

اثرات سطوح مختلف زایلوالیگوساکارید جیره غذایی بر برخی شاخص‌های بیوشیمیایی خون، ساختار بافت روده و بیان ژن‌های وابسته به رشد و ایمنی ماهی صبیتی (*Sparidentex hasta*)

علی اکبر برزن^۱، امین اوجی فرد^{۱،۲}، ناصر آق^۳، احمد قاسمی^۴، وحید مرشدی^{۲*}

^۱گروه شیلات، دانشکده علوم و فناوری نانو و زیستی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران.
^۲گروه شیلات و زیست‌شناسی دریا، پژوهشکده خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران.
^۳گروه تکثیر و پرورش آبزیان، پژوهشکده آرتمیا و آبزی پروری، دانشگاه ارومیه، ایران.
^۴گروه زیست‌فناوری، پژوهشکده خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۱۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۰۱

چکیده

استفاده از پری‌بیوتیک‌ها به‌عنوان جایگزین به‌دلیل استفاده بیش از حد از آنتی‌بیوتیک‌ها اهمیت کاربردی در پرورش ماهی پایدار دارد. اخیراً نشان داده شده است که پری‌بیوتیک‌ها در پرورش ماهی مزایایی مانند تقویت رشد، تحریک سیستم ایمنی و کنترل بیماری دارند. هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثرات پری‌بیوتیک زایلوالیگوساکارید جیره بر برخی شاخص‌های بیوشیمیایی خون، ساختار بافت روده و بیان ژن‌های وابسته به رشد و ایمنی ماهی صبیتی (*Sparidentex hasta*) می‌باشد. سه جیره غذایی حاوی مکمل زایلوالیگوساکارید با سطوح صفر، ۰/۵ و ۱ درصد فرموله و به‌مدت ۸ هفته مورد آزمایش قرار گرفت. ۱۸۰ قطعه ماهی (میانگین وزنی ۳۵/۱۴±۰/۸ گرم) به‌صورت تصادفی در ۹ مخزن فایبرگلاس ۳۰۰ لیتری آب دریا (۲۰ ماهی در هر مخزن) و هر تیمار غذایی در سه تکرار قرار گرفتند. غذاهای ماهی‌ها به‌صورت دو وعده در روز انجام شد. نتایج نشان داد محتوی گلوکز و تری‌گلیسرید پلاسما تیمارهای آزمایشی تحت تأثیر سطوح پری‌بیوتیک جیره قرار نگرفت ($P > 0.05$). میزان کلسترول در تیمار ۰/۵ درصد زایلوالیگوساکارید به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه شاهد بود ($P < 0.05$). جیره غذایی حاوی زایلوالیگوساکارید هیچ‌گونه تأثیر معنی‌داری بر روی مورفولوژی روده نداشت ($P > 0.05$). همچنین اختلاف معنی‌داری در سطح بیان ژن وابسته به ایمنی و رشد تیمارهای آزمایشی در مقایسه با شاهد مشاهده نشد ($P > 0.05$). به‌طور کلی، این مطالعه نشان داد که افزودن پری‌بیوتیک به جیره در مقادیر ۰/۵ و ۱ درصد اثرات معنی‌داری بر فاکتورهای اندازه‌گیری شده نداشت.

کلید واژگان: ماهی صبیتی، پری‌بیوتیک جیره، بافت‌شناسی روده، پاسخ‌های فیزیولوژیک، بیان ژن

مقدمه

با رشد جمعیت و افزایش تقاضا برای مصرف غذاهای دریایی، صنعت پرورش ماهیان دریایی توسعه یافته و مورد توجه کشورها و سازمان‌های جهانی به منظور بهبود وضعیت تغذیه و کاهش فقر قرار گرفته است.

ماهی صیبتی *Sparidentex hasta* از خانواده شانک‌ماهیان (Sparidae) و بومی خلیج فارس، غرب اقیانوس هند و سواحل هند است. این گونه از ماهیان دریایی کوچک تغذیه می‌کند. ماهی صیبتی یک گونه مهم اقتصادی و شیلاتی به‌شمار می‌رود و تکثیر و پرورش آن مورد توجه کشورهای حاشیه خلیج فارس قرار گرفته است (Hussain et al., 1981).

صنعت آبزی پروری همواره با مشکلاتی از جمله تراکم، کاهش کیفیت آب و شیوع بیماری روبه‌رو است. به‌نحوی که شیوع بیماری‌ها به‌عنوان مشکل اساسی آبزی پروری، گسترش اقتصادی این صنعت را در بسیاری از کشورهای جهان تحت تأثیر قرار داده است؛ علاوه بر این، در زمینه کنترل بیماری‌ها، استفاده از داروهای ضد میکروبی (آنتی‌بیوتیک‌ها) خود مشکلاتی فراوانی از جمله مقاوم شدن پاتوژن‌ها، مسائل زیست‌محیطی و هزینه‌های بالا را ایجاد نموده‌اند، به‌طوری که امروزه در اغلب کشورها، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها ممنوع و یا با محدودیت‌های شدیدی مواجه گردیده است. ترکیبات مختلفی مانند ویتامین‌ها، محرک‌های ایمنی و پریبیوتیک‌ها در صنعت آبزی پروری استفاده می‌شود که در سال‌های اخیر استفاده از پریبیوتیک‌ها در جیره آبزیان گسترش یافته است (Hedge et al., 2022). علاوه بر این، آنتی‌بیوتیک‌ها و داروها، عوارض جانبی ناخواسته از جمله مشکلات بهداشتی عمومی، مشکلات امنیت غذایی یا ایمنی حیات وحش با تجمع زیستی آنها در موجودات آبزی دارند (Guardiola et al., 2016). همچنین استفاده بیش از حد از مواد شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به کاهش سیستم ایمنی ماهی و مقاومت دارویی اکتسابی می‌گردد که ممکن است منجر به پیدایش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک شود (Ashouri et al., 2018). پریبیوتیک‌ها انواعی از افزودنی‌های غذایی می‌باشند که ترکیبات قابل هضم در جیره غذایی نیستند و از طریق تحریک رشد و فعال‌سازی متابولیسم باکتری‌های مفید، تأثیر مثبتی بر روی سلامت میزبان دارند (Priya et al., 2021). مطالعات پیشین نشان

داده است که ترکیبات پریبیوتیکی مانند کیتوآولیگو- ساکاریدها، فروکتوآولیگوساکاریدها، زایلواولیگوساکارید، گالاکتوآولیگوساکاریدها، مانوآولیگوساکاریدها و اینولین تأثیرات سودمندی بر روی آبزیان دارند (Myhrstad et al., 2021; Poolsawat et al., 2020). الیگوساکاریدهای غیر قابل هضم به‌عنوان پریبیوتیک در نظر گرفته می‌شوند (Wang et al., 2019). این ترکیبات کربوهیدرات‌هایی با وزن مولکولی کم بوده که استفاده از آنها در جیره غذایی سبب کاهش حضور عوامل بیماری‌زا در فلور روده‌ای و افزایش جمعیت بیفیدوباکتری‌ها و نیز افزایش جذب مواد معدنی در دسترس می‌گردد (Paricheh et al., 2016; Navarro et al., 2019). به‌نظر می‌رسد که اغلب پروبیوتیک‌های معرفی شده به جیره غذایی توانایی ماندگاری، تشکیل پرگنه و جایگزینی در دستگاه گوارش میزبان و یا توانایی رقابت برسر به‌دست آوردن مواد غذایی را نداشته باشند، به‌همین جهت ایده استفاده از پریبیوتیک مطرح گردید. علاوه بر این، برخی از مطالعات نشان دادند که استفاده ترکیبی از پروبیوتیک و پریبیوتیک در جیره غذایی ماهی مشکلات فوق را ندارد (Davani-Davari et al., 2019). الیگوساکاریدها پریبیوتیک‌هایی می‌باشند که به‌طور گسترده در آبزی پروری استفاده شده‌اند. پلی‌ساکاریدها به‌عنوان یک پریبیوتیک بالقوه در برخی مطالعات مورد توجه قرار گرفته‌اند. برخی از عصاره‌های جلبکی عمدتاً پلی‌ساکاریدها (به‌عنوان مثال آگار، آلژینات، فوکویدان، کاراگینان، اولوان و پورفیران) به‌عنوان یک پریبیوتیک شناخته می‌شوند و ویژگی‌های بیولوژیکی متعددی دارند (Van Doan et al., 2016).

یکی از جامع‌ترین روش‌ها برای ارزیابی سلامت و عملکرد مناسب اندام‌های داخلی موجودات، بررسی پارامترهای هماتولوژی و بیوشیمیایی خون می‌باشد. از این پارامترها می‌توان برای ارزیابی هموستازی بدن، وضعیت تغذیه و تشخیص علائم احتمالی یک بیماری استفاده کرد (Du et al., 2020). مهمترین پارامترهای مورد بررسی تری‌گلیسیرید، کلسترول و گلوکز می‌باشند (Akrami et al., 2011; Hoseinifar et al., 2013). هورمون رشد و فاکتور رشد شبه انسولینی (IGFs) پارامترهای اصلی تنظیم‌کننده رشد حیوانات هستند. هورمون رشد مترشحه از غده هیپوفیز می‌تواند با فعالیت مستقیم روی بافت هدف

دریای خزر (Hoseinifar *et al.*, 2014) استفاده شده است. تاکنون مطالعه‌ای بر روی کاربرد زایلوالیگوساکارید بر ساختار بافت‌شناسی روده و سطح مولکولی (بیان ژن) در بچه ماهی صیبتی صورت (*Sparidentex hasta*) نگرفته است. بنابراین هدف این تحقیق بررسی اثرات سطوح مختلف پری‌بیوتیک زایلوالیگوساکارید جیره بر پاسخ‌های فیزیولوژیک، ساختار بافت روده و بیان ژن‌های وابسته به رشد و ایمنی بچه ماهی صیبتی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر در در ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی (ره) وابسته به پژوهشکده آبی‌پروری جنوب کشور صورت پذیرفت. این تحقیق در قالب ۳ تیمار شامل شاهد (بدون افزودن زایلوالیگوساکارید) تیمارهای آزمایشی ۰، ۰/۵ درصد زایلوالیگوساکارید و ۱ درصد زایلوالیگوساکارید (Xu *et al.*, 2009; Morshedi *et al.*, 2018) با سه تکرار افزوده شدند. این آزمایش به مدت ۸ هفته انجام شد. آب ورودی به میزان ۱ لیتر در دقیقه برای هر مخزن تنظیم شد. در این آزمایش از ۹ مخزن ۳۰۰ لیتری پلی‌اتیلن با سیستم آب جاری استفاده شد. حجم آب مخازن در مدت ۵۶ روز آزمایش ۲۵۰ لیتر بود. هر مخزن با یک سنگ هوا به صورت جداگانه، هوادهی شد. مخازن در محیط سرپوشیده قرار داشتند و به صورت کاملاً تصادفی چیدمان آنها انجام شد. از دوره نوری طبیعی با ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در این مطالعه استفاده شد. منبع آب سالن پرورش از آب دریا تأمین شد که پس از ته‌نشین شدن مواد زائد، آب از فیلتر شنی و سپس از UV عبور کرده و از طریق پمپ وارد ایستگاه و در نهایت در مخازن توزیع شد. برای سازگاری با شرایط پرورش، ابتدا ۱۸۰ قطعه بچه ماهی با میانگین $35/14 \pm 0/8$ گرم به مدت ۱۰ روز با استفاده از غذای تجاری تغذیه و سپس در یک طرح کاملاً تصادفی بین ۹ مخزن پلی‌اتیلن در قالب ۳ تیمار و سه تکرار توزیع شدند (۲۰ قطعه بچه ماهی به‌ازای هر مخزن). اندازه‌گیری دما و pH آب به صورت روزانه توسط دستگاه دیجیتالی pH متر ساخت شرکت CRISON اسپانیا انجام شد. همچنین اکسیژن محلول نیز در آب ورودی و خروجی به صورت روزانه توسط دستگاه HI 9142 ساخت شرکت CRISON اسپانیا مدل P45 اندازه‌گیری شد. شاخص‌های کیفی آب شامل درجه

فرآیند رشد را تحریک کند. گزارش شده است که سطح IGF1، سطح تغذیه و نرخ رشد با هم در ارتباط می‌باشند (Al-Samrria and Radovick, 2021). غده هیپوفیز با ترشح هورمون رشد (GH) با فعال کردن گیرنده‌های GH موجب تحریک کبد جهت تولید IGF1 می‌شود. با این حال دستکاری جیره‌های غذایی موجب افزایش پاسخ گیرنده‌های GH در بافت کبد می‌شوند. بنابراین می‌توان سطح IGF1 را با تحت تأثیر قرار دادن عوامل و فرآیندهای مؤثر بر آن کنترل کرد (Beckman, 2011). ایمنی، سازوکار مهم فیزیولوژیکی حیوانات برای محافظت در برابر عفونت‌ها و تأمین تعادل و هموستاز داخلی می‌باشد که ممکن است به صورت غیراختصاصی و یا اکتسابی باشد. مهمترین بخش در سیستم دفاع ماهی، سیستم ایمنی ذاتی است. این سیستم از دو بخش مهم ایمنی همورال و سلول تشکیل شده است (Biller-Takahashi and Urbinati, 2014) و پاسخ التهابی صورت گرفته به وسیله سیتوکین‌ها، بخش مهمی از پاسخ ایمنی سلولی در ماهی می‌باشد (Chinchu *et al.*, 2020). اینترلوکین‌ها، سیتوکین‌هایی می‌باشند که از لکوسیت ترشح و بر سایر لکوسیت‌ها اثر می‌کند. IL-1 β نقش واکنش ایمنولوژیک ایفا می‌نماید (Corripio- (Miyar and Bird, 2007). تاکنون اینترلوکین‌ها را از IL-1 تا IL-38 طبقه‌بندی کرده‌اند (Akdis *et al.*, 2016). مکمل‌های غذایی با اثرگذاری بر گیرنده‌ها و ژن‌های مسئول به طور مستقیم مکانیسم‌های دفاع اولیه را فعال می‌کنند (Bricknell and Dalmo, 2005). افزودن پری‌بیوتیک به جیره غذایی موجب تحریک پاسخ ایمنی غیراختصاصی (افزایش فعالیت لیزوزیم) می‌گردد و از این طریق وضعیت رشد را بهبود می‌بخشد (Daniels and Hoseinifar, 2014; Hoseinifar *et al.*, 2014). زایلوالیگوساکارید یک پروبیوتیک امیدوارکننده در آبی‌پروری به‌شمار می‌آید. از زایلوالیگوساکارید در انسان‌ها (Chung *et al.*, 2007; Buruiana *et al.*, 2017; Van den Abbeele *et al.*, 2018)، پستانداران (Thiennimitr *et al.*, 2018; Long *et al.*, 2019) و برخی از ماهیان مانند (*Oreochromis niloticus* (Van Doan *et al.*, 2018; Poolsawat *et al.*, 2021) (*Megalobrama amblycephala* (Abasubong *et al.*, 2019) و ماهی سفید

پارافین مایع قرار داده شدند و سپس قالب‌گیری شدند (Roberts, 2012). پس از قالب‌گیری با استفاده از میکروتوم مقاطع نمونه بافت‌ها برش داده شدند و به روش هماتوکسیلین-ئوزین رنگ‌آمیزی و با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد مطالعه و اندازه‌گیری قرار گرفتند.

مطالعه تغییرات بیان ژن‌های وابسته به رشد و ایمنی طراحی پرایمرها برای شناسایی ژن‌های IGF1, IL1b: به منظور شناسایی ژن‌های IGF1, IL1b ابتدا طراحی پرایمرها صورت گرفت. بدین منظور توالی‌های هر یک از ژن‌ها در گونه‌های مختلف ماهیان که در NCBI ثبت شده‌اند، جستجو و در فرمت FASTA ذخیره‌سازی شدند و با استفاده از نرم‌افزارهای Oligo7، هم‌ردیفی بین توالی‌ها صورت گرفت و پرایمرهای براساس نواحی حفاظت‌شده طراحی شدند. قابل ذکر است که سنتز تمامی پرایمرهای طراحی شده برای این تحقیق، توسط شرکت Metabion آلمان انجام گرفت.

استخراج RNA از کبد و کلیه ماهی صیبتی:

RNA از اندام‌های کبد و کلیه با استفاده از کیت High Pure RNA Tissue (شرکت Roche) استخراج شد. ۴۰۰ μ l محلول بافر Lysis/Binding به قطعه‌ای از بافت کبد منجمد شده در ازت مایع با وزن حدود ۲۵ میلی‌گرم افزوده و با استفاده از دستگاه هموژنایزر به صورت پودر یک‌دست (هموژن) درآمد. مخلوط فوق به مدت ۲ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. فاز آبی (محلول بالایی) به لوله جدید (میکروتیوپ استریل ۱/۵ میکرولیتری) منتقل و ۲۰۰ μ l اتانول مطلق به آن اضافه و خوب مخلوط گردید. پس از قرار دادن فیلتر مخصوص در داخل لوله جمع‌آوری‌کننده (مخصوص کیت)، کل محلول به داخل فیلتر منتقل شده و ۳۰ ثانیه با دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. مایع داخل لوله جمع‌کننده خارج شده و پس از قرار دادن مجدد فیلتر مخصوص در لوله جمع‌کننده، ۱۰۰ μ l محلول DNase (شامل ۹۰ μ l محلول DNase Incubation Buffer به علاوه ۱۰ μ l آنزیم DNase I) داخل فیلتر افزوده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق ($15-25^{\circ}\text{C}$) قرار داده شد. ۵۰۰ μ l محلول شستشوی (I) به آن اضافه کرده و به مدت ۱۵ ثانیه با دور ۸۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع داخل لوله جمع‌کننده را دور ریخته و پس از قرار دادن مجدد فیلتر مخصوص در لوله جمع‌کننده، ۵۰۰ μ l محلول شستشوی (II) به آن اضافه کرده

حرارت، شوری، pH و اکسیژن محلول به صورت روزانه اندازه‌گیری شد. در طول دوره آزمایش میانگین دما $27/1 \pm 0/9$ درجه سانتی‌گراد، میانگین شوری آب $48 \pm 0/5$ گرم در لیتر، pH $7/5 \pm 0/15$ و اکسیژن محلول $6/3 \pm 0/55$ بود.

اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی: خون‌گیری از سیاهرگ دمی ۵ عدد ماهی از هر تکرار توسط سرنگ‌های هپارینه دو سی‌سی انجام شد. مقداری از خون‌های گرفته شده بلافاصله به درون تیوب‌های حاوی هپارین برای اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون منتقل و در داخل یخچال (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۶۰۰ سانتریفیوژ شدند و بعد از آن پلاسما با استفاده از سمپلر جداسازی و درون تیوب‌های ۲ میلی‌لیتر ریخته شد (Webb et al., 2007).

کلسترول: سنجش این شاخص، به روش کلسترول‌اکسیداز برای اندازه‌گیری تک نقطه‌ای با روش فتومتریک، توسط دستگاه اتوآنالایزر (PFP7,UK) با استفاده از محلول‌ها و استانداردهای مربوطه و کیت‌های تجاری (پارس آزمون، تهران) انجام گرفت (Burtis and Ashwood, 1994).

تری‌گلیسرید: سنجش این شاخص به روش آنزیم لپاز، گلیسرول کیناز و پراکسیداز برای اندازه‌گیری تک نقطه‌ای با روش فتومتریک، براساس دستورالعمل کیت (پارس آزمون، ایران) محاسبه گردید.

گلوکز: سنجش این شاخص به روش واکنش پراکسیداز-اکسیداز گلوکز روش فتومتریک، توسط وسط دستگاه اتوآنالایزر (PFP7,UK) با استفاده از محلول‌ها و استانداردهای مربوطه و کیت‌های تجاری (پارس آزمون، تهران) انجام گرفت (Trinder, 1969).

بافت‌شناسی روده: به منظور مطالعه ساختار روده در پایان آزمایش به صورت کاملاً تصادفی از هر یک از تیمارها و گروه شاهد تعداد ۶ قطعه ماهی انتخاب و نمونه‌های بافتی جهت مشاهده توسط میکروسکوپ نوری در محلول بوئن تثبیت و سپس در اتانول ۷۰ درصد نگهداری شدند. مراحل آبیگری با استفاده از الکل‌های ۹۰ و ۱۰۰ درصد و نهایتاً با الکل بوتیلیک (۱۲ ساعت) انجام گرفت. سپس نمونه‌ها با استفاده از گزلیین شفاف‌سازی و به مدت ۱۲ ساعت در داخل آن در

جدول ۱- برنامه سیکل حرارتی برای واکنش PCR

مرحله	زمان	دما	تکرار
واسرشته‌سازی اولیه (Denaturation)	۵'	۹۴	۱
واسرشته‌سازی اولیه	۳۰"	۹۴	
اتصال آغازگر (Annealing)	۳۰"	۶۵°C/-1 in cycle	۱۰
بسط (Extention)	۴۰"	۷۲	
واسرشته‌سازی اولیه	۲۰"	۹۴	
اتصال آغازگر	۳۰"	۵۸	۲۰
بسط	۴۰"	۷۲	
بسط نهایی	۵'	۷۲	۱

cDNA ساخته شده به‌عنوان الگو در واکنش‌های PCR استاندارد مورد استفاده قرار گرفت.

واکنش‌های PCR برای ژن‌های مختلف

برای به‌دست آوردن هر یک از ژن‌های مورد نظر با استفاده از پرایمرهای طراحی شده برای ژن‌های IGF1 و IL1b و cDNA به‌دست آمده از بافت‌های مختلف واکنش PCR انجام شد. از آنجا که پرایمر مختلف پیشرو و پیرو برای ژن‌های IGF1، IL1b، طراحی شد. در نتیجه ترکیب‌های مختلفی از این پرایمرها در واکنش PCR استفاده گردید.

کتابخانه cDNA ساخته شده از بافت‌های کبد، و کلیه به‌عنوان الگو در نظر گرفته شد و واکنش PCR استاندارد، با استفاده از دستگاه PCR Corbbet reaserch، (ساخت کشور استرالیا) انجام شد. مخلوط واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر، شامل ۳ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، ۲۰۰ میکرومولار مخلوط نوکلئوتیدها، ۱۰ پیکومول از هر پرایمر و ۲u آنزیم smartTaqDNA polymerase سینا ژن تهیه گردید و واکنش PCR، براساس برنامه کاهش دمایی (جدول ۱) انجام گرفت. دمای اتصال برای هر جفت پرایمرهای بهینه‌سازی شد تا باند واضحی در محصول PCR برای هر واکنش به‌دست آید.

الکتروفورز محصول PCR

جهت بررسی کیفیت محصول PCR از ژل آگارز ۱٪، استفاده شد (Sambrook and Rusell, 2001).

تعیین توالی نوکلئوتیدی و آنالیز توالی ژن‌های CYP1

پس از توالی‌یابی محصول PCR توسط شرکت فزایژوه، با استفاده از نرم‌افزار BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)، مقایسه توالی به دست آمده با داده‌های موجود در بانک ژن انجام گردید. در

و به‌مدت ۱۵ ثانیه با ۸۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع داخل لوله جمع‌کننده را دور ریخته و پس از قرار دادن مجدد فیلتر مخصوص در لوله جمع‌کننده، ۳۰۰ μ l محلول شستشوی (II) به آن اضافه کرده و به‌مدت ۲ دقیقه با ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. فیلتر در داخل یک میکروتیوپ استریل ۱/۵ میکرولیتری قرار داده شد و ۵۰-۱۰۰ μ l محلول حل‌کننده به آن افزوده و به‌مدت ۱ دقیقه با دور ۸۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول داخل میکروتیوپ حاوی RNA استخراج شده است.

سنتز cDNA

هر یک از RNA های به‌دست آمده از کبد و کلیه به‌عنوان الگو برای سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفت. سنتز cDNA با استفاده از کیت RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis فرمنتاز و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. cDNA توسط آنزیم رونوشت‌برداری M-MuLV و Oligo (dT) یا Random hexamer به عنوان پرایمر، طبق روش استاندارد و در دو مرحله متوالی ساخته شد:

مخلوطی شامل یک میکروگرم RNA، ۱۰ پیکومول Oligo (dT) در حجم ۷ میکرولیتر در یک میکروتیوپ استریل روی یخ آماده شد. پس از سانتریفیوژ کوتاه، میکروتیوپ به‌مدت ۵ دقیقه در ۷۰°C قرار داده شد. سپس میکروتیوپ روی یخ قرار داده شد و ۲ میکرولیتر بافر، ۱ میکرولیتر RNAase inhibitor، ۲۰۰ میکرومولار مخلوط نوکلئوتیدها و ۱ میکرولیتر آنزیم M-MuLV اضافه شد. مخلوط حاصل برای مدت ۶۰ دقیقه در ۴۲°C قرار داده شد. واکنش با استفاده از تیمار نمونه در درجه حرارت ۷۰°C به‌مدت ۱۰ دقیقه متوقف شد.

جدول ۲- توالی و خصوصیات آغازگر مورد استفاده در روش PCR در زمان حقیقی

ژن	نام پرایمر	توالی پرایمر (۳-۵)	Tm (درجه حرارت، سانتی‌گراد)
	IGF-1F	TGTAGCCACACCCTCTCACT	۶۰
IGF	IGF-1R	AGCCTCTCTCTCCACACACA	۶۰
	ILF	CTGGACTTGGAGATTGCCCA	۶۰
IL1B	ILR	CTTCCACTGCGCTCTCCAG	۶۰
	BCF	AGGGAATCGTGCGTGACAT	۶۰
Housekeeping gene	BCR	CGAGGAAGGATGGCTGGAAG	۶۰

cDNA توسط آنزیم رونوشت‌برداری معکوس M-MuLV و Random hexamer به‌عنوان پرایمر، سنتز گردید.

انجام PCR در زمان حقیقی

در این روش از آغازگرهای مخصوص به روش PCR در زمان حقیقی جهت ارزیابی بیان ژن IGF-1 استفاده گردید، که لیست توالی این آغازگرها و در جدول ۲ ارائه شده است.

ارزیابی مقایسه کارایی تکثیر ژن کنترل داخلی و ژن‌ها

با توجه به انتخاب روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ مقایسه‌ای بیان ژن در این مطالعه، ارزیابی کارایی تکثیر ژن کنترل داخلی و ژن هدف ضروری بود. بدین منظور اقدام به رسم منحنی لگاریتم استاندارد مقادیر رقت سازی شده هر ژن (log input) (ژن IGF-1, IL1B و ژن Beta actine به‌عنوان کنترل داخلی) در برابر مقادیر Ct هر ژن گردید. بدین ترتیب که رقت‌های ۱، ۱/۱۰، ۱/۱۰۰ و ۱/۱۰۰۰ از cDNA کید و آبش تهیه گردید. بر روی نمونه‌ها واکنش PCR در زمان حقیقی مطابق آنچه قبلاً شرح داده شد با ۳ تکرار برای هر نمونه و در مورد هر ژن انجام و مقادیر میانگین Ct رقت‌های مختلف در ۳ بار تکرار محاسبه گردید. سپس با استفاده از نرم‌افزار Excel با قرار دادن مقادیر لگاریتم غلظت بر روی محور x و مقادیر Ct هر ژن بر روی محور y، نمودار XYscatter رسم و فرمول خط متناسب با فرمول $y=ax+b$ استخراج شد و کارایی پرایمرهای هر ژن از فرمول Pfaffi *et al.*, (2001) محاسبه گردید $E\% = (10^{1/slope} - 1) \times 100$.

بررسی مقایسه‌ای بیان ژن

رابطه $2^{-\Delta\Delta CT}$ برای کمی‌سازی داده‌های RT-PCR، مورد استفاده قرار گرفت. از رابطه زیر محاسبه شد: $CT = (CT_{CYP} - CT_{18s})_{in\ treated\ group} - (CT_{CYP} - CT_{18s})_{in\ control\ group}$ متعادل‌سازی داده‌ها برای هر گروه آزمایشی، پس از نرمال‌سازی آن‌ها بر مبنای میزان بیان ژن کنترل داخلی از

ادامه، تست همپوشانی (Alignment) توالی نوکلئوتیدی با سایر گونه‌های ماهیان با استفاده از نرم‌افزار Mega6.0 انجام شد. محاسبه فاصله ژنتیکی، شباهت ژنتیکی و رسم نمودار درخت شجره ژنتیکی توالی به‌دست آمده از آنزیم سیتوکروم با استفاده از روش میانگین شباهت و تفاوت‌ها در نرم‌افزار Mega6.0 رسم گردید.

اندازه‌گیری بیان ژن با واکنش RT-PCR

به‌منظور ارزیابی بیان ژن هدف در کبد از روش PCR در زمان حقیقی و روش مقایسه‌ای $\Delta\Delta Ct$ انجام شد. روش آزمون بر پایه کاربرد رنگ سایبرگرین استوار بود. در این مطالعه از ژن β actin ماهیان به‌عنوان کنترل داخلی استفاده و بیان ژن IGF-1 و IL1 β در بافت‌های مورد مطالعه با توجه به بیان ثابت این ژن ارزیابی گردید (Sambrook and Russell, 2001). برای هر نمونه سه تکرار و نمونه‌های کنترل منفی فاقد cDNA در هر واکنش در نظر گرفته شد.

استخراج RNA

استخراج RNA کل از ۲۰ میلی‌گرم بافت با استفاده از کیت استخراج RNA کل (شرکت Cina gene) انجام شد. حذف آلودگی احتمالی DNA ژنومی در مرحله قبل از شستشو با استفاده از آنزیم DNase1 براساس روش کیت انجام گردید. جهت اطمینان از حذف DNA، نمونه‌های RNA تیمار شده با آنزیم DNase1 به‌عنوان الگو به‌همراه آغازگر ژن مورد نظر در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفتند. کیفیت و تعیین غلظت RNA از دو روش الکتروفورز روی ژل آگارز و اسپکتروفوتومتری اندازه‌گیری شد (Sambrook and Russell, 2001).

سنتز cDNA

ساخت cDNA با استفاده از یک میکروگرم RNA خالص‌سازی‌شده بافت کبد به‌عنوان الگو و با استفاده از کیت RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis فرمتناز و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت.

طریق محاسبه نسبت شدت بیان ژن در گروه مورد مطالعه نسبت به گروه شاهد اجرا گردید.

طرح کلی این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی برنامه‌ریزی و اجرا شد. داده‌های حاصل از آزمایش‌های مختلف با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ پردازش شدند. همه داده‌ها به صورت میانگین از ۳ تکرار به همراه خطای استاندارد گزارش گردیدند. پس از مشخص نمودن نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون Shapiro-Wilk و همگنی واریانس‌ها توسط آزمون Leven، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه جهت بررسی اختلاف بین تیمارها در سطح ۵ درصد استفاده شد. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای توکی استفاده گردید.

نتایج

براساس نمودار شکل ۱ بین میزان گلوکز تیمارهای آزمایشی و گروه شاهد تفاوت معنی‌داری وجود ندارد ($P > 0.05$). بالاترین میزان گلوکز در تیمار ۰/۵ درصد زایلوالیگوساکارید مشاهده می‌شود که معنی‌دار نمی‌باشد ($P > 0.05$).

با توجه به نمودار شکل ۲ بین میزان تری‌گلیسرید تیمارهای آزمایشی و گروه شاهد اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ($P > 0.05$). بیشترین میزان تری‌گلیسرید در گروه شاهد و کمترین آن در تیمار ۱ درصد زایلوالیگو ساکارید مشاهده می‌گردد که معنی‌دار نمی‌باشد ($P > 0.05$).

همان‌طور که در نمودار شکل ۳ مشاهده می‌گردد بین میزان کلسترول گروه شاهد و تیمار ۰/۵ درصد زایلوالیگوساکارید اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P < 0.05$) و بیشترین میزان کلسترول در تیمار ۰/۵ زایلوالیگوساکارید و کمترین آن در تیمار ۱ درصد مشاهده می‌گردد.

نتایج مربوط به بافت‌شناسی روده بچه ماهیان صبیتی در انتهای دوره پرورش در جدول ۳ گزارش شده است. براساس نتایج اندازه عرض ویلی، طول ویلی و اندازه ضخامت لایه عضلانی اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف آزمایشی و گروه شاهد نشان ندادند ($P > 0.05$).

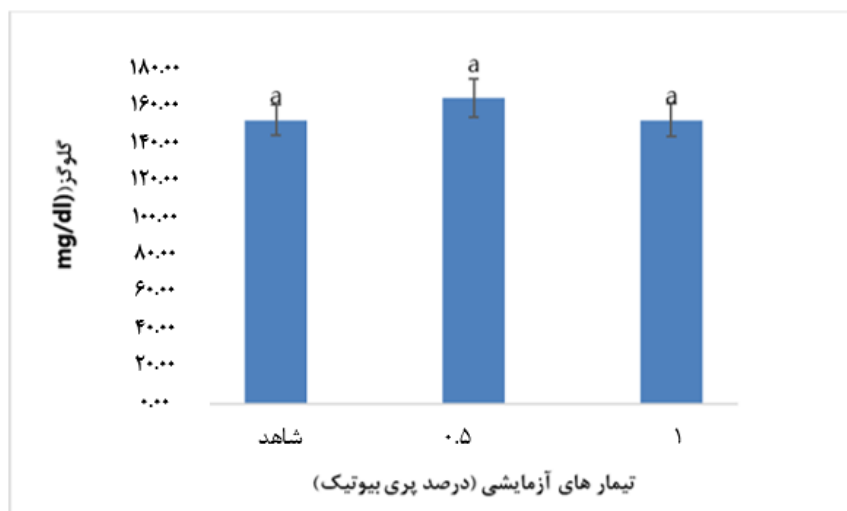
بیان ژن‌های وابسته به رشد و ایمنی: پس از استخراج mRNA از بافت کبد ساخت cDNA از بافت مذکور، ژن IGF-I با استفاده از جفت پرایمرهای IGF-F1، IGF-R2 تکثیر و منجر به ایجاد یک باند به طول ۵۵۰ جفت باز روی ژل آگارز گردید (شکل ۴). سایر جفت پرایمرهای مورد

استفاده محصول PCR با باند واضح روی ژل ایجاد نکردند. پس از تعیین توالی محصول به دست آمده در نهایت ۴۹۱ باز از ژن IGF_1 ماهی صبیتی به دست آمد (شکل ۵). آنالیز Blast برای توالی حاصل از ژن IGF-I حاکی از مشابهت این توالی‌ها (۹۹٪) با توالی‌های cDNA ژن IGF-I بود. نتایج نشان داد که محصول سکانس شده ژن IGF-I می‌باشد. توالی حاصل بیشترین شباهت ژنتیکی به میزان شباهت ۹۹/۶ درصد ($P < 0.01$) با ژن IGF-I در گونه *Acanthopagrus latus* را داشت.

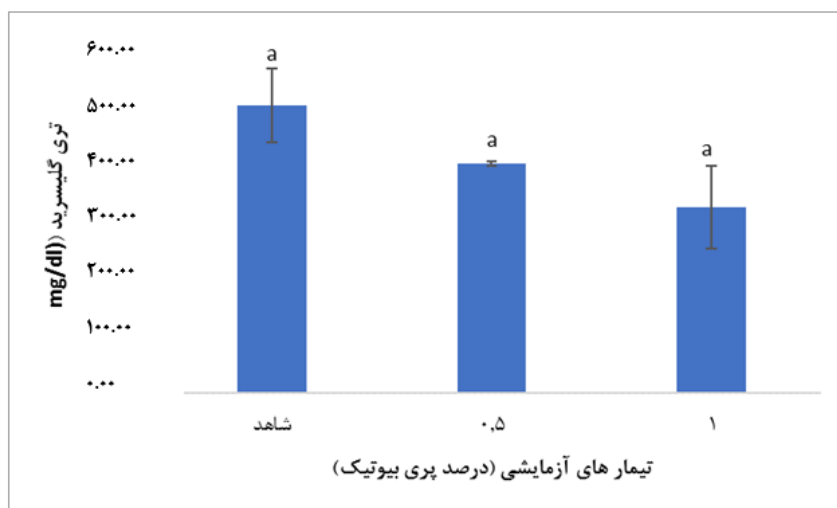
نتایج حاصل از بررسی هومولوژی و فاصله ژنتیکی توالی نوکلئوتیدی ژن IGF-I در ماهی صبیتی براساس فاصله ژنتیکی با روش K2-p و حذف کامل Gap، و در نظر گرفتن جهش‌های ترانزیشن و ترانسفورژن، سرعت جانشینی یکنواخت و الگوی هموزن بین افراد در نرم‌افزار MEGA6.0 محاسبه گردید (جدول ۴).

شناسایی ژن IL1B در ماهی صبیتی: پس از استخراج mRNA از بافت کلیه ساخت cDNA از بافت‌های مذکور، ژن IL1B با استفاده از جفت پرایمرهای ILF1، IL-R1 تکثیر و منجر به ایجاد یک باند به طول ۵۵۰ جفت باز روی ژل آگارز گردید (شکل ۶). سایر جفت پرایمرهای مورد استفاده محصول PCR با باند واضح روی ژل ایجاد نکردند. پس از بررسی تعیین توالی حاصل از قطعه به دست آمده ۵۷۹ نوکلئوتید از ژن IL1B در ماهی صبیتی به دست آمد (شکل ۷). آنالیز Blast برای توالی حاصل از ژن IL1B حاکی از مشابهت این توالی‌ها (۹۸٪) با توالی‌های cDNA ژن IL1B بود. نتایج نشان داد که محصول سکانس شده ژن IL1B می‌باشد. توالی حاصل بیشترین شباهت ژنتیکی به میزان شباهت ۹۸ درصد ($P < 0.01$) با ژن IL1B در گونه *Acanthopagrus schlegelii* را داشت.

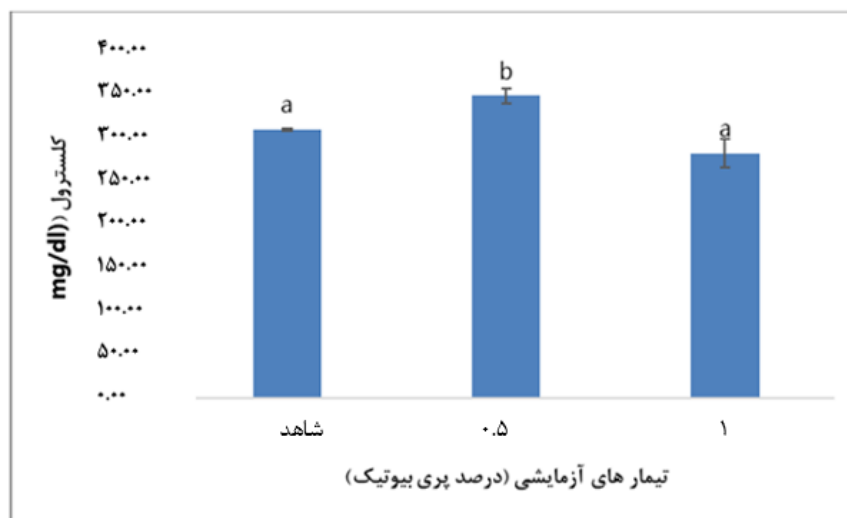
نتایج حاصل از بررسی هومولوژی و فاصله ژنتیکی توالی نوکلئوتیدی ژن IL1B در ماهی صبیتی براساس فاصله ژنتیکی با روش K2-p و حذف کامل Gap، و در نظر گرفتن جهش‌های ترانزیشن و ترانسفورژن، سرعت جانشینی یکنواخت و الگوی هموزن بین افراد در نرم‌افزار MEGA6.0 محاسبه گردید (جدول ۵). بیشترین شباهت کمترین اختلاف ژنتیکی توالی ژنی ژن IL1B ماهی صبیتی با ژن ژن IL1B گونه *Acanthopagrus schlegelii* به میزان ۹۸/۴ و ۰/۱۶ بود.



شکل ۱- نمودار میزان گلوکز (mg/dl) ماهی صیبتی تغذیه شده با جیره‌های غذایی



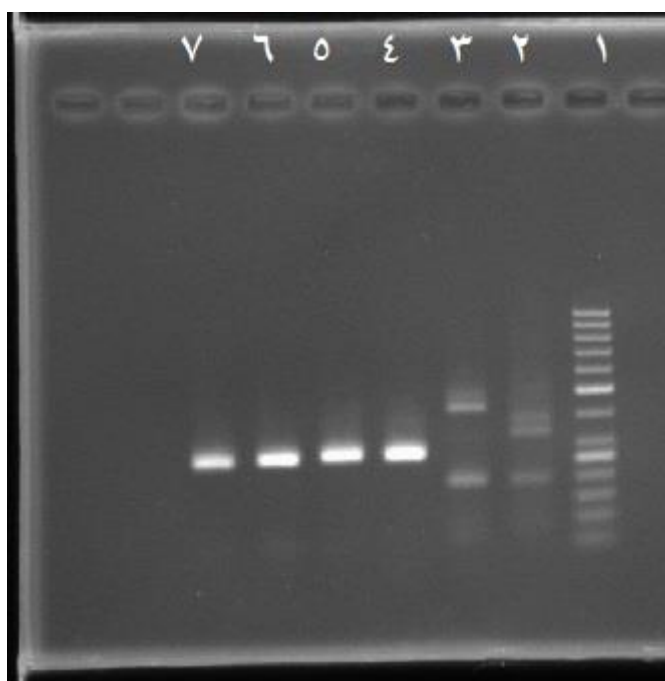
شکل ۲- نمودار میزان تری‌گلیسرید (mg/dl) ماهی صیبتی تغذیه شده با جیره‌های غذایی



شکل ۳- نمودار نتایج میزان کلسترول (mg/dl) ماهی صیبتی تغذیه شده با جیره‌های غذایی

جدول ۳- بافت‌شناسی روده بچه ماهیان صبیتی در پایان آزمایش براساس تیمارهای مختلف (میانگین \pm خطای استاندارد)

تیمارهای مختلف (درصد پرپیوتیک)			
۱	۰/۵	شاهد	
۹۸/۵۷ \pm ۷/۵ ^a	۸۱/۸۷ \pm ۷/۱۵ ^a	۸۳/۳ \pm ۵۴/۳۴ ^a	عرض ویلی (میکرومتر)
۵۶۳/۰۷ \pm ۱۶/۰۴ ^a	۵۷۳/۰۹ \pm ۳۳/۵۹ ^a	۵۵۱/۲۳ \pm ۳۷/۴۳ ^a	طول ویلی (میکرومتر)
۱۲۵/۴۰ \pm ۸/۸۷ ^a	۱۰۳/۶۶ \pm ۱۴/۶۶ ^a	۵۱/۷ \pm ۸۳/۰۵ ^a	ضخامت لایه عضلانی (میکرومتر)



شکل ۴- الکتروفورز محصول PCR برای ژن IGF (۱- مارکر ۱۰۰، ۲- ۳- ۴- ۵- ۶- ۷- جفت پرایمرهای IGF-F1,R2)

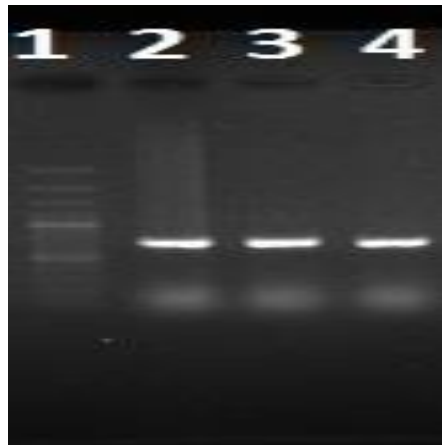
#IGF1 *Sparidentex hasta*

CATTTATGTGATGTCTTCAAAGTGCGATGTGCTGTATCTCCTGTAGCCACACCCTCTCACTACTG
 CTGTGCGTCCTCACTGACTCCGACGGCAACAGGGGCGAGCCCAGAGACCCTGTGCGGGGCGGA
 GCTGGTCGACACGCTGCAGTTTGTGTGTGGAGAGAGAGGGCTTTTATTTTCAGTAAACCTGGCTAT
 GGCCCCAATGCACGGCGGTCACGTGGCATTGTGGACGAGTGCTGCTTCCAAAGCTGTGAGCTG
 CGGCGTCTGGAGATGTACTGTGCACCTGCCAAGACTAGCAAGGCTGCTCGCTCTGTGCGTGCAC
 AGCGCCACACAGACATGCCAAGAGCACCCAAGGTTAGTACCGCAGGGCACAAAGTGGACAAG
 GGCACAGAGCGTAGGACAGCACAGCAGCCAGACAAGACAAAAACAAGAAGAGACCTTTACC
 TGGACATAGTCATTCATCCTTCAAGGAAGTGCATCAGAAAAATTCAAG

شکل ۵- توالی ژن IGF-I به دست آمده در ماهی صبیتی

جدول ۴- فاصله ژنتیکی توالی نوکلئوتیدهای ژن IGF-I صبیتی در مقایسه با سایر ماهیان

گونه	۱	۲	۳	۴	۵	۶
۱ <i>Acanthopagrus schlegeli</i>	۰/۰۰۰					
۲ <i>Sparus aurata</i>	۰/۰۰۲					
۳ <i>Pagrus auriga</i>	۰/۰۰۷	۰/۰۰۹				
۴ <i>Acanthopagrus latus</i>	۰/۰۰۴	۰/۰۰۷	۰/۰۰۱			
۵ <i>Epinephelus lanceolatus</i>	۰/۰۱۸	۰/۰۰۲	۰/۰۲۰	۰/۰۱۸		
۶ <i>Sparidentex hasta</i>	۰/۰۰۴	۰/۰۰۷	۰/۰۱۱	۰/۰۰۴	۰/۰۲۲	۰/۰۰۰



شکل ۶- الکتروفورز محصول PCR برای ژن IL1β (۱- مارکر ۱۰۰، ۲-۴ جفت پرایمرهای IL-F1, R1)

>ILS *Sparidentex hasta*

GAGCCAAGATGCCCGAGGGGCTGGACTTGGAGATTGCCACCATCCCCTCACAAATGAAGCGCG
 TGGTCAACCTCATCATCGCCATGGACAGGTTAAAGGGCAAGGTGTCGGAGTCACCGCGGAGCA
 CTGAGTTCACAGATGACAACCTGCTCAACATGTTGCTGGAGAGCGCAGTGAAGAGCGCACTG
 TGTTTCGAGCGCACCGCAAACCCGCTCAGTACACATACTTCCAGAGCCTATACAGCGTGA
 TGGACAGCGAGCAGAGGCACTTAGTCCGAGTGCCAAACAGCATGGAGCTCCACGCAGTGATGC
 TGCAGGGAGGCACCGGAAACTGTCAAGTTCAACTGAACATGGCAACCTACCTGCCACCTACAC
 CCAGTACTGAGGCCGTAAGTGTGACTCTGTGCATCAAGGACACAAATCTTTACCTGTCTTGTCA
 CAAGGAGGGTAACGAGCCAAGCTTGCATCTGGAGGCGGTGAATGACAAAGACAGTCTGTTGAG
 GATCACCCCGGGCAGCGACATGGTGGATTCTCTTCCACAAACATGTCACCGGGCTGAACAA
 CAGCACCTCG

شکل ۷- توالی بخشی از ژن ماهی صبیتی بر اساس CDNA

جدول ۵- فاصله ژنتیکی توالی نوکلئوتیدهای ژن IL1β ماهی صبیتی در مقایسه با سایر ماهیان

گونه	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷
۱ <i>Acanthopagrus_schlegelii</i>	۰/۰۰۰						
۲ <i>Acanthopagrus_latus</i>	۰/۰۲۰						
۳ <i>Diplodus_puntazzo</i>	۰/۰۵۱	۰/۰۵۷					
۴ <i>Sparus_aurata</i>	۰/۰۴۹	۰/۰۵۹	۰/۰۴۲				
۵ <i>Pagrus_major</i>	۰/۰۶۷	۰/۰۶۸	۰/۰۶۰	۰/۰۵۷			
۶ <i>Dicentrarchus_labrax</i>	۰/۲۴۵	۰/۲۵۸	۰/۲۶۱	۰/۲۶۱	۰/۲۲۹		
۷ <i>Sparidentex_hasta</i>	۰/۰۱۶	۰/۰۲۱	۰/۰۴۹	۰/۰۵۱	۰/۰۶۰	۰/۲۴۳	۰/۰۰۰

جدول ۶- بیان ژن‌های وابسته به رشد و ایمنی بچه ماهیان صبیتی در پایان آزمایش براساس تیمارهای مختلف (میانگین ± خطای استاندارد)

تیمارهای مختلف (درصد پریوتیک)			
تیمار ۱ (شاهد)	۰/۵ درصد	۱ درصد	
IGF-I	۰/۰ ± ۰/۰۹ ^a	۱/۲۰ ± ۰/۱۳ ^a	۰/۰ ± ۰/۰۱ ^a
IL1β	۱/۰ ± ۰/۱۰ ^a	۱/۳۷ ± ۰/۲۴ ^a	۱/۲۱ ± ۰/۱۵ ^a

بحث

هدف از این مطالعه، بررسی اثرات سطوح مختلف زایلوالیگوساکارید جیره غذایی بر برخی شاخص‌های بیوشیمیایی خون، ساختار بافت روده و بیان ژن‌های وابسته به رشد و ایمنی ماهی صبیتی (*Sparidentex hasta*)

نتایج مربوط به بیان ژن رشد (IGF-I) و ایمنی (IL1β) بچه ماهیان صبیتی در انتهای دوره پرورش در جدول ۶ گزارش شده است. همچنان که در جدول مشاهده می‌شود میزان بیان ژن ایمنی (IL1β) اختلاف معنی‌داری را بین تیمارهای مختلف آزمایشی و گروه شاهد نشان ندادند ($P > 0.05$).

کرده‌اند به نظر می‌رسد در مطالعه حاضر خطا در نمونه‌برداری یا خطای دستگاهی باعث ایجاد این افزایش معنی‌دار در کلسترول شده باشد.

در مطالعه حاضر هیچ تفاوت معنی‌داری از نظر گلوکز بین تیمارهای آزمایشی و گروه شاهد مشاهده نشد. مشابه نتایج مطالعه حاضر، Ziólkowska و همکاران (۲۰۲۰) مقادیر ثابت گلوکز را در تیمارهای ماهی تیلایپا تغذیه شده با پری‌بیوتیک ترانس گالاتوالیگوساکارید گزارش کردند، مشابه با نتایج حاضر در مطالعه اکرمی و همکاران (۱۳۸۸) مکمل مانان الیگوساکارید جیره غذایی هیچ تأثیر بر روی میزان گلوکز ماهی فیل‌ماهی (*Huso huso*) نداشت. همچنین در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با پری‌بیوتیک آلفامون میزان گلوکز در مقایسه با گروه شاهد تغییر نکرد (Kanani et al., 2021). همچنین در تضاد با نتایج حاضر، مکمل ایمونوژن، گلوکز را در ماهیان خاویاری سیبری (*Acipenser baeri*) کاهش داد (Ramezani et al., 2018). مطالعاتی نیز تأثیر مکمل زایلوالیگوساکارید جیره را بر روی میزان گلوکز موش و جوجه‌های گوشتی بررسی کرده‌اند. در مطالعه‌ای Akter و Akter (۲۰۱۷) کاهش سطح گلوکز سرم را در جوجه‌های گوشتی گزارش کردند که با مطالعات قبلی بر روی جوجه‌های گوشتی (Zhenping et al., 2013; Samanta et al., 2017) و موش‌های صحرائی (Imaizumi et al., 1991) مطابقت دارد. همان‌طور که بیان گردید، مکمل زایلوالیگوساکارید بر محتوای تری‌گلیسرید تأثیری نداشت. نتایج حاضر مطابق با مطالعه Ye و همکاران (۲۰۱۱) می‌باشد که گزارش دادند که مکمل‌های پری‌بیوتیک (فروکتوالیگوساکارید و مانان الیگو-ساکارید) هیچ تأثیری بر میزان تری‌گلیسرید ماهی کفشک زیتونی (*Paralichthys olivaceus*) ندارد. در تضاد با مطالعه حاضر، در مطالعه‌ای توسط Ziólkowska و همکاران (۲۰۲۰) گزارش شد که پری‌بیوتیک ترانس گالاتوالیگوساکارید موجب کاهش میزان تری‌گلیسرید در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) گردید. در مطالعه‌ای دیگر نیز ماهیان کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*) تغذیه شده با زایلوالیگوساکارید جیره غذایی، محتوای تری‌گلیسرید کمتری نسبت به جیره شاهد نشان دادند. مطالعاتی نیز نشان داده‌اند که پری‌بیوتیک‌ها اثر کاهش چربی خون دارند

می‌باشد. در این مطالعه افزودن مکمل زایلوالیگوساکارید به جیره غذایی موجب افزایش معنی‌داری در میزان کلسترول در تیمار ۰/۵ درصد گردید. برخی از مطالعات تأثیر پری‌بیوتیک‌های مختلف را بر روی میزان کلسترول بررسی کرده‌اند. در مطالعه‌ای Ye و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که مکمل پری‌بیوتیک‌ها (فروکتوالیگوساکارید و مانان الیگوساکارید) هیچ تأثیری بر میزان کلسترول ماهی کفشک زیتونی (*Paralichthys olivaceus*) ندارد. در مطالعه Ziólkowska و همکاران (۲۰۲۰) پری‌بیوتیک ترانس گالاتوالیگوساکارید تأثیری بر روی کلسترول ماهی کپور معمولی نداشت. همچنین تفاوت معنی‌داری در میزان کلسترول کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) تغذیه شده با پری‌بیوتیک ایمونوژن مشاهده نشد (Akbari et al., 2019). مطالعاتی نیز نشان داده‌اند که پری‌بیوتیک‌ها اثر کاهش چربی خون دارند (Mandal et al., 2009; Ooi and Liang, 2010; Pereira and Gibson, 2002). تناقض با نتایج حاضر در مطالعه Zhang و همکاران (۲۰۲۰)، ماهی کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*) تغذیه شده با مکمل زایلوالیگوساکارید، محتوای تری‌گلیسرید و کلسترول کمتری نسبت به گروه شاهد را گزارش کردند. همچنین در مطالعه طرفی صبیح‌زاده و همکاران (۱۴۰۰) سطوح مختلف پری‌بیوتیک گالاتوالیگوساکارید منجر به کاهش مقدار تری‌گلیسرید، کلسترول و گلوکز ماهی بنی (*Mesopotamichthys sharpeyi*) گردید. در مطالعه حاضر مکمل زایلوالیگو-ساکارید جیره موجب افزایش میزان کلسترول گردید.

چون براساس مطالعات پیشین پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها با کاهش کلسترول سرم، پروفیل چربی را بهبود می‌بخشند (Kavitha et al., 2016). مطالعات نشان داده است که کاهش کلسترول خون ممکن است به علت وجود برخی از باکتری‌های پروبیوتیک به‌ویژه باکتری‌های تولیدکننده اسید لاکتیک باشد که می‌توانند در جذب مستقیم کلسترول در روده از طریق عدم اتصال نمک‌های صفراوی دخالت کنند. فرمولاسیون جیره‌های غذایی، نوع پروبیوتیک مورد استفاده، سطوح مختلف پروبیوتیک جیره و روش‌های مختلف اضافه کردن پروبیوتیک به جیره نیز می‌تواند اختلافات در نتایج را موجب شود. بنابراین چون بیشتر مطالعات عدم تغییر کلسترول یا کاهش کلسترول را گزارش

افزایش ساختار بافت روده (اندازه، طول و عرض ویلی) را مشاهده کردند. در مطالعه Wang و همکاران (۲۰۲۲) مکمل زایلوالیگوساکارید موجب افزایش ناحیه چین خوردگی روده و لایه عضلانی ماهی قزل آلائی رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss* گردید. در مطالعه‌ای توسط Ziolkowska و همکاران (۲۰۲۰)، پری بیوتیک ترانس گالاکتوالیگوساکارید موجب افزایش ارتفاع، عرض و سطح پرزها در تیمارهای ۱ و ۲ درصد پری بیوتیک ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) گردید. Yuji-Sado و همکاران (۲۰۱۵) اثر مثبت مکمل مانان الیگوساکارید را بر ریزساختار روده در ماهی تیلایپای نیل (*Oreochromis niloticus*) گزارش کردند. همچنین در تحقیق Zhou و همکاران (۲۰۱۰) ارتفاع میکروویلی‌ها در روده ابتدایی در تیمارهای تغذیه شده با پری بیوتیک‌های مختلف (مانان الیگوساکارید، فروکتوالیگوساکارید، گالاکتوالیگوساکارید و گالاکتوگلوکومانان‌ها) در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت. مشابه با این مطالعات Anguiano و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند گالاکتوالیگوساکارید و مانان الیگوساکارید باعث افزایش ارتفاع میکروویلی‌ها در روده قدامی سرخ ماهی (*Sciaenops ocellatus*) و ماهی باس سفید (*Morone chrysops*) گردید.

مطابق با نتایج حاضر اضافه کردن پری بیوتیک زایلوالیگوساکارید به جیره غذایی ماهی اسکار (*Astronotus ocellatus*) و ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*) تغییری در ساختار بافت روده (طول و عرض ویلی و همچنین ضخامت لایه عضلانی) را ایجاد نکرد (Hoseinifar et al., 2014, 2016). همچنین Zhang و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که مکمل زایلوالیگوساکارید بر ارتفاع و عرض پرزهای روده ماهی کپور چمن‌خوار (*Ctenopharyngodon idellus*) مؤثر نیست که مطابق با یافته‌های تحقیق حاضر می‌باشد. Zhou و همکاران (۲۰۲۰) تأثیر چهار نوع پری بیوتیک فروکتوالیگوساکارید، اینولین، گالاکتوالیگوساکارید و مانان الیگوساکارید را بررسی کردند. نتایج نشان داد که ارتفاع میکروویلی در دریچه پیلور، روده ابتدایی و روده میانی خار ماهی سرخ (*Sciaenops ocellatus*) افزایش یافت.

در مطالعه حاضر، پری بیوتیک در جیره غذایی بر مورفولوژی روده تأثیری نداشت. این را می‌توان با ساختار

(Pereira and Gibson, 2002; Mandal et al., 2009;) Ooi and Liang, 2010) که ممکن است مربوط به اسید-های چرب زنجیره کوتاه تولید شده در روده توسط پری بیوتیک‌ها باشد. اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه با مهار سنتز کلسترول کبدی و توزیع مجدد کلسترول از پلاسما به کبد باعث کاهش سطح سیستمیک لیپیدهای خون می‌شوند (Pereira and Gibson, 2002). مطالعات بر روی موش-هایی که از اینولین به‌عنوان یک پری بیوتیک استفاده می‌کردند؛ نشان داده است که تخمیر روده‌ای فیبرها باعث سرکوب کلسترول پلاسما و کبد و همچنین سطح تری گلیسیرید می‌شود (Mistry et al., 2018). Gupta و همکاران (۲۰۲۱) گزارش داد که پری بیوتیک باعث ادغام استات با پروتئین کل می‌شود که باعث تجمع کمتر تری گلیسیرید می‌گردد. در مطالعاتی توسط Akter و Akter (۲۰۱۷)، Zhenping و همکاران (۲۰۱۳) و Samanta و همکاران (۲۰۱۷) بر روی جوجه‌های گوشتی نیز روند مشابهی گزارش گردید.

در مطالعه حاضر نتایج حاصل از تأثیر استفاده از پری بیوتیک زایلوالیگوساکارید بر ساختار بافت روده شامل اندازه طول و عرض ویلی و همچنین ضخامت لایه عضلانی نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار نسبت به تیمار شاهد بود. تعدادی از مطالعات تأثیر پری بیوتیک‌ها را بر ساختار بافت روده بررسی کرده‌اند که نتایج آنها مخالف با یافته‌های مطالعه حاضر می‌باشد. در مطالعه Sun و همکاران (۲۰۱۸) روی میگوهای پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) تغذیه شده با زایلوالیگو ساکارید، طول روده و پرزهای بیشتری نسبت به گروه شاهد داشتند. در مطالعه‌ای دیگر Dimitroglou و همکاران (۲۰۱۰) بیان داشتند که افزودن پری بیوتیک مانان الیگوساکارید به جیره غذایی ماهی سیم سر طلائی (*Sparus aurata*) افزایش ساختار ویلی را به‌دنبال دارد. ساختار بافت روده به‌دنبال مصرف خوراکی پری بیوتیک در تحقیقات مختلف بررسی شده است. Zhu و همکاران (۲۰۱۰)، Cerezuela و همکاران (۲۰۱۳) و Akter و همکاران (۲۰۱۶) به‌ترتیب با افزودن سه پری بیوتیک اینولین، گالاکتوالیگوساکارید (GOS) و MOS و اینولین و مکمل‌سازی مانان الیگوساکارید به جیره ماهی شوریده (*Sciaenops ocellatus*)، سیم سر طلائی و گربه‌ماهی راه‌راه (*Pangasianodon hypophthalmus*)

همکاران (۲۰۱۱) در بررسی جیره غذایی حاوی مانان الیگوساکارید و فروکتوالیگوساکارید، کاهش بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی کبد و ماهیچه ماهی (*Salmo salar*) در مقایسه با گروه شاهد را گزارش کردند. با توجه به مطالعات اندک بر روی تأثیر زایلوالیگوساکارید بر روی ژن‌های ایمنی ماهی، محققانی تأثیر این مکمل را بر روی موش نیز بررسی کرده‌اند. Hansen و همکاران (۲۰۱۳) نقش ضدالتهابی را به زایلوالیگوساکارید نسبت دادند زیرا موش‌هایی که با رژیم غذایی حاوی ۱۰ درصد زایلوالیگوساکارید تغذیه می‌شدند بیان ژن سیتوکین‌های پیش‌التهابی از جمله IL-1b در آنها کاهش یافت. در مطالعه حاضر عدم تأثیر زایلوالیگوساکارید بر بیان ژن IL-1b را می‌توان به کم بودن سطوح انتخابی این مکمل ارتباط داد. Abasubong و همکاران (۲۰۲۲) نشان دادند که افزایش زایلوالیگوساکارید غذایی تا ۳ درصد باعث تقویت بیان ژن‌های التهابی IL-1b گردید. از جمله در گزارشی Fast و همکاران (۲۰۰۷) بیان کردند با افزایش مقدار زایلوالیگوساکارید در جیره غذایی، عوامل التهابی در سطوح مختلف تولید می‌شوند که نشان می‌دهد زایلوالیگوساکارید می‌تواند بر روی سیستم دفاعی ایمنی عمل کند و بیان عوامل ایمنی را افزایش دهد، ایمنی اختصاصی و غیر اختصاصی بدن را بهبود بخشد و نقش خاصی در دفاع علیه عوامل بیماری‌زا و ویروس‌ها ایفا کند همچنین از سلامت روده محافظت کنند.

در مطالعه حاضر بیان ژن ایمنی در کبد بررسی گردید. در مطالعه‌ای Lumsankul و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند که با افزایش میزان یک پری‌بیوتیک استخراجی از نیشکر بیان ژن‌های التهابی از جمله IL-1 افزایش یافت در حالی که بیان این ژن در روده کاهش یافت. در نتیجه تفاوت در بیان ژن نسبی ایمنی در این مطالعات ممکن است به دلیل تفاوت در حضور سلول‌های ایمنی در هر بافت باشد. روده ماهی از نظر ایمنی فعال است و سلول‌های B، ماکروفاژها، گرانولوسیت‌ها و سلول‌های T در آنجا حضور دارند، در حالی که در کبد، ژن‌های تعدیل‌کننده ایمنی و سرکوب‌کننده سیستم ایمنی، مولکول‌های غیراختصاصی مانند پروتئین فاز حاد، اجزای مکمل و پپتیدهای ضد میکروبی وجود دارد که می‌توانند از صفرا به مخاط روده آزاد شوند که عملکرد آنها اهمیت زیادی دارند (Wu et al., 2016). در تناقض با نتایج حاضر در برخی از مطالعات پری‌بیوتیک‌های مختلف موجب

پپیچیده الیگوساکاریدهای مورد استفاده، طول دوره تغذیه آنها، شرایط پرورش ماهی یا روش تهیه خوراک توضیح داد (Pryor et al., 2003; Torrecillas et al., 2007; Peterson et al., 2012). یافته‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهد که عدم وجود اختلاف معنی‌دار را می‌توان به کم بودن سطوح انتخابی پری‌بیوتیک جیره و متعاقب آن عدم بهبود در ساختار بافت روده نسبت داد.

در مطالعه حاضر نتایج نشان داد که سطوح ۰/۵ و ۱ درصد پری‌بیوتیک زایلوالیگوساکارید تأثیری بر بیان ژن IL-1b نداشت. افزایش بیان ژن IL-1b نشان‌دهنده بهبود وضعیت سیستم ایمنی در ماهیان تغذیه‌شده با مکمل‌های غذایی می‌باشد که می‌تواند مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا را افزایش دهد که در مطالعه حاضر با توجه به عدم افزایش بیان ژن IL-1b و عدم تغییر پاسخ ایمنی سرم که تأییدکننده نتایج بیان ژن است می‌توان نتیجه گرفت که سطح ایمنی ماهیان با استفاده از مکمل‌های غذایی افزایش پیدا نکرده است. برخی محققان کاهش در بیان ژن‌های ایمنی را گزارش کردند. در مطالعه Miura و همکاران (۲۰۲۲) تأثیر مکمل پلی‌ساکارید مشتق از کرم ابریشم بر روی بیان ژن‌های ایمنی ماهی دم زرد (*Seriola quinqueradiata*) و ماهی گیش سفید (*Pseudocaranx dentex*) بررسی گردید. نتایج نشان داد که این مکمل بر بیان ژن‌های ایمنی مؤثر نبود. همچنین در مطالعه دیگری مکمل پلی‌ساکارید مشتق از کرم ابریشم بر روی بیان ژن‌های ایمنی کبد و روده ماهی مداکای ژاپنی (*Orzias latipes*) تأثیری نداشت (Ali et al., 2021 a,b).

در مطالعه Yousefi و همکاران (۲۰۱۸) پری‌بیوتیک ژل‌پلی‌ساکارید بر روی بیان ژن ایمنی IL-1b گورخر ماهی (*Danio rerio*) نیز مؤثر نبود. در مطالعه Nieves-Rodríguez و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که افزودن پری‌بیوتیک بتاگلوگان بر بیان ژن TGF و سایتوکین IL-10 مؤثر نبود که مطابق با نتیجه حاضر می‌باشد. در برخی مطالعات نیز کاهش بیان ژن در اثر افزودن پری‌بیوتیک‌ها به جیره غذایی گزارش شده است. در مطالعه Zhu و همکاران (۲۰۲۱) مکمل پلی‌ساکارید آستراگالوس (*Astragalus Propinquus schischkin*: APS) بیان ژن زایلوالیگوساکارید را در ماهی سرماری شمالی (*Channa argus*) کاهش داد. همچنین Tacchi و

Carnevali و همکاران (۲۰۰۸) در تغذیه بچه ماهیان سی‌باس اروپایی (*Dicentrarchus labrax*) با جیره حاوی پروبیوتیک، بیان ژن‌های وابسته به رشد را مورد سنجش قرار دادند. نتایج بیانگر افزایش بیان ژن IGF-I و کاهش ژن میواستاتین (MSTN) در ماهیان تغذیه شده با پروبیوتیک لاکتوباسیلوس بود. این محققین بیان کردند که در سطح مولکولی، بیان ژن‌های مرتبط با رشد عضله به‌وسیله باکتری‌های ساکن در روده به‌صورت مثبتی تحت تأثیر قرار گرفت. در آزمایشی دیگر افزایش در بیان ژن IGF-I در جوجه‌های گوشتی تحت تأثیر پست‌بیوتیک غذایی و اینولین توسط Kareem و همکاران (۲۰۱۶) گزارش شد. با توجه به نتایج مطالعاتی که بیان گردید درک تفاوت در مطالعات صورت گرفته در زمینه استفاده از محرک‌های ایمنی بر روی بیان ژن‌های وابسته به ایمنی، رشد و غیره در بافت‌های مختلف، تحقیقات بیشتر و جامع‌تری را می‌طلبد. با توجه به نتایج مطالعه حاضر سطوح ۰/۵ و ۱ درصد مکمل زایلوالیگوساکارید در جیره ماهی صبیتی پیشنهاد نمی‌شود.

افزایش بیان ژن IL-1b گردند. از جمله در مطالعه Mohammadian و همکاران (۲۰۲۱) بیان ژن IL-1b در ماهیان شیربت (*Tor grypus*) تغذیه شده با مکمل غذایی پری‌بیوتیک افزایش یافت. همچنین در مطالعه Priya و همکاران (۲۰۲۱) بیان ژن IL-1b در ماهی گورخری (*Danio rerio*) تغذیه شده با مکمل ژل‌پلی‌ساکارید افزایش یافت که با نتایج حاضر مغایرت دارد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مکمل زایلوالیگو-ساکارید بر بیان ژن رشد در ماهی مؤثر نبود. در مطالعه Khosravi و همکاران (۲۰۲۱) افزایش بیان IGF-I در ماهیان سی‌بریم (*Sparus aurata*) تغذیه‌شده با مکمل بیومین و مانان‌الیگوساکارید گزارش شد که با یافته مطالعه حاضر مغایرت دارد. در ارتباط با تدبیر استفاده از پری‌بیوتیک جیره بر بیان ژن‌های وابسته به رشد مطالعات بسیار اندکی صورت گرفته است که این امر امکان قیاس نتایج تحقیق حاضر با دیگر مطالعات و نتیجه‌گیری جامع و کامل را غیرممکن می‌سازد. در تضاد با نتایج تحقیق حاضر

منابع

- اکرمی ر.، کریم آبادی ع.، محمدزاده ح.، احمدی فر ا. ۱۳۸۸. تأثیر پری‌بیوتیک مانان اولیگوساکارید بر رشد، بازماندگی، ترکیب بدن و مقاومت به تنش شوری در بچه ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*). *مجله علوم و فنون دریایی ایران*، ۸ (۳ و ۴): ۴۷-۵۷.
- طرفی صبیح زاده م.، محمدی آذر م.، زنگویی ن.، منیعات م. ۱۴۰۰. اثر سطوح مختلف پری‌بیوتیک گالاکتوالیگوساکارید بر عملکرد رشد، بازماندگی و برخی شاخص‌های بیوشیمیایی خون بچه ماهی بنی (*Mesopotamichthys sharpeyi*). *مجله بهره‌برداري و پرورش آبزیان*، ۱۰ (۴): ۵۵-۶۸.
- Abasubong K.P., Li X.F., Adjoumani J.Y., Jiang G.Z., Desouky H.E., Liu W.B. 2022. Effects of dietary xylooligosaccharide prebiotic supplementation on growth, antioxidant and intestinal immune-related genes expression in common carp *Cyprinus carpio* fed a high-fat diet. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 106(2), 403-418.
- Abasubong K.P., Liu W.-B., Adjoumani Y.J.J., Xia S.-L., Xu C., Li X.-F. 2019. Xylooligosaccharides benefits the growth, digestive functions and TOR signaling in *Megalobrama amblycephala* fed diets with fish meal replaced by rice protein concentrate. *Aquaculture* 500, 417-428.
- Abasubong K.P., Liu W.-B., Zhang D.-D., Yuan X.-Y., Xia S.-L., Xu C., Li X.-F. 2018. Fishmeal replacement by rice protein concentrate with xylooligosaccharides supplement benefits the growth performance, antioxidant capability and immune responses against *Aeromonas hydrophila* in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *Fish Shellfish Immunology* 78, 177-186.
- Abdel-Latif H.M.R., Yilmaz E., Dawood M.A.O., Ringø E., Ahmadifar E., Yilmaz S. 2022. Shrimp vibriosis and possible control measures using probiotics, postbiotics, prebiotics, and synbiotics: A review. *Aquaculture* 551, Article 737951.
- Akbary P. 2019. Growth yield, carcass traits, biochemical and non-specific immune parameters in grey mullet, *Mugil cephalus* Linnaeus, 1758 under cyclic starvation and L-carnitine supplementation. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 18(1), 15-29.
- Akdis M., Aab A., Altunbulakli C., Azkur K., Costa R.A., Cramer R., Duan S., Eiwegger T.,

- Eljaszewicz A., Ferstl R. and Frei R. 2016.** Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : Receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138(4), 984–1010.
- Akrami R., Mansour M.R., Ghobadi S., Ahmadifar E., Khoshroudi M.S., Haji M.S.M. 2013.** Effect of prebiotic mannan oligosaccharide on hematological and blood serum biochemical parameters of cultured juvenile great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1754). *Journal of Applied Ichthyology* 29, 12141218.
- Akter M., Akter N., 2017.** Effect of Xylo-Oligosaccharides (XOS) on Growth Performance, Blood Biochemistry and Total Viable Count in Ileum and Caecum of Broiler Chickens from Day 13-26. *International Journal of Poultry Science* 20(4), 158-164.
- Akter M.N., Sutriana A., Talpur A.D., Hashim R. 2016.** Dietary supplementation with mannan oligosaccharide influences growth, digestive enzymes, gut morphology, and microbiota in juvenile striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*. *Aquaculture International* 24(1), 127-144.
- Ali M.F.Z., Nakahara S., Otsu Y., Ido A., Miura C., Miura T. 2021.** Effects of functional polysaccharide from silk worm as an immunostimulant on transcriptional profiling and disease resistance in fish. *Journal Insects Food Feed* 1-14
- Ali M.F.Z., Kameda K., Kondo F., Iwai T. Kurniawan R.A., Ohta T., Ido A., Takahashi T., Miura C., Miura T. 2021.** Effects of dietary silkrose of *Antheraea yamamai* on gene expression profiling and disease resistance to *Edwardsiella tarda* in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Fish Shellfish Immunology* 114, 207-217.
- Al-Samerria S., Radovick S. 2021.** The role of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in the control of neuroendocrine regulation of growth. *Cells* 10(10), 2664.
- Beckman B.R. 2011.** Perspectives on concordant and discordant relations between insulin-like growth factor 1 (IGF1) and growth in fishes. *General and Comparative Endocrinology* 170(2), 233-252.
- Beckman B.R., Shimizu M.G., Gadberry B.A., Parkins P.J., Cooper KA. 2004.** The effect of temperature change on the relations among plasma IGF-1, 41- kDa IGFBP and growth rate in post smolt coho salmon. *Aquaculture* 241, 601-619.
- Biller-Takahashi J.D., Urbinati E.C. 2014.** Fish Immunology. The modification and manipulation of the innate immune system: Brazilian studies. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 86, 1484-1506
- Bricknell I., Dalmo R.A. 2005.** The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish and Shellfish Immunology* 19, 457-472.
- Burtis C.A., Ashwood E.R., 1994.** Tietz textbook of clinical chemistry (5th ed.). Philadelphia. USA; W.B. Saunders Company, pp. 560-568.
- Buruiana C.T., Gomez B., Vizireanu C., Garrote G., 2017.** Manufacture and evaluation of xylooligosaccharides from corn stover as emerging prebiotic candidates for human health. *LWT* 77, 449-459.
- Carnevali O., Vivo L., Sulpizio R., Gioacchini G., Olivotto I., Silvi S., Cresci A., 2008.** Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. *Aquaculture* 258, 430-438.
- Cerezuela R., Meseguer J., Esteban M. Á., 2013.** Effects of dietary inulin, *Bacillus subtilis* and microalgae on intestinal gene expression in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology* 34, 843-848.
- Chinchu J.U., Mohan M.C., Kumar B.P. 2020.** Anti-obesity and lipid lowering effects of Varanadi kashayam (decoction) on high fat diet induced obese rats. *Obesity Medicine* 17, 100170.
- Corripio-Miyar Y., Bird S., Tsamopoulos K., Secombes C.J. 2007.** Cloning and expression analysis of two pro-inflammatory cytokines, IL-1 β and IL-8, in haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). *Molecular Immunology* 44, 1361-1373
- Cowey C.B., 1992.** Nutrition: estimating requirements of rainbow trout. *Aquaculture* 100, 177-189.
- Davani-Davari D., Negahdaripour M., Karimzadeh I., Seifan M., Mohkam M., Masoumi S.J., Ghasemi Y. 2019.** Prebiotics: definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. *Foods* 8(3), 92.
- Dimitroglou A., Merrifield D.L., Spring P., Sweetman J., Moate R., Davies S.J. 2010.** Effects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed utilisation, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 300, 182-188.

- Dinarello C.A. 1997.** Interleukin-1. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 8, 253-65.
- Ding X.M., Li D.D., Bai S.P., Wang J.P., Zeng Q.F., Su Z.W. 2018.** Effect of dietary xylooligosaccharides on intestinal characteristics, gut microbiota, cecal shortchain fatty acids, and plasma immune parameters of laying hens. *Poultry Science* 97(3), 874-881.
- Dorojan O. G. V., Cristea V., Crețu M., 2015.** Effect of thyme (*Thymus vulgaris*) and vitamin E on growth performance and body composition of *Acipenser stellatus* juveniles. *AACL Bioflux* 8, 195-202.
- Du X., Liu X., Mawolo J. B., Wang H., Mi X., Dong J., Wen Y. 2020.** Determination of haematological and biochemical parameters of Calf Saiga antelope (*Saiga tatarica*) living in the Gansu Endangered Animals Research Center. *Veterinary Medicine and Science* 6(3), 591-599.
- Gibson G.R., Hutkins R., Sanders M.E., Prescott S.L., Reimer R.A., Salminen S.J., Scott K., Stanton C., Swanson K.S., Cani P.D. 2017.** Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 14(8), 491-502.
- Gong H., Lawrence A.L., Jiang D.H., Castillea F.L., Gatlin D.M. 2000.** Lipid nutrition of juvenile *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 190 (3-4), 325-342.
- Gupta S.K. 2021.** Ameliorative and protective effects of prebiotic, microbial levan in common carp, (*Cyprinus carpio*) fry under experimental exposure to fipronil. *International Journal of Aquatic Biology* 9, 134-147.
- Hegde S., Kumar G., Engle C., Hanson T., Roy L.A., Cheatham M., Peterman M. 2022.** Technological progress in the US catfish industry. *Journal of the World Aquaculture Society* 53(2), 367-383.
- Hoseinifar S.H., Mirvaghefi A., Merrifield D.L., Amiri B.M., Yelghi S., 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, 91-96.
- Hoseinifar S.M., Ghobadi S., Khodabakhsh E., Razeghi Mansour M. 2013.** The effect of different levels of soybean meals and avizyme enzyme supplement on hematological and biochemical parameters of serum in rainbow trout. *Iranian Veterinary Journal* 9(3), 43-53.
- Hoseinifar S.H., Esteban M.A., Cuesta A., Sun Y.Z. 2015.** Prebiotics and fish immune response: a review of current knowledge and future perspectives. *Rev. Fish Science Aquaculture*, 23, 315-328.
- Hoseinifar S.H., Sharifian M., Vesaghi M.J., Khalili M., Esteban M.A. 2014.** The effects of dietary xylooligosaccharide on mucosal parameters, intestinal microbiota and morphology and growth performance of Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*) fry. *Fish Shellfish Immunology* 39, 231-236.
- Hoseinifar S.H., Zoheiri F., Dadar M., Rufchaei R., Ringø E. 2016.** Dietary galactooligosaccharide elicits positive effects on non-specific immune parameters and growth performance in Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*) fry. *Fish Shellfish Immunology* 56, 467-472.
- Hussain N.A., Akatsu S., El-Zahr C. 1981.** Spawning, egg and early larval development and growth of *Acanthopagrus cuvieri*. *Aquaculture*, 22, 125-136
- Ibrahem M.D., Fathi M., Mesalhy S., El-Aty A.A. 2010.** Effect of dietary supplementation of inulin and vitamin C on the growth, hematology, innate immunity, and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology* 29, 241-246
- Imaizumi K., Nakatsu Y., Sato M., Sedarnawati Y., Sugano M. 1991.** Effects of xylooligosaccharides on blood glucose, serum and liver lipids and cecum short-chain fatty acids in diabetic rats. *Agriculture Biology Chemistry* 55, 199-205.
- Kanani H., Javadian S. R., Bahram S. 2021.** Evaluation of feed efficiency, growth and biochemical parameters of Juvenile great sturgeon (*Huso huso*) fed with different levels of Alphamune prebiotic. *Sustainable Aquaculture and Health Management Journal* 7(1), 47-55.
- Kareem K.Y., Loh T.C., Foo H.L., Akit H., Samsudin A.A. 2016.** Effects of dietary postbiotic and inulin on growth performance, IGF1 and GHR mRNA expression, faecal microbiota and volatile fatty acids in broilers. *BMC Veterinary Research* 12, 1-10.
- Khosravi S., Shin J., Shin J., Herault M., Fournier V., Lee K.J. 2021.** Evaluation of shrimp protein hydrolysate and krill meal supplementation in low fish meal diet for red seabream (*Pagrus major*). *Fisheries and Aquatic Sciences* 24(3), 109-120.
- Li Z., Tran N.T., Ji P., Sun Z., Wen X., Li S. 2019.** Effects of prebiotic mixtures on growth

- performance, intestinal microbiota and immune response in juvenile chu's croaker, *Nibea coibor*. *Fish & Shellfish Immunology* 89, 564-573.
- Lin S., Mao S., Guan Y., Lin X., Luo L. 2012.** Dietary administration of chitooligosaccharides to enhance growth, innate immune response and disease resistance of *Trachinotus ovatus*. *Fish & Shellfish Immunology* 32, 909-913.
- Lumsangkul C., Tapingkae W., Sringarm K., Jaturasitha S., Le Xuan C., Wannavijit S., Outama P., Van Doan H. 2021.** Effect of Dietary Sugarcane Bagasse Supplementation on Growth Performance, Immune Response, and Immune and Antioxidant-Related Gene Expressions of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Cultured under Biofloc System. *Animals (Basel)*, 11(7), 2035.
- Merrifield D.L., Dimitroglou A., Foey A., Davies S.J., Baker R.T.M., Bogwald J., Castex M., Ringo E. 2010.** The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture* 302, 1-18.
- Mohammadian T., Ghanei-Motlagh R., Molayemraftar T., Mesbah M., Zarea M., Mohtashampour H., Nejad A. J. 2021.** Modulation of growth performance, gut microflora, non-specific immunity and gene expression of proinflammatory cytokines in shabout (*Tor grypys*) upon dietary prebiotic supplementation. *Fish & Shellfish Immunology* 112, 38-45.
- Mistry R.H., Gu F., Schols H.A., Verkade H.J., Tietge U.J.F. 2018.** Effect of the prebiotic fiber inulin on cholesterol metabolism in wildtype mice. *Science Reports* 8, 13238.
- Miura T., Nishikawa M., Otsu Y., Ali M., Hashizume A., Miura C. 2022.** The Effects of Silkworm-Derived Polysaccharide (Silkrose) on Ectoparasitic Infestations in Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) and White Trevally (*Pseudocaranx dentex*). *Fishes* 7, 14.
- Morshedi V., Agh N., Noori F., Jafari F., Tukmechi A., Marammazi J., Pagheh, E. 2018.** Effects of dietary xylooligosaccharide on growth and feeding performance, body composition and physiological responses of sobaity seabream (*Sparidentex hasta*) juvenile. *Aquaculture Nutrition* 24(6), 1796-1803.
- Navarro D.M., Abelilla J.J., Stein H.H. 2019.** Structures and characteristics of carbohydrates in diets fed to pigs: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 10, 1-17.
- Nieves-Rodríguez K.N., Álvarez-González C.A., Peña-Marín E.S., Vega-Villasante F., Martínez-García R., Camarillo-Coop S., Tovar-Ramírez D., Guzmán-Villanueva L.T., Andree K.B., Gisbert E. 2018.** Effect of β -Glucans in Diets on Growth, Survival, Digestive Enzyme Activity, and Immune System and Intestinal Barrier Gene Expression for Tropical Gar (*Atractosteus tropicus*) Juveniles. *Fishes* 3, 27.
- Paricheh N., Jafaryan H., Harsij M., Ahmadi A.R., Sahandi J. 2016.** Effects of Bacillus probiotic enzyme extract on growth and carcass biochemical composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae. *Journal of Marine Science and Technology* 15(3), 1-10
- Poolsawat L., Li X., Xu X., Rahman M.M., Boonpeng N., Leng X. 2021.** Dietary xylooligosaccharide improved growth, nutrient utilization, gut microbiota and disease resistance of tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*). *Animal Feed Science and Technology* 275, 114872.
- Pouramini M., Hosseinifar H. 2007.** Application of probiotics and probiotics in aquaculture. *Moje Sabze Publication*. 104 p.
- Ramezani S., Eshaghzadeh H., Saeimee H., Darvishi S. 2018.** Subyearling Siberian sturgeon *Acipenser baeri* fed a diet supplemented with ImmunoGen: Effects on growth performance, body composition, and hematological and serum biochemical parameters. *Journal of Aquatic Animal Health* 30(2), 155-163.
- Ren T., Koshio Sh., Ishikawa M., Yokoyama S., Micheal F. R., Uyan O., Tung Th. H. 2007.** Influence of dietary vitamin C and bovine lactoferrin on blood chemistry and non-specific immune responses of Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 267, 31-37.
- Roberts R.J. 2012.** Fish pathology. John Wiley and Sons, 592 p.
- Sado R., Raulino F., Freitas P., Baioco-Sales F. 2015.** Prebiotics in Nile tilapia diets 1 Growth, immune status and intestinal morphology of Nile tilapia fed dietary prebiotics (mannan oligosaccharides-MOS). *Latin American Journal of Aquatic Research* 43, 944-952.
- Samanta A.K., Kolte A.P., Elangovan A.V., Dhali A., Senani S., Sridhar M., Jayapal N. 2017.** Effects of corn husks derived xylooligosaccharides on performance of broiler chicken. *Indian Journal Animal Science* 87, 640-643.
- Sun S., Ge X., Zhu J., Zhang W., Zhang Q. 2015.** Molecular cloning, immunohistochemical

- localization, characterization and expression analysis of caspase-8 from the blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) exposed to ammonia. *Fish Shellfish Immunology* 47, 645-654.
- Torrecillas S., Montero D., Caballero M.J., Robaina L., Zamorano M.J., Sweetman J., Izquierdo M. 2015.** Effects of dietary concentrated mannan oligosaccharides supplementation on growth, gut mucosal immune system and liver lipid metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Fish & Shellfish Immunology* 42, 508-516.
- Tran N.T., Li S. 2022.** Potential role of prebiotics and probiotics in conferring health benefits in economically important crabs. *Fish and Shellfish Immunology Reports* 3, Article 100041.
- Wang L., Li C., Huang Q., Fu X., Liu R.H. 2019.** In vitro digestibility and prebiotic potential of a novel polysaccharide from *Rosa roxburghii* Tratt fruit. *Journal of Functional Foods* 52, 408-417.
- Yousefi S., Hoseinifar S. H., Paknejad H., Hajimoradloo A. 2018.** The effects of dietary supplement of galactooligosaccharide on innate immunity, immune related genes expression and growth performance in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish & Shellfish Immunology* 73, 192-196.
- Yuji-Sado R., Raulino-Domanski F., de Freitas P., Baioco-Sales F. 2015.** Growth, immune status and intestinal morphology of Nile tilapia fed dietary prebiotics (mannan oligosaccharides-MOS). *Latin American Journal Aquatic* 43, 944-952.
- Zapata A.G., Chiba A., Varas A. 1996.** Cells and tissues of the immune system of fish, in: Iwama, G., Nakanishi, T., (Eds.), *The Fish Immune System. Organism, Pathogen and Environment. Academic Press* 1e62.
- Zhang C.-N., Li X.-F., Jiang G.-Z., Zhang D.-D., Tian H.-Y., Li J.-Y., Liu W.-B. 2014.** Effects of dietary fructooligosaccharide levels and feeding modes on growth, immune responses, antioxidant capability and disease resistance of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *Fish & Shellfish Immunology* 41, 560-569.
- Zhang Z., Lu K., Liang X.F., Li J., Tang S., Zhang Y. 2022.** Effects of early low temperature exposure on the growth, glycolipid metabolism and growth hormone (GH) gene methylation in the late stage of Chinese perch (*Siniperca chuatsi*). *Comparative Biochemistry Physiology Part B: Biochemistry Molecule Biology* 259, 110705.
- Zhang Z.H., Chen M., Xie S.W., Chen X.Q., Liu Y.j., Tian L.X., Niu J. 2020.** Effects of dietary xylooligosaccharide on growth performance, enzyme activity and immunity of juvenile grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*, *Aquaculture Reports* 18, 100519
- Zheng J.L., Peng L.B., Xia L.P., Li J., Zhu Q.L. 2021.** Effects of continuous and intermittent cadmium exposure on HPGL axis, GH/IGF axis and circadian rhythm signaling and their consequences on reproduction in female zebrafish: Biomarkers independent of exposure regimes. *Chemosphere* 282, 130879.
- Zhenping S., Wenting L., Ruikui Y., Jia L., Honghong L. 2013.** Effect of a straw-derived xylooligosaccharide on broiler growth performance, endocrine metabolism and immune response. *Canadian Journal Veterinary Research* 77, 105-109.
- Zhou Q.C., Buentello J.A., Gatlin D.M. 2010.** Effects of dietary prebiotics on growth performance, immune response and intestinal morphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*) *Aquaculture* 309, 253-257.
- Zhu X.M., Liu X.Y., Xia C.G., Li M.Y., Niu X.T., Wang G.Q., Zhang D.M. 2021.** Effects of dietary *Astragalus Propinquus* Schischkin polysaccharides on growth performance, immunological parameters, antioxidants responses and inflammation-related gene expression in *Channa argus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 249, 109121.
- Ziółkowska E., Bogucka J., Dankowiakowska A., Rawski M., Mazurkiewicz J., Stanek M. 2020.** Effects of a Trans-Galactooligosaccharide on Biochemical Blood Parameters and Intestine Morphometric Parameters of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Animals (Basel)* 10(4), 723.
- Zou J., Grabowski P.S., Cunningham C., Secombes C.J. 1999.** Molecular cloning of interleukin 1 β from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reveals no evidence of an ice cut site. *Cytokine* 11, 552-560.

The effect of different levels of Xylo-oligosaccharide on some blood biochemical parameters, tissue structure of intestine and expression of immune-related and growth-related genes of sobaity (*Sparidentex hasta*)

Aliakbar Barzan¹, Amin Oujifard^{1,2}, Naser Agh³, Ahmad Ghasemi⁴, Vahid Morshedi*²

¹Department of Fisheries, Faculty of Nano and Bioscience and Technology, Persian Gulf University, Bushehr, Iran.

²Department of Fisheries and Marine Biology, Persian Gulf Research Institute, Persian Gulf University, Bushehr, Iran.

³Department of Aquaculture, Artemia and Aquaculture Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran.

⁴Department of Biotechnology, Persian Gulf Research Institute, Persian Gulf University, Bushehr, Iran.

*Corresponding author: v.morshedi@pgu.ac.ir

Received: 22.Sep.2024

Accepted: 9.Dec.2024

Abstract

The application of prebiotics as an alternative to replace the overuse of antibiotics has practical significance in sustainability of the fish farming. Prebiotics have recently been shown to have benefits in growth promotion, immunostimulation, and disease control in fish culture. The aim of this study was to evaluate the effects of dietary Xylo-oligosaccharide prebiotic on some blood biochemical parameters and intestine structure and expression of immune-related and growth-related genes in sobaity (*Sparidentex hasta*). In this regard, diets were supplemented as 3 treatments including zero (control) and containing 0.5 and 1 percent Xylo-oligosaccharide prebiotic for 8 weeks. For this purpose, 180 fish (average weight 35.14±0.8 g) were randomly distributed into 9 tank containing 300 liters with three replicates for each treatment and were fed two times daily. The results showed the glucose and triglyceride plasma content were not significantly affected by different treatments. ($P>0.05$). The plasma cholesterol content was significantly higher in fish fed dietary 0.5 % compared to the control group ($P<0.05$). The dietary XOS had no significant effect on intestinal morphology of sobaity fish ($P>0.05$). Also there was no significant difference in the expression level of immune-related (*IL-1 β*) and growth-related genes (IGF-I) compared to control ($P>0.05$). Overall, this study showed that the diet supplemented with the used levels of Xylo-oligosaccharide had no significant effects on the parameters measured.

Keywords: Sobaity fish, Prebiotic, Immune response, Intestinal structure, Gene expression