



## اثر لسیتین و اسید لینولئیک مزدوج (CLA) جیره غذایی بر برخی شاخص‌های ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

دریا فاتحی<sup>۱</sup>، کوروش سروی مغالو<sup>۲\*</sup>، ناصر آق<sup>۳</sup>، سید میثم ابطحی<sup>۴</sup>، احمد ایمانی<sup>۲</sup>

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۹۷

تاریخ پذیرش: تیر ۹۷

### چکیده

مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر افزودن اسید لینولئیک مزدوج (CLA) به جیره غذایی در سطوح مختلف لسیتین جیره غذایی بر برخی شاخص‌های ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان صورت گرفت. تعداد ۶۰۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی  $10 \pm 100$  گرم در ۱۰ تیمار آزمایشی به صورت کاملاً تصادفی تقسیم و به مدت ۷۰ روز با جیره غذایی مختلف پرورش یافتند. تیمارهای آزمایشی، تلفیقی از سطوح مختلف لسیتین (۲، ۳ و ۴ درصد) و CLA (۱، ۲ و ۳ درصد) شامل ۹ گروه آزمایشی و یک گروه شاهد (بدون افزودن مقادیر اضافی لسیتین و CLA) بود. در پایان دوره، شاخص‌های ایمنی شامل فعالیت لیزوزیم، مسیر فرعی کمپلمان، آنتی‌بادی کل سرم، تکثیر لنفوسیت و قدرت بیگانه‌خواری سلول‌های نوتروفیل (آزمایش برداشت NR) مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت لیزوزیم، مسیر فرعی کمپلمان و آنتی‌بادی کل سرم در سطح ۴ درصد لسیتین، تحت تاثیر سطوح مختلف CLA جیره غذایی قرار گرفتند و بیشترین میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم در سطح ۱ و مسیر فرعی کمپلمان و آنتی‌بادی کل در سطح ۲ درصد CLA مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). شاخص تکثیر لنفوسیت در ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی حاوی حداقل ۳ درصد لسیتین و ۲ درصد CLA بیشترین مقدار بود ( $P < 0.05$ ) و شاخص فاگوسیتوز در تیمار تغذیه شده با جیره غذایی دارای حداقل ۲ درصد لسیتین و ۱ درصد CLA بیشترین مقدار بود ( $P < 0.05$ ). در کل، افزودن حداقل ۱ درصد CLA به همراه ۳ درصد لسیتین به عنوان مکمل غذایی، می‌تواند سبب بهبود شاخص‌های ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان شود.

### واژگان کلیدی: فسفولیپید، ایمنی ذاتی، چربی، آزاد ماهیان.

- ۱- کارشناس ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
- ۲- دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
- ۳- دانشیار پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
- ۴- دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

\* نویسنده مسئول: [k.sarvimoghanlou@urmia.ac.ir](mailto:k.sarvimoghanlou@urmia.ac.ir)

## مقدمه

(20:4n-6) و ایکوزانویک اسید (3-20:5n) پیش‌ساز تشکیل ایکوزانویدها هستند که در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی از جمله لخته‌شدن خون، تنظیم ضربان قلب، واکنش ایمنی و آماسی، تولیدمثل، عملکرد کلیه و اعصاب نقش دارند و منجر به افزایش مقاومت ماهیان از طریق فرآیندهای مختلف فیزیولوژیک می‌شوند.

چربی‌های جیره غذایی همچنین به عنوان منابع تامین کننده فسفاتیدیل سرین، فسفاتیدیل اینوزیتول، فسفاتیدیل کولین و فسفاتیدیل اتانول‌آمین به شمار روند (Tocher et al., 2008). فسفاتیدیل کولین موجب تغییر در عملکرد سلول‌های ایمنی به ویژه تعامل میان لنفوسیت‌ها و ماکروفاژها می‌شود (Makol et al., 2009).

لسیتین از جمله منابع حاوی فسفولیپید است که طی فرآیند تصفیه روغن از منابع مختلفی مانند روغن سویا، آفتاب‌گردان، کانولا، شلغم روغنی و تخم‌مرغ تهیه می‌شود. لسیتین سویا و تخم‌مرغ فراوان‌ترین منابع فسفولیپیدهای مصرفی هستند. البته از نظر محتوای فسفولیپیدی و ترکیبات اسیده‌ای چرب با یکدیگر تفاوت دارند (Kanazawa et

آبزی‌پروری یکی از راه‌های تامین نیاز پروتئینی جمعیت رو به رشد انسانی است (Lee and Donaldson, 2001). تضعیف سیستم ایمنی به ویژه در سیستم‌های متراکم پرورش آبزیان و افزایش حساسیت و تلفات در مواجهه با شرایط نامساعد محیطی و عوامل بیماری‌زای فرصت‌طلب یکی از چالش‌های صنعت پرورش متراکم آبزیان به شمار می‌رود. استفاده از ترکیبات نوینی که بتواند سیستم ایمنی آبزیان را بهبود بخشد، می‌تواند در این ارتباط بسیار کارگشا باشد. یکی از این ترکیبات چربی‌ها هستند که در جذب مواد مغذی، تامین انرژی، رشد و تکثیر سلول‌ها، تشکیل غشای سلولی، ایمنی، تامین اسیده‌ای چرب ضروری برای ساخت ترکیبات شبه هورمونی مانند پروستاگلاندین‌ها و لکوترین‌ها ایفای نقش می‌کنند. ترکیبات اخیر خود دارای نقش تنظیمی از جمله ایمنی و واکنش‌های التهابی هستند، همچنین به عنوان حلال ویتامین‌های محلول در چربی، نقش دارند (Bell et al., 2003; Opsahl-Ferstad et al., 2003).

Tocher و همکاران در سال ۲۰۰۸ بیان داشتند فسفولیپیدهای حاوی اسید چرب ۲۰ کربنه (HUFA) خصوصا آراشیدونیک اسید

آنتی اکسیدانی، ذخیره چربی و بیان ژن مربوطه بر ماهی (*Larimichthys crocea*) پرداخته بودند، به این نتیجه رسیدند که با افزایش سطح CLA جیره غذایی نرخ رونویسی ژن های مربوط به التهاب (سیکلواکسیژناز-۲ و اینترلوکین بتا) در کلیه و کبد کاهش می یابد.

علاوه بر این برخی مطالعات روی ماهیان دریایی وجود اثرات هم افزایی فسفولیپیدها را در متابولیسم چربی ها نشان داده اند. با توجه به نقش های مهم ذکر شده برای اسید چرب CLA به ویژه نقش آن در تقویت سیستم ایمنی و خاصیت آنتی اکسیدانی و برهم کنش میان این ترکیب و اجزای فسفولیپیدی جیره های غذایی، انجام مطالعات در این زمینه می تواند در تنظیم جیره های متناسب با شرایط جدید پرورش آبزیان موثر باشد.

از آنجا که در منابع علمی اطلاعاتی مبنی بر بررسی همزمان اثر لسیتین و اسید لینولئیک مزدوج برای تقویت سیستم ایمنی ماهی قزل آلای رنگین کمان در دست نیست، مطالعه حاضر با هدف بررسی چنین برهم کنش احتمالی برای بهبود سیستم ایمنی ماهی قزل آلای رنگین کمان به عنوان مهم ترین گونه سردابی پرورشی در کشور طرح ریزی و اجرا شد.

al., 1985). لسیتین سویا ترکیبی از تری گلیسرید و گلیکولیپیدها هستند و شامل مجموعه ای از PC (فسفوتیدیل کولین و فسفاتیدیل اینوزیتول) است که بیشترین اثر مثبت را در ماهی نشان می دهد (Coutteau et al., 1997).

در میان ترکیبات متعلق به چربی ها که امروزه بسیار مورد توجه قرار گرفته است می توان به اسید لینولئیک مزدوج (Conjugated Linoleic Acid: CLA) اشاره داشت که به گروهی از همپاره های (Isomer) وضعیتی و هندسی اسید لینولئیک (18:2 n-6) اطلاق می شود که در منابع حیوانی وجود دارند (Ip et al., 1994). محتوای اسید لینولئیک مزدوج در غذاها برحسب نوع تغذیه جانور، نژاد و دوره زندگی آن متفاوت است، اما معمولا دامنه آن ۳ تا ۷ میلی گرم به ازای هر گرم چربی است. اثرات مثبت اسید لینولئیک مزدوج (CLA) بر عملکرد رشد، ایمنی غیراختصاصی، ظرفیت آنتی اکسیدانی ماهی هایی که با روغن سویا تغذیه شده بودند، گزارش شده است (Belury, 2002).

Zuo و همکاران (۲۰۱۳) که به مطالعه اثر CLA بر رشد، ایمنی غیراختصاصی، ظرفیت

## مواد و روش‌ها

## تهیه و نگهداری ماهیان

در پژوهش حاضر تعداد ۶۰۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با میانگین وزنی  $10 \pm 100$  گرم از مرکز پرورش ماهی قزل‌آلای عزیزی واقع در استان آذربایجان غربی تهیه و به پژوهشکده آرتمیا و آبی‌پروری دانشگاه ارومیه منتقل شد و سپس به طور تصادفی در ۳۰ مخزن پلی‌اتیلن ۳۰۰ لیتری تقسیم شد. هر یک از مخازن مجهز به سیستم هوادهی و تخلیه آب مرکزی و شیرهای تنظیم کننده جریان آب ورودی مجزا بود. در طول دوره آزمایش، شاخص‌های فیزیوشیمیایی آب شامل اکسیژن محلول  $2 \pm 0.4$  میلی‌گرم بر لیتر (اندازه‌گیری با اکسیژن‌متر، Hanna Instruments، آمریکا) و دمای آب  $14.5 \pm 0.5$  درجه سانتی‌گراد (اندازه‌گیری با دماسنج دیجیتالی، TP101، TENMA، انگلستان) بود. آب مورد استفاده از چاه عمیق تامین می‌شد و در شرایط مطلوب برای رشد ماهی قزل‌آلا قرار داشت.

## تهیه جیره‌های آزمایشی

این پژوهش در قالب ۱۰ تیمار آزمایشی شامل ۹ تیمار که تلفیقی از سطوح ۲، ۳ و ۴

درصد لسیتین و ۱، ۲ و ۳ درصد CLA (اسید لینولئیک مزدوج) بود و یک گروه شاهد در سه تکرار انجام پذیرفت (جدول ۱). سطوح مختلف CLA و لسیتین بر اساس منابع موجود انتخاب شد (Du and Ahn, 2003; Takahashi et al., 2003; Zhang et al., 2005; Bolukbasi et al., 2006; Sink and Lochmann, 2014).

جدول ۱: جیره‌های آزمایشی حاوی مقادیر مختلف CLA و لسیتین

تیمارها	CLA (درصد)	لسیتین (درصد)
شاهد	-	-
تیمار ۱	۱	۲
تیمار ۲	۲	۲
تیمار ۳	۳	۲
تیمار ۴	۱	۳
تیمار ۵	۲	۳
تیمار ۶	۳	۳
تیمار ۷	۱	۴
تیمار ۸	۲	۴
تیمار ۹	۳	۴

از جیره غذایی تجاری (پر ثمر بناب، ایران) به عنوان جیره پایه برای تهیه جیره‌های آزمایشی استفاده شد. ابتدا مواد اولیه مورد نیاز پس از تهیه با آسیاب تا حد نیم میلی‌متر ریز شد. بعد از تنظیم جیره‌های آزمایشی توسط

بیگانه‌خواری سلول‌های نوتروفیل (آزمایش برداشت  $\gamma$ NR) از ماهیان خون‌گیری به عمل آمد. به این منظور ۲ قطعه ماهی از هر مخزن (۶ قطعه ماهی به ازای هر تیمار) به صورت تصادفی انتخاب و پس از بیهوشی با پودر گل میخک، با استفاده از سرنگ ۲ میلی‌لیتری از سیاهرگ ساقه دمی نمونه‌های خونی جمع‌آوری شد (Clerton et al., 2001; Tukmechi et al., 2011). نمونه‌های خونی بلافاصله برای انجام مراحل بعدی در شرایط استاندارد به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه منتقل شدند.

برای جداسازی سرم، نمونه‌های خون با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (HS-18500، فرزانه آرمان، ایران) شدند. سرم به دست آمده تا زمان سنجش شاخص‌های مورد نظر در دمای  $8^{\circ}\text{C}$  نگهداری شد (Tukmechi et al., 2011).

میزان فعالیت لیزوزیم بر مبنای تخریب (Lysis) باکتری گرم مثبت *Micrococcus lysodeikticus* (Clerton et al., 2001) فعالیت مسیر فرعی کمپلمان سرم بر اساس همولیز گلبول‌های قرمز خرگوش (RaRBC) (Amar et al., 2000) و مقدار

نرم‌افزار WUFFDA و افزودن سطوح تعیین شده روغن به همراه لسیتین (-LUTA CLA60، BASF، آلمان) و CLA، پلت‌های غذایی تولید و جداگانه بسته‌بندی و برچسب‌دار شدند. تجزیه تقریبی جیره شامل تعیین ماده خشک، چربی خام، پروتئین خام، خاکستر خام، فیبر خام و عصاره عاری از ازت و همچنین انرژی خام هر یک از جیره‌های آزمایشی بر اساس AOAC (۱۹۹۵) سنجیده شدند. تیمارهای تغذیه‌ای از لحاظ پروتئین خام (۴۰ درصد) و انرژی قابل هضم (۴ مگاکالری بر کیلوگرم) همسان و از لحاظ سطح لسیتین و CLA متفاوت بودند. ماهیان در سه نوبت صبح، ظهر و عصر به میزان ۲ درصد وزن بدن (FAO، ۲۰۱۳)، به مدت ۷۰ روز با جیره غذایی آزمایشی، تغذیه شدند.

#### سنجش شاخص‌های ایمنی

در انتهای دوره پرورش برای سنجش شاخص‌های ایمنی شامل میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم، فعالیت مسیر فرعی کمپلمان (CH50)، میزان آنتی‌بادی کل سرم، سنجش میزان تکثیر لنفوسیت (MTT<sup>۱</sup>) و قدرت

1- 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

2- Neutral Red

۴۹۰ نانومتر تعیین شد و شاخص تکثیر لنفوسیت (SI) بر اساس رابطه ۱ محاسبه شد (Abtahi Froushani et al., 2015).

رابطه ۱:

$$SI = (OD_P - OD_B) / (OD_C - OD_B)$$

OD<sub>P</sub>: میزان جذب در نمونه حاوی فیتوهماگلوآنتینین؛ OD<sub>B</sub>: میزان جذب در نمونه بلانک؛ OD<sub>C</sub>: میزان جذب در نمونه شاهد (فاقد فیتوهماگلوآنتینین).

قدرت بیگانه‌خواری نوتروفیل‌ها از طریق آزمایش برداشت NR اندازه‌گیری شد. اساس کار آزمون NR بر مبنای جذب رنگ در لیزوزوم سلول‌های زنده بود که پس از تخریب شدن غشای سیتوپلاسمی سلول‌های نوتروفیل و خارج شدن رنگ آن‌ها، میزان رنگ جذب شده توسط دستگاه الایزا (BioTek Instruments، آمریکا) در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان OD به دست آمده نشانگر مقدار پرتو جذب شده توسط سلول‌های زنده بود (Abtahi Froushani et al., 2015).

#### تجزیه و تحلیل داده‌ها

بررسی آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS و به کمک آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و پس‌آزمون

آنتی‌بادی کل بر اساس ترسیب پروتئین‌های محلول سرم (Siwicki et al., 1994) اندازه‌گیری شد.

برای سنجش تکثیر لنفوسیت (MTT) سوسپانسیون حاوی  $1 \times 10^6$  سلول به ازای هر میلی‌لیتر از بافر RPMI-1640 (Sigma، آمریکا) حاوی ۱۰٪ FBS (Fetal Bovine Serum) تهیه و  $100 \mu\text{L}$  از آن در هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ته تخت ریخته شد. برای هر نمونه سه تکرار در حضور  $50 \mu\text{L}$  از محلول فیتوهماگلوآنتینین ( $1 \text{ mg/mL}$ ) و سه تکرار بدون حضور فیتوهماگلوآنتینین در نظر گرفته شد. به عنوان بلانک نیز در سه چاهک تنها از محیط RPMI-1640 استفاده شد. بعد از ۷۲ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور حاوی  $\text{CO}_2$  ۵٪، به هر چاهک  $25 \mu\text{L}$  محلول MTT افزوده و به مدت ۴ ساعت دیگر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شد. در این مدت احیای ماده MTT توسط سلول‌های زنده و در حال تکثیر، سبب تشکیل بلورهای فورمازون شد که با افزودن  $100 \mu\text{L}$  از ماده DMSO (دی‌متیل سولفوکساید) به حالت محلول درآمد. سپس شدت رنگ آن در طول موج

1- Roswell Park Memorial Institute

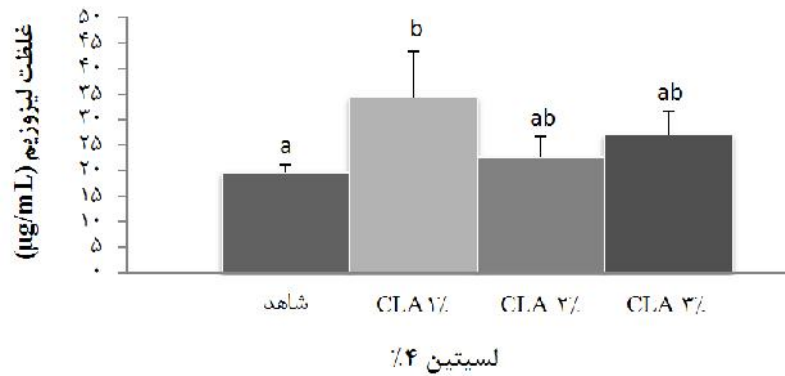
میزان فعالیت مسیر فرعی کمپلمان نیز در سطح ۲ و ۳ درصد لسیترین، تحت تاثیر میزان CLA جیره غذایی قرار نگرفت ( $P > 0/05$ ). البته در سطح لسیترین ۴ درصد میزان این شاخص تحت تاثیر سطوح CLA افزوده شده به جیره‌های غذایی قرار گرفت ( $P < 0/05$ ). به نحوی که بیشترین میزان آن در سطح ۲ درصد CLA و کمترین میزان آن در تیمار شاهد مشاهده شد ( $P < 0/05$ ؛ شکل ۲).

مشابه فعالیت مسیر فرعی کمپلمان، میزان آنتی‌بادی کل سرم نیز در سطوح ۲ و ۳ درصد لسیترین، تحت تاثیر میزان CLA جیره غذایی قرار نگرفت. اما در سطح لسیترین ۴ درصد، میزان این شاخص تحت تاثیر سطوح CLA افزوده شده به جیره‌های غذایی قرار گرفت ( $P > 0/05$ ). به نحوی که بیشترین میزان آن در سطح ۲ درصد CLA و کمترین میزان آن در تیمار شاهد مشاهده شد ( $P < 0/05$ ؛ شکل ۳).

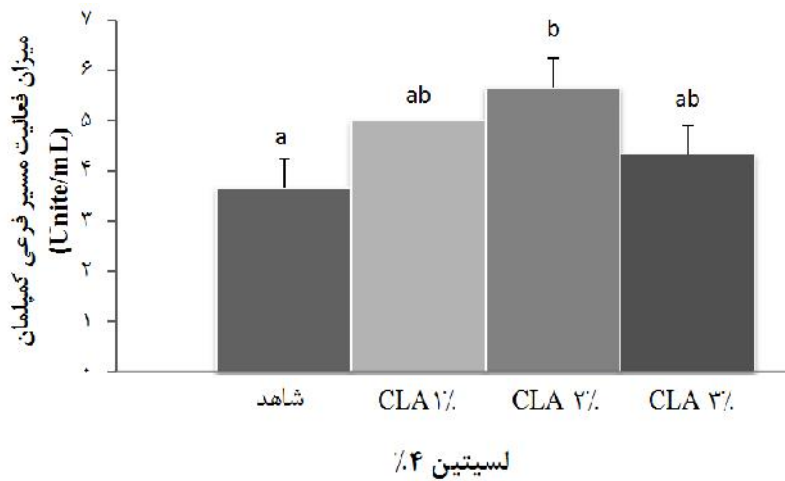
توکی انجام شد. البته پیش از انجام آزمون‌ها، نرمال بودن توزیع داده‌ها و همگنی واریانس‌ها توسط آزمون کولموگروف-اسمیرنوف و لون بررسی شد. علاوه بر این، سطح معنی‌داری آزمون‌ها کمتر از ۵ درصد ( $P > 0/05$ ) انتخاب شد و در نهایت نتایج به صورت «میانگین  $\pm$  انحراف معیار» گزارش شد.

### نتایج

نتایج مربوط به تحلیل واریانس میزان فعالیت لیزوزیم سرم ماهیان تیمارهای مختلف نشان داد که فعالیت این آنزیم در سطوح ۲ و ۳ درصد لسیترین تحت تاثیر سطوح مختلف CLA جیره غذایی قرار نگرفت ( $P > 0/05$ ). در حالی که در سطح ۴ درصد لسیترین بین سطوح مختلف CLA از نظر میزان فعالیت لیزوزیم تفاوت معنی‌داری مشاهده شد و کمترین آن در گروه شاهد و بیشترین مقدار در سطح ۱ درصد CLA بود ( $P < 0/05$ ؛ شکل ۱).

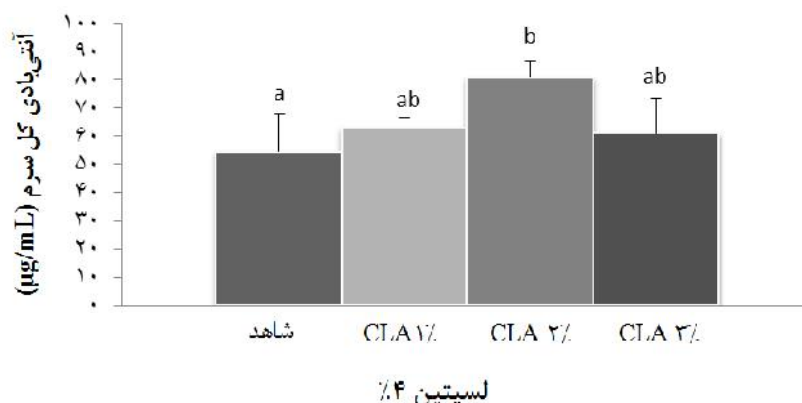


شکل ۱: اثر فعالیت لیروزیم سرم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره غذایی حاوی سطوح مختلف CLA در سطح لسیتین ۴ درصد در انتهای دوره پرورش (میانگین انحراف معیار،  $n = 6$ ). حروف متفاوت نشان دهنده وجود تفاوت آماری معنی‌داری است ( $P < 0.05$ ).



شکل ۲: فعالیت مسیر فرعی کمپلمان ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره‌های غذایی حاوی سطوح مختلف CLA در سطح لسیتین ۴ درصد در انتهای دوره پرورش (میانگین انحراف معیار،  $n = 6$ ). حروف متفاوت نشان دهنده وجود تفاوت آماری معنی‌داری است ( $P < 0.05$ ).

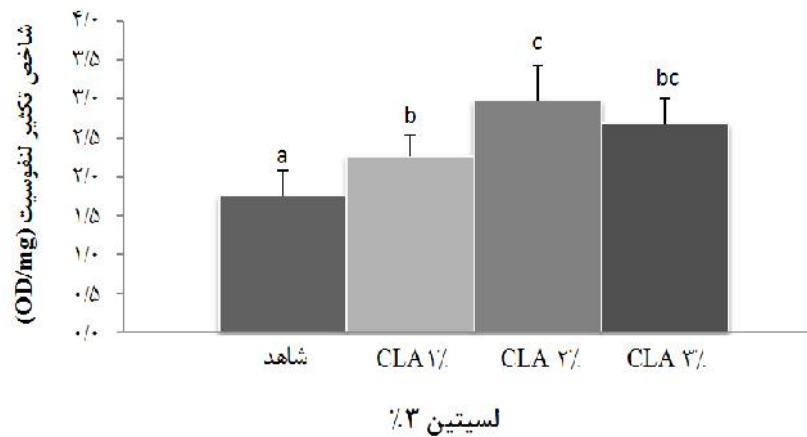




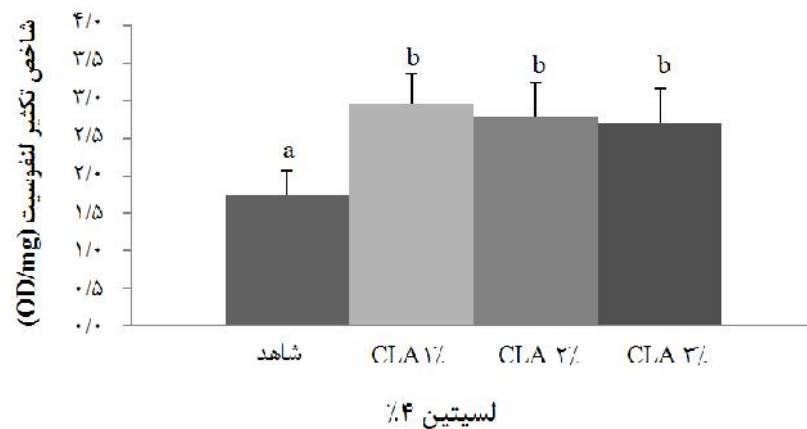
شکل ۳: فعالیت آنتی‌بادی کل سرم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره‌های غذایی حاوی سطوح مختلف CLA در سطح لسیتین ۴ درصد در انتهای دوره پرورش (میانگین انحراف معیار،  $n = 6$ ). حروف متفاوت نشان دهنده وجود تفاوت آماری معنی‌داری است ( $P < 0.05$ ).

در سطوح ۳ و ۴ درصد لسیتین، شاخص برداشت NR تحت تاثیر میزان CLA جیره‌های غذایی قرار گرفت ( $P < 0.05$ )، به نحوی که در سطح ۳ درصد لسیتین بیشترین میزان در سطح ۲ درصد CLA و کمترین میزان آن در تیمار شاهد مشاهده شد ( $P < 0.05$ ؛ شکل ۶). همچنین، در سطح ۴ درصد لسیتین با این که بین سطوح مختلف CLA شامل ۱، ۲ و ۳ درصد اختلافی دیده نشد، اما میان تیمارهای یاد شده با گروه شاهد تفاوت معنی‌دار مشاهده شد ( $P < 0.05$ ؛ شکل ۷).

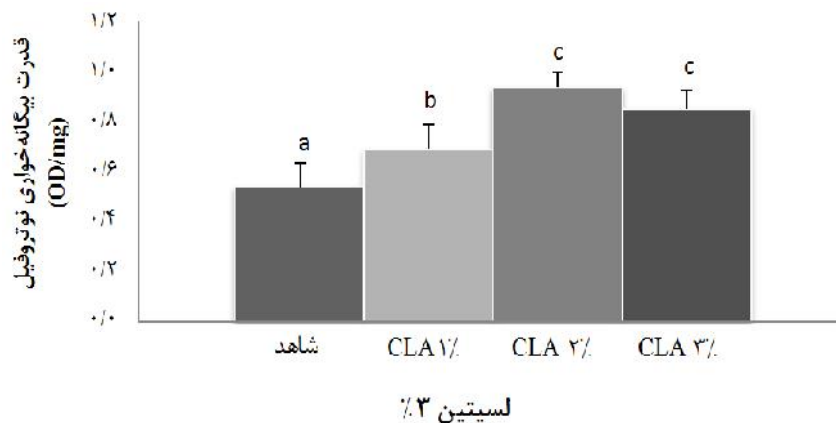
تحلیل واریانس داده‌های مربوط به تکثیر لئوسیت نشان داد که در سطوح ۳ و ۴ درصد لسیتین، میزان این شاخص تحت تاثیر میزان CLA جیره‌های غذایی قرار گرفت ( $P < 0.05$ )، به نحوی که در سطح ۳ درصد لسیتین بیشترین میزان در CLA ۲ درصد و کمترین میزان آن در تیمار شاهد مشاهده شد ( $P < 0.05$ ؛ شکل ۴) و در سطح ۴ درصد لسیتین اگرچه بین سطوح مختلف CLA تفاوت معنی‌داری وجود نداشت، اما اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد مشاهده شد ( $P < 0.05$ ؛ شکل ۵).



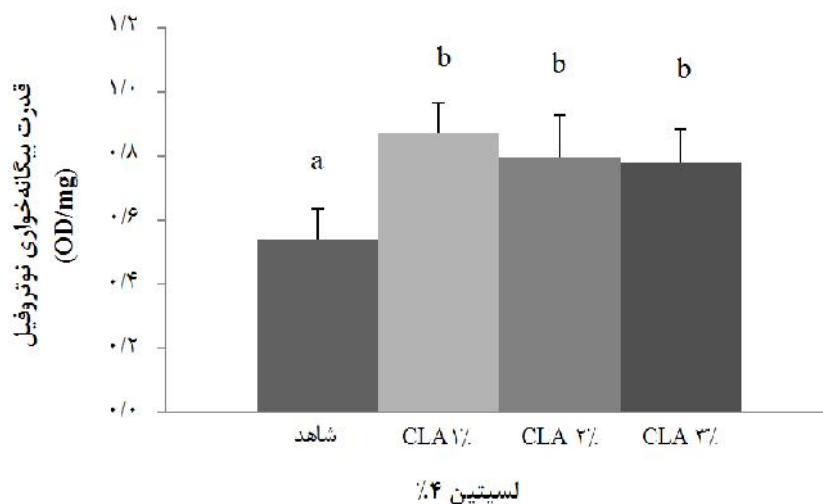
شکل ۴: شاخص تکثیر لئفوسیت در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره‌های غذایی حاوی سطوح مختلف CLA در سطح لسیترین ۳ درصد در انتهای دوره پرورش (میانگین انحراف معیار،  $n = 6$ ). حروف متفاوت نشان دهنده وجود تفاوت آماری معنی‌داری است ( $P < 0.05$ ).



شکل ۵: شاخص تکثیر لئفوسیت در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره‌های غذایی حاوی سطوح مختلف CLA در سطح لسیترین ۴ درصد در انتهای دوره پرورش (میانگین انحراف معیار،  $n = 6$ ). حروف متفاوت نشان دهنده وجود تفاوت آماری معنی‌داری است ( $P < 0.05$ ).



شکل ۶: قدرت بیگانه‌خواری نوتروفیل (برداشت NR) در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره‌های غذایی حاوی سطوح مختلف CLA در سطح لیسیتین ۳ درصد در انتهای دوره پرورش (میانگین انحراف معیار،  $n = 6$ ). حروف متفاوت نشان دهنده وجود تفاوت آماری معنی‌داری است ( $P < 0.05$ ).



شکل ۷: قدرت بیگانه‌خواری نوتروفیل (برداشت NR) در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره‌های غذایی حاوی سطوح مختلف CLA در سطح لیسیتین ۴ درصد در انتهای دوره پرورش (میانگین انحراف معیار،  $n = 6$ ). حروف متفاوت نشان دهنده وجود تفاوت آماری معنی‌داری است ( $P < 0.05$ ).

## بحث

ترکیب جیره غذایی، دما، سن و به ویژه گونه ماهی باشد (Golalipour et al., 2016) اسیدهای چرب غیراشباع PUFA موجود در ترکیب لسیتین می‌تواند از طریق استقرار در غشای فسفولیپیدی و ایجاد تفاوت در سطوح سلول‌های بافت‌های لنفوئیدی باعث تعدیل فعالیت سیستم ایمنی شوند (Clader et al., 1998). کبد محل ذخیره‌سازی و متابولیسم فسفولیپید است و از آنجا که ساخت پروتئین‌های کمپلمان نیز در کبد صورت می‌گیرد، چنین احتمالی وجود دارد که لسیتین از طریق تغییر سطح ایمونوگلوبولین‌ها می‌تواند بر فعالیت کمپلمان تاثیر داشته باشد (Manas et al., 2009).

در مطالعه حاضر میزان آنتی‌بادی کل سرم در سطح لسیتین ۴ درصد، تحت تاثیر سطوح CLA افزوده شده به جیره‌های غذایی قرار گرفت، به نحوی که بیشترین میزان آن در سطح ۲ درصد CLA و کمترین میزان آن در تیمار شاهد مشاهده شد. در نتیجه می‌توان چنین بیان کرد که با ایجاد تغییراتی در ترکیب جیره غذایی به لحاظ اسیدهای چرب می‌توان پاسخ ایمنی هومورال را تحت تاثیر قرار داد. برای مثال اسیدهای چرب ۳-n از طریق کاهش تولید PGE2 می‌توانند موجب

ایمنی ذاتی یا طبیعی در ماهی توسط سه عامل فیزیکی، سلولی و شیمیایی ایجاد می‌شود. لیزوزیم، بعضی از پروتئین‌های سیستم کمپلمان و یک سری عوامل دیگر مربوط به عامل شیمیایی هستند (Pakzad et al., 2009). با توجه به میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم و همچنین فعالیت سیستم کمپلمان گروه‌های مختلف آزمایشی، می‌توان چنین نتیجه گرفت که در سطح ۴ درصد لسیتین، افزودن CLA به جیره غذایی موجب بهبود عملکرد سیستم ایمنی می‌شود، به نحوی که کم‌ترین میزان فعالیت آنزیمی و مسیر فعالیت کمپلمان در گروه شاهد (فاقد CLA) و بیشترین آن به ترتیب در سطح ۱ و ۲ درصد CLA بود. افزودن CLA در سطح ۲ درصد موجب تقویت شاخص‌های ایمنی و مقاومت در برابر بیماری در ماهی *Dicentrarchus labrax* شد، به طوری که افزایش فعالیت لیزوزیم سرم تحت تاثیر CLA در این گونه ماهی مشاهده شد (Makol et al., 2009). تفاوت سطوح CLA مورد نیاز برای بهبود عملکرد ایمنی در مطالعه حاضر با پژوهش Makol و همکاران (۲۰۰۹) می‌تواند ناشی از شاخص‌های فیزیولوژیکی و محیطی مانند

موجب تغییر عملکرد سیستم ایمنی می‌شوند، از این طریق تاثیر غیرمستقیم CLA قابل تفسیر است (O'shea et al., 2004). در پژوهش حاضر نیز شاخص تکثیر لنفوسیت در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های غذایی حاوی ۳ و ۴ درصد لسیترین حاوی سطوح ۱ درصد CLA و بیشتر، نتایج مشابهی دال بر اثر تقویت‌کنندگی همزمان CLA و لسیترین مشاهده شد.

رنگ NR رنگ کاتیونی است که توسط سلول‌های بیگانه‌خوار جذب شده، درون لیزوزوم‌ها ذخیره می‌شود. میزان برداشت رنگ NR توسط سلول فاگوسیت به قابلیت غشایی این سلول‌ها و فعالیت ذاتی سلول‌ها بستگی دارد. بنابراین هر چه میزان برداشت NR توسط سلول فاگوسیتیک بیشتر باشد، قابلیت فاگوسیتوز توسط این سلول نیز بیشتر خواهد بود (Abtahi Froushani et al., 2015). در مطالعه حاضر میزان برداشت NR در تمامی سطوح لسیترین، تحت تاثیر میزان CLA جیره‌های غذایی قرار گرفت، به نحوی که عملاً در سطح CLA ۱ درصد و مقادیر بالاتر شاخص فاگوسیتوز نسبت به گروه شاهد افزایش قابل توجهی داشت. آزمون NR ارتباط مستقیم با غشای سلولی دارد و این احتمال

افزایش تولید آنتی‌بادی شوند (Shushtari and Abtahi Froushani, 2017). همچنین، افزودن CLA به جیره غذایی از طریق تغییر الگوی اسیدهای چرب غشای سلول‌های بافت‌های دخیل در سیستم ایمنی از جمله طحال، موجب افزایش نسبت اسیدهای چرب گروه n-۳ به n-۶ می‌شود. چنین تغییری خود موجب کاهش ترشح میانجی‌های مهمی مانند پروستاگلاندین‌های التهابی (مانند PGE2) می‌شود (Li and Watkins et al., 1998; Belury, 2002; He et al., 2007). برای مثال He و همکاران (۲۰۰۷) همبستگی منفی میان سطح سرمی PGE2 و شاخص تکثیر لنفوسیت مشاهده کردند که می‌تواند ناشی از افزودن CLA به جیره‌های غذایی باشد (He et al., 2007). علاوه بر این مکانیسم‌های دیگری نیز برای اثرگذاری CLA جیره غذایی بر سیستم ایمنی جانوران گزارش شده است که از جمله آن می‌توان به تعامل میان CLA و Peroxisome Proliferators Activated Receptors (PPARs) اشاره کرد، که از طریق اتصال به عناصر حساس به PPARs و سرانجام تحریک یا سرکوب ژن‌های متعدد دخیل در تکثیر لنفوسیت‌ها و مونوسیت‌ها یا ماکروفاژها و غیره

جیره غذایی بر عملکرد سیستم ایمنی پیشنهاد می‌شود که در پژوهش‌های آتی، الگوی اسیدهای چرب غشایی بافت‌های دخیل در ایمنی به همراه بیان ژن عوامل مختلف ایمنی ذاتی و اکتسابی مورد بررسی قرار گیرد.

#### تشکر و قدردانی

از حمایت مالی دانشکده منابع طبیعی دانشگاه ارومیه و همچنین کارکنان محترم سالن تکثیر و پرورش پژوهشکده آرتمیا و آبی‌پروری و آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه به خاطر همکاری در انجام پژوهش حاضر تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

وجود دارد که مصرف گروه‌های مختلف چربی‌ها مانند لسیتین و CLA با تاثیر بر ترکیب بیوشیمیایی غشا و در نتیجه عملکرد آن موثر واقع شوند (Shushtari and Abtahi, 2017).

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، فسفولیپید لسیتین از اثر مثبتی بر ایمنی هومورال و سلولی برخوردار بود و افزودن حداقل ۱ درصد CLA به همراه ۳ درصد لسیتین به عنوان مکمل غذایی، می‌تواند سبب بهبود شاخص‌های ایمنی شامل آنتی‌بادی، لیزوزیم، کمپلمان و قدرت فاگوسیتوزی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان شود. با این وجود، برای درک بیشتر مکانیسم تاثیر لسیتین و CLA

منابع

- Abtahi Froushani S.M., Motlagh B.M. and Ahangaran N.A. 2015.** Calcitriol modulates the effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on macrophage functions. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences (IJBMS)*, 18(7): 672–676.
- Amar E.C., Kiron V., Satoh S., Okamoto N. and Watanabe T. 2000.** Effects of dietary  $\beta$ -carotene on the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fisheries Science*, 66(6): 1068–1075.
- Bell G.W., Eggleston D.B and Wolcott T.G. 2003.** Behavioral responses of free-ranging blue crabs to episodic hypoxia. II. Feeding. *Marine Ecology Progress Series*, 259: 227–235.
- Belury M.A. 2002.** Dietary conjugated linoleic acid in health: Physiological effects and mechanisms of action. *Annual Review of Nutrition*, 22(1): 505–531.
- Bolukbasi S.C. 2006.** Effect of dietary conjugated linoleic acid (CLA) on broiler performance, serum lipoprotein content, muscle fatty acid composition and meat quality during refrigerated storage. *British Poultry Science*, 47: 470–476.
- Clader J.W., Rosenblum S.B., Huynh T., Afonso A., Davis H.R., Yumibe N. and Burnett D.A. 1998.** Discovery of 1-(4-fluorophenyl)-(3R)-[3-(4-fluorophenyl)-(3S)-hydroxypropyl]-(4S)-(4-hydroxyphenyl)-2-azetidinone (SCH 58235): A designed, potent, orally active inhibitor of cholesterol absorption. *Journal of Medicinal Chemistry*, 41(6): 973–980.
- Clerton P., Troutaud D., Verlhac V., Gabaudan J. and Deschaux P. 2001.** Dietary vitamin E and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocyte functions: Effect on gut and on head kidney leucocytes. *Fish and Shellfish Immunology*, 11(1): 1–13.
- Coutteau P., Geurden I., Camara M.R., Bergot P and Sorgeloos P. 1997.** Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture. *Aquaculture*, 155(1): 149–164.
- Du M. and Ahn D.U. 2003.** Dietary CLA affects lipid metabolism in broiler chicks. *Lipids*, 38(5): 505–511.
- FAO 2013.** Yearbook Annuaire Anuario. Fishery and Aquaculture Statistics. Food and Agriculture Organization, Roma. 288P.
- Golalipour Y., Khara H. and Mohseni M. 2016.** Effect of different levels of lipid on liver enzymes, blood hematological and biochemical parameters in Siberian

- sturgeon (*Acipenser Baerii*). *Animal Environment*, 8(1): 229–236.
- He X., Zhang H., Yang X., Zhang S., Dai Q., Xiao W. and Ren G. 2007.** Modulation of immune function by conjugated linoleic acid in chickens. *Food and Agricultural Immunology*, 18(3-4): 169–178.
- Ip C., Singh M., Thompson H.J. and Scimeca J.A. 1994.** Conjugated linoleic acid suppresses mammary carcinogenesis and proliferative activity of the mammary gland in the rat. *Cancer Research*, 54(5): 1212–1215.
- Kanazawa A., Teshima S.I. and Sakamoto M. 1985.** Effects of dietary lipids, fatty acids, and phospholipids on growth and survival of prawn (*Penaeus japonicus*) larvae. *Aquaculture*, 50(1-2): 39–49.
- Lee C.S. and Donaldson E.M. 2001.** General discussion on “Reproductive biotechnology in finfish aquaculture”. *Aquaculture*, 197(1): 303–320.
- Li Y. and Watkins B.A. 1998.** Conjugated linoleic acids alter bone fatty acid composition and reduce ex vivo prostaglandin E2 biosynthesis in rats fed n-6 or n-3 fatty acids. *Lipids*, 33(4): 417–425.
- Makol A., Torrecillas S., Fernandez-Vaquero A., Robaina L., Montero D., Caballero M.J., Tort L. and Izquierdo M. 2009.** Effect of conjugated linoleic acid on dietary lipids utilization, liver morphology and selected immune parameters in sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*). *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 154(1): 179–187.
- Manas R., Izquierdo M.S., Robania I., Gines R., Lopez-Bote C.J. and Mukherhee S.C. 2009.** Characterization of IgM of Indian major carps and their cross reactivity with anti-fish IgM antibodies. *Fish and Shellfish Immunology*, 26: 275–278.
- Opsahl-Ferstad H.G., Rudi H., Ruyter B. and Refstie S. 2003.** Biotechnological approaches to modify rapeseed oil composition for applications in aquaculture. *Plant Science*, 165(2): 349–357.
- O'shea M., Bassaganya-Riera J. and Mohede I.C. 2004.** Immunomodulatory properties of conjugated linoleic acid. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(6): 1199-1206S.
- Pakzad I., Rezaee A., Rasaei M.J., Tabbarae B. and Delpisheh A. 2009.** Immunogenicity of HSA-L7/L12 (*Brucella abortus* ribosomal protein) in an animal model. *Iranian Journal of Immunology*, 6(1): 12–21.
- Shushtari N. and Abtahi Froushani S.M. 2017.** Caffeine augments the instruction of anti-inflammatory macrophages by the conditioned



- medium of mesenchymal stem cells. *Cell Journal (Yakhteh)*, 19(3): 415–424.
- Sink T.D. and 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(2): 163–172.
- Siwicki A.K., Anderson D.P. and Rumsey G.L. 1994.** Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 41(1): 125–139.
- Takahashi K., Akiba Y., Iwata T. and Kasai M. 2003.** Effect of a mixture of conjugated linoleic acid isomers on growth performance and antibody production in broiler chicks. *British Journal of Nutrition*, 89(5): 691–694.
- Tocher D.R., Bendiksen E.A., Campbell P.J and Bell J.G. 2008.** The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. *Aquaculture*, 280(1): 21–34.
- Tukmechi A., Andani H.R.R., Manaffar R. and Sheikhzadeh N. 2011.** Dietary administration of beta-mercapto-ethanol treated *Saccharomyces cerevisiae* enhanced the growth, innate immune response and disease resistance of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish and Shellfish Immunology*, 30: 923–928.
- Zhang H., Guo Y. and Yuan J. 2005.** Conjugated linoleic acid enhanced the immune function in broiler chicks. *British Journal of Nutrition*, 94(5): 746–752.
- Zuo R., Ai Q., Mai K. and Xu W. 2013.** Effects of conjugated linoleic acid on growth, non-specific immunity, antioxidant capacity, lipid deposition and related gene expression in juvenile large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) fed soyabean oil-based diets. *British Journal of Nutrition*, 110(07): 1220–1232.



## Effect of dietary lecithin and conjugated linoleic acid (CLA) on some immune indices of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Darya Fatehi<sup>1</sup>, Kouros Sarvi Moghanlou<sup>2\*</sup>, Naser Agh<sup>3</sup>, Sayed Meysam Abtahi<sup>4</sup>, Ahmad Imani<sup>2</sup>

Received: May 2018

Accepted: July 2018

### Abstract

The present study was to investigate the effect of dietary conjugated linoleic acid (CLA) at various inclusion levels of lecithin on immune indices of rainbow trout. To do so, 600 rainbow trout with an average body weight of  $100 \pm 10$ g were randomly allotted into 10 distinct treatments comprised of various combinations of three dietary inclusion levels of lecithin (2, 3 and 4%) and CLA (1, 2 and 3%) along with a control group (devoid of CLA and lecithin) for 70 days. At the end of the experiment, immune parameters including lysozyme activity, complementary pathway, total antibody, lymphocyte proliferation and phagocytic power of the neutrophil (NR assay) were assayed. Lysozyme activity, complement pathway and total antibody content of serum of those fish fed diet containing 4% lecithin were affected by dietary CLA level to extent that lysozyme activity was the highest at 1% of CLA, while complement pathway and total antibody content of serum were the highest in diets containing 2% CLA ( $P < 0.05$ ). Lymphocyte proliferation of those fish fed diet containing at least 3% lecithin along with 2% CLA was the highest ( $P < 0.05$ ), and NR was significantly increased in those fish received diet included with at least 2% lecithin and 1% CLA ( $P < 0.05$ ). In conclusion, dietary incorporation of at least 1% CLA along with 3% lecithin could improve immune parameters of rainbow trout.

**Key words:** *Phospholipid, Innate Immunity, Lipid, Salmonids.*

1- M.Sc. in Aquaculture, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran.

2- Associate Professor in Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran.

3- Associate Professor in Urmia Lake Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran.

4- Associate Professor in Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

\*Corresponding Author: [k.sarvimoghanlou@urmia.ac.ir](mailto:k.sarvimoghanlou@urmia.ac.ir)