

Original Article



## Effects of Hydroalcoholic Extract of Mallow (*Malva sylvestris*) on Hematological and Physiological Parameters and Gene Expression in Zebrafish (*Danio rerio*)

Hamed Manuchehri<sup>1\*</sup> , Seyedeh Mohadeseh Talebzadeh Hosseini<sup>1</sup> , Saber Vatandoust<sup>1</sup> ,  
Seyed Mehdi Hossenifard<sup>1</sup> , Shayan Ghobadi<sup>1</sup> 

1. Department of Fisheries, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran.

### Article history:

Received: 10 June 2026  
Revised: 12 August 2026  
Accepted: 21 August 2026  
ePublished: 21 August 2026

\*Corresponding author: Hamed Manuchehri, Department of Fisheries, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran.

E-mail: [hdmanuchehri@gmail.com](mailto:hdmanuchehri@gmail.com)

### Abstract

The present study investigated the effects of hydroalcoholic extract of *Malva sylvestris* on blood glucose levels, liver enzymes, and the expression of selected genes in zebrafish (*Danio rerio*). Adult three-and-a-half-month-old zebrafish were randomly assigned to five treatments, each with three replicates. Fish in treatment 1 (control) were fed only a commercial diet without *Malva sylvestris* extract. Fish in treatment 2 were fed a combination of commercial diet and *Artemia* nauplii without *Malva sylvestris* extract. Fish in treatments 3, 4, and 5 were fed a combination of commercial diet and *Artemia* nauplii supplemented with 0.1, 0.5, and 1% *Malva sylvestris* extract, respectively. *Artemia* nauplii were provided to the respective treatments 20 minutes after commercial feeding. To induce hyperglycemia, glucose monohydrate was added to the aquarium water according to the experimental protocol and at predetermined concentrations. Blood glucose levels and liver enzyme activities were measured at the beginning and end of the experiment. The expression of the *FOXO*, *INFγ*, interleukin, *SREBF1*, *TNF-α*, and *PPARα* genes was also evaluated. The results showed that increasing the dietary level of *Malva sylvestris* extract significantly reduced blood glucose levels ( $P < 0.05$ ). The use of *Artemia* increased liver enzyme levels compared with the basal commercial diet; however, *Malva sylvestris* extract reduced liver enzyme levels, and increasing the extract dosage resulted in a significant decrease in liver enzymes ( $P < 0.05$ ). The expression of the studied genes also showed a significant decrease with increasing levels of *Malva sylvestris* extract in zebrafish, while the highest expression levels were observed in fish fed the *Artemia* diet containing 0.1% *Malva sylvestris* extract ( $P < 0.05$ ). Overall, the hydroalcoholic extract of *Malva sylvestris* appeared to be effective in controlling increases in blood glucose and liver enzyme levels without causing adverse effects on the liver.

**Keywords:** Liver enzymes; gene expression; *Malva sylvestris*; zebrafish (*Danio rerio*).

**Please cite this article as follows:** Manuchehri H., Talebzadeh Hosseini S.M., Vatandoust S., Hossenifard S.M., Ghobadi S. Effects of Hydroalcoholic Extract of Mallow (*Malva sylvestris*) on Hematological and Physiological Parameters and Gene Expression in Zebrafish (*Danio rerio*). J Mar Bio, 2026; 18(2): 55–71. DOI:



Copyright © 2026 Journal of Marin Biology. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cite

مقاله اصلی

# بررسی تأثیر عصاره ی هیدرو الکلی گیاه پنیرک (*Malva sylvestris*) بر میزان شاخص های فیزیولوژیک خون و بیان ژن در ماهی گورخری (*Danio rerio*)

حامد منوچهری<sup>۱\*</sup>، سیدهمدیده طالبزاده حسینی<sup>۱</sup>، صابر وطن دوست<sup>۱</sup>، سیدمهدی حسینی فرد<sup>۱</sup>، سیدشایان قبادی<sup>۱</sup>

۱. گروه شیلات، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران.

## چکیده

در تحقیق حاضر، اثر عصاره ی هیدرو الکلی گیاه پنیرک (*Malva sylvestris*) در مهار اثرات احتمالی ناشی از افزایش قند خون، تغییرات آنزیم های کبدی و بیان برخی ژن ها در ماهی گورخری (*Danio rerio*) مورد مطالعه قرار گرفت. ماهیان گورخری بالغ سه و نیم ماهه به صورت تصادفی در ۵ تیمار، هر یک با ۳ تکرار ذخیره سازی گردیدند. ماهیان تیمار ۱ (شاهد) فقط با غذای تجاری فاقد عصاره پنیرک، غذادهی شدند. ماهیان تیمار ۲ با ترکیبی از غذای تجاری و ناپلی آرتیمیا که فاقد عصاره پنیرک بود، غذادهی شدند. ماهیان تیمارهای ۳، ۴ و ۵ با ترکیبی از غذای تجاری و ناپلی آرتیمیا که به ترتیب مقادیر ۰/۱، ۰/۵ و ۱ درصد عصاره پنیرک به آن ها اضافه شده بود، غذادهی شدند. ناپلی آرتیمیا، ۲۰ دقیقه پس از غذای تجاری، در اختیار تیمارهای مربوطه قرار گرفت. به منظور القای افزایش قند خون، گلوکز منوهیدرات مطابق برنامه آزمایشی و در غلظت های تعیین شده به آب آکواریوم ها افزوده شد. مقادیر گلوکز خون و آنزیم های کبدی در ابتدا و انتهای آزمایش، اندازه گیری گردید. بیان ژن های *FOXO*، *INFY*، *TNF-a*، *SREBF1* و *PPAR alpha* نیز بررسی گردید. نتایج نشان داد که با افزایش میزان دوز مصرفی عصاره گیاه پنیرک، میزان قند خون کاهش معنی داری می یابد ( $P < 0.05$ ) استفاده از آرتیمیا سبب افزایش میزان آنزیم های کبدی در مقایسه با جیره تجاری پایه شد اما عصاره گیاه پنیرک بر کاهش میزان آنزیم های کبدی موثر بود و افزایش میزان دوز مصرفی عصاره پنیرک، سبب کاهش معنی دار آنزیم های کبدی گردید ( $P < 0.05$ ). بیان ژن های مورد بررسی نیز با افزایش میزان دوز مصرفی عصاره پنیرک در گورخر ماهی کاهش معنی داری یافت اما بیشترین مقادیر آن ها در تیمار تغذیه شده با جیره آرتیمیای حاوی ۰/۱ درصد عصاره گیاه پنیرک مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). به نظر می رسد که عصاره گیاه پنیرک بدون اینکه تأثیر نامطلوبی بر کبد داشته باشد، در کنترل روند افزایشی آنزیم های کبدی و قند خون موثر عمل نمود.

**واژگان کلیدی:** آنزیم های کبدی، بیان ژن، گیاه پنیرک (*Malva sylvestris*)، ماهی گورخری (*Danio rerio*).

## تاریخچه مقاله

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۵/۳/۲۰

تاریخ ویرایش مقاله: ۱۴۰۵/۵/۲۱

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۵/۵/۳۰

تاریخ انتشار مقاله: ۱۴۰۵/۵/۳۰

تمامی حقوق برای دانشگاه آزاد اهواز محفوظ است.

\* نویسنده مسئول: حامد منوچهری، گروه شیلات، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران.

ایمیل:

[hdmanuchehri@gmail.com](mailto:hdmanuchehri@gmail.com)

**استناد:** حامد منوچهری؛ سیدهمدیده طالبزاده حسینی؛ صابر وطن دوست؛ سید مهدی حسینی فرد؛ سیدشایان قبادی. بررسی تأثیر عصاره هیدروالکلی گیاه پنیرک (*Malva sylvestris*) بر میزان شاخص های فیزیولوژیک خون و بیان ژن در ماهی گورخری (*Danio rerio*). مجله زیست شناسی دریا، تابستان ۱۴۰۵؛ ۱۸(۳): ۵۵-۷۱

## مقدمه

اثرات مفید استفاده از گیاهان دارویی و ترکیبات زیست‌فعال گیاهی در تغذیه و پرورش آبزیان طی سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است. استفاده از این ترکیبات به‌عنوان مکمل‌های طبیعی می‌تواند از طریق تأثیر بر فرآیندهای فیزیولوژیک، متابولیسم و ایمنی، وضعیت سلامت و عملکرد آبزیان را تحت تأثیر قرار دهد. مطالعات انجام‌شده در زمینه استفاده از مکمل‌های گیاهی در جیره غذایی ماهیان نیز نشان داده‌اند که ترکیبات گیاهی می‌توانند بر شاخص‌های رشد، پاسخ‌های ایمنی، شاخص‌های بیوشیمیایی و بیان ژن‌های مرتبط با فرآیندهای فیزیولوژیک اثرگذار باشند. برای نمونه، استفاده از عصاره‌های گیاهی در تغذیه ماهیان مورد بررسی قرار گرفته و اثرات آنها بر شاخص‌های رشد و پاسخ‌های ایمنی گزارش شده است. همچنین، **Bilen و همکاران (2020c)** اثر عصاره آبی - متانولی گیاه *Malva sylvestris* را در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بررسی کرده و اثرات آن را بر عملکرد رشد و پاسخ‌های ایمنی گزارش کردند. این مطالعات نشان می‌دهند که بررسی ترکیبات گیاهی به‌عنوان مکمل‌های غذایی می‌تواند در شناخت ظرفیت آنها برای بهبود وضعیت فیزیولوژیک و سلامت ماهیان اهمیت داشته باشد.

ماهی گورخری (*Danio rerio*) به‌دلیل ویژگی‌هایی مانند اندازه کوچک، چرخه تولیدمثل کوتاه، قابلیت نگهداری آسان و وجود بسیاری از مسیرهای فیزیولوژیک و متابولیسمی مشترک با سایر مهره‌داران، به‌طور گسترده به‌عنوان یک مدل آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفته است. این گونه به‌ویژه در مطالعات مرتبط با متابولیسم گلوکز و اختلالات متابولیسمی اهمیت دارد. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که اندازه‌گیری قند خون در ماهی گورخری امکان بررسی تغییرات هموستاز گلوکز را فراهم می‌کند (**Eames et al., 2010**). همچنین، ایجاد مدل‌های هاپرگلیسمی و اختلال متابولیسم گلوکز در این گونه، کاربرد آن را در مطالعات مرتبط با دیابت و متابولیسم افزایش داده است (**Capiotti et al., 2014; Zang et al., 2017**). از سوی دیگر، استفاده از ماهی گورخری به‌عنوان مدلی برای بررسی و غربالگری ترکیبات طبیعی دارای اثرات ضد دیابتی نیز مورد توجه قرار گرفته است (**Tabassum et al., 2015**). بنابراین، بررسی تأثیر ترکیبات زیست‌فعال گیاهی بر شاخص‌های مرتبط با متابولیسم گلوکز در این گونه می‌تواند اطلاعات ارزشمندی درباره ظرفیت زیستی این ترکیبات فراهم کند.

گیاه پنیرک (*Malva sylvestris* L.) از گیاهان دارویی خانواده *Malvaceae* است که به‌دلیل دارا بودن ترکیبات زیست‌فعال مختلف، از ارزش دارویی و تغذیه‌ای برخوردار است. مطالعات انجام‌شده درباره این گیاه و گونه‌های نزدیک آن، وجود ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و سایر ترکیبات زیست‌فعال را گزارش کرده‌اند که می‌توانند در فعالیت‌های زیستی مختلف این گیاه نقش داشته باشند. برخی مطالعات نیز اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و سایر فعالیت‌های زیستی ترکیبات حاصل از گیاهان جنس *Malva* را مورد بررسی قرار داده‌اند. در زمینه کاربرد این گیاه در آبزیان نیز **Bilen و همکاران (2020c)** اثر عصاره آبی - متانولی *Malva sylvestris* را در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بررسی کردند و اثرات آن را بر عملکرد رشد و پاسخ‌های ایمنی گزارش نمودند.

از سوی دیگر، تغییرات متابولیسمی و فیزیولوژیک در ماهیان می‌تواند با تغییر در شاخص‌های بیوشیمیایی خون و فعالیت آنزیم‌های کبدی همراه باشد. کبد یکی از اندام‌های مهم در تنظیم فرآیندهای متابولیسمی و سم‌زدایی در ماهیان است و بررسی فعالیت آنزیم‌های کبدی می‌تواند به‌عنوان یکی از شاخص‌های وضعیت فیزیولوژیک و سلامت ماهی مورد استفاده قرار گیرد. همچنین، ارتباط میان متابولیسم گلوکز و فرآیندهای التهابی و متابولیسمی، اهمیت بررسی هم‌زمان شاخص‌های قند خون و بیان ژن‌های مرتبط با این فرآیندها را افزایش می‌دهد. در مطالعات مربوط به ماهی گورخری نیز تغییرات متابولیسم گلوکز و بیان ژن‌های مرتبط با فرآیندهای فیزیولوژیک و متابولیسمی مورد توجه قرار گرفته است.

با وجود مطالعات انجام‌شده درباره کاربرد ترکیبات گیاهی در تغذیه آبزیان و همچنین مطالعات انجام‌شده درباره اثرات زیستی *Malva sylvestris*، اطلاعات درباره تأثیر عصاره هیدروالکلی این گیاه بر قند خون، آنزیم‌های کبدی و بیان ژن‌های مرتبط با فرآیندهای متابولیسمی و ایمنی در ماهی گورخری همچنان محدود است. از این‌رو، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر سطوح مختلف عصاره هیدروالکلی *Malva sylvestris* بر میزان قند خون، فعالیت آنزیم‌های کبدی و بیان ژن‌های مورد مطالعه در ماهی گورخری (*Danio rerio*) انجام شد. در این پژوهش، ماهیان در

معرض سطوح مختلف عصاره پنیرک قرار گرفتند و تغییرات شاخص‌های فیزیولوژیک و مولکولی آنها مورد ارزیابی قرار گرفت تا اثر احتمالی این عصاره در کنترل تغییرات قند خون، وضعیت آنزیم‌های کبدی و بیان ژن‌های مورد مطالعه مشخص شود.

## مواد و روش‌ها

### تهیه و نگهداری ماهیان

۱۵۰ قطعه ماهی گورخری بالغ ۱۰۵ روزه با میانگین وزن  $0.001 \pm 0.06$  گرم و طول  $0.1 \pm 1.6$  سانتیمتر به صورت تصادفی در ۵ تیمار به تعداد ۱۰ عدد ماهی، در آکواریوم‌های شیشه‌ای که به ابعاد طول ۳۰ در عرض ۲۰ و در ارتفاع ۲۰ سانتی متر (۵ عدد ماهی به ازای هر ۱/۷ لیتر) رهاسازی و در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد با دوره نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی نگه داری شدند (Westerfield, 2007). طی دوره آزمایش، اکسیژن محلول آب با کمک پمپ هوای آکواریومی بالای ۷ میلی گرم در لیتر و pH در محدوده ۷ حفظ شد. فیلتراسیون و تعویض آب توسط سیستم سامپ مرکزی انجام شد تا کلیه فاکتورهای محیطی در محدوده مطلوب برای نگهداری گورخرماهی حفظ شوند.

### تهیه عصاره آبی-الکلی

گیاه پنیرک پس از تهیه از فروشگاه گیاهان دارویی معتبر، مورد تایید مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی تهران قرار گرفت. عصاره گیری آبی الکلی با استفاده از افزودن ۲۰ گرم پودر گل گیاه پنیرک (*Malva sylvestris*) و ۴۰۰ میلی لیتر متانول ۶۰٪ تهیه شد، بدین منظور مخلوط آماده شده بعد از ۴۸ ساعت قرار گرفتن در انکوباتور شیکر دار با دمای ۲۵ درجه از روی چند گاز استریل عبور داده شد و سپس محلول صاف شده از کاغذ صافی والتمن، صاف و به یک بشر استریل شده منتقل و با دستگاه روتاری حلال موجود در آن، حذف شد. عصاره صاف شده در دستگاه خشک کن انجمادی به ماده خشک تبدیل شدو تا زمان انجام آزمایش در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری گردید (صمصام شریعت، ۱۳۸۶).

### تیمار بندی

گورخرماهیان در ۵ تیمار مختلف، هر یک با ۳ تکرار ذخیره سازی گردیدند. ماهیان تیمارهای مختلف با استفاده از جیره های آزمایشی که دو نوع مختلف غذا (غذای تجاری و ترکیب غذای تجاری + ناپلی آرتیمیا) و سطوح مختلف عصاره پنیرک (۰، ۰/۱، ۰/۵، ۱ درصد) به آنها افزوده شده بود، تغذیه شدند. با استفاده از غذای تجاری Gemma micro ساخت شرکت Skretting که متشکل از ۵۹ درصد پروتئین، ۱۴ درصد چربی، ۰/۲ درصد فیبر و ۱۴ درصد خاکستر است (Skretting a Nutreco company) و آرتیمیای تازه هچ شده و ۳ بار در روز غذادهی شدند ماهیان تیمار ۱ (شاهد) فقط با غذای تجاری که فاقد عصاره پنیرک بود، غذادهی شدند. ماهیان تیمار ۲ با ترکیبی از غذای تجاری (۳ بار در روز) و ناپلی آرتیمیا (یک بار در روز (صبح)) که فاقد عصاره پنیرک بود، غذادهی شدند. ماهیان تیمارهای ۳، ۴ و ۵ با ترکیبی از غذای تجاری و ناپلی آرتیمیا که به ترتیب مقادیر ۰/۱، ۰/۵ و ۱ درصد عصاره پنیرک به آن ها اضافه شده بود، غذادهی شدند (Bilen et al., 2020a).

### تهیه غذا و غذادهی

غذادهی به صورت تغذیه نرمال و پرخیزی (overfeeding) و با استفاده از غذای تجاری Gemma micro ساخت شرکت Skretting (۵۹ درصد پروتئین، ۱۴ درصد چربی، ۰/۲ درصد فیبر و ۱۴ درصد خاکستر (Skretting a Nutreco company) و نیز ناپلی آرتیمیای تازه تخم‌گشایی شده انجام شد. جهت افزودن عصاره به غذا، پس از تهیه عصاره، ابتدا جیره پایه (Gemma micro) توزین شد و عصاره پنیرک در ژلاتین ۵ درصد به‌عنوان حامل حل گردید. سپس محلول حاوی عصاره، متناسب با وزن غذا و سطوح آزمایشی، به‌صورت یکنواخت روی جیره اسپری و مخلوط شد تا عصاره به‌طور یکنواخت در سطح غذا توزیع شود. جیره های آماده شده در هوای محیط آزمایشگاه خشک و در پلاستیک های زیپ دار قرار داده شد و تا زمان مصرف به یخچال با دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری گردید (صفری و همکاران، ۱۳۹۷).

ناپلی آرتیمیا، ۲۰ دقیقه بعد از دریافت غذای تجاری به در تمامی تیمارها، ناپلی آرتیمیا به‌عنوان غذای پایه مورد استفاده قرار گرفت؛ به‌طوری‌که گروه شاهد ناپلی آرتیمیای فاقد عصاره گیاه پنیرک و تیمارهای آزمایشی ناپلی آرتیمیای آغشته به غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی گیاه پنیرک را دریافت کردند، خورنده می شد (Tainaka et al., 2011). میزان غذای تجاری در هر وعده برابر با دوز ۲ میلی گرم در روزو میزان ناپلی آرتیمیا

در هر وعده برابر با ۶۰ بود (Tainaka et al., 2011). با انجام چنین شیوه تغذیه ای، در پایان دوره، میزان وزن بدن و قند خون افزایش یافته و شرایطی بسیار شبیه به چاقی در انسان ایجاد می گردد (Oka et al., 2010).

### افزایش قند خون گورخرماهی

جهت افزایش میزان قند خون ماهیان، از روش افزودن گلوکز به آب آکواریوم ها استفاده شد (Zang et al., 2017). پودر گلوکز استفاده شده متعلق به شرکت Merck آلمان بود. غلظت گلوکز منویدرات در آب مخازن آکواریومی طی مدت ۱۰ روز از صفر به ۷۲ گرم در دو لیتر (۳۶ گرم در لیتر) آب رسانده شد. به طوری که ماهیان به مدت ۴ روز در دوز ۵۰ میلی مولار گلوکز منویدرات (۱۸ گرم) و پس از آن به مدت ۳ روز در دوز ۱۰۰ میلی مولار (۳۶ گرم) و بعد در نهایت به مدت ۳ روز در دوز ۲۰۰ میلی مولار (۷۲ گرم) گلوکز منویدرات در دو لیتر آب قرار داده شدند (Tseng et al., 2009).

### تعیین سطح گلوکز خون

برای تعیین سطح قند خون، قبل از شروع آزمایش، ۳ عدد ماهی به طور تصادفی از هر آکواریوم جمع آوری و غذادهی به آن ها به مدت ۱۲ ساعت قطع گردید. سپس ماهیان به مدت ۱۵ دقیقه در آکواریوم با آب بدون گلوکز قرار داده شدند تا از آلودگی نوار گلوکزومتر جلوگیری شود (Gleeson et al., 2007). پس از آن، بلافاصله ساقه دمی بریده شد و قند خون با قرار دادن نوار تست گلوکزومتر (Accu, One Touch Ultra, Check) به طور مستقیم روی دم، اندازه گیری شد (Eames et al., 2010). با این روش سطح قند خون در ۲ مرحله در غلظت های ۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار و از ابتدای آزمایش (زمان صفر) به صورت هفتگی تا پایان آزمایش، مورد سنجش قرار گرفت.

### سنجش آنزیم های کبدی

برای سنجش آنزیم های کبدی، ابتدا کبد از بقیه اندام ها در زیر استریومیکروسکوپ جدا شد، سپس داخل لوله های اپندرف حاوی PBS در دمای ۷۰- نگهداری گردید و در نهایت به آزمایشگاه بهار در تهران ارسال شد. سنجش میزان آنزیم های کبدی شامل آسپارات آمینوترانسفراز (AST) (Aspartate transaminase)، آلکالین فسفاتاز (ALP) (Alkaline phosphatase) و آلانین آمینوترانسفراز (Alanine transaminase) (ALT) به روش IFCC (فدراسیون بین المللی شیمی بالینی و طب آزمایشگاهی) با استفاده از کیت های آزمایشگاهی پارس آزمون و توسط دستگاه VITACHI 917 با سری ساخت ۱۹۹۴ - ۱۹۸۸ صورت گرفت (Thomas et al., 1998).

### بیان ژن

استخراج RNA از روده ماهی گورخری با استفاده از کیت RNX-Plus Total RNA Isolation مدل EX۶۱۰۱، شرکت سیناژن انجام شد. پس از استخراج RNA، کیفیت RNA استخراج شده بررسی گردید و نمونه های دارای کیفیت مناسب برای بررسی بیان ژن مورد استفاده قرار گرفتند. بیان ژن های مورد مطالعه با استفاده از روش Real-Time PCR و بر پایه رنگ SYBR Green انجام شد. واکنش Real-Time PCR با استفاده از دستگاه CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) مجهز به بلوک ۹۶ چاهکی و محلول PCR (GreenMaster with LowROX qPCR (Jena Bioscience GmbH, Germany) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. بیان نسبی ژن های هدف در مقایسه با ژن کنترل و بین تیمارهای مختلف، با استفاده از روش Pfaffl (۲۰۰۱) و با در نظر گرفتن کارایی تکثیر ژن های هدف و ژن مرجع محاسبه شد. فرمول محاسبه نسبت بیان نسبی ژن ها مطابق روش Pfaffl به صورت زیر در نظر گرفته شد:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{(\text{CP}_{\text{target}}(\text{control}) - \text{CP}_{\text{target}}(\text{sample}))}}{(E_{\text{ref}})^{(\text{CP}_{\text{ref}}(\text{control}) - \text{CP}_{\text{ref}}(\text{sample}))}}$$

در این رابطه، E نشان دهنده کارایی تکثیر و CP نشان دهنده نقطه عبور منحنی تکثیر است.

## تجزیه و تحلیل داده‌ها

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام و نمودارها با استفاده از نرم افزار اکسل ۲۰۱۰ ترسیم گردید. تجزیه و تحلیل اطلاعات حاصله از آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA و برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون Duncan استفاده شد (Duncan, 1955). نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار نمایش داده شد و سپس با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه در سطح اطمینان ۹۵ درصد بررسی گردید. داده‌های مربوط به بیان نسبی ژن بعد از محاسبه با فرمول  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  برابر است با  $\Delta Ct$  ژن هدف منهای  $\Delta Ct$  کالیبراتور) و سپس با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه در سطح اطمینان ۹۵ درصد بررسی گردید.

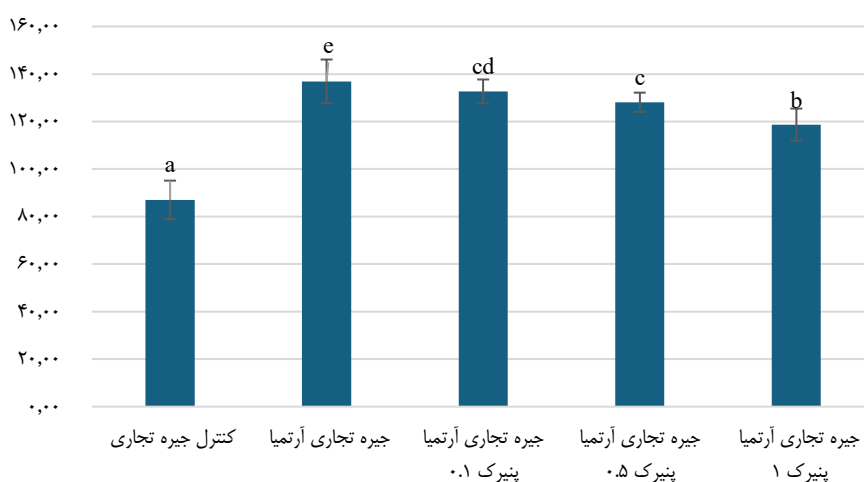
## نتایج

استفاده از عصاره پنیرک اثر معنی داری بر تغییرات میزان قند خون ماهی گورخری داشت (شکل ۱) بطوریکه با افزایش میزان دوز مصرفی عصاره، میزان قند خون کاهش معنی داری یافت ( $P < 0.05$ ). همچنین استفاده از آرتمیا در جیره غذایی تاثیر معنی داری بر افزایش قند خون داشت بطوریکه کمترین میزان قند خون در تیمار استفاده نموده از جیره پایه و بیشترین میزان قند خون در تیمار استفاده نموده از آرتمیا مشاهده شد ( $P < 0.05$ ).

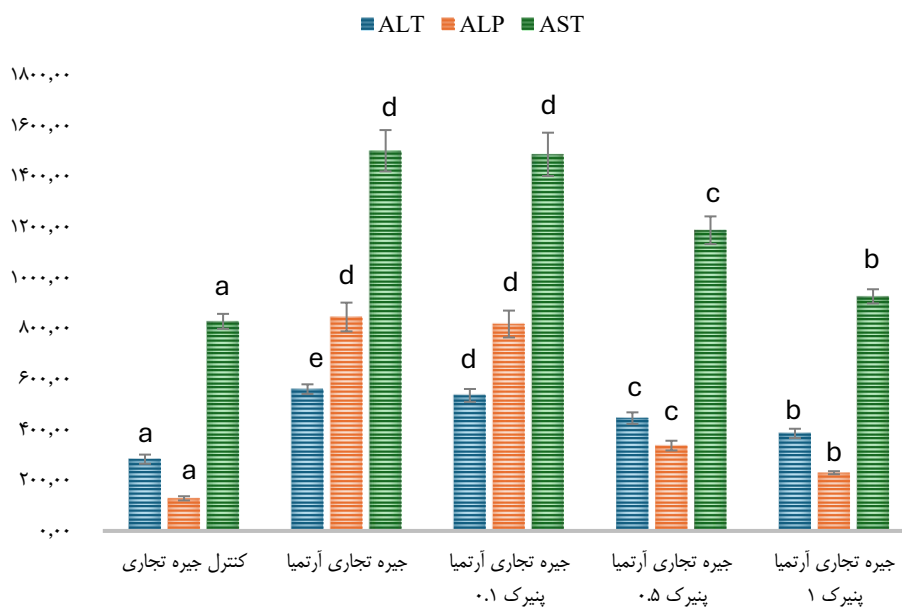
همچنین مطابق شکل ۲ استفاده از عصاره گیاه پنیرک تاثیر معنی داری بر تغییر میزان آنزیم‌های کبدی (ALT و ALP، AST) داشت ( $P < 0.05$ ). بطور کلی استفاده از آرتمیا در تغذیه ماهی گورخری، افزایش میزان آنزیم‌های کبدی در مقایسه با جیره تجاری پایه را در پی داشت ( $P < 0.05$ ). اما استفاده از عصاره گیاه پنیرک بر کاهش میزان آنزیم‌های کبدی موثر بود و افزایش میزان دوز مصرفی عصاره پنیرک، سبب کاهش معنی دار هر سه نوع آنزیم کبدی گردید.

بیان ژن‌های FOXO، INFY، اینترلوکین، TNF-a، SREBF1 و PPAR alpha با افزایش میزان دوز مصرفی عصاره پنیرک در گورخر ماهی کاهش معنی داری یافت (شکل‌های ۳ تا ۸) بطوریکه کمترین مقادیر همه آن‌ها در بین تیمارهای دریافت کننده عصاره پنیرک، در تیمار تغذیه شده با جیره آرتمیای حاوی ۱ درصد عصاره گیاه پنیرک مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). همچنین مشخص شد که میزان بیان این ژن‌ها در تیمار استفاده نموده از غذای تجاری به طور معنی داری کمتر از تیمار استفاده نموده از آرتمیا بود ( $P < 0.05$ ).

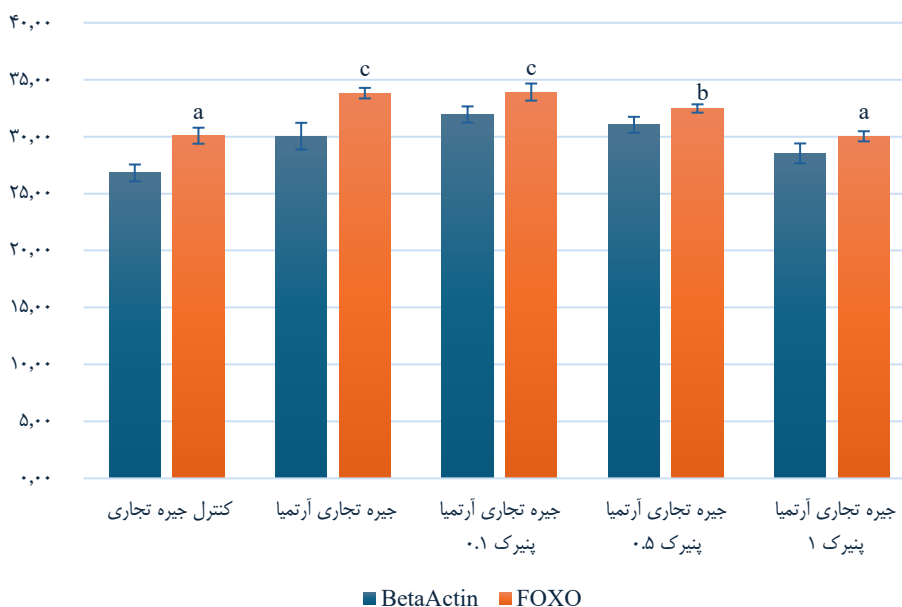
## قند



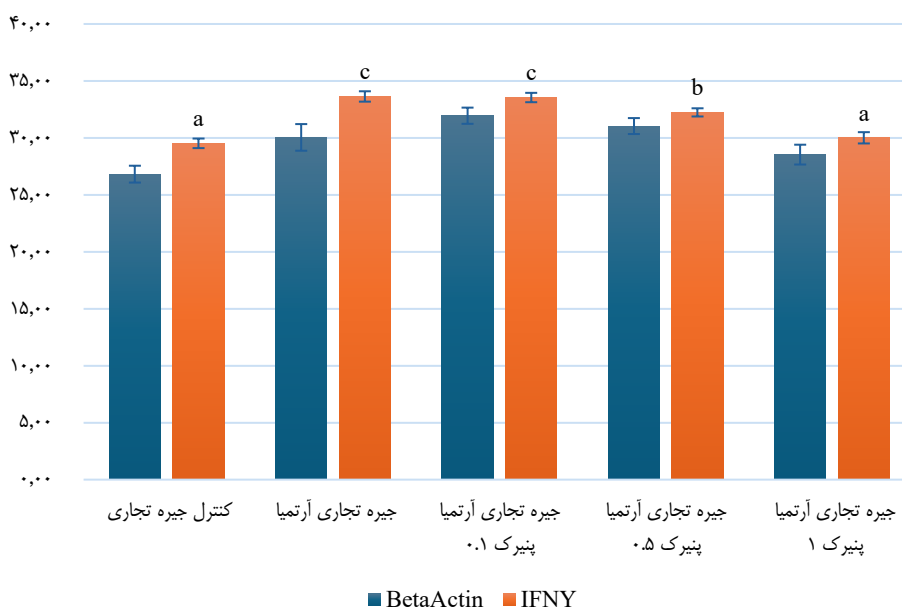
شکل ۱. اثر سطوح مختلف عصاره هیدروالکلی پنیرک (*Malva sylvestris*) بر میزان قند خون ماهی گورخری (*Danio rerio*) در تیمارهای آزمایشی



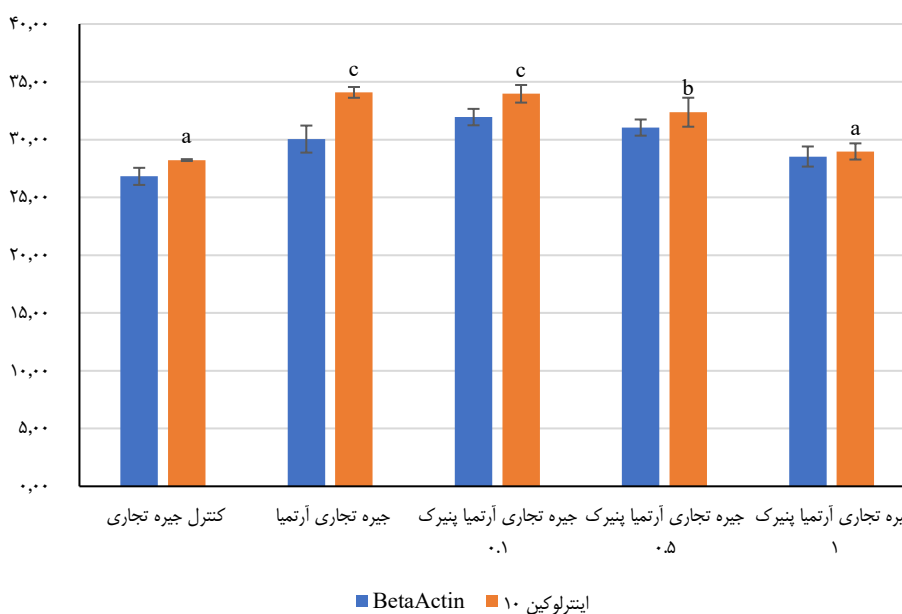
شکل ۲. اثر سطوح مختلف عصاره هیدروالکلی پنیرک (*Malva sylvestris*) بر فعالیت آنزیم‌های کبدی ALT، AST و ALP در ماهی گورخری (*Danio rerio*) در تیمارهای آزمایشی



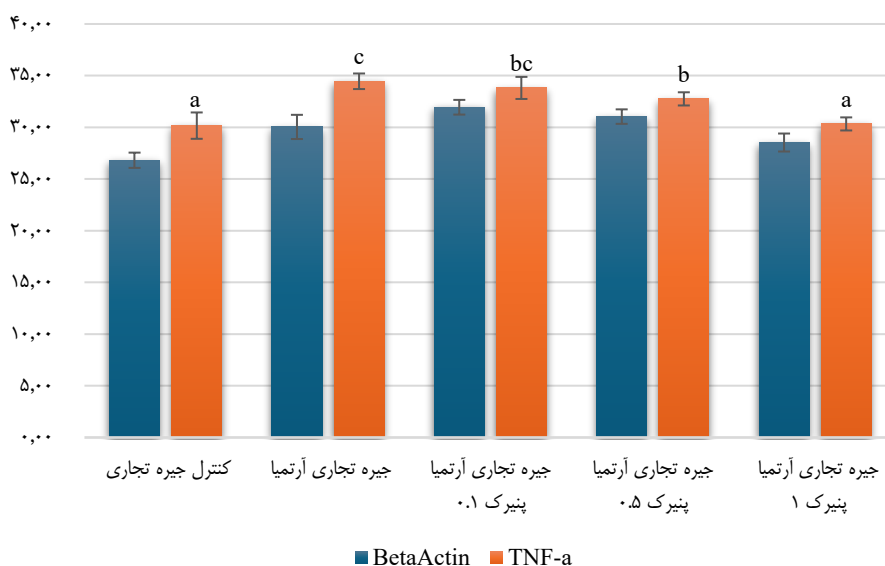
شکل ۳. اثر سطوح مختلف عصاره هیدروالکلی پنیرک (*Malva sylvestris*) بر میزان بیان نسبی ژن FOXO در ماهی گورخری (*Danio rerio*) در تیمارهای آزمایشی



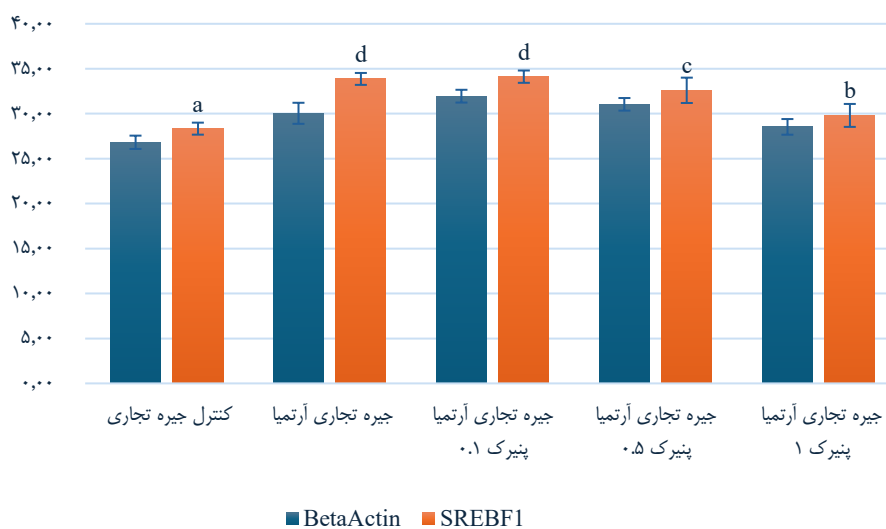
شکل ۴. اثر سطوح مختلف عصاره هیدروالکلی پنیرک (*Malva sylvestris*) بر میزان بیان نسبی ژن  $INF\gamma$  در ماهی گورخری (*Danio rerio*) در تیمارهای آزمایشی



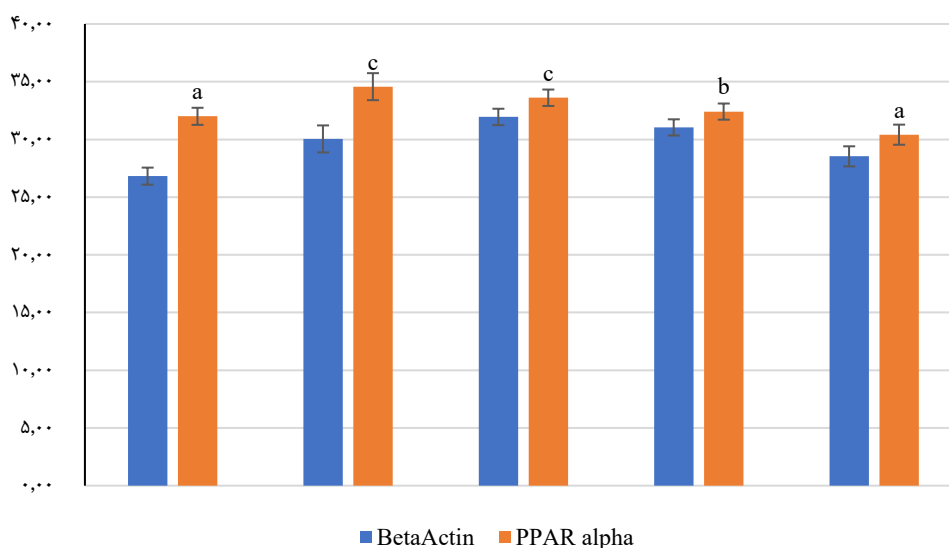
شکل ۵. اثر سطوح مختلف عصاره هیدروالکلی پنیرک (*Malva sylvestris*) بر میزان بیان نسبی ژن اینترلوکین در ماهی گورخری (*Danio rerio*) در تیمارهای آزمایشی



شکل ۶. اثر سطوح مختلف عصاره هیدروالکلی پنیرک (*Malva sylvestris*) بر میزان بیان نسبی ژن TNF- $\alpha$  در ماهی گورخری (*Danio rerio*) در تیمارهای آزمایشی



شکل ۷. اثر سطوح مختلف عصاره هیدروالکلی پنیرک (*Malva sylvestris*) بر میزان بیان نسبی ژن SREBF1 در ماهی گورخری (*Danio rerio*) در تیمارهای آزمایشی



شکل ۸. اثر سطوح مختلف عصاره هیدروالکلی پنیرک (*Malva sylvestris*) بر میزان بیان نسبی ژن PPAR $\alpha$  در ماهی گورخری (*Danio rerio*) در تیمارهای آزمایشی

## بحث و نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که استفاده از آرتمیا در جیره غذایی تاثیر معنی داری بر افزایش قند خون دارد بطوریکه کمترین میزان قند خون در تیمار استفاده نموده از جیره پایه و بیشترین میزان قند خون در تیمار استفاده نموده از آرتمیا مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). از طرفی استفاده از عصاره گیاه پنیرک اثر معنی داری بر تغییرات میزان قند خون ماهی گورخری داشت بطوریکه با افزایش میزان دوز مصرفی عصاره، میزان قند خون کاهش معنی داری یافت ( $P < 0.05$ ) که این امر نشان دهنده تاثیر مطلوب عصاره گیاه پنیرک در کنترل قند خون است زیرا مشاهده گردید که استفاده از ناپلی آرتمیا در جیره غذایی با افزایش قند خون در ماهی گورخری همراه است اما مصرف عصاره پنیرک سبب کنترل این افزایش قند خون می گردد و موثرترین دوز از بین دوزهای مورد بررسی در این تحقیق، دوز ۱٪ عصاره گیاه پنیرک است. نتایج حاصل از پژوهش حاضر با نتایج مطالعات انجام شده بر روی گیاه پنیرک همخوانی دارد. در پژوهش‌های مختلف گزارش شده است که عصاره *Malva sylvestris* به دلیل دارا بودن مقادیر قابل توجهی از ترکیبات فنولی، فلاونوئیدها و سایر ترکیبات زیست‌فعال، موجب کاهش استرس اکسیداتیو، بهبود وضعیت متابولیسم و کاهش غلظت قند خون در مدل‌های آزمایشگاهی شده است (Martins et al., 2017; Bilen et al., 2020; Ko et al., 2018). همچنین Affifi (۲۰۱۶) نیز اثرات ضد دیابتی و محافظت کننده این گیاه را گزارش نموده است. همسو بودن نتایج این مطالعات با یافته‌های پژوهش حاضر نشان می‌دهد که کاهش قند خون مشاهده شده در ماهیان تغذیه شده با عصاره پنیرک، می‌تواند طالعات جدید نیز نقش تنظیم کننده عصاره‌های گیاهی بر متابولیسم گلوکز و مسیرهای مولکولی مرتبط با دیابت را تأیید کرده‌اند. Ahmadifar و همکاران (۲۰۲۱) گزارش کردند که ترکیبات گیاهی قادرند از طریق تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با رشد، ایمنی و متابولیسم، وضعیت فیزیولوژیک ماهیان را بهبود بخشند. همچنین Liu و همکاران (۲۰۲۰a) نشان دادند که مکمل‌های گیاهی علاوه بر افزایش رشد، موجب بهبود پاسخ‌های ایمنی و کاهش استرس اکسیداتیو می‌شوند. Mansour و همکاران (۲۰۲۰) نیز گزارش کردند که استفاده از گیاهان دارویی باعث بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانی و افزایش مقاومت بافت‌ها در برابر تنش‌های اکسیداتیو می‌شود که این یافته‌ها با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. ناشی از حضور ترکیبات زیست‌فعال موجود در این گیاه و اثرات آن‌ها بر تنظیم متابولیسم گلوکز باشد.

عصاره پنیرک حاوی ترکیبات فنولی، فلاونوئیدها، الیگوساکاریدها، آنتوسیانین ها، کاروتنوئیدها و توکوفرول می باشد (Barros et al., 2010) طی تحقیقی مشخص شد که عصاره گیاه پنیرک (*M. sylvestris*) حاوی ۴/۵ درصد ترکیبات فنولیک معادل گالیک اسید بر پایه وزن خشک است (طاهانژاد و همکاران، ۱۳۹۱).

ترکیبات فنولی، فلاونوئیدها و الیگوساکاریدها از عوامل موثر در کنترل قند خون هستند. گزارش شده است که برخی فلاونوئیدها سبب افزایش غلظت انسولین خون، کاهش میزان قند خون و افزایش حساسیت انسولین در بافت هایی همچون کبد، چربی و عضلات می گردند (Liu et al., 2016). الیگوساکاریدها نیز دارای اثرات ضد دیابتی چشمگیری هستند (Agheli et al., 1998; Sangwan et al., 2015). وجود چنین ترکیباتی در عصاره گیاه پنیرک علاوه بر این، Gupta و همکاران (۲۰۲۱) در یک مقله مروری بیان کردند که استفاده از گیاهان دارویی در آبی‌پروری موجب بهبود متابولیسم انرژی، افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و تقویت سیستم ایمنی ماهیان می‌شود. همچنین Liu و همکاران (۲۰۲۰b) گزارش کردند که پلی‌ساکاریدهای گیاهی قادرند بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی را افزایش داده و عملکرد فیزیولوژیک آبزیان را بهبود بخشند. به طور موثری بر کنترل قند خون عمل نموده است. از این رو بررسی ترکیبات تشکیل دهنده عصاره هیدروالکلی گونه *M. sylvestris* جهت تعیین ترکیبات موثره موجود در این گیاه در کنترل قند خون، توصیه می گردد.

کبد یکی از اندام های حیاتی بدن است که در تنظیم بسیاری از فعالیت های فیزیولوژیک دخیل است. هرگونه اختلال در عملکرد کبد باعث ایجاد مجموعه ای از اختلالات می شود که می تواند صدمات جبران ناپذیری را به این عضو وارد نماید (Mokhtari et al., 2008). زمانی که کبد دچار آسیب می شود، سلول های کبدی ترشح این آنزیم ها را افزایش داده و موجب بالا رفتن سطح پلاسمایی آنها می گردند. از این رو آنزیم های ALT، AST و ALP به عنوان شاخص آسیب های کبدی به کار گرفته می شوند و مقادیر زیاد این آنزیم ها نشان دهنده دژنراسیون، نکروز و از بین رفتن کبد به دلیل آسیب سلولی است (Bhardwaj et al., 2009). افزایش سطح آنزیم های کبدی به دلیل تغییر در نفوذپذیری غشاء پلاسمایی سلول های کبدی و یا صدمات سلولی است (Choudhary et al., 2007).

مطالعات انجام‌شده بر روی گیاه پنیرک (*Malva sylvestris*) نشان داده است که این گیاه به دلیل دارا بودن مقادیر قابل توجهی از ترکیبات فنولی، فلاونوئیدها و سایر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، دارای اثرات محافظت‌کننده کبدی بوده و می‌تواند با کاهش استرس اکسیداتیو و مهار آسیب سلول‌های کبدی، موجب کاهش فعالیت آنزیم‌های ALT، AST و ALP شود (Barros et al., 2010; Bilen et al., 2017; Martins et al., 2017; Bilen et al., 2020). نتایج پژوهش حاضر نیز با این یافته‌ها همسو است؛ به‌طوری‌که مصرف عصاره گیاه پنیرک سبب کاهش معنی‌دار آنزیم‌های کبدی در مقایسه با تیمار دریافت‌کننده آرتمیا شد که بیانگر اثر محافظتی این گیاه بر بافت کبد است. نتایج پژوهش‌های اخیر نیز این موضوع را تأیید می‌کنند. Bilen و همکاران (۲۰۲۰c) نشان دادند که استفاده از عصاره آبی — متانولی پنیرک موجب بهبود عملکرد رشد، افزایش پاسخ‌های ایمنی و کاهش تنش فیزیولوژیک در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان شد. همچنین Bilen و همکاران (۲۰۲۰b) گزارش کردند که استفاده از عصاره Melissa officinalis موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش آسیب‌های اکسیداتیو در بافت‌های ماهی گردید که می‌تواند مکانیسم مشابهی با اثرات مشاهده‌شده برای گیاه پنیرک داشته باشد. در تحقیق حاضر، استفاده از عصاره گیاه پنیرک تأثیر معنی داری بر تغییر میزان آنزیم های کبدی (ALT، AST و ALP) داشت ( $P < 0.05$ ). استفاده از آرتمیا در تغذیه ماهی گورخری، افزایش میزان آنزیم های کبدی در مقایسه با جیره تجاری پایه را در پی داشت ( $P < 0.05$ ) اما استفاده از عصاره گیاه پنیرک بر کاهش میزان آنزیم های کبدی موثر بود و افزایش میزان دوز مصرفی عصاره پنیرک، سبب کاهش معنی دار هر سه نوع آنزیم کبدی گردید.

در تحقیقات انجام شده توسط سایر محققین مشخص شد که استفاده از پودر سیر در غذای ماهی *Huso huso* باعث کاهش آنزیم ALT و ALP در مقایسه با گروه شاهد می گردد. پودر سیر به دلیل دارا بودن ترکیبات فعال زیستی آلیسین باعث تحریک سیستم ایمنی می شود و مصرف آن از پراکسیداسیون لیپید غشاهای سلولی جلوگیری کرده و مانع از انتشار آنزیم های ALP و ALT در پلاسما می شود (Gholipour Kanani et al., 2014). نتایج تحقیقات Binaii و همکاران نشان داد که استفاده از سطوح مختلف گیاه گزنه در جیره (*Huso huso*) جوان

تأثیر معنی داری در شاخص‌های ALT، AST و ALP نداشته است (Binaii et al., 2014). همچنین استفاده از زردچوبه در این تحقیق باعث کاهش سطح آنزیم‌های AST و ALP شد (Chukwu et al., 2015).

گیاهان دارای ترکیباتی چون آلکالوئیدها، فلوپاتانین، تانن، ترپنویید، گلیکوزید (Sahren et al., 2011) و فلاونوئید هستند که می‌توانند از طریق فعالیت آنتی‌اکسیدانی (Islam et al., 2012) خود باعث حفظ ثبات و پایداری غشا سلول شوند و آسیب وارده به بافت را بهبود بخشند (Ezhilarasan et al., 2012). مشخص شده که گیاه پنیرک حاوی ترکیباتی همچون انواع اسیدهای چرب مانند لینولینیک اسید، لینولئیک اسید، پالمیتیک اسید (Tbaraki et al., 2012) و اولئیک اسید، عناصر معدنی، فلاونوئیدها، کاروتنوئیدها، آلکالوئیدها، موسیلاژ، تانن، لوکوآنتوسیانین، آنتوسیانین (Salehi Sarmughi, 2006)، ترکیباتی فنولی و ۲-متوکسی - ۴-ونیل فنل است که این ترکیبات به دلیل نقشی که در افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی دارند، دارای خاصیت جذب رادیکال‌های آزاد و اثر آنتی‌اکسیدانی هستند (Tbaraki et al., 2002). Barros et al., 2010 و تروهید و همکاران، ۱۳۹۴) و از این رو می‌تواند از تخریب بافت کبد و نهایتاً افزایش آنزیم‌های کبدی در خون پیشگیری نماید. علاوه بر این، مطالعات جدید نشان داده‌اند که ترکیبات فنولی گیاهان دارویی از طریق کاهش تولید گونه‌های فعال اکسیژن، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با پاسخ ایمنی، نقش مهمی در حفظ سلامت کبد و بهبود عملکرد متابولیکی آبزیان دارند (Gupta et al., 2021; Ahmadifar et al., 2021).

بیشترین میزان بیان ژن‌های FOXO، INFY، اینترلوکین، TNF-a، STAT 3، SREBF1 و PPAR alpha در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی آرتمیا و ۰/۱٪ عصاره پنیرک مشاهده شد ( $P < 0.05$ ) اما با افزایش میزان دوز مصرفی عصاره پنیرک در غذای گورخر ماهی، میزان بیان این ژن‌ها کاهش یافت. به نظر می‌رسد که افزودن آرتمیا به جیره غذایی سبب بهبود معنی دار و افزایش بیان ژن‌های FOXO، INFY، اینترلوکین، TNF-a، STAT 3، SREBF1 و PPAR alpha می‌گردد و افزودن ۰/۱٪ عصاره پنیرک تأثیر نامطلوبی بر بیان ژن‌های مذکور ندارد بلکه بیان این ژن‌ها را در بالاترین سطح خود نگه می‌دارد. با این حال افزایش دوز مصرفی این عصاره، سبب کاهش بیان ژن‌های مذکور می‌شود. مطابق با نتایج تحقیق حاضر در مطالعات دیگری نیز مشخص شد که استفاده از دوزهای بالاتر عصاره‌های گیاهی سبب کاهش بیان برخی از ژن‌ها می‌گردد (Ahmadifar et al., 2021; Liu et al., 2020b).

بیان ژن‌های فرآیندی است که به وسیله آن اطلاعات ذخیره شده در DNA، ساختار RNA و پروتئین‌ها را معلوم ساخته و میزان آگاهی را نسبت به فرآیند‌های بیولوژیک افزایش می‌دهد. در واقع هدف از بررسی بیان ژن در سطح mRNA، بررسی وجود رونوشت مربوط به ژن در نمونه و تعیین مقدار این رونوشت است (Albert et al., 2014).

مطالعات نشان داده است که فعال شدن نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها به استرس اکسیداتیو و هم‌چنین انتشار سیتوکین‌های التهابی از جمله IL-6، IL-1 $\beta$  و TNF- $\alpha$  کمک کرده و منجر به کاهش ترشح انسولین، استاتوز کبدی و یک سری اختلالات متابولیک در دیابت می‌شود (Festa et al., 2000). عدم تعادل در تولید و ترشح سایتوکاین‌های التهابی و مهارتی، از جمله عوامل پیش‌برنده التهاب در دیابت می‌باشد (Donath and Shoenfeld, 2011).

سایتوکین‌ها خانواده‌ای از پروتئین‌ها هستند که واسطه پاسخ‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی هستند و توسط سلول‌های مختلفی تولید و ترشح می‌گردند. هر سایتوکین اغلب بر نوع خاصی از سلول‌ها تأثیر می‌گذارد و پاسخ التهابی نیز به وسیله سایتوکین انجام شده و بخش مهمی از پاسخ ایمنی سلولی در ماهی می‌باشد.

سایتوکین‌ها دارای گیرنده‌هایی بر سلول‌های هدف بوده و با اتصال به گیرنده، اثر خود را بر سلول القاء می‌کنند. در سیستم ایمنی ماهی‌ها و در ارتباط با التهابات مولکول سایتوکینی فاکتور نکروزکننده تومور (TNF)، نقش مهمی دارد که به دنبال تحریک سیستم ایمنی از گلبول‌های سفید ترشح می‌شود (Grayfer et al., 2008).

سایتوکین ها به چند خانواده از جمله اینترلوکین و TNF (فاکتور نکروز کننده تومور) طبقه بندی می شوند. اینترلوکین و TNF- $\alpha$  از سایتوکین های مهم مکانیسم دفاعی میزبان در پاسخ به استقرار یا حمله عوامل بیماریزا هستند (عبدالمنافی، ۱۳۹۹، Qin *et al.*, 2001). اینترلوکین ها، سایتوکین هایی می باشند که از لکوسیت ترشح و بین سایر لکوسیت ها اثر می کند (Corripio-Miyar *et al.*, 2007)

غلظت بالای گلوکز منجر به فرآیند گلیکولاسیون پروتئین و تولید محصولات نهایی گلیکوز پیشرفته (AGEs) می شود. در نتیجه، تجمع AGEs، NF-KB را برای القاء بیان TNF- $\alpha$  که منجر به التهاب مزمن می شود، فعال می کند (Morey *et al.*, 2019).

از این رو مشاهده روند کاهشی در سطح TNF- $\alpha$  در تحقیق حاضر در تیمارهای دریافت کننده عصاره گیاه پنیرک در مقایسه با تیمار تغذیه شده با آرتیمیا، نشان دهنده ی اثر موثر گیاه پنیرک در کنترل قند خون و عدم افزایش میزان TNF- $\alpha$  است. همچنین TNF- $\alpha$  سبب اختلال در مسیر پیام رسانی انسولین از راه کاهش فعالیت کینازی گیرنده ی انسولین و یا افزایش فسفریلاسیون سرین در گیرنده انسولین IRS-1 (Insulin receptor substrate) می گردد (Robison, 2008; Gonzalez *et al.*, 2009).

TNF- $\alpha$  یکی از سایتوکین های التهابی اولیه است که در طول التهاب ترشح می شود (Zou and Secombes, 2016) و برای تکثیر سریع سلولی و تمایز و تحریک سایر سایتوکین ها مهم است (Wie *et al.*, 2009) و در عملکرد سیستم ایمنی ماهی نیز نقش فعالی دارد (Akash *et al.*, 2018).

بررسی های مختلف نشان دادند که گیاهان دارویی مشخصات ژن ایمنی را در گونه های مختلف ماهی تعدیل می کنند (Gupta *et al.*, 2021). طی مطالعات مختلفی در رابطه با تاثیر گیاهان دارویی بر ماهیان، مشخص شده است که افزایش TNF- $\alpha$  در ماهی، بهبود عملکرد سیستم ایمنی را در پی داشته است (Ahmadifar *et al.*, 2021; liu *et al.*, 2020a; Mansour, 2020; Abdellatif *et al.*, 2018; Yilmaz and Ergün, 2018). تاثیر گیاهان دارویی بر ایمنی ماهی با توجه به گونه ماهی، گونه گیاه، میزان و شیوه مصرف و بسیاری عوامل دیگر متفاوت است (Gupta *et al.*, 2021).

در تحقیق حاضر بیشترین میزان TNF- $\alpha$  از بین تیمارهای دریافت کننده ی عصاره پنیرک، در تیمار ۰/۱ درصد عصاره گیاه پنیرک مشاهده شد. به نظر می رسد همین دوز می تواند تا حدی کارایی سیستم ایمنی را در ماهی گورخری افزایش دهد.

PPAR- $\alpha$  فاکتور رونویسی فعال شده با لیپید است که با فعال شدن توسط فیبرات ها، گلیتازون ها و لیگاندهای مربوطه، ژن های دخیل در متابولیسم لیپید و گلوکز، تمایز سلولی و کنترل التهاب را تنظیم می کند. PPAR- $\alpha$  به تنظیم بیان ژن های دخیل در بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب می پردازد و تنظیم کننده اصلی هموستاز انرژی است.

در بررسی انجام شده توسط Zou و همکاران (۲۰۱۹)، مشخص شد که استفاده از گیاه رازیانه (*Radix bupleuri*) به میزان ۲۰۰-۸۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم غذای در ماهی هامور هیبرید (*Epinephelus lanceolatus* × *Epinephelus fuscoguttatus*)، باعث افزایش بیان ژن های مرتبط با لیپولیز از جمله PPAR- $\alpha$  در کبد می شود (Zou *et al.*, 2019).

SREBF1 یا ژن فاکتور ۱ رونویسی اتصال دهنده عنصر تنظیم کننده استرول، یک فاکتور رونویسی را کد می کند که تنظیم کننده اصلی متابولیسم چربی (پروتئین ۱-متصل به عنصر تنظیم کننده استرول) است. ژن SREBF1 در بافت های متعددی از جمله کبد، بافت چربی سفید و قهوه ای، غده فوق کلیوی و به میزان کمتری در سلول بتا پانکراس بیان می شود. انسولین بیان ژن SREBF1 را در بافت چربی، کبد و سلول های ماهیچه ای القا می کند. بیان ژن SREBF1 با رژیم غذایی تنظیم می شود. به عنوان مثال، یک اثر مستقل از انسولین با مصرف انواع مختلف قند مانند گلوکز، فروکتوز و ساکارز در القای بیان ژن SREBF1 نشان داده شده است.

در واقع زمانی که قند خون بسیار بالا است، میزان بیشتری هورمون انسولین ترشح می شود. مکانیسم تنظیم قند خون با انسولین به این صورت است که سلول ها برای داشتن انرژی به گلوکز نیاز دارند و بسیاری از آن ها بدون کمک انسولین، قادر به استفاده از گلوکز نیستند. انسولین اجازه ورود گلوکز به سلول ها را می دهد. انسولین گیرنده های سطح سلول متصل شده و سبب فعال شدن جذب سلول ها به انسولین می گردد.

در تحقیق حاضر، کاهش بیان این ژن با افزایش مصرف عصاره پنیرک نشان دهنده ی اثر موثر عصاره گیاه پنیرک بر کاهش قند خون و انسولین است و نشان می دهد که استفاده از گیاه پنیرک سبب کنترل قند خون می گردد. طی بررسی انجام شده توسط *Tainaka* و همکاران (۲۰۱۱)، مشخص شد که استفاده از گیاه گوجه فرنگی کامپاری در رژیم غذایی گورخرماهی چاق شده (که میزان تری گلیسرید و قطرات چربی در کبد آن افزایش یافته بود)، سبب کاهش *SREBF1 mRNA* از طریق افزایش بیان ژن *FOXO1* گردید. محققین مربوطه دلیل این امر را به محتوای بالای بتاکاروتن در گوجه فرنگی نسبت دادند (*Tainaka et al., 2011*).

گزارش شده است که رسوراترول، پلی فنول موجود در بادام زمینی و انگور، کبد چرب الکلی را با مهار بیان *Srebfl* از طریق مسیر سیگنالینگ *Foxo1* کاهش می دهد (*Tainaka et al., 2011*).

پروتئین های *FOXO* نقش مهمی در تنظیم طول عمر دارند. علاوه بر این، پروتئین های *FOXO 18* نیز در پاسخ های ایمنی نقش دارند. پروتئین *STAT3* در بافت های سراسر بدن فعال است. نقش مهمی در رشد و عملکرد چندین سیستم بدن دارد و برای زندگی ضروری است. در سیستم ایمنی، پروتئین *STAT3* سیگنال هایی را برای بلوغ سلول های سیستم ایمنی، به ویژه سلول های *T* و سلول های *B* ارسال می کند. پنیرک، از نظر ترکیب شیمیایی منبعی غنی از ویتامین هاست. ویتامین های *A*، *B* و *C* باعث افزایش ایمنی و مقاومت در برابر بیماری ها می شوند. در برگ های پنیرک مواد سودمندی همچون آنتی اکسیدان های قوی نظیر فنل، فلاونوئید، کاروتنوئید، توکوفرول و اسیدهای چرب اشباع نشده همچون لینولئیک، لینولنیک و اسید پالمیتیک وجود دارد (*Shale et al., 2005*). همچنین در مطالعات متعدد تکرار شده که عصاره گیاه پنیرک دارای ترکیباتی همچون موسیلاژ، فلاونوئیدها، تانن، ترکیبات فنولی، اسید اسکوربیک، توکوفرول های کاروتنوئیدی و آنتوسیانین هاست (*Cui-lin and Zhen-ya, 2006; Barros et al., 2010; Gasparetto et al., 2011*) که دارای اثرات آنتی اکسیدانی هستند و در بهبود وضعیت سلامت ماهی بسیار موثر عمل می نمایند (*Afifi et al., 2016*).

نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن عصاره هیدروالکلی پنیرک (*Malva sylvestris*) به جیره غذایی ماهی گورخری می تواند بر شاخص های فیزیولوژیک و مولکولی مورد بررسی اثرگذار باشد. استفاده از ناپلی آرتمیا در جیره غذایی با افزایش قند خون و فعالیت آنزیم های کبدی همراه بود، در حالی که افزودن عصاره پنیرک توانست این تغییرات را به صورت وابسته به دوز کاهش دهد. با افزایش سطح عصاره پنیرک از ۱/۰ به ۵/۰ درصد، کاهش معنی داری در میزان قند خون و آنزیم های کبدی مشاهده شد و در میان سطوح مورد بررسی، تیمار حاوی ۱ درصد عصاره پنیرک مؤثرترین تیمار از نظر کنترل قند خون و کاهش آنزیم های کبدی بود. همچنین، افزایش سطح عصاره موجب تغییر معنی دار در بیان ژن های مورد مطالعه شد. بر اساس نتایج حاصل، سطح ۱ درصد عصاره هیدروالکلی پنیرک در شرایط این آزمایش مناسب ترین سطح مورد بررسی برای بهبود شاخص های فیزیولوژیک ارزیابی شده در ماهی گورخری بود؛ با این حال، تعیین سطح بهینه نهایی نیازمند بررسی سطوح دوزی بیشتر و ارزیابی همزمان شاخص های رشد، ایمنی، متابولیسم و سلامت بافتی است.

## References

۱. عبدالمنافی، م.، شعبانی، ع. و صفری، ر. ۱۳۹۹. تأثیر عصاره هیدروالکلی گیاه رازیانه (*Foeniculum vulgare*) بر شاخص های رشد و بقای هر دو جنس نر و ماده ماهی گورخری (*Danio rerio*). (۲)۱۱۳: ۱۳-۲۵.
۲. تروهید، س.ف.، میرازی، ن. و صریحی، ع. ۱۳۹۴. بررسی اثر محافظتی عصاره هیدروالکلی برگ پنیرک (*Malva neglecta* L.) بر آسیب کبدی القا شده توسط تتراکلرید کربن در موش های صحرایی نر. مجله سلول و بافت، ۱۶(۱): ۳۱-۴۲.
۳. صفری، ر.، واحدی امیری، ف.، شعبانی، ع.، حسینی فر، س.ح. و کلنگی میاندره، ح. ۱۳۹۷. اثرات عصاره هیدروالکلی گیاه آنغوزه (*Ferula assafoetida*) در جیره غذایی بر بیان ژن های مرتبط با ایمنی ( $TNF-\alpha$ ) و  $IL-1\beta$  در ماهی گورخری (*Danio rerio*). فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری، ۱۱(۳): ۵۵-۶۶.
۴. صمصام شریعت، ه. ۱۳۸۶. عصاره گیری و استخراج مواد مؤثره گیاهان دارویی و روش های شناسایی و ارزشیابی آنها. انتشارات اصفهان.

۵. طاهانژاد، م.، برزگر، م.، سحری، م. و نقدیادی، ح. ۱۳۹۱. ارزیابی فعالیت آنتی‌رادیکالی و کاربرد عصاره پنیرک (*Malva sylvestris*) در سامانه روغن. فصلنامه گیاهان دارویی، ۱۱(۲): ۸۶-۹۷.

6. Abdellatief, S.A., Abdel Rahman, A.N. and Abdallah, F.D. 2018. Evaluation of immunostimulant activity of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) and sage (*Salvia officinalis*) in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Zagazig Veterinary Journal, 46: 25-36.
7. Affi, A.A.M. 2016. Use of ethanolic *Malva sylvestris* leaves extract as antimicrobial activity and immune stimulant in *Oreochromis niloticus*. Abbassa International Journal for Aquaculture, 9(2): 356-376.
8. Ahmadifar, E., Pourmohammadi Fallah, H., Yousefi, M., Dawood, M.A.O., Hoseinifar, S.H., Adineh, H., Yilmaz, S., Paolucci, M. and Van Doan, H. 2021. The gene regulatory roles of herbal extracts on the growth, immune system and reproduction of fish. Animals, 11: 2167.
9. Akash, M.S.H., Rehman, K. and Liaqat, A. 2018. Tumor necrosis factor-alpha: role in development of insulin resistance and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. Journal of Cellular Biochemistry, 119: 105-110.
10. Albert, F.W., Treusch, S., Shockley, A.H., Bloom, J.S. and Kruglyak, L. 2014. Genetics of single-cell protein abundance variation in large yeast populations. Nature, 506(7489): 494-504.
11. Almabrok, A.A., Amhamed, I.D., Mohamed, G.A., Bilen, S. and Altief, T.A.S. 2018. Effect of *Tilia tomentosa* methanolic extract on growth performance, digestive enzyme activity, immune system, and hematological indices of common carp (*Cyprinus carpio*). Marine Science and Technology Bulletin, 7(1): 16-60.
12. Altunoglu, Y.C., Bilen, S., Ulu, F. and Biswas, G. 2017. Immune responses to methanolic extract of black cumin (*Nigella sativa*) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish and Shellfish Immunology, 27: 103-109.
13. Barros, L., Carvalho, A.M. and Ferreira, I.C.F.R. 2010. Leaves, flowers, immature fruits and leafy flowered stems of *Malva sylvestris*: a comparative study of the nutraceutical potential and composition. Food and Chemical Toxicology, 48: 1466-1472.
14. Bhardwaj, S., Canlas, K., Kahi, C., Temkit, M., Molleston, J., Ober, M., Howenstine, M. and Kwo, P.Y. 2009. Hepatobiliary abnormalities and disease in cystic fibrosis: epidemiology and outcomes through adulthood. Journal of Clinical Gastroenterology, 43(9): 858-864.
15. Bilen, S., Filogh, A.M., Ali, A.B., Kenanoğlu, O.N. and Zoral, M.A. 2020a. Effect of common mallow (*Malva sylvestris*) dietary supplementation on growth performance, digestive enzyme activities, hematological and immune responses of common carp (*Cyprinus carpio*). Aquaculture International, 28: 477-489.
16. Bilen, S., Altief, T.A.S., Özdemir, K.Y., Salem, M.O.A., Terzi, E. and Guney, K. 2020b. Effect of lemon balm (*Melissa officinalis*) extract on growth performance, digestive and antioxidant enzyme activities, and immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Physiology and Biochemistry, 46: 471-481.
17. Bilen, S., Karga, M., Çelik Altunoğlu, Y., Ulu, F. and Biswas, G. 2020c. Immune responses and growth performance of the aqueous methanolic extract of *Malva sylvestris* in *Oncorhynchus mykiss*. Marine Science and Technology Bulletin, 9(2): 159-167.
18. Binaii, M., Ghiasi, M., Farabi Pourgholam, S.M., Fazli, R. and Safari, H. 2014. Biochemical and hemato-immunological parameters in juvenile beluga (*Huso huso*) following the diet supplemented with nettle (*Urtica dioica*). Fish and Shellfish Immunology, 36: 46-51.
19. Capiotti, K.M., Antonioli Junior, R., Kist, L.W., Bogo, M.R., Bonan, C.D. and Da Silva, R.S. 2014. Persistent impaired glucose metabolism in a zebrafish hyperglycemia model. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 171: 58-65.
20. Choi, Y.H., Lee, B.J. and Nam, T.J. 2014. Effect of dietary inclusion of *Pyropia yezoensis* extract on biochemical and immune responses of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquaculture, 435: 347-353.
21. Choudhary, D.K., Prakash, A. and Johri, B.N. 2007. Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. Indian Journal of Microbiology, 47: 289-297.
22. Chukwu, V.O., Akudike Chijioke, J., Ezejindu Damian, N. and Ihim Augustine, C. 2015. The protective effects of turmeric on liver enzymes of metronidazole-treated adult male Wistar rats. International Journal of Advances in Scientific Research, 1: 2395-3616.

23. Corripio-Miyar, Y., Bird, S., Tsamopoulos, K. and Secombes, C.J. 2007. Cloning and expression analysis of two pro-inflammatory cytokines, IL-1 $\beta$  and IL-8, in haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). Molecular Immunology, 44: 1361–1373.
24. Cui-Lin, C.H. and Zhen-Ya, W. 2006. Bacteriostatic activity of anthocyanin of *Malva sylvestris*. Journal of Forestry Research, 17(1): 83–85.
25. Donath, M.Y. and Shoelson, S.E. 2011. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. Nature Reviews Immunology, 11(2): 98–107.
26. Eames, S.C., Philipson, L.H., Prince, V.E. and Kinkel, M.D. 2010. Blood sugar measurement in zebrafish reveals dynamics of glucose homeostasis. Zebrafish, 7(2): 205–213.
27. Ezhilarasan, D., Karthikeyan, S. and Vivekanandan, P. 2012. Ameliorative effect of silibinin against N-nitrosodimethylamine-induced hepatic fibrosis in rats. Environmental Toxicology and Pharmacology, 34: 1004–1011.
28. Festa, A., D'Agostino, R. Jr., Howard, G., Mykkanen, L., Tracy, R.P. and Haffner, S.M. 2000. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the insulin resistance atherosclerosis study (IRAS). Circulation, 102(1): 42–47.
29. Gasparetto, J.C., Ferreira Martins, C.A., Hayashi, S.S., Otuky, M.F. and Pontarolo, R. 2012. Ethnobotanical and scientific aspects of *Malva sylvestris* L.: a millennial herbal medicine. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 64: 172–189.
30. Gholipour Kanani, H., Nobahar, Z., Kakoolaki, S. and Jafarian, H. 2014. Effect of ginger- and garlic-supplemented diet on growth performance, some hematological parameters and immune responses in juvenile *Huso huso*. Fish Physiology and Biochemistry, 40: 481–490.
31. Gleeson, M., Connaughton, V. and Arneson, L.S. 2007. Induction of hyperglycaemia in zebrafish (*Danio rerio*) leads to morphological changes in the retina. Acta Diabetologica, 44: 157–163.
32. Grayfer, L., Walsh, J.G. and Belosevic, M. 2008. Characterization and functional analysis of goldfish (*Carassius auratus* L.) tumor necrosis factor- $\alpha$ . Developmental and Comparative Immunology, 32: 532–543.
33. Gupta, N., Kar, S.R. and Chakraborty, A. 2021. A review on medicinal plants and immune status of fish. Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries, 25(2): 897–912.
34. Islam, M., Parvin, M. and Islam, M. 2012. Antioxidant and hepatoprotective activity of an ethanol extract of *Syzygium jambos* (L.) leaves. Drug Discoveries and Therapeutics, 6(4): 205–211.
35. Ko, J.H., Nam, Y.H., Joo, S.W., Kim, H.G., Lee, Y.G., Kang, T.H. and Baek, N.I. 2018a. Flavonoid 8-O-glucuronides from the aerial parts of *Malva verticillata* and their recovery effects on alloxan-induced pancreatic islets in zebrafish. Molecules, 23: 833.
36. Ko, J.H., Cho, S.M., Joo, S.W., Kim, H.G., Lee, Y.G., Kang, S.C. and Baek, N.I. 2018b. Glycosyl glycerides from the aerial parts of *Malva verticillata* and their chemopreventive effects. Bioorganic Chemistry, 78: 381–392.
37. Ko, J.H., Castaneda, R., Joo, S.W., Kim, H.G., Lee, Y.G., Lee, Y.H., Kang, T.H. and Baek, N.I. 2018c. Glycerides isolated from the aerial parts of *Malva verticillata* cause immunomodulation effects via splenocyte function and NK anti-tumor activity. Food Science and Biotechnology.
38. Ko, J.H., Nuankaew, W., Joo, S.W., Kim, H.G., Thi, N.N., Lee, Y.G., Kang, T.H. and Baek, N.I. 2018d. Phenolic compounds from the aerial parts of *Malva verticillata* and their anti-diabetic effect. Natural Product Communications, 13(7): 861–864.
39. Lenzen, S. 2008. Oxidative stress: the vulnerable beta-cell. Biochemical Society Transactions, 36: 343–347.
40. Liu, C., Chan, C.B. and Ye, K. 2016. 7,8-Dihydroxyflavone, a small molecular TrkB agonist, is useful for treating various BDNF-implicated human disorders. Translational Neurodegeneration, 5: 2–9.
41. Liu, Y.L., Zhong, L., Chen, T., Shi, Y., Hu, Y., Zeng, J.G., Liu, H.Y. and Xu, S.D. 2020a. Dietary sanguinarine supplementation on the growth performance, immunity and intestinal health of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fed cottonseed and rapeseed meal diets. Aquaculture, 528: 735521.
42. Liu, F., Geng, C., Qu, Y.K., Cheng, B.X., Zhang, Y., Wang, A.M., Zhang, J.H., Liu, B., Tian, H.Y. and Yang, W.P. 2020b. The feeding of dietary *Codonopsis pilosula* polysaccharide enhances the immune responses, the

- expression of immune-related genes and the growth performance of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). Fish and Shellfish Immunology, 103: 321–331.
43. Mansour, A.T., Espinosa, C., García-Beltrán, J.M., Miao, L., Francisco, D.C.C., Alsaqufi, A.S. and Esteban, M.Á. 2020. Dietary supplementation of drumstick tree, *Moringa oleifera*, improves mucosal immune response in skin and gills of seabream (*Sparus aurata*) and attenuates the effect of hydrogen peroxide exposure. Fish Physiology and Biochemistry, 46: 1–16.
  44. Martins, C.A.F., Campos, M.L., Irioda, A.C., Stremel, D.P., Trindade, A.C.L.B. and Pontarolo, R. 2017. Anti-inflammatory effect of *Malva sylvestris*, *Sida cordifolia*, and *Pelargonium graveolens* is related to the inhibition of prostanoid production. Molecules, 22(11): 1883.
  45. Mokhtari, M., Shariati, M. and Khodaparast, L. 2008. Hepatoprotective effect of *Mentha pulegium* hydroethanolic leaf extract in rats. Journal of Medical University of Sabzevar, 15(2): 73–78.
  46. Morey, M., O'Gaora, P., Pandit, A. and Helary, C. 2019. Hyperglycemia acts in synergy with hypoxia to maintain the pro-inflammatory phenotype of macrophages. PLoS ONE, 14(8): e0220577.
  47. Oka, T., Nishimura, Y., Zang, L., Hirano, M., Shimada, Y., Wang, Z., Umemoto, N., Kuroyanagi, J., Nishimura, N. and Tanaka, T. 2010. Diet-induced obesity in zebrafish shares common pathophysiological pathways with mammalian obesity. BMC Physiology, 10: 21.
  48. Petersen, K.F. and Shulman, G.I. 2006. Etiology of insulin resistance. American Journal of Medicine, 119(5): S10–S16.
  49. Qin, Q.W., Ototake, M., Noguchi, K., Soma, G.I., Yokomizo, Y. and Nakanishi, T. 2001. Tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ )-like factor produced by macrophages in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish and Shellfish Immunology, 11: 245–256.
  50. Robison, B.D., Drew, R.E., Murdoch, G.K., Powell, M., Rodnick, K.J. and Settles, M. 2008. Sexual dimorphism in hepatic gene expression and the response to dietary carbohydrate manipulation in the zebrafish (*Danio rerio*). Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics, 3: 141–154.
  51. Safari, R., Hoseinifar, S.H., Nejadmoghadam, S. and Jafar, A. 2016. Transcriptomic study of mucosal immune, antioxidant and growth-related genes and non-specific immune response of common carp (*Cyprinus carpio*) fed dietary *Ferula assafoetida*. Fish and Shellfish Immunology, 55: 646–648.
  52. Sahreen, S., Khan, M. and Khan, R. 2011. Hepatoprotective effects of methanol extract of *Carissa opaca* leaves on CCl<sub>4</sub>-induced damage in rat. BMC Complementary and Alternative Medicine, 11: 48.
  53. Salehi Surmaghi, M. 2006. Medical Plants. Donyay-e Taghzieh Publications, Tehran.
  54. Sangwan, V., Tomar, S.K., Ali, B., Singh, R.R. and Singh, A.K. 2015. Hypoglycaemic effect of galactooligosaccharides in alloxan-induced diabetic rats. Journal of Dairy Research, 82: 70–77.
  55. Shale, T.L., Stirk, W.A. and Van Staden, J. 2005. Variation in the antibacterial and anti-inflammatory activity of different growth forms of *Malva parviflora* and evidence for synergism of the anti-inflammatory compounds. Journal of Ethnopharmacology, 96(1–2): 325–330.
  56. Spence, R., Fatema, M., Ellis, S., Ahmed, Z. and Smith, C. 2007. Diet, growth, and recruitment of wild zebrafish in Bangladesh. Journal of Fish Biology, 71: 304–309.
  57. Stumvoll, M., Goldstein, B.J. and van Haeften, T.W. 2005. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. Lancet, 365: 1333–1346.
  58. Tabaraki, R., Yousefi, Z. and Asadi Gharneh, H. 2002. Chemical compounds and antioxidant effect of *Malva neglecta*. Journal of Research in Agricultural Science, 86(1): 58–59.
  59. Tabaraki, R., Yousefi, Z. and Asadi Gharneh, H. 2012. The study of compound and antioxidant properties of *Malva sylvestris*. Journal of Research in Agricultural Science, 86(1): 59–68.
  60. Tabassum, N., Tai, H., Jung, D.W. and Williams, D.R. 2015. Fishing for nature's hits: establishment of the zebrafish as a model for screening antidiabetic natural products. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Article ID 287847.
  61. Tainaka, T., Shimada, Y., Kuroyanagi, J., Zang, L., Oka, T., Nishimura, Y., Nishimura, N. and Tanaka, T. 2011. Transcriptome analysis of anti-fatty liver action by Campari tomato using a zebrafish diet-induced obesity model. Nutrition & Metabolism, 8: 88.

62. Thomas, L. 1998. Alanine aminotransferase (ALT). Aspartate aminotransferase (AST). In: Thomas, L. (Ed.), Clinical Laboratory Diagnostics. 1st ed. TH-Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt, pp. 55–65.
63. Tseng, Y.C., Chen, R.D., Lee, J.R., Liu, S.T., Lee, S.J. and Hwang, P.P. 2009. Specific expression and regulation of glucose transporters in zebrafish ionocytes. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 297: R275–R290.
64. Wei, L., Sun, B., Chang, M., Liu, Y. and Nie, P. 2009. Effects of cyanobacterial toxin microcystin-LR on the transcription levels of immune-related genes in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Environmental Biology of Fishes, 85: 231–238.
65. Westerfield, M. 2007. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*). University of Oregon Press.
66. Yılmaz, S. and Ergün, S. 2018. Trans-cinnamic acid application for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): I. Effects on hematological, serum biochemical, non-specific immune and head kidney gene expression responses. Fish & Shellfish Immunology, 78: 140–157.
67. Zamannejad, N., Emadi, H. and Hafezieh, M. 2016. Effects of supplementation of algae (*Sargassum ilicifolium*) on growth, survival and body composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Iranian Journal of Fisheries Sciences, 15: 194–205.
68. Zang, L., Shimada, Y. and Nishimura, N. 2017. Development of a novel zebrafish model for type 2 diabetes mellitus. Scientific Reports, 7: 1461.
69. Zon, L.I. and Peterson, R.T. 2005. *In vivo* drug discovery in the zebrafish. Nature Reviews Drug Discovery, 4(1): 35–44.
70. Zou, J. and Secombes, C.J. 2016. The function of fish cytokines. Biology, 5: 23.