonat (<i>Astragalus</i> és <i>Lonicera</i>) és a bór hatása a ponty természetes immunválaszára	46
4.1.4. Kétféle gyógynövénykivonat (<i>Astragalus</i> és <i>Lonicera</i>) és a bór hatása a tilápia természetes immunválaszára	48
4.2. A kísérleti eredmények értékelése	52
4.2.1. Az <i>Astragalus</i> kivonat hatása	52
4.2.2. A <i>Ganoderma</i> kivonat hatása	53
4.2.3. A <i>Lonicera</i> kivonat hatása	54
4.2.4. A gyógynövény-kombinációk hatása	54
4.2.5. A bóros kiegészítés hatása	55
4.2.6. A gyógynövénykivonatok és a vakcinálás együttes hatása	56
4.3. A félüzemi próbák eredményei	57
4.3.1. Félüzemi próba tilápiával	57
4.3.2. Félüzemi próba ponttyal	59
4.3.3. Félüzemi próba afrikai harcsával	60
4.4. A félüzemi próbák eredményeinek értékelése	62
5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	64
6. JAVASLATOK	66
7. ÖSSZEFOGLALÁS	67
8. SUMMARY	70
9. IRODALOMJEGYZÉK	73
KÖSZENETNYILVÁNÍTÁS	94

1. BEVEZETÉS

1.1. A fertőző halbetegségek ellen alkalmazott hagyományos védekezési módszerek és azok korlátai

A világ halfogyasztása napjainkban évente kb. 1,5-2%-kal növekszik (FAO, 2010). 2009-ben a globális haltermelés (a természetes vízi halászat és a haltenyésztés együttes teljesítménye) 145 millió tonna volt, amelynek 38%-át a haltenyésztés (akvakultúra) biztosította (FAO, 2010). A természetesvízi halászat lehetőségeinek korlátozottsága miatt az akvakultúra egyre fontosabb szerephez jut, az előrejelzések szerint néhány éven belül több mint 50%-kal fog részesedni a világ haltermeléséből (FAO, 2010). Az akvakultúra szerepének növekedésével egyre fontosabbá válnak az intenzív haltenyésztési rendszerek, amelyekben a halakat nagy népesítési sűrűség mellett tenyésztik halastavakban, ketrecekben, vagy recirkulációs halnevelő rendszerekben (Stündl, 2011). Az ezekkel a tenyésztési módszerekkel együtt járó magas népesítési sűrűség, a szállítási és kezelési stressz, illetve a rosszabb vízminőség azonban károsan hat a tenyésztett halak egészségi állapotára és a betegségekkel szembeni ellenálló-képességére (van Muiswinkel és mtsai., 1999; Oliva-Teles, 2012). Ilyen körülmények között a halak sokkal érzékenyebbek a fertőző betegségekre, hiszen a stressz jelentős mértékben gyengíti az immunválaszt (Jeney és mtsai., 1997; Volpatti és mtsai., 1998). A haltenyésztők az általános higiéniai és fertőtlenítési eljárások mellett hagyományosan antibiotikumokat, kemoterápiás szereket és oltóanyagokat (vakcinákat) alkalmaznak a halbetegségek megelőzésére és kezelésére, ezek alkalmazásának azonban komoly korlátai vannak.

Az antibiotikumok és kemoterápiás szerek a mikroorganizmusokat (baktériumokat és gombákat) és a parazitákat pusztítják el, vagy gátolják a növekedésüket (Schwarz és mtsai., 2001). Az antibiotikumokat más mikroorganizmusok termelik, a kemoterápiás szereket viszont mesterségesen, kémiai szintézis útján állítják elő. A legismertebb ilyen szerek az amoxicillin, az eritromicin, a furazolidon, a flórfenikol és az oxitetraciklin (Agnew és Barnes, 2007; BurrIDGE és mtsai., 2010), amelyeket sokáig a haltenyésztésben is széles körben alkalmaztak. Az utóbbi években azonban számos országban, például az Európai Unió tagországaiban is korlátozták vagy betiltották a használatukat, annak ugyanis több hátrányos következménye is van (Cabello, 2006). Túladagolásuk a halak elhullásához és egyéb

nemkívánatos következményekhez vezethet, a formalin túladagolása például súlyos kopolyúkárosodáshoz, a nitrofurazoné pedig fekélyes bőrgyulladásához (Punitha és mtsai., 2008). A haltenyésztők ezeket az anyagokat nemcsak a halbetegségek kezelésére, hanem megelőzésükre is alkalmazzák (Cabello, 2006). Az ehhez szükséges hosszabb ideig tartó adagolás az immunrendszer gyengülését (immunszuppressziót) és a szövetekben a gyógyszermaradékok felhalmozódását okozhatja (Rijkers és mtsai., 1980; Harikrishnan és mtsai., 2009). A haltenyésztésben használt antibiotikumok egészségre káros maradékai a vízi környezetben is felhalmozódhatnak (Alderman és Hastings, 1998; Burridge és mtsai., 2010).

Az antibiotikumok túlzott használatának másik hátrányos következménye a velük szemben ellenálló (rezisztens) kórokozók kialakulása, amelyek a táplálékláncon keresztül egészen az emberig eljuthatnak, a rezisztenciáért felelős géneket pedig humán kórokozóknak is átadhatják (Alderman és Hastings, 1998; Cabello, 2006). A túlzott antibiotikum-használat hátrányos következményei miatt az Európai Unió tagországaiban 2006 óta tilos bármilyen antibiotikum vagy kemoterápiás szer megelőzési célú használata az állattenyésztésben (Kesarcodi-Watson és mtsai., 2008). Az Európai Unió ezen kívül korlátozza az akvakultúra termékeinek behozatalát olyan, főként ázsiai országokból, ahol nem tiltják az antibiotikumok és kemoterápiás szerek preventív használatát (Verschuere és mtsai., 2000; Kesarcodi-Watson és mtsai., 2008; Harikrishnan és mtsai., 2011).

A fertőző halbetegségek megelőzésének legelterjedtebb és leghatékonyabbnak tartott módszere a halak szerzett (specifikus) immunválaszának javítása vakcinák alkalmazásával. Oltóanyagokkal nemcsak a bakteriális, hanem a vírusos eredetű megbetegedések ellen is hatékony védelem alakítható ki (Gudding és mtsai., 1999). A vakcinálás azonban költséges, idő- és munkaigényes eljárás, és egy vakcina általában csak egy vagy néhány kórokozó ellen hatásos (Evans és mtsai., 2004; Pashnik és mtsai., 2005), emiatt még a fontosabb halbetegségek elleni vakcinálás is gyakran olyan anyagi és időbeli ráfordítást jelent a termelőknek, amely csak az értékesebb halfajok (például a lazacfélék) esetében kifizetődő. Sok kórokozó (pl. az *Aeromonas hydrophila* baktérium) immunológiai szempontból heterogén, azaz sokféle, egymástól különböző törzse létezik. Az ilyen patogének esetében rendkívül bonyolult feladat olyan vakcinát kifejleszteni, amely valamennyi törzs ellen hatásos, a vakcina előállítása pedig nagyon költséges (Poobalane és mtsai., 2008, 2010). A sejten belül élősködő baktériumok (pl. a harcsaféléket megbetegítő *Edwardsiella* fajok, vagy a lazacfélék sejtjeiben élősködő

Renibacterium salmoninarum) elleni oltóanyagok kifejlesztésére tett kísérletek pedig egyelőre nem jártak sikerrel (Sakai, 1999). Csak vakcinák alkalmazásával tehát nem lehetséges a védekezés valamennyi halbetegség ellen, ráadásul a vakcinák kizárólag megelőzésre alkalmasak, a betegségek gyógyítására nem.

Az antibiotikumok, kemoterápiás szerek és oltóanyagok alkalmazásának korlátai miatt a termelők és a kutatók figyelme az utóbbi két évtizedben egyre inkább a természetes (nem-specifikus) immunválaszt erősítő immustimulátorok felé fordult (Galeotti, 1998; Sakai, 1999). Immunstimulátornak nevezünk minden olyan vegyületet, gyógyszert, hatást vagy tevékenységet, amelyek javítják a természetes védekező mechanizmust, az alkalmazásukat követő vakcinálás vagy fertőzés esetén pedig a specifikus immunválaszt is (Anderson, 1992). Szűkebb értelemben azok a természetes vagy mesterséges eredetű vegyületek tartoznak ide, amelyek etetés, fürdetés vagy injekció útján alkalmazva erősítik a nem-specifikus immunválaszt. Alkalmazásuknak a haltenyésztésben különösen jó lehetőségei vannak, hiszen a halak betegségek elleni védekezésében jóval fontosabbak a természetes immunrendszer elemei, mint a magasabb rendű gerincesek esetében (Magnadottir, 2006).

A régóta ismert, főleg élesztősejtekből, baktériumokból vagy tengeri algákból kivont immunstimulátorok mellett napjainkban az immunstimulátorként használható gyógynövénykivonatok kutatása is jelentős fellendülést mutat (Citarasu, 2010; Chakraborty és Hancz, 2011; Harikrishnan és mtsai., 2011). Az ázsiai országokban, különösen Kínában és Indiában a hagyományos orvoslás már több mint 4000 éve alkalmaz gyógynövényeket többek között az immunválasz erősítésére is, hiszen a hagyományos orvoslás mindkét országban nagyobb hangsúlyt helyez a betegségek megelőzésére, mint a gyógyításukra (Tan és Vanitha, 2004). A gyógynövénykivonatok immunstimuláló hatását legtöbbször egereken, csirkéken vagy humán sejtvonalakon sikerült kimutatni (Cao és Lin, 2003.; Lin és Zhang, 2004), újabban viszont egyre több kísérletet végeznek velük halakon is (Chakraborty és Hancz, 2011; Harikrishnan és mtsai., 2011), mivel a hagyományos immunstimulátorok mellett egy újabb lehetőséget nyújtanak a haltenyésztésben alkalmazott antibiotikumok és kemoterápiás szerek kiváltására.

A Halászati és Öntözési Kutatóintézet (HAKI) immunológiai kutatócsoportja közel 20 éve foglalkozik az immunstimulátorok kutatásával. A korábbi, többféle immunstimulátorral (pl. glukánok, C-vitamin) elvégzett kísérletek eredményeire és az ezek során kipróbált vizsgálati módszerekre alapozva kezdődött 2004-ben a

gyógynövények immunstimuláló hatásának vizsgálata, együttműködve a kínai Wuxi városában található Édesvízi Halászati Kutatóközponttal (Freshwater Fisheries Research Center, FFRC). A dolgozatban ennek a kísérletsorozatnak az eredményeit ismertetem.

1.2. Célkitűzések

1. *In vivo* kísérletekben vizsgáltuk három kínai gyógynövény, az *Astragalus membranaceus*, a *Ganoderma lucidum* és a *Lonicera japonica* kivonatainak, illetve ezek kombinációinak hatását intenzív körülmények között tartott tilápiák és pontyok természetes immunválaszára.
2. Ugyanezekben a kísérletekben vizsgáltuk a gyógynövénykivonatok hatását a halak betegségekkel szembeni ellenálló-képességére is, amelyhez modell-kórokozóként az *Aeromonas hydrophila* baktériumot választottuk.
3. A kísérletek eredményei alapján kiválasztottuk a leghatékonyabb gyógynövény-kombinációt, amelynek gyakorlati alkalmazhatóságát félüzemi próbákon teszteltük intenzív körülmények között tartott pontyokon, tilápiákon és afrikai harcsákon.
4. A gyógynövénykivonatokat önmagukban, vakcinálással együtt, illetve egy nyomelemmel, a bórral kiegészítve is vizsgáltuk.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A halak természetes immunrendszere

2.1.1 A természetes immunitás jelentősége

A gerinces állatok immunrendszerét hagyományosan természetes (nem specifikus) és adaptív (specifikus) immunrendszerre szokás felosztani (Magnadottir, 2006). Evolúciós szempontból a természetes immunrendszer tekinthető ősibbnek, mivel bizonyos elemei minden többsejtű állatban megtalálhatók. Mindkét immunrendszer sejttes (celluláris) és a vérplazmában oldott (humorális) elemekből áll. Sokáig úgy gondolták, hogy a természetes immunrendszer szerepe csak annyi, hogy egy gyors, de kevésbé hatékony immunválaszt biztosít a patogének ellen, megelőzve a lassúbb, de hatékonyabb adaptív immunválasz kialakulását. Ma már tudjuk, hogy az ősibb immunrendszer működése számos ponton összefonódik a specifikus immunrendszerével. A természetes immunrendszer aktiválja a specifikus immunválaszt és határozza meg annak természetét, emiatt igazán hatékony adaptív immunválasz nem alakulhat ki a természetes immunrendszer részvétele nélkül (Gergely és Erdei, 1998; Whyte, 2007).

A kétféle védelmi rendszer között a patogének, illetve egyes alkotórészeik felismerési módját tekintve alapvető különbség van. A specifikus immunválasz mindig egy adott antigén ellen alakul ki, amelyet az immunrendszer képes fajlagosan felismerni és eliminálni. Ezt a felismerő molekulák (antigénreceptorok és ellenanyagok) szomatikus génátrendeződés által kialakuló, szinte végtelen sokfélesége teszi lehetővé. A specifikus immunválasz során az antigénnel való kölcsönhatás eredményeképpen hosszú életű memóriasejtek is képződnek, amelyek egyrészt azt biztosítják, hogy az adott antigénnel való ismételt találkozás esetén az immunválasz hamarabb és a primer válasznál hatékonyabban indukálódik, másrészt a memóriasejteknek köszönhető az adott kórokozóval szemben kialakuló folyamatos, gyakran egész életen át tartó immunitás.

A természetes immunrendszer felismerő molekulái nem képesek különbséget tenni az egyes antigének között, hanem a patogénekhez kapcsolódó molekuláris mintázatokat (*Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMP*) ismerik fel. Ezek olyan molekulák, vagy molekulacsoportok, amelyek a patogén mikroorganizmusokban (elsősorban baktériumokban és vírusokban) fordulnak elő, a magasabbrendű

szervezetek sejtjeiből viszont hiányoznak. Ilyen megkülönböztető mintázat például a Gram-negatív baktériumok sejtfalában jelenlevő lipopoliszacharid (LPS), a Gram-pozitív baktériumokra jellemző tejkolsav, az élesztősejtek sejtfalát alkotó mannán vagy bizonyos vírusok kettős szálú RNS-e (Magnadottir, 2006). Magasabbrendű szervezetekben ezek közül egy sem fordul elő, a patogének számára viszont létfontosságúak. A természetes immunrendszer által felismert molekulák elsősorban poliszacharidok, lipidek vagy nukleinsavak, ezzel szemben az adaptív immunrendszer felismerőképessége általában fehérjék ellen irányul (Whyte, 2007; Aoki és mtsai., 2008).

Korlátozott antigénfelismerő képessége ellenére a természetes védekezőrendszer igen hatékonyan képes a különböző patogén mikroorganizmusok elpusztítására. Különösen fontos a szerepe a halak betegségek elleni védekezésében. A halak adaptív immunrendszere ugyanis viszonylagos evolúciós fejletlensége és a halak változó testhőmérséklete miatt nem annyira hatékony, mint a magasabbrendű gerinceseké. Az ellenanyagok sokfélesége és az immunológiai memória korlátozott, az adaptív immunrendszer sejtjei, a limfociták pedig lassabban osztódnak. Emiatt a halak specifikus immunválaszának kialakulásához hosszú idő (esetenként 10-12 hét) szükséges, szemben a gyors és viszonylag hőmérséklet-független természetes immunválasszal (Secombes, 1996; Yano 1996; Magnadottir, 2006).

2.1.2 A halak immunrendszerének szervei

Kételtűekben és magasabbrendű gerincesekben a vér sejtjes elemeinek képződése a csontvelőben megy végbe, a halakban viszont ez a szerv nem található meg (Ellis, 1982). Szerepét a vese és a lép tölti be.

A vese

A halak veséjének kialakulása az egyedfejlődés során két szakaszra osztható. Először a fejvese (pronephros) jelenik meg, amely később, a törzsvese (opisthonephros) kialakulása után elveszíti kiválasztó szerepét és vérképző (hematopoetikus) szervként működik tovább (Ellis, 1982). Kifejlett halakban a vese mindkét része tartalmaz hematopoetikus szövetet, amely funkcióját tekintve megfelel a magasabbrendű gerincesekben megtalálható csontvelőnek (Zapata, 1979), de azzal ellentétben sok ellenanyag-termelő és fagocitáló sejtet tartalmaz (Rijkers és mtsai., 1980a). Emiatt a

halak veséje a kiválasztó funkció mellett ellátja az emlősökből ismert csontvelő és nyirokcsomók feladatát is (Whyte, 2007). A fejvесе legnagyobb számban előforduló sejtjei a makrofágok, amelyek úgynevezett melanomakrofág központokba csoportosulnak. Ezeken kívül még a limfociták előalakjai, a limfoid sejtek valamennyi fejlődési stádiuma is megtalálható (Uribe és mtsai., 2011).

A lép

A lép a halivadék első táplálkozása idején alakul hematopoetikus szervvé (Ellis, 1977; 1982). Szerepe a vérben keringő antigének kiszűrése (Uribe és mtsai., 2011). A lépet belülről kapillárisok (ellipszoidok) hálózák be, melyek falát kötőszöveti rostok és makrofágok alkotják (Ellis, 1976). Az ellipszoidok a lép vörös pulpa állományában színuszokat alkotnak, amelyek vénás kapillárisokba szedődnek össze. Fontos szerepük van az antigének kiszűrésében és valószínűleg az immunológiai memória kialakulásához is hozzájárulnak (Ellis, 1982).

A csecsemőmirigy (tímusz)

A csecsemőmirigy a legkorábban kifejlődő limfoid szerv (Ellis, 1982). A legtöbb csontoshalban a kopolyúüreg felső részén található. A tímuszban történik a specifikus immunrendszer T-limfocitáinak érése, emiatt nagy mennyiségben tartalmazza a T-sejtek előalakjait, a timocitákat, de makrofágok és granulociták is találhatóak benne (Uribe és mtsai., 2011). A magasabbrendű gerincesek csecsemőmirigye élesen elkülönülő kéreg- és velőállományra oszlik, a halakban ez a differenciálódás jóval kisebb mértékű. Az érett T-sejtek a véráramba kerülnek és többé már nem térnek vissza a tímuszba (Ellis, 1982).

A kültakaró

Tágabb értelemben véve a halak kültakarója is a védekezőrendszer szervei közé sorolható, mivel egyrészt fizikai akadályt képez a kórokozókka szemben, másrészt pedig a halak külső testfelületét borító nyálkaréteg olyan fehérjéket (például lizozimot, lektineket vagy immunoglobulinokat) tartalmaz, amelyeknek fontos szerepük van a fertőzések megakadályozásában (Uribe és mtsai., 2011). A nyálkában az immunrendszer humorális alkotórészei mellett a fehérvérsejtek (limfociták, makrofágok és granulociták) is megtalálhatóak (Ellis, 2001). A kültakaró mechanikai sérülése esetén

a kórokozók akadály nélkül juthatnak be a véráramba vagy a szövetekbe (Uribe és mtsai., 2011).

2.1.3 A természetes immunrendszer sejtjei

Monociták és makrofágok

A természetes immunrendszer legfontosabb sejtjei a mieloid progenitor sejtekből származnak (Gergely és Erdei, 1998). A vérképzés (hemopoézis) során ezek a sejtek a vérbe jutnak, és ott monocitákká érnek. A monociták 10-15 μm átmérőjű sejtek, magjuk bab alakú. A vérből kijutó monociták megtelepszenek a különböző szövetekben és makrofágokká differenciálódnak. A monocita és a makrofág tehát két különböző sejtípus (MacKenzie és mtsai., 2003). Eltérő a sejtek morfológiája, fagocitáló aktivitása és az általuk termelt fehérjék sem egyeznek meg. Eredetük viszont közös, funkciójuk pedig hasonló.

A monocitáknak és makrofágoknak egyaránt fontos szerepük van a természetes és a szerzett immunitás kialakításában. Fagocitózis útján eltávolítják a különböző eredetű részecskéket, mikrobákat, elpusztult saját sejteket. A fagocitózis a sejtek legősibb táplálkozási és védekezési módja. A fagocitáló sejt membránján megtapadt molekula vagy kisebb sejt tapadási helye bemélyed a citoplazma felé, majd egy vakuólumot képezve lefűződik. A vakuólum tartalmát a sejt lizoszomális enzimek lebontják (MacArthur és Fletcher, 1985; Neumann és mtsai., 2001). A makrofágok a lebontott antigénekből származó molekulákat képesek bemutatni (prezentálni) a specifikus immunrendszer T-limfocitáinak, amelyek az antigénre és a makrofágok által termelt jelátvivő molekulák (citokinek) hatására segítő (helper) vagy citotoxikus T-sejtekké differenciálódnak (Gergely és Erdei, 1998). Antigénbemutató képességük miatt a makrofágok nélkülözhetetlenek a specifikus immunválasz aktiválásához, ugyanis a T-limfociták a B-sejtekkel ellentétben az antigént csak megfelelően feldolgozott és prezentált formában tudják felismerni.

A T-sejteket aktiváló fehérjék mellett a makrofágok számos másféle citokint is termelnek. Ezek egy része a gyulladási folyamatok kiváltásában fontos, mások a sérült szövetek gyógyulását segítik. A makrofágok és limfociták közötti kapcsolat kétoldalú. Az aktivált T-sejtek olyan citokint termelnek, amelyek hatására a makrofágok hatékonyabb fagocitózissá képesek, ezzel hozzájárulnak a hatékonyabb természetes immunválasz kialakulásához.

A makrofágok sejtmembránján sokféle receptorfehérje található, amelyeken keresztül a sejtek közvetlenül aktiválhatók. Ilyen receptora van például a bakteriális sejtfa alkotórészeinek, mint a glukánoknak vagy a lipopoliszacharidnak, illetve a komplementrendszer C3 jelű komponensének is (Engstad és Robertsen, 1994; Goetz és mtsai., 2004).

A fagocitózis mellett a makrofágok számos más módon képesek a patogén mikroorganizmusok elpusztítására (Neumann és mtsai., 2001; Rieger és Barreda, 2011). Legfontosabb ezek közül a légzési (respirációs) aktivitás növekedése (*Respiratory Burst Activity*). A folyamat során a sejtmembrán stimulációjának hatására a membránban található NADPH-oxidáz enzimek az oxigénmolekulákat erősen toxikus szuperoxid-anionokká alakítják. A reakció jelentős mértékben növeli a sejtek oxigénfelvételét. További reakciók során a szuperoxid-anionból hidrogén-peroxid, hippoklorit és hidroxilgyök keletkezik, amelyek szintén toxikus hatásúak, de nemcsak a patogén, hanem a gazdaszervezet számára is. Az utóbbi negatív hatást a sejtekben található antioxidáns molekulák (C- és E-vitamin, β -karotin) küszöbölik ki (Secombes, 1996). A légzési aktivitás növekedése az egyik legkönnyebben mérhető immunológiai paraméter (Secombes, 1990; Anderson és mtsai, 1992).

Granulociták

A granulociták a citoplazmájukban megfigyelhető szemcsékről (granulumokról) kapták a nevüket. A monocitákhoz hasonlóan ezek a sejtek is a mieloid progenitorból származnak. Funkciójuk is hasonló, képesek a patogén mikrobák fagocitózis általi eltávolítására és respirációs aktivitásuk növelésére, antigénbemutató szerepük viszont nincs (Ainsworth, 1992). A légzési aktivitás növekedése általában csekélyebb mértékű, mint a makrofágok esetében, habár bizonyos halfajok (pl. az atlanti lazac (*Salmo salar*)) esetében ennek ellenkezőjét figyelték meg (Lamas és Ellis, 1994). A granulociták festődési tulajdonságuk alapján háromféle csoportba sorolhatók: neutrofil, eozinofil vagy bazofil sejtek lehetnek. Az eozinofil vagy a bazofil sejtípus sok halfajból hiányzik (Secombes, 1996).

A neutrofil granulociták adják a fehérvérsejtek több mint 50%-át (Ainsworth, 1992). Legfontosabb szerepük az idegen anyagok fagocitózis útján való eltávolítása. A komplementrendszer különböző komponensei és a makrofágok által termelt citokinek aktiválhatják őket. Szöveti sérülés esetén a sérülés helyén lévő makrofágokból,

endotélsejtekből és hízósejtekből olyan molekulák szabadulnak fel, amelyek hatására a neutrofil sejtek a sérülés helyére vándorolnak (kemotaktikus jelek). A granulociták rendkívül gyorsan reagálnak ezekre az ingerekre, emiatt fontos szerepük van a gyulladáshoz vezető reakció kialakulásában (Secombes, 1996).

Hízosejtek (masztociták)

Ezek a sejtek nem találhatók meg a keringésben. Differenciálódásuk után különböző szövetekbe vándorolnak és elszórva találhatók meg a test minden részében (Reite és Evensen, 2006). Egyaránt részt vesznek a természetes és az adaptív immunválasz beindításában, illetve a túlérzékenységi (allergiás) reakciók legfontosabb sejtjei. Az általuk termelt sokféle citokin (pl. TNF- α vagy IL-1) pedig a gyulladáshoz vezető reakció kiváltásához szükséges.

Nem-specifikus citotoxikus sejtek (Non-specific Cytotoxic Cells, NCC)

Az emlősök természetes ölósejtjeihez (Natural Killer Cells, NK-sejtek) szerkezetileg és funkcionálisan hasonló sejtek (Secombes, 1996). Csontos halakban a limfociták előalakjaiból, a limfoid progenitor sejtekből keletkeznek, azonban a limfocitákkal ellentétben nem az adaptív, hanem a természetes immunrendszer alkotórészei. Az emlős NK-sejtekkel szemben a halak NCC sejtjei nem tartalmaznak granulomákat. Elsődleges szerepük a tumorsejtek, egysejtű paraziták és vírusfertőzött sejtek elleni védekezés (Evans és Jaso-Friedmann, 1992; Ellis, 2001). Az NCC sejtek önállóan is képesek az elpusztítandó sejt felismerésére, emiatt más aktivációs jelet nem igényelnek (Gergely és Erdei, 1998).

2.1.4. A természetes immunrendszer humorális elemei

A komplementrendszer

A természetes immunrendszer legfontosabb humorális alkotórésze a vérben és a különböző testnedvekben található, egymást láncreakcióban (kaszkádban) aktiváló fehérjék és az őket szabályozó molekulák összessége (Gergely és Erdei, 1998). Eddig több mint 30 komponensét azonosították, közöttük a kaszkád során aktiválódó molekulákat, a folyamatot szabályozó fehérjéket, a különböző sejtek membránján megtalálható komplementreceptorokat és a szervezet saját sejtjeinek oldását gátló membránfehérjéket. A komplementkomponensek inaktív formában vannak jelen a

szérumban. Aktiváció hatására a komplementrendszer fehérjéi egymást meghatározott sorrendben, proteolitikus hasítás útján aktiválják. Minden komponens lehasít egy darabot a következőből, a keletkező két fragmentum közül a nagyobbik („b”-vel jelölt) viszi tovább a reakciót, a kisebbik („a”-val jelölt) pedig a környezetbe diffundál. A kaszkád továbbvitelén kívül mindkét fragmentumnak gyakran fontos szerepe van más biológiai funkció beindításában is. A C3a fragmentum például hisztamint szabadít fel a hízósejtekből, ezzel fokozza a simaizom-kontrakciót és a hajszálerek permeabilitását. A C3b az antigén felszínéhez kötődve fokozza a fagocitáló sejtek aktivitását, a C5a pedig kemotaktikus szignált jelent a makrofágok és granulociták számára.

A komplementrendszer háromféleképpen aktiválódhat (Yano, 1996). A klasszikus utat a specifikus immunrendszer által termelt ellenanyagokat tartalmazó komplexek indíthatják el a C1 fehérjén keresztül. Az alternatív és a lektinindukált út aktivációjához nincs szükség ellenanyagra. Az alternatív út központi eleme a C3 fehérje, amely hidrolizált formában képes a sejtmembránokhoz kötődni, azonban az eukarióta sejtek membránjában nagy mennyiségben előforduló szíálsav gyorsan inaktiválja (Gergely és Erdei, 1998). A baktériumok és gombák felszíne viszont jóval kevesebb szíálsavat tartalmaz, a C3 így aktív formában marad. A lektinindukált utat a különböző szénhidrátokat (pl. lipopoliszacharidot vagy mannózt) kötő lektin típusú fehérjék aktiválhatják a C4 fehérjén keresztül. Mindhárom aktivációs út során bekövetkezik a C3 fehérje hasítása. A kaszkád ezután közös úton folytatódik, a C5-C9 fehérjékből kialakul a membránkárosító komplex (*Membrane Attack Complex, MAC*), amely egy kb. 10 nm átmérőjű pórust alakít ki a célsejt membránján, ezzel annak lízisét okozza. A pórus nemcsak baktériumsejtek, hanem más nem magvas sejtek, például vörösvértettek líziséhez is elegendő. A komplementaktivitás mérésének ez utóbbi hatás az alapja (komplement hemolitikus aktivitás, CH50) (Whyte, 2007).

Lizozim

A monociták és neutrofil granulociták által termelt enzim a Gram-pozitív baktériumok sejtfalát alkotó N-acetil-glükózamin és N-acetil-muraminsav közötti β (1-4) kötéseket képes elhasítani, ami a baktériumsejtek líziséhez vezet (Magnadottir, 2006). Gram-negatív baktériumok a lizozimmal szemben ellenállóbbak. Ezeket a lizozim csak akkor képes károsítani, ha előzőleg a komplementrendszer és más enzimek leemésztették a külső sejtfalat, feltárva ezzel a belső peptidoglukán réteget (Yano,

1996). Közvetlen antibakteriális hatása mellett a lizozim képes a fagocitáló sejtek és a komplementrendszer aktiválására is.

Halakban a lizozim a vérplazmán kívül a bakteriális fertőzésnek leginkább kitett testrészekben fordul elő a legnagyobb koncentrációban, például a kopoltyúokban, a bőrben vagy az ikrában. A plazma lizozimaktivitása egy lényeges és könnyen mérhető immunológiai paraméter, habár értéke az egyes halfajokban igen eltérő lehet és függ a hal ivarától, fejlődési állapotától és különböző környezeti hatásoktól, mint a víz hőmérséklete és szennyezettsége (Saurabh és Sahoo, 2008).

Transzferrin

Ez a fehérjemolekula szabályozza a vérben szabad formában lévő vas mennyiségét, amely a baktériumok szaporodásában limitáló faktorként szerepel. Ezen kívül a gyulladás kialakulásában is fontos szerepe van, továbbá képes a makrofágok aktiválására is (Jurecka és mtsai., 2009).

Interferonok

Az interferonok a monociták által termelt fehérjék, amelyek gátolják a vírus nukleinsavak átírását, ezáltal fokozzák a gazdaszervezet vírusokkal szembeni ellenálló-képességét. Mindig a vírusfertőzést követően jelennek meg. Más antivirális fehérjék, például az Mx protein átírását is indukálják. Az interferon-hatást sok halfajban kimutatták, az atlanti lazac (*Salmo salar*) esetében pedig az interferon gének szekvenciája is ismert (Robertsen, 2008).

Proteáz inhibitorok

A halak vérében és egyéb testnedveiben található proteáz inhibitorok elsődleges szerepe a testfolyadékok homeosztázisának fenntartása, de fontos szerepük van a proteolitikus enzimeket termelő patogének (pl. az *Aeromonas salmonicida* baktérium) elleni védekezésben is (Ellis, 1987; Salte és mtsai., 1993). A legismertebb ilyen fehérje az $\alpha 2$ -makroglobulin, egy széles specificitású inhibitor, amely a proteázok aktivitását azok elszigetelésével gátolja (Armstrong és Quigley, 1999). Az $\alpha 2$ -makroglobulin és a C3 komplementfehérje nagyon hasonló szerkezetű, valószínűleg közös evolúciós eredetűek (Sottrup-Jensen és mtsai., 1985).

Agglutininek és precipitinek:

Ezek a fehérjék a baktériumok sejtfalát alkotó molekulák felismerésére és megkötésére képesek (Magnadottir, 2006). A mannózkötő lektin (*Mannose Binding Lectin, MBL*) például kalciumionok jelenlétében mannózt, N-acetil-glükózamint és fukózt tud megkötni, amivel a fagocitózist és a komplementrendszer lektinindukált útját aktiválja (Arason, 1996). A pentraxinok a különböző testfolyadékokban megtalálható lektin típusú fehérjék (Bayne és Gerwick, 2001). A legismertebb ilyen molekulák a C-reaktív protein (CRP) és a szérum amidoid protein (SAP), melyek közül az előbbi a bakteriális sejtfalban lévő foszforilkolin, az utóbbi pedig a foszforil-etanolamin és a lipopoliszacharid (LPS) felismerésére képes (Lund és Olafsen, 1998). Általában szöveti sérülés vagy fertőzés hatására aktiválódnak és az MBL-hez hasonlóan képesek a komplementrendszer lektinindukált útjának beindítására (Jiang és mtsai., 1991). Bizonyos halfajokban (pl. tökehalban vagy csatornaharcsában) csak a CRP fordul elő, másokban (pl. az atlanti lazacban) csak a SAP, és vannak olyan fajok, amelyekben mindkettő megtalálható (pl. a szivárványos pisztráng) (Lund és Olafsen, 1998).

2.2. Immunstimulátorok

2.2.1. Az immunstimulátorok általános jellemzése

A halbetegségek megelőzésének talán legígéretesebb módszere a halak ellenállóképességének növelése, amely oltóanyagok (vakcinák) valamint a természetes immunrendszert erősítő anyagok, az immunstimulátorok alkalmazásával valósítható meg. 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 (Galeotti, 1998; Sakai, 1999).

Az immunstimuláció pontos molekuláris mechanizmusát csak néhány anyag, például a lipopoliszacharid (MacKenzie és mtsai., 2003; Goetz és mtsai., 2004) vagy a glukánok (Engstad és Robertsen, 1994) esetében ismerjük, a legtöbb esetben a természetes immunrendszer mérhető paramétereinek változása jelzi az immunválasz erősödését. Az immunstimulátorokkal kezelt halakban a fagocitáló sejtek, elsősorban a makrofágok légzési illetve fagocitáló aktivitása növekszik. Ezt sokféle

immunstimulátor, például a glukánok, a levamizol, az FK-565 vagy a kitin esetében bizonyították (Galeotti, 1998; Sakai, 1999). A humorális elemek közül a komplementrendszer aktivitása erősödik C-vitamin és glukán hatására (Hardie és mtsai., 1991), a glukán ezen kívül a vérplazma lizozimaktivitásának növelésére is képes (Engstad és mtsai., 1992). A természetes és a specifikus immunrendszer szoros együttműködése miatt bizonyos immunstimulátorok képesek a specifikus immunválaszt is erősíteni, illetve a vakcinálás hatékonyságát növelni, amely az adott patogén elleni specifikus antitestek koncentrációjának növekedésével detektálható. Ezt a hatást mutatták ki glukánnal kezelt csatornaharcsa (*Ictalurus nebulosus*) és atlanti lazac (*Salmo salar*) esetében (Chen és Ainsworth, 1992; Aakre és mtsai., 1994), utóbbi halfajnál a C-vitaminnak és az FK-565-nek is ugyanilyen hatása volt (Thompson és mtsai., 1993)

Az immunstimulátorok alkalmazásának a gyakorlatban leghatásosabbnak tartott módszere az injekció, amely azonban rendkívül idő- és munkaigényes, továbbá 15 grammnál kisebb halaknál alkalmazhatatlan (Sakai, 1999). Emiatt egyre elterjedtebbé válik a másik két alkalmazási mód, az etetés és a fürdetés. Az etetési módszernél az immunstimulátort a haltáphoz keverik, amely teljesen stresszmentes és tömeges alkalmazást tesz lehetővé a halak méretétől függetlenül. Sokféle immunstimulátor például a glukán, a laktoferrin, a levamizol vagy a kitozán használható ilyen módon bakteriális eredetű halbetegségek (furunkulózis, vibriózis) megelőzésére (Sakai, 1999). A fürdetési módszernél a halakat meghatározott ideig egy vagy több immunstimulátor adott koncentrációjú vizes oldatába merítik. Ez a módszer szintén jól alkalmazható a gyakorlatban, hatásosságát több halfaj, például a szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*) esetében kimutatták (Jeney és Anderson, 1993; Anderson és Siwicki, 1994). Minden alkalmazási mód esetében nagyon fontos a megfelelő dózis kiválasztása, a túl magas koncentráció ugyanis gyakran hatástalan, esetleg még gyengítheti is az immunválaszt (Kajita és mtsai., 1990). Hasonlóan fontos a kezelés időtartamának helyes megválasztása is, különösen az etetési alkalmazásnál, mivel a hosszabb ideig tartó etetés nem feltétlenül okoz erősebb védettséget (Galeotti, 1998; Sakai, 1999). Az optimális dózist és kezelési időt minden egyes halfaj és immunstimulátor esetében egyedileg kell beállítani.

2.2.2. Fontosabb immunstimulátorok

Levamisol

Eredetileg féregtelenítő szer (antihelmitikum), amely gombás fertőzések ellen is hatásos, így például pontynál alkalmazzák saprolegniosis ellen (Anderson, 1992). A szer immunstimuláló hatással is rendelkezik. Önmagában vagy vakcinálással együtt is alkalmazható. Az 5 mg/kg dózisu levamizollal kezelt szivárványos pisztrángok a *Vibrio anguillarum* baktériummal szemben magas fokú védettséget mutattak (Kajita és mtsai., 1990). A levamizollal és módosított Freund komplett adjuvánssal injektált coho lazac (*Oncorhynchus kisutch*) ellenállóképessége megnövekedett az *Aeromonas salmonicida* baktériummal szemben (Olivier és mtsai., 1985). Levamisol injekció hatására emelkedett a ponty neutrofil granulocitáinak fagocitáló és mieloperoxidáz aktivitása, valamint a fehérvérsejtszám és a plazma lizozimszintje (Siwicki, 1987, 1989). A szer nemcsak injekció, hanem etetés és fürdetés útján is alkalmazható. A ponty esetében például levamisol etetés hatására növekedett a fehérvérsejtszám, a plazma lizozimaktivitása és a makrofágok légzési aktivitása (Siwicki, 1989). 30 percig 5 µg/ml koncentrációjú levamisol oldatba, majd két percig *A. salmonicida* O-antigén oldatába merített szivárványos pisztrángok pedig erősebb természetes (fagocitáló aktivitás) és specifikus (antitestszint) immunválaszt mutattak (Jeney és Anderson, 1993). Túl magas dózisban adva a szer gyengíti a természetes immunrendszert, ezért az alkalmazási módot minden egyes halfaj és korosztály esetén külön-külön kell meghatározni.

FK-565

Szintetikus tetrapeptid, amelynek alapjául a *Streptomyces olivaceogriseus* tenyészetekből izolált peptid szolgált. Szivárványos pisztrángokba injektálva növelte a fagocitáló sejtek aktivitását és a halak ellenálló-képességét *A. salmonicida* ellen (Kitao és Yoshida, 1986). Az *A. salmonicida* és a *Yersinia ruckeri* baktériumokból készült vakcinákkal együtt alkalmazva pedig a falósejtek számának növekedését és az antitestek titerének emelkedését tapasztalták (Kitao és mtsai., 1987).

Lipopoliszacharid (LPS)

A lipopoliszacharid a Gram-negatív baktériumok sejtfalának alkotórésze. Elsősorban a specifikus immunrendszer B-sejtjeinek (Salati és mtsai., 1987) és a

makrofágoknak az aktivitását képes stimulálni. A makrofágok esetében az immunstimuláció molekuláris mechanizmusa is ismert: az LPS a sejtmembránon lévő receptorokon keresztül számos, a makrofágok által termelt citokin (pl. TNF- α , IL-1 β , IL-8) és egyéb fehérje expresszióját képes stimulálni (MacKenzie és mtsai., 2003; Goetz és mtsai., 2004). *In vitro* alkalmazva az LPS növelte az atlanti lazacból izolált makrofágok légzési és fagocitáló aktivitását (Solem és mtsai., 1995), illetve lizozimtermelését (Paulsen és mtsai., 2001).

Muramil-dipeptid (MDP)

A *Mycobacterium* fajok membránjának alkotórésze a makrofágokat, a B-limfocitákat és a komplementrendszer alternatív útját képes aktiválni. MDP és módosított Freund komplett adjuváns keverékével injektált coho lazacok *A. salmonicida* baktériummal szembeni ellenálló-képessége nagymértékben emelkedett (Olivier és mtsai., 1985), az MDP-vel injektált szivárványos pisztrángok makrofágjai pedig megnövekedett légzési és fagocitózis aktivitást mutattak (Kodama és mtsai., 1993).

Freund komplett adjuváns (Freund's Complete Adjuvant, FCA)

A Freund-féle komplett adjuváns egy víz-olaj emulzió, amely vizes fázisában vakcinát, olajos fázisában pedig elölt *Mycobacterium*okat tartalmaz. Jól használható a vakcinálás hatékonyságának növelésére, mivel a vizes fázisban oldott antigén csak lassan, fokozatosan kerül kapcsolatba az immunrendszer sejtjeivel, a *Mycobacterium*ok sejtfalában található MDP pedig aktiválja a makrofágokat (Gergely és Erdei, 1998). A lazacféléken például sikerrel alkalmazták a *R. salmoninarum* és az *A. salmonicida* baktériumokból készített vakcinákkal (Olivier és mtsai., 1985). Az FCA önmagában, vakcinálás nélkül is használható immunstimulátorként. Az FCA-val injektált coho lazac ellenállóképessége jelentős mértékben növekedett az *A. salmonicida*, *A. hydrophila* és *V. ordalii* baktériumokkal szemben (Olivier és mtsai., 1985), amiért a makrofágok megnövekedett fagocitózis és légzési aktivitása felelős (Olivier és mtsai., 1986). FCA-val kezelt szivárványos pisztrángok pedig ellenállóbbá váltak az *A. salmonicida* által okozott furunkulózis betegséggel szemben (Adams és mtsai., 1988).

Kitin és kitozán

A kitin a rákok és rovarok külső vázának fő alkotórésze, de a gombák sejtfalában is előfordul. Ezzel magyarázható immunstimuláló hatása, amelyet halak esetében is bizonyítottak (Kawakami és mtsai., 1998). A kitin deacetilált származéka, a kitozán szintén használható immunstimulátorként. A levamizol mellett a kitin és a kitozán is jelentős mértékben javította a pontyok fehérvérsejtjeinek respirációs aktivitását és a vérplazma lizozimaktivitását 30, 60 és 90 napos etetést követően, illetve 45 napig tartó etetés után csökkentette az *A. hydrophila* fertőzést követő elhullást (Gopalakkanan és Arul, 2006). A lazacfélékhez tartozó pataki szajbling (*Salvellinus fontinalis*) *A. salmonicida* fertőzéssel szembeni ellenálló-képessége megnövekedett kitozán injekció vagy kitozán oldatban való fürdetés után (Anderson és Siwicki, 1994). Szivárványos pisztrángoknál ugyanezt a hatást figyelték meg kitozán etetést követően (Siwicki és mtsai., 1994).

Glukánok

A baktériumok, élesztőgombák és bizonyos növények sejtfalában megtalálható poliszacharidok a legjobban tanulmányozott immunstimulátorok közé tartoznak (Anderson és mtsai., 1997; Sahoo és Mukherjee, 2001, 2002.). A glukánok a makrofágok aktivitását stimulálják a sejtmembránban található receptoraikon keresztül, amelyek jelenlétét több halfajból, például az atlanti lazacból (Engstad és Robertsen, 1994) vagy a csatornaharcsából (Ainsworth, 1994) izolált makrofágokon is kimutatták. Immunstimuláló hatásuk gyors, de legfeljebb néhány napig tart (Galeotti, 1998; Anderson és Siwicki, 1994). A gyakorlatban az élesztőgombák sejtfalából izolált β -1,3- és β -1,6-glukánok használata a legelterjedtebb, többféle glukánalapú immunstimulátor is kapható a kereskedelmi forgalomban (Anderson és mtsai., 1997). Hatásukat igen sok hal- és rákfajon vizsgálták (Sakai, 1999). A glukánnal injektált atlanti lazac fejveséjéből izolált makrofágoknak például megnövekedett a baktériumölő és a légzési aktivitása (Jorgensen és mtsai., 1993; Jorgensen és Robertsen, 1995). Szintén glukán injekciók hatására jelentős mértékben emelkedett a pontyfélékhez tartozó rohu (*Labeo rohita*) fehérvérsejtjeinek fagocitáló és respirációs aktivitása, illetve vérplazmájának összes fehérje- és immunoglobulin-szintje, ezen kívül javult a halak ellenálló-képessége *A. hydrophila* és *Edwardsiella tarda* fertőzésekkel szemben (Misra és mtsai., 2006). A glukánok etetési vagy fürdetési módszerrel is alkalmazhatók (Selvaraj és mtsai.,

2005). Glukánnal etetett tokhibridek (*Acipenser ruthenus* X *Acipenser baeri*) izolált makrofágjai például megemelkedett légzési és fagocitózis aktivitást mutattak (Jeney G. és Jeney Zs., 2002). Hasonló hatást figyeltek meg glukán oldatában fürdetett szivárványos pisztrángoknál is (Jeney és Anderson, 1993). A glukánok alkalmazhatók még adjuvánsként a vakcinálás hatékonyságának növelésére (Aakre és mtsai., 1994; Rorstad és mtsai., 1993), illetve a szállítási stressz immunrendszert gyengítő hatásának csökkentésére (Jeney és mtsai., 1997).

Állati eredetű kivonatok

Néhány gerinctelen állatból készült kivonatnak bizonyítottan immunstimuláló tulajdonsága van. A legismertebbek az *Ecteinascidia turbinata* tengeri zsákállatból (ETE) és a kaliforniai ehető kagylóból (*Haliotis discus*) (HDE) készült kivonatok. Az ETE angolnába injektálva növelte a fehérvérsejtek fagocitáló aktivitását és a halak ellenálló-képességét *A. hydrophila* fertőzéssel szemben (Davis és Hayasaka, 1984), a fagocitózis növekedését *in vitro* körülmények között is megfigyelték (McCumber és mtsai., 1981). A HDE szivárványos pisztrángok makrofágjainak és természetes ölüsejtjeinek aktivitását növelte, valamint csökkentette a *V. anguillarum* fertőzést követő elhullást (Sakai és mtsai., 1991).

Ergosan

Kereskedelmi forgalomban kapható immunstimulátor, amely a *Laminaria digitata* tengeri algából készült kivonatot tartalmaz. Az algakivonat stimulálja az oxigén felvételét és átjuttatását a sejtmembránon, ezáltal fokozza az immunrendszer sejtjeinek metabolikus aktivitását, ami erőteljesebb immunválaszhoz vezet. Szivárványos pisztrángokba injektálva növelte a fagociták légzési és fagocitáló aktivitását, a neutrofil sejtek arányát, és a makrofágok által termelt IL-1 β , IL-8 és TNF- α citokinek átírásának mértékét, a humorális paraméterekre viszont nem volt hatással (Peddie és mtsai., 2002). A tengeri sügér (*Dicentrarchus labrax*) esetében ezzel szemben 15 napos Ergosan-etetést követően jelentős mértékben megemelkedett a vérplazma lizozim-és komplementaktivitása. Ez a két humorális paraméter a kezelt csoportokban még az etetést követő 30. napon is szignifikánsan magasabb volt a kontroll csoportokban mért értékeknél (Bagni és mtsai., 2005).

Vitaminok

A C-vitamin (aszorbinsav) általánosan alkalmazott táplálékkiegészítő. Élettani szerepe alapvetően az, hogy semlegesíti a metabolikus folyamatok során keletkező oxidatív szabadgyököket, ezzel megvédi a sejteket a szabadgyökök okozta károsodástól. Magasabb dózisban adagolva a természetes immunrendszert is erősíti. Ezt a hatást több, gazdaságilag fontos halfaj, így a szivárványos pisztráng, az atlanti lazac és a csatornaharcsa esetében is kimutatták (Navarre és Halver, 1989; Hardie és mtsai., 1991; Li és Lovell, 1985), habár ennek ellentmondó kísérleti eredmények is léteznek (Jeney és Jeney, 2002). Az E-vitamin (tokoferol) fontos szerepet játszik a sejtmembrán szerkezetének megőrzésében és különböző sejtfunkciókban (Anderson, 1992). Az E-vitaminhoz hasonló szerkezetű vegyületek elősegítik a makrofágok és limfociták által termelt citokinek, elsősorban a TNF- α , az IL-1 és az IL-2 termelését, illetve megakadályozzák a makrofágok membránjának károsodását (Galeotti, 1998). Csökkentett E-vitamin tartalmú táp etetése jelentős mértékben gyengítette a szivárványos pisztráng nem specifikus immunválaszát (Blazer és Wolke, 1984) és az atlanti lazac betegségekkel szembeni ellenálló-képességét (Hardie és mtsai., 1990). Emelt dózisu E-vitamint tartalmazó táp etetése viszont elősegítette a makrofágok fagocitáló és légzési aktivitásának növelését csatornaharcsákban (Wise és mtsai., 1993).

Ásványi anyagok

Az állati és emberi szervezet számára a szervetlen anyagok számos élettani folyamathoz, például a csontok kifejlődéséhez, a sav-bázis egyensúly szabályozásához, a kolloid rendszerek fenntartásához vagy a hormonok és enzimek szintéziséhez nélkülözhetetlenek. Az ásványi anyagok hiánya biokémiai, szerkezeti vagy működésbeli zavarokat okozhat, amelyek súlyossága a megvonás mértékétől és időtartamától függ (Watanabe és mtsai., 1997). A szervetlen elemek egy része (például a kalcium, a kén, a foszfor vagy a magnézium) makroelem, többségük (például a cink, a szelén, a vas, a bór vagy a réz) mikro- vagy nyomelem. Az utóbbiak a többi tápanyaghoz képest igen alacsony (napi 100 mg/kg-nál kisebb) koncentrációban szükségesek a szervezet számára (Lim és mtsai., 2001). A nyomelemek túladagolása hasonlóan káros következményekkel jár, mint a hiányuk. A szervezet emiatt a nyomelemek szintjét azok felvételével, raktározásával és ürítésével igen pontosan szabályozza (Watanabe és mtsai., 1997).

A fentebb említett élettani folyamatok mellett az ásványi anyagoknak az immunválasz és a betegségekkel szembeni ellenálló-képesség kialakításában is fontos szerepük van, amelyet számos kísérleti eredmény igazol. 0,4 és 0,85 mg/kg foszfort tartalmazó haltáppal etetett csatornaharcsáknál (*Ictalurus punctatus*) például nem volt mortalitás *Edwardsiella ictaluri* fertőzés után. Ugyanebben a kísérletben a 0, 0,05 és 0,1 mg/kg foszfort tartalmazó táppal etetett halak 59 százaléka elpusztult (Eya és Lovell, 1998). Az antitest-szintézis folyamatában minden egyes amidkötés kialakításához egy adenozin-trifoszfát (ATP) molekula két pirofoszfát-kötésének energiájára van szükség. Elegendő foszfor hiányában az antitestek szintézisében komoly zavarok állhatnak be (Lim és mtsai., 2001).

A nyomelemek közül a szelén a glutation-peroxidáz enzim alkotórésze (Rotruck és mtsai., 1973), amelynek az E-vitaminnal együtt fontos szerepe van az oxidatív szabadgyökök semlegesítésében, ezáltal a sejtmembránok szerkezetének megőrzésében. Ezzel magyarázható a szelénnek az immunválasz kialakításában betöltött szerepe, mivel a glutation-peroxidáz a monociták, makrofágok és granulociták membránjait is megvédi az oxidatív károsodástól (Lim és mtsai., 2001). Csatornaharcsák fejveséjéből izolált makrofágok intracelluláris respirációs aktivitása jelentős mértékben növekedett olyan halak esetében, amelyeket előzőleg a normális növekedéshez szükséges szelén- és E-vitamin-koncentráció négyszeresét tartalmazó táppal etettek (Wise és mtsai., 1993). Szintén csatornaharcsákkal végezték el azt a kísérletet, amelyben *E. ictaluri* fertőzést követően szignifikáns mértékben emelkedett a vérplazmában a baktérium elleni specifikus antitestek koncentrációja azokban a kísérleti csoportokban, amelyeket magasabb szeléntartalmú táppal etettek. A leghatékonyabb szelénforrásnak a szeléntartalmú élesztő bizonyult, a szelén szerves formájának (nátrium-selenit) mérsékeltebb hatása volt. Ugyanebben a kísérletben az *E. ictaluri* fertőzést követő mortalitás jelentős mértékben csökkent a szelén szerves formáját, kisebb mértékben pedig a szerves formáját tartalmazó táppal etetett halak esetében (Wang és mtsai., 1997b). Hasonló eredményeket kaptak egy csendes-óceáni chinook lazacokkal (*Onchorhynchus tshawytscha*) elvégzett kísérletben, amelyben a szelént és E-vitamint nem tartalmazó táppal etetett halak mortalitása jelentős mértékben megnőtt egy *Renibacterium salmoninarum* fertőzést követően (Thorarinsson és mtsai., 1994).

Egy másik nyomelemnek, a cinknek is fontos szerepe van az immunválasz kialakításában, habár a hatásmechanizmus nem ismert olyan pontosan, mint a szelén esetében (Lim és mtsai., 2001). Cinkkel kiegészített táppal etetett csatornaharcsákból

izolált makrofágok kemotaktikus aktivitása például javult a kontroll csoportéhoz képest, a fagocitáló aktivitás viszont csökkent (Lim és mtsai., 1996). Egy másik kísérletben a cinkes tápkiegészítés jelentős mértékben javította a csatornaharcsák ellenálló-képességét az *E. ictaluri* fertőzéssel szemben. A szelénhez hasonlóan a cink szerves formája (cink-metionin) jóval hatékonyabbnak bizonyult, mint a szervesetlen cink-szulfát (Paripatananont és Lovell, 1995).

A bőrnek az immunválasz kialakításában betöltött szerepéről ennél kevesebbet tudunk. Ez a nyomelem az élő szervezetben hidroxil-, valamint amino- és imidazol-csoportokat tartalmazó vegyületek részeként funkcionál. A bőrtartalmú szerves molekulák sokféle enzim működését szabályozzák, amelyek a Ca-, Mg- és P- anyagforgalomban, az energia-metabolizmusban és az immunrendszer megfelelő működésében játszanak szerepet (Szigeti és mtsai., 2005). A bőr immunrendszerre gyakorolt pozitív hatásának mechanizmusa még nem ismert pontosan, azonban magát a hatást több állatfajon, például szarvasmarhákön vagy sertéseken is kimutatták (Armstrong és Spears, 2003; Fry és mtsai, 2010).

2.3. Gyógynövények, mint immunstimulátorok

2.3.1. A gyógynövények alkalmazása a népi gyógyászatban

A népi gyógyászatban régóta ismert bizonyos gyógynövények immunrendszert erősítő hatása (Tan és Vanitha, 2004), habár az aktív komponensek izolálása és azonosítása csak a 19. század végén kezdődött. A természetben ezek a vegyületek a növények saját védekezőrendszerének részei, leggyakrabban a mikrobiális fertőzések ellen termelődnek. A flavonoidok és hidroxilált fenolok például fertőzések hatására szintetizálódnak (Dixon és mtsai, 1983). Az alkaloidok közül a kinin pedig a malária legrégebben ismert és alkalmazott gyógyszere. Egy 1990-es jelentés szerint a világ népességének 64%-a használ növényi eredetű gyógyszereket a betegségek leküzdésére, a szintetikus úton előállított gyógyszereknek pedig 50%-a növényi eredetű, vagy valamilyen természetes vegyület alapján készül (Tan és Vanitha, 2004).

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 (Lin és Zhang, 2004). Elsősorban kínai és indiai kutatók foglalkoznak ezzel a témával, de az érdeklődés világszerte növekszik (Dügenci és mtsai, 2003; Drasar és Moravcova, 2004). A gyógynövények immunstimuláló hatását legtöbbször egereken, csirkéken vagy humán sejtvonalakon vizsgálják (Cao és Lin, 2003.; Lin és Zhang, 2004.), az utóbbi években viszont 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 (Citarasu, 2010; Chakraborty és Hancz, 2011; Harikrishnan és mtsai., 2011). Az irodalmi áttekintés további részében ezért általánosságban fogom ismertetni a gyógynövények immunstimuláló hatását igazoló irodalmi adatokat, esetenként kitérve a halakkal végzett kísérletekre is.

2.3.2. Immunstimulátorként használható gyógynövények

Aloe vera (aloé)

Ez a növény Afrikában őshonos. Innen a 7. században került Kínába, ahol hamar a népi orvoslás fontos eszközévé vált (Tan és Vanitha, 2004.). A növény leveléből készült kivonat sokféle vegyületet tartalmaz (pl. aloint, aldopentózt, kalcium-oxalátot és poliszacharidokat), amelyek közül egy poliszacharidnak, az acemannánnak van jelentősebb immunstimuláló tulajdonsága. Az acetilált mannán képes növelni a makrofágok fagocitáló aktivitását, továbbá az általuk termelt citokinek (IL-1, IL-6 és TNF- α) elválasztását (Egger és mtsai., 1996; Zhang és Tizard, 1996). Acemannánkezelés hatására a lépben és a csontvelőben intenzívebbé válik a limfociták osztódása (Egger és mtsai., 1996).

Angelica (angyalgyökér) fajok

Az *Angelica* fajok leveléből és gyökeréből készített kivonatok mikrobiális fertőzések megelőzésén kívül a természetes és a specifikus immunrendszer stimulációjára is használhatók (Kwon és mtsai., 1997). Az *Angelica gigas* gyökeréből izolált poliszacharid, az angelán serkenti az IL-2, IL-4, IL-6 és IFN- γ citokinek termelését. Az IL-6 szintje az angelánnal történő kezelést követően azonnal megemelkedik, a többi citokin termelésének fokozódása valószínűleg csak ennek

következménye (Tan és Vanitha, 2004.). Ezek a fehérjék a TH2 sejteket aktiválják, az angelán elsődleges hatása tehát a T-sejtektől függő antitesttermelés fokozása.

Astragalus membranaceus (mongol csüdfű)

Az egyik legfontosabb és legismertebb kínai gyógynövény gyökere sokféle biológiailag aktív vegyületet tartalmaz. Vannak közöttük mono- és poliszacharidok (glükuronsav), szteránvázas vegyületek (β -szitoszterol) és flavonoidok (izoflavon), továbbá 14-féle nyomelem (pl. szelén, cink, vas) (Tan és Vanitha, 2004). Ezek közül a legfontosabb egy poliszacharid (*Astragalus* poliszacharid, APS), amelynek immunstimuláló hatását sok kísérleti adat bizonyítja. APS-kezelés hatására például növekszik az aktivált B-limfociták száma (Song és mtsai., 2000), fokozódik a makrofágok által termelt citokinek (IL-1, IL-6 és TNF- α) expressziója, emelkedik a makrofágok száma és a fagocitáló sejtek aktivitása (Song és mtsai., 2000).

Az *Astragalus* egyike azoknak a gyógynövényeknek, amelyek hatását több tenyésztett halfajon is vizsgálták *in vivo* körülmények között. A nílusi tilápia (*Oreochromis niloticus*) esetében a táphoz kevert *Astragalus*-kivonat kétféle dózisa (0,1 és 0,5%) stimulálta a makrofágok fagocitózisát és a vérplazma lizozimaktivitását egy-, illetve háromhetes etetést követően. A makrofágok respirációs aktivitására nem volt hatással (Yin és mtsai., 2006). Kínai kutatók az *Astragalus* és az *Angelica* 5:1 arányú keverékének hatását tanulmányozták a pontyon és a *Pseudosciana crocea* kínai halfajon (Jian és Wu, 2003; 2004). A gyógynövénykeveréket 1,0 és 1,5%-ban tartalmazó táp hatására mindkét faj esetében jelentős mértékben emelkedett a fagocitáló sejtek száma és a vérplazma lizozim- illetve a komplementrendszer hemolitikus aktivitása. Szintén kínai kutatók mutatták ki, hogy az *Astragalus* poliszachariddal injektált pontyok fejveséjében dóziszfüggő módon megemelkedett az IL-1 β mRNS szintje (Yuan és mtsai., 2008), a kopoltyúban és a lépben viszont a vizsgált citokinek kifejeződése nem változott.

Azadirachta indica

Az *A. indica* a hagyományos indiai orvoslás egyik legfontosabb gyógynövénye, amelynek számos előnyös tulajdonságát leírták már (Govindachari, 1992). Indiai kutatók által elvégzett kísérletekben a növény antimikrobiális és antitumor aktivitását sikerült igazolni (Agarwal és Singh, 1999). Az *A. indica* immunrendszert stimuláló

hatását is kimutatták patkányokon (Sen és mtsai., 1996), egereken (Ray és mtsai., 1996) és gyengített immunrendszerű csirkéken (Sadekar és mtsai., 1998). A gyógynövényből izolált terpenoid szerkezetű vegyület, az azadirachtin javította a tilápiák fehérvérsejtjeinek respirációs aktivitását, növelte a halak fehérvérsejtjeinek számát és anti-SRBC aktivitásukat (Logambal és Michael, 2000; 2001). Ugyancsak tilápiákban figyelték meg, hogy az *A. indica* jelentős mértékben javította a vakcinálás utáni elsődleges és másodlagos antitestválaszt, ezzel növelte a vakcinálás hatékonyságát (Venkatalakshmi és Michael, 2001). *A. hydrophila* baktériummal fertőzött pontyok 30 napon keresztül, naponta 10 percre az *A. indica* kivonat 1 g/l koncentrációjú oldatában fürdetve teljesen kigyógyultak a betegségből, még a bőrükön lévő fekélyek is eltűntek, ezzel együtt növekedett a vörösvérsejtjeik száma, hemoglobinszintjük és a vérplazmájuk fehérjekoncentrációja is (Harikrishnan és mtsai., 2003).

Ganoderma lucidum (pecsétviaszgomba)

A többi kínai gyógynövénytől eltérően a *Ganoderma* nem virágos növény, hanem egy gombafaj. Gyógyászati célokra a gomba termőtestét használják, amelynek immunstimuláló és antitumor hatása régóta ismert (Lin és Zhang, 2004). A termőtestből készült kivonat vízdoldékony frakciójában található glikoproteinek és poliszacharidok hatására fokozódik az IL-1, IL-2, IL-6, IFN- γ és TNF- α citokinek termelése (Wang és mtsai., 1997a). Az IFN- γ hatására aktiválódnak a dendritikus sejtek, amelyeknek fontos szerepük van az antigénprezentálásban és a specifikus immunválasz beindításában (Cao és Lin, 2003). A poliszacharidok ezen felül a B- és T- limfocitákat is képesek aktiválni (Bao és mtsai., 2002). A vízzel illetve etanollal készített kivonat pedig képes növelni a természetes ölüsejtek számát (Tan és Vanitha, 2004).

Lonicera japonica (japán lonc)

A *Lonicera* virágából készített kivonat többféle aktív komponenst is tartalmaz, amelyek közül a klorogénsav humán sejtvonalakban képes a makrofágok aktiválására a kalcineurin jelátviteli úton keresztül (Wu és mtsai., 2004). A kínai népi gyógyászatban a *Lonicera* kivonatát régóta alkalmazzák, elsősorban felső légúti fertőzések és a reumás ízületi gyulladás kezelésére (Lee és mtsai., 2001).

Ocimum sanctum (bazsalikom)

A növény levele a fenolhoz hasonló szerkezetű, vízben oldható vegyületeket, illetve eugenolt, metil-eugenolt és kariofillint tartalmaz, amelyek immunstimulátorként működhetnek, a természetes mellett a szerzett immunválaszt is erősíthetik (Logambal és mtsai., 2000). A levélből készített vizes kivonat például egerekben gátolta a tumornövekedést, illetve erősítette az ellenálló-képességüket a fertőzésekkel szemben (Devi és Gnanasoundari, 1995).

Panax ginseng (ginzeng)

Az *Astragalushoz* hasonlóan a ginzengnek is a gyökerét használják a kínai népi gyógyászatban. Aktív komponensei fehérjék, mono- és poliszacharidok, valamint a ginzenozidoknak nevezett szteroidszerű vegyületek (Tan és Vanitha, 2004). Az utóbbiak közül eddig 28-félét azonosítottak. A legtöbb komponensnek bizonyítottan van immunstimuláló tulajdonsága. A ginzenozidok például indukálják a limfociták osztódását és az IL-6 citokin termelését (Cho és mtsai., 2002). A poliszacharidok szintén stimulálják a citokinek expresszióját, valamint a makrofágok fagocitáló aktivitását és nitrogénoxid-termelését, amely az oxidatív szabadgyökök termeléséhez hasonló citotoxikus folyamat (Lim és mtsai., 2002). A ginzeng gyökerében található fehérjék elsősorban antimikrobiális hatásúak, immunstimuláló hatásuk jelenleg nem ismert (Lam és mtsai., 2002, Tan és Vanitha, 2004).

Phyllanthus emblica (amla)

A *P. emblica* kivonatának antioxidáns (Bhattacharya és Ghosal, 2000), gombaölő (Dutta és mtsai., 1998) és antimikrobiális hatása is van (Ahmad és mtsai., 1998). A gyümölcs kivonatóval kezelt patkányokban jelentős mértékben növekedett a peritoneális makrofágok fagocitáló aktivitása (Dahanukar és Tatte, 1997). Az amla gyümölcshúsa nagy mennyiségben tartalmaz C-vitamint, amely szintén immunstimulátor (Li és Lovell, 1985).

Scutellaria (szellőrózsa) fajok

A *Scutellaria* fajok gyökere igen magas (35%) koncentrációban tartalmaz flavonoid típusú vegyületeket, amelyek antibakteriális hatását több kísérleti adat is igazolta. A *S. barbata* gyökeréből készült kivonat hatásosan alkalmazható

Staphylococcus aureus fertőzés ellen (Sato és mtsai., 2000; Tan és Vanitha, 2004), hatása azonban erre a baktériumra specifikus. A *S. baicalensis* kivonata viszont sokféle baktérium (pl. *Streptococcus*, *Mycobacterium* vagy *Pseudomonas*) ellen is hatásos (Tan és Vanitha, 2004). A flavonoidok hatására növekszik a makrofágok által termelt TNF- α citokin expressziója (Hyung és mtsai., 1999), ami a nitrogénoxid-termelés fokozódásához vezet, de csak megfelelő koncentráció esetén (Chiu és mtsai., 2002). Az *Astragalushoz* hasonlóan a *Scutellaria* hatását is vizsgálták tilápiákon (Yin és mtsai., 2006), de ez a gyógynövény nem volt pozitív hatással a természetes immunrendszer jellemzőire, 0,5 és 1,0%-os dózisban pedig még csökkentette is a fehérvérsejtek respirációs és fagocitáló aktivitását. A *Scutellaria* immunrendszerre gyakorolt hatása tehát erősen dóziszfüggő lehet.

Solanum trilobatum

Ezt a gyógynövényt elsősorban légúti betegségek, asztma, szív- és májbetegségek kezelésére használják (Shahjahan és mtsai., 2004). Antimikrobiális és a tumorok növekedését gátló tulajdonságát is kimutatták (Mohan és Devi, 1997; Mohan és mtsai., 1998). Indiai kutatók vizsgálták a gyógynövényből vízzel és hexánnal készített kivonatok hatását a tilápiá természetes immunválaszára és a betegségekkel szembeni ellenálló-képességére. A vízben oldható frakció valamennyi vizsgált dózisa jelentős mértékben növelte a fehérvérsejtek respirációs aktivitását és csökkentette az *Aeromonas hydrophila* fertőzést követő elhullást (Divyaganeswari és mtsai., 2007).

Toona sinensis

A *Toona sinensis* fa levele sokféle, terpén és fenol szerkezetű, biológiailag aktív vegyületet tartalmaz. A belőle készült kivonatot régóta alkalmazzák a hagyományos kínai orvoslásban. Kínai kutatók a kivonat gyuladásgátló (Yang és mtsai., 2006) és antioxidáns (Hseu és mtsai., 2008) hatásait mutatták ki. A növény leveléből készített vizes kivonat kétféle koncentrációban (4 és 8 $\mu\text{g/ml}$) tilápiák hasüregébe injektálva javította a fehérvérsejtek respirációs és fagocitáló aktivitását, illetve a vérplazma lizozimaktivitását (Wu és mtsai., 2010).

Zingiber officinale (gyömbér)

A gyömbér porrá őrölt és szárított gyökerét nemcsak Kínában, hanem más távolkeleti országokban is használják népi gyógyászati célokra (Tan és Vanitha, 2004). A gyömbérgyökér egyik aktív komponense a kurkumin nevű terpénvázas vegyület, amely sokféle mikroorganizmus (pl. *Staphylococcus* vagy *Candida*) növekedését képes gátolni (Martins és mtsai., 2001). A gyökérből készített alkoholos kivonat pedig idő- és dóziszfüggő módon fokozza az IL-1 és IL-6 citokinek termelését (Hori és mtsai., 2003).

Egyéb gyógynövények

Kína és India mellett más országokban, például Mexikóban, Thaiföldön, Japánban és Törökországban is végeztek olyan kísérleteket, amelyekben különféle gyógynövénykivonatok alkalmazásával sikerült a tenyésztett hal- és rákfajok természetes immunválaszát és fertőző betegségekkel szembeni ellenálló-képességét javítani (Auro de Ocampo és Jimenez, 1993; Direkbusarakom és mtsai., 1996; Dügenci és mtsai., 2003).

Török kutatók a gyömbéren kívül a fagyöngy (*Viscum album*) és a nagy csalán (*Urtica dioica*) immunstimuláló hatását is vizsgálták szivárványos pszitragokon *in vivo* körülmények között. A három gyógynövény közül csak a gyömbér növelte jelentősebb mértékben a fehérvérsejtek respirációs és fagocitáló aktivitását, a vérplazma fehérjeszintje viszont mindhárom növényi kivonat hatására megemelkedett (Dügenci és mtsai., 2003). A Chevimmun nevű gyógynövény-kombináció szivárványos pszitragok hasüregébe injektálva jelentős mértékben javította a fehérvérsejtek vándorlási képességét, valamint fagocitáló és respirációs aktivitását. Ez a készítmény háromféle gyógynövény, a kasvirág (*Echinacea angustifolia*), a vízikender (*Eupatorium perfoliatum*) és a vad indigó (*Baptisia tinctoria*) kivonatait tartalmazta (Peddie és Secombes, 2003). Négyféle gyógynövényből (*Cynodon dactylon*, *Aegle marmelos*, *Withania somnifera* és *Zingiber officinale*) készített acetonos kivonat 1% koncentrációban a haltáphoz keverve pozitív hatással volt a mozambiki tilápia (*Oreochromis mossambicus*) leukokrit értékére, fehérvérsejtjeinek fagocitáló aktivitására és a vérplazma lizozimaktivitására (Immanuel és mtsai., 2009). Szintén tilápiákon mutatták ki japán és thaiföldi kutatók, hogy a C-UP III nevű, különböző gyógynövényekből készített és főleg poliszacharidokat tartalmazó immunstimulátor 0,2%-os koncentrációban a haltáphoz keverve mindössze hétnapos etetés után is

jelentős mértékben növelte a fehérvérsejtek fagocitáló aktivitását és a halak ellenálló-képességét *Aeromonas hydrophila* fertőzéssel szemben (Chansue és mtsai., 2000). A bíbor kasvirág (*Echinacea purpurea*) és a fokhagyma (*Allium sativum*) 1,0 ppt (parts per trillion), illetve 3% koncentrációban a haltáphoz keverve javította a tilápiák ellenálló-képességét *A. hydrophila* fertőzéssel szemben, ezen kívül a fehérvérsejtek adhéziós képességére és a fehérvérsejtek (limfociták) számára is pozitív hatással volt (Aly és Mohamed, 2010). A fokhagymának az afrikai harcsák természetes immunválaszára is kedvező hatása volt, hiszen 0,5%-os koncentrációban a táphoz keverve jelentős mértékben növelte a vérplazma fehérjeszintjét, a vörösvérsejtek számát és a halak rezisztenciáját az *A. hydrophila* fertőzéssel szemben (Thanikachalam és mtsai., 2010).

2.4. Az *Aeromonas hydrophila* baktérium

Kísérleteink végén minden csoportból azonos számú halat fertőztünk az *A. hydrophila* baktérium egy virulens törzsével (B2/12). Ez a Gram-negatív baktérium a mozgásképes *Aeromonas*-fajok közé tartozik, amelyek legnagyobb számban a magas szervesanyag-terhelésű édesvizekben fordulnak elő (Roberts, 1993). Fakultatív patogének, azaz majdnem mindig jelen vannak a vízi környezetben, betegséget okozni azonban csak meghatározott körülmények között képesek, akkor, amikor a halak immunrendszere legyengül, ellenálló-képességük csökken valamilyen stresszhatás, a vízi környezet kedvezőtlen változása vagy vírusos fertőzés (pl. *Rhabdovirus carpio*) miatt (Roberts, 1993; Jeney G. és Jeney Zs., 1995). A megfertőzött halakban mindössze néhány nap alatt kifejlődik a mozgó *Aeromonas* szeptikémiának (Motile Aeromonad Septicaemia, MAS) nevezett betegség, amelynek legfontosabb tünetei a bőrön megjelenő, változó mélységű és kiterjedésű, vörös színű fekélyek. A beteg halak hasürege gyakran duzzadt, folyadékkal telt (ödémás). Az egyébként is legyengült immunrendszerű halak a mozgó *Aeromonas*okkal fertőződve szinte biztosan elpusztulnak (Roberts, 1993). Napjainkban az *A. hydrophila* az egyik legkomolyabb problémát jelentő halpatogén baktérium, az általa a haltermelőknél okozott veszteségek dollármilliókban mérhetők (Poobalane és mtsai., 2008). A baktérium elleni védekezést nagyban megnehezíti, hogy számos, különböző antigén-tulajdonságú törzse létezik, és a kereskedelemben jelenleg nem kapható olyan vakcina, amely mindegyik ellen hatásos lenne (Poobalane és mtsai., 2010). Kezelésére gyakran alkalmaznak különböző antibiotikumokat és kemoterápiás szereket (pl. oxitetraciklint vagy szulfamerazint),

ezek túlzott használata azonban rezisztens baktériumtörzsek kifejlődéséhez vezet (Roberts, 1993). Az *Aeromonas*-fertőzés leghatásosabban a kiváltó okok megszüntetésével, azaz a víz szervesanyag-terhelésének csökkentésével és az immunrendszer legyengülésének megakadályozásával előzhető meg (Jeney G. és Jeney Zs., 1995). Az utóbbi cél a halakat ért stresszhatások minimálisra csökkentésével és immunstimulátorok használatával érhető el.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Kísérleti elrendezések

Kísérleteinket a HAKI recirkulációs halnevelő rendszerében hajtottuk végre. A halakat a kísérletek ideje alatt 100 literes műanyag tartályokban tartottuk. A kísérlet során a víz hőmérséklete és pH-értéke állandó volt (22-23 °C; pH 8,5). A víz oldottoxigén-tartalmát a telítettségi érték 80-90%-ára, a vízátfolyás sebességét 7 liter/percre állítottuk be.

Kísérleteinkben olyan gyógynövénykivonatokat alkalmaztunk, amelyekkel kínai kutatási partnereink korábbi vizsgálataik során kedvező eredményeket kaptak. A kísérleti tápok elkészítéséhez a kínai Xuancheng Baicao Plants Industry and Trade Ltd. és a Nantong Sihai Plant Extracts Co. Ltd. kereskedelmi forgalomban kapható termékeit használtuk, amelyek közül az *Astragalus* kivonat 40% *Astragalus* poliszacharidot, a *Lonicera* kivonat 25% klorogénsavat, a *Ganoderma* kivonat pedig 30% *Ganoderma* poliszacharidot tartalmazott. A porrá őrölt gyógynövénykivonatokat roppantott ponty-, tilápia- vagy harcsatáp szemcséivel kevertük össze, majd a tápokhoz állandó keverés mellett kukoricacsíra-olajat adagoltunk (1 kg tápához 30 ml-t). Hasonló módon kevertük a tápokhoz a bőrt is. Kísérleteinkben az Országos Állategészségügyi Intézet (OÁI) munkatársai által előállított bőrkoncentrátumot alkalmaztuk, amely a bőrt szerves molekulákhoz kötött formában tartalmazta. Az alkalmazott dózis kiválasztása elismert magyar táplálkozás-élettani szakértők (Dr. Szigeti Gábor (ÁDI) és Dr. Csengeri István (HAKI)) javaslatai alapján történt. A kontroll tápok csak olajat tartalmaztak, gyógynövényeket vagy nyomelemeket nem. A kísérleti tápokot a felhasználás előtt három napig levegőn szárítottuk.

A kísérletek ideje alatt a halakat olyan óraműves önetetőkkel etettük, amelyek a felhúzást követően 12 óra alatt, egyenletes sebességgel adagolták be a kísérleti tápokot a haltartó kádakba. A napi takarmányadag a kísérleti csoportok össztömegének (biomasszájának) 2%-a volt. Az össztömegek meghatározásához kéthetente lemértük a halak egyedi tömegét.

3.1.1. Az *Astragalus*, a *Lonicera* és a *Ganoderma* kivonatainak hatása a tilápia természetes immunválaszára és az *Aeromonas hydrophila* fertőzéssel szembeni ellenálló-képességére

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* 0,5%; *Lonicera* 1%; *Astragalus* 0,5% + *Ganoderma* 0,5% és a kontroll táp. A halakat három hétig etettük. Ezt követően 20-20 db halat mindegyik csoportból mesterségesen 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.

3.1.2. Az *Astragalus* és a *Ganoderma* kivonatainak hatása a ponty természetes immunválaszára, *Aeromonas hydrophila* fertőzéssel szembeni ellenálló-képességére 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* 0,5%; *Ganoderma* 0,5%; *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 Brittanía) 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 mesterségesen fertőztünk *A. hydrophila*-val ($1,2 \times 10^8$ sejt/ml, ami LD₈₀₋₁₀₀-nak felel meg, i.p. 0,1 ml/hal), és az elhullást egy hétig figyeltük.

3.1.3. Kétféle gyógynövénykivonat (*Astragalus* és *Lonicera*) és a bór hatása a ponty természetes immunválaszára és az *Aeromonas hydrophila* fertőzéssel szembeni ellenálló-képességére

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 mesterségesen

fertőztünk *A. hydrophila*-val (5×10^7 sejt/ml, amely LD₅₀-nek felel meg) és az elhullást egy hétig figyeltük.

3.1.4. Kétféle gyógynövénykivonat (*Astragalus* és a *Lonicera*) és a bór hatása a tilápia természetes immunválaszára és az *Aeromonas hydrophila* fertőzéssel szembeni ellenálló-képességére

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 mesterségesen fertőztünk *A. hydrophila*-val (5×10^7 sejt/ml, ami LD₈₀₋₁₀₀-nak felel meg,) és az elhullást egy hétig figyeltük.

3.2. Félüzemi próbák

A laboratóriumi kísérletekben leghatékonyabbnak bizonyult gyógynövény- és gyógynövény-nyomelem kombinációt félüzemi körülmények között teszteltük. Három ilyen vizsgálatot végeztünk tilápiákon, pontyokon és afrikai harcsákon. Ezeket a kísérleteket is a HAKI recirkulációs halnevelő rendszerében hajtottuk végre. A pontyok és a tilápiák 200-200 egyedből kialakított kísérleti csoportjait 500 literes, az afrikai harcsák 49 egyedből álló csoportjait pedig 20 literes medencékben neveltük, három ismétléssel. 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 önetetőkkel végeztük. A félüzemi kísérletekhez a tápokot a HAKI tápüzeme készítette el.

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.

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

3.3.1. Vérmintavétel a kísérleti halakból

A természetes immunválasz jellemzőit a halak fehérvérsejtjeiből és vérplazmájából határoztuk meg, amelyhez a kísérleti halaktól vérmintát kellett vennünk. A kísérleteknél hetente egyszer, csoportonként 5 db halból vettünk vért. A félüzemi próbáknál csak egyszer, a négy- vagy hathetes etetés végén volt mintavétel, 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 (Matuk és Gulyás, 1987) elaltattuk. Egy halból csak egy vérmintát 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).

3.3.2. 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 µl 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. Ebben a koncentrációban a sejtek fagocitáló és respirációs aktivitása megbízhatóan detektálható (Secombes, 1990).

3.3.3. A fehérvérsejtek fagocitáló aktivitásának mérése

A granulociták, monociták és makrofágok fagocitózis útján képesek a kórokozók elpusztítására. Ez az aktivitás az egyik legkorábban aktiválódó védekezési mechanizmus. Mérése során a sejtek kongóvörössel megfestett élesztősejteket fagocitálnak (Seeley és mtsai., 1990). 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.

3.3.4. A fehérvérsejtek respirációs aktivitásának mérése (sejten kívül)

A fagocitózis mellett a makrofágok oxidatív szabadgyökök termelésével is képesek a patogén mikroorganizmusok elpusztítására. A reakció kiváltásához elegendő a kórokozó tapadása a makrofág membránjához. A folyamat során oxigénmolekulákból toxikus szuperoxid-anionok (O_2^-) keletkeznek, a sejtek oxigénfelvétele, azaz respirációs (légzési) aktivitása pedig növekszik. A szuperoxid-anionok a sejtben maradnak, vagy a sejtten kívülre diffundálnak. Az izolált fehérvérsejtek sejtten kívüli (extracelluláris) respirációs aktivitását a ferricitokró-m-c redukciója alapján határoztuk meg (Secombes, 1990). A sejtkoncentráció beállítása után a sejteket 96 üregű mikrotiter-lemezekre osztottuk szét. Egy üreg 100 μ l sejtszuszpenziót tartalmazott. A mérést mintánként 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 PMA a sejtek membránjához tapadva képes beindítani a szuperoxid gyökök termelését. 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. Ez az enzim a keletkező szuperoxid-anionokat hidrogén-

peroxiddá (H_2O_2) alakítja, megakadályozva ezzel a ferricitokró-m-c redukcióját. A mintákat sötétben, szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk, majd megmértük a fényelnyelésüket 550 nm hullámhosszon. A csak PMA-val kezelt minták fényelnyelési értékeiből kivontuk a PMA/SOD-dal kezelt minták értékeit, az eredményt megszoroztuk 15,87-dal, így megkaptuk a termelt szuperoxid-gyökök mennyiségét nanomólban.

3.3.5. 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 (Secombes, 1990). 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 mintánként 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.

3.3.6. A vérplazma lizozimaktivitásának mérése

A fehérvérsejtek és neutrofil granulociták által termelt lizozim képes a Gram-pozitív baktériumok sejtfalát alkotó N-acetil-glükózamin és N-acetil-muraminsav közötti β (1-4) kötéseket elhasítani, ezáltal a baktériumsejteket elpusztítani. Ez az alapja a lizozimaktivitás mérési módszerének, amelynek során a lizozimra érzékeny Gram-pozitív baktériumok szuszpenzióját adjuk a szérummintákhoz (Sankaran és Gurnani, 1972). Méréseinkhez *Micrococcus lysodeikticus* baktériumokat (Sigma) szuszpendáltunk fel foszfátpufferben (0,05M; pH 6,2), 0,02% (w/v) koncentrációban.

Standard sorozatként liofilizált tojásfehérje-lizozim (Sigma) 0,5; 1; 2,5; 5; 10 és 20 µg/ml-es oldatait használtuk. Minden mérés előtt új standard görbét vettünk fel. A mérést mintánként három párhuzamossal végeztük. Mikrotiter-lemez üregeibe 50-50 µl vérplazmát vagy standard oldatot pipettáztunk, amelyhez 250 µl *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 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.

3.3.7. A vérplazma fehérjeszintjének meghatározása

A vérplazma fehérjéi közé tartoznak az immunrendszer humorális elemei, például az immunoglobulinok, a transferrin, az agglutininek és a precipitinek (Magnadottir, 2006). A vérplazma összes fehérjeszintjét a Biuret-reakción alapuló kolorimetriás módszerrel határoztuk meg, amelyhez egy előre összeállított diagnosztikai reagenskészletet (Reanal) használtunk. A mérést mintánként 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: $y = Am / Ast * x$, ahol y a minta fehérjekoncentrációja, Am a minta fényelnyelése, Ast a standard oldat fényelnyelése, x pedig a standard oldat ismert koncentrációja.

3.3.8. A vérplazma immunoglobulin-szintjének meghatározása

Az immunrendszer humorális elemei közül a vérplazmában oldott immunoglobulinok koncentrációját külön is meghatároztuk, amelyhez szintén egy Biuret-reakción alapuló módszert alkalmaztunk. 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. A centrifugálás során a vérplazmából kicsapódott immunoglobulinok az üregek alján gyűltek össze. Ezután meghatároztuk a felülúszó fázis

fehérjekoncentrációját a fentebb ismertetett módszerrel. A mérést most is mintánként három párhuzamossal végeztük. Ezt az értéket kivontuk a fehérjekoncentrációból, ezzel megkaptuk a vérplazma immunoglobulin-koncentrációját.

3.3.9. Halak fertőzése *Aeromonas hydrophila* baktériummal

A kísérleteinkhez használt baktériumtörzset a Stirlingi Egyetem (Nagy-Britannia) Akvakultúra Intézetének Bakteriológiai Laboratóriuma bocsátotta rendelkezésünkre. 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 baktériumsuszpenziót 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 fertőzéses 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.

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

A pontyokkal elvégzett egyik 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 (Adams, 1990) 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-szuszpenziót 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-benzidín-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.

3.3.11. 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 hálót 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.

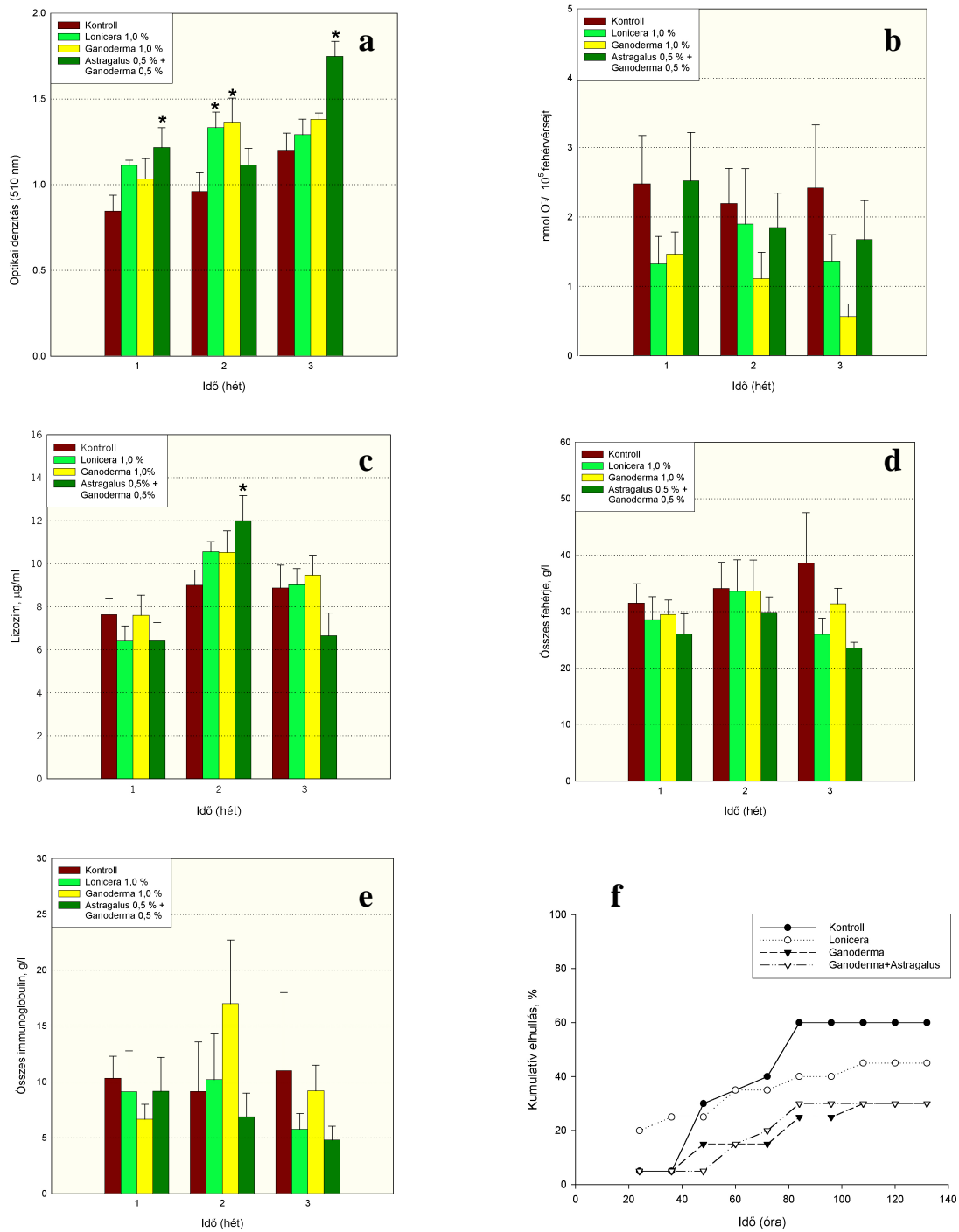
Az adatok statisztikai kiértékeléséhez és az ábrák megrajzolásához az SPSS., Inc. által kifejlesztett SigmaStat és SigmaPlot számítógépes programokat használtuk.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS

4.1. A kísérletek eredményei

4.1.1. A *Lonicera*, a *Ganoderma* és az *Astragalus-Ganoderma* kombináció hatása a tilápia természetes immunválaszára

A fehérvérsejtek extracelluláris légzési aktivitása a gyógynövényes kezelések hatására nem emelkedett számottevő mértékben a kontroll csoporthoz képest (1.b. ábra). A fagocitáló aktivitás viszont szignifikáns növekedést mutatott a kétféle gyógynövénnyel (*Astragalus* és *Ganoderma*) kezelt csoportban az első és a harmadik, a *Lonicerával* és a *Ganodermával* etetett halaknál pedig a második héten (1.a. ábra). A vérplazma lizozimaktivitása a második héten a kétféle gyógynövénnyel kezelt csoportban volt szignifikánsan magasabb, mint a kontrollnál (1.c. ábra). A másik két vizsgált humorális paraméter, a vérplazma fehérje- és immunoglobulin-szintje a kísérlet során egyik kezelt csoportban sem különbözött jelentős mértékben a kontrolltól (1.d. és e. ábra). Az *A. hydrophila*-fertőzés utáni kumulatív mortalitás a kontroll csoportban volt a legmagasabb (60%), a *Ganodermát*, illetve a kétféle gyógynövényt tartalmazó táppal kezelt csoportban pedig a legalacsonyabb (30%). A csak *Lonicerával*, illetve csak *Ganodermával* kezelt csoportban az elhullás mértéke 45% volt (1. f. ábra).



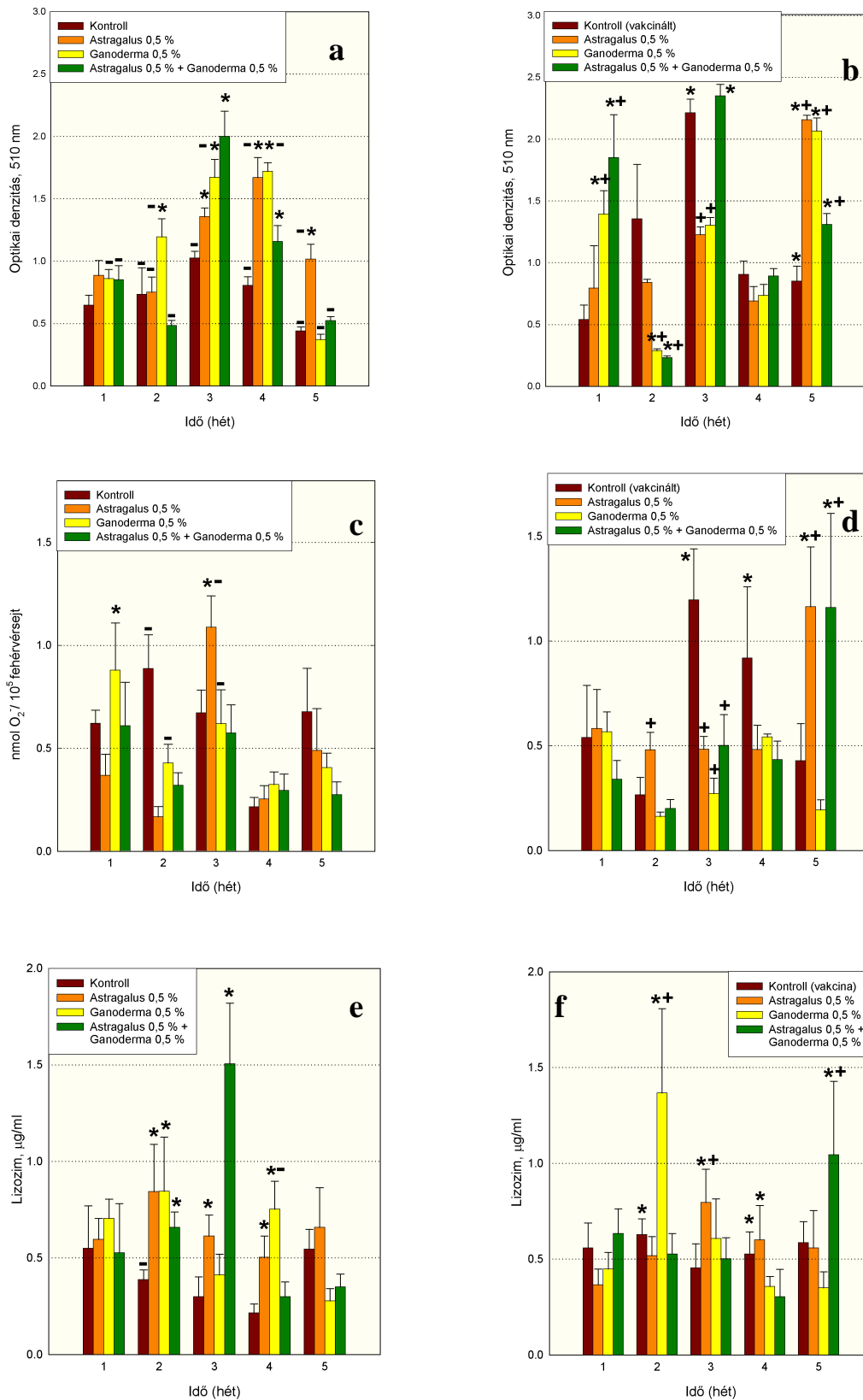
1. ábra. A *Lonicera*, a *Ganoderma* és az *Astragalus-Ganoderma* kombináció hatása a tilápia természetes immunválaszáának mutatóira. A fehérvérsejtek fagocitáló aktivitása (a), légzési aktivitása (b), a vérplazma lizozimaktivitása (c), összes fehérje- (d) és immunoglobulin-szintje (e). Kumulatív mortalitás *A. hydrophila* fertőzés után (f). *: szignifikáns különbség a kontrollhoz képest ($p < 0,05$).

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

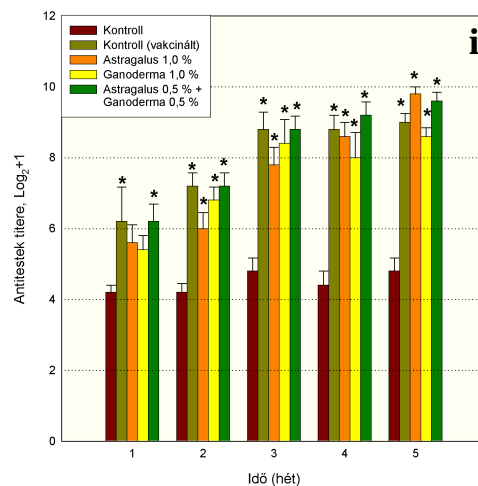
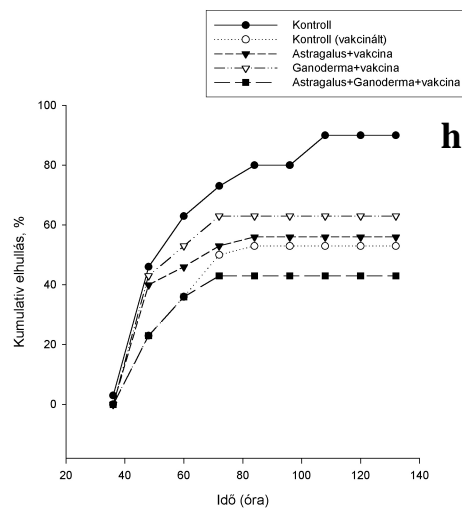
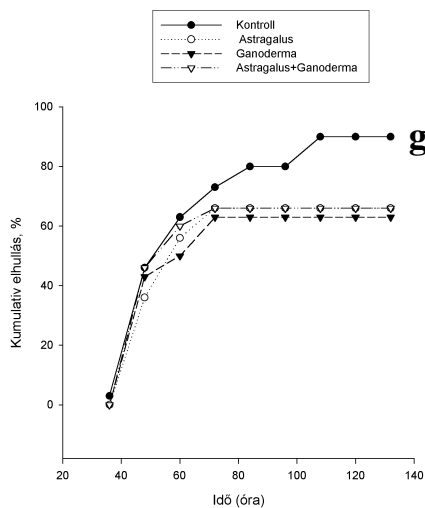
A fehérvérsejtek fagocitáló aktivitása a kísérlet harmadik és negyedik hetében mindhárom, gyógynövényekkel kezelt, nem vakcinált csoportban szignifikáns mértékben magasabb volt, mint a kontrollnál. Ezen kívül az *Astragalus* kivonattal kezelt csoport az ötödik, a *Ganodermával* kezelt csoport pedig a második héten mutatott jelentősebb emelkedést a kontrollhoz képest (2. a. ábra). A vakcinált csoportok közül a *Ganodermával* és a kétféle gyógynövénnyel kezelt csoportban már az első héten szignifikáns mértékben megemelkedett a fehérvérsejtek fagocitáló aktivitása a vakcinált kontrollhoz képest. Ez a paraméter az ötödik héten valamennyi vakcinált csoportban jelentős mértékben magasabb volt, mint a kontroll csoportokban. Ugyanakkor a második héten a *Ganodermával* és a kétféle gyógynövénnyel, a harmadik héten pedig az *Astragalusszal* és a *Ganodermával* kezelt csoportban is szignifikáns mértékű csökkenést mutatott mindkét kontrollhoz képest (2.b. ábra).

A fehérvérsejtek légzési aktivitása a nem vakcinált halaknál a kontrollhoz képest számottevő mértékben megnövekedett a *Ganodermával* kezelt csoportban az első, az *Astragalusszal* etetett csoportban pedig a harmadik héten (2.c. ábra). A vakcinálás és a gyógynövénykivonatok kombinációja ennél változatosabb eredményeket adott. A harmadik héten ez a paraméter mindhárom, gyógynövénnyel kezelt csoportban szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a csak vakcinált halaknál. Ugyanakkor az ötödik héten az *Astragalusszal* és a kétféle gyógynövénnyel etetett halaknál jelentős mértékben magasabb volt, mint a kétféle kontroll csoportban (2.d. ábra).

A vérplazma lizozimaktivitása a nem vakcinált halaknál már a második héten szignifikánsan magasabb volt mindhárom kezelt csoportban, mint a kontroll esetében. A lizozimaktivitás szignifikánsan magasabb maradt az *Astragalusszal* és a kétféle gyógynövénnyel kezelt csoportban a harmadik, az *Astragalusszal* és *Ganodermával* kezelt csoportban pedig a negyedik héten (2.e. ábra). A vakcinált halaknál a lizozimaktivitás jelentős mértékű emelkedését mértük a második héten a *Ganodermával*, a harmadik héten az *Astragalusszal*, a kísérlet végén pedig a gyógynövények kombinációjával kezelt csoportokban (2.f. ábra).



2. ábra. Az *Astragalus* és a *Ganoderma* kivonatok hatása a ponty természetes immunválaszának mutatóira a nem vakcinált (balra) és a vakcinált (jobbra) csoportokban. A fehérvérsejtek fagocitáló aktivitása (a és b), légzési aktivitása (c és d), illetve a vérplazma lizozimaktivitása (e és f). *: szignifikáns különbség a nem vakcinált kontrollhoz képest ($p < 0,05$), +: szignifikáns különbség a vakcinált kontrollhoz képest ($p < 0,05$), -: szignifikáns különbség megfelelő vakcinált és nem vakcinált csoport között ($p < 0,05$).



2. ábra (folytatás). Kumulatív elhullás *Aeromonas hydrophila* fertőzés után a nem vakcinált (balra) és vakcinált (jobbra) csoportokban (g és h), illetve az *A. hydrophila* elleni antitestek títere a vakcinált csoportokban (i). *: szignifikáns különbség a kontrollhoz képest ($p < 0,05$).

A megfelelő vakcinált és nem vakcinált csoportok között elsősorban a fehérvérsejtek fagocitáló aktivitásában volt különbség. Az *Astragalus*szal kezelt és vakcinált halakban ez a paraméter a negyedik héten szignifikánsan alacsonyabb, a második és ötödik héten viszont szignifikánsan magasabb volt, mint a megfelelő nem vakcinált csoportban. A *Ganoderma*val és vakcinával kezelt csoportban a fagocitáló aktivitás a kísérlet első és utolsó hetében szignifikánsan magasabb, a többi mintavételi időpontban pedig alacsonyabb volt, mint a csak *Ganoderma*val kezelt halaknál. A kétféle gyógynövénnyel kezelt és vakcinált halaknál ez a jellemző a harmadik héten szignifikánsan alacsonyabb, az első és az ötödik héten viszont szignifikánsan magasabb volt, mint a megfelelő nem vakcinált csoportban. A kontroll csoportok közül a vakcinált

halak fehérvérsejtjeinek fagocitáló aktivitása a kísérlet második hetétől kezdve végig szignifikánsan magasabb volt a negatív kontrollhoz képest (2.a. és b. ábrák). A fehérvérsejtek légzési aktivitása az *Astragalus*szal kezelt és vakcinált halaknál a harmadik héten szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a megfelelő nem vakcinált csoportban. Hasonló eredményt kaptunk a *Ganoderma*val és vakcinával kezelt halaknál a második és harmadik héten. A vakcinált kontroll csoportnál ez a jellemző a kísérlet második hetében volt szignifikánsan alacsonyabb, mint a negatív kontrollnál (2.c. és d. ábrák). A vérplazma lizozimaktivitása a negyedik héten a *Ganoderma*val kezelt és vakcinált halaknál szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a megfelelő nem vakcinált csoportban. A csak vakcinált halaknál ez a jellemző a második héten szignifikánsan magasabb volt, mint a negatív kontrollnál (2.e. és f. ábrák).

A kísérlet végén *A. hydrophila*val fertőzött halak elhullása a fertőzés után 36 órával kezdődött és kb. négy napig tartott. A nem vakcinált kontroll csoportban már a második napon 50%-os mortalitást figyeltünk meg, amely négy nap alatt 90%-ig emelkedett. A kumulatív mortalitás a többi csoportban ennél jóval alacsonyabb volt. A csak gyógynövényekkel kezelt halaknál 63% (*Ganoderma*), illetve 66% (*Astragalus*, kétféle gyógynövény) (1.g. ábra), a vakcinált halaknál pedig 63 (*Ganoderma*), 57 (*Astragalus*), 53 (csak vakcina), illetve 43% (kétféle gyógynövény) (2.g. és h. ábrák).

A csak gyógynövényekkel kezelt csoportokkal ellentétben a vakcinált csoportokban már a kísérlet első hetében sikerült az *A. hydrophila* elleni specifikus antitesteket kimutatni. A vérben keringő antitestek koncentrációja a kísérlet végéig valamennyi csoportban fokozatosan emelkedett, azonban az egyes csoportok között nem volt szignifikáns különbség (2.i. ábra).

4.1.3. Kétféle gyógynövénykivonat (*Astragalus* és *Lonicera*) és a bór hatása a ponty természetes immunválaszára

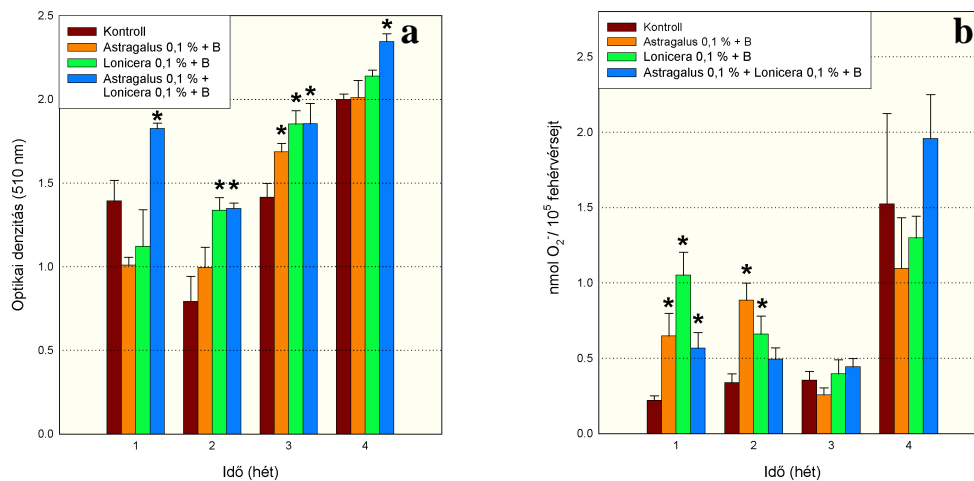
A fehérvérsejtek fagocitáló aktivitása a kétféle gyógynövényt (*Astragalus* és *Lonicera*), illetve bört tartalmazó táppal etetett halaknál már az első héten jelentős mértékben megemelkedett a kontrollhoz képest. Ez a megemelkedett fagocitáló aktivitás a kísérlet során végig megmaradt. A *Lonicera*val és bórral kezelt csoportban hasonló emelkedést mértünk a második és harmadik, az *Astragalus*szal és bórral kezelt csoportban pedig a második héten (3.a. ábra).

A fehérvérsejtek respirációs aktivitása az első héten valamennyi kezelt csoportban szignifikánsan magasabb volt, mint a kontroll esetében. Ezen kívül az *Astragalus*szal és bórral, illetve a *Lonicera*val és bórral kezelt csoportban mértünk szignifikáns növekedést a második héten (3.b. ábra)

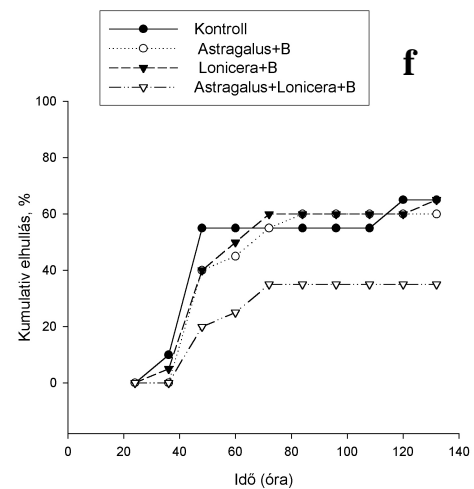
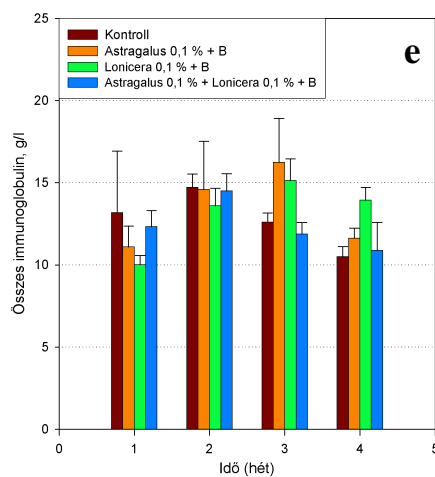
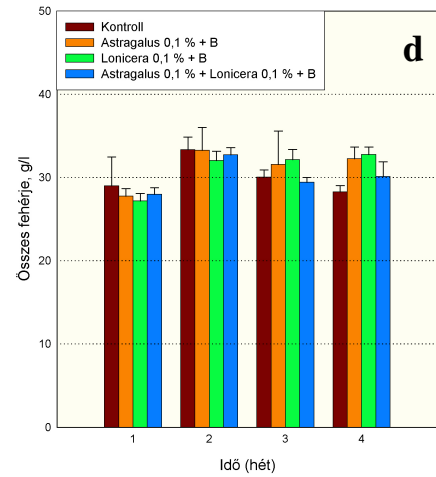
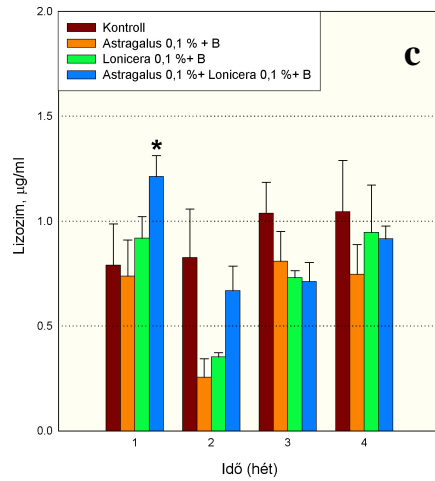
A vérplazma lizozimaktivitása szignifikáns mértékben megemelkedett a kétféle gyógynövénnyel és bórral kezelt csoportban az első héten. A többi csoportban ez a paraméter a kísérlet során nem változott számottevő mértékben a kontrollhoz képest (3. c. ábra).

A vérplazma fehérje- és immunoglobulin-szintje egyetlen kezelt csoportban sem mutatott jelentősebb mértékű emelkedést a kontrollhoz képest a kísérlet teljes időtartama alatt (3. d. és e. ábra).

Az *A. hydrophila* fertőzés utáni kumulatív mortalitás a kontroll csoportban 65%-os volt. A bórral és gyógynövényekkel kezelt halaknál az elhullás mértéke ezzel azonos volt vagy alacsonyabb, a kétféle gyógynövénnyel és bórral kezelt csoportban mindössze 35% (3. f. ábra).



3. ábra. Az *Astragalus*, a *Lonicera* és a bór hatása a ponty természetes immunválaszának mutatóira. A fehérvérsejtek fagocitáló aktivitása (a) és légzési aktivitása (b). *: szignifikáns különbség a kontrollhoz képest ($p < 0,05$).



3. ábra (folytatás). A vérplazma lizoziimaktivitása (c), fehérje- (d) és immunoglobulin-szintje (e). Kumulatív elhullás *A. hydrophila*-fertőzést követően (f). *: szignifikáns különbség a kontrollhoz képest ($p < 0,05$).

4.1.4. Kétféle gyógynövénykivonat (*Astragalus* és *Lonicera*) és a bór hatása a tilápia természetes immunválaszára

Ebben a kísérletben a fehérvérsejtek fagocitáló aktivitása már az első héten jelentős mértékben megemelkedett az *Astragalus*-kivonattal kezelt csoportban, és ez a megnövekedett fagocitáló aktivitás egészen a kísérlet végéig fennmaradt. A *Lonicera*-kivonattal kezelt csoportban a második héten mértünk jelentősebb mértékű emelkedést (4.a. ábra). A gyógynövényekkel és bórral kezelt csoportok közül az *Astragalus*szal etetett halakban ez a paraméter az első három héten szignifikánsan magasabb volt, mint a kontrollnál. Az *Astragalus* és a *Lonicera* kombinációjával kezelt csoportban a második és harmadik, míg a csak *Lonicera*val kezelt csoportban a második héten mértünk szignifikáns emelkedést. A negyedik héten ez a jellemző jelentős mértékben

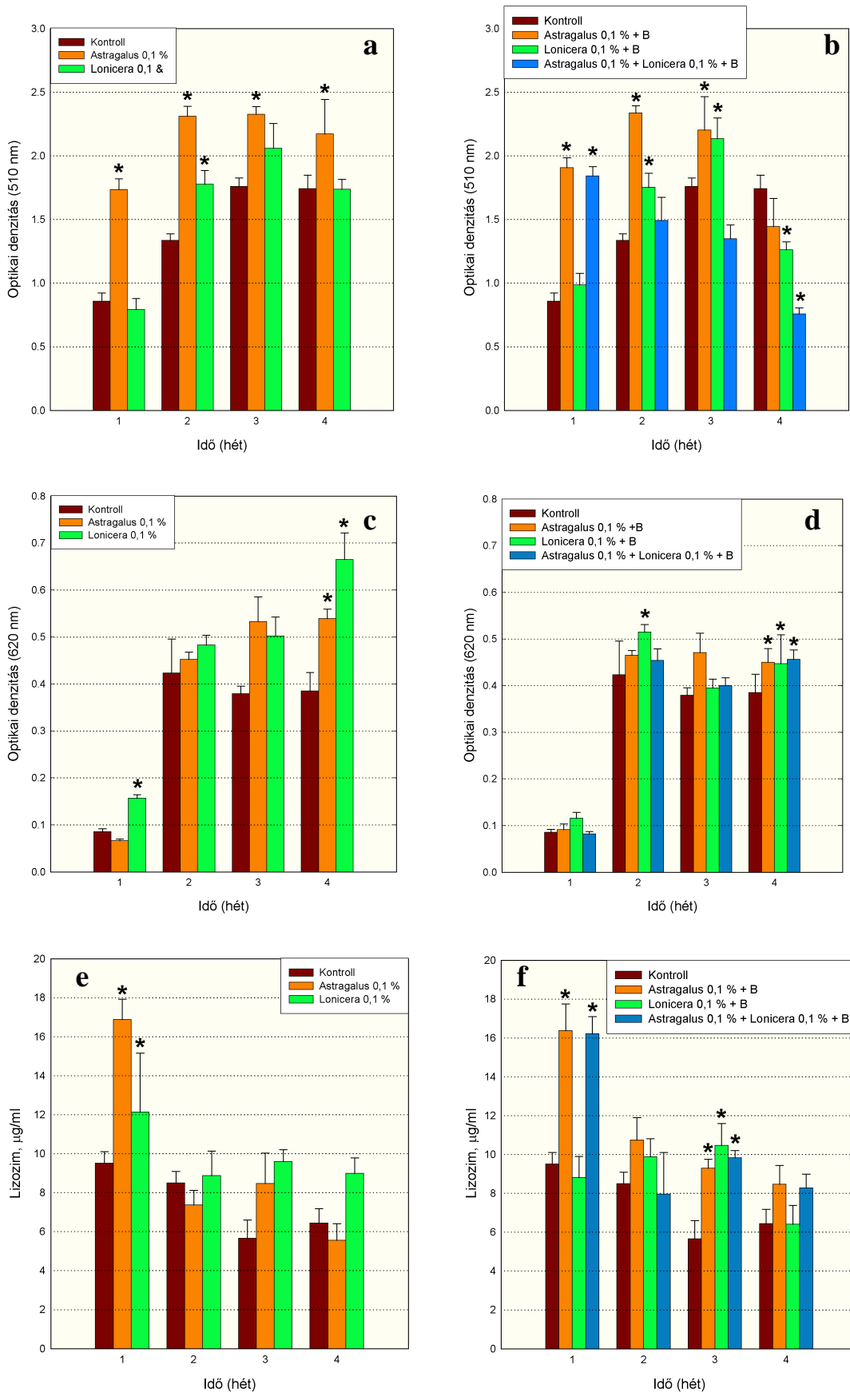
csökkent a kontrollhoz képest a *Lonicerával*, illetve a két gyógynövény kombinációjával kezelt halaknál (4. b. ábra).

A fehérvérsejtek légzési aktivitása a kísérlet végén valamennyi kezelt csoportban szignifikánsan magasabb volt, mint a kontrollnál. Ezen kívül az első héten is szignifikáns növekedést mértünk a *Lonicerával*, a második héten pedig a *Lonicerával* és bórral kezelt csoportban (4. c. és d. ábra).

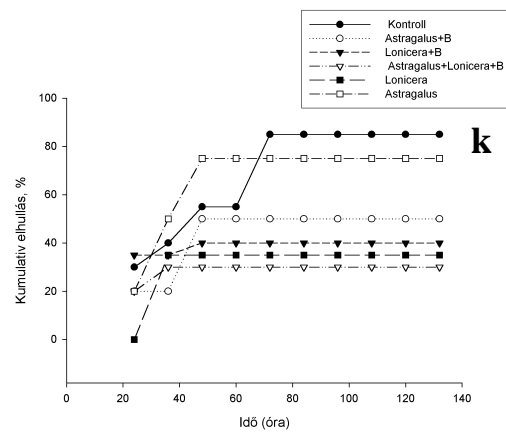
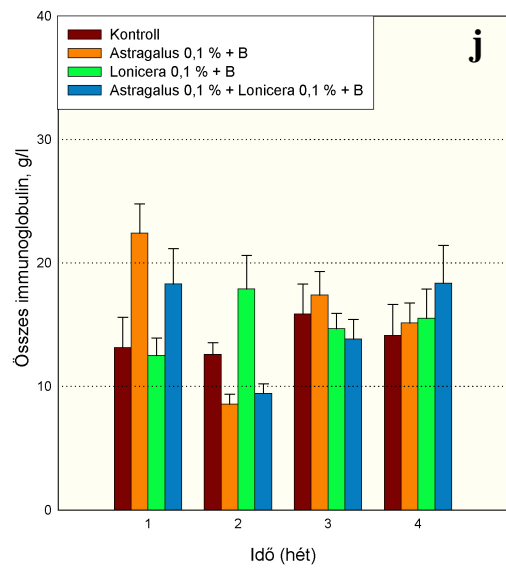
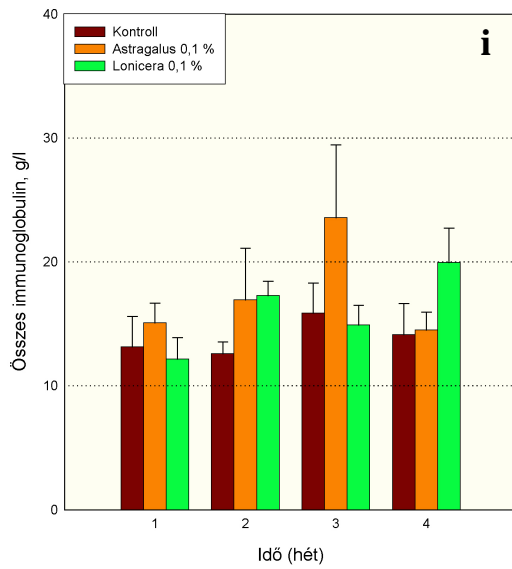
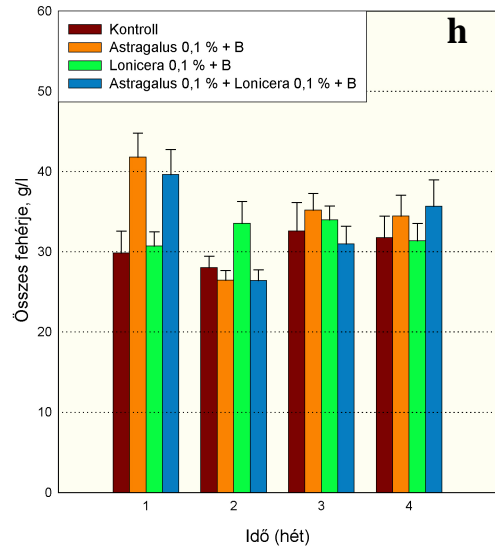
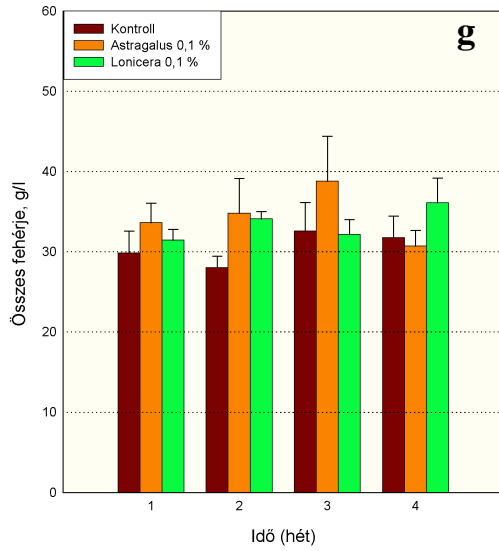
A vérplazma lizozimaktivitása egy kivétellel az összes kezelt csoportban szignifikáns mértékű emelkedést mutatott a kísérlet első hetében, ezen kívül még a harmadik héten mértünk jelentősebb emelkedést a gyógynövénykivonatokkal és bórral kezelt csoportokban (4. e. és f. ábra).

A vérplazma fehérjeszintje egyedül az *Astragalusszal* és bórral kezelt kísérleti csoportban mutatott számottevő emelkedést a kontrollhoz képest, az első héten (4. g. és 4. h. ábra). A vérplazma immunoglobulin-szintje a kísérlet időtartama alatt nem változott jelentős mértékben (4. i. és 4. j. ábra).

A kísérlet végén a halakat *A. hydrophilával* fertőztük. A kumulatív mortalitás a kontrollhoz képest 5%-kal csökkent az *Astragalusszal*, és 35%-kal az *Astragalusszal* és bórral kezelt halaknál. A *Lonicera* kivonat most hatékonyabbnak bizonyult. A kumulatív mortalitás a *Lonicerával* kezelt csoportban 45%-kal, a *Lonicerával* és bórral kezelt csoportban pedig 40%-kal csökkent a kontrollhoz képest. A leghatásosabb azonban a két gyógynövény és a bór kombinációja volt, amely a mortalitást 50%-kal csökkentette (4. k. ábra).



4. ábra. Kétféle gyógynövénykivonat (*Astragalus* és *Lonicera*) és a bőr hatása tilápia természetes immunválaszának mutatóira. A fehérvérsejtek fagocitáló aktivitása (a és b), légzési aktivitása (c és d), illetve a vérplazma lizozimaktivitása (e és f). *: szignifikáns különbség a kontrollhoz képest ($p < 0,05$).



4. ábra (folytatás). A vérplazma fehérjeszintjének (g és h), és immunoglobulin-szintjének (i és j) változása. Kumulatív mortalitás *A. hydrophila* fertőzés után (k). *: szignifikáns különbség a kontrollhoz képest ($p < 0,05$).

4.2. A kísérleti eredmények értékelése

A kísérleteinkben vizsgált gyógynövénykivonatok közül mindhárom hatékony immunstimulátornak bizonyult, mivel önmagukban és egymással kombináltan alkalmazva is jelentős mértékben javították a természetes immunválasz jellemzőit (elsősorban a celluláris paramétereket és a vérplazma lizozimaktivitását), illetve csökkentették az *A. hydrophila* fertőzést követő mortalitást. Eredményeink összhangban vannak azokkal a korábbi kísérleti adatokkal, amelyek szerint a gyógynövényekből készült kivonatok a hagyományos immunstimulátorokhoz hasonlóan alkalmazhatók a halak természetes immunválaszának és a betegségekkel szembeni ellenállóképességének javítására (Tan és Vanitha, 2004; Chakraborty és Hancz, 2012). Egy török kutatók által elvégzett kísérletben például a három vizsgált gyógynövény közül a gyömbér (*Zingiber officinale*) pozitív hatással volt a szívárványos piztrángok fehérvérsejtjeinek respirációs és fagocitáló aktivitására, illetve a vérplazma immunoglobulin-szintjére. A fagyöngy (*Viscum album*) és a nagy csalán (*Urtica dioica*) kivonata csak az immunoglobulin-szintet növelte jelentősebb mértékben (Dügcenci és mtsai., 2003). A *Whitania somnifera* indiai gyógynövény kivonatának 2 és 3 %-os dózisa jelentős mértékben javította a rohu (*Labeo rohita*) fehérvérsejtjeinek fagocitáló aktivitását és csökkentette a bakteriális fertőzés miatti elhullást 42 napos etetés után (Sharma és mtsai., 2010).

4.2.1. Az *Astragalus* kivonat hatása

Az *Astragalus* kivonat mind a négy kísérletünkben hatékony immunstimulátornak bizonyult, mivel a pontyokkal és tilápiákkal elvégzett kísérletekben is javította a vizsgált immunológiai paramétereket, és csökkentette a bakteriális fertőzést követő elhullást. A pontyokkal végzett kísérletek közül az egyik kísérlet nem vakcinált halainál pozitív hatása volt a fehérvérsejtek fagocitáló- és a vérplazma lizozimaktivitására, illetve kisebb mértékben a leukociták légzési aktivitására is. A másik ilyen kísérletben bóros kiegészítéssel együtt alkalmazva a két celluláris paramétert szignifikáns mértékben javította, a humorális jellemzőkre viszont nem volt hatással. A két kísérletben az *Astragalus* kivonattal kezelt pontyok mortalitása az *A. hydrophila* fertőzés után 24, illetve 5 %-kal csökkent. Hasonló eredményeket kaptunk a tilápiákkal elvégzett utolsó kísérletben is: az *Astragalus* kivonat bórral kiegészítve és önmagában alkalmazva is igen pozitív hatással volt a fehérvérsejtek fagocitáló

aktivitására. A respirációs aktivitásra, illetve a vérplazma lizozimaktivitására ennél enyhébb, de még mindig pozitív hatása volt. A bakteriális fertőzés utáni mortalitást is hatékonyan csökkentette.

Ezek a megfigyelések megerősítik azoknak a korábbi kísérleteknek az eredményeit, amelyekben az *Astragalus* kivonat immunstimuláló hatását vizsgálták *in vivo* körülmények között, különböző tenyésztett halfajokon. A HAKI immunológiai kutatócsoportja által korábban elvégzett kísérletben például az *Astragalus* kivonat 0,1 és 0,5%-os dózisa javította a tilápia fehérvérsejtek fagocitáló- és a vérplazma lizozimaktivitását (Yin és mtsai., 2006). Az 1,0 és 1,5 %-os dózisban alkalmazott, 5:1 arányú *Astragalus-Angelica* keverék hatására jelentős mértékben növekedtek a természetes immunválasz jellemzői (a fagocitáló sejtek száma, a vérplazma lizozim- és a komplementrendszer hemolitikus aktivitása) a pontyokkal és a *Pseudosciana crocea* kínai halfajjal elvégzett kísérletekben (Jian és Wu, 2003; 2004). Az *Astragalus* poliszacharid pontyok hasüregébe injektálva pedig pozitív hatással volt az IL-1 β citokin kifejeződésére a halak fejveséjében (Yuan és mtsai., 2008). Egy újabb kísérletben pedig a haltáphoz 0,12 és 0,15%-os koncentrációban adagolt *Astragalus* poliszacharid hatékonyan növelte a sárga harcsa (*Pelteobagrus fulvidraco*) fehérvérsejtjeinek proliferációját és respirációs aktivitását, valamint csökkentette az *A. hydrophila* fertőzés utáni elhullást (Bai és mtsai., 2012).

4.2.2. A *Ganoderma* kivonat hatása

A *Ganoderma* kivonat a pontyokkal elvégzett kísérlet nem vakcinált csoportjaiban az *Astragalus*hoz hasonlóan pozitív hatással volt a vérplazma lizozimaktivitására, valamint a fehérvérsejtek fagocitáló- és kisebb mértékben a respirációs aktivitására is. A bakteriális fertőzést követő elhullást igen hatékonyan, 27%-kal csökkentette. A tilápiákkal elvégzett kísérletben ugyancsak pozitív hatása volt a fehérvérsejtek fagocitáló aktivitására. Az *A. hydrophila* fertőzést követő mortalitást most is hatásosan, 30%-kal csökkentette.

A *Ganoderma* és más gombafajok kivonataival halakon jóval kevesebb vizsgálatot végeztek, mint az *Astragalus*szal, ezek azonban a mi kísérleteinkhez hasonlóan pozitív eredményeket adtak. Az *Epinephelus coioides* kínai halfajjal elvégzett kísérletben például egy *Ganoderma*ból izolált fehérjemolekula rekombináns módon előállított változata többféle dózisban a haltáphoz keverve javította a

fehérvérsejtek respirációs és fagocitáló aktivitását, illetve növelte a TNF- α és az IL-1 β citokin gének kifejeződésének mértékét a sejtekben. A legmagasabb dózis ezen kívül hatékonyan csökkentette az idegnekrozis vírus (Nervous Necrosis Virus, NNV) fertőzése utáni elhullást (Kuan és mtsai., 2012). Egy *in vitro* kísérletben pedig a *Lentinula edodes* gombafajból kivont lentinán nevű poliszacharid kétféle koncentrációban (10 és 100 $\mu\text{g/ml}$) a ponty makrofágok tápoldatához keverve jelentős mértékben növelte azok szabadgyök-termelését (Zhang és mtsai., 2009).

4.2.3. A *Lonicera* kivonat hatása

A másik két gyógynövénykivonathoz hasonlóan a *Lonicera* is hatékony immunstimulátornak bizonyult. Tilápiákkal elvégzett kísérleteink közül az egyikben javította a fehérvérsejtek fagocitáló aktivitását, illetve 15%-kal csökkentette az *A. hydrophila* fertőzést követő mortalitást. Másik hasonló kísérletünkben a *Lonicera* kivonat önmagában és bóros kiegészítéssel együtt alkalmazva is pozitív hatással volt a fehérvérsejtek fagocitáló- és légzési aktivitására, illetve a vérplazma lizozimaktivitására. A bakteriális fertőzés utáni elhullást mindkét kísérleti csoportban hatékonyan csökkentette. A pontyokkal elvégzett kísérletben a bórral kiegészített *Lonicera* kivonat az immunválasz celluláris paramétereit javította. Ebben a csoportban a fertőzést követő mortalitás a kontroll csoporthoz képest nem változott.

A *Lonicera* kivonat immunválaszra gyakorolt hatásáról nagyon kevés előzetes irodalmi adat áll rendelkezésünkre. A gyógynövénykivonat egyik komponense, a klorogénsav aktiválta a makrofágokat a calcineurin reakcióúton keresztül (Wu és mtsai., 2004). A mi megfigyeléseink megerősítik ezt az eredményt, mivel a *Lonicera* kivonatnak mi kísérleteinkben is egyértelműen pozitív hatása volt az izolált fehérvérsejtek aktivitására.

4.2.4. A gyógynövény-kombinációk hatása

Kísérleteinkben egyértelműen az egymással kombináltan alkalmazott gyógynövények voltak a leghatásosabb immunstimulátorok. Valamennyi kísérletünkben a gyógynövény-kombináció (*Astragalus* + *Ganoderma*, illetve *Astragalus* + *Lonicera*) csökkentette leginkább az *A. hydrophila* fertőzés utáni mortalitást. Az *Astragalus* + *Ganoderma* kombinációnak ezen kívül a ponty és a tilápia esetében is pozitív hatása volt a fehérvérsejtek fagocitáló- és a vérplazma lizozimaktivitására. Az *Astragalus* +

Lonicera kombináció bórral kiegészítve a pontyokkal és tilápiákkal elvégzett kísérletben is javította a fehérvérsejtek fagocitáló és légzési aktivitását, illetve a vérplazma lizozimaktivitását.

A gyógynövény-kombinációk immunrendszerre gyakorolt hatását számos halfajon vizsgálták. Ezekben a kísérletekben az egymással kombináltan alkalmazott gyógynövénykivonatok egyértelműen pozitív hatással voltak a halak természetes immunválaszára és betegségekkel szembeni ellenálló-képességére, amelyet a mi eredményeink is megerősítenek. Háromféle indiai gyógynövény (*Azadirachta indica*, *Curcuma longa* és *Ocimum sanctum*) keverékéből készült, injekció útján alkalmazott alkoholos és vizes kivonatok hatására például jelentős mértékben emelkedett az ezüstkárász (*Carassius auratus*) fehérvérsejtjeinek respirációs aktivitása és a vérplazma lizozimaktivitása, illetve csökkent a mortalitás *A. hydrophila* fertőzést követően (Harikrishnan és mtsai., 2009a). Négyféle kínai gyógynövény (*Astragalus membranaceus*, *Polygonum multiflorum*, *Isatis tinctoria*, *Glycyrrhiza glabra*) kivonatának kombinációja 0,5 és 1,0% koncentrációban pontyok tápjához keverve szignifikáns mértékben növelte a fehérvérsejtek fagocitáló aktivitását 30 napos etetés után (Yuan és mtsai., 2007). Egy kínai gyógynövények keverékét tartalmazó immunstimulátor (C-UPIII) hatékonyan növelte a tilápia ellenálló-képességét *A. hydrophila* fertőzéssel szemben, illetve javította a fehérvérsejtek fagocitáló aktivitását (Chansue és mtsai., 2000). Ugyanez az immunstimulátor a guppi (*Poecilia reticulata*) *Tetrahymena*-fertőzéssel szembeni ellenálló-képességére is pozitív hatással volt (Ponpornpisit és mtsai., 2001).

4.2.5. A bóros kiegészítés hatása

A bóros kiegészítés hatását két kísérletben vizsgáltuk. A gyógynövénykivonatokkal és bórral kiegészített haltápok kivétel nélkül kedvező hatással voltak a pontyok bakteriális fertőzéssel szembeni ellenálló-képességére, ezen kívül a fehérvérsejtek fagocitáló és légzési aktivitását, illetve kisebb mértékben a vérplazma lizozimaktivitását is javították. A tilápiák esetében a bört is tartalmazó tápok hatására tovább csökkent a fertőzést követő mortalitás a csak gyógynövénykivonatokkal kezelt csoportokhoz képest. Az immunológiai paraméterek a bórral kiegészített és a bört nem tartalmazó tápokkal kezelt csoportokban hasonlóan alakultak. A bór tehát mindkét

vizsgált halfaj természetes immunválaszára és ellenálló-képességére is pozitív hatással volt.

Bizonyos ásványi anyagok, például a foszfor, a cink vagy a szelén természetes immunválaszban betöltött szerepét és hatásuk mechanizmusát viszonylag jól ismerjük (Lim és mtsai., 2001). Jól ismert tény, hogy a bőrt tartalmazó szerves molekulák számos élettani folyamatban, így az immunválaszban is fontos szerepet játszanak, habár a pontos hatásmechanizmust egyelőre nem ismerjük (Szigeti és mtsai., 2005). Kísérleteinkhez azért választottuk a bóros kiegészítést is, mert a célunk egy olyan, a halak természetes immunválaszára pozitív hatású takarmány premix kifejlesztése volt, amely a kínai gyógynövénykivonatok mellett magyar gyártású összetevőt is tartalmaz. Korábbi kísérleti adatok szerint a haltáp bóros kiegészítése javította az afrikai harcsák növekedési paramétereit (Radics és Szigeti, 2005). A bőrnek a halak természetes immunválaszában játszott szerepéről nem találtunk adatot, viszont az immunválaszra gyakorolt pozitív hatását más állatfajokon, például szarvasmarhákön vagy sertéseken is kimutatták (Armstrong és Spears, 2003; Fry és mtsai, 2010). Ezeket az adatokat a mi kísérleteink eredményei is megerősítik.

4.2.6. A gyógynövénykivonatok és a vakcinálás együttes hatása

Pontyokkal elvégzett egyik kísérletünkben a vakcinálással együtt alkalmazott gyógynövénykivonatok hatására tovább csökkent az *A. hydrophila* fertőzést követő mortalitás a csak gyógynövényekkel kezelt csoportokhoz képest. A természetes immunválasz paramétereire gyakorolt hatás általában pozitív volt, habár a fehérvérsejtek fagocitáló és légzési aktivitása bizonyos mintavételi időpontokban szignifikáns mértékben csökkent a vakcinált kontrollhoz képest. A vizsgált paraméterek közül főleg a fagocitáló aktivitás különbözött jelentősebb mértékben a megfelelő vakcinált és nem vakcinált csoportok között. A kísérlet végén ez a paraméter az összes vakcinált csoportban szignifikánsan magasabb volt, mint a megfelelő nem vakcinált csoportokban. A másik két vizsgált immunológiai jellemző a vakcinálás hatására ennél jóval kisebb mértékben változott. Az *A. hydrophila* elleni specifikus antitestek szintjére a gyógynövénykivonatok nem voltak számottevő hatással.

A gyógynövénykivonatoknak és a vakcinálásnak a halak immunválaszára gyakorolt együttes hatásáról nem ismerünk előzetes irodalmi adatot. Másféle immunstimulátoroknak a vakcinálás hatékonyságára gyakorolt hatását viszont több

halfajon is vizsgálták. Ezekben a kísérletekben - a mi eredményeinkhez hasonlóan - a vakcinálással együtt alkalmazott immunstimulátorok javították a halak ellenálló-képességét a bakteriális kórokozókkal szemben, a specifikus antitestek szintjére és a természetes immunválasz paramétereire gyakorolt hatásuk viszont nem volt egyértelmű. A csatornaharcsák (*Ictalurus punctatus*) hasüregébe injektált β -glukán hatására például szignifikáns mértékben megemelkedett a specifikus antitestek szintje az *Edwardsiella ictaluri* baktérium ellen immunizált halakban a vakcinált kontrollhoz képest, ezen kívül csökkent a bakteriális fertőzést követő mortalitás (Chen és Ainsworth, 1992). Hasonló pozitív hatást figyeltek meg az *A. salmonicida* ellen vakcinált atlanti lazacokban is (Aakre és mtsai., 1994). Szintén *A. salmonicida* ellen immunizált szivárványos pisztrángokban a levamizol, egy szintetikus polipeptid (ISK) és egy ammóniumvegyület (QAC) is a többszörösére növelte a vérben keringő specifikus antitestek koncentrációját 14 nappal az injektálás után, továbbá javította a fehérvérsejtek légzési és fagocitáló aktivitását, illetve csökkentette az *A. salmonicida* fertőzés utáni elhullást (Anderson és Jeney, 1992). Ez a három immunstimulátor nemcsak injekció, hanem fürdetés útján alkalmazva is pozitív hatással volt az *A. salmonicida* elleni specifikus antitestek szintjére, a természetes immunválasz jellemzőire és a baktériummal szembeni ellenálló-képességre is (Jeney és Anderson, 1993). Egy tengeri sügérrel (*Dicentrarchus labrax*) elvégzett kísérletben viszont a korábbiakkal ellentétes eredményt kaptak: a β -glukánok és a vakcinálás együttes alkalmazása után jelentős mértékben csökkent a fehérvérsejtek légzési aktivitása és a vérplazma lizozimaktivitása. A specifikus antitestek szintjére az immunstimulátor nem volt hatással (Bonaldo és mtsai., 2007).

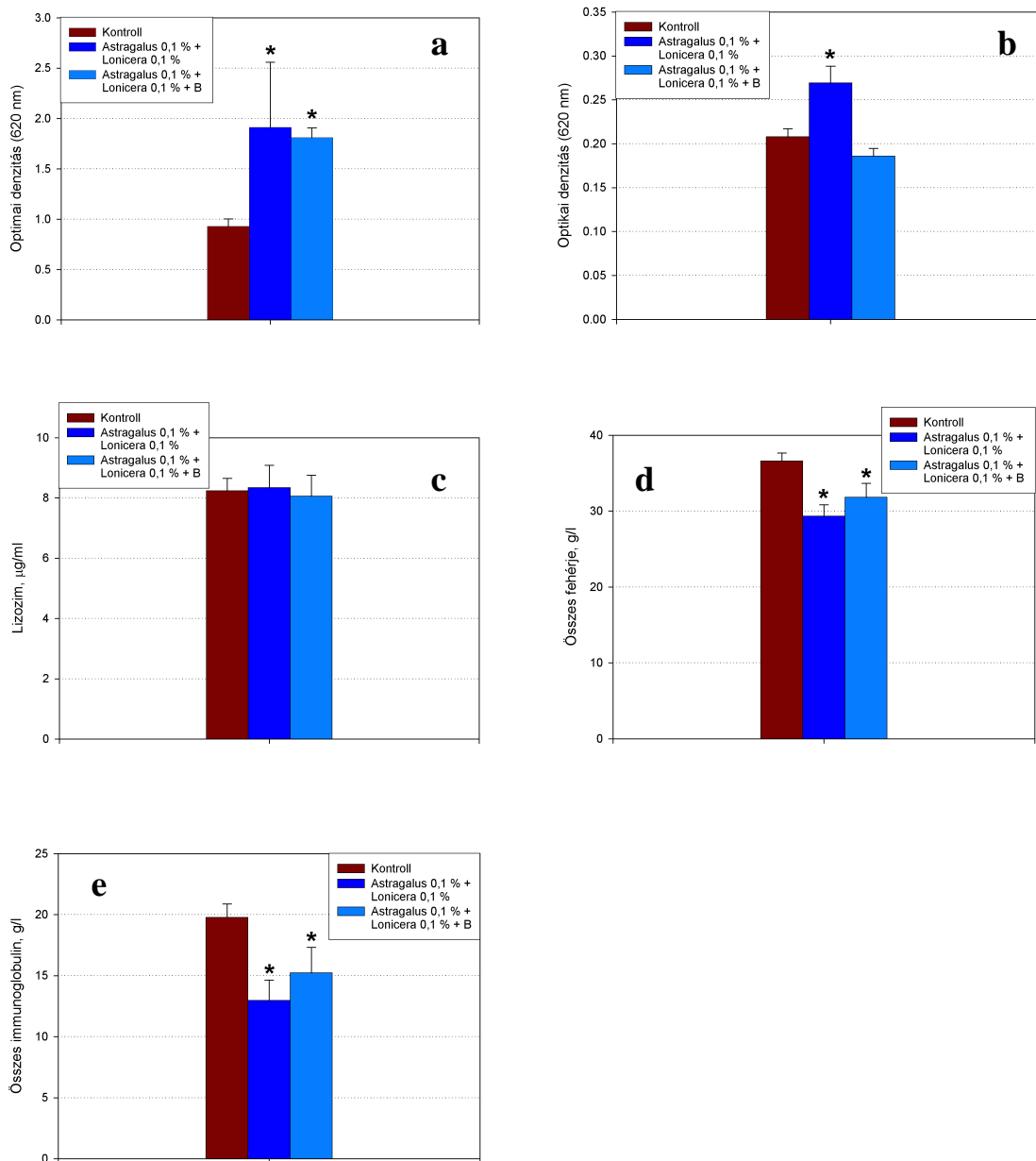
4.3. A félüzemi próbák eredményei

Kísérletekben az *Astragalus* és a *Lonicera* kivonatok kombinációja bizonyult a leghatékonyabb immunstimulátornak, ezért félüzemi körülmények között ezt a kombinációt vizsgáltuk, az egyik kezelt csoportban önmagában, a másikban bóros kiegészítéssel együtt alkalmazva.

4.3.1. Félüzemi próba tilápiával

A tilápiák természetes immunválaszának mutatóit hat hétig tartó etetés után határoztuk meg. A fehérvérsejtek fagocitáló és légzési aktivitása mindkét kezelt csoportban szignifikánsan magasabb volt, mint a kontrollnál (5.a. és 5.b. ábra). A

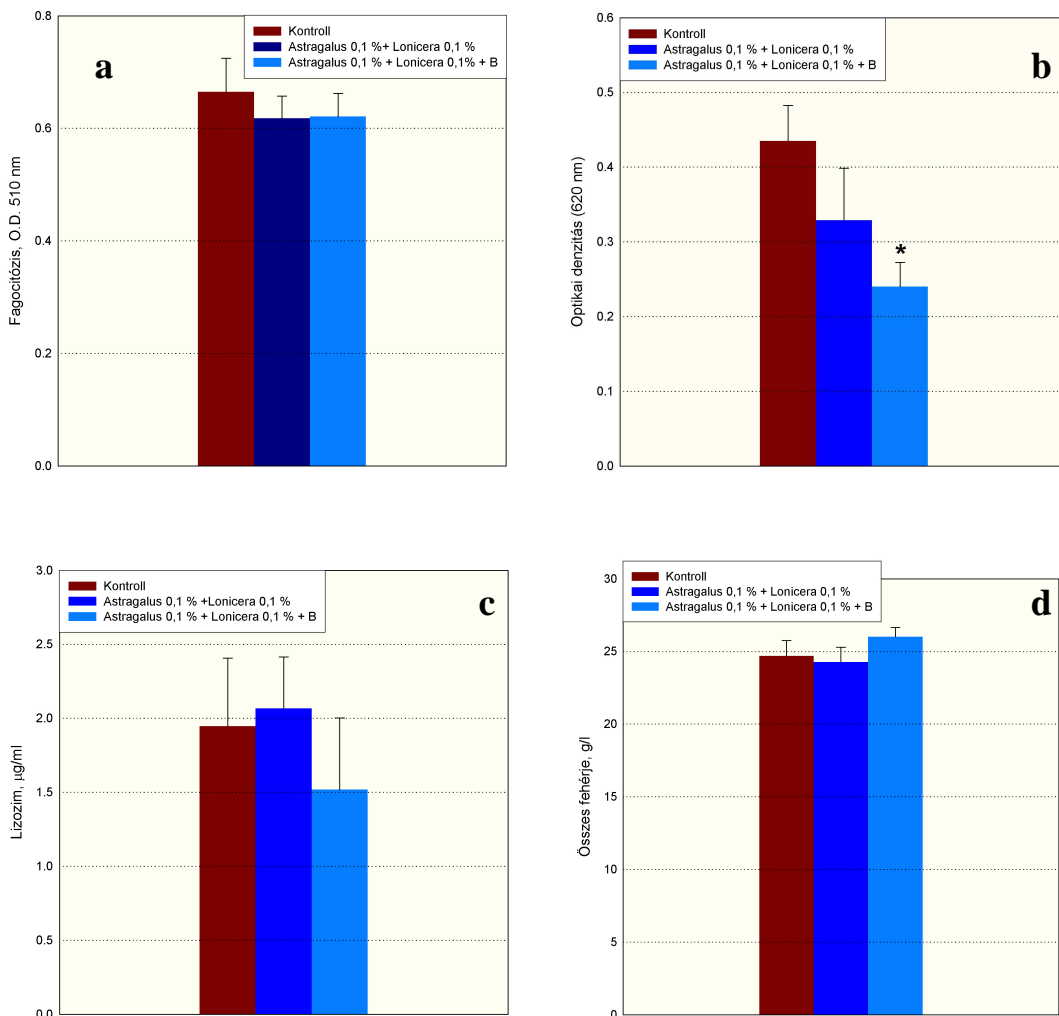
vérplazma fehérje- és immunoglobulin-szintje ugyanakkor szignifikáns mértékben csökkent a kontrollhoz képest (5.d. és 5.e. ábra). A vérplazma lizozimaktivitása egyik kezelt csoportban sem különbözött jelentős mértékben a kontrolltól (5.c. ábra).



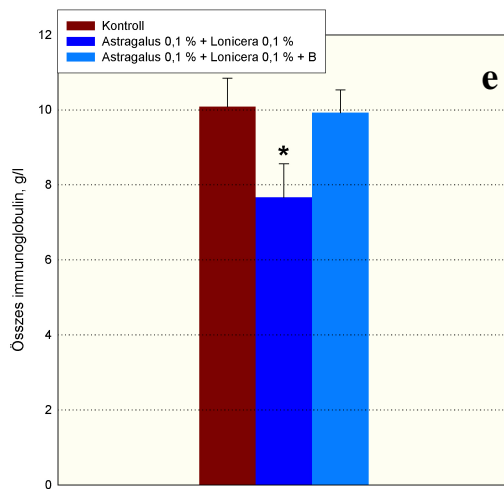
5. ábra. Az *Astragalus*- és *Lonicera*-kivonatok önmagában és bórral kiegészítve alkalmazott kombinációjának hatása a tilápia természetes immunválaszának mutatóira a félüzemi próba során. A fehérvérsejtek fagocitáló aktivitása (a), légzési aktivitása (b), a vérplazma lizozimaktivitása (c), fehérje- (d) és immunoglobulin-szintje (e), hat hétig tartó etetés után. *: szignifikáns különbség a kontrollhoz képest ($p < 0,05$).

4.3.2. Félüzemi próba ponttyal

A pontyok természetes immunválaszának paramétereit négy hétig tartó etetést követően határoztuk meg. A fehérvérsejtek légzési aktivitása szignifikáns mértékben csökkent a kontrollhoz képest a gyógynövényekkel és bórral kezelt csoportban (6. b. ábra). A csak gyógynövényekkel kezelt csoportban a vérplazma immunoglobulin-szintje volt jelentős mértékben alacsonyabb a kontrollnál (6. e. ábra). A fehérvérsejtek fagocitáló aktivitása, illetve a vérplazma lizozimaktivitása és fehérjeszintje egyik csoportban sem változott szignifikáns mértékben a kontrollhoz képest (6. a., 6. b., és 6. c. ábrák).



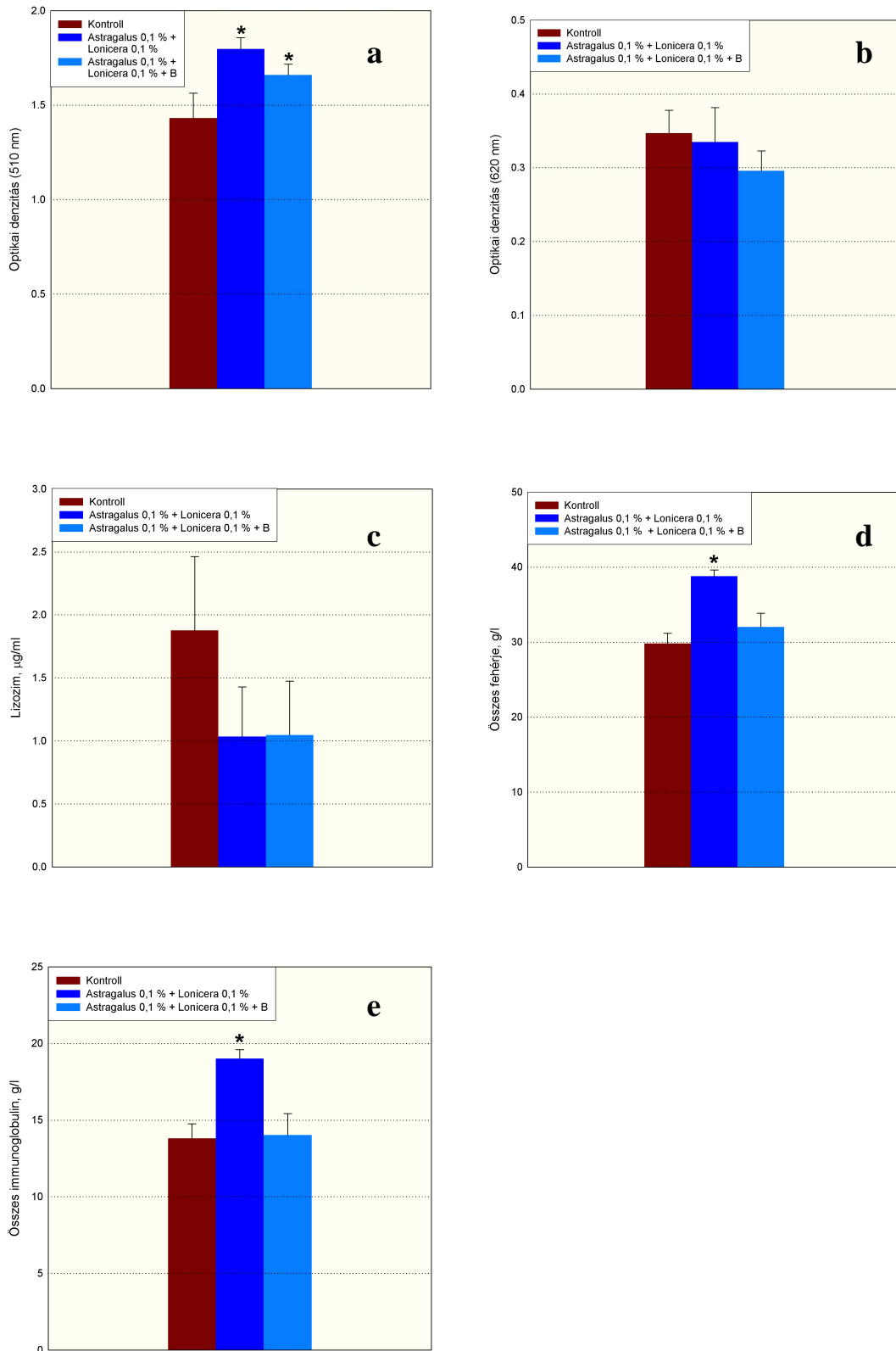
6. ábra. Az *Astragalus*- és *Lonicera*-kivonatok önmagában és bórral kiegészítve alkalmazott kombinációjának hatása a ponty természetes immunválaszának mutatóira a félüzemi próba során. A fehérvérsejtek fagocitáló aktivitása (a) és légzési aktivitása (b) négy hétig tartó etetés után. *: szignifikáns különbség a kontrollhoz képest ($p < 0,05$).



6. ábra (folytatás): A vérplazma immunoglobulin szintje (e) négy hétig tartó etetés után. *: szignifikáns különbség a kontrollhoz képest ($p < 0,05$).

4.3.3. Félüzemi próba afrikai harcsával

Az afrikai harcsákból szintén négy hétig tartó etetést követően vettünk mintát. A fehérvérsejtek fagocitáló aktivitása mindkét kezelt csoportban szignifikáns mértékben magasabb volt, mint a kontrollnál (7.a. ábra). A csak gyógynövényekkel kezelt csoportban ezen kívül a vérplazma összes fehérje- és immunoglobulin-szintje is szignifikánsan megnövekedett (7.d. és 7.e. ábra). A fehérvérsejtek respirációs aktivitása és a vérplazma lizozimaktivitása ugyanakkor egyik kezelt csoportban sem különbözött jelentős mértékben a kontrolltól (7.b. és 7.c. ábra)



7. ábra. Az *Astragalus*- és *Lonicera*-kivonatok önmagában és bórral kiegészítve alkalmazott kombinációjának hatása az afrikai harcsa természetes immunválaszának mutatóira a félüzemi próba során. A fehérvérsejtek fagocitáló aktivitása (a), légzési aktivitása (b), a vérplazma lizozimaktivitása (c), összes fehérje- és immunoglobulin-szintje (d) négy hétig tartó etetés után. *: szignifikáns különbség a kontrollhoz képest ($p < 0,05$).

4.4. A félüzemi próbák eredményeinek értékelése

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 alacsonyabb szinten maradtak. A bórral is kiegészített tápok most kevesebb alkalommal okoztak szignifikáns növekedést az immunológiai paraméterekben, mint a csak gyógynövénykivonatokat tartalmazó tápok. Ezek az eredmények valószínűleg azzal magyarázhatók, hogy a félüzemi próbák során csak egyszer vettünk mintát, négy vagy hat héttel az etetés megkezdése után. A gyógynövénykivonatok immunrendszerre gyakorolt pozitív hatása általában ennél korábban jelentkezik, amelyet az előzetes irodalmi adatokon kívül saját korábbi kísérleteink eredményei is igazolnak (Dügcenci és mtsai., 2003; Jian és Wu, 2003, 2004; Yin és mtsai., 2006; Sharma és mtsai., 2010).

A HAKI kutatói által félüzemi körülmények között, ugyanezekkel a tápokkal elvégzett próbák során az átfolyóvízes rendszerben tartott tilápiák növekedési paraméterei közül a növekedési hányados (growth index, GI) és a napi fajlagos növekedési sebesség (specific growth rate, SGR) szignifikánsan magasabb, a takarmányhasznosítási együttható (feed conversion rate, FCR) pedig alacsonyabb volt a kezelt csoportokban, mint a kontrollnál. Ez a kedvező hatás akkor jelentkezett, ha a víz oldotttoxigén-tartalma az optimálisnál jóval alacsonyabb volt (Jeney és mtsai., 2005). Recirkulációs rendszerben tartott pontyok esetében az FCR szignifikánsan kedvezőbben alakult a kezelt csoportokban (Jeney és mtsai., 2005). Sem recirkulációs, sem átfolyóvízes rendszerben nevelt afrikai harcsák esetében nem volt statisztikailag igazolható különbség az egyes csoportok növekedési mutatói között (Jeney és mtsai., 2005; Rónyai és mtsai., 2012). A kísérleti tápoknak a halak növekedésére gyakorolt hatása tehát szintén fajspecifikus lehet, illetve az is valószínűsíthető, hogy a kedvező hatás sok esetben csak az adott faj számára kedvezőtlen körülmények között jelentkezik (Rónyai és mtsai., 2012).

Viszonylag kevés olyan kísérletet ismerünk, amelyben a gyógynövénykivonatoknak a halak növekedésére és immunválaszára gyakorolt hatását is vizsgálták, azonban a mi eredményeinkhez hasonlóan az ezekben a kísérletekben vizsgált halfajok eltérő módon reagáltak az alkalmazott kezelésekre. Egy szivárványos

pisztrángokkal elvégzett próba során például a gyógynövénykivonatok (*Zingiber officinale*, *Urtica dioica*, *Viscum album*) nem voltak számottevő hatással a halak növekedési mutatóira, az immunológiai paramétereket viszont javították (Dügenci és mtsai., 2003). Ezzel szemben a rebarbara (*Rheum officinale*) kivonata pontyok növekedési mutatói közül az FCR-re és az SGR-re is statisztikailag igazolhatóan pozitív hatással volt, illetve a sűrítési stressz negatív hatásait is csökkentette, és javította a halak ellenálló-képességét az *A. hydrophila* fertőzéssel szemben (Xie és mtsai., 2008). Más gyógynövénykivonatok ehhez hasonlóan pozitív hatással voltak a különböző halfajok növekedési teljesítményére. Egy fekete fűrészesűgérrel (*Epinephelus tauvina*) elvégzett kísérletben a *Whitania somnifera*, az *Ocimum sanctum* és a *Myristica fragrans* kivonatai közül az első kettő jelentős mértékben javította az FCR és SGR értékeket (Sivaram és mtsai., 2004). A *Quillaja saponaria* gyógynövényből készült kivonatnak pontyok és tilápiák tápjához keverve is pozitív hatása volt a halak növekedési teljesítményére. A 300 mg/kg gyógynövénykivonatot tartalmazó táppal kezelt tilápiák egyedi tömege és SGR értéke a 14 hetes kísérlet végén szignifikánsan magasabb volt, mint a kontroll csoporté (Francis és mtsai., 2001). A pontyok esetében a kísérlet végén mért egyedi átlagtömeg mellett az FCR értéke növekedett szignifikánsan a kontrollhoz képest, de nem a 300, hanem a 150 mg/kg gyógynövénykivonatot tartalmazó táppal kezelt csoportban (Francis és mtsai., 2002).

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. A három vizsgált gyógynövény közül a leghatékonyabbnak az *Astragalus* kivonata bizonyult önmagában is, de még inkább a másik két gyógynövénnyel, a *Ganodermával* vagy a *Lonicerával* kombinációban alkalmazva. Ez leginkább a sejtes paraméterekre gyakorolt pozitív hatásban és a fertőzések utáni mortalitás csökkentésében mutatkozott meg. Valamennyi kísérletünkben azoknál a csoportoknál kaptuk a legalacsonyabb mortalitást, amelyeket két gyógynövény kombinációjával etettünk. A három vizsgált gyógynövénykivonat, méginkább ezek kombinációi tehát három-öt hetes etetés után megnövelték a halak ellenálló-képességét a bakteriális fertőzéssel szemben.

2. A többi immunstimulátorhoz hasonlóan a gyógynövénykivonatok kedvező dózisa is igen alacsony. Kísérleteinkben először 0,5 és 1,0%-os dózist alkalmaztunk, amelyet később 0,1%-ra csökkentettünk, de még így is kedvező hatása volt a természetes immunválasz paraméterei közül a fehérvérsejtek fagocitáló és légzési aktivitására, illetve a bakteriális fertőzéssel szembeni ellenálló-képességre.

3. A bórnak egyértelműen pozitív hatása volt a halak egészségi állapotára, amely elsősorban az *A. hydrophila* fertőzést követő elhullások további mérséklésében nyilvánult meg. A haltápok bóros kiegészítésével tehát tovább növelhető a halak ellenálló-képessége.

4. Egyik kísérletünkben vizsgáltuk kétféle gyógynövény, az *Astragalus* és a *Ganoderma*, illetve ezek keverékének hatását az *A. hydrophila* elleni vakcinálás hatékonyságára. A szakirodalmi adatokkal ellentétben, a mi kísérletünkben a gyógynövénykivonatok ezt nem befolyásolták jelentős mértékben. A vakcinálás és a gyógynövények együttes alkalmazása után viszont tovább csökkent az *A. hydrophila*-fertőzés utáni mortalitás, ami a természetes és a specifikus immunválasz egyidejű erősödésének eredménye lehet, mivel a kísérlet végére a fehérvérsejtek fagocitáló aktivitása valamennyi vakcinált csoportban szignifikánsan magasabb volt a megfelelő kontroll csoport értékénél.

5. Kísérleteinkben az *Astragalus* és a *Lonicera* keveréke bizonyult a leghatékonyabb immunstimulátornak, ezért ezt a kombinációt választottuk ki a félüzemi próbákhoz. Tilápiákon, pontyokon és afrikai harcsákon teszteltük önmagában és bóros kiegészítéssel együtt alkalmazva. A három halfaj eltérő módon reagált a kezelésekre, hiszen az afrikai harcsa esetében a természetes immunválasz paraméterei jellemzően pozitív irányban változtak, a pontynál viszont nem volt ilyen változás. A tilápia esetében a hatás nem volt egyértelmű, mivel a sejtes paraméterek a kezelések hatására növekedtek, a humorális paraméterek viszont alacsony szinten maradtak. A bórral is kiegészített tápok a félüzemi kísérletekben kevesebbszer okoztak szignifikáns mértékű növekedést az immunológiai paraméterekben, mint a csak gyógynövénykivonatokat tartalmazó tápok. A növekedési mutatókra ugyanakkor a ponty és a tilápia esetében mindkét kísérleti tápnak kedvező hatása volt. Gyakorlati felhasználásra tehát az *Astragalus* és a *Lonicera* kivonatok 0,1-0,1%-os dózisban alkalmazott keveréke javasolható, önmagában vagy bóros kiegészítéssel együtt alkalmazva.

6. JAVASLATOK

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 telettetéstől amúgy is legyengült szervezetű halak számára az áthelyezés súlyos stresszt jelent, amely fogékonyá 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.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A dolgozatban azokat a kísérleteket ismertettem, amelyeket a szarvasi Halászati és Öntözési Kutatóintézet (HAKI) halimmunológiai laboratóriumában végeztem. A kutatómunkát a Kínában, Wuxi városában található Édesvízi Halászati Kutatóközponttal kötött T&E-együttműködés keretében folytattuk. A kutatás célja a halak immunrendszerét erősítő és a halbetegségek megelőzésére alkalmas takarmány premix kifejlesztése volt, amellyel kiválthatók a haltenyésztésben elterjedten használt antibiotikumok és kemoterápiás szerek, illetve javítható a vakcinálás hatékonysága. Kísérleteinkhez olyan gyógynövények kivonatait használtuk, amelyeket a hagyományos kínai orvoslásban már régóta alkalmaznak, a haltenyésztésben való alkalmazási lehetőségeikről viszont jóval korlátozottabbak az ismereteink.

Az antibiotikus kezelések alkalmazása kettős problémát jelent, egyfelől a rezisztencia terjedését, másfelől az antibiotikumok immunszuppresszív hatását. A gyógyszermaradékok felhalmozódhatnak a vízi környezetben és a halhúsban. A vakcinálás költséges, idő- és munkaigényes eljárás, és egy vakcina általában csak egy vagy néhány kórokozó ellen hatásos, illetve több olyan kórokozó is van, amelyek ellen jelenleg nem létezik hatékony vakcina. Ezek az okok szolgálták alapul a természetes immunválaszt javító immunstimulátorok alkalmazásához, amely a halbetegségek elleni védekezés viszonylag új koncepciója.

A kutatómunka során három ismert kínai gyógynövény, az *Astragalus membranaceus*, a *Ganoderma lucidum* és a *Lonicera japonica* hatását vizsgáltuk a ponty és a nílusi tilápia természetes immunválaszára, illetve *Aeromonas hydrophila* fertőzéssel szembeni ellenálló-képességére. Két kísérletben a gyógynövényeket bórral is kiegészítettük, egy kísérletben pedig vakcinálással kombináltuk. A kísérletek eredményei alapján kiválasztottuk a leghatékonyabb gyógynövény-kombinációt, amelyet félüzemi körülmények között teszteltünk tilápiákon, pontyokon és afrikai harcsákon.

A halak sokkal nagyobb mértékben függenek a nem-specifikus védekező mechnizmus tényezőitől, mint az emlősök. Természetes immunrendszerük szervei a csecsemőmirigy, a lép és a fejvese, illetve a nyálka lítikus enzimeit miatt a kültakaró is ide sorolható. A nem-specifikus védekezőrendszer sejtes (celluláris) és a vérplazmában oldott (humorális) alkotórészekből áll. Az immunstimulátorok hatására a természetes

immunválasz paraméterei jellemzően megváltoznak, ezért alkalmasak az immunválasz erősségének meghatározására.

Több olyan immunstimulátort is ismerünk, amely etetés, fürdetés vagy injekció útján alkalmazható. Ezekhez hasonlóan a gyógynövénykivonatok is használhatók a nem-specifikus immunválasz stimulálására. Ezt a hatást legtöbbször egereken, csirkéken vagy humán sejtvonalakon vizsgálták, halakkal jóval kevesebb kísérletet végeztek.

Valamennyi kísérletet recirkulációs rendszerben, intenzív körülmények között tartott halakkal végeztünk. A vizsgálandó gyógynövénykivonatokat önmagukban vagy egymással kombinálva a haltápokhoz kevertük. A kísérleti csoportokat ezekkel a tápokkal három, négy vagy öt hétig ettük. Kontrollként gyógynövényeket nem tartalmazó tápokot használtunk. A halaktól minden héten vérmintákat vettünk, amelyekből meghatároztuk a természetes immunválasz paramétereit. A kísérletek végén a halakat *Aeromonas hydrophila* baktériummal fertőztük, majd egy héten keresztül regisztráltuk az elhullást és kiszámoltuk a megmaradási arányokat. Az elrendezés a félüzemi próbáknál is hasonló volt azzal a különbséggel, hogy csak egyszer vettünk mintát. Ezekben a kísérletekben a halakat nem fertőztük.

A kísérletekben mindhárom vizsgált gyógynövénykivonat, illetve ezek kombinációi is jellemzően pozitív hatással voltak a fehérvérsejtek (monociták és makrofágok) fagocitáló- és légzési aktivitására, illetve a vérplazma lizozimaktivitására. Az *A. hydrophila* fertőzést követő mortalitás valamennyi kísérletben alacsonyabb volt a kezelt csoportokban, mint a kontrollnál. A bóros kiegészítés hatása leginkább a fertőzés utáni elhullás további csökkenésében mutatkozott meg. A gyógynövénykivonatok és a vakcinálás együttes alkalmazása szintén tovább csökkentette a mortalitást.

A kísérleti eredmények alapján az *Astragalus* és a *Lonicera* 0,1-0,1% koncentrációban, bóros kiegészítéssel (2 mg/kg) vagy anélkül alkalmazott kombinációja bizonyult a leghatékonyabb immunstimulátornak, ezért ezt választottuk ki a félüzemi próbákhoz. Minden próbához egy kontroll és két kezelt csoportot állítottunk be.

A félüzemi körülmények között az egyes halfajok eltérő módon reagáltak a kezelésekre. Az afrikai harcsa esetében a természetes immunválasz paraméterei jellemzően pozitív irányban változtak, a pontynál viszont nem volt ilyen változás. A tilápia esetében a hatás nem volt egyértelmű, mivel a sejtes paraméterek a kezelésekre hatására növekedtek, a humorális paraméterek viszont alacsony szinten maradtak. A bórral is kiegészített tápok a félüzemi próbák során kevesebb alkalommal okoztak

szignifikáns mértékű növekedést az immunológiai paraméterekben. A növekedési mutatókra ugyanakkor a ponty és a tilápia esetében a bórral kiegészített és a bór nélküli tápoknak is kedvező hatása volt, habár ez a tilápia esetében csak szuboptimális oldottoxigén-koncentráció mellett jelentkezett.

Az eredmények értékelésénél az általunk kapott kísérleti adatokat hasonlítottam össze olyan kísérletek eredményeivel, amelyekben gyógynövények vagy egyéb immunstimulátorok (pl. glukánok, kitin és kitozán) hatását vizsgálták különböző halfajokon. A természetes immunválasz jellemző paraméterei általában szignifikáns mértékben emelkednek az immunstimulátorok hatására. A betegségekkel szembeni ellenálló-képesség szintén javul. A mi eredményeink megerősítették ezeket a megfigyeléseket. Az immunválasz jellemzőit és a fertőzéssel szembeni ellenálló-képességet leginkább a gyógynövények kombinációi növelték. A bóros kiegészítés pozitív hatása a mortalitás további csökkentésében nyilvánult meg. Eredményeink alapján gyakorlati felhasználásra az *Astragalus* és a *Lonicera* 0,1-0,1% koncentrációban a haltáphoz adagolt keveréke javasolható, önmagában alkalmazva vagy 2 mg/kg bóros kiegészítés mellett.

8. SUMMARY

Results of the experiments, which were carried out in the laboratory of fish immunology at the Research Institute for Fisheries, Aquaculture and Irrigation (HAKI) are presented in this dissertation. The work was done in collaboration with Freshwater Fisheries Research Centre (FFRC) in Wuxi, China in frame of a Science and Technology Collaboration. The aim of the joint research work was to produce a premix to enhance fish immune system and to prevent fish diseases in order to replace the antibiotics, chemotherapeutic agents widely used in fish culture and to enhance the effect of vaccines used in aquaculture. In our experiments, we used extracts of herbs that have been used as immunostimulants in traditional Chinese medicine for a long time; however, we have only a limited knowledge about their potential use in fish culture.

Application of antibiotics means a double problem, first the spreading of resistance, and second, the immunosuppressive effect of antibiotics. Antibiotic residues can accumulate in the environment and in the fish meat. Vaccination is an expensive, time-consuming and labour-intensive process, a vaccine is usually effective against only one pathogen, and there are many pathogens against which there are no effective vaccines. A base of a relatively new conception of protection against fish diseases is the use of immunostimulants, which can enhance the innate immune response.

During our research work, effects of three well-known Chinese herbs, *Astragalus membranaceus*, *Ganoderma lucidum* and *Lonicera japonica* were investigated on the innate immune response of common carp and Nile tilapia, and on their resistance against *Aeromonas hydrophila* infection. In two experiments the herbal extracts were supplemented with boron, and in one experiment they were combined with vaccination. Based on the experimental results, the most effective combination of herbal extracts was selected and later it was tested in semi-industrial conditions on tilapia, common carp and African catfish.

Fish are more dependent on the non-specific defence mechanisms than mammals. Organs of their innate immune system are the thymus, the spleen and the head kidney, and their skin can also belong to them, due to its lytic enzymes. The non-specific immune system consists of cellular and humoral components. The immunostimulants can modulate the innate immune system and can be used for determining the strength of immune response.

There are some well known immunostimulants that can be applied via feeding, bath or injection. Herbs can be used as immunostimulants as well. Immunomodulating effect of herbal extracts is usually studied in mice, chickens and human cell lines, fewer experiments were done with fish.

All experiments were done in recirculation system with fish kept in intensive conditions. Herbal extracts alone or in combination with each other were mixed to the fish feed in various concentrations. Experimental groups were fed with these feeds for three, four or five weeks. The control feed did not contain herbal extracts. Blood samples were taken from the fish once a week. Cellular and humoral parameters of the innate immune response were measured. At the end of the experiments, fish were challenged with the bacterium *Aeromonas hydrophila*, mortalities were registered during one week and survival rates were calculated. Experimental designs were similar in the half-industrial tests, with a difference that blood samples were taken only once in each experiment. Challenge tests were not done at the end of these tests.

According to our results all three examined herbal extracts and their combinations had characteristically positive effects on the phagocytic and respiratory burst activities of phagocytic blood cells (monocytes, neutrophils), and on the lysozyme activity of blood plasma. Mortality rates following *A. hydrophila* infection were lower in all treated groups than in the control. Effect of boron supplementation was shown mainly by the further reduction of mortality after the infection. Simultaneous application of herbal extracts and vaccination also reduced the mortality.

Based on the results of these experiments, the combinations of *Astragalus* and *Lonicera* mixed to the fish feed in 0.1-0.1% concentration with or without boron supplementation (2 mg/kg) were the most effective, therefore those combinations were selected for the semi-industrial tests. Fish were allocated to one control and two treated groups in all three experiments.

The three fish species reacted differently to the treatments of the semi-industrial tests. In the case of the African catfish, parameters of innate immune response changed to positive direction, when *Astragalus* and *Lonicera* were fed. However, there were no such changes in the case of common carps. In the case of tilapias the effects of the treatments were not clear, while cellular parameters were enhanced, and humoral parameters remained on the same levels as control. Feeds supplemented with boron caused a significant increase of innate immune parameters in all fish species used. Experimental feeds containing herbs with or without boron had a beneficial effect on

growth parameters of common carp and tilapia. However, in the case of tilapia, the positive effect occurred only at suboptimal oxygen concentrations.

Results of our experiments were compared to results of those previous experiments in which the effects of medicinal herbs or other immunostimulants (e.g. glucans, chitin, chitosan) on various fish species were investigated. Parameters of innate immune system are usually enhanced on the effects of immunostimulants. Disease resistance of fish is also increased. Our results confirmed these observations. The best effects on of the fish immune response and resistance against infection were shown by using the combination of herbal extracts. Positive effect of boron supplementation was demonstrated mainly by the further reduction of mortality. Based on our results, the mixture of *Astragalus* and *Ganoderma* added to the fish feed in a concentration of 0.1-0.1% with or without 2 mg/kg boron supplementation can be suggested for practical applications.

9. IRODALOMJEGYZÉK

Aakre, R., Wergeland, H. I., Aasjord, P. M., Endersen, C. (1994): Enhanced antibody response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) to *Aeromonas salmonicida* cell wall antigens using a bacterin containing β -1, 3-M-glucan as adjuvant. *Fish & Shellfish Immunology* 4, 47-61.

Adams, A. (1990): Sandwich enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) to detect and quantify bacterial pathogens in fish tissue. In: Stolen J. S., Fletcher, T. C., Katari, S. L., Rowley, A. F. (editors): Techniques in Fish Immunology vol. 2. SOS Publications, Fair Haven, NJ, USA.

Adams, A., Auchinachie, N., Bundy, A., Tatner, M. F., Horne, M. T. (1988): The potency of adjuvanted injected vaccines in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) and bath vaccines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. *Aquaculture* 69, 15-26.

Agarwal, S. S., Singh, V. K. (1999): Immunomodulators studies on Indian medicinal plants and synthetic Part1: Medicinal Plants. *Proceedings of the Indian National Science Academy* 65, 179-204.

Agnew, W. and Barnes, A. C. (2007): *Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. *Veterinary Microbiology* 122, 1-15.

Ahmad, I., Mehmood, Z., Mohammed, F. (1998): Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. *Journal of Ethnopharmacology* 62, 183-193.

Ainsworth, A. J. (1992): Fish granulocytes: morphology, distribution and function. *Annual Review of Fish Diseases* 2, 123-148.

Ainsworth, A. J. (1994): A beta-glucan inhibitable zymosan receptor on channel catfish neutrophils. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 41, 141-152.

Alderman, D. J., Hastings, T. S. (1998): Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance – potential for consumer health risks. *International Journal of Food Science and Technology* 33 (2), 139-155.

Alexander, J. B., Ingram, G. A. (1992): Non-cellular and non-specific defense mechanism of fish. *Annual Review of Fish Diseases* 2, 249-280.

- Aly, S. M. and Mohamed, M. F. (2010):** *Echinacea purpurea* and *Allium sativum* as immunostimulants in fish culture using Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 94, 31-39.
- Anderson, D. P. (1992):** Immunostimulants, adjuvants and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. *Annual Review of Fish Diseases* 2, 281-307.
- Anderson, D. P. and Jeney, G. (1992):** Immunostimulants added to injected *Aeromonas salmonicida* bacterin enhance the defense mechanisms and protection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 34, 379-389.
- Anderson, D. P., Moritomo, T., de Grooth, R. (1992):** Neutrophil, glass-adherent, nitroblue-tetrazolium assay gives early indication of immunization effectiveness in rainbow trout. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 30, 419-429.
- Anderson, D. P. and Siwicki, A. K. (1994):** Duration of protection against *Aeromonas salmonicida* in brook trout immunostimulated with glucan or chitosan by injection or immersion. *Progressive Fish Culturer* 56, 258-261.
- Anderson, D. P., Jeney, G., Rumsey, L., Siwicki, A. K. (1997):** Adjuvants and immunostimulants for potentiating protection against furunculosis in fish. In: Bernoth, E., Ellis, A. E., Midtlyng, P. J., Olivier, G. and Smith, P. (eds.): *Furunculosis, Multidisciplinary Fish Disease Research*. Academic Press, New York, USA
- Aoki, T., Takano, T., Santos, M. D., Kondo, H., Hirono, I. (2008):** Molecular innate immunity in teleost fish: review and future perspectives. In: Tsukamoto, K., Kawamura, T., Takeuchi, T., Beard, T. D., Kaiser, M. J. (eds.): *Fisheries for Global Welfare and Environment, 5th World Fisheries Congress*, 263-276.
- Arason, G. J.(1996):** Lectins as defence molecules in vertebrates and invertebrates. *Fish & Shellfish Immunology* 6, 277-289.
- Armstrong, P. B. and Quigley, J. P. (1999):** α 2-macroglobulin: an evolutionary conserved arm of the innate immune system. *Dev. Comp. Immunology* 23, 375-390.
- Armstrong, T. A., Spears, J. W. (2003):** Effect of boron supplementation of pig diets on the production of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma. *Journal of Animal Science* 81(10), 2552-2561.

- Auro de Ocampo, A. and Jimenez, E. M. (1993):** Herbal medicines in the treatment of fish diseases in Mexico. *Veterinaria Mex.* 24, 291-295.
- Bagni, M., Romano, N., Finoia, M. G., Abelli, L., Scapigliati, G., Tiscar, P. G., Sarti, M., Marino, G. (2005):** Short- and long term effect of a dietary yeast β -glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish & Shellfish Immunology* 18, 311-325.
- Bai, D. Q., Wu, X., Zhu, G. X., Guo, Y. J., Yang, G., Ning, B., Xing, K. Z. (2012):** *Astragalus* polysaccharides enhance cellular immune response and disease resistance in yellow catfish. *Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh* 64.
- Balogh, K., Elbaraasi, H., Mézes, M. (2002):** A szelén toxicitása halakban. *Halászat* 95(1), 30-33.
- Bao, X. F., Wang, X. S., Qun, D., Fang, J. N., Li, X. Y. (2002):** Structural features of immunologically active polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry* 59(2):175-81.
- Bayne, C. J. and Gerwick, L. (2001):** The acute phase response and innate immunity of fish. *Dev. Comp. Immunology* 25, 725-743.
- Bhattacharya, A. and Ghosal, S. (2000):** Antioxidant activity of tannoid principles of *Emblica officinalis* (amla) in chronic stress induced changes in rat brain. *Indian Journal of Experimental Biology* 38:877-880.
- Blazer, V. S. and Wolke, R. E. (1984):** The effects of atocopherolon immune response and non-specific resistance factors of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Aquaculture* 37, 1-9.
- Bonaldo, A., Thompson, K. D., Manfrin, A., Adams, A., Murano, E., Mordenti, A. L., Gatta, P. P. (2007):** The influence of dietary beta-glucans on the adaptive and innate immune responses of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) vaccinated against vibriosis. *Italian Journal of Animal Sciences* 6(2), 151-164.
- Burrige, L., Weis, J. S., Cabello, F., Pizarro, J., Bostick, K. (2010):** Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture* 306, 7-23.

- Cabello, F. C. (2006):** Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology* 8 (7), 1137-1144.
- Cao, L. Z. and Lin, Z. B. (2003):** Regulatory effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on cytotoxic T-lymphocytes induced by dendritic cells *in vitro*. *Acta Pharmacologica Sinica* 24 (4), 312-326.
- Chakraborty, S. B. and Hancz, Cs., (2011):** Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and antistress agents of fish culture. *Reviews in Aquaculture* 3, 103-119.
- Chansue, N., Ponpornpisit, A., Endo, M., Sakai, M., Satoshi, Y. (2000):** Improved immunity of tilapia *Oreochromis niloticus* by C-UPIII, a herb medicine. *Fish Pathology* 35, 89-90.
- Chen, D., and Ainsworth, A. J. (1992):** Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Journal of Fish Diseases* 15, 295-304.
- Chiu, J. H., Lay, I. S., Su, M. Y., Chiu, H. L., Chiu, A. C, Lui, W. Y. and Wu, C. W. (2002):** Tumor necrosis factor-producing activity of wogonin in RAW 264.7 murine macrophage cell line. *Planta Med.* 68(11):1036-9.
- Cho, J. Y., Kim, A. R., Yoo, E. S., Baik, K. U. and Park, M. H. (2002):** Ginsenosides from *Panax ginseng* differentially regulate lymphocyte proliferation. *Planta Med.* 68(6):497-500.
- Citarasu, T. (2010):** Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquaculture International* 18: 403-414.
- Dahanukar, S. A. and Thatte, U. M. (1997):** Current status of Ayurveda. *Phytomedicine* 4, 297-306.
- Davis, J. S. and Hayasaka, S. S. (1984):** The enhancement of resistance of the American eel, *Anguilla rostrata* Le Sueur, to a pathogenic bacterium *Aeromonas hydrophila* by an extract of the tunicate *Ecteinascidia turbinata*. *Journal of Fish Diseases* 1, 311-316.

- Devi, P.U. and Ganasoundari, A. (1995):** Radioprotective effect of leaf extract of Indian medicinal plant *Ocimum sanctum*. *Indian Journal of Experimental Biology* 33, 205-208.
- Direkbusarakom, S., Herunsalee, A., Yoshimizu, M., Ezura, Y., (1996):** Antiviral activity of several Thai traditional herb extracts against fish pathogenic viruses. *Fish Pathology* 31, 209-213.
- Divyagnaneswari, M., Christyapita D., Michael R. D. (2007):** Enhancement of nonspecific immunity and disease resistance in *Oreochromis mossambicus* by *Solanum trilobatum* leaf fractions. *Fish & Shellfish Immunology*. 23, 249-259.
- Dixon, R. A., Dey, P. M., Lamb, C. J. (1983):** Phytoalexins: enzymology and molecular biology. *Advances in Enzymology* 55, 1-69.
- Drasar. P. and Moravcova, J. (2004):** Recent advances in analysis of Chinese medical plants and traditional medicines. *Journal of Chromatography* 812 (1-2), 3-21.
- Dutta B. K., Rahman, I., Das, T. K. (1998):** Antifungal activity of Indian plant extracts. *Mycoses* 41, 535-536.
- Dügenci, S. K., Arda, N., Candan, A. (2003):** Some medicinal plants as immunostimulant for fish. *Journal of Ethnopharmacology* 88, 99-106.
- Egger, S. F., Brown, G. S., Kelsey, L. S., Yates, K. M., Rosenberg, L. J., Talmadge, J. E. (1996):** Studies on optimal dose and administration schedule of a hematopoietic stimulatory beta-(1,4)-linked mannan. *International Journal of Immunopharmacology* 18 (2), 113-126.
- Ellis, A. E. (1976):** Leukocytes and related cells in the plaice (*Pleuronectes platesa*). *Journal of Fish Biology* 8, 143-156.
- Ellis, A. E. (1977):** The leukocytes of fish: A review. *Journal of Fish Biology* 11, 453-491
- Ellis, A. E. (1982):** Differences between the immune mechanisms of fish and higher vertebrates. In: Roberts (ed.) : *Microbial Diseases of Fish*
- Ellis, A. E. (1987):** Inhibition of the *Aeromonas salmonicida* extracellular protease by α 2-macroglobulin in the serum of rainbow trout. *Microb. Pathog.* 3, 167-177

- Ellis, A. E. (2001):** Innate host defence mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology* 25, 827-839.
- Engstad, R. E., Robertsen, B., Frivold, E.(1992):** Yeast glucan induces increase in activity of lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. *Fish & Shellfish Immunology* 2, 287-297.
- Engstad, R. E. and Robertsen, B (1994):** Specificity of β -glucan receptors on macrophages from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Developmental & Comparative Immunology* 18, 397-408
- Evans, D. L. and Jaso-Friedmann, L. (1992):** Nonspecific cytotoxic cells as effectors of immunity in fish. *Annual Review of Fish Diseases* 2, 109-121
- Evans, J. J., Klesius, P. H., Shoemaker, C. A. (2004):** Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration. *Vaccine* 22, 3769-3773.
- Eya, J. C. and Lovell, R. T. (1998):** Effects of dietary phosphorus on resistance of channel catfish to *Edwardsiella ictaluri* challenge. *Journal of Aquatic Animal Health* 10, 28-34.
- FAO (2010):** The State of World Fisheries and Aquaculture, <http://www.fao.org/docrep/013/i1820e/i1820e.pdf>
- Francis, G., Makkar, H. P. S., Becker, K. (2001):** Effects of *Quillaja* saponins on growth, metabolism, egg production and muscle cholesterol in individually reared Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 129, 105-114.
- Francis, G., Makkar, H. P. S., Becker, K. (2002):** Dietary supplementation with a *Quillaja* saponin mixture improves growth performance and metabolic efficiency in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture* 203, 311-320.
- Fry, R. S., Lloyd, K. E., Jacobi, S. K., Siciliano, P. D., Robarge, W. P., Spears, J. W. (2010):** Effect of dietary boron on immune function in growing beef steers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 94(3), 273-279.
- Galeotti, M. (1998):** Some aspects of the application of immunostimulants and a critical review of methods for their evaluation. *Journal of Applied Ichthyology* 14, 189-199.

- Gergely, J és Erdei, A. (1998):** Immunbiológia. Medicina Kiadó, Budapest
- Goetz, F. W., Iliev, D. B., McCauley, L. A. R., Liarte, C. Q., Tort, L. B., Planas, J. V., MacKenzie, S. (2004):** Analysis of genes isolated from lipopolysaccharide-stimulated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) macrophages. *Molecular Immunology* 41, 1199-1210.
- Gopalakkanan, A. and Arul, V. (2006):** Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. *Aquaculture* 225, 179-187.
- Govindachari, T. R. (1992):** Chemical and biological investigations on *Azadirachta indica* (the neem tree). *Current Science* 63:117.
- Grayson, T. H., Williams, R. J., Wrathmell, A. B., Munn, C. B., Harris, J. E. (1987):** Effects of immunopotentiating agents on the immune response of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson to ERM vaccine. *Journal of Fish Biology* 31, 195-202.
- Gudding, R., Lillehaug, A., Evensen, Ø. (1999):** Recent developments in fish vaccinology. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 72, 203-212.
- Hardie, L. J., Fletcher, T. C., Secombes, C. J. (1990):** The effect of vitamin E on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 87, 1-13
- Hardie, L. J., Fletcher, T. C., Secombes, C. J. (1991):** The effect of dietary Vitamin C on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 95, 201-214.
- Harikrishnan, R., Rani, M. N., Balasundaram, C. (2003):** Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquaculture* 221, 41-50.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Kim, M., Kim, J., Han, J., Heo, M. (2009a):** Innate immune response and disease resistance in *Carassius auratus* by triherbal solvent extracts. *Fish and Shellfish Immunology* 27, 508-515.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M. S. (2009b):** Effect of chemotherapy, vaccines and immunostimulants on innate immunity of goldfish infected with *Aeromonas hydrophila*. *Diseases of Aquatic Organisms* 88 (1), 45-54.

- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M. S. (2011):** Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture* 317, 1-15.
- Hori, Y., Miura, T., Hirai, Y., Fukumura, M., Nemoto, Y., Torizuka, K., Ida, Y. (2003):** Pharmacognostic studies on ginger and related drugs—part 1: five sulfonated compounds from *Zingiberis rhizome* (Shokyo) *Phytochemistry* 62 (4), 613-617.
- Hseu, Y., Chang, W., Chen, C., Liao, J., Huang, C., Lu, F., Chia, Y., Hsu, H., Wu, J., Yang, H. (2008):** Antioxidant activities of *Toona sinensis* leaves extract using different antioxidant models. *Food and Chemical Toxicology* 46, 105-114.
- Hyung, M. K., Eun, J. M., En, L., Kun, M. K., Sang, Y. N., Cha, K. C. (1999):** The nitric oxide-producing activities of *Scutellaria baicalensis*. *Toxicology*, 135 (2-3), 109-115.
- Immanuel, G., Uma, R. P., Iyapparaj, P., Citarasu, T., Peter, S. M. P., Babu, M. M., Palavesam, A. (2009):** Dietary medicinal plant extracts improve growth, immune activity and survival of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Fish Biology* 74, 1462-1475.
- Jeney, G., and Anderson, D. P. (1993):** Enhanced immune response and protection in rainbow trout to *Aeromonas salmonicida* bacterin following prior immersion in immunostimulants. *Fish & Shellfish immunology* 3, 51-58
- Jeney, Zs. and Jeney, G. (1995):** Recent achievements in studies on diseases of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture* 129, 397-420.
- Jeney, G., Galeotti, M., Volpatti, D., Jeney, Zs., Anderson, D. P. (1997):** Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. *Aquaculture* 154, 1-15.
- Jeney, G. and Jeney, Zs. (2002):** Application of immunostimulants for modulation of the non-specific defense mechanisms in sturgeon hybrid: *Acipenser ruthenus* X *A. baeri*. *Journal of Applied Ichtiology* 18, 416-419.
- Jeney, G., Csengeri, I., Molnár, A., Rónyai, A., Szűcs, I. (2005):** Magyar-kínai-chilei haltenyésztési projekt feladatainak támogatása: kínai gyógynövénykivonatok alkalmazása az intenzív haltenyésztésben. NKTH-zárójelentés, szerződés száma: 81-4/2005.

- Jian, J. and Wu, Z. (2003):** Effects of traditional Chinese medicine on nonspecific immunity and disease resistance of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* (Richardson). *Aquaculture* 218, 1-9.
- Jian, J. and Wu, Z. (2004):** Influences of traditional Chinese medicine on non-specific immunity of Jian carp (*Cyprinus carpio* var. *Jian*). *Fish & Shellfish Immunology* 16, 185-191.
- Jiang, H., Siegel, J. N., Gewurz, H (1991):** Binding and complement activation by C-reactive protein via the collagen-like region of C1q and inhibition of these reactions by monoclonal antibodies to C-reactive protein and C1q. *Journal of Immunology* 146, 2324-2330.
- Jorgensen, J. B., Lunde, H., Robertsen, B (1993):** Peritoneal and head kidney cell response to intraperitoneally injected yeast glucan in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* 16, 313-325.
- Jorgensen, J. B. and Robertsen, B. (1995):** Yeast β -glucan stimulates respiratory burst activity of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages. *Dev. Comp. Immunology* 19, 43-57.
- Jurecka, P., Wiegertjes, G. F., Rakus, K. L., Pilarczyk, K., Irnazarow, I. (2009):** Genetic resistance of carp (*Cyprinus carpio* L.) to *Trypanoplasma borreli*: influence of transferrin polymorphism. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 127, 19-25.
- Kajita, Y., Sakai, M., Atsuta, S., Kobayashi, M. (1990):** The immunomodulatory effect of levamisole on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Pathology* 25, 93-98.
- Kawakami, H., Shinohara, N., Sakai, M. (1998):** The non-specific immunostimulation and adjuvant effects of *Vibrio anguillarum* bacterin, M-glucan, chitin or Freund's complete adjuvant in yellowtail *Seriola quinqueradiata* to *Pasteurella piscicida* infection. *Fish Pathology* 33, 287-291.
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M. J., Gibson, L. (2008):** Probiotics in aquaculture: The need, the principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* 274, 1-14.
- Kitao, T. and Yoshida, T. (1986):** Effect of an immunopotentiator on *Aeromonas salmonicida* infection in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 12, 287-291.

- Kitao, T., Yoshida, T., Anderson, D. P. Dixon, O. W., Blanch, A. (1987):** Immunostimulation of antibody-producing cells and humoral antibody to fish bacterins by a biological response modifier. *Journal of Fish Biology* 31, 87-91.
- Kodama, H., Hirota, Y., Mukamoto, N., Baba., T., Azuma, I. (1993):** Activation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocytes by muramyl dipeptide. *Dev. Comp. Immunology* 17, 129-140.
- Kuan, Y., Sheu, F., Lee, G. C., Tsai, M. W., Hung, C. L., Nan, F. H. (2012):** Administration of recombinant Reishi immunomodulatory protein (rLZ-8) diet enhances innate immune responses and elicits protection against nervous necrosis virus in grouper *Epinephelus coioides*. *Fish and Shellfish Immunology* 32(6), 986-993.
- Kwon, Y. S., Kobayashi, A., Kajiyama, S. I., Kawazu, K., Kanzaki, K., Kim, C. M. (1997):** Antimicrobial constituents of *Angelica dahurica* roots. *Phytochemistry* 44(5):887-9.
- Lam, S. K. and Ng, T. B. (2002):** Pananotin, a potent antifungal protein from roots of the traditional chinese medicinal herb *Panax notoginseng*. *Planta Med.* 68(11):1024-8.
- Lamas, J. and Ellis, A. E. (1994):** Atlantic salmon (*Salmo salar*) neutrophil responses to *Aeromonas salmonicida*. *Fish & Shellfish Immunology* 4, 201-219.
- Lee, J. H., Ko, W. S., Kim, Y. H., Kang, H. S., Kim, H. D., Choi, B. T. (2001):** Anti-inflammatory effect of the aqueous extract from *Lonicera japonica* flower is related to inhibition of NF-kappa B activation through reducing I-kappa B alpha degradation in rat liver. *International Journal of Molecular Medicine* 7 (1), 79-83.
- Li, Y. and Lovell, R. T. (1985):** Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune responses in channel catfish. *J. Nutr.* 115, 123-131.
- Lim, C., Klesius, P. H., Duncan, P. L. (1996):** Immune response and resistance to *Edwardsiella ictaluri* challenge when fed various dietary levels of zinc methionine and zinc sulfate. *Journal of Aquatic Animal Health* 8, 302-307.
- Lim, C., Klesius, P. H., Webster, C. D. (2001):** The role of dietary phosphorus, zinc and selenium in fish health. In: Lim, C. and Webster, C. D. (eds.): *Nutrition and Fish Health* pp201-212. Food Products Press, New York.

- Lim, D. S., Bae, K. G., Jung, I. S., Kim, C. H. Yun, Y. S., Song, J. Y. (2002):** Anti-septicaemic effect of polysaccharide from *Panax ginseng* by macrophage activation. *J Infect.* 45(1):32-8.
- Lin, Z. B. and Zhang, H. N. (2004):** Anti-tumor and immunoregulatory activities of *Ganoderma lucidum* and its possible mechanisms. *Acta Pharmacologica Sinica* 25 (11), 1387-1395.
- Logambal, S. M. and Michael, R. D. (2000):** Immunostimulatory effect of azadirachtin in *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Indian Journal of Experimental Biology* 38, 1092-1096.
- Logambal, S. M., Venkatalakshmi, S., Michael, R. D. (2000):** Immunostimulatory effect of leaf extract of *Ocimum sanctum* Linn. in *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Hydrobiologia* 430:113-120.
- Logambal, S. M. and Michael, R. D. (2001):** Azadirachtin – an immunostimulant for *Oreochromis mossambicus*. *J. Aquaculture in the Tropics* 16, 339-347.
- Lund, V. and Olafsen, J. A. (1998):** Atypical phosphorylcholine-reactive protein from Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Comparitive Biochemistry and Physiology* 119, 471-477.
- MacArthur, J. I., Fletcher, T. C. (1985):** Phagocytosis in fish. In: Manning, M. J., Tatner, M. F. (editors): *Fish Immunology*. Academic Press, London, pp. 29-46.
- MacKenzie, S., Planas, J. V., Goetz, F. W. (2003):** LPs-mediated expression of tumor necrosis factor-alpha mRNA in primary trout monocytes and in vitro differentiated macrophages. *Developmental and Comparative Immunology* 27, 393-400.
- Magnadottir, B. (2006):** Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology* 20, 137-151.
- Martins, A. P., Salgueiro, L., Goncalves, M. J., Proenca da Cunha, A., Vila, R., Cavigueral, S., Mazzoni, V., Tomi, F., Casanova, J. (2001):** Essential oil composition and antimicrobial activity of three *Zingiberaceae* from S.Tome e Principe. *Planta Med.* 2001 Aug;67(6):580-4.
- Matuk, K. és Gulyás, T (1987):** A halak altatásának újabb lehetőségei. *Halászat* 33, 11-13.

- McCumber, L. J., Trauger, T., Sigel, M. M. (1981):** Modification of the immune system of the American eel *Anguilla rostrata* by ETE. *Dev. Biol. Stand.* 49, 289-294.
- Misra, C. K., Das, B. K., Mukherjee, S. C., Pattnai, P. (2006):** Effect of multiple injection of β -glucan on non-specific immune response and disease resistance in *Labeo rohita* fingerlings. *Fish and Shellfish Immunology* 20, 305-319.
- Mohan, P. V. and Devi, K. S. (1997):** Effect of Sobatum on tumour development and chemically induced carcinogenesis, *Cancer Lett* 112, 219–223.
- Mohan, P. V., Rao, J. M., Kutty, M. A. S., Devi, K. S. (1998):** Cytotoxicity of extracts of *Solanum trilobatum* and anticarcinogenic activity of Sobatum, *Biomedicine* 18, 106–111.
- Navarre, O. and Halver, J. E. (1989):** Disease resistance and humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C. *Aquaculture* 79, 207-221.
- Neumann, N. F., Stafford, J. L., Barreda, D., Ainsworth, A. J., Belosevic, M. (2001):** Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defence. *Developmental and Comparative Immunology* 25, 807-825.
- Oliva-Teles, A. (2012):** Nutrition and health of aquaculture fish. *Journal of Fish Diseases* 35(2), 83-108.
- Olivier, G., Evelyn, T. P. T., Lallier, R. (1985):** Immunity to *Aeromonas salmonicida* in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) induced by modified Freund's complete adjuvant: its non-specific nature and the probable role of macrophages in the phenomenon. *Dev. Comp. Immunology* 9, 419-432.
- Olivier, G., Eaton, C. A., Campbell, N. (1986):** Interaction between *Aeromonas salmonicida* and peritoneal macrophages of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) *Veterinary Immunology and Immunopathology* 12, 223-234.
- Paripatanont, T. and Lovell, R. T. (1995):** Responses of channel catfish fed organic and inorganic sources of zinc to *Edwardsiella ictaluri* challenge. *Journal of Aquatic Animal Health* 7, 147-154.
- Pashnik, D. J., Evans, J. J., Panangala, V. S., Klesius, P. H., Shelby, R. A., Shoemaker, C. A. (2005):** Antigenicity of *Streptococcus agalactiae* extracellular products and vaccine efficacy. *Journal of Fish Diseases* 28 (4), 205-212.

- Paulsen, S. M., Engstad, R. E., Robertsen, B. (2001):** Enhanced lysozyme production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages treated with yeast β -glucan and bacterial lipopolysaccharide. *Fish and Shellfish Immunology* 11, 23-37.
- Peddie, S., Zou, J., Secombes, C. J. (2002):** Immunostimulation in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intraperitoneal administration of Ergosan. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 86, 101-113.
- Peddie, S. and Secombes, C. J. (2003):** The immunostimulatory effects of Chevimmun in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 23, 48-51.
- Ponpornpisit, A., Endo, M., Murata, H. (2001):** Prophylactic effect of chemicals and immunostimulants in experimental *Tetrahymena* infection of guppy. *Fish Pathology* 36, 1-6.
- Poobalane, S., Thompson, K. D., Diab, A., Ardó, L., Jeney, G., Adams, A. (2008):** Protein expression by *Aeromonas hydrophila* during growth *in vitro* and *in vivo*. *Microbial pathogenesis* 45, 60-69.
- Poobalane, S., Thompson, K. D., Ardó, L., Verjan, N., Han, H. J., Jeney, G., Hiruno, I., Aoki, T., Adams, A. (2010):** Production and efficacy of an *Aeromonas hydrophila* recombinant S-layer protein vaccine for fish. *Vaccine* 28, 3540-3547.
- Punitha, S. M. J., Babu, M. M., Sivaram, V., Shankar, V. S., Dhas, S. A., Mahesh, T. C., Immanuel, G., Citarasu, T. (2008):** Immunostimulating influence of herbal biomedicines on nonspecific immunity in Grouper *Epinephelus tauvina* against *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture International* 16, 511-523.
- Radics, F. és Szigeti, G. (2005):** Előzetes vizsgálatok a bór kiegészítés takarmányhasznosításra gyakorolt hatására az intenzíven tartott afrikai harcsa esetében. *Halászatfejlesztés* 30, 81-83.
- Ray, A., Banerjee, B.D., Sen, P. (1996):** Modulation of humoral and cell mediated immune response by *Azadirachta indica* (Neem) in mice. *Indian J. Exp. Biol.* 34, 698-701.
- Reite, O. B. and Evensen, Ø. (2006):** Inflammatory cells of teleostean fish: A review focusing on mast cells / eosinophilic granule cells and rodlet cells. *Fish and Shellfish Immunology* 20, 192-208.

- Rieger, A. M. and Barreda, D. R. (2011):** Antimicrobial mechanisms of fish leukocytes. *Developmental and Comparative Immunology* 35, 1238-1245.
- Rijkers, G. T. Teunissen, A. G., Vanoosterom, R., van Muiswinkel, W. B. (1980):** Immune system of cyprinid fish. Immunosuppressive effect of the antibiotic oxytetracycline in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture* 19 (2), 177-189.
- Roberts, R. J. (1993):** Motile Aeromonad septicaemia. In: Inglis, V., Roberts, R. J., Bromage, N. R. (editors): *Bacterial Diseases of Fish*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1993, p. 143-155.
- Robertsen, B. (2008):** Expression of interferon and interferon-induced genes in salmonids in response to virus infection, interferon-inducing compounds and vaccination. *Fish and Shellfish Immunology* 25, 351-357.
- Rónyai, A., Jeney, G., Ardó, L., Majoros, F. (2012):** Csillagfürtöt, rizskorpát, illetve gyógynövény-kivonatokat tartalmazó tápok hatása különböző halfajok termelési mutatóira. *Halászat* 105, 20-25.
- Rorstad, G., Aasjord, P. M., Robertsen, B. (1993):** Adjuvant effect of a yeast glucan in vaccines against furunculosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish & Shellfish Immunology* 3, 179-190.
- Rotruck, J. T., Pope, A. L., Ganther, H. E., Swanson, A. B., Hafeman D. G., Hoekstra, W. G. (1973):** Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179, 588-590.
- Sadekar, R.D., Kolte, A.Y., Barmase, B.S., Desai, V.F. (1998):** Immunopotentiating effects of *Azadirachta indica* (Neem) dry leaves powder in broilers, naturally infected with IBD virus. *Indian J. Exp. Biol.* 36:1151-1153.
- Sahoo, P. K. and Mukherjee, S. C. (2001):** Effect of dietary β -1,3 glucan on immune responses and disease resistance of healthy and aflatoxin B1-induced immunocompromised rohu (*Labeo rohita* Hamilton). *Fish & Shellfish Immunology* 11, 683-695.
- Sahoo, P. K. and Mukherjee, S. C. (2002):** The effect of dietary immunomodulation upon *Edwardsiella tarda* vaccination in healthy and immunocompromised Indian major carp (*Labeo rohita*) *Fish & Shellfish Immunology* 12, 1-16.

- Sakai, M., Kamiya, H., Atsuta, S., Kobayashi, M. (1991):** Immunomodulatory effects on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, injected with extract of abalone, *Haliotis discus hannai*. *Journal of Applied Ichthyology* 7, 54-59.
- Sakai, M. (1999):** Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 172, 63-92.
- Salati, F., Hamaguchi, M., Kusuda, R., (1987):** Immune response of red sea bream to *Edwardsiella tarda* antigens. *Fish Pathology* 22, 93-98.
- Salte, R., Gjoen, H. M., Norberg, K., Gjedrem, T. (1993):** Plasma protein levels as potential marker traits for resistance to furunculosis. *Journal of Fish Diseases* 16, 561-568.
- Sankaran, K. and Gurnani, S. (1972):** On the variation in the catalytic activity of lysozyme in fishes. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 9, 62-165.
- Sato, Y., Suzaki, S., Nishikawa, T., Kihara, M., Shibata, H., Higuti, T. (2000):** Phytochemical flavones isolated from *Scutellaria barbata* and antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology* 72(3):483-8.
- Saurabh, S. and Sahoo, P. K. (2008):** Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research* 39(3), 223-239.
- Schwarz, S., Kehrenberg, C., Walsh, T. R. (2001):** Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *International Journal of Antimicrobial Agents* 17, 431-437.
- Secombes, C. J. (1990):** Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. In: Stolen, J. S., Fletcher, T. C., Anderson, D. P., Kattari, S. L. and Rowley, A. F. (eds.): *Techniques in Fish Immunology*, SOS Publications, Fair Haven, N.J., USA.
- Secombes, C. J. (1996):** The nonspecific immune system: cellular defenses. In: Iwama, G. and Nakanishi, T. (eds.) : *The Fish Immune System*. Academic Press, New York.
- Seeley, K. R., Gillespie, P. D., Weeks, B. A. (1990):** A simple technique for the rapid spectrophotometric determination of phagocytosis by fish macrophages. *Marine Environmental Research* 30, 123-128.

- Selvaraj, V, Sampath, K., Sekar, V. (2005):** Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology* 19, 293-306.
- Sen, P., Medirapta, P., Ray, A., Puri, S. (1996):** An experimental evaluation of *Azadirachta indica* in normal and stressed rats and adaptogenic effect. In: Chary, M.S., Singh, P.R., Kraus, W., and Saxena R.C. (eds) Abstracts. World Neem conference (Oxford and IBH Pub. PVT. Ltd., London).
- Shahjahan, M., Sabitha, K.E., Jainu, M., Shyamala Devi, C.S. (2004):** Effect of *Solanum trilobatum* against carbon tetrachloride induced hepatic damage in albino rats, *Indian J Medical Research* 120, 194–198.
- Sharma, A., Deo, A. D., Riteshkumar, S. T., Chanu, T. I., Das, A. (2010):** Effect of *Whitania somnifera* (L. Dunal) root as a feed additive on immunological parameters and disease resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings. *Fish and Shellfish Immunology* 29, 508-512.
- Sivaram, V., Babu, M. M., Immanuel, G., Murugadass, S., Citarsu, T., Marian, M. P. (2004):** Growth and immune responses of juvenile greasy groupers (*Epinephelus tauvina*) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against *Vibrio harveyi* infections. *Aquaculture* 237(1-4), 9-20.
- Siwicki, A. K. (1987):** Immunomodulating activity of levamisole in spawners carp (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of Fish Biology* 31, 245-246.
- Siwicki, A. K. (1989):** Immunomodulating influence of levamisole on nonspecific immunity of carp (*Cyprinus carpio*). *Dev. Comp. Immunology* 14, 231-237.
- Siwicki, A. K., Anderson, D. P., Rumsey, G. L. (1994):** Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 41, 125-139.
- Solem, S. T., Jorgensen, J. B., Robertsen, B. (1995):** Stimulation of respiratory burst and phagocytic activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) by lipopolysaccharide. *Fish & Shellfish Immunology* 5, 475-491.

- Song, Q. H., Kobayashi, T., Xiu, L. M. Tie, H and Cyong, J. C. (2000):** Effects of Astragal root and Hedysari root on the murine B and T cell differentiation. *J Ethnopharmacol* 73(1-2):111-9.
- Sottrup-Jensen, L., Stepanik, T. M., Kristensen, T., Loenblad, P. B., Jones, C. M., Wierzbicki, D. M. (1985):** Common evolutionary origin of alpha sub(2)-macroglobulin and complement component C3 and C4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 9-13.
- Stündl, L. (2011):** Intenzív haltermelési rendszerek fejlesztése. *Állattenyésztés és Takarmányozás* 60(3), 313-334.
- Szigeti, G., Sályi, G., Csaba, Gy., Kelemen, F. (2005):** A bőr élettani hatásának biokémiai alapjai. *XXIX. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, 15.*
- Tan, B. K. H. and Vanitha, J. (2004):** Immunomodulatory and antimicrobial effect of some traditional Chinese medicinal herbs: a review. *Current Medical Chemistry* 11, 1423-1430.
- Thanikachalam, K., Kasi, M., Rathinam, X. (2010):** Effect of garlic peel on growth, hematological parameters and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in African catfish, *Clarias gariepinus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 3(8), 614-618.
- Thompson, I., White, A., Fletcher, T. C., Houlihan, D. F., Secombes, C. J. (1993):** The effect of stress on the immune responses of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets containing different amounts of vitamin-C. *Aquaculture*, 114, 1-18.
- Thorarinsson, R., Landolt, M. L., Elliott, D. G., Pascho, R. J., Hardy, R. W. (1994):** Effect of dietary vitamin E and selenium on growth, survival and the prevalence of *Renibacterium salmoninarum* infection in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture* 121, 343-358.
- Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R., Moran, G. (2011):** Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinarni Medicina* 56(10), 486-503.
- Van Muiswinkel, W. B., Wiegertjes, G. F., Stet, R. M. (1999):** The influence of environmental and genetic factors on the disease resistance of fish. *Aquaculture* 172, 103-110.
- Venkatalakshmi, S., Michael, R.D. (2001):** Immunostimulation by leaf extract of *Ocimum sanctum* L. in *Oreochromis mossambicus* (Peters). *J. Aqua Trop.* 16, 1-10.

- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W. (2000):** Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* Dec. 2000, 655-671.
- Volpatti, D., D'Angelo, L., Jeney, G., Jeney, Z., Anderson, DP, Galeotti, M. (1998):** Nonspecific immune response of fish fed glucan diets prior to induced transportation stress. *Journal of Applied Ichtiology* 14 (3-4), 201-206.
- Wang, S. Y., Hsu., M. L., Hsu., H. C., Tzeng, C. H., Lee, S. S., Siao, M. S., Ho, C. K. (1997a):** The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. *International Journal of Cancer* 70(6):699-705.
- Wang, C., Lovell, R. T., Klesius, P. H. (1997b):** Response to *Edwardsiella ictaluri* challenge by channel catfish fed organic and inorganic sources of selenium. *Journal of Aquatic Animal Health* 9, 172-179.
- Watanabe, T., Kiron, V., Satoh, S. (1997):** Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture* 151, 185-207.
- Whyte, S. K. (2007):** The innate immune response of finfish – A review of current knowledge. *Fish & Shellfish Immunology* 23, 1127-1151.
- Wise, D. J., Tomaso, J. R., Gatlin, D. M., Bai, S. C., Blazer, V. S. (1993):** Effects of dietary selenium and vitamin E on red blood cells peroxidation, glutathione peroxidase activity and macrophage superoxide anion production in channel carfish. *J. Aquat. Anim. Health* 5, 177-182.
- Wu, H. Z.; Luo, J., Yin, Y. X., Wei, Q. (2004):** Effects of chlorogenic acid, an active compound activating calcineurin purified from *Flos Lonicerae* on macrophage. *Acta Pharmacologica Sinica* 25 (12), 1685-1689.
- Wu, C., Liu, C., Chang, Y., Hsieh, S. (2010):** Effects of hot-water extract of *Toona sinensis* on immune response and resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Oreochromis mossambicus*. *Fish and Shellfish Immunology* 29, 258-263.
- Xie, J., Bo, L., Zhou, Q., Su, Y., He, Y., Pan, L., Ge, X., Xu, P. (2008):** Effects of anthraquinone extract from rhubarb *Rheum officinale* Bail on the crowding stress response and growth of common carp *Cyprinus carpio* var. *Jian*. *Aquaculture* 281, 5-11.

Yang, H., Chang, W., Chia, Y., Huang, C., Lu, F., Hsu, H., Hseu, Y. (2006): Toona sinensis extracts induces apoptosis via reactive oxygen species in human pre-myelocytic leukemia cells. *Food and Chemical Toxicology* 44, 1978-1988.

Yano, T. (1996): The nonspecific immune system: humoral defenses. In: Iwama, G. and Nakanishi, T. (eds.) : *The Fish Immune System*. Academic Press, New York.

Yin, G., Jeney, G., Rácz, T. Pao, X., Jeney, Z (2006): Effect of two Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Scutellaria radix*) on non-specific immune response of tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 253, 26-33.

Yuan, C., Li, D., Chen, W., Sun, F., Wu, G., Gong, Y., Tang, J., Shen, M., Han, X. (2007): Administration of a herbal immunoregulation mixture enhances some immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*). *Fish Physiology and Biochemistry* 33 (2), 93-101.

Yuan, C., Pan, X., Gong, Y., Xia, A., Wu, G., Tang, J., Han, X. (2008): Effects of *Astragalus polysaccharides* (APS) on the expression of immune response genes in head kidney, gill and spleen of the common carp, *Cyprinus carpio* L. *International Immunopharmacology* 8, 51-58.

Zapata, A. (1979): Ultrastructural study of the teleost fish kidney. *Developmental and Comparative Immunology* 3, 55-65.

Zhang, L. and Tizard, I. R. (1996): Activation of a mouse macrophage cell line by acemannan: the major carbohydrate fraction from *Aloe vera* gel. *Immunopharmacology* 35(2):119-28.

Zhang, L., Cao, L., Ding, W., Jeney, G., Xu, P., Xiong, C., Yin, G. (2009): *In vitro* effect of lentinan on the activation of immunological cells in *Cyprinus carpio*. *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology* 6(1), 69-74.

A doktori értekezés témájában megjelent saját publikációk:

Lektorált folyóiratban megjelent közlemények:

Ardó, L., Yin, G., Jeney, Zs., Xu, P., 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., Jeney G. (2007): Chinese herbs (*Lonicera iaponica* and *Ganoderma lucidum*) enhance non-specific immune response of tilapia, *Oreochromis niloticus*, and protection against *Aeromonas hydrophila*. *Proceeding 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., 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 immunválaszának javítása gyógynövénykivonatok és nyomelemek alkalmazásával. *50. Georgikon Napok, Keszthely, p. 61.*

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom mindenekelőtt témavezetőmnek, Dr. Jeney Galinának, a Halászati és Öntözési Kutatóintézet (HAKI) tudományos főmunkatársának a munkám szakmai irányításáért és szakmai fejlődésem támogatásáért. Köszönöm Dr. Jeney Zsigmondnak, a HAKI megbízott főigazgatójának a segítőkész támogatását és tanácsait a disszertációm elkészítéséhez. Köszönöm belső konzulensemnek, Dr. Stündl Lászlónak a doktori tanulmányaim elvégzéséhez nyújtott segítségét.

Hálával tartozom Dr. Yin Guojunnak (FFRC, Wuxi, Kína) a kutatási együttműködésért és a közös munka során nyújtott segítségéért. Dr. Saravanane Poobalanek (University of Stirling, Nagy-Britannia) az *Aeromonas hydrophilával* kapcsolatos kísérleti módszerek betanításáért. Dr. Alexandra A. Adamsnek és Kim D. Thompsonnak (University of Stirling, Nagy-Britannia) a specifikus antitestek szintjének meghatározásában nyújtott segítségükért. Dr. Rónyai Andrásnak, a HAKI tudományos főmunkatársának a félüzemi kísérletek beállításáért és lefolytatásáért.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm Holp Józsefné, Benkő Lászlóné és Szucsán Györgyné asszisztenseknek a kísérleti munkák elvégzéséhez nyújtott segítségét.