

اثرات عصاره هیدروالکلی گیاه آنگوزه (*Ferula assafoetida*) در جیره غذایی بر بیان

ژن‌های مرتبط با ایمنی (TNF-alpha و IL1B) در ماهی گورخری (*Danio rerio*)

رقیه صفری^۱، فاطمه واحدی امیری^۲، علی شعبانی^۳، سید حسین حسینی فر^۱، حامد کلنگی میاندره^۱

۱- استادیار، گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
fisheriesafari@yahoo.com

۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۳- دانشیار، گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱/۲۰

چکیده

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

روش کار: بدین منظور ماهیان با میانگین وزنی 0.3 ± 0.1 گرم با غذای حاوی سه سطح مختلف ۰/۵، ۱، و ۲ درصد عصاره فرولا و یک گروه شاهد با جیره پایه به مدت ۸ هفته تغذیه شدند. در پایان دوره از بافت روده نمونه برداری و RNA از نمونه های روده استخراج و cDNA سنتز گردید، بررسی با روش Real Time PCR و استفاده از آغازگرهای اختصاصی TNF-alpha و IL-1 صورت پذیرفت.

یافته ها: نتایج افزایش میزان بیان ژن هر دو ژن در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی عصاره آنگوزه در سطح ۲٪ را نشان داد که این افزایش از نظر آماری در ژن TNF-alpha با تیمارهای ۰/۵٪ و ۱٪ معنی دار بود ($P < 0.05$). در بررسی بیان ژن IL-1، هرچند در تیمار از نظر آماری اختلاف معنی داری بین تیمارهای تغذیه شده با آنگوزه مشاهده نشد ($P > 0.05$)، اما تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ۲٪ عصاره آنگوزه میزان بیان بالاتری را نشان داد.

نتیجه گیری: بر اساس نتایج به نظر می رسد استفاده از عصاره هیدروالکلی گیاهی آنگوزه می تواند به واسطه افزایش بیان نسبی سایتوکین های التهابی به بهبود وضعیت ایمنی در ماهی گورخری کمک نماید.

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

مقدمه

سیستم ایمنی تمایل نشان دهند. در مزارع پرورش ماهی و هجری ها آنتی بیوتیک ها، واکسن ها و برخی مواد شیمیایی به عنوان محرک ایمنی در برابر ویروس ها، باکتری ها، انگل ها و بیماری های قارچی استفاده می شود. استفاده از آنتی بیوتیک ها و پیش گیری کننده های شیمیایی در مقابل بیماری آبزیان دارای عوارضی چون ایجاد مقاومت در عامل بیماری نسبت به دارو، تجمع زیستی در گوشت آبزیان، آلودگی محیط زیست و بیمار نمودن انسان به باکتری های مقاوم شده است (۳). به همین جهت در سال-

با توجه به افزایش جمعیت جهان و نیاز به تامین مواد غذایی از منابع مختلف، صنعت آبزی پروری رشد قابل توجهی داشته و به سمت سیستم های متراکم و فوق متراکم پیش رفته است (۴)، که نیاز به کنترل کیفیت آب، تغذیه و پیشگیری از بیماری ها بیش از پیش احساس می گردد (۲۵). نقش مهم سیستم ایمنی در حفظ سلامت آبزیان و تضمین بقاء و رشد مناسب آن ها در طول دوره پرورش، سبب شده تا محققین به استفاده از انواع ترکیبات شیمیایی و طبیعی محرک و تقویت کننده

ضد ویروسی، ضد اسپاسمی، ضد سرطانی و کاهش دهنده فشارخون این گیاه را نشان داده است (۳۵). سیستم ایمنی ماهیان همانند سایر مهره‌داران از اندام‌ها در برابر عوامل بیماری‌زا دفاع می‌کند. سایتوکین‌ها گلیکوپروتئین‌های محلول می‌باشند که در تنظیم عملکرد سیستم ایمنی نقش عمده‌ای دارند. این ترکیبات دارای گیرنده‌هایی بر سلول‌های هدف بوده و با اتصال به گیرنده اثر خود را بر سلول القاء می‌کنند. در سیستم ایمنی ماهی‌ها و در ارتباط با التهابات مولکول سایتوکینی فاکتور نکروزکننده تومور (TNF) نقش مهمی دارد که به دنبال تحریک سیستم ایمنی از گلبول‌های سفید ترشح می‌شود (۱۷، ۱۶). اینترلوکین‌ها، سایتوکین‌هایی می‌باشند که از لکوسیت ترشح و بین سایر لکوسیت‌ها اثر می‌کند. IL-1B نقش مهمی در پاسخ میزبان به تهاجم میکروبی، آسیب بافتی و واکنش ایمنولوژیک ایفا می‌نماید (۱۰). ماهی گور-خری (*Dani orerio*) ماهی با اندازه کوچک (معمولاً کم‌تر از ۴۰ میلی‌متر) از گونه‌های آب شیرین مناطق گرمسیری بومی پاکستان و هند و ساکن آب‌های کم‌عمق است (۲۱). با توجه به مزایای آن از جمله سهولت تکثیر و وسیع بودن دامنه تحمل حرارتی، این گونه توانسته است نظر علاقمندان زیادی را به خود جلب نموده و در بسیاری از آزمایشات (ژنتیک مولکولی و تحقیقات زیست پزشکی) از آن به‌عنوان مدل آزمایشگاهی استفاده می‌نمایند (۲۹). در مطالعه پیشین صفری و همکاران، اثر پودر گیاه آنگوزه بر بهبود وضعیت ایمنی ماهی کپور بررسی نموده و اثرات مثبت آن را مشاهده کرده است (۲۶). از آن جا که گزارشی در رابطه با اثر عصاره هیدروالکلی این گیاه بر ایمنی ماهی گورخری صورت نگرفته است مطالعه حاضر با هدف بررسی این عصاره بر بیان ژن‌های دخیل در ایمنی (TNF-alpha و IL-1) صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی و سازگاری به شرایط آزمایشگاهی

های اخیر جهت پیش‌گیری، کنترل بیماری یا افزایش ایمنی به افزودن مکمل‌های غذایی طبیعی توجه بیشتری شده است. از آن جایی که برخی گیاهان دارویی دارای طیف وسیعی از خواص مفید از جمله تحریک و تقویت سیستم ایمنی هستند، در بسیاری از کشورها استفاده از محرک‌های ایمنی گیاهی برای کنترل بیماری، افزایش پاسخ ایمنی ذاتی و اکتسابی ماهی توسعه یافته است (۱۸). استفاده از گیاهان دارویی در جیره غذایی ماهی، موجب بهبود عملکرد سیستم ایمنی مانند افزایش فعالیت ضد باکتریایی، افزایش فعالیت لیزوزیم، پاسخ آنتی‌بادی و افزایش بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی در ماهی می‌شود (۱۹). مطالعات متعددی در زمینه تعیین اثرات مثبت گیاهان دارویی به‌عنوان محرک ایمنی طبیعی جایگزین مواد شیمیایی در آبی‌پروری صورت گرفته است که از آن جمله می‌توان به بررسی اثرات گیاه گلپر بر ماهی (*Malabaricus epinephelus*) (۳۲)، عصاره سیر بر ماهی (*Lates calcarifer*) (۳۱)، عصاره سرخار گل (*Echinacea purpurea*) بر ماهی قزل‌آلای رنگین-کمان (*Oncorhynchus mykiss*) (۲۳)، عصاره خرما و گیاه غازیاقی (*Falcaria vulgaris*) بر ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) (۲۰، ۸) و گیاه گون (*Glycyrrhizaglabra*) و شیرین بیان (*Astragalus membranaceus*) بر ماهی سوف زرد (*Percafla vescens*) اشاره نمود (۱۲). گیاه آنگوزه با نام علمی (*Ferula assa foetida*)، بومی ایران و افغانستان یک گیاه چندساله از خانواده چتریان است. صمغ آنگوزه حاوی فرولیک اسیدو استرهای کومارینی فوئیدین و کامولونول، آمبلی‌فرون، فرانسی‌فرول، تتراسولفیدها، سزکویی‌ترپن‌ها، گلوکز، گالاکتوز، رامنوز، پلی-ساکاریدها، گلیکوپروتئین‌ها و هم‌چنین روغن‌های فرار سولفور و ترپنوئیدها می‌باشد (۲۴). مطالعات دارویی و بیولوژیکی خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد قارچی،

سرخار گل با استفاده از افزودن ۲۰ g پودر گیاه آنگوزه و ۴۰۰ میلی لیتر متانول ۶۰٪ تهیه شد. بدین منظور مخلوط آماده شده با گذشت زمان مورد نظر محتویات موجود در ارلن را از روی چند گاز استریل عبور داده تا رسوبات از عصاره جدا و محلول صاف شده را با کاغذ صافی والتمن صاف و به یک بشر ضد عفونی شده منتقل و با دستگاه روتاری حلال موجود حذف شد، سپس در دستگاه خشک کن انجمادی به پودر خشک تبدیل گردید (۹). بعد از تهیه عصاره، ابتدا جیره پایه (غذای بیومار) با ترازوی دیجیتال با نشان تجاری AND EK610i با دقت ۰/۰۰۱ گرم توزین و به نسبت وزن غذا برای سطوح مختلف، عصاره آنگوزه به صورت محلول در ژلاتین ۵ درصد روی غذا به صورت یکنواخت اسپری و مخلوط شد. جیره های آماده شده در هوای محیط آزمایشگاه خشک و در پلاستیک های زیپ دار قرار داده شده و تا زمان مصرف به یخچال با دمای ۴ درجه سانتی گراد منتقل گردیدند. غذاهای به میزان ۵٪ وزن بدن به طور روزانه در طی ۴ الی ۵ نوبت صورت گرفت.

نمونه برداری، استخراج RNA، سنتز cDNA

بعد از ۲ ماه پرورش و تغذیه با سطوح مختلف آنگوزه، جهت بررسی میزان بیان ژن مرتبط با ایمنی (TNF-alpha, IL1B) در شرایط استریل از روده ماهی ها نمونه برداری شد. از هر تکرار ۳ ماهی نمونه برداری و با استفاده از پودر گل میخک با دوز ۲۰۰ ppm بی هوش و پس از آن سطح بدن با پنبه آغشته به الکل استریل شده و به سرعت ناحیه شکم ماهی باز گردید. بافت روده جدا شده و پس از جمع آوری، به داخل تیوپ های از قبل استریل شده ریخته و بلافاصله تیوپ ها به تانک ازت انتقال داده شدند. در پایان نمونه برداری نمونه ها در یخچال ۸۰- درجه سانتی گراد قرار داده شدند و تا زمان استفاده جهت استخراج RNA در آن جا نگهداری گردیدند. استخراج RNA بر اساس روش متوسط

بچه ماهی های گورخری از مرکز خصوصی تکثیر و پرورش ماهیان زینتی واقع در شصت کلا، استان گلستان تهیه و با پلاستیک های محتوی یک سوم آب و دو سوم هوا به مرکز تحقیقات آبی پروری شهید فضلای برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شدند. ابتدا ماهیان جهت انگل زدایی و بهبود استرس ناشی از حمل و نقل در آب نمک (NaCl) به غلظت ۲ درصد به مدت ربع ساعت حمام داده شدند و مدت ۴۸ ساعت جهت کاهش تلفات احتمالی و استرس غذادهی نشدند. جهت آدابتاسیون ماهیان به مدت ۲ هفته با شرایط آزمایشی عادت دهی گردیدند. در این ۲ هفته ماهیان با جیره غذایی پایه (بیومار) مورد تغذیه واقع شدند. طی این مدت روزانه ۵۰ درصد آب مخازن با آب شهری کلرزدایی شده تعویض شد.

طرح آزمایش و مدیریت مخازن

این آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی در ۴ تیمار و هر تیمار با ۳ تکرار انجام شد. تیمارها شامل گروه تغذیه شده (شاهد)، ۰/۵، ۱ و ۲ درصد عصاره هیدرو الکلی گیاه آنگوزه بودند (۲۶). به طور تصادفی تعداد ۵۰ عدد ماهی با میانگین وزنی حدود ۰/۳±۰/۰۱ گرم در آکواریوم های شیشه ای ۵۰ لیتری ذخیره سازی گردیدند. هوادهی آکواریوم ها با استفاده از سنگ هوای متصل به پمپ هواده صورت گرفت. در این آزمایش در طول دوره پرورش میانگین دمای آب ۲۵±۲ درجه سانتی گراد، دامنه pH ۷-۸ و میانگین اکسیژن ۷ میلی گرم در لیتر اندازه گیری شد.

تهیه غذا، عصاره و غذادهی

گیاه آنگوزه از شهرستان بی ارجمند استان سمنان در بهار ۱۳۹۵، جمع آوری و مورد تأیید اساتید گیاه شناسی دانشگاه گلستان قرار گرفت. اندام های هوایی پس از جدا شدن در سایه خشک گردیدند، سپس با استفاده از آسیاب برقی به صورت پودر در آمد. جهت تهیه عصاره هیدرو الکلی بر اساس دستورالعمل استخراج هیدرو الکلی گیاه

بیولوژیکی و ۳ تکرار تکنیکی با استفاده از ۱۰ میکرولیتر بافر سایبر گرین، ۱ میکرولیتر پرایمر پیش‌رونده و پس‌رونده، ۲/۸ میکرولیتر آب، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم tag polymerase و ۵ میکرولیتر cDNA رقیق شده (بر اساس غلظت) صورت گرفت (۶). ژن بتا اکتین به عنوان ژن خانه دار استفاده شد، علت استفاده از ژن بتا اکتین به عنوان ژن خانه دار ثبات بیان در مطالعات پیشین می‌باشد (۲۶). به منظور اطمینان از بهینه بودن شرایط qPCR، سری غلظت‌های مختلف (۱، ۱/۲، ۱/۵، ۱/۱۰، ۱/۲۰ و ۱/۵۰) از نمونه‌های cDNA مخلوط از تیمارهای متفاوت از بافت‌های مذکور تهیه و با هر دو پرایمر هدف و رفرنس در ۳ تکرار تکثیر و منحنی استاندارد جهت تخمین کارایی (E) و تکرارپذیری آزمایش برای هر پرایمر ترسیم شد (۶).

تجزیه و تحلیل آماری

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی برنامه‌ریزی و اجرا گردید. Ct به دست آمده برای ژن‌های ۱-TNF و IL-1 با استفاده از فرمول Ct^2 برابر است با Ct ژن هدف منهای Ct کالیبراتور (در فضای نرم‌افزار اکسل تبدیل به بیان نسبی ژن‌های مورد نظر نسبت به ژن رفرنس actin - گردید (۲۲). عدد به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۰ مرتب و نمودارهای آن رسم گردید.

نتایج

بررسی کیفی RNA

نتایج بررسی کیفی RNA استخراج شده از بافت روده ماهی گورخری در هر نمونه، دو باندها rRNA ۱۸S و ۲۸S را با وضوح بالا نشان داد. نسبت شدت جذب در نمونه‌های RNA استخراج شده در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر در محدوده ۲/۱-۱/۸ قرار داشت، هم‌چنین میزان جذب در طول موج‌های ۲۳۰، ۲۴۰ و ۳۲۰ نیز بیان‌گر قابلیت مناسب RNA در نمونه‌های مورد بررسی بود.

بررسی cDNA سنتز شده

ماده هضم‌کننده بایوزول انجام شد (۱). RNA کل از ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه بافت‌های روده هموژن شده با ازت مایع با استفاده از بایوزول و طبق دستورالعمل شرکت سازنده (Biozol-Bioflux- Bioer) استخراج گردید. کیفیت RNA کل با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد و مشاهده باندهای ۱۸S و ۲۸S مربوط به RNA ریبوزومی و کمیت آن با استفاده از نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر به دست آمده از دستگاه نانوفتومتر (IMPLEN-P100) ارزیابی شد. سپس به غلظت ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر با استفاده از آب DEPC رقیق شدند. جهت حذف هرگونه باقی‌مانده DNA ژنومی در نمونه‌های RNA، تیمار DNase I انجام و سپس اختراش هاول cDNA بر اساس روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز (Fermentase- France) با استفاده از ۵ میکرولیتر RNA تیمار شده با DNase I (غلظت ۵۰۰ نانوگرم)، ۱ میکرولیتر آغازگر الیگو dt (۲۰-۱۸ الیگونوکلئوتید) و ۵ میکرولیتر آب دیس انجام شد. بدین منظور تیوپ‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون و به سرعت روی یخ قرار گرفتند. ۴ میکرو لیتر بافر ۵X آنزیم نسخه‌بردار معکوس، ۲ میکرو لیتر dNTP ۱۰ میلی‌مولار و ۲۰ واحد آنزیم RNase inhibitor و ۱/۵ میکرو لیتر آب DEPC به مخلوط بالا اضافه شد. تیوپ‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفت. بلافاصله ۲۰۰ واحد آنزیم نسخه‌بردار معکوس به هر تیوپ اضافه گردید و به مدت ۱ ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند، سپس تیوپ‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید تا واکنش غیر فعال شود. به هر تیوپ ۳۸۰ میکرو لیتر آب DEPC اضافه و cDNAهای سنتز شده تا شروع آزمایش‌ها در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت بررسی بیان ژن‌های مربوطه (جدول ۱) Real time PCR در ۳ تکرار

پیک مشاهده شده در منحنی ذوب آغازگر برای هر محصول، بیانگر وجود یک محصول ویژه و تکثیر اختصاصی است (شکل ۴). در این مطالعه تغییرات بیان ژن IL-1 در تیمارهای آزمایشی تغذیه شده با عصاره گیاه آنگوزه و تیمار شاهد مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۵ نشان دهنده اثرات عصاره آنگوزه بر میزان بیان ژن IL ماهی گورخری است. همان طور که در نمودار مشخص است، از نظر آماری اختلاف معناداری بین بیان ژن IL-1 در تیمارهای تغذیه شده با عصاره آنگوزه مشاهده نشد ($P > 0.05$). پیک مشاهده شده در منحنی ذوب آغازگر برای هر محصول، بیانگر وجود یک محصول ویژه و تکثیر اختصاصی است (شکل ۶).

cDNA سنتز شده با پرایمر actin - طراحی شده برای این گونه تست و مشاهده باند در ۲۱۶bp سنتز صحیح DNA را تأیید نمود (شکل ۲).

الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵٪ و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید. مارکر ۱۰۰bp

نتایج ارزیابی اثرات عصاره گیاه آنگوزه بر تغییرات بیان ژن TNF- در شکل ۳ آورده شده است. بررسی میزان بیان ژن TNF- ماهی گورخری تحت تیمارهای آزمایشی حاکی از افزایش میزان بیان ژن در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی عصاره آنگوزه در سطح ۲٪ بود که از نظر آماری در مقایسه با سایر گروه های تغذیه شده افزایش معناداری را نشان داد ($P < 0.05$)، در حالی که اختلاف بین گروه های دیگر معنی دار نبود ($P > 0.05$).

جدول ۱- اطلاعات مربوط به توالی آغازگرهای استفاده شده

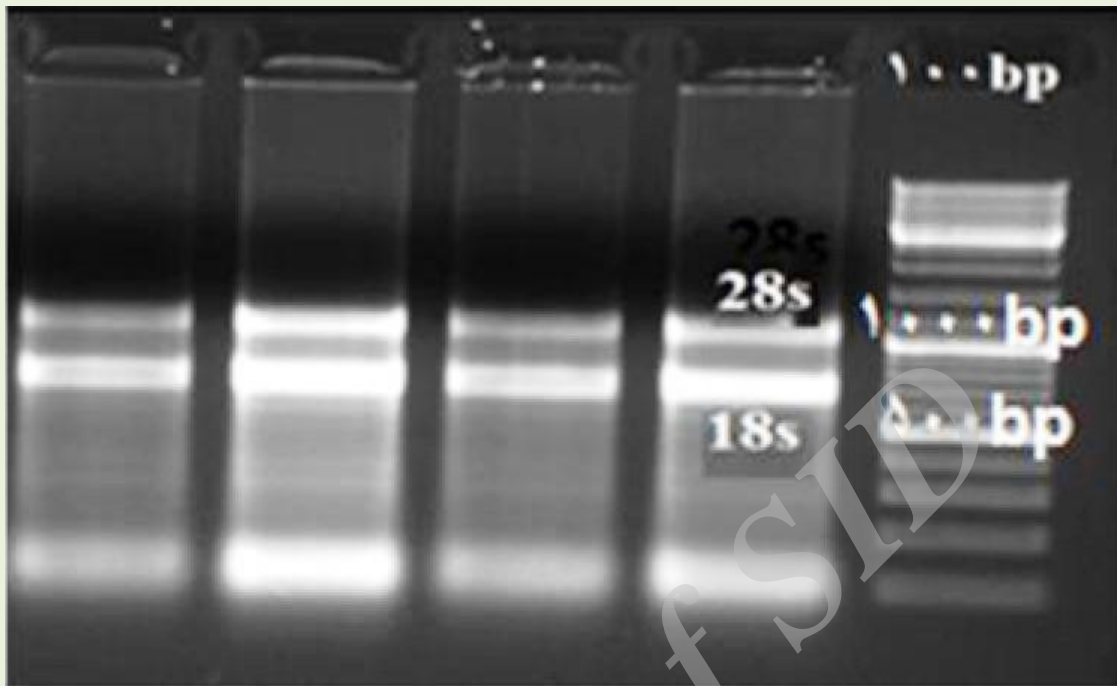
نام پرایمر	توالی (۳' - ۵')	دمای اتصال (C°)	کاربرد
TNF-alfa q-PCR	CTGCTTCACGCTCCATAAGA	۵۸	سنجش کمی بیان ژن های ایمنی
TNF-alfa q-PCR	CTGGTCCTGGTCATCTCTCC	۵۸	
IL-1 q-PCR	CGTCTCCACATCTCGTACTCA	۵۸	سنجش کمی بیان ژن های ایمنی
IL-1 q-PCR	GTGTCTTTCTGTCCATCTCC	۵۸	
- actin q-PCR	AGCAGATGTGGATCAGCAAG	۵۸	ژن خانه دار
- actin q-PCR	TACCTCCCTTTGCCAGTTTC		

ضدانگلی (۳۶) از گیاه آنگوزه نیز گزارش شده است. نتایج مطالعه حاضر حاکی از افزایش معنی دار بیان ژن TNF آلفا در ماهیان گورخری تغذیه شده با جیره حاوی عصاره گیاه آنگوزه در تیمار ۲٪ نسبت به سایر تیمارها و گروه شاهد می باشد ($P < 0.05$). با این حال در این مطالعه اختلاف معناداری در بیان ژن IL بین تیمارهای آزمایشی و تیمار شاهد مشاهده نشد ($P > 0.05$). نتایج مشابهی در ماهی شانک (*Sparus aurata*) تغذیه شده با جیره غذایی حاوی گیاه شنبلیله در بیان ژن TNF آلفا گزارش شد (۲). در بررسی اثر جلبک ساپرو لینا بر بیان ژن های ایمنی

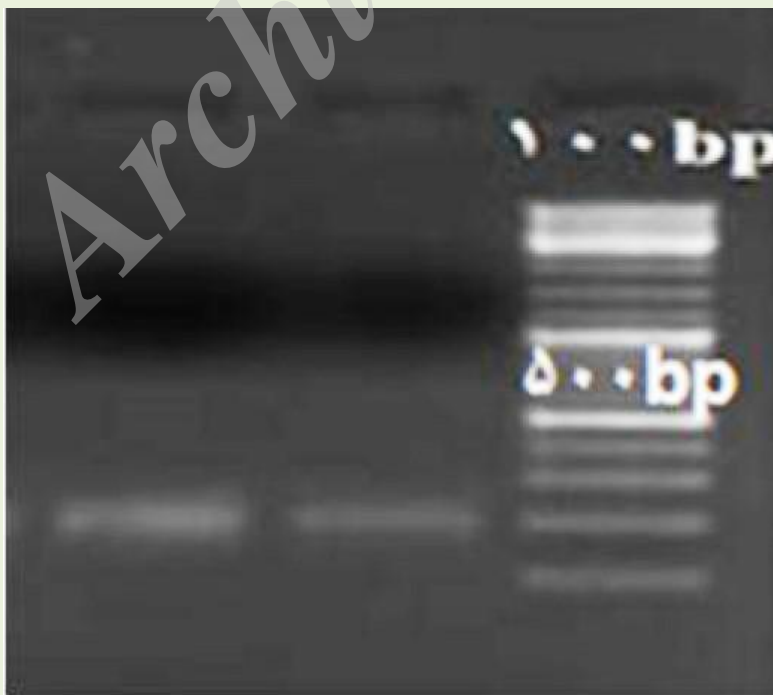
بحث و نتیجه گیری

در سال های اخیر تحقیقات گسترده ای در زمینه استفاده از گیاهان دارویی در جیره غذایی آبزیان جهت افزایش بهره وری از مواد غذایی و هم چنین بهبود وضعیت رشد و ایمنی این موجودات انجام شده است (۳۰، ۱۳، ۵). اثرات مثبت گیاه آنگوزه به دلیل دارا بودن ترکیباتی نظیر اسید گالبانیک، آمبلی فرون، لیمونن و فلاونوئید (۲۸) در درمان دیابت، کاهش قند خون، افزایش ترشح انسولین در موش های صحرایی دیابتی (۱۴) و بهبود ایمنی همورال و سلولی در جوجه های گوشتی (۲۸)، هم چنین اثرات ضد میکروبی و

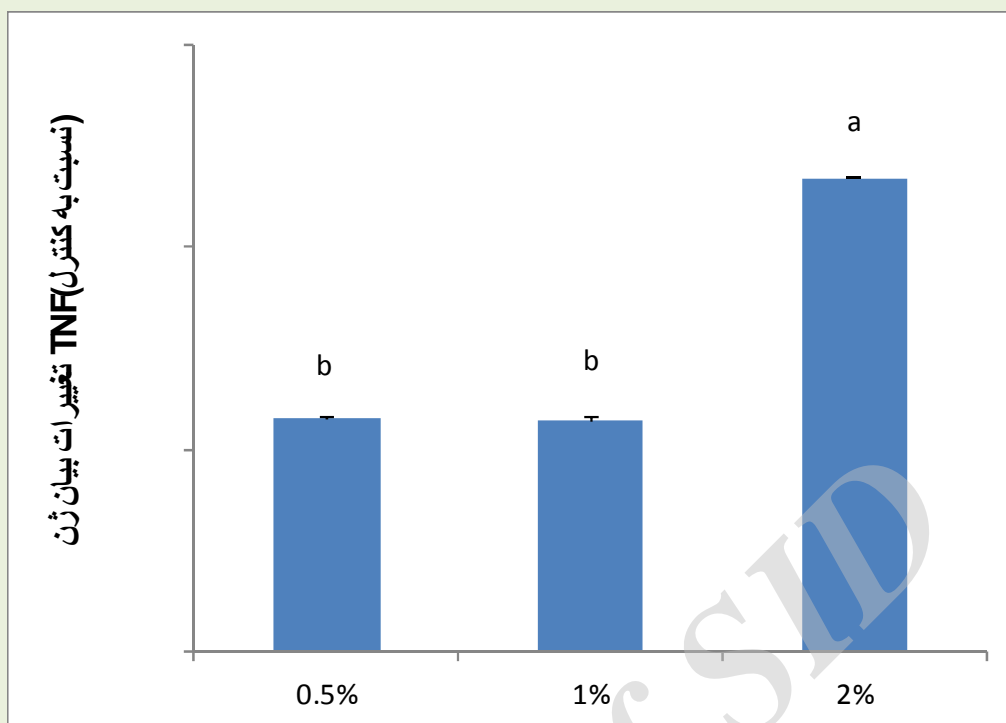
(TNF و IL-10)، نتایج حاکی از افزایش بیان ژن TNF و کاهش بیان ژن IL-10 بود (۳۳).



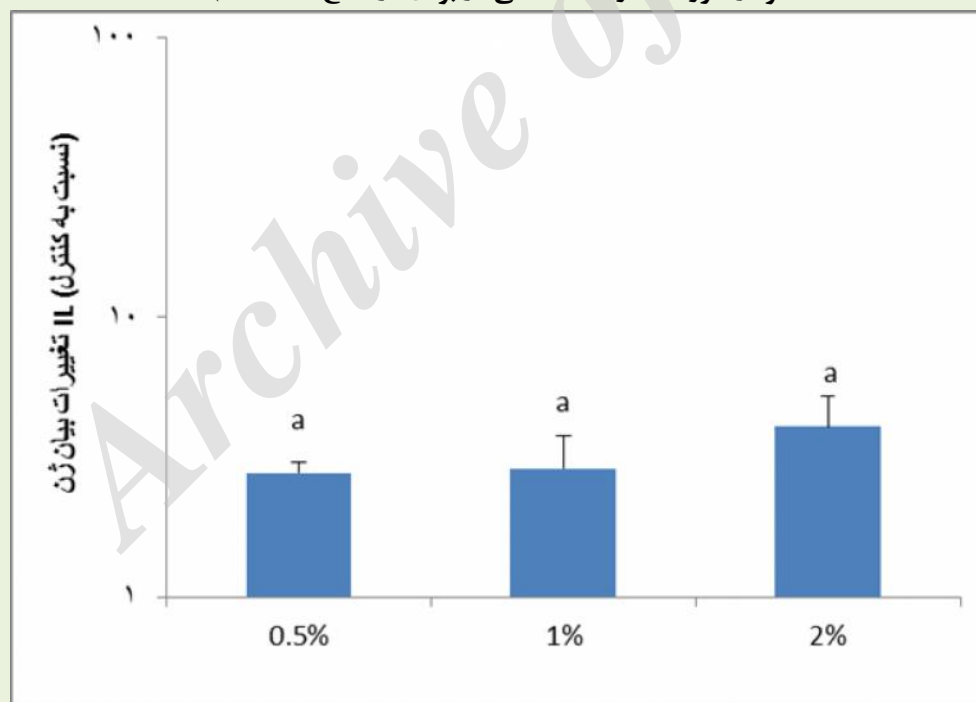
شکل ۱- کیفیت RNA استخراج شده از بافت روده ماهی گورخری روی ژل آگارز ۱/۵٪ و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید در نمونه‌های استخراج شده دوباند متعلق به ۲۸S و ۱۸S rRNA می‌باشند. بررسی کمی RNA (ستون اول از سمت راست مارکر و ستون‌های دیگر RNA نمونه‌ها از تیمارهای مختلف).



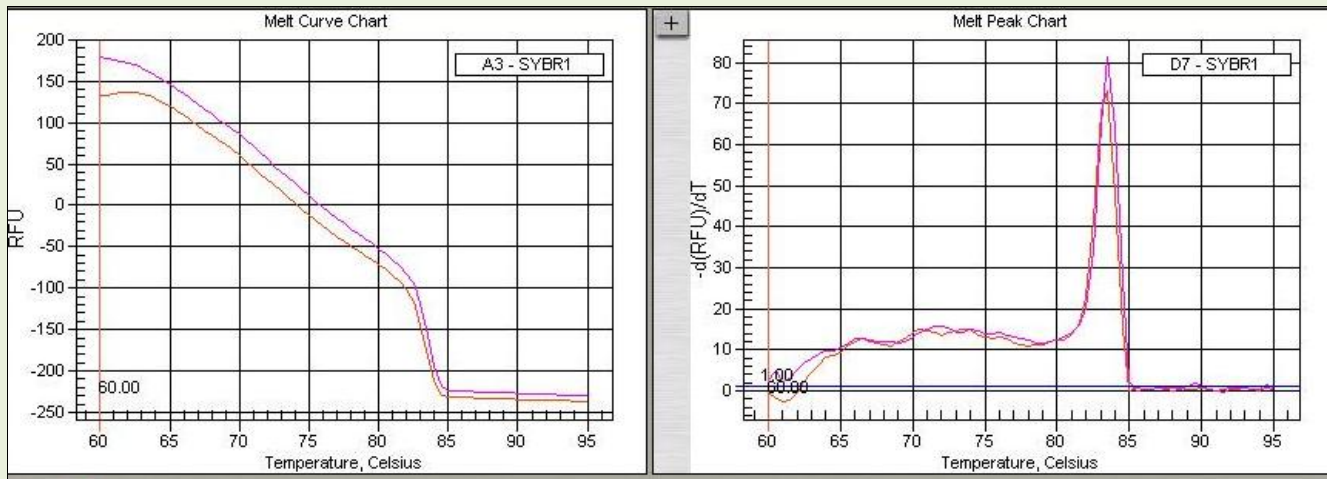
شکل ۲- محصول تکثیر cDNA های سنتز شده با آغاز گر actin (۲۱۶bp) در ماهی گورخری پس از



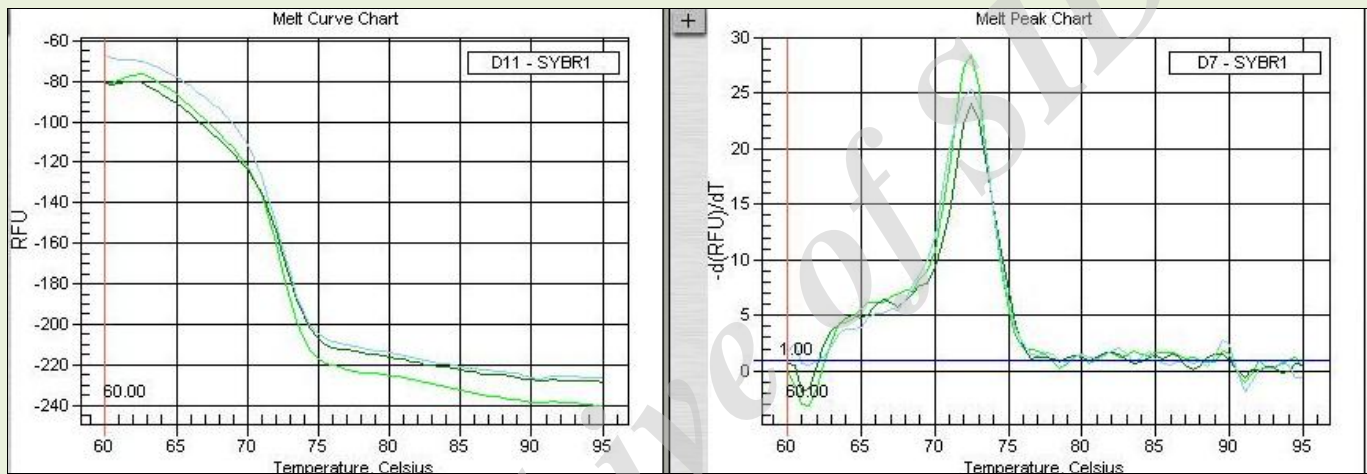
شکل ۳- سطوح بیان ژن TNF- در یک دوره ۸ هفته‌ای در ماهی گورخری تحت تأثیر سطوح مختلف عصاره گیاهی آنگوزه (در هر نمودار حروف متفاوت نشانه معنی دار بودن در سطح ۰/۰۵ است).



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



شکل ۴- منحنی ذوب ترسیم شده از غلظت‌های سریالی برای آغازگر TNF-



شکل ۶- منحنی ذوب ترسیم شده از غلظت‌های سریالی برای آغازگر IL-1

اعلام نمودند که تیمارهای تغذیه شده با پودر گیاه آنگوزه در سطوح مختلف (۰/۵، ۱ و ۲ درصد) نسبت به گروه شاهد افزایش بیان ژن‌های TNF-، IL-1، IL-8 را نشان دادند (۲۶). در مطالعه‌ای دیگر بیلن و همکاران گزارش کردند که به کارگیری عصاره گیاه (*Capparis spinosa*) در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان سبب افزایش رونویسی ژن‌های سایتوکین از جمله TNF- و IL-1 و در نتیجه بهبود پاسخ ایمنی شد (۴). سیتوکین‌های پیش-التهابی مانند IL-8 و TNF-آلفا در شروع و تقویت فرآیندهای التهابی در ماهی دخالت دارند (۱۵). عصاره آنگوزه نیز به دلیل دارا بودن متابولیت‌های ثانویه دارای توانایی کاهش رادیکال‌های آزاد و تقویت سیستم

هم چنین در مطالعه چاکرابارتی و همکاران (۷) رابطه معکوس بین بیان ژن TNF و IL-10 در ماهی کاتلا تغذیه شده با دانه گیاه (*Achyranthes aspera*) مشاهده شد، چراکه IL-10 به عنوان یک سایتوکین چندمنظوره می‌باشد که یکی از فعالیت‌های آن سرکوب عملکرد سیستم ایمنی است (۲۷). یایوان و همکاران (۳۴) در مطالعه‌ای بر ماهی کپور معمولی گزارش کردند که افزودن گیاه گون به جیره غذایی سبب افزایش TNF- و IL-1 شد. هم چنین صفری و همکاران گزارش نمودند که به کارگیری پودر آنگوزه در جیره غذایی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) به مدت ۸ هفته سبب افزایش معنادار بیان ژن‌های دخیل در ایمنی گردید. آن‌ها

پیش‌گیری از بیماری‌ها و جلوگیری از تلفات ماهی توصیه می‌شود، چراکه افزایش ایمنی ذاتی از طریق کاهش احتمالی بیماری می‌تواند اثرات مثبتی را به همراه داشته باشد. هرچند مطالعات بیشتری در خصوص میزان دوز مصرفی، روش استحصال عصاره و تعیین استاندارد تغذیه‌ای مورد نیاز می‌باشد.

ایمنی هستند. در مجموع نتایج حاصل از این مطالعه حاکی از آن است که عصاره گیاهی آنغوزه به منظور افزایش ایمنی غیراختصاصی و به‌عنوان تحریک‌کننده سیستم ایمنی در برابر عوامل بیماری‌زا می‌تواند در جیره غذایی ماهی سودمند باشد. بنابراین استفاده از عصاره این گیاه، یک راه کار مفید برای استفاده درمانی آن به جهت

منابع

1. Awad, E., Mitchell, W. J., Austin, B. (2011). Effect of dietary supplements on cytokine gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of fish diseases*, 34; 629-634.
2. Awad, E., Erezuel, R., Esteban, M.A. (2015). Effects of fenugreek (*Trigonella foenumgraecum*) on gilthead seabream (*Sparus aurata* L). *Immune Status And Growth performance*, 45(2); 454-464.
3. Bairwa, M.K., Jakhar, K., Satyanarayana Y., Reddy D. (2012). Animal and plant originated immunostimulants used in aquaculture. *Journal of Natural Product and Plant Resources*, 2(3); 397-400.
4. Bilen, S., Altunoglu, Y.C., Ulu, F., Biswas, G. (2016). Innate immune and growth promoting responses to caper (*Capparis spinosa*) extract in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology*, 57; 206-212.
5. Brudeseth, B.E., Wiulsirod, R., Fredriksen, B.N., Lindmo, K., Lokling, K.E., Bordevik, M. (2013). Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming. *Fish and Shellfish immunology*, 35; 1759-1768.
6. Bustin, A.S., Benes, V., Garson, J.A., Heilmans, J., Huggett, J., Kubista, M. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4); 611-622.
7. Chakrabarti, R., Srivastava, P.K., Verma, N., Sharma, J. (2014). Effect of seeds of *Achyranthes aspera* on the immune responses and expression of some immune-related genes in carp (*Catla catla*). *Fish and Shellfish Immunology*, 41; 64-69.
8. Chobkar, N. (2015). Effect of using *Falcaria vulgaris* on skin wound healing and immune response of common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Endocrinology and Veterinary Clinic*, 9(1); 1-9.
9. Citarasu, T., Sivaram, V., Immanuel, G., Rout, N., Murugan, V. (2006). Influence of selected Indian immunostimulant herbs against white spot syndrome virus (WSSV) infection in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) with reference to haematological, biochemical and immunological changes. *Fish and shellfish immunology*, 21; 372-384.
10. Corripio-Miyar, Y., Bird S., Tsamopoulos, K., Secombes, C.J. (2007). Cloning and expression analysis of two pro-inflammatory cytokines, IL-1 β and IL-8, in haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). *Molecular Immunology*, 44; 1361-1373.
11. Dorman, H.J.D., Bachmayer, O., Kosar, M., Hiltunen, R. (2004). Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(4); 762-770.
12. Elabd, H., Wang, H.P., Shaheen, A., Yao H., Abbass, A. (2016). Feeding (*Glycyrrhiza glabra*) (liquorice) and (*Astragalus membranaceus*) (AM) alters innate immune and physiological responses in yellow perch (*Perca flavescens*). *Fish and Shellfish Immunology*, 54; 374-384.
13. Faggio, C., Morabito, S.A., Minicante, G.L., Piano, M., Pagano, G., Genovese, G. (2015). Potential use of polysaccharides from the brown alga (*Undaria pinnatifida*) as anticoagulants. *Braz. Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58; 798-804.
14. Fateh, M., Farifteh, F., Fatehi-Hassanabad, Z. (2004). Antispasmodic and hypotensive effects of *Ferula asafoetida* gum extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 91; 321-324.
15. Feng, L., Li, W., Liu, Y., Jiang, W.D., Kuang, S.K., Jiang J. (2015). Dietary phenylalanine-improved Intestin albarrier health in young grass carp (*Ctenopharynx godonidella*) is associated with increased immunestatus and regulated gene expression of cytokines, tight junction proteins, Antioxidant enzymes and related signaling Q4 molecules. *Fish and Shellfish Immunology*, 45 (2); 495-509.
16. Grayfer, L., Walsh, J. G., Belosevic, M. (2008). Characterization and functional analysis

- of goldfish (*Carassius auratus L*) tumor necrosis factor-alpha. *Developmental and Comparative Immunology*, 32; 532-543.
17. Gruss, H.J. (1996). Molecular, structural, and biological characteristics of the tumor necrosis factor ligand superfamily. *International Journal of Clinical and Laboratory Research*, 26; 143-159.
18. Guardiola, F.A., Porcino, C., Cerezuela, R., Cuesta, A., Faggio, C., Esteban, M.A. (2016). Impact of date palm fruits extracts and probiotic, enriched diet on antioxidant status, innate immune response, and immune-related gene expression of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish and Shellfish Immunology*, 52; 298-308.
19. Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M.S. (2011). Diet enriched with mushroom *Phellinus linteus* extract enhances the growth, innate immune response, and disease resistance of kelp grouper, (*Epinephelus bruneus*) against vibriosis. *Fish and Shellfish Immunology*, 30; 128-134.
20. Hoseinifar, S H, Khalili, M, Rufchaei, R, Raeisi, M. (2016). Investigating the effects of date palm extract on growth performance and mucus immune parameters in Common Carp *Cyprinus carpio Linnaeus*, 1758 fingerlings. *Journal of Academia and Industrial Research*, 3(4); 89-100.
21. Lessman, Ch.A. (2011). The developing zebrafish (*Danio rerio*): A vertebrate model for high-throughput screening of chemical libraries. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 93(3); 268-280.
22. Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-CT} method. *Methods*, 25; 402-408.
23. Pourgholam, R., Sharif Rohani, M., Safari, R., Saeedi, A., Binaeei M., Najafeyan R. (2013). Effect of *Echinacea purpurea* extract on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and its resistance to *Streptococcus*. *Journals & Diaries - Personality Cafe*, 22 (3); 1-12.
24. Rahbarian, R., Sadooghi, S.D. (2014). Investigating the effects of aqueous extract of *Asafoetida resin* on the serum level of insulin and blood glucose in type 1 diabetic rats. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences*, 16 (3); 16 - 21.
25. Reverter, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B., Sasal, P. (2014). Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. *Aquaculture*, 433; 50-61.
26. Safari, R., Hoseinifar, S.H., Nezhadmoghadam, S., Jafar, A. (2016). Transcriptomic study of mucosal immune, antioxidant and growth related genes and non-specific immune response of common carp (*Cyprinus carpio*) fed dietary *Ferula* (*Ferula assafoetida*). *Fish and Shellfish Immunology*, 55; 242-248.
27. Savan, R., Igawa, D., Sakai, M. (2003). Cloning, characterization and expression analysis of interleukin-10 from the common carp, (*Cyprinus carpio L*). *European Journal of Biochemistry*, 270; 4647-4654.
28. Shademani, M., Bagherzadeh Kasmani, F., Mirzaee, H.R., Mehri, H.R. (2015). Effect of *Stikun gassa* (*Ferula assafoetida*) powder on performance, immunity status and cecal microbial population of broiler chickens. *Iranian Journal of Applied Animal Science*; 111-118.
29. Shin, J.T., Fishman, M.C. (2002). From zebrafish to human: modular medical models. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 3; 311-40.
30. Sitja-Bobadilla, A. (2008). Living off a fish: a trade-off between parasites and the immune system. *Fish and Shellfish Immunology*, 25; 358-372.
31. Taplur, A.D., Ikhwanuddin, M. (2012). Dietary effects of garlic (*Allium sativum*) on haemato-immunological parameters, survival, growth and disease resistance against *Vibrio harveyi* infection in Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch). *Aquaculture*, 364-356.
32. Wang, Q.K., Chen, C.X., Guo, Y.J., Zhao, H.Y., Sun, J.F., Ma, S. (2011). Dietary polysaccharide from (*Angelica sinensis*) enhanced cellular defence responses and disease resistance of grouper (*Epinephelus malabaricus*). *Aquaculture International*, 19; 945-956.
33. Watanuki, H., Ota, K., Tassakka, A.C.M., Kato, T., Masahiro, S. (2006). Immuno stimulant effects of dietary *Spirulina platensis* on carp, (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, 258; 157-163.
34. Yuan, C., Pan, X., Gong, Y., Xia, A., Wu, G., Tang, J. (2008). Effects of astragalus polysaccharides (APS) on the expression of immune response genes in head kidney, gill and spleen of the common carp, (*Cyprinus carpio L*). *Immunopharmacology*, 8(1); 51-58.
35. Zamani Taghizadeh Rabe, Sh., Iranshahi, M., Mahmoudi, M. (2016). In vitro anti-inflammatory and immune modulatory properties of umbelliprenin and methyl galbanate. *Journal of Immunotoxicology*, 13 (2);

209-216.

36. Zare, A.R.A., Omid, M., Fallah Hoseini, H., Yazdani, D., Rezazadeh, S., Irvani, N. (2011). A

review on pharmacological effects of *Ferula assa foetida* L.: a systematic review. Journal of Manufacturing Processes, 4 (40); 17-25.



Archive of SID

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

R. Safari¹, F. Vahedi Amiri ², A Shabany³, S.H. Hoseinifar¹, H. Kolangi Miandareh¹

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

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

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

Received: 2017. 8. 12

Accepted: 2018.11.8

Abstract

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

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

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

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

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