DOI: 10.22092/vj.2018.121260.1446 شماره ۱۲۱ زمستان ۱۳۹۷

تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی اثر سطوح مختلف باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر پاسخ استرس اکسیداتیو و فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مواجهه با فلز سرب در جیره غذایی

• تکاور محمدیان

استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

• رضا قانعی مطلق (نویسنده مسئول)

دانشجوی دکترای بهداشت آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

• سید صمد حسینی

دکترای بهداشت آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

• صادق رباط کریمی

دانشجوی دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

• مجتبی امام

دانشجوی دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

• نسیم علیجانی

دانشجوی دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

• حسن بخشی

دانشجوی دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

Email: r.ghaneimotlagh@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷-۰۱-۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷-۰۴-۲۴

چکیده

استفاده از ترکیبات فراسودمند مانند پروبیوتیک‌ها می‌تواند در بهبود عملکرد آبزیان موثر باشد. هدف از مطالعه حاضر تاثیر سطوح مختلف باکتری پروبیوتیکی *Lactobacillus acidophilus* (La) روی برخی از فاکتورهای بیوشیمیایی و آنتی‌اکسیدانی سرم خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) پس از مسمومیت با فلز سرب در جیره غذایی بوده است. تعداد ۳۷۵ قطعه ماهی قزل‌آلا بطور تصادفی به پنج گروه در سه تکرار تقسیم شدند. گروه‌های یک، دو و سه به ترتیب از ابتدا تا انتهای آزمایش با جیره‌حاوی ۵×۱۰^{۶}، ۵×۱۰^{۷} و ۵×۱۰^{۸} CFU/gr باکتری پروبیوتیکی تغذیه شدند. گروه چهارم (کنترل) در تمام دوره با جیره فاقد پروبیوتیک و بدون فلز سرب تغذیه شد. گروه پنجم به مدت ۴۵ روز با جیره فاقد پروبیوتیک و سپس (به مدت ۲۱ روز) همراه با تیمارهای پروبیوتیکی تا انتهای آزمایش با جیره حاوی ۵۰۰ µg/kg نیترات سرب تغذیه شد. خونگیری از ماهیان در روزهای صفر، ۴۵، ۵۲، ۵۹ و ۶۶ آزمایش انجام شد. نتایج نشان داد که در گروه دو بعد از ۴۵ روز مصرف پروبیوتیک مقادیر گلوکز، فسفر، ALP و SOD افزایش و مقادیر کلسترول و تری‌گلیسرید کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشته است ($p < ۰/۰۵$). پس از مواجهه با سرب مقادیر LDH در روز ۵۹ و مقادیر ALP در تمامی روزها در گروه دو نسبت به گروه پنج بطور معنی‌داری کاهش یافت ($p< ۰/۰۵$). همچنین سطح آنزیم کاتالاز و SOD در گروه دو نسبت به گروه پنج در روز ۶۶ افزایش معنی‌داری داشته است ($p < ۰/۰۵$). نتایج این مطالعه نشان داد که باکتری La بعنوان یک پروبیوتیک می‌تواند در بهبود شاخص‌های سرمی ماهی قزل‌آلا قبل و پس از مواجهه با فلز سرب نقش داشته باشد. همچنین غلظت ۵×۱۰^{۷} CFU/gr پروبیوتیک روی شاخص‌های سرمی تاثیر بهتری داشته است.

کلمات کلیدی: سرم خون، فلز سرب، قزل‌آلای رنگین‌کمان، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

● Veterinary Researches & Biological Products No 121 pp: 91-105

Investigation of effect of variouslevels of *Lactobacillus acidophilus* on serum oxidative stress response and biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to lead in diet

By: Mohammadian, T., Assistant professor, Department of clinical sciences, Faculty of veterinary medicine, Shahid chamran university of Ahvaz, Ahvaz, Iran. Ghanei-Motlagh, R., (Corresponding Author) PhD student of Aquatic animal health, Faculty of veterinary medicine, Shahid chamran university of Ahvaz, Ahvaz, Iran. Hosseini, S.S., PhD of Aquatic animal health, Faculty of veterinary medicine, Shahid chamran university of Ahvaz, Ahvaz, Iran. Robatkarimi, s., DVM student, Faculty of veterinary medicine, Shahid chamran university of Ahvaz, Ahvaz, Iran. Emam, M., DVM student, Faculty of veterinary medicine, Shahid chamran university of Ahvaz, Ahvaz, Iran. Alijani, N., DVM student, Faculty of veterinary medicine, Shahid chamran university of Ahvaz, Ahvaz, Iran. and Bakhshi, H., DVM student, Faculty of veterinary medicine, Shahid chamran university of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

Received: 2018-04-17 **Accepted: 2018-07-15**

Email: r.ghaneimotlagh@yahoo.com

Application of functional ingredients like probiotics could be effective in promotiong of aquatic animals performance. The aim of this study was to investigate the effect of various levels of probiotic bacterium *Lactobacillus acidophilus* on some serum biochemical and antioxidant factors of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following dietary lead poisoning. 375 trout fish were randomly divided into five groups in three replications. Groups 1, 2 and 3 were respectively fed with diets containing 5×10^6, 5×10^7 and 5×10^8 CFU / g probiotic bacteria from beginning to end of the experiment. Group 4 (control) was fed witha diet free of probiotic and lead. Group 5 was fed with probiotic-free diet for 45 days and then with a diet containing 500 µg / kg lead nitrate (for 21 days) to end of the experiment similar to probiotic-consuming treatments. Bleeding of fish was done on days 0, 45, 52, 59 and 66. The results showed that levels of glucose, phosphorus,ALP and SOD were significantly higher and cholesterol and triglyceride levels were significantly lower ($p < 0.05$)in group 2 compared to control group after 45 days probiotic consumption. After lead exposure, LDH values on day 59 and ALP values in all days were significantly lower in group 2 compared to group 5 ($p < 0.05$). Also, catalase and SOD levels were significantly higher in group 2 than group 5 on day 66 ($p < 0.05$). The results of this study revealed that Lactobacillus acidophilus,as a probiotic,can be effective in improving the blood serum indices of trout before and after lead exposure. Also, level of 5×10^7 CFU / g of probiotic had a better effect on the serum parameters.

Keyword: Blood serum, Lead metal, Rainbow trout, *Lactobacillus acidophilus*

مقدمه

فلزات سنگین انتشار گسترده‌ای در محیط دارند و در نتیجه باعث آلودگی آب، خاک و محیط زیست شده و نهایتا سلامت انسان را تحت تاثیر قرار می‌دهند. این فلزات به طرق مختلف از جمله فعالیت‌های خانگی، صنعتی و کشاورزی وارد اکوسیستم آبی می‌شوند. فلزات سنگین پایدار و از نظر زیستی تجزیه‌ناپذیرند و تمایل به تجمع و ایجاد اثرات زیانباردر موجودات زنده هستند. این فلزات باعث مسمومیت، تغییرات رفتاری، تاثیر بر متابولیسم هوازی و ایجاد اختلال در چرخه احیا با تولید گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن یا رادیکال‌های آزاد، ایجادتنش اکسیداتیو و آسیب به DNA و بافت‌ها می‌شوند (۱۸). از بین فلزات سنگین، سرب بیش از همه عناصر دیگر در محیط‌های مختلف پراکنده است. سرب توانایی تجمع در کبد، کلیه‌ها، طحال و همچنین دستگاه گوارش و آبشش‌ها را دارد. مسمومیت تحت کشنده با سرب در ماهی باعث ایجاد اختلالات فیزیولوژیکی، تغییرات ژنتیکی و اثرات سوء مختلف از جمله اثرات خونی و عصبی می‌شود. سرب باعث آسیب به لوکوسیت‌ها، مرگ زودرس گلبول‌های قرمز بالغ و مهار تشکیل هموگلوبین از طریق مهار آنزیم دلتا-آمینو لولینیک اسید دهیدراتاز (ALAD) و نهایتا کم‌خونی می‌شود. اثرات عصبی سرب در ماهی شامل تیرگی ناحیه ساقه دمی و اختلالات نخاعی است.مکانیسم مسمومیت با سرب به ایجاد اختلال در همئوستازی کلسیم، آسیب مستقیم به میتوکندری، مهار فعالیت پروتئین‌های مختلف بواسطه اتصال آن به گروه‌های سولفیدریل و استرس اکسیداتیو نسبت داده می‌شود. روش‌های حذف فلز سرب از جیره و مواد غذایی تاکنون موفقیت‌آمیز نبوده است. بعنوان مثال درمان با ترکیبات چلاته‌کننده بعنوان یک استراتژی در دفع فلزات سنگین بدلیل اثرات جانبی و از دست

رفتن عناصر ضروری و نداشتن کارایی و سلامت لازم مورد تایید نیست. از این رو روش‌های نوین حذف این قبیل از فلزات سنگین ضروری به نظر می‌رسد (۷, ۱۸).

بررسی شاخص‌های بیوشیمیایی در بررسی و چگونگی آسیب‌های سلولی، ناهنجاری های متابولیک و مهار یا القای آنزیم‌ها توسط گزنوبیوتیک‌ها و داروها نقش دارد. در مطالعات سم شناسی فعالیت‌های آنزیمی مستقیما اختلالات متابولیکی و آسیب سلولی در اندام هدف را منعکس می‌کنند. علاوه بر این فعالیت‌های آنزیمی بعنوان شاخص‌های بیوشیمیایی حساس به عوامل خطرموثر بر ماهی محسوب می‌شوند. آگاهی از اثرات فلزات سنگین بر پارامترهای بیوشیمیایی می‌تواند به شناسایی مکانیسم عمل این فلزات و اختلال اندامی پس از مواجه با آن کمک کند (۲۴).

یکی از مهم‌ترین روش‌های ارتقای سلامت، بهبود عملکرد رشد و کنترل عوامل پاتوژن استفاده از پروبیوتیک‌ها می‌باشد. پروبیوتیک‌ها باکتری‌هایی هستند اگر در مقادیر کافی تجویز شوند، دارای اثرات سودمند برای میزبان هستند. از جمله اثرات باکتری‌های پروبیوتیکی می‌توان به داشتن اثرات آنتاگونیستی نسبت به عوامل بیماری‌زا، رقابت برای مواد غذایی، تولید باکتریوسین، اثرات ضد ویروسی، تنظیم و بهبود عملکرد سیستم ایمنی، بهبود کیفیت آب و ارتقای سیستم آنتی‌اکسیدانی اشاره کرد. امروزه مشخص شده که باکتری‌های اسید لاکتیک دارای توانایی در حذف فلزات سنگین و مایکوتوکسین‌ها هستند (۱۰, ۲۷, ۳۵). در این خصوص سینگو شارما (۲۰۱۰) نشان دادند که باکتری La قادر به اتصال و برداشت فلز ارسنیک از آب است و بیشترین توان برداشت ارسنیک ۴ ساعت بعد از مواجهه بود (۳۲). همچنین در مطالعه السانحوتی و همکاران (۲۰۱۶) مشاهده شد که La یک باکتری با توانایی بالا در کاهش میزان فلزات سنگین آب آلوده است (۱۳). با توجه به نبود یک روش مناسب در حذف فلزات سنگین از مواد غذایی و پتانسیل باکتری‌های اسید لاکتیک دراتصال به فلزات سنگین (۲۷) هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرسطوح مختلف La در جیره غذایی بر پاسخ استرس اکسیداتیو و فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم خون ماهی قزل‌آلا در مواجهه با فلز سنگین سرب در جیره غذایی بوده است.

مواد و روش‌ها

تعداد ۳۷۵ قطعه ماهی قزل‌آلا با میانگین وزنی ۴/۶±۱۵ گرم به آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل و به مدت دو هفته نسبت به شرایط آزمایشگاهی سازگاری یافتند. در طی دوره تطابق، ماهی‌ها با خوراک ماهی قزل‌آلا (ساخت شرکت بیومار) با ترکیب غذایی ۴۰ درصد پروتئین، ۹/۵ درصد چربی و ۸/۳ درصد خاکستر روزانه دو بار و به میزان ۱/۵ درصد وزن بدن تغذیه شدند (۵, ۳۱). پس از طی دوره تطابق، ماهیان به پنج گروه (با سه تکرار و تعداد ۲۰ قطعه ماهی در هر تکرار) در مخازن فایبرگلاس ۳۰۰ لیتری تقسیم شدند. گروه اول با جیره غذایی حاوی 5×10^{6} CFU/gr، گروه دوم با جیره غذایی حاوی 5×10^{7} CFU/gr و گروه سوم با جیره غذایی حاوی 5×10^{8} CFU/gr از باکتری پروبیوتیکی La (جداشده از ماهی شیربت، *Tor grypus*، در مطالعات قبلی محققین) به مدت ۴۵ روز تغذیه شدند (۲۵). پس از اتمام این دوره به غذای هر سه گروه علاوه بر پروبیوتیک مقدار ۵۰۰ میکروگرم در کیلوگرم (µg/kg) خوراک نیترات سرب به مدت ۲۱ روز اضافه شد (۴). گروه چهارم (کنترل) در تمام طول آزمایش با غذای فاقد افزودنی تغذیه و نگهداری شدند. گروه پنجم ابتدا بدون افزودن باکتری به جیره غذایی به مدت ۴۵ روز تغذیه شدند و پس از این مدت تا انتهای دوره آزمایش مورد مواجهه با فلز سرب (۵۰۰ µg/kg خوراک نیترات سرب) قرار گرفتند. اضافه کردن پروبیوتیک به غذای تجاری مطابق با دستورالعمل استاندارد انجام شد (۳۷). نمونه برداری از ماهی‌ها در روزهای صفر، ۴۵، ۵۲، ۵۹ و ۶۶ انجام شد. لازم به ذکر است که کیفیت آب در طول دوره پرورش ثابت و در حد قابل قبول بوده است. شستشوی مخازن بطور روزانه صورت گرفت. شاخص‌های کیفی و فیزیکی و شیمیایی آب از قبیل اکسیژن (۸-۱۰ میلی‌گرم در لیتر)، درجه حرارت (۱۳-۱۶ درجه سانتیگراد)، pH (۷-۷/۵)، شوری (۱-۱/۳ در هزار)، هدایت الکتریکی (۷۰۰ میکروموس بر سانتی‌متر)، آمونیاک غیریونیزه (کمتر از ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر)، نیتریت (کمتر از ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر) و نیترات (کمتر از ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) بصورت روزانه سنجش و ثبت شد که محدوده هر یک در طی دوره آزمایش ذکر شده است.

در روز ۴۵ آزمایش با استفاده از ماده بیهوشی ۲-فنوکسی اتانول (۰/۳ میلی‌لیتر در لیتر) ماهیان بیهوش شدند (۱۵). سپس خونگیری تعداد نه ماهی (سه عدد از هر تکرار) با استفاده از سرنگ ۵ سی‌سی از محل ساقه‌ی دمی انجام شد. نمونه خون اخذ شده به میکروتیوب‌های فاقد ماده ضد انعقاد منتقل و جهت جداسازی سرم، درون دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۳۶۰۰ دور در ثانیه به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. سپس سرم‌ها بلافاصله به فریزر (در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد) منتقل و تا زمان انجام آزمایشات نگهداری شدند. عمل خونگیری از ماهیان در روزهای ۵۲، ۵۹ و ۶۶ آزمایش نیزادامه یافت.

جهت آماده‌سازی باکتری La و افزودن آن‌ها به غذای ماهیان از روش توصیه شده توسط واین و همکاران (۲۰۰۴) استفاده گردید. بطور خلاصه باکتری‌ها در محیط آبگوشت MRS در شرایط بی‌هوازی کشت داده شدند. پس از رشد، باکتری‌ها با عمل سانتریفوژ جداسازی و شستشو گردیده و به کمك لوله‌های استاندارد مك‌فارلند غلظت آن‌ها بر روی CFU/ml 3×10^{9} تنظیم شد و سپس با تهیه رقت‌های متوالی، غلظت مورد نظر به هر گرم غذا اسپری گردید. غذاها در شرایط کاملا استریل به میزان لازم توزین و در سینی‌های استریل قرار داده شده و به مدت ۲۴ ساعت با رعایت شرایط استریل در دمای آزمایشگاه خشک و بسته‌بندی گردیدند. جهت اطمینان از تعداد باکتری‌های زنده موجود در غذا، نمونه‌برداری و شمارش باکتریایی غذای حاصل انجام گردید. بر روی غذای گروه شاهد فقط سرم فیزیولوژی استریل اسپری شد (۳۷).

سنجش پارامترهای بیوشیمیایی و اکسیدان/آنتی‌اکسیدانی به شرح زیر بوده است:

سنجش مقادیر آلبومین، آلکالین فسفاتاز (ALP)، آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، لاکتات دهیدروژناز (LDH)، گلوکز، کلسترول، تری‌گلیسریدو مقادیر یون‌های کلسیم، منیزیم، کلرید و فسفر در سرم خون به روش رنگ‌سنجی و با استفاده از کیت‌های شرکت پارس آزمون مطابق با دستورالعمل موجوددر کیت صورت گرفت.

سنجش آنزیم کاتالاز در سرم بر اساس روش کورولوک و همکاران (۱۹۸۸) صورت گرفت. در این روش آمونیوم مولیبدات با پراکسید هیدروژن موجود در محیط تشکیل کمپلکس زرد رنگی می‌دهد که در طول موج ۴۱۰ نانومتر با روش اسپکتروفتومتری قابل اندازه‌گیری است. آنزیم کاتالاز موجود در نمونه با تجزیه پراکسید هیدروژن، این واکنش را مهار می‌کند (۲۰).

جهت سنجش آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) از تست تقلیل رنگ نیتروبلوتترازولیوم (NBT) استفاده شد که اساس کار به شرح زیر بوده است: ۰/۱ میلی لیتر سرم به ۲ میلی‌لیتر محلول واکنش‌پذیر که شامل ۰/۲ میلی‌مول گزانتین، ۰/۱۲ میلی‌مول NBT، ۰/۴۹ واحد گزانتین اکسیداز و ۰/۱ مول بافر فسفات (PH=۷) است اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شده است. میزان سوپراکسید دیسموتاز از طریق سنجش تقلیل رنگ آبی با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۶۰ نانومتر سنجیده و نتایج به صورت درصد کاهش مهار آن قرائت شد (۲۸).

جهت سنجش آنزیم گلوتاتیون (GSH) از روش توصیف شده توسط المن (۱۹۵۹) استفاده شد. در این روش از محلول DTNB (۵،۵-dithiobis-۲-nitrobenzoic acid) معروف به معرف المن به منظور ایجاد رنگ استفاده می‌شود. گلوتاتیون با احیای این معرف کمپلکس زردرنگ یکنواختی ایجاد می‌کند که پرتوهای با طول موج ۴۱۲ نانومتر را جذب می‌کند. در نهایت غلظت گلوتاتیون با مقایسه جذب حاصل با منحنی استاندارد محاسبه شد(۱۲).

مالون‌دی‌آلدهید (MDA) به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی بر مبنای واکنش آن با تیوباربیتوریک‌اسیدو بر اساس روش گزارش شده توسط لاتا و پاری (۲۰۰۳) با کمی تغییر اندازه‌گیری شد. در این روش MDA با دو مولکول تیوباربیتوریک اسید واکنش می‌دهد و ترکیبی با رنگ متمایل به قرمز ایجاد می‌کند. برای انجام این آزمایش۳۰۰ میکرولیتر از سرم در داخل میکروتیوب به۶۰۰ میکرولیتر از محلول حاوی تری کلرواستیک اسید ۱۵ درصد، اسیدکلریدریک ۰/۲۵ نرمال و تیوباربیتوریک اسید ۰/۳۷ درصد (به نسبت حجمی ۱:۱:۱) اضافه گردید. در ادامه میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در بن‌ماری آب جوش قرار داده شد وبعد از خنک شدن سانتریفیوژ شده و جذب نوری مایع رویی در طول موج ۵۳۵ نانومتر سنجش گردید (۲۱).

به منظور نرمال‌سازی داده‌ها از آزمون آماریKolmogrov-smirnov استفاده شد. جهت آنالیز داده‌ها از آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۲۲ و ضریب اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد($p < ۰/۰۵$). همچنین به منظور بررسی معنی‌داری اختلاف میانگین‌ها از پس آزمون دانکن استفاده شده است.

نتایج

نتایج سنجش مقادیر آلبومین، LDH، AST، ALP، فسفر، کلرید، کلسیم، منیزیوم، گلوکز، کلسترول و تری‌گلیسرید در جدول ۱ آورده شده است.

نتایج مربوط به سنجش میزان آلبومین سرم نشان داد که با مصرف پروبیوتیک به مدت ۴۵ روز تغییر معنی‌داری در میزان آلبومین مشاهده نشده است. بامصرف سرب در روز ۶۶، میزان آلبومین در گروه پنج نسبت به دیگر گروه‌ها کاهش معنی‌داری داشته است.

سنجش سطح آنزیم ALP نشان داد که بدنبال مصرف پروبیوتیک در ۴۵ روز ابتدایی آزمایش، مقدار این آنزیم در گروه یک و دو افزایش معنی‌داری داشته است که این افزایش نسبت به گروه کنترل فقط در گروه دو معنی‌دار بوده است. بدنبال مواجهه با سرب مقادیر آنزیم فوق در اغلب تیمارهای پروبیوتیکی بویژه در گروه دو نسبت به گروه کنترل و گروه پنج کاهش معنی‌داری داشته است. میزان آن در روز ۶۶ آزمایش در گروه پنج نسبت به گروه کنترل از افزایش معنی‌داری برخوردار بوده است.

سنجش آنزیم AST بیانگر آن بوده است که در تیمارهای پروبیوتیکی مقدار آنزیم ۴۵ روز پس از مصرف پروبیوتیک در گروه یک و دو نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است. با مصرف سرب میزان این آنزیم در روز ۵۲ و ۶۶ در گروه پنج نسبت به چهار افزایش معنی‌داری داشته است. پس از مواجهه با سرب مقدار این آنزیم در روز ۵۲ در تمامی تیمارهای پروبیوتیکی و در روز ۵۹ در گروه یک و سه نسبت به گروه پنج کاهش معنی‌داری داشته است.

نتایج بررسی آنزیم LDH بیانگر آن است که بدنبال مصرف پروبیوتیک در جیره به مدت ۴۵ روز، مقدار این آنزیم در گروه سه نسبت به روز صفر کاهش معنی‌داری داشته است. در روز ۴۵ مقدار این آنزیم در تمامی تیمارهای پروبیوتیکی نسبت به گروه کنترل کاهش داشت هر چند این کاهش معنی‌داری نبوده است. در تمامی روزهای پس از مواجهه با سرب اغلب گروه‌های پروبیوتیکی نسبت به گروه کنترل بطور معنی‌داری فعالیت آنزیمی کمتری داشتند. همچنین در گروه پنج مقدار این آنزیم در روزهای ۵۲ و ۶۶ نسبت به گروه کنترل از کاهش معنی‌داری برخوردار بود. در روز ۵۹ میزان LDH در گروه دو نسبت به گروه پنج کاهش معنی‌داری داشته است.

نتایج مربوط میزان فسفر سرم حاکی از آن بود که در تیمارهای پروبیوتیکی در ۴۵ روز ابتدایی آزمایش افزایش معنی‌دار آن در گروه دو و سه نسبت به گروه کنترل وجود دارد. پس ازمصرف سرب در تمامی روزهای بعد از مواجهه مقدار فسفر در گروه دو و سه و گروه پنج نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشته است.

نتایج مربوط به مقادیر کلرید سرم نشان داد که پس از ۴۵ روز تاثیر معنی‌داری در مقدار آن در تیمارهای پروبیوتیکی نسبت به گروه کنترل مشاهده نشده است. بعد مواجهه با سرب در روز ۵۹ مقدار کلرید در تمامی گروه‌های پروبیوتیکی به شکل معنی‌داری نسبت به گروه چهار و پنج کمتر بوده است.

سنجش مقدار کلسیم سرم نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های پروبیوتیکی نسبت به گروه کنترل پس از ۴۵ روز می‌باشد. بدنبال مواجهه با سرب نیز اختلاف معنی‌دار قابل توجهی بین گروه‌ها مشاهده نشده است.

سنجش مقدار منیزیم بیانگر آن بود که در ۴۵ روز ابتدایی آزمایش میزان منیزیم سرم در گروه یک و سه از افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل برخوردار بوده است. بدنبال مصرف سرب میزان آن در گروه سه نسبت به گروه پنج در روز ۵۹ و ۶۶ افزایش معنی‌داری داشته است.

مقدار کلسترول سرم خون در روز ۴۵ در گروه دو و سه نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشته است. میزان کلسترول بعد از مواجهه با سرب در گروه پنج نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت. در اکثر گروه‌های پروبیوتیکی مقدار کلسترول در روز ۵۹ و ۶۶بطور معنی‌داری نسبت به گروه پنج بیشتر بوده است.

مقدار گلوکز در ۴۵ روز ابتدایی آزمایش در گروه دو و سه نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشته است. میزان گلوکز خون بعد از مواجهه با سرب در گروه پنج نسبت به گروه کنترل در تمامی روزها کاهش داشت که این کاهش در روز ۵۹ آزمایش معنی‌دار بوده است. مقدار گلوکز سرم تمامی تیمارهای پروبیوتیکی در تمامی روزهای بعد مواجهه با سرب دارای افزایش معنی‌داری نسبت به گروه چهار و پنج بوده است.

مقدار تری‌گلیسرید در گروه دو بعد از مصرف پروبیوتیک به مدت ۴۵ روز کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشته است. پس از مصرف سرب میزان تری‌گلیسرید در گروه پنج در تمام روزهای پس از چالش نسبت به گروه کنترل کاهش داشت که این کاهش در روز ۶۶ معنی‌دار بوده است. در روز ۶۶ مقدار تری‌گلیسرید در تمامی تیمارهای پروبیوتیکی نسبت به گروه پنج افزایش معنی‌داری داشته است.

نتایج مربوط به سنجش میزان کاتالاز سرم در شکل ۱ آورده شده است. نتایج حاکی از آن است که پس از مصرف پروبیوتیک در جیره به مدت ۴۵ روز افزایش میزان این آنزیم در تمامی گروه‌ها نسبت به گروه کنترل مشاهده شد که این افزایش تنها در گروه یک معنی‌دار بوده است. بعد از مصرف سرب مقدار کاتالاز در روز ۵۲ و ۵۹ در گروه پنج نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار و در روز ۶۶ کاهش غیر معنی‌داری داشته است. پس از مصرف سرب میزان کاتالاز در روز ۶۶ آزمایش در گروه دو نسبت به گروه پنج افزایش معنی‌داری نشان داد.

نتایج مربوط به میزان فعالیت آنزیم GSH در شکل ۲ آورده شده است. نتایج نشانگر آن است در گروه یک و سه بعد از مصرف باکتری پروبیوتیکی به مدت ۴۵ روز میزان فعالیت این آنزیم افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشته است. میزان فعالیت این آنزیم در گروه پنج و تمامی گروه‌های پروبیوتیکی نسبت به گروه کنترل در تمامی روزهای بعد از مواجهه با سرب افزایش معنی‌داری داشته است.

نتایج مربوط به سنجش آنزیم SOD در شکل ۳ آورده شده است. نتایج حاکی از آن است که در ۴۵ روز اول بعد از مصرف پروبیوتیک میزان این آنزیم در گروه‌های دو و سه نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است که این افزایش در گروه دو نسبت به کنترل معنی‌دار بوده است. بدنبال مصرف سرب کاهش معنی‌دار این آنزیم در روزهای ۵۲ و ۶۶ آزمایش در گروه پنج نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. در روز ۵۲ در گروه سه نسبت به گروه پنج و در روز ۶۶ در گروه دو و سه نسبت به گروه پنج افزایش معنی‌دار این آنزیم مشاهده شد.

نتایج مربوط به سنجش مقادیر MDA سرم در شکل ۴ آورده شده است. نتیجه تعیین مقادیر MDA به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی نشان داد که میزان پراکسیداسیون لیپیدی در گروه دو نسبت به گروه کنترل بعد از ۴۵ روز کاهش معنی‌داری داشته است. در مواجهه با سرب میزان آن در گروه پنج نسبت به گروه چهار در روز ۵۹ و ۶۶ کاهش معنی‌داری داشته است. در روز ۵۲ میزان آن در گروه دو و سه نسبت به گروه پنج کاهش داشت که این کاهش در گروه سه معنی‌دار بوده است.

بحث

آلودگی محیط زیست با فلزات سنگین بصورت حاد و یا مزمن موجب استرس مازاد به موجودات آبزی می‌شود. تغییرات زیستی ناشی از مواجهه و یا اثرات آلاینده‌ها در ماهی توسط شاخص‌های زیستی سنجش می‌شود. در این بین شاخص‌های زیستی مهم شامل متغیرهای فیزیولوژیکی مثل سطوح سرمی متابولیت‌ها و یون‌ها و سطوح هورمون‌هایی مثل کورتیزول و متغیرهای بیوشیمیایی مثل فعالیت آنزیم‌ها هستند. تغییرات بیوشیمی خون ممکن است نمایانگر شرایط محیطی نامطلوب مانند درجه حرارت، مقدار اکسیژن و یا حضور فاکتورهای استرس‌زا مانند مواد شیمیایی سمی باشد. فلزات سنگین نیز بسته به نوع فلز، گونه ماهی، کیفیت آب و طول مواجهه می‌تواند منجر به این تغییرات شود. اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی می‌تواند یک ابزار مفید در شناسایی اندام هدف مسمومیت و همچنین وضعیت سلامت کلی حیوان باشد و نسبت به تغییراتی که به موجودات تحت استرس آسیب‌رسان است، هشدار دهنده باشد (۱۴).

در مطالعه حاضر با مصرف پروبیوتیک تغییر معنی‌داری در مقدار آلبومین سرم مشاهده نشد. پس از مصرف سرب مقدار آلبومین در روز ۶۶ نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشته است. در مطالعه محرابی و همکاران (۲۰۱۱) استفاده از مکمل سین‌بیوتیکی (پروبیوتیک *Enterococcus faecium* و پری‌بیوتیک فروکتوالیگوساکارید) در ماهیان انگشت‌قد قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در سطوح ۰/۵ و ۱/۵ گرم بر کیلوگرم جیره تاثیری بر مقادیر آلبومین سرم نداشت(۲۳). همچنین تغییر معنی‌داری در مقدار آلبومین در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) بعد از مصرف پروبیوتیک *Lactobacillus plantarum* مشاهده نشده است (۳۶). در راستای مطالعه حاضر کاهش مقادیر آلبومین بعد از مواجهه با فلزات سنگین در ماهی سرماری (*Channa punctatus*) مشاهده شده است (۱۸). برخلاف مطالعه حاضر، در مطالعه فیراتو همکاران (۲۰۱۰) افزایش میزان پروتئین‌های سرمی آلبومین، ترنسفرین و سرولوپلاسمین در ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) بعد از مواجهه با فلز سنگین روی و کادمیوم مشاهده شد. آلبومین سرم یکی از پروتئین‌های سرمی و همچنین یک بیومارکر استرس اکسیداتیو محسوب می‌شود. در مهره‌داران نیز مشخص شده است که آلبومین، ترنسفرین و سرولوپلاسمین بعنوان آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی عمل می‌کنند. بنابراین افزایش این پروتئین‌های سرمی توسط فلزات مذکور می‌تواند نقش مهمی در محافظت علیه آسیب ناشی از فلز داشته باشد(۱۴).

در مطالعه حاضر میزان ALP سرم پس از مصرف پروبیوتیک در گروه یک و دو افزایش داشته است. پس از چالش با سرب میزان این آنزیم در روز ۶۶ افزایش معنی‌داری در گروه پنج نسبت به گروه کنترل داشته است.مقدار آن در گروه دو نسبت به گروه پنج نیز از بین دیگر تیمارهای پروبیوتیکی بطور معنی‌داری کمتر بوده است. در توافق با این نتایج، در ماهی آمور سیاه (*Megalobrama terminalis*) در تیمارهای مصرف‌کننده جیره حاوی سین‌بیوتیک (*Bacillus licheniformis* و فروکتوالیگوساکارید) به مدت ۸ هفته، مقادیر ALP سرم نسبت به گروه

کنترل بطور معنی‌داری افزایش یافت (۳۹). همچنین استفاده از باکتری *Lactobacillus plantarum* موجب افزایش فعالیت ALP سرم پس از ۳۶، ۴۸ و ۷۲ روز مصرف این پروبیوتیک در ماهی قزل‌آلا شده است. ALP دارای همبستگی با جذب لیپید، گلوکز، کلسیم و فسفات معدنی است. افزایش فعالیت این آنزیم می‌تواند نشان‌دهنده افزایش شکست ذخایر انرژی باشد که ممکن است به منظور افزایش رشد یا ارتقای ایمنی بکار رود(۱۹).افزایش میزان آنزیم‌های ALP و AST بدنبال مواجهه با استات سرب به مقدار ۵ میلی‌گرم در لیتر به مدت ۱۵ روز در مطالعه میرمظلومی و همکاران (۲۰۱۵) در بافت کبدی گزارش شد (۲۴).

در مطالعه حاضر در روز ۴۵ آزمایش مقدار آنزیم AST در گروه‌های پروبیوتیکی نسبت به روز صفر تغییر معنی‌داری نداشته است. در مطالعه صفری و همکاران (۲۰۱۶) نیز بدنبال مصرف پروبیوتیک *Enterococcus casseliflavus* در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغییر معنی‌داری در مقادیر ASTو ALT سرم مشاهده نشد (۳۰). در مطالعه حاضر پس از مصرف سرب در جیره مقدار AST سرم در روز ۵۲ و ۶۶ در گروه پنج نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشته است. همچنین در روز ۵۲ در همه تیمارهای پروبیوتیکی و در روز ۶۶ در تیمار سه مقدار آنزیم نسبت به گروه پنج کاهش معنی‌داری داشته است. در توافق با این نتایج مواجهه ماهی طلایی (*Carassius auratus*) با سطوح تحت حاد نیکل (۴۰ و ۸۰ درصد غلظت کشنده ۵۰ درصد) به مدت ۷ روز موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و GPx، کاهش فعالیت CAT و افزایش آنزیم‌های ALT، AST و ALP کبدی شده است (۲۹). AST و ALT در اندام‌های مختلف وجود دارند و نقش مهمی در متابولیسم کربوهیدرات‌ها و آمینواسیدها ایفا می‌کنند. این آمینوترنسفرازها به عنوان شاخصی برای آسیب‌های بافتی در ماهی شناخته می‌شوند. علاوه بر این فعالیت AST و ALT ممکن است در اثر عوامل شیمیایی، بیولوژیکی و فیزیولوژیکی متفاوت یا به علت مواردی نظیر اختلال در چرخه‌ی کربس تغییر نماید. کاهش فعالیت چرخه‌ی کربس باعث کاهش مواد حدواسط این چرخه شده و ALT و AST با افزایش تولید آلفاکتوگلوتارات این مسئله را جبران می‌کنند. افزایش میزان ALP سرم ممکن است در موارد انسدادهای خارج کبدی، کلستاز کبدی و هپاتیت رخ دهد (۲۴, ۲۶).

نتایج سنجش LDH نشان داد که با مصرف جیره پروبیوتیکی به مدت ۴۵ روز میزان آن در گروه سه نسبت به روز صفر کاهش معنی‌داری داشته است. بعد از مصرف سرب در جیره در گروه پنج مقدار این آنزیم در روزهای ۵۹ و ۶۶ نسبت به گروه کنترل از کاهش معنی‌داری برخوردار بود. در روز ۵۹ میزان LDH در گروه دو نسبت به گروه پنج کاهش معنی‌داری داشته است. در بررسی دای و همکاران (۲۰۰۹) نیز مواجهه ماهی تیلاپیا با فلز سرب در رژیم غذایی موجب کاهش فعالیت آنزیم LDH کلیوی بطور وابسته به دز شده است (۸). در مطالعه اکبری و همکاران (۲۰۱۸) افزایش فعالیت LDH در ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) بعد از مواجهه با سطوح تحت حاد اکسید مس مشاهده شد. LDH یک آنزیم ترامر است که دارای نقش در متابولیسم کربوهیدرات بوده و بعنوان یک شناساگر بالقوه در ارزیابی سمیت مواد شیمیایی بکار می‌رود. علت کاهش این آنزیم در مواجهه با مواد سمی می‌تواند بخاطر افزایش سرعت گلیکولیز باشد که تنها مسیر تولیدکننده انرژی در شرایط مواجهه حیوان با استرس می‌باشد (۲).

نتایج مربوط به میزان فسفر سرم نشان داد که در ۴۵ روز ابتدایی آزمایش افزایش معنی‌دار فسفر در گروه دو و سه نسبت به گروه کنترل وجود دارد. در تمامی روزهای پس از مصرف سرب مقدار فسفر در گروه دو و سه و گروه پنج نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشته است. نتایج مربوط به مقادیر کلرید سرم نشان داد که پس از ۴۵ روز تاثیر معنی‌داری در مقدار آن در تیمارهای پروبیوتیکی نسبت به گروه کنترل مشاهده نشده است. بعد از مصرف سرب در جیره در روز ۵۹ مقدار کلرید در تیمارهای پروبیوتیکی نسبت به گروه پنج کمتر بوده است. سنجش مقدار کلسیم سرم نشان‌دهنده عدم اختلاف قابل توجه تیمارها قبل و بعد از مواجهه با سرب بوده است.سنجش مقدار منیزیم بیانگر آن بود که در ۴۵ روز ابتدایی آزمایش میزان منیزیم سرم در گروه یک و سه از افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشته است. بدنبال مصرف سرب میزان آن در گروه سه نسبت به گروه پنج افزایش معنی‌داری داشته است.

در این راستا در مطالعه الدوحیل و همکاران (۲۰۱۱) پس از مصرف پروبیوتیک *Lactobacillus acidophilus* مقادیر کلسیم، منیزیم و کلرید سرم افزایش یافت(۳). تفسیر دقیق نتایج مربوط به تغییر مقادیر الکترولیت پس از مواجهه با فلزات سنگین نیاز به مطالعات بیشتر داردبه نحویکه بعد از مواجهه با این دسته از عناصر مسمومیت‌زا هیپوکلسمی، هیپرکلسمی و عدم تغییر مقادیر کلسیم و همچنین هیپوفسفاتمی و هیپرفسفاتمی در ماهیان مختلف مشاهده شده است. از جمله علل کاهش کلسیم خون پس از مواجهه، مختل شدن ورود الکترولیت‌ها از آبشش و اختلال عملکرد کلیه بوده است. دژنراسیون آبشش‌ها می‌تواند روی نفوذپذیری یون‌ها اثرگذار باشد و موجب کاهش سطوح یون‌ها در خون شود. کاهش بازجذب مجدد کلسیم و فسفات به دلیل دژنراسیون کلیه و نکروز مجاری کلیوی نیز علت احتمالی دیگر هیپوکلسمی و هیپوفسفاتمی در مطالعات صورت گرفته بوده است (۳۳).

در این تحقیق مقدار کلسترول سرم خون در روز ۴۵ در گروه دو و سه کاهش معنی‌داری داشته است. این مقادیر بعد از مواجهه با سرب در گروه پنج نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت. همچنین در اغلب گروه‌های پروبیوتیکی در روز ۵۹ و ۶۶ بطور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل سرب‌دار بیشتر بوده است.

در توافق با نتایج مطالعه حاضر، کاهش میزان کلسترول سرمی بدنبال تجویز باکتری *Bacillus cereus*، *Bacillus subtilis* و مخمر *Saccharomyces cerevisiae* در ماهی کپور علف‌خوار (*Ctenopharyngodon idella*) مشاهده شده است (۳۴). کلسترول یک بخش ساختاری اصلی در غشای سلولی و همچنین لایه خارجی لیپوپروتئین‌های پلاسما محسوب می‌شود و پیش‌ساز تمامی هورمون‌های استروئیدی است. مشابه با مطالعه حاضر هیپوکلسترومی پس از مواجهه ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) با فلزات سنگین مشاهده شده است. چنین پاسخی می‌تواند ناشی از اثرات مهاری فلزات سنگین روی سنتز کلسترول باشد (۱۴). در ماهی سرماری (*Channa punctatus*) هیپوکلسترومی به علت تغییرات هیدروبیک (آماس) بافتی ومهار تبدیل کلسترول استریفیه به کلسترول

آزاد بعد از مواجه با حشره کش مونوکروتوفوس (Monocrotophos) بعنوان یک آلاینده مشاهده شد. کاهش سطوح کلسترول همچنین در ماهی آبشش آبی (*Lepomis macrochrus*) و تیلاپیای موزامبیک (*Oreochromis mossambicus*) به ترتیب بعد از مواجهه با جیوه و سرب مشاهده شده است (۱). کاهش کلسترول در طی ۱۵ روز در ماهی قزل‌آلا نیز در مواجهه با فلز سنگین کادمیوم مشاهده شد که علت احتمالی آن ناشی از آسیب بافت کلیوی ذکر شد(۱۷).از طرف دیگر افزایش کلسترول سرم در مطالعات مشابه در ماهیان مواجهه شده با فلزات سنگین مشاهده شده است. محتوای کلسترول بالا ممکن است ناشی از انتقال لیپید از محل سنتز به جایگاه مورد مصرف از طریق اکسیداسیون و یا یک فرآیند غیر اشباعیت تدریجی مولکول‌های لیپیدی باشد. نقص عملکرد کبدی و اختلال در متابولیسم لیپیدی نیز منجر به افزایش این مولکول می‌شود. علاوه بر این، تحلیل غشایی می‌تواند دیگر علت احتمالی افزایش آن باشد(۱۸).

مقدار تری‌گلیسرید در گروه دو بعد از ۴۵ روز کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشته است. پس از مصرف سرب میزان تری‌گلیسرید در گروه پنج نسبت به گروه کنترل کاهش داشت. در روز ۶۶ مقدار تری‌گلیسرید در تمامی تیمارهای پروبیوتیکی نسبت به گروه پنج افزایش معنی‌داری داشته است.

کاهش مقادیر کلسترول تام و تری‌گلیسرید در ماهی سیم دریایی قرمز (*Pagrus major*) هم بدنبال مصرف پروبیوتیک *Lactobacillus plantarum* (به شکل کشته شده توسط گرما)گزارش شده است (۹). کاهش مقادیر تری‌گلیسرید بدنبال مواجهه با فلزات سنگین در مطالعات دیگر نیز مشاهده شده است. احتیاجات انرژی بطور دائم می‌تواند منجر به فراخوانی تری‌گلیسریدها شود از آنجایی که آنها به عنوان قطرات چربی عمل می‌کنند. کاهش تری‌گلیسرید همچنین می‌تواند مربوط به استفاده از آنها در بیوژنز غشایی باشد. بجز این،این کاهش ممکن است به علت دریافت غذای کم یا میزان جذب کمتر ناشی از آسیب روده یا سنتز نادرست در کبد باشد (۱۸).

مقدار گلوکز در ۴۵ روز ابتدایی آزمایش در گروه دو و سه افزایش معنی‌داری داشته است. میزان گلوکز خون پس از مصرف سرب در گروه پنج نسبت به گروه کنترل در تمامی روزها کاهش داشت اما معنی‌دار نبود. مقدار گلوکز سرم در همه تیمارهای پروبیوتیکی بعدمواجهه با سرب دارای افزایش معنی‌داری نسبت به گروه پنج بوده است.

این نتایج با نتایج حاصل ازمطالعه الدوحیل و همکاران (۲۰۱۱) که افزایش مقادیر گلوکز سرم پس از مصرف پروبیوتیک *Lactobacillus acidophilus* مشاهده شده است، همخوانی دارد (۳).در مطالعه محرابی و همکاران (۲۰۱۱) استفاده از مکمل سین‌بیوتیکی در ماهیان انگشت‌قد قزل‌آلادر سطوح ۰/۵ و ۱/۵ گرم بر کیلوگرم جیره تغییری در مقادیر گلوکز و کلسترول سرم بدنبال تجویز سین‌بیوتیک به همراه نداشت(۲۳).

سرب می‌تواند موجب اثر بر متابولیسم گلوکز شود.در مطالعه یوو همکاران (۲۰۱۷) تاثیر استفاده از باکتری *Lactobacillus plantarum* سویه CCFM۶۳۹ در مواجه با فلز سنگین آلومینیوم به شکل افزودن این فلز به آب مورد بررسی گرفت. در این بررسی چهار تیمار به شکل تیمار کنترل، تیمار باکتری پروبیوتیکی، تیمار باکتری پروبیوتیکی و فلز آلومینیوم و تیمار مواجه شده با فلز آلومینیوم در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد که مواجهه ماهی تیلاپیا با فلز آلومینیوم موجب کاهش سطوح گلوکز و تری‌گلیسرید و افزایش میزان آنزیم ALT سرم بطور معنی‌دار می‌شود که بدنبال مصرف پروبیوتیک در جیره عکس این حالت رخ داد (۳۸). از طرف دیگر افزایش غلظت گلوکز در پاسخ به مواجهه با سرب در ماهی تیلاپیا (*Sarotherodon aureus*) گزارش شده است. پاسخ هیپرگلایسمیک در ماهیان دیگر نیز به دنبال مواجهه با فلزات دیگر مانند کادمیوم و مس مشاهده شده است (۲۲). نتایج مارتینزو همکاران (۲۰۰۴) نشان داد که مواجهه ماهی *Prochilodus ineatus* با دز ۲۴ میلی‌گرم در لیتر سرب به مدت۹۶ ساعت موجب افزایش گلوکز و کاهش میزان لیپید تام خون ۶ ساعت بعد مواجهه نسبت گروه کنترل می‌شود. حین مواجهه این ماهی با مقدار ۷۱ میلی‌گرم در لیتر سرب افزایش گلوکز خون، کاهش لیپید تام، کلسترول و پروتئین‌های خون مشاهده شد. افزایش میزان پروتئین، کلسترول و گلوکز سرم بدنبال مواجهه با سطوح تحت کشنده استات سرب در ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) نیزگزارش شده است (۱۱, ۲۲).

در مطالعه حاضر نتایج مربوط به سطح کاتالاز نشان داد که پس از مصرف پروبیوتیک در جیره به مدت ۴۵ روز افزایش آن رخ داده است. بعد از مصرف سرب مقدار کاتالاز در روز ۵۲ و ۵۹ در گروه پنج نسبت به گروه کنترل افزایش و در روز ۶۶ کاهش است. میزان کاتالاز در روز ۶۶ آزمایش در گروه دو نسبت به گروه کنترل سرب‌دار افزایش معنی‌داری داشت.

با سنجش فعالیت آنزیم GSH مشخص شد که در گروه یک و سه بعد از مصرف پروبیوتیک به مدت ۴۵ روز میزان آن افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشته است. سطح آنزیم مذکور در گروه پنج و گروه‌های پروبیوتیکی نسبت به گروه کنترل در تمامی روزهای بعد از مواجهه با سرب افزایش معنی‌داری داشته است.

نتایج سنجش آنزیم SOD نشان داد که در ۴۵ روز اول میزان آن در گروه دو نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشته است. بدنبال مصرف سرب کاهش معنی‌دار این آنزیم در روزهای ۵۲ و ۶۶ در گروه پنج نسبت به کنترل مشاهده شد. در روز ۵۲ در گروه سه و در روز ۶۶ در گروه دو و سه نسبت به گروه پنج افزایش معنی‌دار این آنزیم مشاهده شد.

نتیجه مقادیر MDA نشان داد که در گروه دو نسبت به گروه کنترل بعد از ۴۵ روز کاهش معنی‌داری وجود داشته است. در مواجهه با سرب میزان آن در گروه پنج نسبت به گروه چهار در روز ۵۹ و ۶۶ کاهش معنی‌داری داشت. در روز ۵۲ میزان آن در گروه دو و سه نسبت به گروه پنج کاهش داشت.

در توافق با نتایج مطالعه حاضرافزایش معنی‌دار فعالیت کاتالاز سرم در ماهی *Yoshitomi tilapia* پس از مصرف پروبیوتیک *Bacillus subtilis* مشاهده شد. بهبود فعالیت SOD در ماهی روهو (*Labeo rohita*) با مصرف پروبیوتیک‌های *Bacillus subtilis* بطور انفرادی یا در ترکیب با *Lactobacillus plantarum* و *Pseudomonas aeruginosa* گزارش شده است(۱۶). در بررسی ژانگ و همکاران (۲۰۱۳) تاثیر افزودن باکتری *Bacillus licheniformis* در جیره غذایی در ماهی آمور سیاه (*Megalobrama terminalis*) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج

این محققین نشان داد که پروبیوتیک مذکور می‌تواند موجب افزایش معنی‌دار سطوح SOD و کاتالاز و کاهش معنی‌دار مقادیر MDA سرمی و کبدی گردد. فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز نیز در سرم و بافت کبد افزایش یافت هرچند این افزایش فقط در بافت کبد معنی‌دار بوده است. در مطالعه مذکور ارتقای سیستم آنتی‌اکسیدان ماهی به نقش آنتی‌ژنی باکتری باسیلوس نسبت داده شد که می‌تواند با تحریک تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی منجر به حذف رادیکال‌های آزاد مازاد و تنظیم توازن آنتی‌اکسیدانی بدن شود (۳۹).

در مورد اثر فلزات سنگین بر سیستم دفاع آنتی‌اکسیدان/اکسیدانی افزایش فعالیت SOD، گلوتاتیون‌اس‌ترانسفراز (GST) و کاتالاز و کاهش فعالیت GSH در بافت‌های کبد، کلیه و آبشش ماهی سرماری (Channa punctatus) پس از مواجهه با فلزات سنگین مشاهده شد.چنین مشاهداتی در مطالعات دیگر در خصوص ماهیان *Barbus*، *Carassius auratus* *bocagei* و *Channa punctatus* نیز مشاهده شده است (۱۸). فلزات سنگینی که در بافت تجمع می‌یابند، همگی از نظر پتانسیل اکسیداسیون-احیا فعال محسوب می‌شوند که این امر موجب عدم تعادل بین تولید گونه‌های فعال اکسیژن و خنثی‌سازی آنها است. بنابراین این دسته از ماهیان تحت تاثیر تنش اکسیداتیو قرار دارند. این عدم تعادل می‌تواند منجر به آسیب بافت‌ها و اجزای سلولی گردد که به نوبه خود موجب القای مکانیسم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌شود. SOD آنزیمی است که باعث تبدیل آنیون سوپراکسید به پراکسید هیدروژن می‌شود. بدین ترتیب فعالیت کاتالاز نیز که موجب تجزیه هیدروژن‌پراکسید می‌شود، افزایش می‌یابد که در غیر این صورت می‌تواند از طریق غشاهای زیستی نفوذ و موجب غیرفعال‌سازی برخی از آنزیم‌ها گردد(۱۸). همچنین در گونه‌های کپور معمولی(*Cyprinus carpio*)، قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و تاس‌ماهی سیبری (*Acipenser baerii*) بعد از مواجهه با فلز سنگین سرب در آب و پس از تعیین میزان فلز در خون و بافت، در زمان وجود مقادیر کمتر فلز در خون و بافت افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسیداز و نهایتا کاهش پراکسیداسیون لیپیدی (سطح مالون‌دی‌آلدهید) مشاهده شد و افزایش غلظت فلز منجر به افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش فعالیت این آنزیم شد (۶). مقایسه شاخص‌های استرس اکسیداتیو در ماهی *Barbus bocagei* در دو رودخانه آلوده و غیر آلوده به فلزات سنگین نشان داد که در مواجهه با فلزات سنگین سطح فعالیت کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون اس-ترانسفراز، گلوتاتیون رودکتاز، گلوکز ۶-فسفات دهیدروژناز و پراکسیداسیون لیپیدی در بافت کبد افزایش می‌یابد (۲۸).

حضور فلزات سنگین در آب موجب بر هم زدن توازن اکوسیستم آبی می‌شود. فلزات سنگین از بین دیگر عوامل آلاینده سمی براحتی در بافت‌های مختلف ماهی تجمع می‌یابند که منجر به تجمع و بزرگنمایی زیستی این فلزات به یک سطح سمی می‌شود. مطالعات صورت گرفته در گونه‌های ماهی نشان داده است که تجمع زیستی این فلزات می‌تواند فعالیت‌های فیزیولوژیکی و پارامترهای بیوشیمیایی را در بافت‌ها و خون ماهی تغییر دهد. ماهیان استخوانی پیشرفته مدل‌های خوبی در ارزیابی سمیت و اثرات آلاینده‌ها روی حیوانات هستند، زیرا پاسخ‌های بیوشیمیایی آنها شبیه به پاسخ پستانداران و سایر مهره‌داران است. مکانیسم‌های دخیل در جذب زیستی فلزات سنگین توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک شامل تشکیل کمپلکس، تبادل یونی، جذب، دفع (چلاته‌سازی) و ریزترسیب می‌باشد.فراوان‌ترین پروتئین‌های سطحی در بسیاری از گونه‌های لاکتوباسیلوس پروتئین‌های لایه S می‌باشد. این باکتری‌ها دارای گروه‌های عملکردی متعددی از جمله کربوکسیلات، هیدروکسید، آمین، فسفات و هیدروسولفید با اختلاف بارهای متفاوت هستند و بنابراین با داشتن لیگاندهای مختلف می‌توانند بطور انتخابی به یون‌های فلزی متصل شوند (۲۷).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج مطالعه حاضرنشان می‌دهد که استفاده از پارامترهای بیوشیمیایی می‌تواند بطور موثری بعنوان نشانگرهای زیستی بالقوه مسمومیت با فلز سنگین سرب بکار رود. در تحقیق حاضر، تاثیر باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در بهبود فاکتورهای بیوشیمیایی و کاهش سمیت فلز سنگین سرب در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مثبت ارزیابی شد. همچنین به نظر می رسد که غلظت 5×10^{7} CFU/ gr باکتری پروبیوتیکی روی شاخص‌های سرمی تاثیر بهتری داشته است. لازم به ذکر است که تفاوت‌های موجود در مطالعات صورت گرفته می‌تواند مربوط به تفاوت در گونه ماهی، نوع و سویه پروبیوتیک، مدت زمان و دز مصرف پروبیوتیک، روش تجویز پروبیوتیک، نوع فلز سنگین، مدت مواجهه با فلز،سنجش بیومارکرها در بافت‌های مختلف، روش‌های آزمایشگاهی، شرایط محیطی و عوامل ناشناخته باشد.همچنین تحقیقات مرتبط با این زمینه به شناخت مناسب مکانیسم‌های سم‌زدایی فلزات سنگین توسط پروبیوتیک‌ها و رسیدن به روش‌های زیستی نوین و کاربردی در حذف فلزات سنگین از جیره غذایی آبزیان کمک شایانی خواهد کرد.

منابع مورد استفاده

1- Agrahari S., K.C. Pandey and K. Gopal. 2007. Biochemical alteration induced by monocrotophos in the blood plasma of fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 88,268-272.

2- Akbary P., S.S. Yarahmadi and A. Jahanbakhshi. 2018. Hematological, hepatic enzymes' activity and oxidative stress responses of gray mullet (*Mugil cephalus*) after sub-acute exposure to copper oxide. *Environmental Science and Pollution Research* 25,1800-1808.

3- Al Dohail M.A., R. Hashim and M. Aliyu Paiko. 2011. Evaluating the use of *Lactobacillus acidophilus* as a biocontrol agent against common pathogenic bacteria and the effects on the haematology parameters and histopathology in African catfish *Clarias gariepinus* juveniles. *Aquaculture Research* 42,196-209.

4- Alves L., C. Glover and C. Wood. 2006. Dietary Pb accumulation in juvenile freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Archives of* Environmental Contamination and Toxicology 51,615.

5- Balcázar J.L., I. De Blas, I. Ruiz-Zarzuela, D. Vendrell, O. Gironés and J.L. Muzquiz. 2007. Enhancement of the immune response and protection induced by probiotic lactic acid bacteria against furunculosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 51,185-193.

6- Brucka-Jastrzębska E. 2010. The effect of aquatic cadmium and lead pollution on lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in freshwater fish. *Polish Journal of Environmental Studies* 19,1139-1150.

7- Burden V., M. Sandheinrich and C. Caldwell. 1998. Effects of lead on the growth and δ-aminolevulinic acid dehydratase activity of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Environmental Pollution* 101,285-289.

8- Dai W., L. Fu, H. Du, C. Jin and Z. Xu. 2009. Changes in growth performance, metabolic enzyme activities, and content of Fe, Cu, and Zn in liver and kidney of tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to dietary Pb. *Biological trace element research* 128,176-183.

9- Dawood M.A., S. Koshio, M. Ishikawa and S. Yokoyama. 2015. Interaction effects of dietary supplementation of heat-killed Lactobacillus plantarum and β-glucan on growth performance, digestibility and immune response of juvenile red sea bream, *Pagrus major*. *Fish & Shellfish Immunology* 45,33-42.

10- El-Nezami H., P. KANKAANPÄÄ, S. Salminen and J. Ahokas. 1998. Physicochemical alterations enhance the ability of dairy strains of lactic acid bacteria to remove aflatoxin from contaminated media. Journal of food protection 61,466-468.

11- El-Shafei H. 2017. Alterations in the leucocytes and serum biochemistry in Grey Mullet (*Mugil cephalus* L.) fingerlings exposed to sub lethal doses of lead for different exposure periods. *Journal of Aquaculture Research and Development* 8.

12- Ellman G.L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82,70-77.

13- Elsanhoty R.M., I. Al-Turki and M.F. Ramadan. 2016. Application of lactic acid bacteria in removing heavy metals and aflatoxin B1 from contaminated water. *Water Science and Technology* 74,625-638.

14- Fırat Ö. and F. Kargın. 2010. Individual and combined effects of heavy metals on serum biochemistry of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Archives of environmental contamination and toxicology* 58,151-157.

15- Giannenas I., E. Triantafillou, S. Stavrakakis, M. Margaroni, S. Mavridis, T. Steiner and E. Karagouni. 2012. Assessment of dietary supplementation with carvacrol or thymol containing feed additives on performance, intestinal microbiota and antioxidant status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 350,26-32.

16- Giri S., V. Sukumaran, S. Sen and P. Jena. 2014. Effects of dietary supplementation of potential probiotic *Bacillus subtilis* VSG1 singularly or in combination with *Lactobacillus plantarum* VSG3 or/and Pseudomonas aeruginosa VSG2 on the growth, immunity and disease resistance of Labeo rohita. *Aquaculture Nutrition* 20,163-171.

17- Heydarnejad M.S., M. Khosravian-Hemamai and A. Nematollahi. 2013. Effects of cadmium at sub-lethal concentration on growth and biochemical parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Irish veterinary journal* 66,11.

18- Javed M., M.I. Ahmad, N. Usmani and M. Ahmad. 2017. Multiple biomarker responses (serum biochemistry, oxidative stress, genotoxicity and histopathology) in Channa punctatus exposed to heavy metal loaded waste water. *Scientific reports* 7,1675.

19- Kane A.M., M. Soltani, H.A. Ebrahimzahe-Mousavi and K. Pakzad. 2016. Influence of probiotic, *Lactobacillus plantarum* on serum biochemical and immune parameters in vaccinated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against streptococcosis/lactococosis. *International Journal of Aquatic Biology* 4,285.

20- Koroluk M., L. Ivanova and I. Maiorova. 1988. The method of definition of the activeness of catalase. *Laboratorial work*,16-19.

21- Latha M. and L. Pari. 2003. Preventive effects of Cassia auriculata L. flowers on brain lipid peroxidation in rats treated with streptozotocin. *Molecular and Cellular Biochemistry* 243,23-28.

22- Martinez C., M. Nagae, C. Zaia and D. Zaia. 2004. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Brazilian Journal of Biology* 64,797-807.

23- Mehrabi Z., F. Firouzbakhsh and A. Jafarpour. 2012. Effects of dietary supplementation of synbiotic on growth performance, serum biochemical parameters and carcass composition in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) fingerlings. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 96,474-481.

24- Mirmazloomi S., D. Shahsavani and H. Baghshani. 2015. Studies on the protective effects of ascorbic acid and thiamine on lead-induced lipid and protein oxidation as well as enzymatic alterations in some tissues of *Cyprinus carpio*. *Comparative Clinical Pathology* 24,1231-1236.

25- Mohammadian T., M. Alishahi, M. Ghorbanpoor, M.R. Tabandeh and D. Gharibi. 2014. Evaluation of probiotic potential and immunostimulatory effects of some Lactobacillus bacteria isolated from Barbus grypus intestine. PhD Thesis, Shahid Chamran University Of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

26- Mojabi A. 2011. Veterinary clinical biochemistry. 2nd Ed (In Farsi).

27- Mrvčić J., D. Stanzer, E. Šolić and V. Stehlik-Tomas. 2012.

Interaction of lactic acid bacteria with metal ions: opportunities for improving food safety and quality. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28,2771-2782.

28- Peixoto F.P., J. Carrola, A. Coimbra, C. Fernandes, P. Teixeira, L. Coelho, I. Conceição, M.M. Oliveira and A. Fontainhas-Fernandes. 2013. Oxidative stress responses and histological hepatic alterations in barbel, Barbus bocagei, from Vizela River, Portugal. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental* 29,29-38.

29- Rahimikia E. 2017. Analysis of antioxidants and serum biochemical responses in goldfish under nickel exposure by sub-chronic test. *Journal of Applied Animal Research* 45,320-325.

30- Safari R., M. Adel, C.C. Lazado, C.M.A. Caipang and M. Dadar. 2016. Host-derived probiotics *Enterococcus casseliflavus* improves resistance against Streptococcus iniae infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) via immunomodulation. *Fish & Shell-Fish Immunology* 52,198-205.

31- Sharifuzzaman S., A. Al-Harbi and B. Austin. 2014. Characteristics of growth, digestive system functionality, and stress factors of rainbow trout fed probiotics Kocuria SM1 and Rhodococcus SM2. *Aquaculture* 418,55-61.

32- Singh A.L. and P. Sarma. 2010. Removal of arsenic (III) from waste water using *Lactobacillus acidophilus. Bioremediation Journal* 14,92-97.

33- Srivastav A.K., R. Rai, N. Suzuki, D. Mishra and S.K. Srivastav. 2013. Effects of lead on the plasma electrolytes of a freshwater fish, *Heteropneustes fossilis. International Aquatic Research* 5,4.

34- Toutou M.M., A.A.A. Soliman, M.M.S. Farrag and A.E. Abouelwafa. 2016. Effect of probiotic and synbiotic food supplementation on growth performance and healthy status of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes, 1844). 1,111-117.

35- Urban P. and R. Kuthan. 2004. Application of probiotics in the xenobiotic detoxification therapy. *Nukleonika* 49,43-45.

36- Valiallahi J., M. Pourabasali, E. Janalizadeh and A. Bucio. Use of Lactobacillus for improved growth, and enhanced biochemical, hematological and digestive enzyme activity in fishes,(Cyprinus carpio L.), at Mazandaran Iran. *North American Journal of Aquaculture.*

37- Vine N., W. Leukes, H. Kaiser, S. Daya, J. Baxter and T. Hecht. 2004. Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *Journal of Fish Diseases* 27,319-326.

38- Yu L., Q. Zhai, J. Zhu, C. Zhang, T. Li, X. Liu, J. Zhao, H. Zhang, F. Tian and W. Chen. 2017. Dietary Lactobacillus plantarum supplementation enhances growth performance and alleviates aluminum toxicity in tilapia. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 143,307-314.

39- Zhang C.-N., X.-F. Li, W.-N. Xu, G.-Z. Jiang, K.-L. Lu, L.-N. Wang and W.-B. Liu. 2013. Combined effects of dietary fructooligosaccharide and *Bacillus licheniformis* on innate immunity, antioxidant capability and disease resistance of triangular bream (*Megalobrama terminalis*). *Fish & Shellfish Immunology* 35,1380-1386.

جدول ۱- اثر غلظت‌های مختلف *Lactobacillus acidophilus* بر برخی شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون قزل‌آلا در مراحل مختلف نمونه‌گیری. حروف کوچک لاتین ناهمنام در هر سطر و حروف بزرگ ناهمنام در هر ستون نشانگر اختلاف معنی‌دار است ($p < ۰/۰۵$).

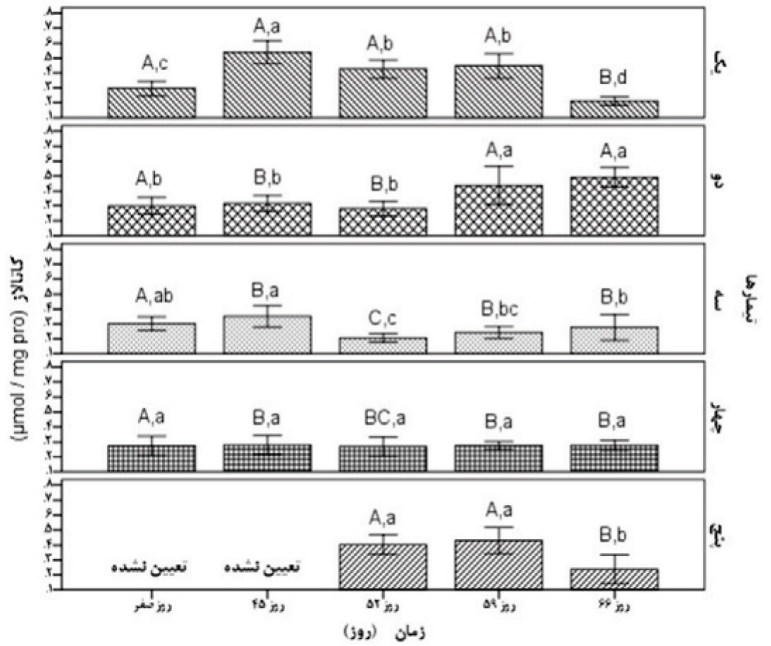
شاخص	گروه ها	روز صفر	روز ۴۵	روز ۵۲	روز ۵۹	روز ۶۶
آلبومین (gr/dl)	گروه یک	۱/۹۱ ± ۰/۱۷ A,c	۱/۹۲ ± ۰/۳۲ A,c	۲/۲۵ ± ۰/۲۹ A,ab	۲ ± ۰/۲۴ A,bc	۲/۳۵ ± ۰/۱۵ A,a
	گروه دو	۱/۹۰ ± ۰/۱۹ A,b	۱/۷۴ ± ۰/۱۸ A,b	۱/۸۳ ± ۰/۱۶ B,b	۱/۹۰ ± ۰/۲۱ AB,b	۲/۲۸ ± ۰/۲۶ AB,a
	گروه سه	۱/۹۶ ± ۰/۱۶ A,ab	۱/۸ ± ۰/۲ A,b	۱/۹۳ ± ۰/۳۱ B,ab	۲/۱۲ ± ۰/۲ A,ab	۱/۸۹ ± ۰/۱۹ C,ab
	گروه چهار	۱/۹۶ ± ۰/۱۱ A,a	۱/۹۶ ± ۰/۱۴ A,a	۱/۹۸ ± ۰/۱۴ B,a	۱/۹۳ ± ۰/۱۱ AB,a	۲/۰۲ ± ۰/۰۷ BC,a
	گروه پنج	تعیین نشده	تعیین نشده	۲/۰۲ ± ۰/۱۴ AB,a	۱/۷۴ ± ۰/۲۶ B,ab	۱/۵۸ ± ۰/۳۸ D,b
آلکالین فسفاتاز (U/l)	گروه یک	۲۷۹/۷۴ ± ۸/۷۲ A,b	۳۱۹/۹ ± ۳۹/۶۲ AB,a	۲۱۶/۳۹ ± ۱۴/۱۵ CD,cd	۱۹۷/۰۶ ± ۲۰/۴۱ B,d	۲۳۸/۰۷ ± ۲۳/۰۲ C,c
	گروه دو	۲۷۶ ± ۵/۵۳ A,b	۳۳۷/۴۶ ± ۵۱/۹۳ A,a	۱۹۰/۲۴ ± ۲۲/۴۹ D,c	۱۴۳/۷۱ ± ۱۷/۴۷ C,d	۱۳۹/۲۴ ± ۱۶/۲۳ D,d
	گروه سه	۲۸۳/۵۸ ± ۱۱/۰۵ A,ab	۲۶۴/۵۹ ± ۴۷/۱۵ C,b	۳۱۰/۷۹ ± ۳۰/۵۹ A,a	۲۰۳/۱۹ ± ۲۹/۰۱ B,c	۲۵۶/۸۱ ± ۲۵/۷۲ B,b
	گروه چهار	۲۷۹/۲۸ ± ۲/۳۸ A,a	۲۷۷ ± ۴/۲۸ BC,a	۲۷۵/۶۷ ± ۴/۵۳ B,a	۲۷۵/۶۴ ± ۴/۵۸ A,a	۲۷۵/۶۷ ± ۵/۰۳ BC,a
	گروه پنج	تعیین نشده	تعیین نشده	۲۳۷/۴ ± ۳۷/۴۲ C,b	۲۲۳/۴۳ ± ۷۲/۴۱ B,b	۳۸۹/۳۳ ± ۳۸/۶۴ A,a
آسپارتات آمینوترنسفراز (U/l)	گروه یک	۱/۰۶ ± ۰/۲۸ A,b	۱/۲۱ ± ۰/۲۳ A,b	۱/۴۵ ± ۰/۲۳ B,a	۰/۳۱ ± ۰/۰۵ C,c	۱/۲۱ ± ۰/۱۰ B,b
	گروه دو	۱/۰۸ ± ۰/۲۵ A,bc	۱/۲۶ ± ۰/۱۶ A,b	۱/۰۱ ± ۰/۱۷ C,c	۲/۲۰ ± ۰/۱۱ A,a	۲/۲۴ ± ۰/۱۹ A,a
	گروه سه	۱/۰۸ ± ۰/۲۶ A,ab	۰/۹۱ ± ۰/۲ B,b	۱/۰۱ ± ۰/۲ C,ab	۰/۱۸ ± ۰/۰۲ C,c	۱/۳۲ ± ۰/۱۸ B,a
	گروه چهار	۱/۰۳ ± ۰/۳ A,a	۰/۸۶ ± ۰/۲ B,a	۰/۸۸ ± ۰/۲ C,a	۰/۸۸ ± ۰/۱۹ B,a	۰/۸۵ ± ۰/۲۲ C,a
	گروه پنج	تعیین نشده	تعیین نشده	۲/۵۲ ± ۰/۴۹ A,a	۰/۸۳ ± ۰/۲ B,b	۱/۱۳ ± ۰/۳۹ B,b
لاکتات دهیدروژناز (U/l)	گروه یک	۱۷/۸۱ ± ۱/۹۵ A,a	۱۵/۷ ± ۰/۷۴ A,ab	۱۲/۸۲ ± ۲/۱۲ B,b	۱۷/۷۱ ± ۳/۳۶ AB,a	۱۴/۲۷ ± ۲/۵۵ B,b
	گروه دو	۱۸/۴۳ ± ۲/۳۸ A,a	۱۶/۰۲ ± ۳/۷۸ A,a	۱۰/۵۲ ± ۰/۲۵ B,b	۱۰/۵۸ ± ۰/۴۷ C,b	۱۰/۶۹ ± ۰/۲۸ CD,b
	گروه سه	۱۹/۳۸ ± ۳/۳۵ A,a	۱۵/۸۲ ± ۰/۴۷ A,bc	۱۸/۳۴ ± ۲/۴۷ A,ab	۱۴/۶۹ ± ۳/۳۵ B,c	۱۲/۸۲ ± ۲/۲۱ BC,c
	گروه چهار	۱۷/۸۳ ± ۲/۹۵ A,a	۱۹/۲۹ ± ۳/۸۷ A,a	۱۹/۰۷ ± ۲/۵۸ A,a	۱۹/۴۷ ± ۳/۷۳ A,a	۱۸/۲۹ ± ۲/۳۸ A,a
	گروه پنج	تعیین نشده	تعیین نشده	۸/۰۱ ± ۲/۱۸ C,b	۱۵/۵۱ ± ۳/۸۵ B,a	۹/۶۱ ± ۳/۱۶ D,b

ادامه جدول ۱ -

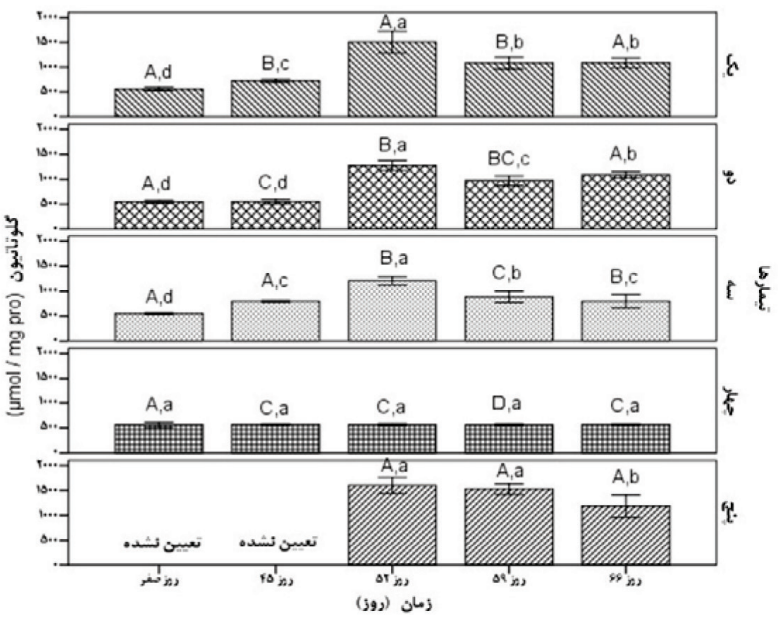
شاخص	گروه ها	روز صفر	روز ۴۵	روز ۵۲	روز ۵۹	روز ۶۶
فسفر (mg/dl)	گروه یک	۵/۷۳ ± ۰/۴۵ A,d	۶/۷۱ ± ۰/۹۶ C,cd	۸/۹۴ ± ۱/۰۴ B,b	۷/۴۵ ± ۱/۸۸ B,bc	۱۱/۵۹ ± ۱/۲۴ A,a
	گروه دو	۵/۵۱ ± ۰/۸۹ A,b	۱۰/۹۵ ± ۲/۱۸ B,a	۱۰/۱۶ ± ۱/۵۶AB,a	۱۰/۱۰ ± ۲/۶۷ A,a	۱۰/۷۲ ± ۱/۳۹ A,a
	گروه سه	۵/۴۶ ± ۰/۶ A,c	۱۳/۱۲ ± ۱/۵۶ A,a	۹/۸۶ ± ۱/۴۴ B,b	۱۰/۴ ± ۳/۳۴ A,b	۱۰/۱۷ ± ۱/۵۶ A,b
	گروه چهار	۵/۸۷ ± ۰/۴۴ A,a	۶/۰۹ ± ۰/۳۵ C,a	۶/۰۹ ± ۰/۳۵ C,a	۵/۸۹ ± ۰/۷ B,a	۶/۰۹ ± ۰/۳۵ B,a
	گروه پنج	تعیین نشده	تعیین نشده	۱۱/۳۹ ± ۱/۴۷ A,a	۱۰/۳ ± ۲/۹ A,a	۱۰/۴۴ ± ۲/۸۵ A,a
کلرید (gr/dl)	گروه یک	۱۱۱/۲۷ ± ۵/۱۲ A,ab	۱۱۰/۷۱ ± ۱۲/۸۸ AB,ab	۱۲۰/۷۳ ± ۱۴/۳۰ A,a	۱۰۶/۸۸ ± ۱۴/۶۸ BC,b	۱۲۴/۳۵ ± ۸/۴۳ AB,a
	گروه دو	۱۱۲/۱۹ ± ۹/۳۱ A,ab	۱۰۸/۱۲ ± ۱۸/۴۷ B,ab	۱۲۳/۳۹ ± ۱۳/۹۹ A,a	۹۹/۶۲ ± ۷/۳۶ C,a	۱۲۲/۲۹ ± ۱۶/۴۶ AB,b
	گروه سه	۱۱۳/۴۶ ± ۶/۳۰ A,b	۱۲۴/۳۳ ± ۱۷/۹۵ A,ab	۱۱۹/۶۱ ± ۱۶/۶۵ A,ab	۹۷/۸۲ ± ۱۰/۶۱ C,c	۱۲۹/۸۲ ± ۱۵/۶۲ A,a
	گروه چهار	۱۱۳/۹۴ ± ۱۳/۱۱ A,a	۱۰۹/۴۶ ± ۵/۶۹ AB,a	۱۱۰/۲۱ ± ۶/۶۸ A,a	۱۱۶/۱۶ ± ۱۰/۹۵ AB,a	۱۰۹/۹۷ ± ۷/۱۸ B,a
	گروه پنج	تعیین نشده	تعیین نشده	۱۲۰/۱۱ ± ۲۰/۰۶ A,a	۱۲۴/۱۴ ± ۲۰/۷۰ A,a	۱۲۱/۵۱ ± ۱۸/۸۷ AB,a
کلسترول (mg/dl)	گروه یک	۲۰۸/۳۷ ± ۱۵/۸۲ A,b	۲۱۹/۰۴ ± ۲۰/۹ A,b	۱۴۳/۲۱ ± ۹/۱۷ B,d	۱۸۱/۹۶ ± ۱۲/۹۷ C,c	۲۷۱/۶۷ ± ۳۴/۵ A,a
	گروه دو	۲۰۶/۳۵ ± ۲۴/۶۶ A,b	۱۴۲/۸۵ ± ۱۶/۰۹C,c	۱۱۶/۸۲ ± ۱۴/۲۵ C,d	۱۵۵/۴۶ ± ۱۳/۶۵ D,c	۲۴۸/۶۴ ± ۱۹ A,a
	گروه سه	۲۰۳/۳۹ ± ۲۶/۷۸ A,b	۱۸۹/۰۲ ± ۲۴/۰۳ B,b	۱۱۸/۵۱ ± ۱۲/۱۹ C,c	۲۳۳/۱۶ ± ۲۴/۷۸ A,a	۲۳۸/۰۴ ± ۳۶/۵۴ AB,a
	گروه چهار	۲۰۹/۹۵ ± ۳۰/۹۲ A,a	۲۱۰/۴۷ ± ۱۵/۵ A,a	۲۱۳/۸ ± ۱۰/۱۳ A,a	۲۰۷/۱۳ ± ۱۴/۲۸ B,a	۲۱۲/۱۵ ± ۱۳/۸۶ B,a
	گروه پنج	تعیین نشده	تعیین نشده	۱۴۱/۰۴ ± ۸/۸۵ B,a	۱۴۴/۳۱ ± ۲۱/۹۹ D,a	۱۳۹/۶۷ ± ۳۰/۹۱ C,a
کلسیم (mg/dl)	گروه یک	۹/۳۸ ± ۲/۲۲ A,ab	۷/۵۳ ± ۱/۰۸ B,b	۹/۶۴ ± ۱/۴۴ A,a	۹/۴۷ ± ۱/۷۴ A,ab	۱۱/۰۳ ± ۱/۵۹ A,a
	گروه دو	۹/۷۶ ± ۲/۷۹ A,a	۹/۵۹ ± ۱/۵۱ A,a	۹/۵۸ ± ۱/۲۴ A,a	۱۰/۱۹ ± ۱/A,a۹۲	۱۰/۸۵ ± ۱/۵۹ A,a
	گروه سه	۹/۷۲ ± ۱/۹۹ A,a	۱۰/۱۷ ± ۱/۴۸ A,a	۹/۰۲ ± ۱/۳۸ A,a	۹/۱۱ ± ۱/۹۹ A,a	۱۱/۱۸ ± ۱/۶۵ A,a
	گروه چهار	۹/۳۸ ± ۲/۴۱ A,a	۹/۳۳ ± ۲/۰۱ A,a	۹/۰۹ ± ۲/۱۲ A,a	۹/۵۴ ± ۲/۲۱ A,a	۹/۳۹ ± ۲/۳۱ A,a
	گروه پنج	تعیین نشده	تعیین نشده	۱۰/۹۶ ± ۲/۰۴ A,a	۱۰/۶ ± ۲/۱۶ A,a	۱۰/۶۸ ± ۱/۸۸ A,a

ادامه جدول ۱ -

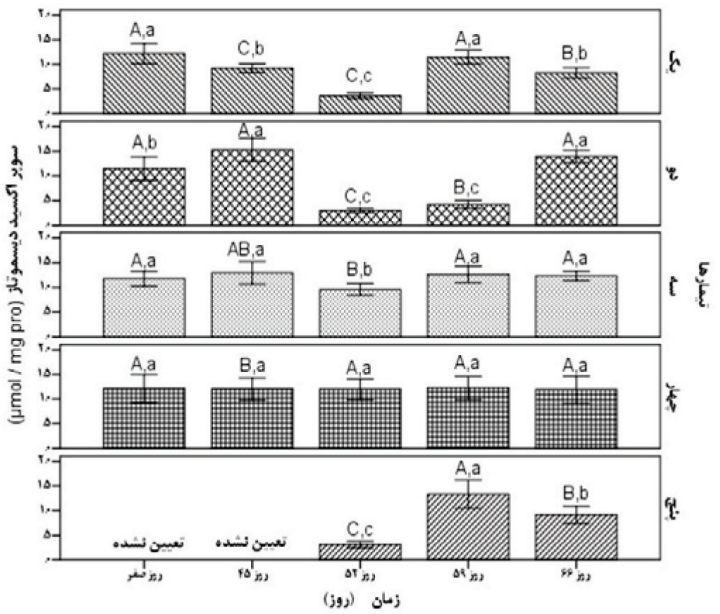
شاخص	گروه ها	روز صفر	روز ۴۵	روز ۵۲	روز ۵۹	روز ۶۶
گلوکز (mg/dl)	گروه یک	۵۲/۷۷ ± ۶/۸۸ A,b	۴۲/۳۷ ± ۷/۲۳ B,c	۵۶/۰۲ ± ۷/۴۲ AB,b	۷۷/۷۷ ± ۵/۴۶ B,a	۸۱/۴۷ ± ۷/۴۸ A,a
	گروه دو	۵۰/۸۵ ± ۵/۲۳ A,c	۸۶/۰۵ ± ۱۰/۷۲ A,a	۶۵/۲ ± ۹/۰۴ A,b	۷۴/۴۴ ± ۱۴/۵۳ B,ab	۷۰/۲ ± ۱۱/۲۷ B,b
	گروه سه	۵۵/۳۴ ± ۷/۹۹ A,c	۷۶/۷۵ ± ۱۰/۳۵A,b	۵۷/۴۹ ± ۷/۰۵ A,c	۹۴/۰۶ ± ۱۲/۱۸ A,a	۸۰/۲۵ ± ۶/۸۴ AB,b
	گروه چهار	۵۱/۷۶ ± ۸/۹۴ A,a	۴۷/۲۳ ± ۲/۲۲ B,a	۴۷/۰۲ ± ۲/۰۵ BC,a	۵۰/۷۶ ± ۴/۶۵ C,a	۴۶/۳۶ ± ۱/۲۶ C,a
	گروه پنج	تعیین نشده	تعیین نشده	۴۵/۰۵ ± ۱۰/۷۲ C,a	۴۲/۷ ± ۱۰/۶۳ D,a	۴۰/۴۷ ± ۹/۱۷ C,a
منیزیم (mg/dl)	گروه یک	۱/۸۶ ± ۰/۳۱A,bc	۲/۲۸ ± ۰/۳۷ AB,a	۱/۷۷ ± ۰/۳۳ A,c	۱/۷۹ ± ۰/۲ B,c	۲/۱۲ ± ۰/۲۳ AB,ab
	گروه دو	۱/۸۵ ± ۰/۴۳ A,a	۱/۷۶ ± ۰/۳۱ C,a	۱/۹۵ ± ۰/۱۹ A,a	۱/۹۷ ± ۰/۲۷ B,a	۱/۸۴ ± ۰/۱۳ B,a
	گروه سه	۱/۶۸ ± ۰/۲۵ A,c	۲/۵ ± ۰/۴۳A,ab	۱/۶۹ ± ۰/۲۷ A,c	۲/۷۳ ± ۰/۴۹ A,a	۲/۳۴ ± ۰/۱۹ A,b
	گروه چهار	۱/۷۷ ± ۰/۴۴ A,a	۱/۸۳ ± ۰/۳ C,a	۱/۹ ± ۰/۳۶ A,a	۱/۹۱ ± ۰/۴۱ B,a	۲/۰۷ ± ۰/۱۸ AB,a
	گروه پنج	تعیین نشده	تعیین نشده	۱/۹۱ ± ۰/۴۹ A,a	۱/۹۶ ± ۰/۳۹ B,a	۱/۸۹ ± ۰/۳۹ B,a
تریگلیسرید (mg/dl)	گروه یک	۲۲۶/۹۹ ± ۲۸/۲ A,b	۲۲۵/۶۶ ± ۲۵/۷۹ AB,b	۲۲۰/۷۳ ± ۲۸/۷۸ B,bc	۱۹۱/۳ ± ۲۷/۷۷ A,c	۲۵۸/۱۸ ± ۳۱/۰۸ A,a
	گروه دو	۲۱۹/۵۸ ± ۲۰/۹۸ A,a	۱۸۸/۱۹ ± ۳۲/۵۷ C,b	۱۷۸/۱۵ ± ۱۸/۵۶ C,b	۱۸۰/۵۱ ± ۲۰/۶۲ A,b	۲۴۸/۵۳ ± ۴۳/۲۹ A,a
	گروه سه	۲۲۷/۰۳ ± ۲۱/۸۴ A,b	۲۰۳/۲۰ ± ۴۱/۳۹ BC,bc	۲۶۶/۰۷ ± ۲۰/۹ A,a	۱۸۲/۷۴ ± ۳۰/۰۷ A,c	۲۳۳/۱۱ ± ۳۱/۸۲ A,ab
	گروه چهار	۲۱۸ ± ۴۷/۴۴ A,a	۲۵۳/۵ ± ۲۲/۰۴ A,a	۲۱۹/۴۶ ± ۳۴/۸۴ B,a	۲۱۷/۷۲ ± ۴۴/۷۸ A,a	۲۱۹/۱۶ ± ۲۲/۷۸ A,a
	گروه پنج	تعیین نشده	تعیین نشده	۲۱۷/۷۷ ± ۳۶/۶۷ B,a	۱۷۸/۳۹ ± ۱۳/۲۶ A,b	۱۷۲/۷۹ ± ۱۵/۵۷ B,b



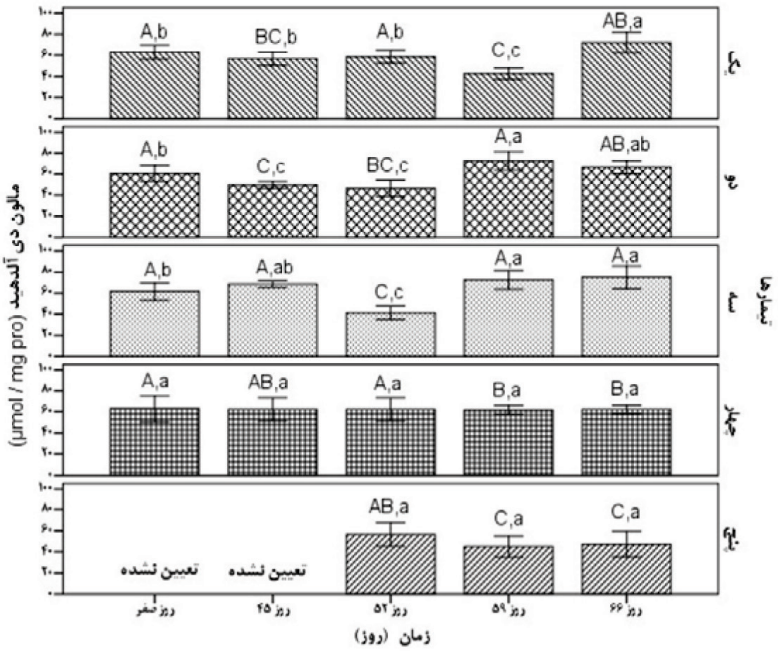
شکل ۱- نتایج مربوط به سنجش میزان فعالیت کاتالاز سرم در تیمارهای مختلف طی مراحل مختلف نمونه‌برداری. بیان داده‌ها به شکل Mean±SD می باشد. حروف کوچک لاتین ناهمنام نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر سطر و حروف بزرگ ناهمنام نشانگر تفاوت معنی‌دار در هر ستون است (p>۰/۰۵).



شکل۲- نتایج مربوط به سنجش فعالیت آنزیم گلوتاتیون سرم در تیمارهای مختلف طی مراحل مختلف نمونه‌برداری. بیان داده‌ها به شکل Mean±SD می باشد. حروف کوچک لاتین ناهمنام نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر سطر و حروف بزرگ ناهمنام نشانگر تفاوت معنی‌دار در هر ستون است (p>۰/۰۵).



شکل ۳- نتایج مربوط به سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز سرم در تیمارهای مختلف طی مراحل مختلف نمونه‌برداری. بیان داده‌ها به شکل Mean±SD می باشد. حروف کوچک لاتین ناهمنام نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر سطر و حروف بزرگ ناهمنام نشانگر تفاوت معنی‌دار در هر ستون است (p>۰/۰۵).



شکل۴- نتایج مربوط به سنجش مقادیر مالون‌دی‌آلدهید سرم در تیمارهای مختلف طی مراحل مختلف نمونه‌برداری. بیان داده‌ها به شکل Mean±SD می باشد. حروف کوچک لاتین ناهمنام نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر سطر و حروف بزرگ ناهمنام نشانگر تفاوت معنی‌دار در هر ستون است (p>۰/۰۵).