

اثرات جیره حاوی گالاکتوالیگوساکارید بر بیان ژن درگیر در اشتها (گرلین) و برخی پارامترهای ایمنی سرم و رشد ماهی قرمز (*Carassius auratus gibelio*)

*شعیب فروردین^۱، حامد کلنگی میاندره^۱، علی شعبانی^۱، سیدحسین حسینی فر^۱ و سیدهساناز رمضانپور^۲

^۱گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران،
^۲گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۵؛ تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۱۹

چکیده

هدف از این پژوهش بررسی اثرات پریبیوتیکی گالاکتوالیگوساکارید (GOS) بر برخی فاکتورهای رشد (ضریب تبدیل غذایی، نرخ رشد ویژه، درصد افزایش وزن بدن و ضریب کارایی غذا)، بیان ژن گرلین و چند فاکتور خونی مرتبط با ایمنی سرم (پروتئین کل، آلبومین، گلوبولین، لیزوزیم، آلکالین فسفاتاز، آگلوتیناسیون و فعالیت کمپلمان) ماهی قرمز بود. آزمایش در سه سطح ۰/۵، ۱ و ۲ درصد از پریبیوتیک و گروه شاهد به صورت کاملاً تصادفی انجام شد. ذخیره سازی با تراکم ۱۵ عدد ماهی با میانگین وزنی 88 ± 0.28 گرم در هر مخزن فایبرگلاس ۵۰۰ لیتری به مدت ۶ هفته در شرایط یکسان و تغذیه با سطوح مختلف GOS، انجام شد. زیست سنجی ماهیان در پایان دوره صورت گرفت. همچنین نمونه برداری از بافت روده به منظور بررسی بیان ژن گرلین پس از طی سه و شش هفته انجام شد. هیچ کدام از فاکتورهای مرتبط با رشد اختلاف معنی داری را در میان تیمارها نشان ندادند ($P > 0.05$). همچنین نتایج تست های ایمنی سرم نیز نشان داد که میزان پروتئین کل، آلبومین، گلوبولین، لیزوزیم، آلکالین فسفاتاز، آگلوتیناسیون و فعالیت کمپلمان تحت تأثیر گالاکتوالیگوساکارید بین تیمارها و گروه شاهد دارای اختلاف معنی دار بود ($P < 0.05$) و گروه شاهد دارای کمترین میزان در تمام تست ها بود. RNA از بافت روده استخراج و cDNA سنتز شد و با پرایمرهای اختصاصی توسط Real Time PCR بیان ژن گرلین مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که در هر دو زمان نمونه گیری اختلاف معنی دار در میزان بیان ژن گرلین وجود داشت ($P < 0.05$). با افزایش سطح GOS مقدار نسبی بیان ژن گرلین کاهش یافت. در این مطالعه مشخص گردید که GOS با سطح ۱ و ۲ درصد در شش هفته تغذیه باعث افزایش ایمنی به واسطه افزایش پروتئین کل، آلبومین، گلوبولین، لیزوزیم، آلکالین فسفاتاز، آگلوتیناسیون و فعالیت کمپلمان در ماهی قرمز می شود اما با وجود گزارش های مختلف مبنی بر افزایش رشد، افزودن GOS به جیره غذایی باعث ایجاد اختلافی در رشد نشد و میزان بیان ژن گرلین که محرک رشد و اشتها است را کاهش داد.

واژه های کلیدی: اشتها، پاسخ ایمنی، پریبیوتیک، رشد، ژن گرلین، گالاکتوالیگوساکارید، ماهی قرمز

مقدمه

تغذیه ای شبیه کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) است (Vesogh و Mostageer، ۱۹۹۵). ماهی قرمز با فرهنگ و عقاید مردم در سراسر جهان عجین شده و یک ماهی بسیار مهم به لحاظ اقتصادی و تحقیقی

ماهی قرمز (*Carassius auratus gibelio*) از خانواده کپورماهیان (*Cyprinidae*) از لحاظ زیستی و

* نویسنده مسئول: shoaiiberty_sna@yahoo.com

را در حفره‌ها و سطح موکوسی روده افزایش دهد و باعث پایداری باکتری‌های مفید و کندن پاتوژن‌های روده و در نهایت افزایش عملکرد دستگاه گوارش در مقابل غذا شود (Gopalakrishnan و همکاران، ۲۰۱۲). تأثیر این مواد بر سازوکارهایی در سلول‌های مختلف بدن است که منجر به تغییر بیان ژن‌های مؤثر در سیستم ایمنی و اشتها می‌گردد. از ژن‌های مؤثر بر رشد و اشتها می‌توان به گرلین اشاره نمود. گرلین یک پپتید محرک اشتها در معده است که اخیراً شناسایی شده و به لیست پپتیدهای تنظیمی دستگاه گوارش اضافه شده است. سطح گرلین تا قبل وعده غذایی در خون خیلی زیاد می‌شود اما با مصرف وعده دوباره تا سطح پایه کاهش می‌یابد. مطالعات متعددی ثابت کردند که گرلین محرک اشتهاست (Kojima و همکاران، ۱۹۹۹). ژن گرلین یک پپتید با طولی حدود ۳۰-۲۰ اسیدآمینو تولید می‌کند که به‌عنوان لیگاند‌های داخلی به رسپتورهای خود در هیپوفیز متصل می‌شود و با تغییر غلظت Ca^{2+} باعث تحریک هیپوفیز به ترشح هورمون رشد می‌شود. همچنین گرلین دارای نقش‌های متعدد فیزیولوژیکی دیگر علاوه بر رهاسازی هورمون رشد و افزایش اشتها می‌باشد (Korbonits و همکاران، ۲۰۰۴). ایمنی ماهی مانند سایر مهره‌داران شامل دو بخش اختصاصی و غیراختصاصی است. فعالیت آگلوتیناسیون، کمپلمان پروتئین‌های آلبومین، گلوبولین، لیزوزیم و آلكالین فسفاتاز، نقش مهمی در مبارزه با عوامل بیماری‌زا و پاتوژن‌ها ایفا می‌کنند. فعالیت این پروتئین‌ها در ماهیان علاوه بر خون در موکوس نیز وجود دارد که یک سد دفاعی می‌سازد (Palaksha و همکاران، ۲۰۰۸). بر خلاف آنتی‌بادی‌ها که به‌صورت اختصاصی عمل می‌کنند فعالیت این مولکول‌ها گستره‌ای از عوامل پاتوژن را در برمی‌گیرد

است (Hasan Nataj Niazi و همکاران، ۲۰۱۳). با افزایش درخواست پرورش ماهی قرمز و با در نظر گرفتن این نکته که عوامل محدودکننده زیادی بر سر راه پرورش این ماهی اعم از شرایط پرورشی و تغذیه‌ای وجود داشته باشد بنابراین ضرورت دارد که برای مقاوم کردن ماهی و افزایش رشد و بازماندگی از ترکیبات خاصی در جیره این ماهی استفاده شود. با توجه به سهم عمده غذا در هزینه‌های پرورش بهبود وضعیت تغذیه‌ای منجر به افزایش تولید و سوددهی خواهد شد (Rahnama و همکاران، ۲۰۱۳). طی سال‌های اخیر به‌دلیل هزینه بالا و مشکلات حاصل از داروها و آنتی‌بیوتیک‌ها مانند تغییرات زیان‌بار زیست‌محیطی، به وجود آوردن پاتوژن‌های مقاوم، مضر بودن برخی از این ترکیبات در فرآورده‌های آبی برای بشر و ... صنعت آبی‌پروری برای تولیدی پربازده و پایدارتر به‌سمت استفاده از مواد طبیعی هم‌چون گیاهان دارویی، پروبیوتیک‌ها و پریبیوتیک‌ها سوق داده شده است (Liu و همکاران، ۲۰۱۳).

پریبیوتیک‌های الیگوساکارید از دیواره سلولی مخمر مشتق شده است (Otaka, ۲۰۰۶) و اثرات زیادی از جمله بهبود رشد و ایمنی (Staykov و همکاران، ۲۰۰۷)، بهبود مورفولوژی روده، تعدیل فلور میکروبی روده (Dimitroglou و همکاران، ۲۰۱۰)، افزایش ایمنی و توانایی مقاومت در برابر استرس (Gu و همکاران، ۲۰۱۱) را در ماهی ایجاد می‌کند. پریبیوتیک گالاکتوالیگوساکارید گروهی از کربوهیدرات‌های زنجیره کوتاه غیرقابل هضم است که به‌طور طبیعی در شیر انسان یافت می‌شود و همچنین به‌طور تجاری برای استفاده به‌عنوان مکمل و در صنایع غذایی تولید می‌شود. این ماده در ارتباط با فلور روده به‌طور انتخابی عمل می‌کند که می‌تواند جمعیت‌های *Lactobacillus* و *Bifidobacterium*

نرخ هضم کم‌تری مشاهده شد. هم‌چنین بیان داشتند که نتایج این پژوهش در مقابله با ماهیان گوشت‌خواری مانند باس کانالی یا درام قرمز (*Sciaenops ocellatus*) قرار می‌گیرد که در آن پریبیوتیک افزایش ضرایب قابلیت هضم جیره بناشده بر اساس پودر ماهی و کنجاله سویا و تغییر فلور میکروبی دستگاه گوارش را باعث شدند (Raggi و Gatlin, ۲۰۱۲). نتایج دیگری مبنی بر عدم تأثیر پریبیوتیک مخمر لبنی (dairy-yeast prebiotic, GroBiotic-A) در ماهیان قرمز نوجوان توسط (Savolainen و Gatlin, ۲۰۰۹) بررسی شد و نتایج حاصل نشان داد که پریبیوتیک‌های لبنی مخمر بازده تغذیه در ماهی‌های قرمز یا مقاومت در برابر پاتوژن باکتریایی را بهبود نمی‌بخشد. با این وجود اطلاعات محدودی درباره اثرات پریبیوتیک GOS بر اشتهای بیان ژن گرلین و ایمنی سرم در ماهی قرمز به‌عنوان یک ماهی زینتی و هم‌چنین مدلی برای کپورماهیان پرورشی وجود دارد. هدف این پژوهش ارزیابی اثرات پریبیوتیک GOS بر برخی شاخص‌های رشد و بیان ژن درگیر در اشتهای رشد (گرلین) و برخی شاخص‌های ایمنی سرم در ماهی قرمز (*Carassius auratus gibelio*) بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در سالن پرورش ماهی شهید فضل‌ی برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و به مدت ۶ هفته انجام شد. بچه‌ماهی‌ها از کارگاه تکثیر ماهی قرمز در رشت تهیه شدند و پس از یک هفته سازگاری اولیه به تعداد ۱۵ عدد با میانگین وزنی $4/8 \pm 0/28$ گرم در مخزن‌های فایرگلاس ۵۰۰ لیتری ذخیره‌سازی شدند. هوادهی مخزن‌ها با استفاده

برای مثال لیزوزیم دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت را تخریب می‌کند و در فعالیت کمپلمان‌ها در تخریب باکتری‌های گرم منفی نیز دخالت دارد (Sahoo و Saurabh, ۲۰۰۸). برخی از این پروتئین‌ها مانند کمپلمان که مولکولی بزرگ متشکل از چندین پپتید است گزارش شده است که فعالیت فاگوسیتوز نیز دارد (Nonaka و همکاران, ۱۹۹۴). به‌طورکلی میزان این پروتئین‌ها به‌دنبال واکنش‌های اکسیناسیون، حمله عوامل پاتوژن، در بیماری‌های خود ایمنی و در پاسخ به محرک‌های ایمنی ترشح می‌شوند و آمادگی بدن در مقابل عوامل نامبرده را بالا می‌برند.

پژوهشگران زیادی از پریبیوتیک‌ها در جیره غذایی استفاده کرده‌اند و نتایجی مبنی بر افزایش ایمنی و رشد را گزارش کرده‌اند به‌طور مثال (Liu و همکاران, ۲۰۱۳) نشان دادند که استفاده از مانان‌الیگوساکارید در جیره به مقدار ۲۸۰-۲۴۰ میلی‌گرم در کیلوگرم می‌تواند ماهی کپور زرد آلوزینوژنتیک را در مقابل عفونت و حمله بیماری مقاوم کند و ایمنی ماهی را افزایش دهد و باعث کاهش مرگ‌ومیر شود. یا در پژوهشی دیگر مشخص شده است که GOS باعث افزایش کارایی رشد، مقاومت در مقابل استرس و تعدیل فلور میکروبی روده با افزایش باکتری‌های اسیدلاکتیک در ماهی کلمه (*Rutilus rutilus*) می‌شود (Hoseinifar و همکاران, ۲۰۱۳). هم‌چنین در پژوهشی بر ماهی قرمز با بررسی مواد دفعی در مدفوع خشک نشان دادند که استفاده از ۱ درصد از ۳ پریبیوتیک گالاکتوالیگوساکارید، مانان‌الیگوساکارید و فروکتوالیگوساکارید در جیره پایه بناشده بر پودر ماهی و پودر سویا در مقایسه با گروه شاهد هیچ تأثیری بر قابلیت هضم جیره توسط ماهی قرمز ندارد بلکه در گروه تغذیه‌شده با ۱ درصد مانان‌الیگوساکارید

برای اندازه‌گیری میزان پروتئین‌های آلبومین، گلوبولین، لیزوزیم، آلکالین فسفاتاز، آگلوتیناسیون و کمپلمان در سرم خون در پایان شش هفته با قطع ساقه دمی و با لوله مویین از ماهیان خون‌گرفته شد و با سانتریفیوژ با دور rpm ۵۰۰۰ سرم جداسازی شد و تا زمان اندازه‌گیری فاکتورها در دمای ۲۰- نگهداری شد. لیزوزیم با روش (Bayne و Demers, ۱۹۹۷) و فعالیت کمپلمان نیز طبق مطالعه (Ortuno و همکاران, ۲۰۰۱) اندازه‌گیری شد. همچنین میزان پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین و فعالیت آگلوتیناسیون با روش (علی‌شاهی و همکاران, 2011) و آلکالین فسفاتاز بر اساس روش (Bernet و همکاران, ۲۰۰۱) اندازه‌گیری شد و در نهایت داده‌های حاصل نرمال‌سازی شدند.

به‌منظور ارزیابی میزان بیان ژن گرلین از هر مخزن ۳ عدد ماهی در میان‌دوره (پس از ۳ هفته) و پایان دوره (پس از ۶ هفته) جهت برداشتن نمونه روده صید شد و تحت شرایط استریل از آن نمونه برداشته شد و بلافاصله در ازت مایع غوطه‌ور شده و پس از انجماد سریع نمونه‌ها به یخچال با دمای ۸۰- تا زمان استخراج RNA منتقل شدند. استخراج RNA با توجه به حساسیت بالایی که دارد به‌طور سریع و با وسایل استریل و با حفظ دمای نمونه‌ها در هر مرحله و با روش Awad و همکاران با استفاده از ماده هضم‌کننده Biozol انجام گرفت (Awad و همکاران, ۲۰۱۱). برای این کار نمونه‌های گرفته‌شده از هر تانک که مربوط به یک تیمار بودند با هم مخلوط شده و در هاون چینی در مجاورت ازت به‌صورت پودر درآمد و مقدار ۵۰ میلی‌گرم از آن در میکروتیوپ‌های از قبل استریل شده منتقل شد و مقدار ۱ میلی‌لیتر بایوزول به آن اضافه شد سپس به‌مدت ۱۵ ثانیه با دستگاه

از سنگ هوای متصل به پمپ هواده صورت گرفت. برای تهیه سطوح مختلف جیره حاوی گالاکتوالیگوساکارید، جیره پایه (غذای رو آبی تایلندی مخصوص ماهی قرمز با سایز ۳۰۰۱) با درصدهای ۰ (شاهد)، ۰/۵، ۱ و ۲ با گالاکتوالیگوساکارید مخلوط شد برای تهیه این جیره ابتدا غذا و پریبیوتیک با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم توزین شد و به نسبت وزن غذا برای سطوح مختلف، گالاکتوالیگوساکارید به‌صورت محلول در ژلاتین درآمد و با اسپری یکنواخت با غذا مخلوط شد. پس از خشک‌شدن غذا تا زمان مصرف در یخچال نگهداری شد. طرح این پژوهش کاملاً تصادفی بود و برای هر سطح (تیمار) ۳ تکرار در نظر گرفته شد. غذادهی روزانه در دو وعده و به مقدار ۴ درصد وزن بدن انجام شد. زیست‌سنجی ماهیان در شروع دوره و پایان دوره برای اندازه‌گیری پارامترهای رشد انجام شد. وزن بچه‌ماهیان با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم اندازه‌گیری شد. بر اساس داده‌های به‌دست آمده شاخص‌های ضریب تبدیل غذایی، نرخ رشد ویژه، درصد افزایش وزن بدن و ضریب کارایی غذا به‌صورت زیر ارزیابی شد (Javaherzade و همکاران, ۲۰۱۲):

- افزایش وزن بدن به گرم / مقدار غذای خورده شده به گرم = (FCR) ضریب تبدیل غذایی
- $100 \times (\text{دوره پرورش به روز} / (\text{وزن اولیه} - \text{وزن ثانویه})) = \text{Ln} (\text{SGR})$ نرخ رشد ویژه
- $100 \times (\text{میانگین وزن اولیه} / (\text{میانگین وزن اولیه} - \text{میانگین وزن ثانویه})) =$ درصد افزایش وزن
- $100 \times (\text{وزن غذای خشک خورده شده} / \text{افزایش وزن ماهی}) = \text{FE}$ درصد کارایی غذا

شد. پرایمرهای استفاده شده برای ژن گرلین
 F: TTCATGATGAGTGCTCCGTTCC
 R: GTCAGAATTCAAGTGGCGAATC
 بود که در مطالعات قبلی مورد استفاده قرار گرفته بود
 (Miura و همکاران، ۲۰۰۷). به منظور سنجش پرایمرهای
 مورد استفاده جهت انجام Real Time PCR ابتدا با
 PCR معمولی جفت پرایمرها مورد آزمایش قرار
 گرفتند که شرایط PCR شامل ۹۶ درجه سانتی‌گراد
 به مدت ۳ دقیقه برای واسرشته‌سازی اولیه، ۹۵ درجه
 به مدت ۳۰ ثانیه و برای ۴۰ چرخه حرارتی، دمای
 aneling پرایمر به مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت
 ۱ دقیقه برای بسط نهایی بود که در نهایت با انجام
 الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲ درصد درستی باندهای
 ایجاد شده مورد ارزیابی قرار گرفت. Real time PCR
 در تیوپ‌های مخصوص آن و در ۴ تکرار فنی برای
 هر نمونه صورت گرفت که محتویات هر تیوپ به
 مقدار ۲۰ میکرولیتر به صورت زیر بود:

- ۱۰ میکرولیتر بافر سایر گرین
- ۱ میکرولیتر پرایمر پیش‌رونده
- ۱ میکرولیتر پرایمر پس‌رونده
- ۲/۸ میکرولیتر آب
- ۰/۲ میکرولیتر آنزیم tag polymerase
- ۵ میکرولیتر cDNA رقیق شده

نتایج به دست آمده توسط دستگاه Real time PCR
 تحت عنوان Ct می‌باشد که نشان‌دهنده تعداد
 چرخه‌هایی است که سیگنال فلورسنت نسخه‌های ژنی
 را شناسایی می‌کند. با ترسیم منحنی استاندارد
 (Standard curve) با استفاده از Ct به دست آمده

ورترکس همگن شد و ۱۵ دقیقه در دمای اتاق
 نگهداری شد، سپس به نمونه‌ها مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر
 کلروفورم اضافه شد و مدت ۱۵ دقیقه بر روی یخ
 نگهداری شدند. در مرحله بعد نمونه‌ها با دستگاه
 سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سلسیوس و به مدت
 ۱۵ دقیقه با دوران ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند و
 فاز شفاف بالایی با سمپلر جدا شده و به
 میکروتیوپ‌های استریل منتقل شدند و هم‌حجم آن‌ها
 ایزوپروپانول سرد اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه با
 دوران ۱۲۰۰۰ rpm و در دمای ۴ درجه سانتریفیوژ
 شدند سپس فاز بالایی آن‌ها به آرامی خالی شد و
 مقدار ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد اضافه شد و جهت
 شستن و تثبیت پلت‌های RNA در کف تیوپ‌ها
 به مدت ۵ دقیقه با ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند
 سپس اتانول خالی شد و پلت‌های سفید RNA در ته
 تیوپ برای عاری شدن از اتانول زیر هود خشک
 شدند و مقدار ۰/۰۵ میلی‌لیتر آب عاری از نوکلئاز به
 آن‌ها اضافه شد سپس RNA استخراج شده تا هنگام
 سنتز cDNA به دمای ۸۰- منتقل شد. برای حصول
 اطمینان از کیفیت RNA با دستگاه نانودراپ غلظت و
 با الکتروفورز کیفیت آن سنجیده شد. همچنین برای
 حذف DNA از DNase استفاده شد به طوری که
 ابتدا ۴ میکرولیتر از RNA با ۱ میکرولیتر بافر
 DNase 10X مخلوط و سپس ۱ میکرولیتر
 به آن اضافه شد و مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق
 نگهداری شد سپس ۱ میکرولیتر EDTA به آن اضافه
 شد و در دمای ۶۵ درجه مدت ۱۰ دقیقه برای خشی
 کردن DNase قرار داده شد و سپس به روی یخ برای
 سنتز cDNA منتقل شد. سنتز با استفاده از مسترمیکس
 (mastermix) سنتز cDNA شرکت GENET BIO
 محصول کشور کره و طبق دستورالعمل آن انجام

شد هم‌چنین تجزیه و تحلیل داده‌ها و سطوح معنی‌داری با استفاده از نرم‌افزار Spss 16 و با آزمون آماری دانکن با درصد اطمینان ۹۵ و با آنالیز واریانس یک‌طرفه (One – Way ANOVA) مشخص شد.

نتایج

اثرات سطوح مختلف پریبیوتیک گالاکتوالیگوساکارید بر برخی شاخص‌های رشد ماهی قرمز به صورت زیر در جدول ۱ بود:

برای رقت‌های مختلف از نمونه‌های cDNA درصد کارایی برای پرایمر به دست آمد. Ct به دست آمده برای نمونه‌ها با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ برابر است با ΔCt ژن هدف منهای ΔCt کالیبراتور (تبدیل به بیان نسبی ژن‌های مورد نظر شد (Livak و Schmittgen, ۲۰۰۱). در نهایت عدد به دست آمده نرمال شده به عنوان نتیجه نهایی بیان ژن و هم‌چنین سطح فاکتورهای همورال ایمنی غیراختصاصی نرمال شده در سرم و شاخص‌های رشد با استفاده از نرم‌افزار Excel 2010 مرتب و شکل‌های آن رسم

جدول ۱- مقایسه میانگین (\pm انحراف معیار) برخی از شاخص‌های رشد ماهی قرمز تحت تأثیر پریبیوتیک گالاکتوالیگوساکارید

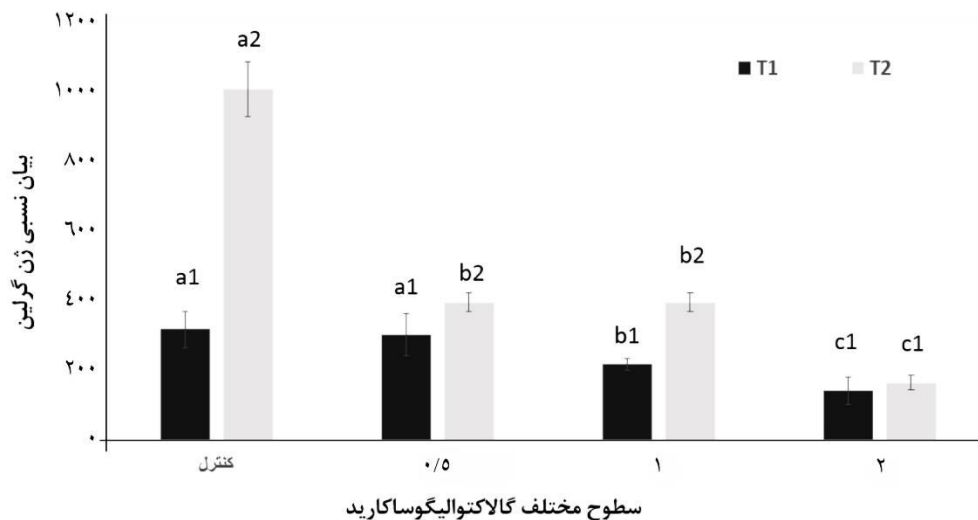
شاخص‌های رشد	شاهد	پریبیوتیک ۰/۵ درصد	پریبیوتیک ۱ درصد	پریبیوتیک ۲ درصد
ضریب تبدیل غذایی (FCR)	$2/75 \pm 0/12$	$3/14 \pm 0/13$	$3/25 \pm 0/63$	$3/13 \pm 0/44$
نرخ رشد ویژه (SGR)	$2/95 \pm 0/09$	$2/76 \pm 0/23$	$2/6 \pm 0/36$	$2/76 \pm 0/34$
درصد افزایش وزن بدن (BWG)	$73/67 \pm 3/8$	$63/02 \pm 3/11$	$62/48 \pm 13$	$65/16 \pm 11/65$
درصد کارایی غذا (FE)	$36/38 \pm 1/57$	$31/86 \pm 1/33$	$31/53 \pm 5/92$	$32/41 \pm 4/79$

* آزمون آماری فاکتورها هیچ اختلاف معنی‌داری را بین تیمارهای مختلف نشان نداد

شش هفته‌ای تغذیه با جیره حاوی گالاکتوالیگوساکارید در بیان آن اختلاف معناداری ایجاد نمود ($P < 0/05$). بیان ژن گرلین در هر دو زمان دارای یک الگوی کاهشی با افزایش درصد پریبیوتیک بود به طوری که گروه شاهد بالاترین سطح بیان ژن و گروه با دو درصد پریبیوتیک تغذیه شده کم‌ترین سطح بیان ژن را دارا بود که این روند در نمونه‌های شش هفته‌ای بیش‌تر مشهود بود و اختلاف زیادی بین شاهد با تیمارها وجود داشت (شکل ۱).

ماهیان اولیه تیمار بندی شده از لحاظ وزنی اختلاف معنی‌داری باهم نداشتند ($P > 0/05$) و در پایان دوره بررسی شاخص‌های رشد نشان داد که افزودن پریبیوتیک گالاکتوالیگوساکارید با سطوح ۰/۵ و ۲ درصد به جیره ماهیان قرمز در طول مدت دوره اختلاف معنی‌داری بین تیمارها با گروه شاهد و هم‌چنین با همدیگر ایجاد نکرد ($P > 0/05$).

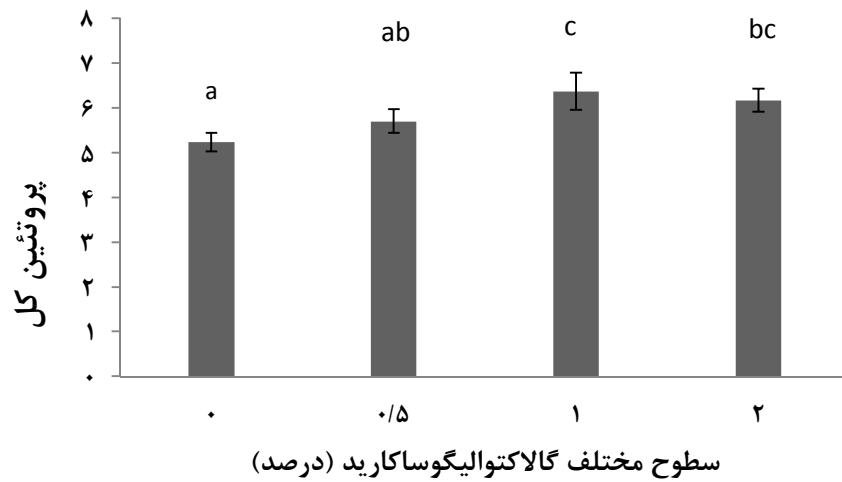
در این پژوهش بیان ژن گرلین ارزیابی شد و نتایج حاصل نشان داد که در هر دو مرحله سه هفته‌ای و



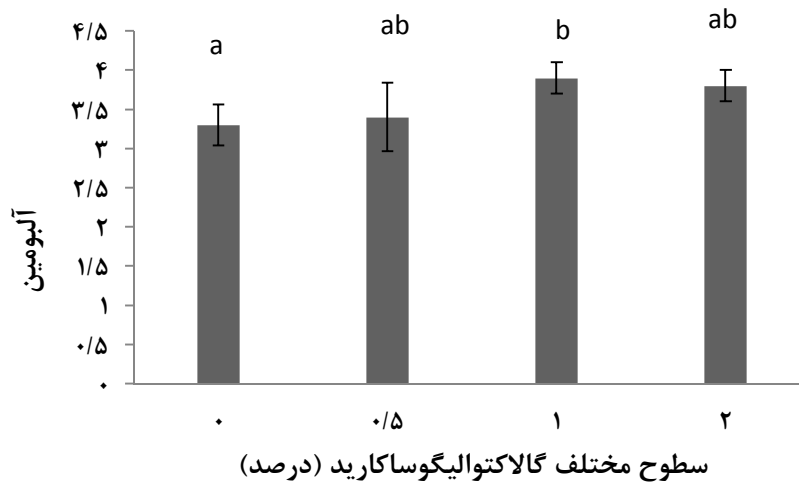
شکل ۱- سطوح بیان وزن گرلین در دو دوره سه هفته‌ای و شش هفته‌ای در ماهی قرمز تحت تأثیر سطوح مختلف پریبیوتیک گالاکتولایگوساکارید (معنی داری داده‌ها با استفاده از ANOVA و آزمون دانکن بررسی شد که در هر شکل حروف متفاوت نشانه معنی دار بودن در سطح ۰/۰۵ است)

شاهد اختلاف معنی داری پیدا کرده بود اما سطوح مختلف آن با هم اختلاف معنی دار نداشتند (شکل ۴). میزان آنزیم لیزوزیم و فعالیت کمپلمان در سرم گروه تغذیه شده با سطح ۱ و ۲ درصد بیشتر و دارای اختلاف معنی داری با دو گروه دیگر بودند اما سایر گروه‌ها باهم اختلاف معنی داری نداشتند (شکل‌های ۵ و ۷). اختلاف معنی دار در سطوح آنزیم آلکالین فسفاتاز بین گروه ۲ درصد با گروه شاهد و ۰/۵ درصد و همچنین گروه ۱ درصد با گروه شاهد بود و سطح آن با افزایش پریبیوتیک افزایش یافته بود (شکل ۶). مقدار آگلوتیناسیون در گروه تغذیه شده با ۲ درصد مکمل با گروه شاهد دارای اختلاف معنی دار بود (شکل ۸).

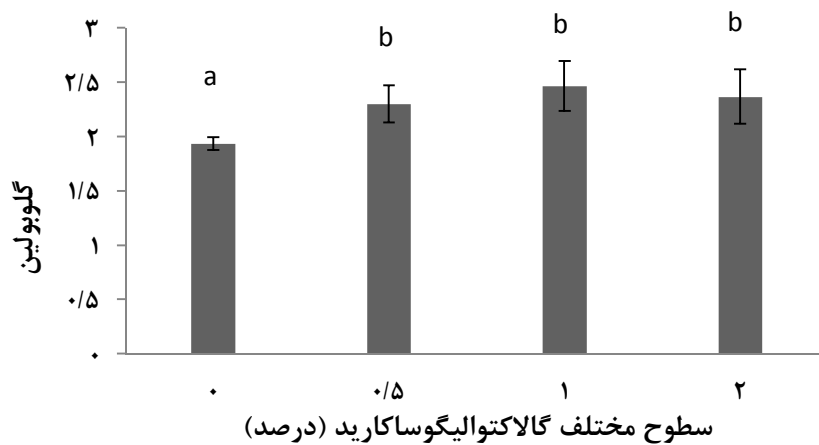
بررسی‌های اثرات گالاکتولایگوساکارید بر ایمنی همورال خون ماهی قرمز نشان داد که همه فاکتورهای اندازه‌گیری شده افزایش معنی داری را در طی تغذیه شش هفته‌ای با مکمل تجربه کرده‌اند ($P < 0.05$). اختلاف معنی دار در میزان پروتئین کل بین گروه تغذیه شده با سطح ۱ درصد با بیشترین پروتئین کل و گروه شاهد با کمترین پروتئین کل بود. همچنین گروه شاهد با تیمار ۲ درصد مکمل و گروه ۱ درصد با ۰/۵ درصد مکمل دارای اختلاف معنی دار بودند (شکل ۲). در سطوح آلبومین سرم تنها اختلاف معنی دار بین گروه با یک درصد مکمل و گروه شاهد بود و سایر گروه‌ها باهم اختلاف معنی داری نداشتند (شکل ۳). میزان گلوبولین سرم با اضافه کردن مکمل در جیره نسبت به



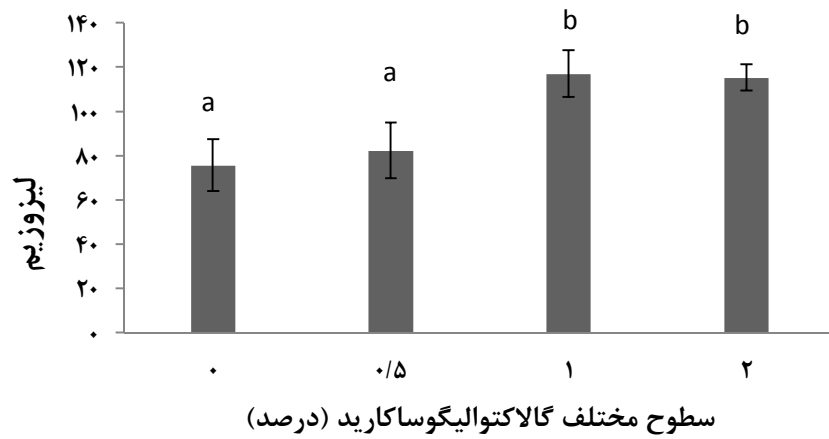
شکل ۲- سطح پروتئین کل در سرم ماهی قرمز تحت تیمار شش هفته‌ای سطوح مختلف پریبیوتیک گالاکتوالیگوساکارید



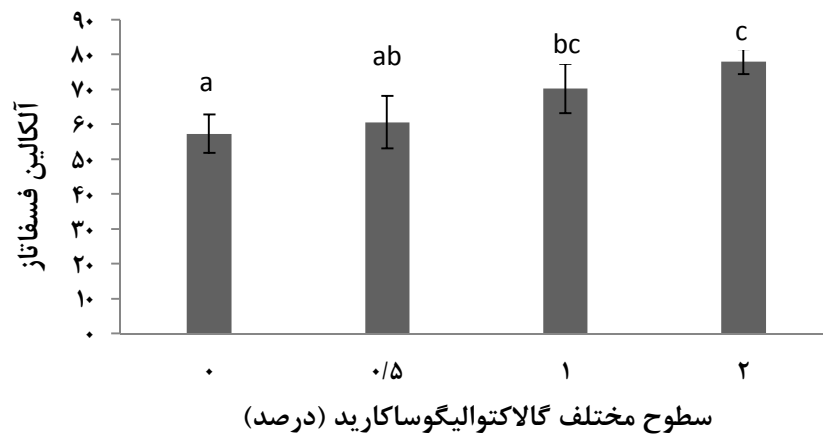
شکل ۳- سطح آلبومین در سرم ماهی قرمز تحت تیمار شش هفته‌ای سطوح مختلف پریبیوتیک گالاکتوالیگوساکارید



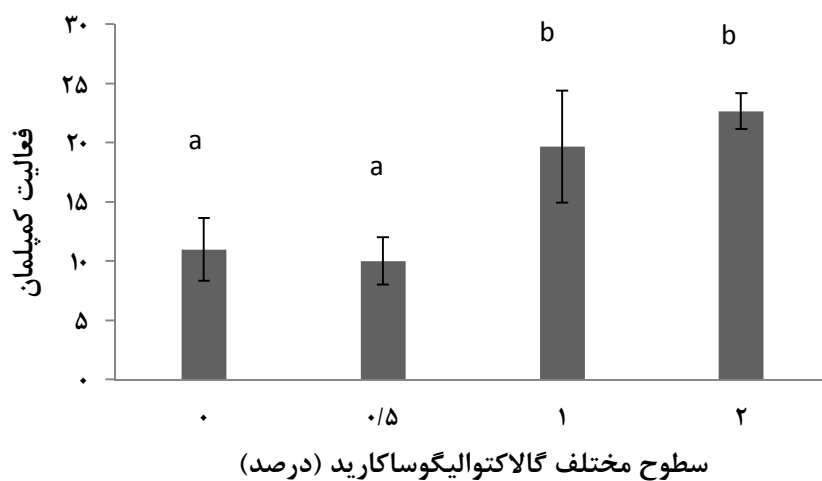
شکل ۴- سطح گلوبولین در سرم ماهی قرمز تحت تیمار شش هفته‌ای سطوح مختلف پریبیوتیک گالاکتوالیگوساکارید



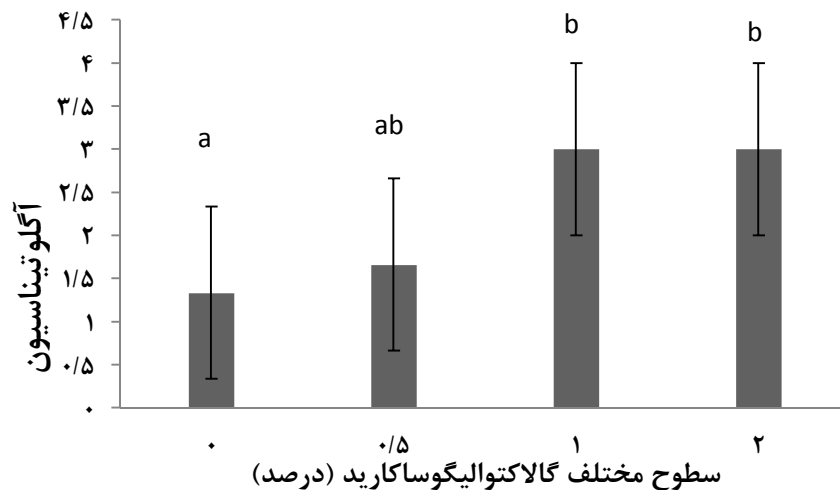
شکل ۵- سطح لیزوزیم در سرم ماهی قرمز تحت تیمار شش هفته‌ای سطوح مختلف پریبیوتیک گالاکتوالیگوساکارید



شکل ۶- سطح آنزیم آلکالین فسفاتاز در سرم ماهی قرمز تحت تیمار شش هفته‌ای سطوح مختلف پریبیوتیک گالاکتوالیگوساکارید



شکل ۷- میزان فعالیت کمپلمان در سرم ماهی قرمز تحت تیمار شش هفته‌ای سطوح مختلف پریبیوتیک گالاکتوالیگوساکارید



شکل ۸- میزان آگلوتیناسیون در سرم ماهی قرمز تحت تیمار شش هفته‌ای سطوح مختلف پریبیوتیک گالاکتوالیگوساکارید

پارامترهای مرتبط (سطوح بیان mRNA پیش‌ساز گلوکاگن روده‌ای و پپتید شبه گلوکاگن در پلاسما) و کاهش گسترش مقدار چربی و التهاب‌های روده‌ای با درجه پایین می‌شود (Everard و همکاران، ۲۰۱۱). متابولیسم چربی نیز یکی دیگر از اثرات پریبیوتیک‌های الیگوساکارید است (Macfarlane و همکاران، ۲۰۰۸) که می‌تواند باعث سوختن چربی‌ها در آبزیان چاق و پرچرب باشد. هم‌چنین در مطالعات متعددی به اثرات پریبیوتیک‌ها بر کاهش اشتها به‌خصوص در افراد دیابتی اشاره شده است (Parnell و Reimer، ۲۰۰۹). برخی از پارامترهای هماتولوژی به‌عنوان فاکتورهای ایمنی اولیه در ماهی کپور معمولی تغذیه‌شده با پریبیوتیک ایمونوژن توسط (Ebrahimi و همکاران، ۲۰۱۲) بررسی شد. پس از ۸ هفته تغذیه کپورماهیان با پریبیوتیک ایمونوژن سطح آلبومین، گلوبولین و پروتئین کل سرم در گروه‌های تغذیه‌شده با سطوح ۱/۵ و ۲/۵ گرم در کیلوگرم پریبیوتیک تجاری ایمونوژن در بالاترین سطح خود بوده است و باعث مقاومت ماهیان در مقابله با باکتری *Aeromonas hydrophila* شده بود.

بحث

در صنعت آبی‌پروری به‌دلیل افزایش تولید و تراکم، از آنتی‌بیوتیک‌ها و داروهای مختلفی برای افزایش رشد و بازدهی و مقاومت در برابر بیماری استفاده می‌شود (Hoseinifar و همکاران، ۲۰۱۱a). این در حالی است که به دلایل زیست‌محیطی و انسانی طی دهه‌های اخیر برای رسیدن به تولید بالا و افزایش ایمنی و جلوگیری از اثرات زیان‌بار، استفاده از مواد ذکرشده با قوانین ممنوعیت و محدودیت روبرو شده و استفاده از مواد طبیعی متداول شد (Liu و همکاران، ۲۰۱۳). از این میان پریبیوتیک‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند چرا که پژوهشگران زیادی آن‌ها را شناسایی کرده و در پژوهش‌های خودشان استفاده نموده‌اند و نتایجی مبنی بر تغییر و افزایش فاکتورهای ایمنی (Hoseinifar و همکاران، ۲۰۱۱b) و افزایش رشد (Hoseinifar و همکاران، ۲۰۱۱a) گزارش نموده‌اند. از طرفی در موش‌های آزمایشگاهی در مقالات پزشکی بررسی واکنش میکروبیوتای روده و متابولیسم گلوکز و چربی تحت‌تأثیر پریبیوتیک نشان داد که پریبیوتیک تعادل گلوکز را بهبود می‌بخشد و باعث افزایش تعداد L-cell در دستگاه گوارش و

نتایج حاصل از این پژوهش اختلاف معنی داری در هیچ کدام از فاکتورهای رشد ذکر شده نشان نداد اگرچه ارقام مربوط به فاکتورهای رشد در گروه شاهد بهتر از سایر گروه‌ها بود ($P > 0/05$). دلیل این امر احتمالاً به ماهی مورد نظر و شرایط آزمایش برمی‌گردد. در این راستا پژوهش (Hoseinifar و همکاران، ۲۰۱۴) بر مکمل غذایی FOS اثرات قابل توجهی بر عملکرد رشد و پارامترهای خونی کپور معمولی نداشت، اما به طور قابل توجهی مقاومت به تنش افزایش یافته بود.

پیتید گرلین نقش مؤثری در تحریک برای گرفتن غذا، ایجاد اشتها و تحریک ترشح هورمون رشد توسط غده هیپوفیز دارد که در بخش‌هایی از بدن مانند مغز، روده و معده ترشح می‌شود اما عمده فعالیت آن در دستگاه گوارش است که در ماهی قرمز به دلیل نداشتن معده مهم‌ترین جایگاه بیان ژن گرلین در روده می‌باشد (Unniappan و همکاران، ۲۰۰۲). نتایج real time PCR رابطه عکسی را بین بیان ژن گرلین در بافت روده و تغذیه با مکمل گالاکتوالیگوساکارید نشان داد که با افزایش میزان پریبیوتیک در جیره میزان بیان ژن گرلین کاهش یافت. نتایج این مطالعه تنها گزارش در مورد بیان ژن گرلین به عنوان شاخص رشد و اشتها در مقابل ایمنی‌زایی تحت تأثیر پریبیوتیک GOS در ماهی قرمز است. بیان ژن گرلین در هر دو بازه سه و شش هفته‌ای معنی دار شد به طوری که در کوتاه‌مدت اختلاف بین تیمارها به صورت تقریباً خطی با شیب ملایم بوده در حالی که در طولانی‌مدت گروه شاهد اختلاف بسیار زیادی با سایر گروه‌ها داشته و میزان بیان در آن خیلی بالا بود که در تیمارها با افزایش سطح GOS بیان ژن کنترل شده بود. ژن گرلین هنگامی در دستگاه گوارش

افزایش می‌یابد که ماهی گرسنه شود که با غذا خوردن دوباره بلافاصله به طور معنی دار کاهش می‌یابد (Amole و Unniappan، ۲۰۰۹) بنابراین و نتایج حاصل از این پژوهش افزودن گالاکتوالیگوساکارید هم‌تراز با سیری و کاهش گرلین است که هر چند باعث بهبود استفاده بهینه از غذا به واسطه پریبیوتیک‌ها می‌شود، میزان غذاگیری را کاهش می‌دهد که در برخی مطالعات انسانی نیز به ایجاد سیری و کاهش وزن و در نتیجه لاغری تحت تأثیر پریبیوتیک‌ها اشاره شده است (Brownawell و همکاران، ۲۰۱۲). کاهش گرلین تولیدشده توسط دستگاه گوارش ماهی تحت تأثیر GOS به ترکیب جمعیتی باکتری‌های هم‌زیست روده ماهی برمی‌گردد که باکتری‌های پریبیوتیک در تماس مستقیم با سلول‌های روده‌اند و می‌توانند فعالیت آن‌ها را با تأثیر بر رسپتورهای سطح آن‌ها به طور مستقیم یا از طریق تولید موادی مؤثر بر این رسپتورها تحت تأثیر قرار دهند، همچنین تخمیر پریبیوتیک و ترکیبات حاصل می‌توانند از این طریق اعمال اثر کنند. در مطالعاتی توسط (Parracho و همکاران، ۲۰۰۷) و (Hamilton-Miller، ۲۰۰۴) نشان داده شده است که پریبیوتیک با مصرف پریبیوتیک و توسط توانایی خود در حفظ سلامتی و یکپارچگی دیواره روده باعث افزایش جذب مواد غذایی می‌شود و فلور میکروبی سالم در روده (پریبیوتیک) در دسترس بودن مواد مغذی را افزایش می‌دهد که این در دسترس بودن از ابتدای روده تا پایان تخمیر پریبیوتیک توسط فلور میکروبی در قسمت‌های انتهایی دستگاه گوارش ادامه می‌یابد و در دسترس بودن مواد مغذی و آزاد شدن آن به خون به طور مستقیم با سرکوب اشتها همراه است. با این حال مطالعات بیش‌تری برای ارزیابی توانایی‌های

مختلف مکانیسم دیگری از پاسخ ایمنی ذاتی است که دارای فعالیت بالا در ماهی است (Sunyer و Tort، ۱۹۹۵). سطح آکالین فسفاتاز در انسان در بیماری پرکاری استخوان یا نقص کبد اندازه‌گیری می‌شود اما سطوح بالای آکالین فسفاتاز و جلوگیری از کاهش آن در سرم در خلال چالش ماهی کپور هندی تغذیه‌شده با محرک ایمنی به‌عنوان شاخص سلامتی و ایمنی توسط (Rao و همکاران، ۲۰۰۶) است. افزایش پروتئین تام سرم، آلبومین و گلوبولین شاخص خوبی از وضعیت سلامت ماهی می‌باشد (Siwicki و همکاران، ۱۹۹۴). همان‌طور که در شکل‌ها نشان داده شده است میزان لیزوزیم، کمپلمان، آگلوتیناسیون، آکالین فسفاتاز، پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین در ماهیان تغذیه‌شده با ۱ و ۲ درصد گالاکتوالیگوساکارید به‌طور معنی‌داری بیش‌ترند. نتایج نشان می‌دهد که گالاکتوالیگوساکارید ماهی‌ها را در وضعیت سلامت خوبی قرار می‌دهد. نتایج مشابه با برخی از محرک‌های ایمنی دیگر نیز یافته شده است. الیگودئوکسی‌نوکلئوتیدهای مصنوعی و مخمر گلوکان فعالیت لیزوزیم سرم در کپور معمولی و ماهی آزاد اقیانوس اطلس را به‌ترتیب افزایش داده‌اند (Sakai و Tassakka، ۲۰۰۲؛ Engstad و همکاران، ۱۹۹۲). در راستای نتایج حاصل از مطالعه حاضر، ابراهیمی و همکاران گزارش دادند که ایمونوژن سبب بهبود پارامترهای ایمنی ذاتی کپور معمولی می‌شود (ابراهیمی و همکاران، ۲۰۱۲). همچنین در مطالعات قبلی اثرات مثبت مانان‌الیگوساکارید در رژیم غذایی بر پارامترهای ایمنی ذاتی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (Dimitroglou و همکاران، ۲۰۰۹) و (Staykov و همکاران، ۲۰۰۷)، باس‌دریایی اروپایی *Dicentrarchus labrax* (Torrecillas و همکاران، ۲۰۰۷) تأیید قرار

بالقوه پریبیوتیک و باکتری‌های پروبیوتیک مانند لاکتوباسیل‌ها در طولانی‌تر شدن سیری مورد نیاز است (Forssten و همکاران، ۲۰۱۳).

طی مطالعات متعدد ثبت‌شده است که القای پریبیوتیک خوراکی پاسخ‌های ایمنی را تحریک می‌کند و وضعیت رشد را بهبود می‌بخشد (Daniels و Hoseinifar، ۲۰۱۴؛ Hoseinifar و همکاران، ۲۰۱۴). سیستم ایمنی ذاتی در ماهی نقش کلیدی در حفظ ماهی در برابر بیماری‌های عفونی بازی می‌کند (Trichet، ۲۰۱۰). محرک‌های ایمنی می‌توانند سنتز پروتئین را برای تولید بیش‌تر مولکول‌های درگیر در ایمنی ذاتی مانند کمپلمان‌ها و لیزوزیم افزایش دهند (Rao و همکاران، ۲۰۰۶). در ماهی با واکسیناسیون یا به‌دنبال بیماری توسط عوامل پاتوژن و همچنین در بیماری‌های خودایمنی سطح پروتئین‌های خون جهت آمادگی بدن در مقابل بیماری و انجام فعالیت‌هایی مانند فاگوسیتوز، لیز کردن دیواره سلولی و سلول‌های عوامل پاتوژن، به دام انداختن عوامل بیگانه، رفع عفونت و غیره افزایش می‌یابد (Magnadóttir، ۲۰۰۶). برخی پارامترهای ایمنی همورال در مطالعه حاضر به‌عنوان شاخص وضعیت سلامت و ایمنی ذاتی ماهی قرمز تغذیه‌شده با گالاکتوالیگوساکارید اندازه‌گیری شدند. لیزوزیم یک آنزیم لیتیک است که باندهای گلیکوزیدی را هیدرولیز می‌کند و سطح آن یا میزان فعالیتش معمولاً به‌عنوان یک پارامتر مهم ایمنی ذاتی اندازه‌گیری شده است (Saurabh و Sahoo، ۲۰۰۸). فعالیت کمپلمان یکی از مهم‌ترین اجزای سیستم ایمنی ذاتی در ماهی است و در لیز و به دام انداختن سلول‌های خارجی و موجودات زنده نقش کلیدی ایفا می‌کند (Lambris و Holland، ۲۰۰۲). تیترا آنتی‌بادی آگلوتیناسیون علیه باکتری‌های

روشن نیست اما بیان شده است که مانان‌الیگوساکارید ترشح لکتین اتصال مانوز (MBL) توسط کبد را تحریک می‌کند که به کپسول باکتری متصل شده و کمپلمان را راه‌اندازی می‌کند (Moran و همکاران، ۲۰۰۴).

با وجود گزارش‌های مبنی بر افزایش ایمنی و رشد حاصل از پریبیوتیک‌ها در این پژوهش مقدار بیان ژن گرلین که محرک رشد و اشتهاست تحت تأثیر GOS کاهش یافته است. همچنین فاکتورهای رشد بین گروه‌های تیمار با شاهد اختلافی نداشتند اما فاکتورهای ایمنی هم‌وزن افزایش یافتند. با این حال پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی تغییرات سایر هورمون‌ها و ژن‌های دخیل در اشتها مانند لپتین در کبد، اورکسین در مغز، گالانین و NPY را که معمولاً در گرسنگی افزایش می‌یابند (Farrell, ۲۰۱۱) به همراه ژن‌های دخیل در ایمنی مانند اینترلوکین‌ها و فاکتور نکروزکننده تومور تحت تأثیر پریبیوتیک به‌طور دقیق بررسی شوند تا ارتباط آن‌ها به‌خوبی مشخص شود.

گرفته است. همچنین در راستای افزایش فاکتورهای پروتئین کل، لیزوزیم، آلبومین، گلوبولین و آلكالین فسفاتاز در سرم تحت تأثیر محرک‌های ایمنی اثرات گیاه *Achyranthes aspera* توسط (Rao و همکاران، ۲۰۰۶) بررسی شده است و افزایش این فاکتورها در گروه تیمار شده با محرک گزارش شده است. در بررسی مانان‌الیگوساکارید بر ماهی قرمز نیز افزایش مقاومت در برابر عفونت ناشی از *Aeromonas hydrophila* با افزایش سطح گلوبولین، آلكالین فسفاتاز و لیزوزیم سرم و مقابله با بیماری نشان داده شده است که مکمل‌های غذایی با غلظت ۲۴۰ تا ۴۸۰ میلی‌گرم در کیلوگرم سبب مقاومت ماهی در مقایسه با گروه شاهد شده‌اند (Liu و همکاران، ۲۰۱۳). در مقابل نتایج این پژوهش‌ها و داده‌های پژوهش حاضر، کاهش فعالیت لیزوزیم ماهی آزاد اقیانوس اطلس تغذیه‌شده با رژیم غذایی حاوی گالاتئال‌الیگوساکارید با غلظت ۱۰ گرم در کیلوگرم غذا به مدت چهار ماه مشاهده شد (Gridale-Helland و همکاران، ۲۰۰۸). اگرچه مکانیسم‌های عمل گالاتئال‌الیگوساکارید در سیستم ایمنی بدن ماهی

منابع

علیشاهی، م.، ۲۰۱۱. تأثیر تجویز خوراکی عصاره خارمریم (*Silybum marianum*) بر پاسخ‌های ایمنی ماهی کپور معمولی. مجله تحقیقات دامپزشکی ۲۶۳-۲۵۵: (۳) ۶۶ (Journal of Veterinary Research).

Amole, N., and Unniappan, S., 2009. Fasting induces preproghrelin mRNA expression in the brain and gut of zebrafish, *Danio rerio*. *General and Comparative Endocrinology*, 161 (1), 133-137.

Awad, E., Mitchell, W.J., and Austin, B., 2011. Effect of dietary supplements on cytokine gene expression in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.* 34 (8), 629-634.

Bernet, D., Schmidt, H., Wahli, T., and Burkhardt-Holm, P., 2001. Effluent from a sewage treatment works causes changes in serum chemistry of brown trout (*Salmo trutta* L.). *Ecotoxicology and environmental safety*, 48 (2), 140-147.

Brownawell, A.M., et al., 2012. Prebiotics and the health benefits of fiber: current regulatory status, future research and goals. *J. Nutr.* 142 (5), 962-974.

Daniels, C., and Hoseinifar, S.H., 2014. Prebiotic applications in shellfish. *Aquaculture nutrition: gut health, probiotics and prebiotics*. pp. 401-418.

- Demers, N.E., and Bayne, C.J., 1997. The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. *Developmental & Comparative Immunology*, 21 (4), 363-373.
- Dimitroglou, A., et al., 2009. Dietary mannan oligosaccharide supplementation modulates intestinal microbial ecology and improves gut morphology of rainbow trout (Walbaum), *J. Animal Sci.* 87 (10), 3226-3234.
- Dimitroglou, A., et al., 2010. Effects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed utilisation, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 300 (1), 182-188.
- Ebrahimi, G., et al., 2012. Effects of a prebiotic, Immunogen®, on feed utilization, body composition, immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* infection in the common carp *Cyprinus carpio* (Linnaeus) fingerlings. *J. Anim. physiol. Anim. Nutr.* 96 (4), 591-599.
- Engstad, R.E., Robertsen, B., and Frivold, E., 1992. Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. *Fish & Shellfish Immunology*, 2 (4), 287-297.
- Everard, A., et al., 2011. Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice. *diabetes*, 60 (11), 2775-2786.
- Farrell, A.P., 2011. *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*. Elsevier Science.
- Forssten, S.D., et al., 2013. Changes in satiety hormone concentrations and feed intake in rats in response to lactic acid bacteria. *Appetite*, 71, 16-21.
- Gopalakrishnan, A., et al., 2012. Supplementation with galacto-oligosaccharides increases the percentage of NK cells and reduces colitis severity in Smad3-deficient mice. *J. Nutr.* 142 (7), 1336-1342.
- Grisdale-Helland, B., Helland, S.J., and Gatlin Iii, D.M., 2008. The effects of dietary supplementation with mannanoligosaccharide, fructooligosaccharide or galactooligosaccharide on the growth and feed utilization of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 283 (1-4), 163-167.
- Gu, M., et al., 2011. Effects of dietary β -glucan, mannan oligosaccharide and their combinations on growth performance, immunity and resistance against *Vibrio splendidus* of sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Fish & shellfish immunology*, 31 (2), 303-309.
- Hamilton-Miller, J., 2004. Probiotics and prebiotics in the elderly. *Postgraduate Med. J.* 80 (946), 447-451.
- Hasan Nataj Niazi, E., Imanpoor, M.R., Zad Majid, V., and Taghizade, V., 2013. The effect of density on the growth and survival in gold fish (*Carassus auratus*). *J. Rep. Sci. Aquacul.* 2: 33-44.
- Holland, M.C.H., and Lambris, J.D., 2002. The complement system in teleosts. *Fish & Shellfish Immunology*, 12 (5), 399-420.
- Hoseinifar, S.H., Khalili, M., Khoshbavar Rostami, H., and Esteban, M.Á., 2013. Dietary galactooligosaccharide affects intestinal microbiota, stress resistance and performance of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. *Fish & Shellfish Immunology*, 35 (5), 1416-1420.
- Hoseinifar, S.H., Mirvaghefi, A., and Merrifield, D.L., 2011a. The effects of dietary inactive brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* on the growth, physiological responses and gut microbiota of juvenile beluga (*Huso huso*). *Aquaculture*, 318 (1), 90-94.
- Hoseinifar, S.H., et al., 2011b. The study of some haematological and serum biochemical parameters of juvenile beluga (*Huso huso*) fed oligofructose. *Fish physiology and biochemistry*, 37 (1), 91-96.
- Hoseinifar, S.H., Soleimani, N., and Ringø, E., 2014. Effects of dietary fructo-oligosaccharide supplementation on the growth performance, haemato-immunological parameters, gut microbiota and stress resistance of common carp (*Cyprinus carpio*) fry. *British J. Nutr.* 112 (8), 1296-1302.
- Javaherzade, F., Alishahi, M., Chelemaal Dezfulezhad, M., and Javaheri, M., 2012. The effect of different levels of vitamin C on Bunnei fish (*Barbus sharpeyi*) growth. *J. New Res. Vet.* 3 (10), 17-26.

- Kojima, M., et al., 1999. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 402 (6762), 656-660.
- Korbonits, M., Goldstone, A.P., Gueorguiev, M., and Grossman, A.B., 2004. Ghrelin-a hormone with multiple functions. *Frontiers in neuroendocrinology*, 25 (1), 27-68.
- Liu, B., et al., 2013. Effects of mannan oligosaccharide on the physiological responses, HSP70 gene expression and disease resistance of Allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) under *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish & shellfish immunology*, 34 (6), 1395-1403.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 – $\Delta\Delta CT$ method. *methods*, 25 (4), 402-408.
- Macfarlane, G., Steed, H., and Macfarlane, S., 2008. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *J. Appl. Microbiol.* 104 (2), 305-344.
- Magnadóttir, B., 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish & shellfish immunology*, 20 (2), 137-151.
- Miura, T., et al., 2007. Regulation of food intake in the goldfish by interaction between ghrelin and orexin. *Peptides*, 28 (6), 1207-1213.
- Moran, C.A., Lyons, T., and Jacques, K., 2004. Functional components of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*: applications for yeast glucan and mannan, *Nutritional biotechnology in the feed and food industries. Proceedings of Alltech's 20th Annual Symposium: re-imagining the feed industry*, Lexington, Kentucky, USA, 23-26 May 2004. Alltech UK, pp. 283-296.
- Nonaka, M., Takahashi, M., and Sasaki, M., 1994. Molecular cloning of a lamprey homologue of the mammalian MHC class III gene, complement factor B. *J. Immunol.* 152 (5), 2263-2269.
- Ortuno, J., Esteban, M., and Meseguer, J., 2001. Effects of short-term crowding stress on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response. *Fish & Shellfish Immunology*, 11 (2), 187-197.
- Otaka, K., 2006. Functional oligosaccharide and its new aspect as immune modulation. *J. Biol. Macromol.* 6 (1), 3-9.
- Palaksha, K., Shin, G.W., Kim, Y.R., and Jung, T.S., 2008. Evaluation of non-specific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish & shellfish immunology*, 24 (4), 479-488.
- Parnell, J.A., and Reimer, R.A., 2009. Weight loss during oligofructose supplementation is associated with decreased ghrelin and increased peptide YY in overweight and obese adults. *Amer. J. Clinic. Nutr.* 89 (6), 1751-1759.
- Parracho, H., McCartney, A.L., and Gibson, G.R., 2007. Probiotics and prebiotics in infant nutrition. *Proceedings of the Nutrition Society*, 66 (3), 405-411.
- Raggi, T., and Gatlin, D.M., 2012. Prebiotics Have Limited Effects on Nutrient Digestibility of a Diet Based on Fish Meal and Soybean Meal in Goldfish. *North Amer. J. Aquacul.* 74 (3), 400-407.
- Rahnama, B., Akrami, R., and Chit Saz, H., 2013. Effect of inulin prebiotic on growth performance, survival, body composition and resistance to stress in gold fish (*Carassius auratus gibelio*). *J. Rep. Sci. Aquacul.* 2, 55-70.
- Rao, Y.V., Das, B., Jyotirmayee, P., and Chakrabarti, R., 2006. Effect of *Achyranthes aspera* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*, 20 (3), 263-273.
- Saurabh, S., and Sahoo, P., 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research*, 39 (3), 223-239.
- Savolainen, L.C., and Gatlin, D.M., 2009. Evaluation of Dairy–Yeast Prebiotic Supplementation in the Diet of Juvenile Goldfish in the Presence or Absence of Phytoplankton and Zooplankton. *J. Aqua. Anim. Health.* 21 (3), 156-163.
- Siwicki, A.K., Anderson, D.P., and Rumsey, G.L., 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Veterinary immunology and immunopathology*, 41 (1), 125-139.

- Staykov, Y., Spring, P., Denev, S., and Sweetman, J., 2007. Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture International*, 15 (2), 153-161.
- Sunyer, J.O., and Tort, L., 1995. Natural hemolytic and bactericidal activities of sea bream *Sparus aurata* serum are effected by the alternative complement pathway. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 45 (3), 333-345.
- Tassakka, A.C.M.A., and Sakai, M., 2002. CpG oligodeoxynucleotides enhance the non-specific immune responses on carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, 209 (1), 1-10.
- Torrecillas, S., et al., 2007. Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. *Fish & Shellfish Immunology*, 23 (5), 969-981.
- Trichet, V.V., 2010. Nutrition and immunity: an update. *Aquaculture Research*, 41 (3), 356-372.
- Unniappan, S., et al., 2002. Goldfish ghrelin: molecular characterization of the complementary deoxyribonucleic acid, partial gene structure and evidence for its stimulatory role in food intake. *Endocrinology*, 143 (10), 4143-4146.
- Vesogh, G.H., and Mostageer, B., 1995. *Freshwater fish*. Press Tehran University of Iran, 317p.

The effects of dietary administration of Galactooligosaccharide on appetite-related (Ghrelin) gene expression and some serum immune parameters and growth factor in gold fish (*Carassius auratus gibelio*)

***Sh. Farvardin¹, H. Kolangi Miandareh¹, A. Shabani¹, S.H. Hoseinifar¹
and S.S. Ramezanpour²**

¹Dept. of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, ²Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Abstract

The aim of this study was to investigate the effects of Galactooligosaccharide Prebiotics (GOS) on some growth factors (feed conversion ratio, specific growth rate, percent of body weight gain and feed efficiency coefficient), the expression of ghrelin gene and several bloody factor related to immune serum (total protein, albumin, globulin, lysozyme, alkaline phosphatase, agglutination and complement activation) in goldfish. Trial was performed randomly on three levels: 0.5, 1 and 2% of the prebiotic and the control group. 15 fish with an average weight of 4.88 ± 0.28 gr per 500-liter fiberglass tank were storage and with the same condition for 6 weeks fed with different levels of GOS. The fish were biometry at the end of the period. The intestinal tissue samples to investigate the ghrelin gene expression after three and six weeks. None of the factors related to growth did not show significant differences among treatments ($P > 0.05$). Also results of serum immune tests showed that the total protein, albumin, globulin, lysozyme, alkaline phosphatase, agglutination and complement activation under the influence of Galactooligosaccharide had significantly different between treatment and control groups ($P < 0.05$) and the rate of the control group was lowest in all tests. RNA was extracted from intestinal tissue and cDNA was synthesized. By using Real Time PCR and with usage specific primers, ghrelin gene expression was examined and the results showed significant differences in both time sampling in the ghrelin gene expression ($P < 0.05$). Increasing of GOS levels decreased relative ghrelin gene expression. This study showed that GOS with Level 1 and 2 percent in six weeks increased safety due to an increase in total protein, albumin, globulin, lysozyme, alkaline phosphatase, agglutination and complement activation in fish, but despite various reports of growth performance improvement, adding GOS to the diet would not make a difference in the growth and decreased gene expression levels of ghrelin, which triggers appetite and growth.

Keywords: Appetite; Galactooligosaccharide; Ghrelin gene; Gold fish; Growth; Immune response; Prebiotic

* Corresponding author; shoailiberty_sna@yahoo.com