DOI: 10.22092/vj.2019.123652.1506
شماره ۱۲۷ تابستان ۱۳۹۹
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده های بیولوژیک

تأثیر تجویز خوراکی آستاگزانتین و نمک صفراوی بر فعالیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و فاکتورهای بیوشیمیایی خون ماهی پَرِت (*Cichlasoma synspilum* × *Cichlasoma citrinellum*) طی دوره محرومیت غذایی

• **امین مخلص آبادی فراهانی**
دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان
• **سالار درافشان (نویسنده مسئول)**
دانشیار، گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، کد پستی ۸۴۱۵۶۸۳۱۱۱
• **فاطمه پیکان حیرتی**
استادیار، گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، کد پستی ۸۴۱۵۶۸۳۱۱۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷-۰۷-۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸-۰۲-۱۵
Email: sdorafshan@cc.iut.ac.ir

چکیده

هدف از مطالعه بهبود سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و شاخص‌های بیوشیمیایی پلاسمای ماهی پرت در طی دوره محرومیت غذایی بود. ۱۹۸ قطعه ماهی پرت (میانگین وزنی۶/۲±۲۵/۵ گرم و میانگین طولی۰/۴۳±۶/۳۴ سانتی‌متر) در سه تیمار شامل تیمار شاهد (جیره پایه)، تیمار آستاگزانتین (جیره حاوی ۴ گرم بر کیلوگرم آستاگزانتین) و تیمار آستاگزانتین- نمک صفراوی (جیره حاوی ۴ گرم بر کیلوگرم آستاگزانتین و ۱۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نمک صفراوی) به مدت ۹۰ روز تغذیه، سپس به مدت ۷ روز در معرض محرومیت غذایی قرارگرفتند. خونگیری از ماهیان در پایان دوره تغذیه (قبل از تنش محرومیت غذایی) و پس از آن صورت گرفت و آنزیم های اکسیداتیو و برخی پارمترهای بیوشیمیایی خون ماهیان سنجیده شد. نتایج نشان داد تغذیه با جیره حاوی آستاگزانتین به تنهایی می تواند باعث کاهش سطح آنزیم‌های اکسیداتیو در مقایسه با گروه شاهد در پایان دوره تغذیه شود، در حالی که کاهش سطح آنزیم های کبدی آسپارات آمینوترانسفراز و آلانین آمینو ترانسفراز پلاسما، تنها در گروه ماهیان تغذیه شده با آستاگزانتین و نمک صفراوی مشاهده شد (p<۰/۰۵). محرومیت غذایی منجر به افزایش معنادار آنزیم‌های اکسیداتیو پلاسما در گروه شاهد شد (p<۰/۰۵). درحالی‌که چنین تغییراتی در تیمارهای تغذیه‌شده با آستاگزانتین و یا آستاگزانتین- نمک صفراوی مشاهده نشد (p<۰/۰۵). به‌طورکلی می‌توان بیان داشت که محرومیت غذایی منجر به افزایش معنادار آنزیم‌های اکسیداتیو و کاهش سطح آنزیم‌های کبدی و پروتئین پلاسمای ماهی پرت می‌شود، بااین‌وجود می‌توان با افزودن آستاگزانتین به‌تنهایی یا در تلفیق با نمک صفراوی به جیره، اثرات محرومیت غذایی را حداقل در برخی شاخص‌ها، کاهش داد.

کلمات کلیدی: ماهی پرت، آستاگزانتین، نمک صفراوی، محرومیت غذایی

www.SID.ir

Archive of SID

Veterinary Researches & Biological Products No 127 pp: 128-135

Effect of dietary administration of astaxanthin and bile salt on oxidative stress enzymes and blood biochemical parameters of parrot (*Cichlasoma synspilum* ♀ × *Cichlasoma citrinellum* ♂) during starvation period

By: Mokhles Abady Farahany, A., MSc in Aquaculture, Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran. Dorafshan, S., (Corresponding Author) Associate professor, Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, Postal Code 8415683111 ,*Iran. and Paykan Heyrati, F., Assistant professor, Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan,* Postal Code 8415683111, *Iran.*

Received: 2018-10-09 **Accepted: 2019-05-05**

Email: sdorafshan@cc.iut.ac.ir

This study was aimed to improve Parrot fish fitness, respecting antioxidant defense system and plasma biochemical parameters affected by starvation. 198 parrot fish (average weight 25.5±6.2 g and length 6.34± 0.43 cm) were randomly distributed in three different treatments, including control (basic diet), astaxanthin (diet enriched with 4g/kg astaxanthin) and astaxanthin-bile salt treatment (diet enriched with 4g/kg astaxanthin and 1200 mg/kg bile salt). The fish were fed for 90 days and then subjected to starvation for 7 days. Bleeding was done at the end of feeding period (before starvation stress) and after starvation phase and some plasma oxidative stress enzymes and blood biochemical parameters were analyzed. Results showed that feeding fish with astaxanthin alone, can reduce the levels of oxidative stress enzymes in fish in comparison to the control at the end of the feeding period while reduced levels of liver enzymes such as asparat aminotransferase and alanine aminotransferase were only observed in fish fed on diet enriched with astaxanthin-bile salt ($P<0.05$). Starvation caused significant elevation of plasma oxidative stress enzymes in the control group ($P<0.05$), while such changes were not observed in fish fed on astaxanthin and/or astaxanthin-bile salt treatments ($P>0.05$). In general, it can be concluded that starvation can cause plasma oxidative stress enzymes elevation, plasma total protein and liver enzymes reduction in parrot fish; nevertheless, by dietary astaxanthin supplementation alone or in combination with bile salt, the negative effects of starvation on parrot fish, at least for some physiological parameters, can minimized. .

Keyword: Parrot fish, Astaxanthin, Bile Salt, Starvation

مقدمه

در آبزی‌پروری، ماهیان ممکن است گرسنگی را در طول دوره‌های قبل از صید، حمل‌ونقل، سهل‌انگاری پرورش‌دهندگان و همچنین در اثر بعضی آزمایش‌های تغذیه‌ای که دوره‌های گرسنگی در آن گنجانده‌شده، تجربه کنند. بین دوره گرسنگی طبیعی و آزمایشگاهی تفاوت زیادی وجود دارد. تحت شرایط طبیعی بسیاری از گونه‌های ماهی دوره گرسنگی طولانی‌مدت را می‌گذارند که این دوره با تغییرات فصل، دسترسی غذا، مهاجرت و تولیدمثل مرتبط است (۷). در بسیاری از ماهیان یک دوره بی‌غذایی بخشی از طبیعت زندگی است. با توجه به توانایی ماهیان در مواجه با گرسنگی، اجرای برنامه‌های محدودیت غذایی کوتاه‌مدت در مزارع پرورشی می‌تواند مزایای زیادی شامل مدیریت آسان تغذیه، آلودگی کمتر آب و بهبود کیفیت محصول نهایی (یا کاهش چربی ماهیچه) را ایجاد کند، بدون اینکه تأثیری روی رشد ماهی ایجاد کند. هزینه‌های تأمین غذا یکی از مهم‌ترین عوامل در پرورش آبزیان به شمار می‌آید و به‌طورمعمول ۳۰ تا ۶۰ درصد کل هزینه لازم برای سامانه‌های پرورش ماهی و سخت‌پوستان را تشکیل می‌دهد (۱۲). گونه‌های مختلف آبزیان از طریق مکانیسم‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی خاص خود می‌توانند دوره محرومیت غذایی را تحمل نمایند. در دوران گرسنگی متابولیسم موجود زنده کاهش می‌یابد. همچنین اعتقاد بر آن است که کاهش میزان متابولیسم می‌تواند تا مدتی بعد از رفع شرایط نامساعد ادامه یابد. گرسنگی می‌تواند منجر به اختلال در ترکیبات بافت عضله و ذخایر چربی بدن ماهی شود و این فرآیند با استفاده از بررسی ترکیب لاشه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و ماهی سیم دریایی به اثبات رسیده است (۲۱). بااین‌حال الگوی مصرف انرژی از منابع مختلف بدن در زمان گرسنگی در ماهیان مختلف متفاوت است به‌عنوان‌مثال در قزل‌آلای رنگین‌کمان اولین بافتی که در زمان گرسنگی مورداستفاده قرار می‌گیرد، بافت چربی است. با افزایش چربی خون در طی این دوره، اکسیداسیون چربی افزایش یافته و به تبع آن سطح رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد (۱۹). رادیکال‌های آزاد پتانسیل بالایی در آسیب‌رسانان به سیستم

www.SID.ir

Archive of SID

بیولوژیک دارند و طی فرآیند اکسیداسیون مولکول‌های زیستی، ازجمله لیپیدها، رادیکال‌های آزاد دیگری مانند پروکسیل را به وجود می‌آورند و با آغاز واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیون سبب آسیب بافتی می‌شوند (۱۶). ازجمله آنزیم‌های اکسیداتیو، سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide Dismutase) است که رادیکال آنیون پراکسید را به اکسیژن و H2O2 تبدیل می‌کند. آنزیم کاتالاز (Catalase) H2O2 حاصل از فرآیند آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و سایر فرآیندهای فیزیولوژیک را مهار می‌کند. ازاین‌رو فعالیت بالای کاتالاز (CAT) می‌تواند بیانگر حضور مقادیر بالای H2O2 باشد. مالون دی آلدئید (Malondialdehyde) در پی متابولیسم چربی‌ها ترشح می‌شود و به‌عنوان شاخص میزان تنش اکسیداتیو و کیفیت گوشت موردبررسی قرار می‌گیرد (۸).

محرومیت غذایی به‌طورکلی در ارتباط با استفاده مناسب از منابع انرژی (گلیکوژن، چربی یا پروتئین) به‌منظور حفظ هموستازی ماهی است. ازاین‌رو استفاده از آستاگزانتین قبل از دوره محرومیت غذای به‌عنوان یک ریزمغذی مهم با پایه چربی در جیره غذایی می‌تواند کمک به عملکردهای زیستی مهمی ازجمله جلوگیری از اکسید شدن چربی‌ها و بهبود سطح ایمنی اختصاصی و رشد، در آبزی‌پروری می‌توان مفید باشد (۵). آستاگزانتین یک ماده مغذی با پایه چربی و وزن مولکولی ۵۹۶/۸ دالتون و فرمول مولکولی $C_{40}H_{52}O$، در آب غیر محلول و چربی‌دوست است (۱۳). حیوانات توانایی تولید آستاگزانتین را ندارند و این نیاز خود را از طریق جیره تأمین می‌کنند. میزان جذب آستاگزانتین در میان آبزیان متفاوت است و بستگی به نوع گونه، طول دوره تغذیه، غلظت آستاگزانتین، وزن و سن ماهی موردمطالعه، دارد؛ به‌عنوان‌مثال قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با وزن متوسط ۴۰۰ گرم تنها ۳۹٪ از آستاگزانتین موجود در جیره را جذب کرده است (۱۰). با توجه به قیمت بالای آستاگزانتین اگر بتوان میزان جذب آن را افزایش داد، علاوه بر میزان افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی در بدن ماهی، هزینه‌های تأمین جیره نیز کاهش می‌یابد. نمک صفراوی می‌تواند فرآیند امولسیون شدگی چربی‌ها را تسهیل نماید و میزان جذب ترکیبات با پایه چربی را در روده کوچک افزایش دهد. چربی‌ها ابتدا در روده کوچک به شکل آزاد به کمک انتقال‌دهنده‌های لیپوپروتئینی جذب خون می‌شوند. در این مرحله آستاگزانتین موجود در جیره غذایی، آزاد و وارد سیستم گوارش می‌شود (۱۳). نمک صفراوی می‌تواند این فرآیند را افزایش و تسریع نماید (۱۴). یکی از این نمک‌های صفراوی، ترکیب Sodium Taurocholate با فرمول شیمیایی C26H44NNaO7S است که به هضم و جذب چربی‌ها کمک می‌کند که طی آن فرآیند جذب آستاگزانتین را بیشتر و سریع‌تر می‌شود. در بسیاری از گونه‌ها تغییرات بیوشیمیایی و مکانیسم فیزیولوژیک به ماهی کمک می‌کند تا از عهده شرایط نامطلوب محرومیت غذایی برآید (۵). ارزیابی فرا سنجه‌های خون و پلاسما اطلاعات بسیار باارزشی در رابطه با ارزیابی واکنش‌های فیزیولوژیک در رژیم‌های مختلف تغذیه‌ای در ماهی فراهم می‌کند (۲). بررسی منابع نشان داد که ترکیبات آنتی اکسیدانی نظیر آستاگزانتین و یا ویتامین E می‌توانند منجر به کاهش سطح آنزیم‌های دفاع آنتی اکسیدانی در برخی ماهیان تجاری نظیر طلال (*Rastrelliger kanagurta*) و نوعی کفشک ماهی (*Scophthalmus maximus*) شود (۱ و ۴). علاوه بر این، بررسی های مختلف اثر تنش گرسنگی (محرومیت غذایی) را بر شاخص‌های فیزیولوژیک، سطح آنزیم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی و نیز آنزیم های کبدی پلاسما، در ماهیان مختلف نظیر (*Pseudosciaena crocea*) به اثبات رسانده است (۱۱). متاسفانه علی رغم اهمیت ماهی پرت به عنوان یک ماهی زینتی با ارزش و مرسوم بودن استفاده از رنگدانه در رنگامیزی این ماهی، تاکنون اثرات فیزیولوژیک استفاده از رنگدانه به تنهایی یا به صورت توام با نمک صفراوی در این ماهی مورد مطالعه قرار نگرفته است. ازاین‌رو در این مطالعه آنزیم‌های اکسیداتیو همچون کاتالاز، سوپراکسیداز دیسموتاز و مالون دی آلدئید و فاکتورهای بیوشیمیایی خون ماهی شامل آسپارتات ترانس آمیناز، آلانین ترانس آمیناز، پروتئین کل موردبررسی قرار گرفت. این مطالعه بر روی ماهی پَرت خونی (Blood parrot) که یکی از ماهیان محبوب زینتی است و از دَگرآمیزی دو گونه ♀ *Cichlasoma synspilum* و ♂ *Cichlasoma citrinellum* تولید می‌شود، انجام پذیرفت. این ماهی در سال ۱۹۸۰، برای اولین بار در کشور تایلند تولید شد و سپس در سال‌های بعد تولید آن به کشورهای ژاپن و چین راه یافت (۲۳). هدف از این مطالعه افزایش توان ماهی پرت در مقابله با استرس‌های اکسیداتیو و بهبود عملکرد شاخص‌های بیوشیمیایی پلاسما در زمان مواجهه با محرومیت غذایی با استفاده از جیره حاوی آستاگزانتین و آستاگزانتین- نمک صفراوی بوده است. ازاین‌رو فعالیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و فاکتورهای بیوشیمیایی خون ماهی‌های تغذیه‌شده با آستاگزانتین و آستاگزانتین-نمک صفراوی پس از تغذیه با جیره مورد آزمایش به مدت ۹۰ روز و بعد از قرار گرفتن در معرض تنش محرومیت غذایی به مدت هفت روز، موردبررسی قرار گرفت.

روش‌ها

برای انجام این مطالعه، ۱۹۸ قطعه ماهی پرت با میانگین وزنی۶/۲± ۲۵/۵ گرم و میانگین طولی۰/۴۳± ۶/۳۴ سانتی‌متر به مدت دو هفته با شرایط آزمایشگاهی سازگار شدند. برای این آزمایش، سه تیمار با دو تکرار و هر تکرار شامل ۳۳ قطعه ماهی شامل تیمار شاهد، تیمار آستاگزانتین و تیمار آستاگزانتین- نمک صفراوی بر مبنای نتایج (۲۳) تنظیم شد (جدول ۱). ماهیان تحت آزمایش به مدت ۹۰ روز با جیره‌های تعیین‌شده روزانه ۳ بار (۸ و۱۲ صبح و ۴ بعدازظهر) به میزان ۲ درصد وزنی تغذیه شدند. از آستاگزانتین ساخت شرکت BUSF آلمان و نمک صفراوی ساخت شرکت Fulka آمریکا در ترکیب جیره استفاده شد. میزان پروتئین خام جیره ۳۷/۷ درصد، چربی خام ۳۷/۰۳ درصد، رطوبت ۳/۸۳ درصد و فیبر خام ۳/۳۶ درصد و میزان انرژی جیره ۲۰/۳ کیلوژول بر هر گرم جیره بود. ترکیبات جیره بر اساس (۲۳) و استاندارد NRC توسط نرم‌افزار محاسبه شد (۱۸).

نمونه‌گیری

در این مطالعه در پایان دوره تغذیه با جیره‌های مورد آزمایش و پس از محرومیت غذایی ۵ قطعه ماهی از هر تیمار به‌صورت تصادفی جداشده و پس از بیهوشی با ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر گل میخک از ورید ساقه دمی با استفاده از سرنگ هپارینه شده خون‌گیری شد. برای استحصال پلاسما نمونه‌های خون از سانتریفیوژ ساخت کشور آلمان مدل HAEMATOKRIT ۲۰۰ (۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه) استفاده شد و برای اندازه‌گیری آنزیم‌های اکسیداتیو و بیوشیمیایی پلاسما خون از روش‌های

www.SID.ir

Archive of SID

زیر استفاده شد.

به‌منظور اندازه‌گیری آنزیم کاتالاز از روش توصیف‌شده توسط گوت (۱۹۹۱) استفاده شد (۹) و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها سوپراکسیداز دیسموتاز (SOD) از روش توصیف‌شده توسط ویتربرن و همکاران (۱۹۷۵) و برای آنزیم MDA از روش توصیف‌شده توسط ویتربرن (۱۹۹۳) استفاده شد (۹ و منابع درج شده در آن).

اندازه‌گیری اسپارتات ترانس آمیناز موجود در پلاسما بر پایه رنگ انجام شد. اساس این روش تبدیل استارات (Stearate) به گلوتامات (Glutamic Acid) درنهایت به مالات (Malate) است. قرائت و اندازه‌گیری نمونه‌ها با کمک دستگاه اتوانالایزر (TechniconRA) (USA,۱۰۰۰-Auto Analyzer) و در طول‌موج ۳۴۰ نانومتر انجام شد. برای سنجش میزان آلانین ترانس آمیناز موجود در پلاسما از روش رنگ سنجی و با به‌کارگیری کیت شرکت پارس آزمون استفاده شد. قرائت نمونه‌ها با کمک دستگاه اتوانالایزر و در طول‌موج ۳۴۰ نانومتر انجام گردید. برای سنجش آلکانین فسفاتاز نیز از روش رنگ‌سنجی بر اساس تبدیل نیتروفنیل فسفات به فسفات استفاده شد.

این آزمون با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون انجام شد و نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اتوانالایز با طول ۴۵۰ نانومتر قرائت شد (۱۷). به‌منظور سنجش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز نیاز است که در ابتدا میزان کل پروتئین‌های موجود در پلاسما بررسی شود که برای تخمین آن، از روش برادفورد (۱۹۷۶) استفاده شد. در این روش، میزان پلاسما آلبومین گاوی به‌عنوان محلول استاندارد در نظر گرفته شد و غلظت پروتئین در طول‌موج ۵۴۶ نانومتر و در دمای ۳۷ سانتی‌گراد محاسبه شد.

به‌منظور بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون Kolmogorov- Smiranov استفاده شد، آنالیز داده‌ها نیز با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS ۱۹ و Excel ۲۰۱۳ انجام شد. این آزمایش در طرح کاملاً تصادفی انجام و با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (one way ANOVA) وجود اختلاف معنادار بودن بین تیمارها در سطح معناداری ۰/۰۵ درصد تحلیل شد. برای مقایسه میانگین تیمارهای مختلف پیش یا پس از تنش گرسنگی از آزمون Duncan در سطح معناداری ۰/۰۵ درصد استفاده شد. برای مقایسه میانگین هر شاخص در هر تیمار پیش و پس از تنش از آزمون آماری t- student مستقل

جدول ۱- ترکیبات جیره غذایی مورد استفاده در آزمایش. محتویات بر حسب درصد و بر مبنای ۱۸ و ۲۳ تنظیم شده است.

تیمارهای آزمایش اجزاء جیره	تیمار شاهد	تیمار آستاگزانتین	تیمار آستاگزانتین- نمک صفراوی
پودر ماهی	۲۱/۱۶	۲۱/۱۶	۲۱/۱۶
سویا	۲۱/۱۶	۲۱/۱۶	۲۱/۱۶
کلزا	۱۵/۸۷	۱۵/۸۷	۱۵/۸۷
ذرت	۲۴/۹۳	۲۴/۹۳	۲۴/۹۳
جو	۱۱/۱۲	۱۱/۱۲	۱۱/۱۲
مکمل‌های معدنی[۱]	۲/۳۸	۲/۳۸	۲/۳۸
مکمل‌های ویتامینی[۲]	۲/۳۸	۲/۳۸	۲/۳۸
روغن آفتاب‌گردان	۰/۵	۰/۵	۰/۵
آستاگزانتین	۰	۰/۴	۰/۴
نمک صفراوی	۰	.	۰/۱۲
نمک	۰/۵۲	۰/۱۲	۰
مجموع	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

[۱]مکمل معدنی ساخت شرکت خوراک دام و آبزیان مازندران، ایران (آهن ۲۱/۶۲ درصد، روی ۳۶/۰۵ درصد، سلنیوم ۰/۰۷ درصد، کبالت ۰/۳۶درصد، مس ۲۱/۶۳ درصد، منگنز ۱۸/۰۲ درصد، ید ۲/۱۶ درصد، کولین کلراید ۰/۰۴ درصد).

[۲]مکمل ویتامینی ساخت شرکت ارس بازار، ایران حاوی ویتامین‌های A ۱۵/۲۴درصد، D۳ ۳/۰۴ درصد، K۳ ۰/۶۰درصد، E ۳/۰۴ درصد، B۱ ۶/۰۹ درصد، B۲ ۰/۹۱ درصد، B۶ ۰/۹۱ درصد، C ۳۰/۴۸ درصد، کلسیم پنتوتنات ۹/۱۴ درصد، متیونین ۱۸/۲۹ درصد، سیستئین ۹/۱۴ درصد

www.SID.ir

Archive of SID

در سطح معناداری ۰/۰۵ درصد بهره برداری شد.

نتایج

در پایان دوره ۹۰ روزه تغذیه با جیره‌های مورد آزمایش مقادیر آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) و مالون دی آلدئید (MDA) در جیره حاوی آستاگزانتین به‌صورت معناداری کمتر از گروه شاهد بود (شکل۱ ؛ $p<۰/۰۵$).

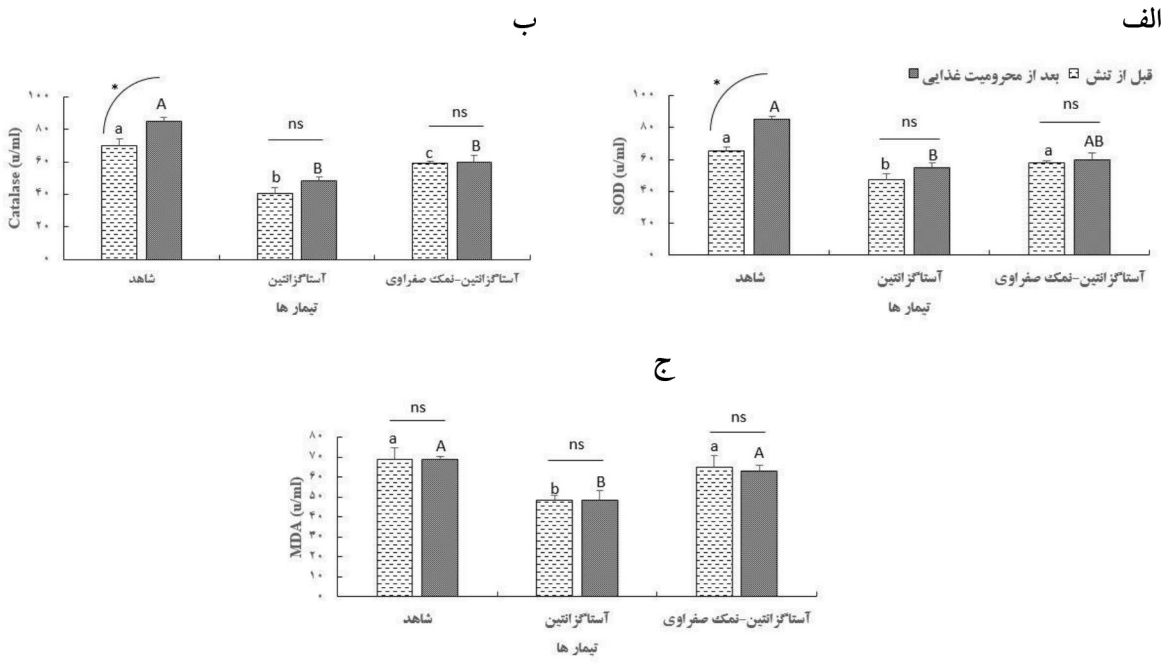
محرومیت غذایی به مدت یک هفته، منجر به افزایش معنادار سطوح آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) در ماهیان تیمار شاهد شد (شکل۱- الف، ب؛ $p>۰/۰۵$). درحالی‌که این تغییرات در تیمارهای آستاگزانتین و آستاگزانتین- نمک صفراوی مشاهده نشد (شکل۱- الف، ب؛ $p<۰/۰۵$). سطح آنزیم مالون دی آلدئید پس از محرومیت غذا بدون تغییر معنی‌داری در همه تیمارها بود (شکل۱ ؛ $p>۰/۰۵$).

در پایان دوره ۹۰ روزه تغذیه با جیره‌های مورد آزمایش میزان آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) در تیمارهای شاهد و آستاگزانتین به‌صورت معناداری بیشتر از تیمار آستاگزانتین- نمک صفراوی بود (شکل۲- الف، ب؛ $p<۰/۰۵$). اختلاف معناداری بین تیمارها در میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) پس از تغذیه با جیره‌های مورد آزمایش مشاهده نشد (شکل۲- ج؛ $p>۰/۰۵$).

پس از محرومیت غذایی به مدت یک هفته سطوح آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) به‌صورت معناداری در تیمار شاهد و آستاگزانتین کاهش پیدا کرد (شکل۲- الف، ب؛ $p>۰/۰۵$) ولی این تغییرات در تیمار آستاگزانتین- نمک صفراوی مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$). همچنین میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) در تیمارهای آستاگزانتین و آستاگزانتین- نمک صفرای به‌صورت معناداری کاهش پیدا کرد (شکل۲- ج؛ $p>۰/۰۵$). ولی این کاهش در تیمار شاهد مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$). میزان پروتئین کل در تیمار پس از تغذیه با جیره‌های مورد آزمایش به مدت ۹۰ روز در بین تیمارهای مورد آزمایش هیچ اختلاف معناداری نداشت (شکل۲- د؛ $p>۰/۰۵$). پس از محرومیت غذایی به مدت یک هفته میزان پروتئین کل پلاسما به‌صورت معناداری در تیمار شاهد و آستاگزانتین- نمک صفراوی کاهش پیدا کرد (شکل۲- د؛ $p>۰/۰۵$). ولی این کاهش در تیمار آستاگزانتین مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$).

بحث

امروزه استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و مصنوعی ازجمله ویتامین‌ها و کاروتنوئید ها نظیر آستاگزانتین در افزایش کارایی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی سلول و پیشگیری از تأثیرات آلاینده‌های زیستی محیطی به امری رایج تبدیل‌شده است (۱۳). نتایج این مطالعه نشان داد که با استفاده

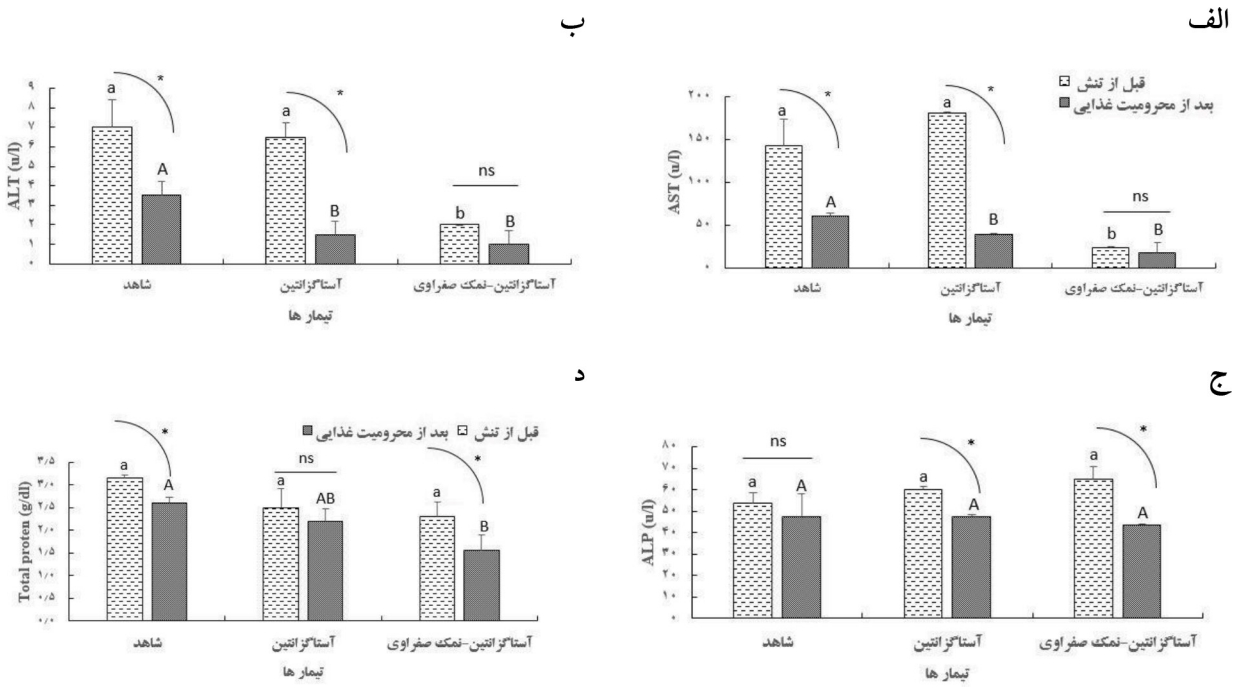


شکل۱- آنزیم‌های اکسیداتیو پلاسما خون ماهی پرت تغذیه‌شده با جیره‌های مختلف آزمایشی پیش و پس از قرار گرفتن در معرض محرومیت غذایی به مدت ۷ روز. الف) سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)ب: کاتالاز (CAT) ج: مالون دی آلدئید .(MDA) حروف کوچک نشان‌دهنده تفاوت معنادار در بین تیمارها پیش از تنش و حروف بزرگ نشان‌دهنده تفاوت معنادار بین تیمارهای مختلف آزمایشی پس از تنش محرومیت غذایی است (Duncan $p<۰/۰۵$). علامت (*) نشان‌دهنده تفاوت معنادار بین زمان پیش و پس از تنش محرومیت غذایی در یک تیمار مشخص است (t. test؛ $p<۰/۰۵$).

www.SID.ir

Archive of SID

از جیره حاوی آستاگزانتین به مدت ۹۰ روز به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان میزان شاخص‌های سوپر- اکسید دیسموتاز، کاتالاز و مالون دی آلدئید در مقایسه با تیمار شاهد کاهش معناداری می‌یابد. آنتی‌اکسیدان‌ها ازجمله آستاگزانتین از واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکال‌های آزاد که با تخریب اسیدهای چرب غیراشباع شروع می‌شود و درنهایت باعث تخریب غشاهای لیپیدی می‌شوند، جلوگیری می‌کند (۱۳). در بررسی اثر ویتامین E در دفاع آنتی‌اکسیدانی، کفشک ماهی(*Scophthalmus maximus*) و شانک زرد باله (*Acanthopagrus latus*) مشاهده شد میزان آنزیم کاتالاز در هر دو گونه با افزایش سطح ویتامین E، کاهش می‌یابد اما کاهش آنزیم سوپراکسید دیسموتاز فقط در ماهی شانک زردباله گزارش‌شده است که می‌تواند بیانگر اثر متفاوت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در گونه‌های متفاوت باشد (۴). در مطالعه حاضر پس از تغذیه با جیره‌های مورد آزمایش میزان شاخص مالون دی آلدئید (MDA) در تیمار آستاگزانتین- نمک صفراوی برخلاف انتظار در مقایسه با تیمار آستاگزانتین به‌صورت معناداری بیشتر بود ولی با تیمار شاهد تفاوت معناداری نداشت. افزایش آنزیم‌های اکسیداتیو در تیمار آستاگزانتین- نمک صفراوی می‌تواند به دلیل افزایش جذب چربی باشد. همچنین بررسی ها نشان داد افزودن روغن ماهی در جیره در طی ۳۰ روز باعث افزایش سوپراکسید دیسموتاز و پس از ۶۰ روز باعث افزایش میزان آنزیم مالون دی آلدئید می‌شود، این مطالعه نشان داد که برای افزایش سطح آنزیم مالون دی آلدئید به مدت‌زمان بیشتری نیاز است (۴). نتایج مطالعه حاضر نشان داد میزان آنزیم‌های کاتالاز (CAT) و سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) در تیمار شاهد بعد از تنش محرومیت غذایی به‌صورت معناداری افزایش پیداکرده است و به نظر می‌رسد دلیل آن افزایش مصرف چربی‌های ذخیره‌شده بدن ماهی و درنتیجه افزایش رادیکال‌های آزاد باشد. ولی این فرایند در تیمارهای آستاگزانتین و آستاگزانتین- نمک صفراوی مشاهده نشد که نشان‌دهنده ایجاد مقاومت در برابر تنش‌های اکسیداتیو در این تیمارها در مقایسه با تیمار شاهد است. در مقابل میزان آنزیم مالون دی آلدئید(MDA) پیش از تنش در مقایسه با پس از تنش محرومیت غذایی در تمام تیمارها تفاوت معناداری نداشته است که می‌تواند دلیل آن عملکرد دیرهنگام این آنزیم بیان کرد. در تحقیق انجام‌شده بر روی ماهی (*Pseudosciaena crocea*) میزان سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) و مالون دی آلدئید (MDA) طی پس از ۳، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز از محرومیت غذایی موردبررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد میزان سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) طی سه روز اول افزایش‌یافته است و بیشتر میزان آن بعد از ۲۸ روز مشاهده شد ولی افزایش میزان شاخص مالون دی آلدئید (MDA) با تأخیر زمانی نسبت به دو شاخص دیگر یعنی پس از گذشت ۲۱ روز مشاهده شد و بیشترین میزان آن در روز ۲۸ ام



شکل۲- آنزیم‌های کبدی پلاسما خون ماهی پرت تغذیه‌شده با جیره‌های مختلف آزمایشی پیش و پس از قرار گرفتن در معرض محرومیت غذایی به مدت ۷ روز. الف: آسپارتات آمینوترانسفراز(AST) ب: آلانین آمینوترانسفراز (ALT) ج: آلکالین فسفاتاز (ALP). د: پروتئین کل. حروف کوچک نشان‌دهنده تفاوت معنادار در بین تیمارها پیش از تنش و حروف بزرگ نشان‌دهنده تفاوت معنادار بین تیمارهای مختلف آزمایشی پس از تنش محرومیت غذایی است .(p<۰/۰۵ Duncan)علامت (*) نشان‌دهنده تفاوت معنادار بین زمان پیش و پس از تنش محرومیت غذایی در یک تیمار مشخص است (p<۰/۰۵ ؛t. test).

www.SID.ir

Archive of SID

گزارش شد. این نتایج نشان می‌دهند تنش محرومیت غذایی می‌تواند باعث افزایش آنزیم‌های اکسیداتیو می‌شود (۱۱) ولی می‌توان با استفاده از جیره حاوی آستاگزانتین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان از اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد جلوگیری کرد.

آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز در میتوکندری حیوانات آبزی حضورداشته و سطح آن‌ها شاخص مهمی برای تشخیص آسیب های کبدی ماهی است (۱۷). با توجه به مطالعات پیشین انتظار می‌رفت جیره حاوی آستاگزانتین باعث کاهش سطح آنزیم‌های کبدی و درنتیجه بهبود عملکرد فعالیت کبد شود ولی نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که پس از ۹۰ روز تغذیه با جیره‌های مورد آزمایش، فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز در تیمارهای شاهد و آستاگزانتین تفاوت معناداری باهم نداشتند، میزان آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز پس از تغذیه با جیره‌های مورد آزمایش در تیمار آستاگزانتین- نمک صفراوی به‌صورت معناداری کاهش‌یافته است، که احتمالاً دلیل این امر عدم استفاده کمتر از حد مناسب آستاگزانتین در جیره باشد و با افزودن نمک صفراوی باعث افزایش جذب آن و کاهش سطح آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز شده است. در مطالعه انجام شده بر روی ماهی طلال (*Rastrelliger kanagurta*)، مشخص گردید که استفاده از مکمل آستاگزانتین باعث کاهش معنادار آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینو ترانسفراز می شود ولی تأثیر معناداری بر میزان آلکالین فسفاتاز ندارد (۱). همچنین دلیل دیگر کاهش سطح آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز پس از تغذیه با جیره‌های مورد آزمایش در تیمار آستاگزانتین- نمک صفراوی می‌تواند این باشد که آسیب سلول‌های کبسه صفرا باعث کاهش ترشح نمک‌های صفراوی و افزایش آنزیم‌های کبدی می‌شود (۲۲). استفاده از نمک صفراوی در جیره می تواند منجر به بهبود فعالیت کبد و درنتیجه کاهش آنزیم‌های کبدی شود؛ با توجه به مطالعات پیشین انتظار می‌رفت پس از محرومیت غذایی میزان آنزیم‌های کبدی کاهش پیدا کند (۲۰)، در مطالعه حاضر میزان آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز در تیمارها شاهد و آستاگزانتین پس از تنش محرومیت غذایی به‌صورت معناداری کاهش یافت. میزان شاخص آلکالین فسفاتاز در تیمارهای آستاگزانتین و آستاگزانتین-نمک صفراوی کاهش معناداری داشت ولی در تیمار شاهد این تفاوت مشاهده نشد. این آنزیم‌ها نقش مهمی در متابولیسم پروتئین و آمینواسیدها دارند و کاهش فعالیت این آنزیم‌ها در دوره گرسنگی به کاهش سنتز و سرعت تغییر و تبدیل این آنزیم‌ها مرتبط بوده که خود می‌تواند ناشی از پایین بودن تقاضای متابولیک در ماهی گرسنه باشد، درواقع کاهش این آنزیم‌ها می‌تواند نشان‌دهنده سرعت‌پایین تبدیل آمینواسید باشد (۶). نتایج پیشین نشان داد محرومیت غذایی باعث کاهش آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز در ماهی شانک زرد باله (*Acanthopagrus latus*) می‌شود (۱). همچنین در مطالعه دیگری بر ماهی سیم دریایی (*Sparus aurata*) میزان آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز پس از گذشت یک هفته از محرومیت غذایی به‌صورت معناداری کاهش یافت (۲۰). محتوای پروتئین پلاسما درآبزیان، به‌عنوان شاخص ایمنی در اثر عوامل خارجی در نظر گرفته می‌شود (۲۲) و اگر عاملی بتوان کاهش محتوای پروتئین را در مقابل تنش‌های خارجی، محدود کرد، می‌توان بیان داشت از میزان تنش وارده به موجود کاسته شده است. در تیمار شاهد در آزمایش حاضر میزان پروتئین پلاسما در مقایسه با زمان قبل از تنش به‌صورت معناداری کاهش‌یافته است.کاهش معنادار پروتئین پلاسما تیمار محرومیت غذایی شانک زردباله (*Acanthopagrus latus*) نشان می‌دهد که ماهی از پروتئین پلاسما خود در طول دوره محرومیت غذایی استفاده نموده است و به‌عبارت‌دیگر به‌عنوان منبع انرژی در طول دوره محرومیت غذایی استفاده کرده است (۱). بررسی‌های انجام‌شده بر روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان حاکی از کاهش کلسترول و پروتئین خون در طول دوره گرسنگی است (۱۵). در مطالعه حاضر در تیمار شاهد میزان شاخص‌های پروتئین کل پس از تنش محرومیت غذایی به‌صورت معناداری کاهش یافت ولی در تیمار آستاگزانتین تفاوت معناداری در میزان پروتئین پلاسما پس از مواجه با محرومیت غذایی مشاهده نشد که نشان‌دهنده کاهش اثرات این تنش در تیمار آستاگزانتین است. با توجه به کاهش سطح آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) پس از محرومیت غذایی در تیمار آستاگزانتین در مقایسه با تیمار شاهد به نظر می‌رسد محرومیت غذایی باعث افزایش ROS می‌شود و آستاگزانتین توانسته توان آنتی‌اکسیدانی پلاسما خون و احتمالاً کبد را افزایش دهد و باعث کاهش میزان پر اکسیداسیون لیپیدی و حفظ چربی‌ها و پروتئین‌های پلاسما خون شود و این دلیلی است برای پایدار بودن سطح پروتئین کل پلاسما پس از دوره محرومیت غذایی در تیمار آستاگزانتین و درنتیجه دو عامل فوق به نظر می‌رسد آسیب‌های وارده به بافت کبد در اثر استفاده از آستاگزانتین در جیره کاهش پیداکرده و این امر با توجه به کمتر بودن سطح آنزیم‌های آسپارتات آمینو ترانسفراز (AST) و آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) در تیمار آستاگزانتین در زمان پس از محرومیت غذایی در مقایسه با تیمار شاهد قابل‌مشاهده است.

نتیجه گیری نهایی

به‌طورکلی می توان بیان داشت استفاده از استاگزانتین به تنهایی یا در تلفیق با نمک صفراوی در جیره غذایی ماهی پرت می تواند منجر به بهبود برخی شاخص های فیزیولوژیک پلاسمای خون این ماهی شود. همچنین نتایج نشان داد که محرومیت غذایی به مدت هفت روز با تغییر در مسیر فیزیولوژیک متابولیسم چربی ها، منجر به افزایش معنادار آنزیم‌های اکسیداتیو و کاهش سطح آنزیم‌های کبدی و پروتئین پلاسمای ماهی پرت می‌شود، بااین‌وجود می‌توان با افزودن آستاگزانتین به‌تنهایی یا تلفیق با نمک صفراوی به جیره غذایی این ماهی، اثرات منفی محرومیت غذایی را حداقل در خصوص برخی شاخص‌های موردبررسی، کاهش داد. به منظور ارزیابی دقیق تر موضوع، استفاده از یک تیمار تغذیه شده با نمک صفراوی به تنهایی در مطالعات آتی پیشنهاد می‌شود.

منابع مورد استفاده

1. Akbary, P., Rabaninejad., F. 2016. Effect of astaxanthin dietary supplementation on the crowding stress response and performance of Indian mackerel (*Rastrelliger kanagurta*). *Journal of Fisheries* 62(3): 309-322 (In Farsi).

2. Bani, A., and Vayghan, A. H. 2011. Temporal variations in hae-

www.SID.ir

Archive of SID

matological and biochemical indices of the Caspian kutum, *Rutilus frisii kutum*. *Ichthyological Research* 58(2), 126-133.

3. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 (2):248-254.

4. Callan, C.K., Laidley, C.W., Kling, L.J., Breen, N.E. and Rhyne, A.L. 2014. The effects of dietary HUFA level on flame angelfish (*Centropyge loriculus*) spawning, egg quality and early larval characteristics. *Aquaculture Research* 45(7):1176-1186.

5. Caruso, G., Denaro, R., Mancari, F., Genovese, L., Maricchiolo, G. 2011. Response to short term starvation of growth, haematological, biochemical and non-specific immune parameters in European sea bass (*Dicentrachus labrax*) and blackspot sea bream (*Pagellus bogaraveo*). *Environmental Research* 72: 46-52.

6. Evans, R. D. 2001. Physiological mechanisms influencing plant nitrogen isotope composition. *Trends in Plant Science* 6(3): 121-126.

7. Friedrich, M., Stepanowska, K. 2000. Effects of intensive culture and feeding isoprotein diets with different fat and carbohydrate contents on cortisol, total protein and protein fractions contents, and body composition and weight increments in carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings. *Academic Ichthyology* 30(1): 93-100.

8. Frigg, M., Prabucki, A. L. and Ruhdel, E. U. 1990. Effect of dietary vitamin E levels on oxidative stability of trout fillets. *Aquaculture* 84(2): 145-158.

9. Goth, L. 1991. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta-demic* 196 (2):143-151.

10. Hardy, K., Torrissen, O., Shearer, T. and Stone, F. 1990. Effects of dietary canthaxanthin level and lipid level on apparent digestibility coefficients for canthaxanthin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 88 (3):351-362.

11. Hidalgo, M.C., Exposito, A., Palma, J. 2002. Oxidative stress generated by dietary Zn-deficiency: studies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cell Biology* 34:183-193.

12. Jobling, M. 2010. Are compensatory growth and catch-up growth two sides of the same coin. *Aquaculture International* 18: 501-510.

13. Jyonouchi, H., Sun, Y., Tomita, S. and Gross, M. D. 1995. Astaxanthin, a carotenoid without vitamin A activity, augments antibody response in cultures including T-helper cell clones and suboptimal doses of antigen. *The Journal of Nutrition* 125 (10):2483.

14. Lakshman, M., Ghosh, P., Liu, Q. H. 1995. Long-term ethanol exposure impairs glycosylation of both N-and O-glycosylated proteins in rat liver. *Metabolism* 44 (7):890-898.

15. Mahboobi Soofiani, N., Hajimoradi, M., Allameh S.K. and Pilevarian, A. 2010. Effect of starvation on some of the morphological and haematological parameters of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Iranian Journal of Biology* 2: 237-234 (In Farsi).

16. Martinez-Alvarez , R. M., Morales, A. E. and Sanz, A. 2005. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. *Fish Biology and Fisheries* 15 (1):75-88.

17. Moss, M. L., Sklair-Tavron, L. and Nudelman, R. 2008. Drug insight: tumor necrosis factor-converting enzyme as a pharmaceutical target for rheumatoid arthritis. *Nature Rheumatology* 4 (6):300-312.

18. NRC, 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp. National Academies Press, Washington, DC.pp: 125-129

19. Olsvik, P. A., Kristensen, T., Waagbo. R., Rosseland. B. O., Tollefsen, K-E., Baeverfjord, G. and Berntssen G. 2005. mRNA expression of antioxidant enzymes (SOD, CAT and GSH-Px) and lipid peroxidative stress in liver of Atlantic salmon *(Salmo salar*) exposed to hyperoxic water during smoltification. *Toxicology and Pharmacology* 141(3): 314-323.

20. Peres, H., Santos, S. and Oliva-Teles, A. 2014. Blood chemistry profile as indicator of nutritional status in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Physiology and Biochemistry* 40: 1339-1347.

21. Rasmussen, R.S., Ostenfeld, T.H. 2000. Effect of growth rate quality traits and feed utilization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Aquaculture* 184: 327-337.

22. Singh, R.K. and Sharma, B. 1998. Carbofuran induced biochemical changes in Clarias batrachus. *Management Science* 53 (4):285-290.

23. Yang, H., Mu, X., Luo, D., Hu, Y., Song, H., Liu, C. J. 2012. Sodium taurocholate, a novel effective feed additive for promoting absorption and pigmentation of astaxanthin in blood parrot (*Cichlasoma synspilum*♀× *Cichlasoma citrinellum*♂). *Aquaculture* 350:42-45.

www.SID.ir