بررسی اثر لسیتین سویا بر برخی شاخص‌های ایمنی و بیوشیمی خون پیش مولدین ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*)

رضوانه جنابی حق‌پرست[۱]، کوروش سروی مغانلو[۲*]، محمود محسنی[۳]، احمد ایمانی[۴]

۱- دانشجوی دکتری تکثیر و پرورش آبزیان، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، پست الکترونیکی: rezvanehjenabi@yahoo.com

۲- دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، پست الکترونیکی: k.sarvimoghanlou@urmia.ac.ir

۳- دانشیار پژوهشی، مرکز تحقیقات ماهیان سرد آبی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تنکابن، پست الکترونیکی: mahmoudmohseni73@gmail.com

۴- دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، پست الکترونیکی: a.imani@urmia.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۲/۲۶ ** نویسنده مسوول* *تاریخ پذیرش: ۹۷/۴/۱۲*

چکیده

مطالعه حاضر با هدف ارزیابی اثر لسیتین سویا بر سطح برخی از پارامترهای ایمنی (لیزوزیم، کمپلمان و آنتی‌بادی تام سرم)، هماتولوژیک، سرولوژی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پیش‌مولدین ماهی آزاد دریای خزر انجام گرفت. بدین منظور تعداد ۹۰ قطعه ماهی (۱۰±۳۵۰گرم) به‌صورت تصادفی در سه تیمار (هر کدام با ۳ تکرار) تقسیم شدند. ماهیان گروه اول (شاهد) فقط با غذای پایه مرکز، گروه دوم غذای پایه به همراه ۱۲٪ روغن سویا، گروه سوم غذای پایه به‌علاوه ۶٪ روغن سویا و ۶٪ لسیتین به مدت ۹۰ روز تغذیه شدند. نتایج فراسنجه‌های ایمنی، فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون S ترانسفراز، سوپراکسید دیسموتاز به همراه برخی از شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون (LDL، HDL و کلسترول) به غیر از VLDL و تری‌گلیسیرید بیانگر برتری آماری تیمار ۲ و ۳ نسبت به تیمار شاهد بود (P≤۰/۰۵). VLDL نیز در تیمار ۱ بیشتر از تیمارهای ۲ و ۳ (تغذیه با روغن سویا و لسیتین) بود (P≤۰/۰۵). همچنین فاکتورهای خونی نظیر RBC، Hb و Hct در تیمار ۲، Hct و WBC در تیمار۳ با تیمار ۱ تفاوت معنی‌داری داشتند (P≤۰/۰۵) بنابراین استفاده از لسیتین به‌عنوان مکمل غذایی در سطح ۶٪ در جیره ماهی آزاد به دلیل اثرات مثبت آن و بهبود فراسنجه‌های فیزیولوژیک ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutt caspius*) توصیه می‌گردد.

کلمات کلیدی: *لسیتین، ایمنی، بیوشیمی خون، ماهی آزاد دریای خزر.*

۱. مقدمه

تولید موثر و بهینه و حفظ سلامتی حیوانات مستلزم تامین مواد مغذی ضروری از طریق جیره‌های غذایی به مقدار مناسب و قابل دسترس از نظر زیستی است (شیوازاد و صیداوی، ۱۳۸۳). تحقیقات نشان می‌دهد که ماهیان و سخت پوستان نمی‌توانند به میزان کافی فسفولیپید مورد نیاز خود را برای حداکثر رشد بسازند، از این‌رو می‌بایستی به جیره‌های آن‌ها افزوده شود (Poston, 1991). فسفولیپیدها یکی از اعضای خانواده چربی‌های مفید هستند و سازنده غلاف و لایه‌های چربی محافظ اطراف سلول‌های عصبی به‌شمار می‌روند. در واقع، از اوایل سال ۱۹۸۰ نتایج Kanazawa و همکاران (۱۹۸۱ و ۱۹۸۳) نشان داد که فسفولیپیدها

به‌طور قابل توجهی رشد و زنده‌مانی ماهی آیو (*Plecoglossus altivelis*) را بهبود می‌بخشد. فسفولیپیدها از طریق عملکرد در ساختار غشای سلولی (Tocher, 2003)، تامین کولین و فسفر، بهبود بلوغ سلول‌های روده‌ای (Gisbert et al., 2005; Cahu et al., 2003)، افزایش جذب اسیدهای چرب بلند زنجیره (Fontagne et al., 2000)، امولسیفایر بودن (Koven et al., 1993) و اثرگذاری بر هضم، جذب و انتقال چربی در سلول‌های روده‌ای از طریق شیلومیکرون‌ها منجر به افزایش رشد، زنده‌مانی، مقاومت به تنش محیطی و کاهش بدشکلی می‌شوند (Wold et al., 2007). لسیتین به عنوان یکی از منابع پایدار با قابلیت بالای زیستی فسفولیپید در سخت پوستان و ماهیان شناخته شده است و یک واژه کلی برای گروهی از چربی‌های زرد مایل به قهوه‌ای است که در بافت‌های گیاهی و جانوری وجود دارد (Thompson et al., 2003). تاثیر مثبت افزودن لسیتین در جیره غذایی ماهیانی نظیر ماهی آزاد اطلس (*Salmo salar*) و قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) توسط Poston (1991) و کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) توسط Fontagne و همکاران (۲۰۰۰) گزارش شده است. همچنین افزایش مقاومت به تنش در ماهی سیم دریایی در اثر افزودن لسیتین به جیره غذایی توسط Salhi و همکاران (۱۹۹۹) مشاهده گردید. لسیتین نقش تعاملی در جذب روده‌ای کلسترول دارد که رشد و بقای گونه‌های مختلف آبزیان را بهبود می‌بخشد (پورعلی فشتمی و همکاران، ۱۳۹۲). همچنین لسیتین از طریق تولید آنتی بادی‌ها و تحریک سیستم ایمنی (سلولی و همورال) باعث بهبود سیستم ایمنی موجود می‌شود. زیرا چربی‌های موجود در فسفولیپیدها باعث افزایش تولید لکوترین (LTB4 و LTB5) در سلول‌های کلیه آزاد ماهیان می‌شود. تحقیقات بسیار کمی در مورد میزان فعالیت آنزیم-های آنتی‌اکسیدانی در ماهیان تغذیه شده با فسفولیپید صورت گرفته است. برای مثال Bell و همکاران (۱۹۸۶) بیان داشتند که استفاده از فسفولیپید در ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کبد در مقایسه با تیمار شاهد می‌گردد. ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) از جمله ماهیان مهاجر رودکوچ دریای خزر بوده و یکی از ۹ زیرگونه قزل‌آلای قهوه‌ای جهان محسوب می‌شود. این ماهی از گونه‌های مهم اقتصادی و در معرض خطر انقراض دریای خزر است که اهمیت ویژه‌ای دارد و حفاظت و پرورش این ماهی از لحاظ کیفیت گوشت، ارزش اقتصادی و همچنین حفظ ذخیره ژنتیکی برای کشورمان ارزشمند است. مطالعات انجام شده نشان می‌دهند بازگشت شیلاتی این ماهی ۰/۴ درصد می‌باشد (سروی مغانلو و همکاران، ۱۳۹۱). از نکات مهم در پرورش این ماهی اعمال مدیریت صحیح تغذیه و تامین مواد مغذی ضروری برای بالا بردن میزان رشد، درصد بقاء و همچنین افزایش ایمنی است. بر این اساس چنین انتظار می‌رود که استفاده از لسیتین می‌تواند به عنوان راهکاری جهت افزایش ایمنی و مقاومت در برابر شرایط نامناسب و بهبود فراسنجه‌های فیزیولوژیک ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutt caspius*) مطرح باشد.

۲. مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در مرکز تحقیقات ماهیان سردابی تنکابن (استان مازندران) انجام گردید. جهت انجام این آزمایش ۳ تیمار مختلف غذایی در نظر گرفته شد که برای هر تیمار ۳۰ قطعه ماهی آزاد با وزن تقریبی ۱۰±۳۵۰ (SE± میانگین) گرم انتخاب شدند و در مخازن ۱۷۰۰ لیتری (که قبلاً با فرمالین ضد عفونی شده‌اند) توزیع گردیدند. مقدار غذای روزانه بر اساس دمای متوسط آب، وزن و تعداد ماهیان موجود در تانک‌های پرورشی بر اساس جدول غذادهی محاسبه گردید (Hardy, 2002). تیمارهای آزمایشی شامل تیمار ۱ (کنترل)، غذای معمول مورد استفاده برای تغذیه ماهی آزاد دریای خزر (حاوی پروتئین خام ۴۴ درصد، چربی ۱۶ درصد، کربوهیدرات ۱۰ درصد و فیبر خام ۲/۵ درصد)، تیمار ۲، غذای معمول به همراه ۱۲٪ روغن سویا و تیمار ۳ غذای معمول به همراه ۶٪ روغن سویا و ۶٪ لسیتین بود. برای تهیه جیره غذایی تیمارهای ۲ و ۳، پس از اضافه شدن روغن سویا، لسیتین و آب مقطر (دمای اتاق) خمیر حاصل توسط چرخ گوشت صنعتی به صورت رشته‌هایی درآمد. در نهایت رشته‌های حاصل، در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت خشک شدند و به شکل قطعات کوچکی درآمدند. تعداد دفعات غذادهی ۳ بار در روز بود و غذاهای تهیه شده در طول آزمایش در یخچال نگه‌داری شدند. کلیه مراحل ساخت غذا در مرکزتحقیقات ماهیان سردابی تنکابن انجام گردید. دبی آب ۰/۱ لیتر بر ثانیه، دما ۱۶-۱۲ درجه سانتی‌گراد و شوری صفر بود.

در پایان دوره پرورش به منظور سنجش شاخص‌های ایمنی (فعالیت لیزوزیم، فعالیت مسیر فرعی کمپلمان و آنتی‌بادی تام سرم)، پارامترهای بیوشیمیایی خون (LDL، HDL، VLDL، تری گلیسیرید و کلسترول)، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی (CAT،

SOD و GST) و شاخص‌های خون‌شناسی شامل تعداد گلبول‌های سفید و قرمز، هماتوکریت، هموگلوبین، میانگین حجم یک گلبول قرمز (MCV)، میانگین هموگلوبین یک گلبول قرمز (MCHC)، میانگین درصد غلظت هموگلوبین در یک گلبول قرمز (MCH)، نوتروفیل، لنفوسیت و مونوسیت، ۳ عدد ماهی به طور تصادفی از هر تیمار صید شدند. بدین منظور ۲۴ ساعت بعد از قطع غذا، ماهیان با پودر میخک بیهوش گردیدند. خونگیری از ورید ساقه دمی با استفاده از سرنگ هپارینه انجام گرفت. سپس برای تعیین پارامترهای هماتولوژیک، خون به درون میکروتیوب انتقال داده شد. تعداد گلبول‌های سفید و قرمز با استفاده از لام نئوبار بعد از رقیق‌سازی خون منعقد نشده با محلول ریس شمارش شدند و تعداد آن‌ها در یک میلی‌متر مکعب خون محاسبه گردیدند. هموگلوبین بر اساس روش Cyanmethemoglobin سنجیده شد. اندازه‌گیری لکوسیت‌ها (نوتروفیل، لنفوسیت و مونوسیت) با دو تکرار برای هر نمونه انجام شد (سیدحسنی و همکاران، ۱۳۹۵). درصد هماتوکریت با سانتریفیوژ میکروهماتوکریت اندازه‌گیری شد و برای محاسبه اندیس‌های خونی MCV، MCH وMCHC از روابط ۱ تا ۳ استفاده گردید (Dacie and Lewis, 1984).

رابطه ۱

MCV (fl) = (تعداد گلبول قرمز / مقدار هماتوکریت) × ۱۰ (میلیون در مترمکعب)

رابطه ۲

MCH (pg/cell) = (تعداد گلبول قرمز / مقدار هموگلوبین) × ۱۰ (میلیون در مترمکعب)

رابطه ۳

MCHC (g/dL) = (تعداد هماتوکریت / مقدار هموگلوبین) × ۱۰۰

سطوح VLDL، LDL، HDL، تری گلیسرید و کلسترول تام، با استفاده از کیت‌های تجاری بر اساس دستور شرکت سازنده (پارس آزمون، تهران) تعیین شدند. برای سنجش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی شامل کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون S ترانسفراز از بافت کبد استفاده شد. فعالیت اختصاصی آنزیم کاتالاز با استفاده از H2O2 به عنوان سوبسترا (Aebi, 1984)، فعالیت اختصاصی سوپراکسید دیسموتاز بر پایه توانایی آن در بازداری از احیای Nitroblue tetrazolium و به وسیله سوپراکسید (Winterbourn et al., 1975) و فعالیت اختصاصی آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز نیز از طریق تشکیل گلوتاتیون کلرو دی نیتروبنزن (CDNB) و به روش اسپکتوفتومتری در طول موج ۳۴۰ نانومتر تعیین شد (Habig and Jakoby, 1981). همچنین در مطالعات ایمنی شناختی، فعالیت لیزوزیم سرم بر اساس روش سیدحسنی و همکاران (۱۳۹۳) و بر مبنای لیز باکتری گرم مثبت حساس به آنزیم لیزوزیم یعنی *Micrococcus lysodeikticus* و فعالیت مسیر فرعی کمپلمان سرم نیز بر اساس همولیز گلبول‌های قرمز خرگوش (RaRBC) و با روش Amar و همکاران (۲۰۰۰) اندازه‌گیری شد. حجمی از سرم که سبب ۵۰ ٪ همولیز شود عبارت است از فعالیت کمپلمان نمونه و از رابطه ۴ برای محاسبه آن استفاده گردید.

رابطه ۴ $ACH50\ (U/ml) = k\times$ (فاکتور رقت) $\times$ ۰/۵

در این رابطه، k مقداری از سرم برحسب ml است که موجب ۵۰ ٪ همولیز می‌شود، ۰/۵ عدد ثابت است.

مقدار آنتی‌بادی کل سرم با روش Siwicki و همکاران (۱۹۹۴) اندازه‌گیری گردید. تفاوت بین مقدار پروتئین تام سرم با مقدار پروتئین مایع رویی پس از ترسیب آنتی‌بادی‌ها عبارت است از میزان آنتی‌بادی تام سرم که بر حسب mg/ml بیان‌می‌گردد. برای بررسی آماری داده‌ها، ابتدا نرمال بودن آن‌ها توسط آزمون Kolmogorov-Smirnov ارزیابی شدند و همگنی واریانس‌ها با آزمون Leven مورد بررسی قرار گرفت. در صورت برقراری شرایط فوق، جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه استفاده شد و اختلاف بین میانگین‌ها به وسیله آزمون توکی بررسی گردید. سطح معنی‌داری آماری در این بررسی $P<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم افزار SPSS، نسخه ۲۱ انجام گرفت. نتایج به‌صورت SE± میانگین ارایه شدند.

۳. نتایج و بحث

همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، شاخص‌های WBC و HCT (هماتوکریت) تیمار۳ (۶ ٪ سطح لسیتین و ۶ ٪ روغن سویا) تفاوت معنی‌داری با تیمارهای شاهد و تیمار ۲ (صفر درصد لسیتین) داشت ($P\leq۰/۰۵$، جدول ۱). همچنین شاخص‌های RBC، Hb و HCT در تیمار ۲ نیز تفاوت معنی‌داری

با تیمار شاهد و تیمار ۳ نشان داد (P≤۰/۰۵). در حالی‌که از نظر MCV، MCH، MCHC، نوتروفیل، لنفوسیت و مونوسیت تفاوت معنی‌داری میان گروه‌های آزمایشی مشاهده نگردید (P≥۰/۰۵، جدول ۱). همچنین بیشترین مقدار MCH، MCV و MCHC در تیمار شاهد مشاهده شد (جدول ۱).

جدول ۱: اثر جیره‌های غذایی مختلف آزمایشی بر شاخص‌های خون‌شناسی ماهی آزاد دریای خزر (SE± میانگین). ردیف‌های با حروف غیرمشابه دارای اختلاف معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).

شاخص	تیمار (کنترل)	تیمار ۲ (۰ درصد لسیتین)	تیمار۳ (۶ درصد لسیتین)
WBC (cell/mm3)	۵۹۶۶/۷±۵۰۳/۳^{a}	۶۵۳۳/۳±۶۶۵/۸۳^{a}	۹۲۳۳/۳ ±۱۵۳۷/۳^{b}
RBC (cell/mm3)	۱/۳×۱۰۶±۷/۵×۱۰۴^{a}	۱/۷×۱۰۶±۷/۶×۱۰۴^{b}	۱/۵×۱۰۶±۴/۰۴×۱۰۴^{a}
Hb(g/dl)	۱۰/۷±۰/۴^{a}	۱۳/۰۶±۰/۵^{b}	۱۱/۷۳±۰/۲۵^{a}
Hct (%)	۴۵/۶±۲/۰۸^{a}	۵۷±۴^{c}	۵۰/۷±۱/۵۲^{b}
MCV(FI)	۳۳۲/۳±۵/۱^{a}	۳۲۸/۷±۳/۸^{a}	۳۲۹/۳±۳/۵^{a}
MCH(pg)	۷۸±۱/۷^{a}	۷۵/۳±۰/۶^{a}	۷۶±۱^{a}
MCHC(g/dl)	۲۳/۹۷±۰/۷۶^{a}	۲۲/۹±۰/۳^{a}	۲۳/۱۷±۰/۳^{a}
نوتروفیل (٪)	۱۱/۳۳±۰/۵۸^{a}	۱۲/۶۷±۱/۱۵^{a}	۱۳±۲/۶۴^{a}
لنفوسیت (٪)	۸۴±۱/۷۳^{a}	۸۱/۳۳±۱/۱۵^{a}	۸۲/۶۷±۴/۱۷^{a}
مونوسیت (٪)	۴/۳±۱/۱۵^{a}	۵/۶۷±۰/۵۸^{a}	۴±۱/۷۳^{a}

نتایج این مطالعه با نتایج مطالعه Řehulka و Minarik (۲۰۰۳) که نشان داد استفاده از لسیتین در جیره باعث بهبود پارامترهای خونی نظیر هماتوکریت و غلظت هموگلوبین می‌شود، منطبق است. همچنین نجفی‌پور مقدم و همکاران (۱۳۹۰) اثر لسیتین جیره را بر شاخص‌های رشد و ویژگی‌های خونی بچه تاسماهی سیبری را مطالعه کردند. این محققین گزارش نمودند که با بکارگیری ۵ و ۷/۵٪ لسیتین در جیره، نتایج مربوط به شاخص‌های هماتولوژیک (هموگلوبین و هماتوکریت) به طور معنی‌داری بالاتر از تیمارهای کنترل و ۲/۵ ٪ لسیتین است که نشان از تاثیر مثبت استفاده از منابع فسفولیپیدی بر اریتروپویزیز دارد. سایر شاخص‌های خونی مانند تعداد گلبول‌های سفید و قرمز، MCV، MCHC و MCH علی‌رغم افزایش، تغییرات معنی‌داری در بین تیمارها نشان ندادند. در ماهیان نیز همانند سایر جانوران پارامترهای هماتولوژی و بیوشیمیایی خون نشانه‌ای از وضعیت فیزیولوژیک ماهی است و متغیرهایی مانند گونه ماهی، جنس، سن، چرخه بلوغ جنسی، شرایط سلامت بدن و تنش می‌توانند پارامترهای هماتولوژی را تغییر دهند. علاوه بر این مقادیر این شاخص‌ها تحت تاثیر نوع و سطح مواد غذایی مصرفی می‌توانند تغییر کنند. از طرفی دیگر سلول‌های قرمز خون یکی از محل‌های اصلی تولید رادیکال‌های آزاد هستند. این رادیکال‌های آزاد می‌توانند عامل اکسیداسیون اولیه در اسیدهای چرب غیر اشباع موجود در غشاء فسفولیپیدی باشند، که این وضعیت می‌تواند منجر به تغییر در کیفیت (از لحاظ اندازه و سالم بودن) و کمیت (از لحاظ تعداد) گلبول‌های قرمز خون گردد (نجفی‌پور مقدم و همکاران، ۱۳۹۰). نتایج پارامترهای بیوشیمی خون نشان داد (جدول ۲) که مقدار VLDL و تری‌گلیسیرید در تیمار شاهد بالاتر از تیمارهای تغذیه شده با تیمار ۲ و تیمار ۳ است و تفاوت معنی‌داری را نشان داد (P≤۰/۰۵). همچنین شاخص‌های LDL، HDL و کلسترول، تیمارهای ۲ و ۳ نسبت به تیمار شاهد بالاتر بود (P≤۰/۰۵). مطالعات نشان داده است که حضور لسیتین در جیره غذایی می‌تواند موجب بهبود جذب و انتقال چربی‌ها از سلول‌های روده به جریان خون و سرانجام بافت‌ها به ویژه کبد گردد. همچنین افزایش سطح کلسترول و HDL نشان‌دهنده انتقال داخلی چربی‌ها در پاسخ به جیره غذایی حاوی فسفولیپید است (Fontagne et al., 1998;). همچنین در مطالعه یزدانی ساداتی و همکاران (۱۳۹۳) مشخص شد که با افزایش سطح کولین (۰، ۲، ۴ و ۸ گرم در کیلوگرم) جیره غذایی، چربی پلاسما و کبد، کلسترول، تری گلیسیرید و فسفولیپید افزایش می‌یابند. سطوح پایین چربی پلاسما گویای وجود نقص در ساخت لیپوپروتئین‌ها در کبد و جلوگیری از رها شدن تری آسیل گلیسرول کبدی به جریان خون هستند (Hung, 1998). مشابه نتایج تحقیق حاضر، در ماهی کوبیا (*Rachycentron canadum*) تغذیه شده با جیره‌های غذایی حاوی سطوح مختلف فسفولیپید، سطح VLDL و تری گلیسیرید کاهش یافته و سطح HDL، LDL و کلسترول پلاسما افزایش می‌یابند. چنین تغییری به دلیل ارتباط میان VLDL و HDL محتمل است، زیرا وجود فسفولیپید به عنوان کوفاکتور آنزیم Lecithin-cholesterolacltransferase (LCAT) می‌باشد که در ساخت HDL دخیل است. بنابراین میزان HDL پلاسما در پاسخ به افزودن لسیتین به جیره غذایی افزایش می‌یابد (Niu et al., 2008).

جدول ۲: اثر جیره‌های غذایی مختلف برشاخص‌های بیوشیمیایی خون ماهی آزاد دریای خزر (SE± میانگین). ردیف‌های با حروف غیرمشابه دارای اختلاف معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).

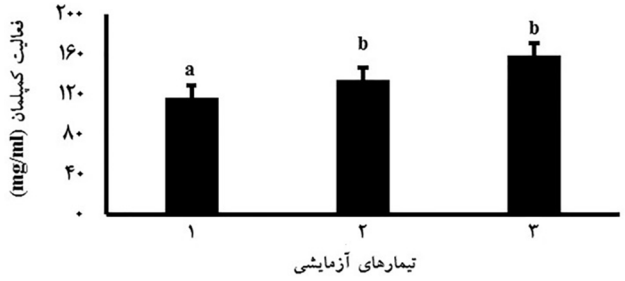
شاخص	تیمار ۱ (کنترل)	تیمار ۲ (۰ درصد لسیتین)	تیمار ۳ (۶ درصد لسیتین)
VLDL	۶۸/۳۳±۴/۰۴^{b}	۴۲/۷±۶/۴^{a}	۳۶±۲/۶^{a}
LDL	۳۴±۶/۵^{a}	۱۱۸±۲۲/۵^{b}	۸۵±۱۳^{b}
HDL	۷۸/۳±۱۳/۵^{a}	۱۸۶/۶۷±۵/۷^{b}	۱۹۴±۷/۵^{b}
Triglycerides	۳۴۲±۱۸/۷^{b}	۲۱۴/۶۷±۳۲/۷^{a}	۱۷۹/۳±۱۰/۳^{a}

Cholesterol	۱۹۰/۷±۲۲/۰۵^{a}	۳۹۴/۷±۲۰/۲^{b}	۳۴۹/۷±۴۳/۴^{b}

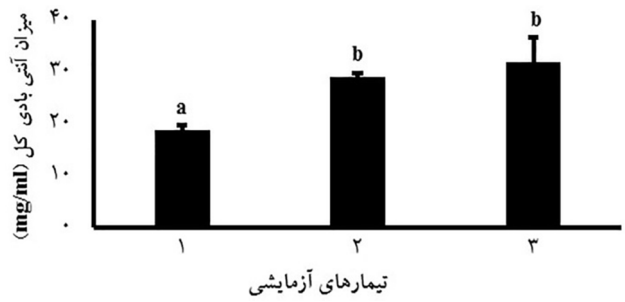
از سوی دیگر بهبود جذب چربی‌ها و تشکیل شیلومیکرون‌ها در انتروسیت‌ها، سبب افزایش انتقال کلسترول و تری گلیسیریدها به کبد می‌شوند. همچنین LDL ناقل اصلی کلسترول از کبد به بافت‌های مهمی نظیر بافت چربی و آدرنال است. بقایای LDL پس از جذب کلسترول و تری گلیسیرید آن توسط بافت‌های مذکور، توسط بافت کبد از جریان خون پاکسازی می‌شوند. اما از آنجایی‌که سرعت جذب LDL توسط سلول‌های کبدی پایین است، مکانیسم تکمیلی (ساخت HDL) برای بازگرداندن کلسترول اضافی به کبد، لازم است. با این حال متابولیسم لیپوپروتئین‌ها در بدن پیچیده بوده و اطلاعات کافی در این زمینه وجود ندارد (Constantinou et al., 2016).

در خصوص شاخص‌های ایمنی، فاکتورهای فعالیت مسیر فرعی کمپلمان سرم (۱۵/۱۳±۱۵۸)، آنتی بادی کل (۴/۶±۳۱/۸۳) و فعالیت لیزوزیم سرم (۱۵/۷۱±۷۴) در تیمار ۳ تفاوت معنی‌داری با شاهد داشت (P≤۰/۰۵) و مقدار آن از بقیه تیمارها بالاتر بود. همچنین تیمار ۲ نیز با شاهد دارای اختلاف معنی‌دار بود (شکل‌های ۲،۱ و۳). اما بین تیمارهای ۲ و ۳ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (P≥۰/۰۵). مطالعات انجام شده حاکی از آن است که در ماهیانی که به جیره آن‌ها فسفولیپید اضافه شده است، سیستم ایمنی با توجه به تنظیم لوکوترین B (LTB4) افزایش یافته است (Bell et al., 1986). در تحقیقی که Sink و Lochmann (۲۰۱۴) روی ماهیان جوان *Ictalurus punctatus* انجام دادند، نشان داد که وجود سطوح صفر ٪، ۲٪ و ۴٪ از مکمل لسیتین در ترکیب رژیم‌های غذایی، اثر محدودی بر ترکیب بدن و سیستم ایمنی ذاتی داشته و تاثیر معنی‌داری بر شاخص‌های ایمنی سرم خون ندارند.

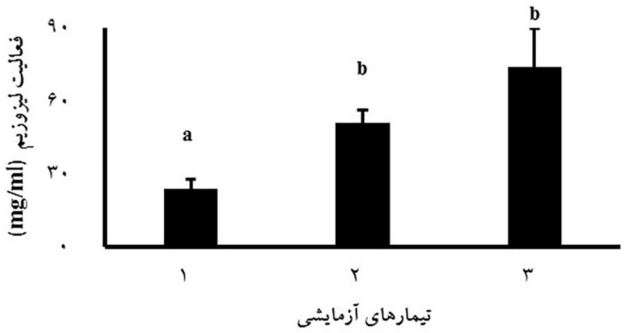
در کل لکوترین LTB4 یک تنظیم کننده ایمنی بسیار قوی است که می‌تواند باعث افزایش غلظت کلسیم درون سلولی در فاگوسیت‌ها شده و باعث افزایش تکثیر لنفوسیت‌ها گردد. تحقیقات نشان‌داده است که LTB4 باعث فعال شدن مارکر CD23 سطح سلول‌های B در حال استراحت (غیر فعال) شده و موجب افزایش تکثیر سلول‌های B بینابینی و همچنین باعث افزایش تولید ایمونوگلوبولین از سلول‌های B تمایز یافته می‌گردد (Bell et al., 1986). مشابه سایر مطالعات، در تحقیق حاضر نیز استفاده از ۶٪ لسیتین سویا سبب بهبود و تغییرات معنی‌داری فعالیت کمپلمان، لیزوزیم سرم و آنتی بادی کل گردید.



شکل ۱: فعالیت مسیر فرعی کمپلمان سرم ماهی آزاد دریای خزر در پایان دوره پرورش. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).



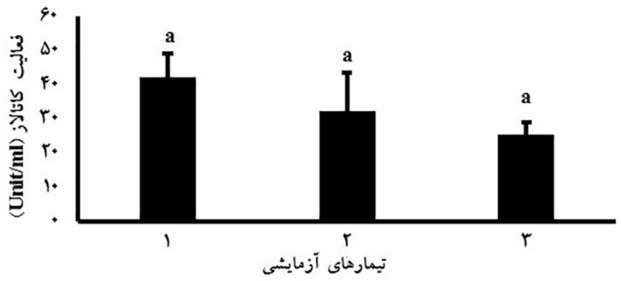
شکل ۲: میزان آنتی بادی کل سرم ماهی آزاد دریای خزر در پایان دوره پرورش. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).



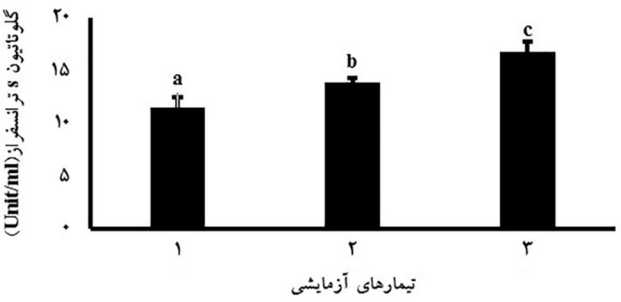
شکل ۳: فعالیت لیزوزیم سرم ماهی آزاد دریای خزر در انتهای دوره پرورش. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).

میزان فعالیت کاتالاز تیمار شاهد (۴۲±۷) با تیمار ۲ (۱۱/۰۱±۳۲) و ۳ (۳/۵۱±۲۵/۳۳) تفاوت معنی‌داری نشان نداد و میزان آن بیشتر بود (P≥۰/۰۵، شکل ۴). میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون S ترانسفراز در تیمارهای ۲ (۰/۴±۱۳/۸۶) و ۳ (۱/۰۱±۱۶/۷۱) دارای تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد (۱±۱۱/۴۶) بود (P≤۰/۰۵، شکل ۵). همچنین تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای ۲ و ۳ نیز وجود داشت (P≤۰/۰۵)، به نحوی که میزان آن در سطح لسیتین ۶٪ در تیمار ۳ نسبت به تیمارهای ۱ و

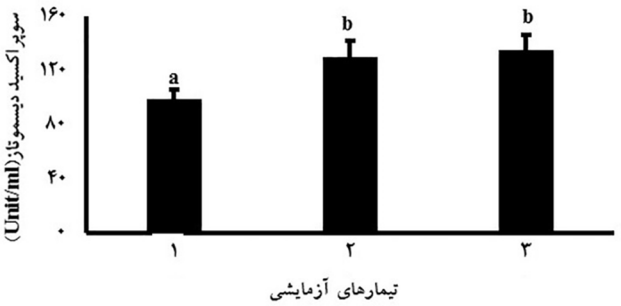
۲ بیشتر بود. همچنین در میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای ۲ (۱۲/۵±۱۲۹/۶۶) و ۳ (۱۱/۰۶±۱۳۴/۶۶) نسبت به تیمار شاهد (۶/۴۲±۹۹/۳۳)وجود داشت که مقدار آن در تیمار ۳، از همه تیمارها بالاتر بود (P≤۰/۰۵، شکل ۶).



شکل ۴: فعالیت کاتالاز سرم ماهی آزاد دریای خزر در پایان دوره پرورش. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).



شکل ۵: فعالیت گلوتاتیون s ترانسفراز ماهی آزاد دریای خزر در پایان دوره پرورش. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).



شکل ۶: میزان سوپراکسید دیسموتاز ماهی آزاد دریای خزر در پایان دوره پرورش. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی دار هستند (P<۰/۰۵).

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بافت کبد، اولین خط دفاعی موجودات از جمله آبزیان در برابر رادیکال‌های آزاد بوده و ارزیابی آن‌ها می‌تواند در بررسی وضعیت سیستم ایمنی آن‌ها بکار برده شوند. سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی یک موجود هوازی می‌تواند مانع تولید رادیکال‌های آزاد یا خنثی‌سازی آن‌ها و ترمیم آسیب‌های حاصل گردد (Diaz et al., 2010). همچنین آبزیان قادر به ساخت بیشتر این مولکول‌های زیستی در پاسخ به شرایط فیزیولوژیک جهت حفاظت خود در برابر رادیکال‌های آزاد ناشی از افزایش سوخت و ساز خود هستند (Huang et al., 2010). اما میزان افزایش سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون S ترانسفراز اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد داشت. Li و همکاران (۲۰۱۵) تاثیر استفاده از لسیتین سویا سطح ۶٪ در ماهی *Megalobrama amblycephala* را بر بیان ژن‌های آنتی اکسیدانی نظیر کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون بررسی کردند، که باعث افزایش فعالیت آن‌ها در کبد در مقایسه با تیمار شاهد شد که منطبق با نتایج مطالعه حاضر است. همچنین Bell و همکاران (۱۹۸۶) بیان داشتند که استفاده از فسفولیپید در ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کبد در مقایسه با تیمار شاهد می‌گردد.

۴. نتیجه‌گیری

به طورکلی می‌توان نتیجه گرفت که اضافه شدن ۶٪ لسیتین به جیره غذایی ماهی آزاد دریای خزر دارای اثرات مثبتی بر پارامترهای فیزیولوژیک نظیر ایمنی، خونی و آنتی‌اکسیدانی برخوردار است. البته جهت بهینه سازی جیره غذایی این گونه ارزشمند از لحاظ منابع مختلف فسفولیپیدی مطالعات بیشتری در آینده توصیه می‌گردد.

۵. سپاسگزاری

نویسندگان مقاله برخود لازم می‌دانند از حمایت‌های مالی دانشگاه ارومیه و همکاری مرکز تحقیقات ماهیان سردابی تنکابن تشکر و قدردانی به‌عمل آورند.

منابع

پورعلی فشتمی، ح.ر.؛ سهیل نقشی، س.؛ یزدانی، م.ع.؛ پژند، ذ.؛ پیکران مانا، ن.، ۱۳۹۲. بررسی اثر لیستین سویا بر شاخص‌های رشد، درصد بازماندگی و ترکیب شیمیایی لاشه بچه تاس‌ماهیان ایرانی (*Acipenser persicus*). مجله توسعه آبزی پروری، دوره هفتم،

شماره اول، صفحات ۲۲-۹.

سروی مغانلو، ک.؛ کلباسی، م.ر.؛ باقر مجازی، ا.، ۱۳۹۱. روند تغییرات فصلی برخی شاخص های فیزیولوژیک بچه ماهیان آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) در آب شیرین و لب شور. نشریه شیلات، دوره ۶۵، شماره ۳: ۳۰۵-۲۹۵.

سیدحسنی، م.ح.؛ یزدانی ساداتی، م.ع.؛ یگانه، ه.؛ پورغلام، م.؛ حسین پور، ع.، ۱۳۹۵. تاثیر سطوح مختلف مخمر *Saccharomyces cerevisiae* بر شاخص‌های رشد و پاره ای از شاخص‌های خونی و ایمنی تاسماهی سیبری. نشریه اقیانوس‌شناسی، دوره ۷، صفحات ۸۹ -۱۰۰

سیدحسنی، م.ح.؛ طالبی حقیقی، د.؛ یزدانی ساداتی، م.ع.؛ پورعلی، ح.؛ یگانه، ه.، ۱۳۹۳. تاثیر جایگزینی پودر ضایعات مرغ بجای پودر ماهی بر روند رشد، سامانه‌ی ایمنی، شاخص‌های خونی و آنزیم‌های کبدی فیل‌ماهی (*Huso huso*) انگشت قد. نشریه اقیانوس‌شناسی، دوره ۵، شماره ۱۸: ۵۱-۳۹.

شیوازاد، م.؛ صیداوی، ع.، ۱۳۸۳. زیست فراهمی مواد مغذی در حیوانات: اسیدهای آمینه، مواد معدنی و ویتامین‌ها. چاپ اول، انتشارات دانشگاه تهران، ۵۶۸ صفحه.

نجفی‌پور مقدم، ا.؛ فلاحتکار. ب.؛ کلباسی، م.، ۱۳۹۰. اثر لسیتین جیره بر شاخص‌های رشد و ویژگی‌های خونی بچه تاس ماهی سیبری (*Acipenser baeri*, Brant 1969). مجله علمی شیلات ایران، دوره ۲۰، شماره سوم، صفحات ۱۵۴-۱۴۳.

یزدانی ساداتی، م. ع.؛ سیدحسنی، م. ح.؛ بهمنی، م.؛ محسنی، م.؛ شکوریان، م.؛ پورعلی، ح. ر.؛ پوراسدی، م.، ۱۳۹۳. تاثیر سطوح مختلف کولین بر روند رشد، شاخص‌های بیوشیمیایی خون و ترکیب لاشه تاس ماهی سیبری جوان (*Acipenser baerii*). مجله علوم و فنون شیلات، دوره ۳، شماره اول، صفحات ۷۹-۶۹.

Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. Methods in Enzymology, 105: 121-126.

Amar, E.C.; Kiron, V.; Satoh, S.; Watanabe, T., 2000. Effects of dietary B-carotene on the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fisheries Science, 66: 1068-1075.

Bell, J.G.; Adron, J.W.; Cowey, C.B., 1986. Effect of selenium deficiency on hydroperoxide stimulated release of glutathione from isolated perfused liver of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). British Journal of Nutrition, 5(5): 421-428.

Cahu, C.L.; Infante, J.L.Z.; Barbosa, V., 2003. Effect of dietary phospholipid level and phospholipid: neutral lipid value on the development of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed a compound diet. British Journal of Nutrition, 90: 21-28.

Constantinou, C.; Karavia, E.A.; Xepapadaki, E.; Petropoulou, P.I.; Papakosta, E.; Karavyraki, M.; Zvintzou, E.; Theodoropoulos, V.; Filou, S.; Hatziri, A.; Kalogevopoulou, C.; Panyiotakoulos, G.; Kypreos, K.E., 2016. Advances in high density lipoprotein physiology: Surprises, overturns and promises. American Journal of Physiology, Edocrinology and Metabolism, 310: E1-E14.

Dacie, J.V.; Lewis, S.M., 1984. Practical haematology. Edinburgh: Churchill Livingstone, London, UK. 453p.

Diaz, M.E.; Furne, M.; Trenzado, C.E.; Garcia Gallego, M.; Domezain, A.; Sanz, A., 2010. Antioxidant defences in the first life phases of the sturgeon *Acipenser naccarii*. Aquaculture, 307: 123-129.

Fontagne, S.; Gurden, I.; Escsffre, A.; Bergot, P., 1998. Histological changes induced by dietary phospholipids in intestine and liver of common carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. Aquaculture, 161: 213-223.

Fontagne, S.; Burtaire, L.; Corraze, G.; Bergot, P., 2000. Effects of medium change chain triacylglycerols (tricaprylin and tricaproin) and phospholipid supply on survival, growth and lipid metabolism in common carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. Aquaculture, 190: 289-303.

Gisbert, E.; Villeneuve, L.; Infante, J.L.Z.; Quazuguel, P.; Cahu, C.L., 2005. Dietary phospholipids are more efficient than neutral lipids for long-chain polyunsaturated fatty acid supply in European sea bass *Dicentrarchus labrax* larval development. Lipids, 40: 1-11.

Habig, W.T.; Jakoby, W.B., 1981. Glutathion S-

survival, plasma lipids and enzymes of lipid metabolism. Fish Physiology and Biochemistry, 34: 9-17.

Poston, H.A., 1991. Response of Atlantic salmon fry to feed-grade lecithin and choline. Progressive Fish-Culturist, 53: 224-228.

Řehulka, J.; Minarik, B., 2003. Effect of lecithin on the hematological and condition indices of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquaculture Research, 34: 617-627.

Salhi, M.; Hernandez-Cruz, C.M.; Bessonart, M.; Izquierdo, M.S.; Fernandez-Palacios, H., 1999. Effect of different dietary polar lipid levels and different n-3 HUFA content in polar lipids on gut and liver histological structure of gilthead seabream (*Sparus aurata*). Aquaculture, 179: 253-263.

Sink, T.D.; Lochmann, R.T., 2014. The effects of soybean lecithin supplementation to a practical diet formulation on juvenile channel catfish (*Ictalurus punctatus*): Growth, survival, hematology, innate immune activity, and lipid biochemistry. Journal of the World Aquaculture Society, 45: 163-172.

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.

Tocher, D.R., 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. Reviews in Fisheries Science, 11: 107-184.

Thompson, K.R.; Muzinic, L.A.; Christian, T.D., Webster, C.D., Manomaitis, L., Rouse, D.B., 2003. Lecithin requirements of juvenile Australian red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. Aquaculture Nutrition, 9: 223-230.

Winterbourn, C.; Hawkins, R.; Brian, M.; Carrell, R., 1975. The estimation of red cell superoxide dismutase Transferas (rat and human). Methods Enzymology, 77: 218-231.

Hardy, R.W., 2002. Nutrient requirement and feeding of fish for aquaculture, CABI Publishing, Walling ford, Oxon, United Kingdom, 184-202.

Huang, W.; Cao, L.; Liu, J.; Lin, L.; Dou, S., 2010. Short-term mercury exposure affecting the development and antioxidant biomarkers of Japanese flounder embryos and larvae. Ecotoxicology and Environmental Safety, 73: 1875-1883.

Hung, S.O.S., 1998. Choline requirement of hatchery-produced juvenile white sturgeon *Acipenser transmontanus*. Aquaculture, 78: 183-194.

Kanazawa, A.; Teshim, S.; Inamori, S.; Iwashita, T.; Nagao, A., 1981. Effects of phospholipids on growth, survival rate and incidence of malformation in the larval ayu. Memory of Faculty of Fisheries, Kagoshima University, 30: 301-309.

Kanazawa, A.; Teshima, S.; Kobayashi, T.; Takae, M.; Iwhashita, T.; Uehara, R., 1983. Necessity of phospholipids for growth of the larval ayu. Memory of Faculty of Fisheries, Kagoshima University, 32: 115-120.

Koven, W.M.; Kolkovski, S.; Tandler, A.; Kissil, G.W.; Sklan, D., 1993. The effect of dietary lecithin and lipase, as function of age, on n-9 fatty acid incorporation in the tissue lipids of *Sparus aurata* larvae. Fish Physiology and Biochemistry, 10: 357-364.

Li, Y.; Gao, J.; Huang, S., 2015. Effects of different dietary phospholipid levels on growth performance, fatty acid composition, PPAR gene expressions and antioxidant responses of blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* fingerlings. Fish Physiology and Biochemistry, 41: 423-436.

Niu, J.; Liu Y.J.; Tian, L.X.; Mai, K.S.; Yang, H.J.; Ye, C.X.; Zhu, Y., 2008. Effects of dietary phospholipid level in cobia (*Rachycentron canadum*) larvae: growth,

activity. The Journal of laboratory and Clinical Medicine, 85: 337-341.

Wold, P.A.; Hoehne-Reitan, K.; Cahu, C.L.; Infante, J.L.Z.; Rainuzzo, J.; Kjorsvik, E., 2007. Phospholipids vs. neutral lipids: Effects on digestive enzymes in Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. Aquaculture, 272: 502-513.