

## تأثیر مکمل‌های غذایی پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* و پری‌بیوتیک *Agaricus bisporus* بر بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در مواجهه با نانوقره

سید رضا خالقی<sup>۱</sup>، سید علی اکبر هدایتی<sup>۲\*</sup>، حدیثه کشیری<sup>۲</sup>، حامد پاک‌نژاد<sup>۴</sup>، سید حسین حسینی‌فر<sup>۲</sup>

تاریخ دریافت: بهمن ۹۶

تاریخ پذیرش: شهریور ۹۷

### چکیده

هدف از این پژوهش ارزیابی اثرات مکمل‌های غذایی پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* و پری‌بیوتیک *Agaricus bisporus* به صورت مجزا و سین‌بیوتیک (ترکیبی) بر بیان ژن‌های دخیل با ایمنی (IL-8، TNF-1) و LYZ-c در ماهی کپور معمولی در مواجهه با نانوقره بود. بدین منظور ۱۸۰ قطعه ماهی با میانگین وزنی ۰/۴ ± ۲۹/۶ گرم در چهار تیمار پروبیوتیک، پری‌بیوتیک، مکمل ترکیبی و شاهد (تغذیه بدون مکمل غذایی) تقسیم و به مدت ۸ هفته تغذیه شدند. سپس ماهیان هم‌زمان با غذاهای، به مدت ۱۴ روز در مواجهه با غلظت تحت کشنده نانوقره (۱ میلی‌گرم در لیتر) قرار گرفتند. نمونه‌برداری از بافت روده برای سنجش بیان ژن‌های مذکور طی روزهای ۱، ۷ و ۱۴ مواجهه با نانوقره صورت پذیرفت. بیان ژن TNF-1 در تیمارهای تغذیه شده با مکمل غذایی پروبیوتیک و پری‌بیوتیک با افزایش مدت زمان مواجهه با نانوقره افزایش معناداری یافت ( $P < 0/05$ ). سطح بیان این ژن در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی مکمل غذایی پری‌بیوتیک در روز ۱۴ مواجهه با نانوقره (۱/۶۱) نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود. بیان ژن‌های IL-8 و LYZ-c در روز ۱ مواجهه بیشترین مقدار خود را داشتند. اما در روزهای ۷ و ۱۴ مواجهه نانوقره بیان این دو ژن کاهش معناداری یافت ( $P < 0/05$ ). همچنین با وجود استفاده از مکمل سین‌بیوتیک در جیره غذایی نسبت به استفاده مجزای آن‌ها برتری نداشت. استفاده مجزا یا توام پروبیوتیک *P. acidilactici* و پری‌بیوتیک پودر قارچ *A. bisporus* در جیره غذایی می‌تواند سبب افزایش بیان نسبی ژن TNF-1 در ماهی کپور معمولی در رویارویی با نانوقره شود. همچنین این مکمل‌های غذایی بر بیان ژن‌های IL-8 و LYZ-c تأثیر مثبتی نداشتند.

### واژگان کلیدی: نانوذرات، ماهی کپور معمولی، ژن TNF-1، IL-8، LYZ-c

۱- کارشناس ارشد بوم‌شناسی آبزیان شیلاتی، گروه بوم‌شناسی آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۲- دانشیار گروه تولید و بهره‌برداری آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۳- استادیار گروه تولید و بهره‌برداری آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

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

\* نویسنده مسئول: [hedayati@gau.ac.ir](mailto:hedayati@gau.ac.ir)

## مقدمه

مکمل‌های غذایی با اثرگذاری بر گیرنده‌ها و ژن‌های مسئول به طور مستقیم مکانیسم‌های دفاع اولیه را فعال می‌کنند (Bricknell and Dalmo, 2005). عامل نکروز کننده تومور (TNF) یک پروتئین سلولی سیگنالینگ (سیتوکین) درگیر در التهاب سیستمیک است و یکی از سیتوکین‌هایی است که واکنش فاز حاد را تشکیل می‌دهد. TNF-1 بیشتر نقش پروتئین‌های واسطه را در سلول‌های ایمنی دارد و سلول‌های ایمنی را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Gruss, 1996). همچنین، برخی از سیتوکین‌ها را تحت عنوان اینترلوکین می‌شناسند که توسط برخی گلبول‌های سفید ترشح شده، گلبول‌های سفید دیگر اثر می‌گذارند. تاکنون اینترلوکین‌ها را از IL-1 تا IL-38 طبقه‌بندی کرده‌اند (Akdis et al., 2016).

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده هستند که در صورت مصرف در انسان یا جانوران با اثر بر فلور میکروبی روده میزبان، موجب ساخت ترکیبات مفید از جمله ویتامین‌ها و برخی آنزیم‌ها شده، در نتیجه باعث تحریک و افزایش کارایی سیستم ایمنی می‌شوند. پروبیوتیک *Pediococcus*

با پیشرفت فناوری نانو، حجم بالایی از نانوذرات تولید و به طرق مختلف وارد محیط زیست و اکوسیستم‌های آبی شده است. ویژگی‌های ضد میکروبی نانوقره، آن را به یک محصول پرکاربرد در صنایع مختلف مانند پوشاک، داروسازی، لوازم بهداشتی و ماشین‌های لباس‌شویی تبدیل کرده است (Shahare et al., 2013). نانوقره قابلیت جذب و ورود به بدن ماهیان از طریق دستگاه گوارش و تاثیر منفی بر اشتها و رشد، و نیز تجمع در بافت‌های مختلف آن‌ها را دارد (جوهری و حسینی، ۱۳۹۳). اگر استفاده از نانوفناوری‌های نقره گسترش زیادی پیدا کند، غلظت نقره در طبیعت به صورت منطقه‌ای و ناحیه‌ای به حدی افزایش می‌یابد که حتی این غلظت‌ها از پیک میزان نقره محلول در آب‌های آلوده نیز خواهد گذشت که این امر می‌تواند نگرانی را در رابطه با خطرهای اکولوژیکی بیشتر و جدی‌تر کند.

مکمل‌های غذایی مانند پروبیوتیک، پری‌بیوتیک و سین‌بیوتیک نیز به عنوان یک نوع محرک سیستم ایمنی می‌توانند با افزایش تحریک پاسخ‌های ایمنی در آبزیان از اهمیت بالایی در منابع آبی برخوردار باشند. این

پری بیوتیک قارچ، ماده غذایی (کربوهیدرات) غیرقابل هضمی است که از طریق تحریک رشد و فعالیت یک یا تعداد محدودی از باکتری‌های موجود در روده اثرات سودمندی برای میزبان دارد و می‌تواند سلامتی میزبان را بهبود ببخشد (Schrezenmeir and Vrese, 2001). Harikrishnan و همکاران (۲۰۱۲)، اثرات به کارگیری عصاره قارچ *Inonotus obliquus* در جیره کفشک‌ماهی (*Paralichthys olivaceus*) را بررسی کردند. نتایج این مطالعه افزایش ایمنی غیراختصاصی و کاهش تلفات را در برابر پاتوژن *Uronema marinum* نشان داد (Harikrishnan et al., 2012). Hoseinifar و همکاران (۲۰۱۵) طی پژوهشی دریافتند جیره غذایی حاوی مکمل پروبیوتیک *P. acidilactici* و پری بیوتیک گالاکتو الیگوساکارید باعث افزایش سطح پاسخ ایمنی غیراختصاصی، شاخص‌های ایمنی موکوسی و مقاومت در برابر بیماری در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) می‌شود. پژوهش دیگری توسط Khodadadianzou و همکاران (۲۰۱۶) بر روی اثرات استفاده از پودر قارچ *Agaricus bisporus* در جیره بر ایمنی موکوس پوست و با *Lactobacillus acidilactici* از خانواده *Lactobacillus*. با تحریک سیستم ایمنی میزبان می‌تواند سبب بهبود وضعیت سلامت آن شود و از تکثیر باکتری‌های بیماری‌زا در لوله گوارش جلوگیری کند (Irianto and Austin, 2002). Ferguson و همکاران (۲۰۱۰) اثر پروبیوتیک *P. acidilactici* را روی میکروبیوتای روده و وضعیت ایمنی تیلاپپای قرمز (*Oreochromis niloticus*) در حال رشد به مدت ۳۲ روز مورد مطالعه قرار دادند، نتایج آن‌ها نشان داد سطوح لوکوسیت روده بعد از اعمال پروبیوتیک بدون تغییر باقی می‌ماند، اما تاثیرات قابل توجهی در ایمنی سیستمیک مشاهده شد. همچنین بازماندگی در تیمارهای حاوی پروبیوتیک به طور معنی‌داری بیشتر بود. نتایج حاصل از بیان ژن‌های TNF-1 و TNF-2 نشان داد که با افزایش مقدار باکتری *Lactobacillus acidophilus* در جیره میزان نسبی بیان این ژن‌ها افزایش پیدا کرد ( $P < 0.05$ ). در این مطالعه مشخص شد که (*L. acidophilus*) باعث افزایش ایمنی به واسطه افزایش بیان نسبی سیتوکین‌های التهابی (TNF-1 و TNF-2) در ماهی قرمز (*Carassius auratus gibelio*) می‌شود (حسینی، ۱۳۹۵).

جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به طور معنی‌داری موجب افزایش طول چین‌های موکوسی و التهاب لوکوسیت‌های اپیتلیال در قسمت ابتدایی و انتهایی روده در گروه‌های تغذیه شده با سین‌بیوتیک شد و بیان ژن‌های IL-1، TNF-1، IL-8 و mx-1 در روده افزایش یافت. نقش اصلی TNF-1 در تنظیم سلول‌های ایمنی است. توانایی پروبیوتیک‌ها در اصلاح عملکرد اپیتلیال و سیتوکین‌ها تنها به تاثیرات فیزیولوژیکی محدود نمی‌شود بلکه این میکروارگانیسم‌ها در سطح بیان ژن نیز قادر هستند اثراتی را اعمال کنند (Grayfer et al., 2008).

از آنجا که عملکرد یک ژن در سطح mRNA با رفتار پروتئین پس از ترجمه متفاوت است بررسی میزان بیان ژن لیزوزیم می‌تواند به عنوان نتیجه قابل استناد در رابطه با اثر محرک‌های ایمنی بر این ژن باشد. سطح لیزوزیم یا فعالیت آن یک شاخص مهم در دفاع اولیه ماهی است. همچنین مشاهده شده است که سطح فعالیت لیزوزیم یا میزان بیان mRNA در پاسخ به بیماری‌های عفونی یا استرس تغییر می‌کند (صمدی یزدی و ولی‌زاده، ۱۳۸۸).

بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی موکوسی و سرمی در بچه ماهی کپور معمولی صورت گرفت. بدین منظور ماهیان به مدت ۸ هفته با جیره‌های آزمایشی حاوی سطوح مختلف پودر قارچ (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ درصد) تغذیه شدند. بررسی بیان ژن‌های TNF-1 و IL-1 در روده موید افزایش معنی‌دار بیان TNF-1 در بچه ماهیان تغذیه شده با ۲ درصد قارچ در مقایسه با سایر تیمارها بود. نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از پودر قارچ در جیره تاثیر مثبتی بر افزایش بیان ژن‌های درگیر در ایمنی داشت و این قارچ را به عنوان یک منبع پری‌بیوتیکی مهم مورد تایید قرار داد.

Griffitt و همکاران (۲۰۰۸) بیان ژن افتراقی را بر روی آبشش ماهی گورخری (*Danio rerio*) در مواجهه با نانوذرات فلزی و Garcia-Reyero و همکاران (۲۰۱۴) بر روی بافت مغز و کبد ماهی *Pimephales promelas* را در مواجهه با نانوقره و یون نقره مورد بررسی قرار دادند. بیان ژن‌های مرتبط نشان داد که هم نانوقره و هم نقره نیترات با قرارگیری مستقیم یون نقره بر روی اندام‌های هدف، دارای سمیت بودند. Abid و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که ترکیب *P. acidilactici* و فروکتو اولیگوساکارید در

ماهیان ابتدا در آب نمک (NaCl) با غلظت ۲ درصد به مدت ۱۵ دقیقه حمام داده شدند و سپس برای سازگار شدن با شرایط آزمایشگاه در ۳ وان ۴۰۰ لیتری ذخیره شدند. برای کاهش تلفات احتمالی، به مدت ۴۸ ساعت غذادهی انجام نشد. ماهیان پس از یک هفته دوره سازگاری، در ۱۲ وان فایبرگلاس با حجم ۱۰۰ لیتر آب به تعداد ۱۵ قطعه در هر وان توزیع شدند. ماهیان روزانه به میزان ۳ درصد وزن بدن در سه نوبت با غذای تجاری ماهی کپور (فرادانه، ایران) حاوی مکمل‌های غذایی (جدول ۱) تغذیه شدند (جافرنوده، ۱۳۹۵). طی دوره آزمایش، نگهداری ماهیان در وان‌های حاوی آب با میانگین دمای  $23 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول  $6/8 \pm 0/4$  میلی‌گرم در لیتر و  $7/8 \pm 0/3$  pH صورت گرفت.

#### غذادهی ماهیان با مکمل‌های غذایی

پروبیوتیک مورد استفاده در این پژوهش *Pediococcus acidilactici* تحت نام تجاری باکتوسل (Lallemand، فرانسه) به صورت لیوفیلیزه تهیه شد. باکتری در غلظت  $10^7 \times 0/9$  CFU/g مورد استفاده قرار گرفت (Castex et al., 2010). همچنین از قارچ دکمه‌ای *Agaricus bisporus* به عنوان

ورود آلاینده‌هایی همچون نانوقره به اکوسیستم‌های آبی به عنوان عامل تنش‌زا می‌تواند با اثرگذاری بر فیزیولوژی و سلامت ماهیان، باعث کاهش عملکرد سیستم ایمنی آن‌ها شود. بررسی سطح بیان ژن‌های سیتوکین و لیزوزیم می‌تواند به عنوان شاخصی برای وضعیت سیستم ایمنی باشند. مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر استفاده از پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* و پری‌بیوتیک *Agaricus bisporus* به صورت مجزا و مکمل ترکیبی بر روی بیان نسیه ژن‌های TNF- $\alpha$ ، IL-8 و LYZ-c و در نهایت امکان کاهش اثر سمیت نانوقره از طریق بهبود عملکرد سیستم ایمنی در ماهیان کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) صورت پذیرفت.

#### مواد و روش‌ها

##### تهیه و نگهداری ماهیان

در مطالعه حاضر ۱۸۰ قطعه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) با میانگین وزن  $29/6 \pm 0/4$  گرم از یک مرکز تکثیر خصوصی واقع در استان گیلان تهیه و در شرایط استاندارد به مرکز آبی‌پروری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شد. به منظور بهبود تنش ناشی از حمل‌ونقل و انگل‌زدایی،

۱) *P. acidilactici* به همراه *A. bisporus* گرم پروبیوتیک در کیلوگرم غذا و ۱۰ گرم پری‌بیوتیک بر کیلوگرم جیره) به جیره پایه اضافه شد. به این ترتیب که ابتدا مکمل‌ها توزین و سپس در محلول ژلاتین ۴ درصد حل شدند و روی جیره پایه اسپری شدند (جافرنوده، ۱۳۹۵).

#### تعیین $LC_{50}$ ۹۶ ساعته نانوقره

با بررسی مطالعات انجام شده، مقادیر نزدیک به  $LC_{50}$  انتخاب شد. برای انجام آزمایش  $LC_{50}$  نانوقره، ماهیان کپور در ۶ تیمار با غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر نانوقره و یک تیمار شاهد با سه تکرار (در هر تکرار ۶ ماهی) به صورت تصادفی در وان‌های ۱۰۰ لیتری قرار گرفتند. با شروع آزمایش کشندگی حاد، هیچ‌گونه تعویض آبی در مخازن آزمایش صورت نگرفت و غلظت آلاینده‌ها هم تجدید نشد. هوادهی در تمامی وان‌ها به گونه‌ای که حداقل آشفستگی در آب ایجاد شود صورت گرفت (هدایتی و همکاران، ۱۳۹۲). زمان انجام آزمایش غلظت کشندگی، ۹۶ ساعت بود و میزان مرگ و میر در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲، و ۹۶ ساعت محاسبه شد. پس از محاسبه  $LC_{50}$  که ۲ میلی‌گرم بر لیتر بود،

پری‌بیوتیک استفاده شد. قارچ‌ها پس از خرد شدن، به علت داشتن مقدار زیادی آب، به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. سپس ۴۸ ساعت در دستگاه آون ۴۵ درجه سانتی‌گراد خشک شد. نهایتاً قارچ‌های خشک شده آسیاب شدند و از پودر قارچ برای تهیه جیره آزمایشی استفاده شد (Sevik et al., 2013).

آزمایش در قالب ۴ تیمار انجام شد. در تیمار شاهد ماهیان با غذای تجاری ماهی کپور به عنوان جیره پایه که مشخصات آن در جدول ۱ آمده است، تغذیه شدند.

جدول ۱: درصد ترکیبات تشکیل دهنده جیره پایه مورد استفاده در تغذیه ماهیان کپور معمولی

ترکیبات جیره	مقدار (%)
پروتئین خام	۳۵-۳۸
چربی خام	۴-۸
فیبر خام	۴-۷
خاکستر	۷-۱۱
رطوبت	۵-۱۱
فسفر کل	۱-۱/۵

در تیمار دوم پروبیوتیک *P. acidilactici*

(۱ گرم پروبیوتیک در کیلوگرم جیره)، در تیمار سوم پری‌بیوتیک *A. bisporus* (۱۰ گرم پری‌بیوتیک بر کیلوگرم جیره) و در تیمار چهارم

مدت ۱۴ روز در مواجهه با نانوقره با غلظت ۵۰٪  $LC_{50}$  قرار گرفتند.

**نحوه نمونه برداری از بافت برای انجام بیان ژن**  
به منظور انجام بیان ژن از بافت روده ماهیان، در روزهای ۱، ۷ و ۱۴ مواجهه با نانوقره و از هر وان ۳ ماهی نمونه برداری شد. قبل از آغاز نمونه برداری تمام وسایل و لوازم مورد استفاده، اتوکلاو و استریل شدند. بافت روده برداشته شده از هر تکرار پس از انتقال به میکروتیوب‌های ۱/۵mL سریعاً به نیتروژن مایع منتقل شدند. پس از تکمیل نمونه برداری از تمامی تیمارها، میکروتیوب‌های حاوی نمونه تا روز آزمایش در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

#### استخراج RNA

از کیت RiboEx™ LS (TRIzol؛ GeneAll Biotechnology، کره جنوبی) برای همگن شدن و دسترسی به محتویات درون سلولی نمونه‌ها، ابتدا بافت روده توسط ازت مایع درون هاون کاملاً پودر شد. در مرحله بعد با اضافه کردن کلروفرم به ترکیب، دو فاز آبی و آلی ایجاد شد. برای رسوب دادن RNA

آزمایش سمیت تحت کشنده انجام شد. با توجه به این که آزمایش تحت حاد در دوره ۲۸-۷ روزه صورت می‌گیرد (Di Giulio and Hinton, 2008)، این آزمایش در ۱۴ روز و با انتخاب ۵۰ درصد از غلظت سمیت کشنده (۱ میلی‌گرم بر لیتر) انجام شد و تمام تیمارهای آزمایشی طی این ۱۴ روز، در مواجهه با نانوقره قرار گرفتند.

#### مواجهه با غلظت تحت کشنده نانوقره

بعد از پایان ۸ هفته دوره غذایی با جیره حاوی مکمل پروبیوتیک *P. acidilactici*، پری‌بیوتیک *A. bisporus* و سین‌بیوتیک، مواجهه ۱۴ روزه ماهیان با غلظت تحت کشنده نانوقره (۱ میلی‌گرم در لیتر) آغاز شد. طی این دوره از کلونید نانوقره (پیشگامان نانومواد ایرانیان، مشهد) استفاده شد. نانوقره به شکل محلول کلونیدی ۴۰۰۰ppm و طبق بررسی با میکروسکوپ الکترونی TEM دارای میانگین اندازه ۲۰ نانومتر بود. آزمایش  $LC_{50}$  طی ۹۶ ساعت طبق روش هدایتی و همکاران (۱۳۹۲) محاسبه شد. پس از محاسبه  $LC_{50}$ ، آزمایش سمیت تحت کشنده انجام شد. به این ترتیب که مجموعاً ۱۲ وان شامل ۴ تیمار و ۳ تکرار به

از ایزوپروپانول استفاده شد. در انتها پس از شستشو با اتانول ۷۵ درصد، پلت RNA رسوب داده شده در انتهای میکروتیوب، قابل مشاهده بود. RNA استخراج شده به دو روش کمی و کیفی مورد ارزیابی قرار گرفت. کمیت RNA توسط دستگاه اسپکتروفتومتر نانودرآپ (UNICO، آمریکا) سنجیده شد و سپس به منظور کنترل کیفیت، RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد مشاهده شد. نتایج کیفی RNA استخراج شده از بافت روده ماهی کپور، دو باند rRNA ۱۸ s و ۲۸ s را با وضوح بالا نشان داد. نسبت شدت جذب در نمونه‌های RNA استخراج شده در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر در محدوده ۱/۸-۲/۱ قرار داشت

که بیانگر قابلیت مناسب RNA در نمونه‌های مورد بررسی بود.

برای سنتز cDNA از کیت Suprime-Script RTase (GeNet Bio، کره جنوبی) استفاده شد. این کیت طی فرآیند حرارتی در دستگاه ترمال سایکل (BIO RAD، آمریکا)، RNA تک‌رشته‌ای را به دو رشته‌ای تبدیل کرد. آغازگرهای مورد استفاده (جدول ۲) بر اساس مطالعات قبلی Hoseinifar و همکاران (۲۰۱۸) انتخاب و با نرم‌افزار Bio Edit با استفاده از توالی موجود در بانک ژن (NCBI National Center for Biotechnology Information) آزموده شدند و کارایی آن‌ها طی تکنیک PCR (Reaction Polymerase Chain) بررسی شد.

جدول ۲: توالی آغازگرهای استفاده شده برای بیان ژن

نام ژن	شماره دسترسی آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال طول قطعه تکثیر (°C)	شونده (bp)
<b>TNF-1</b>	AJ311800	TCAAGCTGCGAGCTGGAGACAG	۶۰	۷۷
		TCCGTCACCGGTTTCTACGCTC	۶۰	
<b>IL-8</b>	EU011243.1	GTCTTAGAGGACTGGGTGTA	۵۸	۱۱۰
		ACAGTGTGAGCTTGGAGGGA	۵۸	
<b>LYZ-c</b>	AB027305.1	AGCCGCAGACTGAAACGCTGTG	۶۰	۱۰۰
		AGGCCGTGCACACATAGTTGCC	۶۰	
<b>-actin</b>	M24113	AGACATCAGGGTGTTCATGGT	۵۸	۲۶۱
		CTCAAACATGATCTGTGTCAT	۵۸	



انجام گرفت. نمودارها نیز در نرم‌افزار Microsoft Excel 2013 رسم شدند.

### نتایج

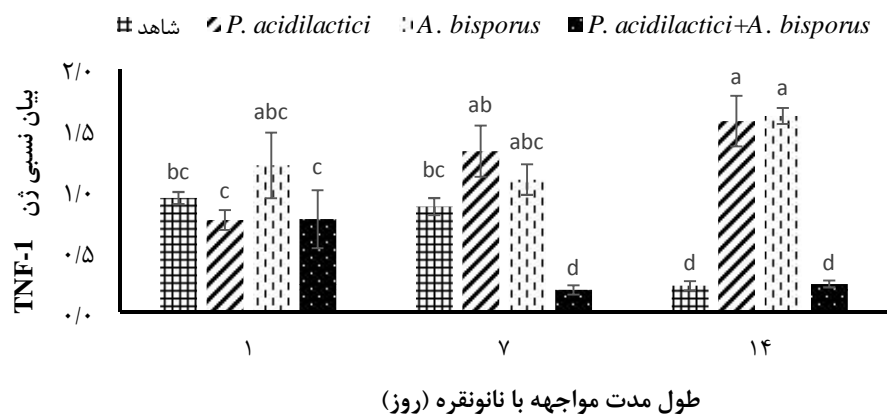
#### بیان نسبی ژن TNF-1

نتایج به دست آمده از تحلیل داده‌های بیان ژن TNF-1 در تیمارهای تغذیه شده با مکمل‌های غذایی حاوی پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici*، پری‌بیوتیک *Agaricus bisporus* و سین‌بیوتیک *P. acidilactici* + *A. bisporus* در مقایسه با تیمار شاهد طی روزهای ۱، ۷ و ۱۴ مواجهه با غلظت تحت کشنده نانونقره در شکل ۱ آورده شده است. در روز ۱ مواجهه تفاوت معناداری در بیان ژن تیمارهای حاوی مکمل‌های غذایی در مقایسه با تیمار شاهد مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ). اما سطح بیان این ژن در جیره حاوی پری‌بیوتیک (۱/۲۱) نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود. در روز ۷ مواجهه با نانونقره، بیان ژن TNF-1 در تیمار پروبیوتیک افزایش معناداری نسبت به روز ۱ داشت ( $P < 0.05$ )، اما در تیمار پری‌بیوتیک تفاوت معناداری با روز ۱ مشاهده نشد و تقریباً در همان سطح اولیه بود ( $P > 0.05$ ). میزان این

در انتها به منظور ردیابی محصول واکنش از تکنیک Real Time PCR (ABI7300، Applied Biosystems، آمریکا) استفاده شد. در این فرآیند نشانگر فلورسنتی YTA SYBR Green qPCR MasterMix 2X (یکتا تجهیز آزما، ایران) برای سنجش میزان محصول به دست آمده به کار رفت. بررسی بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از روش منحنی استاندارد مشخص شد که در تمامی مراحل تقریباً بیان ثابتی دارد، از این رو در پژوهش حاضر، نرمال‌سازی بیان ژن هدف با استفاده از ژن مرجع *-actin* (Larionov et al., 2005).

#### تجزیه و تحلیل داده‌ها

این آزمایش بر مبنای طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار شامل تیمار شاهد (فاقد مکمل غذایی در جیره + مواجهه با نانونقره) و تیمارهای تغذیه با پروبیوتیک *P. acidilactici*، پری‌بیوتیک *A. bisporus* و سین‌بیوتیک (حاوی مکمل غذایی در جیره + مواجهه با نانونقره) در ۳ تکرار صورت پذیرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با روش تحلیل واریانس یک‌طرفه و مقایسه میانگین‌ها با پس‌آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد در نرم‌افزار SPSS 22

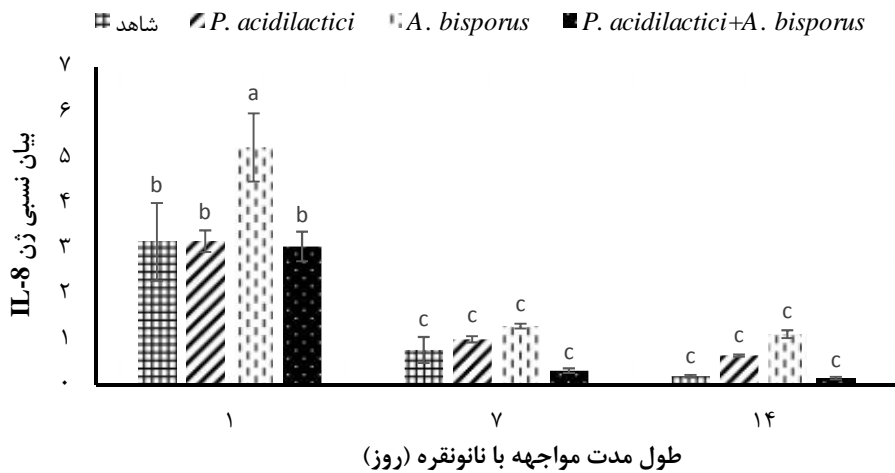


شکل ۱: بیان نسبی ژن TNF-1 در تیمارهای تغذیه شده با مکمل‌های غذایی طی روزهای ۱، ۷ و ۱۴ مواجهه با نانوفره. حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌داری بین تیمارها است ( $P < 0.05$ ).

شاخص در تیمار سین‌بیوتیک روز ۷ کاهش معناداری نسبت به روز ۱ داشت ( $P < 0.05$ ). در روز ۱۴ تیمارهای پروبیوتیک و پری‌بیوتیک با بیشترین سطح بیان ژن به ترتیب ۱/۵۷ و ۱/۶۱، نسبت به تیمارهای شاهد (۰/۲۱) و سین‌بیوتیک (۰/۲۳) تفاوت معنادار داشتند ( $P < 0.05$ ) که این افزایش در تیمار پری‌بیوتیک نسبت به روز ۱ و ۷ تفاوت معناداری در سطح ۵ درصد نداشت. سطح بیان ژن تیمار سین‌بیوتیک در روز ۱۴ تفاوت معناداری با روز ۷ نداشت ( $P > 0.05$ ). اما در تیمار شاهد در روز ۱۴ سطح بیان ژن در مقایسه با روز ۱ و ۷ کاهش معناداری مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). به طور کلی کمترین سطح

#### بیان نسبی ژن IL-8

شکل ۲ نتایج سنجش سطح بیان ژن IL-8 را در تیمارهای مختلف نشان می‌دهد که طی روزهای ۱، ۷ و ۱۴ مواجهه با نانوفره بیان این ژن کاهش معناداری داشت ( $P < 0.05$ ). در روز ۱ مواجهه، سطح بیان ژن در تیمار پری‌بیوتیک تفاوت معناداری در مقایسه با تیمار شاهد داشت ( $P < 0.05$ ), اما در تیمارهای حاوی مکمل‌های غذایی پروبیوتیک و سین‌بیوتیک نسبت به تیمار شاهد تفاوت معناداری مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ).



شکل ۲: بیان نسبی ژن IL-8 در تیمارهای تغذیه شده با مکمل‌های غذایی طی روزهای ۱، ۷ و ۱۴ مواجهه با نانونقره. حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌داری بین تیمارها است ( $P < 0.05$ ).

پروبیوتیک (۰/۶۴) نسبت به روز ۷ تفاوت معنادار نداشت ( $P > 0.05$ ). تیمار پری‌بیوتیک در روز ۱۴ مواجهه تفاوت معناداری با روز ۷ نداشت ( $P > 0.05$ ). تیمار سین‌بیوتیک نیز با وجود کاهش سطح بیان ژن در روز ۱۴ (۰/۱۴) تفاوت معناداری با روز ۷ (۰/۳۰) نداشت ( $P > 0.05$ ). به طور کلی، سطح بیان ژن IL-8 در تمام تیمارهای آزمایشی روز ۱۴، در مقایسه با روز ۱ تفاوت معناداری داشت ( $P < 0.05$ ), اما این کاهش سطح بیان ژن در مقایسه با روز ۷، تقریباً در یک سطح بود و تفاوت معناداری در سطح اطمینان ۹۵ درصد مشاهده نشد. بیشترین میزان سطح بیان ژن IL-8 مربوط به

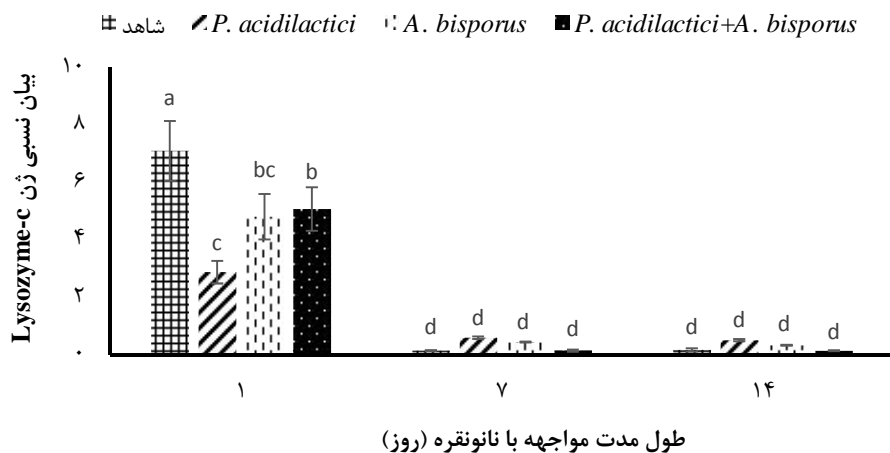
در روز ۷ مواجهه با نانونقره سطح بیان ژن IL-8 در تیمار شاهد (۰/۷۶) در مقایسه با روز ۱ (۳/۱۴) کاهش معنادار داشت ( $P < 0.05$ ). در تیمارهای پروبیوتیک، پری‌بیوتیک و سین‌بیوتیک نیز سطح بیان ژن IL-8 در روز ۷ (به ترتیب ۰/۹۹، ۱/۲۹ و ۰/۳۰) نسبت به روز ۱ (به ترتیب ۳/۱۵، ۵/۲۲ و ۳/۰۴) معنادار بود ( $P < 0.05$ ). سطح بیان ژن IL-8 در روز ۱۴ مواجهه با نانونقره در تیمار شاهد با وجود کاهش سطح بیان ژن، تفاوت معناداری با روز ۷ مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ), اما در مقایسه با روز ۱، این کاهش سطح بیان ژن معنادار بود ( $P < 0.05$ ). در روز ۱۴ سطح بیان ژن در تیمار

تیمار پری بیوتیک روز ۱ (۵/۲۲) و کمترین میزان آن مربوط به تیمار سین بیوتیک روز ۱۴ (۰/۱۴) بود.

### بیان نسبی ژن LYZ-c

نتایج به دست آمده از بررسی سطح بیان ژن LYZ-c در تیمارهای مختلف نشان داد میزان بیان این ژن با افزایش روزهای مواجهه با غلظت تحت کشنده نانونقره کاهش یافت (شکل ۳). در روز ۱، سطح بیان ژن در تیمارهای حاوی مکمل‌های غذایی به طور معناداری کمتر از تیمار شاهد بود ( $P < 0.05$ ). میزان این شاخص در تیمارهای پری بیوتیک و سین بیوتیک تقریباً در یک سطح بود (به ترتیب

۴/۷۹ و ۵/۰۶) و تفاوت معناداری با یکدیگر نداشت ( $P > 0.05$ ). تیمار پروبیوتیک نیز در روز ۱ (۲/۸۶) تفاوت معناداری نسبت به تیمارهای پری بیوتیک (۴/۷۹)، سین بیوتیک (۵/۰۶) و شاهد (۷/۰۸) نداشت ( $P < 0.05$ ). در روز ۷ مواجهه سطح بیان ژن LYZ-c در تمام تیمارها کاهش معناداری در سطح اطمینان ۹۵ درصد نسبت به روز ۱ مشاهده شد، اما تیمارها با یکدیگر تفاوت معناداری نداشتند. سطح بیان ژن LYZ-c در روز ۱۴ مواجهه با نانونقره نسبت به روز ۷ تغییر معناداری نداشت ( $P > 0.05$ ). بیشترین میزان بیان این ژن مربوط به تیمار شاهد در روز ۱ (۷/۰۸) و کمترین میزان آن مربوط به تیمار سین بیوتیک روز ۱۴ (۰/۱۳) بود.



شکل ۳: بیان نسبی ژن LYZ-c در تیمارهای تغذیه شده با مکمل‌های غذایی طی روزهای ۱، ۷ و ۱۴ مواجهه با نانونقره. حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌داری بین تیمارها است ( $P < 0.05$ ).

## بحث

آلاینده‌ها گزارش نشده است. با این وجود نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر مشابه با نتایج به دست آمده از مطالعه Khodadadianzou و همکاران (۲۰۱۶) بود که نشان داد سطح بیان ژن‌های سیتوکین (TNF-1 و IL-1) در اثر تغذیه پری‌بیوتیک قارچ، به مقدار قابل توجهی نسبت به دیگر تیمارها افزایش داشت ( $P < 0.05$ ). در مطالعه دیگری مخمر *Debaryomyces hansenii* پس از چهار هفته موجب افزایش بیان ژن TNF-1 در روده ماهی باس دریایی (*Sparus aurata*) شد (Reyes-Becerril et al., 2008). در همین راستا Kolangi Miandare و همکاران (۲۰۱۶) بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی پری‌بیوتیک گالاکتو الیگوساکارید را بررسی کردند و دریافتند بیان ژن TNF-1 در ماهی قرمز تغذیه شده با جیره حاوی مکمل غذایی پری‌بیوتیک مثبت بود و افزایش داشت. Zhou و همکاران (۲۰۰۲) نیز طی پژوهشی گزارش کردند سطح بیان ژن TNF-1 در قزل‌آلای رنگین‌کمان در پاسخ به محرک لیپوپلی‌ساکارید افزایش یافت. در پژوهش حاضر افزایش بیان ژن TNF-1 در پاسخ به پری‌بیوتیک پودر قارچ استفاده شده را می‌توان به تغییر فلور باکتریایی دستگاه گوارش

نمود دانش کافی از اثرات مضر و زیان‌بار نانوذرات برای منابع طبیعی و موجودات، نگرانی‌هایی را در خصوص ورود آن‌ها به اکوسیستم‌های طبیعی به وجود آورده است. از این رو توسعه دانسته‌های علمی در مورد اثرات نانوذرات به منظور ارزیابی خطرات آن بر آبزیان ضروری است. استفاده از مکمل‌های غذایی برای کنترل زیستی بیماری‌ها و بهبود سیستم ایمنی در ماهیان گسترش یافته است (Bricknell and Dalmo, 2005; Hoseinifar et al., 2011).

در این مطالعه بیان نسبی ژن TNF-1 در تیمارهای تغذیه شده با مکمل غذایی پروبیوتیک و پری‌بیوتیک با افزایش طول زمان مواجهه با نانوقره افزایش معناداری یافت ( $P < 0.05$ ). تیمار پری‌بیوتیک روز ۱۴ و تیمار سین‌بیوتیک روز ۷ به ترتیب با ۱/۶۱ و ۰/۱۸، بیشترین و کمترین سطح بیان ژن را دارا بودند. تیمار با پودر قارچ *A. bisporus* و پس از آن تیمار با باکتری *P. acidilactici* در روز ۱۴ مواجهه بیشترین تأثیر را بر بیان این ژن در مواجهه با نانوقره نشان دادند. بر اساس بررسی منابع، پژوهشی جهت استفاده از مکمل غذایی برای بهبود سیستم ایمنی ماهی در مواجهه با

دادند که بیان ژن‌های TNF- و IL-1 در روده ماهی کپور معمولی با تجویز خوراکی محرک‌های ایمنی تحت تاثیر قرار نگرفت که با یافته‌های پژوهش حاضر در مورد بیان ژن TNF- مغایرت و با بیان ژن IL-8 مطابقت دارد. بتاگلوکان موجود در پری‌بیوتیک پودر قارچ می‌تواند باعث افزایش اینترلوکین‌ها (IL-1، IL-8 و IL-10) در ماهی شود. گزارش‌های زیادی مبنی بر افزایش بیان ژن سیتوکین‌ها در اثر تغذیه با مکمل‌های غذایی در آبزیان وجود دارد (Jung et al., 2012; Kolangi, 2016; Miandare et al., 2016). با این وجود نتایج به دست آمده از تاثیر پروبیوتیک و پری‌بیوتیک روی بیان نسبی ژن IL-8 در این مطالعه موید این موضوع نیست.

در مطالعه حاضر سطح بیان ژن LYZ-c در تمامی تیمارهای تغذیه شده با مکمل‌های غذایی در مقایسه با تیمار شاهد در روز ۱ اختلاف معناداری داشتند و با افزایش روزهای مواجهه با نانوقره میزان سطح بیان این ژن کاهش معناداری یافت ( $P < 0.05$ ). تیمار شاهد روز ۱ با بیان ژن  $7/0.8$  و تیمار سین‌بیوتیک روز ۱۴ با بیان ژن  $0/1.32$  به ترتیب بیشترین و کمترین سطح بیان ژن LYZ-c را داشتند. در پژوهشی مشابه، در ماهی کپور تغذیه شده با

که خود بر سیستم لنفوئیدی در ارتباط با دستگاه گوارش تاثیر می‌گذارد و بهبود سیستم دفاعی اولیه را به دنبال دارد، نسبت داد. همچنین در خصوص پروبیوتیک باکتری مورد استفاده، *Lactobacillus* موجود در روده بزرگ کربوهیدرات‌های غیرقابل هضم را تخمیر می‌کنند و در نتیجه pH کاهش می‌یابد که این امر باعث تکثیر و بقای ارگانسیم‌های هم‌غذایی می‌شوند که موقعیت اسیدی را ترجیح می‌دهند (Resta-Lenert and Barrett, 2006).

در این پژوهش با افزایش طول مدت مواجهه با نانوقره سطح بیان نسبی ژن IL-8 کاهش معناداری یافت ( $P < 0.05$ ). بیشترین سطح بیان ژن مربوط به تیمارهای روز ۱ مواجهه بود. بیشترین و کمترین سطح بیان ژن IL-8 به ترتیب  $5/22$  و  $0/14$  مربوط به تیمار پری‌بیوتیک روز ۱ و سین‌بیوتیک روز ۱۴ مواجهه با نانوقره بود. مطالعه‌ای که توسط Kadowaki و همکاران (۲۰۱۳) برای بررسی تجویز خوراکی محرک ایمنی لیپوپلی‌ساکارید بر بیان ژن‌های TNF-، IL-1 و IL-6 در ماهی کپور معمولی انجام شد، نشان داد که بیان ژن‌های IL-1 و TNF- تقویت شد، اما بیان ژن IL-6 کاهش یافت. در همین راستا Huttenhuis و همکاران (۲۰۰۶) گزارش

*Agaricus bisporus* استفاده شده در جیره غذایی ماهی کپور معمولی در مواجهه با نانوقره، بیان نسبی ژن TNF- $\alpha$  را به طور معناداری افزایش دادند ( $P < 0.05$ ). از این رو می‌توان نتیجه گرفت که پروبیوتیک و پری‌بیوتیک مورد استفاده می‌توانند به عنوان محرک سیستم ایمنی در این ماهیان پس از مواجهه با عوامل تنش‌زا مانند نانوقره باشند. اما این مکمل‌های غذایی بر بیان ژن‌های IL-8 و LYZ-c تاثیر مثبتی نداشتند. استفاده ترکیبی از پروبیوتیک و پری‌بیوتیک مذکور نه تنها نسبت به استفاده مجزای آن‌ها برتری نداشت بلکه نتوانست بر بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی در ماهی کپور معمولی در مواجهه با نانوقره موثر باشد. بنابراین برای افزایش بیان ژن TNF-1 و در نتیجه بهبود عملکرد سیستم ایمنی ماهی کپور معمولی در مواجهه با نانوقره، استفاده از دو مکمل پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* (۱ گرم پروبیوتیک در کیلوگرم جیره) و پری‌بیوتیک *Agaricus bisporus* (۱۰ گرم پری‌بیوتیک بر کیلوگرم جیره) در جیره غذایی توصیه می‌شود.

گالاکتو الیگوساکارید بیان ژن TNF-1 افزایش یافت، اما بیان ژن IL-10 کاهش و بیان ژن LYZ-c تغییری نداشتند (Hoseinifar و همکاران، ۲۰۱۷). همچنین طی پژوهش دیگری، نتایج به دست آمده از تجزیه و تحلیل ژنی، کاهش بیان ژن‌های دخیل در پاسخ ایمنی را در ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) تغذیه شده با مکمل‌های پروبیوتیک و پری‌بیوتیک نشان داد (Tacchi et al., 2011). با این وجود در دو پژوهش دیگر که استفاده از ایمونوژن و مکمل ویتاسل در جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و استفاده از گالاکتو الیگوساکارید را در ماهی گورخری بررسی کردند، افزایش بیان ژن LYZ-c را نشان داد (یوسفی، ۱۳۹۶؛ Ahmadi et al., 2014) که این نتیجه با نتیجه پژوهش حاضر که کاهش بیان ژن LYZ-c را نشان داد، در تناقض است. تاکنون پژوهشی مبنی بر چگونگی مکانیسم عمل مکمل‌های غذایی روی بیان نسبی ژن‌های مرتبط با ایمنی از جمله لیزوزیم انجام نشده است و نیازمند مطالعات بیشتری است. با توجه به پژوهش انجام شده، پروبیوتیک و پری‌بیوتیک *Pediococcus acidilactici* و

## منابع

- از دیدگاه مولکولی. انتشارات دانشگاه تهران. ۴۴۷ص.
- هدایتی ع.، قربانی ر.، باقری ط.، احمدوند ش. و جهانبخشی ع. ۱۳۹۲. بررسی اثرات سمیت کشنده نانو اکسید روی، نانو اکسید مس (CuO NPs) و نانودی اکسید تیتانیوم (TiO<sub>2</sub> NPs) و بررسی اثرات سمیت تحت کشنده آنها بر فاکتورهای خون و بافت آبشش ماهی قرمز (*Carassius auratus*). کیور معمولی (*Rutilus rutilus*) و کلمه (*Cyprinus carpio*) دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۲۹ص.
- یوسفی س. ۱۳۹۶. اثرات به کارگیری گالاکتو الیگوساکارید در جیره بر برخی شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی و بیان ژن‌های مرتبط به ایمنی در ماهی زبرا (*Danio rerio*). پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۸۵ص.
- Abid A., Davies S.J., Wainnes P., Emery M., Castex M., Gioacchini G., Carnevali O., Bickerdike R., Romero J. and Merrifield D.L. 2013. Dietary synbiotic application modulates Atlantic salmon (*Salmo salar*) intestinal microbial communities and intestinal immunity. *Fish and Shellfish Immunology*, 35(6): 1948–1956.
- Ahmadi P.Y., Farahmand H., Miandare H.K., Mirvaghefi A. and Hoseinifar S.H. 2014. The effects of dietary immunogen on innate immune response, immune related genes expression and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology*, 37(2): 209–214.
- Akdis M., Aab A., Altunbulakli C., Azkur K., Costa R.A., Crameri R., Duan S., Eiwegger T., Eljaszewicz A., Ferstl R. and جعفرنوده ع. ۱۳۹۵. بررسی خواص سینرژیستی برخی اسیدهای آلی با باکتری لاکتوباسیلوس کازئی (*Lactobacillus casei*) در پرورش بچه ماهیان انگشت قد قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). رساله دکترای تخصصی، دانشگاه ارومیه. ۱۵۰ص.
- جوهری س.ع. و حسینی س. ۱۳۹۳. سمیت تغذیه‌ای کلونید نانوذرات نقره در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۳(۱): ۳۰–۲۳.
- حسینی م. ۱۳۹۵. ارزیابی اثرات جیره حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر شاخص رشد و بیان ژن‌های درگیر در اشتها (گرلین) و ایمنی (TNF) در ماهی قرمز (*Carassius auratus*) (gibelio). پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۹۶ص.
- صمدی یزدی ب. و ولی‌زاده م. ۱۳۸۸. ژنتیک



- Frei R. 2016.** Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor , and TNF- : Receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138(4): 984–1010.
- Bricknell I. and Dalmo R.A. 2005.** The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish and Shellfish Immunology*, 19: 457–472.
- Castex M., Lemaire P., Wabete N. and Chim L. 2010.** Effect of probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress of *Litopenaeus stylirostris* under *Vibrio nigripulchritudo* challenge. *Fish and Shellfish Immunology*, 28(4): 622–631.
- Di Giulio R.T. and Hinton D.E. 2008.** *The Toxicology of Fishes*. CRC Press. USA. 1096P.
- Ferguson R., Merrifield D.L., Harper G.M., Rawling M.D., Mustafa S., Picchietti S., Balcazar J.L. and Davies S.J. 2010.** The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Applied Microbiology*, 109(3): 851–862.
- Garcia-Reyero N., Kennedy A.J., Escalon B.L., Habib T., Laird J.G., Rawat A., Wiseman S., Hecker M., Denslow N., Steevens J.A. and Perkins E.J. 2014.** Differential effects and potential adverse outcomes of ionic silver and silver nanoparticles in vivo and in vitro. *Environmental Science and Technology*, 48(8): 4546–4555.
- Grayfer L., Walsh J.G. and Belosevic M. 2008.** Characterization and functional analysis of goldfish (*Carassius auratus*) tumor necrosis factor-alpha. *Developmental and Comparative Immunology*, 32(5): 532–543.
- Griffitt R.J., Luo J., Gao J., Bonzongo J.C. and Barber D.S. 2008.** Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(9): 1972–1978.
- Gruss H.J. 1996.** Molecular, structural, and biological characteristics of the tumor necrosis factor ligand superfamily. *International Journal of Clinical and Laboratory Research*, 26(3): 143–159.
- Harikrishnan R., Balasundaram C. and Heo M.S. 2012.** Inonotus obliquus containing diet enhances the innate immune mechanism and disease resistance in olive flounder *Paralichthys olivaceus* against *Uronema marinum*. *Fish and Shellfish Immunology*, 32(6): 1148–1154.

- Hoseinifar S.H., Ahmadi A., Khalili M., Raeisi M., Van Doan H. and Caipang C.M. 2017.** The study of antioxidant enzymes and immune related genes expression in common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings fed different prebiotics. *Aquaculture Research*, 48(11): 5447–5454.
- Hoseinifar S.H., Mirvaghefi A., Amoozegar M.A., Sharifian M. and Esteban M.A. 2015.** Modulation of innate immune response, mucosal parameters and disease resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) upon synbiotic feeding. *Fish and Shellfish Immunology*, 45(1): 27–32.
- Hoseinifar S.H., Mirvaghefi A., Merrifield D.L., Amiri B.M., Yelghi S. and Bastami K.D. 2011.** The study of some haematological and serum biochemical parameters of juvenile beluga (*Huso huso*) fed oligofructose. *Fish Physiology and Biochemistry*, 37(1): 91–96.
- Hoseinifar S.H., Zou H.K., Van Doan H., Kolangi Miandare H. and Hoseini S.M. 2018.** Evaluation of some intestinal cytokines genes expression and serum innate immune parameters in common carp (*Cyprinus carpio*) fed dietary loquat (*Eriobotrya japonica*) leaf extract. *Aquaculture Research*, 49(1): 120–127.
- Huttenhuis H.B., Ribeiro A.S., Bowden T.J., Van Bavel C., Taverne-Thiele A.J. and Rombout J.H. 2006.** The effect of oral immuno-stimulation in juvenile carp (*Cyprinus carpio*). *Fish and Shellfish Immunology*, 21(3): 261–271.
- Irianto A. and Austin B. 2002.** Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 25(6): 333–342.
- Jung T.S., Del Castillo C.S., Javaregowda P.K., Dalvi R.S., Nho S.W., Park S.B., Jang H.B., Cha I.S., Sung H.W., Hikima J.I. and Aoki T. 2012.** Seasonal variation and comparative analysis of non-specific humoral immune substances in the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Developmental and Comparative Immunology*, 38(2): 295–301.
- Kadowaki T., Yasui Y., Nishimiya O., Takahashi Y., Kohchi C., Soma G.I. and Inagawa H. 2013.** Orally administered LPS enhances head kidney macrophage activation with down-regulation of IL-6 in common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish and Shellfish Immunology*, 34(6): 1569–1575.
- Khodadadianzou H., Hoseinifar S.H., Miandare H.K. and Hajimoradloo A. 2016.** *Agaricus bisporus* powder improved cutaneous mucosal and serum immune parameters and up-regulated intestinal cytokines gene

expression in common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings. Fish and Shellfish Immunology, 58: 380–386.

**Kolangi Miandare H., Yarahmadi**

**P. and Abbasian M. 2016.** Immune related transcriptional responses and performance of *Litopenaeus vannamei* post-larvae fed on dietary probiotic PrimaLac. Fish and Shellfish Immunology, 55: 671–678.

**Larionov A., Krause A. and Miller**

**W. 2005.** A standard curve based method for relative real time PCR data processing. BMC Bioinformatics, 6(62): 1–16.

**Resta-Lenert S. and Barrett K.E.**

**2006.** Probiotics and commensals reverse TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ -induced dysfunction in human intestinal epithelial cells. Gastroenterology, 130(3): 731–746.

**Reyes-Becerril M., Salinas I., Cuesta A., Meseguer J., Tovar-Ramirez D., Ascencio-Valle F. and Esteban**

**M.A. 2008.** Oral delivery of live yeast *Debaryomyces hansenii* modulates the main innate immune parameters and the expression of immune-relevant genes in the gilthead seabream (*Sparus aurata*). Fish and Shellfish Immunology, 25(6): 731–739.

**Schrezenmeir J. and de Vrese M.**

**2001.** Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. The American journal of clinical nutrition, 73(2): 361–364.

**Sevik S., Aktas M., Dogan H. and**

**Kocak S. 2013.** Mushroom drying with solar assisted heat pump system. Energy Conversion and Management, 72: 171–178.

**Shahare B., Yashpal M. and Singh**

**G. 2013.** Toxic effects of repeated oral exposure of silver nanoparticles on small intestine mucosa of mice. Toxicology Mechanisms and Methods, 23(3): 161–167.

**Tacchi L., Bickerdike R., Douglas**

**A., Secombes C.J. and Martin S.A. 2011.** Transcriptomic responses to functional feeds in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Fish and Shellfish Immunology, 31(5): 704–715.

**Zhou J., Wang T., Hirono I., Aoki**

**T., Inagawa H., Honda T., Soma G.I., Ototake M., Nakanishi T., Ellis A.E. and Secombes C.J. 2002.** Differential expression of two tumor necrosis factor genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Developmental and Comparative Immunology, 26(2): 161–172.



**Effect of *Pediococcus acidilactici* probiotic and *Agaricus bisporus* prebiotic supplements on the expression of immune-related genes in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to silver nanoparticles**

Seyed Reza Khaleghi<sup>1</sup>, Seyed Ali Akbar Hedayati<sup>1\*</sup>, Hadiseh Kashiri<sup>1</sup>, Hamed Paknejad<sup>2</sup>, Seyed Hossein Hosseinifar<sup>2</sup>

Received: February 2018

Accepted: September 2018

**Abstract**

The aim of this study was to evaluate the effects of food supplements *Pediococcus acidilactici* probiotic and *Agaricus bisporus* prebiotic separate and together (synbiotics) on the expression of immune-mediated genes (TNF-1, IL-8 and LYZ-c) in common carp exposed to silver nanoparticles. For this aim, 180 carp with an average weight of  $29.6 \pm 0.4$ g were divided into four groups of probiotic, prebiotic, combined and control (feeding with no supplements) and were fed for 8 weeks. After the end of feeding period, the fish were exposed to the concentration of sub-acute nano-silver (1mg/L) for 14 days. Sampling from the intestinal tissue was performed to measure the expression of these genes during days 1, 7 and 14. The expression of TNF-1 gene increased significantly with probiotic and prebiotic dietary supplementation during increasing days of exposure to nano-silver ( $P < 0.05$ ). The expression level of this gene was increased in the 14 days treatments (1.61) compared to other treatments. Expression of IL-8 and LYZ-c genes was highest on 1st day of exposure. However, on the 7<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> days of exposure to the nano-silver, the expression of these two genes decreased significantly ( $P < 0.05$ ). However, in spite of the use of synbiotics supplementation in diet, it was not superior to their separate use. Separate or combined use of *P. acidilactici* as a probiotic and *A. bisporus* as a prebiotic in the diet can increase the relative expression of TNF-1 gene in common carp exposed to nanosilver. Also, these supplements did not affect the expression of IL-8 and LYZ-c genes.

**Key words:** Nanoparticles, Common Carp, Gene TNF-1, IL-8, LYZ-c.

1- M.Sc. in Fisheries Aquatic Ecology, Aquatic Ecology Department, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

2- Associate Professor in Aquatics Production and Exploitation Department, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

3- Assistant Professor in Aquatics Production and Exploitation Department, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

4- Associate Professor in Aquaculture Department, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

\*Corresponding Author: [hedayati@gau.ac.ir](mailto:hedayati@gau.ac.ir)