تأثیر ایزوفلاوان جنیستین بر شاخص‌های ایمنی فیل‌ماهی پرورشی (*Huso huso*)

محمود بهمنی[۱]
رویا قاسمی[۲*]
ایوب یوسفی جوردهی[۳]

۱، ۳. موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر، رشت، ایران
۲. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات گیلان، دانش آموخته کارشناسی ارشد شیلات، رشت، ایران

***مسئول مکاتبات:**
Qasemi.roya@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۶/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۹/۱۵
این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دانشجویی می‌باشد.

چکیده

در این تحقیق اثر سطوح مختلف ایزوفلاوان جنیستین بر شاخص‌های ایمنی فیل‌ماهی پرورشی (*Huso huso*) طی ۳ ماه مورد مطالعه (فروردین الی تیر ماه ۱۳۹۱) قرار گرفت. به منظور اجرای این طرح، تعداد ۳۰ قطعه فیل‌ماهی پرورشی با میانگین وزنی ۱/۸±۲۶/۱ کیلوگرم و طول ۷±۱۵۵/۳ سانتی‌متر انتخاب گردیدند. تیماربندی بر اساس سطوح مختلف جنیستین در جیره غذایی (۰، ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۸ و ۱/۶ گرم در هر کیلوگرم جیره) صورت پذیرفت و ماهیان در ابتدای دوره پرورشی و در پایان این دوره خون‌گیری شده و شاخص‌های ایمنی‌شناسی مورد ارزیابی قرار گرفتند. بر اساس نتایج بدست آمده، تعداد گلبول‌های سفید خون تغییرات معنی‌داری را در غلظت‌ها و زمان‌های مورد مطالعه نشان نداند ($P>۰/۰۵$). تعداد نوتروفیل‌ها در همه غلظت‌ها در تیرماه بطور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) نسبت به فروردین ماه کاهش یافت، در حالی‌که تعداد ائوزینوفیل‌ها در همه غلظت‌ها نسبت به شاهد بیشتر بود. تعداد مونوسیت‌ها کاهش معنی‌داری را در غلظت‌های ۰/۴ و ۰/۸ در تیر ماه نسبت به فروردین نشان داد ($P<۰/۰۵$). سطوح CH_{50} و C_4 در همه غلظت‌ها در تیرماه کمتر از فروردین بود، ولی اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید ($P>۰/۰۵$). سطوح لیزوزیم در غلظت ۰/۸ گرم در کیلوگرم ایزوفلاوان جنیستین در تیرماه به طور معنی‌داری نسبت به فروردین افزایش یافت ($P<۰/۰۵$). سطوح IgM در غلظت ۱/۶ گرم در کیلوگرم و C_3 در غلظت‌های ۰/۴ و ۱/۶ گرم در کیلوگرم در تیرماه بطور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) نسبت به فروردین کاهش یافت. با توجه به نتایج بدست آمده، برخی شاخص‌های ایمنی مورد مطالعه به‌ویژه نوتروفیل، سطوح IgM و کمپلمان‌ها تغییرات معنی‌داری را در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف نشان دادند که بیانگر اثر پذیری سیستم ایمنی فیل‌ماهی پرورشی از غلظت‌های مختلف جنیستین در پاسخ به تغییرات فیزیولوژیکی و محیطی می‌باشد.

واژگان کلیدی: فیل‌ماهی، ایزوفلاوان، جنیستین، شاخص‌های ایمنی.

مقدمه

یکی از اهداف اصلی آبزی‌پروری فراهم آوردن بهترین کیفیت غذایی و بهینه کردن بهداشت، رشد و کارآیی تولیدمثلی ماهیان در کنار کاهش هزینه‌های تولید می‌باشد. یک گزینه برای بدست آوردن این هدف کاربرد ایزوفلاون‌ها در جیره می‌باشد. سویا دارای سطوح بالایی از ترکیبات فنولی که اصطلاحاً ایزوفلاون (Isoflovan) نامیده می‌شوند می‌باشد که می‌توانند تاثیرات بیولوژیک بر انسان (GuoTai *et al*., 2001)، حیوانات پرورشی (Woclawek-Potocka *et al*., 2005) و ماهیان (Vanden Ingh and Krogdahl, 1991) داشته باشند.

ایزوفلاوان‌ها زیرمجموعه‌ای از استروژن‌ها هستند که در گیاهان یافت می‌شوند (Peeters *et al*., 2003). ایزوفلاون‌ها به مقادیر زیاد در سویا و فرآورده‌های آن یافت می‌شوند. یکی از فراوان‌ترین ایزوفلاوان‌ها که در سویا یافت می‌شود، جنیستین (Genistein) (۴'، ۵ و۷- تری دیدوکسی ایزوفلاوان می باشد. این ماده دارای ساختار شیمیایی بسیار نزدیک با ۱۷ بتا استرادیول بوده و دارای پیوندهای دوگانه یکسان

می‌باشند. این ترکیب عموماً در سویا به نسبت تقریبی ۰/۲ بوده و حدود ۵۵-۵۰ درصد از ایزوفلاون‌های سویا را تشکیل می‌دهد (Murphy *et al.*, 1999).

ایزوفلاوان‌ها درون لوبیای سویا از لحاظ زیستی غیر فعال می‌باشند، اما هنگام هضم و جذب در بدن انسان و حیوانات به فرم فعال در می‌آیند (Cerrato, 1998). تاکنون مطالعات جامعی در خصوص تعیین نقش و اثرات زیستی مواد موثره در سویا بر سیستم ایمنی ماهیان خاویاری در دسترس نمی‌باشد. شواهدی در خصوص اثر ایزوفلاوان‌ها بر سیستم ایمنی انسان و حیوانات وجود دارد. Yellayi و همکاران (۲۰۰۳) اثر جنیستین را بر سیستم ایمنی موش‌ها بررسی کردند. Ryan و همکاران (۲۰۰۶) عنوان کردند که ایزوفلاوان سویا و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌توانند دارای فواید ایمنی شناسی در زنان و در طول دوره یائسگی باشند.

Messina و همکاران (۲۰۰۴)، پیشنهاد کردند که ایزوفلاوان‌های سویا ترکیبات نهایی برای حفاظت طبیعی گیاه سویا در مقابل شرایط استرس مانند خشکی و حرارت در طی رشد گیاه می‌باشند. به همین علت ایزوفلاوان‌ها ممکن است برای افزایش مقاومت بدن در مقابله با شرایط استرس همچون بیماری مفید باشند (Messina *et al.*, 2004). تحقیقات اخیر نشان داده است که ایزوفلاوان‌های سویا نقش سودمندی در بیماری‌های تولیدمثلی، پوکی استخوان، سرطان و عروق ایفا می‌کنند. جنیستین پاسخ ایمنی خاص آنتی‌ژن را در شرایط زنده محیطی (In vivo) و پاسخ تکثیر لنفوسیت‌ها را در شرایط آزمایشگاهی (In vitro) سرکوب می‌کند. جنیستین پاسخ سیتوتوکسیک وابسته به سلول‌های کشنده و سلول‌های سیتوتوکسیک T و نیز تولید سیتوکین از سلول‌های T را افزایش می‌دهد. بنابراین، اثر جنیستین بر سیستم ایمنی وابسته به سلول ایمنی می‌باشد (Sakai and Kogiso, 2008). اطلاعات حاصل از مطالعات اپیدمیولوژیک در انسان‌ها و سایر موجودات نشان می‌دهد که ایزوفلاوان‌های جیره اثر حفاظتی و حمایتی بر علائم قاعدگی و بسیاری از اختلالات از قبیل بیماری‌های عروقی، سرطان، هیپرپلازیا، پوکی استخوان و اشکال مختلف بیماری‌های حاد کلیوی ایفا می‌کند (Ranich *et al.*, 2001).

از سوی دیگر، ماهیان خاویاری و به‌ویژه فیل‌ماهی (*Huso huso*) از با اهمیت‌ترین ماهیان به شمار می‌روند. عموماً ماهیان خاویاری با هدف تولید خاویار پرورش داده شده و به واسطه کاهش پیوسته سهم ماهیان خاویاری از تولید جهانی ماهی و کاهش ذخایر طبیعی آن‌ها در برخی کشورها، پرورش این ماهیان از اهمیت فوق العاده‌ای برخوردار است. با توجه به اهمیت سویا در جیره غذایی آبزیان و وجود ایزوفلاون‌ها در آن، انجام تحقیقات گسترده در این زمینه و بررسی جنبه‌های مختلف تاثیر این ترکیبات بر آبزیان و خصوصاً ماهیان خاویاری توجیه پذیر می‌نماید. در حال حاضر، غالب مطالعات انجام شده در زمینه تاثیر ایزوفلاوان‌ها روی آبزیان بر تولیدمثل و شاخص‌های گوناگون آن تمرکز یافته است و اطلاعاتی در خصوص تاثیر آن‌ها بر سیستم ایمنی در دست نمی‌باشد. از این‌رو، مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر ایزوفلاوان‌ها بر سیستم ایمنی فیل ماهی و مطالعات ایمنولوژیک مرتبط با آن شامل تعداد کل گلبول‌های سفید، لیزوزیم، فعالیت کامپلمان‌ها (C_3، C_4و CH_{50})، ایمنوگلوبین (IgM) و تعداد افتراقی لنفوسیت‌ها صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها

عملیات اجرایی این تحقیق در طی ماه‌های فروردین الی تیر ۱۳۹۱ در بخش‌های فیزیولوژی و بیوشیمی و نیز تکثیر و پرورش انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان (رشت) به‌انجام رسید. به منظور اجرای این طرح، تعداد ۳۰ قطعه فیل‌ماهی پرورشی با میانگین وزن ۱/۸±۲۶/۱ کیلوگرم و طول ۷±۱۵۵/۳ سانتی‌متر تهیه و به مدت ۲ هفته با شرایط پرورشی پژوهش سازگار شدند. ماهیان در حوضچه‌های بتونی با حجم ۹۰۰۰ لیتر آب که به طور مداوم هوادهی شدند، نگهداری گردیدند. نوع روش تحقیق در این بررسی از نوع مطالعه میدانی- آزمایشی و طرح کاملاً تصادفی بود. این تحقیق دارای ۵ تیمار، شامل یک گروه شاهد (با غلظت ۰) و ۴ تیمار با غلظت‌های ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۸ و ۱/۶ گرم جنیستین به ازای هر کیلوگرم جیره و هر تیمار شامل ۳ تکرار بود (Yousefi Jourdehi *et al.*, 2013).

سطوح ۰، ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۸ و ۱/۶ گرم جنیستین به هر کیلوگرم جیره افزوده شده و کلیه جیره‌ها ایزوکالریک و ایزوپروتئین بودند. جهت تغذیه فیل‌ماهیان از یک ترکیب غذایی حاوی ۴۵ درصد پروتئین، ۱۶درصد چربی، ۱۹ درصد کربوهیدرات و مکمل‌های غذایی دیگر شامل ویتامین‌ها

و مواد معدنی به همراه درصدهای مختلف جنیستین استفاده شد. سپس مخلوط ترکیبات جیره کاملاً همگن شده و به دستگاه پلت زن منتقل شدند تا پلت‌ها تهیه شوند. پلت‌ها پس از تهیه در دستگاه خشک کن و در درجه حرارت ۴۵ درجه سانتی‌گراد خشک شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (یخچال) نگهداری شدند.

ماهیان نیز پس از زیست سنجی (طول کل و وزن) با استفاده از متر نواری و ترازوی دیجیتال و تعیین بیوماس هر تکرار، توسط جیره‌های غذایی مربوطه به میزان حداکثر ۱ درصد وزن بدن، ۲ نوبت در روز و به مدت ۳ ماه غذادهی شدند.

پس از پایان دوره پرورش، با استفاده از سرنگ‌های ۵ سی‌سی هپارینه از سیاهرگ دمی ماهیان خونگیری به‌عمل آمد. پس از ریختن خون در تیوب‌های مخصوص، نمونه‌ها جهت انجام آنالیزهای مربوط به ایمنی‌سنجی به آزمایشگاه منتقل شدند. بررسی‌های ایمنی‌شناسی شامل تعداد کل گلبول‌های سفید، لیزوزیم، فعالیت کامپلمان (C_3، C_4 و CH_{50})، IgM و تعداد لنفوسیت‌ها، مونوسیت‌ها، ائوزینوفیل‌ها و نوتروفیل‌ها بود.

برای شمارش گلبول‌های سفید از یک ملانژور یا پیپت رقیق کننده سفید استفاده شد. بدین‌منظور، پیپت تا درجه ۰/۵ از خون پر شده و بقیه محفظه تا درجه فوقانی (برای گلبول‌های سفید ۱) با محلول رقیق کننده Ress پر شد. در مدت زمان ۳-۲ دقیقه ملانژورها (پیپت ویژه رقیق‌سازی) برای مخلوط شدن خون با محلول‌های رقیق‌کننده تکان داده شد، سپس ۴ قطره اولیه موجود در پیپت دور ریخته شده (زیرا این قطرات رقت واقعی خون را نشان نمی‌دهند) و قطره پنجم را بین لام هماسیتومتر پیشرفته و لامل قرار داده شده و با درشت‌نمایی ۴۰ تعداد گلبول‌ها شمارش گردید (عامری مهابادی، ۱۳۸۴).

تعداد گلبول‌های سفید (White Blood Cell):

$$WBC(N/mm^3)\frac{(W_1+W_2+W_3+W_4)\times 20\times 10}{4}=(W_1+W_2+W_3+W_4)\times 50$$

یک قطره خون به وسیله لوله میکرو هماتوکریت در یک سانتی‌متری گوشه راست لام ریخته شد و سپس با یک لام دیگر با زاویه ۴۵-۳۰ درجه و با یک حرکت یکنواخت و ملایم، قطره خون به طرف چپ انتشار داده شد و بدین ترتیب گسترش خونی تهیه گردید. گسترش به مدت ۵ دقیقه در جریان هوا قرار داده شد تا خشک شود. در مرحله بعد تثبیت با متانول ۹۶ درصد و به مدت ۳ تا ۵ دقیقه انجام شد. پس از خشک شدن لام‌ها در جریان هوا از محلول ۲۰ درصد گیمسا جهت رنگ‌آمیزی استفاده شد و لام‌ها داخل محلول گیمسا به مدت ۳۰ تا ۳۵ دقیقه قرار گرفت. سپس لام‌ها با آب مقطر شسته شد و در جریان هوا قرار داده شدند تا خشک گردند. در نهایت نیز لام‌ها در زیر میکروسکوپ گذاشته شد و شناسایی انواع گلبول‌های سفید (لنفوسیت‌ها، ائوزینوفیل‌ها، نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها) با استفاده از کلیدهای شناسایی انجام شد (خوش‌باور رستمی و سلطانی، ۱۳۸۱).

اندازه‌گیری لیزوزیم با استفاده از روش کدورت‌سنجی انجام شد که بدین منظور سوسپانسیونی از باکتری میکروکوکوس لیزودیکتی‌کوس تهیه شده و به میزان ۲۵ میلی‌گرم از نمونه‌های خون به آن اضافه شد. پس از ۳ دقیقه انکوباسیون به روش طیف‌سنجی و در طول موج ۶۰۰ نانومتر میزان آن خوانده شد. سنجش بر اساس کاهش جذب نوری بود (Ellis, 1997).

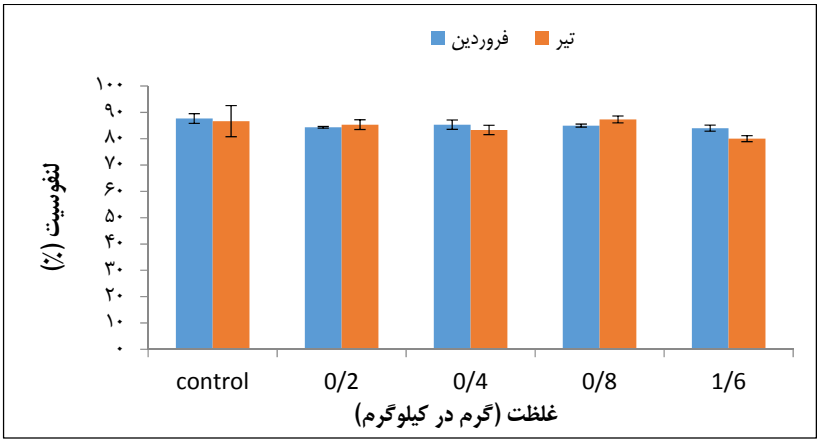
اندازه‌گیری C_3، C_4 و CH_{50} و IgM با استفاده از روش Nephelometry صورت پذیرفت. در این روش C_3، C_4 و CH_{50} موجود در نمونه سرم (به‌طور جداگانه) با آنتی‌بادی ضد C_3، C_4 و CH_{50} و نیز IgM موجود در نمونه سرم با آنتی‌بادی ضد IgM در محلول تشکیل کمپلکس داده و باعث کدرشدن محلول شدند. نفلومتر نور تک رنگ موازی در طول موج‌های بین ۴۰۰ تا ۸۴۰ نانومتر به این محلول تابانده شد که پس از برخورد به کمپلکس، آنتی‌بادی و آنتی‌ژن متفرق شده که به میزان تفرق با مقدار C_3، C_4 و CH_{50} نسبت مستقیم داشت. برای کالیبراسیون و کنترل تست‌های فوق از Binding site ساخت انگلستان استفاده شد.

از آمار توصیفی به منظور بررسی و بدست آوردن سطوح آماری استفاده شد. برای مقایسه میانگین بین تیمارها از آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و برای جداسازی گروه‌های همگن از آزمون چند دامنه دانکن در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد. تجزیه و

تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS نسخه شانزدهم و رسم نمودارها توسط نرم افزار Excel 2007 انجام گرفت. نتایج نیز به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شدند.

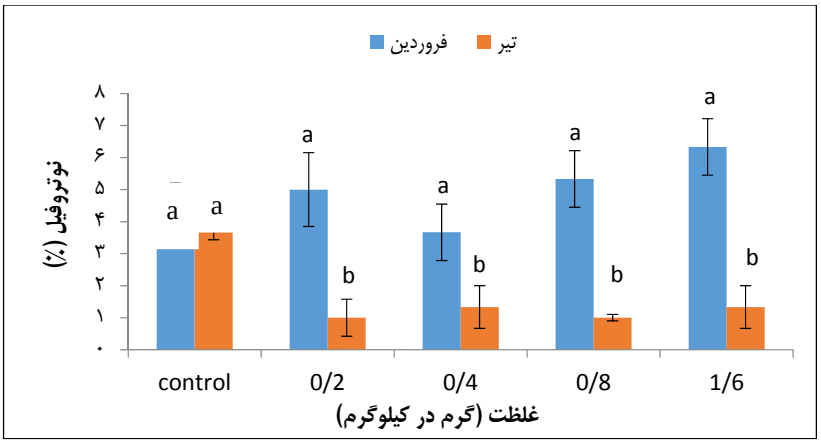
نتایج

نتایج شمارش گلبول‌های سفید افتراقی تغییرات معنی‌داری را در تعداد لنفوسیت‌ها در غلظت‌ها و زمان‌های مورد مطالعه نشان نداد و اختلاف معنی‌داری میان تیمارهای حاوی جنیستین در ماه‌های فروردین و تیر ماه با یکدیگر و نیز گروه شاهد مشاهده نشد (P>۰/۰۵) (شکل ۱).



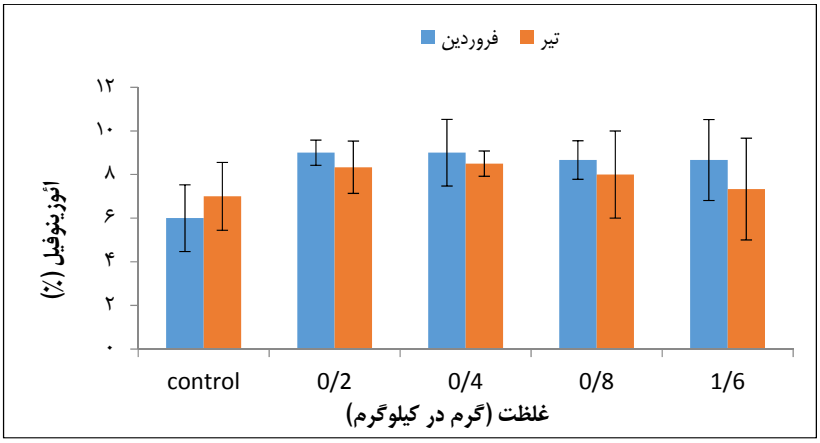
شکل ۱: تغییرات تعداد لنفوسیت در غلظت‌های مختلف جنیستین بر فیل‌ماهیان (*Huso huso*) در زمان‌های مورد مطالعه (۱۳۹۱).

تعداد نوتروفیل‌ها در همه غلظت‌ها در تیرماه به طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) نسبت به فروردین ماه کاهش یافت. تعداد نوترفیل در ماهیان تیمارهای حاوی دوزهای مختلف جنیستین در فروردین ماه فاقد اختلاف معنی‌دار با یکدیگر بود (P>۰/۰۵). همچنین، در تیرماه نیز تیمارهای حاوی غلظت‌های مختلف جنیستین فاقد اختلاف معنی‌دار با یکدیگر بودند (P>۰/۰۵) (شکل ۲).



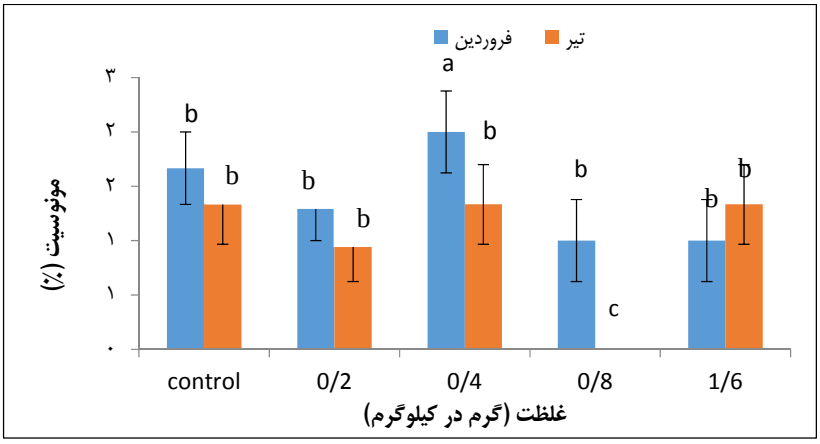
شکل ۲: تغییرات تعداد نوتروفیل در غلظت‌های مختلف جنیستین بر فیل‌ماهیان (*Huso huso*) در زمان‌های مورد مطالعه (۱۳۹۱).

تعداد ائوزینوفیل‌ها در همه تیمارهای حاوی جنیستین در ماه‌های فروردین و تیر نسبت به شاهد بیشتر بود که البته این افزایش به لحاظ آماری فاقد اختلاف معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵) (شکل ۳).



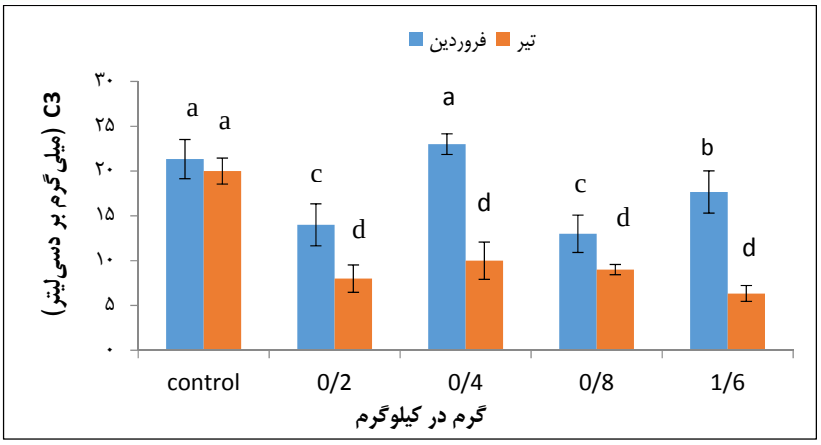
شکل ۳: تغییرات تعداد ائوزینوفیل در غلظت‌های مختلف جنیستین بر فیل‌ماهیان (*Huso huso*) در زمان‌های مورد مطالعه (۱۳۹۱).

تعداد مونوسیت‌ها کاهش معنی‌داری را در غلظت‌های ۰/۴ و ۰/۸ در تیر ماه نسبت به فروردین نشان داد (P<۰/۰۵). بیشترین تعداد مونوسیت در تیمارهای فروردین ماه مربوط به تیمار ۰/۴ و در تیمارهای تیر ماه مربوط به تیمار ۱/۶ بود (شکل ۴).



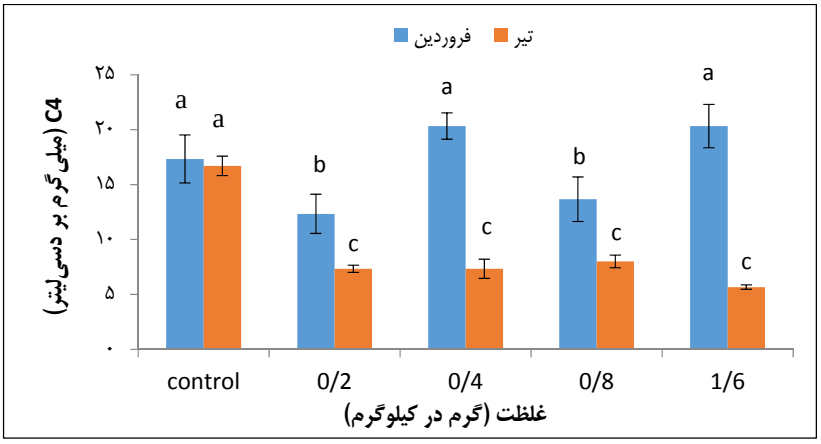
شکل ٤: تغییرات تعداد مونوسیت در غلظت‌های مختلف جنیستین بر فیل‌ماهیان (*Huso huso*) در زمان‌های مورد مطالعه (۱۳۹۱).

سطوح C_3 در کلیه تیمارهای جنیستین در تیرماه بطور معنی‌داری (P<۰/۰۵) نسبت به فروردین کاهش یافت. بالاترین میزان C_3 در بین تیمارهای آزمایشی در گروه شاهد و تیمار ۰/۴ فروردین ماه و کمترین میزان آن در تیمارهای ۰/۲، ۰/۴، ۰/۸ و ۱/۶ تیر ماه مشاهده شد (شکل ۵).



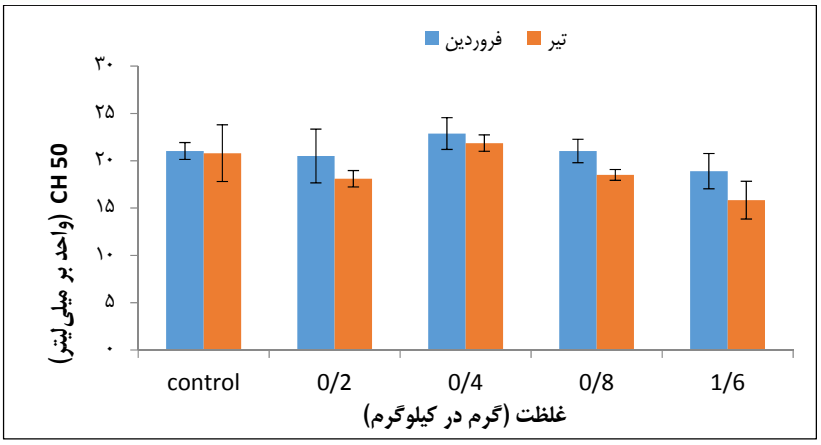
شکل ۵: تغییرات سطوح C_3 در غلظت‌های مختلف جنیستین بر فیل‌ماهیان (*Huso huso*) در زمان‌های مورد مطالعه (۱۳۹۱).

سطوح C_4 در همه غلظت‌ها در تیرماه بطور معنی‌داری (P<۰/۰۵) نسبت به فروردین کاهش یافت. بالاترین میزان C_4 در بین تیمارهای حاوی جنیستین در تیمارهای ۰/۴ و ۱/۶ فروردین ماه مشاهده شد که فاقد اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد (P>۰/۰۵) و دارای اختلاف معنی‌دار با سایر تیمارها در ماه‌های فروردین و تیر بودند (P<۰/۰۵) (شکل ۶).



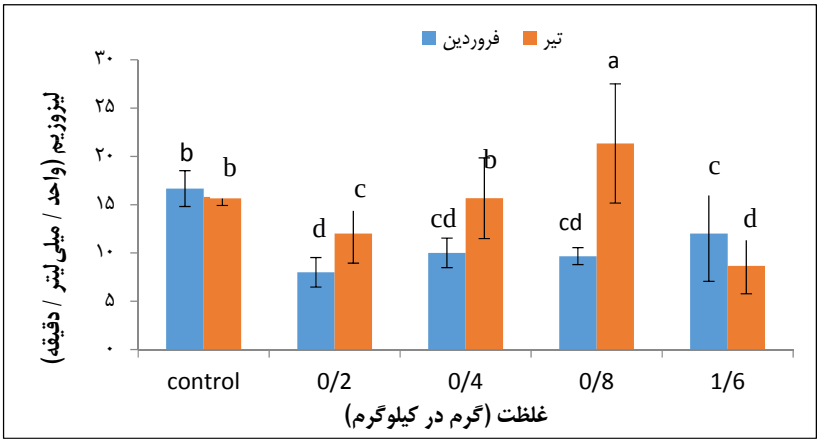
شکل ٦: تغییرات سطوح C_4 در غلظت‌های مختلف جنیستین بر فیل‌ماهیان (*Huso huso*) در زمان‌های مورد مطالعه (۱۳۹۱).

سطوح CH_{50} در همه غلظت‌ها در تیرماه کمتر از فروردین بود، ولی اختلاف معنی‌داری میان تیمارهای حاوی دوزهای مختلف جنیستین با یکدیگر و نیز گروه شاهد مشاهده نگردید (P>۰/۰۵) (شکل ۷).



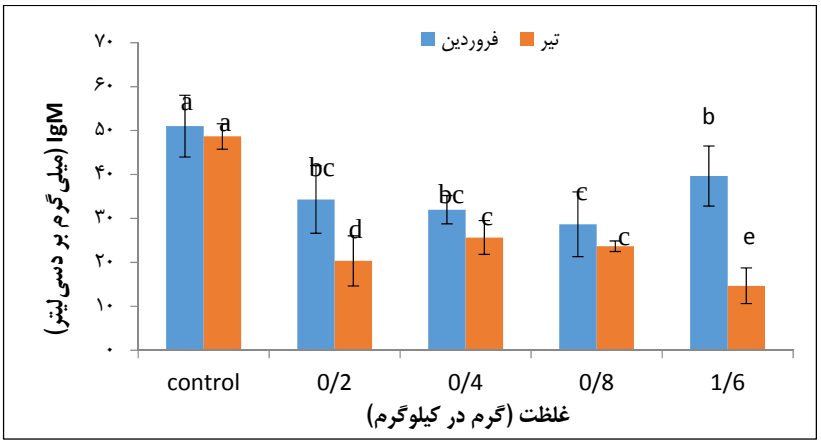
شکل ۷: تغییرات سطوح CH_{50} در غلظت‌های مختلف جنیستین بر فیل‌ماهیان (*Huso huso*) در زمان‌های مورد مطالعه (۱۳۹۱).

سطوح لیزوزیم در غلظت‌های ۰/۰،۴/۲ و ۰/۸ گرم در کیلوگرم در تیر ماه بطور معنی‌داری نسبت به فروردین افزایش یافت (P<۰/۰۵). بالاترین میزان لیزوزیم در تیمار ۰/۸ تیر ماه مشاهده شد (شکل ۸).



شکل ۸: تغییرات سطوح لیزوزیم در غلظت‌های مختلف جنیستین بر فیل‌ماهیان (*Huso huso*) در زمان‌های مورد مطالعه (۱۳۹۱).

سطوح IgM در غلظت ۰/۲ و ۱/۶ گرم در کیلوگرم در تیرماه به طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) نسبت به فروردین کاهش یافت. پایین‌ترین میزان IgM در تیمار ۱/۶ تیرماه مشاهده شد (شکل ۹).



شکل ۹: تغییرات سطوح IgM در غلظت‌های مختلف جنیستین بر فیل‌ماهیان (*Huso huso*) در زمان‌های مورد مطالعه (۱۳۹۱).

بحث و نتیجه‌گیری

مواد مغذی موجود در سویا دارای مقادیر قابل توجهی از ایزوفلاوان‌هایی نظیر جنیستین می‌باشند که سطوح بالای این مواد در برخی از جانوران در شرایط تغذیه‌ای معین باعث القای تاثیرات زیستی قابل توجهی می‌گردد (Paul *et al.*, 2006). قرار گرفتن در معرض جنیستین اغلب از طریق مصرف محصولات سویا که شامل مکمل‌های غذایی دارای فرمولاسیون تغذیه‌ای حاوی سویا می‌باشد، صورت می‌گیرد. علی‌رغم نقش حیاتی تایید شده استروژن‌های گیاهی در بهبود پاسخ ایمنی، مکانیسم عمل آن دقیقاً مشخص نشده است (Paul *et al.*, 2006). همچنین دانشمندان قویاً بیان نمودند که جنیستین می‌تواند عملکرد سیستم ایمنی را تنظیم کند که احتمالاً با مکانیسم‌های فیزیولوژیکی خاص این عمل انجام می‌پذیرد. تحقیقات متعددی وجود دارد که تأثیرات تغذیه با جنیستین را بر سلول‌های ایمنی انسان و جانوران دیگر نشان می‌دهند. میزان بالای ایزوفلاوان سویا در جیره غذایی (بیش از ۴ گرم به ازای هر کیلوگرم وزن ماهی) Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) اثر منفی بر میزان رشد و میزان کارایی غذا (FER) داشت، هر چند زمانی که میزان ایزوفلاوان سویا به حدود ۳-۱ گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن ماهی کاهش یافت اثرات معکوس آن به حدی رسید که قابل اغماض بود (Kangsen *et al.*, 2012). این ماده همچنین باعث کاهش تولید اکسید نیتریت در موش‌ها شد که یکی از عوامل تحریک سیستم ایمنی در این حیوانات محسوب می‌گردد. در یک مطالعه نیز جنیستین در دوز بالا باعث جلوگیری از تولید سلول‌های T در پاسخ به آنتی‌بادی در انسان گردید و نیز مانع تولید لکوسیت B_4 و اینترلوکین‌ها شد (Calemine *et al.*, 2003). جنیستین از جمله ایزوفلاون‌های اصلی به شمار می‌رود که در جهت ارتقای سطح سلامت به طور گسترده توسط انسان نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد (Doerge *et al.*, 2001) و تأثیر آن در بافت‌های حاوی غدد درون ریز به اثبات رسیده است (Chang *et al.*, 2000). به طور کلی، مطالعات کمی درباره تأثیر هورمونی استروژن‌های مشتق شده از گیاهان بر سیستم ایمنی انجام گرفته است. تاثیر استروژن‌ها بر عملکرد سیستم ایمنی جانوران دیگر (غیر از آبزیان) نظیر موش به خوبی به اثبات رسیده است. موش‌های نر تغذیه شده با جنیستین در دوران اولیه رشد دارای حجم تیموس بالاتر و درصد بالایی از سلول‌های T در طحال خود بودند (Whittenand Naftolin, 1992).

در زمینه تأثیر مستقیم ایزوفلاوان جنیستین بر سیستم ایمنی ماهیان اطلاعات منتشر شده‌ای یافت نشد. مطالعات آزمایشگاهی نشان داده است که سطوح بالای جنیستین می‌تواند ماکروفاژها و سلول‌های فاگوسیتوز کننده را از طریق ممانعت از فعالیت تیروزین کیناز II (Steele and Brahmi, 1988) و تولید لنفوسیت‌های T و B را از طریق ممانعت از فعالیت آنزیم توپوایزومراز II کاهش دهد (Chang *et al.*, 1995). با این وجود، سطوح پایین جنیستین می‌تواند فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی را ارتقا بخشد (Zhang *et al.*, 1999). در سیستم

ایمنی فیل ماهیان مورد بررسی در این پژوهش نیز تأثیراتی بر روی برخی از گلبول‌های سفید مشاهده گردید که این تغییرات در مورد ائوزینوفیل و نوتروفیل بسیار نمایان بود، تا جایی‌که میزان کاهش نوتروفیل در تیر ماه در کلیه تیمارها به جز تیمار شاهد معنی‌دار بود. در تحقیق حاضر میزان CH_{50} در فروردین بیشتر از تیرماه بود اما این میزان در حد ناچیزی مشاهده گردید، حال آن که در مورد C_4 این تفاوت معنی‌دار بود و در کلیه تیمارها کاهش میزان C_4 بعد از پایان دوره پرورش مشهود بود. این کاهش در مورد C_3 نیز مشاهده گردید. در این راستا، تحقیقی که بر روی گربه ماهی (*Clarias garipinus*) صورت پذیرفت، بیانگر این نتیجه بود که تغذیه این گونه با استفاده از آرد سویا تأثیری در پروتئین لاشه، حجم گلبول‌های سفید و میزان هموگلوبین نداشت (Sotolu and Faturoti, 2009). مطالعه تاثیرجنیستین روی عملکرد سیستم ایمنی نیازمند تعیین تاثیر مستقیم یا غیر مستقیم جنیستین بر سیستم ایمنی می‌باشد. گیرنده‌های استروژن (β و α) مسدود می‌شوند و سپس جنیستین بر سیستم ایمنی از طریق هورمون‌های استروییدی به صورت مکانیسم مستقل تاثیر می‌گذارد (Yellayi *et al.*, 2000)، هرچند مطالعات بیشتری باید صورت گیرند تا نحوه و مکانیسم دقیق تاثیر این ماده بر عملکرد ایمنی جانوران مشخص گردد (Kangsen *et al.*, 2012).

در مطالعه حاضر، تغذیه فیل‌ماهیان با غلظت ۰/۸ گرم در کیلوگرم ایزوفلاون جنیستین، افزایش سطح لیزوزیم در پایان دوره پرورش را نشان داد. در شرایطی که در تغذیه فیل‌ماهیان با استفاده از ایزوفلاون جنیستین با غلظت‌های مختلف، افزایشی در میزان IgM مشاهده نگردید و حال آنکه مقدار IgM در ماهیان تغذیه شده با استفاده از غلظت ۱/۶ گرم در کیلوگرم جنیستین در تیر ماه کمتر از فروردین بود. Krogdahl و همکاران (۲۰۰۰) با بررسی تأثیر محصولات سویا بر میزان مقاومت در برابر بیماری و سطوح لیزوزیم و IgM در موکوس روده آزاد ماهی اقیانوس اطلس به این نتیجه دست یافتند که سویا به طور معنی‌داری سطوح لیزوزیم و IgM را در بخش‌های قدامی و میانی روده این ماهیان افزایش داد و تفاوت معنی‌داری در میزان مرگ و میر بین گروهای آزمایشی وجود داشت، به‌طوری‌که، بالاترین میزان تفاوت با گروه شاهد در تیمار حاوی ۶۵ درصد سویا و کمترین میزان آن در گروه ۶۰ درصد سویا مشاهده گردید.

تحقیقات صورت گرفته بر تأثیر ایزوفلاوان‌ها بر آبزیان غالباً به مسایل تولیدمثلی مربوط بوده و همان گونه که ذکر گردید، علیرغم انجام تحقیقات گسترده تاکنون منبعی در خصوص بررسی اثر ایزوفلاون‌ها بر سیستم ایمنی ماهیان یافت نشد و عمده مطالعات انجام شده روی انسان و موجوداتی غیر از آبزیان می‌باشد. تحقیقات دیگر محققین نیز نشان می‌دهدکه ایزوفلاوان دارای ظرفیت بالایی برای استفاده به عنوان مکمل در تغذیه حیوانات می‌باشند و بنابراین بررسی تاثیر پذیری سیستم ایمنی آبزیان از این ترکیبات به تحقیقات بیشتری نیاز دارد.

با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش می‌توان بیان داشت از آنجا که برخی شاخص‌های ایمنی مورد مطالعه به‌ویژه نوتروفیل، لیزوزیم، IgM و کامپلمان‌ها تغییرات معنی‌داری را در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف نشان دادند، این نتایج می‌توانند بیانگر اثرپذیری سیستم ایمنی فیل‌ماهی پرورشی از غلظت‌های مختلف جنیستین در پاسخ به تغییرات فیزیولوژیکی و محیطی و فصول باشد.

منابع

خوش‌باور رستمی، ح. و سلطانی، م.، ۱۳۸۱. تأثیرسم دیازینون بر شاخص‌های هماتولوژیکی ماهی شیپ (*A. nudiventris*) و تعیین LC_{50} آن. دومین همایش ملی ماهیان خاویاری. خلاصه مقالات، صفحات ۴۵- ۴۷.

عامری مهابادی، م.، ۱۳۸٤. روش‌های آزمایشگاهی هماتولوژی دامپزشکی. موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، ۱۲۶ ص.

Calemine, J., Zalenka, J., Karpuzoglu-Sahin, E., Ward, D. L., Lengi, A. and Ahmed, S. A., 2003. The immune system of geriatric mice is modulated by estrogenic endocrine disruptors (diethylstilbestrol, alpha-zearalanol, and genistein): effects on interferongamma. Toxicology, 194: 115–28.

Cerrato, P. L., 1998. Can plant estrogens help fight cancer? RN. 61(10): 59-60.

Chang, H. C., Churchwell, M. I., Delclos, K. B., Newbold, R. R., Doerge, D. R. and Mass, A., 2000. Spectrometric determination of Genistein tissue distribution indiet-exposed Sprague-Dawley rats. Journal of Nutrition, 130(8):1963-70.

Chang, Y. M., Nair, M. G. and Nitiss, J. L., 1995. Metabolites of daidzein and genistein and their biological activities. Journal National Production, 58: 1901–1905.

Doerge, D. R., Churchwell, M. I., Chang, H. C., Newbold, R. R. and Delclos, K. B., 2001. Placental transfer of the soy isoflavone genistein following dietary andgavage administration to Sprague Dawley rats. Reproductive Toxicology Mar-Apr, 15(2):105-10.

Ellis, A. E., 1977. The leucocytes of fish: a review. Journal Fish biology, 11: 453-491.

GuoTai, L., Mccay, J., Zhang, L. X., Brown, R. D., Karrow, A., Germolrc, R. and White, K. L., 2001. Genistein modulates immune responses and increases host resistance to B16F10 tumor in adult female B6C3F1 mice. . The Journal of Nutrition, vol. 131, no12, pp. 3251-3258.

Kangsen, M., Yanjiao, Z., Wei, C., Wei, X., Qinghui, A. and Wenbing, Z., 2012. Effects of dietary soy isoflavones on feed intake, growth performance and digestibility in juvenile Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Journal of Ocean University of China, Volume 11, Issue 4, pp. 511-516.

Krogdahl, A., Bakke-McKellep, A. M., Roed, K. H. and Baeverfjord, G., 2000. Feeding Atlantic salmon *Salmo salar* L. soybean products: effects on disease resistance (furunculosis), and lysozyme and IgM levels in the intestinal mucosa. Aquaculture Nutrition, 6: 77–84.

Messina, M. J., Persky, V., Setchell, K. D. and Barnes, S., 2004. Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data. Nutrition and Cancer, 21(2):113-31.

Murphy, P.A., Song, T., Buseman, G., Barua, K., Beecher, G. R. and Trainer, D., 1999. Isoflavones in retail and institutional soy foods. Journal of Agriculture Food Chemistry, 47(7): 2697-704.

Paul, S., Cooke, Y., Selvaraj, V. and Yellayi, S., 2006. Genistein, Estrogen Receptors, and the Acquired Immune Response Symposium: Nutrients, Nuclear Receptors, 708–Inflammation and Immunity, American Society for Nutrition, pp. 704-708.

Peeters, P. H., Keinan-Boker, Y. T., Schouw, V. and Grobbee, D. E., 2003. Phytoestrogens and breast cancer risk. Review of the epidemiological evidence, Breast Cancer Research Treatment Journal, 77: 171-183.

Ranich, T., Bhathena, S. J. and Velasquez, M. T., 2001. Protective effects of dietary phytoestrogens in chronic renal disease. Journal of Renal Nutrition, 11: 183-193.

Ryan-Borchers, T. A., Park, J. S., Chew, B. P., McGuire, M. K., Fournier, L. R. and Beerman, K. A., 2006. Soy isoflavones modulate immune function in healthy postmenopausal women. American Joournal of Clinical Nutrition, 83:118–1125.

Sakai, T. and Kogiso, M., 2008. Soy isoflavones and immunity. Journal of Medical Investigation, 55(3-4): 167-73

Sotolu, A. O. and Faturoti, E. O., 2009. Digestibility and Nutritional Values of Differently Processed *Leucaena leucocephala* (Lam. de Wit) Seed Meals in the Diet of African Catfish (*Clarias gariepinus*). Middle-East Journal of Science Research, 3 (4): 190-199.

Steele, T. A. and Brahmi, Z., 1988. Phosphatidylinositol metabolism accompanies early activation events in tumor target cell-stimulated human natural killer cells. Cell Immunology, 112: 402–413.

Van der Ingh, T., Krogdahl, A., Olli, J. J., Hendricks, H. and Konikx, J., 1991. Effects of soybean-containing diets on the proximal and distal intestine in Atlantic salmon (*Salmo salar*): a morphological study. Aquaculture, 94: 297– 395.

Whitten, P. L. and Naftolin, F., 1992. Effects of a phytoestrogen diet on estrogen-dependent reproductive processes in immature female rats. Steroids, 57: 56–61.

Woclawek-Potocka, I., Bah, M. M., Korzekwa, A., Piskula, M. K., Wiczkovski, W., Depta, A. and Skarzynski, D. J., 2005. Soy-bean derived phytoestrogens regulate prostaglandin secretion in endometrium during the oestrous cycle and early pregnancy in cattle. Experimental Biology Medicine, 230: 189-199.

Yellayi, S., Teuscher, C., Woods, J. A., Welsh, T., Tung, K. S., Nakai, M., Rosenfeld, C. S., Lubahn, D. B. and Cooke, P. S., 2000. Normal development of thymus in male and female mice requires estrogen/estrogen receptor-alpha signaling pathway. Endocrine, 12: 207–13.

Yellayi, S., Zakroczymski, M. A., Selvaraj, V., Valli, V. E., Ghanta, V., Helferich, W. G. and Cooke, P.S., 2003. The phytoestrogen genistein suppresses cell-mediated immunity in mice. Journal Endocrinology, 176: 267–74.

Yousefi Jourdei, A., Sudagar, M., Bahmani, M., Hoseini, S. A., Dehghani, M. A. and Yazdani, M. A., 2013. Comparative study of dietary soy phytoestrogens genistein and equol effects on growth parameters and ovarian development in farmed female beluga sturgeon, *Huso huso*. Fish Physiology Biochemistry, 40(1): 117-128.

Zhang, Y., Song, T. T., Cunnick, J. E., Murphy, P. A. and Hendrich, S., 1999. Daidzein and genistein glucuronides in vitro are weakly estrogenic and activate human natural killer cells as nutritionally relevant concentrations. Journal of Nutrition, 129: 399–405.