

"مقاله پژوهشی"

اثرات تروگزروتین بر بیان mRNA ژن‌های کدکننده لیزوزیم و فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا و بافت‌شناسی پوست ماهی قرمز (*Carassius auratus*)

نجمه شیخ‌زاده^{۱*}، امین مرندی^۲، شلاله موسوی^۱، غلامرضا حمیدیان^۳

۱- گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۲- گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳- گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۸/۱۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۵/۶

چکیده

تروگزروتین، که مشتقی از بیوفلاوونوئید طبیعی روتین به شمار می‌آید، اثرات زیستی مهمی شامل فعالیت تحریک سیستم ایمنی را ایجاد می‌کند. این مطالعه با هدف بررسی تاثیر افزودنی تروگزروتین خوراکی بر روی بافت‌شناسی و بیان mRNA ژن‌های کدکننده لیزوزیم و فاکتور نکروزدهنده تومور آلفا در پوست ماهی قرمز (*Carassius auratus*) انجام شد. بدین منظور، بچه ماهی‌ها با میانگین وزن اولیه 0.08 ± 0.008 گرم توسط جیره‌های حاوی ۰/۱، ۰/۳، ۰/۵ گرم افزودنی تروگزروتین به ازای هر کیلوگرم جیره به مدت ۸۰ روز تغذیه شدند. برای بررسی بافت‌شناسی، پوست سمت راست و نزدیک به باله پشتی ماهی‌ها به میزان ۰/۵ سانتی‌متر برداشته شده و در فرمالین ۱۰٪ قرار داده شد. برای ارزیابی مولکولی، به ترتیب، مراحل استخراج RNA، سنتز و بررسی cDNA و Real Time PCR در پوست صورت گرفت. نتایج بافت‌شناسی پوست، افزایش بیشتری را در تراکم سلول‌های هشداردهنده‌ی گروه‌های تیمار نسبت به گروه کنترل نشان داد ($p < 0.05$). نسبت حجمی سلول‌های هشدار دهنده به اپیدرم در گروه‌های تیمار، میزان بالاتری را نسبت به گروه کنترل نشان داد که این میزان افزایش، در گروه‌های دریافت‌کننده دوز متوسط و دوز بالا بیشتر بود ($p < 0.05$). در ضخامت لایه اپیدرم تفاوت معناداری بین گروه‌های تیمار و گروه کنترل مشاهده نشد ($p > 0.05$). نتایج آزمایش‌های مولکولی، افزایش معنی‌داری را بین میزان بیان ژن کدکننده لیزوزیم در سه گروه تیمار، با گروه کنترل نشان داد ($p < 0.05$). علاوه بر آن، میزان بیان ژن کدکننده TNF- α در گروه‌های دریافت‌کننده دوز متوسط و به خصوص دوز بالا، نسبت به گروه دریافت‌کننده دوز پایین و گروه کنترل افزایش معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.05$). بنابراین، افزودن ۰/۵ گرم تروگزروتین به ازای هر کیلوگرم جیره غذایی، توانایی بهبود فاکتورهای بافت‌شناسی و بیان mRNA ژن‌های کدکننده لیزوزیم و TNF- α در پوست ماهی قرمز را داراست.

کلمات کلیدی: تروگزروتین، ماهی قرمز، بافت‌شناسی، بیان ژن.

مقدمه

در محیط آبی، ماهی‌ها با انواع استرس‌های زیستی، شیمیایی و فیزیکی مواجه می‌شوند. اگرچه، ماهی‌ها سیستم ایمنی اختصاصی و ذاتی دارند که نقش مهمی در زنده‌مانی این موجودات ایفا می‌کنند. در ماهیان استخوانی، بافت‌های روده، پوست و آبشش علاوه بر نقش‌های کاربردی خود، به عنوان سطوح مخاطی مهم در ایمنی بدن نیز نقش دارند. بنابراین، بهبود این ساختارهای مخاطی قادر به کنترل بیماری در موجودات آبرزی می‌باشد (Sheikhzadeh et al., 2019). پوست ماهی به عنوان اولین سد دفاعی به شمار می‌آید. در مخاط پوست، انواع ترکیبات شامل گلیکوپروتئین، آگلوتینین، ترکیبات ضد میکروبی، لیزوزیم و آنتی‌بادی‌های غیراختصاصی حضور دارند که سبب مبارزه با انواع عوامل بیماری‌زا می‌گردند. مطالعات زیادی نیز در خصوص تقویت سیستم ایمنی مخاطی در پوست ماهی با استفاده از افزودنی‌های غذایی مانند انواع پروبیوتیک‌ها و گیاهان دارویی انجام شده است (Vallejos-Vidal et al., 2016; Hoseinifar et al., 2019). در سال‌های اخیر، با توجه به اهمیت حفظ محیط زیست و استفاده از مواد فاقد باقی ماندگی در محیط زیست، استفاده از مواد محرک ایمنی گیاهی در آبرزی پروری رو به افزایش بوده است (Ardo et al., 2008).

تروگزروتین به عنوان یکی از این محرک‌های ایمنی شناخته می‌شود. این ترکیب با فرمول شیمیایی $C_{33}H_{42}O_{19}$ که به عنوان ویتامین P₄ نیز شناخته می‌شود، یک مشتق تری هیدروکسی اتیله شده از ترکیب روتین (Rutin) است (موسوی و همکاران، ۱۴۰۰؛ Fan et al., 2009). بر اساس مطالعات اپیدمیولوژیک صورت

گرفته، مصرف فلاونوئیدها از جمله تروگزروتین توانسته تاثیر به‌سزایی در بهبود چاقی مرتبط به دیابت، بهبود سیستم قلبی-عروقی (کاهش خطرات ناشی از بیماری‌های عروق کرونری) و سیستم عصبی، پیشگیری از بروز انواع سرطان (ریه، معده، کولون و پروستات) و ناباروری، بهبود پاسخ‌های التهابی، سیستم ایمنی و آنتی‌اکسیدانی و حافظت انسان و حیوانات آزمایشگاهی خصوصاً موش در برابر آفتاب بر جای گذارد (Gui et al., 2015; Formica and Regelson, 1995). ولی در آبرزیان، مطالعات محدودی در زمینه اثر روتین تنها در برخی از گونه‌ها صورت گرفته است. به عنوان مثال، Pês و همکاران (۲۰۱۶) به بررسی تاثیر جیره غنی شده با روتین بر پارامترهای خونی، شاخص‌های اکسیداتیو و بیان هورمون هیپوفیزی در گربه ماهی نقره-ای (*Rhamdia quelen*) پرداختند. آن‌ها در مطالعات ۲۱ روزه خود بر روی تعدادی گربه ماهی نقره‌ای، نشان دادند افزودن ۰/۱۵ درصد روتین به جیره، موجب کاهش سطح کورتیزول در پلاسما شده و میزان پراکسیداسیون چربی در تمامی بافت‌ها را کاهش می‌دهد. هم‌چنین، در این مطالعه مشخص گردید افزودن روتین موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، تیول غیر پروتئینی (NPSH)، اسکوربیک اسید (AA) و ظرفیت کل باز فعالی آنتی‌اکسیدان در مغز، گلوکوتاتیون اس - ترانسفراز (GST) و TRAP در آبشش‌ها، CAT، GST و TRAP در کلیه و SOD، CAT، GST، NPSH، AA، TRAP در کبد می‌گردد. (Pês et al., 2016). Zheng و همکاران (۲۰۱۷) به بررسی تاثیرات پیش / ضد التهابی جیره غنی شده با روتین بر کبد تیلاپیا نیل‌های (*Oreochromis niloticus*) جوان پرداختند. آن‌ها

(۱۴۰۰). هم‌چنین، این ماهی از گونه‌های معمول و شناخته‌شده‌ی ماهیان آکواریومی (زینتی) در سراسر دنیا می‌باشد (صابری اصل و همکاران، ۱۳۹۷؛ Harikrishnan *et al.*, 2010). با توجه به اهمیت این گونه ماهی و از طرف دیگر اثرات مفید ترکیب روتین و تروگزروتین در سلامت عمومی گونه‌های ماهی، مطالعه حاضر پایه‌ریزی گردید تا اثر استفاده خوراکی این ترکیب گیاهی بر تقویت سیستم ایمنی مخاطی در پوست ماهی قرمز بررسی گردد.

مواد و روش‌ها

ماهی و طراحی مطالعه

مطالعه حاضر در کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان زینتی سافیش، واقع در شهرستان مرند استان آذربایجان شرقی انجام گرفت. در این پژوهش ۱۲۰ قطعه بچه ماهی سالم با متوسط وزن (انحراف معیار \pm میانگین) $2/74 \pm 0/08$ گرم و متوسط طول $4/86 \pm 0/08$ سانتی متر، پس از ۱۰ روز سازگاری اولیه، به طور تصادفی در ۱۲ تانک شیشه‌ای با ابعاد ۹۰×۴۰×۴۰ سانتی متر ذخیره‌سازی شدند. ماهی‌های مورد مطالعه، مجموعاً در چهار گروه آزمایشی شامل یک گروه کنترل و سه گروه تیمار با سه تکرار و در هر تکرار ۱۰ قطعه ماهی، به صورت کاملاً تصادفی توزیع شدند. میانگین درجه حرارت آب ۲۵/۵-۲۴/۵ درجه سانتی‌گراد، pH آب برابر ۷/۲، آمونیاک کمتر از ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر، نیتريت کمتر از ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر، نترات برابر ۷-۸ میلی‌گرم بر لیتر و نوردی به میزان ۸ ساعت در روز بود. تغذیه ماهی‌ها با خوراک تجاری گرانولی ساخت شرکت Energy تایلند و به میزان ۲/۵٪ وزن بدن به صورت روزانه (در سه وعده) انجام گرفت. پس از

دریافتند که افزودن روتین به میزان ۰/۱ یا ۰/۳ گرم به ازای هر کیلوگرم، موجب کاهش قابل توجه IgM کبدی، سیتوکین‌های ضد التهابی و سیتوکین‌های پیش التهابی در تیلاپیا نیل‌های دریافت کننده مقادیر بالای روتین شده و رونوشت‌های IgM کبدی و سیتوکین‌های ضد التهابی (IL-10, IFN- γ) به طور قابل توجهی کاهش می‌یابند. هم‌چنین، مشخص شد تعداد ماکروفاژ-های کبدی شدیداً کاهش یافته ولی تعداد میکرو ویلی-ها و غدد ترشحی در روده افزایش قابل توجهی می‌یابد (Zheng *et al.*, 2017). مطالعات محدود دیگری نیز در زمینه بررسی اثر روتین در ماهیان صورت گرفته است که از آن جمله، می‌توان به بررسی سطوح مختلف روتین اضافه شده به جیره غذایی، بر روی فعالیت برخی از آنزیم‌های کبدی و شاخص‌های استرس اکسیداتیو در قزل‌آلای رنگین‌کمان در معرض اکسی‌تتراسایکلین توسط Nazeri و همکاران (۲۰۱۷) و یا بررسی تاثیرات سینرژیستی محدود روتین اضافه شده به جیره، بر خواص مغذی ویتامین C در گربه ماهی کانالی انگشت قد توسط Bai و Gatlin (۱۹۹۲) اشاره کرد.

در طول سالیان اخیر، نگهداری و پرورش ماهیان زینتی همواره به‌عنوان یکی از صنایع سودآور مطرح بوده است. امروزه گسترش و سودآوری صنعت آبی‌پروری در حوزه ماهیان زینتی مستلزم دستیابی به پیشرفت‌های چشم‌گیری در زمینه تحقیقات و پژوهش‌های علمی است (موسوی و همکاران، ۱۳۹۹). ماهی قرمز با نام علمی *Carassius auratus* یکی از گونه‌های بسیار مناسب جهت مطالعات ایمنی شناسی است، زیرا از اندازه مناسبی جهت تحقیقات آزمایشگاهی برخوردار است و در اندازه کوچک نیز به بلوغ جنسی می‌رسد (کریمیان کاکلکی و همکاران،

میکرولیتزر کلروفرم به آن افزوده شد. سانتریفوژ نمونه‌ها با سرعت ۱۲۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت و پس از برداشتن مایع رویی، به همان میزان ایزوپروپانول افزوده شد. پس از سانتریفوژ مجدد و دور ریختن مایع رویی، ۱ سی سی اتانول ۷۵٪ اضافه شد. نمونه‌ها مجدداً با سرعت ۱۲۰۰۰ دور به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس اتانول اضافه شده، دور ریخته شد و در پایان، پس از افزوده شدن ۴۰ میکرولیتزر از ۰.۱% DEPC، نمونه‌ها تا زمان ساخت cDNA، در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در انتهای این مرحله، کمیت و یکپارچگی RNAهای استخراج شده نیز با اسپکتروفتومتر (Bio-Rad، آمریکا) مورد بررسی قرار گرفت.

سنتز cDNA، با کیت تجاری ساخت شرکت یکتا تجهیز آزما و بر اساس دستور العمل شرکت سازنده انجام گرفت. ترکیبات مورد نیاز جهت سنتز cDNA با حجم نهایی ۱۳/۴ میکرولیتزر، شامل ۱۰ میکرولیتزر RNA تیمار شده با DNase I، ۱ میکرولیتزر random hexamer و ۲/۴ میکرولیتزر آب-دپس یا diethyl pyrocarbonate بود. بدین منظور، میکروتیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و سپس به سرعت بر روی قطعات یخ قرار گرفتند. سپس ۴ میکرولیتزر Reverse 5X first-strand Buffer، ۱ میکرولیتزر transcriptase، ۱ میکرولیتزر dNTPS ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتزر (Rnase inhibitor) و ۱ میکرولیتزر MuLV reverse transcriptase به هر میکروتیوب اضافه شد. تیوب‌ها در ابتدا به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفتند و سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند، تا واکنش غیرفعال شود. در نهایت cDNAهای

دوره ۱۰ روزه سازگاری، جهت آماده‌سازی خوراک در گروه‌های تیمار، از نمونه تجاری ترোগزروتین ساخت شرکت Merck آلمان استفاده شد. در گروه-های تیمار، ترোগزروتین به میزان ۰/۱، ۰/۳ و ۰/۵ گرم در کیلوگرم، به جیره غذایی ماهی‌ها اضافه شد. دوزهای انتخاب شده بر اساس اثرات مثبت ایجاد شده با این ترکیب در مطالعه قبل بود (Zheng et al., 2017). جهت افزودن ترোগزروتین به خوراک ماهی، از روش اسپری سطحی استفاده شد به صورتی که ترোগزروتین با دوزهای مورد نظر در ۰/۵ سی سی روغن گیاهی حل شد. در گروه کنترل نیز جهت یکسان‌سازی، تنها روغن گیاهی بر روی خوراک اسپری گردید. پس از اتمام خشک شدن، خوراک تا زمانی که به مصرف ماهی‌ها برسد، داخل کیسه‌های پلاستیکی جداگانه ریخته شده و در داخل یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

مطالعات مولکولی

به منظور انجام مطالعات مولکولی، در انتهای دوره ۸۰ روزه، نمونه برداری از بافت پوست ماهی‌ها انجام شد به صورتی که ۰/۵ سانتی‌متر از پوست سمت راست و نزدیک به باله پشتی از ۴ قطعه ماهی در هر تانک برداشت شد و در میکروتیوب‌های فاقد RNase حاوی محلول RNA-later (شرکت یکتا تجهیز آزما، تهران، ایران) قرار گرفت. نمونه‌ها تا زمان انجام PCR، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جهت استخراج RNA، ۵۰ میلی‌گرم از هر پوست هر ماهی برداشت شده و ۱ میلی‌لیتر از محلول RNA isolation به هر میکروتیوب اضافه شد و پس از انکوبه شدن به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق، میزان ۲۰۰

(خانه دار) انتخاب شد. واسرشت اولیه ۹۵ درجه سانتی - گراد به مدت ۵ دقیقه و واسرشت ثانویه ۹۰ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه بود. درجه حرارت مرحله اتصال برای دو ژن لیزوزیم و TNF- α ۵۵ درجه سانتی‌گراد و برای ژن بتا اکتین ۶۰ درجه سانتی‌گراد و تعداد سیکل هر سه ژن در این مرحله ۴۰ بود. توالی پرایمرهای هر یک از ژن‌های بررسی شده در جدول ۱ آمده است.

سنتز شده تا شروع آزمایش‌های بعدی، در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

آزمایشات real time PCR با استفاده از کیت شرکت یکتا تجهیز آزما با سه تکرار (تکرار تکنیکی در دستگاه) انجام شد. مواد مورد استفاده برای این آزمون شامل ۱۰ میکرولیتر SYBR Green qPCR mastermix، ۱ میکرولیتر cDNA و ۰/۴ میکرولیتر از هر پرایمر بود که با افزودن آب مقطر، به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر رسید. ژن بتا اکتین نیز به عنوان ژن شاهد

جدول ۱: پرایمرهای انتخابی جهت بررسی بیان ژن‌های انتخاب شده در بافت پوست ماهی قرمز

ژن هدف	توالی پرایمر	شماره دستیابی	کارایی پرایمر (%)	منبع
لیزوزیم	GCCGGAAATGTCCTGAATAA GTGGTCCTGGCATCGATATT	KM100713.1	۹۵/۶۸	Jinendiran و همکاران، ۲۰۱۹
TNF- α	CATTCTACGGATGGCATTACTT CCTCAGGAATGTCAGTCTTGCAT	EU069817	۹۶/۴۵	Tu و همکاران، ۲۰۱۹
بتا اکتین	GATGCGGAAACTGGAAAGGG GTGAGGGCAGAGTGGTAGACG	AB039726	۹۴/۵۴	Tu و همکاران، ۲۰۱۹

در روز ۸۰، از قسمت جانبی و بالای هر ماهی، از بافت پوست به میزان ۰/۵ سانتی متر برداشته شده و در فرمالین ۱۰٪ قرار داده شد. ۴۸ ساعت بعد تعویض فرمالین انجام گرفته و جهت بررسی از لحاظ بافت شناسی آماده شد. به صورتی که پس از تهیه برش‌های بافتی به روش استاندارد و روتین قالب‌های پارافینی و رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، مطالعات کیفی هیستولوژیک و کمی استریولوژیک به روش فیزیکی و اپتیکال دایسکتور بر روی نمونه‌های بافتی پوست صورت گرفت. در هر نمونه، ۱۰ برش صورت گرفته و به ازای هر مقطع بافتی ۵ میدان میکروسکوپی مورد بررسی بافت شناسی قرار گرفت. به منظور مطالعات هیستومورفومتریک و استریولوژیک پوست، ۲۰ تا ۲۲

چرخه‌ی آستانه برای هر اجرا، به صورت دستی تعیین شد. آنالیز منحنی ذوب برای هر سیکل در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه، ۶۵ درجه سانتی - گراد به مدت ۲۵ ثانیه، ۹۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۰ ثانیه، با نرخ بارگیری ۰/۱ درجه سانتی‌گراد بر ثانیه و ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. مقایسه میزان بیان ژن نمونه‌ها با گروه شاهد، به وسیله نرم افزار 2009 REST© software انجام گرفت. کارایی آزمون PCR نیز با منحنی های استاندارد برپایه رقت‌های ده تایی به دست آمده از تکرارهای محصول PCR تعیین گردید.

آزمایش‌های بافت شناسی

مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. معنی دار بودن تفاوت داده‌ها در شرایط $p < 0.05$ مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج

نتایج آزمایش‌های مولکولی

میزان بیان ژن کد کننده لیزوزیم در سه گروه تیمار، نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی داری را نشان داد ($p < 0.05$). همچنین، میزان بیان ژن در گروه‌های دریافت کننده دوز متوسط و دوز بالا، نسبت به گروه دریافت کننده دوز پایین افزایش معنی‌داری داشت ($p < 0.05$). علاوه بر آن، میزان بیان ژن کد کننده TNF- α در گروه‌های دریافت کننده دوز متوسط و دوز بالا، نسبت به گروه دریافت کننده دوز پایین و گروه کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان داد و بیشترین میزان افزایش، در گروه دریافت کننده دوز بالا مشاهده شد ($p < 0.05$) (جدول ۲).

عدد مقطع بافتی، به طور تصادفی از هر بلوک پارافینی انتخاب شده و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. فاکتورهای مورد مطالعه شامل ضخامت لایه اپیدرمیس، تعداد سلول‌های جامی شکل و هشداردهنده بود. ضخامت لایه اپیدرمیس در سه ناحیه اندازه‌گیری شده و میانگین ضخامت، مد نظر قرار گرفت. برای تخمین تراکم سلول‌های هشدار دهنده در اپیدرمیس، تعداد این سلول‌ها در خطی به طول ۱ میلی‌متر مورد شمارش قرار گرفت (Heidarieh *et al.*, 2013). تراکم حجمی سلول‌های هشدار دهنده در اپیدرمیس نیز به روش شمارش نقطه‌ای تخمین زده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج به صورت خطای استاندارد \pm میانگین گزارش شده است. ارزش آماری داده‌ها توسط آزمون آماری یک‌طرفه واریانس‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت که به این منظور از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲.۰ استفاده شد. همچنین، داده‌ها به وسیله‌ی تحلیل آماری (Least Significant Differences) جهت مقایسه‌ی میانگین‌ها

جدول ۲: نتایج مولکولی ماهی‌قمرهای تغذیه شده با تروگزروتین در یک دوره ۸۰ روزه

گروه‌های تیمار شده با تروگزروتین				موارد
دوز بالا (۰/۵g/kg)	دوز متوسط (۰/۳g/kg)	دوز پایین (۰/۱g/kg)	گروه کنترل	
۴/۲۱ \pm ۰/۱۹ ^c	۴/۲۹ \pm ۰/۱۴ ^c	۳/۰۱ \pm ۰/۱۰ ^b	۱/۰۰ \pm ۰/۰۴ ^a	لیزوزیم
۵/۳۰ \pm ۰/۳۰ ^c	۳/۱۸ \pm ۰/۲۰ ^b	۱/۴۹ \pm ۰/۰۵ ^a	۱/۰۱ \pm ۰/۰۵ ^a	TNF- α

*داده‌ها شامل خطای استاندارد \pm میانگین می باشند. داده‌های نشان داده شده با حروف مختلف در یک ردیف دارای تفاوت معنی‌دار با یکدیگر هستند

($p < 0.05$)

نتایج بافت شناسی

در گروه‌های دریافت کننده تر وگروتین تغییرات مشخصی در تعداد، پراکنش و اندازه سلول‌های سلول‌های هشدار دهنده نشان داده شد. تعداد سلول‌های هشدار دهنده در گروه‌های دریافت کننده تر وگروتین افزایش یافت و با افزایش دوز تیمار شده، اندازه

سلول‌های هشدار دهنده نیز افزایش یافت به نحوی که بخش زیادی از اپیدرم را در برگرفت ($p < 0.05$) (جدول ۲)، اما تفاوت معنی‌داری در ضخامت اپیدرم در گروه‌های مختلف تیمار و کنترل مشاهده نگردید ($p > 0.05$).

جدول ۳: مشخصات هیستومورفومتری و استریولوژیک اپیدرم پوست ماهی قمرزهای تغذیه شده با تر وگروتین در یک دوره ۸۰ روزه

موارد	گروه کنترل	دوز پایین (۰/۱g/kg)	دوز متوسط (۰/۳g/kg)	دوز بالا (۰/۵g/kg)
ضخامت اپیدرم (میکرومتر)	۱۲۳/۸۰ ± ۲/۲۰	۱۲۲/۰۰ ± ۲/۳۰	۱۱۸/۸۰ ± ۱/۹۸	۱۲۳/۸۰ ± ۲/۰۸
تراکم سلول‌های هشدار دهنده در هر میلی‌متر از طول اپیدرم	۷۹/۸۰ ± ۲/۸۹ ^a	۱۰۱/۰۰ ± ۳/۳۶ ^b	۹۶/۰۰ ± ۳/۵۶ ^b	۱۰۰/۰۰ ± ۳/۰۸ ^b
نسبت حجمی سلول‌های هشدار دهنده به اپیدرم (%)	۳۱/۴۰ ± ۲/۰۶ ^a	۵۱/۴۰ ± ۲/۴۲ ^b	۶۳/۰۰ ± ۲/۷۴ ^c	۶۵/۸۰ ± ۱/۳۲ ^c

* داده‌ها شامل خطای استاندارد ± میانگین می باشند. داده‌های نشان داده شده با حروف مختلف در یک ردیف دارای تفاوت معنی‌دار با یکدیگر هستند

($p < 0.05$)

بحث

به طور کلی مصرف برخی افزودنی‌ها و مکمل‌های غذایی نظیر ترکیبات گیاهی، پروبیوتیک‌ها، پری بیوتیک‌ها و دیگر مواد محرک ایمنی، می‌تواند مستقیماً مکانیسم‌های دفاعی اولیه ماهی را از طریق اثر بر گیرنده‌ها و ژن‌های مسئول، فعال سازد که این موضوع به نوبه خود، باعث افزایش مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا و انواع تنش‌های محیطی می‌شود (نژاد مقدم و همکاران، ۱۳۹۶). نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر نیز، نشان داد که مصرف تر وگروتین می‌تواند تاثیرات بسیار خوبی را بر روی سیستم ایمنی مخاطی ماهیان، بر جای گذارد. به طوری که این ماده قادر است بیان ژن-های دخیل در ایمنی مخاطی ماهی از جمله لیزوزیم و

فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا را به شکل معناداری افزایش دهد. لیزوزیم‌ها دسته‌ای از آنزیم‌های موکولیتیک هستند که دارای توانایی از بین بردن میکروب‌ها بوده و در موکوس، بافت‌های لنفاوی، پلازما و مایعات دیگر یافت می‌شوند (Saurabh and Sahoo, 2008). آن‌ها توانایی فعال‌سازی سیستم کمپلمان را داشته و علاوه بر نقش حفاظتی خود در برابر باکتری‌ها، ماهی را از آسیب‌های ناشی از عوامل بیماری‌زای انگلی نیز حفظ می‌کنند (Parida et al., 2018). هم‌راستا با مطالعه حاضر، در برخی مطالعات، اثرات مثبت ترکیبات گیاهی بر میزان فعالیت لیزوزیم پوست ماهی نشان داده شد. به عنوان مثال، در مطالعه‌ای، مصرف نوعی گیاه (*Moringa oleifera*) در

لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (*Lactobacillus acidophilus*) در پوست ماهی طلائی صورت گرفت، مشخص شد که مصرف این ماده به میزان $10^8 \times 6$ باکتری به ازای هر گرم، باعث افزایش بیان برخی ژن-های مرتبط با ایمنی نظیر $TNF-1\alpha$ و $TNF-2\alpha$ می-گردد (Hosseini et al., 2016). هم‌چنین، در مطالعه دیگری که با هدف بررسی اثرات عصاره خرما در پوست کپور معمولی صورت گرفت، مشخص شد که مصرف این ماده می‌تواند موجب افزایش بیان ژن ترکیبات ایمنی اختصاصی نظیر لیزوزیم، $TNF-\alpha$ ، $IL-1$ و $IL-8$ گردد (Hoseinifar et al., 2015). در مطالعات گذشته مشخص گردید که ترکیبات فنلی به سختی از ناحیه روده جذب می‌شوند. اما متابولیزه شدن این ترکیبات توسط فلور دستگاه گوارش، سبب تولید ترکیبات قابل جذب از ناحیه روده می‌شود که اثرات موضعی (local) و یا عمومی برجای می‌گذارند (Oteiza et al., 2018). ممکن است این سازوکار، علت اصلی اثرگذاری ترکیب ترোগزروتین بر سیستم ایمنی روده و در نتیجه تاثیر آن بر سیستم ایمنی عمومی و مخاطی باشد.

بررسی مقاطع بافت شناسی در پایان دوره مطالعه حاضر، نشان داد که مصرف ترোগزروتین می‌تواند بر بهبود ساختاری بافت پوست و لایه اپیدرم آن کاملاً موثر باشد. چرا که تغییرات قابل توجهی در تعداد، پراکنش و اندازه سلول‌های ترش‌حی به ویژه سلول‌های هشدار دهنده رخ داده است. تعداد سلول‌های هشدار دهنده در گروه‌های دریافت کننده ترোগزروتین افزایش یافته است و با افزایش دوز تیمار شده، اندازه سلول‌های هشدار دهنده نیز افزایش یافته به نحوی که بخش زیادی از اپیدرم را در بر گرفته‌اند. در مطالعه‌ای که در رابطه با

ماهی سیم سرطلایی دریایی (*Sparus aurata*) سبب تقویت فعالیت لیزوزیم در پوست گردید (Mansour et al., 2018). هم‌چنین، در مطالعه‌ای دیگر، مصرف کورکومین در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) به مدت ۸ هفته سبب افزایش فعالیت لیزوزیم پوست گردید (Giri et al., 2019).

فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا، به عنوان یک سیتوکین پیش التهابی، از نخستین ژن‌های ایمنی بیان شونده در مراحل ابتدایی درگیری با عوامل عفونی در ماهیان بوده و نقش کلیدی در تنظیم واکنش‌های التهابی دارد. تومور نکروز دهنده آلفا ($TNF-\alpha$) در ماهیان، همانند پستانداران، دارای اعمال هم‌پوشاننده با اینترلوکین ۱ بتا ($IL-1\beta$) می‌باشد. بسیاری از فاکتورهای نکروز دهنده تومور آلفا در ماهی، قادر به فعال‌سازی ماکروفاژها / فاگوسیت‌ها بوده و عملکرد میکروب-کشی آن‌ها را تقویت می‌کنند (Garcia-Castillo et al., 2004). هم‌چنین، $TNF-\alpha$ فعالیت بیگانه‌خواری در لکوسیت‌های ماهیان را تقویت می‌کند (Grayfer et al., 2008). در صنعت آبرزی پروری، طیف وسیعی از مواد محرک ایمنی تا کنون مورد استفاده قرار گرفته و مطالعات زیادی به منظور ارزیابی اثرات استفاده از محرک‌های ایمنی خوراکی از جمله مشتقات انواع جلبک‌ها و عصاره‌های گیاهی در جیره غذایی، به منظور بهبود ایمنی مخاطی ماهیان صورت گرفته است (Vallejos-Vidal et al., 2016). به عنوان مثال، در مطالعه‌ای، مصرف خوراکی عصاره عناب (*Ziziphus jujube*) حاوی ترکیبات فنلیک مانند روتین سبب افزایش بیان ژن کد کننده $TNF-\alpha$ در پوست ماهی کپور معمولی گردید (Hoseinifar et al., 2019). در مطالعه‌ای دیگر که با هدف ارزیابی اثرات پروبیوتیک

سلول های هشدار دهنده و نسبت حجمی این سلول ها به اپیدرم پوست برخوردار است. در کل، مطالعات بیشتری در زمینه اثرات تر وگزر و تین بر سیستم ایمنی مخاطی ماهی در زمان چالش با انواع عوامل بیماری زا مورد نیاز می باشد.

سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز انجام گرفته است.

منابع

۱. صابری اصل، ا.، تقی زاده، و.، ایمانپور، م.، ۱۳۹۷. مقایسه اثرات تزریق هورمون های اوپریم، HCG و عصاره هیپوفیز ماهی باربوس روی پارامترهای اسپرم شناختی ماهی قرمز (*Carassius auratus gibelio*). نشریه توسعه آبروی پروری، ۱۲(۲)، ۶۳-۷۴.
۲. کریمیان کاکلکی، س.، شالویی، ف.، شادخواست، م.، عرب مارکده، م.، ۱۴۰۰. اثر جایگزینی سولفات مس با نانو اکسید مس در جیره غذایی بر فعالیت آنزیم های گوارشی و آسیب شناسی بافت روده ماهی قرمز (*Carassius auratus*). نشریه توسعه آبروی پروری، ۱۵(۲)، ۱۱۵-۱۲۸.
۳. موسوی، ش.، شیخ زاده، ن.، مرندی، م.، ۱۳۹۹. اثر جیره های غذایی حاوی روغن سیاه دانه (*Nigella sativa*) بر عملکرد رشد، شاخص های آنتی اکسیدان و بیوشیمیایی و فعالیت آنزیم گوارشی در سیچلاید الکتریک زرد (*Labidochromis caeruleus*). مجله شیلات، ۷۳(۴)، ۴۷۱-۴۸۲.
۴. موسوی، ش.، شیخ زاده، ن.، مرندی، م.، ۱۴۰۰. مطالعه اثر تر وگزر و تین خوراکی بر مقاومت در برابر

بررسی سرعت ترمیم زخم در تعدادی گربه ماهی آفریقایی تغذیه شده با جیره های حاوی مکمل اسید- اسکوربیک صورت گرفت، مشخص شد که با گذشت ۱۰ روز از جراحی، ضخامت لایه اپیدرم بیشتر شده است. هم چنین، تعداد سلول های مالپیگی، موکوسی و هشدار دهنده افزایش یافته است. در مطالعه دیگری که در زمینه بررسی تاثیر اسپیرولینا پلاتنسیس در بهبود واکنش های ایمنی مخاطی قزل آلاهی رنگین کمان صورت گرفت، بررسی مقاطع بافتی پوست، افزایش قابل توجهی را در تراکم حجمی سلول های جامی شکل ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی حاوی اسپیرولینا پلاتنسیس نشان داد. اگرچه تغییر محسوسی در ضخامت اپیدرمیس و تراکم سلول های جامی شکل این ماهیان به وجود نیامد (Sheikhzadeh et al., 2019). در مطالعه- ای دیگر که راجع به اثرات جیره غذایی حاوی آلئوئه ورا بر مورفولوژی بافت پوست قزل آلاهی رنگین کمان شامل یک گروه کنترل و سه گروه تیمار (به ترتیب ۰.۰۱، ۰.۱، ۱ میلی گرم بر کیلوگرم) صورت گرفت، مشخص شد که تعداد سلول های موکوسی و ضخامت اپیدرم پوست در ماهی های تغذیه شده با مقدار بالای آلئوئه ورا در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی داری یافت (Heidarieh et al., 2013).

در مطالعه حاضر، استفاده از تر وگزر و تین، به ویژه در دوز بالا (۰/۵ گرم در کیلوگرم) سبب بهبود فاکتورهای ایمنی و ساختار بافت شناسی در ماهی قرمز گردید به صورتی که افزایش معنی داری در میزان بیان ژن های مرتبط با ایمنی نظیر لیزوزیم و فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا در پوست ماهیان مشخص گردید. بررسی مقاطع بافتی پوست ماهی ها نیز نشان داد که تر وگزر و تین از توانایی ویژه ای جهت افزایش تراکم

- Cyprinus carpio*. Fish & shellfish immunology, 92, 612-620.
12. Grayfer, L., Walsh, J.G. and Belosevic, M., 2008. Characterization and functional analysis of goldfish (*Carassius auratus* L.) tumor necrosis factor-alpha. Developmental & Comparative Immunology, 32, 532-543.
 13. Gui, Y., Li, A., Chen, F., Zhou, H., Tang, Y., Chen, L., Chen, S. and Duan, S., 2015. Involvement of AMPK/SIRT1 pathway in anti-allodynic effect of troxerutin in CCI-induced neuropathic pain. European journal of pharmacology, 769, 234-241.
 14. Harikrishnan, R., Kim, M.C., Kim, J.S., Han, Y.J., Jang, I.S., Balasundaram, C. and Heo, M.S., 2010. Immune response and expression analysis of cathepsin K in goldfish during *Aeromonas hydrophila* infection. Fish & shellfish immunology, 28, 511-516.
 15. Heidarieh, M., Mirvaghefi, A.R., Sepahi, A., Sheikhzadeh, N., Shahbazfar, A. and Akbari, M., 2013. Effects of dietary Aloe vera on growth performance, skin and gastrointestinal morphology in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 13, 367-373.
 16. Hosseini, M., Miandare, H.K., Hoseinifar, S.H. and Yarahmadi, P., 2016. Dietary Lactobacillus acidophilus modulated skin mucus protein profile, immune and appetite genes expression in gold fish (*Carassius auratus gibelio*). Fish & shellfish immunology, 59, 149-154.
 17. Hoseinifar, S.H., Khalili, M., Rufchaei, R., Raeisi, M., Attar, M., Cordero, H. and Esteban, M.Á., 2015. Effects of date palm fruit extracts on skin mucosal immunity, immune related genes expression and growth performance of common carp (*Cyprinus carpio*) fry. Fish & shellfish immunology, 47, 706-711.
 18. Hoseinifar, S.H., Zou, H.K., Van Doan, H., Harikrishnan, R., Yousefi, M., Paknejad, H. and Ahmadifar, E., 2019. Can dietary jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) fruit extract alter cutaneous mucosal immunity, immune related genes expression in skin and growth performance of common carp (*Cyprinus* انگل ایکتیوفتیریسوس مولتی فیلیس *Ichthyophthirius multifiliis*) در ماهی قرمز (*Carassius auratus*). مجله علمی شیلات ایران، ۳۰(۴)، ۹۵-۱۰۵.
 ۵. نژاد مقدم، ش.، صفری، ر.، نهاوندی، ر.، ۱۳۹۶. بررسی کاربرد محرک‌های ایمنی در آبی پروری و اثرات آن‌ها بر بیان ژن‌های دخیل در ایمنی ماهی. آبریان زینتی، ۴(۱)، ۳۷-۴۵.
 6. Ardó, L., Yin, G., Xu, P., Váradi, L., Szigeti, G., Jeney, Z. and Jeney, G., 2008. Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lonicera japonica*) and boron enhance the non-specific immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and resistance against *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture, 275, 26-33.
 7. Bai, S.C. and Gatlin, D.M., 1992. Dietary rutin has limited synergistic effects on vitamin C nutrition of fingerling channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Fish Physiology and Biochemistry, 10, 183-188.
 8. Fan, S.H., Zhang, Z.F., Zheng, Y.L., Lu, J., Wu, D.M., Shan, Q., Hu, B. and Wang, Y.Y., 2009. Troxerutin protects the mouse kidney from d-galactose-caused injury through anti-inflammation and anti-oxidation. International immunopharmacology, 9, 91-96.
 9. Formica, J.V. and Regelson, W., 1995. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. Food and chemical toxicology, 33, 1061-1080.
 10. Garcia-Castillo, J., Chaves-Pozo, E., Olivares, P., Pelegin, P., Meseguer, J. and Mulero, V., 2004. The tumor necrosis factor α of the bony fish seabream exhibits the in vivo proinflammatory and proliferative activities of its mammalian counterparts, yet it functions in a species-specific manner. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 61, 1331-1340.
 11. Giri, S.S., Sukumaran, V. and Park, S.C., 2019. Effects of bioactive substance from turmeric on growth, skin mucosal immunity and antioxidant factors in common carp,

- of fish innate immune system. *Aquaculture research*, 39, 223-239.
26. Sheikhzadeh, N., Mousavi, S., Hamidian, G., Firouzmandi, M., Oushani, A.K. and Mardani, K., 2019. Role of dietary *Spirulina platensis* in improving mucosal immune responses and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 510, 1-8.
 27. Tu, X., Qi, X., Huang, A., Ling, F. and Wang, G., 2019. Cytokine gene expression profiles in goldfish (*Carassius auratus*) during *Gyrodactylus kobayashii* infection. *Fish & shellfish immunology*, 86, 116-124.
 28. Vallejos-Vidal, E., Reyes-López, F., Teles, M. and MacKenzie, S., 2016. The response of fish to immunostimulant diets. *Fish & shellfish immunology*, 56, 34-69.
 29. Zheng, Y., Zhao, Z., Fan, L., Meng, S., Song, C., Qiu, L., Xu, P. and Chen, J., 2017. Dietary supplementation with rutin has pro-/anti-inflammatory effects in the liver of juvenile GIFT tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & shellfish immunology*, 64, 49-55.
 30. (unnumbered in original) of fish innate immune system. *Aquaculture research*, 39, 223-239.
 31. (unnumbered in original) *carpio*?. *Fish & shellfish immunology*, 94, 705-710.
 19. Jinendiran, S., Nathan, A.A., Ramesh, D., Vaseeharan, B. and Sivakumar, N., 2019. Modulation of innate immunity, expression of cytokine genes and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish (*Carassius auratus*) by dietary supplementation with *Exiguobacterium acetylicum* S01. *Fish & shellfish immunology*, 84, 458-469.
 20. Mansour, A.T., Miao, L., Espinosa, C., García-Beltrán, J.M., Francisco, D.C.C. and Esteban, M.Á., 2018. Effects of dietary inclusion of *Moringa oleifera* leaves on growth and some systemic and mucosal immune parameters of seabream. *Fish physiology and biochemistry*, 44, 1223-1240.
 21. Nazeri, S., Farhangi, M. and Modarres, S., 2017. The effect of different dietary inclusion levels of rutin (a flavonoid) on some liver enzyme activities and oxidative stress indices in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) exposed to Oxytetracycline. *Aquaculture Research*, 48, 4356-4362.
 22. Oteiza, P.I., Fraga, C.G., Mills, D.A., Taft, D.H., 2018. Flavonoids and the gastrointestinal tract: Local and systemic effects. *Molecular Aspects of Medicine*, 61, 41-49.
 23. Parida, S., Mohapatra, A., Kar, B., Mohanty, J. and Sahoo, P.K., 2018. Transcriptional analysis of immune-relevant genes in the mucus of *Labeo rohita*, experimentally infected with *Argulus siamensis*. *Acta parasitologica*, 63, 125-133.
 24. Pês, T.S., Saccol, E.M., Ourique, G.M., Londero, É.P., Gressler, L.T., Finamor, I.A., Rotili, D.A., Golombieski, J.I., Glanzner, W.G., Llesuy, S.F. and Gonçalves, P.B., 2016. Effect of diets enriched with rutin on blood parameters, oxidative biomarkers and pituitary hormone expression in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Fish physiology and biochemistry*, 42, 321-333.
 25. Saurabh, S. and Sahoo, P.K., 2008. Lysozyme: an important defence molecule