DOI: 10.22092/VJ.2021.355050.1867
شماره ۱۳۷ زمستان ۱۴۰۱
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

مطالعه پاسخ‌های ایمنی غیراختصاصی و شاخص‌های آنزیمی همولنف میگوی رودخانه‌ای شرق *(Macrobrachium nipponense)* تغذیه شده با سطوح متفاوت آستازانتین جیره غذایی

• **محمد اتفاق‌دوست**
گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، گیلان، ایران
• **حمید علاف‌نویریان (نویسنده مسئول)**
گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، گیلان، ایران
•**میرمسعود سجادی**
گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، گیلان، ایران
• **بهرام فلاحتکار**
گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، گیلان، ایران

تاریخ دریافت: ۰۸-۰۴-۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: ۲۸-۰۵-۱۴۰۰
Email: navi@guilan.ac.ir

چکیده

مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیرات رنگدانه آستازانتین بر شاخص‌های ایمنی و آنزیم‌های همولنف میگوی رودخانه‌ای شرق *(Macrobrachium nipponense)* انجام گرفت. در این پژوهش، ۲۲۵ قطعه میگو با وزن متوسط ۱/۴۰±۰/۰۵ g به وسیله پنج تیمار غذایی و سه تکرار با مقادیر مختلف آستازانتین شامل صفر (شاهد)، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ mg/kg به مدت زمان هشت هفته، غذادهی گردیدند. در پایان دوره پرورشی، پس از جمع‌آوری همولنف میگوهای مورد مطالعه، شاخص‌های ایمنی و آنزیم‌های همولنف نمونه‌ها به وسیله کیت‌های آزمایشی، دستگاه خوانشگر الایزا و میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج حاصل از مطالعه نشان داد که شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی و آنزیمی همولنف میگوها، تحت تأثیر سطوح مختلف رنگدانه آستازانتین قرار گرفتند (P<۰/۰۵). با افزایش مقادیر آستازانتین جیره غذایی شاخص‌های شیمیایی آلبومین و پروتئین کل همولنف میگوها، به طور معنی‌داری افزایش یافت درحالی‌که میزان کورتیزول از خود کاهش نشان داد (P<۰/۰۵). شاخص‌های ایمنی سلولی همچون تعداد هموسیت کل، سلول‌های گرانولار، نیمه گرانولار و هیالین نیز با افزایش آستازانتین جیره، افزایش معنی‌داری یافتند (P<۰/۰۵). آنزیم‌های همولنف، همچون لایزوزیم و فنول اکسیداز در تیمارهای حاوی رنگدانه آستازانتین بیشتر از تیمار شاهد بود درحالی‌که در آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز، آسپارتات آمینوترانسفراز، آلکالین فسفاتاز و لاکتات دهیدروژناز کاهش معنی‌داری مشاهده گردید (P<۰/۰۵). در نهایت، یافته‌های به دست آمده از این پژوهش نشان داد که افزایش سطوح آستازانتین جیره غذایی موجب بهبود پاسخ‌های بیوشیمیایی، ایمنی غیر اختصاصی و شاخص‌های آنزیمی همولنف میگوی رودخانه‌ای شرق شد و افزودن میزان ۱۵۰ mg/kg از این رنگدانه به جیره غذایی با هدف بهبود شاخص‌های اشاره شده در این میگو پیشنهاد گردید.

کلمات کلیدی: کاروتنوئیدها، مکمل‌های غذایی، همولنف، ایمنی، میگوی رودخانه‌ای شرق

Veterinary Researches & Biological Products No 137 pp: 16-26

Study of non-specific immune responses and enzymatic hemolymph parameters of the oriental river prawn, Macrobrachium nipponense fed different dietary astaxanthin levels

By: Ettefaghdoost, M., Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, Guilan, Iran. Alaf Noveirian, H., (Corresponding Author) Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, Guilan, Iran. Sajjadi, M.M., Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, Guilan, Iran. and Falahatkar, B., Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, Guilan, Iran.

Email: navi@guilan.ac.ir

Received: 2021-06-29 Accepted: 2021-08-19

The present study was aimed to evaluate the effects of astaxanthin on immunological and enzymatic hemolymph parameters of the oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*). In this research, two hundred and twenty-five prawns with mean weight of 1.40±0.05 gram were fed by five dietary treatments and three replications including different levels of astaxanthin containing zero (control), 50, 100, 150 and 200 milligrams astaxanthin per kilogram diet for eight weeks. At the end of the culture period, after collecting the hemolymph of prawns, immunological parameters and hemolymph enzymes of the samples were evaluated by experimental kits, ELISA reader instrument and optical microscope. The results of the study showed that the innate immune and enzymatic hemolymph parameters of prawn hemolymph were affected by different levels of astaxanthin ($P<0.05$). With increasing dietary astaxanthin levels, the immunochemical parameters such as albumin and total protein of prawn hemolymph increased significantly while cortisol levels decreased ($P<0.05$). Cellular immunity parameters such as total hemocyte count, granular cells, semi-granular cells and hyaline cells, also increased significantly with increasing dietary astaxanthin ($P<0.05$). Hemolymph enzymes such as lysozyme and phenol oxidase were higher in treatments containing astaxanthin than control treatment, while alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase and lactate dehydrogenase were significantly reduced ($P<0.05$). Finally, the findings of this study showed that increasing dietary astaxanthin levels improves the non-specific immune response and enzymatic hemolymph parameters of the oriental river prawn and adding 150 milligrams per kilogram of this pigment to the diet was suggested to improve the parameters that mentioned of this prawn.

Key words: Carotenoids, Dietary supplements, Hemolymph, Immunity, Oriental river prawn

مقدمه

امروزه آبزی‌پروی میگوها در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه که از مناطق مناسب پرورش آن بهره‌مند می‌باشند، اهمیت فزاینده‌ای یافته است. بنابراین تولید جهانی میگوهای پرورشی در طی سالیان گذشته، برخوردار از روندی صعودی بوده و بر اساس گزارش سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد (FAO) از حدود ۸۵۰ هزار تن در سال ۱۹۹۵ میلادی به بیش از ۵ میلیون تن در سال ۲۰۱۹ رسیده است (۱۱). در واقع آمارهای ذکر شده بیانگر اهمیت آبزی‌پروری میگوها در این صنعت می‌باشد و لزوم توجه بیشتر را به این بخش را آشکار می‌کند. به طور کلی افزایش میزان تقاضا و ضرورت بالا رفتن سطح تولید میگوهای پرورشی از یک سو و همچنین لزوم افزایش یافتن کارایی و سودآوری آن از سویی دیگر موجب گردید تا پژوهشگران و آبزی‌پروران فعال در این عرصه به فکر استفاده از روش‌های نوین آبزی‌پروری میگو از جمله شناسایی و معرفی گونه‌های جدید و غیر بومی با پتانسیل‌های مطلوب به این صنعت باشند (۷). نتیجه این امر، وارد گردیدن تعدادی گونه مهم پرورشی آب شیرین از جمله میگوی رودخانه‌ای شرق (*Macrobrachium nipponense*)، با هدف پرورش در منابع آب شیرین کشورها بوده است (۱۵).

میگوی رودخانه‌ای شرق با توجه به قابلیت بالای سازگاری آن با شرایط محیطی جدید و بازماندگی بیشتر و رشد مطلوب آن موجب گردید تا در اکثر رودخانه‌ها، تالاب‌ها، استخرها و سایر منابع آبی شیرین مناطق شمالی کشور ایران وفق یافته و در نتیجه جمعیت‌های فراوانی از آن‌ها در محیط‌های بیان شده، گسترش یابند. همچنین به دلیل بهره‌مندی از این قابلیت‌های بیولوژیک به عنوان گونه‌ای بسیار مناسب به منظور بومی‌سازی در بسیاری از مناطق جهان از جمله نواحی شمالی کشور ایران که از شرایط محیطی معتدله و مناسب این گونه برخوردارند، باشد. میگوی رودخانه‌ای شرق قابلیت این را دارد که چرخه زیست خود را در محیط آب شیرین تکمیل نماید که همین عامل، برتری قابل ملاحظه‌ای را نسبت به سایر گونه میگوهای آب شیرین ایجاد نموده است (۱۵، ۱۸). همچنین توانایی منحصر به فرد تحمل دماهای پایین باعث شده که توزیع این گونه تا مناطق سیبری روسیه نیز امتداد داشته باشد، در حالی‌که سایر گونه‌های تجاری میگو، عمدتاً به نواحی گرمسیری تعلق دارند که منجر به بروز محدودیت‌هایی به منظور آبزی‌پروری آن‌ها می‌گردد (۱، ۱۸).

همولنف در سخت‌پوستان‌هایی همانند میگوها، به عنوان یک مایع بیولوژیک محسوب می‌گردد و از اهمیت فراوانی در انتقال ترکیبات مختلف، تبادلات یونی و انجام فعالیت‌های شیمیایی مورد نیاز بدن برخوردار است. علاوه بر این، شاخص قابل توجهی در ارزیابی وضعیت فیزیولوژیک اندام‌های بدن به شمار می‌آید که بررسی آن از لحاظ شاخص‌های بیوشیمیایی و همچنین ایمنی، نقش بسیار زیادی را در تشخیص بیماری‌های مختلف، پاسخ‌های مرتبط با جیره‌های غذایی و کنترل روند زیستی و پرورشی میگوها، ایفا می‌نماید. به همین دلیل، از آنجایی‌که شاخص‌های همولنف، نشان دهنده پاسخ‌های زیستی و فیزیولوژیک میگوها به شرایط تغذیه‌ای و محیطی است، اندازه‌گیری دقیق این شاخص‌ها و بررسی تغییرات در میزان آن‌ها دارای اهمیت فراوانی به منظور ایجاد شرایط بهینه پرورشی و مدیریت سلامت میگوها می‌باشد (۵، ۶، ۱۳، ۲۴). تغذیه آبزیان از جمله موارد مهمی است که تاثیرگذاری قابل توجهی بر عملکرد رشد و ایمنی آن‌ها دارد. در بحث تغذیه مشخص گردیده است که علاوه بر اجزای اصلی و مهم جیره غذایی همچون پروتئین، چربی و کربوهیدرات، سایر افزودنی‌ها نیز به منظور بهبود شاخص‌های رشد، بازماندگی و ایمنی اهمیت فراوانی دارند که یکی از مهمترین افزودنی‌ها، رنگدانه‌های کاروتنوئیدی به شمار می‌آیند. مهم‌ترین رنگدانه کاروتنوئیدی شناخته شده که کاربرد بسیار گسترده‌ای در صنعت آبزی‌پروری دارد، رنگدانه آستازانتین می‌باشد که از طریق خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد تولیدی ناشی از فعالیت طبیعی سلول‌ها و استرس‌های محیطی، منجر به بهبود عملکرد ایمنی آبزیان می‌گردد که افزودن آن را به جیره غذایی را بسیار پر اهمیت می‌کند (۱۹، ۲۱). با توجه به این موضوع، تحقیقات بسیاری مرتبط با مبحث مورد اشاره بر روی آبزیان صورت گرفته است که می‌توان به پژوهش‌های Flores و همکاران (۲۰۰۷) در بررسی سطوح متفاوت رنگدانه آستازانتین بر شاخص‌های ایمنی پست لارو میگوی پاسفید غربی (*Litopenaeus vannamei*)، Chuchird و همکاران (۲۰۱۵) بر روی میگوی پاسفید غربی، Cheng و Wu (۲۰۱۹) بر خرچنگ قرمز (*Procambarus clarkii*) و همچنین Weilong و همکاران (۲۰۱۹) بر میگوی ژاپنی (*Marsupenaeus japonicus*) اشاره کرد. در نتیجه مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات رنگدانه کاروتنوئیدی آستازانتین بر شاخص‌های ایمونولوژیک میگوی رودخانه‌ای شرق به عنوان یک گونه دارای پتانسیل اقتصادی و پرورش مناسب در منابع دارای آب شیرین کشور ایران، انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

میگو و شرایط آزمایش

پژوهش کنونی در فصل تابستان سال ۱۳۹۸ به مدت زمان ۸ هفته در مرکز آکواریوم فیشلند (رشت، گیلان، ایران)، انجام پذیرفت. نمونه‌های میگوی مورد پژوهش، به وسیله تله و همچنین تور با محدوده وزن ۱-۱/۵ g و طول کل حدود ۵ cm از رودخانه سیاه درویشان (طول جغرافیایی '۴۹°۳۰ شرقی؛ عرض جغرافیایی '۳۷°۲۵ شمالی، ارتفاع از سطح دریا ۱۵- m ، صومعه سرا، گیلان، ایران) که از جمله نواحی مهم زیست این میگو در بخش‌های جنوبی دریای خزر می‌باشد، صید و به محل آزمایش منتقل گردیدند. میگوها به مدت زمان دو هفته در مخزن ۷۰۰ L با هدف سازگاری یافتن با شرایط آزمایش، مورد نگهداری قرار گرفتند و در طی این مدت با جیره غذایی پایه میگوی رودخانه‌ای شرق بر اساس مقدار اشتها تغذیه شدند (۱۰). پس از طی دوره سازگاری، میگوها توسط ترازوی دیجیتال (A&D، مدل EK۳۲۰۰I، توکیو، ژاپن) مورد زیست سنجی قرار گرفتند. میگوهای زیست‌سنجی شده، با میانگین وزن ۱/۴۰±۰/۰۵ g و طول کل ۰/۲۷ ± ۵ cm، جداسازی شدند و سپس به طور کاملاً تصادفی در بین ۱۵ آکواریوم شیشه‌ای (۱۵ عدد میگو در هر آکواریوم) تقسیم گردیدند. حجم آبگیری مورد استفاده برای تیمارها، ۶۰ L و منبع آب بهره گرفته شده برای آکواریوم‌ها، آب شهری بود که پیش از به کارگیری در مخازن پرورشی، به منظور کلرزدایی در آن به شکل مداوم هوادهی در طول مدت زمان ۲۴ ساعت، انجام پذیرفت. فرآیند هوادهی در آکواریوم‌های نگهداری میگو در کل طول دوره آزمایش به طور پیوسته با استفاده از سنگ‌های هوا که به هواده مرکزی (Danner، مدل ۱۰۰-AP، نیویورک، آمریکا) اتصال یافته بود، انجام گرفت. آب آکواریوم‌های پرورشی به صورت یک روز در میان پیش از غذادهی به مقدار یک‌سوم ظرفیت آن و در زمان زیست‌سنجی تمام ظرفیت آن مورد تعویض قرار گرفت و با آب کلرزدایی شده جایگزین شد. دوره نوری در طول دوره پرورشی بر اساس ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی تنظیم گردید که توسط لامپ فلورسنت (رنگ نور سفید) انجام پذیرفت (۱۰).

ساخت جیره و طراحی آزمایش

در ابتدا، تنظیم جیره‌های غذایی مورد استفاده در این مطالعه بر طبق جیره پایه میگوی رودخانه‌ای شرق صورت پذیرفت و سپس به جیره‌های آماده شده، پودر آستازانتین CAROPHYLL® pink - DSM ۱۰ درصد (E۱۶۱j*، پاریس، فرانسه) حل شده در آب مقطر به وسیله همزن مغناطیسی (INTLLABTM، مدل ۵۰۰-MS، کوالالامپور، مالزی)، اسپری شد. پس از خشک شدن نمونه‌های غذایی، این جیره‌ها در دمای ۱۶- درجه سانتی‌گراد فریزر منجمد و نگهداری شدند. جیره‌های مصرفی روزانه با توجه به حساس بودن رنگدانه آستازانتین به عوامل محیطی همچون

نور و دما، درون یخچال (دمای حدود ۴ درجه سانتی‌گراد) و همچنین ظرف‌های پلاستیکی مشکی رنگ، مورد نگهداری قرار گرفتند. تیمارهای آزمایشی در این مطالعه شامل پنج جیره غذایی و سه تکرار با سطوح متفاوت آستازانتین صفر (بدون رنگدانه یا شاهد)، (سطوح ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم رنگدانه در کیلوگرم جیره) بر اساس جیره غذایی پایه میگوی رودخانه‌ای شرق بود. فرآیند غذادهی به میگوها به صورت دستی در چهار نوبت (ساعت‌های ۸، ۱۲، ۱۶ و ۲۰) و میزان سه درصد غذادهی (میانگین وزن توده زنده) به مدت زمان ۸ هفته، انجام پذیرفت (۸، ۹). جدول ۱، اقلام غذایی و تجزیه تقریبی جیره‌های آزمایشی مورد استفاده در این مطالعه به منظور پرورش میگوی رودخانه‌ای شرق را نشان می‌دهد (۳).

فرآیند هموله‌گیری

در انتهای دوره آزمایش، نمونه‌گیری از هموله میگوهای تغذیه گردیده با سطوح مختلف رنگدانه کاروتنوئیدی آستازانتین انجام پذیرفت. در ابتدا بعد از قطع غذادهی به مدت زمان ۲۴ ساعت و قرار گرفتن نمونه‌ها با مدت زمان ۱۵ دقیقه در تشت دارای یخ (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) به منظور جلوگیری از بروز استرس و کاهش تحرک میگوها، از هر تکرار به طور کاملاً تصادفی تعداد ۵ عدد میگو انتخاب و جهت نمونه‌گیری هموله با استفاده از سرنگ انسولین (۱ ml) دارای سر سوزن شماره G۲۶ که درون سرنگ جهت جلوگیری از انعقاد با ۰/۴ میلی‌لیتر محلول ضد انعقاد آلزور (۱۱۵ mmol گلوکز، ۲۷ mmol سیترات سدیم، ۳۳۶ mmol سدیم کلرید، ۹ mmol اتیلن دی آمین ترا استیک اسید، pH: ۷/۳) با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و نسبت ۱:۱ آغشته شده بود، انجام گرفت. برای انجام این کار، نوک سوزن سرنگ مورد استفاده را در ناحیه سینوس شکمی (پاهای اول و دوم شنا در کنار طناب عصبی شکمی) با زاویه مورب ۴۵ درجه در زیر لایه قشری پوسته به آرامی فرو گردید و از هر نمونه به میزان حداکثر هموله (حدود ۰/۴ ml و ٪ ۵ وزن بدن میگو) اخذ و پس از آن سرنگ‌های نمونه‌گیری، تکان داده شد تا هموله میگو با محلول ضد انعقاد کاملاً مخلوط شود. بخشی از این هموله‌های نمونه‌گیری شده به منظور اندازه‌گیری شاخص‌های ایمنی سلولی به میکروتیوب‌هایی که معادل حجم آن از بافر فرمالین ٪ ۱۰ استفاده گردیده بود، منتقل شدند و تا زمان سنجش، در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد مورد نگهداری قرار گرفتند. بخش دیگر نمونه‌های هموله اخذ شده تا مرحله آنالیز نمونه‌ها، در میکروتیوب‌های جداگانه و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد (Esco Lexicon®، مدل UUS ۱-۶۶۸A، تورنتو، کانادا) نگهداری گردیدند. میکروتیوب‌های حاوی نمونه پس از انتقال از فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد به محل آزمایشگاه با دمای اتاق (درجه حرارت حدود ۲۷ درجه سانتی‌گراد) فرآیند یخزدایی انجام گرفت و سپس به وسیله دستگاه ورتکس (دنا تجهیز، مدل R۳، تهران، ایران) در مدت زمان ۳۰-۲۰ ثانیه نمونه‌ها به طور کامل همگن و برای انجام آنالیزهای مورد نظر به کار گرفته شد (۱۷، ۲۴).

تعیین شاخص‌های ایمونوشیمیایی هموله

مقدار آلبومین به روش بروموکروزول سبز و اندازه‌گیری پروتئین کل پلاسما با روش بیوره، توسط کیت‌های آزمایشی (شرکت پارس آزمون، کرج، البرز، ایران) در طول موج ۵۴۶ nm بر حسب (g/dl) مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند. سنجش میزان کورتیزول به روش الایزا، به وسیله کیت (Monobind، AccuBind® ELISA، ایلینوی، آمریکا) و همچنین دستگاه خوانشگر الایزا (BioTek®، مدل ELx۸۰۰™، ورمونت، آمریکا) در طول موج ۴۵۰ nm بر حسب (ng/ml) انجام گرفت (۲۰).

تعیین شاخص‌های سلولی هموله

تعداد هموسیت کل توسط لام هموسیتومتر (نئوبار با حجم mm^3 ۰/۱) انجام پذیرفت که به جهت انجام این آزمایش، مقدار µl ۱۰۰ از نمونه توسط سمپلر روی لام قرار داده شد و پس از قرار گرفتن لامل سنگی (Hemocytometer coverslip) بر روی آن در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۴۰× لنز شیئی (شمارش سلول‌های موجود در چهار مربع بزرگ در چهار گوشه صفحه مدرج) بررسی گردید و برای سنجش شمارش افتراقی هموسیت‌ها، شامل سلول‌های گرانولار، نیمه گرانولار و هیالین، در ابتدا به جهت تهیه گسترش، ml ۰/۱ از نمونه هموله را بر روی لام ریخته و لام دیگری را با زاویه مورب ۴۵ درجه بر روی لام دارای قطره هموله کشیده تا آن قطره روی لام کاملاً پخش شود. بعد از آماده نمودن گسترش هموله و خشک گردیدن آن‌ها، با هدف تثبیت نمودن نمونه‌ها به مدت زمان ۳۰ ثانیه درون الکل متیلیک خالص وارد شدند و پس از آن به منظور رنگ آمیزی از روش مای-گرانوالد گیمسا (May-Grünwald Giemsa) و رنگ گیمسا ٪ ۱۰ استفاده گردید. بعد از شستشوی لام‌ها با آب دوبار تقطیر، آن‌ها در دمای اتاق خشک گردیدند و از گسترش‌های تهیه شده به وسیله میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی۴۰× با توجه به اندازه و تعداد گرانول‌های سیتوپلاسم، نسبت هسته به سیتوپلاسم و همچنین رنگ‌بندی سیتوپلاسم سلول‌ها بررسی دقیق صورت گرفت و محاسبه این شاخص‌ها بر اساس $10^5\times$ سلول در میلی‌لیتر ($10^5\times$ cells/ml) انجام پذیرفت (۱۷، ۲۴).

تعیین شاخص‌های آنزیمی هموله

اندازه‌گیری فعالیت لایزوزیم با بهره‌گیری از روش کدورت سنجی و دستگاه (BioTek®، مدل ELx۸۰۰™، ورمونت، آمریکا) انجام پذیرفت. بر طبق آن، µl ۱۵ از نمونه هموله به همراه µl ۱۳۵ از سوسپانسیون mg/ml ۰/۲ باکتری میکروکوکوس لیزودکتیکوس (*Micrococcus lysodeikticus* Sigma، ATCC No. ۴۶۹۸، سنت لوئیس، آمریکا) به عنوان سوبسترا در بافر M ۰/۲ سدیم فسفات (Sigma، P. ۴۴۱۷، سنت لوئیس، آمریکا) با میزان pH ۶/۲، در چاهک‌های میکروپلیت مخلوط شد و بررسی جذب نوری نمونه‌ها در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد(زمان‌های ۱ و ۵ دقیقه پس از مخلوط سازی) و طول موج ۴۵۰ nm، انجام پذیرفت. یک واحد فعالیت آنزیم لیزوزیم، بر اساس میزان آنزیمی که در طول موج و دمای بیان شده، مقدار کاهشی که در جذب سلول‌های باکتری معادل ۰/۰۰۱ در دقیقه ایجاد می‌کند، بر حسب واحد بین‌المللی در دقیقه در میلی‌لیتر (U/min/ml) تعریف گردید. اندازه‌گیری میزان فنول اکسیداز با روش طیف سنجی به وسیله دستگاه (BioTek®، مدل ELx۸۰۰™، ورمونت، آمریکا) در طول موج ۴۹۰ nm و شکل‌گیری رنگدانه قرمز دوپاکروم (DOPA-

جدول ۱- اقلام غذایی و تجزیه تقریبی جیره‌های میگوی رودخانه‌ای شرق *(Macrobrachium nipponense)* مطالعه حاضر (۱۰).

	آستازانتین (mg/kg)				
	صفر	۵۰	۱۰۰	۱۵۰	۲۰۰
ترکیبات جیره (٪)					
آرد ماهی۱	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰
آرد سویا	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰
آرد گندم	۷	۷	۷	۷	۷
آرد ذرت	۷	۷	۷	۷	۷
پروتئین کازئین۲	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶
مکمل ویتامینه۳	۲	۲	۲	۲	۲
مکمل معدنی۴	۲	۲	۲	۲	۲
کلسترول۵	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲
ویتامین C آبزیان۶	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱
دی کلسیم فسفات۷	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
پرکننده ۸(CMC)	۵/۲	۵/۱۹۵	۵/۱۹	۵/۱۸۵	۵/۱۸
کاروتنوئید (آستازانتین)۹	۰	۰/۰۰۵	۰/۰۱	۰/۰۱۵	۰/۰۲
تجزیه تقریبی (درصد ماده خشک)					
رطوبت	۹/۵۷	۹/۵۶	۹/۵۳	۹/۱۸	۹/۵۷
پروتئین	۴۴/۹۱	۴۴/۶۰	۴۴/۶۸	۴۴/۷۴	۴۴/۹۰
چربی	۴/۹۰	۵/۰۴	۴/۷۴	۴/۸۶	۴/۷۵
فیبر	۲/۹۱	۲/۸۵	۲/۷۸	۲/۸۳	۲/۷۷
خاکستر	۱۴/۷۱	۱۴/۷۸	۱۴/۱۲	۱۴/۵۴	۱۴/۵۲
عصاره عاری از ازت	۲۳	۲۳/۱۷	۲۴/۱۵	۲۳/۸۵	۲۳/۴۹
انرژی ناخالص ۱۰(kJ/g)	۱۸/۱۸	۱۸/۲۷	۱۸/۲۴	۱۸/۰۳	۱۸/۲۹
کاروتنوئید کل (mg/kg)	۴/۷۲	۵۲/۲۷	۱۰۷/۳۸	۱۵۵/۸۵	۱۹۸/۶۹

۱شرکت خوراک دام و آبزیان مازندران (ساری، مازندران، ایران) ۲شرکت لابراتوارهای Quelab (مونترآل، کبک، کانادا) ۳شرکت لابراتوارهای سیانس (قزوین، قزوین، ایران)- هر ۱۰۰۰ گرم مکمل ویتامینه شامل؛ ۱۶۰۰۰۰۰ واحد بین المللی رتینول، ۴۰۰۰۰۰ واحد بین المللی کوله کلسیفرول، ۴۰ گرم آلفا توکوفرول، ۲ گرم منادیون، ۶ گرم تیامین، ۸ گرم ریبوفلاوین، ویتامین ۱۲ گرم نیاسین، ۴۰ گرم پانتوتنیک اسید، ۴ گرم پیریدوکسین، ۲ گرم فولیک اسید، ۶۰ گرم اسکوربیک اسید، ۲۴۰ میلی گرم بیوتین، ۲۰ گرم اینوزیتول، ۲۰ گرم بوتیل هیدروکسی تولوئن ۴شرکت لابراتوارهای سیانس (قزوین، قزوین، ایران)- هر ۱۰۰۰ گرم مکمل معدنی شامل؛ ۲۰ گرم آهن، ۶۰ گرم روی، ۴۰۰۰ میلی گرم سلنیوم، ۲۰۰۰ میلی گرم کبالت، ۵۰۰۰ میلی‌گرم مس، ۴۰۰۰ میلی گرم منگنز، ۸۰ میلی‌گرم ید، ۸۰۰۰۰ میلی‌گرم کولین کلراید ۵شرکت سیگما آلدریچ (سنت لوئیس، میزوری، ایالات متحده آمریکا) ۶شرکت لابراتوارهای سیانس (قزوین، قزوین، ایران)- هر ۱۰۰۰ گرم ویتامین C شامل؛ ۵۰۰ گرم Stay-C 35 ۷شرکت ارس تابان (آمل، مازندران، ایران) ۸شرکت کیمیا تهران اسید (تهران، تهران، ایران) ۹شرکت تولیدات غذایی DSM (پاریس، ایل-دو-فرانس، فرانسه)- Carophyll® pink شامل؛ ۱۰ درصد آستازانتین (E161j*) ۱۰محاسبه انرژی ناخالص بر اساس؛ پروتئین (۲۳/۶ کیلوژول بر گرم)، چربی (۳۷/۶ کیلوژول بر گرم)، کربوهیدرات (۱۶/۷ کیلوژول بر گرم).

chrome) بر اساس واحد بین‌المللی در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین (U/min/mg protein) انجام پذیرفت. میزان آلانین آمینوترانسفراز، آسپارتات آمینوترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز بر اساس روش فدراسیون بین‌المللی شیمی بالینی و طب آزمایشگاهی (IFCC) و بدون افزودن Pyridoxal-۵-phosphate در طول موج ۳۴۰ nm، آلکالین فسفاتاز بر اساس روش استاندارد انجمن بیوشیمی آلمان (DGKC) در طول موج ۴۰۵ nm به وسیله کیت‌های تشخیصی (شرکت پارس آزمون، کرج، البرز، ایران) بر حسب واحد بین المللی در لیتر (U/l) مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند (۵، ۲۴).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

در ابتدا به منظور بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف (Kolmogorov-Smirnov) و برای همگنی واریانس‌ها از آزمون لون (Levene) استفاده گردید. تجزیه و تحلیل نتایج، با آنالیز واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) به کمک نرم افزار آماری IBM® SPSS® نسخه ۲۲، ایلینوی، آمریکا) صورت گرفت. سپس آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan's multiple range) در سطح اطمینان ٪ ۹۵، به جهت مقایسه میانگین تیمارها استفاده گردید. در نهایت از نرم‌افزارهای مایکروسافت آفیس (ورد و اکسل، نسخه ۲۰۱۳، ردموند، آمریکا) برای رسم نمودن جداول و نمودارها استفاده گردید، همچنین نتایج درون متن به صورت میانگین ± انحراف معیار (Mean ± Standard deviation) بیان شده است.

نتایج

شاخص‌های ایمونوشیمیایی هومولنف

یافته‌های به دست آمده از بررسی برخی از شاخص‌های شیمیایی هومولنف میگوی رودخانه‌ای شرق در شکل‌های ۱، ۲ و ۳ ارائه شده است. بر اساس نتایج، با افزایش سطوح آستازانتین جیره غذایی شاخص‌های

جدول ۲- مقایسه میانگین (± انحراف معیار) شاخص‌های ایمنی سلولی میگوی رودخانه‌ای شرق *(Macrobrachium nipponense)* تغذیه شده با سطوح متفاوت آستازانتین (mg/kg) پس از ۸ هفته آزمایش.

شاخص‌های ایمنی سلولی هومولنف	آستازانتین (mg/kg)					One- way ANOVA		
	صفر	۵۰	۱۰۰	۱۵۰	۲۰۰	F	.d.f	P
تعداد هموسیت کل (×۱۰^{۵} cells/ml)	۸۸/۳۷±۳/۴۱ ^{d}	۱۰۶/۷۴±۵/۹۰ ^{c}	۱۲۰/۰۲±۶/۵۱ ^{b}	۱۳۱/۰۵±۴/۰۹ ^{a}	۱۳۲/۴۷±۸/۶۲ ^{a}	۲۹/۱۹۵	۴	۰/۰۰۰
سلول‌های گرانولار (×۱۰^{۵} cells/ml)	۸/۸۹±۱/۰۹ ^{c}	۱۴/۷۴±۱/۱۲ ^{b}	۱۷/۲۳±۰/۸۷ ^{b}	۲۱/۲۸±۱/۳۱ ^{a}	۲۱/۸۳±۲/۲۰ ^{a}	۴۳/۲۹۵	۴	۰/۰۰۰
سلول‌های نیمه گرانولار (×۱۰^{۵} cells/ml)	۳۲/۳۳±۲/۸۹ ^{c}	۳۸/۲۸±۲/۴۹ ^{b}	۴۵/۵۱±۱/۳۴ ^{a}	۴۹/۰۱±۳/۲۵ ^{a}	۴۹/۴۷±۴/۵۳ ^{a}	۱۷/۴۰۹	۴	۰/۰۰۰
سلول‌های هیالین (×۱۰^{۵} cells/ml)	۴۷/۴۵±۱/۷۵ ^{c}	۵۳/۷۲±۲/۰۸ ^{b}	۵۷/۲۹±۱/۰۱ ^{ab}	۶۰/۷۳±۴/۱۰ ^{a}	۶۱/۱۷±۵/۳۶ ^{a}	۸/۹۶۳	۴	۰/۰۰۲

اعداد با حروف متفاوت، نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ردیف‌های مختلف با یکدیگر است (P<۰/۰۵).

جدول ۳- مقایسه میانگین (± انحراف معیار) شاخص‌های آنزیمی هومولنف میگوی رودخانه‌ای شرق *(Macrobrachium nipponense)* تغذیه شده با سطوح متفاوت آستازانتین (mg/kg) پس از ۸ هفته آزمایش.

شاخص‌های ایمنی سلولی هومولنف	آستازانتین (mg/kg)					One- way ANOVA		
	صفر	۵۰	۱۰۰	۱۵۰	۲۰۰	F	.d.f	P
لایزوزیم (U/ml/min)	۱۰/۴۸±۰/۳۵ ^{e}	۱۲/۶۰±۰/۲۰ ^{d}	۱۶/۰۴±۰/۴۳ ^{b}	۱۶/۶۱±۰/۱۳ ^{a}	۱۵/۲۸±۰/۳۰ ^{c}	۲۲۰/۸۲۲	۴	۰/۰۰۰
فنول اکسیداز (U/min/mg protein)	۰/۴۷±۰/۰۲ ^{d}	۰/۵۴±۰/۰۳ ^{c}	۰/۵۷±۰/۰۱ ^{bc}	۰/۶۲±۰/۰۲ ^{ab}	۰/۶۴±۰/۰۳ ^{a}	۲۴/۱۰۴	۴	۰/۰۰۰
آلانین آمینوترانسفراز (U/l)	۲۱/۱۳±۲/۰۲ ^{a}	۱۷/۰۳±۱/۲۵ ^{b}	۱۵/۲۲±۱/۱۴ ^{bc}	۱۳/۳۲±۰/۸۵ ^{cd}	۱۱/۰۹±۰/۴۲ ^{d}	۲۷/۲۷۲	۴	۰/۰۰۰
آسپارتات آمینوترانسفراز (U/l)	۷۵/۶۷±۱/۰۵ ^{a}	۷۱/۹۴±۰/۸۹ ^{b}	۷۱/۰۷±۰/۶۹ ^{b}	۶۸/۱۵±۱/۳۵ ^{c}	۶۷/۲۶±۰/۳۲ ^{c}	۳۹/۰۶۵	۴	۰/۰۰۰
آلکالین فسفاتاز (U/l)	۱۵۷/۲۹±۳/۱۷ ^{a}	۱۵۲/۰۸±۱/۸۵ ^{bc}	۱۴۹/۹۳±۱/۶۱ ^{c}	۱۵۳/۲۲±۱/۸۶ ^{abc}	۱۵۴/۳۳±۲/۱۰ ^{ab}	۴/۶۴۱	۴	۰/۰۲۲
لاکتات دهیدروژناز (U/l)	۶۴۴/۳۹±۱/۸۹ ^{a}	۶۲۶/۲۴±۱/۶۳ ^{c}	۶۲۵/۵۶±۲/۷۲ ^{c}	۶۲۵/۰۴±۲/۴۴ ^{c}	۶۳۱/۱۲±۳/۳۸ ^{b}	۳۲/۰۸۵	۴	۰/۰۰۰

اعداد با حروف متفاوت، نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ردیف‌های مختلف با یکدیگر است (P<۰/۰۵).

آلبومین و پروتئین کل همولنف میگوها، به طور معنی‌داری افزایش پیدا نمود در حالی‌که میزان کورتیزول میگوهای غذادهی شده با جیره‌های حاوی رنگدانه آستازانتین، کاهش معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد از خود نشان دادند (P<۰/۰۵).

شاخص‌های ایمنی سلولی همولنف

نتایج حاصل از اندازه‌گیری شاخص‌های ایمنی میگوها در جدول دو بیان گردیده است که در آن شاخص‌های تعداد هموسیت کل، سلول‌های گرانولار، نیمه گرانولار و همچنین سلول‌های هیالین تیمارهای تغذیه شده با سطوح متفاوت رنگدانه آستازانتین افزایش معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد از خود نشان دادند که بیشترین میزان این شاخص‌ها در تیمارهای ۱۵۰ و ۲۰۰ mg/kg رنگدانه آستازانتین و کمترین میزان آن‌ها در تیمار شاهد مشاهده گردید (P<۰/۰۵).

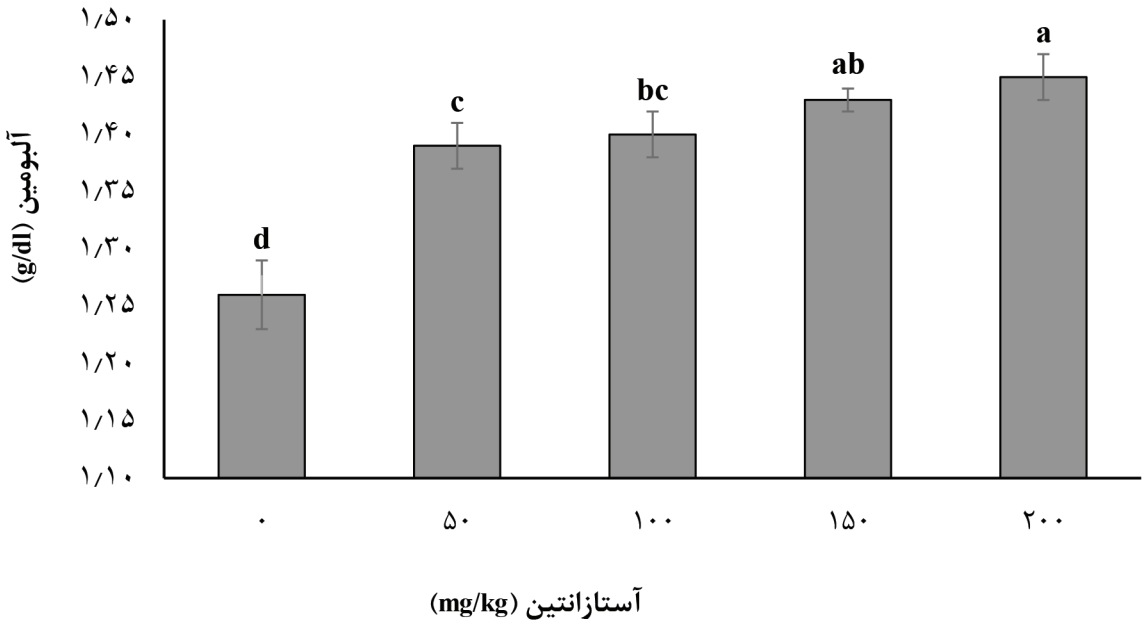
شاخص‌های ایمنی آنزیمی همولنف

یافته‌های به دست آمده از اندازه‌گیری آنزیم‌های همولنف میگوهای آزمایشی در جدول سه اشاره شده است. میزان آنزیم‌های لایزوزیم و فنول اکسیداز در تیمارهای حاوی رنگدانه آستازانتین به طور معنی‌داری بیشتر از تیمار بدون رنگدانه بود. ولی شاخص‌های آنزیمی آلانین آمینوترانسفراز، آسپارتات آمینوترانسفراز، آلکالین فسفاتاز و لاکتات دهیدروژناز کاهش معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد از خود نشان دادند (P<۰/۰۵).

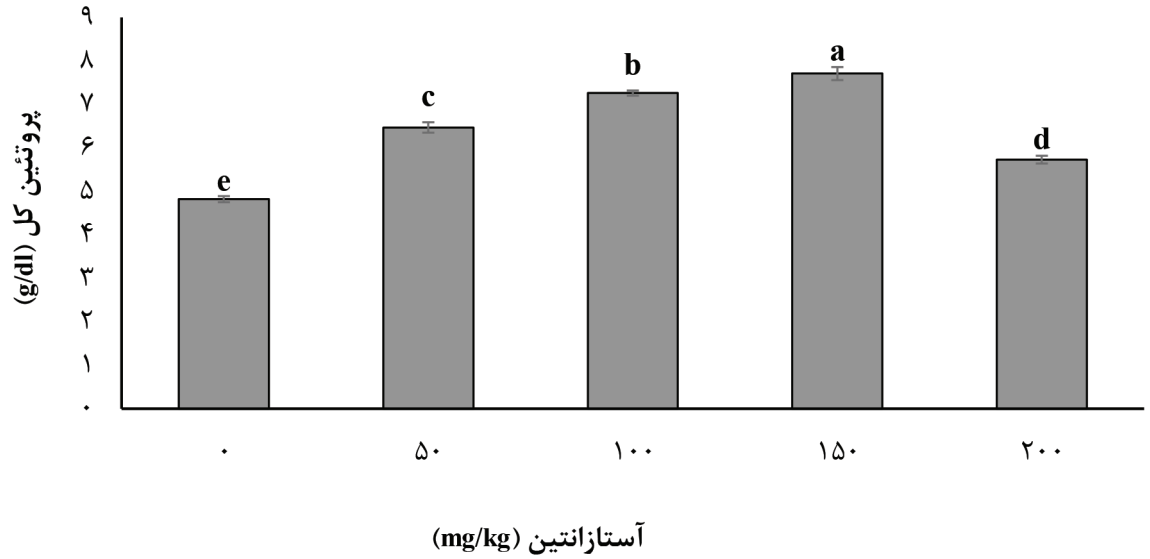
بحث

رنگدانه آستازانتین در بسیاری از فعالیت‌های حیاتی آبزیان نقش عمده ایفا می‌کند. یکی از مهم‌ترین نقش‌های آن به عنوان آنتی‌اکسیدان در فرآیندهای متابولیکی است. این رنگدانه، آنتی‌اکسیدانی قوی محسوب می‌شود (۵۵۰ برابر ویتامین E و ۱۰ برابر رنگدانه بتاکاروتن که به همین جهت آن را سوپر ویتامین E می‌گویند) که انرژی تحریک‌کننده اکسیژن منفرد را بر روی زنجیره خود جذب و موجب تخریب مولکول خود می‌شوند ولی از تخریب دیگر بافت‌ها و همچنین پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع (موجب حفظ غشاهای لیپیدی از طریق محدودیت نفوذپذیری یون‌ها و ترکیبات اکسیدکننده به داخل غشا) جلوگیری به عمل می‌آورند آستازانتین به وسیله خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد تولیدی ناشی از فعالیت طبیعی سلول‌ها و استرس‌های محیطی، موجب بهبود عملکرد ایمنی آبزیان می‌گردد که اضافه نمودن آن را به جیره غذایی این جانداران را بسیار پر اهمیت می‌کند (۱۲، ۱۴).

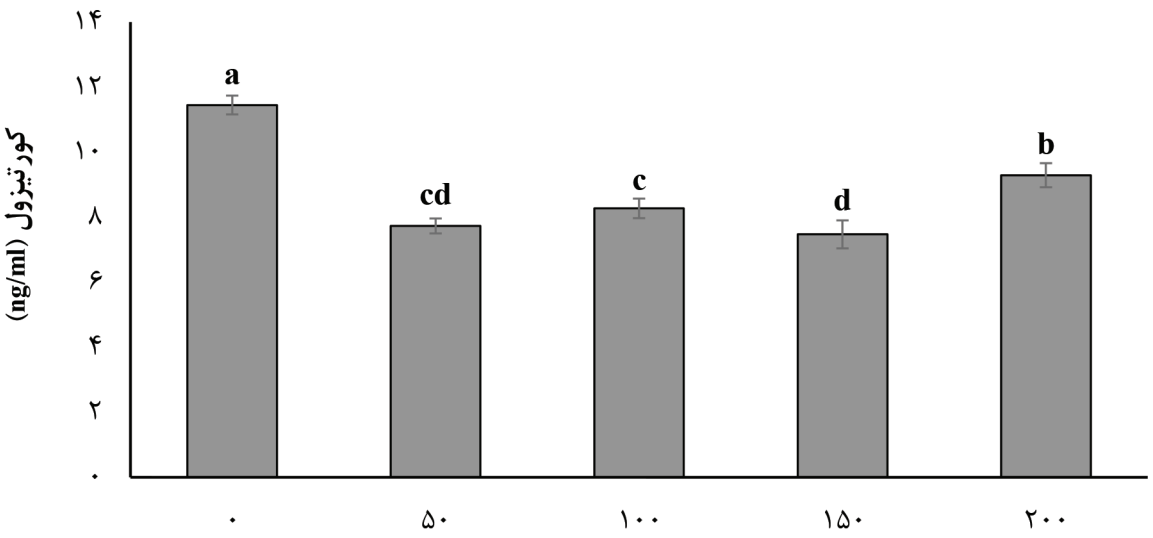
در مطالعه حاضر شاخص‌های بیوشیمیایی همچون آلبومین و پروتئین کل همولنف میگوها، به طور معنی‌داری در تیمارهای تغذیه شده با سطوح مختلف رنگدانه آستازانتین افزایش پیدا نمود در حالی‌که میزان کورتیزول به طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد از خود کاهش نشان داد که نتایج حاصل از این پژوهش با مطالعه Cheng و Wu (۲۰۱۹) دارای مطابقت بود که با آزمایش اثر سطوح مختلف رنگدانه آستازانتین بر روی شاخص پروتئین کل همولنف خرچنگ قرمز با میانگین وزنی g ۷/۱۵ و به مدت ۸ هفته، افزایش معنی‌داری را در این شاخص بیوشیمیایی



شکل ۱- مقایسه میانگین (± انحراف معیار) آلبومین میگوی رودخانه‌ای شرق *(Macrobrachium nipponense)* تغذیه شده با سطوح متفاوت آستازانتین (mg/kg) پس از ۸ هفته؛ حروف متفاوت، نشان دهنده تفاوت معنی‌دار تیمارهای مختلف با یکدیگر است (P<۰/۰۵).



شکل ۲- مقایسه میانگین (± انحراف معیار) پروتئین کل میگوی رودخانه‌ای شرق *(Macrobrachium nipponense)* تغذیه شده با سطوح متفاوت آستازانتین (mg/kg) پس از ۸ هفته؛ حروف متفاوت، نشان دهنده تفاوت معنی‌دار تیمارهای مختلف با یکدیگر است (P<۰/۰۵).



شکل ۳- مقایسه میانگین (± انحراف معیار) کورتیزول میگوی رودخانه‌ای شرق *(Macrobrachium nipponense)* تغذیه شده با سطوح متفاوت آستازانتین (mg/kg) پس از ۸ هفته؛ حروف متفاوت، نشان دهنده تفاوت معنی‌دار تیمارهای مختلف با یکدیگر است (P<۰/۰۵).

در تیمارهای تغذیه شده با آستازانتین نسبت به تیمار شاهد، مشاهده نمودند. همچنین Beygi Kaleshtari و همکاران (۲۰۱۹) نیز به نتایج مشابهی دست یافتند، زیرا در آزمایش ایشان با بررسی اثر مقادیر مختلف پودر هویج حاوی رنگدانه بتاکاروتن بر روی شاخص‌های بیوشیمیایی ماهی قزل آلای رنگین کمان *(Oncorhynchus mykiss)* با میانگین وزنی ۵۰ g و به مدت ۶۰ روز، به این نتیجه رسیدند که با افزایش مقادیر آن در جیره غذایی، شاخص‌های بیوشیمیایی پروتئین کل به طور معنی‌داری افزایش یافت ولی میزان کورتیزول کاهش معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد از خود نشان داد. افزایش آلبومین و پروتئین کل همولنف تیمارهای آزمایشی غذادهی شده با آستازانتین در پژوهش حاضر و تشابه این نتایج با سایر مطالعات مذکور، بیانگر نقش تعدیل‌کننده ایمنی کاروتنوئیدها بر سلول‌های هپاتوپانکراس است که منجر به فعال نمودن و افزایش ظرفیت‌های آنابولیک این سلول‌ها با هدف سنتز پروتئین‌های همولنف می‌گردد (۵، ۱۳). از آنجایی‌که کورتیزول از جمله شاخص‌های فیزیولوژیک شناخته شده و مهم با هدف بررسی رخداد استرس است به همین دلیل در زمان وقوع تنش، میزان آن به طور قابل‌توجهی افزایش می‌یابد. کاهش میزان کورتیزول در این مطالعه و تشابه این یافته با دیگر تحقیقات اشاره شده را می‌توان به نقش مثبت رنگدانه‌های کاروتنوئیدی همچون آستازانتین بر فعالیت‌های سوخت و سازی و همچنین کاهش استرس‌های تغذیه‌ای و محیطی همچون تغییرات فیزیکی و شیمیایی آب و کاهش استرس اکسیداتیو ارتباط داد (۵).

در پژوهش کنونی با افزایش مقادیر رنگدانه آستازانتین جیره غذایی، شاخص‌های ایمنی سلولی همانند تعداد هموسیت کل و سلول‌های گرانولار، نیمه گرانولار و هیالین به طور معنی‌داری افزایش پیدا نمود که این نتایج با آزمایش Chuchird و همکاران (۲۰۱۵) بر اثرات رنگدانه آستازانتین بر روی میگوی پاسفید غربی با میانگین ۴/۴۵ g در مدت ۶۰ روز به این نتیجه دست یافتند که با افزایش سطوح آستازانتین جیره غذایی، شاخص‌های ایمنی میگوهای مطالعه شده همچون تعداد هموسیت کل همولنف به طور معنی‌داری نسبت به تیمار بدون رنگدانه افزایش نشان داد، دارای همخوانی بود. همچنین نتایج مشابهی در تحقیقات Flores و همکاران (۲۰۰۷) با بررسی سطوح متفاوت رنگدانه آستازانتین (صفر، ۴۰، ۸۰ و ۱۵۰ mg/kg) بر شاخص‌های مذکور بر روی پست لارو میگوی پاسفید غربی، Wang و همکاران در (۲۰۱۸) بر تأثیرات مقادیر مختلف آستازانتین به مدت ۶۰ روز در میگوی ژاپنی با میانگین وزن ۱/۴۱ g، Weilong و همکاران (۲۰۱۹) بر اثر سطوح مختلف رنگدانه آستازانتین روی میگوی ژاپنی با میانگین وزن ۲/۸ g، حاصل گردید. با توجه به این که سلول‌های سیستم ایمنی وابستگی بالایی به ارتباطات سلول-سلول توسط گیرنده‌های دیواره سلولی دارند، در برابر آسیب‌های غشایی و استرس اکسیداتیو ایجاد گردیده به وسیله رادیکال‌های آزاد حساس می‌باشند. در نتیجه استفاده از آنتی‌اکسیدان‌هایی همچون آستازانتین در جیره غذایی میگوها، توسط خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد (تولید شده به دلیل شرایط استرس‌زا، بیماری‌ها و غیره) باعث افزایش هموسیت‌ها شده و نقش قابل ملاحظه‌ای را در سلامت این آبزیان ایفا می‌نمایند (۲۱، ۲۲، ۲۴). در واقع تشابه یافته‌های به دست آمده از مطالعات مختلف اشاره شده، بیانگر نقش قابل توجه رنگدانه‌های کاروتنوئیدی در بهبود وضعیت فرآیندهای مرتبط با ایمنی غیر اختصاصی و افزایش مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زای محیطی همانند باکتری‌ها و همچنین بالا بردن میزان تحمل در مقابل شرایط استرس محیطی می‌باشد، در حالت کلی افزایش تعداد هموسیت کل در سخت‌پوستان به عنوان شاخصی برای مقاومت در برابر بیماری‌ها محسوب می‌گردد (۵، ۶).

در این مطالعه میزان آنزیم‌های لایزوزیم و فنول اکسیداز در تیمارهای شامل رنگدانه آستازانتین به طور معنی‌داری بیشتر از تیمار بدون رنگدانه بود. در ارتباط با این موضوع، تحقیقات Alishahi و همکاران (۲۰۱۵) با بررسی اثرات مقادیر مختلف آستازانتین بر روی ماهی اسکار *(Astronotus ocellatus)* در مدت ۵۰ روز به این نتیجه رسیدند که با افزایش مقادیر آستازانتین جیره غذایی، در میزان آنزیم لایزوزیم افزایش معنی‌داری مشاهده گردید و همچنین Cheng و Wu (۲۰۱۹) در ارتباط با اثر آستازانتین بر روی آنزیم لایزوزیم همولنف خرچنگ قرمز، نتایج مشابهی حاصل شد که با یافته‌های به دست آمده از مطالعه کنونی، همخوانی دارد. آنزیم‌های لایزوزیم و فنول اکسیداز از جمله مهم‌ترین شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی سخت پوستان محسوب می‌گردد که تأثیر قابل توجهی بر از بین بردن باکتری‌ها (به ویژه از نوع گرم-مثبت) ایفا می‌نماید. که در واقع میزان فعالیت این آنزیم‌ها نشانه‌ای از عملکرد مناسب ایمنی و سلامت این آبزیان به شمار می‌آید (۲۵). با بررسی نتایج این مطالعه با یافته‌های مشابه بیان شده، می‌توان اینطور نتیجه گرفت که افزایش سطوح فعالیت این آنزیم‌ها در نمونه‌های مطالعه شده بیانگر نقش موثر رنگدانه‌های کاروتنوئیدی همچون آستازانتین بر روی قابلیت ایمنی غیر اختصاصی این میگو می‌باشد.

در این پژوهش آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز، آسپارتات آمینوترانسفراز، آلکالین فسفاتاز و لاکتات دهیدروژناز با افزایش سطوح آستازانتین جیره غذایی کاهش معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد از خود نشان دادند، در حالی‌که که آنزیم آلکالین فسفاتاز تحت تأثیر سطوح مختلف رنگدانه آستازانتین قرار نگرفت. این نتایج با مطالعه Cheng و Wu (۲۰۱۹) دارای مشابهت بود که تحقیق ایشان با افزایش سطوح آستازانتین جیره غذایی در خرچنگ قرمز، این شاخص‌ها کاهش معنی‌داری از خود نشان دادند. آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز از جمله مهم‌ترین انتقال دهنده‌های آمینواسیدها می‌باشند و نقش مهمی در متابولیسم پروتئین‌ها ایفا می‌کنند. تغییر در میزان این آنزیم‌ها نشانه‌ای از وضعیت فیزیولوژیک سلول‌های کبدی است و در حالت معمول سطح پایینی از میزان آن‌ها مشاهده می‌گردد و در صورتی‌که سلول‌های کبدی دچار آسیب‌های جدی شوند، میزان بالایی از آنزیم‌های بیان شده به همولنف وارد می‌گردند. در واقع نتایج مشابه مذکور با مطالعه حاضر در ارتباط با کاهش معنی‌دار این آنزیم‌ها در همولنف تحت تأثر سطوح رنگدانه آستازانتین، نشان‌دهنده نقش قابل ملاحظه این رنگدانه همانند سایر رنگدانه‌های کاروتنوئیدی بر روی وضعیت سلامت سلول‌های هپاتوپانکرانس میگوی مورد مطالعه می‌باشد (۵، ۱۶).

نتیجه‌گیری

در نهایت، نتایج به دست آمده از مطالعه کنونی نشان داد که افزایش سطوح آستازانتین جیره غذایی موجب بهبود ایمنی غیر اختصاصی

میگوی رودخانه‌ای شرق گردید که نشان‌دهنده اهمیت قابل ملاحظه رنگدانه آستازانتین در افزایش عملکرد بهنیه فرآیندهای سوخت و ساز سلولی و تأثیرگذاری مطلوب بر فرآیندهای مرتبط با ایمنی می‌باشد. در نتیجه با مشاهده و ارزیابی یافته‌های حاصل شده، افزودن مقادیر این رنگدانه کاروتنوئیدی تا سطح ۱۵۰ mg/kg آستازانتین به جیره غذایی با هدف بهبود شاخص‌های ایمنی شیمیایی، سلولی و آنزیمی همولنف این میگو، پیشنهاد می‌گردد.

منابع مورد استفاده

1- Afanasyev, D., L. Zhivoglyadova, N. Nebesikhina, M. Magomedov, Y. K. Mutallieva, B. Velibekova and A. Mirzoyan. 2020. Finding of Oriental River Prawn *Macrobrachium nipponense* (De Haan, 1849) in the Lower Terek River (Caspian Sea Basin). *Russian Journal of Biological Invasions*, 11(3):191-197.

2- Alishahi, M., M. Karamifar and M. Mesbah. 2015. Effects of astaxanthin and *Dunaliella salina* on skin carotenoids, growth performance and immune response of *Astronotus ocellatus*. *Aquaculture International*, 23(5):1239-1248.

3- AOAC. 2016. Official Methods of Analysis, 20th Ed. (Editor: Dr. George W. Latimer, Jr.) Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC. USA. 3172P. ISBN: 0935584870.

4- Beygi Kaleshtari, A., S. V. Hosseini, M. Farhangi and G. Rafiee. 2019. Replacement of carrot powder with synthetic astaxanthin in the rainbow trout diet: effect on the growth performance and blood parameters. *Journal of Aquatic Animals Nutrition*, 5(1): 59-70.

5- Cheng, Y. and S. Wu. 2019. Effect of dietary astaxanthin on the growth performance and nonspecific immunity of red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *Aquaculture*, 512: 734341.

6- Chuchird, N., P. Rorkwiree and T. Rairat. 2015. Effect of dietary formic acid and astaxanthin on the survival and growth of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and their resistance to *Vibrio parahaemolyticus*. *SpringerPlus*, 4(1): 440-447.

7- Cocke, J., M. Salazar and M. Rye. 2017. Strategies for managing diseases in non‐native shrimp populations. *Reviews in Aquaculture*, 9(3): 211-226.

8- Ding, Z., Y. Kong, Y. Zhang, J. Li, F. Cao, J. Zhou and J. Ye. 2017. Effect of feeding frequency on growth, body composition, antioxidant status and mRNA expression of immunodependent genes before or after ammonia-N stress in juvenile oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*. *Fish & Shellfish Immunology*, 68(1): 428-434.

9- Ettefaghdoost, M. and H. Alaf Noveirian. 2017. The effect of different feeding rates on growth indices, feed conversion ratio and body composition of oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* (De Haan, 1849). *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 25(5): 97-112.

10- Ettefaghdoost, M., H. Alaf Noveirian and B. Falahatkar. 2018. Growth performance, feed efficiency and whole-body chemical composition of the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*, fed different dietary protein to lipid ratio. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 17(3): 585-602.

11- FAO. 2020. Fishery Statistics Yearbook. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action, Retrieved Nov.2019. FAO, Rome, Italy. ISBN: 978-92-5-132692-3.

12- Fassett, R. G. and J. S. Coombes. 2009. Astaxanthin, oxidative stress, inflammation and cardiovascular disease. *Future Cardiology*, 5(4): 333-342.

13- Flores, M., F. Díaz, R. Medina, A. D. Re and A. Licea. 2007. Physiological, metabolic and haematological responses in white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles fed diets supplemented with astaxanthin acclimated to low‐salinity water. *Aquaculture Research*, 38(7): 740-747.

14- Iwamoto, T., K. Hosoda, R. Hirano, H. Kurata, A. Matsumoto, W. Miki, M. Kamiyama, H. Itakura, S. Yamamoto and K. Kondo. 2000. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by astaxanthin. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 7(4): 216-222.

15- Lavajoo, F., N. Amrollahi Biuki, A. A. Khanipour, A. Mirzajani, J. Gutiérrez Fruitos and A. Akbarzadeh. 2019. Natural diet of *Macrobrachium nipponense* shrimp from three habitats in Anzali Wetland, Iran. *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 17(2): 101-111.

16- Lim, K. C., F. M. Yusoff, M. Shariff and M. S. Kamarudin. 2018. Astaxanthin as feed supplement in aquatic animals. *Reviews in Aquaculture*, 10(3): 738-773.

17- Liu, T., G. Zhang, Y. Feng, C. Kong, C. L. Ayisi, X. Huang and X. Hua. 2019. Dietary soybean antigen impairs growth and health through stress-induced non-specific immune responses in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 84(1): 124-129.

18- Mirzajani, A., A. Ghane, S. Bagheri, K. Abbasi, M. Sayadrahim, M. Salahi and F. Lavajoo. 2020. Diet Survey and Trophic Position of *Macrobrachium nipponense* in the Food Web of Anzali Wetland. *Wetlands*. 40(1): 1229-1239.

19- Nakano, T. and G. Wiegertjes. 2020. Properties of Carotenoids in Fish Fitness: A Review. *Marine Drugs*, 18(11): 568-579.

20- Stalin, A., P. Suganthi, S. Mathivani, K. Broos, V. Gokula, A. Sadiq Bukhari, H. Syed Mohamed, R. Singhal and P. Venu-Babu. 2019. Effect of cobalt-60 gamma radiation on total hemocyte content and biochemical parameters in *Macrobrachium rosenbergii*

(De Man, 1879). *International Journal of Radiation Biology*, 95(6):753-763.

21- Wade, N. M., J. Gabaudan and B. D. Glencross. 2017. A review of carotenoid utilisation and function in crustacean aquaculture. *Reviews in Aquaculture* 9(2): 141-156.

22- Wang, Z., C.-f. Cai, X.-m. Cao, J.-m. Zhu, J. He, P. Wu and Y.-t. Ye. 2018. Effects of dietary astaxanthin supplementation on juvenile kuruma shrimp, Marsupenaeus japonicus. *Aquaculture*, 491(3): 197-204.

23- Weilong, W., M. Ishikawa, S. Koshio, S. Yokoyama, M. A. Dawood, M. S. Hossain and A. S. Moss. 2019. Effects of dietary astaxanthin and vitamin E and their interactions on the growth performance, pigmentation, digestive enzyme activity of kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*). *Aquaculture Research*, 50(4): 1186-1197.

24- Xu, Z., W. Guan, D. Xie, W. Lu, X. Ren, J. Yuan and L. Mao. 2019. Evaluation of immunological response in shrimp *Penaeus vannamei* submitted to low temperature and air exposure. *Developmental & Comparative Immunology*, 100: 103413.

25- Zhang, J., Y. Duan, Z. Zhang, H. Dong and Z. Li. 2015. Research progress of intestinal microbial flora in shrimp. *South China Fisheries Science*, 11(6): 114-119.