



ارزیابی اثرات ناپلی غنی شده با ید بر بیان ژن‌های آنتی اکسیدانی و ایمنی در ماهی زبرا گوره‌خری (*Danio rerio*)

رقیه صفری*، سمیرا مقدم فر، محمدرضا ایمانپور، علی شعبانی، علی جعفر نوده

گروه تکثیر و پرورش آبریان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

نوع مقاله:	چکیده
پژوهشی	ید به عنوان عنصر اصلی در تولید هورمون تیروئید از هورمونهای مرتبط با متابولیسم و ایمنی به شمار می‌آید. مطالعه حاضر به منظور ارزیابی تاثیر تغذیه با ناپلی آرتیمیا فرانسيسکانا غنی شده با یدید پتاسیم بر میزان بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز) و ایمنی (لیزوزیم و TNF-alfa) در ماهی زبرا گوره‌خری انجام گرفت. لاروهای ماهی زبرا با میانگین وزنی 2 ± 0.1 میلی‌گرم در ۴ تیمار با ۳ تکرار به مدت ۲ ماه در مخازن پرورش نگهداری شدند. تیمارهای آزمایش شامل لارو ماهی زبرا تغذیه شده با ناپلی آرتیمیا غنی شده با 0.2 ، 0.5 و 1 میلی‌گرم در لیتر یدید پتاسیم و ناپلی غنی نشده (شاهد) بود. نتایج نشان داد که یدید پتاسیم بیان ژن‌های کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز، لیزوزیم و TNF-alfa را نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌دار ($P \leq 0.05$) افزایش داد و این افزایش بیان در تیمارها از روند وابسته به دوز تبعیت می‌کرد. به طوری که بالاترین میزان بیان در تمامی ژن‌های مورد بررسی در تیمار ۱ میلی‌گرم مشاهده شد. با توجه به تغییرات بیان ژن‌های مرتبط به نظر می‌رسد یدید پتاسیم می‌تواند در بهبود عملکرد سیستم ایمنی و آنتی‌اکسیدانی در ماهی زبرا گوره‌خری نقش بازی نماید.
تاریخچه مقاله: دریافت: ۹۵/۰۱/۱۷ اصلاح: ۹۵/۰۳/۲۱ پذیرش: ۹۴/۰۴/۰۴	
کلمات کلیدی: آنتی اکسیدان آرتیمیا زبرا گوره‌خری	

مقدمه

از میان غذاهای زنده مورد استفاده در تغذیه لاروی آبریان، آرتیمیا کاربرد وسیعی دارد و تاکنون غذای فرموله مناسبی به عنوان جایگزین آرتیمیا تولید نشده است (Nabi Adloo *et al.*, 2010). ناپلی آرتیمیای تازه تفریخ شده می‌تواند تحت فرایند غنی‌سازی به عنوان حامل مناسب ویتامین‌ها، رنگدانه‌ها، آنتی بیوتیک‌ها، هورمون‌ها و مواد معدنی مورد استفاده قرار گیرد (Sorgeloos *et al.*, 2001). این عمل به منظور انتقال این ترکیبات به جانور شکارچی و بهبود کیفیت لارو، افزایش بازماندگی و مقاومت آن در برابر تنش‌های محیطی و بیماری‌های مختلف و افزایش سیستم ایمنی صورت می‌گیرد (Kazemi *et al.*, 2011). مواد معدنی برای فرآیندهای طبیعی حیات مورد نیاز هستند و همه جانوران از جمله ماهیان به عناصر غیر آلی نیاز دارند. ماهی می‌تواند این مواد

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: rsafari@gau.ac.ir

معدنی را از جیره یا محیط آب دریافت نماید. ید یکی از عناصر معدنی مورد نیاز موجودات است. میزان ید در آب‌های دریایی ($58 \mu\text{g l}^{-1}$) بالاتر از آب‌های شیرین ($15 \mu\text{g l}^{-1}$) گزارش شده است (Fuge, 2007). ید، در کنار هورمون محرک تیروئید عامل مهم تولید هورمون تیروئید می‌باشد و مکانیسم تولید این هورمون در ماهیان شبیه به مهره‌داران عالی تر است (Ribeiro *et al.*, 2012). در فولیکول‌های تیروئیدی پروتئینی به نام تیروگلوبین که در ساختمان آن تیروزین به کار رفته تولید می‌شود. سلول‌های فولیکولی ید را به صورت فعال از خون جذب و اکسید نموده و به داخل مایع فولیکولی می‌فرستند تا با مولکول تیروزین اتصال و تولید مونویدوتیروزین، دی‌یدوتیروزین، تیروکسین (T4) و تری‌یدو تیرونین (T3) نمایند. در غده تیروئید تولید تیروکسین (T4) بیشتر از تری‌یدو تیرونین (T3) است (Ribeiro *et al.*, 2012). مطالعات نشان داده است که ید می‌تواند به عنوان آنتی‌اکسیدان عمل نماید، ید پراکسید هیدروژن را در دو مرحله، با تبدیل به هیپویدوس اسیدها و سپس آب، خنثی نموده و از تولید رادیکال‌های هیدروکسیل جلوگیری می‌نماید (Miller, 2006). افزایش میزان جذب ید در شرایط استرس اکسیداتیو در کلب *Laminariales* موید این مطلب است (Küpper *et al.*, 1998). Winkler و همکاران (۲۰۰۰)، نشان دادند که ید به عنوان از بین برنده رادیکال‌های هیدروکسیل عمل کرده و مانند ویتامین C حالت آنتی‌اکسیدانی سرم خون انسان را افزایش می‌دهد. Cocchi و Venturi (۲۰۰۰)، مشاهده کردند که ید با اتصال به پیوندهای دوگانه اسیدهای چرب غیراشباع غشا سلولی، از پراکسیداسیون چربی سلول‌های مغزی موش جلوگیری می‌نماید. هم‌چنین گزارش شده که ید می‌تواند به عنوان کوفاکتور آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی عمل نماید (Winkler *et al.*, 2000). گزارشی مبنی بر ایجاد استرس اکسیداتیو در اکسیداسیون ید جهت ساخت هورمون تیروئید و نیاز فولیکول‌ها به سیستم آنتی‌اکسیدانی نظیر گلوکوتاتیون پراکسیداز و تیروکسین ردواکتاز ارائه شده است (Beckett *et al.*, Kohrle *et al.*, 2005). (1993). به نظر می‌رسد که ید با از بین بردن عوامل بیماری‌زا و هم‌چنین افزایش سیستم آنتی‌اکسیدانی به افزایش سیستم ایمنی کمک می‌نماید. بهبود وضعیت سلامتی از طریق استفاده از آرتمیای غنی شده با موادی نظیر ویتامین C، مواد معدنی، روغن‌های گیاهی و اسیدهای چرب غیراشباع در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان، شانک زردباله و ماهی زبرا گزارش شده است (Kazemi *et al.*, 2011، Nabi Adloo *et al.*, 2010 و Hawkyard *et al.*, 2011).

دید پتاسیم به عنوان یکی از مشتقات مهم ید در داروسازی و ضد عفونی‌کننده‌ها و صنعت پلیمر می‌باشد. از آنجا که مطالعه‌ای در رابطه با تاثیر تغذیه ماهیان با آرتمیای غنی سازی شده با ید بر بیان ژن‌های آنزیم‌های مرتبط با سیستم آنتی‌اکسیدانی و ایمنی و حتی فعالیت بیوشیمیایی آنها وجود ندارد، پژوهش حاضر با هدف تاثیر تغذیه ماهیان با آرتمیای غنی‌سازی شده با سطوح مختلف دید پتاسیم بر بیان ژن‌های آنزیم‌های درگیر در سیستم آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز)، آنزیم لیزوزیم و فاکتور TNF- α در ماهی زبرا گوره‌خوری (*Danio rerio*) به عنوان یک گونه مدل صورت پذیرفت.

مواد و روش

غنی‌سازی آرتمیا و تغذیه ماهیان

ابتدا سیستم آرتمیا فرانسيسکنا در آب با شوری ۳۵ ppt، دمای ۲۸-۲۶ درجه، pH ۸/۵ و اکسیژن ۷ میلی گرم در لیتر، طی مدت ۲۴ ساعت هج شد و سپس ۱۲ ساعت اجازه داده شد که ناپلی آرتمیا از کیسه زرده تغذیه کند و بعد از آن به مدت ۱۲ ساعت با تیمارهای مختلف دید سدیم به میزان ۱، ۰/۵ و ۰/۲ میلی گرم در لیتر غنی سازی شدند (Hawkyard *et al.*, 2011) با کمی تغییر). روند غنی‌سازی به صورتی انجام گرفت که هر روز آرتمیای غنی شده تازه در دسترس ماهیان بود. تعداد ۶۰۰ قطعه لارو ماهی زبرا گوره‌خوری (*Danio rerio*) با میانگین وزنی 1.0 ± 0.2 میلی گرم پس از سازگاری به مدت ۲ هفته با شرایط محیطی، به ۱۲ آکواریوم با تراکم ۵۰ ماهی منتقل شدند و در طی دو ماه پرورش با ۴ تیمار آرتمیای غنی شده با ۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر دید پتاسیم و شاهد (آرتمیای غنی سازی نشده) به میزان ۱۰ درصد وزن بدن تغذیه شدند. شاخص‌های کیفی آب در طی

دوره پرورش به طور روزانه اندازه گیری و ثبت شد (دمای آب 23 ± 2 درجه سانتی گراد، pH ۷-۸ و اکسیژن ۹ میلی گرم در لیتر). در پایان دوره به علت کوچک بودن لاروها از کل لاروها نمونه برداری و بلافاصله در ازت مایع قرار گرفته و تا شروع آزمایش در فریزر ۸۰- نگهداری شدند.

استخراج RNA

به منظور ارزیابی میزان سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) و ژنهای درگیر در ایمنی لیزوزیم و TNF- α ، از هر آکواریوم ۱۰ عدد لارو ماهی در پایان دوره (پس از ۸ هفته) برداشته شده و کل نمونه بلافاصله در ازت مایع غوطه‌ور شده و پس از انجماد سریع نمونه‌ها به یخچال با دمای ۸۰- تا زمان استخراج RNA منتقل شدند. استخراج RNA با استفاده از کیت Biozol انجام گرفت. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با دستگاه نانودراپ و با الکتروفورز ژل آگاروز سنجیده شد.

ساخت cDNA و اندازه گیری بیان ژن

جهت حذف هرگونه باقی‌مانده DNA ژنومی در نمونه‌های RNA، تیمار DNase I انجام شد و سپس ساخت رشته اول cDNA بر اساس روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز (Fermentase- France) با استفاده از ۵ میکرولیتر از RNA تیمار شده با DNase I (غلظت ۵۰۰ نانوگرم)، یک میکرولیتر آغازگر الیگو dt (۲۰-۱۸ الیگونوکلوئوتید) و ۵ میکرولیتر آب دپس^۱ انجام شد. به این منظور تیوپ‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شدند و سپس به سرعت روی یخ قرار گرفتند. ۴ میکرولیتر بافر ۵X آنزیم نسخه‌بردار معکوس، ۲ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی مولار و ۲۰ واحد آنزیم RNase inhibitor و ۱/۵ میکرولیتر آب دپس به مخلوط بالا اضافه شد. تیوپ‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفت. بلافاصله ۲۰۰ واحد آنزیم نسخه‌بردار معکوس به هر تیوپ اضافه گردید و به مدت ۱ ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند، سپس تیوپ‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید تا واکنش غیرفعال شود. به هر تیوپ ۳۸۰ میکرولیتر آب دپس اضافه شد و سپس cDNA های سنتز شده تا شروع آزمایش‌ها در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. واکنش qPCR بعد از بهینه‌سازی دما و مواد مصرفی، در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با استفاده از پرایمر qPCR طراحی شده برای ژنهای آنتی اکسیدانی سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) و ژنهای درگیر در ایمنی لیزوزیم و TNF- α و پرایمر ژن رفرنس بتا اکتین (جدول ۱) توسط کیت سایبر گرین در دستگاه iQ5 شرکت (BIO-RAD, USA) و با استفاده از نرم‌افزار (BIO RAD IQ5 OPTICAL) برای هر نمونه در ۳ تکرار بیولوژیکی و ۳ تکرار تکنیکی انجام شد. از آنجایی‌که در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد محصول غیراختصاصی و دایمر مشاهده نشد، این دما به عنوان دمای واکنش در نظر گرفته شد.

تجزیه و تحلیل داده‌های آنالیز کمی qPCR

داده‌های به‌دست آمده جهت تعیین بیان نسبی ژنهای آنتی اکسیدانی سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) و ژنهای درگیر در ایمنی لیزوزیم و TNF- α نسبت به بتا اکتین با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ با کمک نرم افزار REST (Pfaffl et al., 2002) مورد آنالیز قرار گرفت و سپس نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولوموگروف-اسمیرنوف و شیبپرو-ویلیک تست شد و آزمون لون نیز جهت بررسی برابری واریانس‌ها مورد استفاده قرار گرفت. آنالیز داده‌های مربوط به بیان نسبی ژنهای سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) و ژنهای درگیر در ایمنی لیزوزیم و TNF- α نسبت به بتا اکتین در طی دوره تغذیه با ناپلی‌های غنی شده با غلظت‌های مختلف ید توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه در سطح اطمینان ۹۵ درصد صورت گرفت. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار نمایش داده شد.

¹ DEPC Water

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای ایمنی و آنتی اکسیدانتهی مورد استفاده در این مطالعه

کاربرد	دمای اتصال (C°)	توالی (۵' - ۳')	نام پرایمر
سنجش کمی بیان ژنهای ایمنی	۵۸	GGCAGTGGTGT TTTTGTGTC	Lyz q-PCR F
		CGTAGTCCTTCCCGTATCA	lyz q-PCR R
سنجش کمی بیان ژنهای ایمنی	۵۸	CTGCTTCACGCTCCATAAGA	TNF- α q-PCR F
		CTGGTCCTGGTCATCTCTCC	TNF- α q-PCR R
سنجش کمی بیان ژنهای آنتی اکسیدانتهی	۵۸	GGGTGGCAATGAGGAAAAG	SOD q-PCR F
		GCCACATAGAAATGCACAG	SOD q-PCR R
سنجش کمی بیان ژنهای آنتی اکسیدانتهی	۵۸	GCATGTTGGAAAGACGACAC	CAT q-PCR F
		GTGGATGAAAGACGGAGACA	CAT q-PCR R
ژن خانه دار	۵۸	AGCAGATGTGGATCAGCAAG	β - actin q-PCR F
		TACCTCCCTTTGCCAGTTTC	β - actin q-PCR R

نتایج

بررسی کیفی و کمی RNA

نتایج کیفی RNA استخراج شده از لارو ماهی زبرا تغذیه شده با آرتمیای غنی شده با یدید پتاسیم در هر نمونه، دو باند rRNA S ۱۸ و ۲۸S را با وضوح بالا نشان داد (شکل ۱).

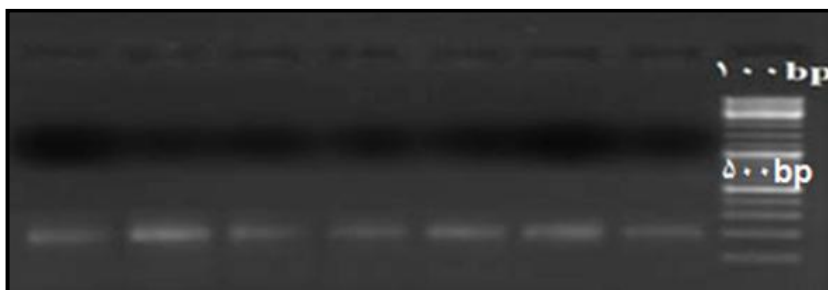
نسبت شدت جذب در نمونه‌های RNA استخراج شده در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر در محدوده ۲/۱ - ۱/۸ قرار داشت و هم‌چنین میزان جذب در طول موج‌های ۲۳۰، ۲۴۰ و ۳۲۰ نیز بیانگر قابلیت مناسب RNA در نمونه‌های مورد بررسی بود.



شکل ۱. کیفیت RNA استخراج شده از لارو ماهی زبرا روی ژل آگارز ۱/۵٪ و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید. در نمونه‌های استخراج شده دو باند متعلق به rRNA ۱۸S و ۲۸S می‌باشند.

بررسی سنتز شده cDNA

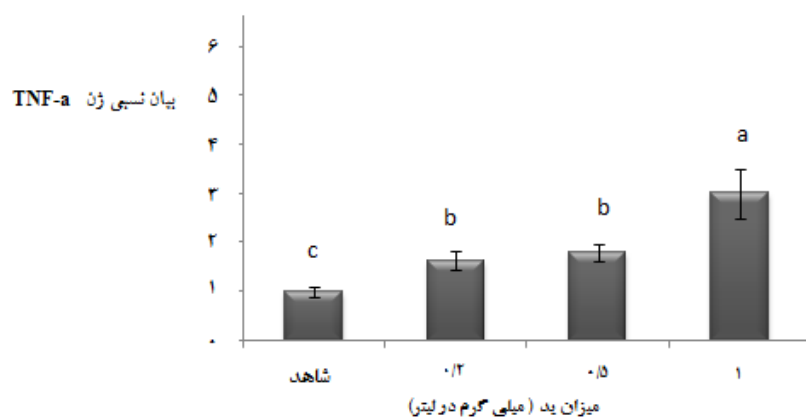
cDNA سنتز شده با پرایمر β -actin طراحی شده برای این گونه تست شد و مشاهده باند در ۲۱۶bp سنتز صحیح cDNA را تایید نمود (شکل ۲).



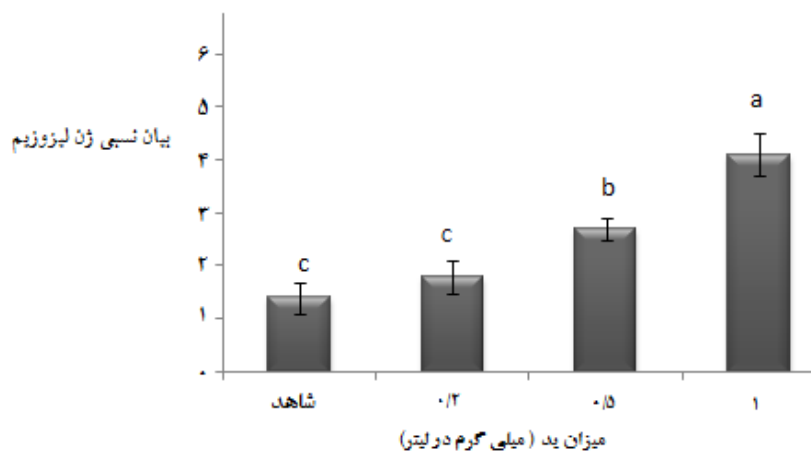
شکل ۲. محصول تکثیر cDNAهای سنتز شده با آغازگر β -actin (۲۱۶ bp) در ماهی زبرا پس از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵٪ و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید. مارکر ۱۰۰ bp.

نتایج ارزیابی بیان ژن‌ها

نتایج حاصل از ارزیابی بیان ژن‌های TNF- α و لیوزیم (Lyz) در این تحقیق نشان داد که تغذیه ماهی زبرا با آرتمیای غنی شده با یدید پتاسیم، بیان هر دو ژن مرتبط با ایمنی را در این گونه به طور معنی داری افزایش می‌دهد ($P \leq 0.05$). بررسی الگوی بیان ژن‌های مذکور الگوی افزایشی وابسته به دوزی را نشان داد به طوری که گروه شاهد کمترین و گروه تغذیه شده با آرتمیای غنی شده با سطح ۱ میلی گرم در لیتر ید بیشترین میزان بیان این ژن‌ها را نشان دادند (شکل ۳ و ۴).

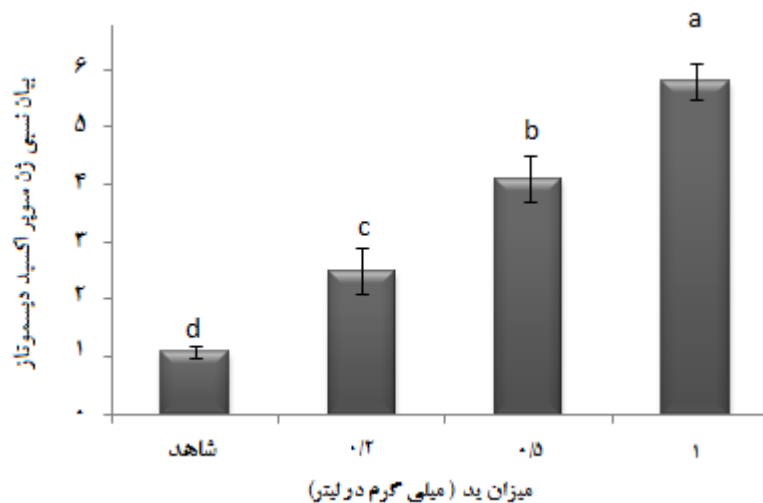


شکل ۳. تغییرات بیان نسبی ژن TNF-a به بتا اکتین در لارو ماهی زبرا تغذیه شده با آرتمیای غنی شده با ۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر یدید پتاسیم. حروف کوچک اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) بین تیمارها را نشان می‌دهد.

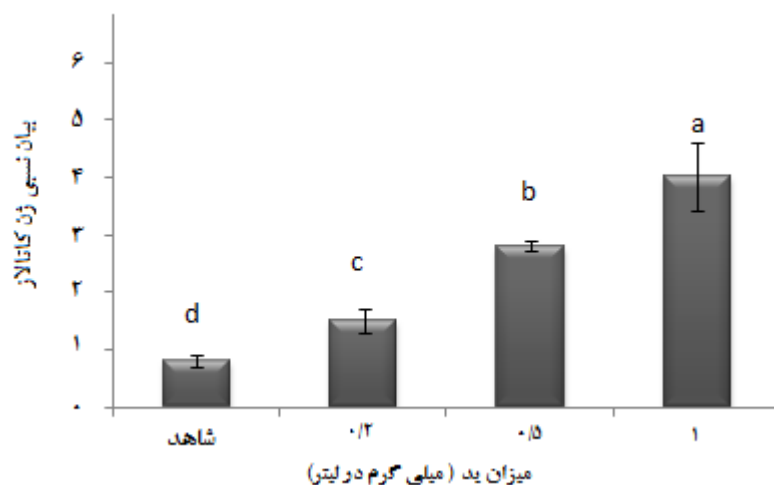


شکل ۴. تغییرات بیان نسبی ژن لیوزیم (Lyz) به بتا اکتین در لارو ماهی زبرا تغذیه شده با آرتمیای غنی شده با ۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر یدید پتاسیم. حروف کوچک اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) بین تیمارها را نشان می‌دهد.

نتایج ارزیابی بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانتی (کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز) در این تحقیق نیز افزایش معنی‌دار ($P \leq 0.05$) بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانتی در ماهیان زبرا تغذیه شده با آرتمیای غنی شده با یدید پتاسیم را نشان داد. بررسی الگوی بیان ژن‌های مذکور نشان داد که با افزایش دوز ید میزان بیان ژن‌های مذکور افزایش پیدا می‌کند (شکل ۵ و ۶).



شکل ۵. تغییرات بیان نسبی ژن سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) به بتا اکتین در لارو ماهی زبرا تغذیه شده با آرتمیای غنی شده با ۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر یدید پتاسیم. حروف کوچک اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) بین تیمارها را نشان می‌دهد.



شکل ۶. تغییرات بیان نسبی ژن کاتالاز (CAT) به بتا اکتین در لارو ماهی زبرا تغذیه شده با آرتمیای غنی شده با ۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر یدید پتاسیم. حروف کوچک اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) بین تیمارها را نشان می‌دهد.

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که یدید پتاسیم به طور معنی‌دار ($P \leq 0.05$) توانایی افزایش بیان ژن‌های کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز، لیزوزیم و TNF-alfa را نسبت به گروه شاهد را داشته و می‌تواند در بهبود عملکرد سیستم ایمنی و آنتی‌اکسیدانی نقش بازی نماید. به طور طبیعی در فرآیندهای متابولیسمی، گونه‌های فعال اکسیژنی (ROS) تشکیل می‌شوند که می‌توانند با مولکول‌های مهم بدن نظیر لیپید، پروتئین و اسیدهای نوکلئیک واکنش داده و عملکرد آنها را برهم بزنند. همه موجودات زنده دارای سیستم‌های محافظت‌کننده در مقابل واکنش‌های رادیکال‌های آزاد هستند که از آن جمله می‌توان به آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و استرس اکسیداتیوی اشاره نمود. در واقع این سیستم‌های محافظت‌کننده قادرند در شرایط طبیعی بین تولید و حذف گونه‌های فعال اکسیژنی تعادل ایجاد نمایند. اختلال در این فرآیند منجر به برهم خوردن سیستم هموستاز بدن و ایجاد استرس اکسیداتیوی در

سلول‌های مختلف موجودات زنده می‌شود (Derakhshesh *et al.*, 2014). آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز از مهم‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی هستند که در بافت کبد بیشترین میزان فعالیت را دارند و به نظر می‌رسد دلیل اهمیت این آنزیم‌ها، به خاطر جایگاه ویژه واکنش‌های اکسیدانی چندگانه و حداکثر تولید رادیکال‌های آزاد در این بافت باشد (Farombi *et al.*, 2007). آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی اولین خط دفاعی موجودات از جمله آبزیان در شرایط استرس بوده و ارزیابی آنها می‌تواند در بررسی وضعیت سیستم ایمنی آنها به کار برده شود (Kalaimani *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2013). در مطالعه حاضر میزان بیان ژن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز (CAT) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در ماهیان زبرا تغذیه شده با ناپلی غنی شده با ید بیشتر از ماهیان گروه کنترل بود که می‌تواند به نقش کوفاکتوری ید برای آنزیم‌هایی نظیر پراکسیداز، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز یا نقش ید در از بین بردن رادیکال‌های آزاد همچون هیدروکسیل (OH) نسبت داده شود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی در این مطالعه از روند وابسته به دوز تبعیت کرده و در ماهیان تغذیه شده با ناپلی غنی شده با ۱ میلی‌گرم در لیتر دیدید سدیم بیشتر از ناپلی غنی شده با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر بود. افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در خرچنگ چینی (*Eriocheir sinensis*) تغذیه شده از ناپلی غنی شده با مس (Sun *et al.*, 2013)، میگوی مونودون (*Penaeus monodon*) تغذیه شده با جیره حاوی مس (Lee and Shiau, 2003) گزارش و به نقش مس در ساختار و عملکرد آنزیم‌هایی نظیر لیزیل اکسیداز، سیتوکروم اکسیداز، فروکسیداز، تیروزیناز و سوپراکسید دیسموتاز نسبت داده شده است (Lall, 2002; Lee and Shiau, 2003; Sun *et al.*, 2013). اگر چه میزان اندک مواد معدنی برای رشد و حیات حیوانات کاملاً ضروری است اما اگر مقادیر زیاد این مواد مصرف و جذب شود امکان بروز سمیت و برهم زدن سلامت موجودات وجود دارد. افزایش میزان ROS و نقص سیستم ایمنی در لارو سخت پوستان تغذیه شده با جیره فقیر از مس (Sabatini *et al.*, 2009) و جیره های حاوی مقادیر بالای مس (Sun *et al.*, 2013) گزارش شده است. غذاهای دریایی و به ویژه علف‌های دریایی سرشار از ید بوده و گزارشاتی از سمیت یدی تیروئیدی در مردم مناطق ژاپن و ایسلند که میزان مصرف علف‌های دریایی در آنها زیاد است، ارائه شده است (Fuge, 2007). لیزوزیم در بسیاری از مهره داران وجود دارد و یکی از فاکتورهای دفاعی در برابر عوامل بیماریزا است (Iwama and Nakanishi, 1996). لیزوزیم توسط گلبول‌های سفید منتشر می‌شود و در ترشحات موکوسی، آبشش‌ها، بافت‌های کلیه، طحال، دستگاه گوارش و سرم خون یافت می‌شود (Salighehzadeh *et al.*, 2016). در سیستم ایمنی ماهیان و در ارتباط با التهابات مولکول سایتوکینی فاکتور نکروز کننده تومور (TNF) نقش مهمی در ایمنی دارد که به دنبال تحریک سیستم ایمنی از گلبول‌های سفید ترشح می‌شود که علاوه بر خون در کلیه نیز به میزان زیادی تجمع و ترشح دارد (Grayfer *et al.*, 2008). در مطالعه حاضر میزان بیان ژنهای لیزوزیم و TNF- α در تیمارهای تغذیه کرده از ناپلی غنی شده با ید افزایش نشان داد. از آنجا که تا کنون مطالعه‌ای در زمینه اثر مستقیم ید بر سیستم ایمنی گزارش نشده است با محصول اصلی این عنصر یعنی هورمون تیروئید به بحث می‌پردازیم، ید عنصر اصلی در تولید هورمون تیروئید می‌باشد که این هورمون در متابولیسم بدن نقش مهمی دارد و از آنجا که متابولیسم بدن به طور مستقیم با ایمنی در ارتباط است این عنصر می‌تواند با فاکتورهای ایمنی در ارتباط باشد. Hawkyard و همکاران (۲۰۱۱)، افزایش هورمون تیروئید را در لارو ماهیان زبرا تغذیه شده با ناپلی آرتمیای غنی شده با ید مشاهده کردند. تاثیر هورمون تیروئید بر تعدیل پاسخ-های ایمنی از جمله افزایش لنفوسیت‌های T (Hodkinson *et al.*, 2009)، فاگوسیتوز و رهاسازی سایتوکینین (De Vito *et al.*, 2011) در پستانداران اثبات شده است. اما در ماهیان مطالعات اندکی در این زمینه وجود دارد. گزارش شده که ماهیان رهو (*Labeo rohito*) تغذیه شده با جیره حاوی T3 مقاومت بیشتری به باکتری آئروموناس هیدروفیلا نشان دادند (Sahoo, 2003). Lam و همکاران (۲۰۰۵) نیز تاثیر هورمون تیروئید را بر میزان بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی Rag1, TCRAC, Ikaros, IgLC در ماهی زبرا مورد مطالعه قرار دادند و گزارش کردند هورمون تیروئید می‌تواند بر سیستم ایمنی تاثیر بگذارد که موید نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر می‌باشد. Quesada-Garcia و همکاران (۲۰۱۴)، پاسخ ایمنی ماهی قزل آلائی رنگین کمان به هورمون تیروئید را با تغییر در بیان ژن‌های csf1r, mIgM, cd4, cd8a, trb مشاهده کردند. به طور کلی، استفاده از آرتمیای غنی شده با ید

موجب افزایش بیان ژن‌های آنتی اکسیدان و ایمنی در ماهی زبرا گردید و به نظر می‌رسد یدید پتاسیم می‌تواند به عنوان مکمل غذایی جهت افزایش سطح ایمنی و اقدام پیشگیرانه در مواجهه با عوامل بیماری زا استفاده شود.

منابع

- Beckett, G.J., Nicol, F., Rae, P.W., Beech, S., Guo, Y., Arthur, J.R. 1993. Effects of combined iodine and selenium deficiency on thyroid hormone metabolism in rats. *American Journal of Clinical Nutrition*. 57: 240-243.
- Cocchi, M., Venturi, S. 2000. Iodide, antioxidant function and omega-6 and omega-3 fatty acids: a new hypothesis of biochemical cooperation? *Progress in Nutrition*. 2: 15-19.
- Derakhshesh, N., Movahedinia, A., Salamat, N., Hashemitabar, M., Bayati, V. 2014. Comparative study of the basic levels of antioxidant enzyme activity superoxide dismutase and catalase enzymes of fish grouper (*Epinephelus coioides*) in in vitro and in vivo models. *Aquatic Physiology and Biotechnology*. 2(3): 47-76. (in Persian).
- De Vito, P., Incerpi, S., Pedersen, J.Z., Luly, P., Davis, F.B., Davis, P.J. 2011. Thyroid hormones as modulators of immune activities at the cellular level. *Thyroid*. 21: 879-890.
- Farombi, E.O., Adelowo, O.A., Ajimoko, Y.R. 2007. Biomarkers of oxidative stress and heavy Nigeria Ogun River. *International Journal of Environmental Research Publication Health*. 4(2): 158-165.
- Fuge, R. 2007. Iodine deficiency: an ancient problem in a modern world. *Ambio*. 36 (1): 70-72.
- Grayfer, L., Walsh, J.G., Belosevic, M. 2008. Characterization and functional analysis of goldfish tumor necrosis factor alfa. *Developmental and Comparative Immunology*. 32: 532-543.
- Iwama, G., Nakanishi, T. 1996. *The Fish Immune System. Organism, Pathogen and Environment*. Academic Press. 395 p.
- Hawkyard, M., Sæle, Q., Nordgreen, A., Langdon, C., Hamre, K. 2011. Effect of iodine enrichment of *Artemia* sp. on their nutritional value for larval zebrafish (*Danio rerio*). *Aquaculture*. 316: 37-43.
- Hodkinson, C.F., Simpson, E.E.A., Beattie, J.H., O'Connor, J.M., Campbell, D.J., Strain, J.J. 2009. Preliminary evidence of immune function modulation by thyroid hormones in healthy men and women aged 55e70 years. *Journal of Endocrinology*. 202: 55-63.
- Kazemi, A., Agh, N., Alamifar, H., Rastian nasab, A. 2011. Oil plant enriched *Artemia urmiana* nauplii and effect on growth and survival of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae. *Iranian Fisheries Scientific Journal*. 21(2): 89-97. (in Persian).
- Kohrle, J., Jakob, F., Contempre, B., Dumont, J.E. 2005. Selenium, the thyroid, and the endocrine system. *Endocrine Review*. 26: 944-984.
- Küpper, F.C., Schweigert, N., Ar Gall, E. 1998. Iodine uptake in Laminariales involves extracellular, haloperoxidase-mediated oxidation of iodide. *Planta*. 207: 163-171.
- Lall, S.P. 2002. The minerals. In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.). *Fish Nutrition*. New York. Academic Press. pp. 259-308.
- Lam, S.H., Sin, Y.M., Gong, Z., Lam, T.J. 2005. Effects of thyroid hormone on the development of immune system in zebrafish. *General and Comparative Endocrinology*. 142: 325-335.
- Lee, M.H., Shiau, S.Y. 2003. Increase of dietary vitamin C improves haemocyte respiratory burst response and growth of juvenile grass shrimp *Paenus monodon* fed with high dietary copper. *Fish and Shell Fish Immunology*. 14: 305-315.
- Miller, M.D. 2006. Extrathyroidal benefits of iodine. *Journal of American Physicians and Surgeons*. 11(4): 106-110.
- Nabi Adloo, M., Matinfar, A., Shamsaei Mehrjan, M. 2010. Effect of cod liver oil and vitamin C enriched *Artemia* on growth, survival and stress resistance of yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*) Larvae. *Journal of Renewable Natural Resources*. 2(1): 78-90. (in Persian).

- Pfaffl, M.W., Horgan, G.H., Dempfle, L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group wide comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acid Research*. 30(9): 1-36.
- Quesada-García, A., Valdehita, A., Kropf, C., Casanova-Nakayama, A., Segner, H., Navas, J.M. 2014. Thyroid signaling in immune organs and cells of the teleost fish rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology*. 38: 166-174.
- Ribeiro, A.R.A., Ribeiro, L., Sæle, Ø., Dinis, M.T., Moren, M. 2012. Iodine and selenium supplementation increased survival and changed thyroid hormone status in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae reared in a recirculation system. *Fish Physiology and Biochemistry*. 38: 725-734.
- Sabatini, S.E., Juarez, A.B., Eppis, M.R., Bianchi, L., Luquet, C.M., Rios de Molina, M.C. 2009. Oxidative stress and antioxidant defences in two green microalgae exposed to copper. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 72: 1200-1206.
- Sahoo, P.K. 2003. Immunostimulating effect of triiodothyronine: dietary administration of triiodothyronine in rohu (*Labeo rohita*) enhances immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* infection. *Journal of Applied Ichthyology*. 19: 118-122.
- Salighehzadeh, R., Yavari, V., Mosavi, S., Zakeri, M. 2016. Effect of *Spirulina platensis* as feed additive on immune factors in *Mesopotamichthys sharpeyi*. *Journal of Aquatic Ecology*. 5(1): 44-50. (in Persian).
- Sorgeloos, P., Dhert, P., Candreva, P. 2001. Use of brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture*. 200: 147-159.
- Sun, S., Liqiao, Ch., Xianping, G., Jianguang, Q., Zhiqiang, J., Li, E. 2013. Effect of copper-enriched *Artemia* on growth, body composition, antioxidant enzyme activities, and osmotic stress tolerance of Chinese Mitten Crab (*Eriocheir sinensis*) larvae. *Journal of Shellfish Research*. 39(3): 759-766.
- Winkler, R., Griebenow, S., Wonisch, W. 2000. Effect of iodide on total antioxidant status of human serum. *Cell Biochemistry Function*. 18: 143-146.