Journal of Animal Biology, Spring 2024; 16(3):239-252

Research Article

The Effect of Different Levels of Dietary Manganese on Antioxidant Activity, Liver Enzymes and Liver Histology in Reared Young Beluga (*Huso huso*)

Fatemeh Hemmati[1], Hossein Khara[1*], Habib Vahaabzadeh Roudsari[1], Rezvanollah Kazemi[2]

1. Department of Fishery, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran

2. Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), International Sturgeon Research Institute, Rasht, Iran

*Corresponding author: h.khara1974@yahoo.com

Received: 16 January 2024 Accepted: 13 February 2024

DOI: 10.60833/ascij.2024.1588

Abstract

This research aims to determine the effect of different amounts of dietary manganese on antioxidant activity, liver enzymes and, liver tissue of rearing young beluga (*Huso huso*) from October to December 2022 at the Dr. Beheshti Reproduction and Genetic Stock Restoration Center of Sturgeon in Rasht, Guilan province. For this study, 180 pieces of beluga with an average initial weight of 266 ± 3.05 grams underwent a two-week adaptation period in the breeding environment, in six treatment groups and each treatment with three repetitions, with concentrations of 5 (Mn1), 10 (Mn2), 15 (Mn3), 20 (Mn4) and 25 (Mn5) mg of manganese sulfate monohydrate (MnSO4H2O) per kilogram of food and control treatment (Mn0) without adding manganese sulfate supplement were carried out in two months. At the end of each month, three pieces of fish were selected from each repetition, blood was collected and their livers were sampled for histological studies. The results revealed a significant difference in catalase and glutathione peroxidase levels among the experimental treatments ($p<0.05$) and their maximum amount was the control treatment fish, while superoxide dismutase levels did not differ significantly ($p<0.05$). Among the liver enzymes, Alkaline-phosphatase and aspartate-aminotransferase had a significant difference between the control treatment and other experimental treatments ($p<0.05$), but the alanine-aminotransferase enzyme had no significant difference ($p<0.05$). Also, different forms of tissue damage were observed in the liver tissue of all treatments, even the control (atrophy, biliary stagnation, Fat degeneration and, cellular necrosis). Based on the results of this research, the levels of 10-15 mg of dietary manganese could improve antioxidant activities, liver enzymes and reduce liver tissue damage in breeding young beluga.

Keywords: Beluga (*Huso huso*), dietary manganese, Antioxidant activity, liver enzymes, Liver tissue

زیست‌شناسی جانوری، سال شانزدهم، شماره سوم، بهار ۱۴۰۳، صفحات ۲۵۲-۲۳۹

مقاله پژوهشی

اثر سطوح مختلف منگنز جیره بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی، آنزیم‌های کبدی و بافت کبد در فیل ماهیان (*Huso huso*) جوان پرورشی

فاطمه همتی[۱]، حسین خارا[۱*]، حبیب وهابزاده رودسری[۱]، رضوان اله کاظمی[۲]

۱- گروه شیلات، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

۲- سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری، رشت، ایران

[*]مسئول مکاتبات: h.khara1974@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۲۴

DOI: 10.60833/ascij.2024.1588

چکیده

این تحقیق با هدف تعیین اثر مقادیر مختلف منگنز جیره بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی، آنزیم‌های کبدی و بافت کبد فیل‌ماهیان (*Huso huso*) جوان پرورشی، از ماه مهر تا آذر ۱۴۰۱ در مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ژنتیکی ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی سد سنگر شهرستان رشت در استان گیلان انجام گرفت. بدین منظور ۱۸۰ قطعه فیل ماهی با میانگین وزن اولیه ماهیان ۳/۰۵± ۲۶۶ گرم پس از ۲ هفته سازگاری با محیط پرورشی، در شش تیمار و هر تیمار با سه تکرار، با غلظت‌های ۵ (Mn_1)، ۱۰ (Mn_2)، ۱۵ (Mn_3)، ۲۰ (Mn_4) و ۲۵ (Mn_5) میلی‌گرم سولفات‌منگنز مونوهیدرات ($MnSO_4H_2O$) در هر کیلوگرم غذا و تیمار شاهد (Mn_0) بدون افزودن مکمل سولفات‌منگنز در دو ماه انجام شد. در پایان آزمایش از هر تکرار سه قطعه ماهی انتخاب، خونگیری و از کبد آن‌ها جهت مطالعات بافت‌شناسی نمونه‌برداری شد. نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و گلوتاتیون‌پراکسیداز بین تیمارهای‌آزمایشی دارای اختلاف معنی‌دار بود ($p < ۰/۰۵$) و بیشینه میزان آنها در ماهیان تیمار شاهد وجود داشت، ولی سطوح سوپراکسید دیسموتاز اختلاف معنی‌داری نداشت ($p > ۰/۰۵$). آنزیم‌های کبدی آلکالین‌فسفاتاز و آسپارتات‌آمینوترانسفراز دارای اختلاف معنی‌دار بین تیمار شاهد با دیگر تیمارهای آزمایشی بود ($p < ۰/۰۵$)، اما آنزیم آلانین‌آمینوترانسفراز، فاقد اختلاف معنی-دار بود ($p > ۰/۰۵$). همچنین آسیب‌های بافتی به اشکال مختلف در بافت کبد همه تیمارها، حتی شاهد (آتروفی، رکود صفراوی، دژنرسانس چربی و نکروزسلولی) مشاهده شد. بر اساس نتایج این پژوهش، سطوح ۱۵-۱۰ میلی‌گرم منگنز جیره توانست سبب بهبود فعالیت‌های‌آنتی‌اکسیدانی، آنزیم‌های‌کبدی و نیز کاهش آسیب‌های بافتی کبد در فیل‌ماهی جوان پرورشی شد.

کلمات کلیدی: فیل‌ماهی (*Huso huso*)، منگنز جیره‌غذایی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، آنزیم‌های کبدی، بافت کبد

مقدمه

پرورش ماهیان خاویاری با هدف تولید خاویار، گوشت و نیز بازسازی ذخایر، از اهمیت فوق العاده‌ای برخوردار است (۱۳). فیل‌ماهی (*Huso huso*) به دلیل رشد نسبتاً سریع بـه عنوان گونه اصلی پرورش، در میان ۵ گونه ماهی خاویاری منطقه خزر جنوبی می‌باشد (۲۷). آبزی‌پروری موفق بستگی به خوراک تجاری متعادل و مقرون به صرفه دارد (۱۴). در بین عناصر غذایی مختلف، مواد معدنی به عنوان یکی از اجزای ضروری جیره غذایی آبزیان، دارای نقش مهمی در سلامت و بسیاری از فعالیت‌های فیزیولوژیک

ماهیان پرورشی است (۲۴). با وجود اهمیت مواد معدنی در فرآیندهای مختلف، تحقیقات در رابطه با عملکرد آنها در تغذیه آبزیان اندک است (۳). از میان مواد معدنی مورد نیاز، منگنز یکی از مواد معدنی کم - مصرف است که دارای عملکرد کوفاکتوری در بسیاری از سیستم‌های آنزیمی می‌باشد. این عنصر برای تنظیم کارکرد دستگاه عصبی و افزایش سلامتی ماهیان ضروری بوده و نقش مهمی در متابولیسم کربوهیدرات‌ها (٤)، تنظیم متابولیسم پروتئین و انرژی، استخراج مواد معدنی استخوان، سنتز گلیکوزآمینوگلیکان و دفاع سلولی در برابر رادیکال‌های آزاد دارد (۵). در سال‌های اخیر تمایل به استفاده از مکمل‌های غذایی معدنی بخصوص عناصر کمیاب به دلیل ضرورت تأمین مایحتاج مورد نیاز جیره برای موجود زنده و تأثیر کمبود آن بر سلامتی و رشد بسیار مورد توجه آبزی‌پرواران قرار گرفته است (۳۱، ۱۰). این مکمل‌ها علاوه بر بهبود شاخص‌های رشد، منجر به افزایش مقاومت ماهی نسبت به استرس‌های محیطی، بیماری‌های عفونی مختلف، تحریک سیستم ایمنی غیراختصاصی آبزیان و منجر به بهبود کارایی تولید در صنعت آبزی‌پروری می‌شوند (۳٤)، اما با وجود اثرات مثبت مکمل‌ها به عنوان محرک ایمنی و رشد، نمی توان عوارض و آسیب های احتمالی آنها بر اندام‌ها و بافت‌های مختلف را نادیده گرفت، لذا بررسی تغییرات آسیب‌شناسی بافتی ناشی از این مکمل‌ها، در آبزیان ضروری می‌باشد (۷). کبد با توجه به نقش و عملکرد آن در متابولیسم مواد مغذی، شاخصی مناسب برای آسیب شناسی تغذیه بوده، لذا تغییرات بافتی ناشی از مواد غذایی به خوبی در آن قابل تشخیص و بررسی می‌باشد (۳۷). آنزیم-های کبدی تحت تأثیر فاکتورهای فیزیولوژیکی و محیطی از جمله نوع جیره‌غذایی قرار می‌گیرند (۱۸)، همچنین از آنزیم‌های مهم در تعیین وضعیت سلامت ماهیان و به عنوان شاخص فعالیت کبدی محسوب می‌شوند (۳۹). از سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی به عنوان شاخص آزمایشگاهی استاندارد، برای بررسی اختلالات کبدی در موجودات استفاده می‌گردد (۳۳). آنزیم سوپراکسیددیسموتاز نقش مهمی در عملکرد دستگاه ایمنی بدن ایفا می‌کند (۲۰). پژوهش Tan و همکاران (۲۰۱۲) روی گربه ماهی زرد (*Pelteobagrus fulvidraco*) اثرات مکمل منگنز جیره بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنزیم‌های کبدی را گزارش کردند (۳۸). برخی از مطالعات نشان داد که مکمل منگنز جیره باعث بهبود معنی‌دار سوپراکسید-دیسموتاز کل (٤٤) و افزایش معنی‌دار فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و آنزیم کبدی می‌شود (٤). اهمیت جذب منگنز از طریق جیره‌غذایی توسط پژوهشگران مختلفی مورد بررسی قرار گرفته و نشان داد ماهیانی چون ماهی هامور (*Epinephelus coioides*) و ماهی آزاد اقیانوس‌اطلس (*Salmo salar*) که از جیره‌های غذایی حاوی مقادیر پایین منگنز تغذیه نموده‌اند، دچار مشکلاتی چون افزایش مرگ و میر، کاهش رشد، ضریب تبدیل بالا و کاهش تجمع بافتی این عنصر در بافت‌هایی نظیر عضلات نشان می‌شوند (٤۲، ۱۹). با وجود مطالعاتی در خصوص اهمیت و نیز مقدار مورد نیاز منگنز در برخی از ماهیان‌پرورشی، متأسفانه هنوز مطالعه‌ای در ماهیان‌خاویاری پرورشی در این زمینه انجام نشده است. بهبود جیره‌های غذایی فرموله شده برای افزایش رشد و ارتقاء سلامتی آبزیان یکی از مسایل عمده در آبزی‌پروری تجاری است (۹)، بنابراین برای حل برخی از مجهولات مربوط به تاثیر مکمل منگنز جیره بر بافت کبد، فعالیت آنتی-اکسیدانی، آنزیم‌های کبدی در فیل‌ماهیان جوان-پرورشی این پژوهش طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در شرایط یکسان پرورشی از مهر تا آذر ۱۴۰۱ در مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ژنتیکی ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی سدسنگر شهرستان رشت در استان‌گیلان انجام گرفت. از ۱۸۰ قطعه فیل‌ماهی جوان با میانگین‌وزنی ۳/۰۵ ± ۲۶۶ گرم با میانگین-طول ۰/۴۹±۳۸/۲۳ سانتی‌متر استفاده شد. این آزمایش در ۶ تیمار و هر تیمار با ۳ تکرار صورت گرفت، تیمارها بر اساس پژوهش Ye و همکاران (۲۰۰۹) انتخاب شدند (۴۲). از مکمل سولفات منگنز - مونوهیدرات ($MnSO_4H_2O$) با درصد خلوص ۹۹٪ و کد شناسایی (Manganes(II) sulfate monohydrate MERCK 1.05941.0250) در جیره‌غذایی استفاده شد. گروه‌های تیمار شامل: تیمار صفر (Mn_0): بدون افزودن سولفات‌منگنز (تیمار شاهد)، تیمار ۱ (Mn_1): ۵ میلی‌گرم سولفات‌منگنز به ازای هر کیلوگرم غذا، تیمار ۲ (Mn_2): ۱۰ میلی‌گرم سولفات‌منگنز به ازای هر کیلوگرم غذا، تیمار ۳ (Mn_3): ۱۵ میلی‌گرم سولفات‌منگنز به ازای هر کیلوگرم غذا، و تیمار ۴ (Mn_4): ۲۰ میلی‌گرم سولفات‌منگنز به ازای هر کیلوگرم غذا و تیمار ۵ (Mn_5): ۲۵ میلی‌گرم سولفات‌منگنز به ازای هرکیلوگرم غذا. برای تهیه جیره‌های غذایی از غذای کنسانتره پرواری GFS1، ۴ میلی‌متر شرکت فرادانه استفاده شد. غلظت سولفات‌منگنز مورد نظر، پس از توزین با آب دیونیزه حل و سپس به غذای کنسانتره پودری اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه همراه با مخلوط کن برقی مخلوط گردید، سپس خمیر حاصل بدون حرارت با دستگاه پلت ساز به رشته هایی به قطر ۴ میلی‌متر تبدیل و در دستگاه خشک کن قرار داده شد. غذای آماده شده تا شروع آزمایش در بسته‌های پلاستیکی در یخچال با دمای ۳ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. در پایان دوره پرورش برای سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنزیم‌های کبدی، از هر تکرار ۳ قطعه فیل ماهی به صورت تصادفی انتخاب و پس از بیهوشی با عصاره گل میخک (۰/۵ گرم بر لیتر) نسبت به خون‌گیری با سرنگ از سیاهرگ دمی اقدام (۱۵) و نمونه‌های خون جهت اندازه‌گیری فاکتورهای مورد نظر به آزمایشگاه ویرومد رشت منتقل گردید. فعالیت آنتی‌اکسیدانی، کاتالاز (CAT) به روش Goth (۱۲)، گلوتاتیون‌پراکسیداز (GPX) به روش طیف-سنجی (۸) و آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (SOD) بر اساس مهار اتواکسیداسیون (۲۶) سنجیده شد. همچنین آنزیم‌های کبدی آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آلکالین فسفاتاز (ALP) با کیت شرکت پارس‌آزمون (کرج، ایران) و بر پایه پروتکل اندازه‌گیری شدند. جهت بررسی کبد فیل‌ماهی‌ها، نمونه‌های بافتی تهیه شد. بدین منظور ابتدا فیل‌ماهیان با استفاده از پودر گل میخک بیهوش و سپس کشته شدند و پس از کالبد-گشایی از کبد آنها نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌های بافت جهت انجام بررسی‌های بافت‌شناسی، پس از تثبیت در محلول بوئن، در الکل ۷۰ درصد قرار داده شدند و پس از انجام مراحل معمول بافت‌شناسی (ثبوت، آبگیری، شفاف‌سازی، قالب‌گیری، برش، رنگ‌آمیزی و مونته‌کردن) در آزمایشگاه، برش‌هایی با ضخامت ۶-۴ میکرون از بافت‌ها تهیه و رنگ‌آمیزی شد (۳۵).

تجزیه و تحلیل آماری: این پژوهش بر اساس طرح آماری کاملا تصادفی انجام شد. با توجه به توزیع نرمال داده‌ها، به منظور مقایسه آماری بین گروه‌ها در تیمارها از آزمون واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و پس از انجام آزمون Test of Homogeneity Variances جهت مقایسه گروه‌ها با یکدیگر از آزمون دانکن استفاده شد. کلیه آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS Version 23 و جهت رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel 2010 استفاده

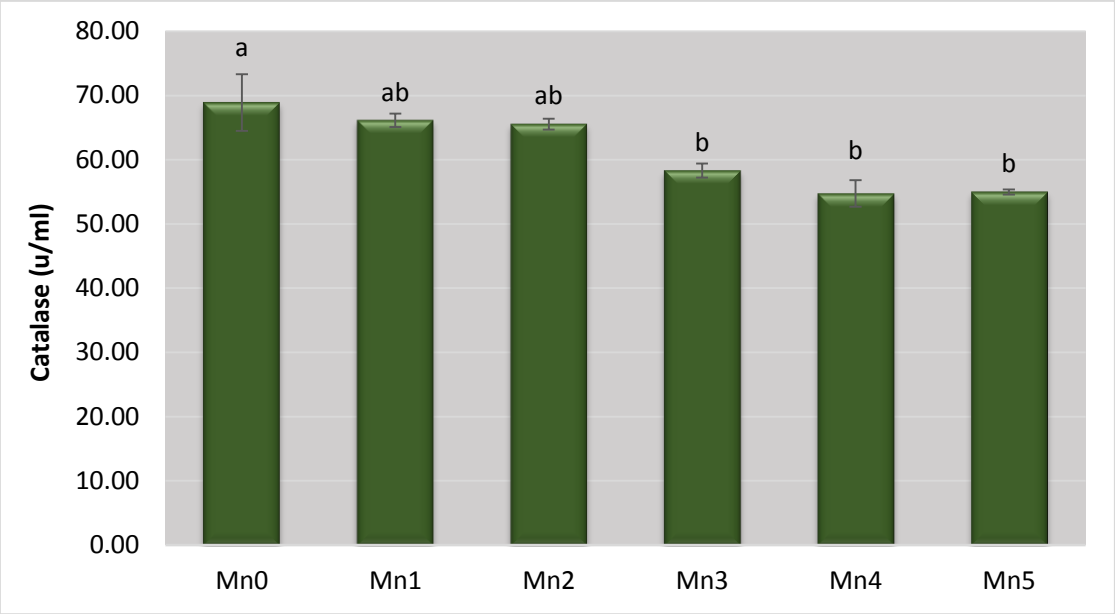
شد، کلیه داده‌ها به صورت میانگین± اشتباه معیار بیان شد.

نتایج

فعالیت آنتی‌اکسیدانی: بالاترین میزان فعالیت آنزیم های کاتالاز (نمودار ۱) و گلوتاتیون‌پراکسیداز (نمودار ۲) در تیمار شاهد (Mn_2) مشاهده شد و با افزایش مقادیر منگنز، سطح این دو آنزیم روند کاهشی داشت. بطوریکه سه تیمار با مقادیر بیشتر منگنز (Mn_3، Mn_4 و Mn_5) دارای کمترین مقدار این دو آنزیم بودند، و دو تیمار دیگر (Mn_1 و Mn_2) نیز در حد واسط تیمار شاهد و تیمارهای دیگر قرارداشتند. نتایج حاصله براساس آزمون واریانس یکطرفه دارای اختلاف‌ها معنی‌دار بودند ($p < ۰/۰۵$). همچنین برطبق آزمون دانکن تیمارهای تیمارهای Mn_3، Mn_4 و Mn_5 تقریبا با یکدیگر برابر و فاقد تفاوت آماری بودند، که این وضعیت بین تیمارهای Mn_1 و Mn_2 مشاهده شد ($p>۰/۰۵$). ولی همه تیمارهای منگنز نسبت به ماهیان تیمار شاهد براساس آزمون دانکن دارای اختلاف‌ها معنی-دار بودند ($p < ۰/۰۵$). در مورد آنزیم سوپراکسید - دیسموتاز اگرچه بالاترین میزان فعالیت آن در تیمار Mn_3 مشاهده شد، ولی میزان این آنزیم در تمامی تیمارها در سطح تقریبا یکسانی اندازه‌گیری شد، بطوریکه از لحاظ آماری فاقد اختلاف معنی‌دار بودند ($p > ۰/۰۵$)(نمودار ۳).

آنزیم‌های کبدی: میزان آنزیم اسپارتات آمینوترانسفراز از تیمار شاهد به سمت مقادیر بیشتر منگنز روند کاهشی داشت، بطوریکه در دو تیمار آخر (Mn_4 و Mn_5) مقادیر این آنزیم ثابت و برابر بود. از لحاظ آمای نیز، براساس آزمون واریانس یکطرفه و دانکن اختلاف‌ها معنی‌دار بودند ($p < ۰/۰۵$) (نمودار ٤). مقادیر آنزیم آلکانین فسفاتاز از تیمار شاهد به سمت مقادیر بیشتر منگنز، ابتدا روند افزایشی (Mn_1 و Mn_2) و سپس از تیمار Mn_3 به بعد روند کاهشی داشت، که براساس آزمون واریانس یکطرفه و دانکن اختلاف‌ها معنی‌دار بودند ($p<۰/۰۵$) (نمودار ۵). میزان آنزیم آلانین‌آمینوترانسفراز در تمامی تیمارها تقریبا یکسان و فاقد اختلاف معنی‌دار آماری بودند ($p > ۰/۰۵$) (نمودار ٦).

بافت‌شناسی کبد: نتایج بافت‌شناسی، آسیب‌های بافتی مختلفی را در سطوح متفاوت در کبد ماهیان تیمارهای آزمایشی و شاهد نشان داد. سلول‌های هپاتوسیت (ستاره)، دژنرسانس چربی(Fd)، آتروفی(A) و نکروز سلولی(N)، خونریزی (He)، آتروفی(A) و رکورد صفراوی (Ds) در بافت کبد تیمارهای مختلف و شاهد مشاهده شد، اما در مجموع گسترش عوارض بافتی در کبد ماهیان تیمارهای مختلف از روند $Mn_5 > Mn_4 > Mn_0 > Mn_1 > Mn_3 > Mn_2$ پیروی کرد (شکل ۱).

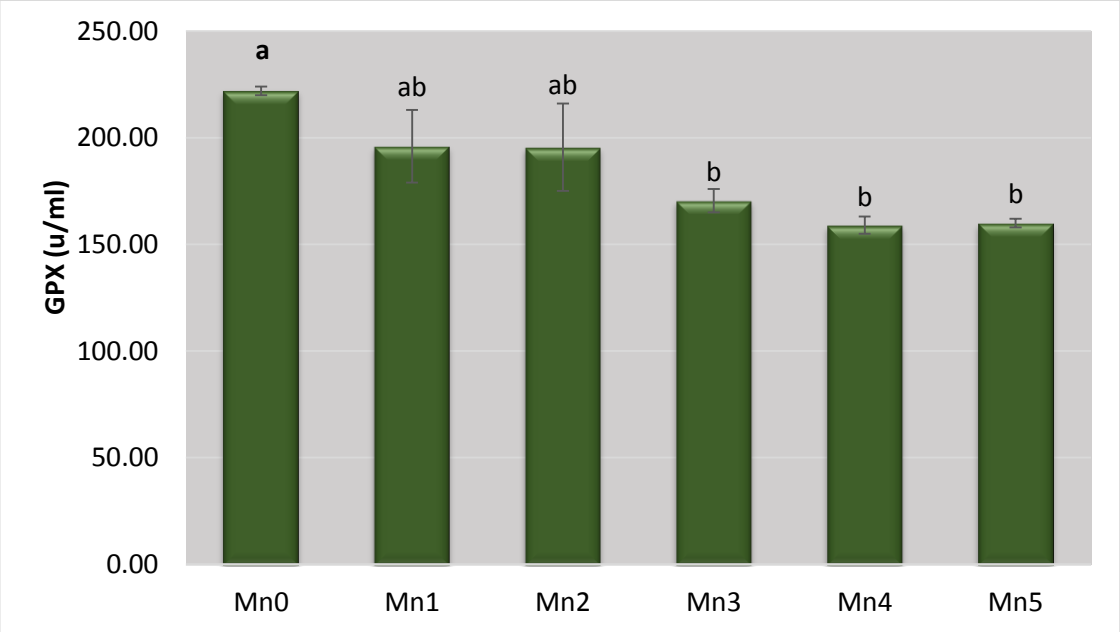


نمودار ۱- میزان کاتالاز خون فیل ماهی در تیمارهای مختلف.

*حروف انگلیسی غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار است ($p < ۰/۰۵$)

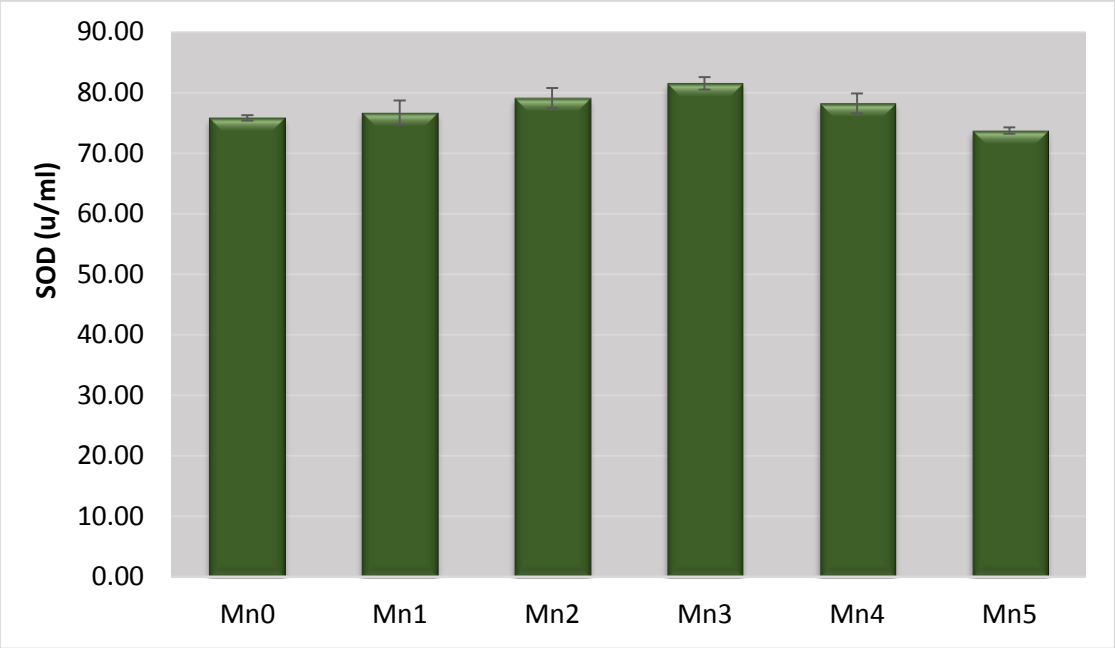
Unsimilar English ($p < 0.05$) Fig 1: Catalase levels in the blood of beluga in different treatments.

*letters indicate a significant difference



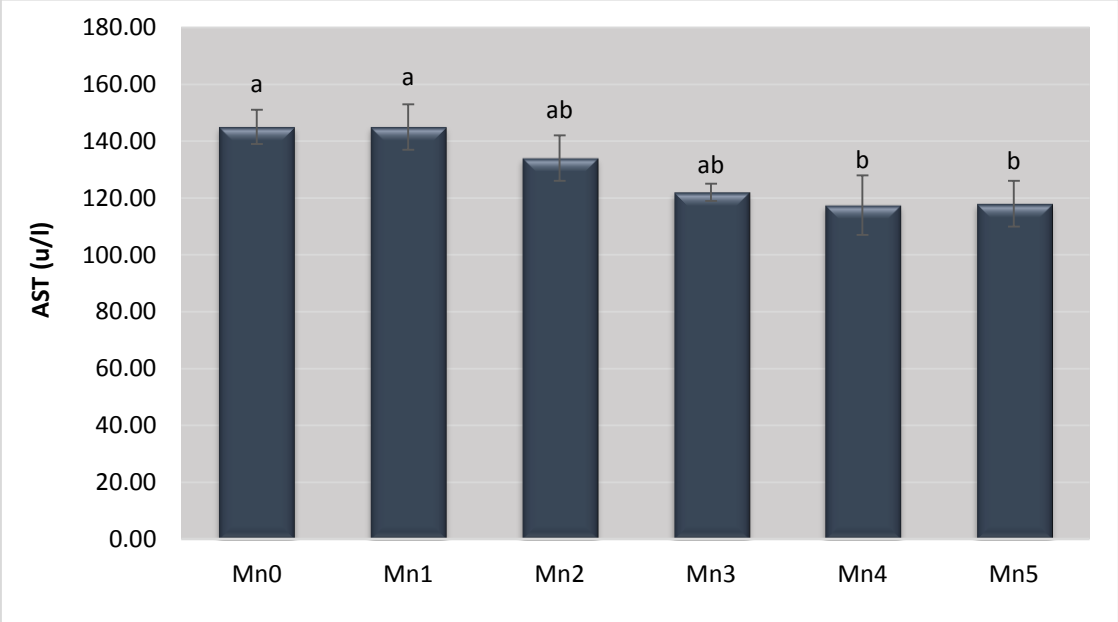
نمودار ۲- میزان گلوتاتیون پراکسیداز خون فیل ماهی در تیمارهای مختلف.

Fig 2: Glutathione peroxidase levels in the blood of beluga in different treatments



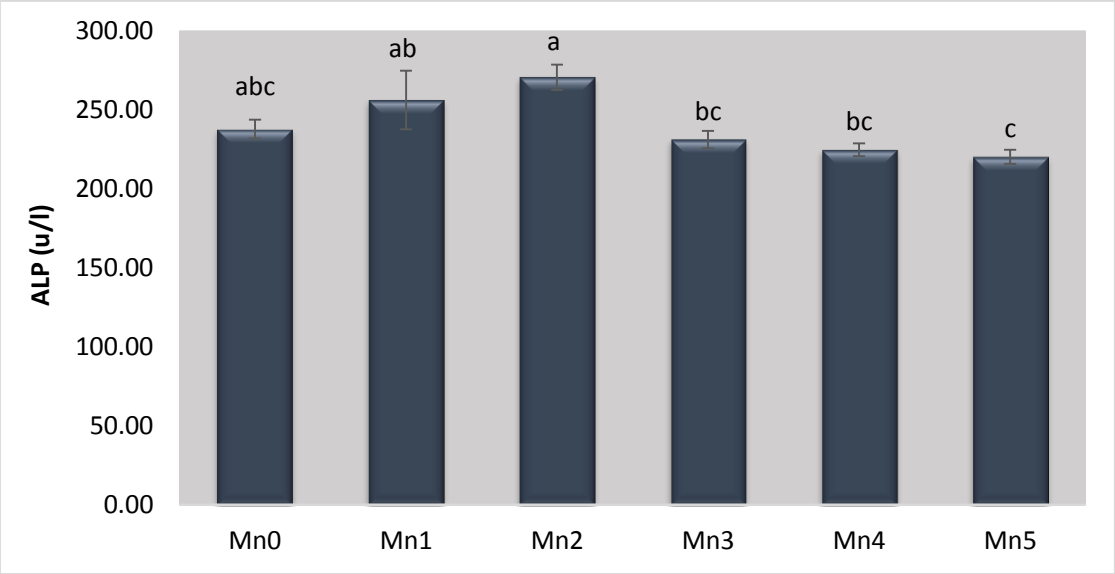
نمودار ۳- میزان سوپراکسید دیسموتاز خون فیل ماهی در تیمارهای مختلف

Fig 3: Superoxide dismutase levels in the blood of beluga in different treatments



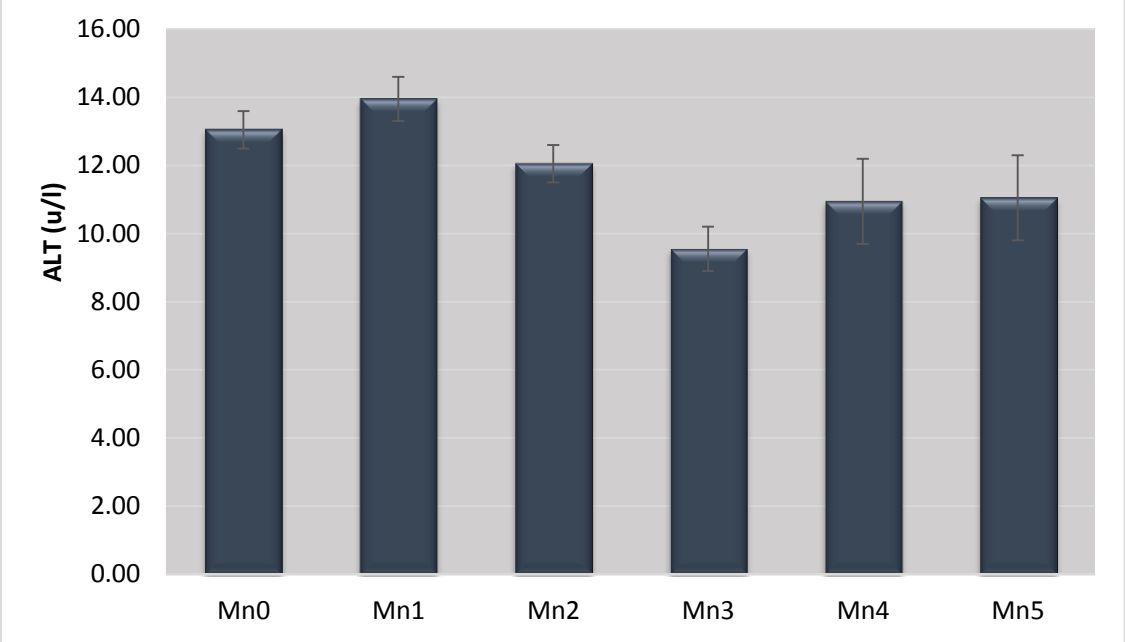
نمودار :- میزان AST خون فیل ماهی در تیمارهای مختلف

Fig 4. AST level of beluga blood in different treatments



نمودار ۵- میزان ALP خون فیل ماهی در تیمارهای مختلف

Fig 5. ALP level of beluga blood in different treatments

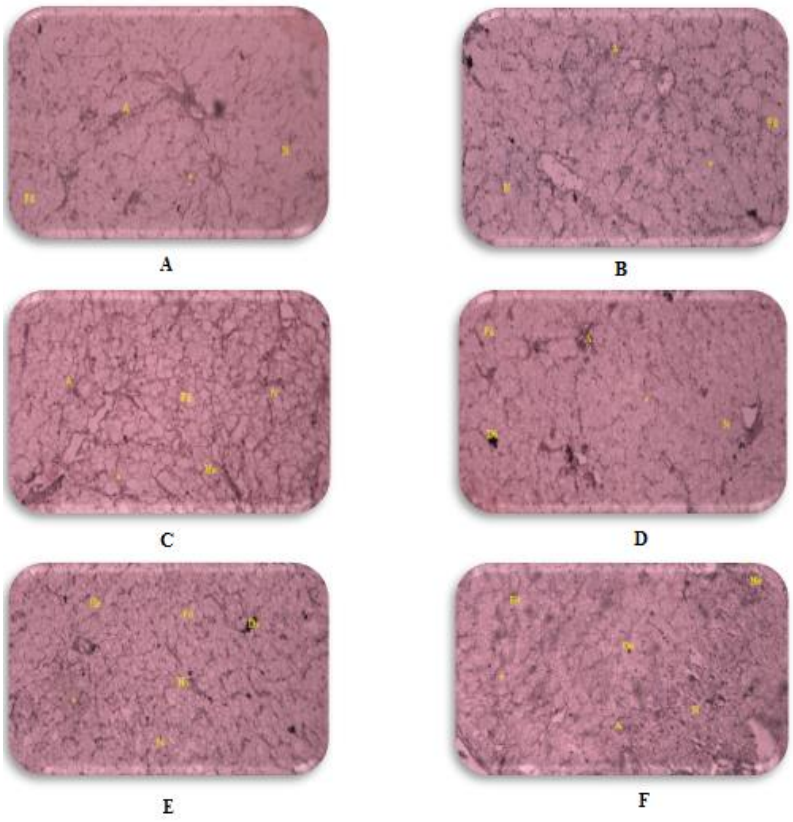


نمودار ٦- میزان ALT خون فیل ماهی در تیمارهای مختلف

Fig 6. ALT level of beluga blood in different treatments

*حروف انگلیسی غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار است ($p < ۰/۰۵$)

*Unsimilar English letters indicate a significant difference ($p < 0.05$)



شکل ۱- برش عرضی از قسمت بافت کبد فیل‌ماهی (H&E, 10X). تصویر A، تیمار شاهد (Mn_0). تصویر B، تیمار Mn_1. تصویر C، تیمار Mn_2. تصویر D، تیمار Mn_3. تصویر E، تیمار Mn_4. تصویرF، تیمار Mn_5. مشاهده سلول‌های هپاتوسیت (ستاره)، دژنرسانس چربی(Fd)، آتروفی(A) و نکروز سلولی(N)، خونریزی (He)، آتروفی(A) و رکورد صفراوی (Ds)

Fig 1. Transverse section of beluga liver tissue (H&E, 10X). Image A, control treatment (Mn0). Image B, Mn1 treatment. Image C, Mn2 treatment. Image D, Mn3 treatment. Image E, Mn4 treatment. Figure F, Mn5 treatment. Observation of hepatocyte cells (star), fatty degeneration (Fd), atrophy (A) and cell necrosis (N), hemorrhage (He), atrophy (A) and biliary record (Ds)

بحث

در پژوهش حاضر در خصوص فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و گلوتاتیون‌پراکسیداز اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده گردید به نحوی که با افزایش میزان غلظت مکمل سولفات‌منگنز بعد از تیمار Mn_2، غلظت آنها در سرم خون کاهشی بود، ولی در خصوص آنزیم سوپر-اکسیددیسموتاز هر چند که اختلاف معنی‌داری بین تیمارها نداشت، اما بالاترین میزان آن در تیمار Mn_3 مشاهده شد، در پژوهش Tan و همکاران (۲۰۱۲) در گربه ماهی زرد (*Pelteobagrus fulvidraco*)، تا غلظت ۶/۹ میلی‌گرم با افزایش این آنزیم روبرو بودند و پس از آن روند کاهشی بود (۳۸). در نتایج مشابهی Maage و همکاران (۲۰۰۰) در ماهی‌آزاد اقیانوس-اطلس تا غلظت ۲۴ میلی‌گرم مکمل منگنز در کیلوگرم غذا (۲۳)، Wang و همکاران (۲۰۱۰) در میگوی گیلاسی (*Neocaridina heteropoda*) تغذیه کننده جیره تیمارهای تا ۶۰ میکروگرم مکمل منگنز بر گرم غذا ابتدا روند افزایشی و سپس کاهشی این آنزیم‌ها را گزارش کردند (۳۹، ۴۰). اما Welker و همکاران (۲۰۱۸) در ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تا غلظت ۸ میلی‌گرم

منگنز در کیلوگرم غذا ابتدا کاهش و سپس افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی را مشاهده کردند (٤١). در بررسی دیگری در کپور هندی روهو (*Labeo rohita*) افزودن مکمل منگنز جیره غذایی تا غلظت ۱۱/۱ میلی‌گرم منگنز در کیلوگرم غذا، ابتدا باعث بهبود معنی‌دار شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی و سپس تثبیت میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی شد (۲۸). در گربه‌ماهی نیش‌زن با افزایش منگنز جیره از ۱/۸۵ تا ۷/٦۸ میلی-گرم در کیلوگرم غذا فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید-دیسموتاز و کاتالاز نیز افزایش یافت (٤٣). همچنین در پژوهش Pan و همکاران (۲۰۰۸) در ماهی قرمز (*Carassius auratus gibelio*) آنزیم سوپراکسید-دیسموتاز تا غلظت ۲۲/۱۷ میلی‌گرم در کیلوگرم روند افزایشی نشان داد (۳۲). Asaikkutti و همکاران (۲۰۱٦) نیز در میگوی آب شیرین گزارش دادند که، افزودن تا ۱۸ میلی‌گرم مکمل منگنز به جیره باعث افزایش معنی‌دار فعالیت شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز خواهد شد (٤). Zhang و همکاران (۲۰۱٦) در کفشک زرد بزرگ (*Larimichthys crocea*) بهبود معنی‌دار سوپراکسید-دیسموتاز کل با مکمل منگنز جیره را گزارش کردند (٤٤). از طرف دیگر نتایج پژوهش Liu و همکاران (۲۰۱۸) در هیبرید هامور و Ma و همکاران (۲۰۱۵) روی ماهی توربوت (*Scophthalmus maximus*) نشان دادند که با افزایش غلظت منگنز جیره، وضعیت فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهبود یافت (۱۷، ۲۱). بنابراین به نظر می‌رسد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی با توجه به گونه ماهی یا آبزی، می‌تواند در غلظت خاصی از منگنز جیره، در بهینه وضعیت خود باشد، بر این اساس در فیل‌ماهی جوان بهینه وضعیت فعالیت آنتی-اکسیدانی تا غلظت ۱۵ میلی‌گرم منگنز در هر کیلوگرم جیره رخ داد. نتایج آنزیم‌های کبدی نشان داد که آلکالین‌فسفاتاز و آسپارتات آمینوترانسفراز دارای تفاوت معنی‌دار و آنزیم آلانین آمینوترانسفراز فاقد اختلاف معنی‌دار بین تیمارها بودند به طوری که میزان آنها در ۳ تیمار آخر نسبت به تیمارهای شاهد، Mn_1 و Mn_2 روند کاهشی داشت. در همین راستا پژوهش Tan و همکاران (۲۰۱۲) در گربه ماهی زرد نیز بالاترین میزان آلانین آمینو ترانسفراز را در تیمار شاهد داشتند (۳۸). همچنین در میگوی آب شیرین مکمل - منگنز جیره سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز گردید (٤). از سوی دیگر بر پایه مطالعات Ye و همکاران (۲۰۰۹) در ماهی هامور معمولی، استفاده از منگنز تا غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم غذا دارای رشد طبیعی و فاقد سمیت بود (٤٢) و همچنین با توجه به اینکه برخی از پژوهشگران بر این باورند که افزایش فعالیت آنزیم‌های کبدی نمی‌تواند همواره بیانگر عملکرد منفی آن باشد (۲)، پس در مطالعه حاضر، افزایش فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی را باید از جنبه‌های مثبت و منفی (آسیب‌های کبدی) مورد سنجش قرار داد. افزایش آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز، آسپارتات آمینو ترانسفراز و آلکالین - فسفاتاز پلاسمای‌خون می‌تواند بیانگر شرایط بد تغذیه ای یا محیطی ماهی باشد (۱)، بنابراین با توجه به نتایج آنزیم‌های کبدی این پژوهش، اگر چه اختلاف عددی در تیمارهای مختلف مشاهده شد، اما به نظر می‌رسد تمامی غلظت‌های بکار رفته منگنز در جیره غذایی کلیه تیمارها، در کوتاه مدت فاقد اثر سمیت بود. در مطالعه حاضر هر چند که در همه تیمارهای آزمایشی و حتی شاهد کم و بیش آسیب‌های بافتی در اشکال مختلفی از جمله دژنرسانس چربی، آتروفی و نکروز سلولی، خونریزی، آتروفی و رکورد صفراوی مشاهده شد، اما به ترتیب تیمارهای Mn_2، Mn_3 و سپس تیمار Mn_1 از نظر بافت کبدی، دارای وضعیت بهتری نسبت به تیمار شاهد و تیمارهای سطوح بالاتر

منگنز (Mn_4 و Mn_5) بودند. Mansouri و همکاران (۲۰۱۵) گزارش دادند که قرارگرفتن کپور معمولی در معرض همزمان نانو اکسید مس و نانوذرات دی اکسید تیتانیوم باعث ناهنجاری‌های بافتی مختلف در کبد، از جمله واکوئالسیون و نکروز سلول‌های کبدی می شود (۲۵). فلزات سنگین میتوانند بطور مستقیم از آب یا رسوب و یا غیر مستقیم از طریق زنجیره غذایی، ساختار و عملکرد اندام‌های مختلف ماهی این اندام‌ها را تحت تأثیر قرار دهند (۱۱). همچنین در مطالعه‌ای روی قزل‌آلای رنگین‌کمان، تغییرات آسیب‌شناسی مختلفی از جمله آتروفی، نکروزه شدن، پرخونی و واکوئله شدن سلول‌های بافت کبد در تیمارهای دارای سطوح بالای سلنیوم معدنی و ماهیان گروه شاهد مشاهده شد (۲۹)، از طرف دیگر برخی از مطالعات نشان داد که غلظت و دامنه نامناسب فلزات و عناصر در درازمدت می‌تواند سبب تغییرات هیستوپاتولوژیک به ویژه در کبد آبزیان شود (۳۶). بنابراین نتایج پروژه حاضر نیز همسو با نتایج بررسی‌های فوق نشان داد که مطالعات کوتاه‌مدت در خصوص عناصر نمی‌تواند گویای اثرات احتمالی زیان‌بار این عناصر بر بافت‌هایی چون کبد باشد. همچنین مشخص شد در صورت بالا بودن منگنز جیره‌غذایی، کاهش جذب روده‌ای منگنز، افزایش متابولیسم کبدی و دفع صفراوی به عنوان مکانیزم‌های خود تنظیمی عمل می‌کنند (۵). بنابراین موجودات زنده از جمله آبزیان مجهز به سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی قوی هستند که از افزایش سطح رادیکال‌های آزاد در بدن جلوگیری می‌کنند، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز پس از قرارگرفتن در معرض فلزات سنگین در کبد فعال می شوند (۶، ۱۶، ۲۲). از طرفی با توجه به دامنه منگنز مورد نیاز جیره در گونه‌های مختلف آبزیان (بین ۲/۵ تا ۲۵ میلی‌گرم در هر کیلوگرم جیره غذایی) (۳۰)، در مطالعه حاضر نیز دامنه سولفات‌منگنز در تیمارهای مختلف بین ۲۵ - ۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره غذایی قرار داشت، بنابراین احتمال آسیب‌های بافتی کم بوده و سطوح ۱۵-۱۰ میلی‌گرم منگنز در هر کیلوگرم جیره غذایی فیل‌ماهیان جوان، باعث آسیب دیدگی کمتر بافت کبد و در نتیجه کارایی بهتر این اندام در این غلظت می شود، شاید در دراز مدت و با مطالعات بیشتر بتوان به نتایج محکم‌تری دست یافت.

نتیجه‌گیری

می‌توان اذعان داشت که سطوح مختلف منگنز جیره به خصوص در غلظت ۱۵-۱۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم جیره غذایی فیل ماهیان جوان پرورشی می‌تواند علاوه بر بهبود فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و آنزیم‌های‌کبدی، باعث کاهش آسیب‌های بافتی کبد شود. همچنین تفاوت میزان شدت و سطح اثرگذاری مکمل منگنز جیره برای گونه فیل‌ماهی پرورشی (در مرحله جوانی) نسبت به دیگر آبزیان پرورشی می‌تواند به دلایل تفاوت گونه‌ای، مرحله رشدی ماهی، نوع مکمل منگنز، رژیم غذایی، نوع طراحی آزمایش، فعل و انفعالات شیمیایی، متغیرهای پاسخ و روش‌های آماری متفاوت باشد.

تشکر و قدردانی

سپاس و قدردانی خود را از مسئولین محترم سازمان شیلات ایران، مرکز بازسازی ذخایر ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی سد سنگر و انیستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری به خاطر همکاری‌های صمیمانه در مراحل اجرایی این پروژه اعلام می‌داریم. همچنین از همکاری‌های آقایان دکتر ناصر کرمی‌راد، مهندس کوروش خلیلی، دکتر سعید جهاندار، دکتر علی حلاجیان و مهندس جلیل جلیل پور سپاسگزاری می‌شود.

منابع

1. Abdelhamid A., Abdel-Khalek A. E., Mehrim A.I., Khalil F.F. 2004. An attempt to alleviate aflatoxicosison On Nile tilapia fish by dietary supplementations with chicken-hatchery by-products (egg shells) and shrimp processing wastes (shrimp shells) ON: 1· Fish Performance and Feed and Nutrients Utilization. *Journal of Animal and Poultry Production*, 29(11):6157-6173.

2. Allameh S.K., Noaman V., Nahavandi R. 2017. Effects of probiotic bacteria on fish performance. *Advanced Techniques in Clinical Microbiology*, 1(2):11-25.

3. Antony Jesu Prabhu, P., Schrama, J. W., and Kaushik, S. J. 2016. Mineral requirements of fish: a systematic review. *Reviews in Aquaculture*, 8(2), 172-219.

4. Asaikkutti A., Bhavan P.S., Vimala K., Karthik M. Cheruparambath P. 2016. Dietary supplementation of green synthesized manganese-oxide nanoparticles and its effect on growth performance, muscle composition and digestive enzyme activities of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 35:7-17.

5. Aschner J.L., Aschner M. 2005. Nutritional aspects of manganese homeostasis. *Molecular Aspects of Medicine*, 26(4): 353-362.

6. Awasthi Y., Ratn A., Prasad R., Kumar M., Trivedi S.P. 2018. An in vivo analysis of Cr6+ induced biochemical, genotoxicological and transcriptional profiling of genes related to oxidative stress, DNA damage and apoptosis in liver of fish, *Channa punctatus* (Bloch, 1793). *Aquatic Toxicology*, 200, 158-167.

7. Camargo M. M., Martinez C.B. 2007. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotropical Ichthyology*, 5:327-336.

8. Carlberg I., Mannervik, B. 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, 250(14): 5475-5480.

9. Chebanov M., 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.

10. Dato-Cajegas C.R.S., Yakupitiyage A. 1996. The need for dietary mineral supplementation for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, cultured in a semi-intensive system. *Aquaculture*, 144(1):227-237.

11. Farag A.M., Nimick D.A., Kimball B.A., Church S.E., Harper D.D., Brumbaugh W. G. 2007. Concentrations of metals in water, sediment, biofilm, benthic macroinvertebrates, and fish in the Boulder River watershed, Montana, and the role of colloids in metal uptake. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 52:397-409.

12. Goth L. 1992. Characterization of acatalasemia detected in two Hungarian sisters. *Enzymologia Biologica et Clinica*, 46(4-5):252-258.

13. Hamlin H.J. 2006. Nitrate toxicity in Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). *Aquaculture*, 253(1): 688-693.

14. Hixson S. M., Parris, C.C., Anderson D. M. 2014. Full substitution of fish oil with camelina (*Camelina sativa*) oil, with partial substitution of fish meal with camelina meal, in diets for farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) and its effect on tissue lipids and sensory quality. *Food Chemistry*, 157:51-61.

15. Kazemi R., Pourdehghani M., Yousefi Jourdeh, A., Yarmohammadi M., Nasri

Tajan M. 2010. Cardiovascular system physiology of aquatic animals and applied techniques of fish hematology. Published by; *Iranian Fisheries Research Organization*, Tehran, Iran 194p. [In Persian].

16. Kim J.H., Kang J.C. 2015. The arsenic accumulation and its effect on oxidative stress responses in juvenile rockfish, *Sebastes schlegelii*, exposed to waterborne arsenic (As3+). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 39(2):668-676.

17. Liu Y., Wang J.Y., Li B.S., Qiao H.J., Liu X.D., Hao T.T., Wang X.Y. 2018. Dietary manganese requirement of juvenile hybrid grouper, *Epinephelus lanceolatus*× *E. fuscoguttatus*. *Aquaculture Nutrition*, 24(1): 215-223.

18. Liu Z., Barrett E. J. 2002. Human protein metabolism: its measurement and regulation. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 283(6):E1105-E1112.

19. Lorentzen M., Maage A., Julshamn K. 1996. Manganese supplementation of a practical, fish meal based diet for Atlantic salmon parr. *Aquaculture Nutrition*, 2(2):121-125.

20. Lu Y., Liang X.P., Jin M., Sun P., Ma H. N., Yuan Y., Zhou, Q. C. 2016. Effects of dietary vitamin E on the growth performance, antioxidant status and innate immune response in juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Aquaculture*, 464:609-617.

21. Ma R., Hou, H., Mai K., Bharadwaj A. S., Ji F., Zhang W. 2015. Comparative study on the effects of chelated or inorganic manganese in diets containing tricalcium phosphate and phytate on the growth performance and physiological responses of turbot, *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture Nutrition*, 21(6):780-787.

22. Mai W.J., Yan J.L., Wang L., Zheng Y., Xin, Y., Wang W.N. 2010. Acute acidic exposure induces p53-mediated oxidative stress and DNA damage in tilapia (*Oreochromis niloticus*) blood cells. *Aquatic Toxicology*, 100(3):271-281.

23. Maage A., Lygren B., El-Mowafi A. F. A. 2000. Manganese requirement of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry. *Fisheries Science*, 66(1), 1-8.

24. Magnadottir B. 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish and Shellfish Immunology*, 20(2), 137-151.

25. Mansouri B., Rahmani R., Azadi N.A., Davari B., Johari S.A., Sobhani P. 2015. Effect of waterborne copper oxide nanoparticles and copper ions on guppy (*Poecilia reticulata*): Bioaccumulation and histopathology. *Journal of Advances in Environmental Health Research*, 3: 215 - 223.

26. Marklund, S. and Marklund, G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*, 47(3): 469-474.

27. Mohseni M., Pourali H.R., Kazemi R., Bai S.C. 2014. Evaluation of the optimum dietary protein level for the maximum growth of juvenile beluga (*Huso huso* L. 1758). *Aquaculture Research*, 45(11):1832-1841.[In persian].

28. Musharraf M., Khan M.A. 2021. Dietary manganese requirement of fingerling Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton) estimated by growth, tissue manganese concentration and hepatic manganese-superoxide dismutase activity. *Aquaculture*, 540: 734-736.

29. Nazari K. 2023. The effect of different levels of organic and inorganic Selenium on the morphology of intestinal vily and histological changes of liver in rainbow trout parr. *Journal of Aquaculture Development*, 17(2):115-130.

30. Nie J. Q., Don X.H., Tan B.P., Chi S.Y., Yang Q.H., Liu, H.Y., Shuang, Z. 2016. Effects of dietary manganese sources and levels on growth performance, relative manganese bioavailability, antioxidant activities and tissue mineral content of juvenile cobia (*Rachycentron canadum* L). *Aquaculture Research*, 47(5):1402-1412.

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

32. Pan L., Zhu X., Xi S., Lei W., Han D., Yang Y. 2008. Effects of dietary manganese on growth and tissue manganese concentrations of juvenile gibel carp, *Carassius auratus gibelio*. *Aquaculture Nutrition*, 14(5): 459-463.

33. Parma M. J., Loteste A., Campana M., Bacchetta C. 2007. Changes of hematological parameters in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae) exposed to sublethal concentration of cypermethrin. *Journal of Environmental Biology*, 28(1):147-149.

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

35. Sharifpour I., Hallajian A., Kazemi R. 2014. Histology Laboratorial Techniques for Aquatics. Firs edition, *Iranian Fisheries Research Organization*, Tehran, 345p. [In Persian].

36. Sovenyi, J., and Szakolczai, J. 1993. Studies on the toxic and immunosuppressive effects of cadmium on the common carp. *Acta Veterinaria Hungarica*, 41(3-4): 415-426.

37. Tacon A.G. 1992. Nutritional fish pathology: morphological signs of nutrient deficiency and toxicity in farmed fish . *Food and Agriculture Organization*. 75p.

38. Tan X. Y., Xie P., Luo Z., Lin, H. Z., Zhao, Y.H., Xi W. Q. 2012. Dietary manganese requirement of juvenile yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*, and effects on whole body mineral composition and hepatic intermediary metabolism. *Aquaculture*, 326:68-73.

39. Vaglio A., Landriscina C. 1999. Changes in liver enzyme activity in the *TeleostSparus auratain* response to cadmium intoxication. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 43(1): 11-116.

40. Wang H.W., Cai D. B., Zhao C. L., Xiao G. H., Wang Z. H., Xu H. M., Yang L. K., Ma L., Ma J. L. 2010. Effects of dietary manganese supplementation on antioxidant enzyme activity in the shrimp (*Neocaridina heteropoda*). *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 62(2):78-84.

41. Welker T. L., Overturf K., Abernathy J., Barrows, F.T., Gaylord G. 2018. Optimization of dietary manganese for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, fed a plant- based diet. *Journal of the World Aquaculture Society*, 49(1):71-82.

42. Ye C. X., Tian L.X., Yang H.J., Liang J.J., Niu J., Liu Y.J. 2009. Growth performance and tissue mineral content of juvenile grouper (*Epinephelus coioides*) fed diets supplemented with various levels of manganese. *Aquaculture Nutrition*, 15(6):608-614.

43. Zafar N., Khan, M.A. 2019. Growth, feed utilization, mineralization and antioxidant response of stinging catfish, *Heteropneustes fossilis* fed diets with different levels of manganese. *Aquaculture*, 509:120-128.

44. Zhang H., Sun R., Xu W., Zhou H., Zhang, W., Mai K. 2016. Dietary manganese requirement of juvenile large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Richardson, 1846). *Aquaculture*, 450:74-79.