فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۳۹، جلد ۱۰، شماره ۴، پائیز۹۶، صفحه ۵۷ تا۶۸

بررسی اثرات به کارگیری سطوح مختلف گالاکتو اولیگوساکارید بر سیستم دفاع آنتی اکسیدانی در ماهی زبرا(*Danio rerio*)

سمیرا یوسفی[۱]، سید حسین حسینی‌فر[۱]، عبدالمجید حاجی‌مرادلو[۱]، حامد پاک نژاد[۱]

۱- گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران. hoseinifar@gau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۶/۶/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۶/۸/۱

چکیده

زمینه و هدف: گالاکتو اولیگوساکارید(GOS)، پریبیوتیکی است که از واکنش آنزیمی لاکتوز حاصل شده و عمدتاً از مولکول‌های گلوکز و گالاکتوز تشکیل شده است.هدف از این پژوهش، بررسی اثرات سطوح مختلف گالاکتوالیگوساکارید جیره، بر سیستم دفاع آنتی اکسیدانی در ماهی زبرا(*Danio rerio*) به عنوان مدل آزمایشگاهی می باشد.

روش کار: تعداد ۴۲۰ قطعه ماهی ۰/۱±۴۵ میلی‌گرم به طور کاملاً تصادفی در چهار تیمار با سه تکرار در آکواریوم‌های ۶۰ لیتری توزیع و با چهار جیره آزمایشی حاوی صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ درصد پریبیوتیک به مدت ۸ هفته تغذیه شدند. در پایان دوره آزمایش فعالیت آنتی‌اکسیدان کل ماهی‌ها و نیز بیان ژن‌های مرتبط با دفاع آنتی اکسیدانی کاتالاز(CAT) و سوپراکسید دیسموتاز(SOD) بررسی گردید.

یافته ها: نتایج به دست آمده نشان داد که استفاده از سطوح مختلف گالاکتو اولیگوساکارید اثر معنی‌داری بر فعالیت آنتی-اکسیدانی کل نداشت($P>0/05$). هم چنین بررسی بیان ژن‌های مورد نظر نیز نشان دهنده کاهش سطح بیان ژن CAT در گروه‌های تغذیه شده با سطوح ۰/۵ و ۲ درصد نسبت به گروه شاهد بود($P<0/05$). در حالی که بین سطح ۱ درصد و گروه شاهد اختلاف معنی-داری وجود ندارد($P>0/05$). بررسی میزان بیان نسبی ژن SOD نیز نشان دهنده کاهش معنادار بیان این ژن در گروه‌های تغذیه شده با سه سطح ۰/۵، ۱ و ۲ درصد نسبت به گروه شاهد بود($P<0/05$). در حالی که بین این سه سطح با یکدیگر اختلاف معناداری مشاهده نشد($P>0/05$).

نتیجه گیری: با توجه به این نتایج به نظر می‌رسد که استفاده از گالاکتوالیگوساکارید در جیره ماهی زبرا سبب کاهش بیان ژن های مرتبط با دفاع آنتی اکسیدانی ماهی زبرا می شود ولی بر فعالیت آنتی اکسیدانی کل اثری ندارد.

واژه های کلیدی: پریبیوتیک، گالاکتوالیگوساکارید، دفاع آنتی اکسیدانی، ماهی زبرا.

مقدمه

شیوع بیماری‌ها در دهه‌های اخیر باعث زیان‌های اقتصادی زیادی در حوزه آبزی‌پروری در سراسر جهان شده است. هم چنین وضعیت نامناسب آب، کمبود مواد مغذی، تولید سموم و عوامل ژنتیکی باعث افزایش مرگ و میر ماهیان پرورشی می‌شود(۲۰). در دهه‌های اخیر کنترل بیماری‌ها از طریق روش‌های شیمیایی و داروهای دامپزشکی به ویژه آنتی‌بیوتیک‌ها گسترش یافته است(۱۲). اگرچه گزارش شده است که این روش‌های کنترل از طریق گسترش انتخابی، تکثیر و پایداری سویه-های باکتریایی مقاوم، باعث به خطر افتادن سلامت عمومی می‌شود(۵). به همین دلیل استفاده از آنتی-بیوتیک‌ها به عنوان محرک رشد و راهکار درمانی با محدودیت رو به رو شد(۶). از این رو محرک‌های ایمنی می‌توانند به عنوان جایگزین مناسبی برای آنتی بیوتیک‌ها در جیره ماهی استفاده شوند. پریبیوتیک‌ها به منظور افزایش رشد، ایمنی ذاتی و مقاومت در برابر بیماری استفاده می‌شوند(۲۴). ویژگی‌های اکسیدکنندگی اکسیژن نقش حیاتی در اعمال بیولوژی متفاوت از جمله استفاده از غذا، انتقال الکترون برای تولید ATP دارد. با وجود ضرورت برای حیات، اکسیژن می تواند باعث

اکسید کردن مواد درون سلول شده و نقش تخریب کننده داشته باشد. اکسیژن می‌تواند به شکل‌های فعال مانند رادیکال‌های پراکسید(O^{-2})، رادیکال‌های هیدروکسیل(OH) و پر اکسید هیدروژن(H_2O_2) تبدیل شود و به این صورت می‌تواند به DNA، آنزیم‌های ضروری و پروتئین‌های ساختاری(مانند کلاژن، الاستین و کراتین) آسیب برساند. واکنش‌های اتواکسیداسیون و پراکسیداسیون را برانگیزد(۲). رادیکال‌های آزاد مولکول‌های فعال شده با منشأ داخلی یا خارجی هستند. از مهم‌ترین اثرات تخریبی رادیکال‌های آزاد آغاز پر-اکسیداسیون لیپید است که به تخریب غشای سلولی منجر می‌شود. پراکسیداسیون لیپید باعث اختلال در ساختار غشا و تغییر فعالیت آنزیم‌های وابسته به آن و پروتئین‌های دیگر می‌باشد، که همراه با آزاد کردن رادیکال‌های هیدروپراکسیل و آلکوپراکسیل به صورت بالقوه برای سلول مضر می شود. آنتی اکسیدان‌ها شامل آنزیم‌ها مانند سوپر اکسید دیسموتاز(SOD)، کاتالاز(CAT)، GR و GST و غیر آنزیم‌ها مانند آسکوربیک اسید، آلفا توکوفرول‌ها که مسئول مبارزه مستقیم با اکسیژن واکنش دهنده هستند. استرس‌های محیطی مانند هایپوکسی، هایپراکسی، قرار گرفتن در معرض عوامل بیگانه شیمیایی وغیره باعث ایجاد استرس اکسیداتیوی می‌شوند(۲۷). بنابراین افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی به یک ارگانیسم کمک می‌کند که هنگام بروز مشکلات ذکر شده عملکرد بهتری از خود نشان دهد. مطالعات در زمینه اثرات آنتی‌اکسیدانی پریبوتیک‌ها محدود است. به طوری که در مطالعات اخیر گزارش شده است که تغذیه میگو *Litopenaeus stylirostris* با پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici*(۷) و استفاده از سطوح مختلف فروکتواولیگوساکارید در جیره ماهی *Megalobrama terminalis*(۳۸)، هم چنین تغذیه ماهی *Lutjanus peru* با پریبوتیک(۱۳)موجب بهبود دفاع آنتی اکسیدانی گردیده است. مطالعه در این زمینه می‌تواند منجر به درک بهتر اثرات آنتی اکسیدانی و محرک ایمنی پریبوتیک‌ها شود که مانند سیستم ایمنی ارتباط نزدیکی با سیستم آنتی اکسیدانی دارند(۱). استفاده از پریبوتیک‌ها از طریق تغییر در میکروبیوتای روده و افزایش باکتری-های اسید لاکتیک و جنس باسیلوس با دیواره سلولی(لیپو پلی ساکاریدی) با خواص محرک ایمنی(۱۵) بر فعالیت فاگوسیتیک تأثیر گذاشته، هم چنین با تحریک تولید اکسیژن واکنش دهنده از طریق فعالیت ماکروفاژ-ها(۲۵) احتمالاً کاهش یا عدم تغییر در میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی را به دنبال خواهد داشت. احتمالاً ROS تولید شده در طول فعالیت فاگوسیتیک تحریک شده توسط محرک ایمنی می‌تواند مسئول کاهش فعالیت یا عدم تغییر در میزان فعالیت آنتی اکسیدانی شود. محققان بر این باورند که کاهش میزان SOD و در نهایت فعالیت کلی آنتی اکسیدانی می‌تواند ناشی از انباشته شدن H_2O_2 در نتیجه مهار CAT از طریق تجمع O^{-}_2 است. در تحقیق حاضر پریبوتیک گالاکتواولیگوساکارید(GOS) جهت بهبود دفاع آنتی اکسیدانی در ماهی مورد بررسی قرار گرفته که از واکنش آنزیمی لاکتوز حاصل شده و عمدتاً از مولکول‌های گلوکز و گالاکتوز تشکیل شده است(۳۳). ماهی زبرا در سال‌های اخیر به عنوان مدلی جهت آنالیز سریع عملکرد ژن‌ها و فعالیت‌های بیولوژیکی مولکول‌های آلی مطرح ش(۴۰). این ماهی از نظر ژنتیکی، فیزیولوژیکی و فارماکولوژیکی شباهت زیادی با انسان دارد. جهت تشخیص مواد طبیعی با پتانسیل‌های درمانی مختلف، بسیار مناسب به نظر می‌رسد. دلایل اولیه‌ای که سبب گسترش این مدل شده، عبارت-اند از اندازه کوچک لارو و جنین مورد آزمایش(۱ تا ۵ میلی‌متر بسته به مرحله رشد)، قدرت باروری بالای ماهی-های بالغ(صدها بچه ماهی در یک جفت گیری طی یک هفته)، شفافیت جنین و لارو در خارج از رحم صورت

می‌گیرد) و به این ترتیب امکان درگیری اثرات مختلف ترکیبات مورد آزمایش امکان پذیر خواهد شد(۹). با توجه به مدل بودن ماهی زبرا و قابل تعمیم بودن نتایج حاصل از مطالعات صورت گرفته در این ماهی به مطالعات انسانی و خلا تحقیقاتی در زمینه اثرات این پریبیوتیک در ماهیان زینتی، در این تحقیق اثرات احتمالی افزودن پریبیوتیک گالاکتواولیگوساکارید(GOS)، به جیره غذایی بر دفاع آنتی اکسیدانی ماهی زبرا بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی و شرایط آزمایشگاهی

تحقیق حاضر در مرکز تحقیقات آبزی‌پروری شهید ناصر فضلی برآبادی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. ۴۲۰ قطعه ماهی زبرا با میانگین وزنی ۰/۱±۴۵ میلی‌گرم از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان زینتی خصوصی در استان گلستان تهیه و پس از دو هفته عادت دهی به طور تصادفی در ۱۲ آکواریوم(۴۰ لیتری)، با تراکم ۳۵ ماهی در هر آکواریوم ذخیره سازی گردید. درجه حرارت آب، سختی کل، اکسیژن محلول و pH به‌طور روزانه اندازه‌گیری شده و به ترتیب مقادیر آن ۲۶/۷۸±۱/۱۲°C، ۲۵۰±۱۳/۲mg L^{-1}، ۷/۶±۰/۲ mgL^{-1}، ۷/۱۹±۰/۱۵ بود. تیمارها تحت هوادهی با استفاده از سنگ هوا در هر آکواریوم و یک پمپ هوادهی مرکزی بودند و ۵۰ درصد تعویض آب روزانه، هم چنین فیلتراسیون جهت کاهش مواد معلق آب انجام گردید.

ساخت جیره غذایی

ماهی‌ها جهت سازگاری به مدت دو هفته با غذای تجاری(بیومار فرانسه با قطر ۰/۵ میلی‌متر) تغذیه شدند(جدول ۱). سپس آکواریوم‌ها به ۴ تیمار و ۳ تکرار تقسیم بندی گردیدند. جهت ساخت جیره‌های آزمایشی سطوح مورد نظر(۵، ۱۰ و ۲۰ گرم پریبیوتیک بر کیلوگرم غذا) از پریبیوتیک گالاکتواولیگوساکارید(ساخت شرکت دوموفریسلند هلند) با استفاده از ژلاتین به جیره پایه(جیره تجاری بیومار) و به جیره گروه شاهد نیز ژلاتین فاقد پریبیوتیک اسپری شد(۴۱). برای تهیه جیره مکمل، ابتدا پریبیوتیک توزین و سپس به محلول ژلاتین اضافه و به غذای مورد استفاده اسپری گردید. ترکیب به دست آمده خشک شده و در زیپ پلاست در یخچال نگهداری شد. طی دوره آزمایش(۸ هفته) ماهی‌ها ۳ نوبت در روز به صورت دستی و تا حد سیری تغذیه شدند.

جدول ۱- آنالیز ترکیب تقریبی غذای بیومار مورد استفاده در مطالعه

مشخصات شیمیایی	ماده خشک	پروتئین	چربی	خاکستر
مقدار (٪)	۹۲	۵۴	۱۸	۷/۹

نمونه‌برداری

در این آزمایش جهت بررسی میزان بیان ژن‌های CAT و SOD به دلیل کوچک بودن اندازه ماهی از کل بدن ماهی استفاده شد(۳۰). نمونه‌برداری در شرایط کاملاً استریل و پس از ۸ هفته تغذیه با مکمل انجام گردید، به طوری که تعداد ۳ قطعه ماهی از هر تکرار به طور تصادفی برداشته، دم و باله‌ی ماهی‌ها جدا شده و به تیوپ‌های استریل منتقل و تیوپ‌ها بلافاصله به تانک ازت منتقل شدند. تا زمان استخراج RNA در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردیدند. جهت اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدان کل به دلیل کوچک بودن اندازه ماهی و امکان‌پذیر نبودن خونگیری از کل بدن ماهی استفاده شد، به طوری که تعداد ۳ قطعه ماهی از هر تانک برداشته و در شرایط کاملاً استریل بعد از بیهوش کردن ماهی‌ها با گل میخک با دوز ppm۲۰۰۰ سر و باله‌ها جدا شد و سپس ماهی‌ها هموژن گردیدند(۱۴). هموژن با دور

۱۰۰۰۰rpm در ۳ مرحله در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ و از فاز بالایی برای سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی استفاده شد.

استخراج RNA

استخراج RNA در مطالعات بیان ژن یکی از حساس-ترین مراحل انجام کار است که باید با حفظ شرایط کاملاً استریل و دمای نمونه‌ها RNA با کیفیت مناسب استخراج شود. در این آزمایش استخراج RNA بر اساس روش عواد و همکاران توسط ماده هضم کننده بایوزول طبق دستورالعمل شرکت تولید کننده انجام شد(۳). RNA استخراج شده به دو روش کیفی و کمی مورد ارزیابی قرار گرفت که جهت ارزیابی کیفی از دستگاه الکتروفورز و ژل آگاروز ۱ درصد و جهت ارزیابی کمی از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. سنتز cDNA با استفاده از مستر میکس سنتز cDNA شرکت جینت بایو محصول کشور کره طبق دستورالعمل آن انجام شد(۴۱).

طراحی آغازگر

آغازگرهای مورد استفاده از روی توالی mRNA ژن‌های مورد نظر در بانک ژن طراحی شد. به طوری که آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق از مطالعات قبلی گرفته شده و با استفاده از نرم‌افزار بایو ادیت با استفاده از توالی‌های موجود در بانک ژن آزمون و با آزمایش کردن در دستگاه PCR بهترین دما برای تکثیر به دست آمد. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۲ نشان داده شده است(۳۱).

جدول۲. توالی پرایمرهای مورداستفاده در این مطالعه

نام پرایمر	توالی (´۳-´۵)	دمای اتصال(°C)	کارایی کاربرد
SOD q-PCRF	GGGTGGCAATGAGGAAAG	۵۸	٪۸۷ سنجش کمی بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدان
SOD q-PCRR	GCCCACATAGAAATGCACAG		
CAT q-PCRF	GCATGTTGGAAAGACGACAC	۵۸	٪۸۹ سنجش کمی بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی
CAT q-PCRR	GTGGATGAAAGACGGAGACA		
- actin q-PCRF	AGCAGATGTGGATCAGCAAG	۵۸	٪۹۹ژن بتا اکتین
- actin q-PCRR	TACCTCCCTTTGCCAGTTTC		

انجام PCR برای آزمودن cDNA و آغازگرها

قبل از انجام Real time PCR برای اطمینان از درستی آغازگرها و هم چنین در آزمایش cDNA: ۲µl cDNA رقیق شده با نسبت ۱ به ۱۰، ۱µl آغازگر پیش رونده، ۱µl آغازگر پس رونده، ۳µl آب استریل عاری از نوکلئاز و ۵µl ترکیب مسترمیکس مخصوص PCR شرکت جینت بایو محصول کشور کره ترکیب شده و PCR معمولی انجام شد(۳۱).

انجام Real time PCR

Real time PCR در تیوب‌های مخصوص آن و در ۴ تکرار تکنیکی برای هر تیمار صورت گرفت که محتویات هر تیوب به مقدار ۲۰ میکرولیتر به صورت زیر بود:

۱۰µl بافر سایبرگرین

۱µl آغازگر پیش رونده ژن هدف و رفرنس

۱µl آغازگر پس رونده ژن هدف و رفرنس

۲/۸µl آب

۰/۴µl آنزیم تگ پلی مراز

۵µl cDNA رقیق شده

نتایج به دست آمده توسط دستگاه Real time PCR تحت عنوان CT می‌باشد که نشان دهنده تعداد چرخه-هایی است که سیگنال فلورسنت نسخه‌های ژنی را شناسایی می‌کند.

ارزیابی عملکرد آغازگرهای به کار رفته با استفاده از منحنی استاندارد

به منظور اطمینان از بهینه بودن شرایط Real time PCR، سری غلظت‌های مختلف(۱/۱۰، ۱/۲۰، ۱/۵۰، ۱/۱۰۰ و ۱/۲۰۰) از نمونه‌های cDNA مخلوط از

تیمارهای متفاوت هر پلیت تهیه و با هر دو آغازگر هدف و رفرنس در ۴ تکرار تکثیر شدند و جهت تخمین کارایی و تکرار پذیری آزمایش برای هر آغازگر منحنی استاندارد ترسیم شد(۲۸) و کارایی برای هر آغازگر ارزیابی گشت.

اندازه‌گیری فعالیت فعالیت آنتی‌اکسیدان کل

برای بررسی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان کل ابتدا با استفاده از اتانول ۹۶ درصدو DPPH محلول ۰/۱ میلی مولار تهیه شد. سپس ۴۰۰ میکرولیتر از نمونه با ۴۰۰ میکرولیتر محلول DPPHمخلوط گردید، مخلوط حاصل به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری و در نهایت جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه-گیری شد(۲۲). در نمونه شاهد به جای نمونه از ۴۰۰ میکرولیتر آب مقطر استفاده شد.

فعالیت آنتی‌اکسیدان کل از رابطه زیر محاسبه گردید:

٪ فعالیت آنتی‌اکسیدان کل =

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گردید. Ct به دست آمده برای ژن‌هایSOD و CAT با استفاده از فرمول 2^{-Ct} برابر است با Ct ژن هدف منهای Ct کالیبراتور) در فضای نرم افزار اکسل تبدیل به بیان نسبی ژن‌های موردنظر نسبت به ژن رفرنس بتا اکتین گردید. عدد به دست آمده با استفاده از نرم افزار اکسل ۲۰۱۰ مرتب و نمودارهای آن رسم شد. هم چنین نرمال بودن داده ها با استفاده از آزمون کلموگراف اسمیرنف و همگن بودن واریانس داده‌ها با آزمون لون(Levene) بررسی گردید. پس از تعیین محقق بودن شرط نرمال بودن داده‌ها، اختلاف بین تیمارها از طریق آنالیز واریانس یک طرفه One-way-ANOVA و اختلاف میانگین داده‌ها از طریق تست دانکن در سطح معنی‌داری($P<۰/۰۵$) و با استفاده از نرم افزار SPSS 16.00بررسی گردید.

نتایج

نتایج مربوط به بررسی cDNA سنتز شده و آزمودن آغازگرهای به کار رفته

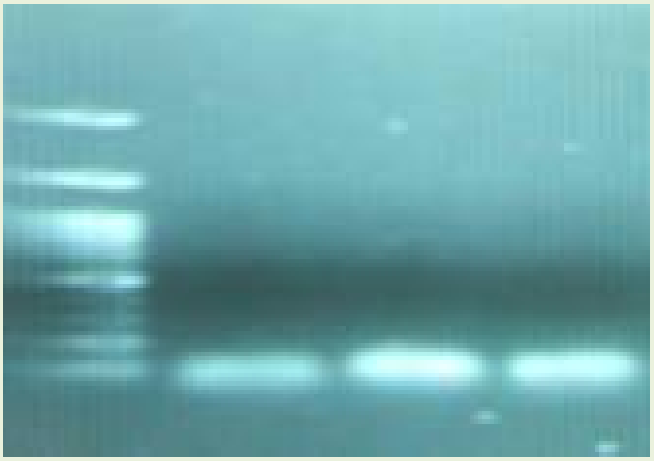
cDNA سنتز شده با پرایمرهای طراحی شده تست شد که نتایج آن به صورت مشاهده باند سنتز صحیح DNA را تأیید نمود(شکل ۱).

نتایج حاصل از ارزیابی کمی و کیفی RNA استخراج شده

کمیت اسیدهای نوکلوئیک با توجه به نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ بیان می‌شود، که برای نمونه‌های این آزمایش اعداد به دست آمده محدوده ۱/۶ تا ۲/۴ قرار داشتند(۳۱)، که نشان دهنده غلظت مناسب RNA جهت سنتز cDNA است. در بررسی‌های کیفی RNA با استفاده از ژل الکتروفورز باید اندازه باند ۲۸srRNA نسبت به باند مربوط به ۱۸srRNA، ۱ به ۲ باشد و باید DNA ژنومی وجود نداشته باشد. وجود باندهای مشخص، پررنگ و بدون هاله نشان از کیفیت مناسب RNA است که در ژل مشاهده شد(شکل ۲).

بیان نسبی ژن‌های آنتی‌اکسیدانی

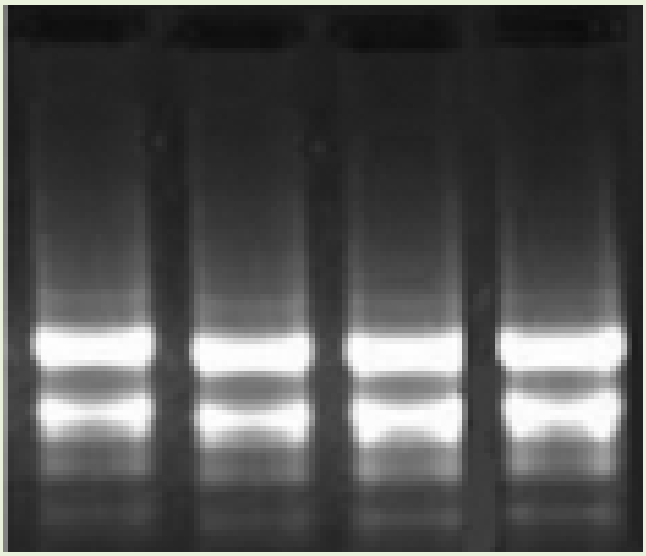
جدول ۴ نشان دهنده اثرات افزودن سطوح مختلف گالاکتواولیگوساکارید بر میزان بیان ژن کاتالاز(CAT) می‌باشد. بررسی بیان نسبی ژن CAT در پایان دوره نشان دهنده کاهش معنادار بیان این ژن در دو گروه تغذیه شده با سطوح ۰/۵ و ۲ درصد نسبت به گروه شاهد بود($P<۰/۰۵$). اگرچه بین گروه تغذیه شده با سطح ۱ درصد با گروه شاهد اختلاف معناداری مشاهده نشد($P>۰/۰۵$)(شکل ۳).



شکل ۱- محصول تکثیر cDNAهای سنتز شده با آغازگرهای مورد استفاده در ماهی زبرا به ترتیب از چپ به راست لدر، آغازگر بتا اکتین، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز

جدول ۳. بررسی کمیت RNA در کل بدن به وسیله اسپکتروفتومتر

طول موج	شاهد	٪۰/۵	٪۱	٪۳
۲۳۰	۰/۹۹۱	۱/۳۲	۱/۳۶۱	۲/۲
۲۶۰	۱/۵۶۱	۲/۳	۱/۷۰۷	۲/۴
۲۸۰	۰/۶۶۶	۱/۰۴	۰/۹۷	۱/۶
مقدار RNA کل	۴۶۸	۶۰۰	۵۱۲	۶۰۰

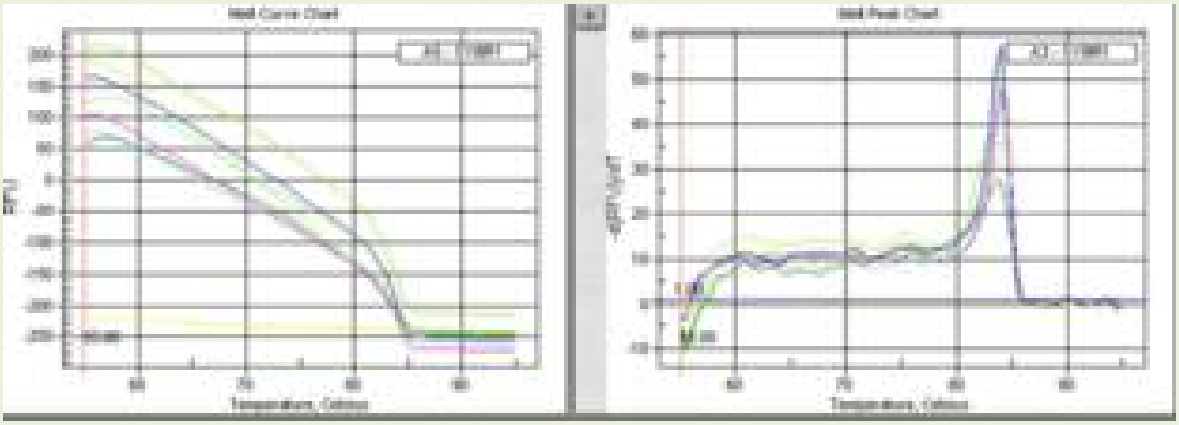


شکل ۲- نتایج ارزیابی RNA استخراج شده کل بدن ماهی زبرا روی ژل آگارز(از راست به چپ باندها به ترتیب مربوط به گروه شاهد و سطوح ۰/۵، ۱ و ۲ درصد)

جدول٤- تأثیر سطوح مختلف گالاکتواولیگوساکارید جیره بر بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنتی اکسیدان کل در ماهی زبرا

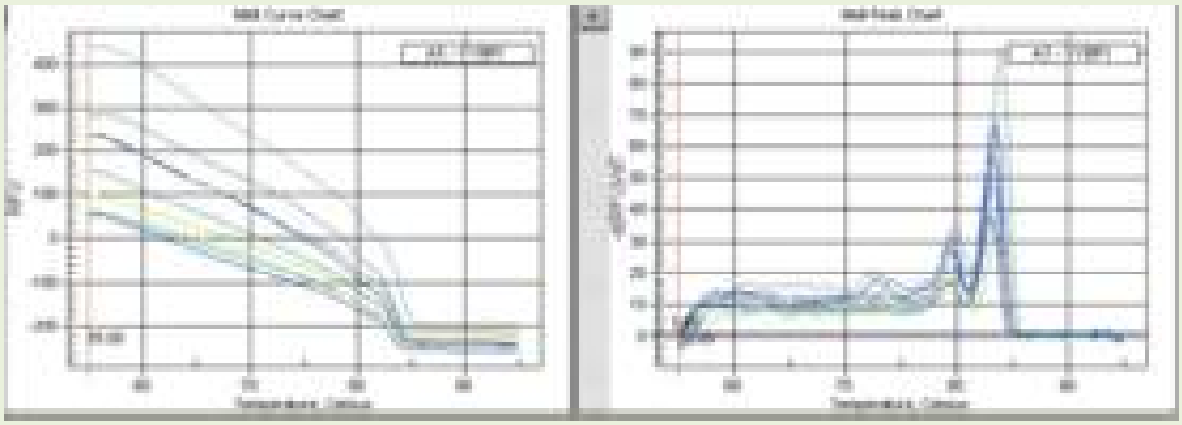
	شاهد	٪۰/۵	٪۱	٪۲
بیان نسبی SOD	۲/۹۲±۰/۷[a]	۱/۴۰±۰/۵۵[b]	۱/۰۹±۰/۲۲[b]	۱/۵۴±۰/۴۱[b]
بیان نسبی CAT	۲/۷±۰/۴۴[a]	۰/۱۲±۰/۰۱[b]	۰/۳۷±۰/۴۶[a]	۰/۲۱±۰/۰۳[b]
فعالیت آنتی اکسیدان کل	۴۵/۰۳±۶/۲۲[a]	۲۹/۳۱±۱/۴۸[a]	۳۷/۸۹±۵/۶۸[a]	۴۴/۲۸±۶/۳۸[a]

حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنادار می‌باشد (P<۰/۰۵)



شکل۳- منحنی ذوب و پیک ذوبReal Time PCR برای ژن کاتالاز در گروه‌های تحت تیمار با غلظت‌های مختلف گالاکتواولیگوساکارید

تأثیر سطوح مختلف گالاکتوالیگوساکارید جیره بر میزان بیان نسبی ژن سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) در شکل ۴ و جدول ۴ ارائه شده است. بررسی‌ها نشان داد میزان بیان این ژن در سه گروه تغذیه شده با سطوح ۰/۵، ۱ و ۲ درصد به طور معناداری نسبت به گروه شاهدکاهش یافته است(P<۰/۰۵). در حالی که بین این سه سطح با یکدیگر اختلاف معناداری وجود نداشت (P>۰/۰۵).



شکل٤- منحنی ذوب و پیک ذوب Real Time PCR برای ژن سوپراکسید دیسموتاز در گروه‌های تحت تیمار با غلظت‌های مختلف گالاکتواولیگوساکارید

فعالیت آنتی اکسیدانی کل

در جدول ۴ میزان فعالیت کل آنتی اکسیدانی تحت تأثیر استفاده از سطوح مختلف گالاکتواولیگوساکارید ارائه شده است. بررسی میزان فعالیت آنتی اکسیدانی کل در پایان دوره نشان داد که بین گروه‌های مختلف تغذیه شده با سطوح متفاوت پریبیوتیک و گروه شاهد اختلاف معناداری وجود نداشت($P>0/05$). هم چنین تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف پریبیوتیکی از حیث فعالیت آنتی اکسیدانی کل مشاهده نشد($P>0/05$).

بحث و نتیجه گیری

اکسیژن واکنش دهنده(ROS) به طور معمول در بدن ماهی تولید شده و سیستم دفاع آنتی اکسیدانی جهت جلوگیری از آسیب‌های اکسیداتیو تکامل پیدا کرده‌اند(۲۶). سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز از جمله مهم‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی هستند که نقش حیاتی در خنثی کردن اثرات منفی ROS در شرایط نامطلوب محیطی ایفا می‌کنند(۳۵).سیستم دفاع آنتی اکسیدانی و آنزیم های آن از جمله SOD و CAT اولین خط دفاع در برابر استرس اکسیداتیو است(۱۱)، و در طی حذف ROS ابتدا O^{-}_{2} را به O_2 و H_2O_2 تبدیل کرده و سپس H_2O_2 توسط CAT شکسته و به O_2 و H_2O تبدیل می‌شود(۱۸). احتمالاً تأثیر آنتی اکسیدانی پریبیوتیک‌ها مربوط به تأثیر بیفیدوژنیک آن ها است. مطالعات آزمایشگاهی اخیر نشان داد که دیواره سلولی باکتری‌های اسید لاکتیک و تخمیر پریبیوتیک‌ها به وسیله باکتری‌های اسید لاکتیک موجب ایجاد اثرات آنتی اکسیدانی می‌شود(۴). احتمالاً خواص آنتی اکسیدانی پریبیوتیک‌ها می‌توانند به عنوان یک مکانیسم دفاعی از طریق جمعیت میکروبی روده در غلبه به استرس‌های اکسیداتیو خارجی و درونی نقش داشته باشد. در واقع، افزایش فعالیت‌های آنزیمی آنتی‌اکسیدانی، در برخی موارد، با افزایش استرس اکسیداتیو و فعالیت‌رادیکال‌های آزاد همراه است. هرچه استرس اکسیداتیو بیشتر باشد آنزیم‌های آنتی اکسیدانی بیشتری تولید می‌شود(۲۷). نتایج مطالعه حاضر کاهش بیان ژن‌های مرتبط با دفاع آنتی اکسیدانی(SOD و CAT) ماهی زبرا تغذیه شده با سطوح مختلف پریبیوتیک را نشان داد. در مطالعات انجام شده در زمینه تأثیر پریبیوتیک‌ها بر ماهی اطلاعات محدودی در خصوص تأثیر پریبیوتیک‌ها بر وضعیت آنتی‌اکسیدانی ماهی موجود است. اگرچه در مطالعات اخیر گزارش نموده اند که استفاده از پریبیوتیک‌های گالاکتواولیگوساکارید، فروکتو-اولیگوساکارید در جیره ماهی کپور معمولی، منجر به افزایش بیان ژن‌های گلوتاتیون اس ترانسفراز و گلوتاتیون ردوکتاز شده است(۱۶). با توجه به این که اسیدهای چرب زنجیره کوتاه در نتیجه تخمیر پریبیوتیک‌ها در روده توسط برخی باکتری‌ها تولید می‌شوند، نتایج مطالعه حاضر را می‌توان به مطالعات پیشین در خصوص اسیدهای چرب زنجیره کوتاه مقایسه کرد. به عنوان مثال همراستا با نتایج مطالعه حاضر صفری و همکاران(۲۰۱۶)، اثرات سطوح مختلف اسید چرب زنجیره کوتاه سدیم پروپیونات بر بیان ژن‌های آنتی اکسیدانی را بررسی کرده و کاهش در میزان بیان ژن‌های CAT و SOD گزارش نمودند(۳۲). اگرچه استبان و همکاران(۲۰۱۴) گزارش کردند که استفاده از پروبیوتیک‌ها و عصاره‌های گیاهی منجر به افزایش بیان ژن‌های کاتالاز، سوپراکسیددیسموتاز در آبشش و پوست ماهی *Sparus aurata* شده است(۱۰). صفری و همکاران(۲۰۱۷) گزارش نمودند که استفاده از عصاره گیاه مورد (*Myrtus communis*) در جیره ماهی زبرا با افزایش در بیان ژن‌های CAT و SOD منجر به بهبود وضعیت آنتی اکسیدانی ماهی زبرا(*Danio rerio*) گردید(۳۱). در پژوهشی دیگر حسینی‌فر و همکاران(۲۰۱۶) گزارش کردند که استفاده از عصاره خرما در جیره ماهی کپور معمولی(*Cyprinus carpio*) منجر به افزایش بیان ژن

گلوتاتیون پراکسیداز گردیده، در حالی که بر میزان بیان ژن‌های گلوتاتیون ردوکتاز و گلوتاتیون اس ترانسفراز تأثیر معناداری نداشت(۱۶). با وجود مطالعات محدود در خصوص تأثیر پریبیوتیک‌ها بر بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی هنوز مکانیسم تأثیرگذاری این مکمل‌های غذایی بر بیان ژن ها مشخص است و اظهار نظر قطعی در مورد آن نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد. هم چنین نتایج مطالعه حاضر بیان‌گر این بود که استفاده از سطوح مختلف پریبیوتیک مذبور بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل تأثیری نداشت. در خصوص تأثیر مکمل‌های غذایی بر وضعیت آنتی اکسیدانی نتایج متناقضی گزارش شده است به طوری که در پژوهشی کاستکس و همکاران(۲۰۱۰) گزارش کردند که استفاده از پروبیوتیک *Pedicoccus acidilactici* در جیره میگو *Stylirostris hemolymph* L. منجر به افزایش در فعالیت کل آنتی‌اکسیدان، کاهش فعالیت CAT و عدم تغییر در میزان SOD و گلوتاتیون پر-اکسیداز(GPX) می‌شود(۷). گزمان-ویلانووا و همکاران(۲۰۱۳) نیز گزارش نمودند که استفاده از بتا گلوکان در جیره ماهی *Lutjanus peru* منجر به افزایش فعالیت SOD گردید، در حالی که در میزان فعالیت CAT تأثیری نداشت(۱۳). در پژوهشی دیگر ریبز بسریل و همکاران(۲۰۰۸a) گزارش کردند که تغذیه ماهی *Mycteroperca rosacea* با مخمر *Debaryomyces hasenii* منجر به افزایش میزان SOD شده در حالی که بر میزان CAT تأثیری نداشته است(۲۹). ژانگ و همکاران(۲۰۱۰) افزایش در میزان SOD، CAT و GPx کبد و SOD در نتیجه تغذیه ماهی *Megalobrama terminalis* با فروکتواولیگوساکارید و *B. licheniformis* را گزارش کردند(۳۹). در خصوص تأثیر ROS بر فعالیت آنتی اکسیدانی کل توسط کنو و فریدریچ(۱۹۸۲)، ویلهلم فیلهو وهمکاران(۱۹۹۳) تایید شده است(۳۶، ۱۹). قابل توجه است که تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و در نهایت فعالیت کلی سیستم آنتی اکسیدانی در نتیجه بیان ژن‌های مربوط به فعالیت آنتی اکسیدانی از جمله CAT و SOD است که هنوز مکانیسم اثرگذاری پریبیوتیک‌ها بر بیان این ژن‌ها نامشخص و نیازمند مطالعات بیشتر در این زمینه است. به عنوان یک نتیجه گیری کلی می توان چنین بیان کرد که استفاده از پریبیوتیک گالاکتواولیگوساکارید در جیره غذایی ماهی زبرا سبب کاهش بیان ژن های مرتبط سیستم دفاع آنتی اکسیدانی در سطح بیان ژن گردید. اگرچه اثری بر فعالیت آنتی اکسیدانی کل مشاهده نشد. با توجه به نتایج متناقض این مطالعه و مطالعات پیشین به نظر می رسد تعیین دقیق اثرات پریبیوتیک ها و مکانیسم اثرگذاری نیازمند مطالعات بیشتری باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و در قالب پایان نامه کارشناسی ارشد صورت پذیرفته است. نگارندگان این مقاله از کمک‌های کارشناسان آزمایشگاه های گروه شیلات تشکر و قدردانی می نمایند.

منابع

1.Adema, C.M., Vander, K., Naap., W.P.W., Sminia, T. (1991). Molluscan haemocyte mediated cytotoxicity: the role of reactive oxygen intermediates. Rev. Aquat.Sci, 4; 201–223.

2.Ajith, T. A., Hema, U., Aswathy, M.S. (2007). Zingiber officinale *Roscoe prevents* acetaminophen-induced acute hepatotoxicity by enhancing hepatic antioxidant status. Food.Chemis. Toxicol, 45(11); 2267-2272.

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

4.Lin, M.Y., Yen, C.L. (1999). *Bifidobacterium longum*. J Agricul Food Chemic, 47; 3661-3664.

5.Cabello, F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: A growing problem for human and animal health and for the environment. Environt. Microbiol, 8; 1137–1144.

6.Castanon, J. I.(2007). History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. Poultry Sci, 86; 2466–2471.

7.Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N., Chim, L. (2010). Effect of probiotic *Pediococcus acidilactici on* antioxidant defences and oxidative stress of *Litopenaeus stylirostris* under *Vibrio nigripulchritudo* challenge. Fish.Shellfish. Immunol, 28; 622–631.

8.Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N., Chim, L. (2010). Effect of probiotic *Pediococcus acidilactici*on antioxidant defences and oxidative stress of *Litopenaeus stylirostris*under *Vibrio nigripulchritudo*challenge. Fish Shellfish. Immunol, 28; 622–631.

9.Crawford, A. D., Esguerra, CV. (2008). Witte PAM.fishing for drugs from nature: Zebrafish as a technology platform for natural product discovery. Planta. Medica., 74; 624 - 32.

10. Esteban, M., Cordero, H., Mart_ınez-Tom_e, M., Jim_enez-Monreal, A., Bakhrouf, A., Mahdhi, A. (2014). Effect of dietary supplementation of probiotics and palm fruits extracts on the antioxidant enzyme gene expression in the mucosae of gilthead seabream (*Sparus aurata*L.). Fish. Shellfish. Immunol, 39; 532–540.

11. Farombi, E., Adelowo, O., Ajimoko, Y.(2007). Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African cat fish(*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. International Journal of Environmental Research and Public Health, 4; 158-165.

12. Guardiola, F., Porcino, C., Cerezuela, R., Cuesta, A., Faggio, C., Esteban, M. (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. Shellfish. Immunol, 52; 298–308.

13. Guzman – Villanueva, L.T., Ascencio - ValleF., Macias – Rodriguez, M.E., Tovar-Ramirez, D. (2013). Effects of dietary b-1, 3/1, 6-glucan on the antioxidant and digestive enzyme activities of Pacific red snapper(*Lutjanus peru*) after exposure to lipo polysaccharides. Fish. Physiolo. Biochemic, 40; 827–837.

14. Holbech, H., Andersen, L., Petersen, G.I., Korsgaard, B., Pedersen, K.L., Bjerregaard, P. (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of Zebrafish(*Danio rerio*). Journal of Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxico. Pharm, 130(1); 119-131.

15. Hoseinifar, S. H., Dadar, M., Khalili, M., Cerezuela, R., Esteban, M. A. (2016). Effect of dietary supplementation of palm fruit extracts on the transcriptomes of growth, antioxidant enzyme and immune related genes in common carp(*Cyprinus carpio*) fingerlings. Aquat. Res, 7; 3684-3692.

16. Hoseinifar, S. H., Eshaghzadeh, H., Vahabzadeh, H., Peykaran Mana, N. (2016). Modulation of growth performances, survival, digestive enzyme activities and intestinal microbiota in common carp(*Cyprinus carpio*) larvae using short chain fructo oligo saccharide. Aquat. Res, 47; 3246–3253.

17. Hoseinifar, S.H., Ahmadi, A., Khalili., Raeisi, M., Van Doen, H., Marlowe Caipang, C.M. (2017). The study of antioxidant enzymes and immune-related genes expression in common carp(*Cyprinus carpio*) fingerlings fed different prebiotics. Aquat Research, 00; 1–8.

18. Jovanovi -Galovi , A., Blagojevi , D,P., Grubor-Lajši , G., Worland, R., Spasi M, B. (2004). Role of antioxidant defense during different stages of preadult life cycle in European corn borer(*Ostrinia nubilalis*, Hubn.): diapa use and metamorphosis. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 55; 79–89.

19. Kono, Y., Fridovich, I. (1982). Superoxide radical inhibits catalase. J Biolo Chemis, 257; 5751–5754.

20. Lauriano, E., Pergolizzi, S., Capillo, G., Kuciel, M., Alesci, A., Faggio, C. (2016). Immuno histochemical characterization of Toll-like receptor 2 in gut epithelial cells and macrophages of gold fish *Carassius auratus* fed with a high-cholesterol diet. Fish. Shellfish. Immunol, 59; 250–255.

21. Lin, M.Y., Yen, C.L. (1999). Inhibition of lipid peroxidation by *Lactobacillus acidophilus* and male youth. Asia Pacific journal of Clinical Nutrition, 13; 106-111.

22. Malekinejad, H., Alizadeh, A,. Cheraghi, H., Meshkini,S., Dardmeh, F. (2010). The protective effect of Liquorice plant extract on CCl_4-induced heap totoxicity in common Carp (*Cyprinus carpio*). Vet. Res. Forum, 1(3); 158-164.

23. Miandare, H.K., Farvardin, S., Shabani, A., Hoseinifar, S.H., Ramezanpour, S.S. (2016). The effects of trans cript galacto oligo saccharide on systemic and mucosal immune response, growth performance and appetite related gene in goldfish(*Carassius auratus gibelio*). Fish. Shellfish. Immunol, 55; 479-483.

24. Nayak, S. K. (2010). Probiotics and immunity: A fish perspective. Fish . Shellfish. Immunol, 29; 2–14.

25. Panigrahi, A., Viswanath, K., Satoh, S. (2011). Real-time quantification of the immune gene expression in rainbow trout fed different forms of probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus*. AquatRes, 42; 906–917.

26. Pohlenz, C., Gatlin, D.M. (2014). Inter relationships between fish nutrition and health. Aquat, 431;111–117.

27. Rahmat, A., Abu Bakar, M.F., Faezah, N., Hambali, Z. (2004). The effects of consumption of guava(*Psidium guajava*) or papaya (*Carica papaya*) on total antioxidant and lipid profile in normal male youth. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 13; S106- S116.

28. 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. Neuroscienc letters, 339; 62-66.

29. Reyes-Becerril, M., Tovar-Ramı´rez, D., Ascencio-Valle, F., Civera- Cerecedo, R., Gracia-Lo´pez, V., Barbosa-Solomieu, V. (2008a). Effects of dietary live yeast *Debaryomyces hansenii* on the

immune and antioxidant system in juvenile leopard grouper *Mycteroperca rosacea* exposed to stress. Aquat, 280; 39–44.

30. Rojo, I., Martlnez de Ilarduya, O., Estonba, A., Angel Pardo, M. (2007). Innate immune gene expression in individual Zebrafish after *Listonella anguillarum* inoculation. Fish .Shellfish.Immunol, 23; 1285-1293.

31. Safari, R., Hoseinifar, S.H., Van Doan, H., Dadar, M. (2017). The effects of dietary Myrtle(*Martus communis*) on skin mucus immune parameter and mRNA levels of growth, antioxidant and immune related genes in Zebrafish(*Danio rerio*). Fish. Shellfish Immunol, 66; 264-269.

32. Safari, R., Hoseinifar, S.H., Kavandi, M. (2016). Modulation of antioxidant defense and immune response in zebra fish(*Danio rerio*) using dietary sodium propionate. Fish.Physiol.Biochem, 42(6); 1733-1739.

33. Sako, T., Matsumoto, K., Tanaka, R. (1999). Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligo saccharides. International Dairy Journal, 9; 69-80.

34. Parvez, S., Raisuddin, S. (2005). Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidativestress-inducing pesticides in fresh water fish *Channa punctata*(Bloch). Environ.Toxicol. Pharm, 20; 112-117.

35. Tabrez, S., Ahmad, M. (2009). Effect of waste water intake on antioxidant and marker enzymes of tissue damage in rattissues: implications for the use of biochemical markers. Food. Chemic. Toxicol, 47; 2465–2478.

36. Wilhelm Filho, D., Giulivi, C., Boveris, A. (1993). Antioxidant defences in marine fish. I. Teleosts. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharm, Toxicol . Endocrinol, 106; l409–413.

37. Winston, G.W., Digiulio, R.T. (1991). Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. Aquat . Toxicol, 19; 137–161.

38. Zhang, C.N., Li, X.F., Xu, W.N., Jiang, G.Z., Lu, K.L., Wang, L.N., Liu, W.B. (2013). Combined effects of dietary fructo oligo saccharide and *Bacillus licheniformis* on innate immunity, antioxidant capability and disease resistance of triangular bream(*Megalobrama terminalis*). Fish . Shellfish Immunol, 35; 1380–1386.

39. Zhang, Q., Ma, H.M., Mai, K.S., Zhang, W.B., Liufu, Z.G., Xu, W. (2010). Interaction of dietary *Bacillus subtilis*and fructo oligo saccharide on the growth performance, nonspecific immunity of sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. Fish. Shellfish Immunol, 29; 204-211.

40. Zon, L. I., Peterson, R. T. (2005). In vivo drugdiscovery in the Zebrafish. Nat. Revi. Drug Discove, 4; 35 - 44.

41. Miandare, H.K., Farvardin, S., Shabani, A., Hoseinifar, S.H., Ramezanpour, S.S. (2016). The effects of galacto oligo saccharide on systemic and mucosal immune response, growth performance and appetite related gene transcript in gold fish (*Carassius auratus gibelio*). Fish & Shellfish Immunology, 55; 479-483.

The Effects of Different Levels of Dietary Galactooligosaccharide on Antioxidant Defence in Zebra Fish (*Danio rerio*)

S. Yousefi, **Seyed H. Hoseinifar**, A. Hajimoradloo, H. Paknejad
Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan. Iran. **Hoseinifar@gau.ac.ir**

Received:2017. 21. 9 **Accepted: 2017.23. 10**

Abstract

Inroduction & Objective: The aim of the study was to study the effects of different levels of prebiotic galactooligosaccharide (GOS) on antioxidantdefense system in zebrafish (*Danio rerio*) as model organism.

Material and Methods: A total number of 420 fish (45±0.1 mg) were supplied and randomly stocked in 60 L aquariums assigned to four treatments repeated in triplicates. Fish were with four experimental diets contain0, 0.5, 1 and 2% prebiotic for 8 weeks. At the end of feeding trial, total antioxidant activity as well as expression of antioxidant defense related genes Catalase (CAT) and Superoxide dismutase (SOD).

Results: The obtained results revealed that administration of different levels of GOS had no significant effects on total antioxidant activity (P>0.05). Also, gene expression studies showed that CAT expression was remarkably down-regulated in fish fed 0.5 and 2% GOS (P<0.05). While, no significant difference was noticed between 1% GOS and control treatment (P>0.05). Evaluation of SOD gene expression revealed significant down regulation in prebiotic fed fish (0.5, 1 and 2%) compared control group (P<0.05). However, there were no significant difference between different GOS levels in case of SOD expression (P>0.05).

Counclusion: Based on these results, it seems that administration of GOS in zebra fish diet down-regulates antioxidant defense related genes without any effect on total antioxidant activity.

Keywords: Prebiotic, Galactooligosaccharide, Antioxidant defence, Zebra fish.

.