اثر جیره غذایی مکمل‌سازی شده با سلنیوم آلی (Selenomethionine) و سین‌بیوتیک دی‌پروپلاس (Dipro^{+}) به صورت جداگانه و تلفیقی روی ظرفیت آنتی‌اکسدانی، آنزیم‌های متابولیکی کبدی و بافت-شناسی کبد در ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*)

مازیار اکبرآبادی[۱]، حسین خارا[۲]*، حبیب وهابزاده رودسری[۳]، محدثه احمدنژاد[٤] و رقیه صفری[٥]

۱) دانشجوی دکتری، گروه شیلات، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران.
۲) دانشیار گروه شیلات، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران. *رایانامه نویسنده مسئول مکاتبات: h.khara@liau.ac.ir
۳) استادیار گروه شیلات، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران.
٤) استادیار پژوهشکده آبزی‌پروری آب‌های داخلی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرانزلی، ایران.
٥) دانشیار گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

https:/doi.org/10.71916/jrnr.2024.07736
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۱۴

چکیده

استفاده از محرک‌های ایمنی مانند سین‌بیوتیک و عناصر کمیاب از جمله سلنیوم در ماهی‌های پرورشی جهت افزایش فعالیت مکانیسم‌های دفاع غیراختصاصی و ایجاد مقاومت در برابر بیماری‌ها رواج یافته است. هدف از پژوهش حاضر تعیین اثر جیره غذایی مکمل‌سازی شده با سلنیوم آلی و سین‌بیوتیک دی‌پروپلاس به صورت جداگانه و تلفیقی روی ظرفیت آنتی‌اکسدانی، آنزیم‌های متابولیکی کبدی و بافت‌شناسی کبد در ماهی آزاد دریای خزر بود. برای این منظور، تعداد ٥٤٠ قطعه بچه ماهی آزاد دریای خزر با میانگین وزن ۱/٤٥±٦٦/٣٤ گرم (حاصل تکثیر ۱۳۹۸) تهیه شد. ماهیان پس از سازگاری با شرایط آزمایشی رقم‌بندی شدند و در ۲۷ عدد حوضچه مخصوص بچه ماهی‌ها به‌طور کاملا تصادفی توزیع گردیدند. این آزمایش در قالب یک طرح کاملا تصادفی تحت ۸ تیمار آزمایشی و یک گروه شاهد (هر کدام با ۳ تکرار) به مدت ٦۰ روز صورت گرفت. تیمارهای آزمایشی شامل ۲ گرم سین‌بیوتیک در کیلوگرم جیره (تیمار ۱)، ۳ گرم سین‌بیوتیک در کیلوگرم جیره (تیمار ۲)، ۲ میلی‌گرم سلنیوم آلی در کیلوگرم جیره (تیمار ۳)، ٤ میلی‌گرم سین‌بیوتیک در کیلوگرم جیره (تیمار٤)، ۲ گرم سین‌بیوتیک و ۲ میلی‌گرم سلنیوم آلی در کیلوگرم جیره (تیمار٥)، ۲ گرم سین‌بیوتیک و ٤ میلی‌گرم سلنیوم آلی در کیلوگرم جیره (تیمار٦)، ۳ گرم سین‌بیوتیک و ۲ میلی‌گرم سلنیوم آلی در کیلوگرم جیره (تیمار۷)، ۳ گرم سین‌بیوتیک و ٤ میلی‌گرم سلنیوم آلی در کیلوگرم جیره (تیمار۸) بود. سپس در انتهای آزمایش به‌منظور بررسی فعالیت آنزیم‌های کبدی (آلانین آمینوترنسفراز، آسپارتات آمینوترنفراز، آلکالین فسفاتاز) و آنتی‌اکسیدانی سرم (کاتالاز، گلوتاتیون، ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی، گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دسموتاز، مالون‌دی‌آلدهید) خون‌گیری با کمک سرنگ انسولین از سرخرگ یا سیاهرگ ناحیه دمی یا قطع ساقه دمی انجام گرفت. همچنین، جهت سنجش تغییرات بافتی کبد از این بافت نمونه‌برداری شد. نتایج بررسی‌ها نشان داد بین گروه شاهد و تیمارهای تغذیه‌شده با جیره‌های آزمایشی در میزان آنزیم‌های کبدی شامل آلکالین فسفاتاز، آلانین آمینوترنسفراز و آسپارتات آمینوترنسفراز تفاوت معنی‌دار وجود داشت ($P<۰/۰٥$)، به‌طوری‌که بیشترین میزان این آنزیم‌ها در گروه شاهد مشاهده شد. بر اساس نتایج مشاهده گردید کمترین میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل سوپراکسید دیسموتاز، ظرفیت کل‌آنتی‌اکسیدانی، گلوتاتیون پراکسیداز، گلوتاتیون و کاتالاز و بیشترین میزان مالون‌دی‌آلدهید به‌طور معنی‌داری درگروه شاهد مشاهده شد ($P<۰/۰٥$). مطالعه بافت‌شناسی کبد

در پژوهش حاضر نشان داد استفاده از سلنیوم‌آلی و سین‌بیوتیک دی‌پروپلاس به‌صورت جدا از یکدیگر و یا توام باعث ایجاد تغییراتی در بافت کبد بچه ماهیان آزاد دریای خزر شد که در برخی از موارد آسیب‌های بافتی مشاهده شد. به‌طور کلی نتایج نشان داد استفاده توام سین‌بیوتیک دی‌پروپلاس و سلنیوم‌آلی توانست آسیب‌های بافتی را کاهش دهد و به‌عنوان مکمل غذایی در جیره ماهی آزاد دریای خزر توصیه می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم، آنتی‌اکسیدان، سلنیوم‌آلی، سین‌بیوتیک دی‌پروپلاس، کبد، ماهی آزاد دریای خزر.

مقدمه

در دهه‌های اخیر، با توجه به روند رو به رشد جمعیت جهان و نیاز بشر به دستیابی به منابع پروتئینی متنوع و سالم، مصرف آبزیان یکی از راه‌های حیاتی جهت تامین پروتئین در نظر گرفته شد. از این رو، پیش‌بینی شد در دو دهه آینده آبزی-پروری نقش به‌سزایی در تامین غذای بشر و کاهش فقر جهانی ایفا کند. در این راستا، غذاهای غنی‌شده با ترکیبات فعال فیزیولوژیکی مانند: پروبیوتیک، پری‌بیوتیک و سین‌بیوتیک نسبت به سایر ترکیبات برتری مصرف دارند، زیرا علاوه بر اینکه این ترکیبات دوست‌دار طبیعت هستند و تجمع زیستی و مقاومت باکتریایی ایجاد نمی‌کنند، می‌توانند نقش مهمی در تخمیر روده‌ای میزبان داشته و جمعیت باکتریایی روده را به سمت باکتری‌های مفید سوق دهند (Puupponen *et al.*, 2002).

در سال‌های اخیر تحقیقات فراوانی در ارتباط با استفاده از افزودنی‌های غذایی مانند ترکیبات پروبیوتیکی، پری‌بیوتیکی و سین‌بیوتیکی که سبب بهبود سلامت آبزیان می‌گردند، صورت گرفته است (Hoseinifar *et al.*, 2019; Kuebutornye *et al.*, 2020; Mohammadian *et al.*, 2019; Ghafarifarsani *et al.*, 2021b; Zakariaee *et al.*, 2021; Yilmaz *et al.*, 2022; Mohammadi *et al.*, 2022). در واقع، استفاده همزمان گونه‌های پروبیوتیکی به همراه پری-بیوتیک‌های مناسب به‌عنوان سوبسترایی برای افزایش غالبیت و رشد پایدار باکتری‌های پروبیوتیکی تحت عنوان سین‌بیوتیک می‌باشد (Zakariaee *et al.*, 2021)، زیرا گونه‌های پروبیوتیکی برای تشکیل کلونی پایدار و حفظ غالبیت در میکروبیوتای روده‌ای آبزیان ناتوان می‌باشند (Li & Gatlin, 2003).

استفاده از مکمل‌های غذایی معدنی به خصوص عناصر کمیاب به‌دلیل ضرورت تامین مایحتاج مورد نیاز جیره برای موجود زنده و تاثیر کمبود آن بر سلامتی و رشد بسیار مورد توجه پرورش‌دهندگان دام و آبزیان قرار گرفته است (Oliva-Teles, 2012; Dato-Cajegas & Yakupitiyage, 1996). این مکمل‌ها علاوه بر بهبود شاخص‌های رشد منجر به افزایش مقاومت ماهی نسبت به استرس‌های محیطی، بیماری‌های عفونی مختلف و تحریک سیستم ایمنی غیراختصاصی آبزیان می‌گردند که همه این عوامل در نهایت منجر به بهبود کارآیی تولید در صنعت آبزی‌پروری می‌شود (Roubach *et al.*, 2019). علاوه بر مهیا نمودن شرایط مناسب پرورش، تغذیه آبزیان پرورشی با جیره‌های مناسب که حاوی ترکیبات ضروری و در عین حال موثر سبب بهبود عملکرد رشد و کاهش ضریب تبدیل غذایی می‌گردند، امری است که توجه به آن ضروری به نظر می‌رسد. بهبود جیره‌های غذایی فرموله‌شده برای افزایش رشد و ارتقا سلامتی آبزیان یکی از مسایل عمده در آبزی‌پروری پایدار است (Chebanov & Billard, 2001). در این بین، سلنیوم از جمله عناصر کمیاب ضروری برای تمامی موجودات زنده است (Hamilton, 2004). سلنیوم یک ریزمغذی ضروری برای انسان، حیوانات و ماهیان محسوب می‌شود. این فلز جز اصلی ساختمان آنزیم گلوتاتیون‌پراکسیداز است. وظیفه این آنزیم محافظت سلول‌ها و غشاها در برابر آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد است (Watanabe *et al.*, 1997). علاوه بر این، سلنیوم نقش مهمی در محافظت بدن موجودات در برابر اثرات سمی فلزات سنگین مانند کادمیوم و جیوه دارد. همچنین وجود این عنصر برای رشد بافت عضله ضروری و باعث تقویت سیستم ایمنی و ثبات ژنومی نیز می‌گردد (Miezeliene *et al.*, 2011).

تا کنون مطالعات مختلفی در ارتباط با اثر مثبت سین بیوتیک تجاری بر عملکرد رشد، تولیدمثل و ایمنی آبزیان

صورت گرفته است. به‌عنوان مثال می‌توان به اثر استفاده از سین‌بیوتیک بایومین ایمبو (پروبیوتیک: *Enterococcus faecium* و پربیوتیک: فروکتوالیگوساکارید به همراه قطعات دیواره سلولی باکتری‌های مفید و ترکیبات فایکوفایتیک) روی ماهی زبرا (Nekoubin *et al*., 2012a; Ghafarifarsani *et al*., 2021a)، ماهی آنجل (Nekoubin *et al*., 2012b)، تاس ماهی روسی (Vaezi *et al*., 2016)، ماهی کپور (قاسم‌پوردهاقانی و همکاران، ۱۳۹۲) و ماهی کفال (بیتا و همکاران، ۱۳۹۶) اشاره کرد. همچنین اثر سلنیوم روی فیل‌ماهی (صفابخش و همکاران، ۱۳۹۸؛ رجبی‌استرابادی و همکاران، ۱۳۹۱) و قزل‌آلای رنگین‌کمان (نظری و همکاران، ۱۳۹۶) مورد بررسی قرار گرفته است.

آزاد ماهیان از مهم‌ترین گونه‌های پرورشی ماهیان در سراسر دنیا می‌باشند. پرورش آزادماهیان از زمان‌های گذشته تا کنون در جوامع مختلف در حال انجام است (Lee & Donaldson, 2001). در این میان، ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*) یکی از ارزشمندترین ماهیان اقتصادی دریای خزر بوده که به‌طور عمده در جنوب و سواحل دریای خزر وجود دارد (وثوقی و مستجیر، ۱۳۷۱). در سال‌های اخیر، بنا به دلایلی از جمله صید بی‌رویه، نسل این ماهیان دارای ارزش اقتصادی بالا در معرض خطر انقراض قرار گرفته است (Kiabi *et al*., 1999). از این رو، تکثیر و پرورش مصنوعی این گونه اقتصادی برای بازسازی و حفظ ذخایر انجام می‌گردد و بچه ماهیان به رودخانه‌های منتهی به دریای خزر به ویژه رودخانه چشمه کیله تنکابن رهاسازی می‌شوند (روشن‌طبری و همکاران، ۱۳۹۳).

از آن‌جایی که ماهی آزاد دریای خزر از گونه‌های با اهمیت اقتصادی بالا جهت آبزی‌پروری است، توجه به نیازهای تغذیه-ای این گونه باارزش حایز اهمیت می‌باشد. با این حال، تاکنون مطالعات محدودی در ارتباط با نیازهای غذایی آن صورت گرفته است. به‌طوری‌که در اکثر موارد، از نتایج تحقیقات صورت گرفته روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان برای ماهی آزاد دریای خزر استفاده می‌شود. این در حالی است که از ضروریات پرورش یک گونه، شناخت اثر مکمل‌های غذایی مختلف در جهت بهبود شاخص‌های رشد، سیستم ایمنی و عملکرد دستگاه گوارش می‌باشد. این مسئله در مورد سلنیوم و سین‌بیوتیک‌ها نیز صادق است. به نحوی که تاکنون اثر سلنیوم و سین‌بیوتیک دی پرو پلاس به‌صورت مجزا و توام روی ماهی آزاد دریای خزر مورد بررسی قرار نگرفته است. به همین دلیل هدف از انجام این تحقیق، بررسی اثر توام سلنیوم آلی و سین‌بیوتیک دی‌پروپلاس روی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، آنزیم‌های متابولیکی کبدی و بافت‌شناسی کبد در ماهی آزاد دریای خزر بود.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد و محل انجام آزمایش: این تحقیق به مدت ۶۰ روز در مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت واقع در استان مازندران انجام شد. بدین منظور، سین‌بیوتیک دی‌پروپلاس از شرکت دانش‌بنیان تک‌ژن‌زیست (تهران) و سلنیوم‌آلی از شرکت دانش‌بنیان توسعه مکمل زیست‌فناور آریانا (مشهد) (متشکل از عنصر سلنیوم می‌باشد که به شکل یون با مولکول‌های آلی اسیدآمینه متیونین باند شده و با حامل کنسانتره‌ای متشکل از ذرت، سویا، جو و سبوس ترکیب شده است) تهیه گردید. اجزای تشکیل‌دهنده سین-بیوتیک دی‌پروپلاس در جدول (۱) آورده شده است.

جدول ۱. ترکیبات تشکیل‌دهنده سین‌بیوتیک دی‌پروپلاس

بخش پروبیوتیکی	باسیلوس سابتیلیس (*Bacillus subtilis*)، باسیلوس لیکنی‌فورمیس (*Bacillus licheniformis*)، باکتری لیوفیلیزه پدیوکوکوس اسیدی‌لاکتیکی (*Pediococcus acidilactici*) و ٤ سویه از باکتری‌های اسیدلاکتیکی
بخش پری‌بیوتیکی	مانان اولیگو ساکارید

جدول ۲. آنالیز خوراک استفاده شده جهت تغذیه بچه ماهی‌ها

قطرخوراک (میلی‌متر)	وزن ماهی (گرم)	حداقل پروتئین خام (٪)	حداقل چربی خام (٪)	انرژی قابل هضم (کیلوکالری بر کیلوگرم)	حداکثر فیبرخام (٪)	حداقل فسفر قابل جذب (٪)	حداکثر رطوبت (٪)
۳/۲-۳/٤	۷۵-۲۵	٤٤	۱٤/۵	٤۳۰۰	۲/۲	۰/۸	۱۰

جدول ۳. نحوه تیماربندی ماهی آزاد دریای خزر به مدت ٦۰ روز

تیماربندی	کدبندی	سلنیوم (Se) (میلی‌گرم در کیلوگرم جیره)	سین‌بیوتیک دی‌پروپلاس (Dip) (گرم در کیلوگرم جیره)
گروه شاهد	Dip0Se0	-	-
تیمار ۱	Dip2Se0	-	۲
تیمار ۲	Dip3Se0	-	۳
تیمار ۳	Dip0Se2	۲	
تیمار ٤	Dip0Se4	٤	
تیمار ۵	Dip2Se2	۲	۲
تیمار ٦	Dip2Se4	٤	۲
تیمار ۷	Dip3Se2	۲	۳
تیمار ۸	Dip3Se4	٤	۳

طراحی آزمایش و تهیه جیره غذایی: آزمایش در قالب یک طرح کاملا تصادفی تحت ۸ تیمار آزمایشی و یک گروه شاهد (هر کدام با ۳ تکرار) صورت گرفت. برای این منظور، تعداد۵٤۰ قطعه بچه ماهی آزاد دریای خزر با میانگین وزن ۱/٤۵±٦٦/٤٤ گرم (حاصل تکثیر ۱۳۹۸) تهیه شد. ماهیان پس از سازگاری با شرایط آزمایشی رقم‌بندی شدند و در ۲۷ عدد حوضچه (۲۰ قطعه در هر تانک) مخصوص بچه ماهی‌ها به‌طور کاملا تصادفی توزیع گردیدند. در این مطالعه، از خوراک اکسترود رشد۲[1] شرکت تعاونی۲۱بیضا استفاده شد. مشخصات فیزیکی و آنالیز غذای مصرفی در جدول (۲) نشان داده شده است. همچنین، نحوه تیماربندی بچه ماهیان نیز در جدول (۳) بیان شده است.

بررسی شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب: هر یک از حوضچه‌ها به‌طور جداگانه به سیستم هوادهی مجهز شده بودند. در طول آزمایش سطح اکسیژن آب در حد استاندارد نگهداری شد. شاخص‌های کیفی آب مانند دما، پی‌اچ و اکسیژن محلول با استفاده از دستگاه EUTECH مدل DO6 به‌طور روزانه اندازه‌گیری شد. در طول اجرای آزمایش سعی شد دمای آب روی ۱۷ درجه سانتی‌گراد، پی‌اچ روی ٦/۹-۷ و اکسیژن در حد ۷ میلی‌گرم در لیتر تثبیت شود (صیادبورانی و همکاران، ۱۳۹۳).

بررسی آنزیم‌های متابولیکی کبد: اندازه‌گیری آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز، آلانین آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون (کرج، ایران) و دستگاه اتوآنالایزر[2] با روش آنزیمی[3] مطابق دستورالعمل انجام شد. نتایج برای ترانسفرازهای کبدی در طول موج ۳٤۰ نانومتر و برای آلکالین فسفاتاز در طول موج ٤۰۵ نانومتر با واحد IU ارایه گردید (Reitman & Frankel, 1957).

بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی: از نمونه‌های بافت کبد استخراج شده و نگهداری شده در فریزر، جهت سنجش برخی از پارامترهای استرس اکسیداتیو استفاده شد. سنجش فعالیت کاتالاز[4] به روش Koroluk و همکاران (۱۹۸۸) بر اساس

1. EX-TG2
2. Perstige 24i
3. IFCC International Federation of Clinical Chemistry
4. CAT

کاهش جذب نوری آب اکسیژنه، گلوتاتیون[1] با استفاده از معرف المن که با گروه‌های سولفیدیل احیا واکنش داده و تولید کمپلکس رنگی می‌کند (Ellman, 1959)، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل با استفاده از تری‌پیریدیل تری‌آذین[2] و بر اساس روش Benzie و همکاران (۱۹۹۶) و تعیین میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز[3]، گلوتاتیون پراکسیداز[4] با استفاده از کیت تجاری، و مالون دی‌آلدئید[5] به‌ترتیب با استفاده از کیت‌های تجاری بر اساس واکنش با تری‌کلرواستیک اسید و در نهایت تیوباربیتوریک اسید صورت گرفت (Razygraev *et al.*, 2018).

نمونه‌برداری از کبد به‌منظور بررسی‌های بافت‌شناسی: از هر کدام از تیمارها نمونه‌برداری کبد انجام گرفت. بچه ماهیان ابتدا با استفاده از عصاره گل میخک (۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) بیهوش و کشته شدند. سپس، بلافاصله پس از باز کردن محوطه شکمی، روده و کبد آنها خارج شد. نمونه‌های بافتی در فرمالین ۱۰ درصد جهت ثبوت غوطه‌ور و مراحل آماده‌سازی و پاساژ بافتی، آبگیری، شفاف‌سازی و غوطه‌ورسازی در پارافین صورت گرفت. در مرحله نهایی، قالب‌های پارافینی تهیه و با استفاده از میکروتوم، برش‌های ٦-۵ میکرومتری از قالب‌ها تهیه و گسترش بافتی نیز آماده گردید. در نهایت نمونه‌ها به وسیله هماتوکسیلین-ائوزین و تری‌کروم‌ماسون رنگ‌آمیزی شدند (Takashima *et al.*, 2005).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: این آزمایش در یک طرح کاملا تصادفی و در قالب آزمون فاکتوریل با دو فاکتور شامل فاکتور اول سین‌بیوتیک دی‌پروپلاس در سه سطح و فاکتور دوم سلنیوم‌آلی در سه سطح و هر کدام با سه تکرار انجام شد. داده‌های به‌دست آمده جهت بررسی نرمالیتی با استفاده از آزمون کولوموگروف‌اسمیرنوف بررسی شدند. سپس با استفاده از آنالیز واریانس دو طرفه و جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد از نرم افزار SPSS ویرایش ۲۱ استفاده شد. همچنین، تمامی نمودارها و جدول‌ها در محیط آفیس ۲۰۱۰ ترسیم گردید.

نتایج

آنزیم‌های متابولیکی کبد در ماهیان آزاد تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی نتایج به‌دست آمده از آنزیم‌های متابولیکی کبدی در جدول (٤) نشان داده شده است. نتایج بررسی‌ها نشان داد بین گروه شاهد و تیمارهای تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی در میزان آنزیم‌های کبدی شامل آلکالین فسفاتاز، آلانین آمینوترنسفراز و آسپارتات آمینوترنسفراز تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($P<۰/۰۵$)، به‌طوری‌که بیشترین میزان این آنزیم‌ها در گروه شاهد مشاهده شد. همچنین نتایج جدول (٤) نشان داد ترکیب سین‌بیوتیک و سلنیوم آلی در هر سه شاخص کبدی (ALP، ALT و AST) با یکدیگر بر هم‌کنش متقابل داشتند ($P<۰/۰۵$).

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ماهیان آزاد تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی

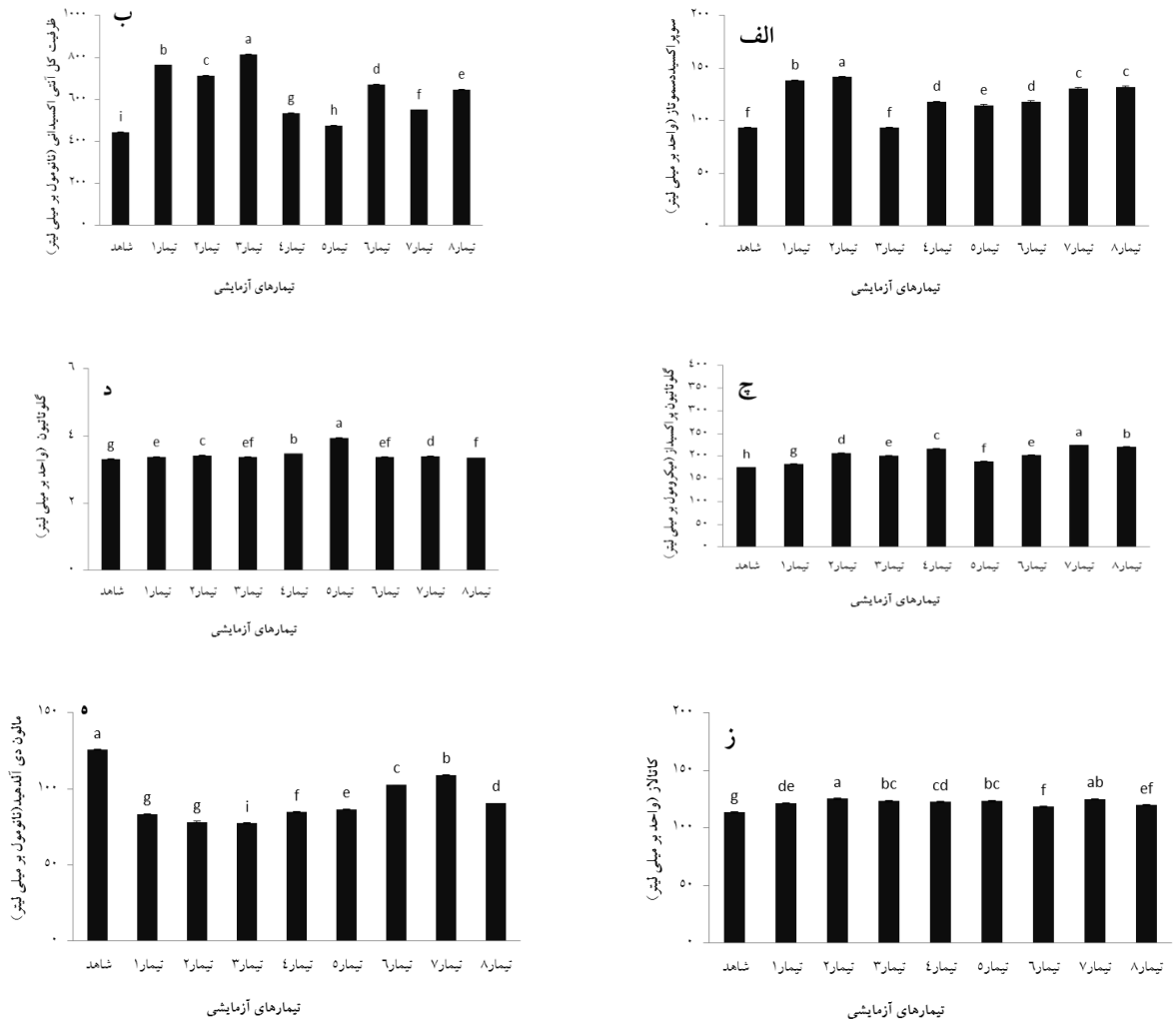
نتایج به‌دست آمده از بررسی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ماهیان آزاد تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی در شکل (۱) نشان داده شده است. بر اساس نتایج مشاهده گردید کمترین میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل سوپراکسیددیسموتاز، ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی، گلوتاتیون پراکسیداز، گلوتاتیون و کاتالاز و بیشترین میزان مالون دی آلدهید به‌طور معنی‌داری در گروه شاهد مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). همچنین، بیشترین میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (به جز ظرفیت کل آنتی اکسیدانی) به‌طور معنی‌داری در تیمارهای سین‌بیوتیکی ($P<۰/۰۵$) و کمترین میزان مالون‌دی‌آلدهید نیز در تیمار ۳ (۲ میلی‌گرم سلنیوم آلی) مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). به علاوه، نتایج حاصل از آنالیز طرح فاکتوریل نشان داد بین دو مکمل استفاده شده برای جیره ماهیان آزاد دریای خزر رابطه متقابل وجود دارد ($P<۰/۰۵$).

1. GSH
2. TPTZ
3. SOD
4. GPx
5. MDA

جدول ٤. مقایسه میانگین آنزیم‌های متابولیکی کبد در ماهیان آزاد دریای خزر تغذیه شده با سطوح مختلف سلنیوم‌آلی و سین‌بیوتیک دی‌پروپلاس به مدت ٦٠ روز

آنزیم‌های کبدی	تیمارهای آزمایشی*							
	گروه شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ٤	تیمار ٥	تیمار ٦	تیمار ۷	تیمار ۸
آلانین آمینوترنسفراز (واحد درلیتر)	± ۰/۸۸^{a}	± ۰/٦٦^{de}	± ۰/۸۸^{dc}	± ۰/۳۳^{e}	۰/۸۸^{abc}	± ۰/۰۰^{cd}	۰/۳۳^{bcd}	± ۰/۳۳^{ab}	± ۲/۵۲^{cd}
	۳۳/۳۳	۲٦/۳۳	۲۸/٦۷	۲٤/۳۳	± ۳۰/٦۷	۲۸/۰۰	۲۹/۳۳ ±	۳۲/۳۳	۲۸/۰۰
آسپارتات آمینوترنسفراز (واحد درلیتر)	± ۱/٤٥^{a}	± ۰/٦۷^{g}	± ۰/۸۸^{f}	± ۰/٦۷^{h}	± ۱/۲۰^{d}	± ۰/۰۰^{c}	± ۰/۸۸^{b}	± ۰/۳۳^{e}	± ۰/۵۸^{c}
	۲٦۲/٦۷	۲۰٦/۳۳	۲۲٦/٦۷	۱۹۸/٦۷	۲۳۸/۳۳	۲٤۷/۰۰	۲۵۳/۳۳	۲۳۱/۳۳	۲٤٦/۰۰
آلکالین فسفاتاز (واحد درلیتر)	± ۰/۸۸^{a}	± ۱/۰۰^{h}	± ۱/۱۵^{g}	± ۰/٦۷^{i}	± ۰/٦۷^{f}	± ۰/۳۳^{b}	± ۰/۸۸^{c}	± ۰/٦۷^{d}	± ۰/٦۷^{c}
	۷۳۰/۳۳	٤۹۲/۰۰	۵۳۲/۰۰	۵۰۹/۱۳	۵٦٤/۳۳	٦۷۲/٦۷	٦۰۹/۳۳	۵۹۷/٦۷	۵۸٦/۳۳

* حروف لاتین غیرهمنام در هر ردیف تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهند ($P<۰/۰۵$).



شکل ۱. میانگین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی: الف) سوپراکسیددسموتاز، ب) ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی، ج) گلوتاتیون پراکسیداز، د) گلوتاتیون، ز) کاتالاز، ه) مالون‌دی‌آلدهید در ماهیان آزاد دریای خزر تغذیه شده با سطوح مختلف سلنیوم‌آلی و سین‌بیوتیک دی‌پروپلاس به مدت ٦٠ روز

* حروف لاتین غیرهمنام در هر ستون تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهد ($P<۰/۰۵$).

نتایج حاصل از بررسی بافت‌شناسی کبد در ماهیان آزاد تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی

مطالعه بافت شناسی کبد در تحقیق حاضر نشان داد استفاده از سلنیوم‌آلی و سین‌بیوتیک دی‌پروپلاس به‌صورت جدا از یکدیگر و یا توام، باعث ایجاد تغییراتی در بافت کبد بچه ماهیان آزاد دریای خزر شد که آسیب‌های بافتی مشاهده شده در جدول (۵) و شکل‌های (۲) و (۳) نشان داده شده‌اند. بر اساس نتایج مشاهده شد در گروه شاهد بافت کبد طبیعی بود و هپاتوسیت‌ها بیشترین جمعیت سلول‌های کبدی را تشکیل می‌دادند. هپاتوسیت‌ها سلول‌هایی چندضلعی با هسته‌های کروی پررنگ بودند که حد و مرز آنها کاملا واضح و مشخص بود. حضور واکویل‌های چربی درون سیتوپلاسم برخی سلول‌ها به‌صورت ذرات سفید رنگ مشهود بود.

در تیمار ۱ (۲ گرم سین‌بیوتیک به ازای ۱ کیلوگرم غذا، بدون افزودن سلنیوم‌آلی)، بیشتر هپاتوسیت‌ها سالم بودند، اما نسبت به گروه شاهد اندازه کوچکتری داشتند و کاهش لیپیدها در آنها قابل مشاهده بود. بی‌نظمی‌های معدودی همچون پیکنوز هسته‌ای و آتروفی در برخی سلول‌ها مشاهده شد.

در تیمار ۲ (۳ گرم سین‌بیوتیک به ازای ۱ کیلوگرم غذا، بدون افزودن سلنیوم‌آلی) بیشتر هپاتوسیت‌ها سالم بودند، اما نسبت به گروه شاهد اندازه کوچکتری داشتند که کاهش لیپیدها هم در آنها قابل مشاهده بود. بی‌نظمی‌های معدودی همچون

پیکنوز هسته‌ای و آتروفی در برخی سلول‌ها مشاهده شد که میزان این آسیب‌ها نسبت به تیمار ۱ بیشتر بود.

در تیمار ۳ (بدون افزودن سین‌بیوتیک و ۲ میلی‌گرم سلنیوم آلی به ازای ۱ کیلوگرم غذا) پیکنوز هسته‌ای و آتروفی به‌صورت محدود قابل مشاهده بود. کاریورکسی و کاریولیز و به دنبال آن دژنره شدن هپاتوسیت‌ها و نکروز مشاهده شد.

در تیمار ٤ (بدون افزودن سین‌بیوتیک و ٤ میلی‌گرم سلنیوم‌آلی به ازای ۱ کیلوگرم غذا). آتروفی سلولی و پیکنوز هسته‌ای بیشتر از تیمار ۳ بود. هسته در تعداد زیادی از سلول‌ها دچار کاریورکسی و کاریولیز شده بود و نکروز سلولی نیز قابل توجه بود. همچنین تورم ابری در برخی سلول‌ها مشاهده شد. میزان آسیب بافتی در این تیمار نسبت به سایر تیمارها شدت بیشتری داشت.

در تیمار ۵ (۲ گرم سین‌بیوتیک به ازای ۱ کیلوگرم غذا، و ۲ میلی‌گرم سلنیوم‌آلی به ازای ۱ کیلوگرم غذا) پیکنوز، کاریورکسی و کاریولیز هسته و آتروفی سلولی و نکروز به میزان کم مشاهده شد. شدت آسیب‌های بافتی نسبت به تیمارهای ۳ و ٤ کمتر بود.

در تیمار ٦ (۲ گرم سین‌بیوتیک به ازای ۱ کیلو گرم غذا، و ٤ میلی‌گرم سلنیوم آلی به ازای ۱ کیلوگرم غذا) کاریورکسی و کاریولیز هسته و نکروز با وسعت بیشتری نسبت به تیمار ۵ مشاهده شد. تعداد معدودی آتروفی و پیکنوز هسته مشاهده شد. در مجموع عوارض بافتی از تیمار ۵ بیشتر بود.

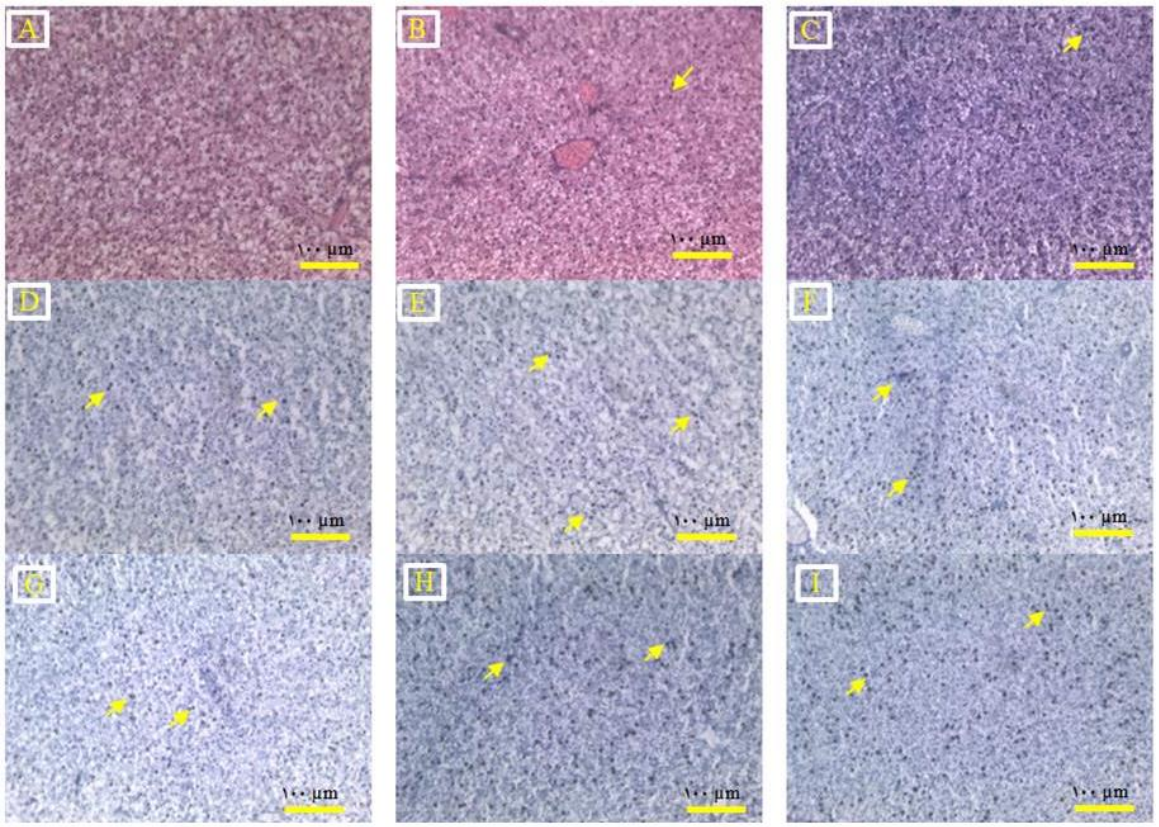
در تیمار ۷ (۳ گرم سین‌بیوتیک به ازای ۱ کیلوگرم غذا، و ۲ میلی‌گرم سلنیوم‌آلی به ازای ۱ کیلوگرم غذا) تعداد معدودی کاریورکسی، کاریولیز هسته مشاهده شد که شدت آنها کمتر از تیمار ٦ بود. همچنین تعداد معدودی پیکنوز هسته مشاهده شد که میزان آن از تیمارهای ۵ و ٦ کمتر بود. هپاتوسیت‌ها از گروه شاهد کوچکتر بودند. آتروفی سلولی و نکروز بافتی به صورت محدود مشاهده شد که میزان آن نسبت به تیمار ٦ کمتر بود.

در تیمار ۸ (۳ گرم سین‌بیوتیک به ازای ۱ کیلوگرم غذا، و ٤ میلی‌گرم سلنیوم‌آلی به ازای ۱ کیلوگرم غذا) هپاتوسیت‌ها از گروه شاهد کوچکتر بودند. تعداد معدودی کاریورکسی، کاریولیز و پیکنوز هسته‌ای مشاهده شد که شدت آنها بیشتر از تیمار ۷ بود. میزان آتروفی سلولی نسبت به تمام تیمارها بیشتر بود.

جدول ۵. آسیب‌های بافتی مشاهده شده در کبد ماهیان آزاد دریای خزر تغذیه شده با سطوح مختلف سلنیوم‌آلی و سین‌بیوتیک دی-پروپلاس به مدت ٦۰ روز

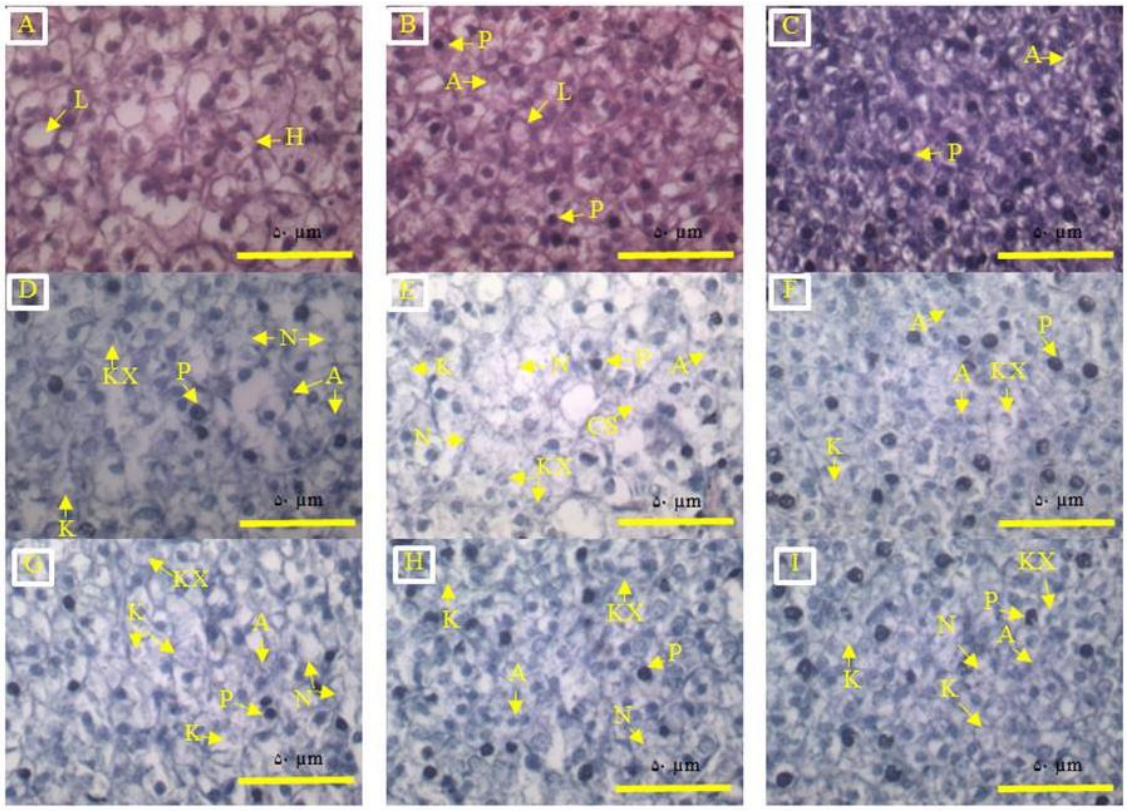
ضایعه	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ٤	تیمار ۵	تیمار ٦	تیمار ۷	تیمار ۸
پیکنوز هسته (Pyknotic Nucleus)	–	+	++	++	+++	+++	++	+	++
کاریورکسی (Karyorrhexis)	–	–	–	+	+++	+	++	+	++
کاریولیز (Karyolysis)	–	–	–	–	+++	+	++	+	++
تورم ابری (Cloudy swelling)	–	–	–	–	+	–	–	–	–
آتروفی (Atrophy)	–	+	++	+	++	+	+	+	+++

نکروز (Necrosis)	–	–	+	+++	+	++	+	+	+



شکل ۲. مقایسه شدت آسیب‌های بافت کبد با استفاده از تصاویر میکروسکوپی با بزرگ‌نمایی ٤٠× از بافت کبد بچه ماهیان آزاد دریای خزر بیوتیک دی‌پروپلاس به‌صورت مجزا و یا توام در تیمارهای ۱ در گروه شاهد و قرار داده شده در معرض سلنیوم‌آلی و سین تا ۸

* با توجه به شکل از هم‌گسستگی سلول‌ها و دژنره شدن و نکروز در تیمارهای ۳ و ٤ نسبت به سایر تیمارها مشهودتر است و شدت پیکنوز در تیمار ٤ منجر به پیشرفت آسیب بافت به سمت انحلال هسته و سیتوپلاسم و در نهایت از بین رفتن سلول شده است. در این شکل، فلش‌ها نقاط پیکنوز هسته‌ای را نشان می‌دهند (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین – ائوزین، بزرگ‌نمایی ٤٠×).



شکل ۳. مقطع عرضی بافت کبد بچه ماهیان آزاد دریای خزر قرار داده شده در معرض سلنیوم‌آلی و سین‌بیوتیک دی‌پروپلاس به‌صورت مجزا و یا توام.

* A: گروه شاهد، بافت کبد طبیعی و واجد هپاتوسیت‌های سالم است. B: تیمار ۱، اندازه هپاتوسیت‌ها نسبت به گروه شاهد کوچکتر هستند، پیکنوز هسته‌ای (P) و آتروفی سلولی (A) مشاهده می‌شود. C: تیمار ۲، اندازه هپاتوسیت‌ها نسبت به گروه شاهد کوچکتر هستند، میزان پیکنوز هسته‌ای (P) و آتروفی سلولی (A) نسبت به تیمار ۱ بیشتر است. D: تیمار ۳، علاوه بر پیکنوز هسته‌ای (P) و آتروفی سلولی (A)، کاریورکسی (KX) و کاریولیز (K) در هسته برخی سلول‌ها و نکروز (N) به میزان محدود مشاهده می‌شود. E: تیمار ٤، پیکنوز هسته‌ای (P)، کاریورکسی (KX) و کاریولیز (K)، آتروفی سلولی (A) و نکروز (N) با شدت بیشتری مشاهده می‌شود. تورم ابری (CS) نیز در برخی سلول‌ها مشاهده می‌شود. F: تیمار ٥، پیکنوز هسته‌ای (P)، کاریورکسی (KX)، کاریولیز هسته (K) و آتروفی سلولی (A) مشاهده می‌شود. شدت آسیب‌های بافتی نسبت به تیمارهای ۳ و ٤ کمتر است. G: تیمار ٦، کاریورکسی (KX)، کاریولیز هسته (K)، نکروز (N) و تعداد معدودی آتروفی سلولی (A) و پیکنوز هسته‌ای (P) مشاهده شد، وسعت آسیب‌های بافتی از تیمار ٥ بیشتر است. H: تیمار ۷، هپاتوسیت‌ها نسبت به گروه شاهد کوچکتر هستند، تعداد معدودی پیکنوز هسته‌ای (P)، کاریورکسی (KX)، کاریولیز هسته (K) و آتروفی سلولی (A) مشاهده شد، نکروز (N) به میزان کم وجود داشت. I: تیمار ۸، هپاتوسیت‌ها از گروه شاهد کوچکترند، میزان پیکنوز هسته‌ای (P)، کاریورکسی (KX)، کاریولیز هسته (K) بیشتر از تیمار ۷ و آتروفی سلولی (A) از سایر تیمارها بیشتر است (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین – ائوزین، بزرگ‌نمایی ٤۰۰×).

** تیمار ۱ (۲ گرم سین‌بیوتیک به ازای ۱ کیلوگرم غذا، بدون افزودن سلنیوم‌آلی)؛ تیمار ۲ (۳ گرم سین‌بیوتیک به ازای ۱ کیلوگرم غذا، بدون افزودن سلنیوم‌آلی)؛ تیمار ۳ (بدون افزودن سین‌بیوتیک و ۲ میلی‌گرم سلنیوم‌آلی به ازای ۱ کیلوگرم غذا)؛ تیمار ٤ (بدون افزودن سین‌بیوتیک و ٤ میلی‌گرم سلنیوم‌آلی به ازای ۱ کیلوگرم غذا)؛ تیمار ٥ (۲ گرم سین‌بیوتیک به ازای ۱ کیلوگرم غذا، و ۲ میلی‌گرم سلنیوم آلی به ازای ۱ کیلوگرم غذا)؛ تیمار ٦ (۲ گرم سین‌بیوتیک به ازای ۱ کیلوگرم غذا، و ٤ میلی‌گرم سلنیوم‌آلی به ازای ۱ کیلوگرم غذا)؛ تیمار ۷ (۳ گرم سین‌بیوتیک به ازای ۱ کیلوگرم غذا، و ۲ میلی‌گرم سلنیوم‌آلی به ازای ۱ کیلوگرم غذا)؛ تیمار ۸ (۳ گرم سین‌بیوتیک به ازای ۱ کیلوگرم غذا، و ٤ میلی‌گرم سلنیوم‌آلی به ازای ۱ کیلوگرم غذا).

*** **علایم اختصاری**: A: آتروفی (Atrophy)؛ CS: تورم ابری (Cloudy swelling)؛ H: هپاتوسیت (Hepatocyte)؛ K: کاریولیز (Karyolysis)؛ L: قطرات چربی (Lipid droplets)؛ KX: کاریورکسی (Karyorrhexis)؛ N: نکروز (Necrosis) و P: پیکنوز هسته (Pyknotic Nucleus).

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعات نشـان داد هر گونه تغییری در فعالیت آنزیم‌های کبدی و افزایش آنها به میزان زیادی نشان‌دهنده آسیب سلولی یک اندام خاص و یا اختلال در فرآیند متابولیک می‌باشـد، بنابراین مطالعه فعالیت آنزیم‌های متابولیکی کبد به‌عنوان یک شـاخص بیوشـیمیایی مهم و یک راهبرد مهم جهت ارزیابی شرایط محیط و وجود ترکیبات سمی در محیط اطراف و یا در جیره غذایی ماهیان مورد توجه می‌باشـد (Baghshani & Shahsavani, 2013). در تحقیق حاضر نتایج بررسی‌ها نشان داد بیشترین میزان آنزیم‌های متابولیکی کبدی (ALP، ALT و AST) به‌طور معنی‌داری در گروه شاهد مشاهده شد. ALP به عنوان یک فسـفومونواسـتراز شـناخته می‌شود و مواد مغذی با فعالیت آن سـم‌زدایی، هضـم و جذب می‌شـوند و در طول زنـدگی عـادی در شـرایط نرمال فعالیت آن زیاد نمی‌باشـد (Yao *et al*., 2022). تـرانس آمینـازهـای کبـدی (ALT وAST) حسـاس‌ترین نشـانگرهای بیوشـیمیایی، شاخص‌های سـرمی برای عملکرد کبـد، تشـخیص بیماری‌های کبدی و شاخص‌های نکروز کبدی هستند (Ali *et al*., 2015). سطوح بالای این آنزیم‌ها ممکن اسـت نشان‌دهنده دژنراسیون، نکروز و آسـیب کبدی به‌دلیل آسـیب سـلولی باشد (Bhardwaj *et al*., 2009; Ahmadifar *et al*., 2020). گزارش شده است که فعالیت آنزیم‌های AST، ALP و ALT در محدوده نرمال نشـان‌دهنده وضـعیت سـلامت ماهی است (Ahmadifar *et al*., 2020). با توجه به اینکه در مطالعه حاضـر میزان این سه شـاخص در گروه شـاهد در مقایسـه با تیمارهای آزمایشـی به‌طور معنی‌داری بیشـتر بود، می‌توان چنین برداشـت کرد که این ترکیبات به هیچ عنوان برای ماهیان آزاد دریای خزر مضـر نبودند، چرا که سـطح حضـور این سـه شاخص در تیمارها از گروه شـاهد نیز کم‌تر بود و ممکن اسـت سـین‌بیوتیک و سـلنیوم‌آلی به خاطر خاصـیتی که دارند، توانسـته باشند نقشی مشـابه با این سـه آنزیم ایفا کنند. بنابراین بدن ترشـح این سه آنزیم را با توجه به عدم نیازش به‌طور خودکار کاهش داد. چرا که مقادیر نامناسـب سـلنیوم جیره در کبد و آبشـش ماهیان انباشـته می‌شـود و موجب تغییرات آسـیب‌شـناختی در کبد، شـامل احتقان سـلول‌های آسـینار، سـینوزوئیدهای کبدی و واکوئـل‌های مربوطه می‌گردد (Khalil *et al*., 2019) و در پژوهش حـاضـر اگر چنین اثرات سـویی رخ می‌داد، میزان تـرواش این سـه فاکتور به داخل جریان خون از گروه شـاهد بیشتر می‌شد (Mansour *et al*., 2017).

بررسی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ماهیان آزاد تغذیه شده با جیره‌های آزمایشـی نشـان داد کمترین میزان آنزیم‌های آنتی اکسـیدانی شـامل سـوپراکسـیددیسـموتاز، ظرفیت کل آنتی اکسیدانی، گلوتاتیون پراکسیداز، گلوتاتیون و کاتالاز و کمترین میزان مـالون‌دی‌آلدهید به‌طور معنی‌داری در مقایسـه با گروه شـاهد مشـاهده شـد. غنی بودن ماهیان از اسـیدهای چرب غیراشـباع این محصـولات را نسـبت به دیگر محصـولات خوراکی در مواجه با فساد اکسیداتیو و پیام‌های منفی ناشی از آن بیشتر مستعد می‌کند (Kashiri *et al*., 2011). در صورت بروز اسـترس اکسیداتیو مقدمات تغییرات شیمیایی بدن فراهم شـده و با پیشـرفت آن، شـرایط و تغییرات نامطلوبی ایجاد می‌شود (احمدی‌فر و همکاران، ۱۳۹۸).

در تحقیق حاضـر، به‌طور کلی بیشـترین میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسـیدانی به‌طور معنی‌داری در تیمارهای سـین‌بیوتیکی مشـاهده گردید. تحقیقات نشـان داد باکتری‌های پروبیوتیکی قادر هسـتند متابولیت‌های مختلفی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی از قبیـل گلوتـاتیون، بوتیرات و فولات را تولیـد کنند که نقش مهمی در بهبود وضـعیت اکسـیداتیو دارند (Wang *et al*., 2017). هـمچنین، اکثر پروبیوتیـک‌هـا سـنتز آنزیم‌هـای آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون را برای حذف موثر رادیکال‌های آزاد و حفظ تعادل وضعیت اکسیداتیو تحریک و افزایش می‌دهند (Carbone & Faggio. 2016; Bartoskova *et al*., 2013; Li *et al*., 2012; Castex *et al*., 2009; Faggio *et al*., 2016). تحت شـرایط اسـترس سـیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی شامل سه آنزیم مهم سوپراکسید دیسـموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز برای مهار گونه‌های اکسیژنی فعال ضروری است (Atencio *et al*., 2009). آنزیم سـوپراکسیددیسموتاز یکی از آنزیم‌های مهم در دستگاه دفاعی آنتی‌اکسـیدانی اسـت که افزایش فعالیت این آنزیم نشان‌دهنده مهار شـدن فعالیت رادیکال‌های آزاد و بهبود وضـعیت آنتی اکسـیدانی میزبان اسـت (Puangkaew *et al*., 2005). در واقع، این آنزیم رادیکال سـوپراکسید را به اکسیژن مولکولی یا پراکسـیدهیدروژن تبدیل می‌کند، سـپس کاتالاز، پراکسـید هیـدروژن را بـه اکسـیژن تکی و مولکول آب تجزیه می‌کند

(Pascual *et al*. 2003). محققان مختلف دریافتند پروبیوتیک‌ها به‌طور معنی‌دار پراکسیداسیون لیپیدی و تشکیل نیتریک‌اکساید را در بافت‌های بدن مهار کرده و از این طریق آسیب اکسیداتیو ایجاد شده را کاهش، و مقادیر آنزیم‌های آنتی اکسیدانی از قبیل گلوتاتیون پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز و سوپراکسید دیسموتاز را افزایش می‌دهند (Yadav *et al*., 2008). همچنین، ثابت شد که کارآیی پروبیوتیک‌ها در ترکیبات سین‌بیوتیکی بسیار بیشتر از حالت منفرد آنها است (Hosseinifar *et al*., 2017; Lee *et al*., 2016; Dawood *et al*., 2019; Zhang *et al*., 2013)، بنابراین، احتمال می‌رود که در پژوهش حاضر به علت استفاده از ترکیبات سین‌بیوتیکی در جیره، سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی ماهیان آزاد ارتقا یافته باشد. از سویی دیگر، ثابت شده است که سلنیوم به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان غیرمستقیم نیز محسوب می‌گردد، چرا که کوفاکتور اصلی برای ساخت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله گلوتاتیون‌ها است (Bell *et al*., 1986; Hilton *et al*., 1980). در این راستا، Chiu و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند استفاده از سلنیوم فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز را افزایش می‌دهد، زیرا جزیی جدایی‌ناپذیر از ساختمان این آنزیم است. در واقع سلنیوم با افزایش فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز سبب تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی می‌گردد (Hilton *et al*., 1980). زمانی که این ریزمغذی همراه با ترکیب سین‌بیوتیکی به جیره ماهیان آزاد اضافه شده، در اثر هم‌افزایی بین این دو مکمل نتایج بهتر را در تیمارهایی که در جیره آنها سین‌بیوتیک وجود داشت، نشان داد. همچنین، در تحقیق حاضر مشخص شد بیشترین و کمترین میزان مالون‌دی آلدهید به‌ترتیب در گروه شاهد و تیمار ۳ (۲ میلی‌گرم سلنیوم آلی) وجود داشت. بر اساس یافته‌ها مالون‌دی‌آلدهید محصول ثانویه پراکسیداسیون لیپیدها است و به‌صورت مستقیم می‌تواند درجه پراکسیداسیون لیپیدها و به‌صورت مستقیم سطح آسیب به سلول را نشان دهد (Peng *et al*., 2010). بسیاری از محققان بیان کردند سطح بالاتر مالون‌دی‌آلدهید به‌عنوان یک نشانگر استرس اکسیداتیو اندازه‌گیری می‌شود و سطوح پایین‌تر با زندگی طولانی‌تر و کیفیت بهتر گوشت در ارتباط است (Gatta *et al*., 2000)، بنابراین کاهش میزان مالون‌دی آلدهید و افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در تمامی تیمارها در مقایسه با گروه شاهد نشان می‌دهد که این دو مکمل در تلفیق با یکدیگر و همچنین به صورت مجزا سبب پایداری و افزایش میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود. آنزیم‌های آنتی اکسیدانی تولید شده به وسیله تحریک سین‌بیوتیک مصرفی و همچنین سلنیوم‌آلی که خود جزیی از ساختمان برخی از این آنزیم‌ها هستند، سبب حذف رادیکال‌های آزاد و مهار ادامه واکنش‌های زنجیره‌ای تولید رادیکال‌های آزاد می‌شوند. به علاوه، عدم مصرف این آنزیم‌های تولید شده پس از تغذیه با مکمل‌های مذکور به‌دلیل عدم وجود شرایط استرس، سبب بالا نگه داشته شدن سطح این آنزیم‌ها شده و در مقابل از تولید مالون‌دی‌آلدهید در گروه‌های تیمار جلوگیری به عمل می‌آید (Khosravinia *et al*., 2015). با این حال، در تیمار ٤ (٤ میلی‌گرم سلنیوم‌آلی)، کاهش اثر سلنیوم در این تیمار در مقایسه با تیمار ۳ می‌تواند به علت سمیت این عنصر در غلظت‌های بالا باشد که در نتیجه استفاده گسترده از این عنصر را به عنوان کاهش‌دهنده مالون‌دی‌آلدهید با محدودیت مواجه می‌کند (Zhou *et al*., 2009).

مطالعات هیستوپاتولوژی به‌عنوان یک روش ارزشمند برای ارزیابی آثار محیطی انواع متفاوتی از آلاینده‌ها روی ماهی شناخته می‌شود (قرشی و همکاران، ۱۳۹۲). از این رو، می‌توان در شرایط آزمایشگاهی با به‌کارگیری انواع مواد و بررسی‌های بافتی در اندام‌های مختلف ماهیان از آنها به عنوان نشانگرهای زیستی یاد کرد (پوستی و ادیب‌مرادی، ۱۳۸۷). کبد نیز اندامی است که اعمال حیاتی مختلفی را در ارتباط با متابولیسم در بدن انجام می‌دهد. همچنین این اندام در نقل و انتقالات زیستی شرکت دارد و از این‌رو این اندام در بدن موجودات بسیار حایز اهمیت می‌باشد (رضوانی‌گیل‌کلایی و همکاران، ۱۳۸۵). تحقیقات نشان داد این اندام حیاتی نقش کلیدی در متابولیسم و تغییر شکل بیوشیمیایی مواد شیمیایی محیطی ایفا می‌کند که در نهایت با ایجاد جراحات و یا تغییرات هیستوپاتولوژی پارانشیم خود یا مجرای صفراوی روی سلامت کبد بازتاب می‌گردد (جوادزاده و همکاران، ۱۳۹٤).

تا کنون مطالعاتی در ارتباط با اثرات محیطی و تغذیه‌ای سلنیوم‌آلی روی بافت‌شناسی کبد ماهیان صورت نگرفته است. همچنین، برای توجیه مکانسیم اثر حفاظتی سین‌بیوتیک روی بافت‌شناسی کبد می‌توان به موارد مشابه روی سایر گونه‌ها

اشـــاره کرد، زیرا بر اســـاس دانســـته‌ها هیچ مطالعه‌ای درباره ســـین‌بیوتیک دی‌پروپلاس و یا ســـین‌بیوتیک‌های دیگر روی ماهی آزاد دریای خزر یافت نشـــده اســـت. در همین راســـتا، Ghaly و همکـاران (۲۰۲۳) گزارش کردنـد تغییرات بـافـت کبـدی در مـاهی تیلاپیـای تغـذیه شـــده با مکمل‌های پرو و پری‌بیوتیکی به صورت مجزا و تلفیقی شامل نکروزه، دژنراتیو چربی می‌شـد که تغییرات در آسـین پانکراس، نکروز لوله‌ای دژنراتیو بـالا و هیپرپلازی خونســـاز بود. در مطـالعه مذکور، گروه‌هـای مـاهی کـه مکمـل‌هـای غـذایی بـا پروبیوتیـک، پری‌بیوتیک و ســین‌بیوتیک دریافت کرده بودند، در مقایســه با گروه‌های بدون مکمل میزان آسیب کمتری به قسمت کوردون کبد وارد شد و پرخونی کمتری را نشان دادند. گزارش‌ها نشان داد واکوئلاســـیون ســـلول‌هـای کبـدی در پارانشـــیم کبدی نشـان‌دهنده اثرات مثبت پروبیوتیک‌ها، بدون پاسخ‌های التهابی مضـر بر سیستم ایمنی بدن میزبان است (Saad, 2006) که با نتایج تحقیق حاضـــر مطابقت داشـــت. این پژوهش بیان کرد ســـین‌بیوتیک دی‌پروپلاس توانســـت اثرات مخرب ســـلنیوم را کاهش دهد. اگر چه ســـلنیوم ماده غذایی کمیاب و ضـــروری برای انســـان‌ها و حیوانات اســـت و می‌تواند عملکرد طبیعی ایمنی، تولیدمثل و سیستم عصبی موجودات را حمایت کرده و از بیمـاری‌هـای متعـدد جلوگیری نمـاید (قنبری و همکاران، ۱۳۹۶)، ولی نتایج تحقیق حاضـر نشـان داد میزان مصـرف آن بـاید کنترل شـــده و همراه با یک محافظت‌کننده مانند مکمل ســین‌بیوتیکی باشـد. چرا که سلنیوم صرف‌نظر از شکل آن اگر در مقدار بهینه مصـرف شود، می‌تواند سمیت را در کبد، کلیه، طحال، مغز و قلب حیوانات کاهش دهد (Zwolak, 2020).

به‌طور کلی نتایج نشـــان داد اســـتفاده توام ســـین‌بیوتیک دی‌پروپلاس و ســـلنیوم‌آلی توانســـت ســـبب تقویت ظرفیت سـیسـتم آنتی‌اکسـیدانی ماهیان آزاد دریای خزر گردد. اگر چه ســـلنیوم ماده غذایی کمیاب و ضـــروری برای انســـان‌ها و حیوانـات اســـت و می‌توانـد عملکرد طبیعی موجودات را حمـایـت کرده و از بیمـاری‌های متعدد جلوگیری نماید، ولی زمانی‌که مقدار اسـتفاده آن بیش از حد مجاز باشد، سبب بروز آســـیـب‌هـای بـافتی می‌گردد. بـا این حـال، ســـین‌بیوتیـک دی‌پروپلاس توانست اثرات مخرب سلنیوم را کاهش دهد.

منابع

قرشی، ش.، شجیعی، ه.، واعظی، غ. و محمدنژادشموشکی، م. (۱۳۹۲) عوارض هیستوپاتولوژیک کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhychus mykiss*) در مواجهه با غلظت‌های تحت حاد اتیلن دی‌آمین تترااستیک اسید (EDTA). زیست شناسی جانوری، ٦(۱): ۵۰-۴۱.

احمدی‌فر، ا.، آدینه، ح.، فدای‌رایتی، ر. و مقدم‌فر، س. (۱۳۹۸) تاثیر پودر گلبرگ زعفران بر عملکرد رشد، تغذیه و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی لارو ماهی کپور علفخوار. مجله علمی شیلات ایران، ۲۸(۳): ٤٤-۳۳.

بیتا، س.، اکبری، پ.، سرحدی‌پور، م.ی. و نگهداری-جعفربیگی، ی. (۱۳۹٦) تاثیر سین بیوتیک BiominImbo بر عملکرد رشد، تغذیه و ترکیب شیمیایی لاشه بچه ماهی کفال خاکستری. تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های آن، ۳۰(۱): ۱۹٤-۲۰۰.

پوستی، ا. و ادیب‌مرادی، م. (۱۳۸۷).بافت‌شناسی مقایسه‌ای و هیستوتکنیک، تهران: انتشارات دانشگاه تهران، ١٦٤ صفحه.

جوادزاده، ن.، تیموری، م. و معبودی، ح. (۱۳۹٤) بررسی تاثیر ماده بیهوشی۲ فنوکسی اتانول بر بافت کبد ماهی شیریت. پژوهش زیست‌شناسی جانوری، ۸(۲): ۱-۹.

رجبی‌استرآبادی، ح.، عمادی، ح. و ایمان‌پور، م.ر. (۱۳۹۱) اثرات سلنیوم روی عملکرد رشد، هماتوکریت و برخی پارامترهای خون‌شناسی بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله پژوهش‌های علوم و فنون دریایی، ۷(۲): ٤٠-٥٤.

رضوانی‌گیل‌کلایی، س.، شریف‌پور، ع. و کاظمی، ر. (۱۳۸۵) بررسی آثار هیستوپاتولوِیک ناشی از برخی عوامل زیست محیطی دریای خزر بر روی ماهیان استخوانی شکارچی ماهی آزاد و ماهی سوف دریای خزر، انتشارات موسسه تحقیقات شیلات ایران، ۵۰ صفحه.

روشن‌طبری، م.، رحمتی، ر.، پورغلام، ر.، خداپرست، ن.، رستمیان، م.ت. و رضوانی، غ. (۱۳۹۳) شناسایی، تراکم و پراکنش گروه‌های مختلف زئوپلانکتون در اعماق مختلف حوضه جنوبی دریای خزر در سال ۱۳۸۸. نشریه فن‌آوری-های نوین در توسعه آبزی‌پروری، ۸(٤): ۳۵-٤۲.

صفابخش، م.ر.، بحری، ا.ه.، محسنی، م. و محمدی‌زاده، ف. (۱۳۹۸) تاثیر سلنیوم بر شاخص‌های رشد، ترکیب لاشه و برخی از شاخص‌های خونی فیل ماهیان جوان پرورشی (*Huso huso*). نشریه توسعه آبزی‌پروری، ۱۳(۱): ٤۲–۳۱۳.

صیادبورانی، م.، خارا، ح.، صیادبورانی، م. و فخارزاده، س.م.ا. (۱۳۹۳). بررسی تاثیر سطوح مختلف ویتامین C و ویتامین Eدر جیره بر پارامترهای رشد و سیستم ایمنی ماهی آزاد دریای خزر. مجله علمی شیلات ایران، ۲۳(٤): ۸۵–۹۶.

قاسم‌پوردهاقانی، پ.، جواهری‌بابلی،م.، ضیایی‌نژاد، س.، تقوی‌مقدم، ا. و پورهادی، م. (۱۳۹۲) بررسی اثر مکمل غذایی سین‌بیوتیک بایومین ایمبو به‌عنوان مکمل غذایی بر عملکرد رشد، بازماندگی و فلور باکتریایی روده ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) انگشت قد. نشریه توسعه آبزی‌پروری، ۷(۳): ٤۳–۵۲.

قنبری، ف.، پذیرا، ع.، عبیدی، ر. و فروزانی، ص. (۱۳۹٦) بررسی تجمع زیستی فلزات سنگین مس، روی، آهن و سلنیوم در بافت‌های عضله، کبد و آبشش ماهی سنگسر معمولی (*Pomadasys kaakan*) در بندر بوشهر. مجله علمی شیلات ایران، ۲٦(٦): ۱۷۱–۱۷۷.

نظری، ک.، شمسایی‌مهرجان، م.، شریف‌پور، ع.، ایلیا، ن. و کمالی، ا. (۱۳۹٦) اثرات سلنیوم آلی و معدنی بر عوامل رشد، پارامترهای خونی و ایمنی‌شناسی بچه ماهیان قزل-آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علمی شیلات ایران، ۲٦(۳): ۱۲۹–۱۳۸.

وثوقی، غ.ح. و مستجیر، ب. (۱۳۷۱) ماهیان آب شیرین، چاپ اول، تهران، انتشارات دانشگاه تهران، ۳۱۷صفحه.

Ahmadifar, E., Sadegh, T.H., Dawood, M.A., Dadar, M. and Sheikhzadeh, N. (2020) The effects of dietary *Pediococcus pentosaceus* on growth performance, hemato-immunological parameters and digestive enzyme activities of common carp (*Cyprinus carpio*). Aquaculture, 516: 734656.

Ali, O.K., Ahmed, A.J.S. and Mawlood, A.G. (2015) Effects of tramadol on histopathological and biochemical parameters in male rabbits. American Journal of Biology and Life Sciences, 3(3): 85-90.

Atencio, L., Moreno, I., Jos, Á., Prieto, A.I., Moyano, R., Blanco, A. and Cameán, A.M. (2009) Effects of dietary selenium on the oxidative stress and pathological changes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to a microcystin-producing cyanobacterial water bloom. Toxicon, 53(2): 269-282.

Baghshani, H. and Shahsavani, D. (2013) Effects of lead acetate exposure on metabolic enzyme activities in selected tissues of common carp (*Cyprinus carpio*). Comparative clinical pathology, 22(5): 903-907.

Bartoskova, M., Dobsikova, R., Stancova, V., Zivna, D., Blahova, J., Marsalek, P., Zelníckova, L., Bartos, M., Casuscelli di Tocco, F. and Faggio, C. (2013) Evaluation of ibuprofen toxicity for zebrafish (*Danio rerio*) targeting on selected biomarkers of oxidative stress. Neuro Endocrinol Lett, 34(2): 102-108.

Bell, J.G., Adron, J.W. and Cowey, C.B. (1986) Effect of selenium deficiency on hydroperoxide-stimulated release of glutathione from isolated perfused liver of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). British journal of nutrition, 56(2): 421-428.

Benzie, I.F. and Strain, J.J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Analytical biochemistry, 239(1): 70-76.

Bhardwaj, S., Canlas, K., Kahi, C., Temkit, M.H., Molleston, J., Ober, M., Howenstine, M. and Kwo, P.Y. (2009) Hepatobiliary abnormalities and disease in cystic fibrosis: Epidemiology and outcomes through adulthood. Journal of Clinical Gastroenterology, 43(9): 858-864.

Carbone, D. and Faggio, C. (2016) Importance of prebiotics in aquaculture as immunostimulants. Effects on immune system of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. Fish & Shellfish Immunology, 54: 172-178.

Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N. and Chim, L. (2009) Effect of dietary probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress status of shrimp *Litopenaeus stylirostris*. Aquaculture, 294(3-4): 306-313.

Chebanov, M. and Billard, R. (2001) The culture of sturgeons in Russia: Production of juveniles for stocking and meat for human consumption. Aquatic Living Resources, 14(6): 375-381.

Chiu, S.T., Hsieh, S.L., Yeh, S.P., Jian, S.J., Cheng, W. and Liu, C.H. (2010) The increase of immunity and disease resistance of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* by feeding with selenium enriched-diet. Fish and Shellfish Immunology, 29(4): 623-629.

Dato-Cajegas, C.R.S. and Yakupitiyage, A. (1996) The need for dietary mineral supplementation for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, cultured

raffinose. Developmental and Comparative Immunology, 94: 59-65.

Hoseinifar, S.H., Mirvaghefi, A., Amoozegar, M.A., Merrifield, D.L. and Ringø, E. (2017) In vitro selection of a synbiotic and in vivo evaluation on intestinal microbiota, performance and physiological response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. Aquaculture Nutrition, 23(1): 111-118.

Kashiri, H., Haghparast, S. and Shabanpour, B. (2011) Effects of sodium salt solutions (sodium acetate, lactate and citrate) on physicochemical and sensory characteristics of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) fillets under refrigerated storage. Journal of Agricultural Science and Technology, 13(1): 89-98.

Khalil, H.S., Mansour, A.T., Goda, A.M.A. and Omar, E.A. (2019) Effect of selenium yeast supplementation on growth performance, feed utilization, lipid profile, liver and intestine histological changes, and economic benefit in meagre, *Argyrosomus regius*, fingerlings. Aquaculture, 501: 135-143.

Khosravinia, H., Alirezaei, M., Ghasemi, S. and Neamati, S. (2015) Effect of Satureja khuzistanica essential oils on antioxidative potential and postmortem pH of breast muscle in heat stressed broiler chicken. Journal of Veterinary Research, 70(2): 227-234.

Kiabi, B., Abdoli, A. and Naderi, M. (1999) Status of the fish fauna in the South Caspian Basin of Iran. Zoology in the Middle East, 18(1), 57–65.

Koroluk, M.A., Ivanova, L. and Maiorova, I. (1988) The method of definition of the activeness of catalase. Laboratorial work, 1: 16-19.

Kuebutornye, F.K., Abarike, E.D., Lu, Y., Hlordzi, V., Sakyi, M.E., Afriyie, G., Wang, Z., Yuan Li, Y. and Xie, C.X. (2020) Mechanisms and the role of probiotic Bacillus in mitigating fish pathogens in aquaculture. Fish Physiology and Biochemistry, 46(3): 819-841.

Lee, C.S. and Donaldson, E.M. (2001) Reproductive biotechnology in finfish aquaculture, Gulf Professional Publishing (1st Edition), Proceedings of a Workshop Hosted by the Oceanic Institute, Elsevier, p. 11.

Lee, S., Nambi, R.W., Won, S., Katya, K. and Bai, S.C. (2016) Dietary selenium requirement and toxicity levels in juvenile Nile tilapia, Oreochromis niloticus. Aquaculture, 464: 153-158.

Li, P. and Gatlin III, D.M. (2003) Evaluation of brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a feed supplement for hybrid striped bass in a semi-intensive system. Aquaculture, 144(1-3): 227-237.

Dawood, M.A., Koshio, S., Abdel-Daim, M.M. and Van Doan, H. (2019) Probiotic application for sustainable aquaculture. Reviews in Aquaculture, 11(3): 907-924.

Ellman, G. L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. Archives of biochemistry and biophysics, 82(1): 70-77.

Faggio, C., Pagano, M., Alampi, R., Vazzana, I. and Felice, M.R. (2016) Cytotoxicity, haemolymphatic parameters, and oxidative stress following exposure to sub-lethal concentrations of quaternium-15 in *Mytilus galloprovincialis*. Aquatic Toxicology, 180: 258-265.

Gatta, P., Pirini, A., Testi, B., Vignola, G. and Monetti, C. (2000) The influence of different levels of dietary vitamin E on sea bass *Dicentrarchus labrax* flesh quality. Aquaculture Nutrition, 6(1): 47-52.

Ghafarifarsani, H., Hoseinifar, S.H., Talebi, M., Yousefi, M., Van Doan, H., Rufchaei, R. and Paolucci, M. (2021a) Combined and singular effects of ethanolic extract of persian shallot (*Allium hirtifolium Boiss*) and synbiotic Biomin® IMBO on growth performance, serum-and mucus-immune parameters and antioxidant defense in Zebrafish (*Danio rerio*). Animals, 11(10): 2995.

Ghafarifarsani, H., Rashidian, G., Bagheri, T., Hoseinifar, S.H. and Van Doan, H. (2021b) Study on growth enhancement and the protective effects of dietary prebiotic inulin on immunity responses of rainbow trout fry infected with. Annals of Animal Science, 21(2): 543-559.

Ghaly, F.M., Hussein, S.H., Awad, S.M. and El-Makhzangy, A.A. (2023) Growth promoter, immune response, and histopathological change of prebiotic, probiotic and synbiotic bacteria on Nile tilapia. Saudi Journal of Biological Sciences, 30(2): 103539.

Hamilton, S.J. (2004) Review of selenium toxicity in the aquatic food chain. Science of the total environment, 326(1-3): 1-31.

Hilton, J.W., Hodson, P.V. and Slinger, S.J. (1980) The requirement and toxicity of selenium in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). The Journal of Nutrition, 110(12): 2527-2535.

Hoseinifar, S.H., Hosseini, M., Paknejad, H., Safari, R., Jafar, A., Yousefi, M., Van Doan, H. and Mozanzadeh, M.T. (2019) Enhanced mucosal immune responses, immune related genes and growth performance in common carp (*Cyprinus carpio)* juveniles fed dietary *Pediococcus acidilactici* MA18/5M and

deprivation on oxidative stress biomarkers in fish (*Sparus aurata*). Chemico-Biological Interactions, 145(2): 191–199.

Peng, S., Xing, Y., Rui, L. and Jian-ping, C. (2010) Effects of nitrobenzene on liver antioxidant defense system of *Carassius auratus*. Chemical Research in Chinese Universities, 26(2): 204-209.

Puangkaew, J., Kiron, V., Satoh, S. and Watanabe, T. (2005) Antioxidant defense of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to dietary n-3 highly unsaturated fatty acids and vitamin E contents. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology, 140(2): 187-196.

Puupponen-Pimiä, R.A.M.A., Aura, A.M., Oksman-Caldentey, K.M., Myllärinen, P., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T. and Poutanen, K. (2002) Development of functional ingredients for gut health. Trends in Food Science and Technology, 13(1): 3-11.

Razygraev, A.V., Yushina, A.D. and Titovich, I.A. (2018) A method of measuring glutathione peroxidase activity in murine brain in pharmacological experiments. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 165(2): 292-295.

Reitman, S. and Frankel, S. (1957) A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. American Journal of Clinical Pathology, 28(1): 56-63.

Roubach, R., Menezes, A., Oh, K. and Dabbadie, L. (2019) Towards guidelines on sustainable aquaculture. FAO aquaculture newsletter, (60): 55-56.

Saad, S.M.I. (2006) Probióticos e prebióticos: O estado da arte. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 42(1): 1-16.

Takashima, H., Nakajima, T., Moriguchi, M., Sekoguchi, S., Nishikawa, T., Watanabe, T., Katagishi, T., Kimura, H., Minami, M., Itoh, Y., Kagawa, K. and Okanoue, T. (2005) In vivo expression patterns of survivin and its splicing variants in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. Liver International, 25(1): 77-84.

Vaezi, M., Khara, H. and Shenavar, A. (2016) Synbiotic (Biomin imbo) alters gut bacterial microflora of Russian sturgeon, *Acipenser guldenstadti* (Brandt & Ratzeburg, 1833) in a time-dependent pattern. Journal of Parasitic Diseases, 40(4): 1189-1192.

Wang, X., Sun, Y., Wang, L., Li, X., Qu, K. and Xu, Y. (2017) Synbiotic dietary supplement affects growth, immune responses and intestinal (*Morone chrysops*× *M. saxatilis*). Aquaculture, 219(1-4): 681-692.

Li, W., Huang, Q., Li, Y., Rajput, I.R., Huang, Y. and Hu, C. (2012) Induction of probiotic strain *Enterococcus faecium* EF1 on the production of cytokines, superoxide anion and prostaglandin E2 in a macrophage cell line. Pakistan Veterinary Journal, 32(4): 530-534.

Mansour, A.T.E., Goda, A.A., Omar, E.A., Khalil, H.S. and Esteban, M.Á. (2017) Dietary supplementation of organic selenium improves growth, survival, antioxidant and immune status of meagre, *Argyrosomus regius*, juveniles. Fish and Shellfish Immunology, 68(6): 516-524.

Miezeliene, A., Alencikiene, G., Gruzauskas, R. and Barstys, T. (2011) The effect of dietary selenium supplementation on meat quality of broiler chickens. Biotechnology, Agronomy and Society and Environment, 15(1): 61-69.

Mohammadi, G., Hafezieh, M., Karimi, A.A., Azra, M.N., Van Doan, H., Tapingkae, W., Abdelrahman, H.A. and Dawood, M.A. (2022) The synergistic effects of plant polysaccharide and *Pediococcus acidilactici* as a synbiotic additive on growth, antioxidant status, immune response, and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against *Aeromonas hydrophila*. Fish and shellfish immunology, 120(4): 304-313.

Mohammadian, T., Nasirpour, M., Tabandeh, M.R., and Mesbah, M. (2019) Synbiotic effects of β-glucan, mannan oligosaccharide and *Lactobacillus casei* on growth performance, intestine enzymes activities, immune-hematological parameters and immune-related gene expression in common carp, *Cyprinus carpio*: An experimental infection with *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture, 511: 634197.

Nekoubin, H., Gharedashi, E., Imanpour, M.R. and Asgharimoghadam, A. (2012a) The influence of synbiotic (Biomin Imbo) on growth factors and survival rate of Zebrafish (*Danio rerio*) larvae via supplementation with biomar. Global Veterinaria, 8(5): 503-506.

Nekoubin, H., Hatefi, S., Javahery, S. and Sudagar, M. (2012b) Effects of synbiotic (Biomin Imbo) on growth performance, survival rate, reproductive parameters of angelfish (*Pterophyllum scalare*). Walailak Journal of Science and Technology (WJST), 9(4): 327-332.

Oliva-Teles, A. (2012) Nutrition and health of aquaculture fish. Journal of fish diseases, 35(2): 83-108.

Pascual, P., Pedrajas, J.R., Toribio, F.J., López-Barea, J. and Peinado, J. (2003) Effect of food

microbiota of *Apostichopus japonicus*. Fish & Shellfish Immunology, 68: 232-242.

Watanabe, T., Kiron, V. and Satoh, S. (1997) Trace minerals in fish nutrition. Aquaculture, 151(1-4): 185-207.

Yadav, H., Jain, S. and Sinha, P.R. (2008) Oral administration of dahi containing probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* delayed the progression of streptozotocin-induced diabetes in rats. Journal of Dairy Research, 75(2): 189-195.

Yao, L., Li, X., Li, H., Liao, Z., Xie, C., Ning, G., Wu, Y. and Wang, Y. (2022) Detection of pyrophosphate and alkaline phosphatase activity based on polyT single stranded DNA-copper nanoclusters. Journal of Fluorescence, 32(5): 1949-1957.

Yilmaz, S., Yilmaz, E., Dawood, M.A., Ringø, E., Ahmadifar, E. and Abdel-Latif, H.M. (2022) Probiotics, prebiotics, and synbiotics used to control vibriosis in fish: A review. Aquaculture, 547: 737514.

Zakariaee, H., Sudagar, M., Hosseini, S.S., Paknejad, H. and Baruah, K. (2021) In vitro selection of synbiotics and in vivo investigation of growth indices, reproduction performance, survival, and ovarian Cyp19α gene expression in Zebrafish *Danio rerio*. Frontiers in Microbiology, 12: 758758.

Zhang, C.N., Li, X.F., Xu, W.N., Jiang, G.Z., Lu, K.L., Wang, L.N. and Liu, W.B. (2013) Combined effects of dietary fructooligosaccharide and *Bacillus licheniformis* on innate immunity, antioxidant capability and disease resistance of triangular bream (*Megalobrama terminalis*). Fish and shellfish immunology, 35(5): 1380-1386.

Zhou, X., Wang, Y., Gu, Q. and Li, W. (2009) Effects of different dietary selenium sources (selenium nanoparticle and selenomethionine) on growth performance, muscle composition and glutathione peroxidase enzyme activity of crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). Aquaculture, 291(1-2): 78-81.

Zwolak, I. (2020) The role of selenium in arsenic and cadmium toxicity: an updated review of scientific literature. Biological trace element research, 193(1): 44-63.

The effect of diet supplemented with organic selenium (Selenomethionine) and synbiotic Dipro^{+} individually and combined on antioxidant capacity, liver metabolic enzymes and liver histology in Caspian Sea salmon (*Salmo caspius)*

Maziyar Akbarabadi[1], Hossein Khara[2*], Habib Vahabzadeh Roudsari[3], Mohaddeh Ahmadnejad[4] and Roghieh Safari[5]

1) PhD Candidate, Department of Fisheries, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.
2) Associate Professor, Department of Fisheries, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran. *Corresponding Author Email Address: h.khara@liau.ac.ir
3) Assistant Professor, Department of Fisheries, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.
4) Assistant Professor, Aquaculture Research Institute of Inland Waters, Fisheries Science Research Organization of Iran, Agricultural Research, Education and Promotion Organization, Bandar-Anzali, Iran.
5) Associate Professor, Department of Aquatic Reproduction and Breeding, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

Date of Submission: 2024/08/04 Date of Acceptance: 2024/04/22

Abstract

The use of immune stimulants has become popular such as synbiotics and rare elements such as selenium in farmed fish to increase the activity of non-specific defense mechanisms and enhance the resistance against diseases. so; this research was conducted to determine the effect of diet supplemented with organic selenium (Selenomethionine) and synbiotic Dipro+ individually and combined on antioxidant capacity, liver metabolic enzymes and liver histology in *Salmo caspius*. 540 pieces of Caspian Sea salmon fry with an average weight of 66.34 ± 1.45 grams (reproduction of 2018) were prepared. After adapting to the experimental conditions, the fish was randomly distributed in 27 tanks. This experiment was conducted in the form of a completely randomized design under 8 experimental treatments and a control group (each with 3 repetitions) for 60 days. Experimental treatments include: 2 grams of synbiotics per kilogram of diet (treatment 1), 3 grams of synbiotics per kilogram of diet (treatment 2), 2 milligrams of organic selenium per kilogram of diet (treatment 3), 4 milligrams of synbiotics per kg of diet (treatment 4), 2 grams of synbiotic and 2 mg of organic selenium per kg of diet (treatment 5), 2 grams of synbiotic and 4 mg of organic selenium per kg of diet (treatment 6), 3 1 gram of synbiotic and 2 mg of organic selenium per kg of diet (treatment 7), 3 grams of synbiotic and 4 mg of organic selenium per kg of diet (treatment 8). At the end of the trial, in order to check the activity of liver enzymes (alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase) and serum antioxidants (catalase, glutathione, total antioxidant capacity, glutathione peroxidase, superoxide desmutase, malondialdehyde) sampling was done from the artery or vein of the caudal region or by cutting the caudal stem. Also, in order to measure liver damage sampling was taken from liver. The results showed that there was a significant difference between the control group and the treatments fed with experimental diets in the amount of liver enzymes including: alkaline phosphatase, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase ($P < 0.05$). So that the highest amount of these enzymes was observed in the control group. Based on the results, it was observed that the lowest amount of antioxidant enzymes including: superoxide dismutase, total antioxidant capacity, glutathione peroxidase, glutathione and catalase and the highest amount of malondialdehyde was significantly observed in the control group ($P < 0.05$). The histological study of the liver showed the organic selenium and synbiotic $DPro^{+}$, separately or together, caused changes in the liver tissue, which in some cases caused damage. In general, the results showed that the combination of synbiotic $Dpro^{+}$ and organic selenium could reduce liver damage and is recommended as a feed additive in the diet of Caspian salmon.

Keywords: Caspian Sea salmon, $Dpro^{+}$ synbiotic, Organic selenium.