فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال چهارم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۹۵

اثرات جایگزینی روغن‌های گیاهی با روغن ماهی در جیره غذایی بر آنزیم‌های کبدی سرم و بافت کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

ایمان زارع حقیقی[۱]، افشین قلیچی[۲]*، سارا جرجانی[۳]

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۹۵ تاریخ پذیرش: مرداد ۹۵

چکیده

این مطالعه برای ارزیابی تاثیر اسیدهای چرب بر بافت کبد و همچنین تغییرات آنزیم‌های کبدی سرم خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در هنگام جایگزینی کامل روغن ماهی با روغن‌های گیاهی انجام شد. برای این منظور چهار تیمار شامل تیمار ۱ (شاهد): جیره حاوی روغن ماهی، تیمار ۲: جیره حاوی روغن سویا، تیمار ۳: جیره حاوی روغن آفتاب‌گردان و تیمار ۴: جیره حاوی روغن کانولا، در نظر گرفته شد. ۲۵ قطعه ماهی با وزن متوسط ۱/۱۳±۶۵/۱۲ گرم در هر حوضچه (برای هر تیمار ۲ حوضچه) به صورت تصادفی توزیع و به مدت ۵۰ روز تغذیه شدند. با توجه به نتایج به دست آمده، اختلاف معنی‌داری از لحاظ وزن نهایی بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد. مقادیر آنزیم‌های کبدی (AST، ALT و LDH) در تیمار حاوی ۱۰۰٪ روغن ماهی به طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود. بافت کبد در تمامی تیمارها ضایعاتی از قبیل دژنرسانس چربی، هیپرتروفی، نکروز سلولی، پرخونی و خونریزی داشت. این ضایعات در تیمار شاهد بیش‌تر بود. با توجه به نتایج به دست آمده، اکسیداسیون روغن ماهی در جیره باعث آسیب دیدن کبد و بالا رفتن مقادیر آنزیم‌های کبدی سرم خون می‌شود. در نتیجه‌گیری نهایی می‌توان بیان کرد که حداقل بخشی از روغن جیره می‌تواند از منابع گیاهی تامین شود. همچنین در هنگام استفاده از روغن ماهی در جیره باید به کیفیت آن توجه زیادی شود.

واژگان کلیدی: *قزل‌آلای رنگین‌کمان، روغن ماهی، روغن سویا، روغن آفتاب‌گردان، روغن کانولا.*

۱- کارشناس ارشد شیلات، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران.
۲- دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران.
۳- استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران.
* نویسنده مسئول: afshin.ghelichi@yahoo.com

مقدمه

قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) نخستین گونه از خانواده آزادماهیان است که به عنوان غذای اصلی انسان پرورش یافت (عبدالله مشایی، ۱۳۷۹). در حال حاضر، این ماهی سهم با ارزشی در تامین غذای انسان دارد. علت این امر فقط ارزش غذایی بالای این ماهی و افزایش قیمت ماهیان وحشی که از طبیعت صید می‌شوند نیست، بلکه به این دلیل است که این ماهی‌ها غنی از چربی‌های اشباع نشده هستند که وجودشان در غذای سالم ضروری است (عبدالله مشایی، ۱۳۷۹).

از آنجا که در آبزی‌پروری برای تولید غذای تجاری، آرد ماهی و روغن ماهیان وحشی مصرف می‌شود، مطالعات در مورد ده گونه ماهی مهم پرورشی نشان داده است که به طور میانگین برای تولید یک کیلوگرم ماهی پرورشی که با غذاهای تجاری پرورش می‌یابند، برای تولید آرد و روغن ماهی تقریبا ۱/۹ کیلوگرم ماهی وحشی مصرف می‌شود. دانشمندان پیش‌بینی کردند که تا سال ۲۰۵۰ کاهش شدیدی در صید تمامی گونه‌های وحشی آبزیان رخ خواهد داد و این امر می‌تواند صنعت آبزی‌پروری را به دلیل عدم امکان تهیه آرد ماهی و روغن ماهی، تهدید کند. بنابراین، صنعت آبزی پروری به منظور کاهش این فقدان باید به دنبال منابع پایدارتر و کم هزینه‌تر دیگر باشد (Turchini et al., 2009). پژوهشگران بسیاری برای فائق آمدن بر این مشکل در صدد جایگزینی آرد ماهی با پروتئین‌های آلی و نیز روغن ماهی با روغن‌های گیاهی دیگر هستند (Turchini et al., 2009; Abedian Kenari et al., 2011; Arsalan et al., 2012).

چربی در جیره غذایی ماهی نه تنها یک منبع انرژی است، بلکه نقش مهمی در بسیاری از فعالیت‌های فیزیولوژیکی بدن دارد. این اسیدهای چرب و به ویژه اسیدهای چرب ضروری (Essential Fatty Acids) در تکامل جنینی و سیستم ایمنی، واکنش‌های استرسی و مکانیزم سازش‌پذیری نقش بسیار مهمی دارند (Sargent et al., 2002; Bell and Sargent, 2003). برای جایگزینی روغن ماهی با سایر منابع روغنی، تعادل مناسب اسیدهای چرب ضروری، برای تامین رشد بهینه و ایجاد مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا و استرس‌های محیطی، ضروری است. جایگزینی روغن ماهی به صورت جزئی و کلی با روغن‌های گیاهی با وجود کاهش معنی‌دار قیمت تمام شده ماهی و غذا می‌تواند بر سلامت ماهی و کیفیت فیله تاثیر بگذارد

(Demska-Zakeoe et al., 2012).

مطالعات علمی گسترده‌ای در مورد استفاده از روغن‌های گیاهی در تغذیه ماهی و تاثیر آن بر پارامترهای رشد، ضریب تبدیل غذایی، شاخص قیمت، کیفیت فیله و پروفایل اسید چرب فیله انجام شده است. اما مطالعات بسیار اندکی در مورد تاثیر جایگزین کردن روغن‌های گیاهی بر سلامت ماهی صورت گرفته و تاثیر جایگزینی آن‌ها در جیره غذایی ماهیان مبهم و نامعلوم است. انتظار می‌رود جایگزینی روغن‌های گیاهی بر شاخص‌های خونی، عملکرد سیستم ایمنی بدن و نیز بافت کبد (محل اصلی سنتز چربی) و مقدار ترشح آنزیم‌های کبدی تاثیرگذار باشد.

سلول‌های موجود در اندام‌های مختلف حاوی آنزیم‌هایی هستند که در ارتباط با کارکرد خاص آن سلول‌ها فعالیت می‌کنند و تمام واکنش‌های بیوشیمایی داخل سلول توسط آن‌ها کاتالیز می‌شود. هنگامی که سلول دچار آشفتگی می‌شود آنزیم‌ها به مایعات بین بافتی و از آنجا به سرم خون و مایع مغزی-نخاعی وارد می‌شوند. بنابراین سنجش مقدار آنزیم و میزان فعالیت آن در مایعات زیستی، نحوه کارکرد بافت‌ها و انداهای مختلف را مشخص می‌کند. آزاد شدن آنزیم‌ها و ورود آن‌ها به گردش خون علل مختلفی دارد، مانند نکروز سلولی و آنوکسی که باعث از دست رفتن یکپارچگی غشای سلول و ورود آنزیم از داخل سلول به پلاسما می‌شود. در نتیجه می‌توان با اندازه‌گیری غلظت آنزیم‌ها در سرم و مقایسه با میزان طبیعی آن‌ها، به تغییرات ایجاد شده و اندام درگیر پی برد (مجابی، ۱۳۷۰).

مطالعات مختلفی در ارتباط با تاثیر جایگزینی روغن‌های گیاهی با روغن ماهی صورت گرفته است، به عنوان مثال صفری و بلداجی (۱۳۸۷) به بررسی اثر سطوح مختلف جایگزینی کنجاله کانولا به جای آرد ماهی بر لیپیدها و لیپوپروتئین‌های سرم خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ۱۰۰ گرمی پرداختند و به این نتیجه رسیدند که جایگزینی کنجاله کانولا تا سطح ۵۰ درصد به جای آرد ماهی جیره پایه، بر اساس مطالعات سرم‌شناسی و رشد در این ماهی امکان‌پذیر است. خواجه و پیغان (۱۳۸۶) برخی شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورش یافته در استخر خاکی را مورد سنجش و آنالیز قرار دادند و مقادیر آنزیم‌های سرمی فسفاتاز قلیایی (ALP)، آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و لاکتات دهیدروژناز (LDH) را به ترتیب

۷۲۲±۳۲۰، ۳۳۷±۱۵۰، ۲۹±۲۴ و ۵۷۹±۳۵۳ واحد در لیتر اعلام کردند. Arsalan و همکاران (۲۰۱۲) به بررسی اثر جایگزینی روغن ماهی خوراکی با روغن‌های گیاهی مختلف بر روی عملکرد و ترکیب اسید چرب ماهی قزل‌آلای قهوه‌ای (*Salmo trutta*) پرداختند. بر طبق نتایج آن‌ها، طویل‌سازی (Elongation) و غیراشباع‌سازی (Desaturation) اسید چرب C_{18} به منبع لیپید جیره بستگی دارد و قزل‌آلای قهوه‌ای توانایی تغییر شکل لینولئیک اسید و لینولنیک اسید را به ترتیب به آراشیدونیک اسید و دکوزاهگزانوئیک اسید دارد (Arsalan et al., 2012). Peng و همکاران (۲۰۰۸) اثر جایگزینی روغن ماهی با روغن سویا در جیره بر عملکرد رشد، ترکیب شیمیایی کبد و ترکیب بیوشیمیایی لاشه را در ماهیان جوان باس دریایی *Acanthopagru schlegeli* بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که استفاده از روغن سویا شاخص کبدی را افزایش می‌دهد. Demska-Zakeoe و همکاران (۲۰۱۲) تاثیر جایگزینی روغن کتان، آراشید (Arachide Oil) و روغن کلزا را بر برخی شاخص‌های خونی، سیتولوژی و بافت‌شناختی کبد ماهی لای (*Tinca tinca*) جوان بررسی کردند. طبق نتایج این پژوهشگران، کمترین میزان هموگلوبین و هماتوکریت، در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی روغن ماهی مشاهده شد. در حالی که بیشترین تغییرات در سلول‌های کبدی مربوط به ماهیان تغذیه شده با روغن دانه کتان و آراشید رخ داده بود. در این گروه سلول‌های کبدی کوچک‌تر و نسبت حجم هسته به سیتوپلاسم بیشتر بود (Demska-Zakeoe et al., 2012). Guler و Yildiz (۲۰۱۱) به بررسی اثرات جایگزین کردن روغن ماهی با روغن دانه پنبه بر روی فرآیند رشد و ساختار اسید چرب قزل‌آلای رنگین‌کمان پرداختند. آن‌ها با توجه به پارامترهای رشد و ترکیب اسیدهای چرب، جایگزینی ۵۰ درصد روغن دانه پنبه را توصیه کردند (Guler and Yildiz, 2011).

با توجه به اهمیت استفاده از روغن‌های گیاهی به جای روغن ماهی، مطالعه حاضر به منظور بررسی تاثیر جایگزینی کامل روغن‌های آفتاب‌گردان، سویا و کانولا به جای روغن ماهی بر بافت کبد و میزان آنزیم‌های کبدی سرم خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام شده است.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی

در مطالعه حاضر ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مورد نیاز از مرکز پرورش قزل‌آلای واقع در استان گلستان تهیه شدند. تعداد ۲۰۰ قطعه قزل‌آلای جوان با وزن متوسط ۱/۱۳±۶۵/۱۲ گرم و طول متوسط ۴/۷±۱۷ سانتی‌متر انتخاب و به تعداد ۲۵ قطعه در ۸ حوضچه فایبرگلاس ۵۰۰ لیتری که از قبل آماده‌سازی شده بودند، رهاسازی شدند.

آماده‌سازی جیره و نحوه غذادهی

برای ساخت جیره‌های آزمایشی، جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان قبل از مرحله اضافه کردن روغن ماهی از کارخانه خوراک دام و آبزیان مازندران شهر ساری تهیه شد (پروتئین خام: ۳۵/۳۱). سپس به ۸۵۰ گرم جیره خام بر اساس تیمارهای آزمایشی ۱۵۰ گرم روغن اضافه شد (چهار تیمار هر یک با دو تکرار). به این ترتیب که به تیمار ۱ (شاهد) تا ۴ به ترتیب ۱۵۰ گرم روغن ماهی، روغن سویا، روغن آفتاب‌گردان و روغن کانولا بر روی مواد خشک اسپری شد. سپس جیره بر روی سطحی تمیز پخش شد تا در مجاورت هوا خشک شود (جرجانی و همکاران، ۱۳۹۳). روغن در این مرحله کاملا جذب جیره می‌شد. سپس هر جیره در ظرف‌های جداگانه که قبلا توسط برچسب کدگذاری شده بود، قرار داده شد.

در طول دوره تیمار، ماهیان روزانه به میزان ۴ درصد وزن بدن در سه وعده (ساعات ۸ و ۱۲ و ۱۸) به صورت دستی به مدت ۵۰ روز غذادهی شدند. میزان غذای مورد نیاز بعد از هر بار زیست‌سنجی (هر دو هفته یک‌بار) و تعیین متوسط زیست‌توده موجود در حوضچه‌ها، بر اساس وزن بدن ماهیان تعیین می‌شد (عبدالله مشایی، ۱۳۷۹).

نمونه‌برداری از خون و تهیه سرم

در انتهای دوره، ۲ ماهی از هر تکرار (۴ ماهی از هر تیمار) به صورت کاملا تصادفی انتخاب شد. برای خون‌گیری، ابتدا ماهیان با اسانس گل میخک با دوز ppm ۲۰۰ بیهوش شدند. سپس بلافاصله بعد از خشک کردن بدن ماهی، با سرنگ استریل ۲ سی‌سی از ورید ساقه دمی خون‌گیری به عمل آمد. از هر نمونه مقدار ۱ سی‌سی خون در لوله‌های فاقد هپارین ریخته شد. به منظور جداسازی سرم، نمونه‌های خون به مدت ۵ دقیقه با ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ (EBA21، Hettich، آلمان) شدند.

سرم جدا شده در لوله‌های کوچک تخلیه و تا زمان بررسی آنزیم‌های کبدی سرم در فریزر (۱۸- درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند (Borges et al., 2004).

اندازه‌گیری آنزیم‌های سرم خون

در این مطالعه سنجش آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، لاکتات دهیدروژناز (LDH)، آلکالین فسفاتاز (ALP)، به وسیله دستگاه بیوشیمی آنالایزر (شرکت اپندورف، آلمان) طبق دستورالعمل شرکت سازنده با استفاده از کیت‌های آزمایشگاهی (پارس‌آزمون، ایران) به روش آنزیمی، اندازه‌گیری شدند (Borges et al., 2004).

تهیه نمونه‌های بافتی از کبد

در این مطالعه کبد به صورت کامل از بدن ماهی خارج و در محلول بوئن ده درصد تثبیت شد و برای انجام مراحل مختلف آبگیری، رنگ‌زدایی و شفاف کردن نمونه در داخل دستگاه پردازنده بافتی (Tissue Processor) قرار گرفت. در مرحله بعد قالب‌گیری نمونه‌ها و تهیه بلوک‌های پارافینی صورت گرفت و سپس با استفاده از میکروتوم برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرون تهیه شد. در خاتمه نمونه‌ها با استفاده از روش هماتوکسیلین- ائوزین رنگ‌آمیزی و به وسیله میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند (پوستی و ادیب‌مرادی، ۱۳۸۸).

روش آماری و تجزیه و تحلیل داده‌ها:

نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون Shapiro-Wilk مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به آنزیم‌های سرمی و ایمنی از طریق آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه (One-way Analysis of Variance- ANOVA) و مقایسه میانگین بین تیمارها بر اساس آزمون دانکن (Duncan's Multiple-range Test) انجام شد و وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح خطای ۵ درصد بررسی و مقادیر $P<۰/۰۵$ معنی‌دار تلقی شد. بررسی‌های آماری با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS 20 و Microsoft Excel 2007 در محیط ویندوز انجام شد.

نتایج

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که جایگزینی کامل روغن‌های گیاهی با روغن ماهی تاثیر معنی‌داری بر رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ندارد. به طوری که میزان افزایش وزن بدن در

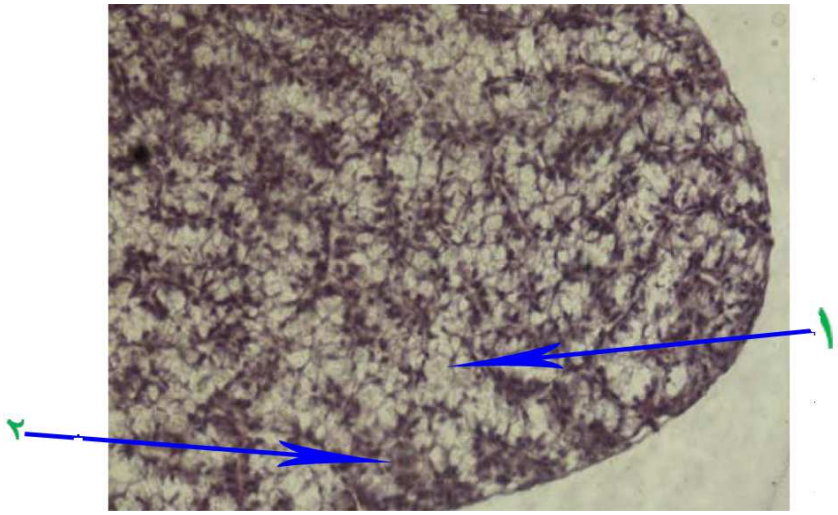
تیمارها ۱ تا ۴ به ترتیب ۸۵/۷۳±۲/۵۶، ۹۰/۹۳±۴/۸۹، ۸۵/۴۲±۱/۳۳ و ۸۱/۱۰±۵/۴۹ بود (میانگین ± انحراف معیار؛ P>۰/۰۵).

تاثیر جایگزینی کامل روغن‌های گیاهی به جای روغن ماهی بر روی بافت کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمار شاهد، نشان داد که آسیب‌های جدی از جمله رکود صفراوی کم، دژنرسانس چربی بسیار بالا، پرخونی، نکروز سلولی و خونریزی زیاد در بافت کبد ایجاد شده است (شکل ۱).

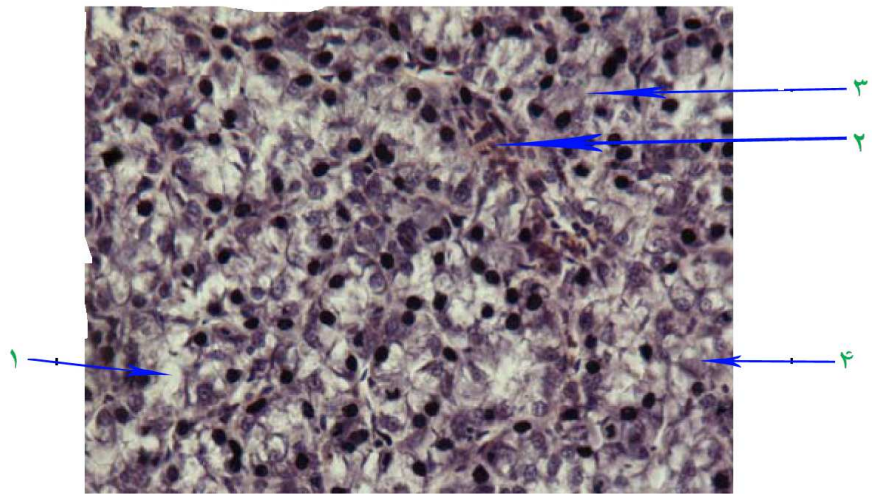
در تیمار ۲ نیز آسیب‌های جدی از جمله آتروفی، پرخونی، خونریزی، نکروز سلولی و دژنرسانس چربی مشاهده شد. همچنین تعداد سلول‌های کوپفر کم بود (شکل ۲).

با توجه به نتایج به دست آمده، ضایعات کبدی ایجاد شده در تیمار ۳ شامل خونریزی و دژنرسانس چربی زیاد و آتروفی و کمی نکروز سلولی بود (شکل ۳).

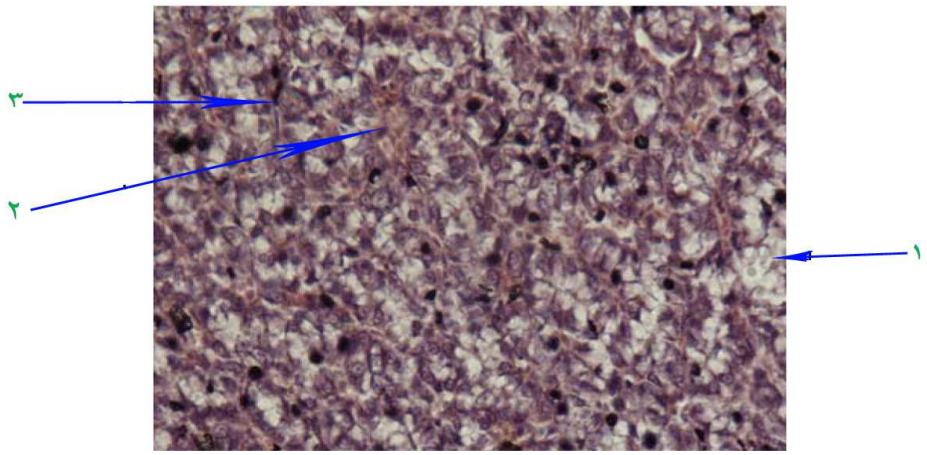
همچنین با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعات بافت‌شناسی، هیپرتروفی کم، دژنرسانس چربی بالا، پرخونی، نکروز سلولی، خونریزی زیاد و کاهش سلول‌های کوپفر از جمله ضایعات کبدی ایجاد شده در تیمار ۴ بود (شکل ۴).



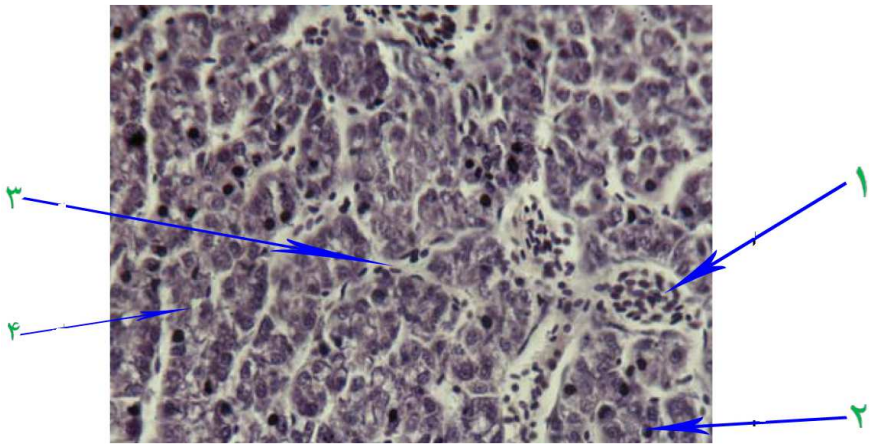
شکل ۱: مقطع بافت کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمار شاهد (تغذیه شده با جیره حاوی روغن ماهی). (۱) دژنرسانس چربی؛ (۲) نکروز سلولی (H&E، ۴۰×).



شکل ۲: مقطع بافت کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمار ۲ (تغذیه شده با جیره حاوی روغن سویا). (۱) دژنرسانس چربی؛ (۲) پرخونی؛ (۳) خونریزی؛ (۴) نکروز سلولی (H&E، ۴۰×).



شکل ۳: مقطع بافت کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمار ۳ (تغذیه شده با جیره حاوی روغن آفتاب‌گردان). (۱) دژنرسانس چربی؛ (۲) خونریزی؛ (۳) نکروز سلولی (H&E، ۴۰×).

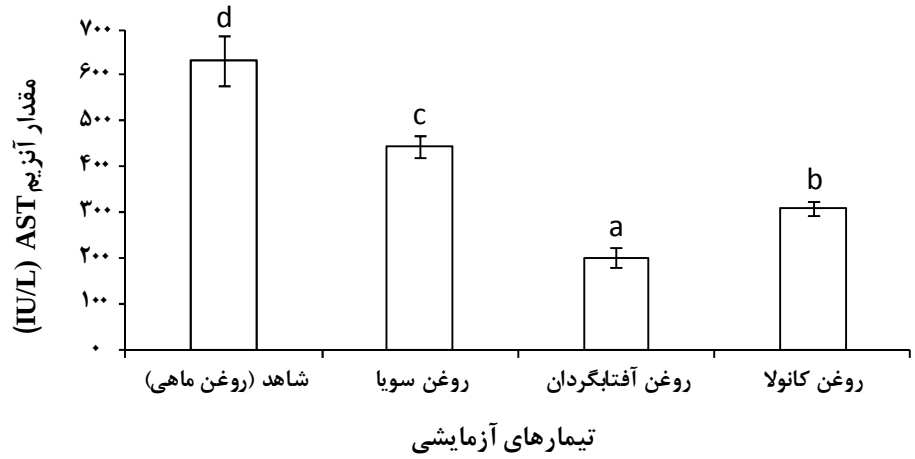


شکل ۴: مقطع بافت کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمار ۳ (تغذیه شده با جیره حاوی روغن کانولا). (۱) پرخونی؛ (۲) هیپرتروفی؛ (۳) سلول‌های کوپفر؛ (۴) نکروز سلولی (H&E، ۴۰×).

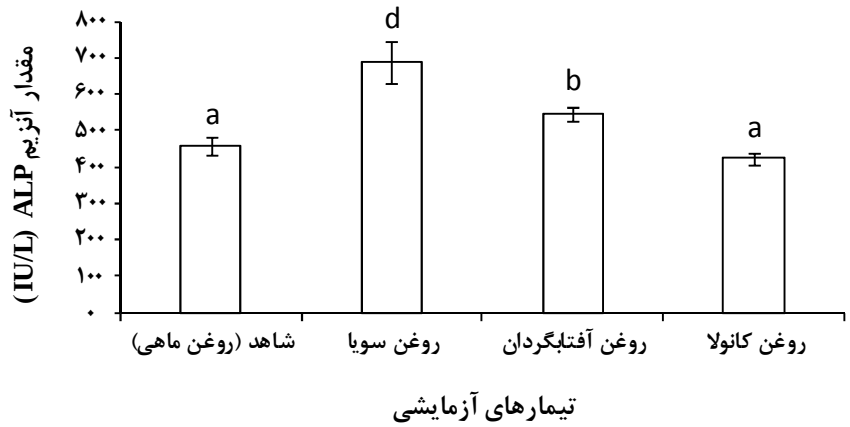
نتایج این بررسی نشان داد که ماهیان تغذیه شده با ٪۱۰۰ روغن ماهی، دارای بیشترین میزان آنزیم AST در سرم بودند، به طوری که اختلاف معنی‌داری بین این شاخص در مقایسه با سایر تیمارها مشاهده شد (P<۰/۰۵). مقدار این آنزیم در تیمار ۳ نیز به طور معنی‌داری کم‌تر از سایر تیمارها بود (P<۰/۰۵؛ شکل ۵).

همچنین نتایج به دست آمده نشان داد که ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی روغن سویا (تیمار ۲) بیشترین میزان آنزیم ALP را در سرم داشتند، به طوری که اختلاف معنی‌داری بین این شاخص در مقایسه با سایر تیمارها مشاهده شد (P<۰/۰۵؛ شکل ۶). ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی روغن سویا (تیمار ۲) همچنین دارای بیش‌ترین میزان آنزیم ALT در سرم بودند، به طوری که اختلاف معنی‌داری بین این شاخص در مقایسه با سایر تیمارها مشاهده شد (P<۰/۰۵؛ شکل ۷).

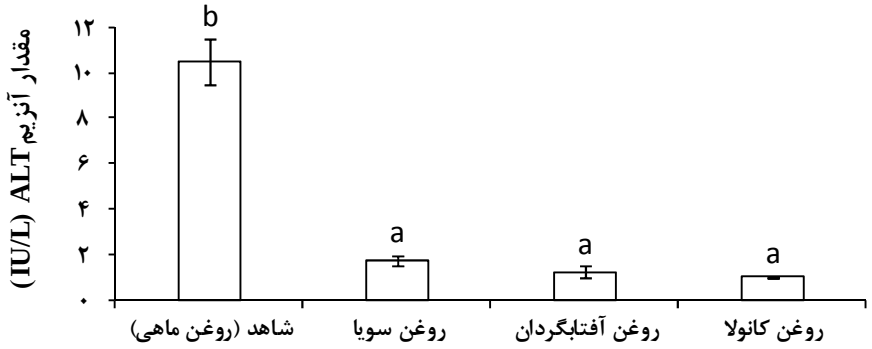
همچنین نتایج این بررسی نشان داد که ماهیان تغذیه شده با ٪۱۰۰ روغن ماهی، دارای بیشترین میزان آنزیم LDH در سرم بودند، به طوری که اختلاف معنی‌داری بین مقادیر این شاخص در مقایسه با سایر تیمارها مشاهده شد (P<۰/۰۵؛ شکل ۸).



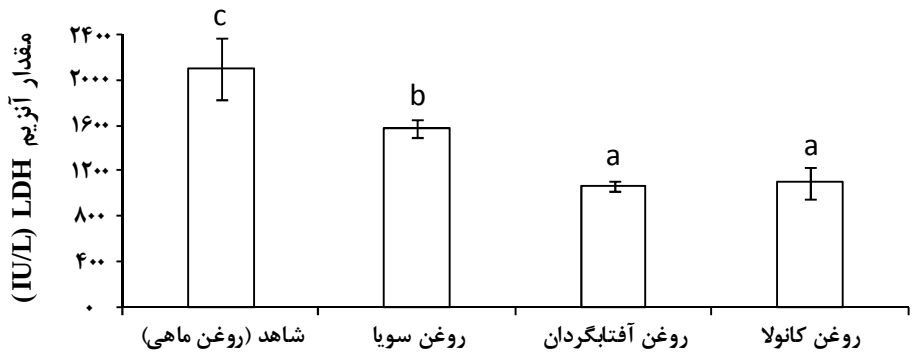
شکل ۵: مقادیر آنزیم AST سرم خون ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره حاوی روغن‌های مختلف (میانگین ± انحراف معیار). حروف انگلیسی متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است.



شکل ۶: میانگین مقادیر آنزیم ALP سرم خون ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره حاوی روغن‌های مختلف (میانگین ± انحراف معیار). حروف انگلیسی متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است.



شکل ۷: میانگین مقادیر آنزیم ALT سرم خون ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره حاوی روغن‌های مختلف (میانگین ± انحراف معیار). حروف انگلیسی متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است.



شکل ۸: میانگین مقادیر آنزیم LDH سرم خون ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره حاوی روغن‌های مختلف (میانگین ± انحراف معیار). حروف انگلیسی متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است.

بحث

مطالعه بافت‌شناسی کبد در بررسی‌های تغذیه‌ای امری اجتناب‌ناپذیر است (Poleksic et al., 2007; Raskovic et al., 2009). برخی از پژوهشگران وضعیت ریخت‌شناسی و فیزیولوژیکی کبد را مرتبط با شرایط تغذیه‌ای

می‌دانند. وضعیت کبد یک شاخص مهم آسیب‌شناسی برای تشخیص صدمات ایجاد شده به علت شرایط تغذیه‌ای است، زیرا وظیفه آن سوخت‌وساز تولیداتی است که از دستگاه گوارش می‌رسد.

در مطالعه حاضر، کبد ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در تمام تیمارها دچار آسیب‌دیدگی شده بود. این آسیب‌ها در تیمار شاهد بیش‌تر بود. Menoyo و همکاران (۲۰۰۴) دریافتند که اکسیداسیون چربی در کبد ماهیان سیم (*Sparus aurata*) تغذیه شده با روغن سویا به ترتیب به میزان ٪۲۱ و ٪۱۱ در مقایسه با ماهیان تغذیه شده با روغن ماهی و روغن بزرک کمتر بود. نتایج این پژوهشگران با نتیجه به دست آمده در مطالعه حاضر مطابقت داشت. از نظر تئوری جیره‌هایی که حاوی اسیدهای چرب غیراشباع زیاد در ترکیب خود باشند مستعد اکسیداسیون چربی هستند که این خود باعث افزایش درجه پراکسیداسیون چربی موجود در میتوکندری و آسیب به سلول‌های کبدی می‌شود (Abedian Kenari et al., 2011).

چون کبد محل اصلی متابولیسم اسیدهای چرب در بدن است، بسیاری از پژوهشگران آسیب کبدی را ناشی از خوب متابولیزه نشدن یا کم متابولیزه شدن اسیدهای چرب امگا- ۳ طولانی زنجیره موجود در روغن ماهی و ایجاد تغییرات بافت چربی در کبد (Fatty Degeneration) عنوان کرده‌اند (Brown et al., 1997).

کشت سلول‌های کبدی موش‌های تغذیه شده با روغن ماهی نشان داده است که در نهایت، با وجود تشدید میزان اکسیداسیون اسیدهای چرب، محتوی تری‌گلیسرید سلول‌های کبدی افزایش می‌یابد. زیرا جریان چربی به شکل لیپوپروتئین‌های غنی از تری‌گلیسرید و اسیدهای چرب آزاد، از روده به کبد بیشتر می‌شود. از سوی دیگر، اثر مهاری انسولین بر ترشح VLDL، باعث تجمع تری‌گلیسرید در کبد می‌شود. در مطالعه Ritskes و همکاران (۱۹۹۸)، ایجاد واکوئل‌های چربی در سلول‌های کبدی به کمتر متابولیزه شدن یا متابولیزه نشدن چربی ناشی از تجمع این اسیدهای چرب نسبت داده شده است.

تجمع چربی به واکنش التهابی در بافت کبد منجر می‌شود که نتیجه آن، تکثیر سلول‌های کبدی و از جمله سلول‌های مجرایی است. روغن ماهی به علت داشتن اسیدهای چرب غیراشباع طولانی زنجیره، پراکسیداسیون لیپیدها را افزایش می‌دهد. محصولات پراکسیداسیون لیپیدها سرانجام آسیب کبدی

ایجاد می‌کنند (Nanji et al., 1995) که در این مطالعه به شکل تکثیر سلول‌های مجرایی کبد خود را نشان داد.

همچنین مصرف روغن ماهی با کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، غلظت رادیکال‌های آزاد را در کبد افزایش می‌دهد و باعث ایجاد التهاب در کبد می‌شود. نتیجه التهاب، تغییرات پاتولوژیکی سلول‌های کبدی است. شدت پراکسیداسیون چربی‌ها با شدت کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و میزان آسیب کبدی ارتباط مستقیم دارد و هر چه میزان روغن ماهی دریافتی در رژیم غذایی بیشتر باشد، شدت این آسیب‌ها بیشتر می‌شود (Bhattacharya et al., 2003). کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلول‌های کبدی منجر به تکثیر آن‌ها می‌شود. زیرا سطح آنتی‌اکسیدان‌ها طی چرخه تکثیر سلول‌های افزایش می‌یابد و سلول از این مکانیسم جبرانی در مقابل کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی القا شده توسط روغن ماهی استفاده می‌کند (Zulfikaroglu et al., 2003).

هنگامی که آرد ماهی با آرد سویا جایگزین شد، پیکنوز هسته در سلول‌های کبدی مشاهده شد. همچنین اندازه هسته کاهش یافت. این یافته‌ها تاثیر سوءتغذیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را هنگامی که از آرد سویا به عنوان تنها منبع پروتئینی در جیره غذایی استفاده شد، نشان داد.

Ostaszewska و همکاران (۲۰۰۵) در مطالعه‌ای که بر اثرات جایگزینی کازئین با سویا در غذای قزل‌آلای رنگین‌کمان و پاکو (*Piaractus mesopotamicus*) انجام دادند، مشاهده کردند که هپاتوسیت‌های ماهی پاکو ساختار طبیعی داشتند، ولی هپاتوسیت‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان دارای هسته پیکنوز با شکل غیرمنتظم بودند که به حاشیه سلول رانده شده بود.

در مطالعه دیگری Ostaszewska و همکاران (۲۰۰۸) تاثیر مثبت غذای طبیعی را بر ساختمان هپاتوسیت‌های سیم نقره‌ای (*Vimba vimba*) و نسبت تقریبا برابر لیپید و گلیکوژن را در این سلول‌ها مشاهده کردند.

Yamamoto و همکاران (۲۰۰۸) از حجم سیتوپلاسم و قطر هسته سلول‌های کبدی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان برای بررسی اثرات مکمل عصاره الکلی سویای چربی‌زدایی شده بر بافت کبد استفاده کردند. نتایج این بررسی نشان داد که هپاتوسیت‌های ماهیان تغذیه شده با عصاره الکلی سویا، دچار آتروفی شده بودند (Yamamoto et al., 2008).

نتایج به دست آمده از بررسی آنزیم‌های کبدی نشان داد که در ماهیان تغذیه شده با ٪۱۰۰ روغن ماهی، میزان آنزیم‌های AST، ALT و LDH به طور معنی‌داری از ماهیان تیمارهای دیگر بالاتر بود. آنزیم‌های AST، ALP و ALT به گروه آنزیم‌های اختصاصی غیرپلاسمایی تعلق دارند که نه تنها در پلاسمای خون بلکه در بافت کبد، قلب، آبشش، کلیه، ماهیچه و سایر اندام‌ها یافت می‌شوند. همچنین آن‌ها می‌توانند اطلاعاتی ویژه‌ای را در مورد عملکرد و نارسایی این اندام‌ها فراهم کنند. میزان AST، ALP و ALT به عنوان شاخص فعالیت کبد به کار می‌رود و جزء آنزیم‌های با اهمیت در بررسی وضعیت سلامتی ماهیان به شمار می‌روند. سلول‌های کبدی غنی از این آنزیم‌ها هستند. مقدار آنزیم LDH نیز اغلب برای ارزیابی وجود آسیب‌های بافتی کبد اندازه‌گیری می‌شود (Yilmaz et al., 2006).

تغییر در ترکیب اسیدهای چرب جیره غذایی هم بر سیستم ایمنی ذاتی (Obach et al., 1993; Waagbo et al., 1995)، هم بر سیستم ایمنی اکتسابی (Fracolossi and Lovell, 1994; Thompson et al., 1995) و همچنین بر مقاومت به بیماری‌های عفونی (Thompson et al., 1995) تاثیر می‌گذارد.

در مطالعه حاضر مقادیر آنزیم‌های AST و ALT در تیمار شاهد (جیره حاوی روغن ماهی) به طور معنی‌داری بیش از سایر تیمارها بود. مدیریت نادرست تغذیه ممکن است بر روی فعالیت ALT سرم تاثیر بگذارد. فعالیت سرم ALT و AST به طور مشخص بسته به گونه متفاوت است. افزایش در میزان AST و ALT پلاسما ممکن است به شرایط استرس، آسیب‌های سلولی کبدی یا تجزیه سلولی ناشی از فلزات سنگین در کبد، قلب یا عضله مربوط باشد (Yokoyama et al., 2003). Rehulka و Minaoik (۲۰۰۷) اظهار کرده‌اند که افزایش فعالیت AST نشانه‌ای از علایم آسیب جدی به کبد از طریق آزاد سازی AST میتوکندریایی است. عفونت نیز باعث افزایشی در مقادیر ALT و LDH می‌شود (Rehulka and Minaoik, 2007).

مقدار آنزیم LDH در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ٪۱۰۰ روغن ماهی به طور معنی-داری بیشتر از سایر تیمارها بود. ممکن است سطح بالای اشباع در جیره باعث چروکیده شدن گلبول‌های قرمز شود (Mourente and Bell, 2006). این آنزیم به مقدار زیاد در تمام بافت‌ها وجود دارد ولی مقدار آن در گلبول های قرمز خون ۱۵۰ برابر بیش از پلاسما است

و حتی همولیز بسیار کم گلبول قرمز باعث تغییر قابل ملاحظه‌ای در این آنزیم خواهد شد. بنابراین دلیل احتمالی بالا بودن این آنزیم در تیمار یاد شده آسیب دیدن گلبول‌های قرمز و وارد شدن این آنزیم به داخل پلاسما است.

خواجه و پیغان (۱۳۸۶) برخی شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورش یافته در استخر خاکی مانند ALP و ALT را مورد سنجش و بررسی قرار دادند که در مقایسه با این مطالعه، مقادیر به دست آمده برای آنزیم‌های ALP و ALT در مطالعه حاضر کمتر از مقادیر گزارش شده توسط خواجه و پیغان (۱۳۸۶) بود. در مورد آنزیم AST تنها در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ٪۱۰۰ روغن ماهی، بیشتر از مقادیر به دست آمده توسط خواجه و پیغان (۱۳۸۶) بود که علت این امر نیز همان طور که قبلا ذکر شد احتمالا به دلیل اکسیداسیون روغن ماهی استفاده شده است. مقادیر آنزیم LDH در مطالعه حاضر در تمامی تیمارها بالاتر از مقادیر اندازه‌گیری شده توسط خواجه و پیغان (۱۳۸۶) بود. با توجه به این‌که اضافه کردن روغن به غذا در مطالعه حاضر به روش دستی بوده و غذا در شرایط محیط نگهداری می‌شد، شاید اکسید شدن روغن‌ها به ویژه روغن ماهی تاثیر منفی بر گلبول‌های قرمز داشته و آزاد شدن آنزیم LDH موجود در آن‌ها باعث افزایش مقدار این آنزیم در پلاسما شده باشد. به هر حال برای اثبات این موضوع باید ریخت‌شناسی گلبول‌های قرمز مورد بررسی قرار گیرد.

با توجه به نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر، روغن‌های مورد استفاده در جیره غذایی تاثیر به سزایی در سیستم ایمنی ماهی داشت. با توجه به این که مطالعه حاضر در یک دوره ۵۰ روزه انجام شد، می‌توان بیان کرد که حداقل بخشی از روغن جیره را می‌توان از منابع گیاهی تامین کرد. همچنین نتایج به دست آمده نشان داد که در هنگام استفاده از روغن ماهی در جیره (تیمار ۱) باید به موارد بهداشتی در زمان نگهداری روغن‌های مختلف به خصوص روغن ماهی و همچنین بسته‌بندی مناسب بعد از تهیه غذا توجه شود. زیرا اکسیداسیون اسیدهای چرب نه تنها باعث افزایش پاسخ ایمنی می‌شود، بلکه باعث تضعیف سیستم ایمنی خواهد شد.

منابع

پوستی ا. و ادیب‌مرادی م. ۱۳۸۸. بافت‌شناسی مقایسه‌ای و هیستوتکنیک. انتشارات دانشگاه تهران. ۵۲۲ص.

جرجانی س.، قلیچی ا. و بغدادی آ. ۱۳۹۳. اثرهای جایگزینی کامل روغن ماهی با روغن-های گیاهی بر پارامترهای رشد، کارایی غذا و پروفایل اسیدهای چرب عضله ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان. نشریه توسعه آبزی‌پروری، ۸(۳): ۱۳-۳۰.

خواجه غ. و پیغان ر. ۱۳۸۶. بررسی برخی فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورش یافته در استخرهای خاکی. مجله تحقیقات دامپزشکی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۶۲(۳): ۱۹۳-۲۰۷.

صفری ا. و بلداجی ف. ۱۳۸۷. بررسی تاثیر جایگزینی نسبی کنجاله کانولا و کنجاله سویا با آرد ماهی در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله پژوهش و سازندگی، ۷۹: ۵۱-۴۴.

عبدالله مشایی م. ۱۳۷۹. راهنمای تکثیر و پرورش ماهی قزل‌آلا (ترجمه). انتشارات آسمان. ۲۰۸ص.

مجابی ع. ۱۳۷۰. بیوشیمی درمانگاهی. انتشارات جهاد دانشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران. ۳۷۲ص.

Abedian Kenari A., Mozanzadeh M.T. and Pourgholam R. 2011. Effects of total fish oil replacement to vegetable oils at two dietary lipid levels on the growth, body composition, haemato-immunological and serum biochemical parameters in Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius* Kessler, 1877). Aquaculture Research, 42(8): 1131–1144.

Arsalan M., Sirkecioglu N., Bayir A., Arslan H. and Aras M. 2012. The influence of substitution of dietary fish oil with different vegetable oils on performance and fatty acid composition of brown trout, *Salmo trutta*. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 12: 575–583.

Bell J.G. and Sargent J.R. 2003. Arachidonic acid in aquaculture feeds: Current status and future opportunities. Aquaculture, 218: 491–499.

Bhattacharya A., Lawrence R.A., Krishnan A., Zaman K., Sun D. and Fernandes G. 2003. Effect of dietary n-3 and n-6 oils with and without food restriction on activity of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in livers of cyclo-phosphamide treated autoimmune-prone NZB/W female mice.

Journal of the American College of Nutrition, 22(5): 388–399.

Borges A., Scotti L.V., Siqueira D.R., Jurinitz D.F. and Wassermann G.F. 2004. Hematologic and serum biochemical values for jundia (*Rhamdia quelen*). Fish Physiology and Biochemistry, 30: 21–25.

Brown A.M., Baker P.W. and Geoffrey F.G. 1997. Changes in fatty acid metabolism in rat hepatocytes in response to dietary n-3 fatty acids are associated with changes in the intracellular metabolism and secretion of apolipoprotein B-48. Journal of Lipid Research, 38: 469–481.

Demska-Zakeoe K., Zakeoe Z., Ziomek E. and Jarmolowicz S. 2012. Impact of feeding juvenile tench (*Tinca tinca* (L.)) feeds supplemented with vegetable oils on hematological indexes and liver histology. Archives of Polish Fisheries, 20: 67–75.

Fracolossi D.M. and Lovell R.T. 1994. Dietary lipid sources influence responses of channel catfish (*Ictalarus punctatus*) to challenge with the pathogen *Edwardsiella ictaluri*. Aquaculture, 119: 287–298.

Guler M. and Yildiz M. 2011. Effects of dietary fish oil replacement by cottonseed oil on growth performance and fatty acid composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Research Article, 35(3): 157–167.

Menoyo D., Izquierdo M.S., Robaina L., Gines R., Lopez-Bote C.J. and Bautista J.M. 2004. Adaptation of lipid metabolism, tissue composition and flesh quality in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) to the replacement of dietary fish oil by linseed and soyabean oils. British Journal of Nutrition, 92: 41–52.

Mourente G. and Bell J.G. 2006. Partial replacement of dietary fish oil with blends of vegetable oils (rapeseed, linseed and palm oils) in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) over a long term growth study: Effects on muscle and liver fatty acid composition and effectiveness of a fish oil finishing diet. Comparative Biochemistry and Physiology, 145(3-4): 389–399.

Nanji A.A., Sadrzadeh S.M., Yang E.K., Fogt F., Meydani M. and Dannenberg A.J. 1995. Dietary saturated fatty acids: A novel treatment for alcoholic liver disease. Gastroenterology, 109(2): 547–554.

Obach A., Quentel C. and Laurencin F.B. 1993. Effects of α-tocopherol and dietary oxidized fish oil on the immune response of sea bass *Dicentrarchus labrax*. Disease of Aquatic Organism, 15: 175–185.

Ostaszewska T., Dabrowski K., Czuminska K., Olech W. and Olejniczak M. 2005. Rearing of pikeperch larvae using formulated diets-first success with starter feeds. Aquaculture Research, 36: 1167–1176.

Ostaszewska T., Dabrowski K., Hliwa P., Gomolka P. and Kwasek K. 2008. Nutritional regulation of intestine morphology in larval cyprinid fish, silver bream (*Vimba vimba*). Aquaculture Research, 39: 1268–1278.

Peng S., Chen L., Qin J., Hou J., Yu N., Long Z., Ye J. and Sun X. 2008. Effects of replacement of dietary fish oil by soybean oil on growth performance and liver biochemical composition in juvenile black seabream, *Acanthopagrus schlegeli*. Aquaculture, 276: 154–161.

Poleksic V., Raskovic B., Markovic Z., Dulic Z., Stankovic M., Zivic I. and Lakic N. 2007. Effects of different dietary protein sources on intestine and liver morphology of carp yearlings. Proceedings of the 3rd Serbian Congress for Microscopy. Serbian Microscopy Society, Belgrade, Serbia. PP: 237–238.

Raskovic B., Stankovic M., Dulic Z., Markovic Z., Lakic N. and Poleksic V. 2009. Effects of different source and level of protein in feed mixtures on liver and intestine histology of the common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758). Comparative Biochemistry and Physiology A (Supplement), 153(2): 112.

Rehulka J. and Minaoik B. 2007. Blood parameters in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) affected by columnaris disease. Aquaculture Research, 38: 1182–1197.

Ritskes H.J., Verschuren P.M., Meijer G.W., Wiersma A., Van de Kooij A.J. and Timmer W.G. 1998. The association of increasing dietary concentrations of fish oil with hepatotoxic effects and a higher degree of aorta atherosclerosis in the ad lib-fed rabbit. Food Chemistry and Toxicology, 36: 663–672.

Sargent J.R., Tocher D.R. and Bell J.G. 2002. The lipids. P: 181–257. In: Halver J.E. and Hardy R.W. (Eds.). Fish Nutrition. Academic Press, San Diego.

Thompson K.D., Henderson R.J. and Tatner M.F. 1995. A comparison of the lipid composition of peripheral blood cells and head kidney leucocytes of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Comparatine Biochemistry and Physiology B, 112: 83–92.

Turchini G.M. and Francis D.S. 2009. Fatty acid metabolism (desaturation, elongation and b-oxidation) in rainbow trout fed fish oil or linseed oil-based diets.

British Journal of Nutrition, 102: 69–81.

Waagbo R., Hemr G.I., Hol J.C. and Lie O. 1995. Tissue fatty acid composition, haematology and immunity in adult cod, *Gadus morhua* L., fed three dietary lipid sources. Journal of Fish Disease, 18: 615–622.

Yamamoto T., Goto T., Kine Y., Endo Y., Kitaoka Y., Sugita T., Furuita H., Iwashita Y. and Suzuki N. 2008. Effect of an alcohol extract from a defatted soybean meal supplemented with a casein-based semi-purified diet on the biliary bile status and intestinal conditions in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquaculture Research, 39: 986–994.

Yilmaz E., Akyurt I. and Mutlu E. 2006. Effects of energetic diets on growth, blood chemistry and liver pathology of African catfish (*Clarias gariepinus*). The Israeli Journal of Aquaculture, 58: 191–197.

Yokoyama Y., Toth B. and Ktchens W. 2003. Role of thromboxane in producing portal hypertension following trauma hemorrhage. American Journal of Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology, 285(6): 1293–1299.

Zulfikaroglu B., Zulfikaroglu E., Ozmen M.M., Ozalp N., Berkem R. and Erdogan S. 2003. The effect of immunonutrition on bacterial translocation, and intestinal villus atrophy in experimental obstructive jaundice. Clinical Nutrition, 22(3): 277–281.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 4, No. 4, Winter 2017

Effect of replacing dietary fish oil with vegetable oils on serum hepatic enzymes and liver histology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Iman Zare Haghighi[1], Afshin Ghelichi[2]*, Sara Jorjani[3]

Received: May 2016 Accepted: August 2016

Abstract

This study was conducted to evaluate the effect of replacement of fish oil (FO) by vegetable oils on liver histology and serum hepatic enzymes of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Four experimental diets were formulated with complete replacement of FO (treatment 1) with soybean oil (treatment 2), sunflower oil (treatment 3), and canola oil (treatment 4). Twenty five fish (65.12±1.13g mean weight) were allotted for each treatment tanks in duplicates groups at random and were fed for 50 days. There were no significant differences in the final weight of fish in any treatment. The results showed that serum AST, ALT and LDH levels were higher in fish fed the FO diet than the other fish. Hepatic lesions in liver tissue of all fish were characterized as hydropic degeneration, hepatocytes hypertrophy, necrosis, congestion and bleeding. Besides, liver tissues of treatment 1 (control) showed higher degree of liver lesions. These results indicate that oxidation of fish oil can cause hepatic lesions and increasing of serum hepatic enzymes in rainbow trout. In conclusion, mix of vegetable oils and fish oil can replace the sole use of fish oil in rainbow trout diet. Also, when using fish oil in the diet should be a lot of attention to its quality.

Key words: *Rainbow Trout, Fish Oil, Soybean Oil, Sunflower Oil, Canola Oil.*

1- M.Sc. in Fisheries, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Azadshahr Branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran.
2- Associate Professor in Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Azadshahr Branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran.
3- Assistant Professor in Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Azadshahr Branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran.
*Corresponding Author: afshin.ghelichi@yahoo.com