فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۴۲، جلد ۱۱، شماره ۳، تابستان ۹۷، صفحه ۵۵ تا ۶۶

اثرات عصاره هیدروالکلی گیاه آنغوزه(*Ferula assafoetida*) در جیره غذایی بر بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی(TNF-alpha و IL1B) درماهی گورخری(*Daniorerio*)

رقیه صفری[۱]، فاطمه واحدی امیری[۲]، علی شعبانی[۳]، سید حسین حسینی فر[۱]، حامد کلنگی میاندره[۱]
۱– استادیار، گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
fisheriesafari@yahoo.com
۲–دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه تکثیر و پرورش آبزیان،دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۳–دانشیار، گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: افزایش روز افزون مقاومت های باکتریایی نسبت به آنتی بیوتیک های تجاری، گرایش به استفاده از گیاهان را به منظور تحریک سیستم ایمنی ذاتی افزایش داده است. هدف از این تحقیق ارزیابی اثرات عصاره هیدرو الکلی گیاه آنغوزه(*Ferula assafoetida*) بر بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی(TNF-alpha و IL-1β) در ماهی گورخری بود.

روش کار: بدین منظور ماهیان با میانگین وزنی ۰/۳±۰/۰۱ گرم با غذای حاوی سه سطح مختلف ۰/۵، ۱، و ۲ درصد عصاره فرولا و یک گروه شاهد با جیره پایه به مدت ۸ هفته تغذیه شدند. در پایان دوره از بافت روده نمونه‌برداری و RNA از نمونه‌های روده استخراج و cDNA سنتز گردید، بررسی با روش Real Time PCR و استفاده از آغازگرهای اختصاصی TNF-alpha و IL-1β صورت پذیرفت.

یافته ها: نتایج افزایش میزان بیان ژن هر دو ژن در تیمار تغذیه‌شده با جیره حاوی عصاره آنغوزه در سطح ۲٪ را نشان داد که این افزایش ازنظر آماری در ژن TNF-alpha با تیمارهای ۰/۵٪ و ۱٪ معنی‌دار بود(P<۰/۰۵). در بررسی بیان ژن IL-1β، هرچند در تیمار ازنظر آماری اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای تغذیه‌شده با آنغوزه مشاهده نشد(P>۰/۰۵)، اما تیمار تغذیه‌شده با جیره حاوی ۲٪ عصاره آنغوزه میزان بیان بالاتری را نشان داد.

نتیجه گیری: بر اساس نتایج به نظر می‌رسد استفاده از عصاره هیدرو الکلی گیاهی آنغوزه می‌تواند به‌واسطه افزایش بیان نسبی سایتوکین‌های التهابی به بهبود وضعیت ایمنی در ماهی گورخری کمک نماید.

واژه های کلیدی: ماهی گورخری، آنغوزه، ژن TNF-alpha، IL-1β.

مقدمه

با توجه به افزایش جمعیت جهان ونیازبه تامین مواد غذایی از منابع مختلف، صنعت آبزی‌پروری رشد قابل-توجهی داشته و به سمت سیستم‌های متراکم و فوق متراکم پیش رفته است(۴)، که نیاز به کنترل کیفیت آب، تغذیه‌وپیشگیری از بیماری‌ها بیش از پیش احساس می‌گردد(۲۵). نقش مهم سیستم ایمنی در حفظ سلامت آبزیان وتضمین بقاء و رشد مناسب آن‌ها در طول دوره پرورش، سبب شده تا محققین به استفاده از انواع ترکیبات شیمیایی و طبیعی محرک و تقویت‌کننده سیستم ایمنی تمایل نشان دهند. در مزارع پرورش ماهی و هچری‌ها آنتی‌بیوتیک‌ها، واکسن‌ها و برخی مواد شیمیایی به‌عنوان محرک ایمنی در برابر ویروس‌ها، باکتری‌ها، انگل‌ها و بیماری‌های قارچی استفاده می‌شود. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و پیش‌گیری کننده‌های شیمیایی در مقابل بیماری آبزیان دارای عوارضی چون ایجاد مقاومت در عامل بیماری نسبت به دارو، تجمع زیستی در گوشت آبزیان، آلودگی محیط‌زیست و بیمار نمودن انسان به باکتری‌های مقاوم شده است(۳). به همین جهت در سال-

های اخیر جهت پیش‌گیری، کنترل بیماری یا افزایش ایمنی به افزودن مکمل‌های غذایی طبیعی توجه بیشتری شده است. ازآن جایی‌که برخی گیاهان دارویی دارای طیف وسیعی از خواص مفید ازجمله تحریک و تقویت سیستم ایمنی هستند،در بسیاری از کشورها استفاده از محرک‌های ایمنی گیاهی برای کنترل بیماری، افزایش پاسخ ایمنی ذاتی و اکتسابی ماهی توسعه‌یافته است(۱۸). استفاده از گیاهان دارویی در جیره غذایی ماهی، موجب بهبود عملکرد سیستم ایمنی مانند افزایش فعالیت ضد باکتریایی، افزایش فعالیت لیزوزیم، پاسخ آنتی‌بادی و افزایش بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی در ماهی می‌شود(۱۹). مطالعات متعددی در زمینه تعیین اثرات مثبت گیاهان دارویی به‌عنوان محرک ایمنی طبیعی جایگزین مواد شیمیایی در آبزی‌پروری صورت گرفته است که از آن جمله می‌توان به بررسی اثرات گیاه گلپر بر ماهی(*Malabaricus epinephelus*)(۳۲)، عصاره سیر بر ماهی(*Lates calcarifer.*)(۳۱)، عصاره سرخار گل(*Echinacea purpurea*) بر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان(*Oncorhynchus mykiss*)(۲۳)، عصاره خرما و گیاه غازیاقی(*Falcaria vulgaris*) بر ماهی کپور معمولی(*Cyprinus carpio*)(۲۰، ۸) و گیاه گون(*Glycyrrhizaglabra*) و شیرین‌بیان(*Astragalus membranaceus*) بر ماهی سوف زرد (*Percafla vescens*) اشاره نمود(۱۲). گیاه آنغوزه با نام علمی (*Ferula assa foetida*)، بومی ایران و افغانستان یک گیاه چندساله از خانواده چتریان است. صمغ آنغوزه حاوی فرولیک اسیدو استرهای کومارینی فوئتیدین و کامولونول،آمبلی‌فرون، فرانسی‌فرول، تتراسولفیدها، سزکویی ترپن‌ها، گلوکز، گالاکتوز، رامنوز، پلی‌ساکاریدها، گلیکوپروتئین‌ها و هم چنین روغن‌های فرار سولفوره و ترپنوئیدها می‌باشد(۲۴). مطالعات دارویی و بیولوژیکی خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد قارچی، ضدویروسی، ضداسپاسمی، ضد سرطانی و کاهش‌دهنده فشارخون این گیاه را نشان داده است(۳۵). سیستم ایمنی ماهیان همانند سایر مهره‌داران از اندام‌ها در برابر عوامل بیماری‌زا دفاع می‌کند. سایتوکین‌ها گلیکوپروتئین‌های محلول می‌باشند که در تنظیم عملکرد سیستم ایمنی نقش عمده‌ای دارند. این ترکیبات دارای گیرنده‌هایی بر سلول‌های هدف بوده و بااتصال به گیرنده اثر خود را بر سلول القاء می‌کنند. در سیستم ایمنی ماهی‌ها و در ارتباط با التهابات مولکول سایتوکینی فاکتور نکروزکننده تومور(TNF) نقش مهمی دارد که به دنبال تحریک سیستم ایمنی از گلبول‌های سفید ترشح می‌شود(۱۷، ۱۶). اینترلوکین‌ها، سایتوکین‌هایی می‌باشند که از لکوسیت ترشح و بین سایر لکوسیت‌ها اثر می‌کند. IL-1B نقش مهمی در پاسخ میزبان به تهاجم میکروبی، آسیب بافتی و واکنش ایمونولوژیک ایفا می‌نماید(۱۰). ماهی گورخری(*Dani orerio*) ماهی با اندازه کوچک (معمولاً کم‌تر از ۴۰ میلی‌متر) از گونه‌های آب شیرین مناطق گرمسیری بومی پاکستان و هند و ساکن آب‌های کم‌عمق است(۲۱).با توجه به مزایای آن ازجمله سهولت تکثیر و وسیع بودن دامنه تحمل حرارتی، این‌گونه توانسته است نظر علاقمندان زیادی را به خود جلب نموده و در بسیاری از آزمایشات(ژنتیک مولکولی و تحقیقات زیست پزشکی) از آن به‌عنوان مدل آزمایشگاهی استفاده می‌نمایند(۲۹). در مطالعه پیشین صفری و همکاران، اثر پودر گیاه آنغوزه بر بهبود وضعیت ایمنی ماهی کپور بررسی نموده و اثرات مثبت آن را مشاهده کرده است(۲۶). ازآن جا که گزارشی در رابطه با اثر عصاره هیدروالکلی این گیاه بر ایمنی ماهی گورخری صورت نگرفته است مطالعه حاضر با هدف بررسی این عصاره بر بیان ژن‌های دخیل در ایمنی(TNF-alpha و IL-1β) صورت گرفت.

مواد و روش ها

تهیه ماهی و سازگاری به شرایط آزمایشگاهی

بچه ماهی‌های گورخری از مرکز خصوصی تکثیر و پرورش ماهیان زینتی واقع در شصت کلا، استان گلستان تهیه و با پلاستیک‌های محتوی یک‌سوم آب و دوسوم هوا به مرکز تحقیقات آبزی‌پروری شهید فضلی برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شدند. ابتدا ماهیان جهت انگل‌زدایی و بهبود استرس ناشی از حمل‌ونقل در آب‌نمک(NaCl) به غلظت ۲ درصد به مدت ربع ساعت حمام داده شدند و مدت ۴۸ ساعت جهت کاهش تلفات احتمالی و استرس غذادهی نشدند. جهت آدابتاسیون ماهیان به مدت ۲ هفته با شرایط آزمایشی عادت دهی گردیدند. در این ۲ هفته ماهیان با جیره غذایی پایه(بیومار) مورد تغذیه واقع شدند. طی این مدت روزانه ۵۰ درصد آب مخازن با آب شهری کلرزدایی شده تعویض شد.

طرح آزمایش و مدیریت مخازن

این آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی در ۴ تیمار و هر تیمار با ۳ تکرار انجام شد. تیمارها شامل گروه تغذیه‌شده با(شاهد)، ۰/۵، ۱ و ۲ درصد عصاره هیدرو الکلی گیاه آنغوزه بودند(۲۶). به‌طور تصادفی تعداد ۵۰ عدد ماهی با میانگین وزنی حدود ۰/۰۱±۰/۳ گرم در آکواریوم‌های شیشه‌ای ۵۰ لیتری ذخیره‌سازی گردیدند. هوادهی آکواریوم‌ها با استفاده از سنگ هوای متصل به پمپ هواده صورت گرفت. در این آزمایش در طول دوره پرورش میانگین دمای آب ۲±۲۵ درجه سانتی گراد، دامنه pH ۸-۷ و میانگین اکسیژن ۷ میلی گرم در لیتر اندازه‌گیری شد.

تهیه غذا، عصاره و غذادهی

گیاه آنغوزه ازشهرستان بی ارجمند استان سمنان در بهار ۱۳۹۵، جمع‌آوری و مورد تأیید اساتید گیاه شناسی دانشگاه گلستان قرارگرفت. اندام‌های هوایی پس ازجدا شدن درسایه‌خشک گردیدند، سپس با استفاده از آسیاب برقی به‌صورت پودر در آمد. جهت تهیه عصاره هیدرو الکلی بر اساس دستورالعمل استخراج هیدروالکلی گیاه سرخار گل با استفاده از افزودن g ۲۰ پودر گیاه آنغوزه و ۴۰۰ میلی‌لیتر متانول ۶۰٪ تهیه شد. بدین منظور مخلوط آماده شده باگذشت زمان مورد نظر محتویات موجود در ارلن را از روی چند گاز استریل عبور داده تا رسوبات از عصاره جدا و محلول صاف‌شده را با کاغذ صافی والتمن صاف و به یک بشر ضدعفونی شده منتقل و با دستگاه روتاری حلال موجود حذف شد، سپس در دستگاه خشک‌کن انجمادی به پودر خشک تبدیل گردید(۹). بعد از تهیه عصاره،ابتدا جیره پایه(غذای بیومار) با ترازوی دیجیتال با نشان تجاری AND EK610i با دقت ۰/۰۰۱گرم توزین و به نسبت وزن غذا برای سطوح مختلف، عصاره آنغوزه به‌صورت محلول در ژلاتین ۵ درصد روی غذا به‌صورت یکنواخت اسپری و مخلوط شد. جیره‌های آماده‌شده در هوای محیط آزمایشگاه خشک و در پلاستیک‌های زیپ‌دار قرار داده‌شده و تا زمان مصرف به یخچال با دمای ۴ درجه سانتی گراد منتقل گردیدند. غذادهی به میزان ۵٪ وزن بدن به‌طور روزانه در طی ۴ الی۵ نوبت صورت گرفت.

نمونه‌برداری، استخراج RNA، سنتز cDNA

بعد از ۲ ماه پرورش و تغذیه با سطوح مختلف آنغوزه، جهت بررسی میزان بیان ژن مرتبط با ایمنی(TNF-alpha, IL1B) در شرایط استریل از روده ماهی ها نمونه‌برداری شد. از هرتکرار۳ ماهی نمونه برداری و با استفاده از پودر گل میخک با دوز ppm ۲۰۰ بی‌هوش و پس‌ازآن سطح بدن با پنبه آغشته به الکل استریل‌شده و به‌سرعت ناحیه شکم ماهی باز گردید. بافت روده جدا شده و پس از جمع‌آوری، به داخل تیوپ‌های از قبل استریل‌شده ریخته و بلافاصله تیوپ‌ها به تانک ازت انتقال داده شدند. در پایان نمونه‌برداری نمونه‌ها در یخچال ۸۰- درجه سانتی گراد قرار داده شدند و تا زمان استفاده جهت استخراج RNA در آن جا نگهداری گردیدند. استخراج RNA بر اساس روشتوسط

ماده هضم‌کننده بایوزول انجام شد(۱). RNA کل از ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه بافت‌های روده هموژن شده با ازت مایع با استفاده از بیوزول و طبق دستورالعمل شرکت سازنده(Biozol-Bioflux- Bioer) استخراج گردید. کیفیت RNA کل با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵درصد و مشاهده باندهای S ۱۸ و۲۸S مربوط به RNA ریبوزومی و کمیت آن با استفاده از نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر به‌دست آمده از دستگاه نانوفتومتر(IMPLEN-P100) ارزیابی شد. سپس به غلظت ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر با استفاده از آب DEPC رقیق شدند. جهت حذف هرگونه باقی‌مانده DNA ژنومی در نمونه‌های RNA، تیمار DNase I انجام و سپس اخترشت هاول cDNA بر اساس روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز(Fermentase- France) با استفاده از ۵ میکرولیتر RNA تیمار شده با DNase I(غلظت ۵۰۰ نانوگرم)، ۱ میکرولیتر آغازگر الیگو dt(۲۰-۱۸ الیگونوکلئوتید) و ۵ میکرولیترآب دپس انجام شد. بدین منظور تیوپ‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون و به‌سرعت روی یخ قرارگرفتند. ۴ میکرو لیتر بافر ۵X آنزیم نسخه‌بردار معکوس، ۲ میکرو لیتر dNTP ۱۰ میلی‌مولار و ۲۰ واحدآنزیم RNase inhabitor و ۱/۵ میکرو لیترآبDEPC به مخلوط بالا اضافه شد. تیوپ‌ها به مدت ۵ دقیقه دردمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفت. بلافاصله ۲۰۰ واحد آنزیم نسخه‌بردار معکوس به هر تیوپ اضافه گردید و به مدت ۱ ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند، سپس تیوپ‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید تا واکنش غیر فعال شود. به هر تیوپ ۳۸۰ میکرو لیتر آب DEPC اضافه و cDNAهای سنتزشده تا شروع آزمایش‌ها در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت بررسی بیان ژن‌های مربوطه(جدول۱) Real time PCR در ۳ تکرار بیولوژیکی و ۳ تکرار تکنیکی با استفاده از ۱۰ میکرولیتر بافر سایبر گرین، ۱ میکرولیتر پرایمر پیش‌رونده و پس‌رونده، ۲/۸ میکرولیتر آب، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم tag polymerase و ۵ میکرولیتر cDNAرقیق‌شده(بر اساس غلظت) صورت گرفت(۶). ژن بتا اکتین به‌عنوان ژن خانه دار استفاده شد، علت استفاده از ژن بتا اکتین به‌عنوان ژن خانه دار ثبات بیان در مطالعات پیشین می‌باشد(۲۶). به منظور اطمینان از بهینه بودن شرایط qPCR، سری غلظت‌های مختلف(۱، ۱/۲، ۱/۵، ۱/۱۰، ۱/۲۰ و ۱/۵۰) از نمونه‌های cDNA مخلوط از تیمارهای متفاوت از بافت‌های مذکور تهیه و با هر دو پرایمر هدف و رفرنس در ۳ تکرار تکثیر و منحنی استاندارد جهت تخمین کارایی(E) و تکرارپذیری آزمایش برای هر پرایمر ترسیم شد(۶).

تجزیه و تحلیل آماری

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی برنامه‌ریزی و اجرا گردید. Ct به‌دست آمده برای ژن‌های TNF-α_1و IL-1β با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (ΔΔCt) برابر است با ΔCt ژن هدف منهای ΔCt کالیبراتور) در فضای نرم‌افزار اکسل تبدیل به بیان نسبی ژن‌های مورد نظر نسبت به ژن رفرنس β- actin گردید(۲۲). عدد به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۰ مرتب و نمودارهای آن رسم گردید.

نتایج

بررسی کیفی RNA

نتایج بررسی کیفی RNA استخراج‌شده از بافت‌روده ماهی گورخری در هر نمونه، دو باندRNA 18S r و ۲۸S را با وضوح بالا نشان داد. نسبت شدت جذب در نمونه‌های RNA استخراج شده در دو طول‌موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر در محدوده ۲/۱ -۱/۸ قرار داشت، هم‌چنین میزان جذب در طول موج‌های ۲۳۰، ۲۴۰ و ۳۲۰ نیز بیان‌گر قابلیت مناسب RNA در نمونه‌های موردبررسی بود.

بررسی cDNA سنتز شده

cDNA سنتز شده با پرایمر β -actin طراحی‌شده برای این‌گونه تست و مشاهده باند در ۲۱۶bp سنتز صحیح DNA را تأیید نمود(شکل۲).

الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵٪ و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید. مارکر۱۰۰bp

نتایج ارزیابی اثرات عصاره گیاه آنغوزه بر تغییرات بیان ژن TNF-αدر شکل ۳ آورده شده است. بررسی میزان بیان ژن TNF-α ماهی گورخری تحت تیمارهای آزمایشی حاکی ازافزایش میزان بیان ژن در تیمار تغذیه‌شده با جیره حاوی عصاره آنغوزه در سطح ۲٪ بود که از نظر آماری در مقایسه با سایر گروه‌های تغذیه‌شده افزایش معناداری را نشان داد(P<۰/۰۵)، درحالی‌که اختلاف بین گروه‌های دیگر معنی‌دار نبود(P>۰/۰۵).

پیک مشاهده‌شده در منحنی ذوب آغازگر برای هر محصول، بیان‌گر وجود یک محصول ویژه و تکثیر اختصاصی است(شکل ۴). در این مطالعه تغییرات بیان ژن IL-1β در تیمارهای آزمایشی تغذیه‌شده با عصاره گیاه آنغوزه و تیمار شاهد موردبررسی قرار گرفت. شکل ۵ نشان‌دهنده اثرات عصاره آنغوزه بر میزان بیان ژن IL ماهی گورخری است. همان‌طور که در نمودار مشخص است، ازنظر آماری اختلاف معناداری بین بیان ژن IL-1β در تیمارهای تغذیه‌شده با عصاره آنغوزه مشاهده نشد(P>۰/۰۵). پیک مشاهده‌شده در منحنی ذوب آغازگر برای هر محصول، بیان‌گر وجود یک محصول ویژه و تکثیر اختصاصی است(شکل ۶).

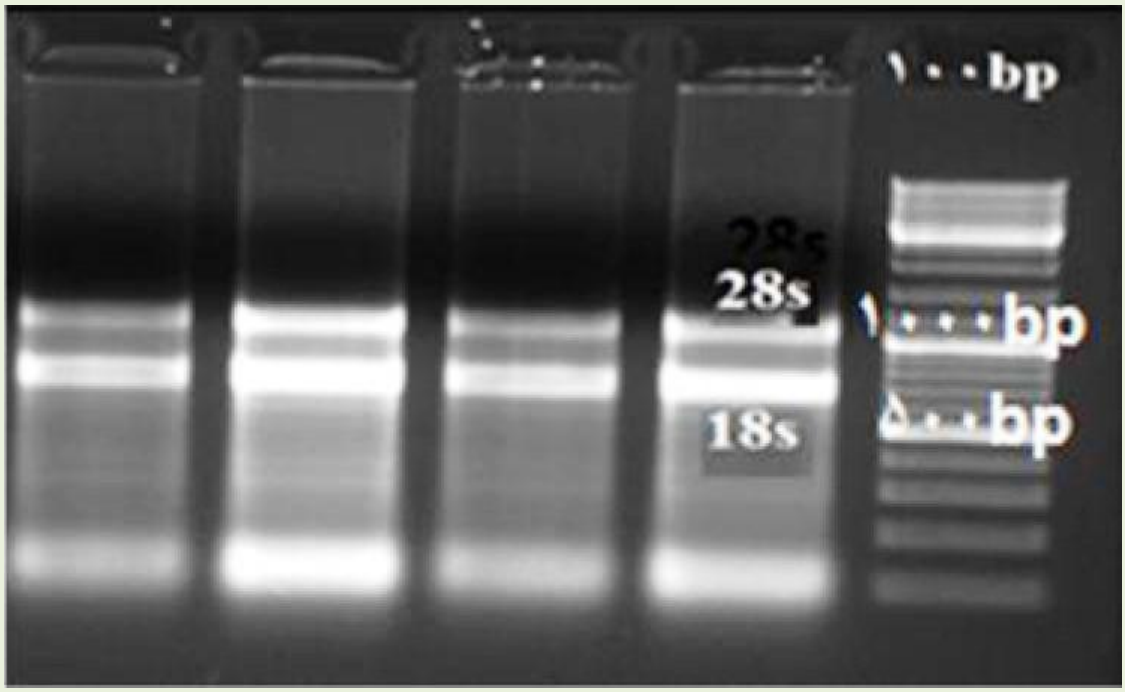
جدول۱- اطلاعات مربوط به توالی آغازگرهای استفاده‌شده

نام پرایمر	توالی (´۳-´۵)	دمای اتصال (C°)	کاربرد
TNF-alfa q-PCRF	CTGCTTCACGCTCCATAAGA	۵۸	سنجش کمی بیان ژن‌های ایمنی
TNF-alfa q-PCRR	CTGGTCCTGGTCATCTCTCC		
IL-1βq-PCRF	CGTCTCCACATCTCGTACTCA	۵۸	سنجش کمی بیان ژن‌های ایمنی
IL-1β q-PCRR	GTGTCTTTCCTGTCCATCTCC		
β- actin q-PCRF	AGCAGATGTGGATCAGCAAG	۵۸	ژن خانه‌دار
β- actin q-PCRR	TACCTCCCTTTGCCAGTTTC		

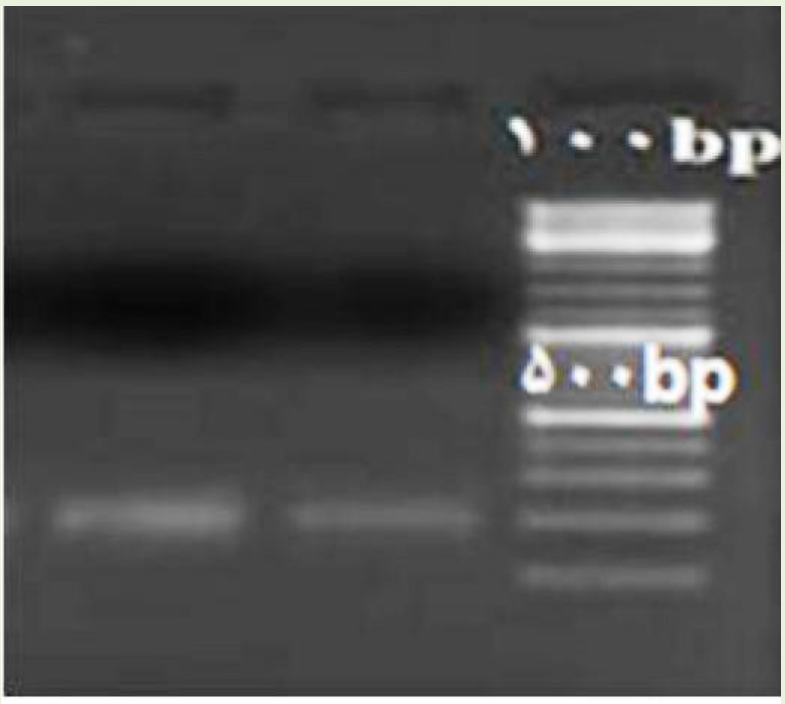
بحث و نتیجه‌گیری

در سال‌های اخیر تحقیقات گسترده ای در زمینه استفاده از گیاهان دارویی در جیره غذایی آبزیان جهت افزایش بهره‌وری از مواد غذایی و هم چنین بهبود وضعیت رشد و ایمنی این موجودات انجام شده است(۱۳،۳۰، ۵). اثرات مثبت گیاه آنغوزه به دلیل دارا بودن ترکیباتی نظیر اسیدگالبانیک، آمبلی‌فرون، لیمونن و فلاونوئید(۲۸) در درمان دیابت، کاهش قند خون، افزایش ترشح انسولین در موش‌های صحرایی دیابتی(۱۴) و بهبود ایمنی هومورال و سلولی در جوجه‌های گوشتی(۲۸)، هم چنین اثرات ضدمیکروبی و ضدانگلی(۳۶) از گیاه آنغوزه نیز گزارش‌شده است. نتایج مطالعه حاضر حاکی از افزایش معنی‌دار بیان ژن TNFآلفا در ماهیان گورخری تغذیه‌شده با جیره حاوی عصاره گیاه آنغوزه در تیمار ۲٪ نسبت به سایر تیمارها و گروه شاهد می باشد(P<۰/۰۵). بااین‌حال در این مطالعه اختلاف معناداری در بیان ژن IL بین تیمارهای آزمایشی و تیمار شاهد مشاهده نشد(P>۰/۰۵). نتایج مشابهی در ماهی شانک(*Sparus aurata*) تغذیه‌شده با جیره غذایی حاوی گیاه شنبلیله در بیان ژن TNFآلفاگزارش شد(۲). در بررسی اثر جلبک ساپرولینا بر بیان ژن‌های ایمنی

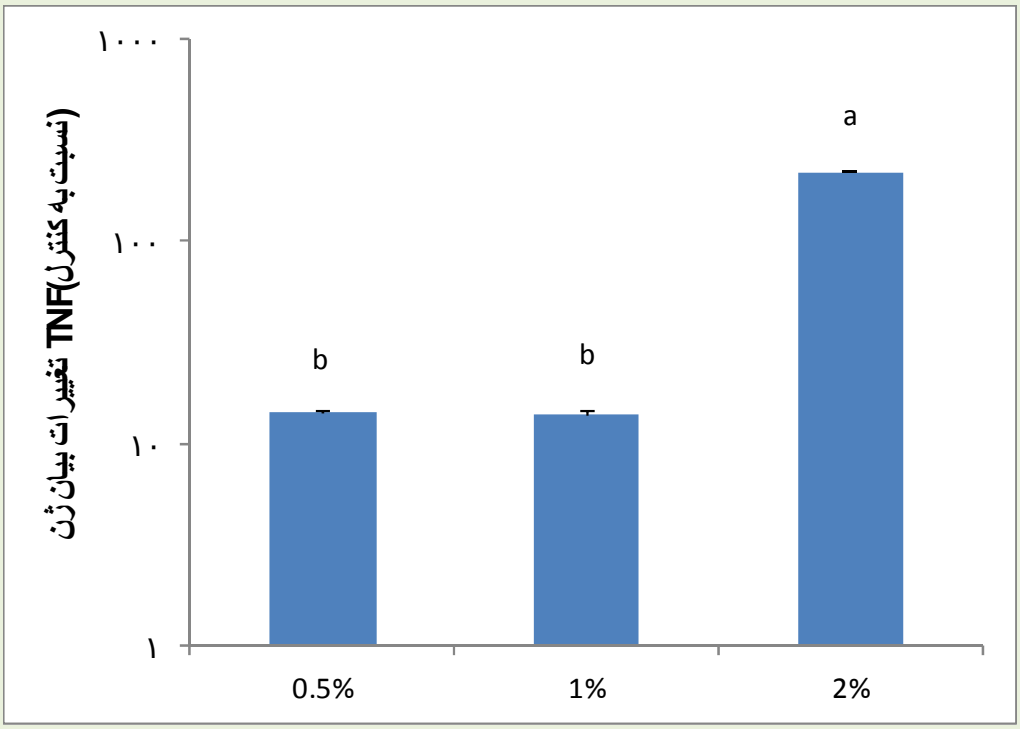
(TNFα و IL-10)، نتایج حاکی از افزایش بیان ژن TNFα و کاهش بیان ژن IL-10 بود(۳۳).



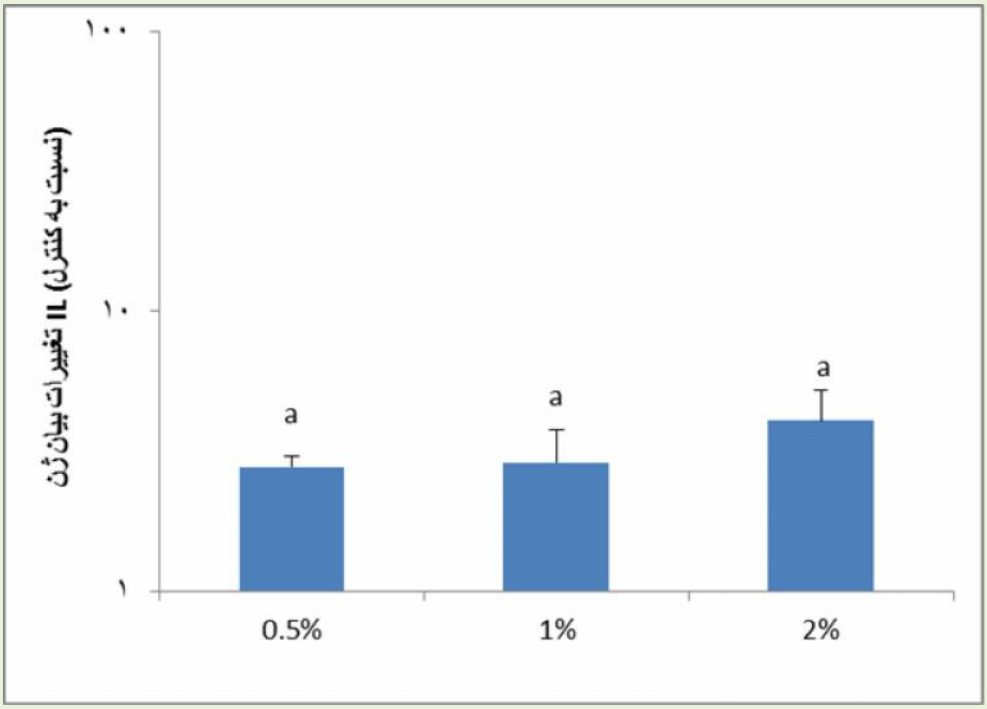
شکل ۱- کیفیت RNAاستخراج‌شده از بافت‌روده ماهی گورخری روی ژل آگارز ۱/۵٪ و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید در نمونه‌های استخراج‌شده دوباند متعلق به ۱۸SrRNA و ۲۸S می‌باشند. بررسی کمی RNA(ستون اول از سمت راست مارکر و ستون‌های دیگر RNA نمونه‌ها از تیمارهای مختلف).



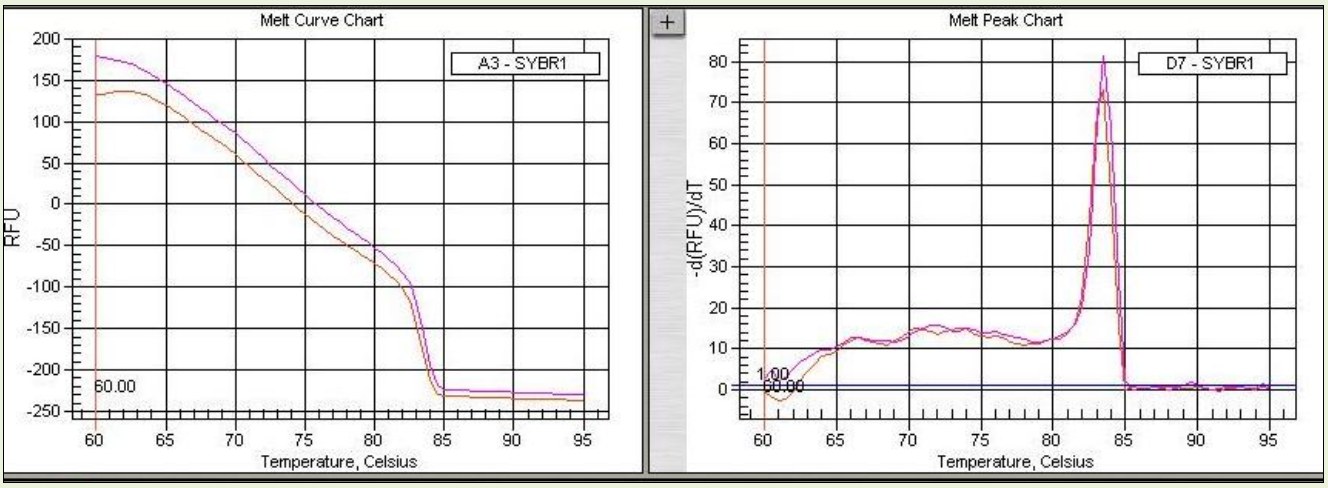
شکل۲- محصول تکثیر cDNAهای سنتز شده با آغازگرβ-actin(۲۱٦bp) در ماهی گورخری پس از



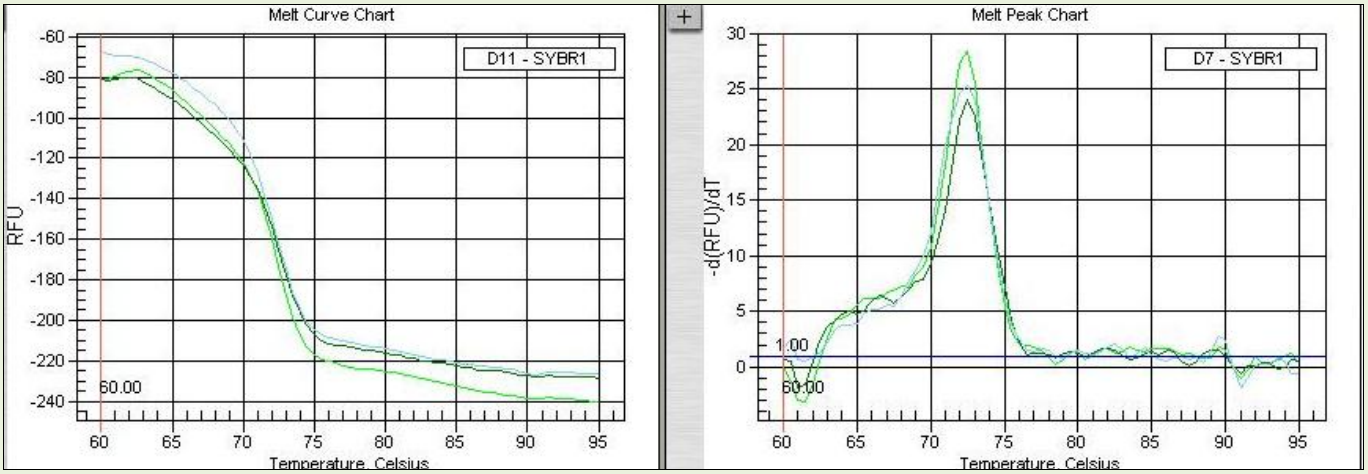
شکل ۳- سطوح بیان ژن TNF-α در یک دوره ۸ هفته‌ای در ماهی گورخری تحت تأثیر سطوح مختلف عصاره گیاهی آنغوزه(در هر نمودار حروف متفاوت نشانه معنی‌دار بودن در سطح ۰/۰۵ است).



شکل ۵-سطوح بیان ژن IL-1βدر یک دوره ۸ هفته‌ای در ماهی گورخری تحت تأثیر سطوح مختلف عصاره گیاهی آنغوزه(در نمودار حروف مشابه نشانه عدم معنی‌دار بودن است).



شکل٤- منحنی ذوب ترسیم‌شده از غلظت‌های سریالی برای آغازگر TNF-α



شکل٦- منحنی ذوب ترسیم‌شده از غلظت‌های سریالی برای آغازگر IL-1β

هم چنین در مطالعه چاکرابارتی و همکاران (۷) رابطه معکوس بین بیان ژن TNFα و IL-10 در ماهی کاتلا تغذیه‌شده با دانه گیاه(*Achyranthes aspera*) مشاهده شد،چراکه IL-10 به‌عنوان یک سایتوکین چندمنظوره می‌باشد که یکی از فعالیت‌های آن سرکوب عملکرد سیستم ایمنی است(۲۷). یایوان و همکاران(۳۴) در مطالعه‌ای بر ماهی کپور معمولی گزارش کردند که افزودن گیاه گون به جیره غذایی سبب افزایش TNF-α و IL-1 شد. هم چنین صفری و همکاران گزارش نمودند که به‌کارگیری پودر آنغوزه در جیره غذایی ماهی کپور معمولی(*Cyprinus carpio*) به مدت ۸ هفته سبب افزایش معنادار بیان ژن‌های دخیل در ایمنی گردید. آن‌ها اعلام نمودند که تیمارهای تغذیه‌شده با پودر گیاه آنغوزه در سطوح مختلف(۰/۵، ۱ و ۲ درصد) نسبت به گروه شاهد افزایش بیان ژن‌های TNF-α، IL-1،IL-8 را نشان دادند(۲۶). در مطالعه‌ای دیگر بیلن و همکاران گزارش کردند که به‌کارگیری عصاره گیاه(*Capparis spinosa*) در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان سبب افزایش رونویسی ژن‌های سایتوکین ازجمله TNF-α و IL-1 و درنتیجه بهبود پاسخ ایمنی شد(۴). سیتوکین‌های پیش-التهابی مانند IL-8 و TNFآلفا در شروع و تقویت فرآیندهای التهابی در ماهی دخالت دارند(۱۵). عصاره آنغوزه نیز به دلیل دارا بودن متابولیت‌های ثانویه دارای توانایی کاهش رادیکال‌های آزاد و تقویت سیستم

ایمنی هستند. درمجموع نتایج حاصل از این مطالعه حاکی ازآن است که عصاره گیاهی آنغوزه به منظور افزایش ایمنی غیراختصاصی و به‌عنوان تحریک‌کننده سیستم ایمنی در برابر عوامل بیماری‌زا می‌تواند در جیره غذایی ماهی سودمند باشد. بنابراین استفاده از عصاره این گیاه، یک راه‌کار مفید برای استفاده درمانی آن به جهت پیش‌گیری از بیماری‌ها و جلوگیری از تلفات ماهی توصیه می‌شود، چراکه افزایش ایمنی ذاتی از طریق کاهش احتمالی بیماری می‌تواند اثرات مثبتی را به همراه داشته باشد. هرچند مطالعات بیشتری در خصوص میزان دوز مصرفی، روش استحصال عصاره و تعیین استاندارد تغذیه‌ای مورد نیاز می‌باشد.

منابع

1.Awad, E., Mitchell, W. J.,Austin, B. (2011). Effect of dietary supplements on cytokine gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of fish diseases, 34; 629-634.

2.Awad, E., erezuel, R.,Esteban, M.A. (2015). Effects of fenugreek (*Trigonella foenumgraecum*) on gilthead seabream (*Sparus aurata L*). Immune Status And Growth performance, 45(2); 454-464.

3.Bairwa, M.K., Jakhar, K., Satyanarayana Y., Reddy D. (2012). Animal andplant originated immunostimulants used in aquaculture. Journal of Natural Product and Plant Resources, 2(3); 397-400.

4.Bilen, S., Altunoglu, Y.C., Ulu, F., Biswas, G. (2016). Innate immune and growth promoting responses to caper (*Capparis spinosa*) extract in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish and Shellfish Immunology, 57; 206-212.

5.Brudeseth, B.E., Wiulsrod, R., Fredriksen, B.N., Lindmo, K., Lokling, K.E., Bordevik,M. (2013). Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming. Fish and Shellfish immunology, 35; 1759-1768.

6.Bustin, A.S., Benes, V., Garson, J.A., Healmans, J., Huggett, J., Kubista, M. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time pcr expriments. Clinical Chemistry, 55(4); 611-622.

7.Chakrabarti, R., Srivastava, P.K., Verma, N., Sharma, J. (2014). Effect of seeds of *Achyranthes aspera* on the immune responses and expression of some immune-related genes in carp (*Catla catla*). Fish and Shellfish Immunology, 41; 64-69.

8.Chobkar, N. (2015). Effect of using *Falcaria vulgaris* on skin wound healing and immune response of common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Endocrinology and Veterinary Clinic, 9(1); 1-9.

9.Citarasu, T., Sivaram, V., Immanuel, G., Rout, N., Murugan, V. (2006). Influence of selected Indian immunostimulat herbs against white spot syndrome virus(WSSV) infection in black tiger shrimp,(*Penaeus monodon*) with reference to haematological, biochemical and immunological changes. Fish and shellfish immunology, 21; 372-384.

10. Corripio-Miyar, Y., Bird S., Tsamopoulos, K., Secombes, C.J. (2007). Cloning and expression analysis of two pro-inflammatory cytokines, IL-1ß and IL-8, in haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). Molecular Immunology, 44; 1361-1373.

11. Dorman, H.J.D., Bachmayer, O., Kosar, M., Hiltunen, R. (2004). Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(4); 762–770.

12. Elabd, H., Wang, H.P., Shaheen, A., Yao H., Abbass, A. (2016). Feeding(*Glycyrrhiza glabra*) (*liquorice*) and(*Astragalus membranaceus*)(AM) alters innate immune and physiological responses in yellow perch(*Perca flavescens*). Fish and Shellfish Immunology, 54; 374-384.

13. Faggio, C., Morabito, S.A., Minicante, G.L., Piano, M., Pagano, G., Genovese, G. (2015). Potential use of polysaccharides from the brown algea(*Undaria pinnatifida*) as anticoagulants, Braz. Brazilian Archives of Biology and Technology, 58; 798-804.

14. Fateh, M., Farifteh, F., Fatehi-Hassanabad, Z. (2004). Antispasmodic and hypotensive effects of *Ferula asafoetida* gum extract. Journal of Ethnopharmacology, 91; 321–324.

15. Feng, L., Li, W., Liu, Y., Jiang, W.D., Kuang, S.K., Jiang J. (2015). Dietary phenylalanine-improved Intestin albarrier health in young grass carp(*Ctenopharyn godonidella*) is associated with increased immunestatus and regulated geneexpression of cytokines, tight junction proteins, Antioxidant enzymes and related signaling Q4 molecules. Fish and Shellfish Immunology, 45 (2); 495-509.

16. Grayfer. L., Walsh, J. G., Belosevic, M. (2008). Characterization and functional analysis

of goldfish (*Carassius auratus L*) tumor necrosis factor-alpha. Developmental and Comparative Immunology, 32; 532-543.

17. 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.

18. Guardiola, F.A., Porcino, C., Cerezuela, R., Cuesta, A., Faggio, C., Esteban, M.A. (2016). Impact of date palm fruits extracts and probiotic, enriched diet on antioxidant status, innate immune response, and immune-related gene expression of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). Fish and Shellfish Immunology, 52; 298-308.

19. Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M.S. (2011). Diet enriched with mushroom Phellinus linteus extract enhances the growth, innate immune response, and disease resistance of kelp grouper,(*Epinephelus bruneus*) against vibriosis. Fish and Shellfish Immunology, 30; 128-134.

20. Hoseinifar, S H, Khalili, M, Rufchaei, R, Raeisi, M. (2016). Investigating the effects of date palm extract on growth performance and mucus immune parameters in Common Carp *Cyprinus carpio Linnaeus*, 1758 fingerlings. Journal of Academia and Industrial Research, 3(4); 89-100.

21. Lessman, Ch.A. (2011). The developing zebrafish(*Danio rerio*): A vertebrate model for high-throughput screening of chemical libraries. Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews, 93(3); 268-280.

22. Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis ofrelative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods, 25; 402-408.

23. Pourgholam, R., Sharif Rohani, M., Safari, R., Saeeidi, A., Binaeei M., Najafeyan R. (2013). Effect of *Echinacea purpurea* extract on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and its resistance to Streptococcusis. Journals & Diaries - Personality Cafe, 22 (3); 1-12.

24. Rahbarian, R., Sadooghi, S.D. (2014). Investigating the effects of aqueous extract of *Asafoetida resin* on the serum level of insulin and blood glucose in type 1 diabetic rats. Journal of Shahrekord University of Medical Sciences, 16 (3); 16 - 21.

25. Reverter, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B., Sasal, P. (2014). Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. Aquaculture, 433; 50-61.

26. Safari, R., Hoseinifar, S.H., Nezhadmoghadam, S., Jafar, A. (2016). Transciptomic study of mucosal immune, antioxidant and growth related genes and non-specific immune response of common carp(*Cyprinus carpio*) fed dietary Ferula (*Ferula assafoetida*). Fish and Shellfish Immunology, 55; 242-248.

27. Savan, R., Igawa, D.,Sakai, M. (2003). Cloning, characterization and expression analysisof interleukin-10 from the common carp, (*Cyprinus carpio L*). European Journal of Biochemistry, 270; 4647-4654.

28. Shademani, M., Bagherzadeh Kasmani, F., Mirzaee, H.R., Mehri, H.R. (2015). Effect of Stikun gassa(*Ferulaa assafoetida*) powder on performance, immunitystatus and cecal microbial population of broiler chickens. Iranian Journal of Applied Animal Science; 111-118.

29. Shin, J.T., Fishman, M.C. (2002). From zebrafish to human: modular medical models. Annual Review of Genomics and Human Genetics, 3; 311–40.

30. Sitja-Bobadilla, A. (2008). Living off a fish: a trade-off between parasites and the immune system. Fish and Shellfish Immunology, 25; 358-372.

31. Taplur, A.D., Ikhwanuddin, M. (2012). Dietary effects of garlic(*Allium sativum*) on haemato-immunological parameters, survival, growth and disease resistance against Vibrio harveyi infection in Asian sea bass, Lates calcarifer (Bloch). Aquaculture, 364-356.

32. Wang, Q.K., Chen, C.X., Guo, Y.J., Zhao, H.Y., Sun, J.F., Ma, S. (2011). Dietary polysaccharide from(*Angelica sinensis*) enhanced cellular defence responses and disease resistance of grouper(*Epinephelus malabaricus*). Aquaculture International, 19; 945–956.

33. Watanuki, H., Ota, K., Tassakka, A.C.M., Kato, T.,Masahiro, S. (2006). Immuno stimulant effects of dietary Spirulina platensis on carp, (*Cyprinus carpio*). Aquaculture, 258; 157-163.

34. Yuan, C., Pan, X., Gong, Y., Xia, A., Wu, G., Tang, J. (2008). Effects of astragalus poly saccharides (APS) on the expression of immune response genes in headkidney, gill and spleen of the common carp,(*Cyprinus carpio L*). Immunopharmacology, 8(1); 51-58.

35. Zamani Taghizadeh Rabe, Sh., Iranshahi, M., Mahmoudi, M. (2016). In vitro anti inflammatory and immune modulatory properties of umbelliprenin and methyl galbanate. Journal of Immunotoxicology, 13 (2);

209-216.
36. Zare, A.R.A., Omidi, M., Fallah Hoseini, H., Yazdani, D., Rezazadeh, S., Irvani, N. (2011). A review on pharmacological effects of *Ferula assa foetida* L.: a systematic review. Journal of Manufacturing Processes, 4 (40); 17-25.

.

.

. .

Effect of Supplementation of Diet with *Ferula assafoetida* Hydoalkohalic Extract on Immune Related (IL-1β and TNF-alpha) Gene

R. Safari[1], F. Vahedi Amiri [2], A Shabany[3], S.H. Hoseinifar[1], H. Kolangi Miandareh[1]

1.Assistant Professor, Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environment, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Gorgan, Gorgan, Iran. **fisheriesafari@yahoo.com**

2.Ph.D. Student, Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environment, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Gorgan, Gorgan, Iran.

3.Associate Professor, Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environment, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Gorgan, Gorgan, Iran.

Received:2017. 8. 12 **Accepted: 2018.11.8**

Abstract

Inroduction & Objective: Due to the increased bacterial resistance to common antibiotics, there is tendency towards using herbal extracts in order to increase the non-specific immune system. The aim of present study was to investigate the effect of hydroalkohalic extract of *Ferula assafoetida* on expression of genes related to immune (IL-1β and TNF-alpha) in Zebrafish.

Material and Methods: For this purpose zebrafish with average weight of 0.3±0.1 gr, were fed diets supplemented with 3 different levels of *Ferula* extract (0.5, 1 and 2%) and one control group for 8 weeks. At the end of feeding trial, RNA extracted from intestine, cDNA syntesised and Real-time PCR were done using IL-1β and TNF-alpha primers.

Results: Results showed the increase in expression of both genes in fish fed 2% *Ferula*, which was significant with other group (0.5% and 1%) in TNF-alpha ($P<0.05$). IL-1β gene expression didn't show significant difference ($P>0.05$) among fish fed ferula extracts, though the highest gene expression was seen in 2% *Ferula*.

Conclusion: According to results, it seems that using *Ferula assafoetida* hydroalkohalic extract could improve Zebrafish immune with increase of relative gene expression of inflammatory cytokine.

Keywords: *Ferula assafoetida*, Zebrafish, Gene expression, IL-1β and TNF-α.

.