

## بررسی تاثیر عصاره گیاه خارخاسک (*Tribulus terrestris*) خوراکی بر بیان

### ژن‌های لیزوزیم، IL1 و TNF در ماهی گورخری (*Danio rerio*)

احمد قرایی<sup>۱\*</sup>، حسین ابراهیمی جرجانی<sup>۱</sup>، جواد میردار هریجانی<sup>۱</sup>، حامد کلنگی میاندره<sup>۲</sup>

\*agharaei551@uoz.ac.ir

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، زابل، ایران  
 ۲- گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

#### چکیده

پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر عصاره گیاه خارخاسک بر بیان ژن لیزوزیم، IL1 و TNF در ماهی زبرا دانیو انجام گرفت. به همین منظور ماهیان در چهار تیمار شامل گروه کنترل (T0)، (T1) ۵۰، (T2) ۱۰۰ و (T3) ۲۰۰ میلی گرم عصاره گیاه در هر کیلوگرم غذا) به مدت ۶۰ روز تغذیه شدند. به منظور اندازه گیری بیان ژن، نمونه برداری از ماهیان در پایان دوره آزمایش صورت گرفت. نتایج نشان داد که استفاده از عصاره گیاه خارخاسک بر بیان ژن‌ها تاثیر مثبت داشته و بیان ژن‌های لیزوزیم، IL1 و TNF در پایان دوره آزمایش در تیمار T1 به طور معنی داری بیشتر از تیمارهای T2 و T3 بود ( $p < 0.05$ ) اما بین تیمار شاهد و تیمار T1 تفاوت معنی دار مشاهده نگردید ( $p > 0.05$ ). در مجموع می توان استفاده از جیره غذایی ۵۰ میلی گرم عصاره گیاه خارخاسک را جهت دستیابی به بالاترین مقدار بیان ژن‌های لیزوزیم، IL1 و TNF در ماهی گورخری به عنوان گونه مدل در آبی پروری پیشنهاد نمود.

**کلمات کلیدی:** ژن IL1، ژن TNF، ژن LYZ، عصاره گیاه خارخاسک، ماهی گورخری.

## مقدمه

در سیستم ایمنی ماهی‌ها و در ارتباط با التهابات مولکول سایتوکینی فاکتور نکروز کننده تومور (<sup>1</sup>TNF) نقش مهمی دارد که به دنبال تحریک سیستم ایمنی از گلبول‌های سفید ترشح می‌شود و همچنین TNF یک تعدیل‌کننده‌ی مرکزی و سایتوکین مؤثر بر پاسخ‌های التهابی و ضد میکروبی می‌باشد (Grayfer *et al.*, 2008) که علاوه بر خون در کلیه به مقدار فراوانی ترشح و تجمع دارد. استفاده از روش‌های مولکولی به-خصوص بررسی بیان ژن‌های فاکتورهای ایمنی و سایر مولکول‌های فیزیولوژیکی مورد نظر در سطح رونویسی ژن این امکان را فراهم می‌کند که با فرآنگری پاسخ‌های ایمنی از زمان استفاده مکمل، زمان بیان ژن را به طور دقیق‌تری به دست آورد. همچنین مزیتی که بررسی از طریق رونویسی ژن نسبت به سنجش آنزیمی می‌تواند داشته باشد این است که با بررسی بیان ژن در بافت‌های مختلف می‌توان معیار دقیق‌تری از پاسخ گویی بافت‌های مختلف به محرک و همچنین مکانیسم عمل محرک به دست آورد (Paulsen *et al.*, 2003).

در تحقیق حاضر از گیاه خارخاسک استفاده گردید. گیاه خارخاسک<sup>2</sup> از راسته زیگوفیلاسه<sup>3</sup> آ<sup>3</sup> یک گیاه یکساله می‌باشد که بطور گسترده در چین، ژاپن، نواحی غربی آسیا و قسمت جنوبی اروپا و آفریقا پراکنش یافته است. در انسان‌ها تحقیق بر روی کاربرد پودر عصاره خارخاسک انجام شد (Cek *et al.*, 2007). نشان داده شده که این گیاه موجب افزایش سطوح تستوسترون به طور طبیعی و بی خطر در انسان و موجودات می‌شود (Bucci, 2000). همچنین موجب بهبود لیپید و اسپرماتوزنیز در انسان و سایر موجودات می‌شود (Tomova and Gjulemetova, 1981). در آزمایشات ناتوانی‌های جنسی هم به عنوان افزایش سطوح تستوسترون در بهبود عملکرد و کارایی ورزشکاران استفاده می‌شود. خارخاسک حاوی مقداری مواد مختلف شناخته شده مشابه مواد استروئیدی است. تأثیر عملکرد مواد موجود در خارخاسک بر روی سطوح تستوسترون توسط پروتودیوسکین<sup>4</sup> شناخته شده

است (Adimoelja and Adaikan, 1997; Ganzera *et al.*, 2001).

فاکتور نکروز کننده تومور یک پروتئین سلولی سیگنالینگ (سایتوکین<sup>5</sup>) درگیر در التهاب سیستمیک است و یکی از سایتوکین‌هایی است که واکنش فاز حاد را تشکیل می‌دهند. مطالعات فراوانی بر روی این پروتئین و ژن کد کننده آن در انسان انجام شده است که نتایج حاصل نشان می‌دهد به طور عمده توسط ماکروفاژهای فعال شده تولید می‌شود، هرچند که می‌تواند توسط بسیاری از انواع سلول‌های دیگر مانند لنفوسیت‌ها، سلول‌های NK<sup>6</sup>، نوتروفیل، ماست سل‌ها<sup>7</sup>، ائوزینوفیل‌ها و سلول‌های عصبی تولید شود. نقش اصلی TNF در تنظیم سلول‌های ایمنی است که از نظر ساختاری، پروتئین-های مرتبط، محلول و یا متصل به غشاء می‌باشند (Gruss, 1996). این مولکول‌ها به طور عمده در اعمال تنظیم سلولی مانند کشتن سلول‌های تومور هنگام پاسخ‌های ایمنی و واکنش‌های التهابی درگیر هستند (Aoki, *et al.*, 2008) و از سایتوکین‌های پیش التهابی بوده و به دنبال تحریک سیستم ایمنی از گلبول‌های سفید ترشح می‌شود که نقش اصلی آن در ایمنی است اما نقش‌های جانبی دیگری هم ایفا می‌کند (آقاجانی و همکاران، ۱۳۹۱). TNF قادر به القاء تب، التهاب و مهار تومور و تکثیر ویروسی و پاسخ به عفونت از طریق تولید سلول‌های IL1<sup>8</sup> و IL6 است. ایجاد اختلال در نظم تولید TNF، در انواع مختلف بیماری‌های انسان از جمله بیماری آلزایمر نقش دارد با اینکه هنوز جای بحث دارد مطالعات افسردگی و بیماری التهابی روده در حال حاضر به سطح TNF مرتبط است (Swardfager *et al.*, 2010). در ماهیان TNF یک تعدیل‌کننده‌ی مرکزی و سایتوکین مؤثر بر پاسخ‌های التهابی و ضد میکروبی است (Grayfer *et al.*, 2008).

لیزوزیم<sup>9</sup> (مورامیداز<sup>10</sup> یا N-استیل مورامید گلیکان هیدرولاز<sup>11</sup>) از خانواده پپتیدهای ضد میکروبی است که با سوراخ کردن دیواره سلولی باکتری‌های بیماری‌زا از جانور

<sup>5</sup>cytokin

<sup>6</sup> Natural killer cell

<sup>7</sup> Mast cell

<sup>8</sup> Interleukin

<sup>9</sup> - Lysozyme

<sup>10</sup> - Muramidases

<sup>11</sup> - N- acetylmuramide glycanhydrolase

<sup>1</sup>Tumor Necrosis Factor

<sup>2</sup>*Tribulus terrestris*

<sup>3</sup> zygophyllacea

<sup>4</sup>Protodioskin

افزایش و بهبود کارایی سیستم ایمنی از راهکارهای مدیریتی در امر پرورش آبزیان به شمار می‌آیند باتوجه به اینکه استفاده از مواد آنتی‌بیوتیکی شدیداً محدود شده است، لذا استفاده از مکمل‌های غذایی محرک سیستم ایمنی سازگار با محیط زیست که به‌تواند اثرات مطلوب ایجاد نماید یکی از ضرورت‌ها در بحث مدیریت بهداشتی مزارع آبی‌پروری است. بنابراین هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر عصاره گیاه خارخاسک به‌عنوان محرک رشد و افزایش دهنده سیستم ایمنی و نیز پاسخ‌های ایمنی در ماهی زبرا دانیو در سطح بیان ژن می‌باشد. از این رو تحقیق حاضر با هدف بررسی تاثیر عصاره گیاه خارخاسک بر بیان ژن‌های TNF، Lys و IL1 در ماهی زبرا دانیو انجام گردید.

### مواد و روش کار

جهت انجام آزمایش، شامل گروه کنترل (T0)، ۵۰ (T1)، ۱۰۰ (T2) و ۲۰۰ (T3) میلی‌گرم عصاره در هر کیلوگرم غذا) به‌مدت ۶۰ روز تغذیه شدند. به‌منظور انجام بیان ژن، نمونه‌برداری از ماهیان در پایان دوره آزمایش صورت گرفت. جهت بررسی میزان بیان ژن فاکتور نکروز کننده (TNF)، لایزوزیم (LYZ) و IL1 از کل بدن ماهیان نمونه‌برداری شد و به داخل تیوپ‌های از قبل استریل شده انتقال داده شد و بلافاصله تیوپ‌ها به تانک ازت منتقل شدند. سپس نمونه‌ها در یخچال ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و تا زمان استفاده جهت استخراج RNA در آن‌جا نگهداری شدند.

نمونه لاروهای منجمد شده با استفاده از ازت مایع بصورت هموژن تبدیل شدند، و فرآیند استخراج با استفاده از کیت RNX-Plus مطابق دستورالعمل شرکت سازنده (SinaColon) انجام شد به این صورت که RNA کل از سه نمونه برای هر مرحله از مراحل نمونه‌گیری و هر مرحله با سه تکرار استخراج شد. جهت ارزیابی کیفی RNA کل از دستگاه الکتروفورز و ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. کمیت (غلظت) RNA از دستگاه نانودراپ ND-1000 (Thermo Scientific) تعیین گردید. دستگاه با استفاده از دستگاه نانوفتومتر (IMPLEN-P100)، مقدار جذب نمونه‌ها در طول موج‌های ۲۳۰، ۲۶۰، ۲۸۰ و ۳۲۰ نانومتر قرائت شد. برای از بین بردن DNA ژنومی احتمالی در RNA استخراج شده از تیمار (Invitrogen, CA, USA) DNase I استفاده گردید. ساخت

حفاظت می‌کند (Tian et al., 2015; Chen et al., 2016). در واقع این آنزیم با هیدرولیز پیوند بتا ۱ و ۴ گلیکوزیدی ۱ میان N-استیل موارمیک اسید<sup>۲</sup> و N-استیل گلوکوزامین<sup>۳</sup> در دیواره پپتید و گلیکان باکتری‌های بیماری‌زا از ورود آن‌ها به بدن میزبان جلوگیری می‌کند (Xu et al., 2014; Tian et al., 2015). لیزوزیم به غیر از فعالیت ضد باکتری وظایف مختلف دیگری از جمله، تحریک‌کننده رشد، تولید مثل، ضد التهاب، ضد تومور، ضد ویروس و تنظیم‌کننده پاسخ‌های ایمنی بر عهده دارد (Tian et al., 2015).

لیزوزیم (muramidase, Ec 3.2.1.17) یک آنزیم است که در رده‌های مختلف جانوری و گیاهی گسترده شده است. لیزوزیم در بدن ماهی در سرم، موکوس و تعداد زیادی دیگر از اندام‌ها و بافت‌های ماهی وجود دارد که در بافت راس کلیه دارای فعالیت بالایی است (Hikima et al., 2003). همچنین لیزوزیم یکی از مهمترین مولکول‌های دفاعی خط دفاع اولیه است و یک آنزیم موکولیتیک است که از لوکوسیت‌ها منشأ می‌گیرد. لایزوزیم پیوند بتا ۱-۴ بین N-acetylmuramic acid و N-acetyl glucosamine در دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت از بین می‌برد (Saurabh and Sahoo, 2008).

در ارتباط با تاثیر عصاره‌های گیاهی بر سیستم ایمنی آبزیان مطالعاتی صورت گرفته است. به عنوان مثال: سلطانی و همکاران (۱۳۹۱) تاثیر اسانس آویشن شیرازی (Zataria multiflora) بر میزان فعالیت لیزوزیم خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss*) بررسی نمودند. عبدی و علیشاهی (۱۳۹۲) به بررسی اثر ماده محرک ایمنی ایمونوفن (اسانس گیاه *Echinacea purpurea*) بر ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انگشت قد پرداختند. پورمظفر (۱۳۹۵) به بررسی تاثیر سرکه سیب بر عملکرد ژن‌های درگیر در سیستم ایمنی همچون لیزوزیم و کراستین پرداختند. Bobadilla et al., (2005) اثر جیره‌های غذایی حاوی مقادیر متفاوت پروتئین گیاهی روی مکانیسم دفاع غیر اختصاصی در ماهی Gilthead sea bream مورد بررسی قرار دادند.

<sup>۱</sup> -  $\beta$ -(1,4) glycosidic

<sup>۳</sup> - N-acetylglucosamine

رشته اول cDNA بر اساس روش پیشنهادی شرکت GeNet در جدول (۱) توالی آغازگرهای استفاده شده ارائه شده است. Bio برای نمونه‌ها انجام شد.

جدول ۱: توالی آغازگرهای استفاده شده

ژن	mRNA شماره دستیابی توالی Accession Number	آغازگرها:		طول قطعه تکثیر شونده (bp)
		پیش‌رونده (forward) و پس‌رونده (reverse)		
IL1	AY340959.1	F: CGTCTCCACATCTCGTACTCA R: GTGCTTTTCCTGTCCATCTCC		205
TNF	EU069818	F: CATTCTACGGATGGCATTACTT R: CTCAGGAATGTCAGTCTTGCAT		77
LYS	AY170126.2	F: TGT TCC GAT CTG ATG TCC R: GCT GTT GTA AGC CAC CC		123
Beta-actin	AB039726.2	F: CTGGGATGATATGGAGAAGA R: CCAGTAGTACGACCTGAAGC		216

## نتایج

در ابتدا پرایمرهای ژن های هدف TNF، IL1 و LYZ و ژن رفرنس  $\beta$ -actin مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفتند. به همین جهت با استفاده از یک PCR نرمال تست شدند و محصول PCR بر روی ژل آگاروز یک درصد رویت شد. نتایج نشان داد که پرایمرها به جایگاه صحیح ژن متصل شده اند. بیان نسبی ژن‌های هدف در پایان دوره آزمایش و پس از ۶۰ روز تغذیه ماهیان با عصاره گیاه خارخاسک مورد بررسی قرار گرفت (شکل‌های ۱، ۲ و ۳). بیان ژن‌های مذکور با استفاده از ژن رفرنس  $\beta$ -actin نرمال گردید. نتایج نرمال شده، نشان داد که بیان ژن‌های مذکور در پایان دوره آزمایش در تیمار حاوی ۵۰ گرم عصاره گیاه خارخاسک بطور معنی‌داری بیشتر از تیمارهای T2 و T3 بود ( $p < 0.05$ ) اما بین تیمار شاهد و تیمار T1 تفاوت معنی دار مشاهده نگردید ( $p > 0.05$ ).

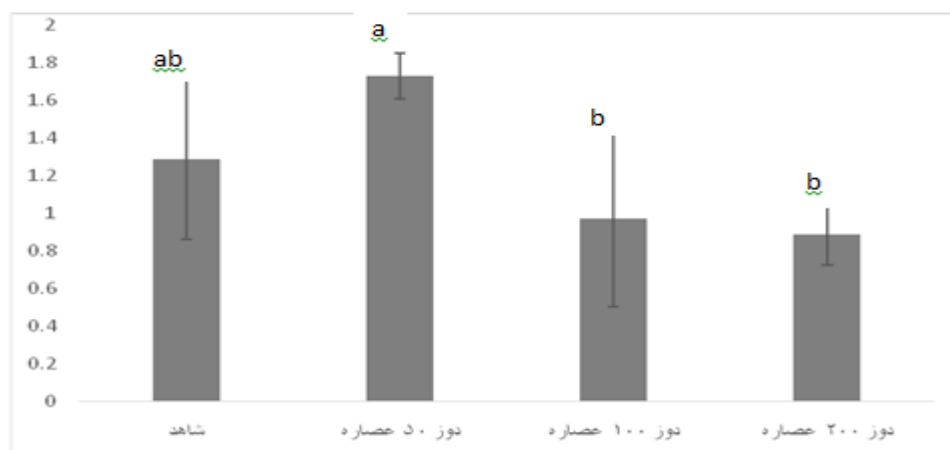
به منظور اطمینان از بهینه بودن شرایط Real time PCR، سری غلظت‌های مختلف (۱/۱۰، ۱/۱۰۰، ۱/۱۰۰۰ و ۱/۲۰۰) از نمونه‌های cDNA مخلوط از تیمارهای متفاوت هر پلت تهیه و با هر دو آغازگر هدف و رفرنس در ۴ تکرار تکثیر شدند و جهت تخمین کارایی و تکرارپذیری آزمایش برای هر آغازگر منحنی استاندارد ترسیم شد (Ramakers *et al.*, 2003) و کارایی برای هر آغازگر ارزیابی گشت.

## تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

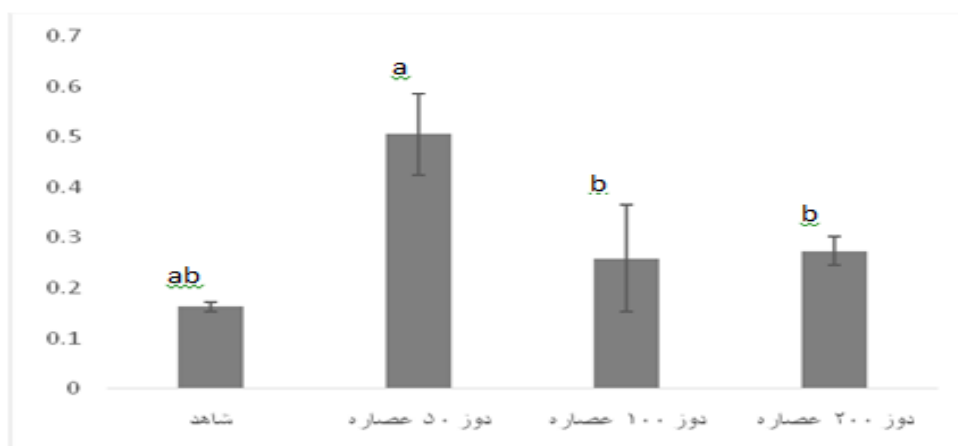
در قالب طرح کاملاً تصادفی ۱ این تحقیق برنامه‌ریزی و اجرا گردید. Ct به دست آمده برای ژن‌های TNF، LYZ، IL1 و TNF با استفاده از (فرمول  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )، برابر است با  $\Delta Ct$  ژن هدف منهای  $\Delta Ct$  کالیبراتور) در فضای نرم‌افزار اکسل ۲ تبدیل به بیان نسبی ژن‌های مورد نظر نسبت به ژن رفرنس بتا-اکتین گردید. عدد به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۰ مرتب و نمودارهای آن رسم شد. همچنین تجزیه و تحلیل داده‌ها و مشخص کردن سطوح معنی‌داری با استفاده از نرم‌افزار SPSS ۱۶ و با آزمون آماری دانکن با درصد اطمینان ۹۵ و با آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA One – Way) انجام شد.

<sup>1</sup> Completely Randomized Design

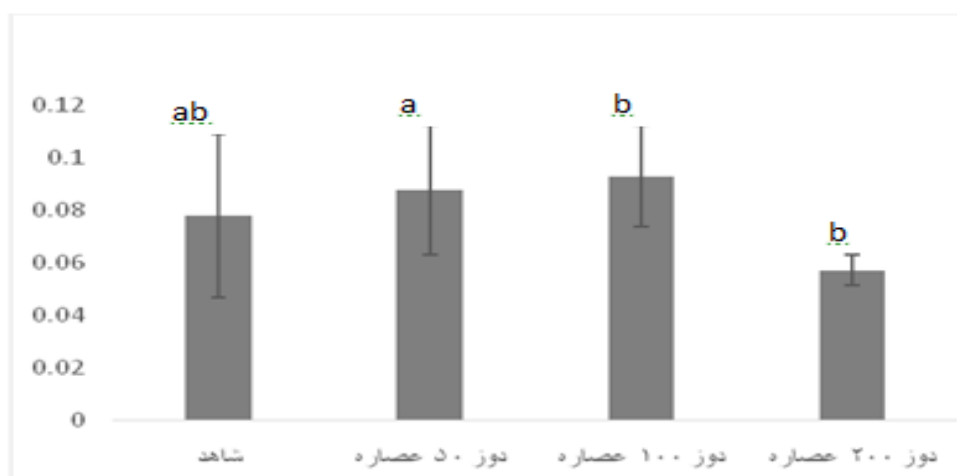
<sup>2</sup> Excel



شکل ۱: بیان نسبی ژن لیزوزیم در ماهی زبرا دانیو تغذیه شده با سطوح مختلف عصاره گیاه خارخاسک (حروف متفاوت بر روی هر ستون نشاندهنده اختلاف معنی دار ( $p < 0.05$ ) است).



شکل ۲: بیان نسبی ژن TNF در ماهی زبرا دانیو تغذیه شده با سطوح مختلف عصاره گیاه خارخاسک (حروف متفاوت بر روی هر ستون نشاندهنده اختلاف معنی دار ( $p < 0.05$ ) است).



شکل ۳: بیان نسبی ژن IL1 در ماهی زبرا دانیو تغذیه شده با سطوح مختلف عصاره گیاه خارخاسک (حروف متفاوت بر روی هر ستون نشاندهنده اختلاف معنی دار ( $p < 0.05$ ) است).

## بحث

در تحقیق حاضر به بررسی تاثیر عصاره گیاه خارخاسک بر بیان ژن‌های TNF، IL1 و LYS پرداخته شد. بر طبق نتایج مشخص گردید بیان ژن‌های مذکور در پایان دوره آزمایش در تیمار حاوی ۵۰ گرم عصاره گیاه خارخاسک بطور معنی‌داری بیشتر از تیمارهای T2 و T3 بود ( $p < 0.05$ ) اما بین تیمار شاهد و تیمار T1 تفاوت معنی‌دار مشاهده نگردید ( $p > 0.05$ ). لیزوزیم یکی از شناخته شده‌ترین پپتیدهای ضد میکروبی است که به صورت مستقیم به عوامل بیماری‌زا همچون باکتری‌ها حمله کرده و دیواره سلولی آن‌ها را تخریب می‌کند. از طرفی، در این مطالعه مشخص شد، که بیان ژن‌های مرتبط با سیستم ایمنی و از جمله لیزوزیم در تیمارهای حاوی عصاره گیاه خارخاسک افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد در پایان دوره پرورش داشت (شکل‌های ۱، ۲ و ۳). مطابق با این نتایج، Kolangi *et al.* (2016)، گزارش دادند که رژیم غذایی حاوی پروبیوتیک تجاری پریمالاک<sup>۱</sup> موجب افزایش بیان ژن لیزوزیم در میگوی وانامی شد. همچنین، تزریق لیپو پلی ساکارید بعد از گذشت ۶ ساعت منجر به افزایش بیان ژن لیزوزیم نوع (I و C) در هیپاتوپانکراس میگوی وانامی شد (Peregrino-Uriarte, *et al.* 2012). فعالیت ضد میکروبی لیزوزیم در برابر باکتری‌های بیماری‌زا، بسیار متنوع می‌باشد، به نحوی که لیزوزیم میگوی وانامی فعالیت ضد باکتری قوی در برابر باکتری ویبریو و میکروکوکاسه لیزودیکتیکوس<sup>۲</sup> داشت به طوری که در مواجهه با باکتری ویبریو بیان ژن لیزوزیم در اندام‌هایی نظیر هیپاتوپانکراس، همولنف، روده، عضله و آبشش افزایش پیدا کرد، اما در برابر باکتری اشیریشیا کولی<sup>۳</sup> عملکرد ضعیفی داشت (Chen *et al.*, 2016). علاوه بر نقش ضد باکتریایی، آنزیم لیزوزیم در فرآیندهای ضد ویروسی هم نقش مؤثری دارد. به طوری که Liu and Saint (2016)، گزارش دادند که تزریق ۸ میکروگرم پروتئین لیزوزیم منجر به افزایش تعداد هموسیت، فاگوسیتوز، انفجار تنفسی و افزایش بقاء در برابر ویروس لکه سفید در میگوی آبی شد. همچنین، ۷۲ ساعت بعد از تزریق

ویروس لکه سفید به میگوی کوروما<sup>۴</sup>، افزایش قابل توجه در بیان ژن لیزوزیم آبشش مشاهده شد (Liu and Saint, 2016). بنابراین، عصاره گیاه خارخاسک با افزایش سطح لیزوزیم، موجب افزایش ایمنی غیراختصاصی و جلوگیری از شیوع بسیاری از بیماری‌ها در ماهی زبرا دانیو می‌شود.

بر طبق یافته‌های محققین مشخص گردیده است که نقش اصلی TNF در تنظیم سلول‌های ایمنی است که از نظر ساختاری، پروتئین‌های مرتبط، محلول و یا متصل به غشاء می‌باشند (Gruss, 1996). مولکول‌های سیستم سایتوکین به شکل مؤثری در سیستم دفاع اولیه دخالت دارد و به همراه برخی دیگر از مولکول‌های این سیستم در بروز پاسخ‌های التهابی نقش دارند. در واقع سایتوکین‌ها پروتئین‌های پیام رسان بیولوژیک هستند که در واکنش‌های ایمنی شرکت می‌کنند و می‌توان تأثیر ایمنی‌زایی آن‌ها را با تأثیر بر روی عملکرد ماکروفاژها و لنفوسیت‌ها توضیح داد بدین شکل که در یک نقطه به دنبال عوامل خارجی TNF به همراه سایر ژن‌های درگیر در بروز پاسخ‌های التهابی موجب تمرکز ماکروفاژها و لنفوسیت‌ها می‌شود که این خود پاسخ التهابی را به دنبال دارد (Zou *et al.*, 2002). مولکول‌های سیستم سایتوکین توانایی تحریک پاسخ‌های ایمنی را دارا می‌باشند، به‌طور مثال TNF- $\alpha$  بیشتر نقش پروتئین‌های واسطه را در سلول‌های ایمنی بازی می‌کند و سلول‌های ایمنی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Gruss, 1996). محرک‌های سیستم ایمنی با توجه به ماهیت خود ماده و نحوه به‌کارگیری می‌تواند از طریق مکانیسم‌های مختلفی بر بهبود وضعیت ایمنی گونه آبی اثرگذارند. در تحقیق یاراحمدی (۱۳۹۳) نتایج حاصل از ارزیابی بیان ژن TNF-a نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین سطوح مختلف پروبیوتیک لاکتواسیلوس اسیدوفیلوس با شاهد وجود داشت.

پورمظفر (۱۳۹۵) طی بررسی تاثیر سرکه سیب بر عملکرد ژن‌های درگیر در سیستم ایمنی همچون لیزوزیم و کراستین، بیان نمود این ماده موجب افزایش بیان ژن لیزوزیم و در مقابل اثر منفی بر بیان ژن کراستین در میگو وانامی داشت. سلطانی و همکاران (۱۳۹۱) تاثیر اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) بر میزان فعالیت لیزوزیم خون ماهی

<sup>1</sup> - Primalac

<sup>2</sup> - *Micrococcaceae lysodeikticus*

<sup>3</sup> - *Escherichia coli*

<sup>4</sup> - *Marsupenaeus japonicus*

## منابع

قزل‌آلای رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*) بررسی نمودند. نتایج این محققین نشان داد میزان فعالیت لیزوزیم سرم در روزها و در تیمارهای مختلف، تفاوت آماری معنی‌داری با گروه شاهد نداشت اما در تحقیق حاضر وجود عصاره گیاه خارخاسک در غلظت T1 اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد داشت.

عبدی و علیشاهی (۱۳۹۲) به بررسی اثر ماده محرک ایمنی ایمونوفن (اسانس گیاه *Echinacea purpurea*) بر ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان انگشت قد پرداختند و مشاهده نمودند که میزان فعالیت لیزوزیم و قدرت باکتری‌کشی سرم نیز در تیمار اکیناسه با افزایش معنیداری همراه بود از این رو بیان نمودند اسانس گیاه اکیناسه قادر به بهبود برخی پاسخ‌های ایمنی ماهی قزل‌آلا در شرایط استخر پرورش ماهی می‌باشد که با یافته‌های تحقیق حاضر همخوانی دارد.

در مطالعه‌ای که توسط Bobadilla et. al., (2005) صورت گرفت اثر جیره‌های غذایی حاوی مقادیر متفاوت پروتئین گیاهی روی مکانیسم دفاع غیراختصاصی در ماهی Gilthead sea bream مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که مقدار لیزوزیم در بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری ندارد اما میزان فعالیت مسیر جانبی عامل مکمل در گروهی که جیره غذایی آن حاوی ۵۰ درصد پروتئین گیاهی بوده نسبت به گروه‌های دیگر افزایش معنی‌داری داشته است که می‌تواند تا حدودی به دلیل تحریک تولیدات عامل مکمل باشد.

به‌طور کلی از نتایج تحقیق حاضر می‌توان دریافت که عصاره گیاه خارخاسک می‌تواند بر بیان ژن‌های مرتبط با سیستم ایمنی تأثیر بگذارد. از این رو می‌توان نتیجه گرفت که عصاره گیاه خارخاسک می‌تواند به‌عنوان محرک سیستم ایمنی در ماهی زبرا دانیو به‌عنوان یک ماهی مدل در آزمایشگاه‌ها و کارهای تحقیقاتی برای کپور ماهیان مورد استفاده قرار گیرد. اما باید در نظر داشت که مدت‌زمان استفاده و همچنین سطح عصاره گیاهی اهمیت ویژه‌ای دارد.

## تشکر و قدردانی

نگارندگان تقدیر و تشکر خود را از حمایت مالی دانشگاه زابل تحت گرنت شماره UOZ-GR-9618-94 ابراز می‌دارند.

آفاجانی، م.، واعظ مهدوی، م.ر.، غضنفری، ط.، خلیلی، م.، عظیمی، آ. و ارباب سلیمانی، س.، ۱۳۹۱. اثرات موقعیت اجتماعی غالب مغلوب بر پاسخ درد و تغییرات سرمی سایتوکین‌های پیش التهابی در موش‌های آزمایشگاهی مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی، دوره ۱۶، شماره ۴، صص ۳۹۲-۳۸۰.

پورمظفر، س.، ۱۳۹۵. اثر سطوح مختلف سرکه سیب بر کارایی رشد، بیان ژن‌های لیزوزیم و کراستین، یکپارچگی هپاتوپانکراس و فلور باکتریایی روده میگوی پاسبید غربی (*Litopenaeus vannamei*). رساله دکتری. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۸۳ ص.

سلطانی، م.، ظریف منش، ط. و ذریه‌زهر، س.ج.، ۱۳۹۱. مطالعه تاثیر اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) بر میزان فعالیت سیستم عامل مکمل و لیزوزیم خون ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*). مجله علمی شیلات ایران. سال ۲۱، شماره ۴، صص ۲۳-۱۳.

عبدی، ا. و علیشاهی، م.، ۱۳۹۲. بررسی اثر ماده محرک ایمنی ایمونوفن (اسانس گیاه *Echinacea purpurea*) بر ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان انگشت قد. دومین همایش ملی توسعه و پرورش ماهیان سردآبی. ۱۰ و ۱۱ اردیبهشت. شهر کرد. صص ۵۷۰-۵۶۴.

یاراحمدی، پ.، ۱۳۹۳. اثر پره بیوتیک تجاری ایمونوژن و مکمل ویتاسل بر روی بیان ژن لیزوزیم C-type و TNF $\alpha$  در اندام کلیه، برخی از فاکتورهای ایمنی همورال و مقاومت به چلنج با باکتری *Aeromonas hydrophila* در قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه منابع طبیعی تهران. ۸۴ ص.

Adimoelja, A. and Adaikan, P.G., 1997. Protodioscin from herbal plant *Tribulus terrestris* L. improves male sexual functions possibly via DHEA. International Journal of Impotence Research. 9: 1-70.

Aoki, T., Takano, T., Santos, M.D., Kondo, H.

- and Hirono, I., 2008. Molecular Innate Immunity in Teleost Fish: Review and Future Perspectives. Fisheries for Global Welfare and Environment, 5th World Fisheries Congress. 263-276.
- Bobadilla, A.S., Iopis, S.P., Requeñi, P.G., Medale, F., Kaushik, S. and Sanchez, J.P., 2005.** Effect of fish meal replacement by plant protein sources on non-specific defense Mechanisms and oxidative stress in Gilthead Sea bream (*Sparus aurata*). Aquaculture. 249: 387-400.
- Bucci, L.R., 2000.** Selected herbals and human exercise Performance. Journal of Clinical Nutrition. 72(2): 624-636.
- Cek, S., Turan, F. and Atik, E., 2007.** Masculinization of Convict Cichlid (*Cichlasoma nigrofasciatum*) by immersion in *Tribulus terrestris* Extract. Aquaculture International. 15: 109-119.
- Chen, T., Ren, C., Wang, Y., Luo, P., Jiang, X., Huang, W., Chen, C. and Hu, C., 2016.** Molecular cloning, inducible expression and antibacterial analysis of a novel i-type lysozyme (lyz-i2) in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology, 54:197-203.
- Ganzer, M., Bedir, E. and Khan, I.A., 2001.** Determination in Androgens in *Tribulus terrestris* by reversed-phase high-performance lipid chromatography and evaporative light scattering detection. Journal of Pharmaceutical Sciences, 90(11): 1752-1758.
- Grayfer, L., Walsh, J.G. and Belosevic, M., 2008.** Characterization and functional analysis of goldfish, *Carassius auratus* tumor necrosis factor-alpha. Developmental and Comparative Immunology, 32: 532-543.
- Gruss, H.J., 1996.** Molecular, structural, and biological characteristics of the tumor necrosis factor ligand superfamily. International Journal of Clinical and Laboratory Research. 26: 143-159.
- Hikima, J.I., Hirono, I. and Aoki, T., 2003.** The lysozyme gene in fish. Shimizu N, Aoki T and Hirono (eds), Aquatic Genomics. pp. 301-309.
- Kolangi Miandare, H., Yarahmadi, P., Farahmand, H., Mirvaghefi, A. and Hoseinifar, S.H. 2016.** Dietary fermentable fiber upregulated immune related genes expression, increased innate immune response and resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against *Aeromonas hydrophila*. Fish and Shellfish Immunology. 41: 326-31.
- Liu, W. and Saint, D.A., 2016.** A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. Analytical Biochemistry. 302: 52-59.
- Paulsen, S. M., Lunde, H., Engstad, R.E. and Robertsen, B., 2003.** In vivo effects of  $\beta$ -glucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon, *Salmo salar*. Fish and Shellfish Immunology. 14: 39-54.
- Peregrino-Uriarte, A.B., Muhlia-Almazan, A.T., Arvizu-Flores, A.A., Gomez-Anduro, G., Gollas-Galvan, T., Yepiz-Plascencia, G. and Sotelo-Mundo, R.R., 2012.** Shrimp invertebrate lysozyme i-lyz: Gene structure, molecular model and response of c and i

- lysozymes to lipopolysaccharide (LPS). *Fish & Shellfish Immunology*. 32: 230-236.
- Ramakers, C., Ruijter, J. M., Deprez, R.H.L. and Moorman, A.F., 2003.** Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*. 339: 62-66.
- Saurabh, S. and Sahoo P.K., 2008.** Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research*. 39: 223-239.
- Swardfager, W., Lanctot, K., Rothenbutg, L., Wong, A., Cappell, J. and Hermann, N., 2010.** A meta-analysis of cytokines in alzheimers disease. *Biological Psychiatry*. 68(10): 930-941.
- Tian, Y., Liang, X.W., Chang, Y.Q. and Song, J., 2015.** Expression of c-type lysozyme gene in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) is highly regulated and time dependent after salt stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 180: 68-78.
- Tomova, M. and Gjulemetova, R., 1981.** Steroidal saponins from *Tribulus terrestris* L. with a stimulating action on the sexual functions. *International Conference of Chemistry and Biotechnology of Biologically Active Natural Products, Varna, Bulgaria, September*. 26(1): 298 – 302.
- Xu, N., Pan, J., Liu, S., Xue, Q. and Zhang, S., 2014.** Three in one: Identification, expression and enzymatic activity of lysozymes in amphioxus. *Developmental and Comparative Immunology*. 46: 508-517.
- Zou, J., Wang, T., Hirono, I., Aoki, T., Inagawa, H., Honda, T., Soma, G.I., Ototak, M., Nakanishi, T. and Ellis, A., 2002.** Differential Expression of two tumor necrosis factor genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Developmental and Comparative Immunology*. 26: 161-172.

## Effect of dietary *Tribulus Terrestris* extract on expression of lysozyme, IL1 and TNF genes in *Danio rerio*

Gharaei A.<sup>1\*</sup>; Ebrahimi Jorjani H.<sup>1</sup>; Mirdar Harijani J.<sup>1</sup>; Kolangi Miandare H.<sup>2</sup>

\* agharaei551@uoz.ac.ir

1- Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Zabol University, Zabol, Iran

2- Fisheries Department, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

### Abstract

The purpose of this study was to investigate the effect of *Tribulus terrestris* extract on the expression of lysozyme gene, IL1 and TNF in Zebra fish. For this purpose, fish were fed in four treatment group's including; T0 (control (0)), T1 (50), T2 (100) and T3 (200 mg of extract per kg of food) for 60 days. In order to measurement of the gene expression, sampling was performed at the end of the experiment. The results showed that the use of *Tribulus terrestris* extract had a positive effect on genes expression and The expression of lysozyme, IL1 and TNF genes at the end of the trial period was significantly higher in T1 treatment than to T2 and T3 treatments ( $p < 0.05$ ). However, there was no significant difference between the control groups in compared with T1 treatment group. Finally, the results suggested that 50 mg of *Tribulus terrestris* extract per kg food to obtain the highest expression of lysozyme, IL1 and TNF genes in Zebra fish as a model species in aquaculture was suitable.

**Keywords:** IL1 gene, TNF gene, LYZ gene, Zebra fish, *Tribulus terrestris* extract.