مقاله پژوهشی، صفحات۲۹۴-۳۱۰ DOI: 10.22034/JAR.2023.2344

اثر سطوح مختلف سرکه سیب موجود در جیره غذایی، بر عملکرد رشد و بیان برخی ژن‌های آنتی‌اکسیدانی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مبتلا به کبد چرب غیرالکلی

سلیمه اسدی[۱]، حمیدرضا احمدنیای مطلق[۲*]، امید صفری[۲]، حامد وردست زاده[۲]، یاسمن زراعت پیشه[۱]و علی جوادمنش[۱]

[۱] **ایران، مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه علوم دامی.**

[۲] **ایران، مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، گروه شیلات.**

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۲۱

چکیده

این مطالعه برای نخستین بار باهدف مقایسه اثرات سطوح مختلف سرکه سیب بر عملکرد رشد و بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز) در کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) طراحی شد. برای این منظور یک گله ۳۰۰ قطعه‌ای (۱۴/۲۴±۷۳/۳۵ گرم) با جیره مخصوص القاکننده کبد چرب که برای اولین بار تنظیم‌شده بود به مدت یک ماه تغذیه شدند؛ سپس از گله موردنظر، تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی (۵/۴۰ ± ۷۴/۲۰) مبتلا شده انتخاب و به قفس‌های مربوطه منتقل شدند. این آزمایش به صورت طرح کاملا تصادفی با شش تیمار و سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل: تیمار ۱: ماهیان سالم بدون سرکه سیب، تیمار ۲: ماهیان سالم با چهار درصد سرکه سیب، تیمار ۳: ماهیان مبتلا شده بدون سرکه سیب، تیمار ۴: ماهیان مبتلا شده با یک درصد سرکه سیب، تیمار ۵: ماهیان مبتلا شده با دو درصد سرکه سیب و تیمار ۶: ماهیان مبتلا شده با چهار درصد سرکه سیب. غذادهی به صورت روزانه به میزان دو درصد وزن بدن به مدت ۶۰ روز صورت پذیرفت. سرکه سیب مورد استفاده حاوی ۵ درصد اسیداستیک بود. بر اساس نتایج، ازنظر وزن نهایی و شاخص وزن کبدی تفاوتی بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد ($P>0.05$). همچنین نتایج حاصل از بیان ژن نشان داد که سرکه سیب تأثیر معنی‌داری بر بیان ژن‌های گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز ندارد ($P>0.05$). به‌طورکلی افزودن سرکه سیب تأثیری بر روند فعالیت آنتی‌اکسیدانی کبد در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مبتلا شده به بیماری کبد چرب نداشت اما سبب بهبود عملکرد رشد شد.

واژه های کلیدی: اسید استیک، کبد چرب، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: Ahmadnia@um.ac.ir

مقدمه

کبد چرب غیرالکلی به‌عنوان یک اختلال متابولیکی در نظر گرفته می‌شود که از تعامل پیچیده بین عوامل ژنتیکی، هورمونی و تغذیه‌ای ناشی می‌شود (۱۲). این بیماری یکی از رایج‌ترین انواع بیماری‌های کبدی در جهان است و شامل طیف وسیعی از آسیب‌های کبدی است و در صورت عدم توجه می‌تواند منجر به استئاتوهپایت غیرالکلی، فیبروز و سیروز کبدی شود (۵و۶).

سلول‌های بدن به‌طور طبیعی دارای یک مکانیسم دفاعی آنتی‌اکسیدانی هستند و در شرایطی که تعادل بین ترکیبات اکسیدکننده و آنتی‌اکسیدان‌ها از بین رود دچار استرس اکسیداتیو می‌شود (۲۶). در چنین شرایطی بدن با استفاده از آنزیم‌هایی مانند کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز مبارزه می‌کند. کاتالاز آنزیمی متعلق به کلاس اکسیدوردوکتازها است که تجزیه پراکسید هیدروژن به اکسیژن توسط آب را

مقاله پژوهشی، صفحات۲۹۴-۳۱۰ DOI: 10.22034/JAR.2023.2344

کاتالیز می‌کند. کاتالاز در تمام بافت های حیوانی و گیاهی و همچنین در میکروارگانیسم‌های هوازی وجود دارد. زمانی که اسیدهای چرب آزاد در کبد افزایش می‌یابند، منجر به اکسیداسیون ناقص در میتوکندری‌ها، پراکسی زوم‌ها و میکروزوم‌ها می‌شودو گونه‌های اکسیژن فعال تولید می‌شوند. در میان گونه‌های اکسیژن فعال تولیدشده، آب اکسیژنه عمدتاً در پراکسی زوم ها تولید می‌شود و توسط کاتالاز تجزیه می‌شود. با این حال، هنگامی‌که غلظت آب اکسیژنه به دلیل کاهش بیان یا فعالیت کاتالاز افزایش می‌یابد، به سیتوزول و سایر اندامک‌ها مهاجرت می‌کند و باعث آسیب سلولی و استرس اکسیداتیو می‌شود (۱۹). گلوتاتیون پراکسیداز نیز یکی از کلیدی‌ترین آنزیم‌های کبدی در شرایط استرس اکسیداتیو و ایجاد آسیب‌های کبدی است (۹). گلوتاتیون پراکسیداز، تجزیه هیدروپراکسید را به شکل پایدار هیدروکسیدها کاتالیز می‌کند.در این زمینه، گلوتاتیون در انواع فرآیندهای متابولیکی، انتقال و سم زدایی شرکت می‌کند که از آسیب رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کند (۱۳).

سرکه سیب، یک محصول کاملاً طبیعی است که از تخمیر سیب به دست می‌آید. این ماده غذایی حاوی فلانوییدها، پلی فنولیک، اسیدهای آلی دیگر، ویتامین‌ها و عناصر معدنی هست که این مواد عملکرد دارویی مانند فعالیت آنتی‌اکسیدانی، کاهش فشارخون و کاهش میزان کلسترول، بدون اثرات جانبی دارند (۴). معمولاً اسیدهای آلی به‌عنوان تقویت‌کننده‌های ایمنی و آنتی‌اکسیدان‌های بالقوه در تغذیه طیور و دام‌های پرورشی در نظر گرفته می‌شوند (۳ و ۲۴).

در مطالعات مختلفی سرکه سیب سبب تنظیم فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شده و آسیب‌های سلولی ناشی از استرس اکسیداتیو را کاهش داده است. گزارش شده است که اسیداستیک به‌عنوان یکی از اجزای اصلی سرکه سیب که در مطالعات آبزی‌پروری و حیوانات مزرعه‌ای به‌طور گسترده استفاده می‌گردد، دارای قدرت آنتی‌اکسیدانی بالایی است، از طرفی بررسی‌ها نشان داده است که افزایش تجمع چربی در هپاتوسیت‌های کبدی باعث افزایش آسیب‌پذیری این بافت نسبت به ترکیبات اکسیداتیو شده و این تنش‌های اکسیداتیو در پیشرفت آسیب‌های کبدی تأثیرگذار می‌باشد (۸). افزودن سطوح صفر، ۱/۵، ۳ و ۴/۵ درصد سرکه سیب در جیره غذایی گوره خر ماهی (*Danio rerio*) نشان داد که سطح ۴/۵ درصد سرکه سیب بهبود فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی و عملکرد رشد می‌شود (۱). در تغذیه میگو نیز استفاده از سرکه سیب سبب بهبود رشد و بیان ژن‌های مرتبط با سیستم ایمنی شد (۲۲). در مطالعه دیگری نیز استفاده از سطوح صفر، ۱، ۲ و ۴ درصد سرکه سیب در جیره غذایی ترور سبز (*Andinoacara rivulatus*) سبب افزایش فعالیت آنزیم گوارشی، عملکرد رشد، پاسخ‌های ایمنی و خواص ایمنی مخاط پوست این ماهی شد (۲). به همین جهت این مطالعه برای نخستین بار باهدف مقایسه اثرات استفاده از سطوح مختلف سرکه سیب در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بر رشد و بیان دو ژن آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در ماهیان سالم و مبتلا شده به کبد چرب غیرالکلی طراحی شد.

مواد و روشها

جیره‌های آزمایشی، طراحی آزمایش و پرورش ماهیان: جهت ابتلای ماهیان به بیماری کبد چرب، یک گله ۳۰۰ قطعه‌ای (۱۴/۲۴±۷۳/۳۵ گرم) با جیره مخصوص القاکننده کبد چرب که برای اولین بار تنظیم‌شده بود به مدت یک ماه تغذیه شدند؛ سپس از گله موردنظر، تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی (۵/۴۰ ± ۷۴/۲۰) مبتلا شده انتخاب و به قفس‌های مربوطه (با ابعاد ۱×۱، در کانال آبراهه) منتقل شدند. جهت مقایسه تأثیر سرکه سیب در ماهیان سالم و مبتلا شده، تعداد ۶۰ قطعه ماهی سالم نیز به تیمارها اضافه شدند درنتیجه این آزمایش با شش تیمار (هرکدام در سه تکرار) طراحی گردید. تیمارهای آزمایشی شامل: تیمار ۱: ماهیان

مقاله پژوهشی، صفحات۲۹۴-۳۱۰ DOI: 10.22034/JAR.2023.2344

سالم بدون سرکه سیب، تیمار ۲: ماهیان سالم با ۴ درصد سرکه سیب، تیمار ۳: ماهیان مبتلا شده بدون سرکه سیب، تیمار ۴: ماهیان مبتلا شده با ۱ درصد سرکه سیب، تیمار ۵: ماهیان مبتلا شده با ۲ درصد سرکه سیب و تیمار ۶: ماهیان مبتلا شده با ۴ درصد سرکه سیب. به ازای هر تیمار ۳ قفس تعبیه شد که در هر قفس ۱۰ ماهی قرار داده شد. پیش از شروع تیمار با سرکه سیب به‌منظور حصول اطمینان از القای بیماری، از ماهیان مبتلا شده نمونه‌برداری شد و با توجه به شواهد بالینی مانند رنگ و اندازه کبد، تجمع چربی در بافت کبد مورد تائید قرار گرفت.

سرکه سیب (۵ درصد اسیداستیک) در مقادیر معین به جیره‌های آزمایشی اضافه و کاملاً مخلوط گردید. جهت جلوگیری از آبشویی سرکه سیب، محلول ژلاتین هشت درصد نیز به‌صورت مساوی روی سطح غذا اسپری شد. جیره‌های آماده شده به مدت ۳ ساعت در معرض جریان هوا قرارگرفته و خشک شدند (۲ و ۳). غذادهی به میزان دو درصد وزن بدن و سه بار در روز صورت گرفت. مواد تشکیل دهنده و آنالیز اجزای رژیم غذایی به ترتیب در جدول های ۱ و ۲ گزارش شده است.

جدول ۱- اجزاء تشکیل دهنده جیره غذایی معمول و پرچرب ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

جیره نرمال مزرعه (درصد)	جیره پرچرب (درصد)	اجزاء تشکیل دهنده
۳۰	۳۰	پودر ماهی
۱۳	۱۳	پودر گوشت
۶	۶	گلوتن گندم
۱۴	۱۰/۵	آرد گندم
۱۴	۱۰/۵	آرد ذرت
۱۵	۱۵	کنجاله سویا
۲	۵/۵	روغن ماهی
۲	۵/۵	روغن سویا
۰/۵	۰/۵	ویتامین C
۱/۵	۱/۵	پرمیکس ویتامینه
۱/۵	۱/۵	پرمیکس معدنی
۰/۵	۰/۵	نمک

پرمیکس معدنی حاوی (میلی‌گرم بر کیلوگرم) منیزیوم، ۱۰۰; روی، ۶۰; آهن، ۴۰; مس، ۵; کبالت، ۰/۱; ید، ۰/۱; آنتی‌اکسیدان، ۱۰۰/۲. پرمیکس ویتامینه حاوی (میلی‌گرم بر کیلوگرم) ویتامین E، ۳۰; پتاسیم، ۳؛ ریبوفلاوین، ۷; پیریدوکسین، ۳; اسید پانتوتنیک، ۱۸; نیاسین، ۴۰; فولاسین، ۱/۵; کولین، ۶۰۰; بیوتین، ۰/۷ و سیانوکوبالامین، ۲/۰۲.

جدول ۲- آنالیز اجزای جیره معمولی و القاکننده کبد چرب غیرالکلی

جیره نرمال مزرعه (درصد)	جیره پرچرب (درصد)	ترکیبات
۴۲/۹	۴۲/۹	پروتئین خام
۱۲/۳۸	۲۰/۸	چربی خام
۱	۰/۹۸	فیبر خام
۳۷/۶	۲۹/۴۱	عصاره عاری از ازت
۵/۹۱	۵/۹۱	خاکستر
۹۴/۰۹	۹۴/۰۹	مواد آلی

مقاله پژوهشی، صفحات۲۹۴-۳۱۰ DOI: 10.22034/JAR.2023.2344

شاخص‌های رشد: جهت پایش اثر سرکه سیب بر رشد بچه ماهیان سالم و مبتلا شده، زیست‌سنجی در سه مرحله (اول، وسط و آخر دوره) با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ گرم و خط کش با دقت ۰/۱ سانتی‌متر انجام شد. شاخص‌های رشد شامل وزن ابتدایی و نهایی، میزان افزایش وزن روزانه و شاخص وزن کبدی در طول دوره آزمایش و با استفاده از فرمول‌های زیر به دست آمد.

وزن اولیه (گرم) – وزن نهایی (گرم) = افزایش وزن بدن (گرم)

نمونه‌برداری: ماهیان ۲۴ ساعت قبل از نمونه‌برداری غذادهی نشدند. از هر تکرار شش قطعه ماهی به‌صورت تصادفی انتخاب و با استفاده از پودر گل میخک (نیم گرم در لیتر) بی‌هوش شده و وزن گیری صورت پذیرفت. بعد از وزن گیری جهت استخراج RNA از بافت کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، قسمتی از بافت کبد برش داده شد و در میکروتیوب حاوی محلول تثبیت‌کننده RNA (RNA Shield)(دنا زیست آسیا، ایران) منتقل‌شده و تا زمان استخراج در فریزر ۸۰- نگه‌داری شد.

استخراج RNA و بیان ژن: طبق دستورالعمل‌های سازنده، از کیت استخراج RNA (Total RNA Extraction Kit، پارس توس، ایران) برای استخراج RNA کامل از پنجاه میلی گرم از بافت کبد قزل‌آلای رنگین‌کمان استفاده شد. برای تعیین خلوص و کیفیت RNA استخراج شده از دستگاه اسپکتروفتومتر مایکروپلیت ریدر (Biotec-Epoch, USA) استفاده شد. DNA ژنومی با استفاده از کیت ترموفیشتر ساخت آمریکا (DNase I Thermo Fisher Scientific، USA) حذف شد. به‌منظور سنتز cDNA به میزان دو میکرولیتر RNA (معادل یک میکروگرم) استفاده شد و طبق دستور کیت ساخت cDNA (Easy cDNA Synthesis Kit، پارس توس، ایران) صورت گرفت.

بیان سه ژن مرجع GAPDH,EF1α و بتااکتین (B-Actin) و دو ژن هدف کاتالاز (CAT) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) با استفاده از ریل تایم پی‌سی‌آر quantitative real-time PCR) انجام شد. راندمان بیان ژن توسط منحنی استاندارد محاسبه شد و بیان ژنهای هدف توسط میانگین هندسی بیان ژن های مرجع نرمال سازی شد (۲۳ و ۲۵). میزان حجم واکنش ۲۰ مایکرولیتر بود و به ازای هر نمونه دو تکرار در نظر گرفته شد. برای این منظور از مستر میکس ریل تایم پی سی آر شرکت یکتا تجهیز آزما (ایران) استفاده شد. لیست آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۳ و برنامه حرارتی جهت تکثیر قطعات موردنظر در جدول ۴ آورده شده است. در این مطالعه به علت وجود دو جایگاه برای ژن کاتالاز در سایت داده NCBI در مجموعه ژنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، دو سری پرایمر طراحی شد با عنوان کاتالاز و کاتالاز N که با توجه به نتایج حاصل از آزمایش PCR، پرایمر کاتالاز به‌عنوان پرایمر مورد استفاده در qPCR مورد استفاده قرار گرفت.

آنالیز استیک اسید موجود در سرکه سیب: به‌منظور اندازه‌گیری غلظت استیک اسید در سرکه سیب، چهار میلی‌لیتر سرکه سیب به همراه یک میلی‌لیتر اسید متافسفریک (۲۵ درصد) مخلوط شد و با دور g۲۸۰۰ و مدت پنج دقیقه و دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. مایع رویی توسط GC-FID (Varian, Model CP-3800)، با استفاده از یک ستون Teknokroma TRB-FFAP با زیر مورد تحلیل قرار گرفت: 30m × 0.32mm × 0.5µm. هلیوم به‌عنوان گاز حامل مورداستفاده قرار گرفت، دمای ورودی برابر ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد بود، دمای فر از ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به ۱۶۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت پنج دقیقه سانتی‌گراد در دقیقه افزایش یافت (به مدت دو دقیقه نگه‌داشته شود) و دمای آشکارساز در ۲۵۰ درجه تنظیم شد. برای تهیه منحنی‌های کالیبراسیون از استانداردهای اسید استیک با غلظت‌های ۵۰۰۰، ۲۵۰۰، ۱۲۵۰ و ۶۲۵ میلی‌گرم در لیتراستفاده شده است (۲). درنهایت میزان اسیداستیک موجود در سرکه سیب ۵ درصد محاسبه گردید.

مقاله پژوهشی، صفحات۲۹۴-۳۱۰ DOI: 10.22034/JAR.2023.2344

جدول ۳- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در برنامه ریل تایم پی سی آر

نام ژن	توالی	طول قطعه(bp)	شماره دسترسی
CAT	AAGAGGGCAACTGGGACCTTACT TTAGGTGAGTCTGGGGGTTGC	۱۱۴	XM_021564302.2
GPX	AAGGGGCTAGTTGATTCTGGGG CGGACGGAACTTTAAGGACA	۱۰۰	NM_001124525.1
B-Actin	GATGGGCCAGAAAGACAGCTA TCGTCCCAGTTGGTGACGAT	۱۰۵	NM_001124235.1
EF1	ACCCGAGGGACCTGTG TCCTCTTGGTCGTTTCGCTG	۱۵۹	NM_001124339.1
GAPDH	TTGTAAAGCCCCTGTTCTGG GAAGCAGGTTCAGTGCAACA	۸۹	XM_021623341.2

جدول ۴- برنامه ریل تایم مورد استفاده جهت تکثیر قطعات ژن‌های موردنظر

مراحل	تکرار	زمان (ثانیه)	دما (°C)
Initial Denaturation		۳۰۰	۹۴
Denaturation		۳۰	۹۴
Annealing	۴۰	۲۰	۶۰
extention		۱۵	۷۲

آنالیز آماری

نرمال و همگن بودن واریانس به ترتیب با استفاده از آزمون‌های Shapiro-Wilk (این تست یک تست نرمال بودن است که در سال ۱۹۶۵ توسط ساموئل سانفورد شاپیرو و مارتین ویلک منتشر شد.) و Levene (در آمار، آزمون لوین یک آمار استنباطی است که برای ارزیابی برابری واریانس ها برای یک متغیر محاسبه شده برای دو یا چند گروه استفاده می شود.) مورد آزمایش قرار گرفتند (۲۳). از آزمون‌های تجزیه واریانس یک‌طرفه و توکی (Tukey) به منظور مقایسه میانگین‌ها باسطح معنی‌داری ۵٪ استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SAS نسخه 9.4 انجام شد.

نتایج

شاخص‌های رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان: نتایج حاصل از استفاده از سطوح مختلف سرکه سیب بر شاخص‌های رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مبتلا به کبد چرب در جدول ۵ آورده شده است. نتایج نشان داد که کاربرد این افزودنی غذایی تأثیری بر وزن اولیه، وزن نهایی، افزایش وزن و شاخص وزن کبدی (Interest of hepatic steatosis index) ماهیان نداشت (P>0.05).

بیان ژن‌های کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز: نتایج حاصل از تأثیر سطوح مختلف سرکه سیب بر بیان دو ژن آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در جدول ۶ گزارش شده است. با توجه به نتایج سرکه سیب دارای تأثیر معنی‌داری بر بیان ژن‌های کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز نداشته است (P>0.05).

بحث

در این مطالعه، از سرکه سیب به‌عنوان مکمل غذایی برای ارزیابی نرخ رشد بالقوه و اثرات آنتی‌اکسیدانی روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان استفاده شد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از سرکه سیب در تمامی سطوح مورد مطالعه (صفر، ۱، ۲ و ۴ درصد جیره) در جیره‌ی ماهی قزل آلای رنگین کمان، تأثیر معنی‌داری بر افزایش وزن و شاخص

مقاله پژوهشی، صفحات۲۹۴-۳۱۰ DOI: 10.22034/JAR.2023.2344

کبدی پس از ۶۰ روز نداشت؛ هرچند وزن نهایی در تیمارهای آزمایشی بیشتر از گروه شاهد بود اما این اختلاف معنی‌دار نبود.

جدول ۵- مقایسه میانگین شاخص‌های رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه‌شده با جیره‌های حاوی سرکه سیب (گرم)

تیمارها	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴	تیمار ۵	تیمار ۶
وزن اولیه	۷۷/۳±۷۱/۴۱	۷۸/۱±۳۳/۱۳	۷۵/۵±۹۶/۰۵	۷۸/۲±۱۶/۰۴	۶۷/۱±۷۷/۰۵	۶۷/۱±۵۳/۶۲
وزن نهایی	۱۰۰/۱۷±۱۶/۳۶	۱۰۵/۱۵±۷/۴	۱۰۶/۱۰±۱۹/۱۷	۱۰۵/۱۷±۹۶/۰۳۷	۱۰۴/۱۸±۲۳/۲۵	۹۶/۱۸±۰۴/۲۴
افزایش وزن	۲۲/۱۰±۴۵/۰۶	۲۷/۱۰±۳۷/۵۳	۳۰/۷±۲۴/۰۴	۲۷/۱۰±۷۳/۷۵	۳۶/۱۵±۴۸/۱۳	۲۸/۱۱±۵۱/۲۸
شاخص وزن کبدی	۱/۰±۶۵/۲۵	۱/۰±۹/۷۵	۱/۰±۵۱/۳۸	۱/۰±۶۵/۳۱	۱/۰±۱۰/۲۹	۱/۰±۴۹/۲۸

تیمار ۱: ماهیان سالم بدون سرکه سیب، تیمار ۲: ماهیان سالم با ۴ درصد سرکه سیب، تیمار ۳: ماهیان مبتلا شده بدون سرکه سیب، تیمار ۴: ماهیان مبتلا شده با ۱ درصد سرکه سیب، تیمار ۵: ماهیان مبتلا شده با ۲ درصد سرکه سیب و تیمار ۶: ماهیان مبتلا شده با ۴ درصد سرکه سیب.

جدول ۶- جدول تأثیر سطوح مختلف سرکه سیب بر بیان ژن کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در کبد ماهی قزل‌آلای رنگین کمان

تیمارها	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴	تیمار ۵	تیمار ۶
کاتالاز	۱/۱±۹۸/۰۷	۱/۰±۷۴/۴۲	۲/۲±۶۱/۶۶	۲/۰±۰۷/۸۲	۱/۰±۵۰/۸۱	۱/۰±۸۰/۳۵
گلوتاتیون پراکسیداز	۱۳/۱۱±۸۷/۱۹	۲۳/۱۷±۵۹/۲۸	۲۲/۳۱±۳۳/۰۷	۳۰۰/۲۲۸±۰۴/۳۳	۵/۸±۵۵/۵۶	۱۱/۱۰±۵۳/۷۳

از ژن‌های GAPDH,EF1α و بتااکتین به‌عنوان ژن مرجع استفاده شد.

هم‌راستا با این نتایج، محققین نشان دادند که استفاده از اسید آلی در جیره تأثیر معنی‌داری بر عملکرد رشد در ماهی سرخ دریایی (*Pagrus majo*) (۱۵)، تیلاپیای قرمز (*Coptodon zillii*) (۲۰)، قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) (۱۲)، گربه‌ماهی (*Clarias gariepinus*) (۸) ندارد. نتایج حاصل از یک پژوهش که تاثیر سطوح ۰، ۱، ۲ و ۴ درصد سرکه سیب در جیره بچه ماهیان کپور بر عملکرد رشد و پارامترهای ایمنی غیراختصاصی مخاط پوست طی یک دوره ۶۰ روزه پرداخته بود نشان داد که بین تیمارها تفاوت معنی‌داری در افزایش وزن بدن وجود نداشت (۲۱). در تضاد با نتایج مطالعه حاضر، برخی پژوهشگران گزارش کردند که استفاده از اسیدهای آلی می‌توانند سبب افزایش رشد و بهبود کارایی تغذیه در آبزیانی مانند تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) (۱۱) شوند. استفاده از سرکه سیب در جیره ماهی قرمز (*Carassius auratus*) نیز به طور معنی‌داری سبب افزایش وزن در سطح ۴ درصد نسبت به تیمار شاهد شد (۳). همچنین در بررسی دیگری افزودن ۲ درصد سرکه به جیره ماهی گرین ترور (*Andinoacara rivulatus*) به طور معنی‌دری سبب افزایش وزن نسبت به تیمار شاهد شد (۲). استفاده از چهار درصد سرکه سیب در جیره *Carassius auratus* باعث افزایش معنی‌دار در شاخص رشد شد. محققان اعلام کردند اسیدهای آلی از طریق تأثیر بر باکتری‌های روده، کاهش pH دستگاه گوارش و افزایش میزان ترشحات روده، تأثیرگذاری بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی و مورفولوژی روده، افزایش حلالیت مواد معدنی، اسیدهای آمینه برای موجودات مفید هستند. همه این نتایج از طریق افزایش رشد آشکار می‌شود (۲، ۳ و ۱۶). در مطالعه حاضر با اینکه شاهد اختلاف معنی‌داری در شاخص‌های رشد در تیمارهای مختلف نبودیم اما تیمارهای حاوی سرکه سیب نسبتاً دارای میانگین افزایش وزن بیشتری بودند. به‌طورکلی دلایل نتایج متناقض در

DOI: 10.22034/JAR.2023.2344 مقاله پژوهشی، صفحات۲۹۴-۳۱۰

مطالعات مختلف را می‌توان به متفاوت بودن روش انجام آزمایش (طول دوره‌ی آزمایش، سن حیوان و درصد استفاده از سرکه، میزان درصد اسید استیک و ترکیبات فنولیک سرکه سیب) و نوع گونه‌ی انتخابی (نژاد و جنسیت) نسبت داد.

رادیکال‌های آزاد تولیدشده در بافت ماهی توسط سیستم آنتی‌اکسیدانی دفاع آنزیمی (مانند گاوتاتیون پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز) و دفاع غیر آنزیمی (مانند ویتامین E، ویتامین C و کاروتنوئیدها) از بین می‌روند (۱۴). هنگامی‌که فعالیت آنتی‌اکسیدانی سیستم دفاعی کاهش می‌یابد، تولید ROS افزایش می‌یابد و باعث استرس اکسیداتیو می‌شود (۱۷)؛ بنابراین، سلامت ماهی با تولید ROS و مکانیسم‌های دفاعی سیستم آنتی‌اکسیدانی که مسئول حذف و محافظت از غشای سلولی در برابر این گونه‌های فعال است، مرتبط است (۱۰). در مطالعه‌ی حاضر مشخص شد، هیچ‌کدام از سطوح مصرفی سرکه سیب بر بیان ژن‌های گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز تأثیر نداشتند. در تضاد با نتایج مطالعه‌ی حاضر، نشان داده شد که استفاده از اسیدهای آلی در آب آشامیدنی خوک‌های از شیر گرفته شده منجر به بهبود فعالیت کاتالاز و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل شد (۲۷). همچنین مشخص شد استفاده از سطوح ۳ و ۴/۵ درصد سرکه سیب در جیره گوره خر ماهی به طور معنی‌داری سبب افزایش بیان ژن کاتالاز نسبت به تیمار شاهد شد اما تاثیر معنی‌داری بر بیان ژن گلوتاتیون پراکسیداز نداشت (۱). در یک پژوهش به منظور افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش محتوای MDA در روده *Scophthalmus maximus* افزودن سرکه سیب در جیره با ۱۵ و ۳۰ گرم در کیلوگرم اسید سیتریک حاوی پروتئین سویا پیشنهاد شده است (۷). در یک پژوهش کاهش سطح ROS را در *Pelteobagrus fulvidraco* هنگام تغذیه با رژیم‌های غذایی حاوی اسیدهای آلی مشاهده کردند (۱۸). مشخص شده است که ترکیبات فنلی موجود در سرکه سیب در بهبود سیستم آنتی‌اکسیدانی تاثیر مثبت دارد (۱).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج، در این مطالعه افزودن سطوح مختلف سرکه سیب به جیره ماهی قزل‌آلای رنگین کمان مبتلا شده به کبد چرب، تأثیر معنی‌داری بر شاخص‌های رشد و بیان ژن گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز در کبد نداشت. به طور کلی استفاده از سرکه سیب در جیره ماهی قزل‌آلای رنگین کمان مبتلا شده به کبد چرب غیر الکلی می‌تواند سبب بهبود عملکرد رشد شد اما فعالیت آنتی‌اکسیدانی ارتقا نیافت.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت دانشگاه فردوسی مشهد، گرنت شماره ۳/۴۹۳۲۸ انجام شد. از همه کسانی که ما را در انجام این پژوهش یاری نمودند به ویژه آقای منصوریان، کمال تشکر را داریم.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می کنند که هیچ تعارض منافعی وجود ندارد.

منابع

1. Ahmadifar, E., Dawood, M. A., Moghadam, M. S., Sheikhzadeh, N., Hoseinifar, S. H., & Musthafa, M. S. (2019). Modulation of immune parameters and antioxidant defense in zebrafish (*Danio rerio*) using dietary apple cider vinegar. *Aquaculture*, *513*, 734412.

2. Ahmadniaye Motlagh. H., Sarkheil. M. Safari. O., Paolucci. M., 2020. Supplementation of dietary apple cider vinegar as an organic acidifier on the growth performance, digestive enzymes and mucosal immunity of green terror (*Andinoacara rivulatus*). *Aquaculture Research*. 51(1): 197-205.

مقاله پژوهشی، صفحات۲۹۴-۳۱۰ DOI: 10.22034/JAR.2023.2344

3. Ahmadniaye Motlagh. H., Javadmanesh. A. Safari. O., 2020. Improvement of non-specific immunity, growth, and activity of digestive enzymes in *Carassius auratus* as a result of apple cider vinegar administration to diet. *Fish physiology and biochemistry*.46 (4):1387-1395.
4. Asadi. S., Ahmadniaye Motlagh. H., Safari. O., Javadmanesh. A., 2020. Effect of apple cider vinegar on growth performance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) suffering from non-alcoholic fatty liver disease. In: *The 7th Iranian National Fisheries Conference*. Khoramabad. 30 October. Iran.106-113. (In Farsi)
5. Barbuio. R., Milanski. M., Bertolo. M. B., Saad. M. J., Velloso L. A., 2007. Infliximab reverses steatosis and improves insulin signal transduction in liver of rats fed a high-fat diet. *J Endocrinol*. 194:539-50.
6. Chan, D., Li. A., Chu. W., Chan. M., Wong. E., Liu. E. Fok. T., 2004. Hepatic steatosis in obese Chinese children. *International journal of obesity*. 28(10): 1257-1263.
7. Chen. Z., Zhao. S., Liu. Y., Yang. P. Ai. Q., Zhang. W., Mai. K., 2018. Dietary citric acid supplementation alleviates soybean meal-induced intestinal oxidative damage and micro-ecological imbalance in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Aquaculture Research*. 49(12):3804-3816.
8. Day CP. From fat to inflammation. *Gastroenterology*, 2006; 130(1):207-10.
9. Deneke. S. M., Fanburg. B. L., 1989. Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol*. 257:L163-L173.
10. Dong. G. F.,Yang. Y. O., Song. X. M., Yu. L., Zhao. T. T., Huang. G. L., Zhang. J. L., 2013. Comparative effects of dietary supplementation with maggot meal and soybean meal in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) and darkbarbel fish (*Pelteobagrus vachelli*): growth performance and antioxidant responses. *Aquaculture Nutrition*, 19(4): 543-554.
11. Elala. N. M. A., Ragaa. N. M., 2015. Eubiotic effect of a dietary acidifier (potassium diformate) on the health status of cultured *Oreochromis niloticus*. *Journal of Advanced Research*. 6(4): 621-629.
12. Gao. Y., Storebakken. T., Shearer. K. D., 2011. In-based diets for rainbow trout with a mixture of sodium formate and butyrate. *Aquaculture*. 240-233.
13. Hassan. L., 2005.Time course of antioxidant enzyme activities in liver transplant recipients." *Transplantation proceedings*. Vol. 37. 9.
14. Hong. Y., Jiang. W., Kuang. S., Hu. K., Tang. L., Liu. Y. Feng. L., 2015. Growth, digestive and absorptive capacity and antioxidant status in intestine and hepatopancreas of sub-adult grass carp *Ctenopharyngodon idella* fed graded levels of dietary threonine. *Journal of Animal Science and Biotechnology*.6:1. 1-11.
15. Hossain. M. A., Pandey. A., Satoh. S., 2007. Effects of organic acids on growth and phosphorus utilization in red sea bream *Pagrus major*. *Fisheries science*. 73:6. 1309-1317.
16. Li. X., Q. Cui., W. O.,. Leng, X. J., 2017. Citric acid substituted the inclusion of inorganic phosphorus in diet of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Research*, 48(3): 1089-1098.
17. Martínez-Álvarez. R., M. Morales. A. E., Sanz, A., 2005. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology and fisheries*, 15(1):75-88.
18. Mdegela. R., Myburgh. J., Correia. D., Braathen, M., Ejobi, F., Botha, C. Skaare, J. U., 2006. Evaluation of the gill filament-based EROD assay in African sharptooth fish (*Clarias gariepinus*) as a monitoring tool for waterborne PAH-type contaminants. *Ecotoxicology*, 15(1): 51-59.
19. Mirhamidova. P., Karimbayeva. M., Toychiyeva. D., 2021. Determination of activity of catalaza enzyme during the growth period of grain and legal plants. *Norwegian Journal of Development of the International Science*. 69(1):13-15.
20. Ng. W. K., Koh. C. B., Sudesh. K., Siti-Zahrah. A., 2009. Red hybrid tilapia, *Oreochromis* sp. and subsequent survival during a challenge test with *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture Research*, 40(13): 1490-1500.
21. Nekoubin. H., Hajimoradloo. A., Hoseinifar. S. H., 2020. Effects of apple cider vinegar on growth performance and non-specific immune parameters of skin mucus in common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings. *International Journal of Aquatic Biology*, 8(5). 311-316.
22. Pourmozaffar, S., Hajimoradloo, A., Paknejad, H., & Rameshi, H. (2019). Effect of dietary supplementation with apple cider vinegar and propionic acid on hemolymph chemistry, intestinal microbiota and histological structure of hepatopancreas in white shrimp, *Litopenaeus*

مقاله پژوهشی، صفحات۲۹۴-۳۱۰ DOI: 10.22034/JAR.2023.2344

vannamei. *Fish & shellfish immunology*, 86, 900-905.

23. Riasi, M., Mozaffari Jovin, S., Javadmanesh, A., 2022. Effect of Intramuscular and Intraperitoneal Injections of conjugated MSTN-siRNA-cholesterol on Inhibition of Myostatin Gene expression. *Journal of Cell and Molecular Research*: 14(1): 20-27.
24. Safari. R., Hoseinifar. S. H., Nejadmoghadam. S., Khalili. M., 2017. Apple cider vinegar boosted immunomodulatory and health promoting effects of Lactobacillus casei in common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish and Shellfish Immunology*. 67: 441-448.
25. Saliani, M., Jalal, R., Javadmanesh, A., 2022. Differential expression analysis of genes and long non-coding RNAs associated with KRAS mutation in colorectal cancer cells. *Scientific Reports*. 12:7965.
26. Shahidi. F., McDonald. J., Chandrasekara. A., Zhong, Y., 2008. Phytochemicals of foods, beverages and fruit vinegars: chemistry and health effects. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 17.
27. Zhu. Y., Qiu. X., Ding. Q., Duan. M., Wang. C., 2014. Combined effects of dietary phytase and organic acid on growth and phosphorus utilization of juvenile yellow Cat fish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Aquaculture*. 430. 1-8.

Effects of different levels of apple cider vinegar on growth performance and expression of some antioxidant genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with nonalcoholic fatty liver disease

Asadi S.[1], Ahmadniaye Motlagh H.R.[2], Safari O.[2], Vardastzadeh sardroud H.[2], Zeraatpisheh Y.[1] and Javadmanesh A.[1]

[1] Dept. of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. of Iran

[2] Dept. of Fisheries, Faculty of Natural Resources and Environment, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. of Iran

Abstract

This study was designed for the first time to compare the effects of different levels of apple cider vinegar on the growth performance and expression of antioxidant genes (catalase and glutathione peroxidase) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). For this purpose, a herd of 300 animals (73.35 ± 14.24 g) was fed with a special ration for inducing fatty liver, which was adjusted for the first time, for one month; Then, 120 infected fish (74.20 ± 5.40) were selected from the intended flock and transferred to the respective cages. This experiment was conducted as a completely randomized design with six treatments and three replications. Experimental treatments include: treatment 1: healthy fish without apple cider vinegar, treatment 2: healthy fish with four percent apple vinegar, treatment 3: infected fish without apple vinegar, treatment 4: infected fish with one percent apple vinegar, treatment 5: infected fish with two percent apple vinegar, and treatment 6: infected fish with four percent apple vinegar. Feeding was done daily at the rate of two percent of body weight for 60 days. Based on the results, no difference was observed between different treatments in terms of final weight. Also, the results of gene expression showed that apple cider vinegar had no significant effect on catalase and glutathione peroxidase genes. In conclusion, ACV administration showed no significant effect on the antioxidant activity of rainbowtrout with non-alcoholic fatty liver disease, but improved growth function of treated fish.

Key words: Acetic acid, Catalase, Fatty liver, Glutathione peroxidase.