اثرات تغذیه با عصاره چای سبز (*Camellia sinensis*) و روغن ماهی اکسیدشده بر پاسخ استرس در تاس ماهی هیبرید (*Huso huso* ♂ × *Acipenser ruthenus* ♀)

ویان ابراهیمی[۱]
امیر پرویز سلاطی[۲*]
حمید محمدی آذر[۳]
حسین پاشا زانوسی[۴]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران
۲، ۳. استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، ایران
۴. مربی گروه فیزیک دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران

***مسئول مکاتبات:**
apsalati@kmsu.ac.ir

کد مقاله: ۱۳۹۴۰۴۰۳۶۵
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۹/۱۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۲۴
این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد است.

چکیده

در مطالعه حاضر اثر تغذیه تاس ماهی هیبرید (*Huso huso* ♂ × *Acipenser ruthenus* ♀) با سطوح مختلف عصاره چای سبز (GTE) و روغن ماهی اکسیدشده (OFO) در پاسخ به استرس حاد موردبررسی قرار گرفت. جهت انجام آزمایش ۹ جیره شامل جیره پایه، GT_{50} (GTE ۵۰mg/kg)، GT_{100} (GTE ۱۰۰mg/kg)، OFO_{50} (OFO ٪۵۰)، OFO_{100} (OFO ۱۰۰٪)، $GT_{50}OFO_{50}$ (GTE ۵۰mg/kg و OFO ۵۰٪)، $GT_{50}OFO_{100}$ (GTE ۵۰mg/kg و OFO ۱۰۰٪)، $GT_{100}OFO_{50}$ (GTE ۱۰۰g/kg و OFO ۵۰٪) و $GT_{100}OFO_{100}$ (GTE ۱۰۰mg/kg و OFO ۱۰۰٪) طراحی شد. ماهی‌های مورداستفاده جهت سازگاری با شرایط آزمایشگاهی قبل از شروع آزمایش به مدت ۲ هفته با جیره پایه مورد تغذیه قرار گرفتند. تعداد ۱۲۰ عدد ماهی (میانگین وزن اولیه ۰/۷± ۲۱۲/۶ گرم) به‌صورت تصادفی در ۱۲ مخزن فایبرگلاس ۱۰۰۰ لیتری تقسیم شد. هر گروه شامل ۳ تکرار بوده که به‌صورت دستی ۳ بار در روز (۸:۰۰، ۱۴:۰۰ و ۲۰:۰۰) و در حد سیری به مدت ۶ هفته مورد تغذیه قرار گرفتند. بعدازاین مدت، جهت اعمال استرس حاد ماهی‌ها به مدت ۱ دقیقه در معرض هوا قرار گرفتند. در طول دوره بهبود پس از استرس، در زمان‌های ۱، ۲، ۵ و ۱۲ ساعت بعد از استرس، خون‌گیری انجام شد. برای ارزیابی پاسخ استرس در تیمارهای مختلف کورتیزول، گلوکز و لاکتات سرم اندازه‌گیری گردید. قرار گرفتن در معرض هوا باعث افزایش میزان کورتیزول سرم در همه گروه‌های آزمایشی شد که در ماهیان تغذیه‌شده با جیره حاوی OFO و فاقد GTE برجسته‌تر بود ($P<0/05$). در ماهیان تغذیه‌شده با جیره حاوی GTE میزان کورتیزول سرم بعد از استرس سریع‌تر از گروه شاهد و گروه تغذیه‌شده با OFO به حالت طبیعی بازگشت ($P<0/05$). برای گلوکز نیز الگوی مشابه کورتیزول مشاهده شد. همچنین تغذیه با عصاره چای سبز میزان لاکتات سرم را در ماهیان تغذیه‌شده با OFO کاهش داد ($P<0/05$). یافته‌های این مطالعه نشان داد که چای سبز در مقادیر ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره می‌تواند باعث شود تا شدت پاسخ به استرس در مقایسه با گروه شاهد و گروه‌های تغذیه‌شده با روغن ماهی اکسیدشده کمتر بوده و سریع‌تر به حالت پایه بازگردد؛ بنابراین می‌توان چای سبز را برای کاهش پاسخ به استرس در ماهی‌های تغذیه‌شده با چربی اکسیدشده در جیره به کاربرد.

واژگان کلیدی: کورتیزول، گلوکز، لاکتات، چای سبز، روغن ماهی اکسیدشده.

مقدمه

یکی از اجزای غذایی اصلی در ترکیبات جیره غذایی برای ماهیان گوشت‌خوار، روغن ماهی است که از استخراج روغن کل بدن ماهی یا ضایعات ماهی به دست می‌آید (Karalazos, 2007). روغن ماهی تقریباً یک منبع بی‌نظیر از اسیدهای چرب ضروری، بخصوص اسیدهای چرب غیراشباع

بلند زنجیر سری n-3 است که دارای هضم پذیری بالایی بوده و شامل ۱۰ تا ۲۵ درصد کل اسیدهای چرب است (Nasopoulou and Zabetakis, 2012). حضور مقدار قابل‌توجهی از اسیدهای چرب غیراشباع در روغن ماهی سبب می‌گردد تا در مقابل فساد ناشی از اکسیداسیون بسیار حساس و آسیب‌پذیر باشد. اکسیداسیون لیپید در جیره ماهی به‌ویژه در نبود مقدار کافی از آنتی‌اکسیدان‌ها در جیره‌ی ماهی، رشد و ایمنی ماهی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Baker and Davies, 1996). رادیکال‌ها، پر اکسیدها، هیدروپراکسیدها، آلدهیدها و کتون‌ها حاصل از اکسیداسیون چربی با سایر اجزای جیره شامل پروتئین‌ها و ویتامین‌ها واکنش داده و ضمن کاهش ارزش بیولوژیک آن‌ها، قابلیت هضم را نیز کاهش می‌دهند. اثرات تغذیه ماهی با روغن اکسیدشده شامل کاهش مصرف غذا، کاهش رشد و کارایی غذا، تورم و رسوب چربی کبد، افزایش مرگ‌ومیر و تغییر شکل‌های اسکلتی در گونه‌های مختلف ماهی گزارش‌شده است (Hamre *et al.*, 2001 Sargent *et al.*, 2002; Lewis-McCrea and Lall, 2007). از طرف دیگر مشخص‌شده که چربی جیره و کیفیت آن می‌تواند بر پاسخ استرس در ماهی تأثیر بگذارد. برای مثال در سیم دریایی (*Sparus aurata*) تغذیه‌شده از جیره غذایی با میزان آراشیدونیک اسید بالا، کاهش حساسیت ماهی در برابر استرس حاد با کاهش کورتیزول پلاسما و اسمولاریته پلاسما مشاهده‌شده است (Van Anholt *et al.*, 2004). از سوی دیگر ترکیبات مختلفی برای کاهش شدت پاسخ ماهی به استرس مورداستفاده قرار می‌گیرند. ازجمله این مواد گیاهان دارویی می‌باشند. گزارش‌ها مختلفی از اثر گیاهان دارویی برافزایش رشد، کاهش اثرات تنش و افزایش توان سیستم ایمنی در ماهی وجود دارد (Ji *et al.*, 2007). باوجود ارتباط احتمالی بین چربی جیره و مقاومت در برابر استرس، هنوز اطلاعات کمی در مورد چگونگی تأثیر چربی اکسیدشده جیره در پاسخ به استرس‌های فیزیولوژیک در ماهی شناخته‌شده است (Martins *et al.*, 2007). از طرف دیگر مکانیسم‌های فیزیولوژیک در ماهیان خاویاری به‌عنوان ماهیان غضروفی-استخوانی متفاوت از ماهیان استخوانی می‌باشد. ازاین‌رو کمبود اطلاعات درباره پاسخ استرس متعاقب دوره‌های تغذیه با چربی اکسیدشده و یک ماده آنتی‌اکسیدان به‌صورت همزمان باعث شد تا در مطالعه حاضر به بررسی تأثیر روغن اکسیدشده جیره و نقش احتمالی آنتی‌اکسیدان‌های موجود در عصاره چای سبز بر پاسخ استرس حاد در تاس ماهی هیبرید پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

تمامی مراحل اجرایی این تحقیق در سالن پرورش لارو مجتمع بازسازی ذخایر ماهیان خاویاری دکتر شهید بهشتی واقع در سد سنگر شهرستان رشت به مدت ۶ هفته از ۱۵ آبان ماه تا ۳۰ آذرماه سال ۱۳۹۲ به انجام رسید. تعداد ۲۷۰ عدد تاس ماهی هیبرید جوان از مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی تهیه شد. این بچه ماهیان حاصل تکثیر بهار ۱۳۹۱ بودند که پس از پرورش و نگهداری در استخرهای خاکی این مجتمع به حوضچه‌های فایبرگلاس (۱۰ عدد در هر تانک) منتقل شدند. میانگین وزنی این ماهیان در شروع دوره آزمایش ۰/۷ ± ۲۱۲/۶ گرم بود در این آزمایش از ۲۷ مخزن فایبرگلاس با حجم ۲ مترمکعب (۰/۵×۲×۲ متر) با حجم آبگیری ۷۰۰ لیتر استفاده شد. این تحقیق شامل ۹ تیمار و هر تیمار ۳ تکرار بود. بدین‌صورت که عصاره الکلی چای سبز در سه سطح (۰، ۵۰ و ۱۰۰mg/kg) و چربی اکسیدشده نیز با سه سطح (۰، ۵۰ و ۱۰۰ درصد چربی جیره) به جیره پایه (جدول ۱) اضافه شد. عصاره چای سبز استفاده‌شده در این مطالعه، از شرکت تجاری سها جیسا واقع در شهرک صنعتی سلمان شهر مازندران و روغن ماهی مصرفی جیره از شرکت قائم ساحل پودر خزر واقع در شهرستان رشت خریداری شد و سپس در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت با هوادهی شدید (Dong *et al.*, 2011; Bogline *et al.*, 2014)، اکسید شد. برای اطمینان از اکسید شدن چربی، عدد پر اکسید بر اساس استاندارد AOAC و محتوای مالون دی آلدهید به روش Buege و Aust (۱۹۷۸) اندازه‌گیری شد (جدول ۲). در طول دوره آزمایش، غذادهی ماهیان بر اساس روش سیری و به‌صورت دستی در سه نوبت صبح، بعدازظهر و عصر (ساعات ۸، ۱۴ و ۲۰) انجام گردید. پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب در طول دوره پرورش به‌صورت روزانه موردسنجش قرار گرفتند. دمای آب، pH و

غلظت اکسیژن محلول با استفاده از دستگاه دیجیتالی (YK-2001DO, Lutron, Taipei, Taiwan) اندازه‌گیری و ثبت شد. به‌طوری‌که میانگین دمای آب در طول دوره ۱/۲۹ ± ۱۶/۷۲ درجه سانتی‌گراد، pH آب ۰/۱۱± ۷/۱۳ و میزان اکسیژن محلول ۰/۰۷ ± ۹/۵۳ میلی‌گرم در لیتر تعیین گردید.

بعد از ۶ هفته تغذیه ماهیان با جیره حاوی عصاره چای سبز و سطوح مختلف روغن ماهی اکسیدشده، ماهیان بر اساس روش فلاحت کار و همکاران (۲۰۰۹) تحت استرس حاد قرار گرفتند. بدون کاهش سطح آب مخزن، توسط تور پره ماهی‌ها صیدشده و به مدت ۱ دقیقه بیرون از آب نگهداری و سپس به مخزن بازگردانده شدند. خون‌گیری در زمان‌های ۰، ۱، ۲، ۵ و ۱۲ ساعت پس از استرس صورت گرفت. خون‌گیری زمان صفر قبل از استرس انجام و نمونه‌های آن به‌عنوان مقدار پایه در نظر گرفته شد. در تمام زمان‌های نمونه‌برداری ماهیان مورداستفاده بعد از خون‌گیری از چرخه مطالعه خارج‌شده و به مخزن ذخیره ماهیان خون‌گیری شده که از قبل آماده‌شده بود، انتقال می‌یافتند.

جهت خون‌گیری به‌صورت تصادفی و بدون کاهش سطح آب مخزن در هر زمان، ۲ عدد ماهی برای خون‌گیری از هر مخزن صیدشده و با استفاده از پودر گل میخک (۲۰۰ mg/liter) بی‌هوش و با استفاده از سرنگ ۲/۵ میلی‌لیتر فاقد ماده ضد انعقاد، از سیاهرگ ساقه‌ی دمی نمونه‌گیری انجام شد. سپس سرم نمونه‌های خون با استفاده ازسانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه، جداشده و سپس تا زمان انجام آزمایش‌های موردنظر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

جدول ۱: اجزای جیره غذایی مورداستفاده در مطالعه حاضر.

ترکیبات جیره	(درصد)
پودر ماهی	۶۰
کنجاله سویا	۸
آرد گندم	۱۰
پودر گوشت	۵
روغن ماهی	۱۰
ملاس چغندرقند	۱/۵
مکمل ویتامینه*	۲/۵
مکمل معدنی†	۱/۵
ماسه‌بادی	۱/۵

*شرکت لابراتوارهای سیانس (قزوین، ایران). هر ۱۰۰۰ گرم پرمیکس ویتامینه حاوی IU ۱۶۰۰۰۰ ویتامین A، IU ۴۰۰۰۰۰ ویتامین D_3، ۴۰ گرم ویتامین E، ۲ گرم ویتامین K_3، ۶ گرم تیامین، ۸ گرم ریبوفلاوین، ۱۲ گرم کلسیم پنتتونات، نیاسین ۴۰ گرم، پیریدوکسین ۴ گرم، اسیدفولیک، ۲ گرم، سیانوکوبالامین ۸ گرم، ۰/۲۴ گرم H_2، ۶۰ گرم ویتامین C، ۲۰ گرم اینوزیتول و ۲۰ گرم BHT است.

†شرکت لابراتوارهای سیانس (قزوین، ایران). هر ۱۰۰۰ گرم پرمیکس معدنی حاوی ۲۶ گرم آهن، ۱۲/۵ گرم روی، ۲ گرم سلنیوم، ۴۸۰ میلی‌گرم کبالت، ۴/۲ گرم مس، ۱۵/۸ گرم منگنز، ۱ گرم ید و ۱۲ گرم کولین کلراید است.

جدول ۲: گروه‌های آزمایشی در مطالعه حاضر.

تیمارها		**عصاره چای سبز** (mg/kg جیره)	**روغن ماهی اکسیدشده** (درصد چربی جیره)
(شاهد)	Control	۰	۰
(تیمار ۱)	GT_{50}	۵۰	۰
(تیمار ۲)	GT_{100}	۱۰۰	۰
(تیمار ۳)	OFO_{50}	۰	۵۰
(تیمار ۴)	OFO_{100}	۰	۱۰۰
(تیمار ۵)	$GT_{50}OFO_{50}$	۵۰	۵۰
(تیمار ۶)	$GT_{100}OFO_{50}$	۱۰۰	۵۰
(تیمار ۷)	$GT_{50}OFO_{100}$	۱۰۰	۵۰
(تیمار ۸)	$GT_{100}OFO_{100}$	۱۰۰	۱۰۰
شاخص اکسیداسیون	POV(meq/kg)	MDA(mol/kg)	
روغن ماهی اکسیدشده	۱۷/۲۱ ± ۴۱۰/۲۸	۰/۱۹ ±۷/۳۳	
روغن ماهی اکسید نشده	۰/۰۵۶ ± ۲/۷	۰/۰۰۵ ±۰/۰۸	

GT50: ۵۰ mg/kg عصاره چای سبز GT100: ۱۰۰ mg/kg عصاره چای سبز

OFO50: ۵۰٪ روغن ماهی اکسید OFO100: ۱۰۰٪ روغن ماهی اکسیدشده

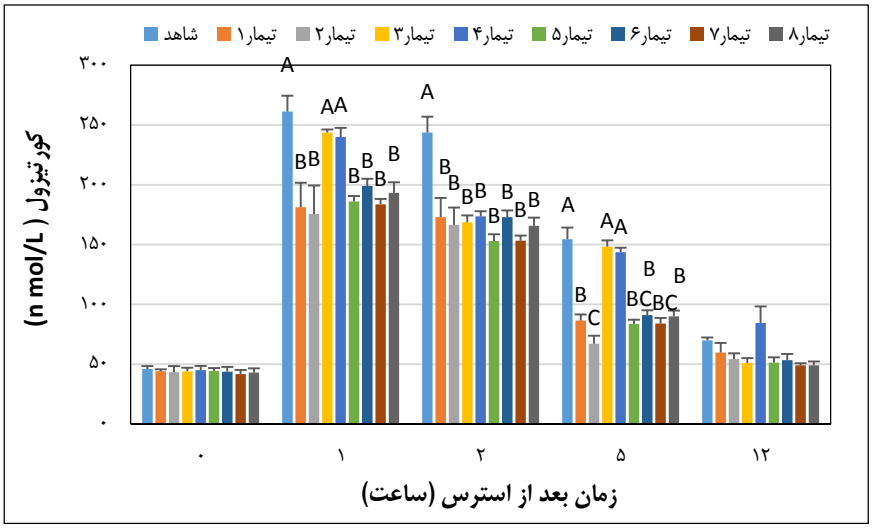
سنجش میزان کورتیزول پلاسما به روش الایزا با استفاده از کیت تجاری Monobind (USA ,Forest Lake) بر اساس روش توصیه‌شده توسط شرکت سازنده با استفاده از الایزا ریدر Mindray (Mindray, China) انجام شد. گلوکز پروتئین به روش رنگ سنجی و لاکتات به روش آنزیماتیک با کیت پارس آزمون (کرج، ایران) با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و از نرم‌افزار Microsoft Excel ویرایش ۲۰۱۰ جهت رسم نمودارها استفاده شد. داده‌ها در فصل نتایج به‌صورت میانگین ± خطای استاندارد (Mean±SE) بیان‌شده است. میزان سطح معنی‌دار بودن در این بررسی، (P<۰/۰۵) است. جهت تجزیه‌وتحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One- Way ANOVA) و جهت اندازه‌گیری اختلاف بین میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ی Duncan استفاده شد.

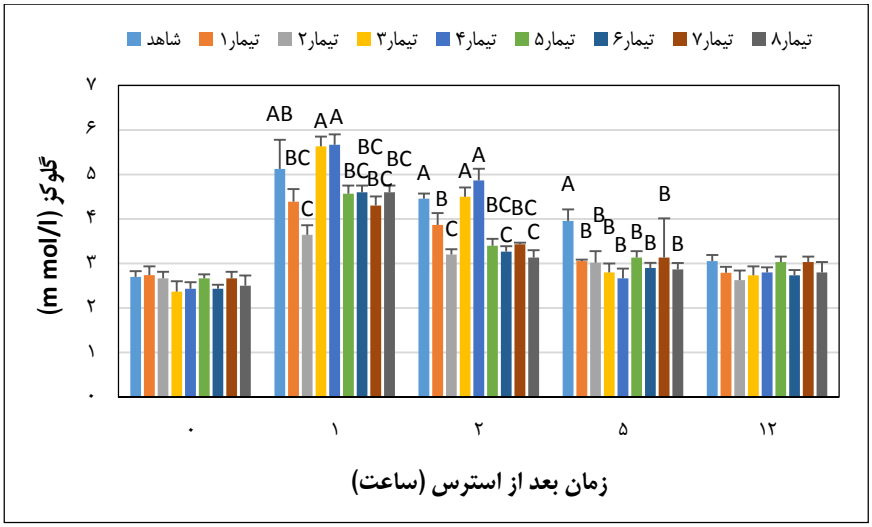
نتایج

همان‌گونه که در شکل ۱ دیده می‌شود میزان کورتیزول سرم در همه‌ی تیمارها پس از واردکردن استرس به‌صورت معنی‌داری نسبت به سطح پایه (زمان صفر) افزایش پیداکرده است (P<۰/۰۵). این روند افزایشی در تمام تیمارها تا زمان ۲ ساعت پس از قرارگیری در معرض هوا ثبت گردید اما میزان افزایش در ماهیان تغذیه‌شده با چای سبز کمتر از گروه شاهد و گروه‌های تغذیه‌شده با چربی اکسیدشده بود. در تیمارهایی که با چای سبز و چربی اکسیدشده تغذیه‌شده بودند این روند کاهشی در مقایسه با ماهیانی که همان میزان چربی اکسیدشده دریافت کرده بودند مشاهده گردید. سپس، ۵ ساعت پس از استرس میزان کورتیزول در تمام گروه‌ها کاهش پیدا کرد. در این زمان نیز اثر کاهنده چای سبز قابل‌مشاهده است. در تیمارهای تغذیه‌شده با چای سبز در این زمان کورتیزول به سطح پایه بازگشت اما در گروه تغذیه‌شده با چربی اکسیدشده این اتفاق در ساعت ۱۲ رخ داد.

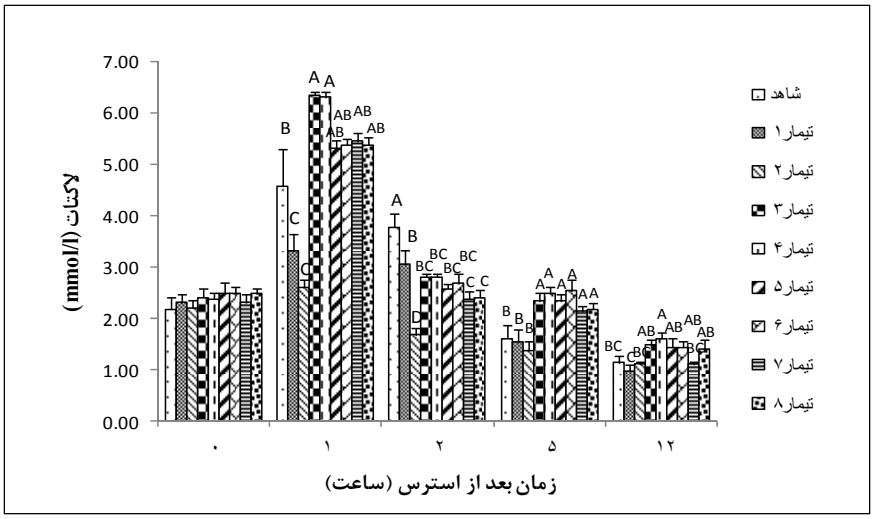
همان‌گونه که در شکل ۲ دیده می‌شود سطوح گلوکز در همه‌ی تیمارها پس از واردکردن استرس به‌صورت معنی‌داری نسبت به سطح پایه (زمان صفر) افزایش پیداکرده است (P<۰/۰۵). این روند افزایشی در تمام تیمارها تا زمان ۵ ساعت پس از قرارگیری در معرض هوا ثبت گردید اما میزان افزایش در ماهیان تغذیه‌شده با چای سبز کمتر از گروه شاهد و گروه‌های تغذیه‌شده با چربی اکسیدشده بود. در تیمارهایی که با چای سبز و چربی اکسیدشده تغذیه‌شده بودند این روند کاهشی در مقایسه با ماهیانی که همان میزان چربی اکسیدشده دریافت کرده بودند مشاهده گردید. سپس، ۱۲ ساعت پس از استرس میزان گلوکز در تمام گروه‌ها کاهش پیدا کرد. در این زمان نیز اثر کاهنده چای سبز قابل‌مشاهده است. در تیمارهای تغذیه‌شده با چای سبز در این زمان گلوکز به سطح پایه بازگشت.



شکل ۱: روند تغییرات سطوح کورتیزول سرم پس از قرارگیری در معرض هوا در زمان‌های موردبررسی در تیمارهای موردمطالعه. حروف یکسان نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها در هریک از زمان‌های نمونه‌گیری در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ است.



شکل ۲: روند تغییرات سطوح گلوکز سرم پس از قرارگیری در معرض استرس در زمان‌های مختلف در تیمارهای مختلف. حروف یکسان نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها در هریک از زمان‌های نمونه‌گیری در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ است.



شکل ۳: روند تغییرات سطوح لاکتات سرم پس از قرارگیری در معرض استرس در زمان‌های مختلف در تیمارهای مختلف. حروف یکسان نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها در هریک از زمان‌های نمونه‌گیری در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ است.

همان‌گونه که در شکل ۳ دیده می‌شود با قرارگیری در معرض استرس سطوح لاکتان سرم در همه‌ی تیمارها به‌صورت معنی‌داری نسبت به سطح پایه (زمان صفر) افزایش پیداکرده است (P<۰/۰۵). این روند افزایشی در تمام تیمارها تا زمان ۱ ساعت پس از قرارگیری در معرض هوا ثبت گردید اما میزان افزایش در ماهیان تغذیه‌شده با چای سبز کمتر از گروه شاهد و گروه‌های تغذیه‌شده با چربی اکسیدشده بود. در تیمارهایی که با چای سبز و چربی اکسیدشده تغذیه‌شده بودند این روند کاهشی در مقایسه با ماهیانی که همان میزان چربی اکسیدشده دریافت کرده بودند مشاهده گردید. سپس، ۲ ساعت پس از استرس میزان لاکتان در تمام گروه‌ها کاهش پیدا کرد. در این زمان نیز اثر کاهنده چای سبز قابل‌مشاهده است. در تیمارهای تغذیه‌شده با چای سبز در این زمان لاکتات به سطح پایه بازگشت اما در گروه تغذیه‌شده با چربی اکسیدشده این اتفاق در ساعت ۵ رخ داد.

بحث و نتیجه‌گیری

ماهیان پس از مواجهه با استرس به روش‌های متفاوتی هومئوستازی بدنشان را حفظ می‌کنند، ترشح هورمون کورتیزول یکی از این روش‌ها است (Acerete *et al.*, 2004). اندازه‌گیری میزان کورتیزول پلاسما به‌عنوان شاخص پاسخ اولیه استرس مورد ارزیابی قرار می‌گیرد (Abreu *et al.*, 2008). در ماهیان خاویاری همانند ماهیان استخوانی، افزایش سطح کورتیزول و گلوکز در پاسخ به استرس در نظر گرفته می‌شود (Cataldi, 1998; Bayunova *et al.*, 2002). نتایج حاصل تحقیق حاضر نشان داد که بین غلظت عصاره چای سبز و روغن اکسیدشده و تغییرات سطوح کورتیزول در تاس ماهی هیبرید موردمطالعه ارتباط معنی‌داری وجود دارد. بر اساس نتایج شکل ۴-۱ و ۴-۲ کمترین پاسخ‌ها به استرس (مقدار کورتیزول) به ترتیب مربوط به تیمار ۱ درصد چای سبز (۱۷۵/۶۶۵ nmol/l) و ۰/۵ درصد چای سبز (۱۸۱/۱۸۳ nmol/l) و بیشترین پاسخ‌ها مربوط به ماهیان تغذیه‌شده با جیره پایه (۲۶۱/۱۹۵ nmol/l) و ۰/۵ و ۱ درصد روغن اکسیدشده (به ترتیب ۲۴۳/۶۷ و ۲۴۰ nmol/l) بود و تغییرات مشاهده‌شده در تیمارهای فوق، ازنظر آماری در سطح معنی‌داری بودند (P<۰/۰۵). با توجه به نتایج، کمترین میانگین در بین مقادیر کورتیزول در تیمار تغذیه‌شده با عصاره چای سبز مشاهده شد. علت این امر می‌تواند وجود ترکیباتی نظیر فلاونوئیدها (همانند چای کوهی) و ال تیانین در عصاره چای سبز باشد که فلانوئیدهای موجود در چای سبز با تأثیر بر روی محور هیپوتالاموس- هیپوفیز و همچنین دستگاه گردش خون باعث کاهش تنش و اضطراب در ماهی می‌شود (Benmebarek *et al.*, 2013) و اسیدآمینه الف تیانین به علت اثرات ضد استرسی به‌وسیله‌ی ممانعت از تحریک نورون‌های قشری به‌عنوان عامل ضداسترسی مطرح است (Kimura *et al.*, 2007 ; Yoto *et al.*, 2012). از دیگر دلایلی که می‌توان برای اثر حفاظتی چای سبز پیشنهاد نمود خصوصیات آنتی‌اکسیدانی آن می‌باشد که از تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و به دنبال آن آسیب سلولی جلوگیری می‌کند (Peng *et al.*, 2006). این اسیدآمینه کنترل‌کننده کورتیزول نیز است. همچنین سبب افزایش قدرت ایمنی بدن، محافظت از سلول‌های عصبی مغز و کاهش فشارخون می‌گردد (موسوی و استکی، ۱۳۹۲). گیاهان دارویی متعددی برای کاهش استرس در ماهی مورداستفاده قرار می‌گیرند. Ji و همکاران (۲۰۰۷ و ۲۰۰۹) اثر مکمل‌های گیاهی را بر روند تغییرات شاخص‌های استرس در ماهی فلان در ژاپنی (*Paralichthys olivaceus*) و ماهی سیم دریایی قرمز (*Pagrus major*) بررسی و نتایج نشان داد که میزان کورتیزول پلاسما در تیمارهای تغذیه‌شده با جیره گیاهی به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه تغذیه‌شده با جیره کنترل بوده و گیاهان دارویی باعث بازگشت سریع کورتیزول و به دنبال آن گلوکز به مقادیر اولیه خود با تغییرات کمتر می‌شود (Ji *et al.*, 2007; Ji *et al.*, 2009). بهرامی (۱۳۹۱) اثر عصاره چای کوهی (*Stachys lavandulifolia*) را در پاسخ استرس در ماهی کپور معمولی بررسی کردند و نتایج نشان دادند که عصاره ۸٪ چای کوهی می‌تواند در کاهش پاسخ استرس مفید باشد. مطالعات نشان داده‌اند که چربی جیره نیز می‌تواند بر پاسخ استرس در ماهی تأثیر بگذارد. یکی از نکات مهم در توان پاسخ ماهی به استرس متعاقب تغذیه با چربی اکسیدشده اندازه ماهی است (Mourente *et al.*, 2002). برای مثال

Nguyen (۲۰۱۱) مشاهده کرد که در آتلانتیک سالمون با وزن ۲/۲ کیلوگرم شدت پاسخ به استرس متعاقب تغذیه با چربی اکسیدشده کمتر از مطالعه حاضر بوده است. در مطالعات انجام‌شده در سایر جانوران مشخص‌شده تغذیه با چربی اکسیدشده از طریق افزایش بیان ژن‌های دخیل در متابولیسم زنوبیوتیک ها و پاسخ به استرس موجب بروز پاسخ‌هایی شدیدتر در مقایسه با گروه شاهد می‌گردد (Sulzel *et al.*, 2004; Liu and Chan, 2000). از طرف دیگر میزان چربی اکسیدشده جیره هم می‌تواند پاسخ ماهی به استرس را تحت تأثیر قرار دهد. Martinz و همکاران (۲۰۰۷) با افزودن مقادیر چربی اکسیدشده در حد قابل‌قبول به جیره آتلانتیک هالیبوت (*Hippoglossus hippoglossus* L.) تغییری در پاسخ به استرس در مقایسه با گروه شاهد مشاهده نکردند اما افزودن ویتامین E به جیره همین ماهیان موجب بهبود پاسخ استرس گردید. همچنین در سیم دریایی‌های (*Sparus aurata*) تغذیه‌شده از جیره غذایی با میزان آراشیدونیک اسید بالا، کاهش حساسیت ماهی در برابر استرس حاد با کاهش کورتیزول پلاسما و اسمولاریته پلاسما مشاهده شد (Van Anholt *et al.*, 2004).

گلوکز از فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون است که می‌تواند به‌عنوان یکی از شاخص‌های مهم در تعیین وضعیت زیستی ماهی بکار رود و دارای نقش مهمی در تولید انرژی جانوران با تولید ATP دارد. سطوح گلوکز در هر زمان وابسته به فاکتورهای مختلفی مثل جیره غذایی، سن، تغذیه و فصل است و از مهم‌ترین پاسخ‌های ثانویه در ارتباط با بالا رفتن کورتیزول است (Wedemeryer *et al.*, 1990). در این مطالعه پس از قرارگیری ماهیان در معرض هوا، سطح گلوکز در تمام تیمارها نسبت به سطح پایه افزایش معنی‌داری پیدا کرد. نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که بین غلظت عصاره چای سبز و روغن اکسیدشده و تغییرات سطوح گلوکز در تاس ماهی هیبرید موردمطالعه ارتباط معنی‌داری وجود دارد. کمترین میزان گلوکز سرم در تیمارهای تغذیه‌شده با عصاره چای سبز مشاهده شد. علت این امر را می‌توان به وجود کاتچین‌های مختلف موجود در چای سبز نسبت داد که از افزایش گلوکز جلوگیری می‌کنند (موسوی و استکی، ۱۳۸۹). همچنین احتمالاً عصاره چای سبز از طریق تأثیر بر گلیکونئوژنز و گلیکوژنولیز کبدی و یا از طرق مهار جذب گلوکز از روده موجب کاهش گلوکز خون می‌شوند. میانگین پایین‌تر و نوسان کمتر در مقادیر گلوکز (همانند کورتیزول) پس از استرس نشان‌دهنده عملکرد بهتر فیزیولوژیکی بدن ماهی در برابر استرس و کاهش اثر آن بر جنبه‌های مختلف فیزیولوژیک است (Tahmasebi-Kohyani *et al.*, 2011).

افزایش مصرف اکسیژن در طی استرس به دلیل سریع بودن متابولیسم منجر به افزایش لاکتات می‌شود ازاین‌رو میزان لاکتات تولیدشده را می‌توان بازتابی از وضعیت متابولیک در نظر گرفت (Barton *et al.*, 2000). نتایج بررسی حاضر نشان داد که میزان لاکتات سرم در همه‌ی تیمارها پس از واردکردن استرس به‌صورت معنی‌داری نسبت به سطح پایه (زمان صفر) افزایش پیداکرده است ($P<۰/۰۵$). در تاس ماهی هیبرید افزایش لاکتات در اثر کاهش اکسیژن حاصل از استرس موجب افزایش فعالیت بی‌هوازی عضلات شده است. الگوی مشابهی از تغییرات لاکتات نیز در ماهیان فلاندر، آزاد اقیانوس اطلس، کفشک گزارش‌شده است (Waring *et al.*, 1992). Falahatkar و همکاران (۲۰۰۹) در ماهی *Huso huso*، Hur و همکاران (۲۰۰۷) در ماهی Paralichthys *olivaceus* افزایش معنی‌دار در سطح لاکتات را پس از تور گیری مشاهده کردند. این حالت می‌تواند در به پاسخ استرس در ارتباط با افزایش فعالیت‌های متابولیکی ماهی و کم اکسیژنی در طول بارگیری هنگامی‌که ماهی در تور قرارگرفته است باشد (Hur *et al.*, 2009). عصاره چای سبز می‌تواند برای تأمین انرژی موردنیاز ماهی مورداستفاده قرار بگیرد (Hwang *et al.*, 2013)، بنابراین این ماهیان متابولیسم بدن خود را به حالت بی‌هوازی تغییر نداده درنتیجه لاکتات کمتری تولید می‌شود. این می‌تواند کمتر بودن سطح لاکتات خون بعد از استرس را در ماهیان تغذیه‌شده با عصاره چای سبز در مقایسه با تیمارهای که فاقد عصاره چای سبز را توجیه نماید.

بر اساس نتایج تحقیق حاضر، افزودن عصاره چای سبز به جیره غذایی تاس ماهی هیبرید باعث بهبود پاسخ به استرس با کاهش میزان کورتیزول، گلوکز و لاکتات پس از استرس می‌گردد. همچنین استفاده همزمان عصاره چای سبز باروغن اکسیدشده در جیره، بهبود شاخص‌های استرس در مقایسه با گروه‌های هم‌سطح خود ازنظر روغن اکسیدشده (فاقد عصاره چای سبز) گردید.

منابع

بهرامی، ص.، ۱۳۹۱. تأثیر عصاره چای کوهی (*Stachys lavandulifolia*) بر پاسخ به استرس در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد رشته شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان، ۱۰۰ ص.

موسوی، ف، ا. و استکی، م.، ۱۳۹۲. رمز سلامتی با چای سبز. نشر نصوح، اصفهان. ۱۵۳ ص.

Abreu, J. S., Sanabria-Ochoa, A. I., Goncalves, F. D. and Urbinati, E. C., 2008. Stress responses of jovenile Matrinxa (*Brycon amazonicus*) after transport in a closed system under different loading densities. Ciencia Rural, 38(5): 1413-1417.

Acerete, L., Balasch, J.C., Espinosa, E., Josa, A, and Tort, L., 2004. Physiological responses in Eurasian perch (Perca fluviayilis L.) Subjected to stress by transport and handling. Aquaculture, 237: 167-178.

Baker, R. T. M. and Davies, S. J., 1996. Oxidative nutritional stress associated with feeding rancid oils to African catfish, (*Clarias gariepinus*) and the protective role of alpha-tocopherol. Aquaculture Research, 27: 795-803.

Barton, B. A., Bolling H., Hauskins B. L. and Jansen C. R., 2000. Juvenile pallid sturgeon (*Scaphirhychus albus*) and hybrid pallid 9 shovelnose (*S. albus* × *platorynchus*) sturgeons exhibit low physiological responses to acute handling and severe confinement. Comparative Biochemistry and Physiology, 126A: 120-134.

Bayunova, L., Barannikova, I. and Semenkova, T., 2002. Sturgeon stress reaction in aquaculture. Journal of Applied Ichthyology, 18: 397-404.

Benmebarek, A., Zerizer, S., ouheila Laggoune, S. and Kabouche, Z., 2013. Immunostimulatory activity of *Stachys mialhesi* de Noe. Asthma and Clinical Immunology, 9: 2-7.

Boglino, A., darias, M. J., Andree, K.B., Estevez, A, and Gisbert, E., 2014. The effects of dietary arachidonic acid on bone in flatfish larvae: the last but not the least of the essential fatty acids. Journal of Applied Ichthyology, 30: 643-651.

Buege, J. A. and Aust, S. D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. Methods in Enzymology, 52: 302-310.

Cataldi, E., Di Marco, P., Mandich, A. and Cataudella, S., 1998. Serum parameters of Adriatic sturgeon A. *naccarii* (Pisces: Acipenseriformes): effects of temperature and stress. Comparative Biochemistry and Physiology, 121A: 351-354.

Dong, X. L., Lei, W., Zhu, X. M., Han. D., Yang, Y. X and Xie, S. Q., 2011. Effects of dietary oxidized fish oil on growth performance and skin colour of Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris*). Aquaculture Nutrition, 17: 861-868.

Falahatkar, B., Poursaeid, S., Shakoorian M. and Barton, B., 2009. Responses to handling and confinement stressors in juvenile great strugeon *Huso huso*. Journal of Fish Biology, 75: 784-796.

Hamre, K., Kolas, K., Sandnes, K., Julshamn, K. and Kiessling, A., 2001. Feed intake and absorption of lipid oxidation products in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets coated with oxidized fish oil. Fish Physiology and Biochemistry, 25: 209-219.

Hur, J. W., Park, I. S. and Chang, Y. J., 2007. Physiological responses of the Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, to a series stress during the transportation process. Ichtyological research, 54: 32-37.

Hwang, J. H., Lee, S. W., Rha, S. J., Yoon, H. S., Park, E. S., Han., K. H, and Kim, S. J., 2013. Dietary green tea extract improves growth performance, body composition, and stress recovery in the juvenile black rockfish, (*Sebastes schlegeli*). Aquaculture International, 21: 525-538.

Ji, S. C., Jeong, G. S., Im, G. S., Lee, S. W., Yoo, J. H. and Takii, K., 2007. Dietary medicinal herbs improve growth performance, fatty acid utilization, and stress recovery of Japonese flounder. Fisheries Science, 73: 70-76.

Ji, S. C., Takaoka, O., Lee, S. W., Hwang, J. H., Kim, Y. S., Ishimaru, K., Seoka, M., Jeong, G. S. and Takii, K., 2009. Effects of dietary medicinal herbs on lipid metabolism and stress recovery in red sea bream *Pagrus major*. Fisheries Science**,** 75: 665-672.

Karalazos, V., Bendiksen, E.Å., Dick, J. R. and Bell, J. G., 2007. Sustainable alternatives to fish meal and fish oil in fish nutrition: effects on growth, tissue fatty acid composition and lipid metabolism. Aquaculture Nutrition, 13: 256–265.

Kimura, K., Ozeki M, Juneja L. R. and Ohira, H., 2007. L-theanine reduces psychological and physiological stress responses. Biological Psychology, 74: 39–45.

Koven, W. M., Van Anholt, R. D., Lutsky, S., Ben Atia, I., Nixon, O., Ron, B. and Tandler, A., 2003. The effect of dietary arachidonic acid on growth, survival and cortisol levels in different-age gilthead seabream larvae (*Sparus aurata*) exposed to handling or daily salinity change. Aquaculture, 228: 307-320.

Lewis-McCrea, L. M. and Lall, S. P., 2007. Effects of moderately oxidized dietary lipid and the role of vitamin E on the development of skeletal abnormalities in juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). Aquaculture, 262: 142–155.

Liu, J. F. and Chan, F. C., 2000. Forms of cytochrome P450 in the liver microsome of oxidized frying oil-fed guinea pigs. Journal of Nutritional Sciennce and Vitaminology, 46: 240-245.

Martins, D. A., Afonso, L. O. B., Hosoya, S., Lewis-McCrea L. M., Valente, L. M. P. and Lall, S. P., 2007. Effects of moderately oxidized dietary lipid and the role of vitamin E on the stress response in Atlantic halibut *(Hippoglossus hippoglossus L.)*. Aquaculture, 272: 573-580.

Mourente, G., Diaz-Salvago, E., Bell, J. G. and Tocher, D. R., 2002. Increased activities of hepatic antioxidant defence enzymes in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed dietary oxidised oil: attenuation by dietary vitamin E. Aquaculture, 214 (1-4): 343-361.

Nasopoulou, C and Zabetakis, I., 2012. Benefits of fish oil replacement by plant originated oils in compounded fish feeds. A review. LWT-Food Science and Technology, 47: 217-224.

Nguyen H. A. T., 2011. Effects of dietary oxidation status and vitamin E level on performance, fillet quality and robustness to acute stress in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Master thesis in Aquaculture, Norvegian University of Life Sciences.

Peng, S., Chen, L., Qin, J. G., Hou, J., Yu, N., Long, Z., Li, E. and Ye, J., 2009. Effects of dietary vitamin E supplementation on growth performance, lipid peroxidation and tissue fatty acid composition of black sea bream (*Acanthopagrus schlegeli*) fed oxidized fish oil. Aquaculture Nutrition, 15 (3): 329-337.

Sargent, J. R., Bell, J. G., Mcevoy, L., Tocher, D. R. and Estevez, A., 1999. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. Aquaculture, 177: 191-199.

Sülzle, A., Hirche, F. and Eder, K., 2004. Thermally oxidized dietary fat upregulates the expression of target genes of PPARα in rat liver. Journal of Nutrition, 134: 1375-1383.

Tahmasebi-Kohyani, A., Keyvanshokooh, S., Nematollahi, A., Mahmoudi, M. and Pasha-Zanoosi, H., 2011. Effects of dietary nucleotides supplementation on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) performance and acute stress response. Fish Physiolology and Biochemistry, 38: 431-440.

Van Anholt, R. D., Spanings, F. A. T., Koven, W. M., Nixon, O. and Bonga, S. E. W., 2004. Arachidonic acid reduces the stress response of gilthead seabream *Sparus aurata* L. The Journal of Experimental Biology, 207: 419-3430.

Wedemeyer, G. A., Barton, B. A. and McLeay, D. J., 1990. Stress and acclimation. In: Shreck, C. B. and Moyle. P. B. Eds. Methods for Fish Biology. American Fisheries Society, U.S.A. pp, 451-477.

Yoto, A., Motoki, M., Murao, S., and Yokogoshi, H., 2012. Effects of L-theanine or caffeine intake on changes in blood pressure under physical and psychological stresses. Journal of Physiological Anthropology, 31(1): 28-32.