

**Original Research Paper****Effects of different levels of sodium alginate with low molecular weight on some blood factors and expression of immune-related genes in the common carp (*Cyprinus carpio*)****Monire Sahli, Hamed Paknezhad^{*}, Seyed Hossein Hoseinifar, Mohammad Sudagar, Mohammad Mazandarani***Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran***Key Words**Interleukin-6 (IL-6)
Sodium alginate
Gene expression
Blood factor
Tumor necrosis factor
(TNF-1 α)
Common carp**Abstract****Introduction:** This study aimed to investigate the effects of using different levels of low molecular weight sodium alginate on blood factors and immune-related expression genes in common carp (*Cyprinus carpio*).**Materials & Methods:** For this purpose, 240 carp fry with an average weight of about 19.12 $\pm$ 0.40 g were prepared and stored in 12 200-liter tanks (4 treatments and each treatment in 3 replications). After a two-week adaptation period, juveniles with diets containing 0 (control group; diet without sodium alginate), 5, 10, and 20 g of sodium alginate per kg of food for seven weeks (daily 3% of fish body weight and fed twice a day). At the end of the experiment, some blood factors and expression of TNF-1 α and IL-6 genes were measured.**Results:** There was no significant difference in blood factors (red blood cell count, hematocrit, hemoglobin, MCV, MCH and MCHC) ($P < 0.05$), But a significant increase in white blood cell count was observed in the treatment of 0.5% sodium alginate compared to the control group ($P < 0.05$). However, differential white blood cell counts (lymphocytes, monocytes, neutrophils and eosinophils) were not significant ($P < 0.05$). There was a significant difference in the relative expression of TNF-1 α gene ($P < 0.05$). In treatments containing 1% and 2% sodium alginate, a decrease in relative expression of TNF-1 α gene was observed ($P < 0.05$), But in the treatment containing 0.5% sodium alginate, no significant difference was observed with the control group ($P < 0.05$). Also, a significant increase in relative expression of IL-6 gene was observed in the treatment containing 1% sodium alginate compared to the control group ($P < 0.05$). In the treatment containing 2% sodium alginate, the relative expression of IL-6 gene was significantly reduced ($P < 0.05$), But in the treatment containing 0.5% sodium alginate, no significant difference was observed with the control group ($P < 0.05$).**Conclusion:** The results showed that the use of sodium alginate in common carp is effective as a stimulant of the immune system.^{*} Corresponding Author's email: hkolangi@gmail.com

Received: 28 December 2021; Reviewed: 26 January 2022; Revised: 26 March 2022; Accepted: 27 April 2022

(DOI): [10.22034/AEJ.2022.328498.2770](https://doi.org/10.22034/AEJ.2022.328498.2770)

مقاله پژوهشی

اثرات سطوح مختلف سدیم آلژینات با وزن مولکولی پایین بر برخی فاکتورهای خونی و بیان ژن‌های مربوط با ایمنی در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

منیره سهلی، حامد پاکنژاد*، سیدحسین حسینی‌فر، محمد سوداگر، محمد مازندرانی

گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

چکیده

کلمات کلیدی

اینترلوکین-۶ (IL-6)
سدیم آلژینات
بیان ژن
فاکتور خونی
فاکتور نکروز کننده تومور (TNF-1α)
ماهی کپور معمولی

مقدمه: هدف این پژوهش، بررسی اثرات به کارگیری سطوح مختلف سدیم آلژینات با وزن مولکولی پایین بر فاکتورهای خونی و بیان ژن‌های مربوط با ایمنی در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) بود.

مواد و روش‌ها: بدین منظور تعداد ۲۴۰ قطعه بچه ماهی کپور با میانگین وزنی حدود $19/12 \pm 0/40$ گرم تهیه و در ۱۲ مخزن ۲۰۰ لیتری (۴ تیمار و هر تیمار در ۳ تکرار) ذخیره سازی شدند. پس از یک دوره آدپتاسیون دو هفته‌ای، بچه ماهی‌ها با جیره‌های حاوی ۰ (گروه شاهد؛ جیره بدون سدیم آلژینات)، ۵، ۱۰ و ۲۰ گرم سدیم آلژینات به ازای هر کیلوگرم غذا به مدت ۷ هفته (روزانه به میزان ۳ درصد وزن بدن ماهی و ۲ بار در روز) غذادهی شدند. در انتهای دوره آزمایش برخی فاکتورهای خونی و بیان ژن‌های IL-6 و TNF-1α اندازه گیری شدند.

نتایج: تفاوت معنی داری در فاکتورهای خونی (تعداد گلبول‌های قرمز، هماتوکریت، هموگلوبین، MCV، MCH، MCHC) مشاهده نشد ($P > 0/05$)، اما افزایش معنی دار تعداد گلبول‌های سفید در تیمار ۰/۵٪ گرم بر کیلوگرم سدیم آلژینات نسبت به گروه شاهد مشاهده شد ($P < 0/05$). با این وجود، شمارش افتراقی گلبول‌های سفید (لنفوسیت، مونوسیت، نوتروفیل و ائوزینوفیل) معنی دار نبود ($P > 0/05$). تفاوت معنی داری در بیان نسبی ژن TNF-1α مشاهده گردید ($P < 0/05$). به نحوی که در تیمارهای حاوی ۰/۱٪ و ۰/۲٪ سدیم آلژینات، کاهش نسبی بیان ژن TNF-1α مشاهده شد ($P < 0/05$)، اما در تیمار حاوی ۰/۵٪ سدیم آلژینات تفاوت معنی داری با گروه شاهد مشاهده نگردید ($P > 0/05$). هم چنین، افزایش معنی دار بیان نسبی ژن IL-6 در تیمار حاوی ۰/۱٪ سدیم آلژینات نسبت به گروه شاهد مشاهده شد ($P < 0/05$). در تیمار حاوی ۰/۲٪ سدیم آلژینات بیان نسبی ژن IL-6 به طور معنی داری کاهش یافت ($P < 0/05$)، اما در تیمار حاوی ۰/۵٪ سدیم آلژینات تفاوت معنی داری با گروه شاهد مشاهده نشد ($P > 0/05$).

بحث و نتیجه گیری: بررسی نتایج نشان داد که استفاده از سدیم آلژینات در ماهی کپور معمولی به عنوان محرک سیستم ایمنی موثر می باشد.

مقدمه

کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) یکی از گونه‌های مهم در صنعت پرورش آبزیان است (۱). این گونه دارای اهمیت اقتصادی بوده و معمولاً در آسیا و اروپا پرورش داده می‌شود. میزان تولید جهانی این ماهی ۸-۹ درصد از تولیدات آبی پروری دنیا را شامل می‌شود (۲). سیستم آبی پروری همواره دارای مشکلات فراوانی از قبیل: تغییر کیفیت آب، مشکلات تغذیه‌ای، بروز بیماری‌ها بوده است، به نحوی که شیوع بیماری‌ها، گسترش اقتصادی این صنعت را در بسیاری از کشورهای جهان تحت‌تاثیر قرار داده است (۳). در پرورش ماهی کپور معمولی و سخت‌پوستان، بسیاری از بیماری‌ها منجر به بروز خسارات و کاهش تولید ماهی می‌شوند (۴). استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در بسیاری از کشورها به علت وضع قوانین، محدود و یا ممنوع شده است (۵)، که این مورد سبب استفاده از رژیم غذایی پروبیوتیک و پریبیوتیک (محرک‌های ایمنی) به عنوان راهبرد جایگزین به جای آنتی‌بیوتیک‌ها در کنترل بیماری شده است (۶). آلزینات سدیم یک بیوپلیمر ارزان در دسترس است، که به دلیل داشتن خواصی چون تجزیه پذیری زیستی، خصوصیات هیدروفیلیکی، حساسیت به PH و ماهیت طبیعی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در سال‌های اخیر برای کاربردهای بیوتکنولوژی، پزشکی، دارویی و مخصوصاً صنایع غذایی مورد استفاده بوده است. هم‌چنین از این ماده، در بسته‌بندی مواد غذایی استفاده می‌شود و به عنوان ماده امولسیون کننده و ژل ساز در این مواد به کار می‌رود. آلزینات سدیم توانایی بالایی در تشکیل فیلم دارد و در نتیجه می‌توان آن را به عنوان یک پوشش غذایی مناسب استفاده کرد. محرک‌های سیستم ایمنی شامل یک گروه از ترکیبات زیستی و سنتتیک هستند که موجب افزایش دفاع غیراختصاصی و یا اختصاصی در حیوانات شده (۷) و هم‌چنین سبب افزایش مقاومت بدن آن‌ها نسبت به طیف گسترده‌تری از آلودگی‌های پاتوژنی و عوامل عفونی نسبت به استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و بسیاری از واکسن‌ها می‌گردد، بدون این که بیماری بالینی، خطر مسمومیت و سرطان را به وجود آورند (۴). Akbari و همکاران، با بررسی اثرات پروبیوتیک بالقوه *Enterococcus casseliflavus* (EC-001) بر عملکرد رشد، ایمنی، و مقاومت در برابر عفونت *Aeromonas hydrophila* در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) دریافتند که گنجاندن رژیم غذایی $10^8 \times 1$ CFU g-1 $10^9 \times 1$ به طور قابل توجهی پروتئین کل سرم، آلبومین و محتوای ایمونوگلوبولین را افزایش داده است ($P < 0.05$). تغذیه ماهیان با خوراک $10^9 \times 1$ CFU g-1 منجر به افزایش قابل توجهی در فعالیت لیروزیم مخاطی سرم و پوست در مقایسه با گروه‌های دیگر شد ($P < 0.05$). مرگ و میر تجمعی در ماهیان تیمار شده (از ۱۰ تا ۲۲٪) نسبت به

گروه شاهد (۳۱٪) پس از به چالش کشیدن ماهیان با عفونت *A. hydrophila* کم تر بود، درحالی که ماهیان تغذیه شده با *E. casseliflavus* (EC-001) در $10^9 \times 1$ CFU g-1 کم‌ترین میزان مرگ و میر را نشان دادند ($P < 0.05$) (۸). Wang و همکاران، تأثیر سطوح مختلف استویوزید بر عملکرد رشد، فعالیت آنزیم‌های گوارشی، ظرفیت آنتی اکسیدانی و بیان ژن ماهی کپور آینه‌ای جوان (*Cyprinus carpio*) را مطالعه نموده و دریافتند که میزان افزایش وزن (WGR)، فاکتور وضعیت (CF) و محتوای لاشه به صورت خطی افزایش یافتند ($P < 0.05$)، اما شاخص کبدی (HSI) به صورت خطی کاهش یافت ($P < 0.05$). مکمل غذایی استویوزید تمایل به بهبود محتوای پروتئین تام (TP)، کلسترول تام (TCHO) و لیپوپروتئین با چگالی کم (LDL) داشت ($P < 0.10$). افزودن استویوزید موجب افزایش فعالیت پروتئاز و کاهش فعالیت آمیلاز در قسمت جلویی روده شد ($P < 0.10$). بیان mRNA ژن فاکتور نکروز تومور آلفا ($TNF-\alpha$)، اینترلوکین-۱ بتا ($IL-1\beta$) و فاکتور تمایز میلوئیدی ۸۸ ($MyD88$) تفاوت معنی‌داری نداشت ($P < 0.05$) (۹). Ashouri و همکاران، اثرات ترکیبی سدیم آلزینات با وزن مولکولی پایین و پدیوکوکوس اسیدیل‌اکتیس ($MA 18 / M5$) بر عملکرد رشد، پاسخ‌های خون‌شناسی و ایمنی ذاتی بچه‌ماهیان سی‌بس آسیایی (*Lates calcarifer*) را مطالعه نموده و بیان داشتند که تعداد گلبول‌های قرمز و سفید خون با تجویز منفرد یا ترکیبی Low Molecular Weight Sodium Alginate (LMWSA) و PA در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش بود ($P < 0.05$). تجویز منفرد PA و مکمل ترکیبی LMWSA-5 gkg-1 با PA به طور قابل توجهی عملکرد رشد و مصرف خوراک را در مقایسه با سایر گروه‌های آزمایشی افزایش داد ($P < 0.05$). این نتایج نشان داد که تجویز ترکیبی LMWSA و PA می‌تواند به عنوان افزودنی خوراک مفید و محرک ایمنی در بچه ماهیان سی‌باس آسیایی در نظر گرفته شود (۱۰). Noei Taadoli و Taati، در پژوهشی به منظور بررسی عملکرد رشد و برخی از پارامترهای خونی و ایمنی بچه‌ماهی کپور معمولی بیان کردند که استفاده از انواع متنوع افزودنی‌های گیاهی به منظور ارتقای شاخص‌های رشد و بهبود پارامترهای خونی و ایمنی ماهیان نیاز به مطالعات بیش‌تری بر روی سنین مختلف گونه‌های ماهیان دارد تا بتوان نتایج ضد و نقیض دانشمندان را تفسیر نمود. با این حال، اختلاف موجود در نتایج تحقیقات دانشمندان مختلف را می‌توان به نوع گونه پرورشی، اندازه، سن، طول دوره پرورش، شرایط محیطی، رفتارهای تغذیه‌ای، خصوصیات فیزیولوژیک گونه، نوع مواد اولیه به کار رفته در تهیه جیره‌های غذایی، کمیت و کیفیت آن‌ها، نوع افزودنی گیاهی و ترکیب انواع اسانس‌های آن و میزان سطح مورد استفاده ربط داد (۱۱). Ghiasi و Falahatkar، مطالعه‌ای را به منظور بررسی اثر تزریقی کورتیزول بر شاخص‌های

با سطوح مختلف سدیم آلژینات به مدت ۷ هفته تغذیه شدند. سدیم آلژینات (دارای فرمول شیمیایی $C_5H_7O_4COONa$ ، محصول شرکت دالین کشور چین، $PH=6-8$ ، $VISCOSITY= 500-750$ (CPS)) به جیره غذایی پایه اضافه شد. این آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام پذیرفت که شامل ۴ تیمار و هر کدام در ۳ تکرار بود. تیمارهای غذایی شامل تغذیه بچه ماهی کپور با جیره های غذایی حاوی سطوح ۰ (شاهد)، ۵، ۱۰ و ۲۰ گرم سدیم آلژینات به ازای هر کیلوگرم غذا بود (۶). برای تهیه جیره آزمایشی سطح مدنظر سدیم آلژینات به جیره غذایی پایه افزوده شد و به صورت پلت آماده گردید. پس از زیست سنجی و تعیین بیوماس، بچه ماهیان هر تیمار با جیره های غذایی به صورت دستی و براساس حداکثر ۳٪ وزن توده بدنی در ۲ نوبت در روز تغذیه شدند.

بیان ژن های مرتبط با ایمنی: استخراج RNA کل از روده انجام شد. نمونه بافت های حاصل، بلافاصله به تانک ازت مایع انتقال داده شدند. استخراج RNA کل با استفاده از Biozol (Geneall) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. کمیت و کیفیت RNA با استفاده از اسپکتروفتومتری و ژل آگارز ۱٪ انجام گردید، سپس RNAها تا زمان سنتز cDNA در فریزر ۸۰- نگه داری شدند. برای سنتز cDNA از کیت Reverse-Transcriptase (Genall, Korea) استفاده شد و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده سنتز cDNA صورت گرفت. اثبات تکثیر cDNA، با استفاده از پرایمرهای یک Normal PCR انجام پذیرفت و محصول واکنش روی ژل آگار ۱٪ الکتروفورز گردید، از داده موجود در بانک های ژنی NCBI پرایمر ژن های مورد نظر ($TNF-1\alpha$ ، IL-6) طراحی و ژن بتا-اکتین به عنوان ژن رفرنس (جدول ۱) استفاده شد (۱۴).

رشد، میزان مصرف غذا و میزان کورتیزول پلاسما در بچه ماهی کپور معمولی انجام دادند و دریافتند که افزایش کورتیزول در دوره کوتاهی پس از تزریق، موجب تغییر در محتوای کورتیزول شده و می تواند با کاهش مصرف غذا، اثرات منفی بر رشد داشته باشد (۱۲). Fujiki و Yano، اثرات آلژینات سدیم بر سیستم دفاعی غیر اختصاصی کپور معمولی را بررسی نمودند و بیان کردند که تعداد فاگوسیت های تحریک یافته توسط سدیم آلژینات ۲ تا ۵۰ برابر بیش تر از تعداد فاگوسیت های تحریک یافته توسط عوامل محرک سلول ماده مترشح صفاقی شناخته شده هنگام تزریق در همان دوز بود. هم چنین در سنجش شیمیایی، مشخص شد که سدیم آلژینات برخی از زیر جمعیت های لکوسیته درون حفره صفاقی را برای تولید و یا ترشح فاکتور شیمیایی تحریک می کند، درحالی که به طور هم زمان حساسیت فاگوسیت های فوق کلیه به فاکتورها را افزایش می دهد (۱۳). هدف از این پژوهش، بررسی اثرات سطوح مختلف سدیم آلژینات با وزن مولکولی پایین بر فاکتورهای خونی و بیان ژن های مربوط با ایمنی در ماهی کپور معمولی است.

مواد و روش ها

این پژوهش در سالن آبی پروری شهید ناصر فضلی برآبادی دانشکده شیلات و محیط زیست دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. در این پژوهش بچه ماهیان کپور از مرکز تکثیر و پرورش بخش خصوصی تهیه شدند. تعداد ۲۴۰ قطعه بچه ماهی کپور معمولی (میانگین وزنی $19/12 \pm 0/40$ گرم)، تامین و با تراکم ۲۰ قطعه بچه ماهی در تانک های آزمایشی رهاسازی و به مدت ۲ هفته جهت سازگاری با شرایط آزمایشی نگه داری شدند و سپس

جدول ۱: طراحی پرایمر ژن های مورد مطالعه

ژن	کد دستیابی در بانک ژن	توالی پرایمر	دمای ذوب پرایمر
بتا اکتین	M24113.1	F: AGACATCAGGGTGTGCATGGTTGGT R: CTCAAACATGATCTGTGTCAT	59
IL1b	AB010701.1	F: ACCAGCTGGATTGTGTCAGAAAG R: ACATACTGAATTGAACTTTG	58
IL6	AY102633	F: ACACAAAGCACTGTGTGGACG R: GGCTGAAGACGCTCCTGAC	59
TNF-1 α	AB112732	F: GGTGATGGTGTGCGAGGAGGAA R: TGGAAAGACACCTGGCTGTA	58

ترتیب توسط روش های بروموکرزول، اکسیداز و بیوره سنجیده شدند (۱۶). اندازه گیری آنزیم ها با استفاده از کیت های آزمایشگاهی انجام شد و اندازه گیری ALP و ALT به روش آنزیماتیک کینتیک صورت گرفت (۱۷). جهت اندازه گیری ایمونوگلوبولین کل از روش Siwicki استفاده گردید (۱۸). این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. در پایان از نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ جهت آنالیز داده ها استفاده

فاکتورهای خونی: تعداد گلبول های سفید، تعداد گلبول های قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت، MCHC، MCH، MCV براساس فرمول های استاندارد تعیین گردید. هم چنین شمارش افتراقی گلبول های سفید به روش Houston شامل نوتروفیل، مونوسیت، لنفوسیت و ائوزینوفیل انجام شد (۱۵). برای اندازه گیری غیرالکترولیت ها نیز از کیت های آزمایشگاهی استفاده شد. آلومین، گلوکز و پروتئین به

اما سدیم آلزینات ۲٪ به صورت معنی داری باعث کاهش بیان ژن شده است ($P > 0.05$). علاوه بر این، در تیمار حاوی ۵٪ سدیم آلزینات اختلاف معنی داری با گروه شاهد مشاهده نشد ($P > 0.05$) (شکل ۲).

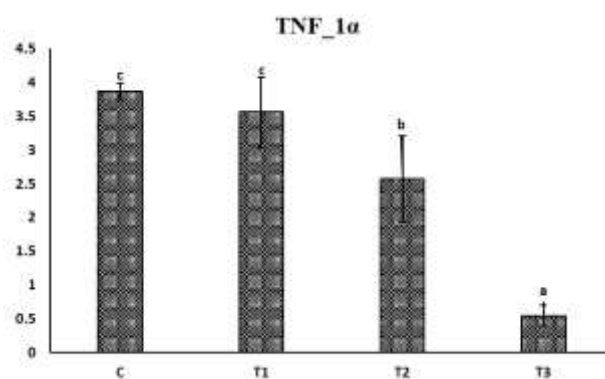
فاکتورهای خونی: سدیم آلزینات ۵٪ و ۲٪ به ترتیب بیشترین

تاثیر را روی گلبول قرمز نمونه‌ها داشته است، اما سدیم آلزینات ۱٪ دارای تاثیر منفی روی گلبول قرمز نمونه‌ها بود. اختلاف معنی داری بین جیره‌های آزمایشی با گروه شاهد مشاهده نشد ($P > 0.05$). سدیم آلزینات ۲٪ بیشترین تاثیر را روی هموگلوبین نمونه‌های مورد مطالعه داشته است، اما سدیم آلزینات ۵٪ و ۱٪ دارای تاثیر منفی روی هموگلوبین نمونه‌ها بود، اما تفاوت معنی داری بین تیمارها و گروه شاهد وجود نداشت ($P > 0.05$). سدیم آلزینات ۱٪ و ۲٪ تاثیر منفی روی درصد هماتوکریت نمونه‌ها داشت و سدیم آلزینات ۵٪ تفاوتی با گروه شاهد نداشت، با این حال تفاوت معنی داری بین تیمارها و گروه شاهد مشاهده نشد ($P > 0.05$). سدیم آلزینات ۱٪ بیشترین تاثیر را روی هموگلوبین متوسط سلولی (MCH) نمونه‌های مورد مطالعه داشت، اما سدیم آلزینات ۵٪ و ۲٪ دارای تاثیر منفی روی هموگلوبین متوسط سلولی نمونه‌ها بود و تفاوت معنی داری بین تیمارها و گروه شاهد وجود نداشت ($P > 0.05$). سدیم آلزینات ۲٪ و ۱٪ به ترتیب، بیشترین تاثیر را روی غلظت متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز (MCHC) نمونه‌های مورد مطالعه داشت، اما سدیم آلزینات ۵٪ دارای تاثیر منفی روی غلظت متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز نمونه‌ها بود. با این حال، تفاوت معنی داری بین تیمارها و گروه شاهد مشاهده نشد. سدیم آلزینات ۱٪ بیشترین تاثیر را روی حجم متوسط گلبولی (MCV) نمونه‌های مورد مطالعه داشت، اما سدیم آلزینات ۵٪ و ۲٪ دارای تاثیر منفی روی حجم متوسط گلبولی نمونه‌ها بود. تفاوت معنی داری بین تیمارها و گروه شاهد مشاهده نشد ($P > 0.05$). سدیم آلزینات ۵٪ افزایش معنی دار گلبول‌های سفید نسبت به گروه شاهد را نداشت و تفاوت معنی داری بین تیمارهای تغذیه شده با سدیم آلزینات و گروه شاهد مشاهده نشد ($P > 0.05$). سدیم آلزینات ۲٪ و ۱٪ به ترتیب، دارای بیشترین تاثیر روی لنفوسیت نمونه‌های بررسی شده بودند، اما سدیم آلزینات ۵٪ تاثیر منفی روی لنفوسیت نمونه‌ها داشت. با این وجود، تفاوت معنی داری بین تیمارها و گروه شاهد مشاهده نشد ($P > 0.05$). سدیم آلزینات ۱٪ و ۵٪ به ترتیب، بیشترین تاثیر را روی نوتروفیل نمونه‌های مورد مطالعه داشت، اما در سدیم آلزینات ۲٪ هیچ تاثیری روی نوتروفیل نمونه‌ها مشاهده نشد. با این حال، تفاوت معنی داری بین تیمارها و گروه شاهد دیده نشد ($P > 0.05$). بیشترین تاثیر منفی روی مونوسیت مورد مطالعه را سدیم آلزینات ۲٪ دارا بوده است. همچنین تفاوت معنی داری بین تیمارها و گروه شاهد دیده نشد ($P > 0.05$). گروه

گردید. مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون One way Anova و Tukey در سطح اطمینان ۹۵٪ انجام گرفت. هم چنین برای آنالیز داده‌های بیان ژن از روش رسم منحنی استاندارد و $2^{-\Delta\Delta Ct}$ استفاده شد.

نتایج

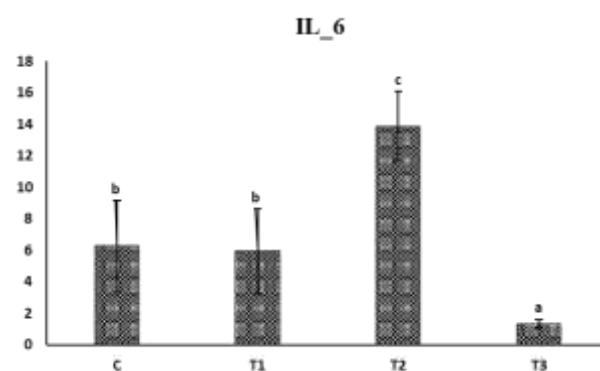
بیان ژن: استفاده از جیره حاوی سدیم آلزینات ۲٪ منجر به کاهش معنی دار بیان نسبی ژن $TNF_{1\alpha}$ نسبت به گروه شاهد شد ($P < 0.05$). علاوه بر این، در سدیم آلزینات ۱٪ نیز کاهش معنی دار بیان ژن $TNF_{1\alpha}$ نسبت به گروه شاهد مشاهده گردید ($P < 0.05$)، اما در سدیم آلزینات ۵٪ تفاوت معنی داری با گروه شاهد مشاهده نشد ($P > 0.05$) (شکل ۱).



شکل ۱: تاثیر سطوح مختلف سدیم آلزینات بر روی بیان ژن

$TNF_{1\alpha}$ نمونه‌های مورد مطالعه

وجود حروف غیرهمنام کوچک روی ستون‌ها بیانگر اختلاف معنی دار است ($P < 0.05$)



شکل ۲: تاثیر سطوح مختلف سدیم آلزینات بر روی بیان ژن IL-6

نمونه‌های مورد مطالعه

وجود حروف غیرهمنام کوچک روی ستون‌ها بیانگر اختلاف معنی دار است ($P < 0.05$)

استفاده از سدیم آلزینات ۱٪ در جیره غذایی منجر به افزایش معنی دار بیان نسبی ژن IL-6 نسبت به گروه شاهد گردید ($P < 0.05$).

شاهد دیده نشد ($P>0.05$). تیمارهای حاوی سدیم آلژینات باعث کاهش گلوکز در نمونه های مورد مطالعه شده و تفاوت معنی داری بین تیمارها با گروه شاهد دیده نشد ($P>0.05$). سدیم آلژینات ۰/۵٪ بیش ترین تاثیر را روی نمونه های مورد مطالعه داشت، اما سدیم آلژینات ۱٪ و ۲٪ دارای تاثیر منفی روی آلبومین نمونه ها بود و تفاوت معنی داری بین تیمارها وجود نداشت ($P>0.05$). همه گروه های حاوی سدیم آلژینات باعث افزایش پروتئین کل سرم نسبت به گروه شاهد شدند و بین تیمارهای حاوی سدیم آلژینات و گروه شاهد تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($P>0.05$). تفاوت معنی داری از نظر ایمونو گلوبین کل سرم در گروه های تغذیه شده با سدیم آلژینات و گروه شاهد مشاهده نشد ($P>0.05$). علاوه بر این، به جز سدیم آلژینات ۰/۵٪ که کاهش ایمونوگلوبولین کل سرم را داشت، در تیمارهای ۱٪ و ۲٪ افزایش آن مشاهده گردید (جدول ۲).

شاهد و سدیم آلژینات ۱٪ دارای نتایج مشابهی بودند و تغییری در اتوزینوفیل آن ها مشاهده نگردید، اما در سدیم آلژینات ۰/۵٪ و ۲٪ تاثیر مثبتی روی اتوزینوفیل نمونه های مورد مطالعه دیده شد. با این وجود، تفاوت معنی داری بین تیمارها و گروه شاهد وجود نداشت ($P>0.05$). گروه شاهد و سدیم آلژینات ۱٪ دارای نتایج مشابهی بودند و تغییری در اتوزینوفیل آن ها مشاهده نگردید، اما در سدیم آلژینات ۰/۵٪ و ۲٪ تاثیر مثبتی روی اتوزینوفیل نمونه های مورد مطالعه دیده شد. با این وجود، تفاوت معنی داری بین تیمارها و گروه شاهد وجود نداشت ($P>0.05$). در تمام تیمارهای حاوی سدیم آلژینات، افزایش آلكالین فسفاتاز مشاهده گردید و بیشینه آن در جیره حاوی ۰/۵٪ سدیم آلژینات بود. بین تیمارها و گروه شاهد تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($P>0.05$). میزان آمینوترانسفراز در جیره های حاوی سدیم آلژینات کاهش داشته و بیش ترین میزان کاهش در سدیم آلژینات ۰/۵٪ مشاهده شد. تفاوت معنی داری بین تیمارها و گروه

جدول ۲: تاثیر سطوح مختلف سدیم آلژینات بر فاکتورهای خونی نمونه های مورد مطالعه

تیمار	شاهد	سدیم آلژینات ۰/۵٪	سدیم آلژینات ۱٪	سدیم آلژینات ۲٪
گلبول قرمز	۰/۱۵±۱/۸۲	۰/۷۸±۲/۲۴	۰/۱۱±۱/۴۷	۰/۱۷±۲/۱۴
هموگلوبین	۸/۰۱±۱/۹۰	۷/۲۲±۰/۰۹	۷/۶۲±۰/۸۱	۹/۲۴±۱/۵۵
هماتوکریت	۴۴/۶۰±۱۲/۷۶	۳۵/۲۵±۱۲/۷۶	۵۱/۹۵±۵/۸۸	۴۲/۹۷±۴/۲۱
هموگلوبین متوسط سلولی	۴/۴۱±۰/۸۵	۴/۴۰±۰/۱۰	۴/۲۲±۰/۲۴	۴/۳۵±۰/۴۲
غلظت متوسط هموگلوبین گلبول های قرمز	۳/۶۴±۰/۳۴	۳/۵۷±۰/۱۱	۳/۸۰±۰/۱۸	۳/۸۶±۰/۱۹
حجم متوسط گلبولی	۲/۲۸±۱۸/۳۷	۲/۰۲±۸۰/۱۲	۲/۳۴±۳۸/۵۹	۱/۸۲±۱۹/۴۳
گلبول سفید	۰/۷±۶/۰۰	۰/۹۰±۳/۴۰	۱/۲۵±۴/۱۷	۰/۴۰±۲/۸۰
لنفوسیت	۵/۲۰±۰/۰۳	۵/۲۰±۰/۰۲	۵/۲۱±۰/۰۳	۵/۲۴±۰/۰۴
نوتروفیل	۰/۴۸±۰/۸۳	۰/۹۶±۰/۸۳	۱/۰۹±۰/۹۶	۰/۴۸±۰/۸۳
مونوسیت	۲/۷۹±۰/۲۷	۲/۷۶±۰/۲۵	۲/۶۲±۰/۲۹	۲/۱۰±۰/۶۷
اتوزینوفیل	۰	۰/۲۹±۰/۵۱	۰	۰/۴۸±۰/۸۳
آلكالین فسفاتاز	۵۱/۴۶±۵۰/۷۴	۲۲/۳۶±۱۴/۷۷	۳۸/۶۰±۲۶/۵۹	۲۸/۴۹±۱۱/۲۹
آلاتین آمینوترانسفراز	۵/۰۷±۱/۹۱	۱۵/۴۴±۵۰/۸۷	۱۱/۲۵±۶/۵۲	۸/۱۶±۹/۵۵
گلوکز	۴۷/۱۷±۱/۳۱	۳۵/۰۵±۱/۰۷	۴۰/۴۴±۱/۰۱	۵/۷۴±۱/۲۱
آلبومین	۱/۴۸±۰/۰۴	۱/۸۶±۰/۰۶	۱/۴۵±۰/۵۰	۱/۴۰±۰/۱۸
پروتئین کل سرم	۳/۳۴±۰/۱۶	۳/۸۳±۰/۵۰	۳/۵۴±۰/۹۲	۴±۰/۰۶
ایمونوگلوبولین کل سرم	۱/۲۳±۰/۵۲	۱/۲۲±۰/۵۵	۱/۷۷±۰/۸۵	۱/۴۰±۰/۷۲

بحث

TNF-1α (فاکتور نکروز کننده تومور)، یکی از سایتوکین هایی است که بر روی سلول های ایمنی موثر است و بیش تر، نقش پروتئین های واسطه را در سلول های ایمنی بازی می کند. نقش اصلی TNF-1α در تنظیم سلول های ایمنی است، که از نظر ساختاری، پروتئین های

مرتبط، محلول و یا متصل به غشاء می باشند (۱۹). این سایتوکین به عنوان یک بیومارکر و اندیکاتور سیستم ایمنی در پستانداران و ماهی ها مطرح می باشد (۲۰). بررسی نتایج تحقیق حاضر نشان داد که استفاده از سدیم آلژینات در جیره غذایی منجر به کاهش معنی دار بیان ژن TNF-1α شده است. در گروه های سدیم آلژینات ۱٪ و ۲٪ تاثیر منفی روی نمونه های مورد مطالعه مشاهده شد و بیش ترین اثر

منفی در جیره حاوی سدیم آلزینات ۲٪ بود. ولی در سدیم آلزینات ۵٪ تفاوتی با گروه شاهد مشاهده نگردید. Kolangi و همکاران، با بررسی اثرات جیره غذایی حاوی گالاتوالیگوساکارید بر بیان ژن‌های درگیر در ایمنی ($TNF-1\alpha$) در ماهی قرمز (*Carassius auratus gibelio*) نشان دادند که گالاتوالیگوساکارید با سطح ۱ و ۲ درصد در شش هفته باعث افزایش ایمنی به واسطه افزایش بیان نسبی سایتوکین‌های التهابی از جمله ($TNF-1\alpha$) در ماهی قرمز می‌شود (۲۱). هم‌چنین Khodadadian و همکاران، در مطالعه‌ای اثرات پریبیوتیک پودر قارچ را بر بیان ژن‌های ایمنی بچه‌ماهی کپور معمولی را بررسی کردند که نتایج آن نشان داد، ژن‌های سایتوکین از جمله $TNF-1\alpha$ افزایش بیان داشته‌اند و بیش‌ترین میزان بیان در تیمار ۲ درصد پودر قارچ مشاهده گردید (۲۲). در مقابل براساس پژوهشی که توسط Huttenhuis و همکاران صورت گرفت، مشاهده نمودند که بیان ژن $IL-1\beta$ و $TNF-1\alpha$ در روده با تجویز خوراکی محرک‌های ایمنی در ماهی کپور معمولی تحت تاثیر قرار نمی‌گیرد (۲۳). اینترلوکین‌ها هم از سایتوکین‌های مهم مکانیسم دفاعی میزبان در پاسخ به استقرار و یا حمله عوامل بیماری‌زا هستند (۲۴، ۲۵). $IL-6$ به‌عنوان یک واسطه التهابی در سیستم ایمنی در نظر گرفته می‌شود (۲۶). ماکروفاژها منبع اصلی $IL-1$ ، $IL-6$ ، $IL-12$ هستند و به‌عنوان سلول‌های اصلی موثر در مقاومت علیه عوامل عفونی و سلول‌های تومور مطرح هستند. ظاهراً تولید متعادل $IL-6$ و $IL-8$ برای اجازه دادن به هر دو ایمنی ذاتی و اکتسابی بسیار مهم است یعنی سیستم به‌درستی به پاتوژن‌های ماهی پاسخ می‌دهد (۲۷). نتایج پژوهش نشان داد که استفاده از سدیم آلزینات ۱٪ در جیره غذایی منجر به افزایش معنی‌دار بیان نسبی ژن $IL-6$ نسبت به گروه شاهد شده است ($P < 0.05$)، اما سدیم آلزینات ۲٪ به‌صورت معنی‌داری باعث کاهش بیان ژن شده است ($P < 0.05$). هم‌چنین در تیمار حاوی ۵٪ سدیم آلزینات اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد وجود نداشت ($P > 0.05$). Ren و همکاران، در مطالعه‌ای اثر محافظتی لنتین بر پاسخ التهابی ناشی از لیپوپلی ساکارید در روده تایمن جوان (*Hucho taimen*, Pallas) را بررسی کردند و دریافتند که لنتین پاسخ التهابی ناشی از لیپوپلی ساکارید را کاهش داده و میزان بیان نسبی ژن $IL-6$ کاهش می‌یابد (۲۸). هم‌چنین در مطالعه‌ای که توسط Djordjevic و همکاران، انجام شد مشخص شد که پاسخ التهابی روده ناشی از لیپوپلی ساکارید سبب افزایش بیان $TNF-1\alpha$ ، $IL-1\beta$ ، $IL-6$ و $IL-8$ می‌شود (۲۹). دانشمندان معتقدند که فاکتورهای خونی و سرمی ماهیان در گونه‌های مختلف با هم تفاوت داشته و هم‌چنین، ارتباط و وابستگی زیادی با شرایط محیطی، تغذیه‌ای، سن و ... دارد (۱۹). زیستگاه ماهیان و شرایط موجود در آن نظیر: درجه حرارت، مواد غذایی و آلودگی‌ها بر مقادیر

متابولیت‌ها و سلول‌های خونی موثر است (۳۰). Avekh Keysami و همکاران، اثربخشی باکتری پروبیوتیکی *Bacillus subtilis* بر رشد و بازماندگی لارو ماهی کپور معمولی در حوضچه‌های غیرخاکی را مطالعه کردند و نتیجه گرفتند که میانگین افزایش وزن در تیمارها در غلظت‌های پائین‌تر و بالاتر از 10^6 کاهش داشت. هم‌چنین در افزایش وزن، روزانه و ضریب تبدیل غذایی بین تیمارها و شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($P < 0.05$). درصد بقاء بین شاهد و تیمارها اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.05$), لیکن در کیفیت آب و ترکیب بیوشیمیایی لاشه لارو کپور بین شاهد و تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($P > 0.05$) (۳۱). در پژوهشی Shirmohammadli و همکاران، ارتباط بین وزن و برخی از شاخص‌های خون‌شناسی و بیوشیمیایی سرم خون ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) را بررسی نموده و گزارش کردند که افزایش وزن ماهی کپور نقره‌ای در میزان گلبول‌های سفید، گلبول‌های قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت، MCV، MCH، MCHC، PLT، لنفوسیت، مونوسیت و گرانولوسیت تاثیر نداشته و از این لحاظ هیچ‌گونه اختلاف معنی‌دار آماری در گروه‌های مختلف وزنی وجود نداشت ($P > 0.05$). هم‌چنین نتایج بررسی برخی از شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون نشان داد به‌جز کلسیم که در گروه وزنی ۱۶۰۰ گرم کپور نقره‌ای بیش‌تر از گروه‌های وزنی دیگر بود ($P < 0.05$)، افزایش وزن تاثیری در مقدار گلوکز، اوره، تری‌گلیسرید، کلسترول، فسفر، سدیم، پتاسیم، آلومین و توتال پروتئین ندارد ($P > 0.05$) (۳۲). Sahli و همکاران، اثرات سطوح مختلف سدیم آلزینات با وزن مولکولی پایین بر عملکرد رشد و شاخص‌های ایمنی موکوس در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) را بررسی کردند و دریافتند که شاخص‌های رشد، ایمونوگلوبولین کل موکوس و لیزوزیم موکوس بین تیمارهای تغذیه شده با سدیم آلزینات با وزن مولکولی پایین و گروه شاهد تفاوت معنی‌داری وجود ندارد ($P > 0.05$). ولی افزایش معنی‌دار پروتئین کل موکوس در همه تیمارهای حاوی سدیم آلزینات نسبت به گروه شاهد مشاهده شد ($P < 0.05$) و بیش‌ترین میزان پروتئین کل موکوس در تیمار ۱٪ سدیم آلزینات مشاهده شد ($P < 0.05$). Bohlouli و Sadeghi، عملکرد رشد و شاخص‌های هماتولوژیک و ایمونولوژیک ماهی قزل‌آلای رنگین کمان را بررسی نموده و دریافتند که اختلاف معنی‌داری بین گروه شاهد و سایر تیمارها در شاخص‌های خون‌شناسی مانند تعداد گلبول قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین وجود ندارد، اما تفاوت معنی‌داری در گلبول‌های سفید، لنفوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها وجود دارد که به‌جز برخی شاخص‌ها، بقیه موارد با نتایج به‌دست آمده مطابقت داشت. در پژوهشی افزودن اینولین ۵٪ و ۲ درصد به جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) باعث

منابع

1. Shirali, S., Majd, N.E., Mesbah, M. and Seifi, M.R., 2012. Histological studies of common carp ovarian development during breeding season in Khuzestan Province, Iran. World Journal of fish and marine sciences. 4(2): 159-164.
2. FIGIS. 2013. Fisheries Global Information System (FAO-FIGIS) – Web site. Fisheries Global Information System (FIGIS). FI Institutional Websites. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. (available at: www.fao.org/fishery/figis/en).
3. Hoseinifar, S.H., Sharifian, M., Vesaghi, M.J., Khalili, M. and Esteban, M.Á., 2014. The effects of dietary xylooligosaccharide on mucosal parameters, intestinal microbiota and morphology and growth performance of Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*) fry. Fish and Shellfish Immunology. 39(2): 231-236.
4. Bairwa, M.K., Jakhar, J.K., Satyanarayana, Y. and Reddy, A.D., 2012. Animal and plant originated immunostimulants used in aquaculture. Journal of Natural Product and Plant Resources. 2(3): 397-400.
5. Cabello, F.C., 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. Environmental Microbiology. 8: 1137-1144.
6. Van Doan, H., Tapingkae, W., Moonmanee, T. and Seepai, A., 2016. Effects of low molecular weight sodium alginate on growth performance, immunity, and disease resistance of tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish and Shellfish Immunology. 55: 186-194.
7. Jeney, G. and Anderson, D.P., 1993. Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhance the non-specific defence mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. 116(4): 315-329.
8. Akbari, H., Hosseini Shekrabi, S.P., Soltani, M. And Shamsaie Mehran, M., 2021. Effects of potential probiotic *Enterococcus casseliflavus* (EC-001) on growth performance, immunity, and resistance to *Aeromonas hydrophila* infection in Common Carp. Probiotics and Antimicrobial Proteins. 13: 1316-1325.
9. Wang, J., Li, K., Wang, L. and Xu, Q., 2021. Effects of different levels of stevioside on growth performance, digestive enzyme activity, antioxidant capacity and gene expression of juvenile mirror carp (*Cyprinus carpio*). Aquaculture. 543: 737019.
10. Ashouri, G., Soofiani, N.M., Hoseinifar, S.H., Jalali, S.A.H., Morshedi, V., Van Doan, H. and Mozanadeh, M.T., 2018. Combined effects of dietary low molecular weight sodium alginate and *Pediococcus acidilactici* MA18/5M on growth performance, haematological and innate immune responses of Asian sea bass (*Lates calcalifer*) juveniles. Fish and shellfish immunology. 79: 34-41.
11. Taati, R. and Noei Taadoli, H., 2015. Determination of growth performance and some hematological and immune parameters of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings fed different levels of dietary herbal additive including Carvacrol, Anethole and Limonene. Journal of Marine Biology. 7(1): 35-42. (In Persian)
12. Ghiasi, S. and Falahatkar, B., 2015. Changes of growth, food intake and cortisol plasma in juvenile carp (*Cyprinus carpio*) following cortisol injection. Iranian Scientific Fisheries Journal. 24(2): 1-12. (In Persian)

افزایش معنی‌دار تعداد گلبول‌های سفید ماهیان تغذیه شده با اینولین نسبت به گروه شاهد شده بود، ولی تفاوت معنی‌داری در فاکتورهای خونی نظیر هموگلوبین، هماتوکریت، تعداد کل گلبول‌های قرمز، MCV، MCH و MCHC مشاهده نشد (۳۵)، که با نتایج به دست آمده پژوهش ما تطابق دارد. افزایش تعداد گلبول‌های سفید احتمالاً به دلیل تحریک سیستم ایمنی می‌باشد. آنزیم‌های ALT و ALP جزء آنزیم‌های مهم در بررسی وضعیت سلامت ماهیان هستند (۳۶). Steffens و همکاران، با مطالعه روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شده با رژیم غذایی متفاوت از نظر چربی، دریافتند که تفاوت معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های ALT و ALP پلاسما وجود ندارد، که با نتایج تحقیق ما همگون است. علاوه بر این، Hoseinifar و همکاران، اثر پریبیوتیک الیگوفروکتوز بر روی بچه‌فیل ماهی (*Huso huso*) بررسی کردند و بیان کردند که الیگو فروکتوز اثری بر گلبول‌های قرمز، حجم متوسط گلبولی (MCV)، هموگلوبین متوسط سلولی (MCH)، غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MCHC)، گلوکز، پروتئین کل سرم، ALT و ALT ندارد، ولی در میزان هماتوکریت و هموگلوبین و تعداد گلبول‌های سفید تفاوت معنی‌داری مشاهده کردند (۳) که به جز در موارد هموگلوبین و هماتوکریت با نتایج ما مشابهت دارد. در این پژوهش، ایمونوگلوبولین کل سرم در تیمارهای حاوی ۱٪ و ۲٪ سدیم آلژینات افزایش یافت و بیش‌ترین مقدار آن در سدیم آلژینات ۱٪ مشاهده گردید، هر چند که اختلاف معنی‌داری بین تیمارها و گروه شاهد دیده نشد ($P > 0.05$). Hoseinifar و همکاران، طی پژوهشی گزارش کردند که استفاده از گالاتئالایگوساکارید و زایلوالیگوساکارید در جیره ماهی سفید باعث بهبود ایمونوگلوبولین کل و شاخص‌های ایمنی می‌شود (۳۸). هم‌چنین، در مطالعه دیگری که توسط Hoseinifar و همکاران، اثر پریبیوتیک الیگوفروکتوز بر بچه‌ماهی فیل ماهی بررسی گردید، بیان داشتند که الیگوفروکتوز اثری بر پروتئین کل سرم ندارد (۳۹) که با نتایج به دست آمده ما مطابقت دارد. نتایج این پژوهش، نشان داد که استفاده از سدیم آلژینات با وزن مولکولی پایین در جیره غذایی تأثیری روی رشد ماهی کپور معمولی ندارد، ولی با توجه به تأثیر مثبتی که جیره حاوی سدیم آلژینات ۱٪ روی بیان نسبی ژن IL-6 و هم‌چنین برخی شاخص‌های ایمنی (تعداد گلبول‌های سفید و پروتئین کل موکوس) دارد می‌توان نتیجه گرفت که سدیم آلژینات با وزن مولکولی پایین باعث تحریک سیستم ایمنی در ماهی کپور معمولی می‌شود. با توجه به تمامی نتایج حاصله استفاده از سدیم آلژینات در ماهی کپور معمولی به‌عنوان محرک سیستم ایمنی موثر بوده، اما جهت اطمینان بیش‌تر انجام مطالعات تکمیلی توصیه می‌شود.

- (*Paralichthys olivaceus*). Fish and shellfish immunology. 42(1): 177-183.
28. Ren, G., Xu, L., Lu, T., Zhang, Y., Wang, Y. and Yin, J., 2019. Protective effects of lentinan on lipopolysaccharide induced inflammatory response in intestine of juvenile taimen (*Hucho taimen*, Pallas). International journal of biological macromolecules. 121: 317-325.
 29. Djordjevic, B., Skugor, S., Jorgensen, S.M., Overland, M., Myland, L.T. and Krasnov, A., 2009. Modulation of splenic immune response to bacterial lipopolysaccharide in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed lentinin, a β -glucan from mushroom *Lentinula edodes*. Fish and shellfish immunology. 26(2): 201-209.
 30. Bullis, R.A., 1993. Clinical pathology of temperate freshwater and estuarine fishes. fish medicine. WB Sanders Co., Philadelphia. 232-239.
 31. Avekh Keysami, M., Zoughi Shalmani, A. and Azmoodeh Mojdehi, M., 2021. Effectiveness of *Bacillus subtilis* on growth and survival of common carp larva in non-earthen ponds. Journal of Animal Environment. 13(3): 261-268. (In Persian)
 32. Shirmohammadli, H.M., Mohammadnejad, M. and Alemi Rostami, Sh., 2019. Relationship between weight and some hematological and biochemical indices of blood serum of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). Journal of Animal Ecology. 12(2): 238-233. (In Persian)
 33. Sahli, M., Paknejad, H., Hosseinfar, S.H., Soudagar, M., Mazandarani, M. and Senchouli, H.A., 2021. Effects of different levels of low molecular weight sodium alginate on growth performance and mucus immunity indices in common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Animal Ecology. 12(2): 202-195. (In Persian)
 34. Bohlouli, S. and Sadeghi, E., 2016. Growth performance and haematological and immunological indices of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings supplemented with dietary *Ferulago angulata* (Schlecht) Boiss. Acta Veterinaria Brno. 85(3): 231-238.
 35. Sheikh-Eslami Amiri, M., 2008. The effect of prebiotic inulin on growth, survival, microflora and immune system of rainbow trout. Master's thesis, Khorramshahr University of Marine Sciences and Technology.
 36. Racicot, J.G., Gaudet, M. and Leray, C., 1975. Blood and liver enzymes in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) with emphasis on their diagnostic use: Study of CCl₄ toxicity and a case of *Aeromonas* infection. Journal of fish Biology. 7(6): 825-835.
 37. Steffens, W., Renert, B., Wirth, M. and Kruper, R., 1999. Effect of tow lipid levels on growth, feed utilization, body composition and some biochemical parameters of rainbow trout. Journal of Applied Ichthyology. 15: 159-164.
 38. Hoseinifar, S., Mirvaghefi, A., Mojazi Amiri, B., Khoshbavar Rostami, H. and Darvish Bastami, K., 2011. The effects of prebiotic oligofructose on hematological, serum biochemical parameters and liver enzymes of juvenile beluga (*Huso huso*). Iranian Scientific Fisheries Journal. 20(2): 27-36. (In Persian)
 39. Hoseinifar, S.H., Ringø, E., Shenavar Masouleh, A. and Esteban, M.A., 2016. Probiotic, prebiotic and synbiotic supplements in sturgeon aquaculture: a review. Reviews in Aquaculture. 8(1): 89-102.
 13. Fujiki, K. and Yano, T., 1997. Effects of sodium alginate on the non-specific defence system of the common carp (*Cyprinus carpio* L.). Fish and Shellfish Immunology. 7(6): 417-427.
 14. Eggsetøl, H.Ø., Lunde, H.S. and Haugland, G.T., 2020. The proinflammatory cytokines TNF- α and IL-6 in lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.)-identification, molecular characterization, phylogeny and gene expression analyses. Developmental & Comparative Immunology. 105: 103608.
 15. Houston, A.H., 1990. Blood and circulation. Methods for fish biology. 415-488.
 16. Mojabi, A. and Heydarnejad, A., 2003. Veterinary Hematology and Laboratory Methods. Publications of the Agricultural Jihad Institute of Applied Scientific Education. 55-95. (In Persian)
 17. Moss, D.W., 1986. Henderson, A.R. and Kachmar, J.F., Enzymes. Textbook of clinical chemistry. Philadelphia: Saunders. 619-774.
 18. Siwicki, A.K., 1993. Nonspecific defense mechanisms assay in fish II Potential killing activity of neutrophils and macrophages, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin (Ig) level in serum. Fish diseases diagnosis and preventions methods. 105-111.
 19. Ross, L.G., 1999. Anesthetic and sedative techniques for aquatic animals. Edited by Ross, L.G. and Ross, B.
 20. Subramanian, S., MacKinnon, S.L. and Ross, N.W., 2007. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. 148(3): 256-263.
 21. Kolangi Miandare, H., Farvardin, S., Shabani, A., Hoseinifar, S.H. and Ramezanzpour, S.S., 2016. The effects of galactooligosaccharide on systemic and mucosal immune response, growth performance and appetite related gene transcript in goldfish (*Carassius auratus gibelio*). Fish and Shellfish Immunology. 55: 479-483.
 22. Khodadadian Zou, H., Hoseinifar, S.H., Miandare, H.K. and Hajimoradloo, A., 2016. Agaricus bisporus powder improved cutaneous mucosal and serum immune parameters and up-regulated intestinal cytokines gene expression in common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings. Fish and Shellfish Immunology. 55: 380-386.
 23. Huttenhuis, H.B., Ribeiro, A.S., Bowden, T.J., Van Bavel, C., Taverne-Thiele, A.J. and Rombout, J.H., 2006. The effect of oral immuno-stimulation in juvenile carp (*Cyprinus carpio* L.). Fish and Shellfish Immunology. 21(3): 261-271.
 24. Qin, Q.W., Ototake, M., Noguchi, K., Soma, G.I., Yokomizo, Y. and Nakanishi, T., 2001. Tumor necrosis factor alpha (TNF α)-like factor produced by macrophages in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Fish and Shellfish Immunology. 11(3): 245-256.
 25. Khalili, A., 2004. Abstract of Abul Abbas' Cellular and Molecular Immunology. Hayan Publications. First edition. 284 p. (In Persian)
 26. Song, J.Y., Han, S.K., Son, E.H., Pyo, S.N., Yun, Y.S. and Yi, S.Y., 2002. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages by ginsan. International immunopharmacology. 2(7): 857-865.
 27. Beck, B.R., Kim, D., Jeon, J., Lee, S.M., Kim, H.K., Kim, O.J. and Song, S.K., 2015. The effects of combined dietary probiotics *Lactococcus lactis* BFE920 and *Lactobacillus plantarum* FGL0001 on innate immunity and disease resistance in olive flounder