بررسی تاثیر عصاره گیاه خارخاسک (*Tribulus terrestris*) خوراکی بر بیان ژن‌های لیزوزیم، IL1 و TNF در ماهی گورخری (*Danio rerio*)

احمد قرایی[۱*]، حسین ابراهیمی جرجانی[۱]، جواد میردار هریجانی[۱]، حامد کلنگی میاندره[۲]

*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. به‌همین منظور ماهیان در چهار تیمار شامل گروه کنترل (۰ (T0)، ۵۰ (T1)، ۱۰۰ (T2) و ۲۰۰ (T3) میلی‌گرم عصاره گیاه در هر کیلوگرم غذا) به‌مدت ۶۰ روز تغذیه شدند. به‌منظور اندازه‌گیری بیان ژن، نمونه‌برداری 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 به‌طور معنی داری بیشتر از تیمارهای T2 و T3 بود ($p<0.05$) اما بین تیمار شاهد و تیمار T1 تفاوت معنی‌دار مشاهده نگردید ($p>0.05$). در مجموع می‌توان استفاده از جیره‌غذایی ۵۰ میلی‌گرم عصاره گیاه خارخاسک را جهت دستیابی به بالاترین مقدار بیان ژن‌های لیزوزیم، IL1 و TNF در ماهی گورخری به‌عنوان گونه مدل در آبزی‌پروری پیشنهاد نمود.

کلمات کلیدی: ژن IL1، ژن TNF، ژن LYZ، عصاره گیاه خارخاسک، ماهی گور خری.

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1398.6.1.3.3]

مقدمه

در سیستم ایمنی ماهی‌ها و در ارتباط با التهابات مولکول سایتوکینی فاکتور نکروز کننده تومور (TNF[1]) 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 ضدمیکروبی می‌باشد (Grayfer *et. al*., 2008) که علاوه بر خون در کلیه به‌مقدار فراوانی ترشح و تجمع دارد. استفاده از روش‌های مولکولی به‌خصوص بررسی بیان ژن‌های فاکتورهای ایمنی و سایر مولکول‌های فیزیولوژیکی موردنظر در سطح رونویسی ژن این امکان را فراهم می‌کند که با فرانگری پاسخ‌های ایمنی از زمان استفاده مکمل، زمان بیان ژن را به‌طور 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 به‌دست آورد (Paulsen *et al*., 2003).

در تحقیق حاضر از گیاه خارخاسک استفاده گردید. گیاه خارخاسک[2] از راسته زیگوفیلاسه آ[3] یک گیاه یکساله می‌باشد که بطور گسترده در چین، ژاپن، نواحی غربی آسیا و قسمت جنوبی اروپا و آفریقا پراکنش یافته است. در انسان ها تحقیق بر روی کاربرد پودر عصاره خارخاسک انجام شد (Cek *et al*., 2007). نشان داده شده که این گیاه موجب افزایش سطوح تستوسترون به‌طور طبیعی و بی خطر در انسان و موجودات می‌شود (Bucci, 2000). همچنین موجب بهبود لیپید و اسپرماتوژنزیس در انسان و سایر موجودات می‌شود (Tomova and Gjulemetova, 1981). در آزمایشات ناتوانی‌های جنسی هم به‌عنوان 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[4] شناخته شده است (Adimoelja and Adaikan, 1997; Ganzera *et. al*., 2001).

فاکتور نکروز کننده تومور یک پروتئین سلولی سیگنالینگ (سایتوکین[5]) 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 انجام‌شده است که نتایج حاصل نشان می‌دهد به‌طور عمده توسط ماکروفاژهای فعال‌شده تولید می‌شود، هرچند که می‌تواند توسط بسیاری از انواع سلول‌های دیگر مانند لنفوسیت‌ها، سلول‌های NK[6]، نوتروفیل، ماست سل‌ها[7]، ائوزینوفیل‌ها و سلول‌های عصبی تولید شود. نقش اصلی TNF در تنظیم سلول‌های ایمنی است که ازنظر ساختاری، پروتئین‌های مرتبط، محلول و یا متصل به غشاء می‌باشند (Gruss, 1996). این مولکول‌ها به‌طور 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 به‌عفونت از طریق تولید سلول‌های IL1[8] 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[9] (مورامیداز[10] یا N– استیل مورامید گلیکان هیدرولاز[11]) از خانواده پپتیدهای ضد میکروبی است که با سوراخ کردن دیواره سلولی باکتری‌های بیماری‌زا از جانور

[1] Tumor Necrosis Factor
[2] *Tribulus trrestris*
[3] zygophyllacea
[4] Protodioskin

[5] cytokin
[6] Natural killer cell
[7] Mast cell
[8] Interleukin
[9] - Lysozyme
[10] - Muramidases
[11] - N- acetylmuramide glycanhydrolase

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.24234575.1398.6.1.3.3]

حفاظت می‌کند (Tian *et al*., 2015; Chen *et al*., 2016). در واقع این آنزیم با هیدرولیز پیوند بتا ۱و ۴ گلیکوزیدی۱ میان N- استیل موارمیک اسید۲ و N- استیل گلوکوزامین۳ 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 رده های مختلف جانوری و گیاهی گسترده شده است. لیزوزیم در بدن ماهی در سرم، موکوس و تعداد زیادی دیگر از اندام ها و بافت های 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 منشاء می‌گیرد. لایزوزایم پیوند بتا ۱-۴ بین N-acetylemuramic acid و N-acetyl glucosamine در دیواره سلولی باکتری های گرم مثبت از بین می‌برد (Saurabh and Sahoo, 2008).

در ارتباط با تاثیر عصاره های 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 قز ل آلای رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*) بررسی نمودند. عبدی و علیشاهی (۱۳۹۲) به بررسی اثر ماده محرک ایمنی ایمونوفن (اسانس گیاه *Echinacea purpurea*) بر ایمنی ماهی قزل آلای رنگین کمان 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.

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 آبزی‌پروری 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 (۰ (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 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 داده‌شدند 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 نمونه گیری 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 DNase I (Invitrogen, CA, USA) استفاده گردید. ساخت

[1] - β-(1,4) glycosidic

[3] - N-acetylglucosamine

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1398.6.1.3.3]

رشته اول cDNA بر اساس روش پیشنهادی شرکت GeNet Bio برای نمونه‌ها انجام شد.

در جدول (۱) توالی آغازگرهای استفاده شده ارائه شده است.

جدول۱: توالی آغازگرهای استفاده شده

ژن	شماره دستیابی توالی mRNA Accession Number	آغازگرها: پیش‌رونده (forward) و پس‌رونده (reverse)	طول قطعه تکثیر شونده (bp)
IL1	AY340959.1	F: CGTCTCCACATCTCGTACTCA R: GTGTCTTTCCTGTCCATCTCC	**205**
TNF	EU069818	F:CATTCCTACGGATGGCATTTACTT 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**

به‌منظور اطمینان از بهینه بودن شرایط Real time PCR، سری غلظت‌های مختلف (۱/۱۰، ۱/۱،۵۰/۲۰، ۱/۱۰۰و 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[1] این تحقیق برنامه‌ریزی و اجرا گردید. Ct به‌دست‌آمده برای ژن‌های Lyz، TNF و IL1 با استفاده از (فرمول $\Delta\Delta ct^{-2}$، $\Delta\Delta Ct$ برابر است با ΔCt ژن هدف منهای ΔCt کالیبراتور) در فضای نرم‌افزار اکسل[2] تبدیل به بیان نسبی ژن‌های موردنظر نسبت به ژن رفرنس بتا-اکتین گردید. عدد به‌دست‌آمده 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.

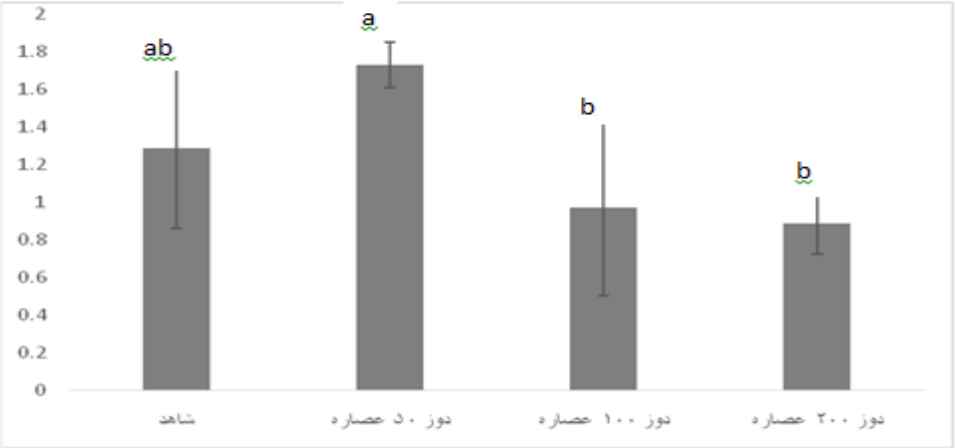
نتایج

در ابتدا پرایمرهای ژن های هدف TNF، IL1 و LYz و ژن رفرنس β-actin مورد بررسی و ارزیابی قرارگرفتند. به‌همین 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 β-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 ($p>0.05$).

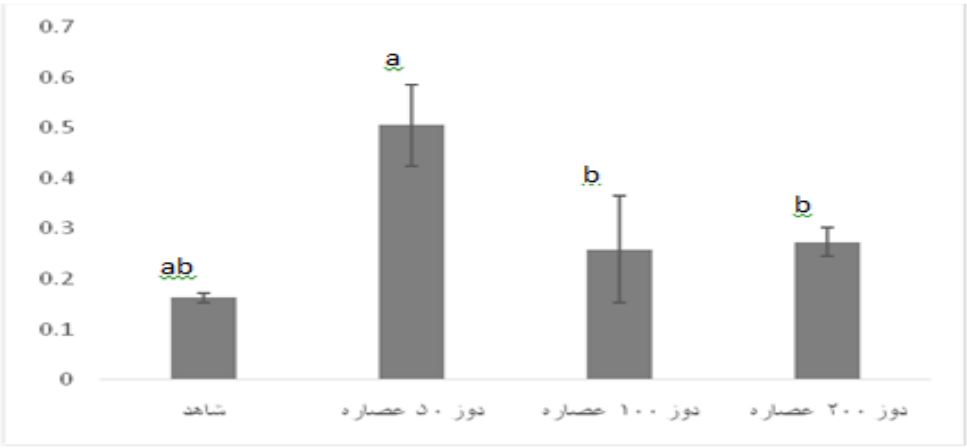
[1] Completely Randomized Design
[2] Excel

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2024-03-29]

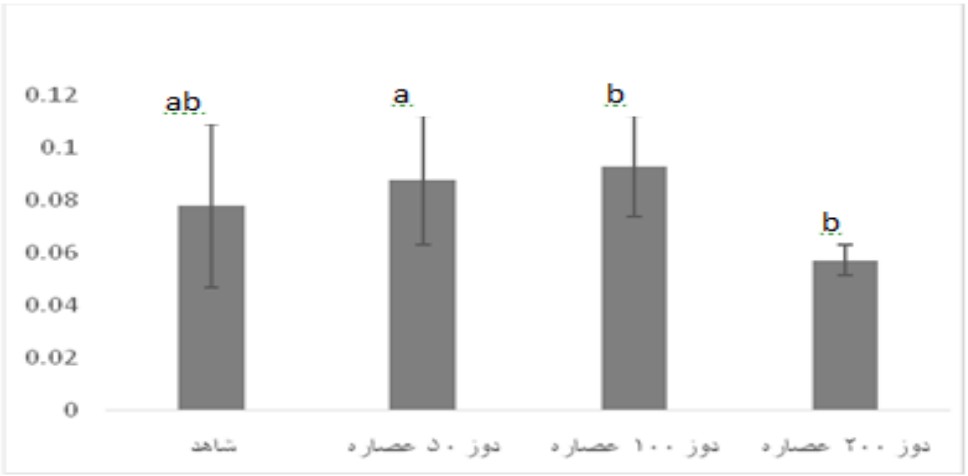
[DOR: 20.1001.1.24234575.1398.6.1.3.3]



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 معنی‌دار ($p<0.05$) است.

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.24234575.1398.6.1.3.3]

ویروس لکه سفید به میگوی کوروما[4]، 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 به‌همراه 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 سیتوکین توانایی تحریک پاسخ‌های ایمنی را دارا می‌باشند، به‌طور مثال TNF-α 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 آبزی 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

[4] - *Marsupenaeus japonicus*

بحث

در تحقیق حاضر به بررسی تاثیر عصاره گیاه خارخاسک بر بیان ژن‌های IL1، TNF 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 به‌صورت مستقیم به‌عوامل 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[1] موجب افزایش بیان ژن لیزوزیم در میگوی وانامی شد. همچنین، تزریق لیپو پلی ساکاردید بعد از گذشت ۶ ساعت منجر به افزایش بیان ژن لیزوزیم نوع (I و C) در هپاتوپانکراس میگوی وانامی شد (Peregrino-Uriarte, *et al*. 2012). فعالیت ضدمیکروبی 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[2] داشت به طوری که در مواجهه با باکتری ویبریو بیان ژن لیزوزیم در اندام‌هایی نظیر هپاتوپانکراس، همولنف، روده، عضله و آبشش افزایش پیدا کرد، اما در برابر باکتری اشریشیا کولی۳ 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

[1] - Primalac
[2] - *Micrococcaceae lysodeikticus*
[3] - *Escherichia coli*

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.24234575.1398.6.1.3.3]

قزل‌آلای رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*) بررسی نمودند. نتایج این محققین نشان داد میزان فعالیت لیزوزیم سرم در روزها و در تیمارهای مختلف، تفاوت آماری معنی-داری 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 قزل آلای رنگین کمان انگشت قد پرداختند و مشاهده نمودند که میزان فعالیت لایزوزیم 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 پاسخ-های ایمنی ماهی قزل‌آلا در شرایط استخر پرورش ماهی می-باشد که با یافته های 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 معنی-داری 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 به‌دلیل 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.

منابع

آقاجانی، 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 سایتوکین های پیش التهابی در موش های 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 پاسفید غربی (*Litopenaeus vannamei*). رساله دکتری. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۸۳ ص.

سلطانی، م.، ظریف منش، ط. و ذریه‌زهرا، 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 TNFα در اندام کلیه، برخی از فاکتورهای ایمنی هومورال 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 possibily via DHEA. International Journal of Impotence Research. 9: 1-70.

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

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.24234575.1398.6.1.3.3]

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., lopis, S.P., Requeni, 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.

Ganzera, 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.

K**olangi 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 β-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

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1398.6.1.3.3]

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 Psychatry. 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.

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1398.6.1.3.3]

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

Gharaei A.[1*]; Ebrahimi Jorjani H.[1]; Mirdar Harijani J.[1]; Kolangi Miandare H.[2]

[*] 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.

[Downloaded from ornamentalaquatics.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24234575.1398.6.1.3.3]