استفاده از لاکتوفرین در جیره ماهیان دریایی

وحید مرشدی[1]* ، فاطمه پورجم[1]

۱. پژوهشکده خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر

* نویسنده مسئول: vahid_morshedi@yahoo.com

چکیده

لاکتوفرین یک گلیکوپروئتین متصل شونده به یون آهن و متعلق به خانواده ترانسفرین می‌باشد،که به مقادیر مختلف در شیر پستانداران از جمله گاو وجود دارد. این گلیکوپروتئین اولین بار از شیر گاو جدا و به دلیل محتوای آهن آن به عنوان پروتئین قرمز شیر شناسایی شد. لاکتوفرین به عنوان یک مولکول دفاعی مهم میزبان درنظر گرفته می‌شود و دارای طیف گسترده‌ای از عملکردهای بیولوژیکی شامل نقش در متابولیسم آهن، تکثیر و تمایز سلولی و فعالیت ضدباکتریایی، ضدویروسی و ضدانگلی می‌باشد. که یکی از مهمترین خاصیت‌های لاکتوفرین جذب و انتقال آهن است. لاکتوفرین با جذب آهن آزاد، محیط را عاری از این عنصر کرده و در نتیجه پاتوژنهایی که برای ادامه حیات به این عنصر حیاتی نیاز دارند را از آن محروم می‌کند و بدین ترتیب با مهار رشد باکتری‌های مضر به صورت غیرمستقیم گسترش عفونت را مهار می‌کند. نتیجه بررسی‌ها نشان می‌دهد هرچند در پرورش برخی گونه‌ها مانند شانک زرد باله (*Acanthopagrus latus*) و مارماهی ژاپنی (*Anguilla japonica*) استفاده از لاکتوفرین گاوی در جیره باعث افزایش عملکرد رشد و ایمنی گردیده، اما استفاده در برخی گونه‌ها مانند ماهی صبیتی (*Sparidentex hasta*) نتایج متفاوتی داشت (تاثیر مثبت و عدم اختلاف معنی دار). بنابراین به نظر می‌رسد برای هر گونه ماهی و در شرایط آزمایشی مختلف نتایج متفاوت خواهد بود و پژوهش‌های بیشتری در این زمینه مورد نیاز است.

کلمات کلیدی: محرک ایمنی، لاکتوفرین،جیره غذایی، ماهیان دریایی، خلیج فارس

مقدمه

امروزه برای پیشگیری از بیماری‌های عفونی و غیرعفونی در صنعت آبزی پروری به جای دارو درمانی، جلوگیری از اثرات سوء بهداشت انسانی ناشی از مصرف آنتی بیوتیک‌ها و دیگر مواد شیمیایی با ماندگاری بالا در عضلات و دیگر بافت‌های ماهی و نیز هزینه اقتصادی از محرک‌های ایمنی استفاده می‌شود (Gamnam and Sehrock, 1999). محرک‌های ایمنی با تقویت سیستم ایمنی غیراختصاصی، مقاومت ماهی را در برابر بیماری‌های عفونی افزایش می‌دهند. این مواد به عنوان عوامل دارویی برای کنترل بیماری‌ها، از اهمیت زیادی برخوردار هستند چون فاقد هر گونه اثرات منفی موجود در آنتی بیوتیک‌ها و واکسن‌های زنده بر محیط زیست هستند و چون جزو ترکیبات طبیعی محسوب می‌شوند باقیمانده‌های داروئی نامطلوب ایجاد نمی‌کنند (Sakai, 1999). محرک ایمنی یک ماده شیمیائی- داروئی است که بوسیله واکنش مستقیم با سلول‌های سیستم فعال کننده آنها پاسخ ایمنی غیراکتسابی را افزایش می‌دهد. در عمل ماده محرک ایمنی می‌تواند مکمل غذایی باشد که باعث کنترل بیماری و افزایش توان مقابله با آن گردد و در انواع موجودات مانند ماهیان کاربرد دارد و با تنظیم سیستم دفاع میزبان در مقابل عوامل بیماری‌زای فرصت طلب در محیط باعث افزایش مقاومت در برابر بیماری می‌شود (Gamnam and Sehrock, 1999). انواع گسترده‌ای از ترکیبات مختلف وجود دارند که در ماهی پاسخ ایمنی را تحریک می‌کند. بیشتر این ترکیبات فقط از راه تزریق موثرند ولی برخی از راه خوراکی و یا غوطه‌وری نیز تاثیر می‌گذارند. ترکیباتی مانند گلوکان‌ها، پلی‌پپتیدهای خاص، لوامیزول و ویتامین C به طور گستردهای مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. بیشتر مطالعات اخیر در خصوص تاثیر مکمل‌های غذایی محرک ایمنی بر سلامت ماهیان، روی بتاگلوکان متمرکز شده است اگرچه دیگر محرک‌های ایمنی نظیر لاکتوفرین نیز نویدبخش بوده است. (Welker et al., 2007).

لاکتوفرین و منابع تولید لاکتوفرین

لاکتوفرین (Lf) یک نوع گلیکوپروتئین با وزن مولکولی KDa80 با باندهای آهن است و شامل زنجیره‌های پپتیدی منفرد با ۲ لوب کروی در هر مولکول است (شکل ۱) ، که هر کدام دارای یک جایگاه برای باند شدن با آهن است (Kumari et al., 2003). در مقیاس تجاری لاکتوفرین از شیر گاو استخراج می‌شود که گزارش شده حدودا در دامنه۲۰۰-۲۰ mg/ml است. تولید گسترده لاکتوفرین گاوی در دهه‌های اخیر به مقدار قابل توجهی افزایش یافته که به میزان ۱۰۰-۵۰ تن در سال با درجه خلوص بالای ۹۰ درصد در حال حاضر رسیده است (Steijns, 2004). لاکتوفرین مقاوم به حرارت بوده همچنین تا حدودی مقاوم به تجزیه پروتئولیتیک است، که نشان دهنده این امر است که می‌تواند بر شرایط تولید غذا، مایعات اسیدی معده و پروتئولیتیک روده فائق آید. با توجه به این خصوصیات، تجویز خوراکی آن را که امکان تیمار توده‌ای ماهیان را داده و با استرس‌های دستکاری کمتری همراه است، فراهم می‌آورد (Kumari et al., 2003). لاکتوفرین یکی از مولفه‌های مهم سیستم ایمنی غیراختصاصی است که نقش‌های فیزیولوژیک بسیاری به آن نسبت داده شده که شامل تنظیم متابولیسم آهن (Welker et al., 2007)، حفاظت در مقابل عفونت‌های باکتریائی (Sakai et al., 1993)، تنظیم عملکرد ایمنی (Chand et al., 2006; Esteban et al., 2005)، تحریک پاسخ‌های ایمنی غیراختصاصی (Kamilya et al., 2006)، افزایش رشد سلول‌های مختلف جانوری شامل لنفوسیت‌ها، افزایش تولید رادیکال آزاد هیدروکسیل توسط نوتروفیل‌های انسانی، افزایش فاگوسیتوز و کشتن انگل‌های درون سلولی توسط ماکروفاژهای موش و منوسیت‌های انسانی (Kumari et al., 2003; Lygren et al., 1999)، شرکت در ترشحات موضعی ایمنی در سینرژیسم با ایمنوگلوبولین‌ها و سایر فاکتورهای محافظتی، خواص باند شدن با سموم، فعالیت ضدویروسی و فعالیت ضدقارچی است (Kumari et al.,

2003). لاکتوفرین توسط سلول‌های اپیتلیال موکوسی در گونه‌های مختلف پستانداران شامل انسان، گاو، بز، اسب، سگ و تعدادی از جوندگان تولید می‌شود. این گلیکوپروتئین در ترشحات موکوسی پستانداران شامل اشک، بزاق، مایعات واژینال، منی، ترشحات بینی و برانشیال، صفرا، مایعات معده‌ای-روده‌ای، ادرار و با بالاترین مقادیر در شیر و آغوز یافت می‌شود که بعد از کازئین، دومین پروتئین فراوان را تشکیل می‌دهد. لاکتوفرین در مایعات بدنی نظیر پلاسمای خون و مایع آمنیوتیک نیز یافت می‌شود. همچنین لاکتوفرین در مقادیر قابل ملاحظه‌ای در گرانول‌های ثانویه نوتروفیل‌ها یافت می‌شود (González-Chávez et al., 2009). با توجه به توانائی‌های فیزیولوژیک لاکتوفرین در دفاع از میزبان و همچنین نقش تغذیه‌ای و دارویی آن، به عنوان یک ماده غذایی دارویی در نظر، گرفته شده و در دهه‌های اخیر به تحقیق در زمینه آسان‌ترین روش تولید آن پرداخته شده است. امروزه می‌توان لاکتوفرین را به صورت طبیعی از شیر چندین پستاندار جداسازی کرد یا به صورت نوترکیب که از طریق سیستم بیان ژن باکتریایی، قارچی و ویروسی تولید می‌شود، بدست آورد. بیان این پروتئین در ارگانیسم‌های عالی‌تر نظیر گیاهان و پستانداران نیز صورت گرفته است.

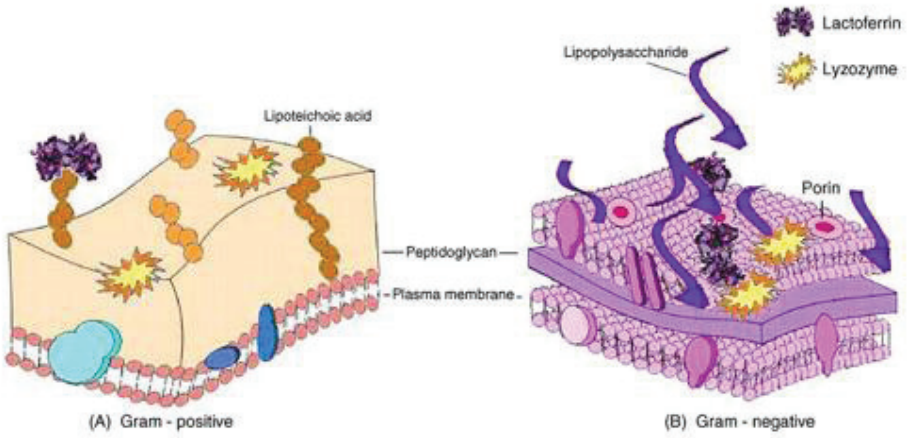
شکل۱: ساختار سه بعدی لاکتوفرین گاوی

لاکتوفرین توسط سلول‌های اپیتلیال موکوسی در گونه‌های مختلف پستانداران شامل انسان، گاو، بز، اسب، سگ و تعدادی از جوندگان تولید می‌شود. این گلیکوپروتئین در ترشحات موکوسی پستانداران شامل اشک، بزاق، مایعات واژینال، منی، ترشحات بینی و برانشیال، صفرا، مایعات معده‌ای-روده‌ای، ادرار و با بالاترین مقادیر در شیر و آغوز یافت می‌شود که بعد از کازئین، دومین پروتئین فراوان را تشکیل می‌دهد. لاکتوفرین در مایعات بدنی نظیر پلاسمای خون و مایع آمنیوتیک نیز یافت می‌شود. همچنین لاکتوفرین در مقادیر قابل ملاحظه‌ای در گرانول‌های ثانویه نوتروفیل‌ها یافت می‌شود (González-Chávez et al., 2009). با توجه به توانائی‌های فیزیولوژیک لاکتوفرین در دفاع از میزبان و همچنین نقش تغذیه‌ای و دارویی آن، به عنوان یک ماده غذایی دارویی در نظر، گرفته شده و در دهه‌های اخیر به تحقیق در زمینه آسان‌ترین روش تولید آن پرداخته شده است. امروزه می‌توان لاکتوفرین را به صورت طبیعی از شیر چندین پستاندار جداسازی کرد یا به صورت نوترکیب که از طریق سیستم بیان ژن باکتریایی، قارچی و ویروسی تولید می‌شود، بدست آورد. بیان این پروتئین در ارگانیسم‌های عالی‌تر نظیر گیاهان و پستانداران نیز صورت گرفته است.

کارکردهای زیستی لاکتوفرین

فعالیت‌های ضدباکتریایی

اسناد زیادی مبنی به وجود فعالیت‌های ضد باکتریایی لاکتوفرین در هر دو محیط in vitro (مطالعاتی در سطح محیط کشت و بدون وجود موجود زنده) و in vivo (مطالعات با حضور موجود زنده) برای باکتری‌های گرم مثبت و منفی و همچنین باکتری‌های مقاوم به اسید و الکل وجود دارد (Jenssen and Hancock, 2009) این‌گونه بیان شده که کارکردهای باکتریواستاتیک لاکتوفرین ناشی از اعمال و توانایی‌های آن در گرفتن آهن و ایجاد کردن محدودیت غذایی برای باکتری‌ها است (Lönnerdal and Iyer, 1995). در ماهیان دریایی نیز برخی از باکتری‌های بیماری زا از خانواده ویبریوها، سودوموناس‌ها، استرپتوکوک‌ها برای رشد و توسعه خود به آهن نیاز دارند که استفاده از لاکتوفرین در جیره این ماهیان تا حدی می‌تواند در این راستا مفید واقع شود. کارکردهای ضد باکتریایی لاکتوفرین به صورت تأثیرات متقابل و مستقیم آن بر سطح باکتری‌ها نیز شرح داده شده است. لاکتوفرین به واسطه اثر متقابل با لیپوپلی ساکارید (LPS) به غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی آسیب می‌زند (Ellison et al., 1988). بار مثبت لوب N ترمینوس لاکتوفرین باعث ممانعت از اثر متقابل بین LSP و کاتیون‌های باکتریایی (Mn^{+2}, Ca^{+2}) می‌شود که سبب رهاسازی LSP از دیواره سلولی می‌شود و به دنبال آن نفوذ پذیری در دیواره باکتری افزایش می‌یابد و باکتری مستعد آسیب پذیری می‌شود (Coughlin et al., 1983). اثر متقابل لاکتوفرین و LSP همچنین باعث تقویت فعالیت‌های آنتی باکتریال‌های طبیعی مانند لیزوزیم می‌شود (Ellison et al., 1988). لاکتوفرین با باند شدن با شبکه بار مثبت مولکول‌های آنیونی بر پوسته باکتری‌های گرم مثبت، باعث می‌شود که بار منفی بر روی سطح باکتری کاهش یابد (شکل ۲) و در نتیجه باعث می‌شود اتصال میان لیزوزیم و لایه پپتیدوگلیکان قوی‌تر شود و پوسته باکتری آسیب ببیند (Leitch and Willcox 1999).



شکل ۲: مکانیزم عمل لاکتوفرین بر علیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی

سایر فعالیت

لاکتوفرین فعالیت‌های ضدویروسی وسیعی بر علیه دامنه وسیعی از ویروس‌های عفونت زای انسانی و حیوانی دارد،

بدین گونه که لاکتوفرین با باند شدن با RNA و DNA ویروس‌ها مانع ازدیاد و تکثیر آن‌ها می‌شود. فعالیت ضدویروسی لاکتوفرین علیه دامنه وسیعی از ویروس‌ها مانند ویروس ایدز، انتروویروس و آرتوویروس گزارش شده است (Van der Strate et al., 2001). نتایج تحقیق Saint-Jean و همکاران (۲۰۱۲) در خصوص ارزیابی خواص ضد ویروسی پروتئین‌های شیر مانند لاکتوفرین بر روی سلول‌های تک لایه آزاد ماهیان و در برابر بیماری‌های ویروسی IPNV و IHNV نشان داد که پروتئین‌ها و پپتیدهای مستخرج از شیر می‌تواند کاربردهای با قابلیت بالا در کنترل بیماری‌های ویروسی ماهیان داشته باشند. همانند باکتری‌ها، لاکتوفرین با تغییراتی که در نفوذ پذیری سلول‌های قارچی ایجاد می کند باعث آسیب رساندن به آن‌ها می شود. همچنین لاکتوفرین می‌تواند با برخی از سمومی که از قارچها ترشح می شود باند شود و مانع اثر پذیری آن‌ها شود (González-Chávez et al., 2009). لاکتوفرین توانایی دارد تولید سیتوکین‌ها را در سرطان کنترل کند. مطالعات اخیر نشان داده که مطالعات اخیر نشان داده که لاکتوفرین می‌تواند تا اندازه‌ای جلوی رشد تومورهای سرطانی را بگیرد (Lonnerdal and lyer, 1995).

عملکردهای مرتبط با تنظیم ایمنی

علاوه بر اثرات مستقیم لاکتوفرین در دفاع از میزبان در مقابل باکتری‌ها، ویروس‌ها، قارچها و انگل‌ها، نقش آن در تنظیم پاسخ ایمنی نیز گزارش شده است. خواص تنظیم ایمنی لاکتوفرین با آزمایش‌های مختلف در شرایط in vitro و in vivo در انسان و جانوران ثابت شده است (Legrand et al., 2006). دفاع میزبان شامل سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی است که لاکتوفرین جزئی از سیستم ایمنی ذاتی است. در هر حال شواهد مختلف نشان می‌دهد که لاکتوفرین می‌تواند حداقل به طور غیرمستقیم در ایمنی اکتسابی نیز دخیل باشد. لاکتوفرین ممکن است مسئول تنظیم سلول‌های ایمنی و سلول‌های دخیل در فرآیندهای التهابی نیز باشد. این فعالیت‌های تنظیمی به دلیل خواص باند شدن آن با آهن و بیشتر از همه به دلیل توانایی‌های آن در کنش با سلول‌ها و مولکول‌های هدف است. برخی آزمایشات in vitro نشان داده‌اند که لاکتوفرین ممکن است موجب تنظیم تکثیر، تمایز و فعالسازی سلول‌های ایمنی شده و بنابراین به صورت مستقیم و غیرمستقیم موجب تقویت پاسخ ایمنی شود. در حقیقت بیشتر مکانیسم‌هایی که لاکتوفرین از طریق آن‌ها سیستم ایمنی را تنظیم می‌کند شامل اثر مستقیم بر سلول‌های ایمنی است (Legrand et al., 2006).

بار مثبت لاکتوفرین به آن امکان باند شدن با مولکول‌های با بار منفی سطح سلول‌های مختلف سیستم ایمنی را داده و پیشنهاد شده است که این ارتباط می‌تواند توام با سیگنال‌دهی‌هایی باشد که منجر به پاسخ‌های سلولی نظیر فعال‌سازی، تمایز و تکثیر سلول‌های ایمنی شود. همچنین مشاهده شده است که لاکتوفرین می‌تواند با ورود به هسته سلول از طریق باند شدن با DNA سیگنال‌دهی‌های مختلفی را فعال کند (Gonzalez-Chavez et al., 2009).

مکانیسم عمل لاکتوفرین خوراکی

متابولیسم و مکانیسم‌عمل لاکتوفرین گاوی خوراکی مورد بررسی قرار گرفته و نشان داده شده که در مجرای معده‌ای-روده‌ای به طور کامل تجزیه نشده، بلکه تا اندازه‌ای (نظیرپپتیدهای حاوی لاکتوفریسین) حفظ می‌شود. تحقیقات نشان داده است که لاکتوفرین گاوی خورده شده عموماً جذب جریان خون نشده، بلکه بر روی سیستم ایمنی روده ای عمل کرده و سیستم حفاظتی سیستمیک میزبان را تحت تاثیر قرار می دهد (Tomita et al., 2009).

در سیستم ایمنی سیستمیک، لاکتوفرین گاوی خوراکی موجب افزایش تعداد سلول‌ها در گره‌های لنفی و طحال، افزایش فعالیت ماکروفاژهای صفاقی و سلول‌های کشنده طبیعی طحال می‌شود. چرخش سیتوکین‌ها یا سایر فاکتورهای هومورال و مهاجرت سلول‌های ایمنی ممکن است پل ارتباطی بین سیستم ایمنی روده‌ای و نقاط عفونی

در عمل لاکتوفرین گاوی باشد(Tomita et al., 2009). در هر حال مکانیسم‌های مولکولی جزئی تر دخیل در میان-کنش بین لاکتوفرین گاوی یا پپتیدهای حاصل از هضم آن و گیرنده‌های لاکتوفرین، ورود لاکتوفرین گاوی یا پپتیدهای حاصل از آن به درون سلول و سیگنال‌دهی‌های درون سلولی بایستی در مطالعات آینده شفاف سازی گردد. سلول‌های دندریتیک ممکن است سلول‌های هدف مهم برای لاکتوفرین گاوی یا پپتیدهای حاصله باشد، چون اخیراً گزارش شده است که لاکتوفرین انسانی (hLf) نوترکیب می‌تواند موجب تحریک بلوغ سلول‌های دندریتیک به T-cell های ابتدایی ساده گردد (Wakabayashi et al., 2006).

نتایج استفاده از لاکتوفرین در جیره آبزیان

Esmaeili و همکاران (۲۰۱۹) تحقیقی بر روی اثرات سطوح مختلف لاکتوفرین جیره بر روی عملکرد پارامترهای رشد، تغذیه، سیستم ایمنی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و مقاومت به بیماری در بچه ماهی شانک زرد باله (*Acanthopagrus latus*) انجام دادند. ماهیان با میانگین وزنی ۱۰ گرم به مدت ۸ هفته با چهار سطح ۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ میلی‌گرم لاکتوفرین در کیلوگرم جیره تغذیه شدند. نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که ماهیان تغذیه شده با لاکتوفرین، به طور معنی‌داری وزن نهایی بالاتری را نسبت به گروه شاهد داشتند. در مطالعات مشابه با مطالعه حاضر پارامترهای رشد و تغذیه‌ای مارماهی ژاپنی (*Anguilla japonica*) و تیلاپیا نیل (*Oreochromis niloticus*) نیز پس از تغذیه با لاکتوفرین بهبود یافته است (Badawy and Al-Kenawy, 2013; Ren et al., 2007). برخلاف نتایج مذکور استفاده از لاکتوفرین گاوی (۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) در جیره ماهی هامور خالدار نارنجی (*Epinephelus coioides*) با میانگین وزنی ۳ گرم و به مدت ۳۰ روز افزایش بقا در مقابل استرس در معرض هوا قرار گرفتن و افزایش ترشح موکوس را به همراه داشت ولی افزودن لاکتوفرین تاثیر معنی‌داری بر وزن ماهیان ایجاد نکرد (Yokoyama et al., 2006). تفاوت در نتایج مطالعات مختلف می‌تواند به عواملی مانند شرایط آماده سازی لاکتوفرین تجاری مورد استفاده از جمله حرارت (Lonnerdal, 2009)، گونه ماهی، اندازه ماهی، میزان لاکتوفرین جیره و شرایط پرورشی نسبت داده شود (Eslamloo et al., 2012). همچنین برخی محققین بیان کرده‌اند که اثرات سینرژیستی لاکتوفرین با اجزای ناشناخته تشکیل دهنده جیره‌های تجاری ممکن است در عملکرد رشد و تغذیه ماهیان تاثیرگذار باشد(Yokoyama et al., 2006). مکانیسم اثرگذاری لاکتوفرین بر شاخص‌های رشد هنوز به طور کامل مشخص نشده است (Yokoyama et al., 2006).

نتایج مطالعات در دو تحقیق انجام شده بر روی یک گونه که در ذیل به آنها اشاره می‌شود جالب توجه می‌باشد: مرشدی و همکاران (۱۳۹۵) تحقیقی بر روی بچه ماهیان صبیتی (*Sparidentex hasta*) با میانگین وزنی ۷ گرم انجام دادند. ماهیان به مدت ۴۲ روز با جیره‌های حاوی۰، ۴۰۰ و۸۰۰ میلی‌گرم لاکتوفرین به ازای هر کیلوگرم جیره تغذیه شدند. لاکتوفرین جیره عملکرد رشد و تغذیه ماهی صبیتی را تغییر نداد. نتایج مطالعه مذکور نشان داد پارامترهای ایمنی غیراختصاصی شامل تعداد گلبول‌های سفید، ایمنوگلوبولین کل، لیزوزیم و کمپلمان به وسیله‌ی لاکتوفرین تغییر نکرد. با این حل تنها فعالیت باکتری‌کشی موکوس در ماهیان تغذیه شده با ۸۰۰ میلی گرم لاکتوفرین به صورت معنی داری افزایش یافت. به طور کلی تغذیه بچه ماهی صبیتی با دوزهای مذکور در یک دوره ۶ هفته‌ای پاسخ ایمنی غیراختصاصی و عملکرد رشد را افزایش نداد. این مسئله می‌تواند به کوتاه بودن طول دوره آزمایش و یا پایین بودن دوز انتخابی لاکتوفرین نسبت داده شود؛ چرا که در تحقیقی که توسط Pagheh و همکاران (۲۰۱۸) به مدت ۸ هفته بر بچه ماهیان ماهی صبیتی با میانگین وزنی ۳۸ گرم برای ارزیابی سطوح مختلف لاکتوفرین جیره (۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰) انجام شد. ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی ۸۰۰ میلی‌گرم لاکتوفرین در

کیلوگرم جیره دارای بالاترین عملکرد رشد نسبت به سایر گروه‌ها بود. علاوه بر این بالاترین میزان فعالیت لیزوزیم سرم در ماهیان تغذیه شده با ۸۰۰ میلی‌گرم لاکتوفرین در کیلوگرم جیره مشاهده شد. همچنین نتایج نشان داد که لاکتوفرین تاثیری بر پارامترهای آنتی‌اکسیدانی کبد و شاخص‌های خونی نداشت. بنابراین به نظر می‌رسد استفاده از لاکتوفرین در جیره با توجه به روش استفاده (اسپری یا مخلوط با غذا) برای هر گونه ماهی و در شرایط آزمایشی مختلف نتایج متفاوت خواهد داشت و قبل از توصیه به استفاده از آن در جیره برای گونه مورد نظر تحقیقات در شرایط پرورشی مدنظر جهت به دست آوردن دوز مناسب انجام گیرد.

لاکتوفرین به عنوان یک باند کننده آهن قوی توانایی باند شدن با آهن را در شرایط گوناکون دارد که این توانایی لاکتوفرین باعث ایجاد تغییراتی در جذب آهن و همچنین انتقال و ذخیره سازی آهن می شود (Davidson and Lonnerdal, 1989) و متعاقبا برخی از پارامترهای فیزیولوژیک وابسته به آهن مانند شاخص‌های خونی تحت تاثیر لاکتوفرین قرار می گیرد. مطالعات Ren و همکاران (۲۰۰۷) و Welker و همکاران (۲۰۰۷)، به ترتیب تاثیر لاکتوفرین جیره را بر شاخص‌های خونی مارماهی ژاپنی و تیلاپیا نیل را بررسی کردند. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که سطوح مختلف لاکتوفرین جیره تاثیر معنی‌داری بر روی تعداد گلبول‌های قرمز، میزان هماتوکریت و هموگلوبین در مقایسه با گروه شاهد ندارند. در مقابل تغذیه ماهی صبیتی با جیره حاوی ۴۰۰و ۸۰۰ میلی گرم لاکتوفرین برای یک دوره ۶ هفته‌ای اختلاف معنی‌دار را در میزان هموگلوبین، هماتوکریت و تعداد گلبول‌های قرمز تیمارها در مقایسه با گروه شاهد به وجود آورد (مرشدی و همکاران، ۱۳۹۵). به نظر می‌رسد که عواملی مانند شرایط فیزیولوژیک جانور و همچنین میزان آهن موجود در غذا، در قابلیت بهبود بخشیدن به پارامترهای خون‌شناسی توسط لاکتوفرین موثر است (Eslamloo et al., 2012). متغیرهایی نظیر گونه ماهی، جنس، سن، سیکل بلوغ جنسی، شرایط تغذیه‌ای، شرایط سلامت بدن و استرس نیز می‌توانند پارامترهای خون‌شناسی را تغییر دهند (McCarthy et al., 1973). مشخصه‌های بیوشیمیایی خون شاخص‌های کلیدی در پایش سلامت شرایط فیزیولوژیک آبزیان هستند. پروتئین‌ها در تمامی سیستم‌های فیزیولوژیک دخیل بوده و یک موقعیت کلیدی در متابولیسم موجودات دارند. پروتئین‌ها جزء اساسی‌ترین ترکیبات موجود در سرم بوده و در حفظ سلامت سیستم ایمنی ضروری هستند (Kumar et al., 2005). Ren و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعه اثرات جداگانه ویتامین ث و ترکیب با لاکتوفرین در مارماهی ژاپنی بیشترین میزان پروتئین کل سرم را در تیمارهای حاوی لاکتوفرین مشاهده کردند. با توجه به نقش‌های لاکتوفرین در متابولیسم آهن، در تحقیقات صورت گرفته آهن سرم و ظرفیت باند شدن آهن (TIBC) به عنوان دو پارامتر بیوشیمیایی عمده در ماهیان تغذیه شده با لاکتوفرین در نظر گرفته می‌شود. در تحقیق Esmaeili و همکاران (۲۰۱۹) مشاهده شد که با افزایش میزان لاکتوفرین در جیره میزان آهن در پلاسما افزایش و ظرفیت باند شدن آهن پلاسما کاهش یافته است. یافته‌های مربوط به تاثیر لاکتوفرین بر روی متابولیسم آهن در ماهیان ظاهرا متناقض و گاهی مخالف یکدیگر است . به عنوان مثال Welker و همکاران (۲۰۰۷) مشاهده کردند که سطح آهن سرم در ماهی تیلاپیا نیل تغذیه شده با لاکتوفرین کاهش و همچنین ظرفیت باند شدن آهن ماهیان تغذیه شده با رژیم غذایی حاوی لاکتوفرین افزایش یافته است. این تفاوت‌ها می‌تواند با مدت دوز مصرفی لاکتوفرین یا توانایی ماهی برای استفاده ازلاکتوفرین نسبت داده شود.لایزوزیم یک آنزیم پپتیدی با فعالیت‌های ضد باکتریایی بوده و به عنوان یکی از اجزای مهم سیستم ایمنی غیر اختصاصی ماهیان می باشد. این آنزیم به وسیله گلبول‌های سفید و بالاخص لوکوسیت‌ها تولید می شود و بطور مستقیم یا غیرمستقیم باکترهای گرم مثبت و منفی را تحت تاثیر قرار دهد (Saurabh and Sahoo, 2008). مکانیسم اثرات لاکتوفرین بر فعالیت لیزوزیم هنوز ناشناخته است. با این

حال، گیرنده‌های لاکتوفرین در انواع مختلفی از سلول‌های ایمنی در حیوانات مختلف کشف شده است؛ به طوری که انتظار می‌رود که لاکتوفرین بتواند واکنش‌های سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی را تحت تاثیر قرار دهد (Hwang and Kruzel, 2009). در تحقیق Ren و همکاران (۲۰۰۷) اثرات جداگانه ویتامین ث (AMP-Na/Ca) و ترکیب با لاکتوفرین گاوی (جیره حاوی ۳۲ و ۷۶۲ میلی‌گرم ویتامین ث در کیلوگرم جیره و ۵۰۰ میلی‌گرم لاکتوفرین در کیلوگرم در جیره) بر پارامترهای بیوشیمیایی خون و پاسخ ایمنی غیراختصاصی مارماهی ژاپنی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در تیمارهای حاوی لاکتوفرین بیشترین فعالیت لیزوزیم سرم و فعالیت ضدباکتریایی موکوس مشاهده گردید. این محققین بیان کردند که لاکتوفرین یک عامل مهم در افزایش فعالیت لیزوزیم سرم بود و تعامل مثبت و مکمل بین ویتامین ث و لاکتوفرین بر روی فعالیت ضدباکتری سرم وجود داشت.

فعالیت ضد باکتریایی لاکتوفرین بر علیه طیف وسیعی از باکتری‌ها شامل گرم منفی یا مثبت به اثبات رسیده است (Jenssen and Hancock, 2009). Walker و همکاران (۲۰۰۷) دریافتند اضافه کردن لاکتوفرین به جیره تیلاپیای نیل میزان بقا آنها را در مواجه با باکتری *Streptococcus iniae* افزایش می‌دهد. استفاده از لاکتوفرین در جیره ماهی شانک زرد باله مقاومت آن را در برابر عفونت‌های باکتریایی *Vibrio harveyi* افزایش داد (Esmaeili et al., 2019). لاکتوفرین با اثرات متقابلی که با لیپوپلی ساکارید (LSP) ایجاد می کند می تواند به پوسته خارجی باکتری‌های گرم منفی خسارت وارد کند که این عملکرد لاکتوفرین باعث قوی تر شدن اثر سایر مواد ضد میکروبی طبیعی موجود در بدن می شود (González-Chávez et al., 2009). علاوه بر این لاکتوفرین دارای یک اثر مکمل با آنزیم لایزوزیم است به گونه ای که لاکتوفرین بار منفی را بر پوسته باکتری کاهش می‌دهد که باعث می‌شود دسترسی لایزوزیم به درون باکتری و لایه پپتیدوگلیکان با سهولت بیشتری انجام گیرد (Jenssen and Hancock, 2009). دلیل افزایش میزان فعالیت ضد باکتریایی در سرم ماهیانی که از لاکتوفرین تغذیه کرده بودند، می تواند بدلیل انتقال لاکتوفرین به درون خون یا اثر بخشی لاکتوفرین بر پارامترهای ایمنی غیر اختصاصی باشد.

نتیجه‌گیری

از آنجایی که تغذیه نقش مهمی در رشد آبزیان دارد، استفاده از مکمل‌ها و محرک‌های غذایی مناسب در جیره غذایی می‌تواند نقش بسزایی در تامین نیازهای غذایی آبزی ایفا کند. به طور کلی لاکتوفرین گاوی پتانسیل بالای برای استفاده به عنوان محرک ایمنی در جیره غذایی آبزیان و به خصوص در جیره مولدین و سایر حیوانات دارند. با این حال نتایج تحقیقات نشان داده است که حوزه تاثیر استفاده از لاکتوفرین در جیره غذایی آبزیان به گونه ماهی مورد مطالعه و هم‌چنین سطح افزودنی، درجه خلوص و غیرع بستگی دارد و باید برای هر کدام از گونه‌های ماهیان پرورشی نوع (به صورت اسپری یا مخلوط با جیره) و میزان استفاده از آن مورد مطالعه قرار گیرد.

منابع :

مرشدی، و.، آق، ن.، غفله مرمضی، ج.، نوری، ف.، محمدیان، ت. ۱۳۹۵. اثرات لاکتوفرین جیره بر روی رشد، تغذیه، فاکتورهای خونی و پاسخ ایمنی غیراختصاصی بچه ماهی صبیتی (*Sparidentex hasta*). فصلنامه علمی پژوهشی محیط زیست جانوری، ۸(۲)، ۱۸۹-۱۹۸.

BADAWY, T. E. & AL-KENAWY, D. 2013. Assessment of Immune Response Supplemental Immunoton and Bovine Lactoferrin as Alternatives to Antibiotics in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of the Arabian Aquaculture Society. 8(2), 341–356.

COUGHLIN, R. T., TONSAGER, S. & McGROATY, E. J. 1983. Quantitation of metal cations bound to membranes and extracted lipopolysaccharide of Escherichia coli. Biochemistry, 22, 2002-2007.

CHAND, R. K., SAHOO, P. K., KUMARI, J., PILLAI, B. R. & MISHRA, B. K. 2006. Dietary administration of bovine lactoferrin influences the immune ability of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) and its resistance against *Aeromonas hydrophila* infection and nitrite stress. Fish and Shellfish Immunology, 21, 119-129.

DAVIDSON, L. A. & LONNERDAL, B. 1989. Fe-saturation and proteolysis of human lactoferrin: effect on brush-border receptor-mediated uptake of Fe and Mn. American Journal of Physiology, 257, 930-934.

ELLISON, R. T., GIEHL, T. J. & LAFORCE, F. M. 1988. Damage of the membrane of enteric Gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. Infection and Immunity, 56, 2774–2781.

ESTEBAN, M. A., RODRIGUEZ, A., CUESTA, A. & MESEGUER, J. 2005. Effects of lactoferrin on non-specific immune responses of gilthead seabream (*Sparus auratus*). Fish and Shellfish Immunology, 18, 109-124.

ESLAMLOO, K., FALAHATKAR, B. & YOKOYAMA, S. 2012. Effects of dietary bovine lactoferrin on growth, physiological performance, iron metabolism and non-specific immune responses of Siberian sturgeon *Acipenser baeri*. Fish and shellfish immunology, 32(6), 976-985.

ESMAEILI, A., SOTOUDEH, E., MORSHEDI, V., BAGHERI, D.& DORAFSHAN, S. 2019 Effects of dietary supplementation of bovine lactoferrin on antioxidant status, immune response and disease resistance of yellowfin sea bream (*Acanthopagrus latus*) against *Vibrio harveyi*. Fish and Shellfish Immunology, 93, 917-923.

GAMNAM, A. L., SEHRCK, R. M. 1999. Immunostimulants in fish diets. Journal of Applied Aquaculture, 9, 68–79.

GONZÁLEZ-CHÁVEZ, S. A. S., AREVALO-GALLEGOS, S. & RASCON-CRUZ, Q. 2009. Lactoferrin: structure, function and applications. International Journal of Antimicrobial Agents, 33, 3011-3018.

HWANG, S.A., Kruzel, M. & AKTOR, J. K. 2009. Influence of bovine lactoferrin on expression of presentation molecules on BCG-infected bone marrow derived macrophages. Biochimie, 91, 76–85.

JENSSEN, H. & HANCOCK, B. R. 2009. Antimicrobial properties of lactoferrin. Biochimie, 91, 19–29.

KUMARI, J., SWAIN, T. & SAHOO, P. 2003. Dietary bovine lactoferrin induces changes in immunity level and disease resistance in Asian catfish (*Clarias batrachus*). Veterinary Immunology and Immunopathology, 94, 1-9.

KUMA, S.; SAHU, N. P.; PAL, A. K.; CHOUDHURY, D.; YENGKOKPAM, S. & MUKHERJEE, S. C. 2005. Effect of dietary carbohydrate on hematology, respiratory burst activity and histological changes in *L. rohita* juveniles. Fish and Shellfish Immunology, 19, 331-334.

KAMILYA, D., GHOSH, D., BANDYOPADHAY, S., MAL, B. & MAITI, T. 2006. In vitro effects of bovine lactoferrin, mushroom glucan and Abrus agglutinin on Indian major carp, catla (*Catla catla*) head kidney leukocytes. Aquaculture, 253, 130-139.

LEGRAND, D. ELASS, E., CARPENTIER, M. & MAZURIER, J. 2006. Interactions of lactoferrin with cells involved in immune function. Biochemistry and Cell Biology, 84, 282–290.

LONNERDAL, B. & IYER, S. 1995. Lactoferrin: molecular structure and biological function. Annual Review of Nutrition, 15, 93–110.

LEITCH, E. C. & WILLCOX, M. D. 1999. Elucidation of the antistaphylococcal action of lactoferrin and lysozyme. Journal of Medical Microbiology, 48, 867–871.

LYGREN, B., SVEIER, H., HJELTNES, B. & WAAGBO, R. 1999. Examination of the immunomodulatory properties and the effect on disease resistance of dietary bovine lactoferrin and vitamin C fed to Atlantic salmon (*Salmo salar*) for a short-term period. Fish and shellfish immunology, 9, 95-107.

LONNERDAL, B. 2009. Nutritional roles of lactoferrin. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care, 12, 293–297.

McCARTHY, D. H., STEVENSOM, J. P. & ROBERTS, M. S. 1973. Some blood parameters of the rainbow trout (Salmo gairdneri Richardson). Journal of Fish Biology, 5, 1–8.

PAGHEH, E., MARAMMAZI, J. G., AGH, N., NOURI, F., SEPAHDARI, A., GISBERT, E. & TORFI MOZANZADEH, M. 2018. Growth performance, hemato-immunological responses, and digestive enzyme activities in silvery-black porgy (*Sparidentex hasta*) fed dietary bovine lactoferrin. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 10(3), 399-407.

REN, T., KOSHIO, Sh., ISHIKAWA, M., YOKOYAMA, S., MICHEAL, F. R., UYAN, O. & TUNG, Th. H. 2007. Influence of dietary vitamin C & bovine lactoferrin on blood chemistry and non-specific immune responses of Japanese eel, (*Anguilla japonica*). Aquaculture, 267, 31–37.

SAINT-JEAN, S.R., PRIETO, S.I.P., LOPEZ-EXPOSITO, I., RAMOS, M., ANA, I. & RECIO, I., 2012. Antiviral activity of dairy proteins and hydrolysates on salmonid fish viruses. International Dairy Journal, 23(1), 24-29.

SAKAI, M.; OTUBO, T.; ATSUTA, S. & KOBAYASHI, M., 1993. Enhancement of resistance to bacterial infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), by oral administration of bovine lactoferrin. Journal of Fish Diseases, 16, 239-247.

SAKAI, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. Aquaculture, 172, 63-92.

STEIJNS, J. M. 2004. IFT Annual Meeting, July 12-16 - Las Vegas, NV.

SAURABH, S. & SAHOO, P. K. 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. Aquaculture Research, 39, 223-239.

TOMITA, M. WAKABAYASHI, H., SHIN, K., YAMAUCHI, K., YAESHIMA, T. & IWATSUKI, K. 2009. Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications. Biochimie, 91, 52–57.

VAN DER STRATE, B., BELIJAARS, L., MOLEMA, G., HARSEN, M. C. & MEIJER, D. K. 2001. Antiviral activities of lactoferrin. Antiviral Research, 52, 225–239.

WAKABAYASHI, H., YAMAUCHI, K. & TAKASE, M. 2006. Lactoferrin research, technology and applications. International Dairy Journal, 16, 1241–1251.

WELKER, T. L., LIM, C., YILDIRIM-AKSOY, M. & KLESIUS, P. H. 2007. Growth, immune function, and disease and stress resistance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed graded levels of bovine lactoferrin. Aquaculture, 262, 156-162.

YOKOYAMA, S.; KOSHIO, S.; TAKAKURA, N.; OSHIDA, K.; ISHIKAWA, M.; GALLARDO-CIGARRO, F. J.; CATACUTAN, M. R. & TESHIMA, S. 2006. Effect of dietary bovine lactoferrin on growth response, tolerance to air exposure and low salinity stress conditions in orange spotted grouper *Epinephelus coioides*. Aquaculture, 255, 507-513.

The use of lactoferrin in marine fish diet

Vahid Morshadi[1]*, Fatemeh Pourjam[1]

1. Persian Gulf Institute, Persian Gulf University, Bushehr, Iran

*Corresponding author: vahid_morshedi@yahoo.com

Abstract

Lactoferrin is an iron ion-binding glycoprotein belonging to the transferrin family, which is present in varying amounts in the milk of mammals, including cows. This glycoprotein was first isolated from cow's milk and was identified as milk red protein due to its iron content. Lactoferrin is considered an important host defense molecule and has a wide range of biological functions including a role in iron metabolism, cell proliferation and differentiation, and antibacterial, antiviral, and antiparasitic activity. One of the most important properties of lactoferrin is the iron absorption and transport. By absorbing free iron, lactoferrin deprives the environment of this element and thus deprives it of the pathogens that it needs to survive, thereby indirectly inhibiting the spread of infection by inhibiting the growth of harmful bacteria. The results show that although the use of lactoferrin in the culture of some species such as yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*) and Japonica eel (Anguilla japonica) has increased the growth and immune performance but use in the diet of some species such as sobaity fish (*Sparidentex hasta*) had different results (positive effect and no effect). Therefore, it seems that results will be varied for every species and different experimental conditions and more research is needed in this field.

Key words: Immune stimulants, lactoferrin, diet, marine fish, Persian Gulf.