

"مقاله پژوهشی"

آنزیم‌های سرم خون و سیستم آنتی‌اکسیدانی کبد ماهیان کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) تغذیه شده با سطوح مختلف مخمر نانویی (*Saccharomyces cerevisiae*)

پریا اکبری^{*}

۱. گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۵/۳۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۹

چکیده

اخیرا استفاده از پروبیوتیک‌ها به منظور افزایش سلامت و ایمنی آبزیان مورد توجه قرار گرفته است. لذا هدف از مطالعه حاضر، بررسی تاثیر سطوح مختلف مخمر نانویی (*Saccharomyces cerevisiae*) بر آنزیم‌های سرم خون (آلکالین فسفاتاز (ALP)، آسپاراتات اسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT)) و سیستم آنتی‌اکسیدانی کبد (سوپراکسیداز دیسموتاز (SOD)، گلوکاتیون پراکسیداز (GPX)، مالون‌دی‌آلدئید (MDA) و کاتالاز (CAT)) ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) به مدت ۶۰ روز بود. این آزمایش به صورت طرح کاملا تصادفی در قالب ۴ تیمار و هر یک در ۳ تکرار طراحی شد. مخمر ساکارمایسیس سرروزیا در ۳ سطح ۲، ۴ و ۶ درصد وزن غذا به جیره غذایی پایه اضافه شد. همچنین یک تیمار بدون افزودن مخمر بعنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شد. ماهیان کفال-خاکستری با وزن اولیه ۵/۵۶ گرم به صورت تصادفی در ۱۲ مخزن فایبر گلاس ۶۰ لیتری با تعداد ۲۰ قطعه ماهی در هر مخزن توزیع شدند. در پایان دوره آزمایش، نتایج نشان داد که بیشترین فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و کمترین فعالیت آنزیم‌های ALT و ALP و میزان MDA در تیمار حاوی ۶ درصد مخمر مشاهده شد که با بقیه تیمارها دارای تفاوت معنی‌دار بود ($P < 0.05$). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که مخمر مایسیس سرروزیا اثرات مطلوبی بر میزان فعالیت آنزیم‌های سرم خون و سیستم آنتی‌اکسیدانی کبد ماهی کفال خاکستری دارد.

کلمات کلیدی: ماهی کفال خاکستری، مخمر ساکارمایسیس سرروزیا، سیستم آنتی‌اکسیدانی، آنزیم‌های کبد

مقدمه

آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز و آسپاراتات آمینوترانسفراز از خانواده ترانس آمینازها در ماهیان، در بافت کبد تغلیظ می‌شوند و مقادیر آن‌ها در بیماری نکروتیک حاد کبد در اثر تماس با سموم کبدی افزایش می‌یابد. در بیماری‌های حاد کبدی که منجر به ایجاد صدمات غشایی یا نکروز سلولی می‌شوند، فعالیت آمینوترانسفراز در سرم خون به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد (Akrami et al., 2015). آلکالین فسفاتاز آنزیمی است که دارای انواع استخوانی، روده‌ای و کبدی است. میزان این آنزیم در بیماری حاد کبدی افزایش می‌یابد و به محض گذر از مرحله حاد سطح سرمی آن به ناگهان کاهش می‌یابد (Soochan et al., 2012).

مطالب زیادی در زمینه دخالت استرس اکسیداتیو در زمینه تعدادی از بیماری‌های دامی و انسانی وجود دارد (Hoeschen, 1997; Ames et al., 1998; Lykkesfeldt and Svendsen, 2007). ماهی‌ها همانند تمام موجودات خشکی‌زی به‌خاطر مقادیر بالای اسید-های چرب اشباع‌نشده، به‌طور خاص مستعد روبه‌رو شدن با انواع رادیکال‌های آزاد هستند. برخی از بیماری‌های ماهی، مانند دیستروفی عضلانی، همولیز شدن، و یرقان تحت تاثیر آسیب اکسیداتیو به بافت ایجاد می‌گردند (Santacroce et al., 2012). فرم فعال اکسیژن (Reactive Oxygen species ROS) یکی از انواع رادیکال‌های آزاد است که در شرایط نامتعادل واکنش‌های اکسیداسیون و احیای درون سلولی تولید می‌شود که قدرت اکسیدکنندگی بالا و توانایی زیادی جهت آسیب زدن به اجزای حیاتی سلول از قبیل لیپید-ها، DNA، پروتئین‌ها و آنزیم‌ها دارند (Agarwal and

Sekhon, 2010). علی‌رغم وجود آنتی‌اکسیدان‌های مختلف در بدن، سیستم دفاعی بدن به تنهایی قادر به از بین بردن رادیکال‌های آزاد ایجاد شده در بدن نیست به‌همین جهت نیاز به تامین آنتی‌اکسیدان از منابع خارجی دارد که از طریق مواد غذایی تامین می‌شود (Tovar-Ramírez et al., 2010).

در سال‌های اخیر از مخمر به‌دلیل ارزش غذایی آن از قبیل پروتئین‌ها، ویتامین‌ها، رنگدانه‌ها و کربو هیدرات‌های بسیار پیچیده، برای مثال بتا - ۱، ۳ گلوکان، تری هالوز، مانان به‌عنوان مواد غذایی برای انسان و حیوانات استفاده شده است (Ravindra, 2000) مان‌های مخمر به‌عنوان محرک ایمنی دارای خاصیت ضد توموری هستند و منجر به تحریک فعالیت ماکروفاژها می‌شود (Nakano et al., 1999). هر هر چند تحقیقات متعددی در زمینه اثر انواع گونه مخمر بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی ماهی، از جمله مخمر قرمز (*Phaffia rhodozyma*) در ماهی قزل‌آلای رنگین-کمان (*Oncorhynchus mykiss*) (Nakano et al., 1999) مخمر زنده *Debaryomyces hansenii* در ماهی هامور (*Mycteroperca rosacea*) (Debaryomyces et al., 2008) مخمر نانویی (*Saccaromyces cerevisiae*) در ماهی باس دریایی (*Dicentrarchus labrax*) (Tovar-Ramírez et al., 2010; Santacroce et al., 2012) و بر میزان فعالیت آنزیم-های سرم خون از جمله مخمر ساکارمایسیس سروزی بر ماهی تیلپیا (*Sarotherodon galilaeus*) (Abdel-Tawwab et al., 2010) و فیل ماهی (*Huso huso*) (Hassanpour Fatahi et al., 2014) صورت گرفته است. با این حال اطلاعات محدودی در زمینه اثر مخمر ساکارومایسیس سروزی به‌عنوان پروبیوتیک بر آنزیم-

های سرم خون و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی ماهی وجود دارد.

ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) متعلق به خانواده کفال ماهیان (*Mugilidae*) یکی از ماهیان استخوانی دریایی با ارزش تجاری بالا است که قادر به تحمل دامنه وسیعی از شوری و درجه حرارت می‌باشد و به‌صورت نیمه‌متراکم در استخرها پرورش داده می‌شود (Balamurrgan and Munuswami, 2017). این گونه به دلیل دارا بودن شرایط مناسب جهت پرورش، ضریب رشد خوب، ضریب تبدیل غذایی مناسب، بازارپسندی عالی، امکان پرورش با سایر گونه‌ها یکی از بهترین گونه‌های ماهیان دریایی پرورشی در سراسر جهان به‌شمار می‌آید (Rostami et al., 2015). کفال ماهیان عموماً دتريت‌خوار بوده و قدرت تبدیل این مواد را به پروتئین دارند. مقاوم بودن این ماهیان در برابر تغییرات شوری و تغذیه در سطوح پایین هرم غذایی، موجب شده تا آن‌ها را به‌عنوان گونه‌ای بسیار ممتاز و یک منبع پروتئین حیوانی ارزان قیمت که برای پرورش در شرایط مناسب می‌باشند، معرفی نماید (Dahhar et al., 2014). از طرف دیگر، وجود منابع آب شور و لب شور فراوان در نواحی ساحلی شمال و جنوب و استان‌های مرکزی و همچنین زمین‌های نامرغوب و کم‌بازده از نظر کشاورزی که برای پرورش این گونه مناسب تشخیص داده شده است (Rostami et al., 2015).

اولین گام در تشخیص آسیب کبدی انجام آزمایش ساده خون است که حضور آنزیم‌های خاص را نشان می‌دهد. تحت شرایط عادی این آنزیم‌ها درون سلول‌های کبدی وجود دارند اما زمانی که کبدی آسیب می‌بیند این آنزیم‌ها وارد جریان خون می‌شوند. حساسترین و پرمصرف‌ترین آنزیم‌های کبدی

آمینوترانسفرازها هستند (Ahmed and Khater 2001; Kumar et al., 2004). سنجش آنزیم‌های کبدی از جمله آلکالین فسفاتاز (ALP)، آسپارات-آمینوترانسفراز (ASP) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) برای بررسی وضعیت تغذیه‌ای، سیستم عروق و عملکرد کبد در ماهی‌ها از ارزش تشخیصی قابل توجهی برخوردار است (Kumar et al., 2004). موجودات زنده سیستم آنتی‌اکسیدانی پیچیده‌ای جهت مقابله با گونه‌های فعال رادیکال‌های آزاد و کاهش مخرب آن‌ها دارند. سیستم آنتی‌اکسیدانی به‌صورت سیستم دفاعی آنزیمی و غیرآنزیمی عمل می‌کنند (Morales et al., 2004). آنزیم‌ها دفاع آنتی‌اکسیدانی شامل سوپر-اکسید دیسموتاز (Super Oxide Dismutase (SOD))، کاتالاز (catalase (CAT)) اشاره کرد که به‌همراه دیگر آنزیم‌ها مجموعه‌ای از دفاع آنتی‌اکسیدانی سلولی را تشکیل می‌دهند و نقش حذف رادیکال‌های آزاد را بر عهده دارند علی‌رغم وجود آنتی‌اکسیدان‌های مختلف در بدن، سیستم دفاعی بدن به تنهایی قادر به از بین بردن رادیکال‌های آزاد ایجاد شده در بدن نیست به‌همین جهت نیاز به تامین آنتی‌اکسیدان از منابع خارجی دارد که از طریق مواد غذایی تامین می‌شود (Vettrivel et al., 2013).

تحقیق حاضر برای ارزیابی اثر مخمر ساکارمایسیس سروژیا در سطوح مختلف بر آنزیم‌های سرم خون و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی ماهی کفال خاکستری طراحی شد.

مواد و روش‌ها

ماهی و شرایط پرورش

این تحقیق در سالن مرکز تحقیقات شیلات آب‌های دور چابهار در قالب طرح کاملاً تصادفی در آذرماه ۱۳۹۵، با ۴ تیمار و سه تکرار به مدت ۶۰ روز انجام گرفت. ماهیان مورد استفاده در این مطالعه، از سواحل چابهار صید و پس از سازگاری اولیه (۲ هفته)، تعداد ۲۰ قطعه ماهی به ازای هر تکرار، در مخازن فایبر گلاس ۶۰ لیتری با میانگین وزنی $5/56 \pm 0/65$ گرم و طولی $3/40 \pm 0/49$ سانتی متر ذخیره‌سازی شدند. جیره غذایی مورد استفاده در این مطالعه، جیره تجاری ساخت شرکت هوراش تولید غذای میگو و آبزیان بوشهر با سائز $1/2$ میلی‌متر (۳۹ درصد پروتئین، ۷ درصد چربی، ۸ درصد خاکستر و ۵ درصد رطوبت) بود که ماهیان در طول دوره آزمایش، روزانه به میزان ۵ درصد وزن بدن طی دو مرحله (ساعت ۹ و ۱۷) تغذیه شدند (Sudagar et al., 2004). مخمر ساکارمایسیس سروریا سویه الیسوئیدوس (*Saccharomyces cerevisiae* var ellipsoidous) با نام تجاری Amax (تپاکس ایران) تهیه شده از شرکت داکسال ایتالیا وارداتی شرکت داروسازان ایران، در سطوح ۲، ۴ و ۶ درصد وزن غذا از طریق روغن ماهی کاد (۳۲ میلی‌لیتر به ازای هر کیلوگرم غذا) پوشش دار و سوسپانسیون حاوی مخمر و روغن ماهی کاد به غذا اسپری شد و به جیره غذایی تیمار شاهد، تنها روغن ماهی کاد اسپری شد (Chang and Liu, 2002; Wache et al., 2006).

بقایای مواد غذایی با استفاده از سیفون با دقت از مخازن روزانه پیش از غذادهی جمع‌آوری می‌شد. طول مدت روشنایی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در نظر گرفته شد. درجه حرارت آب $28/45 \pm 0/78$

درجه سانتی‌گراد و pH آب $7/5-7/9$ بود و در طول دوره آزمایش، میزان اکسیژن محلول آب ۸ میلی‌گرم بر لیتر نگه داشته شد. آب مورد نیاز پرورش از دریا با شوری ۳۵ گرم بر لیتر پمپاژ شد و به کارگاه انتقال داده شد.

خون‌گیری و سنجش آنزیم‌های سرم خون

در پایان دوره آزمایش (روز ۶۰)، ۲۴ ساعت پس از قطع غذا به صورت تصادفی از ۳ ماهی هر تکرار پس از بیهوشی (۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره گل میخک) (Velisek et al., 2005) از رگ ساقه دمی آن‌ها خون‌گیری صورت گرفت و خون جمع‌آوری شده از هر تکرار به میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری بدون هپارین منتقل گردید. سپس با استفاده از سانتریفیوژ (مدل Hettich, DV200، ژاپن) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه سرم آن جدا و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Jalali hajiabadi et al., 2009). علیزاده رودپشتی و همکاران، ۱۳۹۶، اکبری و همکاران، ۱۴۰۰.

سنجش آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) در طول موج ۵۰۵ نانومتر و آلکالین فسفاتاز (ALP) در طول موج ۴۱۰ نانومتر توسط روش Liu و همکاران (۲۰۱۶) صورت گرفت.

نمونه‌برداری کبد و سنجش سیستم آنتی اکسیدانی

در پایان دوره آزمایش (روز ۶۰)، ۱۸ ماهی از هر تیمار (۶ ماهی از هر تکرار) بعد از ۲۴ ساعت قطع غذا به صورت تصادفی صید و پس از بیهوش نمودن با پودر گل میخک (۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) (Santacroce et al., 2012)، برای تعیین میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی

اکسیدانی کبدی و میزان گلوکاتایون احیاء سریعاً در مجاورت یخ (به‌منظور به‌حداقل رساندن تغییر فعالیت آنزیمی) کالبدشکافی آن‌ها صورت گرفت و کبد آن‌ها با دقت جدا شد و بلافاصله در شرایط انجماد در دمای -20°C - درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Chong et al., 2002). بافت کبد با نسبت (۱:۱۰ حجم / وزن) در بافر پتاسیم فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار EDTA، ۰/۱۵ میلی‌مولار KCL، ۰/۱ میلی‌مولار فلوراید سولفونیل متیل فنیل (PMSF) و ۱ میلی‌مولار دی‌تیوتریتول (DTT) با PH ۷/۴ هموژن شد. برای اندازه‌گیری میزان مالون دی‌آلدئید نیمی از نمونه هموژن شده هر تیمار، به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۸۰۰ برای حذف سلول‌های شکسته نشده در دمای 4°C - درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و برای سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نیمی دیگر نمونه‌های هموژن شده در دور ۶۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و سوپر ناتانت‌های تهیه شده از هر دو طریق سانتریفیوژ به ترتیب برای سنجش میزان مالون دی‌آلدئید و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و مورد استفاده قرار گرفتند (Santacroce et al., 2012).

سنجش فعالیت آنزیم سوپر اکسیداز دیسموتاز طبق روش Misra (۱۹۸۵)، با استفاده از کیت ارزیابی این آنزیم بر اساس دستورالعمل سازنده آن (راندوکس، انگلیس) در طول موج ۵۰۵ نانومتر صورت گرفت. سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) در دیسموتاسیون رادیکال سمی O_2^- تولید شده در طی مراحل اکسیداتیو انرژی به O_2 و H_2O_2 شرکت می‌کند. در این روش از گزانتین و گزانتین اکسیداز (XOD) جهت تولید رادیکال‌های سوپر اکساید استفاده می‌شود که با Int (فنیل‌تترازولیوم کلراید - ۵ - (نیتروفنل - ۴ -) - ۳ - (یدوفنل - ۴ -) واکنش می‌دهند و رنگ قرمز

فورمازون تولید می‌شود که در طول موج ۵/۵ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. در صورت وجود آنزیم SOD در نمونه رادیکال‌های سوپراکسید به پراکسید هیدروژن و O_2 تبدیل شده و از ایجاد رنگ قرمز فورمازون ممانعت می‌شود و فعالیت آنزیم SOD بوسیله درجه ممانعت از این واکنش تعیین می‌شود. یک واحد SOD باعث مهار ۵۰ درصد سرعت احیا Int یا مهار ۵۰ درصد مقدار اکسیداسیون NADPH تحت غلظت‌های اندازه‌گیری می‌باشد. و مقدار آنزیم در بافت به صورت واحد بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد. سنجش آنزیم کاتالاز طبق روش Clairborne (۱۹۸۵) صورت گرفت اساس واکنش در این روش هیدروژن پراکساید توسط آنزیم کاتالاز به آب و اکسیژن تجزیه می‌شود که در طول موج ۲۴۰ نانومتر به روش اسپکتروفتومتری تجزیه H_2O_2 مستقیماً با کاهش جذب همراه است. یک واحد فعالیت آنزیمی عبارت است از مقدار آنزیمی که باعث تولید یک میلی‌مول H_2O_2 در دقیقه در یک غلظت ابتدایی ۱۰ میلی‌مول در لیتر در $\text{pH}=7/4$ در دمای 37°C - درجه سانتی‌گراد می‌شود. و مقدار آنزیم در بافت به صورت واحد بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد. سنجش فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز مطابق روش Lawrence و Burk (۱۹۷۶) صورت گرفت. آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز واکنش اکسیداسیون گلوکاتایون (GSH) را توسط کومن هیدروپراکسید (Cumene Hyroperoxide) کاتالیز می‌نماید. در حضور آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز و NADPH، گلوکاتایون اکسید شده (GSSG) مجدداً به گلوکاتایون احیاء تبدیل می‌شود که این احیاء با اکسیداسیون همزمان ADPH به NADP^+ همراه است. در این واکنش کاهش جذب نوری در طول موج ۳۴۰ نانومتر

اندازه گیری می شود. سنجش مالنون دی آلدئید توسط روش Buege و Aust (۱۹۷۸) صورت گرفت. به ۱ میلی لیتر از سوپرناتانت حاصل ۱ میلی لیتر تری-کلرواستیک اسید ۲۰ درصد (وزنی به حجمی) در ۰/۶ مولار اسید کلریدریک افزوده، و پس از مخلوط کردن، در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد در دور ۲۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. ۰/۳ میلی لیتر از محلول ۰/۱۲ مولار تیوباربتوریک اسید در ۰/۲۶ مولار تریس با اسیدیته ۷ را به ۱/۵ میلی لیتر از محلول رویی سانتریفیوژ شده افزوده و و سپس در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد و پس از سرد شدن در مجاورت یخ، جذب نمونه ها در طول موج ۵۳۵ نانومتری قرائت شد و نتایج بر حسب واحد مالون دی-آلدئید بر حسب میلی گرم پروتئین بیان شد.

تجزیه و تحلیل های آماری

ارزیابی تغییرات متغیرهای بین تیمارهای تحت مطالعه، از طریق آزمون تجزیه واریانس یک طرفه (one way analysis of variance ANOVA) و مقایسه میانگین بین تیمارها بر اساس آزمون چند دامنه ای

جدول ۱. مقایسه میانگین (میانگین $\pm$ خطای معیار) آنزیم های سرم خون ماهی کفال خاکستری در تیمارهای مختلف

فعالیت آنزیم های سرم خون (واحد بر لیتر)	تیمار			
	۱	۲	۳	۴
آلانین آمینوترانسفراز (ALT)	۴/۲۵ $\pm$ ۰/۱۲ ^a	۳/۸۵ $\pm$ ۰/۱۵ ^b	۳/۶۱ $\pm$ ۰/۱۲ ^c	۳/۲۰ $\pm$ ۰/۱۲ ^d
آسپارات آمینوترانسفراز (AST)	۴۵/۳۳ $\pm$ ۲/۰۸ ^a	۴۳ $\pm$ ۲/۶۴ ^{ab}	۴۱/۳۳ $\pm$ ۲/۰۸ ^c	۴۱/۱۶ $\pm$ ۱/۷۶ ^c
آلکالین فسفاتاز (ALP)	۳۳۶ $\pm$ ۱۵/۲۵ ^d	۳۲۶ $\pm$ ۱۰ ^b	۳۱۸ $\pm$ ۰/۱۲ ^c	۳۱۰ $\pm$ ۱۱ ^d

وجود حروف غیر همسان در هر ردیف نشانه اختلاف معنی دار است ($P < ۰/۰۵$).

سنجش سیستم آنتی اکسیدانی کبد

بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)، مالون دی آلدئید (MDA) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در تیمار ۴ مشاهده که اختلاف معنی داری را با سایر تیمارها نشان داد

دانکن در سطح معنی دار ۵ درصد استفاده شد. با استفاده از تست کالموگراف اسمیرنوف نرمال بودن داده ها و از تست لون برابری واریانس ها استفاده شد تجزیه و تحلیل کلیه داده ها توسط نرم افزار SPSS ویرایش ۱۹ صورت گرفت و جهت محاسبات آماری از نرم افزار Excel ویرایش ۲۰۱۰ استفاده شد.

نتایج

آنزیم های سرم خون

با افزایش میزان مخمر در جیره غذایی میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و آلانین آمینو ترانسفراز کاهش معنی داری را در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد و بین سایر تیمارها این اختلاف معنی دار بود ($P < ۰/۰۵$) (جدول ۱). کمترین میزان فعالیت آنزیم آسپارات آمینوترانسفراز در تیمار ۳ و ۴ مشاهده شد که اختلاف معنی داری را با تیمار ۲ و شاهد نشان دادند ($P < ۰/۰۵$) ولی از نظر میزان فعالیت آنزیم آسپارات آمینوترانسفراز بین تیمار ۳ و ۴ اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($P > ۰/۰۵$) (جدول ۱).

($P < ۰/۰۵$). همچنین بیشترین فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز در تیمار ۳ و ۴ مشاهده شد که اختلاف معنی داری را با تیمار ۲ و شاهد نشان داد ($P < ۰/۰۵$) (جدول ۲).

جدول ۲. مقایسه میانگین (میانگین $\pm$ خطای معیار) سیستم آنتی اکسیدانی ماهی کفال خاکستری در تیمارهای مختلف

سیستم آنتی اکسیدانی (واحد بر میلی لیتر)	تیمار			
	۱	۲	۳	۴
سوپر اکسیداز دیسموتاز (SOD)	۱۲۷/۲۶ $\pm$ ۱۱/۱۲ ^c	۱۲۹ $\pm$ ۱۴/۰۲ ^c	۱۳۵/۶۶ $\pm$ ۱۲/۵۱ ^b	۱۴۵/۳۳ $\pm$ ۱۶/۱۲ ^a
گلوکاتیون پراکسیداز (GPX)	۸۰۰ $\pm$ ۲۰/۱۲ ^c	۸۲۸/۶۶ $\pm$ ۲۸/۰۸ ^b	۸۶۰ $\pm$ ۱۵/۱۷ ^a	۸۷۱/۶۶ $\pm$ ۱۱/۵۲ ^a
مالون دی آلدئید (MDA)	۵/۸۲ $\pm$ ۰/۵۲ ^d	۶/۳۶ $\pm$ ۰/۳۳ ^c	۷/۰۶ $\pm$ ۰/۲۵ ^b	۷/۷۴ $\pm$ ۰/۲۲ ^a
کاتالاز (CAT)	۳۶۷/۳۳ $\pm$ ۱۷/۷۴ ^d	۳۸۲ $\pm$ ۱۵/۲۹ ^c	۳۹۹/۳۳ $\pm$ ۱۰/۰۶ ^b	۴۱۴/۱۶ $\pm$ ۱۴/۱۶ ^a

وجود حروف غیر همسان در هر ردیف نشانه اختلاف معنی دار است ($P < 0.05$).

بحث

سنجش فعالیت این آنزیم‌ها از اهمیت زیادی در بررسی وضعیت سلامتی ماهی برخوردار است (Satheeshkumar *et al.*, 2012). آنزیم‌های ALT، AST و ALP در میتوکندری سلول‌ها به‌ویژه سلول‌های کبدی قرار دارند لذا هرگونه التهاب یا آسیب سلول‌های کبدی منجر به رهاسازی این آنزیم‌ها و افزایش سطح این آنزیم‌ها در سرم می‌شود (Dadras *et al.*, 2016). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که میزان فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز (ALP) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) با افزایش غلظت مخمر ساکارمایسیس سروزیا در جیره غذایی ماهی کفال خاکستری کاهش معنی‌داری پیدا کردند به‌طوری‌که در تیمار حاوی ۶ درصد مخمر ساکارمایسیس سروزیا کمترین مقادیر فعالیت این آنزیم‌ها مشاهده شد و بین همه تیمارها از نظر فعالیت آنزیم‌های مذکور این اختلاف معنی‌دار بود. کمترین میزان فعالیت آنزیم

آسپارات آمینوترانسفراز نیز در تیمار ۳ و ۴ مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری را با سایر تیمارها نشان دادند. در تایید نتایج این تحقیق، Hassanpour Fatahi و همکاران (۱۳۹۳) مشاهده نمودند که استفاده از سطوح مختلف مخمر ساکارمایسیس سروزیا ($10^6 \times 2$ و $10^6 \times 4$ و 6×10^6 سلول در گرم غذا) در جیره غذایی فیل ماهی (*Huso huso*) سبب کاهش معنی‌دار میزان فعالیت آنزیم‌های ALT و ALP در مقایسه با تیمار شاهد شد. می‌توان گفت که کاهش سطح فعالیت این آنزیم‌ها در سرم ماهیان تحت تاثیر مخمر ساکارمایسیس سروزیا به‌عنوان پروبیوتیک، نشان دهنده وضعیت سلامتی بافت‌های کفال ماهیان و دلیلی بر عملکرد مناسب کبد می‌باشد (SeyhaneyildizCan *et al.*, 2014). مغایر با نتایج حاصل از این تحقیق، Abdel-Tawwab و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که هر چند استفاده از ۱۰ گرم مخمر ساکارمایسیس سروزیا زنده در جیره غذایی تیلاپیا (*Sarotherodon galilaeus*) تاثیر معنی‌داری را بر میزان فعالیت آنزیم-

های AST و ALT نداشت ولی این موضوع نشان داد که استفاده از مخمر ساکارمایسیس سروزیا فاقد اثرات سمی برای ماهی تیلپیا است همچنین آن‌ها گزارش نمودند که بعد از آلودگی ماهی تیلپیا با مس استفاده از مخمر ساکارمایسیس سروزیا در جیره غذایی ماهی تیلپیا منجر به کاهش معنی‌دار میزان فعالیت آنزیم AST و ALT شد و مقاومت ماهی را در برابر آلودگی با مس افزایش داد. همچنین SeyhaneyildizCan و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که استفاده از پروبیوتیک کفیر (Kefir) در سطوح مختلف (۱۰، ۲۰ و ۴۰ گرم بر کیلوگرم غذا) در جیره غذایی ماهی سالمون کوهو (*Salmo corhensis*) منجر به افزایش میزان فعالیت آنزیم‌ها ALT و AST در مقایسه با شاهد شد ولی این اختلاف معنی‌دار نبود که با نتایج حاصل از این تحقیق همخوانی نداشت. می‌توان گفت که عواملی نظیر میزان مخمر در جیره غذایی، مدت زمان استفاده از آن و نوع گونه ماهی می‌تواند در نتایج به‌دست آمده تاثیرگذار باشد.

آنزیم‌های آنتی اکسیدانی نقش اساسی در کنترل آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد داشته و کنترل فعالیت آن‌ها سلول‌ها و بافت‌ها را در برابر فشار استرس اکسیداتیو محافظت می‌نماید (Reda et al., 2018). سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) سوپر اکسید (O_2^-) را به اکسیژن مولکولی (O_2) یا پراکسید هیدروژن (H_2O_2) تبدیل می‌کند. گلووتاتیون پراکسیداز در برابر استرس اکسیداتیو سلول‌ها را از طریق غیر فعال سازی و دفع

گاز هیدروژن و پراکسیداسیون لیپید محافظت می‌کند. مالون دی‌آلدئید یکی از محصولات اسیدهای چرب اشباع شده است که به عنوان شاخص مناسبی برای پراکسیداسیون لیپید و استرس اکسیداتیو در نظر گرفته شده است (Hayyan et al., 2016). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که بیشترین میزان فعالیت آنزیم‌های GPX و CAT و کمترین میزان MDA در تیمار حاوی ۶ درصد مخمر ساکارمایسیس سروزیا مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری را با سایر تیمارها نشان داد و بیشترین فعالیت آنزیم SOD در تیمار حاوی ۴ و ۶ درصد مخمر ساکارمایسیس سروزیا مشاهده شده اختلاف معنی‌داری را بین آن‌ها از این نظر مشاهده نشد. Xu و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که استفاده از ۰/۶ و ۱/۲ گرم نوکلئوتید مستخرج شده از مخمر ساکارمایسیس سروزیا بر کیلوگرم غذا منجر به افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم SOD و کاهش معنی‌دار میزان MDA در سرم خون ماهی تیلپای هیبرید (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) در مقایسه با تیمار شاهد شد که با نتایج این تحقیق همخوانی داشت. می‌توان گفت که استفاده از مخمر ساکارمایسیس سروزیا در جیره غذایی ماهی کفال خاکستری می‌تواند منجر به تقویت سیستم دفاع آنتی اکسیدانی کبد آن‌ها شود. Meng و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که استفاده از ۰/۱۵ تا ۳ گرم نوکلئوتید مستخرج شده از مخمر ساکارمایسیس سروزیا بر کیلوگرم غذا منجر به افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم گلووتاتیون پراکسیداز در ماهی

منابع

۱. اکبری، ح.، حسینی شکری، س.پ.، سلطانی، م.، شمسانی مهرجان، م.، ۱۴۰۰. تاثیر مقادیر مختلف پروبیوتیک *Enterococcus faecium* بر برخی شاخص‌های ایمنی سرم خون و موکوس پوست بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). نشریه توسعه آبی‌پروری، ۱۵(۲)، ۲۶-۱۵.
۲. عزیززاده رودپشتی، م.، شناور ماسوله، ع.، خلیل پور، ح.، معصوم زاده، م.، بازاری مقدم، ل.، یگانه، ه.، عزیززاده، ل.، ۱۳۹۶. اثر اتروکوکوس فکالینس به عنوان پروبیوتیک بر شاخص‌های خونی و سرمی بچه تاس ماهی ایرانی *Acipenser persicus* نشریه توسعه آبی‌پروری، ۱۱(۱)، ۸۳-۱۰۳.
3. Abdel-Tawwab, M., Mousa, M.A.A. and Mohammed, M.A., 2010. Use of Live Baker's Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, in Practical Diet to Enhance the Growth Performance of Galilee Tilapia, *Sarotherodon galilaeus* (L.), and Its Resistance to Environmental Copper Toxicity. Journal of the World Aquaculture Society, 41, 214-223.
4. Agarwal, A. and Sekhon, L., 2010. The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. Human Fertility, 13, 217-225.
5. Ahmed, M.B. and Khater, M.R. 2001. Evaluation of protective potential of Ambrosia martimia extract on acetaminophen-induced liver damage, Journal of ethnopharmacology, 75(2-3), 169-74.
6. Akrami, R., Gharaeib, A., Razeghi Mansour, M. and Galeshi, A., 2015. Effects of dietary onion (*Allium cepa*) powder on growth, innate immune response and hemato-biochemical parameters of beluga (*Huso huso* Linnaeus, 1754) juvenile. Fish and Shellfish Immunology, 45, 828-834.
7. Ames, B.N., Gold, L.S. and Willett, W.C., 1998. The causes and prevention of cancer. The role of environment. Biotherapy, 11, 205-220.
8. Balamurugan, R., Munuswami, N., 2017. Cryopreservation of sperm in Grey mullet

توربوت (*Scophthalmus maximus*) در مقایسه با تیمار شاهد شد و کمترین میزان فعالیت مالون دی آلدئید در تیمار حاوی ۰/۳ گرم نوکلئوتید مخمر بر کیلوگرم غذا شد که با نتایج حاصل از این تحقیق همخوانی داشت. در حالی که استفاده از نوکلئوتید مخمر بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در ماهی توربوت تاثیر معنی‌داری نداشت که با نتایج این تحقیق همخوانی نداشت.

با توجه به بررسی فعالیت آنزیم‌های سرم خون و سیستم آنتی‌اکسیدانی کبد ماهی کفال خاکستری تغذیه شده با سطوح مختلف مخمر ساکارومایسیس سروریا استفاده از ۶ درصد مخمر ساکارومایسیس سروریا در جیره غذایی به منظور بهبود فعالیت آنزیم‌های کبدی (ALT، ALP و AST) و تقویت سیستم دفاع آنتی اکسیدانی کبد کفال ماهیان توصیه می‌گردد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از همکاری ریاست و پرسنل محترم مرکز تحقیقات شیلات چابهار به دلیل فراهم آوردن امکانات پژوهش و کارشناسان محترم آزمایشگاه تخصصی پاتوبیولوژی صدف چابهار و شرکت میزان سنجش پاسارگاد تهران تشکر و قدردانی می‌گردد.

18. Jalali hajiabadi, M. A., Sadeghi, A. A., Mahbobi sofiyani, N., Chamani, M. and Riyazi, Gh., 2009. The effect of dietary L-carnitine supplementation on blood factors and growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Agriculture Science and Natural resource, 47, 105-115.
19. Kumar, S., Sahu, N. P., Pal, A. K., Choudhury, D., Yengkokpam, S. and Mukherjee, S. C. 2005. Effect of dietary carbohydrate on haematology, respiratory burst activity and histological changes in *Labeo rohita* juveniles. Fish and Shellfish Immunology, 19(4), 331 - 344.
20. Lawrence, R.A. and Burk, R.F. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficiency rat liver biochemical and biophysics research communications, 71, 952-958.
21. Liu, F., Shi, H., Guo, Q., Yu, Y., Wang, A., Lv, F. and Shen, W., 2016. Effects of astaxanthin and emodin on the growth, stress resistance and disease resistance of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). Fish and Shellfish Immunology, 51, 125-135.
22. Lykkesfeldt, J. and Svendsen, O., 2007. Oxidant and antioxidant in disease: oxidative stress in farm animals. Veterinary Journal, 173, 502-511.
23. Meng, Y., Ma, R., Ma, J., Han, D., Xu, W. and Zhang, W., 2017. Dietary nucleotides improve the growth performance, antioxidative capacity and intestinal morphology of turbot (*Scophthalmus maximus*). Aquacult. Nutr, 23 (2017) 585-593.
24. Misra, H.P., 1985. Adrenochrome assay. In: Greenwald RA (ed) Handbook of methods for oxygen radical research. CRC Press, Boca Raton, pp, 237-241.
25. Morales, A.E., Pérez-Jiménez, A., Hidalgo, M.C., Abellán, E. and Cardenete, G., 2004. Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in Dentex dentex liver. Comparative Biochemistry and Physiology, 139, 153-161.
26. Nakano, T., Kanmuri, T., Sato, M. and Takeuchi, M., 1999. Effect of astaxanthin rich red yeast (*Phaffia rhodozyma*) on oxidative stress in rainbow trout. Biochemistry Biophysic Acta, 1426, 119-125.
- Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758). Animal reproduction science, 185, 205-203.
9. Buege, J.A. and Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. Methods in Enzymology, 52, 302-310.
10. Chang, C.I.W. and Liu, W.Y., 2002. An evaluation of two bacterial strains, *Enterococcus faecium* SF68 and *Bacillus toyoi*, for reducing *Edwardsiella* in cultured European eel, *Anguilla anguilla* L. Journal of Fish Diseases, 25, 311-315.
11. Chong, A.S.C., Hashim, R. M., Chow-Tang, L. and Ali, A. B., 2002. Partial characterization and activities of protease from the digestive tract of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*). Aquacultur, 203, 321-331.
12. Clairborne, A., 1985. Catalase activity. In: Greenwald RA (ed) CRC handbook of methods for oxygen radical research. CRC Press, Boca Raton, pp, 283-284.
13. Dadras, H., Hayatbakhsh, M.R., Shelton, W.L. and Golpour, A., 2016. Effects of dietary administration of Rose hip and Safflower on growth performance, haematological, biochemical parameters and innate immune response of Beluga, *Huso huso* (Linnaeus, 1758). Fish and Shellfish Immunology, 59, 109-114.
14. Dahhar A.A., Salama M.E., Moustafa, Y.T. and Elmorshedy, E.M., 2014. Effect of using Equal Mixture of Seaweeds and Marine Algae in Striped Mullet (*Mugil Cephalus*) Larval Diets on Growth Performance and Feed Utilization. Journal of the Arabian Aquaculture Society, 9(1), 145-160.
15. Hassanpour Fatahi, A., Jafarian, H., Khosravi, A., Gholipour, H. and Kanani, H., 2014. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus niger* Isolated from Beluga Adult Digestive Tract on the Feeding Efficiency and Blood Serum Enzymes of Beluga Juvenile Sturgeon (*Huso huso*). Journal of Fisheries Science and Technology, 3(1), 1-13.
16. Hayyan, M., Hashim, M.A. and Inashef, I.M., 2016. Superoxide ion: generation and chemical implications, Chemical Review. 116, 3029-3085.
17. Hoeschen, R.J., 1997. Oxidative stress and cardiovascular disease. Canadian Journal of Cardiology, 13, 1021-1025.

- Vannagen) growth stimulant supplementation on the growth and survival rate of grand beluga juvenile (*Huso huso*). *Iranian Journal of Marine Science*, 3, 33-38.
36. Tovar-Ramírez, D., Mazurais, D., Gatesoupe, J.F., Quazuguel, P., Cahu, C.L. and Zambonino-Infante, J.L., 2010. Dietary probiotic live yeast modulates antioxidant enzyme activities and gene expression of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*, 300, 142-147.
 37. Vetrivel, C., Pugazhendy, K., Meenambal, M., Jayanthi, C., 2013. Curative Efficacy of Spirulina against Lead Acetate Toxicity on the *Cyprinus carpio* Fresh Water Fish. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 4(3), 537-542.
 38. Velisek, J., Svobodova, Z. and Piaakova, V., 2005. Effects of clove oil anaesthesia on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Acta Veterinaria Brno*, 74, 139-146.
 39. Waché, Y., Auffray, F., Gatesoupe, F.J., Zambonino, J., Gayet, V., Labbé, L. and Quentel, C., 2006. Cross effects of the strain of dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, fry. *Aquaculture*, 258, 470-478.
 40. Xu, L., Ran, C., He, S., Zhang, J., Hu, J. and Yang, Y., 2015. Effects of dietary yeast nucleotides on growth, non-specific immunity, intestine growth and intestinal microbiota of juvenile hybrid tilapia *Oreochromis niloticus*♀×*Oreochromis aureus*♂. *Animal Nutrition*, 244-251.
 27. Ravindra, A.P., 2000. Value-added food: single cell protein. *Biotechnology Advance*, 18, 459-479.
 28. Reda, R.M., Selim, K.M., Mahmoud, R. and El-Araby, I.E., 2018. Effect of dietary yeast nucleotide on antioxidant activity, non-specific immunity, intestinal cytokines, and disease resistance in Nile Tilapia. *Fish and Shellfish Immunology*, 80, 281-290.
 29. Reyes-Becerril, M., Tovar-Ramírez, D., Ascencio-Valle, F., Civera-Cerecedo, R., Gracia-Lo'pez, V. and Barbosa-Solomieu, V., 2008. Effects of dietary live yeast *Debaryomyces hansenii* on the immune and antioxidant system in juvenile leopard grouper *Mycteroperca rosacea* exposed to stress. *Aquaculture*, 280, 39-44.
 30. Rostami, S.A., Anini, K., Jorjani, M., 2015. The effect of density and stocking weight on growth rate and production of grey mullet (*Mugil cephalus* L.). *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 24(3), 23-27.
 31. Santacroce, M.P., Merra, E., Centoducati, G., Zacchino, V. and Casalino, E., 2012. Effects of dietary yeast *Saccaromyces cerevisiae* on the antioxidant system in the liver of juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1, 1-10.
 32. Satheeshkumar P., Ananthan G., Senthil Kumar D. and Jagadeesan, L., 2012. Haematology and biochemical parameters of different feeding behaviour of teleost fishes from Vellar estuary, India. *Comparative Clinical Pathology*, 21(6), 1187-1191.
 33. Seyhaneyildizcan, S., Kutluyer, F., Can, E., Kayis, S., Delihasonay, F., Aksu, Ö., Erdamar, H., Yigitoglu, R. and Kayim, M., 2014. Effect of dietary Kefir on the digestive and liver enzymes activities and glucose level of coruh trout, *Salmo coruhensis* (Actinopterygii salmoniformes, salmonidae). *Acta Ichthyologica Aetpiscatoria*, 44(2), 167-170.
 34. Soochan, D., Keough, V., Wanless, I. and Molinari, M., 2012. Intra and extra-hepatic cystadenoma of the biliary duct. Review of literature and radiological and pathological characteristics of a very rare case. *BMJ Case Report*, 4, 2012-2014.
 35. Sudagar, M., Imanpoor, M. and Hoseinifar, S.H., 2004. Effect of optimum (Ascogen or