"مقاله پژوهشی"

اثرات تروگزروتین بر بیان mRNA ژن‌های کد کننده لیزوزیم و فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا و بافت شناسی 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 دریافت: ۱۴۰۱/۵/۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۸/۱۳

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 بافت شناسی و بیان mRNA ژن‌های کدکننده لیزوزیم و فاکتور نکروزدهنده تومور آلفا در پوست ماهی‌قرمز (*Carassius auratus*) انجام شد. بدین منظور، بچه ماهی‌ها با میانگین وزن اولیه‌ی ۰/۰۸ ± ۲/۷۴ 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 بافت شناسی، پوست سمت راست و نزدیک به باله پشتی ماهی‌ها به میزان ۰/۵ سانتی‌متر برداشته‌شده 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 معنا داری بین گروه‌های تیمار و گروه کنترل مشاهده نشد ($p>0.05$). نتایج آزمایش‌های مولکولی، افزایش معنی داری 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 کد کننده TNF-α در گروه‌های دریافت کننده 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 بافت شناسی و بیان mRNA ژن‌های کد کننده لیزوزیم و TNF-α در پوست ماهی‌قرمز را داراست.

کلمات کلیدی: تروگزروتین، ماهی قرمز، بافت شناسی، بیان ژن.

* عهده‌دار مکاتبات: nsheikh@tabrizu.ac.ir

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1401.16.4.8.6]
[DOI: 10.52547/aqudev.16.4.95]

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1401.16.4.8.6]

[DOI: 10.52547/aqudev.16.4.95]

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 آبزی می‌باشد (Sheikhzadeh *et al*., 2019). پوست ماهی به عنوان اولین سد دفاعی به شمار می‌آید. در مخاط پوست، انواع ترکیبات شامل گلیکوپروتئین، آگلوتینین، ترکیبات ضدمیکروبی، 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 آبزی 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 P_4 نیز شناخته می‌شود، یک مشتق تری هیدروکسی اتیله‌شده 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 خصوصا موش در برابر آفتاب بر جای گذارد (Gui *et al*., 2015; Formica and Regelson, 1995). ولی در آبزیان، مطالعات محدودی در زمینه اثر روتین تنها در برخی از گونه‌ها صورت گرفته است. به عنوان مثال، Pês و همکاران (۲۰۱۶) به بررسی تاثیر جیره‌ی غنی شده با روتین بر پارامترهای خونی، شاخص‌های اکسیداتیو و بیان هورمون هیپوفیزی در گربه ماهی نقره‌ای (*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 آنتی اکسیدان در مغز، گلوتاتیون اس - ترانسفراز (GST) و TRAP در آبشش ها، 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/ ضدالتهابی جیره غنی شده با روتین بر کبد تیلاپیا نیل‌های (*Oreochromis niloticus*) جوان پرداختند. آن‌ها

دریافتند که افزودن روتین به میزان ۰/۱ یا ۰/۳ گرم به ازای هر کیلوگرم، موجب کاهش قابل توجه I_gM کبدی، سیتوکین‌های ضد التهابی و سیتوکین‌های پیش التهابی در تیلاپیا نیل‌های دریافت کننده مقادیر بالای روتین شده و رونوشت‌های I_gM کبدی و سیتوکین‌های ضد التهابی (IL-10 , IFN-γ) به طور قابل توجهی کاهش می‌یابند. هم‌چنین، مشخص شد تعداد ماکروفاژ-های کبدی شدیدا 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 قزل آلای 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 آبزی‌پروری در حوزه ماهیان زینتی مستلزم دستیابی به پیشرفت‌های چشم‌گیری در زمینهٔ تحقیقات و پژوهش‌های علمی است (موسوی و همکاران، ۱۳۹۹). ماهی‌قرمز 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، 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 گونهٔ 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 ماهی‌قرمز 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 ± میانگین) ۰/۰۸ ± ۲/۷۴ گرم و متوسط طول ۰/۰۸± ۴/۸۶ سانتی متر، پس از ۱۰ روز سازگاری اولیه، به طور تصادفی در ۱۲ تانک شیشه‌ای با ابعاد۹۰ ×۴۰ ×۴۰ سانتی متر ذخیره‌سازی شدند. ماهی‌های مورد مطالعه، مجموعا در چهار گروه آزمایشی شامل یک گروه کنترل و سه گروه تیمار با سه تکرار و در هر تکرار ۱۰ قطعه ماهی، به صورت کاملا 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، نیتریت کمتر از ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر، نیترات برابر ۷-۸ میلی‌گرم بر لیتر و نوردهی 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

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1401.16.4.8.6]
[DOI: 10.52547/aqudev.16.4.95]

دوره ۱۰ روزه سازگاری، جهت آماده‌سازی خوراک در گروه‌های تیمار، از نمونه تجاری تروگزروتین ساخت شرکت Merck آلمان استفاده شد. در گروه‌های تیمار، تروگزروتین 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 تروگزروتین به خوراک ماهی، از روش اسپری سطحی استفاده شد به صورتی که تروگزروتین 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 برداشت‌شده 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 میکرولیتر 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 سی‌سی اتانول ۷۵٪ اضافه شد. نمونه‌ها مجددا 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 میکرولیتر از DEPC 0.1%، 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 میکرولیتر، شامل ۱۰ میکرولیتر RNA تیمار شده با DNase I، ۱ میکرولیتر random hexamer و ۲/۴ میکرولیتر 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 میکرولیتر 5X first-strand Buffer Reverse transcriptase، ۱ میکرولیتر dNTPS ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتر) Rnase inhibitor و ۱ میکرولیتر M-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 cDNA های

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1401.16.4.8.6]
[DOI: 10.52547/aqudev.16.4.95]

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 (خانه دار) انتخاب شد. واسرشت اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد 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.

جدول۱: پرایمرهای انتخابی جهت بررسی بیان ژن‌های انتخاب شده در بافت پوست *ماهی‌قرمز*

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

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 سانتی‌گراد 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 REST© software 2009 انجام گرفت. کارایی آزمون PCR نیز با منحنی های استاندارد برپایه رقت‌های ده‌تایی به‌دست آمده از تکرارهای محصول PCR تعیین گردید.

آزمایش‌های بافت شناسی

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 فیزیکال 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

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1401.16.4.8.6]
[DOI: 10.52547/aqudev.16.4.95]

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 ± میانگین گزارش شده است. ارزش آماری داده‌ها توسط آزمون آماری یک‌طرفه واریانس‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت که به این منظور از نرم افزار SPSS نسخه‌ی ۲۲.۰ استفاده شد. هم‌چنین، داده‌ها به وسیله‌ی تحلیل آماری LSD (Least Significant Differences)، جهت مقایسه‌ی میانگین‌ها 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 دریافت‌کننده دوز متوسط و دوز بالا، نسبت به گروه دریافت‌کننده 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).

جدول ۲: نتایج مولکولی *ماهی‌قرمز*های تغذیه شده با تروگزروتین در یک دوره ی ۸۰ روزه

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

*داده‌ها شامل خطای استاندارد ± میانگین می باشند. داده‌های نشان داده شده با حروف مختلف در یک ردیف دارای تفاوت معنی‌دار با یکدیگر هستند ($p<0.05$)

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1401.16.4.8.6]
[DOI: 10.52547/aqudev.16.4.95]

نتایج بافت شناسی

در گروه‌های دریافت‌کننده تروگزروتین تغییرات مشخصی در تعداد، پراکنش و اندازه سلول‌های سلول‌های هشدار دهنده نشان داده شد. تعداد سلول‌های هشدار دهنده در گروه‌های دریافت‌کننده تروگزروتین 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 ($p>0.05$).

جدول۳: مشخصات هیستومورفومتری و استریولوژیک اپیدرم پوست *ماهی‌قرمز*های تغذیه شده با تروگزروتین در یک دوره ی ۸۰ روزه

موارد	گروه کنترل	گروه‌های تیمار شده با تروگزروتین		
		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 مستقیما مکانیسم‌های دفاعی اولیه ماهی را از طریق اثر بر گیرنده‌ها و ژن های 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 به‌دست آمده در مطالعه حاضر نیز، نشان داد که مصرف تروگزروتین می‌تواند تاثیرات بسیار خوبی را بر روی سیستم ایمنی مخاطی ماهیان، بر جای گذارد. به طوری که این ماده قادر است بیان ژن‌های 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، پلاسما 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

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1401.16.4.8.6]
[DOI: 10.52547/aqudev.16.4.95]

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-α) در ماهیان، همانند پستانداران، دارای اعمال هم‌پوشاننده با اینترلوکین۱ بتا (IL-1β) 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). هم چنین، TNF-α فعالیت بیگانه‌خواری در لکوسیت‌های ماهیان را تقویت می‌کند (Grayfer *et al*., 2008). در صنعت آبزی 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-α در پوست ماهی کپور *معمولی* گردید (Hoseinifar *et al*., 2019). در مطالعه‌ای دیگر که با هدف ارزیابی اثرات پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (*Lactobacillus acidophilus*) در پوست *ماهی طلائی* صورت گرفت، مشخص شد که مصرف این ماده به میزان ۶×۱۰^{۸} باکتری به ازای هر گرم، باعث افزایش بیان برخی ژن-های مرتبط با ایمنی نظیر TNF-1α و TNF-2α 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-α، 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 تروگزروتین 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 تروگزروتین می‌تواند بر بهبود ساختاری بافت پوست و لایه اپیدرم آن کاملا 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 تروگزروتین 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

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1401.16.4.8.6]
[DOI: 10.52547/aqudev.16.4.95]

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

در مطالعه حاضر، استفاده از تروگزروتین، به‌ویژه در دوز بالا (۰/۵ گرم در کیلوگرم) سبب بهبود فاکتورهای ایمنی و ساختار بافت شناسی در *ماهی‌قرمز* گردید به صورتی که افزایش معنی‌داری در میزان بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی نظیر لیزوزیم و فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا در پوست ماهیان مشخص گردید. بررسی مقاطع بافتی پوست ماهی‌ها نیز نشان داد که تروگزروتین از توانایی ویژه‌ای جهت افزایش تراکم سلول‌های هشداردهنده و نسبت حجمی این سلول‌ها به اپیدرم پوست برخوردار است. در کل، مطالعات بیشتری در زمینه اثرات تروگزروتین بر سیستم ایمنی مخاطی ماهی در زمان چالش با انواع عوامل بیماری‌زا مورد نیاز می‌باشد.

سپاسگزاری

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

منابع

۱. صابری اصل، ا.، تقی‌زاده، و.، ایمانپور، م.، ۱۳۹۷. مقایسه اثرات تزریق هورمون‌های اواپریم، HCG و عصاره هیپوفیز ماهی باربوس روی پارامترهای اسپرم شناختی ماهی‌قرمز (*Carassius auratus gibelio*). نشریه توسعه آبزی‌پروری، 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 آنزیم‌های گوارشی و آسیب شناسی بافت روده ماهی قرمز (*Carassius auratus*). نشریه توسعه آبزی‌پروری، ۱۵(۲)، ۱۱۵-۱۲۸.

۳. موسوی، ش.، شیخ‌زاده، ن.، مرندی، م.، ۱۳۹۹. اثر جیره‌های غذایی حاوی روغن سیاه دانه (*Nigella sativa*) بر عملکرد رشد، شاخص‌های آنتی‌اکسیدان و بیوشیمیایی و فعالیت آنزیم گوارشی در سیچلاید الکتریک زرد (*Labidochromis caeruleus*). مجله شیلات، ۷۳(۴)، ۴۷۱-۴۸۲.

۴. موسوی، ش.، شیخ‌زاده، ن.، مرندی، م.، ۱۴۰۰. مطالعه اثر تروگزروتین خوراکی بر مقاومت در برابر

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1401.16.4.8.6]
[DOI: 10.52547/aqudev.16.4.95]

انگـــــل ایکتیوفتیریـــــوس مـــــولتی‌فیلـــــیس (*Ichthyophthirius multifilis*) در مـــاهی قرمـــز (*Carassius auratus*). مجله علمی شـیلات ایـران، ۳۰(۴)، ۱۰۵-۹۵.

۵. نـژاد مقـدم، ش.، صـفری، ر.، نهاونـدی، ر.، ۱۳۹۶. بررسی کاربرد محرک‌های ایمنی در آبـزی پـروری و اثرات آن‌ها بر بیان ژن‌های دخیل در ایمنی مـاهی. آبزیان 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, *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 gastrointestine 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*

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1401.16.4.8.6]
[DOI: 10.52547/aqudev.16.4.95]

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 of fish innate immune system. Aquaculture research, 39, 223-239.
26. Sheikhzadeh, N., Mousavi, S., Hamidian, G., Firouzamandi, 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.

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1401.16.4.8.6]
[DOI: 10.52547/aqudev.16.4.95]