نشریه علوم درمانگاهی دامپزشکی ایران؛ ۱۴۰۴؛ ۱۹(۲): ۱۵-۲۴.
http://doi.org/10.22034/ijvcs.2026.14886.1088

تأثیر مصرف هم‌زمان پروبیوتیک *ویسلا کانفوسا* و رنگدانه آستاگزانتین بر برخی شاخص‌های ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

سیاوش اسدی [۱]، شفیق شفیعی*[۲]، مسعود قربانپور [۳]، اسماعیل پیرعلی [۴]

۱. دانشجوی دکتری بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۲. گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد-ایران.
۳. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۴. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.

دریافت: ۲۹ دی‌ماه ۱۴۰۴ **پذیرش:** ۲ خردادماه ۱۴۰۵

چکیده

آبزی‌پروری به‌عنوان بخشی کلیدی از تولید غذایی جهانی نیازمند راهبردهایی برای کاهش تلفات ناشی از بیماری و تقویت سلامت ماهیان پرورشی است. مکمل‌های تغذیه‌ای مانند پروبیوتیک‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها به‌عنوان ابزارهای امیدوارکننده برای بهبود ایمنی و سلامت ماهیان مورد توجه قرار گرفته‌اند. در این مطالعه، اثر مصرف هم‌زمان پروبیوتیک *ویسلا کانفوسا* (*Weissella confusa*) و رنگدانه آنتی‌اکسیدانی آستاگزانتین بر بیان ژن‌های ایمنی در قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بررسی شد. برای این منظور ۲۴۰ قطعه ماهی به ۴ گروه (شاهد، پروبیوتیک، آستاگزانتین و ترکیبی؛ هر تیمار در ۳ تکرار و هر تکرار ۲۰ قطعه) تقسیم و به مدت ۲۸ روز تغذیه شدند. بیان ژن‌های اینترفرون گاما، اینترلوکین ۶، اینترلوکین ۱۰، اینترلوکین ۱۲، اینترلوکین ۱۷ و فاکتور نکروز تومووری آلفا در کلیه قدامی و طحال، در روزهای ۱۴ و ۲۸ مطالعه، با qPCR اندازه‌گیری شد. بیان ژن‌های اینترلوکین ۱۰، اینترلوکین ۱۲، اینترلوکین ۱۷و TNF-α، در تیمار ترکیبی نسبت به سایر گروه‌ها، به‌طور معنی‌داری ($P<0/05$) بیشتر بود. در گروه ترکیبی، بیان اینترفرون گاما نیز به‌طور معنی‌داری ($P<0/05$) در روز ۱۴ افزایش ولی در روز ۲۸ کاهش یافت. بیان اینترلوکین ۶ در روز ۲۸ به‌طور معنی‌داری ($P<0/05$) در گروه‌های پروبیوتیک و ترکیبی بالاتر از گروه شاهد بود. الگوی زمانی بیان سیتوکین‌ها بیانگر تنظیم دینامیک و اثرات هم‌افزایی پروبیوتیک و آستاگزانتین بود. به نظر می‌رسد که تجویز هم‌زمان *ویسلا کانفوسا* و آستاگزانتین منجر به تقویت شاخص‌های مولکولی ایمنی در قزل‌آلای رنگین‌کمان شده و می‌تواند به‌عنوان یک راهبرد تغذیه‌ای مؤثر برای بهبود سلامت و مقاومت به بیماری در تولیدات آبزی‌پروری پیشنهاد گردد.

واژه‌های کلیدی: قزل‌آلای رنگین‌کمان، پروبیوتیک، آستاگزانتین، سیتوکین، *ویسلا کانفوسا*

مقدمه

آبزی‌پروری نقش حیاتی در تأمین امنیت غذایی جهانی داشته و سهم قابل‌توجهی در تولید فرآورده‌های غذایی ایفا می‌کند. بااین‌وجود پرورش متراکم منجر به افزایش تنش‌های فیزیولوژیکی و بروز بیماری‌های بیشتر در ماهیان می‌شود که زیان‌های اقتصادی چشمگیری را به دنبال دارد. ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌عنوان گونه‌ای باارزش تجاری بالا و مورد مصرف گسترده، نسبت به انواع بیماری‌ها حساس است؛ از این‌رو، تدوین راهبردهایی برای تقویت سیستم ایمنی این ماهی از الزامات توسعه پایدار آبزی‌پروری محسوب می‌شود (۵، ۲۰، ۲۱).

سیستم ایمنی اکتسابی ماهیان در مقایسه با مهره‌داران عالی‌تر ضعیف‌تر بوده و کارایی کمتری دارد، که بر اهمیت تقویت ایمنی ذاتی برای پیشگیری از بیماری‌ها در آبزی‌پروری تأکید دارد (۱۰، ۱۷). برای پاسخ به این چالش‌ها، در آبزی پروری به‌طور فزاینده‌ای به استفاده از روش‌ها و مکمل‌های

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: sshafiei@sku.ac.ir

نوین روی آورده شده است. پروبیوتیک‌ها به‌عنوان میکروارگانیسم‌های زنده‌ای تعریف می‌شوند که در صورت مصرف در مقادیر کافی، باعث ارتقاء سلامتی میزبان می‌گردند (۷، ۱۳). این مکمل‌ها به‌طور گسترده‌ای برای بهبود عملکرد رشد، افزایش مقاومت در برابر بیماری و تنظیم سیستم ایمنی در ماهیان مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (۲). پروبیوتیک‌ها می‌توانند فعالیت فاگوسیتی، سطح لیزوزیم، فعالیت دستگاه مکمل، انفجار تنفسی و همچنین بیان سایتوکاین‌ها در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان را افزایش دهند (۱۱). این میکروارگانیسم‌ها با تعدیل سطوح سایتوکین‌های پیش‌التهابی مانند IL-1β و TNF-α و نیز سیتوکین‌های ضدالتهابی، تعادل مناسبی در پاسخ ایمنی ایجاد کرده و موجب افزایش کارایی سیستم دفاعی ماهی می‌شوند. همچنین، پروبیوتیک‌ها از طریق بهبود سلامت و عملکرد دستگاه گوارش و تحریک بافت‌های لنفوئیدی مرتبط با روده، نقش مهمی در افزایش مقاومت به بیماری‌ها و حفظ هموستازی ایمنی ایفا می‌کنند. میزان این اثرات به سویه پروبیوتیکی، دوز مصرفی، مدت زمان استفاده و گونه ماهی بستگی دارد (۱۰، ۱۱).

باکتری *ویسلا کانفوسا* پتانسیل بالایی به‌عنوان پروبیوتیک در آبزی‌پروری نشان داده است. این باکتری ابتدا از غذاهای تخمیرشده و دستگاه گوارش حیوانات جدا شد و مطالعات اخیر اثرات سودمندی آن بر سلامت ماهی‌ها را نشان داده‌اند (۱۸). Kahyani و همکاران در سال ۲۰۲۱ نشان داده‌اند که افزودن *ویسلا کانفوسا* به غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌طور معنی‌داری فعالیت لیزوزیم، فعالیت عامل مکمل و بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی مانند فاکتور نکروز توموری آلفا و اینترلوکین ۸ را افزایش داده، موجب بهبود عملکرد رشد و تغییر در میکروبیوتای روده می‌شود (۴).

آستاگزانتین به‌طور طبیعی در جلبک‌ها، پلانکتون‌ها و غذاهای دریایی یافت می‌شود و به‌دلیل ایجاد رنگ صورتی در گوشت ماهیان مورد توجه پرورش‌دهندگان قرار گرفته است. فراتر از خاصیت رنگ‌بخشی، این ترکیب دارای خواص آنتی‌اکسیدانی قدرتمندی است که عملکرد سیستم ایمنی را بهبود می‌بخشد (۸، ۱۶). مطالعه Amar و همکاران در سال ۲۰۰۴ نشان داد که افزودن آستاگزانتین به جیره با افزایش فعالیت عامل مکمل، ارتقاء بیگانه‌خواری و محافظت سلول‌های ایمنی در برابر آسیب اکسیداتیو، موجب تقویت ایمنی ذاتی در قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌گردد (۱)؛ بااین‌وجود برخی مطالعات نقش تعدیل‌گر ایمنی آن را تقویت می‌کند (۸، ۱۶).

درحالی‌که اثرات مفید پروبیوتیک‌ها و آستاگزانتین به‌تنهایی اثبات شده است، اطلاعات در خصوص مصرف هم‌زمان آن‌ها به‌ویژه در قزل‌آلای رنگین‌کمان محدود است. یافته‌های حاصل از مطالعه در میگوی سفید (*Litopenaeus vannamei*) نشان داده که ترکیب آستاگزانتین با پروبیوتیک *لاکتوکوکوس لاکتیس* (*Lactococcus lactis*) همواره اثر افزایشی نداشته و آستاگزانتین به‌تنهایی اثرگذاری بیشتری دارد (۶)؛ این یافته‌ها احتمالاً بیانگر وجود اثرات وابسته به گونه است و لزوم تحقیقات هدفمند در قزل‌آلای رنگین‌کمان را برجسته می‌سازد؛ بر این اساس مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر مصرف هم‌زمان *ویسلا کانفوسا* و آستاگزانتین بر برخی شاخص‌های ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام شد.

مواد و روش کار

تعداد ۲۴۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی ۵±۲۰۰ گرم پس از دوره عادت‌پذیری ۷ روزه، به‌صورت تصادفی به چهار گروه (هر گروه شامل ۳ تکرار و هر تکرار شامل ۲۰ قطعه ماهی) تقسیم شدند. ماهیان در ۱۲ تانک مجزا با حجم ۲۰۰ لیتر نگهداری شدند. شرایط فیزیکوشیمیایی آب در طول مطالعه ثابت و شامل دمای ۰/۵±۱۴ درجه سانتی‌گراد، غلظت اکسیژن محلول حدود ۹ میلی‌گرم در لیتر، pH برابر ۷ و آمونیاک کمتر از ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر بود. خوراک‌ها به‌صورت اکسترود شده (شرکت فرادانه آبزیان) تهیه و در دمای ۸ درجه نگهداری شدند. جیره‌های غذایی زیر با استناد به مطالعه‌ی Shabanzadeh و همکاران در سال ۲۰۲۳ در خصوص میزان

آستاگزانتین (۱۵) و Kahyani و همکاران در سال ۲۰۲۲ در خصوص میزان پروبیوتیک *ویسلا کانفوزا* (۴) به شرح زیر اعمال شدند:

- گروه شاهد: جیره پایه بدون افزودنی
- گروه پروبیوتیک: جیره پایه حاوی ۱ گرم در هر کیلوگرم پروبیوتیک *ویسلا کانفوسا*
- گروه رنگدانه: جیره پایه حاوی ۱ گرم در هر کیلوگرم رنگدانه آستاگزانتین
- گروه ترکیبی: جیره پایه همراه با ۱ گرم در هر کیلوگرم پروبیوتیک و ۱ گرم در هر کیلوگرم آستاگزانتین

ماهی‌ها به مدت ۲۸ روز، روزانه در دو نوبت و هر روز معادل ۲ درصد وزن بدن تغذیه شدند. برای نمونه‌گیری در روزهای ۱۴ و ۲۸، از هر تکرار ۵ قطعه ماهی (۱۵ قطعه از هر گروه) به‌صورت تصادفی انتخاب شدند. پس از بیهوشی با پودر گل میخک، بافت‌های کلیه قدامی و طحال نمونه‌برداری شده و در فویل آلومینیومی قرار گرفتند و تا زمان استخراج RNA در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA از نمونه‌ها با استفاده از کیت تجاری GeneAll® (کره جنوبی) طبق پروتکل سازنده انجام شد. برای هر نمونه، ۲۰ میلی‌گرم از بافت در ۲۰۰ میکرولیتر بافر لیز و ۲۰ میکرولیتر محلول پروتئیناز K ورتکس و سپس در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت قرار گرفت. در ادامه، مراحل افزودن بافرهای توصیه شده و شستشو طبق دستورالعمل کیت انجام شد و نهایتاً رسوب RNA استخراج شده در ۵۰ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز حل و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. RNA استخراج شده از هر نمونه با استفاده از کیت PrimeScript™ RT (Takara، ژاپن) به cDNA تبدیل شدند. پرایمرهای اختصاصی ژن‌های فاکتور نکروز توموری آلفا، اینترلوکین‌های ۶، ۱۰، ۱۲، ۱۷ و اینترفرون گاما درج شده در منابع معتبر (جدول ۱) پس از بلاست، سفارش ساخت گردیدند. ژن EF1-α housekeeping به عنوان کنترل داخلی برای نرمال‌سازی استفاده شد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای اختصاصی ژن‌های مرتبط با پاسخ ایمنی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

نام ژن	توالی پرایمر (3′→5′)	دمای اتصال (°C)	کارامدی (%)
IL-6	F: ACTCCCCTCTGTCACACACC R: GGAAGTCTTTGCCCCTCTTT	۶۳/۱	۹۱/۷۱
IL-10	F: TGGACAGCATCCTGAAGTTCTA R: AGTAGTTCCTGCATTGGACGAT	۶۰/۵	۹۵/۹۴
TNF-α	F: CCTTGAAAATAGCCTTGTGGAC R: TTGCACCAATGAATATCTCCAG	۵۸/۹	۹۵/۶۲
IFN-γ	F: ATGCTGCTCAGTTCACATCAAT R: TCAGATACACGTCCAGAACCAC	۶۰/۲	۹۷/۲۴
IL-12	F: GCCAACATGAGACCATTGTG R: CTCCCATCATCTCCACCACT	۵۸/۸	۹۳/۰۵
IL17	F: CAAACGTACACTTTTTGATGGTGCTG R: GGGACTCATCATAGGTGGTGTTGGT	۵۸/۳	۹۷/۰
EF1-α housekeeping	F: CCATTGACATTTCTCTGTGGAAGT R: GAGGGTACCAGTGATCATGTTCTTGA	۶۰/۰	۹۶/۰

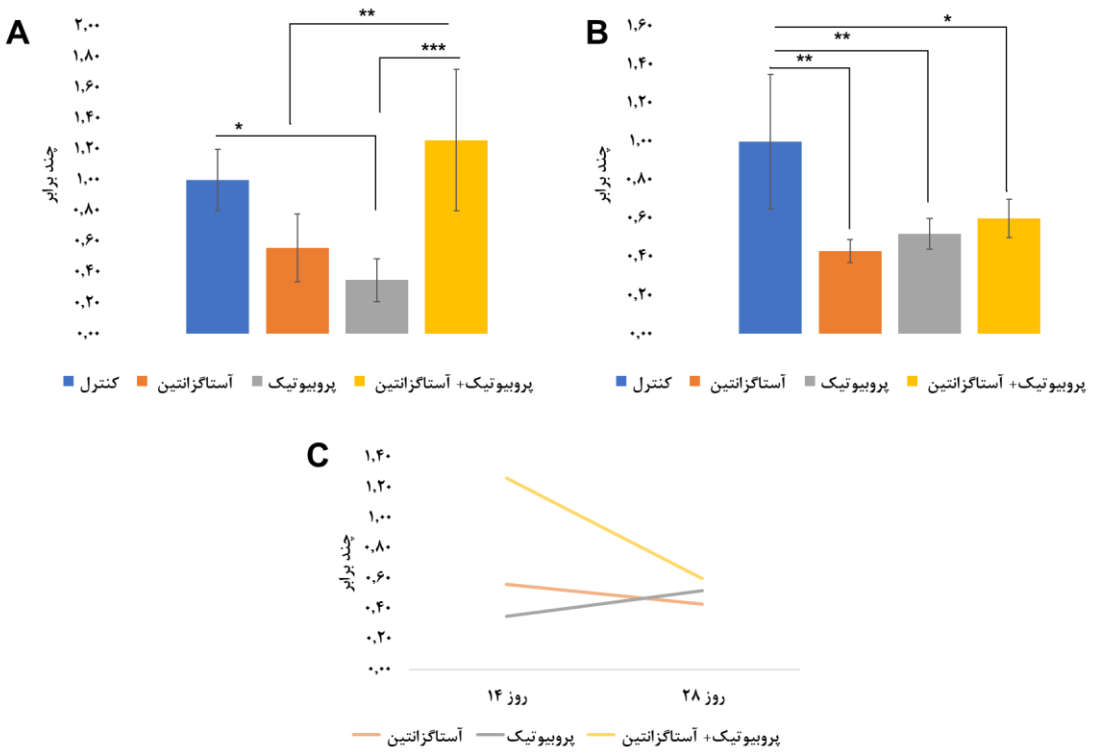
واکنش qPCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر cDNA، ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس SYBR® Taq™ II، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (فوروارد و ریورس) و ۳/۵ میکرولیتر آب بدون نوکلئاز اجرا شد. چرخه‌های حرارتی شامل دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۰ چرخه (شامل دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه، اتصال در دمای مناسب (Ta) هر زوج پرایمر مندرج در جدول ۱، سنتز در دمای ۷۲ درجه

سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه) و در نهایت سنتز نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه بود. تکثیر اختصاصی ژن‌های هدف با رسم منحنی ذوب بررسی شد. بازده واکنش‌ها در محدوده ۹۰ تا ۱۱۰ درصد بود.

داده‌ها به‌صورت میانگین و انحراف معیار گزارش شدند. برای مقایسه آماری بین گروه‌ها از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد. تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها با آزمون تعقیبی توکی (Tukey) ارزیابی گردید. تمامی تحلیل‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۹۶ انجام شده و سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ (P<۰/۰۵) در نظر گرفته شد. کلیه مراحل این پژوهش مطابق با اصول اخلاقی کار با حیوانات و پس از تأیید کمیته اخلاق حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه شهرکرد (کد اخلاق: IR.SKU.REC.1402.004) انجام گردید.

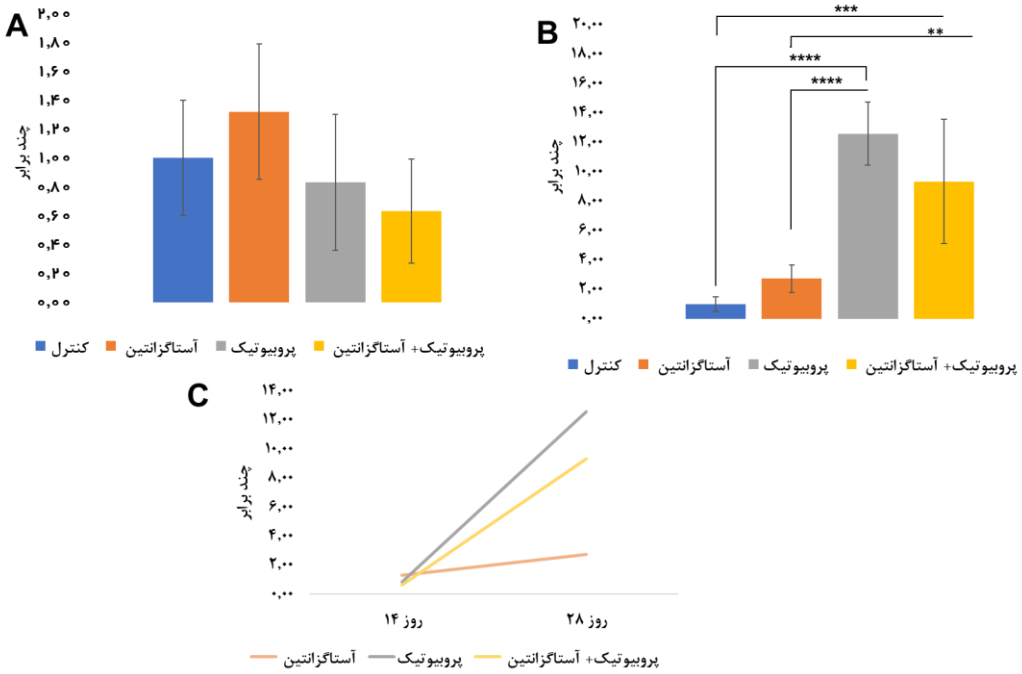
نتایج

بیان ژن اینترفرون گاما در روز ۱۴ در گروه دریافت‌کننده ترکیب آستاگزانتین و پروبیوتیک به طور معنی‌داری بالاتر از سایر گروه‌ها بود، به‌طوری که در مقایسه با گروه‌های آستاگزانتین (P=۰/۰۰۶۱) و پروبیوتیک (P=۰/۰۰۰۶) تفاوت آماری معنی‌دار مشاهده شد. در همین روز، بیان ژن فوق در گروه پروبیوتیک نسبت به گروه شاهد نیز کاهش معنی‌دار (P=۰/۰۱۰۷) داشت؛ اما در روز ۲۸، سطح بیان اینترفرون گاما در گروه شاهد بالاتر از سایر گروه‌ها بود و این تفاوت در مقایسه با همه گروه‌های دیگر معنی‌دار (P<۰/۰۵) بود (شکل ۱).



شکل ۱- بیان ژن اینترفرون گاما در روز ۱۴ (A) و روز ۲۸ (B) و تغییرات بیان در روز ۱۴ تا ۲۸ (C). (*:P<۰/۰۵، **: P<۰/۰۱؛ ***: P<۰/۰۰۱).

بیان ژن اینترلوکین ۶ در روز ۱۴ تفاوت معنی‌داری (P>۰/۰۵) بین گروه‌ها نشان نداد؛ اما در روز ۲۸، افزایش معنی‌داری در گروه پروبیوتیک و گروه ترکیبی نسبت به گروه‌های شاهد (P<۰/۰۰۰۱) و آستاگزانتین (P=۰/۰۰۰۳) دیده شد. گروه پروبیوتیک نیز نسبت به گروه ترکیبی مقدار بیشتری بیان داشت، اما این اختلاف معنی‌دار (P>۰/۰۵) نبود (شکل ۲).



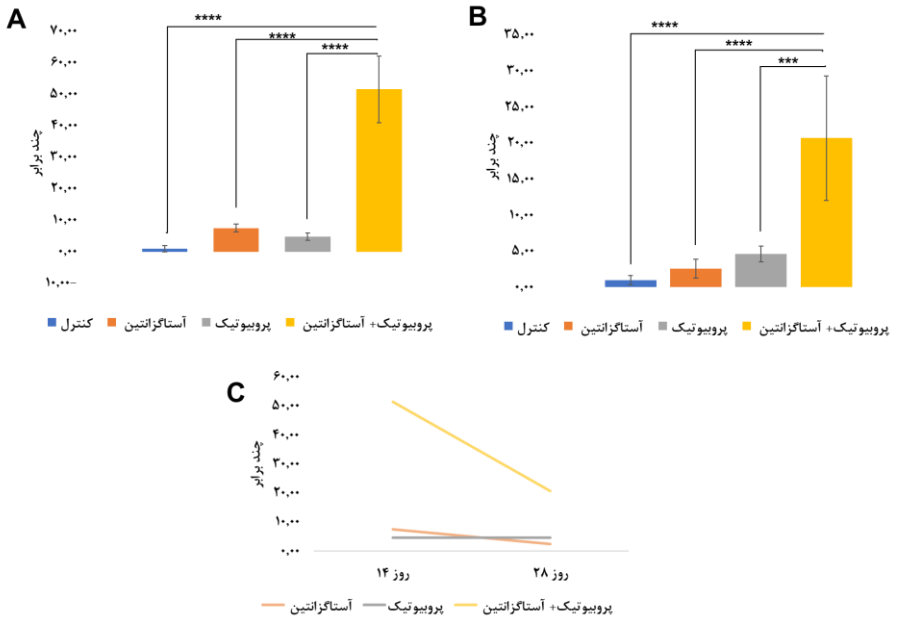
شکل ۲- بیان ژن اینترلوکین ۶ در روز ۱۴ (A) و روز ۲۸ (B) و تغییرات بیان در روز ۱۴ تا ۲۸ (C) متعاقب تغذیه ۲۸ روزه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با جیره‌های حاوی پروبیوتک *ویسلا کانفوزا*، استاگزانتین و ترکیب این دو (*:P<۰/۰۵، **: P<۰/۰۱).

در خصوص ژن اینترلوکین ۱۰، گروه ترکیبی در هر دو روز ۱۴ (P<۰/۰۰۰۱) و ۲۸ (P<۰/۰۰۰۱) نمونه‌برداری بیشترین سطح بیان را نشان داد. سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری (P>۰/۰۵) با یکدیگر نداشتند (شکل ۳).

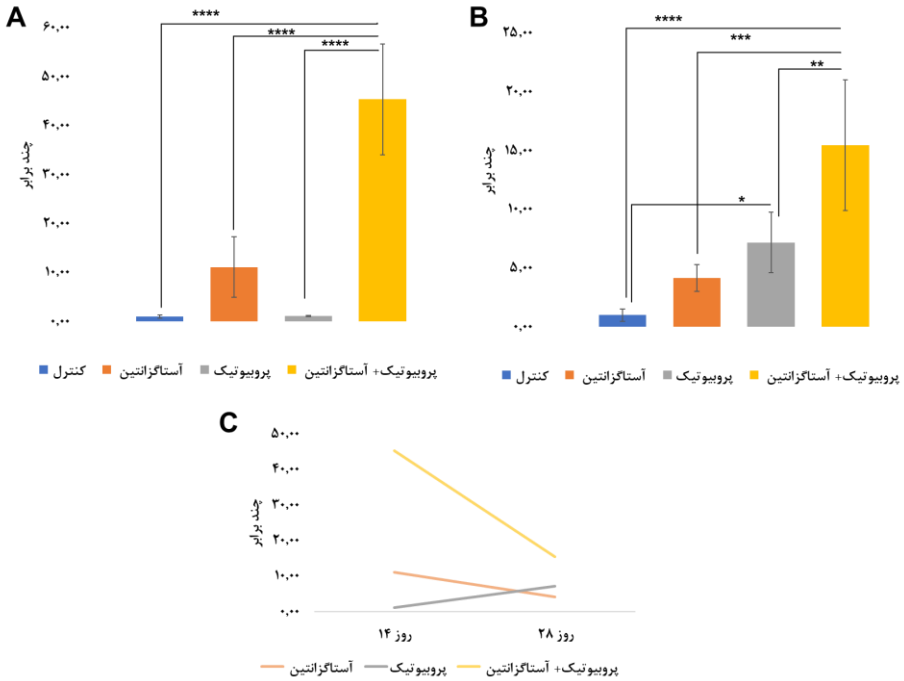
بیان ژن اینترلوکین ۱۲ نیز الگوی مشابهی داشت؛ بیشترین بیان در گروه ترکیبی در روز ۱۴ و ۲۸ بود که نسبت به سایر گروه‌ها تفاوت آماری معنی‌دار (P<۰/۰۵) داشت. در روز ۲۸ گروه پروبیوتیک نیز افزایش معنی‌دار (P=۰/۰۲۹۸) نسبت به شاهد داشت (شکل ۴).

بیان ژن اینترلوکین ۱۷ در روز ۱۴ در گروه ترکیبی به‌شدت (P=۰/۰۰۰۱) افزایش یافت و همین روند با شدت بیشتر در روز ۲۸ تکرار شد. تفاوت معنی‌دار (P=۰/۰۰۰۳) بین گروه ترکیبی و پروبیوتیک در روز ۲۸ نیز مشاهده شد. پروبیوتیک به‌تنهایی نیز روند افزایشی داشت؛ ولی این افزایش معنی‌دار (P>۰/۰۵) نبود (شکل ۵).

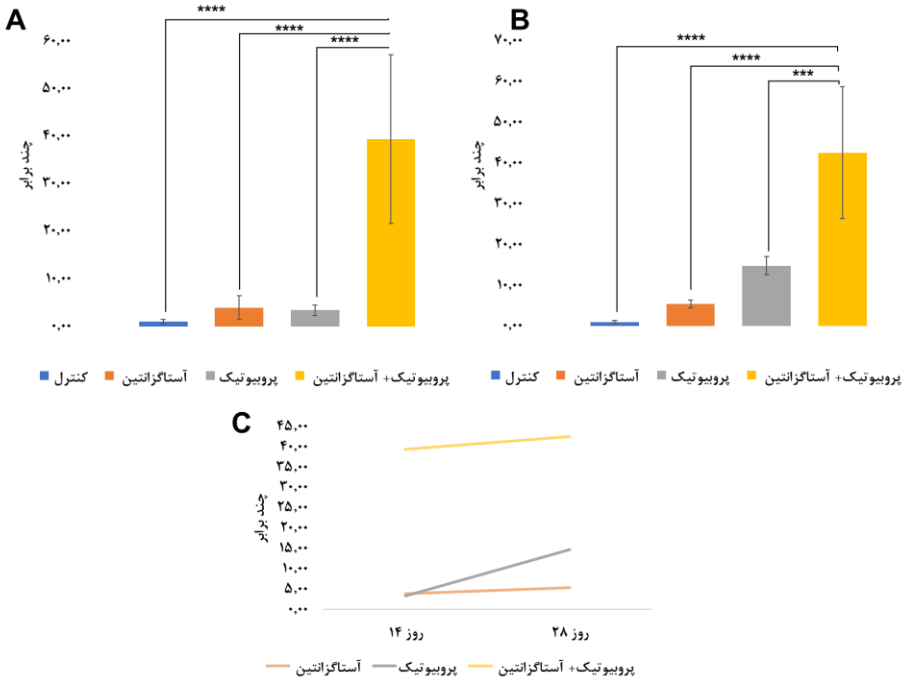
در نهایت، فاکتور نکروز توموری آلفا در گروه ترکیبی در هر دو زمان بیشترین سطح بیان را نشان داد. در روز ۱۴، گروه آستاگزانتین نیز برخلاف گروه پروبیوتیک افزایش معنی‌دار داشت. در روز ۲۸، فقط گروه ترکیبی به‌صورت معنی‌دار بالا (P<۰/۰۰۰۱) بود و سایر گروه‌ها افزایش معنی‌دار (P>۰/۰۵) نداشتند (شکل ۶).



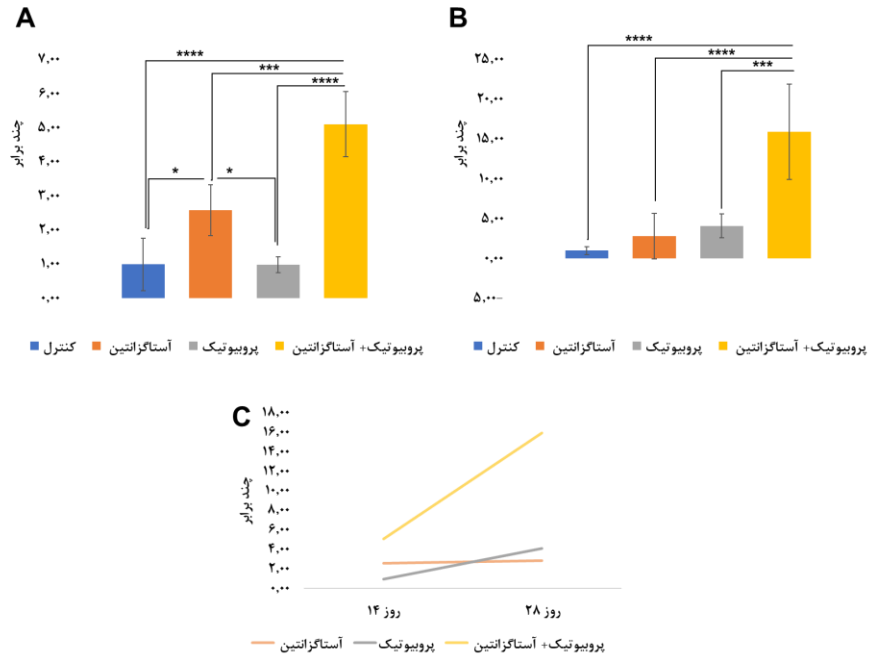
شکل ۳- بیان ژن اینترلوکین۱۰ در روز ۱۴ (A) و روز ۲۸ (B) و تغییرات بیان در روز ۱۴ تا ۲۸ (C)(***:P<۰/۰۰۱، ****: P<۰/۰۰۰۱).



شکل ۴- بیان ژن اینترلوکین۱۲ در روز ۱۴ (A) و روز ۲۸ (B) و تغییرات بیان در روز ۱۴ تا ۲۸ (C) متعاقب تغذیه ۲۸ روزه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با جیره‌های حاوی پروبیوتک ویسلا کانفوزا، استاگزانتین و ترکیب این دو (*:P<۰/۰۵، **: P<۰/۰۱؛ ***:P<۰/۰۰۱، ****: P<۰/۰۰۰۱).



شکل ۵- بیان ژن اینترلوکین ۱۷ در روز ۱۴ (A) و روز ۲۸ (B) و تغییرات بیان در روز ۱۴ تا ۲۸ (C) متعاقب تغذیه ۲۸ روزه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با جیره‌های حاوی پروبیوتک ویسلا کانفوزا، استاگزانتین و ترکیب این دو (***:P<۰/۰۰۱، ****: P<۰/۰۰۰۱).



شکل ۶- بیان ژن فاکتور نکروز توموری آلفا در روز ۱۴(A) و روز ۲۸ (B) و تغییرات بیان در روز ۱۴ تا ۲۸ (C) متعاقب تغذیه ۲۸ روزه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با جیره‌های حاوی پروبیوتک ویسلا کانفوزا، استاگزانتین و ترکیب این دو (*:P<۰/۰۵، ***:P<۰/۰۰۱، ****: P<۰/۰۰۰۱).

بحث

تقویت پاسخ ایمنی ماهیان پرورشی برای بهبود مقاومت در برابر بیماری‌ها و کاهش زیان‌های اقتصادی در آبزی‌پروری که بخشی حیاتی برای امنیت غذایی جهانی محسوب می‌شود، از اهمیت بالایی برخوردار است. مطالعات متعددی در ارتباط با بررسی تاثیرات جیره‌های غذایی حاوی آستاگزانتین یا *ویسلا کانفوسا* در گونه‌های آبزی انجام گرفته است که می‌توان به گزارش Kahyani و همکاران (۴)، Park و همکاران (۱۲)، Zhang و همکاران (۲۲)، Talebi و همکاران (۱۹) و Meng و همکاران (۹) اشاره کرد که در این مطالعات، اثر ترکیبات فوق بر شاخص‌های رشد، مورفولوژی روده، فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، شمارش باکتری‌های روده‌ای و شاخص‌های ایمنی سرولوژیک مورد بررسی قرار گرفته و نشان داده شده است که باعث تقویت وضعیت ایمنی می‌شوند. این مطالعه با هدف بررسی اثرات تجویز هم‌زمان پروبیوتیک *ویسلا کانفوسا* و رنگدانه آستاگزانتین بر بیان ژن‌های ایمنی منتخب در قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام شد.

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که تجویز ترکیبی *ویسلا کانفوسا* و آستاگزانتین به طور معنی‌داری بیان چندین ژن مرتبط با ایمنی، شامل ژن‌های کدکننده اینترلوکین ۱۰، اینترلوکین ۱۲، اینترلوکین ۱۷ و فاکتور نکروز توموری آلفا را در مقایسه با گروه‌های مکمل‌دهی منفرد یا گروه کنترل افزایش می‌دهد. همچنین بیان اینترلوکین ۶ در گروه‌های تحت درمان با پروبیوتیک و ترکیبی به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد؛ در حالی که بیان اینترفرون گاما در ابتدا با درمان ترکیبی افزایش اما سپس کاهش پیدا می‌نماید.

پروبیوتیک‌ها با تأثیر بر بافت‌های لنفاوی مرتبط با روده (GALT)، تولید سیتوکین را در ماهی‌ها تحریک می‌کنند (۱۱). در مطالعه‌ی Kahyani و همکاران در سال ۲۰۲۱ پس از مصرف جیره حاوی *ویسلا کانفوسا*، بیان ژن‌های پیش‌التهابی TNF-α، IFN-γ و IL-8 در ماهیان به‌طور معنی‌داری افزایش و بیان ژن ضدالتهابی IL-10 کاهش یافت که بیانگر آن است که افزودن پروبیوتیک *ویسلا کانفوسا* به جیره غذایی قزل‌آلا می‌تواند بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی را تغییر دهد که با مطالعه حاضر همسو است (۴).

Meng و همکاران در سال ۲۰۲۴ گزارش کرده‌اند که مصرف آستاگزانتین منجر به پاسخ‌های وابسته به دوز بر کاهش معنی‌دار بیان سایتوکاین‌های پیش‌التهابی IL-1β، افزایش بیان سایتوکاین‌های ضدالتهابی (IL-10 و TGF-β) و تقویت پاسخ ایمنی مخاطی در بافت روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌شود (۹).

Zhang و همکاران (۲۲) با بررسی اثرات آستاگزانتین در ماهی باس دهان‌گشاد (*Micropterus salmoides*) نشان دادند که بیان سیتوکین‌های التهابی اینترلوکین ۱۵ و فاکتور نکروز توموری آلفا کاهش یافته است که با نتایج مطالعه حاضر در تضاد هستند. این ناهمخوانی‌ها ممکن است ناشی از پاسخ‌های ایمنی خاص گونه باشد، زیرا ماهی باس دهان‌گشاد و قزل‌آلای رنگین‌کمان از نظر مشخصات فیزیولوژیکی و ژنتیکی متفاوت هستند؛ علاوه بر این، تفاوت در روش‌های اندازه‌گیری بیان ژن در دو مطالعه ممکن است نتایج متفاوت در مطالعات را توجیه نماید.

افزایش هم‌زمان بیان سایتوکین‌های التهابی اینترلوکین ۱۲، اینترلوکین ۱۷ و فاکتور نکروز توموری آلفا و سایتوکاین ضدالتهابی اینترلوکین ۱۰ در گروه درمانی ترکیبی با مطالعات قبلی که پتانسیل تعدیل‌کنندگی ایمنی پروبیوتیک‌ها و آستاگزانتین در گونه‌های آبزی را نشان داده‌اند، همخوانی دارد (۹). این یافته‌ها نشان‌دهنده یک تعامل هم‌افزایی بین پروبیوتیک و آستاگزانتین است که با سازوکار زمانی متمایزی در تنظیم ژن‌های ایمنی همراه است و بیانگر آن است که در کنار تقویت پاسخ‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی، درمان ترکیبی می‌تواند هموستاز و مکانیسم‌های خودتنظیمی ایمنی را تقویت نموده و از التهاب بیش از حد که می‌تواند به بافت‌های ماهی آسیب برساند، جلوگیری نماید و در مجموع نقش مهمی در حفظ تعادل ایمنی ماهی ایفا کند. همچنین تغییرات مرتبط با بیان اینترفرون گاما (افزایش اولیه و سپس کاهش آن)، می‌تواند بازتابی از مکانیسم‌های تنظیم ایمنی و

تنظیم‌کننده‌های اینترفرون گاما در ماهی باشد، زیرا افزایش طولانی‌مدت سیتوکین‌ها می‌تواند منجر به فرسودگی ایمنی شود (۳، ۱۴). این یافته‌ها نشان می‌دهند که جیره‌های حاوی مکمل، می‌توانند ایمنی ماهی‌ها را تقویت کرده و پایداری را بهبود بخشند. مطالعه کنونی شناخت ما از مکانیسم‌های ایمنی در ماهی‌ها را ارتقا می‌دهد و بر تعامل بین تعدیل میکروبی و پشتیبانی آنتی‌اکسیدانی در تنظیم ایمنی تأکید می‌کند.

در مجموع، تجویز ترکیبی *ویسلا کانفوسا* و آستاگزانتین به طور معنی‌داری بیان سیتوکین‌های اینترلوکین ۱۰، اینترلوکین ۱۲، اینترلوکین ۱۷ و فاکتور نکروز توموری آلفا را در مقایسه با گروه‌های دریافت‌کننده مکمل‌های منفرد یا گروه کنترل افزایش داد. این نتایج حاکی از اثرات هم‌افزایی بین *ویسلا کانفوسا* و آستاگزانتین است که منجر به پاسخ ایمنی قوی‌تر در ماهی‌های قزل‌آلا می‌شود. همچنین افزایش هم‌زمان اینترلوکین ۱۰ و الگوی زمانی بیان اینترفرون گاما که با افزایش اولیه و سپس کاهش همراه بود، نشان‌دهنده مکانیسم‌هایی برای جلوگیری از تحریک بیش از حد سیستم ایمنی است. این یافته‌ها کارایی بالاتر استفاده ترکیبی از این دو ماده را تأیید و ارزش مکمل‌های غذایی را در بهینه‌سازی ایمنی ماهی‌ها برجسته می‌سازد.

منابع

1. Amar, E.C; Kiron, V; Satoh, S; Watanabe, T; Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. Fish Shellfish Immunol. 2004;16(4):527-37.
2. Calcagnile, M; Tredici, S.M; Alifano, P; A comprehensive review on probiotics and their use in aquaculture: Biological control, efficacy, and safety through the genomics and wet methods. Heliyon. 2024;10(24):e40892.
3. Huang, S; Liu, K; Cheng, A; Wang, M; Cui, M; Huang, J; et al.; SOCS proteins participate in the regulation of innate immune response caused by viruses. Front. Immunol. 2020;11.
4. Kahyani, F; Pirali-Kheirabadi, E; Shafiei, S; Shenavar Masouleh, A; Effect of dietary supplementation of potential probiotic *Weissella confusa* on innate immunity, immune-related genes expression, intestinal microbiota and growth performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquacult. Nutri. 2021;27(5):1411-20.
5. Little, D; Newton, R; Beveridge, M; Aquaculture: a rapidly growing and significant source of sustainable food? Status, transitions and potential. Proc. Nutr. Soc. 2016;75:274-86.
6. Liu, L; Li, J; Cai, X; Ai, Y; Long, H; Ren, W; et al.; Dietary supplementation of astaxanthin is superior to its combination with *Lactococcus lactis* in improving the growth performance, antioxidant capacity, immunity and disease resistance of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Aquac. Rep. 2022;24:101124.
7. Maftei, N.M; Raileanu, C.R; Balta, A.A; Ambrose, L; Boev, M; Marin, D.B; et al.; The potential impact of probiotics on human health: an update on their health-promoting properties. Microorganisms. 2024;12(2).
8. Martling, S; Voorhees, J; Erlenbusch, M; Nachtigal, I; Barnes, M; Astaxanthin: A Powerful antioxidant used in aquaculture for coloration with aquatic animal health implications. J. Anim. Sci. Anim. Nutr. 2023;2:1-19.
9. Meng, X; Yang, F; Zhu, L; Zhan, L; Numasawa, T; Deng, J; Effects of dietary astaxanthin supplementation on growth performance, antioxidant status, immune response, and intestinal health of rainbow

stress and reproductive performance. Animals. 2023;13(21):3357.
17. Smith, N.C; Rise, M.L; Christian, S.L; A comparison of the innate and adaptive immune systems in cartilaginous fish, ray-finned fish, and lobe-finned fish. Front. Immunol. 2019;10:2292.
18. Sturino, J.M; Literature-based safety assessment of an agriculture- and animal-associated microorganism: Weissella confusa. Reg. Toxicol. Pharmacol. 2018;95:142-52.
19. Talebi, M; Khara, H; Zoriehzahra, J; Ghobadi, S.H; Khodabandelo, A; Mirrasooli, E; Effects of astaxanthin on pigmentation, growth and blood factors on rainbow trout (O*ncorhynchus mykiss*). J. Aquat. Anim. 2012;71-79.
20. Verdegem, M; Buschmann, A.H; Latt, U.W; Dalsgaard AJT; Lovatelli A. The contribution of aquaculture systems to global aquaculture production. J. World Aquac. Soc. 2023;54(2):206-50.
21. Wong, S; Waldrop, T; Summerfelt, S; Davidson J; Barrows, F; Kenney, P.B; et al.; Aquacultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) possess a large core intestinal microbiota that is resistant to variation in diet and rearing density. Appl. Environ. Microbiol. 2013;79(16):4974-84.
22. Zhang, J; Yang, Y; Xu ,H; Li, X; Dong, F; Chen, Q; et al.; Effects of dietary astaxanthin on growth performance, immunity, and tissue composition in largemouth bass, Micropterus salmoides. Front. Mar. Sci. 2024;11:1404661.

trout (*Oncorhynchus mykiss*). Anim Nutr. 2024;17:387-96.
10. Mokhtar, D.M; Zaccone, G; Alesci, A; Kuciel, M; Hussein, M.T; Sayed, R.K.A; Main components of fish immunity: an overview of the fish immune system. Fishes. 2023; 8(2).
11. Nayak, S.K; Probiotics and immunity: a fish perspective. Fish shellfish immunol. 2010;29(1):2-14.
12. Park, J.S; Mathison, B.D; Hayek, M.G; Massimino, S; Reinhart, G.A; Chew, B.P; Astaxanthin stimulates cell-mediated and humoral immune responses in cats. Vet. Immunol. Immunopathol. 2011;144(3-4):455-61.
13. Rahayu, S; Amoah, K; Huang ,Y; Cai J; Wang ,B; Shija, V.M; et al.; Probiotics application in aquaculture: its potential effects, current status in China and future prospects. Front. Mar. Sci. 2024;11:1455905.
14. Secombes, C.J; Wang, T; Hong, S; Peddie, S; Crampe, M; Laing, KJ; et al.; Cytokines and innate immunity of fish. Dev. Comp. Immunol. 2001;25(8-9):713-23.
15. Shabanzadeh, S; Vatandoust, S; Hosseinifard, S.M; Sheikhzadeh, N; Shahbazfar, A.A; Dietary astaxanthin (Lucantin® Pink) mitigated oxidative stress induced by diazinon in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vet. Res. Forum*. 2023; 14 (2): 97-104.
16. Shastak, Y; Pelletier, W; Captivating Colors, Crucial Roles: Astaxanthin's antioxidant impact on fish oxidative

Vol. 19 / No. 2
Fall & Winter 2025/2026

Iran. J. Vet. Clin. Sci.; 2025; 19(2): 15-24.
http://doi.org/ 10.22034/ijvcs.2026.14832.1086

The Effect of Simultaneous Administration of *Weissella confusa* Probiotic and Astaxanthin Pigment on Selected Immune Indices of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Syavash Asadi[1]; Shafigh Shafiei[2]*; Masoud Ghorbanpoor[3]; Esamail Pirali[4]

1. Ph.D. Student in Aquatic Animal Health and Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
2. Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
3. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
4. Department of Fishery Science, Faculty of Natural Resources and Earth Sciences, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.

Received: 19 January 2026 ***Accepted***: 23 May 2026

Summary

Aquaculture, as a key component of global food production, requires strategies to reduce disease-related losses and improve the health of cultured fish. Nuritional supplements such as probiotics and antioxidants have been recognized as promising tools for enhancing fish immunity. In this study, the simultaneous effect of the probiotic *Weissella confusa* and the antioxidant pigment astaxanthin on the expression of immune-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) was investigated. A total of 240 fish were divided into four treatments (control, probiotic, astaxanthin, and combined; each treatment in three replicates with 20 fish per replicate) and fed for 28 days. Expression levels of IFN-γ, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, and TNF-α were measured in the anterior kidney and spleen using qPCR. The combined treatment showed the highest ($P<0.05$) upregulation of IL-10, IL-12, IL-17, and TNF-α compared to other groups. *IFN-γ* expression increased on day 14 in the combined group but declined by day 28. Moreover, IL-6 expression was significantly higher ($P<0.05$) in the probiotic and combined groups on day 28. The temporal expression patterns indicated dynamic regulation and synergistic effects of probiotic and astaxanthin supplementation. It appears that concurrent administration of *Weissella confusa* and astaxanthin enhances molecular immune markers in rainbow trout and may serve as an effective nutritional strategy to improve health and disease resistance in aquaculture production.

***Keywords*:** Rainbow trout, Probiotic, Astaxanthin, Cytokine, *Weissella confusa*

* Corresponding Author: sshafiei@sku.ac.ir