"مقاله پژوهشی"

اثرات تغذیه‌ای عصاره گیاه گزنه (*Utrica dioica*) بر پاسخ ایمنی موکوس و بیان ژن مربوط به ایمنی TNF-alfa در ماهی قرمز (*Carassius auratus*)

شبنم نژادمقدم[1]*، محمدرضا ایمانپور[1]، ولی‌اله جعفری[1]، رقیه صفری[1]

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

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۵/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۷/۱۸

چکیده

با توجه به اثرات محرک‌های ایمنی گیاهی بر واکنش ایمنی غیراختصاصی آبزیان، این مطالعه با هدف بررسی اثرات عصاره گیاه گزنه (*Utrica dioica*) بر شاخص‌های ایمنی موکوس (لیزوزیم، ایمنوگلوبولین کل و پروتئاز) و همچنین بیان ژن مرتبط با ایمنی TNF-alfa در لارو ماهی قرمز (*Carassius auratus*) صورت پذیرفت. تعداد ۱۸۰ قطعه لارو ماهی با میانگین وزنی ۰/۰۱۴± ۰/۱۹۲گرم در ۳ تیمار آزمایشی و هر تیمار با ۲ تکرار شامل تیمار شاهد (جیره غذایی بدون عصاره)، تیمارهای با جیره غذایی حاوی عصاره (۲ و ۴ گرم در کیلوگرم غذا) به صورت تصادفی در آکواریوم‌های پرورش تقسیم و به مدت ۶ ماه مورد تغذیه قرارگرفتند. ارزیابی شاخص‌های ایمنی موکوس، فعالیت لیزوزیم و آنزیم پروتئاز موجود در موکوس در ماهیان تغذیه‌شده با ۴ گرم عصاره گزنه در مقایسه با شاهد و تغذیه‌شده با ۲ گرم عصاره تفاوت معنی‌داری نشان داد ($p<۰/۰۵$). در مقایسه میزان توتال ایمنوگلوبولین درماهیان تغذیه‌شده با عصاره گزنه با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$). داده های بیان ژن اختلاف معنی‌دار در میزان بیان ژن TNF-alfa در ماهیان تغذیه شده با عصاره گزنه در مقایسه با گروه کنترل با یک روند وابسته به دوز را نشان داد ($p<۰/۰۵$) و با افزایش سطح عصاره در جیره غذایی مقدار نسبی بیان ژن افزایش یافت. براساس نتایج این تحقیق و عصاره گزنه در بهبود شاخص‌های ایمنی موکوسی و بیان ژن ایمنی در ماهی قرمز به عنوان یک مکمل غذایی در بهبود عملکرد سیستم ایمنی غیر اختصاصی ماهی قرمز پیشنهاد می‌شود.

کلمات کلیدی: گزنه، ماهی قرمز، ایمنی موکوسی، بیان ژن ایمنی

* عهده‌دار مکاتبات: sh.n.moghadam88@gmail.com

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-06-15]

[DOI: 10.71901/jad-2024-1-480]

مقدمه

ماهی قرمز (*Carassius auratus*) از خانواده کپورماهیان (Cyprinidae) می‌باشد که در طی هزاران سال همراه با زندگی بشر بوده است. ماهی قرمز از لحاظ شرایط زیستی و تغذیه‌ای شبیه کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*) بوده و با گسترش آبزی‌پروری ماهیان زینتی، همه‌ساله شاهد ظهور ارقام تجاری مختلفی از این ماهی در بازار جهانی هستیم (دادگر، ۱۳۸۹). ماهی قرمز به عنوان مدل آزمایشگاهی در مطالعات ایمنی و پاسخ به استرس مورد استفاده قرارمی‌گیرد (Nero *et al.*, 2006).

همگام با رشد و توسعه آبزی‌پروری در کشور رعایت اصول بهداشتی، توسعه روش‌های تشخیص، پیش‌گیری و درمان بیماری‌های ماهی الزامی است (سلطانی و همکاران، ۱۳۹۴). ابتلا به بیماری‌ها می‌تواند باعث کاهش وزن، لاغری، کاهش بازده تولیدمثلی یا عقیمی، رفتارهای غیرطبیعی، زخم‌های جلدی، نارسایی آبششی و علایمی از این قبیل در ماهی‌ها شوند که به نوبه خود می‌تواند ضرر و زیان اقتصادی زیادی به دنبال داشته باشد (پیغان و عبدا... مشائی، ۱۳۸۸). نگرانی اصلی در خصوص استفاده از مواد شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌ها در کنترل و درمان بیماری‌ها اثرات مضر زیست‌محیطی، ایجاد مقاومت دارویی، باقی ماندن داروها پس از درمان در گوشت ماهیان موردتغذیه انسان می‌باشد، بنابراین در حال حاضر چالش اصلی یافتن محرک‌های ایمنی طبیعی که مطمئن، مقرون به‌صرفه و دوست‌دار محیط زیست بوده، می‌باشد (Bairwa *et al.* 2012).

تنظیم و افزایش کارایی سیستم ایمنی در ماهیان از طریق دست‌کاری جیره‌های غذایی ابزاری قدرتمند و مؤثر جهت حفظ سلامت ماهی و کاهش تلفات می‌باشد (Alishahi *et al.*, 2014). باتوجه به رواج گرایش جهانی آبزی‌پروری سبز و توسعه سیستم‌های ارگانیک که در آن بیشترین استفاده از مواد طبیعی و کمترین استفاده از مواد شیمیایی و آلاینده به عمل می‌آید و با توجه به غنای سرزمینی و تنوع گیاهان دارویی کشور، می‌توان از گیاهان بومی ایران برای درمان و پیش‌گیری آنتی‌بیوتیکی استفاده نمود (Bahmani *et al.*, 2014). افزودن گیاهان دارویی به جیره، از طریق فعالیت ضدمیکروبی انتخابی و یا ایجاد شرایط مطلوب برای برخی گونه‌ها، طیف میکروبی روده را تحت تأثیر قرار می‌دهند که بهره‌گیری بیشتر و جذب بهتر مواد مغذی، تحریک سیستم ایمنی و رشد را به‌دنبال دارد. محصولات گیاهی به‌دلیل وجود برخی ترکیبات از جمله آلکالوئیدها، فلانوئیدها، کارتنوئیدها، ترپن و روغن‌های ضروری و... جهت درمان بیماری‌های مختلف و تقویت سیستم ایمنی تجویز می‌شوند (Ardo *et al.*, 2008). مطالعات متعددی فواید گیاهان دارویی را به عنوان محرک ایمنی و یک روش جایگزین مناسب به جای استفاده از داروها و مواد شیمیایی را نشان داده است (Citarasu, 2010; Bai *et al.*, 2012; Ghosal and Chakraborty, 2014; Talpur, 2014; Awad *et al.*, 2015; Bilen *et al.*, 2016; Beltran *et al.*, 2017). نتایج این مطالعات ارتقاء سیستم ایمنی را در گونه‌های مورد آزمایش نشان داده‌اند.

در این میان گیاه گزنه (*Utrica dioica* L) متعلق به خانواده (Urticaceae) می‌باشد و به‌عنوان گیاه دارویی در سطح جهان شناخته شده است (Bondarenko *et al.*, 2003). برگ گیاه گزنه دارای ترکیباتی مانند کلروفیل، پنتوتنیک‌اسید، اولئیک‌اسید، لینولئیک‌اسید، پالمتیک‌اسید، پنتوتنیک‌اسید، کربوهیدرات، چربی،

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-06-15]
[DOI: 10.71901/jad-2024-1-480]

گزانتوفیل، کبالت، فلاونوئید، سروتونین، آلفا-توکوفرول، ترپن‌ها، استرول‌ها شامل بتاسیتوسترول می-باشد. همچنین برگ‌های این گیاه غنی از ویتامین k، B_2، C، بتاکاروتن، کلسیم، منیزیم، آهن، روی، مولیبدن، مس، سیلسیم و فسفر می‌باشد و دارای خواصی از جمله خاصیت ضد میکروبی، ضدقارچی و ضدعفونی‌کننده می‌باشد (Dugenci *et al.*, 2003; Gabor *et al.*, 2010). تحقیقات نشان داده است که غذاهای غنی از ترکیبات فنولیک و فلانوئیدی مجموعه‌ای از خصوصیات فیزیولوژیکی از جمله تقویت سیستم ایمنی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی را دارا هستند (تنگستانی و همکاران، ۱۳۹۰). باتوجه به این‌که گزنه نیز دارای ترکیبات فنولیک و فلانوئید می‌باشد احتمالاً این ترکیبات باعث افزایش عملکرد سیستم ایمنی می‌شوند.

در برخی مطالعات اثرات تحریک ایمنی گیاه گزنه بر ماهی گزارش شده‌است. Awad و همکاران (۲۰۱۳) تأثیر روغن دانه زیره سیاه و عصاره گزنه بر افزایش ایمنی در قزل‌آلای رنگین‌کمان را بررسی کردند که در مقادیر یک درصد گزنه و سه درصد روغن دانه زیره نتایج مطلوبی درفاکتورهای ایمنی نشان دادند. Binaii و همکاران (۲۰۱۲) تأثیر پودر گیاه گزنه بر فاکتورهای ایمنی خون فیل‌ماهی در مقادیر۳، ۶ و ۱۲ درصد در جیره را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که مقادیر ۶ و ۱۲ درصد در جیره باعث افزایش هموگلوبین، نوتروفیل، ایمونوگلوبولین و سایر فاکتورهای ایمنی خون در فیل‌ماهی گردید. همچنین همایون‌پور در سال ۱۳۹۴ تأثیر سطوح مختلف پودر گزنه بر بقاء کپور معمولی را مورد بررسی قرارداد. نتایج به دست آمده، نشان داد که میزان بازماندگی در همه تیمارهای پودر گزنه به‌مراتب بیشتر از تیمار شاهد بود. از بین تیمارهای پودر گزنه بیشترین میزان بازماندگی در ماهیان تحت تیمار یک درصد پودر گزنه مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد نشان داد. در ادامه، تأثیر سطوح مختلف پودر گزنه بر بازماندگی بچه‌ماهیان کپور معمولی در برابر استرس دما و فرمالین مورد ارزیابی قرار گرفت، که در پایان نمونه‌های تغذیه شده با پودر گزنه دارای بازماندگی ۱۰۰٪ بودند و تیمار شاهد ۹۰٪ بازماندگی داشتند. وی اعلام داشت که با توجه به اینکه گزنه دارای ترکیبات فنولیک می‌باشد احتمالاً این ترکیبات باعث افزایش بازماندگی بچه-ماهیان کپور معمولی در برابر شوک دما و فرمالین شده است.

از آنجا که تاکنون مطالعه‌ای در رابطه با اثر تغذیه‌ای طولانی‌مدت عصاره گیاه گزنه بر شاخص‌های ایمنی موکوس و بیان ژن مربوط به ایمنی لارو ماهی قرمز صورت نگرفته است، بنابراین هدف از مطالعه حاضر بررسی فاکتورهای مذکور در لارو ماهی قرمز می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق به‌منظور تعیین اثر جیره غذایی حاوی سطوح مختلف عصاره گیاهی گزنه بر ایمنی غیر اختصاصی ماهی قرمز در یک دوره ۶ ماهه در شهریور ماه سال ۱۳۹۴ در آزمایشگاه پرورش ماهی شهید فضلی‌بر آبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام گرفت. تعداد ۱۸۰ قطعه لارو ماهی قرمز با میانگین وزنی ۰/۰۱۴± ۰/۱۹۲ گرم از یکی از مراکز تکثیر و پرورش ماهی قرمز استان اصفهان خریداری شد. در ابتدای آزمایش جهت سازگاری ماهیان با شرایط پرورش به مدت ۲ هفته با غذای پایه موردتغذیه

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-06-15]
[DOI: 10.71901/jad-2024-1-480]

قرارگرفتند. پس از اتمام دوره سازگاری به‌صورت تصادفی در ۳ تیمار و هر تیمار با ۲ تکرار توزیع شدند. پرورش در آکواریوم به حجم آب ۵۰ لیتر با تراکم ۳۰ قطعه در هر آکواریوم صورت گرفت. عصاره آبی الکلی گیاه گزنه با ماده مؤثر ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره از شرکت آدنیس گل‌داروی تهران تهیه شد. به‌منظور آماده سازی تیمارهای آزمایشی با غلظت ۰، ۲ و ۴ گرم در کیلوگرم عصاره به جیره پایه اضافه گردید. غذادهی ماهیان آزمایشی طی دوره آزمایش به میزان ۵ درصد وزن بدن و ۳ بار در روز انجام شد. به‌منظور ایجاد شرایط مطلوب در محیط پرورش لارو ماهیان شاخص‌های محیطی از جمله: درجه حرارت، اکسیژن محلول، pH اندازه‌گیری و ثبت گردید. در این آزمایش در طول دوره پرورش میانگین دمای آب ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد، رنج pH ۷-۸ و میانگین اکسیژن ۹ میلی‌گرم در لیتر اندازه‌گیری شد.

جدول ۱: ترکیب و درصد اجزاء جیره تجاری مورد استفاده در تغذیه ماهیان

اجزای جیره	پروتئین خام	چربی	فیبر	خاکستر	رطوبت	فسفر
درصد اجزاء جیره(٪)	۳۲	۸	۶	۱۰	۱۰	۱

جمع‌آوری موکوس

در انتهای دوره، جهت جمع‌آوری موکوس غذادهی به مدت ۲۴ ساعت قطع گردید. موکوس با استفاده از ۱۰ میلی‌لیتر محلول نمک (مرک آلمان) ۵۰ میلی‌مولار از نمونه‌ها در طی زمان ۳ دقیقه در پلاستیک جمع‌آوری و توسط دستگاه سانتریفیوژ (5810R Eppendorf, Engelsdorf, Germany) با دور ۱۵۰۰g (دور بر دقیقه)، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتریفیوژ شدند، سپس مایع سطحی جمع‌آوری و به لوله‌های استریل منتقل شده و جهت انجام آزمایشات بعدی در دمای ۸۰- نگهداری شدند (Subramanian *et al.*, 2007).

سنجش فعالیت شاخص‌های ایمنی موکوس

فعالیت لیزوزیم

سنجش میزان لیزوزیم موکوس پوست ماهی قرمز تیمارهای آزمایشی با استفاده از روش Turbidimetric بر اساس روش (Esteban *et al.*, 2001) با در نظر گرفتن توانایی لیزوزیم سرم در تخریب لایه پپتید و گلیکان باکتری گرم مثبت (Micrococcus lysodeikticus) انجام گرفت. مقدار لیزوزیم نمونه موردنظر براساس کدورت سنجی برحسب میلی گرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد.

فعالیت ایمونوگلوبولین

برای سنجش میزان ایمونوگلوبولین (IgM) از روش (Siwicki and Anderson, 1993) استفاده شد. این سنجش بر اساس اندازه‌گیری محتوای پروتئین کل و با استفاده از روش میکروپروتئین‌ها (طبق دستورالعمل شرکت سیگما) انجام شد. در ابتدا، میزان پروتئین سرم تعیین‌شده و سپس به نمونه موکوس پلی‌اتیلن گلایکول ۱۲ درصد اضافه شد. پس از گذشت ۲ ساعت در دمای اتاق نمونه‌ها سانتریفیوژ شده و غلظت پروتئین در قسمت بالایی محلول مجدداً اندازه‌گیری گردید. میزان

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-06-15]
[DOI: 10.71901/jad-2024-1-480]

ایمینوگلوبولین کل از تفریق غلظت پروتئین در نمونه اولیه و غلظت پروتئین پس از افزودن پلی‌اتیلن گلایکول محاسبه شد.

فعالیت پروتئاز

فعالیت پروتئاز موکوس با استفاده از ارزیابی هیدرولیز آزوکازئین مورد سنجش قرارگرفت (Palaksha *et al*., 2012). فعالیت آنزیمی برحسب واحد در میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

بررسی بیان ژن مرتبط با سیستم ایمنی (TNF-alfa)

جمع‌آوری نمونه بافتی

در انتهای دوره آزمایش، جهت بررسی میزان بیان ژن مرتبط با ایمنی (TNF-alpha) در شرایط استریل از اندام کلیه ماهیان نمونه‌برداری شد. نمونه‌برداری به‌طور تصادفی از تیمارها انجام شد. ماهیان در گل میخک با غلظت ۱ گرم در لیتر بیهوش شدند. بافت کلیه نمونه‌ها خارج و و پس از جمع‌آوری، به داخل تیوپ‌های از قبل استریل شده انتقال داده شد و بلافاصله تیوپ‌ها به تانک ازت انتقال داده شدند. در پایان نمونه‌برداری نمونه‌ها در یخچال ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و تا زمان استفاده جهت استخراج RNA در آنجا نگهداری شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA

RNA کل از ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه بافت‌های کلیه هموژن شده با ازت مایع با استفاده از بیوزول و طبق دستورالعمل شرکت سازنده (بیویر، کره) استخراج شد. کمیت وکیفیت RNA کل با استفاده از اسپکتروفتومتر و الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵درصد بررسی شد. نسبت شدت جذب در نمونه‌های RNA استخراج شده در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر در محدوده ۲/۱ - ۱/۸ قرار داشت و هم‌چنین میزان جذب در طول موج‌های ۲۳۰، ۲۴۰و ۳۲۰ نیز بیانگر قابلیت مناسب RNA در نمونه‌های مورد بررسی بود. جهت حذف هرگونه باقی‌مانده DNA ژنومی در نمونه‌های RNA، تیمار DNase I انجام شد و سپس ساخت رشته اول cDNA بر اساس روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز (Fermentase- France) انجام شد و سپس cDNAهای سنتز شده تا شروع آزمایش‌ها در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

بررسی بیان ژن ایمنی

واکنش qPCR بعد از بهینه‌سازی دما و مواد مصرفی، در حجم نهایی۲۰ میکرولیتر با استفاده از پرایمر qPCR طراحی شده برای ژن TNF-alfa (Hosseini et al., 2017) و TNF-alfa و پرایمر ژن رفرنس بتا اکتین (جدول ۱) توسط کیت سایبر گرین در دستگاه iQ5 شرکت (BIO-RAD, USA) و با استفاده از نرم‌افزار بایورد iQ5 اپتیکال برای هر نمونه در ۳ تکرار بیولوژیکی و ۳ تکرار تکنیکی انجام شد. از آن‌جایی که در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد محصول غیراختصاصی و دایمر مشاهده نشد، این دما به‌عنوان دمای واکنش در نظر گرفته شد.

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-06-15]

[DOI: 10.71901/jad-2024-1-480]

جدول ۲: مشخصات پرایمرهای مورداستفاده در بررسی بیان ژن ایمنی در ماهی قرمز

نام پرایمر	توالی (´۳-´۵)	دمای اتصال (C°)	طول قطعه	کاربرد
Ca TNF-alfa q-PCRF	TCATTCCTTACGACGGCATTT	۶۰	۸۵	سنجش کمی بیان ژن
Ca TNF-alfa q-PCRR	CAGTCACGTCAGCCTTGCAG	۶۰		
Ca β- actin q-PCRF	ACTGCACAGCCAAGAGAGTTCA	۶۰	۱۸۸	ژن رفرنس (خانه دار)
Ca β- actin q-PCRR	GTTATTAAAGCGGCCGATATGC	۶۰		

تجزیه و تحلیل آماری

داده های ژنتیکی

داده‌های مربوط به بیان نسبی ژن با استفاده از فرمول 2-ΔΔct (ΔΔCt برابر است با ΔCt ژن هدف منهای ΔCt کالیبراتور) آنالیز و سچس توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه در سطح اطمینان ۹۵ درصد تست شدند. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار نمایش داده شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد.

داده های ایمنی

جهت آنالیز داده های ایمنی موکوسی نیز از آنالیز واریانس یکطرفه استفاده شد. بدین منظور ابتدا نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولوموگروف-اسمیرنوف تست شد و آزمون لون نیز جهت بررسی برابری واریانس‌ها مورد استفاده قرارگرفت. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار نمایش داده شد.

نتایج

شاخص‌های ایمنی موکوس

اثرات استفاده از سطوح مختلف عصاره گیاهی گزنه (۰، ۲ و ۴ گرم در کیلوگرم غذا) بر شاخص‌های ایمنی موکوس (میزان لیزوزیم، ایمنوگلوبولین و پروتئاز) ماهی قرمز در جدول ۳ ارائه شده است.

باتوجه به نتایج مذکور افزایش معنی‌داری در بررسی میزان فعالیت لیزوزیم موکوس در تیمار تغذیه-شده با عصاره ۴ گرم در کیلوگرم غذا در مقایسه با سایر تیمارها مشاهده شد (p<۰/۰۵). اختلاف معنی‌داری در میزان لیزوزیم موکوس بین گروه شاهد و تیمار تغذیه-شده با عصاره ۲ گرم در کیلوگرم غذا مشاهده نشد (p>۰/۰۵). نتایج حاصل از سنجش میزان ایمنوگلوبولین ماهی قرمز تغذیه‌شده با سطوح مختلف نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف وجود دارد. به طوری‌که بالاترین میزان ایمنوگلوبولین در ماهیانی مشاهده شد که با عصاره ۴ گرم بر کیلوگرم غذا تغذیه شده بودند (p<۰/۰۵). کم‌ترین مقدار مربوط به تیمار شاهد بود اما اختلاف معناداری با تیمار تغذیه شده با

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-06-15]
[DOI: 10.71901/jad-2024-1-480]

عصاره ۲ گرم در کیلوگرم غذا را نشان نداد (۰/۰۵ <p). بر اساس نتایج این بررسی یک روند افزایشی در میزان آنزیم پروتئاز بین تیمارهای تغذیه‌شده با عصاره نسبت به گروه شاهد را نشان داد. حداکثر میزان آنزیم پروتئاز در تیمار تغذیه‌شده با عصاره ۴ گرم در کیلوگرم غذا مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد و تیمار تغذیه شده با عصاره ۲ گرم در کیلوگرم غذا داشت (۰/۰۵>p). البته این اختلاف بین گروه شاهد و تیمار تغذیه شده با عصاره ۲ گرم در کیلوگرم غذا مشاهده نشد (۰/۰۵<p).

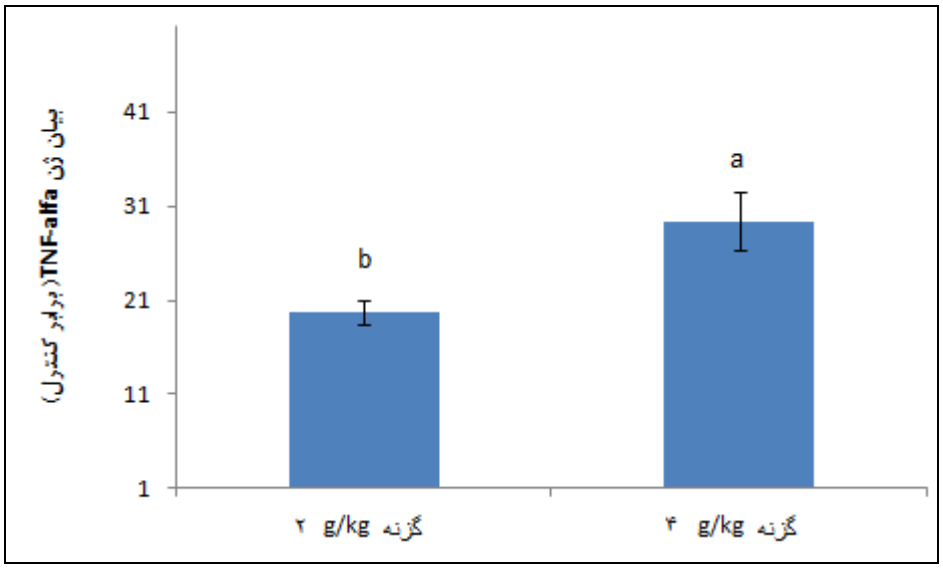
جدول۳: میزان فعالیت لیزوزیم، ایمونوگلوبولین و پروتئاز موکوس در ماهیان قرمز تغذیه شده با دوزهای مختلف عصاره گزنه

میزان عصاره در غذا	پروتئاز	ایمونوگلوبولین	لیزوزیم
شاهد (۰گرم در کیلوگرم غذا عصاره گزنه)	۰/۰±۹۸/۴۹ ^{b}	۱۰/۰±۷/۳۵ ^{b}	۱۴/۰±۵/۷ ^{b}
۲گرم در کیلوگرم غذا عصاره گزنه	۱/۰±۲/۱۴ ^{b}	۱۲/۰±۸۵/۹۱ ^{ab}	۱±۱۴ ^{b}
۴ گرم در کیلوگرم غذا عصاره گزنه	۲/۰±۲/۲۱ ^{a}	۱۴/۰±۳۵/۷ ^{a}	۱±۲۶/۴^{a}

حروف کوچک غیز مشابه اختلاف معنی‌دار (۰/۰۵>p) بین تیمارها را نشان می‌دهد.

نتایج بیان ژن

اثرات استفاده از سطوح مختلف عصاره گیاهی گزنه (۰، ۲ و ۴ گرم در کیلوگرم غذا) در بیان ژن TNF-alfa ماهی قرمز در جدول ۲ ارائه گردیده است. در این تحقیق بیان ژن TNF-alfa پس از ۶ ماه تغذیه با جیره حاوی عصاره گزنه افزایش معناداری با گروه شاهد نشان داد (۰/۰۵>p). افزایش بیان این ژن روند وابسته به دوزی تبعیت می کرد و با افزایش میزان عصاره در جیره بیان ژن مرتبط با ایمنی افزایش یافت (شکل ۱).



شکل۱: تغییرات بیان نسبی TNF-a به بتا اکتین در ماهیان قرمز تغذیه‌شده با دوزهای مختلف عصاره گزنه

حروف کوچک اختلاف معنی‌دار (۰/۰۵>p) بین تیمارها را نشان می‌دهد.

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-06-15]

[DOI: 10.71901/jad-2024-1-480]

بحث

لیزوزیم موجود در موکوس به‌عنوان یک آنزیم ضدباکتریایی در طیف وسیعی از موجودات از جمله ماهی‌ها شناسایی و مطالعه شده است. لیزوزیم یک پپتید با خاصیت ضدمیکروبی می‌باشد که در برابر باکتریها مؤثر است (Masschalk and Michiels, 2003) و یک فاکتور مهم در سیستم ایمنی بدن می‌باشد (Magnadottir, 2006). در مطالعه حاضرمیزان فعالیت لیزوزیم موکوس در ماهیان تغذیه شده با دوز ۴ گرم در کیلوگرم غذا عصاره گزنه بیشتر از گروه شاهد بوده است. ظهیری و همکاران (۱۳۹۶) گزارش کردند تغذیه ماهی سفید (*Rutilus kutum*) با جیره غذایی حاوی پودر زنجبیل به‌طور معنی‌داری سبب افزایش فعالیت آنزیم لیزوزیم موکوس شد.

افزایش سطح پروتین‌های موکوس به‌عنوان شاخص مناسبی برای بررسی وضعیت ایمنی غیراختصاصی ماهیان مطرح می‌باشد. موکوس حاوی انواعی از مواد ضدعامل بیماری‌زای دیگری از جمله ایمنوگلوبولین‌ها، پروتئین‌های ضدمیکروبی و آنزیم‌های تجزیه‌کننده‌ی پروتئین (مانند پروتئاز) است (Palaksha *et al.*, 2008). سلول‌هایی موسوم به سلول‌های کیسه‌ای شکل دراپیدرم ماهیان، پروتئین‌هایی (مانندایمنوگلوبولین‌ها) را ترشح می‌کنند که ماهیان را در برابر عفونت‌ها و یا آسیب‌های بافتی ناشی از انگل‌های خارجی حفاظت می‌نماید (Suzuki *et al.*, 2003). پروتئازها به‌عنوان بخشی از فاکتورهای فعال موکوس می‌باشند که در سیستم ایمنی اختصاصی ماهیان نقش مهمی را ایفا می‌نمایند و در زمان آسیب بافتی و تهاجم عوامل بیماری‌زا اثرات مستقیمی بر پاتوژن‌ها دارند. در اثر ترشح پروتئاز، ترکیب موکوس پوست ماهیان تغییر نموده و در نهایت سبب افزایش خاصیت لزجی پوست، به دام انداختن عوامل بیماری‌زا و حذف آن‌ها از سطح بدن می‌شوند (Aranishi *et al.*, 1998). بر اساس نتایج کسب شده در بررسی حاضر میزان ایمنوگلوبولین و پروتئاز موکوس روند افزایشی در تیمارهای آزمایشی نسبت به گروه شاهد نشان داد به طوری‌که بالاترین میزان ایمنوگلوبولین در تیمار تغذیه‌شده با ۴ گرم عصاره در کیلوگرم غذا نسبت به سایر تیمارها مشاهده شد. براساس گزارش Sheikhzadeh و همکاران (۲۰۱۲) به‌کارگیری محرک ایمنی مخمر ساکارومایسز سرویزیه در جیره غذایی ماهی قزل‌آلا سبب افزایش معنی‌دار فعالیت پروتئازی موکوس شده است. علاوه‌بر این در مطالعه انجام شده بر ماهی کپور معمولی، Hoseinifar و همکاران (۲۰۱۵) مشاهده کردندکه استفاده از عصاره خرما در جیره غذایی سبب افزایش معنی‌دار سطوح ایمونوگلوبولین کل و فعالیت آنزیم‌های لیزوزیم، پروتئاز در مقایسه با تیمار شاهد شد.

مکمل‌های غذایی مانند ترکیبات گیاهی می‌توانند به‌طور مستقیم مکانیسم‌های دفاعی اولیه را از طریق اثر بر گیرنده‌ها و ژن‌های مسئول فعال سازند (Bricknell and Dalmo, 2005). TNF-alfa به عنوان یک میانجی دفاعی ضدمیکروبی که با ایجاد انواع پاسخ‌های سلولی (مانند فاگوسیتوز) قابلیت از بین بردن عوامل بیماری‌زا را دارد و مسئول تنظیم ایمنی و پاسخ التهابی بدن در برابر عوامل بیماری‌زا می‌باشد (Goets *et al.*, 2004). در مطالعه حاضر بیان این ژن با افزایش میزان عصاره در غذا افزایش معنی‌داری را نشان داد.

نتایج حاصل از سایر مطالعات نیز به خوبی نشان داده است که استفاده از مکمل‌های غذایی مانند گیاهان به دلیل مواد مؤثر موجود در آنها می‌توانند موجب

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-06-15]
[DOI: 10.71901/jad-2024-1-480]

بهبود سیستم ایمنی از جمله افزایش میزان فعالیت شاخص‌های ایمنی موکوس و ژن‌های مرتبط با ایمنی را به همراه داشته باشند که این موضوع به نوبه خود باعث افزایش مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا و انواع تنش‌های محیطی می‌شود. در مطالعات صورت‌گرفته، افزایش بیان ژن ترکیبات ایمنی اختصاصی (TNF-alfa) به‌طور معنی‌داری در ماهی کپور معمولی تغذیه شده با گیاه آنغوزه (Safari *et al*., 2016)، همچنین افزودن چای سبز به جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (Nootash *et al*., 2013)، به کارگیری عصاره خرما در تغذیه ماهی کپور معمولی (Hoseinifar *et al*., 2015) و به کارگیری عصاره گیاه (*Capparis spinosa*) در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (Bilen *et al*., 2016) گزارش شده است، که با نتایج حاصل از این مطالعه مطابقت دارد.

درمجموع نتایج حاصل از این مطالعه حاکی ازآن است که عصاره گیاهی گزنه 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 راه‌کار مفید برای استفاده درمانی آن به جهت پیش‌گیری از بیماری‌ها و جلوگیری از تلفات ماهی می‌باشد و استفاده از این مکمل خوراکی (به ویژه در سطح ۴ گرم در کیلوگرم غذا) در جیره غذایی ماهی به‌منظور افزایش ایمنی و مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا 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.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از مساعدت همه کسانی که در مراحل اجرایی این پروژه ما را یاری نمودند، سپاسگزاری می نماییم.

منابع

۱. پیغان، ر.، عبدا... مشایی، م.، ۱۳۸۸. پرورش و بیماری‌های ماهی و میگو. انتشارات دانشگاه شهید چمران. چاپ اول. ۵۲۷ صفحه.

۲. تنگستانی، ر.، علیزاده دوغیکالیی، الف.، ابراهیمی، ع.، زارع، پ.، ۱۳۹۰. اثر اسانس گیاه سیر بر شاخص‌های هماتولوژیک فیل‌ماهیان جوان پرورشی. مجله تحقیقات دامپزشکی، ۶۶(۳)، ۲۱۶-۲۰۹.

۳. دادگر، م.، ۱۳۸۹. راهنمای مراقبت از ماهی طلایی. انتشارات موج سبز. چاپ اول. ۵۶ صفحه.

۴. سلطانی، م.، پیرعلی خیرآبادی، الف.، طاهری‌میرقائد، ع.، زرگر، الف.، محمدیان، س.، روح‌الهی، ش.، زکیان، م.، ۱۳۹۴. مطالعه عوامل خطر شیوع استرپتوکوکزویس و لاکتوکوکوزیس در مزارع قزل‌آلای رنگین‌کمان استان‌های فارس و لرستان. نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی، ۱۱(۱)، ۵۸-۴۹.

۵. ظهیری، ف.، ایمانپور، م.ر.، حاجی مرادلو، ع.، حسینی‌فر، س.ح.، ۱۳۹۶. اثرات پودر زنجبیل (*Zingiber officinale*) بر رشد، برخی پارامترهای ایمنی موکوسی و پارامترهای خونی در بچه ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus kutum* Kamensky, 1901). نشریه علمی پژوهشی پژوهشهای ماهی شناسی کاربردی، ۵ (۱)، ۷۸-۶۹.

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-06-15]

[DOI: 10.71901/jad-2024-1-480]

۶. همایون‌پور، م.، ۱۳۹۴. تاثیر پودر گزنه بر شاخص‌های رشد و بازماندگی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). پایان‌نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد (رشته شیلات). دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات، دانشگاه زابل. ۵۸ صفحه.

7. Alishahi, M., Soltani, M., Mesbah, A., 2014. The effects of immune stimulation and growth levamisole, Argus and three plant extracts in common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Veterinary Research (Tehran University), 67(2), 135-142.
8. Aranishi, F., Mano, N., Nakane, M., Hirose, H., 1998. Epidermal response of the Japanese eel to environmental stress. Fish Physiology and Biochemistry, 19,197-203.
9. Ardo, L., Yin, G., Xu, P., Varadi, L., Szigeti, G., Jeney, Z., 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(1-4), 26-33.
10. Awad, E., Austin, D., R. Lyndon, A., 2013. Effect of black cumin seed oil (*Nigella sativa*) and nettle extract (Quercetin) on enhancement of immunity in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*) (Walbaum). Aquaculture, 388–391, 193-197.
11. Bahmani, M., Rafieian-Kopaei, M., Hassanzadazar, H., Saki., Karamati, S.A., Delfan, B. A., 2014. review on most important herbal and synthetic antihelmintic drugs. 2014. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 7(1), 29-33.
12. Bai, D., Wu, X., Zhu, G., Guo, Y., Yang, G., Ning, B., 2012. Astragalus polysaccharides enhance cellular immune response and disease resistance in yellow catfish. The Israel Journal of Aquaculture-Bamidgeh, 822-865.
13. 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.
14. Beltran, J.M.G., Espinosa, C., Guardiola, F.A., Esteban, M.A., 2017. Dietary dehydrated lemon peel improves the immune but not the antioxidant status of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish and Shellfish, 64, 426-436.
15. 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.
16. Binaii, M., Ghiasi, M., Farabi, M., Pourgholam, R., Fazli, H., Safari, R., Alavi, E., Taghavi, M., Bankehsaz, Z., 2014, Biochemical and hemato-immunological parameters in juvenile beluga (*Huso huso*) following the diet supplemented with nettle (*Urtica dioica*). Fish and Shellfish Immunology, 36, 46-51.
17. Bondarenko, B., Wather, C., Funk, P., Schlafke, S., Engelmann, U., 2003, Long-term efficacy and safety of PRO 160/120 (a combination of sabal and urtica extract) in patients with lower urinary tract symptoms (LUTS). Phytomedicine, 10, 53-58.
18. Bricknell, I., Dalmo, R.A., 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. Fish and Shellfish Immunology, 19, 457-472.
19. Citarasu, T., 2010. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. Aquaculture, 18, 403–414.
20. Dugenci, S.K., Arda, N., Candan, A., 2003. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. Journal of Ethnopharmacology, 99–106.
21. Esteban, M.A., Cruesta, A., Ortuno, J., Meseguer, J., 2001. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin on gilthead (*Sparus aurata* L.) innate immune system. Fish and Shellfish Immunology, 11, 303-15.
22. Esteban, M.A., 2012. An overview of the immunological defenses in fish skin. Fish and Shellfish Immunology, 1, 1-29.
23. Gabor, E. F., Sara, A., Barbu, A., 2010. The Effects of Some Phytoadditives on Growth, Health and Meat Quality on Different Species of Fish. Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies, 43, 61-65.

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-06-15]

[DOI: 10.71901/jad-2024-1-480]

24. Ghosal, I., Chakraborty, B.S., 2014. Effects of the aqueous leaf extract of (*Basella alba*) on sex reversal Nile tilapia, Oreochromis niloticus L. IOSR. Journal of Pharmaceutical Biology, 9, 162-164.
25. Goetz, F.W., Planas, J.V., MacKenzie, S., 2004. Tumor necrosis factors, Developmental and Comparative Immunology, 28, 487-497.
26. Hosseini, M., Miandare, H.K., Shabani, A., Hoseinifar, S.H., Yarahmadi, P., 2017. Corrigendum to "Dietary Lactobacillus acidophilus modulated skin mucus protein profile, immune and appetite gene expression in gold fish (*Carassius auratus*). Fish and Shellfish Immunology, 59, 149-154.
27. Hoseinifar, S.H., Khalili, M., Rufchaei, R., Raeisi, M., Attar, M., Cordero, H., Angeles Esteban, M., 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 and Shellfish Immunology, 47, 706-711.
28. Magnadottir, B., 2006. Innate immunity of fish (overview). Fish and Shellfish, 20, 137–151.
29. Masschalck, B., Michiels, C.W., 2003. Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria. Critical Reviews in Microbiology, 29, 191–214.
30. Nero, V., Farwell, A., Lister, A., Van der Kraak, G., Lee, L.E., Van Meer, T., MacKinnon, M.D., Dixon, D.G., 2006. Gill and liver histopathological changes in yellow perch (*Perca flavescens*) and goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands processaffected water. Ecotoxicology and Environmental Safety, 63, 365–377.
31. Nootash, Sh., Sheikhzadeh, N., Baradaran, B., Khani Oushani, A., Maleki Moghadam, M.R., Nofouzi, Katayoon, Monfaredan, A., Aghebati, L., Zare, F., Shabanzadeh, S., 2013. Green tea admonestration induces expression of immune relevant genes and biochemical parameters in (*rainbow trout*). Fish and shellfish immunology, 35, 1916-1923.
32. Palaksha K. J., Shin G.W., Kim Y. R., Jung, T.S., 2008. "Evaluation of non-specific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)," Fish and Shellfish Immunology, 24(4), 479–488.
33. Safari, R., Hoseinifar, S.H., Nezhadmoghadam, SH., Jafar, A., 2016. Transciptomic 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, 1-16.
34. Sheikhzadeh, N., Karimi Pashaki, A., Nofouzi, K., Heidarieh, M., Tayefi-Nasrabadi, H., 2012. Effects of dietary Ergosan on cutaneous mucosal immune response in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish and Shellfish Immunology, 32, 407–10.
35. Siwicki, A., Anderson, D., 1993. Nonspecific defence mechanisms assay in fish II; Potential killing activity of neutrophils and manocytes, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin (Ig) level in serum, International Journal of Aquatic Biology, 105-111.
36. Subramanian, S., MacKinnon, S.L., Ross, N.W., 2007. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. Comparative Biochemistry and Physiology B, 148(3), 256–263.
37. Suzuki, Y., Tasumi, S., Tsutsui, S., Okamoto, M., Suetake, H., 2003. Molecular diversity of skin mucus lectins in fish. Comparative Biochemistry and Physiology, 136(72), 3-30.
38. Talpur, A., 2014. (*Mentha piperita*) (Peppermint) as feed additive enhanced growth performance, survival, immune response and disease resistance of Asian sea bass, (*Lates calcarifer)* (Bloch) against Vibrio harveyi infection. Aquaculture, 420-421, 71-78.

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-06-15]

[DOI: 10.71901/jad-2024-1-480]

Effect of Nettles (*Utrica dioica*) hydroalcohalic extract on mucosal immune response and immune related (TNF-alfa) gene expression in goldfish

Nezhad Moghadam, Sh.[1*], Imanpoor, M.R.[1], Jafari, V.[1], Safari, R.[1]

1-Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

Received: 21 August 2023 Accepted: 19 December 2023

Abstract

Considering the effect of plant immunostimulants on non-specific immune response in aquatic animals, the present study was conducted to investigate the effects of supplementation of goldfish (*Carasius auratus*) diet with (*Utrica dioica*) hydroalcohalic extract on mucosal immune response (total immunoglobin, lysozyme and protease) as well as immune related (TNF-alfa) gene expression. For this purpose, 180 fish with an average weight of 0.192 ± 0.014 were randomly divided in 6 aquaria (two replicate) and fed with this extract on three levels: 0, 2 and 4 gr/kg. Evaluation of mucosal immune parameters revealed that supplementation of diet with *Utrica dioica* significantly elevated lyzozyme and protease activity in fish fed 4 gr/kg compared to control and 2 gr/kg (p<0.05). Total immunogloubin didn't show significant difference in fish fed supplemented diet compared to control (p>0.05). Molecular studies on immune gene (TNF-alfa) gene expression revealed significant increase in *Achilleamille folium* fed diet (p<0.05). Results showed immunomodulatory effects of dietary *Utrica dioica* extract on skin mocus as well as expression of inflammatory cytokine in gold fish.

Keywords: Nettles, Goldfish, Mucosal immune, Gene expression

[*] *Corresponding Author: sh.n.moghadam88@gmail.com*

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-06-15]

[DOI: 10.71901/jad-2024-1-480]