

## اثر جیره غذایی مکمل سازی شده با سلنیوم آلی (Selenomethionine) و سین بیوتیک دی پروپلاس (Dipro<sup>+</sup>) به صورت جداگانه و تلفیقی روی ظرفیت آنتی اکسدانی، آنزیم های متابولیکی کبدی و بافت-شناسی کبد در ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*)

مازیار اکبرآبادی<sup>۱</sup>، حسین خارا<sup>۲\*</sup>، حبیب وهابزاده رودسری<sup>۳</sup>، محدثه احمدنژاد<sup>۴</sup> و رقیه صفری<sup>۵</sup>

- (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](mailto:h.khara@liau.ac.ir)
- (۳) استادیار گروه شیلات، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران.
- (۴) استادیار پژوهشگر، آبی پروری آبهای داخلی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرانزلی، ایران.
- (۵) دانشیار گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۱۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۰۳

### چکیده

استفاده از محرک های ایمنی مانند سین بیوتیک و عناصر کمیاب از جمله سلنیوم در ماهی های پرورشی جهت افزایش فعالیت مکانیسم های دفاع غیر اختصاصی و ایجاد مقاومت در برابر بیماری ها رواج یافته است. هدف از پژوهش حاضر تعیین اثر جیره غذایی مکمل سازی شده با سلنیوم آلی و سین بیوتیک دی پروپلاس به صورت جداگانه و تلفیقی روی ظرفیت آنتی اکسدانی، آنزیم های متابولیکی کبدی و بافت شناسی کبد در ماهی آزاد دریای خزر بود. برای این منظور، تعداد ۵۴۰ قطعه بچه ماهی آزاد دریای خزر با میانگین وزن  $66/34 \pm 1/45$  گرم (حاصل تکثیر ۱۳۹۸) تهیه شد. ماهیان پس از سازگاری با شرایط آزمایشی رقم بندی شدند و در ۲۷ عدد حوضچه مخصوص بچه ماهی ها به طور کاملاً تصادفی توزیع گردیدند. این آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی تحت ۸ تیمار آزمایشی و یک گروه شاهد (هر کدام با ۳ تکرار) به مدت ۶۰ روز صورت گرفت. تیمارهای آزمایشی شامل ۲ گرم سین بیوتیک در کیلوگرم جیره (تیمار ۱)، ۳ گرم سین بیوتیک در کیلوگرم جیره (تیمار ۲)، ۲ میلی گرم سلنیوم آلی در کیلوگرم جیره (تیمار ۳)، ۴ میلی گرم سین بیوتیک در کیلوگرم جیره (تیمار ۴)، ۲ گرم سین بیوتیک و ۲ میلی گرم سلنیوم آلی در کیلوگرم جیره (تیمار ۵)، ۲ گرم سین بیوتیک و ۴ میلی گرم سلنیوم آلی در کیلوگرم جیره (تیمار ۶)، ۳ گرم سین بیوتیک و ۲ میلی گرم سلنیوم آلی در کیلوگرم جیره (تیمار ۷)، ۳ گرم سین بیوتیک و ۴ میلی گرم سلنیوم آلی در کیلوگرم جیره (تیمار ۸) بود. سپس در انتهای آزمایش به منظور بررسی فعالیت آنزیم های کبدی (آلانین آمینوترانسفراز، آسپاراتات آمینوترانسفراز، آلکالین فسفاتاز) و آنتی اکسیدانی سرم (کاتالاز، گلوکاتایون، ظرفیت کل آنتی اکسیدانی، گلوکاتایون پراکسیداز، سوپراکسید دسموتاز، مالون دی آلدئید) خون گیری 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 نمونه برداری شد. نتایج بررسی ها نشان داد بین گروه شاهد و تیمارهای تغذیه شده با جیره های آزمایشی در میزان آنزیم های کبدی شامل آلکالین فسفاتاز، آلانین آمینوترانسفراز و آسپاراتات آمینوترانسفراز تفاوت معنی دار وجود داشت ( $P < 0/05$ )، به طوری که بیشترین میزان این آنزیم ها در گروه شاهد مشاهده شد. بر اساس نتایج مشاهده گردید کمترین میزان آنزیم های آنتی اکسیدانی شامل سوپراکسید دسموتاز، ظرفیت کل آنتی اکسیدانی، گلوکاتایون - پراکسیداز، گلوکاتایون و کاتالاز و بیشترین میزان مالون دی آلدئید به طور معنی داری در گروه شاهد مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). مطالعه

بافت‌شناسی کبد در پژوهش حاضر نشان داد استفاده از سلنیوم‌آلی و سین‌بیوتیک دی‌پروپلاس به‌صورت جدا از یکدیگر و یا توأم 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 توأم 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

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 کارایی 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 گلوکوتاتیون پراکسیداز 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 سین‌بیوتیک تجاری بر عملکرد رشد، تولیدمثل و ایمنی آبزیان صورت گرفته است. به‌عنوان مثال می‌توان به اثر استفاده از

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 آبی‌پروری 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 پری‌بیوتیک‌های مناسب به‌عنوان سوبسترای 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

این حال، تاکنون مطالعات محدودی در ارتباط با نیازهای غذایی آن صورت گرفته است. به طوری که در اکثر موارد، از نتایج تحقیقات صورت گرفته روی ماهی قزل آلی رنگین-کمان برای آزاد دریای خزر استفاده می شود. این در حالی است که از ضروریات پرورش یک گونه، شناخت اثر مکمل های غذایی مختلف در جهت بهبود شاخص های رشد، سیستم ایمنی و عملکرد دستگاه گوارش می باشد. این مسئله در مورد سلنیوم و سین بیوتیک ها نیز صادق است. به نحوی که تاکنون اثر سلنیوم و سین بیوتیک دی پرو پلاس به صورت مجزا و توأم روی ماهی آزاد دریای خزر مورد بررسی قرار نگرفته است. به همین دلیل هدف از انجام این تحقیق، بررسی اثر توأم سلنیوم آلی و سین بیوتیک دی پرو پلاس روی ظرفیت آنتی اکسیدانی، آنزیم های متابولیکی کبدی و بافت شناسی کبد در ماهی آزاد دریای خزر بود.

#### مواد و روش ها

**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، سین بیوتیک دی پرو پلاس از شرکت دانش بنیان تک ژن زیست (تهران) و سلنیوم آلی از شرکت دانش بنیان توسعه مکمل زیست فناوری آریانا (مشهد) (متشکل از عنصر سلنیوم می- باشد که به شکل یون با مولکول های آلی اسید آمینه متیونین باند شده و با حامل کنسائترهای متشکل از ذرت، سویا، جو و سبوس ترکیب شده است) تهیه گردید. اجزای تشکیل دهنده سین بیوتیک دی پرو پلاس در جدول (۱) آورده شده است.

سین بیوتیک بایومین ایمبو (پروبیوتیک: *Enterococcus faecium* و پریوتیک: فروکتوالیگوساکارید به همراه قطعات دیواره سلولی باکتری های مفید و ترکیبات فایکوفایتیک) روی ماهی زبرا (Nekoubin et al., 2012a; Ghafarifarsani et al., 2021a)، ماهی آنجل (Nekoubin et al., 2012b)، ماهی روسی (Vaezi et al., 2016)، ماهی کپور (قاسم پوردهاقانی و همکاران، ۱۳۹۲) و ماهی کفال (بیتا و همکاران، ۱۳۹۶) اشاره کرد. همچنین اثر سلنیوم روی فیل- ماهی (صفابخش و همکاران، ۱۳۹۸؛ رجبی استرآبادی و همکاران، ۱۳۹۱) و قزل آلی رنگین کمان (نظری و همکاران، ۱۳۹۶) مورد بررسی قرار گرفته است.

آزاد ماهیان از مهم ترین گونه های پرورشی ماهیان در سراسر دنیا می باشند. پرورش آزاد ماهیان از زمان های 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 به طور عمده در جنوب و سواحل دریای خزر وجود دارد (وثوقی و مستجیر، ۱۳۷۱). در سال های اخیر، بنا به دلایلی از جمله صید بی رویه، 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 می گردد و بچه ماهیان به رودخانه های منتهی به دریای خزر به ویژه رودخانه چشمه کیله تنکابن رهاسازی می شوند (روشن طبری و همکاران، ۱۳۹۳).

از آنجایی که ماهی آزاد دریای خزر از گونه های با اهمیت اقتصادی بالا جهت آبی پروری است، توجه به نیازهای تغذیه ای این گونه با ارزش حایز اهمیت می باشد. با

#### جدول ۱. ترکیبات تشکیل دهنده سین بیوتیک دی پرو پلاس

بخش پروبیوتیکی	باسیلوس سابیلیس ( <i>Bacillus subtilis</i> )، باسیلوس لیکنی فورمیس ( <i>Bacillus licheniformis</i> )، باکتری لیوفیلیزه پدیوکوکوس اسیدی لاکتیکی ( <i>Pediococcus acidilactici</i> ) و ۴ سویه از باکتری های اسید لاکتیکی
بخش پری بیوتیکی	مانان اولیگو ساکارید

جدول ۲. آنالیز خوراک استفاده شده جهت تغذیه بچه ماهی ها

قطر خوراک (میلی متر)	وزن ماهی (گرم)	حداقل پروتئین خام (%)	حداقل چربی خام (%)	انرژی قابل هضم (کیلوکالری بر کیلوگرم)	حداکثر فیبرخام (%)	حداقل فسفر قابل جذب (%)	حداکثر رطوبت (%)
۳/۲-۳/۴	۷۵-۲۵	۴۴	۱۴/۵	۴۳۰۰	۲/۲	۰/۸	۱۰

جدول ۳. نحوه تیمار بندی ماهی آزاد دریای خزر به مدت ۶۰ روز

تیمار بندی	کد بندی	سلنیوم (Se) (میلی گرم در کیلوگرم جیره)	سین بیوتیک دی پروپلاس (Dip) (گرم در کیلوگرم جیره)
گروه شاهد	Dip0Se0	-	-
تیمار ۱	Dip2Se0	-	۲
تیمار ۲	Dip3Se0	-	۳
تیمار ۳	Dip0Se2	۲	-
تیمار ۴	Dip0Se4	۴	-
تیمار ۵	Dip2Se2	۲	۲
تیمار ۶	Dip2Se4	۴	۲
تیمار ۷	Dip3Se2	۲	۳
تیمار ۸	Dip3Se4	۴	۳

اکسیژن در حد ۷ میلی گرم در لیتر تثبیت شود (صیادبورانی و همکاران، ۱۳۹۳).

**بررسی آنزیم های متابولیکی کبد:** اندازه گیری آنزیم آسپاراتات آمینوترانسفراز، آلانین آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون (کرج، ایران) و دستگاه اتوآنالایزر<sup>۲</sup> با روش آنزیمی<sup>۳</sup> مطابق دستورالعمل انجام شد. نتایج برای ترانسفرازهای کبدی در طول موج ۳۴۰ نانومتر و برای آلکالین فسفاتاز در طول موج ۴۰۵ نانومتر با واحد IU ارایه گردید (Reitman & Frankel, 1957).

**بررسی ظرفیت آنتی اکسیدانی:** از نمونه های بافت کبد استخراج شده و نگهداری شده در فریزر، جهت سنجش برخی از پارامترهای استرس اکسیداتیو استفاده شد. سنجش فعالیت کاتالاز<sup>۴</sup> به روش Koroluk و همکاران (۱۹۸۸) بر اساس کاهش جذب نوری آب اکسیژنه، گلو تاتیون<sup>۵</sup> با استفاده از معرف المن که با گروه های سولفیدیل احیا واکنش داده و تولید کمپلکس رنگی می کند (Ellman, 1959)، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل با استفاده از تری پیریدیل تری آذین<sup>۶</sup> و بر اساس روش Benzie و همکاران (۱۹۹۶) و تعیین میزان فعالیت

**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، تعداد ۵۴۰ قطعه بچه ماهی آزاد دریای خزر با میانگین وزن ۱/۴۵±۶۶/۴۴ گرم (حاصل تکثیر ۱۳۹۸) تهیه شد. ماهیان پس از سازگاری با شرایط آزمایشی رقم بندی شدند و در ۲۷ عدد حوضچه (۲۰ قطعه در هر تانک) مخصوص بچه ماهی ها به طور کاملا تصادفی توزیع گردیدند. در این مطالعه، از خوراک اکستروود رشد<sup>۱</sup> شرکت تعاونی<sup>۲</sup> بیضا استفاده شد. مشخصات فیزیکی و آنالیز غذای مصرفی در جدول (۲) نشان داده شده است. همچنین، نحوه تیمار بندی بچه ماهیان نیز در جدول (۳) بیان شده است.

**بررسی شاخص های فیزیکی و شیمیایی آب:** هر یک از

حوضچه ها به طور جداگانه به سیستم هوادهی مجهز شده بودند. در طول آزمایش سطح اکسیژن آب در حد استاندارد نگهداری شد. شاخص های کیفی آب مانند دما، پی اچ و اکسیژن محلول با استفاده از دستگاه EUTECH مدل DO6 به طور روزانه اندازه گیری شد. در طول اجرای آزمایش سعی شد دمای آب روی ۱۷ درجه سانتی گراد، پی اچ روی ۶/۹-۷ و

2. Perstige 24i  
3. IFCC International Federation of Clinical Chemistry  
4. CAT  
5. GSH  
6. TPTZ

## نتایج

**آنزیم‌های متابولیسم کبد در ماهیان آزاد تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی** نتایج به دست آمده از آنزیم‌های متابولیسم کبدی در جدول (۴) 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 آمینوترانسفراز و آسپاراتات آمینوترانسفراز تفاوت معنی‌داری وجود دارد ( $P < 0/05$ )، به طوری که بیشترین میزان این آنزیم‌ها در گروه شاهد مشاهده شد. همچنین نتایج جدول (۴) نشان داد ترکیب سین‌بیوتیک و سلنیوم آلی در هر سه شاخص کبدی (ALP، ALT و AST) با یکدیگر بر هم‌کنش متقابل داشتند ( $P < 0/05$ ).

**آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ماهیان آزاد تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی**

نتایج به دست 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 کاتالاز و بیشترین میزان مالون دی‌آلدئید به‌طور معنی‌داری در گروه شاهد مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). همچنین، بیشترین میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (به جز ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی) به‌طور معنی‌داری در تیمارهای سین‌بیوتیکی ( $P < 0/05$ ) و کمترین میزان مالون دی‌آلدئید نیز در تیمار ۳ (۲ میلی‌گرم سلنیوم آلی) مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). 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 ( $P < 0/05$ ).

سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز<sup>۲</sup> با استفاده از کیت تجاری، و مالون دی‌آلدئید<sup>۳</sup> به ترتیب با استفاده از کیت‌های تجاری بر اساس واکنش با تری‌کلرواستیک اسید و در نهایت تیوباریتوریک اسید صورت گرفت (Razygraev et al., 2018).

**نمونه‌برداری از کبد به منظور 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، آگیری، شفاف‌سازی و غوطه‌ورسازی در پارافین صورت گرفت. در مرحله نهایی، قالب‌های پارافینی تهیه و با استفاده از میکروتوم، برش‌های ۶-۵ میکرومتری از قالب‌ها تهیه و گسترش بافتی نیز آماده گردید. در نهایت نمونه‌ها به وسیله هماتوکسیلین-ئوزین و تری‌کروم‌ماسون رنگ‌آمیزی شدند (Takashima et al., 2005).

**تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها:** این آزمایش در یک طرح

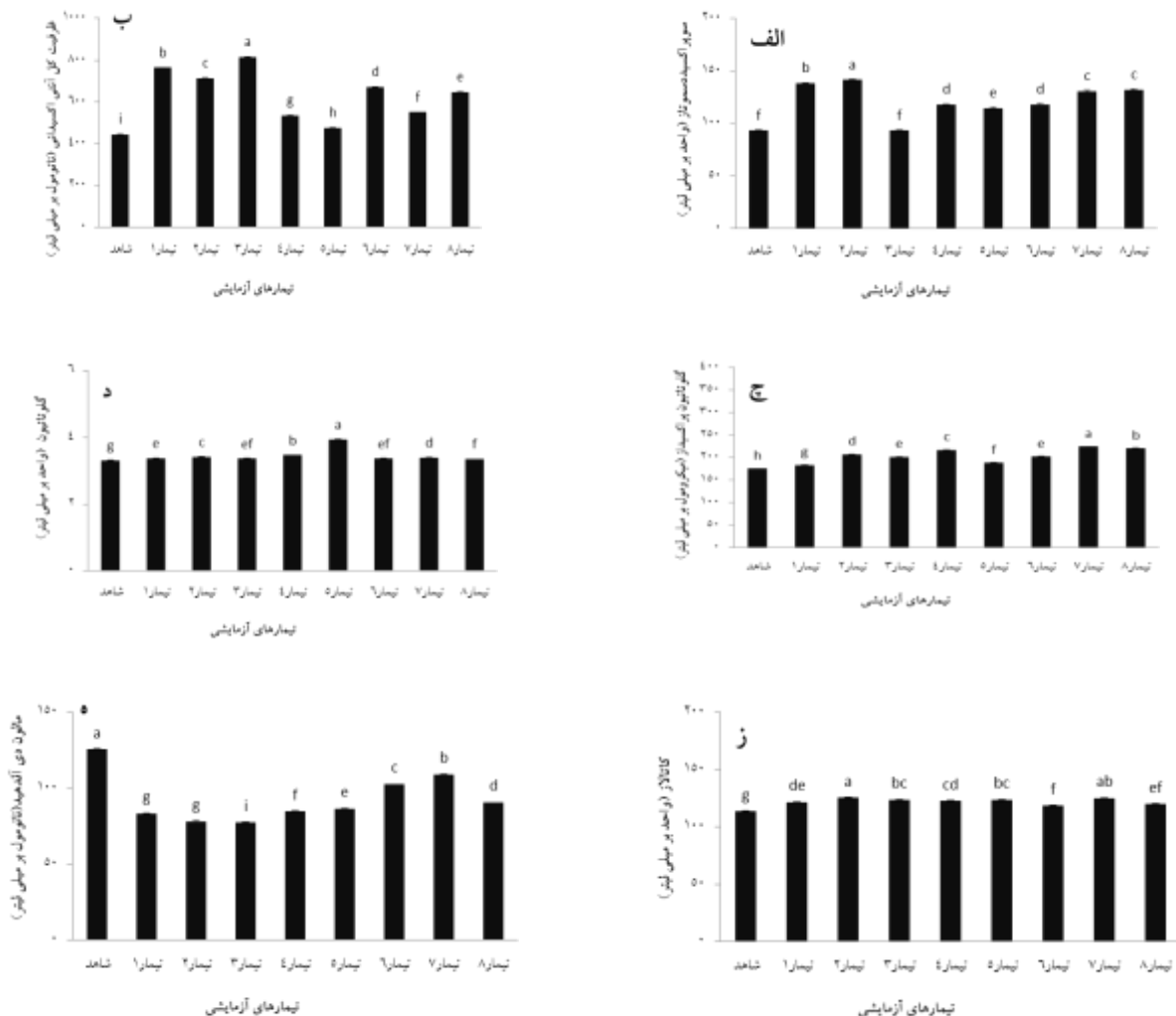
کاملاً تصادفی و در قالب آزمون فاکتوریل با دو فاکتور شامل فاکتور اول سین‌بیوتیک دی‌پروپلاس در سه سطح و فاکتور دوم سلنیوم آلی در سه سطح و هر کدام با سه تکرار انجام شد. داده‌های به دست آمده جهت بررسی نرمالیتی با استفاده از آزمون کولوموگروف اسمیرنوف بررسی شدند. سپس با استفاده از آنالیز واریانس دو طرفه و 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.

جدول ۴. مقایسه میانگین آنزیم‌های متابولیکی کبد در ماهیان آزاد دریای خزر تغذیه شده با سطوح مختلف سلنیوم آلی و

سین بیوتیک دی پروپلاس به مدت ۶۰ روز

تیمارهای آزمایشی*									آنزیم‌های کبدی
تیمار ۸	تیمار ۷	تیمار ۶	تیمار ۵	تیمار ۴	تیمار ۳	تیمار ۲	تیمار ۱	گروه شاهد	
± ۲/۵۲ <sup>cd</sup>	± ۰/۳۳ <sup>ab</sup>	۰/۳۳ <sup>bcd</sup>	± ۰/۰۰ <sup>cd</sup>	۰/۸۸ <sup>abc</sup>	± ۰/۳۳ <sup>e</sup>	± ۰/۸۸ <sup>dc</sup>	± ۰/۶۶ <sup>de</sup>	± ۰/۸۸ <sup>a</sup>	آلانین آمینوترانسفراز (واحد درلیتر)
۲۸/۰۰	۳۲/۳۳	۲۹/۳۳ ±	۲۸/۰۰	۳۰/۶۷ ±	۲۴/۳۳	۲۸/۶۷	۲۶/۳۳	۳۳/۳۳	آسپاراتات آمینوترانسفراز (واحد درلیتر)
± ۰/۵۸ <sup>c</sup>	± ۰/۳۳ <sup>e</sup>	± ۰/۸۸ <sup>b</sup>	± ۰/۰۰ <sup>c</sup>	± ۱/۲۰ <sup>d</sup>	± ۰/۶۷ <sup>h</sup>	± ۰/۸۸ <sup>f</sup>	± ۰/۶۷ <sup>g</sup>	± ۱/۴۵ <sup>a</sup>	آلانین آمینوترانسفراز (واحد درلیتر)
۲۴۶/۰۰	۲۳۱/۳۳	۲۵۳/۳۳	۲۴۷/۰۰	۲۳۸/۳۳	۱۹۸/۶۷	۲۲۶/۶۷	۲۰۶/۳۳	۲۶۲/۶۷	آلکالین فسفاتاز (واحد درلیتر)
± ۰/۶۷ <sup>c</sup>	± ۰/۶۷ <sup>d</sup>	± ۰/۸۸ <sup>c</sup>	± ۰/۳۳ <sup>b</sup>	± ۰/۶۷ <sup>f</sup>	± ۰/۶۷ <sup>i</sup>	± ۱/۱۵ <sup>g</sup>	± ۱/۰۰ <sup>h</sup>	± ۰/۸۸ <sup>a</sup>	
۵۸۶/۳۳	۵۹۷/۶۷	۶۰۹/۳۳	۶۷۲/۶۷	۵۶۴/۳۳	۵۰۹/۱۳	۵۳۲/۰۰	۴۹۲/۰۰	۷۳۰/۳۳	

\* حروف لاتین غیرهمنام در هر ردیف تفاوت معنی داری را نشان می‌دهند (P<۰/۰۵).



شکل ۱. میانگین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی: الف) سوپراکسیددسموتاز، ب) ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی، ج) گلوکاتایون پراکسیداز، د) گلوکاتایون، ز) کاتالاز، ه) مالون دی‌آلدهید در ماهیان آزاد دریای خزر تغذیه شده با سطوح مختلف سلنیوم آلی و سین بیوتیک دی پروپلاس به مدت ۶۰ روز

\* حروف لاتین غیرهمنام در هر ستون تفاوت معنی داری را نشان می‌دهند (P<۰/۰۵).

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

مطالعه بافت‌شناسی کبد در تحقیق حاضر نشان داد استفاده از سلنیوم آلی و سین‌بیوتیک دی‌پروپلاس به صورت جدا از یکدیگر و یا توأم، 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 هسته-های کروی پررنگ بودند که حد و مرز آنها کاملاً واضح و مشخص بود. حضور واکویل‌های چربی درون سیتوپلاسم برخی سلول‌ها به صورت ذرات سفید رنگ مشهود بود.

در تیمار ۱ (۲ گرم سین‌بیوتیک به ازای ۱ کیلوگرم غذا، بدون افزودن سلنیوم آلی)، 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 سلنیوم آلی) 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 به صورت محدود قابل مشاهده بود. کاربورکسی و کاربولیز به دنبال آن دژنره شدن هپاتوسیت‌ها و نکروز مشاهده شد.

در تیمار ۴ (بدون افزودن سین‌بیوتیک و ۴ میلی‌گرم سلنیوم آلی به ازای ۱ کیلوگرم غذا). آتروفی سلولی و پیکنوز

هسته‌ای بیشتر از تیمار ۳ بود. هسته در تعداد زیادی از سلول‌ها دچار کاربورکسی و کاربولیز 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 سلنیوم آلی به ازای ۱ کیلوگرم غذا) پیکنوز، کاربورکسی و کاربولیز هسته و آتروفی سلولی و نکروز به میزان کم مشاهده شد. شدت آسیب‌های بافتی نسبت به تیمارهای ۳ و ۴ کمتر بود.

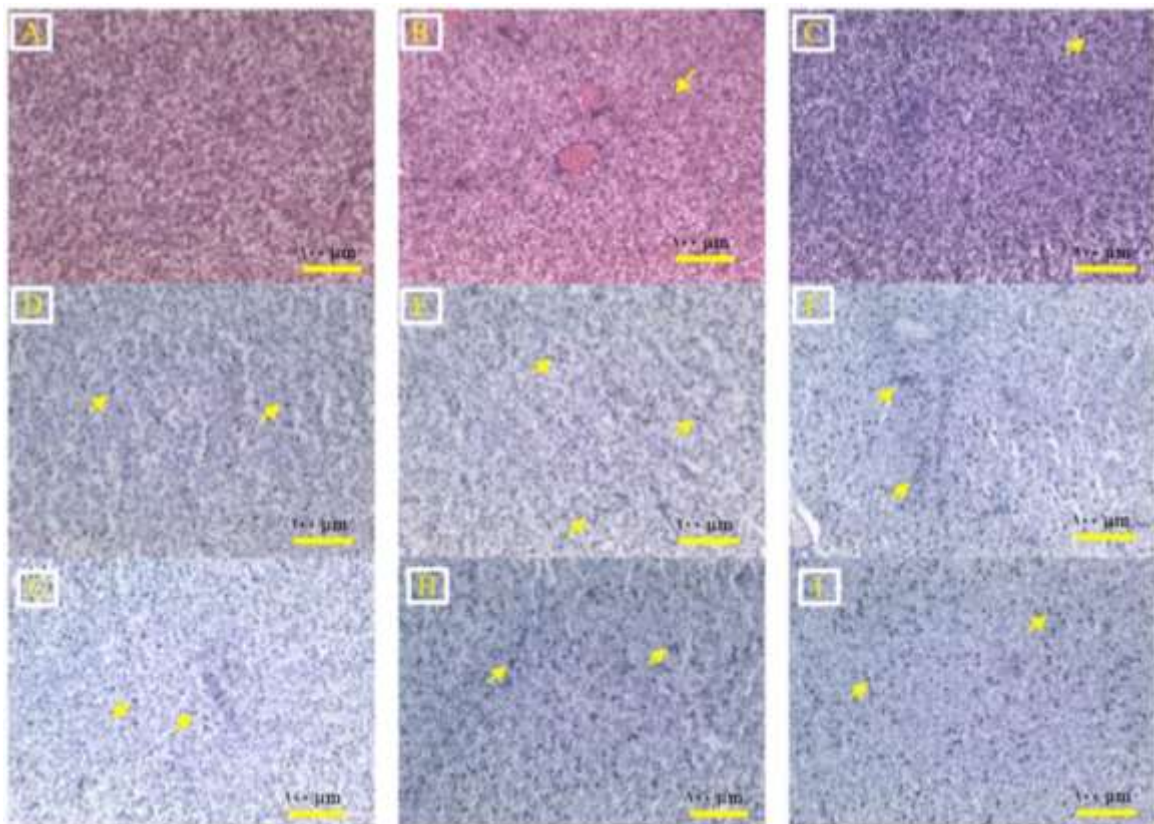
در تیمار ۶ (۲ گرم سین‌بیوتیک به ازای ۱ کیلوگرم غذا، و ۴ میلی‌گرم سلنیوم آلی به ازای ۱ کیلوگرم غذا) کاربورکسی و کاربولیز هسته و نکروز با وسعت بیشتری نسبت به تیمار ۵ مشاهده شد. تعداد معدودی آتروفی و پیکنوز هسته مشاهده شد. در مجموع عوارض بافتی از تیمار ۵ بیشتر بود.

در تیمار ۷ (۳ گرم سین‌بیوتیک به ازای ۱ کیلوگرم غذا، و ۲ میلی‌گرم سلنیوم آلی به ازای ۱ کیلوگرم غذا) تعداد معدودی کاربورکسی، کاربولیز هسته مشاهده شد که شدت آنها کمتر از تیمار ۶ بود. همچنین تعداد معدودی پیکنوز هسته مشاهده شد که میزان آن از تیمارهای ۵ و ۶ کمتر بود. هپاتوسیت‌ها از گروه شاهد کوچکتر بودند. آتروفی سلولی و نکروز بافتی به صورت محدود مشاهده شد که میزان آن نسبت به تیمار ۶ کمتر بود.

در تیمار ۸ (۳ گرم سین‌بیوتیک به ازای ۱ کیلوگرم غذا، و ۴ میلی‌گرم سلنیوم آلی به ازای ۱ کیلوگرم غذا) هپاتوسیت‌ها از گروه شاهد کوچکتر بودند. تعداد معدودی کاربورکسی، کاربولیز 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 سلینیوم آلی و سین بیوتیک دی- پروپلاس به مدت ۶۰ روز

ضایعه	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴	تیمار ۵	تیمار ۶	تیمار ۷	تیمار ۸
پیکنوز هسته (Pyknotic Nucleus)	-	+	++	++	+++	+++	++	+	++
کاربورکسی (Karyorrhexis)	-	-	-	+	+++	+	++	+	++
کاربولیز (Karyolysis)	-	-	-	-	+++	+	++	+	++
تورم ابری (Cloudy swelling)	-	-	-	+	-	-	-	-	-
آتروفی (Atrophy)	-	+	++	+	++	+	+	+	+++
نکروز (Necrosis)	-	-	-	+	+++	+	++	+	+

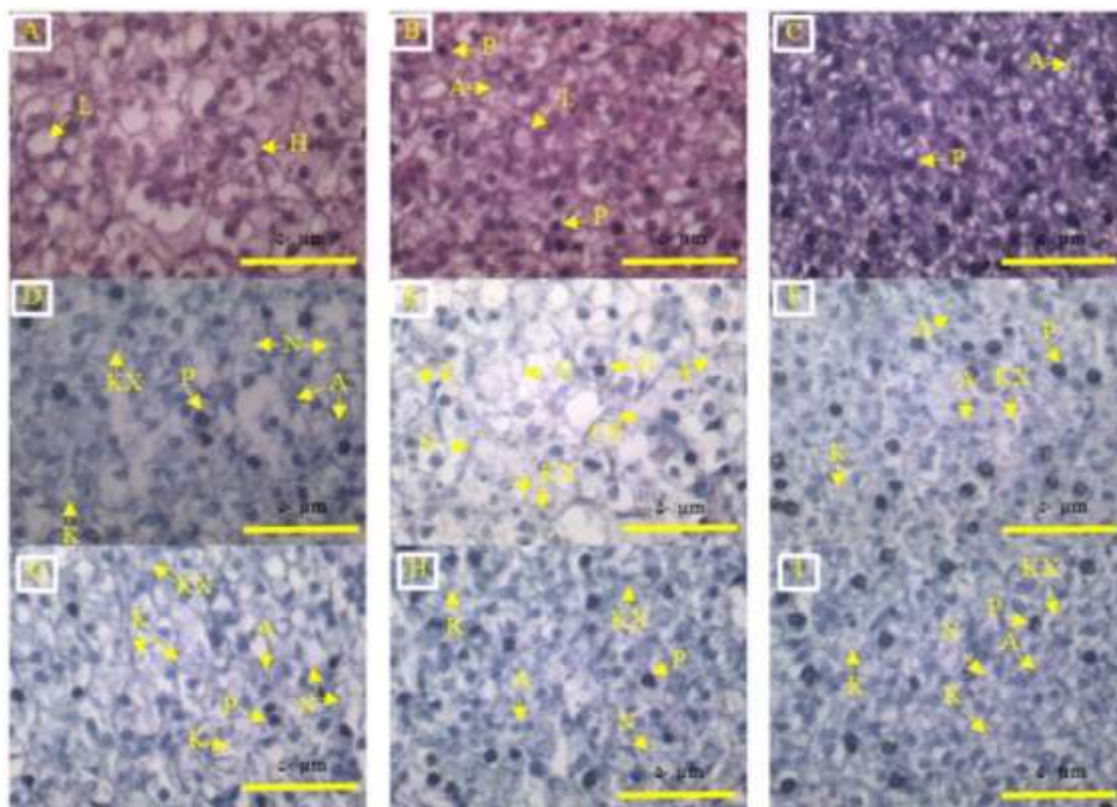


شکل ۲. مقایسه شدت آسیب‌های بافت کبد با استفاده از تصاویر میکروسکوپی با بزرگ‌نمایی  $\times 40$  از بافت کبد بچه ماهیان آزاد دریای خزر بیوتیک دی پروپلاس به صورت مجزا و یا توام در تیمارهای ۱ در گروه شاهد و قرار داده شده در معرض سلینیوم آلی و سین

تا ۸

\* با توجه به شکل از هم‌گسستگی سلول‌ها و دژنره شدن و نکروز در تیمارهای ۳ و ۴ نسبت به سایر تیمارها مشهودتر است و شدت پیکنوز در تیمار ۴ 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 - اتوزین، بزرگ‌نمایی  $\times 40$ ).





شکل ۳. مقطع عرضی بافت کبد بچه ماهیان آزاد دریای خزر قرار داده شده در معرض سلنیوم آلی و سین بیوتیک دی پروپلاس به صورت مجزا و یا توأم.

\* 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)، کاربورکسی (KX) و کاربولیز (K) در هسته برخی سلول‌ها و نکروز (N) به میزان محدود مشاهده می‌شود. E: تیمار ۴، پیکنوز هسته‌ای (P)، کاربورکسی (KX) و کاربولیز (K)، آتروفی سلولی (A) و نکروز (N) با شدت بیشتری مشاهده می‌شود. تورم ابری (CS) نیز در برخی سلول‌ها مشاهده می‌شود. F: تیمار ۵، پیکنوز هسته‌ای (P)، کاربورکسی (KX)، کاربولیز هسته (K) و آتروفی سلولی (A) مشاهده می‌شود. شدت آسیب‌های بافتی نسبت به تیمارهای ۳ و ۴ کمتر است. G: تیمار ۶، کاربورکسی (KX)، کاربولیز هسته (K)، نکروز (N) و تعداد معدودی آتروفی سلولی (A) و پیکنوز هسته‌ای (P) مشاهده شد، وسعت آسیب‌های بافتی از تیمار ۵ بیشتر است. H: تیمار ۷، هپاتوسیت‌ها نسبت به گروه شاهد کوچکتر هستند، تعداد معدودی پیکنوز هسته‌ای (P)، کاربورکسی (KX)، کاربولیز 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)، کاربورکسی (KX)، کاربولیز هسته (K) بیشتر از تیمار ۷ و آتروفی سلولی (A) از سایر تیمارها بیشتر است (رنگ آمیزی هماتوکسیلین - اتوزین، بزرگ‌نمایی  $\times 400$ ).

\*\* تیمار ۱ (۲ گرم سین بیوتیک به ازای ۱ کیلوگرم غذا، بدون افزودن سلنیوم آلی)؛ تیمار ۲ (۳ گرم سین بیوتیک به ازای ۱ کیلوگرم غذا، بدون افزودن سلنیوم آلی)؛ تیمار ۳ (بدون افزودن سین بیوتیک و ۲ میلی‌گرم سلنیوم آلی به ازای ۱ کیلوگرم غذا)؛ تیمار ۴ (بدون افزودن سین بیوتیک و ۴ میلی‌گرم سلنیوم آلی به ازای ۱ کیلوگرم غذا)؛ تیمار ۵ (۲ گرم سین بیوتیک به ازای ۱ کیلوگرم غذا، و ۲ میلی‌گرم سلنیوم آلی به ازای ۱ کیلوگرم غذا)؛ تیمار ۶ (۲ گرم سین بیوتیک به ازای ۱ کیلوگرم غذا، و ۴ میلی‌گرم سلنیوم آلی به ازای ۱ کیلوگرم غذا)؛ تیمار ۷ (۳ گرم سین بیوتیک به ازای ۱ کیلوگرم غذا، و ۲ میلی‌گرم سلنیوم آلی به ازای ۱ کیلوگرم غذا)؛ تیمار ۸ (۳ گرم سین بیوتیک به ازای ۱ کیلوگرم غذا، و ۴ میلی‌گرم سلنیوم آلی به ازای ۱ کیلوگرم غذا).

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

رخ می‌داد، میزان ترواش این سه فاکتور به داخل جریان خون از گروه شاهد بیشتر می‌شد (Mansour *et al.*, 2017). بررسی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ماهیان آزاد تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی نشان داد کمترین میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل سوپراکسید دیسموتاز، ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی، گلوکاتایون پراکسیداز، گلوکاتایون و کاتالاز و کمترین میزان مالون‌دی‌آلدهید به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد. غنی بودن ماهیان از اسیدهای چرب غیراشباع این محصولات را نسبت به دیگر محصولات خوراکی در مواجهه با فساد اکسیداتیو و پیام‌های منفی ناشی از آن بیشتر مستعد می‌کند (Kashiri *et al.*, 2011). در صورت بروز استرس اکسیداتیو مقدمات تغییرات شیمیایی بدن فراهم شده و با پیشرفت آن، شرایط و تغییرات نامطلوبی ایجاد می‌شود (احمدی‌فر و همکاران، ۱۳۹۸).

در تحقیق حاضر، به‌طور کلی بیشترین میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به‌طور معنی‌داری در تیمارهای سین‌بیوتیکی مشاهده گردید. تحقیقات نشان داد باکتری‌های پروبیوتیکی قادر هستند متابولیت‌های مختلفی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی از قبیل گلوکاتایون، بوتیرات و فولات را تولید کنند که نقش مهمی در بهبود وضعیت اکسیداتیو دارند (Wang *et al.*, 2017). همچنین، اکثر پروبیوتیک‌ها سنتز آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز و گلوکاتایون 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 شرایط استرس سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی شامل سه آنزیم مهم سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز برای مهار گونه‌های اکسیژنی فعال ضروری است (Atencio *et al.*, 2009). آنزیم سوپراکسید دیسموتاز یکی از آنزیم‌های مهم در دستگاه دفاعی آنتی‌اکسیدانی است که افزایش فعالیت این آنزیم نشان‌دهنده مهار شدن فعالیت رادیکال‌های آزاد و بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانی میزبان است (Puangkaew *et al.*, 2005). در واقع، این آنزیم رادیکال سوپراکسید را به اکسیژن مولکولی یا پراکسید هیدروژن تبدیل می‌کند، سپس

مطالعات نشان 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 می‌باشد، بنابراین مطالعه فعالیت آنزیم‌های متابولیکی کبد به‌عنوان یک شاخص بیوشیمیایی مهم و یک راهبرد مهم جهت ارزیابی شرایط محیط و وجود ترکیبات سمی در محیط اطراف و یا در جیره غذایی ماهیان مورد توجه می‌باشد (Baghshani & Shamsavani, 2013). در تحقیق حاضر نتایج بررسی‌ها نشان داد بیشترین میزان آنزیم‌های متابولیکی کبدی (ALT, ALP و AST) به‌طور معنی‌داری در گروه شاهد مشاهده شد. ALP به‌عنوان یک فسفومونواستراز شناخته می‌شود و مواد مغذی با فعالیت آن سم‌زدایی، هضم و جذب می‌شوند و در طول زندگی عادی در شرایط نرمال فعالیت آن زیاد نمی‌باشد (Yao *et al.*, 2022). ترانس آمینازهای کبدی (ALT و AST) حساس‌ترین نشانگرهای بیوشیمیایی، شاخص‌های سرمی برای عملکرد کبد، تشخیص بیماری‌های کبدی و شاخص‌های نکرور کبدی هستند (Ali *et al.*, 2015). سطوح بالای این آنزیم‌ها ممکن است نشان‌دهنده دژنراسیون، نکرور و آسیب کبدی به‌دلیل آسیب سلولی باشد (Bhardwaj *et al.*, 2009; Ahmadifar *et al.*, 2020). گزارش شده است که فعالیت آنزیم‌های ALT, ALP و AST در محدوده نرمال نشان‌دهنده وضعیت سلامت ماهی است (Ahmadifar *et al.*, 2020). با توجه به اینکه در مطالعه حاضر میزان این سه شاخص در گروه شاهد در مقایسه با تیمارهای آزمایشی به‌طور معنی‌داری بیشتر بود، می‌توان چنین برداشت کرد که این ترکیبات به هیچ‌عنوان برای ماهیان آزاد دریای خزر مضر نبودند، چرا که سطح حضور این سه شاخص در تیمارها از گروه شاهد نیز کم‌تر بود و ممکن است سین‌بیوتیک و سلنیوم‌آلی به خاطر خاصیتی که دارند، توانسته باشند نقشی مشابه با این سه آنزیم ایفا کنند. بنابراین بدن ترشح این سه آنزیم را با توجه به عدم نیازش به‌طور خودکار کاهش داد. چرا که مقادیر نامناسب سلنیوم جیره در کبد و آبشش ماهیان انباشته می‌شود و موجب تغییرات آسیب‌شناختی در کبد، شامل احتقان سلول‌های آسیینار، سینوزوئیدهای کبدی و واکوئل‌های مربوطه می‌گردد (Khalil *et al.*, 2019) و در پژوهش حاضر اگر چنین اثرات سویی

کاهش میزان مالون‌دی‌آلدهید 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 آنتی‌اکسیدانی تولید شده به وسیله تحریک سین‌بیوتیک مصرفی و همچنین سلنیوم آلی 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 به دلیل 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 ۴ (۴ میلی‌گرم سلنیوم آلی)، 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، ۱۳۹۴).

کاتالاز، پراکسید هیدروژن را به اکسیژن 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 آنتی‌اکسیدانی از قبیل گلوتاتیون پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز و سوپراکسید دیسموتاز را افزایش می‌دهند (Yadav et al., 2008). همچنین، ثابت شد که کارایی پروبیوتیک‌ها در ترکیبات سین‌بیوتیکی بسیار بیشتر از حالت منفرد آنها است (Hosseinifar et al., 2017; Lee et al., 2016; Zhang et al., 2013; Dawood et al., 2019). 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., 1980; Hilton et al., 1986). 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 کمترین میزان مالون‌دی‌آلدهید 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

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 اشاره کرد، زیرا بر اساس دانسته‌ها هیچ مطالعه‌ای درباره سین-بیوتیک دی‌پروپلاس و یا سین‌بیوتیک‌های دیگر روی ماهی آزاد دریای خزر یافت نشده است. در همین راستا، Ghaly و همکاران (۲۰۲۳) گزارش کردند تغییرات بافت کبدی در ماهی تیلاپای تغذیه شده با مکمل‌های پرو و پری‌بیوتیکی به صورت مجزا و تلفیقی شامل نکروزه، دژنراتیو چربی می‌شد که تغییرات در آسین پانکراس، نکروز لوله‌ای دژنراتیو بالا و هیپرپلازی خونساز بود. در مطالعه مذکور، گروه‌های ماهی که مکمل‌های غذایی با پروبیوتیک، پری‌بیوتیک و سین‌بیوتیک دریافت کرده بودند، در مقایسه با گروه‌های بدون مکمل میزان آسیب کمتری به قسمت کوردون کبد وارد شد و پرخونی کمتری را نشان دادند. گزارش‌ها نشان داد واکوئلاسیون سلول‌های کبدی در پارانسیم کبدی نشان‌دهنده اثرات مثبت پروبیوتیک‌ها، بدون پاسخ‌های التهابی مضر بر سیستم ایمنی بدن میزبان است (Saad, 2006) که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت. این پژوهش بیان کرد سین‌بیوتیک دی-پروپلاس توانست اثرات مخرب سلنیوم را کاهش دهد. اگر چه سلنیوم ماده غذایی کمیاب و ضروری برای انسان‌ها و حیوانات است و می‌تواند عملکرد طبیعی ایمنی، تولیدمثل و سیستم عصبی موجودات را حمایت کرده و از بیماری‌های متعدد جلوگیری نماید (قنبری و همکاران، ۱۳۹۶)، ولی نتایج تحقیق حاضر نشان داد میزان مصرف آن باید کنترل شده و همراه با یک محافظت‌کننده مانند مکمل سین‌بیوتیکی باشد. چرا که سلنیوم صرف‌نظر از شکل آن اگر در مقدار بهینه مصرف شود، می‌تواند سمیت را در کبد، کلیه، طحال، مغز و قلب حیوانات کاهش دهد (Zwolak, 2020).

به‌طور کلی نتایج نشان داد استفاده توأم سین‌بیوتیک دی-پروپلاس و سلنیوم‌آلی توانست سبب تقویت ظرفیت سیستم آنتی‌اکسیدانی ماهیان آزاد دریای خزر گردد. اگر چه سلنیوم ماده غذایی کمیاب و ضروری برای انسان‌ها و حیوانات است و می‌تواند عملکرد طبیعی موجودات را حمایت کرده و از بیماری‌های متعدد جلوگیری نماید، ولی زمانی که مقدار

استفاده آن بیش از حد مجاز باشد، سبب بروز آسیب‌های بافتی می‌گردد. با این حال، سین‌بیوتیک دی‌پروپلاس توانست اثرات مخرب سلنیوم را کاهش دهد.

#### منابع

- قرشی، ش.، شجعی، ه.، واعظی، غ. و محمدنژادشموشکی، م. (۱۳۹۲) عوارض هیستوپاتولوژیک کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss*) در مواجهه با غلظت‌های تحت حاد اتیلن دی‌آمین تتراستیک اسید (EDTA). زیست‌شناسی جانوری، ۶(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): ۴۴-۳۳.
- بیتا، س.، اکبری، پ.، سرحدی‌پور، م.ی. و نگهداری-جعفربیگی، ی. (۱۳۹۶) تاثیر سین‌بیوتیک BiominImbo بر عملکرد رشد، تغذیه و ترکیب شیمیایی لاشه بچه ماهی کفال خاکستری. تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های آن، ۳۰(۱): ۱۹۴-۲۰۰.
- پوستی، ا. و ادیب‌مرادی، م. (۱۳۸۷). بافت‌شناسی مقایسه‌ای و هیستوتکنیک، تهران: انتشارات دانشگاه تهران، ۱۶۴ صفحه.
- جوادزاده، ن.، تیموری، م. و معبودی، ح. (۱۳۹۴) بررسی تاثیر ماده بیهوشی ۲ فنوکسی اتانول بر بافت کبد ماهی شیریت. پژوهش زیست‌شناسی جانوری، ۸(۲): ۹-۱.
- 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): ۵۴-۴۰.
- رضوانی‌گیل‌کلایی، س.، شریف‌پور، ع. و کاظمی، ر. (۱۳۸۵) بررسی آثار هیستوپاتولوژیک 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.

- 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.
- روشن طبری، 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 فن-آوری‌های نوین در توسعه آبی‌پروری، ۸(۴): ۳۵-۴۲.
- 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 آبی‌پروری، ۱۳(۱): ۴۲-۳۱۳.
- صیادبورانی، م.، خارا، ح.، صیادبورانی، م. و فخارزاده، س.م.ا. (۱۳۹۳). بررسی تاثیر سطوح مختلف ویتامین C و ویتامین E در جیره بر پارامترهای رشد و سیستم ایمنی ماهی آزاد دریای خزر. مجله علمی شیلات ایران، ۲۳(۴): ۸۵-۹۶.
- قاسم‌پوردهاقانی، پ.، جواهری‌بابلی، م.، ضیایی‌نژاد، س.، تقوی‌مقدم، ا. و پورهادی، م. (۱۳۹۲) بررسی اثر مکمل غذایی سین‌بیوتیک با یومین ایمبو به‌عنوان مکمل غذایی بر عملکرد رشد، بازماندگی و فلور باکتریایی روده ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) انگشت قد. نشریه توسعه آبی‌پروری، ۷(۳): ۴۳-۵۲.
- قنبری، ف.، پذیرا، ع.، عبیدی، ر. و فروزانی، ص. (۱۳۹۶) 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، ۲۶(۶): ۱۷۷-۱۷۱.
- نظری، ک.، شمسایی‌مهرجان، م.، شریف‌پور، ع.، ایلیا، ن. و کمالی، ا. (۱۳۹۶) اثرات سلنیوم آلی و معدنی بر عوامل رشد، پارامترهای خونی و ایمنی‌شناسی بچه ماهیان قزل-آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۶(۳): ۱۳۸-۱۲۹.
- وثوقی، غ.ح. و مستجیر، ب. (۱۳۷۱) ماهیان آب شیرین، چاپ اول، تهران، انتشارات دانشگاه تهران، ۳۱۷ صفحه.
- 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

- 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 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
- 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 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., Alampì, 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.
- Ghafariarsani, 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.
- Ghafariarsani, 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

- 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 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 aquaculture, Gulf Professional Publishing (1<sup>st</sup> 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 (*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  $\beta$ -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.

- 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 Cyp19 $\alpha$  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.
- splicing variants in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Liver International*, 25(1): 77-84.
- Vaezi, M., Khara, H. and Shenavar, A. (2016) Synbiotic (Biomimimbo) alters gut bacterial microflora of Russian sturgeon, *Acipenser guldenstadtii* (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 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)



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

Maziyar Akbarabadi<sup>1</sup>, Hossein Khara<sup>2\*</sup>, Habib Vahabzadeh Roudsari<sup>3</sup>, Mohaddeh Ahmadnejad<sup>4</sup> and Roghieh Safari<sup>5</sup>

- 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](mailto: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<sup>+</sup> 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  $66.34 \pm 1.45$  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<sup>+</sup>, 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> synbiotic, Organic selenium.