

Kétféle kínai gyógynövényt (*Ganoderma lucidum* és *Lonicera japonica*) tartalmazó haltáp hatása a nílusi tilápia (*Oreochromis niloticus*) természetes immunrendszerére (előzetes eredmények)

Ardó László¹ – Yin Guojun² – Jeney Zsigmond¹ – Xu Pao² – Jeney Galina¹

¹Halászati és Öntözési Kutatóintézet, Szarvas

²Freshwater Fisheries Research Center of Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi, Kína

ÖSSZEFOGLALÁS

Két kínai gyógynövényt, a *Ganoderma lucidum* és a *Lonicera japonica* hatását vizsgáltuk a tilápia természetes immunrendszerére. A kontroll (gyógynövényeket nem tartalmazó) tápon kívül háromféle haltápot készítettünk, amelyek gyógynövénytartalmúak a következők voltak: 1,0% *Ganoderma*, 1,0% *Lonicera*, 0,5%-0,5% *Ganoderma* és *Lonicera*. A halakat ezekkel a tápokkal 3 hétig etettük. A kísérlet során mértük a fehérvérsejtek fagocitáló és respirációs aktivitását. A kísérlet végén a halakat *Aeromonas hydrophila* baktériummal fertőztük, és egy héten keresztül regisztráltuk az elhullást. A kísérleti eredmények azt mutatták, hogy mindkét gyógynövény önmagában és kombinálva is jelentős mértékben növelte a fehérvérsejtek fagocitáló aktivitását, a respirációs aktivitásra viszont nem volt hatással. Az *A. hydrophila* fertőzés utáni elhullás a kontroll csoportban volt a legmagasabb (56,66%). A *Lonicera* kivonattal kezelt csoportban ez az érték 43,33% volt, a *Ganoderma* kivonattal kezelt csoportban pedig 30,00%. A legalacsonyabb mortalitást (20,00%) a két gyógynövény kombinációjával kezelt halaknál tapasztaltuk. Ez alapján kijelenthetjük, hogy mindkét gyógynövénykivonat képes volt erősíteni a tilápia természetes immunválaszát és betegséggel szembeni ellenálló képességét.

Kulcsszavak: gyógynövények, *Ganoderma lucidum*, *Lonicera japonica*, természetes immunitás, nílusi tilápia, *Aeromonas hydrophila*

SUMMARY

The effect of two Chinese herbs (*Ganoderma lucidum* and *Lonicera japonica*) on non-specific immune response of tilapia was examined. In addition to the control (no herbs), three diet variations were used. These contained 1.0% of *Lonicera*, 1.0% of *Ganoderma* and a mixture of *Ganoderma* (0.5%) and *Lonicera* (0.5%). The respiratory burst and phagocytic activity of blood leukocytes were monitored. Three weeks after feeding, the fish were infected with *Aeromonas hydrophila*. The results of this study showed that feeding tilapia with *Ganoderma* and *Lonicera* alone or in combination enhanced the phagocytosis of blood leukocytes, but not the respiratory burst activity. Both herbs, when used alone or in combination, reduced mortality after challenge with *A. hydrophila*. The highest mortality was observed in the control fish – 56.66%, and fish fed with *Lonicera* extract – 43.33% while 30% of fish died in the group fed with *Ganoderma* and the lowest mortality (20%) was observed when the fish were fed with a combination of the two herbs. It can be concluded that the herb extracts added to this diet act as immuno-stimulants and appear to improve the immune response and disease resistance of tilapia.

Keywords: medicinal herbs, *Ganoderma lucidum*, *Lonicera japonica*, innate immunity, Nile tilapia, *Aeromonas hydrophila*

1. BEVEZETÉS

Az *Aeromonas hydrophila* baktérium által okozott szeptikémia az egyik legelterjedtebb édesvízi halbetegség, amely egyaránt veszélyezteti a hideg- és melegvízben tenyésztett halfajokat (Plumb, 1999), például a pontyot, az angolnát, a tilápiát, a harcsa- és lazacfélét (Miyazaki és Yo, 1985; Rahman és mtsai, 1997). A fertőzés megelőzésére és gyógyítására leggyakrabban antibiotikumokat használnak, de ez magában hordozza a rezisztens baktériumok kialakulásának lehetőségét. Egy másik módszer a kórokozó elleni vakcinák alkalmazása, azonban az *A. hydrophilának* sokféle, egymástól jelentős mértékben különböző törzse létezik, és nem kapható olyan oltóanyag, amely valamennyi törzs ellen hatásos lenne.

A fertőző halbetegségek megelőzésének legígéretesebb módszere a halak természetes ellenálló képességének növelése a nem-specifikus immunrendszert erősítő anyagok, az immunstimulátorok alkalmazásával (Sakai, 1999). Az utóbbi évtizedekben számos különféle vegyületről bebizonyították, hogy képesek a tenyésztett halfajok természetes immunválaszának erősítésére. Ilyen például a baktériumok sejtfalának alkotórészei, a lipopoliszacharid (LPS) és a glukánok (Engstad és Robertsen, 1994; MacKenzie és mtsai, 2003; Goetz és mtsai, 2004), de szintetikus anyagoknak, poliszacharidoknak és vitaminoknak is lehet ilyen hatása (Siwicki, 1987, 1989; Hardie és mtsai, 1991; Thompson és mtsai, 1993). Az immunstimulátorok alkalmazhatók injekció formájában, fürdetés vagy etetés útján, amelyek közül a haltenyésztési gyakorlatban az utóbbi a leginkább használható módszer.

A gyógynövényekből készült kivonatok szintén alkalmazhatók immunstimulátorként. Kínában és a többi távol-keleti országban már évezredek óta használnak gyógynövényeket a humán gyógyászatban az immunrendszer erősítésére (Tan és Vanitha, 2004). Az utóbbi években jelentős fellendülést mutat a gyógynövények aktív komponenseinek azonosítása és hatásmechanizmusuk kutatása (Lin és Zhang, 2004). A növényi kivonatok immunstimuláló hatását legtöbbször egereken, csirkéken vagy humán sejtvonalakon vizsgálták

(Shan és mtsai, 1999; Cao és Lin, 2003; Lin és Zhang, 2004), de különböző tenyésztett halfajokon is számos kísérletet végeztek. Az *Astragalus membranaceus* és az *Angelica sinensis* gyógynövények keverékének hatására például jelentős mértékben növekedett a ponty (*Cyprinus carpio*) fehérvérsejtek fagocitáló aktivitása és a vérplazma lizozimaktivitása (Jian és Wu, 2004). A nilusi tilápia (*Oreochromis niloticus*) esetében pedig a fehérvérsejtek bakteriolitikus aktivitása növekedett egy kínai gyógynövénykeverék hatására (Chansue és mtsai, 2000). Többféle halfajjal, például szivárványos pisztránggal (*Oncorhynchus mykiss*), mozambiki tilápiával (*Oreochromis mossambicus*) vagy indiai ponttyal (*Catla catla*) végzett kísérletek során is hasonló eredményeket kaptak (Dey és Chandra, 1995; Logambal és Michael, 2000; Dügenci és mtsai, 2003).

Kísérleteinkhez kétféle kínai gyógynövény, a *Ganoderma lucidum* (pecsétviaszgomba) és a *Lonicera japonica* (japán lonc) kivonatait használtuk. Mindkettőt régóta ismerik a hagyományos kínai gyógyászatban. A *Ganoderma* leginkább antitumor hatásáról ismert (Lin és Zhang, 2004), de a termőtestből készült kivonat vízdoldékony frakciójában található poliszacharidok és glikoproteinek hatékony immunstimulátorok, hatásukra fokozódik az immunválasszal kapcsolatos gének (pl. IL-1, IL-6, TNF- α) kifejeződése (Wang és mtsai, 1999), az antigénprezentáló sejtek valamint a B- és T-limfociták aktivitása (Bao és mtsai, 2002; Cao és Lin, 2003). A *Lonicera*t főleg láz és fejfájás csillapítására használják (Kumar és mtsai, 2005), de gyulladásgátlóként is hatékony (Lee és mtsai, 2001; Suh és mtsai, 2005). Egyik aktív komponensének, a polifenolok közé tartozó klorogénsavnak viszont immunstimuláló hatása is van, mivel képes fokozni a makrofágok aktivitását (Wu és mtsai, 2004), a limfociták osztódását (Boon és mtsai, 2002) és aktiválni a komplementrendszer (Koethe és mtsai, 1995).

A kísérlethez nilusi tilápiákat használtunk. A halakat három hétig etettük a kétféle gyógynövény különböző dózisait tartalmazó haltápokkal. Kontrollként gyógynövényeket nem tartalmazó tápot használtunk. A kísérlet során meghatároztuk a halak természetes immunrendszerének paramétereit, majd a kísérlet végén a halakat *A. hydrophilával* fertőztük, és meghatároztuk a baktériummal szembeni ellenálló képességüket.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. Halak

Az $52,5 \pm 3,5$ g átlagtömegű kísérleti halakat a kísérlet előtt a HAKI recirkulációs halnevelő rendszerében, 2000 literes műanyag medencékben tartottuk, állandó vízátfolyás mellett. A víz hőmérséklete 22-23 °C volt.

2.2. Gyógynövénykivonatok

A kísérlethez 25% klorogénsavat tartalmazó *Lonicera* kivonatot és 30% poliszacharidot tartalmazó *Ganoderma* kivonatot használtunk. Mindkettő a kínai Xuancheng Baicao Plants Industry and Trade Ltd. kereskedelmi terméke.

2.3. Kísérleti elrendezés és mintavétel

A kísérletet a HAKI recirkulációs halnevelő rendszerében végeztük. A kísérlet során a halakat 100 literes műanyag tartályokban tartottuk, állandó 7 liter/perces vízátfolyás mellett. A víz hőmérséklete és pH értéke a kísérlet időtartama alatt állandó volt (22 °C, pH 8,5). A víz oxigéntartalma 80% és 90% között változott.

A halakból négy csoportot alakítottunk ki. Minden csoportba 60 db hal tartozott. A kísérlethez háromféle, gyógynövénykivonatot tartalmazó haltápot készítettünk, amelyek 1,0% *Ganoderma* kivonatot, 1,0% *Lonicera* kivonatot, illetve 0,5-0,5% *Ganoderma* és *Lonicera* kivonatot tartalmaztak. Kontrollként gyógynövényeket nem tartalmazó tápot használtunk. A halakat ezekkel a tápokkal három hétig etettük.

Csoportonként 5 db halból minden héten egyszer 1 ml vérmintát vettünk. Egy halból csak egy mintát vettünk, hogy elkerüljük a többszöri vérvétel okozta stresszhatást. A mintavételek során véralvadástgátlóként heparint használtunk.

2.4. Fehérvérsejtek izolálása a vérmintákból

A vérmintákból sűrűséggradiens-centrifugálással izoláltuk a fehérvérsejteket. Szilikonizált centrifugacsövekbe 1-1 ml Histopaque 1.119-et (Sigma) töltöttünk, amelyre 1-1 ml Histopaque 1.077-et (Sigma) rétegeztünk. Mindkét réteg 0,1 ml Bacto Hemagglutination Buffert tartalmazott (Difco, USA). A vérmintákat óvatosan a Histopaque 1.077-re rétegeztük, majd 4 °C-on, 700 g erővel 15 percig centrifugáltuk. 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 2×10^6 sejt/ml-re állítottuk be.

2.5. Fagocitáló aktivitás mérése

A fehérvérsejtek fagocitáló aktivitását Seeley és mtsai (1990) módszerével határoztuk meg. A mérés során a sejtek kongóvörössel megfestett élesztősejteket fagocitálnak.

Műanyag centrifugacsövekben minden mintából 1 ml fehérvérsejt-szuspenziót kevertünk 1 ml, kongóvörössel festett élesztő-szuspenzióhoz. 60 perces, szobahőmérsékleten történt inkubációt követően a sejtszuspenziók 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, tripszin-EDTA oldatot használva referenciaként.

2.6. Respirációs aktivitás mérése

A fagocitáló sejtek a fagocitózis mellett peroxid- és szuperoxid anionok termelésével is képesek a patogén mikroorganizmusok elpusztítására, melynek során a sejtek oxigénfelvétele (respirációs aktivitása) jelentős mértékben növekszik. Az izolált fehérvérsejtek respirációs aktivitását a ferricitokrómc redukciója alapján határoztuk meg (Secombes, 1990). A sejt koncentráció beállítását után a sejteket 96 üregű mikrotiter-lemezekre osztottuk szét. Egy üreg 100 µl sejtszuspenziót tartalmazott. A mérést három párhuzamossal végeztük. A mintákhoz azonos mennyiségű, 2 µg/ml koncentrációjú ferricitokrómc oldatot adtunk, amely 1 µg/ml koncentrációban forbol-mirisztinsav-acetátot (phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA, Sigma) tartalmazott. A reakció specificitásának ellenőrzésére egy másik mintasorhoz olyan ferricitokrómc oldatot adtunk, amely a PMA-n kívül 300 U/ml koncentrációban szuperoxid-dizmutázt (SOD, Sigma) is tartalmazott. A mintákat sötétben, szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk, majd megmértük a fényelnyelésüket 550 nm hullámhosszon. A csak PMA-val kezelt minták fényelnyelés értékeiből kivontuk a PMA/SOD-dal kezelt minták értékeit, az eredményt megszoroztuk 15,87-dal, így megkaptuk a termelt szuperoxid-gyökök (O₂⁻) mennyiségét nanomólban.

2.7. Fertőzés *Aeromonas hydrophila* baktériummal

A kísérlet végén minden csoportból 30 db halat fertőztünk az *A. hydrophila* egy virulens törzsével (B2/12). A 4 °C-on, szilárd táptalajon tartott baktériumokat 10 ml TSB (Tryptic Soy Broth, Fluka) oltottuk, majd 28 °C-on egy napig inkubáltuk. A folyadék kultúrát lecentrifugáltuk, a kiülepedett baktériumokat felsuszpendáltuk 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 előzetes kísérletekkel határoztuk meg. A halak hasüregébe 0,1 ml baktériumszuspenziót oltottunk,

majd egy héten keresztül regisztráltuk az elhullást és kiszámoltuk a megmaradási értékeket.

2.8. Statisztikai elemzés

A respirációs aktivitás mérést három párhuzamossal végeztük, az adatok feldolgozása során ezek átlagával számoltunk. A fagocitáló aktivitás meghatározásánál minden mintát csak egyszer mértünk le. Csoportonként minden héten 5 mintát vettünk, ezek adataiból számtani átlagot számoltunk. Az egyes csoportok mérési eredményei közötti különbségeket egytényezős varianciaanalízissel, P<0,05 szignifikanciaszinten értékeltük, majd táblázatos formában ábrázoltuk. A fagocitáló- és respirációs aktivitás változását bemutató táblázatokban az adatok számtani átlagát és a standard hibát (Standard Error of Method, SEM) tüntettük fel.

Az adatok statisztikai kiértékeléséhez az SPSS., Inc. által kifejlesztett SigmaStat számítógépes programot használtuk.

3. EREDMÉNYEK

Az izolált fehérvérsejtek fagocitáló aktivitása a kísérlet teljes időtartama alatt mindhárom kezelt csoportban szignifikánsan magasabb volt, mint a kontroll csoportban. A legmagasabb értéket a harmadik héten mértük, a kétféle gyógynövény kombinációjával kezelt csoportban (1. táblázat).

A gyógynövénykivonatok nem voltak hatással a fehérvérsejtek respirációs aktivitására. A reaktív oxigénformák termelése a kezelt csoportokban nem mutatott statisztikailag szignifikáns különbséget a kontrollhoz képest (2. táblázat).

Az *A. hydrophila*-fertőzés után a legmagasabb mortalitást a kontroll csoport mutatta, amelyben a fertőzött halak 56,66%-a elpusztult. A *Lonicera*val kezelt csoportban a halak 43,33%-a, a *Ganoderma*val kezelt csoportban pedig 30%-a hullott el a fertőzést követően. A legalacsonyabb, 20%-os mortalitást a két gyógynövény kombinációjával kezelt csoportban figyeltük meg (3. táblázat).

1. táblázat

A tilápia fehérvérsejtek fagocitáló aktivitásának változása a kísérlet során (fényelnyelés 550 nm-en)

	1. hét(1)	2. hét(1)	3. hét(1)
Ganoderma(2)	1,033±0,119*	1,364±0,141*	1,381±0,037*
Lonicera(2)	1,112±0,031*	1,332±0,091*	1,291±0,091*
Ganoderma és Lonicera(2)	1,217±0,116*	1,115±0,097*	1,747±0,089*
Kontroll(3)	0,846±0,092	0,960±0,109	1,200±0,100

*szignifikáns növekedés a kontrollhoz képest(4)

Table 1: Changes in the phagocytic activity of isolated tilapia leukocytes (extinction at 550 nm)

weeks of experiment(1), treated groups(2), control(3), *significant increase compared to the control(4)

2. táblázat

A tilápia fehérvérsejtek respirációs aktivitásának változása a kísérlet során (nmol O₂ / 10⁵ fehérvérsejt)

	1. hét(1)	2. hét(1)	3. hét(1)
Ganoderma(2)	1,464±0,320	1,111±0,380	0,564±0,184
Lonicera(2)	1,325±0,397	1,899±0,800	1,364±0,383
Ganoderma és Lonicera(2)	2,521±0,698	1,848±0,498	1,673±0,565
Kontroll(3)	2,479±0,697	2,196±0,503	2,419±0,910

Table 2: Changes in the respiratory burst activity of the isolated tilapia leukocytes (nmol O₂ / 10⁵ leukocytes) weeks of experiment(1), treated groups(2), control(3)

3. táblázat

Elhullás *Aeromonas hydrophila* fertőzést követően (az elhullott halak aránya az összes fertőzött halhoz képest)

	1. nap(1)	2. nap(1)	3. nap(1)	4. nap(1)	5. nap(1)	6. nap(1)	7. nap(1)
Ganoderma(2)	6,66%	13,33%	13,33%	20,00%	30,00%	30,00%	30,00%
Lonicera(2)	20,00%	26,66%	33,33%	40,00%	43,33%	43,33%	43,33%
Ganoderma és Lonicera(2)	6,66%	6,66%	20,00%	20,00%	20,00%	20,00%	20,00%
Kontroll(3)	6,66%	26,66%	40,00%	56,66%	56,66%	56,66%	56,66%

Table 3: Cumulative mortality following *Aeromonas hydrophila* infection (in percents compared to all infected fish) days following infection(1), treated groups(2), control(3)

4. ÉRTÉKELÉS

Kísérletünkben két kínai gyógynövény, a *Ganoderma lucidum* és a *Lonicera japonica* hatását vizsgáltuk a nilusi tilápia természetes immunrendszerére. A *Ganoderma*t régóta alkalmazzák Kínában és a többi távol-keleti országban különféle humán betegségek megelőzésére és kezelésére (Lin, 2001). Bizonyított, hogy a *Ganoderma*ból készült vizes kivonat stimulálja az egér makrofágok fagocitáló aktivitását (Tang, 2000; Wang és mtsai, 2003), a limfociták osztódását és a citokin gének kifejeződését (Wang és mtsai, 1999). A *Lonicera*t elsősorban gyulladásgátlóként, légúti fertőzések és cukorbetegség kezelésére használják (Lee és mtsai, 1998), de megfelelő koncentrációban alkalmazva a *Lonicera* kivonat képes növelni a granulociták fagocitáló aktivitását is (Hu és mtsai, 1992).

A kísérlet során két celluláris (fehérvérsejtekre jellemző) immunológiai paramétert, a fagocitáló és a respirációs aktivitást mértük. A gyógynövénykivonatokkal kezelt halak fehérvérsejtjei a kísérlet teljes időtartama alatt szignifikáns mértékben megemelkedett fagocitáló aktivitást mutattak. Számos, immunstimulátorokkal végzett etetési kísérletben kaptak hasonló eredményt. Az élesztőből készült immunstimulátorok (MacroGard, Vitastim) (Siwicki és mtsai, 1994; Jeney és mtsai, 1997) és különböző növényi kivonatok (Dügener és mtsai, 2003) jelentős mértékben emelték a szívárványos pizstráng fehérvérsejtjeinek fagocitáló aktivitását. Négy különböző kínai gyógynövény (*Rheum officinale*, *Andrographis paniculata*, *Isatis indigotica*, *Lonicera japonica*) kivonata pedig az ezüstkárász (*Carassius auratus*) fehérvérsejtek fagocitáló aktivitására volt pozitív hatással (Chen és mtsai, 2003).

Az immunstimulátorok általában pozitív hatással vannak a másik, általunk vizsgált paraméterre, a respirációs aktivitásra is. Jeney és mtsai (1997) például kimutatták, hogy a glukánnal kiegészített haltáp hatására igen jelentős mértékben növekedett a szívárványos pizstráng fehérvérsejtjeinek respirációs aktivitása. A gyömbér (*Zingiber officinale*) kivonatának hasonló hatása volt (Dügener és mtsai, 2003). Kísérletünkben viszont nem tudunk szignifikáns mértékű emelkedést kimutatni egyik kezelt csoportban sem. Korábbi, szintén tilápiával végzett kísérletünkben az *Astragalus membranaceus* és a *Scutellaria baicalensis* gyógynövények kivonatait vizsgáltuk. Abban a kísérletben az *Astragalus* kivonatnak nem volt jelentős hatása a respirációs aktivitásra, a *Scutellaria* kivonatnak pedig kifejezetten gátló hatása volt (Yin és mtsai, 2006). Szívárványos pizstráanggal végzett kísérletben a csalán (*Urtica dioica*) és a fagyöngy (*Viscum album*) kivonataival kezelt halakban a respirációs aktivitás a kontroll csoportéhoz hasonló szinten maradt (Dügener és mtsai, 2003).

Az *A. hydrophila* fertőzés után mindhárom kezelt csoportban alacsonyabb mortalitást figyeltünk meg, mint a kontroll csoportban. Lehetséges, hogy ezt a természetes immunrendszer valamelyik alkotórészének hatékonyabb működése okozta. Több halfaj esetében is bizonyították, hogy az immunstimulátorok (például glukánok) hatására csökken a fertőzéseket követő elhullás (Anderson, 1992; Sakai, 1999). Például 1% kitozánt és 250 mg/kg levamizolt tartalmazó táppal etetett pontyok mortalitása a kontrollhoz képest jelentős mértékben csökkent *A. hydrophila* fertőzést követően.

Kísérleti eredményeink alapján mindkét vizsgált gyógynövény erősítette a tilápia nem-specifikus immunválaszát és *A. hydrophila* fertőzéssel szembeni ellenálló képességét, ezért használható immunstimulátornak bizonyult.

IRODALOM

- Anderson, D.P. (1992): Immunostimulants, adjuvants and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. *Ann. Rev. Fish. Dis.* 2. 287-307.
- 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.
- Boon, A.C.-Vos, A.P.-Graus, Y.M.-Rimmelzwaan, G.F.-Osterhaus, A.D. (2002): In vitro effect of bioactive compounds on influenza virus specific B- and T-cell responses. *Scandinavian Journal of Immunology* 55(1). 24-32.
- Cao, L.Z.-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.
- Chansue, N.-Ponpornpisit, A.-Endo, M.-Sakai, M.-Satoshi, Y. (2000): Improved immunity of tilapia, *Oreochromis niloticus*, by C-UP III, a herbal medicine. *Fish Pathology* 35. 89-90.
- Chen, X.-Wu, Z.-Yin, J.-Li, L. (2003): Effects of four species of herbs on immune function of *Carassius auratus gibelio*. *J. Fish. Sci. of China* 10. 36-40.
- Dey, R.K.-Chandra, S. (1995): Preliminary studies to raise disease resistant seed (fry) of Indian major carp *Catla catla* (Ham.) through herbal treatment of spawn. *Fish Chimes* 14. 23-25.
- Düğenci, S.K.-Arda, N.-Candan, A. (2003): Some medicinal plants as immunostimulant for fish. *Journal of Ethnopharmacology* 88. 99-106.
- Engstad, R.E.-Robertson, B. (1994): Specificity of β -glucan receptors on macrophages from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Developmental & Comparative Immunology* 18. 397-408.
- 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.
- 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.
- Hu, S.-Cai, W.-Ye, J.-Qian, Z.-Sun, Z. (1992): Influence of medicinal herbs on phagocytosis by bovine neutrophils. *Zentralbl. Veterinarmed., Reihe A* 39. 593-599.
- Jeney, G.-Galeotti, M.-Volpatti, D.-Jeney, Z.-Anderson, D.P. (1997): Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. *Aquaculture* 154. 1-15.
- Jian, J.-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.
- Koethe, S.M.-Nelson, K.E.-Becker, C.G. (1995): Activation of the classical pathway of complement by tobacco glycoprotein. *Journal of Immunology* 155(2). 826-835.
- Kumar, N.-Singh, B.-Bhandari, P.-Gupta, A.P.-Uniyal, S.K.-Kaul, V.K. (2005): Biflavonoids from *Lonicera japonica*. *Phytochemistry* 66. 2740-2744.
- 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-kappaB activation through reducing I-kappaB α degradation in rat liver. *Int. J. Mol. Med.* 2001. 7(1). 79-83.
- Lee, S.J.-Son, K.H.-Chang, H.W.-Kang, S.S.-Kim, H.P. (1998): Anti-inflammatory activity of *Lonicera japonica*. *Phytoh. Res.* 12. 445-447.
- Lin, Z.B. (2001). In: Lin, Z. B. (ed.): *Modern Research of Ganoderma*. Beijing Med. Univ. Press, Beijing, 284-309.
- Lin, Z.B.-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.-Michael, R.D. (2000): Immunostimulatory effect of azadirachtin in *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Indian Journal of Experimental Biology* 38. 1092-1096.
- 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.
- Miyazaki, T.-Yo, J. (1985): A histopathological study of motile Aeromonad disease in ayu, *Plecoglossis altivelis*. *Fish Pathology* 20. 55-60.
- Plumb, J.A. (1999): Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. Iowa State University Press, Ames, Iowa. 328.
- Rahman, M.H.-Kusuda, R.-Kawai, K. (1997): Virulence of starved *Aeromonas hydrophila* in cyprinid fish. *Fish Pathology* 32. 163-168.
- Sakai, M. (1999): Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 172. 63-92.
- Secombes, C.J. (1990): Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. In: J.S. Stolen-D.P. Anderson-B.S. Robertson-W.B. van Muiswinkel (eds.): *Techniques in Fish Immunology*. SOS Publications, Fair Haven. 137-154.
- Seeley, K.R.-Gillespie, P.D.-Weeks, B.A. (1990): A simple technique for the rapid spectrophotometric determination of phagocytosis by fish macrophages. *Marine Env. Res.* 30. 123-128.
- Shan, B.E.-Yoshida, Y.-Sugiura, T.-Yamashita, U. (1999): Stimulating activity of Chinese medicinal herbs on human lymphocytes *in vitro*. *International journal of Immunopharmacology* 21. 149-159.
- 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.
- Suh, S.-Chung, T.-Son, M.-Kim, S.-Moon, T.C.-Son, K.H.-Kim, H.P.-Chang, H.W.-Kim, C. (2005): The naturally occurring biflavonoid, ochnaflavone, inhibits LPS-induced iNOS expression, which is mediated by ERK 1/2 via NF- κ B regulation in RAW264.7 cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 447. 136-146.
- Tan, B.K.H.-Vanitha, J. (2004): Immunomodulatory and antimicrobial effect of some traditional Chinese medicinal herbs. *Current Medical Chemistry* 11. 1423-1430.
- Tang, X. (2000): Effect of aqueous extract of *Ganoderma lucidum* on the immune function of mice. *TCM Research* 13. 8-10.

- 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.
- Wang, K.-Wu, G.-Dai, S. (2003): Study on the immunological effect of the aqueous extract from Guangxi *Ganoderma lucidum* in the mice. *Journal of Guangxi Medical University Press*, 871-874.
- Wang, R.-Li, D.-Bourne, S. (1999): Can 2000 years of herbal medicine history help us to solve problems in the year 2000? *Biotechnoogy in the feed industry. Proceedings of Alltech's 14th Annual Symposium*, 273-291.
- Wu, H.-Luo, J.-Yin, Y.-Wei, Q. (2004): Effects of chlorogenic acid, an active compound activating calcineurin, purified from *Flos Lonicerae* on macrophage. *Acta Pharmacologica Sinica* 12. 1685-1689.
- Yin, G.-Jeney, G.-Rácz, T.-Xu, P.-Jun, 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. 39-47.